

Curso 2006/07
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/5
I.S.B.N.: 978-84-7756-739-4

ELYN CALVIÑO PÉREZ

**Determinación de H₂ gas disuelto en orina.
Una herramienta útil para el diagnóstico
de patologías gastrointestinales**

Directores

**MIGUEL ÁNGEL ESTESO DÍAZ
RAQUEL RODRÍGUEZ RAPOSO**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Agradecimientos

Mi más sincera gratitud, a los profesores Dr. Miguel Angel Esteso Díaz y Dra. Raquel Rodríguez Raposo, directores de esta Tesis Doctoral. Al profesor M. Esteso por permitirme realizar esta Tesis y poder compartir sus inestimables conocimientos y experiencias. A la profesora Raquel por su trabajo constante, por lo que cada día me ha enseñado y por el enorme entusiasmo y dedicación mostrada, a lo largo de estos años.

Al profesor J. Podestá, porque han sido sus ideas y proyectos la base de este trabajo y por facilitarnos el diseño y desarrollo del sensor potenciométrico, para los inicios de esta Tesis.

A los doctores D. Eduardo Domenech Martínez y D. Honorio de Armas, y a la ATS Dña. Ana Delia Rodríguez Brito por la información suministrada y la colaboración prestada en las investigaciones que propiciaron el comienzo de este trabajo.

Al profesor Enrique Meléndez Hevia, por el infinito tiempo y paciencia, además de los cuantiosos recursos aportados, para poder terminar esta Tesis Doctoral.

Al Instituto del Metabolismo Celular y a todo el personal científico técnico, por el interés y el apoyo prestado.

A mi hija Lucia, por la dulzura que me da cada día. A mi esposo por el apoyo que siempre me ha dado sin perder su mejor sonrisa, y a mi familia porque la distancia no ha sido impedimento para que sigan dejando, su huella en cada pedazo de mi formación.

Agradecer a todos mis amigos y personas anónimas que han prestado su ayuda en este trabajo, y a los compañeros del Departamento de Química Física.

Por último señalar, que para la realización de esta Tesis Doctoral he disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (2001-2004).

La Laguna, 22 de Septiembre de 2006

Índice

Índice general

1. Introducción	1
2. Fundamento teórico	
2.1 Absorción intestinal de carbohidratos	12
2.2 Flora bacteriana intestinal	14
2.2.1 Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	18
2.2.2 Género <i>Clostridium</i>	19
2.3 Función Renal. El Riñon	20
2.3.1 Formación y Composición de la orina	24
a) Filtración glomerular	25
b) Reabsorción selectiva	27
b.1) Función Tubular	27
b.2) Túbulo proximal	27
b.3) Asa de Henle	28
b.4) Túbulo distal	29
c) Secreción selectiva	29
c.1) En el Túbulo proximal	29
c.2) En el Túbulo Distal	30
2.4 Hidrógeno metabólico en el ser humano	30
2.4.1 Producción anaerobia del hidrógeno	30
a) Fermentación de las Enterobacterias	30
a.1) Fermentación ácido mixta	31
a.2) Fermentación butanodiólica	33
b) Fermentación de los clostridios	35
2.4.2 Vías de excreción del hidrógeno	36
2.5 Trastornos gastrointestinales acompañados de producción de H ₂	39
2.5.1 Intolerancia a la lactosa	39

2.5.2 Infecciones intestinales	42
2.6 Determinación de hidrógeno biológico	44
2.6.1 Revisión de los diferentes métodos clínicos actuales	44
2.6.2 Método utilizado en el Hospital Universitario de Canarias	47
2.7 Determinación de hidrógeno biológico en orina. Una propuesta alternativa	53
2.8 Sensores sólidos de gases	55
2.8.1 Sensores de electrólito sólido polimérico	56
a) Métodos de preparación de los spe y sus características	58
b) Principales diseños y sus aplicaciones	59
2.9 Pilas de Combustible	62
2.10 Ecuación de Nernst	63
2.11 Termodinámica de las disoluciones de gases en líquidos	65
2.11.1 Disolución ideal y disolución diluida ideal	65
2.11.2 Disoluciones de gases en líquidos	68
2.12 Cálculo de la concentración de hidrógeno disuelto	73
2.13 Determinación experimental de la concentración del H ₂ disuelto.....	75

3. Parte experimental

3.1 Diseño del burbujeador. Método de saturación	80
3.2 Control de las variables de medida	81
3.2.1 Temperatura	81
3.2.2 Presión ambiental. Calibrado del barómetro	82
3.3 Medidas con un sensor potenciométrico de hidrógeno	84
3.3.1 Diseño y funcionamiento del sensor potenciométrico	84
3.3.2 Diseño y funcionamiento de la célula de medida	87
3.3.3 Determinación de la humedad relativa	88
3.3.4 Medida del potencial eléctrico. Registro de datos	89
a) Multivoltímetro digital	89
b) Equipo informático	92

3.4 Medidas con un sensor amperométrico de hidrógeno	92
3.4.1 Diseño y funcionamiento del sensor amperométrico	92
3.4.2 Célula de medida	95
3.4.3 Medida de la corriente eléctrica	96
3.4.4 Registro de datos	97
3.5 Métodos operatorios	98
3.5.1 Descripción de un experimento típico con muestras de agua que contienen hidrógeno burbujeado	98
a) Medida potenciométrica	98
b) Medida amperométrica	101
3.5.2 Descripción de un experimento típico con muestras de orina que contienen hidrógeno biológico	104

4. Resultados y discusión

4.1 Medidas de H ₂ disuelto en agua, usando un sensor potenciométrico.....	108
4.1.1 Volumen de muestra	108
4.1.2 Tiempo de saturación con H ₂	111
4.1.3 Influencia de la presión atmosférica sobre el sensor spe	113
4.1.4 Grado de humedad relativa de la membrana polimérica	116
4.1.5 Curva de Calibración	124
4.1.5.1 Cálculo de la presión parcial del hidrógeno en el interior de la célula de medida	135
4.2 Medidas del hidrógeno disuelto en agua, usando un sensor amperométrico. Electrodo de <i>Unisense</i> [®]	137
4.2.1 Variables experimentales. Volumen de muestra	137
4.2.2 Tiempo de saturación con H ₂	138
4.2.3 Influencia de la presión atmosférica	138
4.2.4 Humedad relativa de almacenamiento	138
4.2.5 Curva de Calibración	139
4.3 Determinación del Coeficiente de Bunsen del hidrógeno	144

4.3.1 Coeficiente de Bunsen del hidrógeno en disoluciones acuosas	145
a) Medida Potenciométrica	146
b) Medida Amperométrica	148
4.3.2 Coeficiente de Bunsen del hidrógeno en orina	153
4.3.3 Curva de calibración de hidrógeno disuelto en orina	156
4.4 Detección de hidrógeno biológico disuelto en orina	158
4.4.1 Medida de hidrógeno disuelto en la orina de sujetos sanos	159
a) Tras la ingesta de lactosa	159
b) Tras la ingesta de lactulosa	164
4.4.2 Medidas con orinas de sujetos que presentan alguna patología gastrointestinal	166
a) Intolerantes a la lactosa	166
b) Infección intestinal	168
4.5 Acumulación del hidrógeno en orina	170
4.6 Importancia de la dieta sin carbohidratos antes del análisis	172
4.7 Propuesta de un protocolo alternativo como herramienta útil para el diagnóstico de ciertas patologías gastrointestinales	173
a) Período de dieta	173
b) Recogida de la muestra	174
5. Resumen y conclusiones	176
6. Bibliografía	181
7. Apéndice	185

Índice de figuras

2. Fundamento teórico

2.1 Principales subdivisiones anatómicas del intestino grueso humano	12
2.2 Flora intestinal típica del tracto gastrointestinal de los seres humanos	16
2.3 Esquema de la estructura del Sistema Urinario	20
2.4 Representación esquemática del riñón de un ser humano	22
2.5 Representación esquemática de los procesos que ocurren en la nefrona durante la formación de la orina	25
2.6 Esquema de las rutas metabólicas correspondientes a la fermentación ácido mixta, con indicación de los productos finales.....	32
2.7 Esquema de las rutas metabólicas de la fermentación butanodiólica y productos finales obtenidos.....	34
2.8 Esquema metabólico de la fermentación de azúcares por las bacterias del ácido butírico del género <i>Clostridium</i> , con indicación de sus productos finales	36
2.9 Sinergismo entre la producción de hidrógeno de una enterobacteria y su consumo por una bacteria metanogénica	38
2.10 Formación de ácido acético por las bacterias acetogénicas del grupo del ácido butírico del género <i>Clostridium</i> , a partir de CO ₂ y H ₂ producidos en sus propios procesos de fermentación.....	38
2.11 Ciclo del hidrógeno en las bacterias reductoras del azufre	39
2.12 Estructuras del disacárido de la leche y de los monosacáridos, productos de su hidrólisis por acción de la enzima β-galactosidasa	40
2.13 Dispositivo utilizado en el Hospital Universitario de Canarias, para la toma de muestra del aire espirado	49
2.14 Despiece de la célula electroquímica utilizada en el Hospital Universitario de Canarias, para medir la concentración de hidrógeno en muestras de aire espirado	50
2.15 Esquemas de los niveles de hidrógeno en sujetos sanos y en pacientes intolerantes a la leche o con infección intestinal	52 - 53

2.16 Presiones de vapor del soluto y del disolvente sobre una disolución según las leyes de Henry y de Raoult	66
2.17 Solubilidad de varios gases en función de su presión parcial sobre el líquido, a 25,0 °C	69

3. Parte experimental

3.1. Esquema del burbujeador	80
3.2. Diseño del sensor potenciométrico de hidrógeno	85
3.3. Sensor potenciométrico de hidrógeno acoplado a la célula de trabajo	88
3.4. Esquema del circuito equivalente correspondiente a la media de f.e.m. con un multivoltímetro	90
3.5. Esquema del sensor amperométrico <i>Unisense</i> [®]	93
3.6. Fotografía del sensor amperométrico <i>Unisense</i> [®] introducido en la célula de trabajo	96
3.7. Fotografía del montaje para las medidas potenciométricas instalado en nuestro laboratorio	99
3.8. Curva de potencial para 10,0 mL de una muestra acuosa saturada de hidrógeno y otra de agua <i>Millipore</i> [®]	100
3.9. Fotografía del montaje de las medidas amperométricas, instalado en el laboratorio.....	103
3.10. Curva de potencial para una dilución acuosa desde la saturación del 70 % de hidrógeno	104
3.11. Curva de potencial obtenida para una muestra de orina, de un sujeto sano, tras la ingesta de 250,0 mL de leche entera	107

4. Resultados y discusión

4.1. Respuesta del sensor potenciométrico para los diferentes volúmenes de agua saturada de hidrógeno.....	109
4.2. Representación gráfica de los valores de potencial para muestras acuosas burbujeadas con hidrógeno durante tiempos crecientes	112

4.3. Oscilación de los valores de potencial para muestras acuosas saturadas de hidrógeno, en un amplio intervalo de presiones atmosféricas	115
4.4. Influencia del porcentaje de humedad de almacenamiento de la membrana en la respuesta potenciométrica del sensor	118
4.5. Comportamiento de los sensores potenciométricos frente al porcentaje de humedad de almacenamiento	121
4.6. Curva de Calibración, del hidrógeno insolubilizado en la fase gaseosa, con un electrodo potenciométrico	133
4.7. Curva de Calibración, del hidrógeno disuelto en disoluciones acuosas, con un electrodo amperométrico	142
4.8. Potencial frente a concentración de hidrógeno disuelto, sin agitación magnética (sensor <i>Unisense</i> ®).....	143
4.9. Localización de los valores de potencial obtenidos para las disoluciones de H ₂ en presencia de diferentes electrolitos sobre la recta de calibración del sensor potenciométrico	147
4.10. Curva de calibrado del electrodo amperométrico, para el hidrógeno insolubilizado en la fase gaseosa, junto con los valores de potencial obtenidos para las disoluciones de H ₂ en presencia de electrolitos	151
4.11. Variación lineal del potencial con las partes por millón de hidrógeno disuelto en orina (sensor <i>Unisense</i> ®)	157
4.12. Valores de potencial frente a las partes por millón de hidrógeno disuelto en muestras de orina artificial y de orina humana	158
4.13. Evolución del hidrógeno excretado en la orina tras una dosis de 250,0 mL de leche entera para un sujeto sano	160
4.14. Evolución del hidrógeno excretado en la orina tras una dosis de 250,0 mL de leche entera para sujetos sanos de distintas edades	161
4.15. Variación con la edad de la concentración de hidrógeno eliminado por orina a las 4 horas de la toma de 250,0 mL de leche entera	162
4.16. Evolución en el tiempo, del contenido de hidrógeno en la orina tras la ingesta de 20,0 mL de <i>Duphalac</i> ®, para sujetos sanos	165
4.17. Comparación del hidrógeno eliminado a las cuatro horas tras la ingesta entre sujetos sanos e intolerantes a la lactosa, de distintas edades	167

4.18.Evolución en el tiempo, del contenido de hidrógeno en el aliento tras la ingesta de leche, para un niño intolerante a la lactosa	168
4.19.Eliminación de hidrógeno en orina para sujetos con infección gastrointestinal	169
4.20.Eliminación de hidrógeno en el aliento para un niño con infección gastrointestinal	170
4.21.Eliminación de hidrógeno disuelto en orina para distintos tiempos de recogida de la orina en un sujeto sano	171

Índice de tablas

2. Fundamento teórico

2.1. Contribuciones bioquímicas y metabólicas de la microflora intestinal	17
2.2. Clasificación de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> según la capacidad de fermentar la lactosa	31
2.3. Productos finales obtenidos a partir del ácido pirúvico, mediante las fermentaciones ácido mixta y butanodiólica	33
2.4. . Gases detectados por sensores sólido de electrólitos polimérico	60
2.5. Coeficientes de Bunsen a diferentes temperaturas, para algunos gases disueltos en agua	73

4. Resultados y discusión

4.1. Valores de potencial para diferentes volúmenes de muestras saturadas de hidrógeno	110
4.2. Valores de potencial para muestras acuosas burbujeadas con hidrógeno durante tiempos crecientes	112
4.3. Valores de potencial obtenidos a diferentes porcentajes de humedad de almacenamiento	116
4.4. Valores de potencial obtenidos a diferentes porcentajes de humedad de almacenamiento, realizando una medida previa de agua y sin realizar dicha medida previa	119
4.5. Valores del potencial calculados a partir de los obtenidos, para cada muestra de agua saturada y su correspondiente medida previa de agua	123
4.6. Hidrógeno disuelto en los diferentes porcentajes de dilución estudiados, expresado como concentración molar, como concentración v/v y como partes por millón v/v	125
4.7. Influencia del volumen de la fase gaseosa de las células de trabajo utilizadas, sobre los valores de potencial medidos con el sensor potenciométrico	128

4.8. Concentración de hidrógeno en la fase gaseosa para los diferentes <i>porcentajes de dilución desde la saturación</i> estudiados, expresada en concentración v/v y en partes por millón v/v	129
4.9. Valores de potencial registrados con muestras de igual concentración inicial de hidrógeno solubilizado tras ser expuestas a la atmósfera del laboratorio durante tiempos crecientes	131
4.10. Valores de potencial medidos experimentalmente y del logaritmo decimal de la concentración de hidrógeno en la fase gaseosa, para los diferentes <i>porcentajes de dilución desde la saturación</i> utilizados en la elaboración de la curva de calibración	132
4.11. Valores de presión parcial de hidrógeno en la fase gaseosa de la célula de medida para cada una de las concentraciones estudiadas	136
4.12. Hidrógeno disuelto en los diferentes porcentajes de dilución estudiados, expresados en concentración molar, en concentración v/v y en partes por millón v/v medidos con el electrodo amperométrico	139
4.13. Valores de potencial registrados, con el electrodo amperométrico, para cada una de las concentraciones de hidrógeno disuelto	141
4.14. Valores de potencial registrados y sus correspondientes porcentajes de H ₂ residual para muestras de igual concentración, tras ser expuestas a la atmósfera del laboratorio durante tiempos crecientes	143
4.15. Valores del coeficiente de Bunsen (α_j) del hidrógeno, a 25,0 °C para diferentes disoluciones acuosas	146
4.16. Valores del coeficiente de Bunsen del hidrógeno a 25,0 °C obtenidos con un nuevo método y los extraídos de la bibliografía para las disoluciones acuosas estudiadas	146
4.17. Valores de potencial y concentración para las disoluciones acuosas de H ₂ , y en presencia de electrolitos, a diferentes diluciones desde la saturación, midiendo en la fase gaseosa,	149
4.18. Valores del coeficientes de Bunsen del H ₂ , a 25,0 °C, para diferentes disoluciones acuosas, obtenidos por el método aquí propuesto y recogidos de la bibliografía	152

4.19. Comparación entre los valores del coeficientes de Bunsen del hidrógeno obtenidos aplicando nuestro método y con ambos electrodos para las diferentes disoluciones estudiadas	152
4.20. Valores de potencial obtenidos para muestras de de orina humana, burbujeadas con H ₂ durante tiempos crecientes	153
4.21. Valores del coeficiente de Bunsen del hidrógeno en orina humana para los distintos porcentajes de dilución estudiados	154
4.22. Valores del coeficiente de Bunsen del hidrógeno obtenidos en orina artificial para los porcentajes de dilución estudiados	155
4.23. Valores de potenciales obtenidos para las diferentes concentraciones de hidrógeno disuelto en muestras de orina	156
4.24. Concentración de hidrógeno eliminado en la orina de 4 horas de sujetos intolerantes a la lactosa y su comparación con el valor registrado en individuos sanos	167
4.25. Concentración de hidrógeno eliminado por la orina de un sujeto sano sometido a diferentes periodos de dieta	173

Introducción

Introducción

Como es sabido, la Licenciatura en Farmacia se focaliza hacia el medicamento y su aplicación para remediar los diferentes estados patológicos que se presentan en los individuos. No obstante, también dirige su atención hacia otros campos relacionados con la salud, incluido el de la analítica clínica, coadyuvante en el diagnóstico de tales estados patológicos.

Es por ello que para un Licenciado en Farmacia que se plantee acometer la realización de una determinada investigación, como la contenida en el desarrollo de una Tesis Doctoral, la posible aplicación sanitaria de los resultados obtenidos, constituye uno de los motivos principales que mueven su interés para llevar a cabo esa investigación. La elección del tema de esta Tesis Doctoral estuvo muy condicionada por ese interés.

Es conocido que ciertas patologías gastrointestinales (tales como la intolerancia a la lactosa o los procesos infecciosos bacterianos) cursan acompañados de un desarrollo importante de gas H_2 intestinal y que es, precisamente, la determinación cuantitativa de ese gas, la fuente principal de información para su diagnóstico.

Es asimismo conocido que las enzimas catalizan de manera específica la casi totalidad de las reacciones químicas que tienen lugar en los sistemas biológicos, por lo que su carencia provoca que la correspondiente reacción se produzca a mucha menos velocidad, y que no cumpla el objetivo biológico deseado, lo que da origen a la aparición de trastornos metabólicos.

En el caso de la lactasa, enzima responsable de la hidrólisis del azúcar de la leche, su carencia en el organismo provoca que este azúcar alcance el intestino sin metabolizar, dando origen a la aparición de uno de los procesos más comunes de malabsorción de este azúcar en el hombre, que se conoce como intolerancia a la lactosa. Esta intolerancia puede tener un origen genético (como ocurre en muchos individuos de raza negra, asiática o amerindia y en algunos de raza blanca) como consecuencia de una producción escasa, o incluso nula, de lactasa. En estos casos, la dificultad para digerir la leche existe desde el momento del nacimiento y la alteración que ocasiona posee carácter permanente, obligando al individuo que la sufre a evitar ingerir, durante toda su vida, este alimento y otros productos

lácteos. En otras ocasiones, como consecuencia de episodios de gastroenteritis, o simplemente por el declive fisiológico debido a la edad, o como resultado de "ataques" específicos sobre la mucosa intestinal producido a consecuencia de la administración de ciertos fármacos o alimentos, se ocasiona un daño pasajero a la mucosa intestinal que reduce la normal producción de lactasa. El resultado de todo ello es una aparición temporal de una cierta intolerancia a la lactosa.

Como la lactosa sin hidrolizar no puede de ser absorbida, se acumula en el lumen del intestino delgado y la entrada de líquido hacia la luz del mismo produce, por efecto osmótico, el síntoma característico de la diarrea recurrente. Por otra parte, este azúcar es fermentado por las sacaridasas de las bacterias presentes en la microbiota del intestino grueso, con producción de diversos gases (CH_4 , CO_2 , H_2) cuya presencia origina distensión intestinal y flatulencias, síntomas éstos que son característicos del fenómeno de malabsorción de carbohidratos.

Como es de sobra conocido, la presencia de microorganismos en el tracto gastrointestinal, lejos de ser perjudicial resulta necesaria y, en ocasiones, imprescindible. Ello es debido a que, además de concluir el proceso digestivo de los alimentos ingeridos, algunos de ellos resultan esenciales en el proceso de la síntesis de determinados compuestos que resultan necesarios para nuestro metabolismo, como es el caso de ciertas vitaminas.

Sin embargo, la mayoría de las enterobacterias que forman parte de la flora anaerobia habitual del tracto digestivo del hombre, son también agentes patógenos potenciales, esto es, capaces de expresar su acción patógena cuando las defensas del hospedador se encuentran disminuidas, o cuando existen alteraciones de las mucosas que sirven de barrera frente a la flora comensal. En el primer caso producen las denominadas infecciones oportunistas. En el segundo, alcanzan zonas altas del intestino donde no son habituales, por lo que, si se multiplican de manera incontrolada, puede alterarse el equilibrio de la microbiota, de modo que algunas cepas se vuelvan más virulentas a expensas de otras, provocando así episodios de gastroenteritis que cursan con una sintomatología análoga a la malabsorción de lactosa (náuseas, diarreas, dolor, flatulencia y espasmos abdominales)

En general, en individuos sanos la producción de hidrógeno es pequeña. Sin embargo, cuando existe alguna de las patologías anteriormente mencionadas, la producción de hidrógeno, a consecuencia de la acción de la flora intestinal, se ve

notablemente incrementada. Es precisamente la cuantificación de este biohidrógeno la que sirve de dato de referencia a la hora de diagnosticar estos trastornos intestinales, así como para valorar su intensidad y alcance. Esto ha dado lugar al desarrollo de diversos tipos de ensayos clínicos dirigidos a su valoración cuantitativa.

Entre los métodos empleados para llevar a cabo esta determinación, está el *Test de hidrógeno espirado*, que está basado en la medida del contenido en H₂ presente en el aliento exhalado por el paciente. Este ensayo y otros similares, también sobre muestras de aliento de los pacientes, son los que han recibido una mayor atención por parte de los profesionales sanitarios. En este tipo de ensayos clínicos, la cantidad de H₂-gas se evalúa empleando una técnica cromatográfica o una técnica polarográfica. Todos ellos presentan la gran ventaja de no ser invasivos, si bien todos ellos poseen una limitación asociada a la toma de la muestra, que hace disminuir de forma importante su fiabilidad. En efecto, cuando los pacientes son niños de corta edad, los problemas surgen por la dificultad de que éstos realicen correctamente las espiraciones para la toma de muestra (la espiración debe ser profunda y prolongada, ya que el H₂ se aloja, masivamente, en el último tercio del pulmón, requiriendo, en consecuencia, de una espiración muy forzada). En el caso de bebés estos problemas se incrementan notablemente, puesto que es evidente que un bebé “no sabe soplar” y, mucho menos, en las condiciones forzadas requeridas por el analista. Por ello, en este último caso, se recurre al uso de una especie de “mascarilla” para efectuar la toma de la muestra. Con dicha mascarilla simplemente se recolecta aliento exhalado, pero sin la suficiente garantía de representatividad, en lo que hace a su composición.

Por todo lo anterior, se planteó la búsqueda de un procedimiento alternativo, que permita obviar las dificultades comentadas y que, al mismo tiempo, resulte de fácil aplicación para realizar la medida analítica del hidrógeno intestinal. Los objetivos a cubrir por este trabajo de Tesis Doctoral fueron, por tanto, los siguientes:

- 1) Encontrar un procedimiento de análisis del H₂ presente en el organismo humano que, al igual que los actualmente en uso en el ambiente clínico, fuese igualmente confiable que aquellos.
- 2) Que al mismo tiempo, sin embargo, su aplicación resulte más sencilla y menos molesta para el paciente, al tiempo que de menor coste económico para la

sociedad. Hay que tener en cuenta que, como se ha señalado con anterioridad, los pacientes son, generalmente, niños de corta edad. Por ello, en los actuales procesos analíticos de determinación del H₂ intestinal –basados en la medida de la cantidad de dicho gas excretada por vía pulmonar– a los que éstos se ven sometidos para obtener el oportuno diagnóstico, deben estar acompañados de un familiar (generalmente uno de los padres) que, por tal motivo debe perder la jornada laboral de ese día.

3) Por último, que dicho procedimiento sencillo, resulte más ágil, al poder extenderse para ser aplicado en régimen de una prueba analítica más que no necesita de la presencia continuada del paciente (como sucede con los actuales tests en aliento), sino que éste haga, únicamente, entrega de “su” muestra para ser sometida al pertinente análisis.

En concordancia con lo anterior, se planteó una primera cuestión básica: encontrar una muestra, alternativa al aliento –que contuviese el H₂ intestinal generado y, además, en una concentración que resultase representativa de su nivel de producción en el organismo, bajo las condiciones fisiológicas derivadas de su patología– sobre la que centrar la determinación analítica pretendida.

La idea manejada fue la siguiente: si el hidrógeno es generado en el intestino grueso de un sujeto que presenta algún tipo de dolencia gastrointestinal, pasa posteriormente al torrente sanguíneo para ser transportado hasta alcanzar los pulmones, donde es excretado, nada impide que dicho gas pueda, transportado por la sangre, alcanzar otros órganos por los que, también, pueda ser excretado. Este es el caso de los riñones. De ser así, a través de la orina el H₂ podría ser eliminado, si bien tal posibilidad no aparece reflejada en la bibliografía clínica.

Pues bien, el resultado de esa búsqueda llevó a constatar que, tal como se había supuesto, el H₂ intestinal era, también, excretado disuelto en la orina. Tal hallazgo abrió la posibilidad a un procedimiento analítico de determinación relativamente sencillo, al menos en principio. Por tanto, en una primera etapa, que culminó con la presentación de mi Tesina de Licenciatura –que mereció la consideración de Premio Extraordinario de la Facultad de Farmacia, correspondiente al curso académico 2000-2001– se realizaron estudios preliminares que sirvieron de base para la realización de esta Tesis Doctoral. De entre estos estudios, merece mención destacada la comprobación fehaciente, por vez primera [1-3], de la existencia de cantidades importantes de H₂ disuelto en la orina de los pacientes y, en

consecuencia, la constatación de que dicha vía es una de las empleadas en la excreción del bio-H₂ intestinal.

Sobre la base de este importante resultado, el paso siguiente consistió en la propuesta de un método clínico sencillo que permita su determinación cuantitativa, disuelto en la orina, y que resulte, en consecuencia, alternativo a la vez que útil en el diagnóstico de este tipo de padecimientos. Dicha propuesta incluyó el uso de sensores electroquímicos debido a su especificidad y, consecuentemente, a la escasa (y, en ocasiones, nula) influencia sobre los resultados obtenidos, como consecuencia de la presencia de otras sustancias –en este caso otros gases provenientes, también, de los procesos metabólicos concurrentes– que puedan estar en la muestra a medir.

Para este trabajo se usaron dos tipos diferentes de sensores: uno potenciométrico, conteniendo una membrana de estado sólido (SEPES) y otro amperométrico. El primero de ellos –cuyo desarrollo se ha llevado a cabo por nuestro grupo de investigación de la Universidad de La Laguna– es, en esencia, una pila de combustible que emplea la oxidación anódica del bio-hidrógeno y la reducción catódica del oxígeno –proveniente del aire del laboratorio– para formar H₂O [4]. Dicho proceso electroquímico genera una f.e.m. de equilibrio que es proporcional a la concentración del hidrógeno presente en la muestra (en este caso, orina) sometida a estudio. El segundo –un sensor comercial de la firma *Unisense*®– es, en realidad, una célula de tres electrodos (trabajo, de Pt, contra-electrodo y de referencia) embebidos en una disolución electrolítica formada por una sal apropiada disuelta en un disolvente orgánico adecuado. La oxidación del bio-hidrógeno da origen a la aparición de una corriente anódica, entre el electrodo de trabajo y el contra-electrodo, que es convertida a una señal de voltaje mediante el uso de un pico-amperímetro (también suministrado por *Unisense*®)

A partir de aquí, la siguiente meta a alcanzar en este trabajo de Tesis Doctoral, fue encontrar las condiciones óptimas, así como una metodología de trabajo adecuada, para hacer efectivos estos ensayos de analítica clínica basados en la determinación electroquímica de la porción del gas H₂ que es eliminado del organismo por la vía renal. Para ello, fue necesario analizar, desde una base experimental, todas y cada una de las variables físicas y fisicoquímicas que intervienen en el proceso de la medida experimental [5], a fin de conocer cuál es su incidencia en el mismo y, en consecuencia, para tratar de exaltar, en unos casos, y

mitigar, en otros, esa influencia y obtener, finalmente, un protocolo de evaluación cuantitativa del bio-hidrógeno disuelto en la orina, que resulte ágil, sencillo y confiable y que permita complementar, en el plazo corto -y si es posible, con posterioridad, sustituir en el medio plazo- las actuales pruebas clínicas (que, como ya antes se ha mencionado, presentan una relativa complejidad) en la búsqueda del necesario diagnóstico. El estudio que se emprendió tuvo, en todo momento, el rigor científico exigible a una investigación que pretende cubrir la consideración de Tesis Doctoral. Es decir, se analizó, con todo rigor, la influencia de una serie de parámetros fisicoquímicos que confluyen en el global del proceso (desde la toma de la muestra y su almacenamiento, hasta la propia medida experimental electroquímica y su posterior manipulación matemática conducente al cálculo de la solubilidad del H_2 en ese medio) y que, de alguna manera, podrían influir sobre la medida electroquímica y afectar su precisión. Esto es, de manera sistemática se moduló la variación de cada uno de los parámetros, manteniendo el resto de las condiciones constante. De esta manera fue posible analizar la influencia de cada una de estas variables o parámetros termodinámicos para, de ese modo, poder imputar los posibles cambios observados en la respuesta electroquímica, al parámetro en cuestión.

Establecidas las condiciones de trabajo óptimas, lo siguiente fue obtener una curva de calibración para ambos sensores para aplicar a la posterior determinación del contenido de hidrógeno disuelto en una orina [6]. Ésta se llevó a cabo en medio acuoso por dos cuestiones fundamentales: de una parte, porque la orina es esencialmente una disolución acuosa, evidentemente compleja, de varios solutos (unos electrólitos y otros no electrólitos), por lo que es posible extender los comportamientos observados en el medio acuoso al complejo sistema de la orina. Por otra parte, porque la solubilidad de los gases en los líquidos, y en concreto del H_2 en agua y en diferentes medios acuosos, ha recibido una importante atención por parte de un gran número de investigadores, hecho éste que permite, afortunadamente, disponer de una extensa bibliografía, con datos suficientes y de un alto grado de precisión, acerca de la solubilidad del H_2 en los medios acuosos, que resulta muy valiosa a la hora de establecer la curva de calibración buscada.

Ahora bien, dado que el organismo de los seres vivos (en especial el del hombre) es un sistema biológico enormemente complejo, la disolución del H_2 en cualquiera de los fluidos corporales (por ejemplo, en este caso, en la orina) no puede considerarse como un proceso fisicoquímico sencillo del que se deriva un

sistema simple. Por el contrario, la complejidad de tal sistema obliga a establecer pautas regulares de estudio que permitan sugerir respuestas que no queden vinculadas a la concurrencia de efectos sinérgicos. Por ello, el estudio tiene que plantearse de una manera sencilla, en cuanto a la modificación sistemática de los parámetros fisicoquímicos que se pretenda analizar en cada momento y con interpretaciones de los resultados encontrados, también sencillas.

Es evidente que el disolvente condiciona notablemente la solubilidad del H₂. Ahora bien, tal como se ha insistido con anterioridad, el hecho de tener como objetivo principal la búsqueda de un procedimiento aplicable a la determinación de H₂ disuelto en orina, esto es, disuelto en una disolución en base acuosa, llevó a centrar el trabajo de este estudio sistemático en el empleo, únicamente, de disoluciones de este disolvente, descartando la posible utilización de cualquier otro, no acuoso, en el que, incluso, tal solubilidad pudiese verse incrementada, ya que, de cualquier modo, la posibilidad de utilización de un disolvente no acuoso a la hora de acometer las analíticas pretendidas, resulta muy improbable en la práctica. Aunque el rango de trabajo de las disoluciones de H₂ que se van a encontrar en el campo clínico, para el caso de las muestras de orina, es relativamente reducido y, sobre todo, centrado en valores correspondientes a cantidades de gas disuelto sensiblemente pequeñas (del orden de unas pocas ppm v/v, ya que inclusive para una persona que sea considerada como afectada por una dolencia gastrointestinal, los valores de H₂ que, con carácter general, se van a encontrar no sobrepasan las 300 ppm, v/v), el estudio que aquí se ha desarrollado se ha extendido desde el límite más bajo en el que dicho gas puede ser cuantitativamente detectado con rigor, por esta vía electroquímica, hasta el límite máximo de solubilidad de este gas; esto es, hasta la saturación.

Uno de los inconvenientes que presenta el trabajo con H₂ es su gran tendencia a escapar del recipiente que lo contiene, derivada de su pequeño tamaño y de su estructura molecular. Por este motivo, se hace necesario guardar ciertas precauciones que garanticen un mínimo de estanqueidad en las muestras, sobre todo durante el periodo de almacenamiento. Por ello, se acudió a la disminución de la temperatura –almacenando las muestras en nevera– a fin de aumentar la solubilidad del gas en la disolución que lo contiene. Por otra parte, fue necesario buscar el máximo hermetismo posible en los recipientes de almacenamiento a emplear –por ejemplo, usando recipientes de vidrio provistos de tapa de cierre especial para el manejo de gases– especialmente cuando, por alguna circunstancia

particular, dicho periodo de almacenamiento de las muestras hubo de prolongarse. En el desarrollo de la medida experimental electroquímica, sin embargo, no siempre fue necesario mantener estas estrictas medidas de estanqueidad. Así, en los estudios con el sensor potenciométrico y puesto que las medidas se realizan en la fase gaseosa situada sobre la disolución, sí resultó necesario emplear una técnica operatoria de cierto nivel de sofisticación para evitar pérdidas del gas H_2 que, de producirse, habrían alterado al valor de la concentración de las muestras, durante la manipulación experimental. Sin embargo, en las medidas amperométricas, por realizarse en el seno de la disolución, pudo trabajarse en una célula de diseño mucho más simple, que no requirió un cierre hermético, dado que la velocidad de insolubilización del H_2 desde la disolución de muestra hasta la fase gaseosa sobre dicha disolución, comparada con la de obtención de la medida electroquímica, no es lo suficientemente elevada para que se produzcan reducciones significativas de la concentración del gas disuelto, que puedan afectar a los resultados encontrados.

También los equipos de medida utilizados requirieron ciertas precauciones a fin de conseguir un mayor grado de repetividad de los resultados. Entre éstas hay que destacar el almacenamiento del sensor en un ambiente de humedad relativa controlada, especialmente en el caso de los sensores potenciométricos, para los que la regulación de dicha humedad resulta de extrema importancia, al incorporar, en su estructura, una membrana polimérica sólida. El mantenimiento del sensor polarizado durante los periodos de reposo entre medidas, si éstos son cortos, también supuso una precaución importante, que se puso de manifiesto con claridad y de manera inequívoca cuando, a consecuencia de estar sometidos estos sensores a largos periodos de reposo, se dejaron de polarizar. Asimismo, se hizo necesaria la realización periódica de controles que garantizaran el óptimo funcionamiento de los equipos. Las medidas se realizaron siempre a la temperatura de 25 °C, que es la temperatura tipo para el trabajo analítico, y a la presión atmosférica, ya que, de una parte, resulta mucho más simple a la hora de acometer el trabajo experimental de laboratorio y, de otra, es evidente que la recogida de la muestra al paciente (recogida de la orina, que podrá, en un futuro, hacerse en el hogar) condiciona la modificación de esta variable.

Para agilizar el análisis de los resultados encontrados, se recurrió a la pseudo-automatización de los equipos de medida. Para ello, se dispuso de un software específico que facilitó la adquisición y almacenamiento de los datos

experimentales, al tiempo que, por otra parte, facilitó la manipulación, de acuerdo a las ecuaciones oportunas, de tales datos para finalmente obtener, a partir de tales medidas, los valores de la concentración de H₂ presente en el medio líquido y su correlación con la medida eléctrica usada para el control analítico. La posible aplicación, fiable, de estas curvas de calibración fue otro de los puntos de estudio y análisis. No hay que olvidar que la cuantificación del H₂ presente en la muestra, a través de la concurrencia de la medida de la f.e.m. generada por ésta, con el empleo de la curva de calibración correspondiente, tiene que permitir discernir entre una situación claramente no patológica para el paciente y otra que podría serlo (lo cual debe ser confirmado mediante su concordancia con otras pruebas diagnósticas). Para ello, en una primera etapa, se acometió la medida del contenido de H₂ en orinas de individuos sanos (esto es, de individuos a los que no se les había diagnosticado padecimiento de patología gastrointestinal alguna) para comprobar la presencia y posibilidad de detección del gas en sus orinas (corroborando, de ese modo, la bondad del procedimiento de medida aquí planteado) así como su cuantía. Posteriormente, en colaboración con la Unidad de Pediatría del Hospital Universitario de Canarias (Tenerife), se acometió, en una segunda etapa, la medida de la cantidad de H₂ que se acumula, con el tiempo, en la orina de pacientes diagnosticados de tener padecimiento de alguna patología intestinal. La comparación entre estos resultados y los encontrados para individuos sanos puso de manifiesto varias cuestiones importantes:

- a) Que, efectivamente, el H₂ generado en el intestino humano por la acción de bacterias residentes, es excretado por vía renal a través de la orina.
- b) Que esta vía de excreción es importante y cuantitativamente comparable con la pulmonar, a través del aliento, por lo su determinación cuantitativa puede llevarse a cabo con suficiente precisión.
- c) Que el sistema de determinación electroquímica planteado en este trabajo es adecuado y puede ser utilizado para realizar una medida analítica clínica.

Esto último se hizo patente al comparar la conducta analítica de los resultados obtenidos tanto por aplicación del método aquí propuesto, como mediante el *Test de hidrógeno espirado*, universalmente aceptado en la práctica clínica. Las comparaciones se realizaron tanto con individuos sanos como con sujetos afectados de una patología gastrointestinal, encontrándose en todos los casos una magnífica similitud de comportamiento.

Hasta aquí, todo el trabajo de Tesis Doctoral desarrollado se centró en la caracterización sistemática de las diferentes variables fisicoquímicas que inciden en el adecuado funcionamiento de los equipos experimentales (sensores), así como en la determinación de las condiciones óptimas de las variables que confluyen en el proceso de medida, cuyo conocimiento debe permitir la realización de ésta con un alto grado de precisión. En la última parte del trabajo, sin embargo, se pretende un enfoque de mayor aplicación práctica. Se ha buscado tener respuestas a las interrogantes inicialmente planteadas y hacer una propuesta de pautas de actuación que permitan trasladar los conocimientos aquí adquiridos e incorporarlos al día a día, para de ese modo intentar contribuir a la minoración de los problemas de salud relacionados con el tema elegido.

Con este trabajo de Tesis Doctoral se inició en el Departamento de Química Física de la Universidad de La Laguna una nueva línea de investigación –cuyos comienzos se remontan al año 2000– que pretende ser de aplicación en el corto plazo. A partir de los resultados en ella encontrados, se intenta contribuir a la superación de un problema de salud que afecta a un número importante de personas: la intolerancia a la lactosa. Asimismo, este trabajo pretende también servir de punto de partida para la realización de estudios paralelos, dirigidos hacia la detección analítica de otros problemas gastrointestinales que evolucionan siguiendo pautas relativamente próximas (como es la producción masiva de algún bio-gas, cuya determinación cuantitativa sirve, o puede servir, de punto de apoyo para su diagnóstico). Es evidente que tal expectativa contribuye al atractivo de este trabajo, del que aún quedan, evidentemente, algunas interrogantes sin una solución definitiva.

Llegados a este punto, es necesario señalar que el trabajo desarrollado ha sido intenso y, en algunos momentos ha inducido a un estado de cierto estado anímico de desaliento. Sin embargo, en este momento, alcanzadas –y en algunos casos, sobrepasadas– las metas inicialmente propuestas para llevarlo adelante, esas sensaciones quedan muy atrás, prácticamente en el olvido, para dejar paso a la satisfacción por lo hasta aquí realizado y, sobre todo, por las perspectivas que, de la posible aplicación de los resultados encontrados, parecen apuntarse.

Quisiera, por otra parte, señalar que este trabajo de investigación me ha servido para consolidar muchos de los conocimientos adquiridos durante la Licenciatura, por medio de su aplicación al estudio de este tema concreto –lo que, considero,

reviste una gran importancia, pues reafirma el sentido de los estudios universitarios realizados-. Asimismo, me ha permitido adquirir unos hábitos de trabajo y estudio sistemáticos que, de no haber acometido la realización de este proyecto, difícilmente podría haberlos alcanzado. Finalmente, en el transcurso de este trabajo de Tesis Doctoral he visto crecer en mí una actitud de inconformismo sano ante los interrogantes que se iban presentando, que ha supuesto siempre un acicate más en la búsqueda de respuestas.

Fundamento teórico

2. Fundamento teórico

2.1 Absorción intestinal de carbohidratos

Como sabemos, el intestino grueso, o colon (figura 2.1), es la última porción del tracto gastrointestinal. En él se lleva a cabo la digestión de los alimentos y la absorción de las moléculas nutrientes hacia el torrente sanguíneo. En el ser humano, entre sus principales funciones destacan: por un lado la producción de moco y secreciones acuosas ricas en K^+ y HCO_3^- [7] y por otro la recuperación de agua y electrolitos secretados durante la digestión. Así pues, ejerce un importante control sobre la excreción de productos metabólicos de desecho y sustancias tóxicas. Además, el intestino grueso alberga los microorganismos encargados de concluir el proceso digestivo a través de la fermentación, por lo que este segmento del tracto gastrointestinal puede ser considerado como un vaso de fermentación especializado.

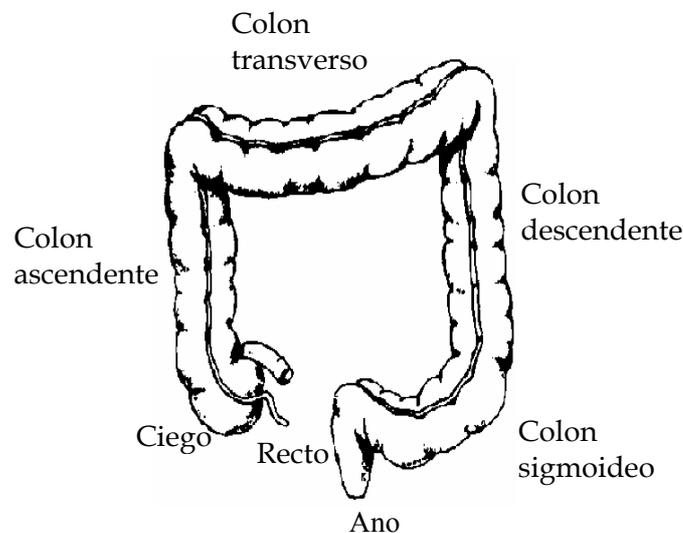


Figura 2.1 Principales subdivisiones anatómicas del intestino grueso del ser humano

El término fermentación es utilizado, en fisiología animal, para describir los procesos mediante los cuales los carbohidratos, generalmente polisacáridos procedentes de la dieta, son hidrolizados a azúcares más sencillos por los microorganismos, fundamentalmente anaerobios, que colonizan el último tramo

del intestino [8]. A través de este proceso de fermentación, el hospedador tiene la posibilidad de recuperar parte de la energía perdida debido a la mala absorción de carbohidratos -como, por ejemplo almidón-, otros polisacáridos no relacionados con el almidón y azúcares en general. Es evidente por lo tanto, que la estimación cuantitativa de la fermentación bacteriana intestinal es esencial para entender la fisiología y metabolismo de los animales homeotérmicos (y, de entre ellos, los del hombre)

En general, las fermentaciones son reacciones de mantenimiento que no requieren la participación de una cadena de transporte de electrones. Como resultado de la no participación de un aceptor externo de electrones, el sustrato orgánico experimenta, simultáneamente, una serie de reacciones de oxidación y de reducción simultáneas. No obstante, en algunos casos puede ser necesaria la intervención de aceptores de electrones, en tal circunstancia éstos desempeñarían funciones secundarias. La mayoría de estos procesos fermentativos utilizan la ruta de Embden-Meyerhof, o vía glucolítica, para la conversión de glucosa, como sustrato orgánico, en ácido pirúvico, con la reducción de dos moléculas de NAD^+ , las cuales se reoxidan posteriormente en reacciones implicadas en el metabolismo del piruvato. A partir del piruvato se obtienen diferentes productos finales: ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico, butírico, etc.) y gases como dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e hidrógeno (H_2). Estos productos finales son los que diferenciarán la amplia gama de fermentaciones existentes: propiónica, succínica, butanodiolica, tipo clostridio, etc. [9].

No obstante, no todos los mecanismos fermentativos siguen la ruta de la glucólisis. Algunas fermentaciones de la glucosa siguen la ruta de las pentosas fosfato y otras las de Entner-Doudoroff. Las fermentaciones de otros sustratos que no son azúcares, como por ejemplo los aminoácidos, implican rutas más específicas.

Desde el punto de vista digestivo es importante distinguir entre mono-, di-, y polisacáridos. Mientras los monosacáridos no necesitan hidrolizarse para ser absorbidos, los disacáridos y los polisacáridos precisan de la acción de las enzimas de la superficie del intestino delgado y posteriormente, los polisacáridos, también de la amilasa pancreática.

Los disacáridos como la fructosa, la sacarosa o la lactosa, y los polisacáridos

como el almidón o el glucógeno, son atacados inicialmente por las endosacaridasas α -amilasas de la saliva (lactasa, sacarasa, isomaltosa, glucoamilasa), enzimas específicas para los enlaces glucosídicos α -1,4 sin puntos de ramificación y que una vez en el estómago son inactivadas por el jugo gástrico. Los productos de la digestión de estas enzimas son: maltosa (disacárido), maltotriosa (trisacárido), y las denominadas α -ciclodextrinas límite (8 unidades de glucosa con uno o más enlaces glucosídicos α -1,6)

Las secreciones pancreáticas contienen otra amilasa, la α -amilasa pancreática, que hidroliza tanto los enlaces α -1,4 (que no fueron hidrolizados por la amilasa de la saliva) como los α -1,6. De esta forma todos los polisacáridos son convertidos en oligosacáridos. La hidrólisis final de estos últimos y de los disacáridos a monosacáridos, se lleva a cabo por las α -glucosidasas, enzimas de la superficie de las células epiteliales (bordes en cepillo) del intestino delgado, cuya actividad generalmente excede a las necesidades de la digestión.

Los di-, oligo-, y polisacáridos que no son hidrolizados ni por las amilasas, ni por las α -glucosidasas no pueden ser absorbidos, alcanzando el tracto final del intestino que se encuentra colonizado, a partir del íleon inferior, por numerosas bacterias.

Las bacterias pueden asimilar una mayor variedad de glúcidos que el hombre, ya que sus sacaridasas pueden romper muchos tipos de enlaces que, sin embargo, no se ven afectados por las enzimas humanas. Son los monosacáridos obtenidos por las sacaridasas de las bacterias y metabolizados de forma anaerobia por ellas mismas, las que dan origen del hidrógeno eliminado por el hombre. Junto a él, otros productos de degradación de los monosacáridos son: ácidos grasos de cadena corta, lactato, metano y dióxido de carbono, fundamentalmente [10].

2.2 Flora bacteriana intestinal

Junto con la mucosa bucal y el rumen de los animales homeotérmicos, el tracto intestinal posee una microbiota característica que presenta cierta variedad según los hospedadores, aunque siempre está dominada por eubacterias anaerobias, incluyendo bacterias gram-negativas y gram-positivas.

La flora intestinal de un recién nacido se establece muy tempranamente. En

bebés amantados, dicha flora es bastante simple y consiste en su mayor parte, en bacilos gram-positivos pertenecientes a la especie *Bifidobacterium sp* (antiguamente llamado *Lactobacillus bifidus*); en bebés alimentados con biberón, la flora es más compleja. Durante la lactancia materna, la flora se encuentra condicionada por el hecho de que la fuente principal de alimentación es la leche, puesto que ésta posee un alto contenido en complejos nutricionales -requeridos también por *Bifidobacterium sp* como factor de crecimiento - como es el aminoazúcar N-acetilglucosamida u otros disacáridos β -sustituidos (por ejemplo el N-acetil lactosamina)

Las bacterias del ácido láctico constituyen un subgrupo diferencial importante de las eubacterias gram-positivas. Son no esporulados, que se caracterizan por la producción de grandes cantidades de ácido láctico y, por tanto, de uno o dos moles de ATP, por fermentación de azúcares. *Bifidobacterium sp* se parece, en varios aspectos, a las bacterias del ácido láctico. También fermenta azúcares con formación de ácido láctico como producto final más importante, además de producir CO₂, acetato y trazas de ácido fórmico. Sin embargo, su ecuación global no corresponde a una fermentación homoláctica ni a una fermentación heteroláctica (característica de las bacterias del ácido láctico), sino que es una ruta de fermentación única que resulta energéticamente más favorable, ya que suministra cinco moles de ATP por cada dos moles de glucosa fermentada.

Conforme el niño crece y su dieta cambia, la composición de la flora intestinal también se modifica, acercándose a las características de la del adulto.

La elevada acidez del primer tramo del tubo digestivo, donde el pH del estómago es aproximadamente 2, limita su colonización bacteriana (10⁴ por mililitro de contenido) constituyendo así una barrera microbiológica contra la penetración de bacterias extrañas en el tubo gastrointestinal. En general, las paredes del estómago están colonizadas por *Lactobacillus* y *Streptococcus* tolerantes a los ácidos, géneros que se encuentran incluidos dentro del denominado grupo de las bacterias del ácido láctico. Éstas, como ya se ha dicho con anterioridad, se caracterizan por la producción de grandes cantidades de ácido láctico por fermentación de azúcares. Una especie que se ha aislado del estómago de humanos y de animales es la *Sarcina ventriculi*, coco no esporulado, anaerobio y gram-positivo, muy tolerante al ácido, que puede crecer a valores de pH muy

bajos (iguales a 1). Esta bacteria fermenta azúcares por la ruta de Embden-Meyerhof produciendo una mezcla de lactato, acetato, etanol y H₂ [9,11].

El duodeno, al encontrarse adyacente al estómago, es también bastante ácido y su flora es similar a la de éste. Del duodeno hacia el íleon el pH aumenta haciéndose alcalino y por lo tanto, permitiendo el asentamiento de otro tipo de flora bacteriana, que aumenta notablemente en el intestino grueso y alcanza su máximo número en el colon terminal.

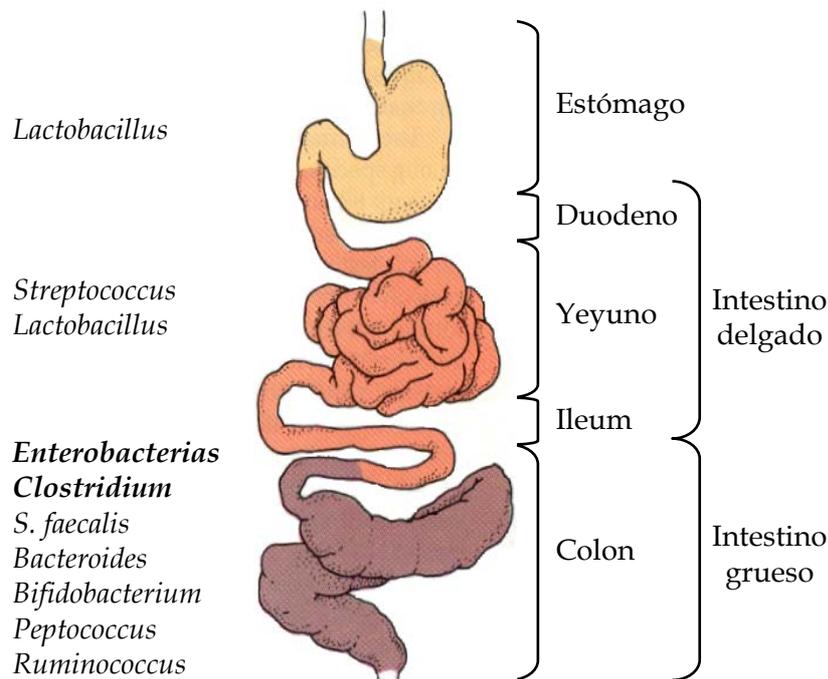


Figura 2.2 Flora intestinal típica del tracto gastrointestinal de los seres humanos

Los recuentos ponen de manifiesto que los anaerobios facultativos están presentes en menor proporción (10^7 /gramo de contenido intestinal) que los anaerobios estrictos. Incluso el más abundante de ellos, *Escherichia coli*, contribuye únicamente con una cantidad comprendida entre el 0.1 % y el 1.0 % a la biomasa bacteriana total del intestino [9,12]. Estos microorganismos consumen el oxígeno presente, haciendo el medio estrictamente anaerobio y favoreciendo la proliferación de anaerobios obligados, tales como las especies de *Clostridium* y

Bacteroides, cuya presencia es mucho mayor (de 10^{10} a 10^{11} /gramo de contenido intestinal) [11] (figura 2.2)

Son numerosos los factores que influyen y controlan la población microbiana. Entre ellos destacan la acidez del jugo gástrico, el peristaltismo intestinal, las secreciones intestinales, la presencia de inmunoglobulinas, las diferentes interacciones bacterianas, la dieta del hospedador e incluso el medio ambiente en el que éste se desenvuelve. Pero sobre todo, influyen sobre ella las alteraciones anatómicas o funcionales del tubo digestivo [13]. La flora intestinal colabora con notables aportaciones al ser vivo que la contiene, puesto que lleva a cabo una amplia variedad de reacciones metabólicas (tabla 2.1). En consecuencia los cambios en ella, debidos a una dieta o una enfermedad, pueden afectar al hospedador.

Tabla 2.1 Contribuciones bioquímicas y metabólicas de la microflora intestinal.

Síntesis de vitaminas	Productos: tiamina, riboflavina, piridoxina, B ₁₂ , K
Producción de gases	Productos: CO ₂ , CH ₄ , H ₂ ,
Producción de sustancias olorosas	Productos: H ₂ S, NH ₃ , aminas, indoles, escatol, ácido butírico.
Producción de ácidos orgánicos	Productos: ácidos acético, propiónico, butírico
Fijación de nitrógeno	Agente: <i>Klebsiella pneumoniae</i> (en humanos con una dieta rica en carbohidratos)
Reacciones de la glucosidasa	Enzimas: β-glucoronidasa, β-galactosidasa, β-glucosidasa, α-glucosidasa, α-galactosidasa
Metabolismo de esteroides	Procesos: esterificación, deshidroxilación, oxidación, reducción, inversión.

Dentro de la gran variedad de bacterias que pueden habitar en el intestino humano, bien de forma natural o causando una infección, nos centraremos en aquéllas cuyo metabolismo implica la producción de hidrógeno a partir de la fermentación de carbohidratos. Éstas son, principalmente, ciertas especies dentro de la gran familia Enterobacteriaceae y del género *Clostridium*.

2.2.1 Familia Enterobacteriaceae

La amplia gama de bacilos gram-negativos anaerobios facultativos y no esporulados, que son huéspedes habituales del intestino del hombre y de los animales, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Son organismos quimioheterótrofos, poco exigentes en sus necesidades nutritivas, y relativamente resistentes a la acción de los agentes ambientales, lo que condiciona su capacidad de supervivencia en el medio externo. En condiciones anaerobias, su crecimiento depende estrictamente de la aportación de un carbohidrato fermentable, mientras que en condiciones aerobias, pueden utilizar, como sustratos oxidables para la respiración, una gran variedad de compuestos orgánicos: ácidos orgánicos, aminoácidos, péptidos y carbohidratos. Algunas especies son capaces de reducir el nitrato y el fumarato. Así mismo se sabe que participan en el metabolismo de algunas vitaminas (B₁₂ y ácido fólico) y de fármacos. Los nutrientes de los que se abastecen en el intestino proceden probablemente del moco intestinal, las células de descamación, las secreciones enzimáticas y los nutrientes no digeridos completamente.

Estas características explican que las enterobacterias se hallen muy difundidas, encontrándose no sólo formando parte de la microbiota que coloniza el tubo digestivo, sino que, además, la gran mayoría pueden comportarse como organismos patógenos. Atendiendo a su acción patógena podemos clasificarlas en: *Enterobacterias patógenas*, que son aquellas que por lo general no forman parte de la flora intestinal pero que pueden dar lugar a procesos diversos en huéspedes y las *Enterobacterias oportunistas*, que son microorganismos que forman parte de la flora comensal del tubo digestivo y normalmente no se comportan como patógenos, pero, cuando se produce un aumento de susceptibilidad del hospedador, debido a una disminución de sus mecanismos defensivos, dan lugar a diversos cuadros clínicos. La determinación de estas características, mediante pruebas bioquímicas sencillas, constituye la base de la clasificación taxonómica de las enterobacterias en tribus, géneros y especies.

La familia Enterobacteriaceae está constituida principalmente por los géneros: *Escherichia* (siendo la *Escherichia coli*, uno de los integrantes más característicos de la microbiota normal de los mamíferos y un importante patógeno causante de infecciones intestinales y del tracto urinario), *Salmonella* y *Shigella* (ambos

relacionados estrechamente con el anterior), *Enterobacter*, *Serratia* y *Proteus* (presentes, sobre todo en suelo y agua), *Erwinia* (responsable fundamentalmente de infecciones en plantas) y *Yersinia* (de la cual cabe destacar la especie causante de la peste bubónica)

Otras bacterias muy relacionadas con este grupo, son los géneros *Vibrio* (cuya especie *Vibrio cholerae* es responsable del cólera) y *Aeromonas* [9,12,13].

2.2.2 Género *Clostridium*

Otro grupo de bacterias gram-positivas que forman parte importante de la microflora del intestino, son aquellas que pertenecen al género *Clostridium*. Los clostridios son microorganismos anaerobios estrictos, habitantes del suelo y del colon de muchos mamíferos, incluido el hombre. Su papel, en general, se considera simbiótico con el organismo hospedador, lo que significa que no sólo no son perjudiciales en condiciones normales, sino que incluso colaboran con las funciones digestivas. Estas bacterias se incorporan en el aparato digestivo del hospedador junto con los alimentos que éstos ingieren, atravesando la barrera del estómago gracias a la facultad que poseen de transformarse en *esporas*. Las *esporas* son unas eficaces formas de resistencia que pueden soportar condiciones de ausencia de humedad, alta tensión de oxígeno, alta salinidad del medio, temperatura extrema, alta radiación y un amplio rango de acidez y alcalinidad, condiciones que, en cualquier caso, no permitirían la vida de sus correspondientes formas vegetativas. Esta facultad permite la supervivencia de este grupo de bacterias, en un ambiente hostil, durante largos periodos de tiempo, a la espera de que las condiciones cambien hacia otras más favorables que permitan su reproducción, produciendo, la mayoría de ellas, toxinas causantes de diversas enfermedades

Hacia finales del siglo XIX se hizo evidente que algunas especies de este género son agentes infecciosos en el hombre y en los animales. Asimismo, son los responsables de algunos tipos de descomposición de alimentos que, cuando se encuentran enlatados, evidencian su estado al hincharse las latas [9,11].

Uno de los mayores agentes infecciosos en humanos es el patógeno *C. perfringens*, causante de procesos de gastroenteritis e, incluso, de la necrosis aguda

del intestino delgado con elevada producción de H_2 . Es, además, el germen responsable de la destrucción tisular y de la gangrena gaseosa. Otros conocidos clostridios patógenos, no productores de H_2 , son el *C. botulinum* y *C. tetani*, causantes del botulismo y el tétanos, respectivamente.

Algunas especies del género *Clostridium* clasificadas, la gran mayoría, dentro del grupo *saccharolytic clostridia* (clostridios sacarolíticos) fermentan una amplia variedad de carbohidratos para terminar produciendo CO_2 , H_2 , alcoholes y ácidos, fundamentalmente acético y butírico (en este último caso, se les denomina clostridios del ácido butírico) [9].

2.3 Función Renal. El riñón

El aparato urinario es el encargado de eliminar del organismo las sustancias nocivas que se forman en las células, así como de contribuir a mantener la reacción alcalina de la sangre. Está formado esencialmente por (figura 2.3):

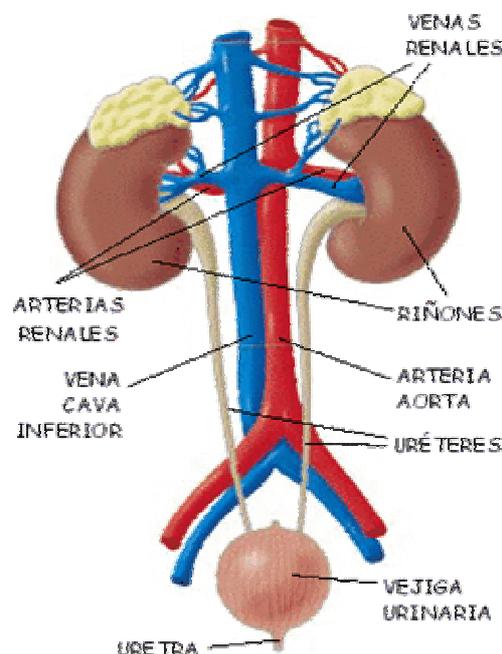


Figura 2.3 Esquema de la estructura del Sistema Urinario

- Dos riñones, que producen orina de forma constante mediante el filtrado y la depuración de la sangre que pasa a través de ellos.

- Dos uréteres, que son dos conductos que transportan la orina producida en los riñones hacia la vejiga de la orina.
- Una vejiga, que sirve para almacenar la orina que se produce de forma continua y permite que podamos evacuar su contenido cuando resulta apropiado.
- La uretra, que comunica la vejiga urinaria con el exterior. Es el conducto por el que orinamos.

El riñón es el principal órgano secretor del cuerpo y el líquido obtenido por su actividad, a partir del plasma, es la orina. A diferencia de otras secreciones, la orina presenta unas variaciones notables tanto de volumen como de composición, a causa de las variaciones metabólicas y de las circunstancias ambientales, lo que faculta al riñón para regular el volumen y la composición del líquido extracelular, mediante las siguientes funciones:

- Formación de la orina y eliminación, a través de ella, de los productos de desecho del metabolismo tales como urea, creatinina y ácido úrico, mediante filtración glomerular y secreción tubular
- Balance de los líquidos corporales, mediante secreción y reabsorción tubular, controlando la eliminación o absorción de agua de la sangre, siendo éste uno de los mecanismos con el que el riñón participa en la regulación de la presión arterial.
- Regulación del pH sanguíneo y corporal, mediante la eliminación de orina ácida o alcalina.
- Regulación de la presión osmótica sanguínea, a través de la eliminación o reabsorción de sales minerales contenida en ella, participando así del balance hidroelectrolítico y de la regulación de la presión arterial.
- Funciones hormonales y metabólicas realizadas por el propio riñón

Los riñones están recubiertos por una gran cantidad de grasa que los protege de los golpes y de los movimientos bruscos. Si se quita la grasa que los recubre se aprecia que tienen la forma de una alubia y el tamaño aproximado de un puño. Se localizan a los lados de la columna vertebral, debajo de la caja torácica y separados

de ella por medio del músculo diafragma, y detrás del hígado y el estómago, pegados a la pared interna de la espalda. Tienen una superficie brillante y en la zona cóncava del riñón se aprecia una arteria renal por donde llega la sangre sucia o con impurezas y una vena renal por donde sale la sangre limpia o filtrada [14].

El cuerpo humano, en condiciones normales, tiene dos riñones. La unidad funcional del riñón es la nefrona. En cada riñón hay aproximadamente un millón de nefronas. Cada nefrona se divide en cuatro elementos (figura 2.4)

- Glomérulo.
- Túbulo proximal.
- Túbulo distal.
- Túbulo colector.

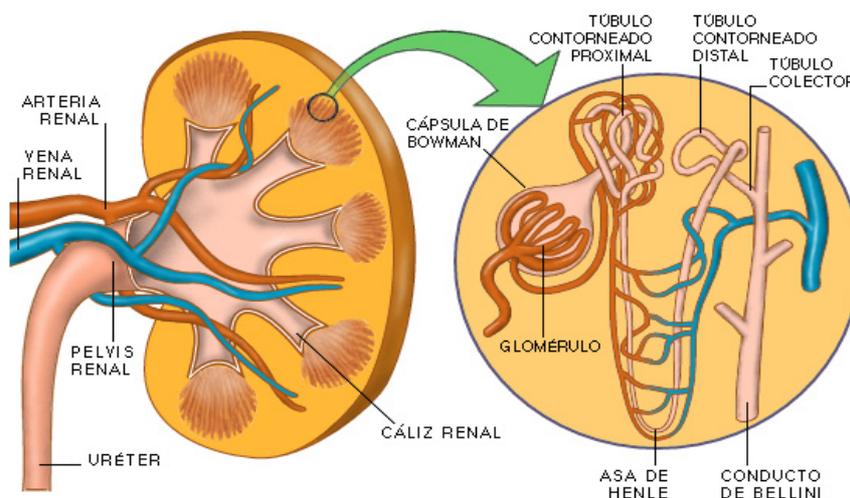


Figura 2.4 Representación esquemática del riñón de un ser humano

El glomérulo es un ovillo de capilares sanguíneos, formado por la división de la arteriola aferente, que posteriormente se vuelven a reunir formando la arteriola eferente. El ovillo glomerular está dentro de la cápsula de Bowman. El espacio libre localizado dentro de la cápsula de Bowman, entre los capilares, se llama espacio urinoso.

El túbulo renal proximal se divide en dos partes: el túbulo contorneado proximal y el asa de Henle. El túbulo contorneado distal está a continuación del

asa de Henle y finalmente encontramos el túbulo colector. Éste recolecta la orina que se produce en las nefronas.

Los túbulos colectores, que se van uniendo, terminan en la papila renal que es por donde se drena la orina en los cálices renales, cuyo nombre se debe a que tienen forma de cáliz o copa y recogen la orina que se produce en el riñón.

Desde el punto de vista macroscópico, el riñón puede dividirse en dos grandes áreas: la corteza renal y la médula renal. La corteza contiene los glomérulos, los túbulos contorneados proximales y distales, y las arterias interlobulillares y peritubulares. La médula contiene las asas de Henle, los túbulos colectores y los vasos.

En cuanto a la circulación sanguínea renal, la sangre llega al riñón por la arteria renal, que nace de la arteria aorta y se subdivide después en las arterias interlobares, arqueadas e interlobulillares. De ésta sale la arteriola aferente, que como hemos dicho, forma el ovillo capilar glomerular. La cantidad de sangre que pasa por el riñón es aproximadamente un litro por minuto. La sangre proveniente de la arteria renal, tiene una presión del glomérulo de 75 mmHg, lo que posibilita su proceso de filtrado. Y aunque hay elementos que dificultan dicha filtración (presión osmótica de la sangre, presión del tejido renal y dentro del tubo renal), los glomérulos filtran más de 100 g de líquido por minuto. Este líquido contiene todos los elementos solubles del plasma sanguíneo, salvo las proteínas, lo que daría una enorme cantidad de orina que si se eliminara así haría que el organismo perdiese, junto con las sustancias que debe eliminar, otras que le son necesarias. Para evitar esto, los túbulos renales reabsorben aproximadamente el 99% del agua que filtran los glomérulos y seleccionan las sustancias que esa agua lleva disueltas, reabsorbiendo por completo algunas de ellas (tales como la glucosa) y dejando pasar parte de otras (como la sal)

El riñón mide la cantidad de sustancias químicas presentes en la sangre, como el sodio, el fósforo y el potasio, y permite eliminar el exceso de éstas o retenerlas para regular sus niveles en el cuerpo, del mismo modo que un termostato regula la producción de calor o permite el enfriamiento de una habitación para mantener su temperatura constante [14,15].

Las sustancias de desecho presentes en la sangre provienen de la ingesta y de los productos que se generan por la actividad del organismo. El cuerpo utiliza los

alimentos para obtener energía y para la reparación de los tejidos. Cuando ha utilizado lo que necesita de la comida, los desechos se envían a la sangre. Si los riñones no limpiasen la sangre de estos desechos, se produciría un aumento de los mismos en la sangre que dañarían al organismo.

Además de depurar la sangre, los riñones también desarrollan funciones metabólicas importantes y producen hormonas como:

- La eritropoyetina, hormona que estimula la producción de glóbulos rojos en el interior de la médula de los huesos.
- La renina, hormona que sirve para regular la presión arterial. Si el riñón detecta una presión baja, produce más renina para aumentar la presión.
- La forma activa de la vitamina D, que ayuda a regular el metabolismo calcio-fósforo y la secreción de hormona paratifoidea en las glándulas paratiroides.

2.3.1 Formación y Composición de la Orina

El ser humano elimina al día, aproximadamente, 1,4 litros de orina producida en el riñón a partir de la sangre que transporta la arteria renal. Cerca de la mitad de la materia sólida que contiene es urea, que es el principal producto de degradación del metabolismo de las proteínas. El resto incluye minerales tales como: sodio, potasio, calcio, magnesio, cloruro, sulfuro, amonio, además de creatinina, ácido úrico y bicarbonato. La sangre pasa por cada uno de los glomérulos, quedando retenidos en los mismos las sustancias de mayor volumen, mientras que el agua, las sales y la urea, entre otras, pasan desde las paredes de los capilares a la cápsula de Bowman. Por tanto, el glomérulo realiza la función de filtrar, mientras que la cápsula y los túbulos recogen la orina formada y la transportan a las vías urinarias para su posterior eliminación. Estos tres procesos pueden resumirse en:

- a) Ultra filtración a través de los capilares del glomérulo
- b) Reabsorción selectiva, tanto de agua como de los solutos, en el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y los conductos colectores.
- c) Secreción selectiva en la luz de los túbulos proximal y distal

a) Filtración Glomerular

Entre las principales funciones que realiza el riñón, para contribuir a mantener el equilibrio del organismo, una de las más importantes es sin duda la filtración glomerular. Grandes cantidades de ultra filtrado, libre de proteínas, son elaboradas diariamente en los glomérulos a partir del plasma que pasa por los capilares. El ultra filtrado glomerular, que en el ser humano representa 180 litros/día, corresponde a un volumen cuatro veces mayor al volumen hídrico total del organismo, más de diez veces el volumen del líquido extracelular y cien a doscientas veces la cantidad de agua ingerida diariamente (figura 2.5)

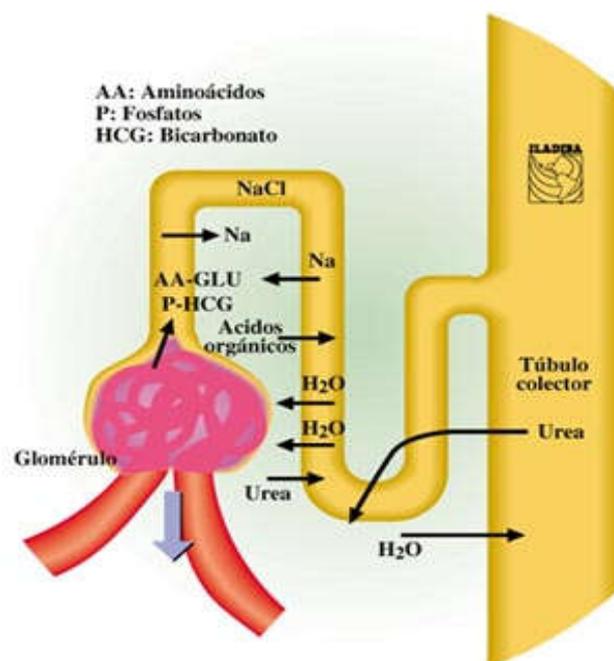


Figura 2.5 Representación esquemática de los procesos que ocurren en la nefrona durante la formación de la orina

Se denomina ultra filtrado, porque sólo contiene solutos de pequeño tamaño capaces de atravesar la membrana semipermeable que constituye la pared de los capilares. Ésta permite libremente el paso de agua y de sustancias disueltas con peso molecular inferior de 15000, mientras que es totalmente impermeable, en condiciones normales, a solutos con peso molecular superior a 70000 y deja pasar, en cantidad variable, los de peso molecular comprendidos entre 15000 y 70000. Así

la orina primitiva, que se recoge en el espacio urinario del glomérulo, y que a continuación pasa al túbulo proximal, está constituida por agua y por pequeños solutos en una concentración idéntica a la del plasma y carece de células, proteínas y otras sustancias de peso molecular elevado.

Los factores que influyen en la filtración glomerular son: el flujo sanguíneo y el efecto de las arteriolas aferente y eferente, ya que el diámetro de la arteriola aferente es mayor que el de la eferente, por lo que soporta la presión mayor en el cuerpo.

La filtración glomerular se produce por la interacción de diferentes fuerzas físicas. El volumen filtrado está determinado, por una parte, por la diferencia entre la presión hidrostática y la coloidosmótica transcapiulares y, por otra parte, por el coeficiente de ultra filtración. La presión sanguínea en el interior del capilar favorece la filtración glomerular; por su parte, la presión ejercida por las proteínas del plasma y la presión hidrostática del espacio urinario actúan en contra de la filtración. La resultante del conjunto de dichas fuerzas es la que condicionará la mayor o menor cantidad de filtrado producido por cada glomérulo. Por lo que se deduce que, si la presión hidrostática capilar disminuye considerablemente, como en casos de hipotensión severa, la presión de filtración podrá llegar a cero y cesar el filtrado glomerular.

Para la medición del filtrado glomerular existen diferentes métodos. El aclaramiento de insulina es el método que produce una menor incertidumbre, pero tiene el inconveniente de tratarse de una sustancia no endógena y que, por tanto, debe infundirse durante la prueba. La concentración de urea plasmática es un índice poco fiable dado que, además de filtrarse por el glomérulo, la urea es también, en determinadas circunstancias, reabsorbible y secretada por el túbulo renal en cantidad considerable. El método más utilizado es el de la concentración plasmática de creatinina y el cálculo de su aclaramiento. La creatinina es una sustancia producida en el organismo que se filtra en el glomérulo y que no sufre grandes modificaciones a lo largo del túbulo renal. Para obtener un resultado fiable, es fundamental la correcta recogida de la orina de 24 horas. En un adulto, el valor normal del aclaramiento de creatinina oscila entre 90 y 110 mL/mm. [7,15,16].

b) Reabsorción selectiva

b.1) Función Tubular

Tras formarse en el glomérulo el ultra filtrado del plasma, el túbulo se encarga, en sus diferentes porciones, de modificar la composición de dicho ultra filtrado hasta formar orina de composición definitiva, que se elimina al exterior a través de la vía excretora.

Normalmente de los 600 mL. de plasma que fluyen por los riñones en un minuto, se filtran 120 mL., este ultra filtrado llega al túbulo contorneado proximal, asa de Henle, túbulo contorneado distal y tubo colector. En todo este recorrido sufre una serie de modificaciones en su composición, hasta la formación de orina final. Para ello se vale de mecanismos de transporte iónico de reabsorción tubular, secreción y excreción tubular. Estos movimientos iónicos pueden ser activos o pasivos.

Conforme el filtrado glomerular circula a lo largo del túbulo renal, la mayor parte del agua y de los solutos sufren un proceso de reabsorción desde la luz tubular hacia los capilares peritubulares. Esta reabsorción se caracteriza por ser cuantitativamente elevada. Así el agua se filtra en el glomérulo en el lapso de 24 horas, en cuantía de 180 litros, de los cuales se reabsorben en los túbulos 178.5 litros y se eliminan, con la orina, aproximadamente, tan solo 1.5 litros. Otras sustancias como la glucosa y aminoácidos son reabsorbidos casi totalmente. La urea se reabsorbe solo parcialmente, eliminándose con la orina en cantidades variables.

La mayor parte de los iones existentes en el filtrado glomerular, como es el caso del sodio, cloruro, potasio, calcio, fósforo y magnesio, se reabsorben casi completamente para mantener constante la composición química del medio interno [7,16].

b.2) Túbulo Proximal

En el túbulo proximal se reabsorbe alrededor del 50 al 60% del filtrado glomerular.

Dicha reabsorción se produce como consecuencia de las modificaciones de las fuerzas que determinan la filtración glomerular en los capilares peritubulares. Ello condiciona la recuperación de un volumen importante de líquido filtrado y contribuye fundamentalmente a mantener el líquido del espacio extracelular. En los capilares peritubulares se presenta una disminución de la presión hidrostática frente a un aumento de la presión coloidosmótica, como consecuencia del filtrado glomerular libre de proteínas.

Así, a nivel del túbulo proximal, el sodio y el agua son reabsorbidos en proporciones isosmóticas, lo que provoca que la osmolalidad del líquido tubular se mantenga semejante a la del plasma durante todo su recorrido. Una de las funciones más relevantes que se lleva a cabo en el túbulo contorneado proximal es la regulación del equilibrio ácido-base, ya que a este nivel se recupera el bicarbonato casi en su totalidad. En realidad no se trata de un proceso de reabsorción. Por el contrario, el bicarbonato se comporta como un ión no reabsorbible. Lo que sucede es que los iones bicarbonato del fluido tubular no atraviesan la barrera celular, sino que quedan retenidos por ella. En este proceso juega un papel importante la anhidrasa carbónica, por su acción catalizadora, acelerando la formación de ácido carbónico a partir del anhídrido carbónico y agua.

b.3) Asa De Henle

El Asa de Henle presenta una configuración muy similar a la de una horquilla. Está formada por una rama delgada descendente, una rama delgada ascendente y una rama gruesa ascendente. Fisiológicamente el asa de Henle reabsorbe aproximadamente un 25% del sodio y del cloro filtrados y alrededor de un 15% del agua filtrada. El líquido que llega al asa de Henle es isotónico respecto al plasma (tiene una osmolaridad de 285 mOsm/l), por lo que el líquido que sale es forzosamente hipotónico (150 mOsm/l.)

El paso de sodio al tejido intersticial determina una hipertonicidad, que es muy importante para que el riñón pueda concentrar o diluir la orina y mantener así el balance hídrico del organismo. Esa hipertonicidad del líquido intersticial del riñón se incrementa conforme el asa de Henle penetra en la zona medular, alcanzando valores máximos de 1.200 mOsm/Kg a nivel de la papila renal [16].

b.4) Túbulo Distal

En el túbulo distal se completa la reabsorción del sodio y cloro que no ha sido reabsorbido en el túbulo proximal, lo que representa, aproximadamente, el 9% del sodio total filtrado. La reabsorción es de tipo activa y está controlada por la acción de la bomba de Na^+K^+ /ATPasa. La reabsorción del cloro es, por el contrario, de tipo pasiva y viene favorecida por el gradiente de potencial eléctrico.

c) Secreción selectiva

c.1) En el Túbulo proximal

Otra función importante que se realiza a nivel de los túbulos renales es la secreción tubular, que constituye la vía de eliminación de diversas sustancias extrañas al organismo. La secreción en los diferentes segmentos del túbulo se realiza de forma activa o pasiva. El transporte activo determina un consumo de energía, y ello implica siempre consumo de oxígeno, producción de CO_2 y liberación de lactato. Esta energía proviene del metabolismo celular y es utilizada por las bombas de transporte. Las bombas son del tipo ATPasa que utiliza la energía desprendida de la hidrólisis de transformación de ATP a ADP. La energía se utiliza para el transporte de los solutos: Na^+ ; Ca^{++} ; y H^+ fuera de la célula (Bombas Na^+K^+ - ATPasa, Ca^{++} -ATPasa e H^+ - ATPasa)

Algunas sustancias como la glucosa, para que se realice su reabsorción, requieren de mecanismos de transporte tubular (capacidad de transporte máximo) que fluctúan entre 300 a 375 mg/min. En condiciones normales, toda la glucosa filtrada es reabsorbida y no aparece en la orina. Si la concentración de glucosa en sangre aumenta por encima de un nivel crítico, la cantidad de glucosa filtrada sobrepasa la máxima capacidad de reabsorción tubular y ésta aparece en la orina. El transporte tubular pasivo se realiza gracias a un gradiente, ya sea de concentración o electroquímico, que no requiere consumo de energía.

El agua sigue en forma pasiva a los solutos reabsorbidos, primero hacia el interior de la célula y luego hacia el capilar peri-tubular, gracias al gradiente de presión osmótica que genera el transporte de los solutos. Por su parte, la urea es

reabsorbida parcialmente a través de mecanismos pasivos. Conforme el agua se reabsorbe, aumenta la concentración de urea en la luz tubular, lo que determina un aumento del gradiente de concentración que favorece la difusión de la urea hacia el interior de la célula [15,16].

c.2) En el Túbulo Distal

A nivel del túbulo distal se produce la secreción de H^+ , potenciada por la aldosterona, que es también activa y condicionada por la presencia de una bomba en la membrana celular. En relación con la secreción del potasio, ésta es de tipo pasivo y viene regulada por el elevado contenido intracelular de K^+ .

2.4 Hidrógeno metabólico en el ser humano

El hidrógeno (H_2) es, junto al nitrógeno (N_2), el dióxido de carbono (CO_2) y el metano (CH_4), uno de los gases que se encuentra en el interior del organismo humano. Un adulto normal expelle entre 400 y 650 mL de flatulencias por día, compuestas en un 50 % por N_2 , alrededor de un 40 % por CO_2 y pequeñas cantidades de CH_4 y H_2 . El CO_2 , CH_4 y H_2 son gases producidos durante la fermentación microbiana de carbohidratos en el intestino grueso [11]. El N_2 , por el contrario, procede del aire inhalado puesto que, al tratarse de un gas inerte, no interviene en ningún proceso metabólico.

2.4.1 Producción anaerobia del hidrógeno

a) Fermentación de las Enterobacterias

Una de las características de ciertas enterobacterias es su capacidad para fermentar directamente la lactosa de la dieta (disacárido compuesto por una molécula de glucosa y otra de galactosa). Gracias a la enzima β -galactósido-permeasa, la lactosa difunde a través de la pared celular de los microorganismos y posteriormente otra enzima, la β -galactosidasa, hidroliza el enlace

β -galactósido de la lactosa, liberando la glucosa que puede ser finalmente fermentada. Así, *Escherichia coli* y algunas especies de *Enterobacter*, consiguen glucosa a partir de lactosa, siendo consideradas como fermentadoras rápidas de la lactosa. Aquellas bacterias que poseen la β -galactosidasa pero carecen de la enzima β -galactósido-permeasa, o ésta presenta poca actividad, son consideradas fermentadoras lentas o no fermentadoras de la lactosa, dependiendo de la bibliografía que se consulte (tabla 2.2)

Tabla 2.2 Clasificación de la familia “*Enterobacteriaceae*” según la capacidad de fermentar lactosa

Fermentadores rápidos	Fermentadores lentos	No Fermentadores
<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Shigella</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Edwardsiella</i>
	<i>Yersinia</i>	<i>Proteus</i>
	<i>S. arizonae</i>	<i>Morganella</i>
	<i>S. sonnei</i>	<i>Providencia</i>

A partir de la glucosa, bien procedente de la lactosa o directamente de la dieta, las enterobacterias obtienen ácido pirúvico por fermentación de este azúcar siguiendo la vía de Embden-Meyerhoff, o vía glucolítica [12,13].

Las posteriores transformaciones que sufre el piruvato, llevan a obtener distintos productos finales (Tabla 2.3) cuya diferente proporción permite clasificar a las enterobacterias, en fermentadoras ácido mixtas o fermentadoras butanodiólicas, según se deriven, prioritariamente, hacia una u otra de las dos rutas metabólicas siguientes:

a.1) Fermentación ácido mixta

Mediante esta ruta (figura 2.6), a partir del piruvato se forman diversos ácidos: como láctico, acético, succínico y fórmico; gases CO₂ y H₂, y etanol. Por

convención, en este grupo se incluye a una bacteria cuando ésta produce suficiente ácido como para hacer descender el pH a un valor aproximado de 4,5 o inferior, independientemente de la generación de otros productos finales. Esta fermentación es característica de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Photobacterium* y *Vibrio*.

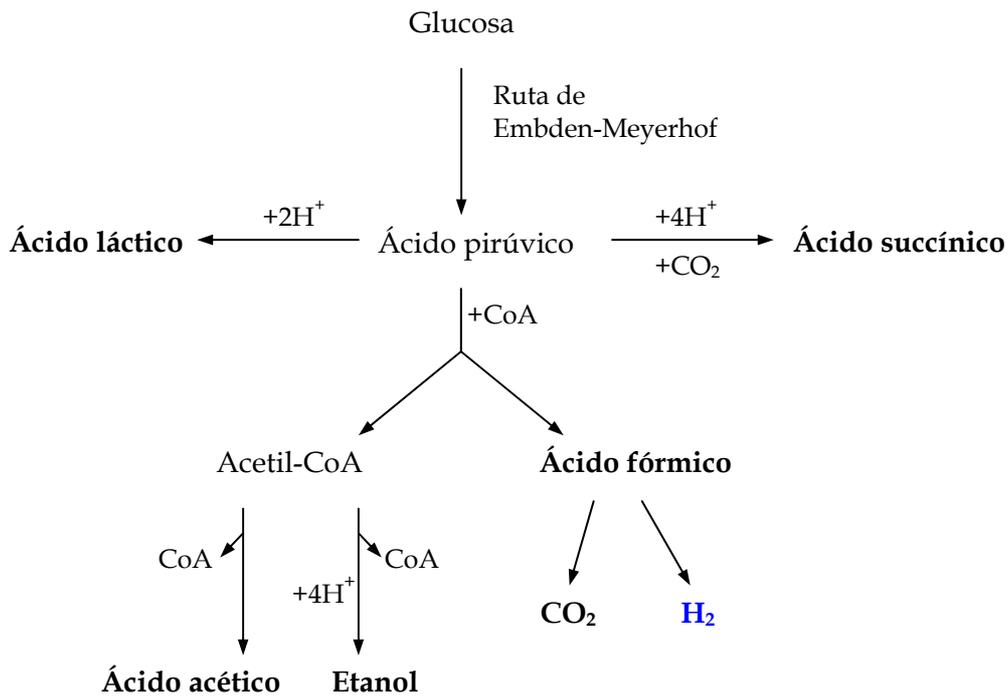


Figura 2.6 Esquema de las rutas metabólicas correspondientes a la fermentación ácido mixta, con indicación de los productos finales

Las proporciones relativas de los productos finales pueden variar considerablemente de una a otra bacteria, en función de cual sea la ruta seguida en la última parte del proceso de fermentación del ácido pirúvico (figura 2.6). En la Tabla 2.3 se presentan las cantidades producidas por algunas bacterias (*Escherichia coli*, *Aeromona s. punctata* y *Photobacterias phosphoreum*)

Tabla 2.3 Productos finales obtenidos a partir del ácido pirúvico, mediante las fermentaciones ácido mixta y butanodiólica.

	Moles de producto final por 100 moles de glucosa fermentada				
	Fermentación ácido mixta			Fermentación butanodiólica	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Aeromonas punctata</i>	<i>Photobacterias phosphoreum</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>
Etanol	50	64	8	70	46
2,3-Butanodiol	-	-	0.6	66	64
Ácido acético	36	62	44	0.5	4
Ácido láctico	79	43	42	3	10
Ácido succínico	11	22	6	-	8
Ácido fórmico	2.5	105	94	17	48
H ₂	75	-	55	35	-
CO ₂	88	-	48	172	116
Ácido formado	129	232	186	20	70

a.2) Fermentación butanodiólica

Esta ruta (figura 2.7) se caracteriza por la formación de grandes cantidades de butanodiol, así como de etanol, ácido fórmico y de gases CO₂ y H₂. Como norma general, se designa fermentación butanodiólica a aquella en que la producción de ácido es insuficiente para reducir el pH hasta un valor de 4,5. Esta fermentación es típica de *Enterobacter*, *Serratia*, *Erwinia* y de algunas especies de *Aeromonas* y *Photobacterium*. En la Tabla 2.3 se resumen las cantidades de productos obtenidas para el caso de algunas bacterias (*Enterobacter aerogenes* y *Serratia marcescens*)

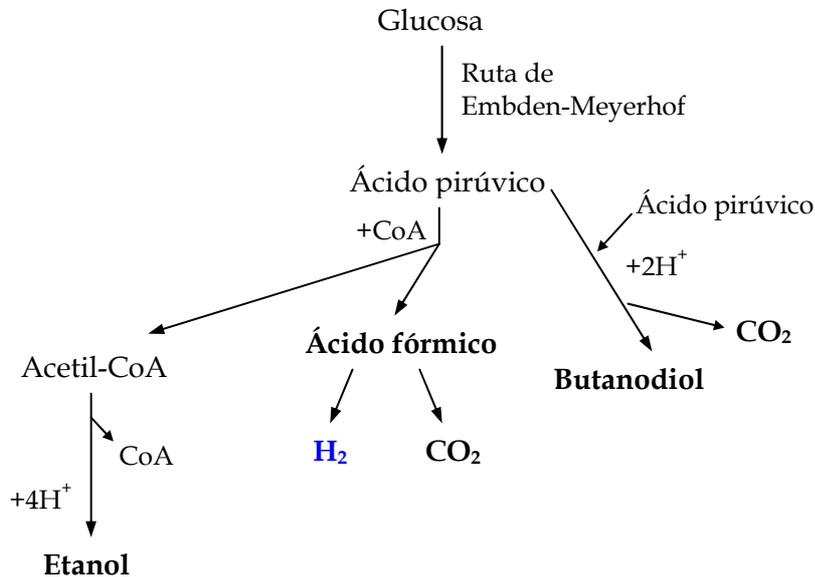
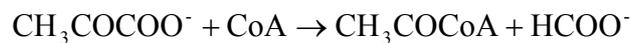


Figura 2.7 Esquema de las rutas metabólicas de la fermentación butanodiólica y productos finales obtenidos.

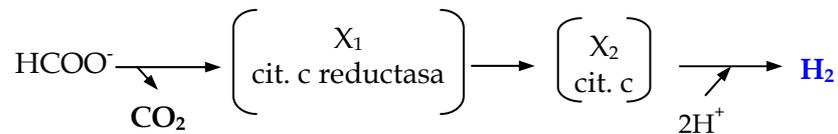
Como puede apreciarse al analizar los esquemas de ambas rutas metabólicas, la fermentación de enterobacterias presenta la característica bioquímica particular, que no se da en otras fermentaciones bacterianas, consistente en una escisión especial del ácido pirúvico para dar ácido fórmico, producto final que es, con frecuencia, mayoritario:



Piruvato

Formiato

Sin embargo, no siempre el ácido fórmico se acumula como producto final. Algunas de estas bacterias poseen el sistema enzimático hidrogenoliasa fórmica (compuesto por dos enzimas distintas: la deshidrogenasa fórmica soluble y la hidrogenasa unida a la membrana) que lo escinde en CO_2 y H_2 (figuras 2.6 y 2.7) según:



donde X_1 y X_2 son tan solo transportadores de electrones. X_1 puede ser un citocromo C reductasa y X_2 un citocromo C de bajo potencial redox (C_{552}) que únicamente se produce en las enterobacterias durante el crecimiento anaerobio.

Los organismos que teniendo hidrogenoliasa fórmica desarrollan la fermentación ácido mixta, producen cantidades equimoleculares de CO_2 y H_2 y los de la butanodiólica, más CO_2 que H_2 . Esto se debe a que los primeros producen únicamente CO_2 a partir de ácido fórmico, mientras que los fermentadores butanodiólicos generan CO_2 adicional en las reacciones que producen butanodiol. La formación de gas y el tipo de éste, sirve para la diferenciación taxonómica en el grupo entérico [9, 12, 13].

b) Fermentación de los clostridios

Como se ha indicado en el epígrafe 2.2, la formación de hidrógeno molecular como producto final de la fermentación de azúcares, es también característica de muchos endosporulados del grupo de los clostridios del ácido butírico.

La fermentación butírica que éstos llevan a cabo, se inicia, de igual manera, con la conversión de los azúcares en piruvato a través de la ruta de Embden-Meyerhof o vía glucolítica. El piruvato obtenido se oxida a acetyl-CoA y CO_2 , con la ferredoxina como aceptor de electrones. La reoxidación posterior de la ferredoxina por la hidrogenasa de la bacteria, es la responsable de la producción de H_2 . Este conjunto de reacciones constituyen lo que se denomina el “complejo piruvato-ferredoxina oxidorreductasa” [9, 11] (figura 2.8)

Ejemplos de clostridios productores de gas hidrógeno que habitan normalmente en el intestino del hombre, son las siguientes especies sacarolíticas: *C. indolis*, *C. innocuum*, *C. methylpentosum*, *C. clostridioforme*. El *C. perfringens*, dada su capacidad para degradar no solamente azúcares sino también proteínas, está encuadrado dentro de un grupo intermedio entre los clostridios sacarolíticos y los proteolíticos.

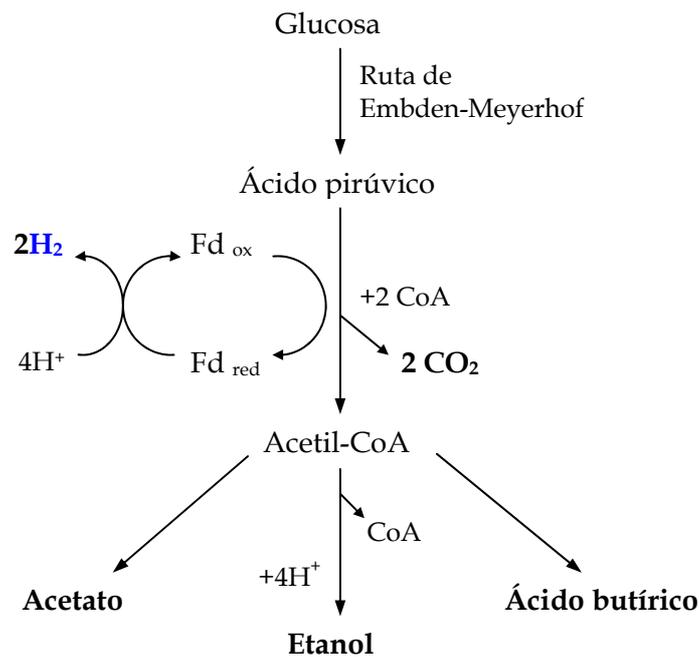


Figura 2.8 Esquema metabólico de la fermentación de azúcares por las bacterias del ácido butírico del género *Clostridium*, con indicación de sus productos finales.

2.4.2 Vías de excreción del hidrógeno

El hidrógeno metabólico producido por la flora bacteriana durante la fermentación de carbohidratos, no es metabolizado por las células de los mamíferos, por lo que debe ser eliminado.

Una parte de este gas es eliminado por vía anal, a través del flato. Otra parte es absorbida a través de la pared intestinal del colon, incorporándose al torrente circulatorio. Una vez en la sangre, es excretado por diversas vías, entre ellas en el aire expirado. Estas dos formas de excreción han sido las que, tradicionalmente, han recibido mayor atención por parte de los científicos [17, 18].

Actualmente se sabe que una parte importante del hidrógeno producido por fermentación bacteriana, es metabolizada por los propios microorganismos del colon consumidores de hidrógeno. Estudios realizados en intestinos aislados de ratas normales, a los cuales se les instiló hidrógeno gas, permitieron comprobar que más del 90 % del mismo fue metabolizado; mientras que en intestinos libres de bacterias, prácticamente todo el hidrógeno suministrado fue recuperado [19].

Christl et al. han demostrado que la cantidad total de H₂ excretado después de la ingestión de lactulosa constituye, en realidad, sólo una parte del hidrógeno producido por la fermentación microbiana, por lo que “hidrógeno excretado” no es sinónimo de “hidrógeno producido”. Sin embargo, a efectos prácticos, se puede considerar que la velocidad de excreción se corresponde con el balance total entre la velocidad de producción real y la de desaparición de hidrógeno por consumo por la flora.

Tres especies de microorganismos del colon compiten por el hidrógeno molecular, producto de la fermentación de otros microorganismos anaerobios: las bacterias metanógenas o metanogénicas, las bacterias acetógenas o acetogénicas y las bacterias que reducen el sulfato a sulfuro. Estos tres procesos están muy influenciados por el pH del medio: en el caso de la metanogénesis ésta se ve favorecida en un pH neutro; la acetogénesis, por un pH ácido y la reducción de sulfato, por un medio alcalino [20]

a) Las bacterias metanogénicas son un grupo de arqueobacterias anaerobias estrictas, que generalmente reducen el CO₂ (proveniente de la fermentación de carbohidratos) a metano, utilizando como suministro de electrones, fundamentalmente el hidrógeno gaseoso, aunque también pueden oxidar otros productos tales como el formiato, el acetato, el metanol o ciertas metilaminas, todos ellos de igual procedencia. El metabolismo conjunto entre ambas bacterias, las anaerobias fermentadoras de azúcares y las metanogénicas, constituye un ejemplo clásico de sinergismo en busca de un afinado aprovechamiento de los recursos del medio en el que ambas se desarrollan. El esquema de la figura 2.9 representa este metabolismo para el caso de *Methanobacillus omelianskii*.

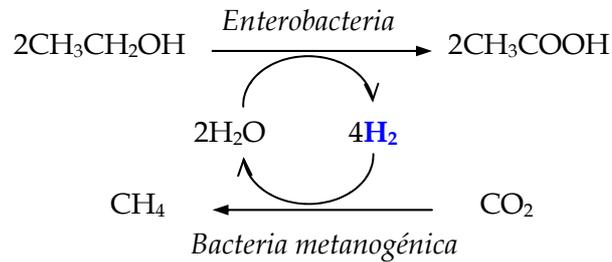


Figura 2.9 Sinergismo entre la producción de hidrógeno de una enterobacteria y su consumo por una bacteria metanogénica.

Las bacterias metanogénicas están presentes comúnmente tan sólo en el colon izquierdo, mientras que la producción de hidrógeno se realiza en todas las partes del mismo [21,22]. Como resultado de ello, una gran parte del hidrógeno producido pasa al torrente sanguíneo antes de llegar al colon descendente y poder ser consumido por las bacterias metanogénicas.

b) Las bacterias acetogénicas por su parte, también reducen el CO_2 , o cualquier otro precursor que contenga un sólo átomo de carbono, a acetato. Asimismo, obtienen acetato, utilizando el H_2 como reductor. Este grupo incluye ciertas bacterias del ácido butírico del género *Clostridium* que, utilizando el CO_2 y el H_2 , productos de su propia fermentación de azúcares, obtienen un nuevo mol de acetato. Este peculiar mecanismo las hace merecedoras de la denominación de bacterias heteroacetógenas. El esquema de este metabolismo se muestra en la figura 2.10 [22].

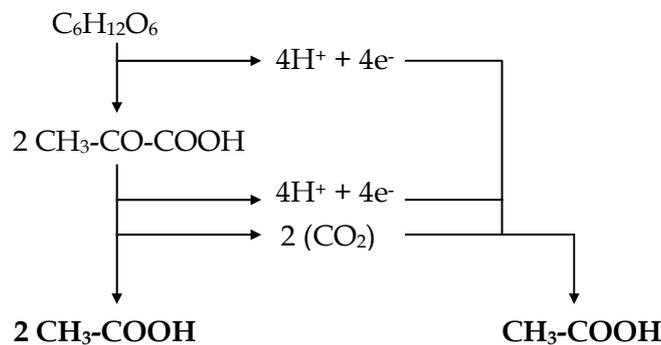


Figura 2.10 Formación de ácido acético por las bacterias acetogénicas del grupo del ácido butírico del género *Clostridium*, a partir de CO_2 y H_2 producidos en sus propios procesos de fermentación.

c) Las **bacterias reductoras del sulfato** son microorganismos anaerobios estrictos que, al igual que las anteriores, utilizan su propio hidrógeno molecular en la reducción del SO_4^{2-} a S^{2-} al poseer, lo mismo que los clostridios, el complejo piruvato-ferredoxina oxidorreductasa. El H_2 difunde a través de la membrana celular hacia el exterior. Si en el citoplasma de la bacteria hay SO_4^{2-} disponible, el gas es oxidado por una hidrogenasa periplasmática, que transfiere los electrones al interior de la célula para reducir al sulfato. En el caso de que no haya SO_4^{2-} disponible, el H_2 es metabolizado por otras bacterias como, por ejemplo, las metanogénicas. Ejemplos de bacterias reductoras de sulfatos son: *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfovibrio vulgaris* [22,23] (figura 2.11)

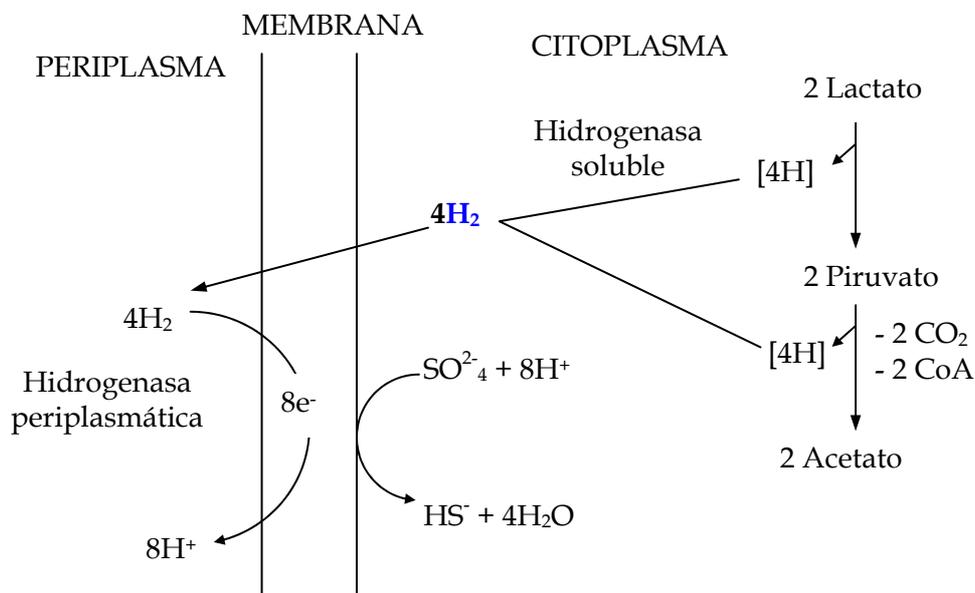


Figura 2.11 Ciclo del hidrógeno en las bacterias reductoras del azufre.

2.5 Trastornos gastrointestinales acompañados de producción de hidrógeno

2.5.1 Intolerancia a la lactosa

Por diversas razones, que pueden ser un defecto genético, una enfermedad, el declive fisiológico debido a la edad, o como resultado de "ataques" específicos

sobre la mucosa intestinal producido por ciertos fármacos o alimentos [10], tiene lugar el proceso conocido como *malabsorción*, por el que ciertos elementos de la dieta no se absorben por completo. Casos bien conocidos de este tipo de dolencia son: la enfermedad celíaca en el adulto, la enfermedad de Crohn, complicaciones de la diabetes mellitus y de la pancreatitis, o las cicatrices del intestino delgado derivadas de largas extirpaciones. Además, se ha demostrado en pacientes alcohólicos que el incremento excesivo de la ingesta de alcohol puede causar lesiones en la mucosa del intestino, disminuir la actividad de las enzimas disacaridasas de la mucosa, así como aumentar la secreción intestinal de agua y solutos y disminuir la absorción intestinal de nutrientes. Todas estas afecciones son causa de una disminución en la capacidad de la pared intestinal para absorber nutrientes [10].

Numerosos son los problemas y trastornos metabólicos que una malabsorción puede provocar. De entre ellos destacan algunos muy significativos, como es la anemia ferropénica, o importantes deficiencias de vitamina D, B2, ácido fólico, etc.

La carencia de lactasa (enzima β -galactosidasa) producida por la mucosa del intestino delgado y responsable de la hidrólisis de los enlaces β -1,4-galactosídico del azúcar de la leche o lactosa, hasta su conversión en los monosacáridos glucosa y galactosa (figura 2.12), desencadena uno de los procesos más comunes de malabsorción en el hombre: la denominada *intolerancia a la lactosa*, absoluta o en diferentes grados [9].

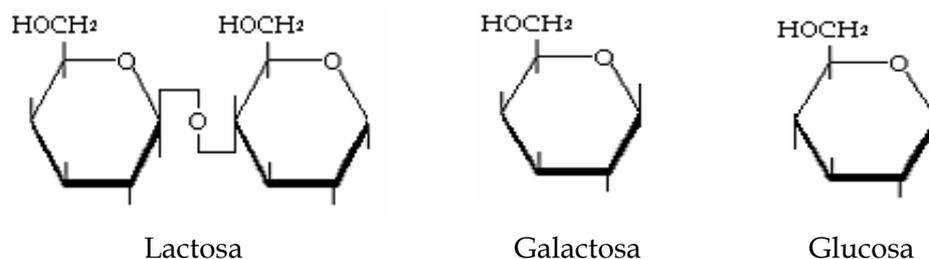


Figura 2.12 Estructuras del disacárido de la leche (lactosa) y de los monosacáridos (glucosa y galactosa), productos de su hidrólisis por acción de la enzima β -galactosidasa.

La intolerancia a la lactosa puede comenzar en diversos momentos de la vida.

El organismo de los bebés produce esta enzima, de tal forma que éstos pueden digerir la leche, incluyendo la leche materna. Antes de que el ser humano se convirtiera en granjero y procesara productos lácteos, la mayoría de las personas no continuaban consumiendo leche a lo largo de su vida, de tal manera que, después de las primeras etapas de la infancia, cesaba la producción de lactasa. Es por ello que las personas pertenecientes a culturas en las que el consumo de leche y de productos lácteos, entre los adultos, se presentó de forma más temprana, tienen menos probabilidades de sufrir intolerancia a la lactosa que aquellos pertenecientes a pueblos o culturas en los que el consumo de productos lácteos comenzó más recientemente. Como consecuencia de lo anterior, la intolerancia a la lactosa es más común en poblaciones asiáticas, africanas, afroamericanas, nativos americanos y pueblos del Mediterráneo, que en las poblaciones del norte y occidente de Europa.

De forma general, la escasa o nula producción de lactasa viene producida por un defecto genético o por un daño en la mucosa intestinal. Es por esto que la intolerancia se clasifica en dos tipos:

- *Intolerancia primaria o genética:* como consecuencia de la cual se produce una pérdida progresiva de la producción de la lactosa y, por tanto, una pérdida gradual de la capacidad de digerir la leche. Tiene una causa genética y suele darse, a lo largo de la vida, en ciertos grupos étnicos. Suele ser progresiva y permanente. Las personas con esta intolerancia van notando cómo la ingesta de leche les causa cada vez más síntomas.
- *Intolerancia secundaria:* en la que la disminución de la producción de lactosa es secundaria, ya que esta inducida por un daño intestinal temporal, causado generalmente por una gastroenteritis vírica. Es transitoria. Este tipo de intolerancia es muy frecuente en la infancia tras un episodio de gastroenteritis agudo.

La lactosa sin hidrolizar, imposible de ser absorbida, se acumula en el lumen del intestino delgado y la entrada de líquido hacia la luz del mismo, por efecto osmótico, produce el síntoma característico de la diarrea. Por otro lado, la fermentación de este azúcar, por acción de la enzima β -galactosidasa de las bacterias, con el consiguiente desprendimiento de gas, origina distensión intestinal y flatulencias. Para las personas con intolerancia a la lactosa, la eliminación de la

leche de la dieta puede causar una deficiencia de calcio, vitamina D, riboflavina y proteínas [23].

2.5.2 Infecciones intestinales

El exceso en la producción de hidrógeno puede ser debido, no sólo a una intolerancia al azúcar de la leche, como se ha visto en el epígrafe anterior, sino también a una infección intestinal. Como es sabido, una infección intestinal se produce cuando algunos agentes infecciosos, como virus o bacterias patógenas, se instalan y se reproducen en los intestinos y/o en el estómago, provocando alteraciones de diversos tipos y de gravedad variable. Los síntomas más frecuentes en las infecciones intestinales son: diarrea, dolores abdominales, vómitos, cólicos, flatulencia abundante e incluso presencia de sangre en las heces.

Las infecciones intestinales que generan un exceso de secreción de hidrógeno son causadas, fundamentalmente, por enterobacterias. Éstas se transmiten, casi exclusivamente, por contaminación fecal de aguas y alimentos, por lo que su erradicación se logra, principalmente, mediante un control sanitario adecuado. *E. coli* es la enterobacteria que tradicionalmente se utiliza, junto con el *Streptococcus fecalis* (bacteria del ácido láctico), como índice de contaminación fecal.

Como sabemos, la mayoría de las enterobacterias constituyen parte de la flora anaerobia habitual del tubo digestivo del hombre, aunque son también agentes patógenos oportunistas. Esto es, son capaces de expresar su acción patógena cuando se encuentran disminuidas las defensas del hospedador, causando las denominadas infecciones oportunistas (fuera o dentro del tubo digestivo). Asimismo, tal acción patógena puede sobrevenir cuando existen alteraciones de las mucosas que sirven de barrera frente a la flora comensal, en cuyo caso estas bacterias alcanzan zonas altas del intestino en las que no son habituales. Ejemplos de estas enterobacterias productoras de gas hidrógeno son: *E. coli*, *Proteus* y *Providencia*. La existencia de microorganismos en el intestino delgado, fuera de su hábitat normal, facilita que éstos entren en contacto con los azúcares de la dieta aún sin hidrolizar. La fermentación masiva de estos azúcares provoca, además de un proceso de malabsorción en el huésped, abundante cantidad de hidrógeno que es el responsable de las flatulencias, los cólicos y la distensión intestinal. Si los microorganismos infecciosos o sus toxinas acaban por verterse en la sangre puede

producirse una enfermedad más generalizada [13].

Existe también un grupo reducido de enterobacterias patógenas estrictas que, por lo general, no forman parte de la flora intestinal pero que, sin embargo, pueden dar lugar a alteraciones diversas, en su mayoría en el tubo digestivo (enteritis), en huéspedes normales. Algunos ejemplos que producen hidrógeno son la *E. coli* (que provoca diarrea) y *Salmonella*.

La toxicidad de las enterobacterias es debida a factores diversos:

- Presencia de antígenos estructurales de superficie, como el antígeno somático o antígeno O y el antígeno capsular o antígeno K. Este último se encuentra en algunas cepas productoras de hidrógeno de *E. coli* y *Salmonella*.
- Producción de bacteriocinas (proteínas que presentan propiedades tóxicas), como ocurre con algunas cepas de *E. coli*.
- Presencia de una endotoxina ligada al lípido A (fracción interna del lipopolisacárido de la pared celular de las bacterias Gram negativas)
- Producción de exotoxinas enterotropas. Las enterotoxinas más conocidas son las de *E. coli* y se supone que también existen en *Salmonella*.

Algunas bacterias del género *Clostridium*, productoras de hidrógeno, como por ejemplo *Clostridium perfringens*, son responsables de intoxicaciones alimentarias. La contaminación de los alimentos por sus esporas es difícil de evitar al estar ampliamente distribuido en el suelo, el aire y el agua. Sin embargo, la intoxicación sólo se produce tras ingerir un gran número de células vegetativas vivas del microorganismo. Una vez en el interior del tracto gastrointestinal, *C. perfringens* encuentra las condiciones adecuadas de temperatura y baja presión parcial de oxígeno, para poder proliferar. Los síntomas de la infección son, como en otros productores de gas: dolor abdominal y diarrea, acompañados en algunos casos por vómitos y raramente fiebre. Además, produce una enterotoxina que actúa a nivel del intestino delgado agravando el cuadro clínico.

Otro miembro del género *Clostridium*, no productor de hidrógeno, es el *C. botulinum*, responsable de la conocida intoxicación botulínica. La fuente más común son los alimentos enlatados que no han sido calentados lo suficiente para destruir las esporas. Esta bacteria libera una toxina, que no se inactiva por el pH ácido del estómago, que es activada por la enzima tripsina del estómago [9,22,23].

2.6 Determinación de hidrógeno biológico

2.6.1 Revisión de los diferentes métodos clínicos actuales

En bioquímica clínica están descritos una gran variedad de métodos para detectar la malabsorción de azúcares. Todos ellos pueden ser clasificados en cuatro tipos diferentes, presentando cada uno de ellos desventajas específicas.

- a) En primer lugar está la determinación de los niveles de glucosa en sangre, tras una dosis administrada por vía oral. Este método parece presentar, como señalan algunos autores [24], una elevada incidencia en resultados “falsos positivos”. Al paciente se le suministran 100 gramos de lactosa y las muestras de sangre se toman a los 30, 60 y 120 minutos siguientes a la ingesta. Normalmente, debe aparecer un aumento de 2mg/dl de glucosa a las 2 horas de la ingesta de la lactosa.
- b) En segundo lugar, está el diagnóstico clínico de la intolerancia infantil a la lactosa, mediante la detección del exceso de sustancias reducidas en las heces [25,26]. Este es, también, un método cuestionado, puesto que la fiabilidad de sus resultados depende estrechamente de la correcta toma de la muestra [27].
- c) Un tercer tipo de prueba consiste en la extracción de material de la mucosa del intestino delgado del paciente y la posterior comprobación, *in vitro*, de la disminución de la actividad enzimática (en el caso particular de la lactosa, de la actividad lactásica). La biopsia del intestino delgado puede obtenerse por EGD (esófagogastroduodenoscopia) u otra endoscopia del tracto gastrointestinal superior. Para la toma de las muestras de tejido, se introduce un tubo flexible de fibra óptica (endoscopio) bien a través de la boca o de la nariz, hacia el tracto gastrointestinal superior. Las muestras obtenidas durante la endoscopia son examinadas en el laboratorio para constatar la presencia, o no, de lactasa en la mucosa intestinal. Esta técnica, además de ser altamente invasiva, no facilita, según consta en la bibliografía, resultados que presenten una buena correlación con el diagnóstico clínico de la intolerancia a los azúcares [28].
- d) Por último, hay que mencionar los métodos basados en la medida del H₂ producido en la fermentación de carbohidratos por las bacterias que habitan en el colon. Los intentos de medir este gas en adultos, cuando dicho gas es

eliminado por vía rectal, no han dado buenos resultados ya que, generalmente, los tubos utilizados se obstruyen y, en ocasiones, se rompen originando daños en la parte final del recto y dolor al paciente [29,30]. Recientemente se han descritos métodos basados en la evaluación de los cambios producidos en las concentraciones de hidrógeno, o de anhídrido carbónico marcado isotópicamente, espirados después de la ingestión de una sobredosis del hidrato de carbono correspondiente y tras un periodo previo de ayuno [31,32,33].

El análisis del aire espirado suministra una valiosa información, no sólo sobre la concentración de hidrógeno, sino también de otros productos metabólicos de relativo bajo peso molecular, como son, por ejemplo, ácidos grasos volátiles, cetonas, mercaptanos, sulfuro de dimetilo, aminas, y sustancias tóxicas volátiles incorporadas al organismo, tales como monóxido de carbono, o ciertos alcoholes [31,34].

En general, en individuos sanos, la producción de hidrógeno es pequeña. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que cuando existe una malabsorción de algún azúcar, la producción de hidrógeno se ve incrementada. La buena correlación que se ha encontrado entre la velocidad de producción de hidrógeno intestinal y la de excreción de este gas por vía pulmonar [35,36], ha impulsado el desarrollo de este último método en el diagnóstico, no solamente de las alteraciones en la digestión de algunos glúcidos, sino también en la estimación del grado de desarrollo de la flora microbiana y de la medida del tiempo de tránsito intestinal.

De los estudios fisiológicos de Christl et al. sobre excreción de hidrógeno, se deduce que la vía pulmonar contribuye con un 50 % al total del hidrógeno eliminado. Sin embargo, estos valores pueden variar en función de la velocidad de excreción. A muy bajas velocidades (menor a 50 mL/15 h) la mayor parte del hidrógeno es eliminado a través de los pulmones, mientras que la excreción pulmonar cae hasta un 15 % del total, cuando las velocidades de excreción son elevadas (600 mL/15 h). Los autores atribuyen esta importante declinación de la excreción de H₂ en el aliento, a la rápida propulsión del gas a lo largo del colon y/o a la saturación de la absorción de H₂ en el torrente circulatorio, debido a sus elevadas concentraciones. Aunque la mayoría de los estudios hechos dan validez a las medidas de H₂ espirado como una simple medida del total de este gas

eliminado, es importante tener en cuenta que la relación lineal entre hidrógeno eliminado en el aliento y eliminado por el flato, se rompe durante aquellos periodos donde la velocidad de eliminación es muy baja o muy alta [29].

Debido a que la concentración de hidrógeno espirado es normalmente baja (8 ppm), los primeros métodos desarrollados consistían en respirar en un *sistema cerrado*, al objeto de concentrar el gas, terminando con una larga espiración forzada. El tiempo de muestreo podía variar entre unos minutos y varias horas, según la técnica. La toma de las muestras se realizaba periódicamente a partir del *sistema cerrado* y la velocidad de eliminación pulmonar de H₂ se calculaba a partir del volumen de gas del *sistema cerrado* y la concentración de H₂ presente en las muestras [35].

En otros casos, el paciente expulsa el aire a través del denominado tubo de Haldane-Priestley, o cualquiera de sus modificaciones posteriores. Básicamente, este aparato consiste en un tubo de plástico de 120 cm de longitud y 25 mm de diámetro, en uno de cuyos extremos se coloca una boquilla, para facilitar que el paciente expela su aire pulmonar, y en el otro una jeringuilla plástica de, al menos, 30 mL de capacidad [34]. Las muestras se recogen de la última porción del aire exhalado (que es donde se encuentra el H₂ alveolar) tras una espiración forzada y profunda del paciente, utilizando la jeringuilla.

No es recomendable el uso de esta técnica en pacientes con problemas pulmonares, al no poder garantizar que la mezcla de gas alveolar recogida sea representativa.

Cuando los pacientes son niños, se utilizan dispositivos de diferentes diseños para la recolección del aire. Diseños que van desde incómodas pinzas sujetas a la nariz, hasta máscaras faciales que van firmemente sujetas a la nariz y la boca del niño.

Las diferentes técnicas descritas en la bibliografía para el análisis de la concentración de H₂, pueden ser clasificadas en varios grupos. Las más extendidas son aquellas que usan un cromatógrafo de gases, constituido bien por un detector de ionización de helio (DIHe) con una fuente radiactiva [31], un detector térmico conductimétrico [34,35,37], o un sensor semiconductor que disminuye su resistencia tras la adsorción sobre él de gases reductores [34]. Otro grupo de técnicas utilizan un sensor electroquímico constituido por una membrana no

porosa, pero permeable al gas, metalizada con una fina capa de platino. Esta membrana funciona como un electrodo de trabajo de una célula polarográfica, de la cual el gas en estudio toma o cede electrones (reduciéndose u oxidándose respectivamente). El potencial de este electrodo se mantiene constante, respecto del electrodo de referencia, mediante el empleo de un potencióstato en la región de potencial donde el gas es electroquímicamente activo en el electrodo de trabajo. La magnitud de la corriente producida por la reacción electroquímica es proporcional a la concentración de gas (presión parcial). Cuando este dispositivo es sensible tanto a H₂, como al CO₂ e incluso a O₂, la separación de los gases, antes de la entrada al detector, se lleva a cabo con una columna cromatográfica. De acuerdo con la bibliografía, estos métodos pueden ser capaces de detectar hasta 0.25 ppm de hidrógeno [38,39].

2.6.2 Método utilizado en el Hospital Universitario de Canarias

Desde enero de 1991 hasta el momento actual, la unidad de pediatría del Hospital Universitario de Canarias (dependiente de la Unidad Departamental universitaria de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna), realiza la determinación, en niños, de hidrógeno en aire espirado, para el diagnóstico de la malabsorción de carbohidratos (intolerancia a la lactosa), de infecciones gastrointestinales y para valorar el tiempo de tránsito intestinal.

Puesto que las muestras de orina de pacientes que en un futuro vamos a manejar serán suministradas por esta unidad y nuestros resultados comparados con los del hospital, parece conveniente describir aquí la metodología seguida por el equipo de profesionales de este Hospital.

Cuando un niño –que presenta un “cuadro” con continuas molestias gastrointestinales, diarreas y flatulencias– acude al hospital, el médico puede sospechar que se encuentra ante un caso de infección intestinal o de una intolerancia a la lactosa y, por tanto, solicita una determinación del hidrógeno espirado.

La correcta realización del Test de hidrogeno espirado exige que el paciente siga las siguientes normas (a continuación se transcriben, textualmente, las instrucciones que suministra el hospital) [40]

1. No padecer o haber padecido la semana anterior al examen, algún proceso respiratorio (faringoamigdalitis, bronquitis, etc.) o diarreas, ni estar sometido a tratamiento antibiótico.
2. Haber dormido bien y estar en ayunas desde las diez de la noche del día anterior a la prueba. Los lactantes pueden hacer ayuno desde 8 horas antes solamente.
3. No ingerir alcohol ni bebidas carbonatadas o gasificantes, ni comer alimentos ricos en azúcares (mermeladas, pasteles, etc.) o féculas (lentejas, garbanzos, guisantes, judías, espárragos, col, etc.) durante los tres días anteriores al análisis.
4. No utilizar enemas o laxantes en los tres días previos a la prueba.
5. El día en el que se realiza la prueba, el paciente tras espirar aire la primera vez, tiene que tomar en su totalidad una dosis de leche sola, sin azúcar, o una disolución de lactulosa, sin vomitar, ni comer nada más durante la prueba.

El objetivo del periodo de *semi-ayuno* al que se somete al paciente, es obtener la mejor correlación posible entre la cantidad de hidrógeno detectada durante la prueba y una dosis de azúcar suministrada.

Cuando el sujeto es sospechoso de poseer una infección intestinal, dicha dosis suministrada consiste en la ingestión de 250 mL de una disolución de un azúcar no metabolizable por el organismo (lactulosa), preparada con 0,5 mL de lactulosa por Kg. de peso del paciente (hasta un máximo de 20 mL). Por el contrario, cuando existen indicios de que se trata de individuos intolerantes a la lactosa, éstos ingieren 250 mL de leche entera o, alternativamente, una disolución de lactosa que contenga hasta un máximo de 12 g.

La primera toma de muestra de aire espirado se realiza antes de la ingestión del azúcar, con el fin de determinar el contenido de hidrogeno basal del paciente, una vez transcurrido el periodo de *semi-ayuno*. Las sucesivas muestras de aire se recogen para intervalos de tiempo variables, según se trate de pacientes que hayan ingerido lactosa (vaso de leche) o lactulosa. En el caso de la lactosa, cada media hora durante 5 horas; en el de la lactulosa, cada 20 minutos durante las dos primeras horas y, después, cada media hora hasta completar un total de 5 horas.

La toma de muestra se lleva a cabo con el dispositivo que se muestra en la

figura 2.13. Después de conectar la pieza plástica en “T” a una jeringuilla plástica de 50 mL, el paciente exhala el aire de sus pulmones soplando por el orificio (a). El primer 75 % de su capacidad de espiración sale a la atmósfera a través de dicha pieza por el orificio (b). Durante el último 25 %, quien realiza la toma de la muestra, bloquea la salida a la atmósfera (b) y al mismo tiempo permite lentamente que el aire entre en la jeringuilla (hasta que el niño enrojece por el esfuerzo) [41].

El mismo procedimiento se realiza durante las cinco horas siguientes, debiendo permanecer el niño y su acompañante (generalmente uno de los padres) en la sala de espera del hospital y, evidentemente, sin que el niño ingiera ningún tipo de alimento durante ese tiempo.

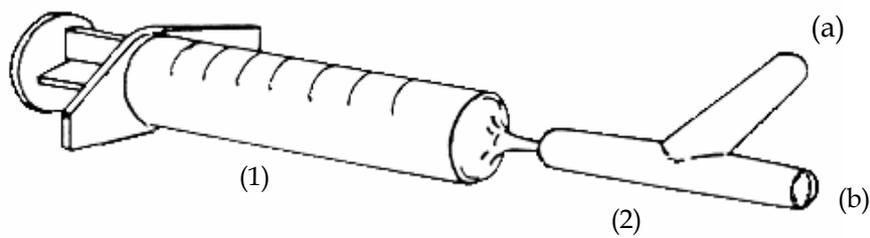


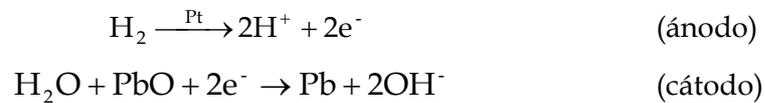
Figura 2.13 Dispositivo utilizado en el Hospital Universitario de Canarias, para la toma de muestra del aire espirado.

- (1) Jeringuilla plástica de 50 mL
- (2) Pieza plástica en “T”
- (a) Orificio de entrada del aire exhalado
- (b) Orificio de salida a la atmósfera del aire exhalado

Cuando el paciente es un bebé, el proceso es más complicado puesto que se lleva a cabo utilizando una mascarilla, que engloba la nariz y la boca del bebé, conectada a una válvula de inspiración-espiración. Se espera, con la mascarilla colocada, un minuto aproximadamente para que el niño se tranquilice lo máximo posible y cuando éste ha respirado con normalidad, al menos durante 30 seg., aproximadamente, se realiza la toma de la muestra.

Tras la toma de la muestra de aire, la pieza en “T” (que debe ser esterilizada antes de ser usada con un nuevo paciente) se separa de la jeringuilla y el contenido de esta última se inyecta lentamente en el instrumento de medida.

El equipo de medida utilizado por la unidad de pediatría de este hospital, está constituido por una célula electroquímica de tres electrodos (figura 2.14). El electrodo de trabajo, c, es una membrana de PTFE recubierta de Pt pulverizado; el de referencia, uno de Hg/HgSO₄ y el contra-electrodo, a, es de Pb/PbO. Como electrólito utiliza una disolución de H₂SO₄ 0.1 N. El hidrógeno procedente de la muestra a analizar, solubilizado en el ácido sulfúrico, se adsorbe sobre el platino que recubre la membrana y se oxida. Por su parte, el óxido de plomo se reduce, depositándose plomo metálico en el contra-electrodo. Las reacciones que tienen lugar en la célula electroquímica son las siguientes:



Para mantener constante el potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia, la unidad se conecta a un potencióstato. La señal de corriente que circula entre el electrodo de trabajo y el contra-electrodo es amplificada, convertida en voltaje y posteriormente transformada en partes por millón de hidrógeno v/v.

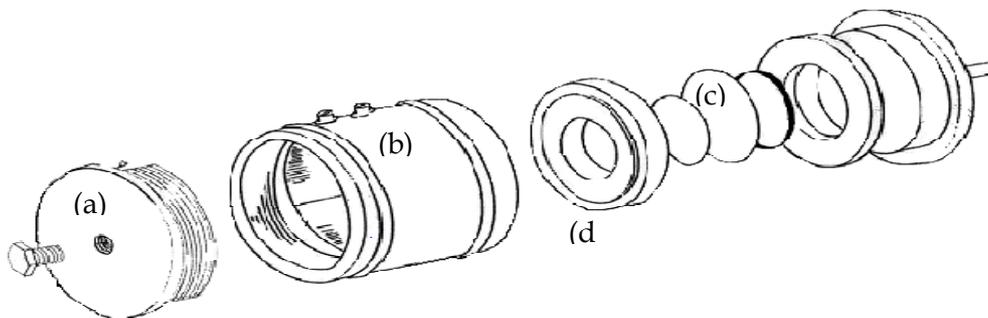


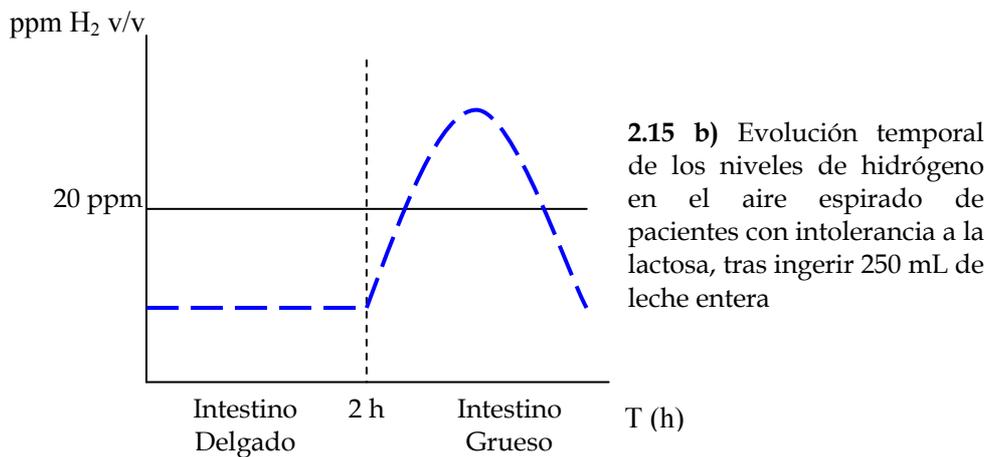
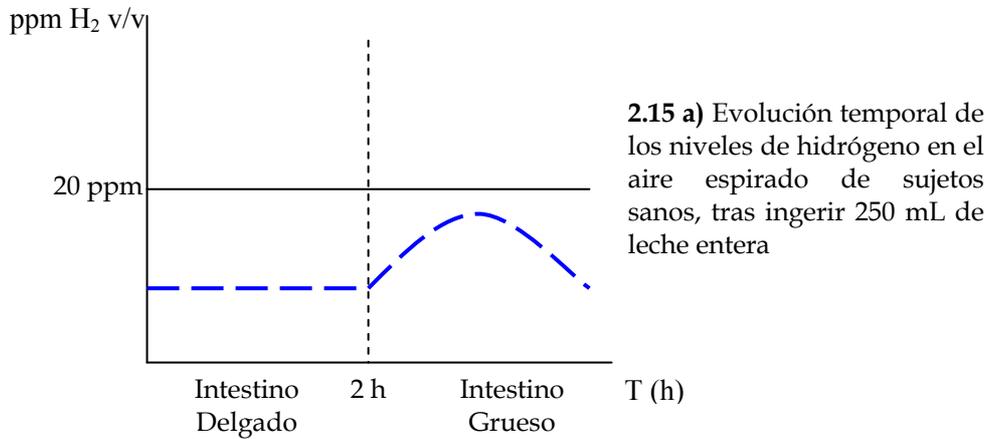
Figura 2.14 Despiece de la célula electroquímica utilizada en el Hospital Universitario de Canarias, para medir la concentración de hidrógeno en muestras de aire espirado.

- (a) Contraelectrodo (electrodo auxiliar)
- (b) Cuerpo principal del sensor
- (c) Electrodo de trabajo
- (d) Placa donde se monta el electrodo de

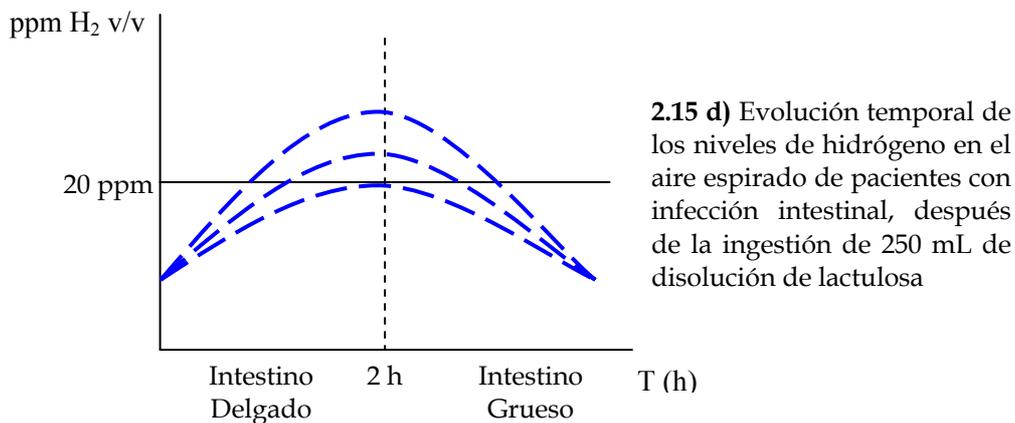
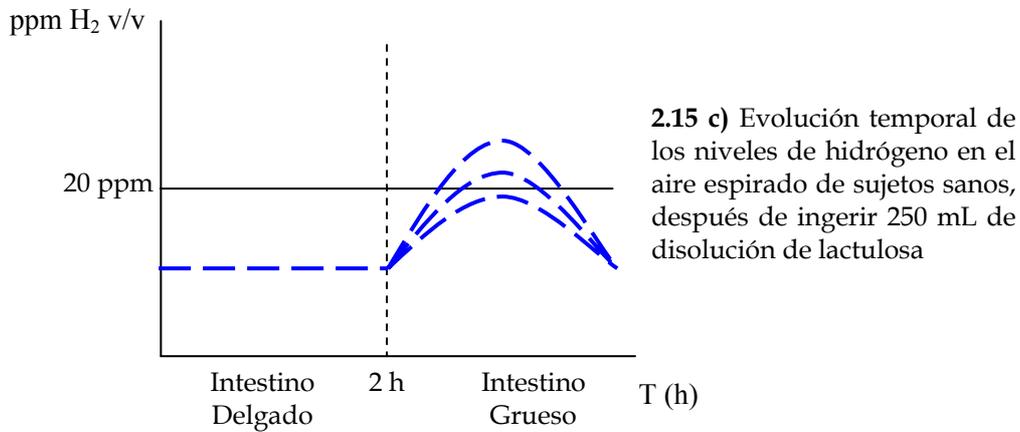
La célula electroquímica se mantiene termostata para evitar las variaciones en las lecturas provocadas por las fluctuaciones de temperatura. El aparato posee dos intervalos de medida: uno para el rango de concentraciones de 0 a 50 ppm y el otro de 0 a 250 ppm, debiendo ser calibrado mediante la inyección de una muestra de 20 mL de gas estandarizado. El rango de temperatura de trabajo está comprendido entre 15 y 30 °C y la vida operativa promedio de su electrodo de trabajo es de 12 meses.

Las medidas del hospital revelan que la ingestión de la dosis de leche, tras un periodo previo de *semi-ayuno*, produce un incremento de las ppm de hidrógeno en el aire espirado, a partir de las 2 horas de la ingesta. Este incremento se debe a la fermentación bacteriana sobre aquella porción de lactosa no absorbida previamente en el intestino delgado. Para un individuo sano, este incremento es pequeño no superando, generalmente, las 20 ppm de hidrógeno (figura 2.15 a). Cuando el individuo presenta intolerancia a la lactosa, esta cantidad aumenta de manera proporcional al grado de intolerancia, pudiendo llegar a alcanzar hasta 250 ppm (figura 2.15 b). Evidentemente, si el nivel de la enzima lactasa en el intestino delgado es bajo, una mayor cantidad de azúcar sin hidrolizar alcanzará el intestino grueso y será fermentada por su flora, produciendo una cantidad de hidrógeno en el aliento que será superior a 20 ppm [25].

Cuando se administra un azúcar no metabolizable por el organismo, como es por ejemplo la lactulosa, a partir de las dos horas desde la ingesta se produce un aumento de hidrógeno que será proporcional a la cantidad de azúcar ingerido y a las características particulares de la población bacteriana del individuo (figura 2.15 c). En el caso en que exista una invasión del intestino delgado por parte de las bacterias del colon, el tiempo que tardan los microorganismos en disponer del azúcar es menor y dicho aumento de la concentración de hidrógeno se observa antes de que se cumplan las dos horas tras la ingesta (figura 2.15 d)



Estos resultados permiten diferenciar, no sólo una persona sana de una posiblemente enferma, sino también distinguir entre los trastornos gastrointestinales debidos a una intolerancia a la lactosa y a una infección intestinal.



2.7 Determinación de hidrógeno biológico en orina. Una propuesta alternativa

Se sabe que el hidrógeno producido en el intestino difunde a la sangre capilar de sus mucosas y, por el torrente circulatorio, es transportado hasta los pulmones. Una vez allí, entra a formar parte del aire alveolar y es, en último término, excretado a través del aire espirado [31].

La propuesta novedosa del presente trabajo, se fundamenta en la idea de que este hidrógeno debe llegar también, vía torrente sanguíneo, a los riñones y por tanto ser eliminado por vía renal, abriendo la posibilidad de ser cuantificado en la orina. La cantidad de hidrógeno gaseoso disuelto, en ese caso, depende

fundamentalmente de la solubilidad de dicho gas en la orina, a la temperatura corporal y a la presión de una atmósfera, dato que actualmente no está disponible en la literatura científica.

Los métodos existentes basados en la determinación de H_2 en el aire espirado, están limitados fundamentalmente por el protocolo de la toma de muestras. En primer lugar, este análisis obliga a realizar espiraciones profundas, con objeto de vaciar casi completamente los pulmones, puesto que el hidrógeno se encuentra en el último tercio de éstos. Es comprensible por lo tanto, que cuando los pacientes son niños de corta edad, la toma de muestra sea poco fiable, debido a la dificultad de que éstos realicen las espiraciones correctamente y, por supuesto, imposible de llevar a cabo cuando se trata de bebés. Son precisamente estos últimos, junto con los niños pequeños, los individuos más propensos a las infecciones intestinales y a los que, por otra parte, urge detectar una posible intolerancia a la lactosa, ya que su dieta es abundante en leche.

En el caso de los bebés, cuando la toma de muestras se lleva a cabo utilizando una mascarilla que engloba la nariz y la boca, el bebé, molesto, trata de liberarse y al verse impedido llora, con lo que la mascarilla se llena de babas y mucosidades nasales, haciendo poco fiable la muestra recolectada.

Asimismo, tal y como se ha visto en el apartado anterior, el protocolo utilizado actualmente en el hospital es largo, obligando al paciente y a sus familiares, cuando se trata de niños o bebés, a permanecer en las instalaciones hospitalarias durante varias horas, impidiendo que el menor asista al colegio, al tiempo que hace perder un día de trabajo a su acompañante, generalmente uno de sus padres.

Recientemente, Podestá y cols. [42] han manejado una membrana electrolítica polimérica, recubierta metálicamente, para la detección cuantitativa de hidrógeno biológico producido por bacterias. La idea para el presente trabajo es utilizar este sensor electroquímico para cuantificar dicho gas en la orina.

Los objetivos que la presente Tesis pretende alcanzar pueden resumirse en los siguientes:

- a) Realizar la calibración de estos sensores electroquímicos, así como la determinación de las condiciones bajo las cuales su respuesta es óptima. Para ello se emplearán disoluciones acuosas patrón de hidrógeno gas.

- b) Obtener la confirmación de que el hidrógeno es efectivamente excretado, vía renal, disuelto en la orina, tal como parecen indicar algunos trabajos previos de nuestro grupo de investigación [43].
- c) Comprobar que la cantidad de gas eliminado por esta vía es suficientemente significativa como para que ésta pueda ser utilizada en el análisis de las patologías gastrointestinales que cursan con producción de H₂.

Una vez evidenciadas cada una de las anteriores premisas, se estaría en la disposición de acometer nuevos objetivos para esta línea de investigación. Entre ellos está, en primer lugar, elaborar un protocolo y un método de análisis del hidrógeno eliminado (basados en un proceso completamente natural como es la micción) que resulten alternativos a los métodos tradicionales basados en el aire espirado. La propuesta que aquí se realiza no solamente deberá simplificar, significativamente, el procedimiento actual sino, además, acortar el largo tiempo que los individuos deben permanecer en las instalaciones médicas durante las pruebas clínicas, con el consiguiente ahorro social de tiempo y de dinero. En segundo lugar, intentará comprobar que el nuevo método, también, es capaz de diferenciar entre las dos patologías que cursan con un aumento de la cantidad de H₂ detectado: la intolerancia a la lactosa y las infecciones gastrointestinales.

Un proyecto aún más ambicioso que, en principio, sobrepasa los objetivos de esta Tesis Doctoral, llevaría a albergar la posibilidad de que la determinación de H₂ en orina pudiese llegar a constituir, en un futuro próximo, un análisis extra-hospitalario (como ocurre actualmente con diferentes tests tales como los de embarazo o de azúcar en sangre)

2.8 Sensores Sólidos de Gases

Hoy en día, el campo de los sensores es muy amplio. Incluye desde aquellos que reaccionan ante cambios en las propiedades físicas (temperatura, humedad, radiación); los llamados *biosensores*, que detectan moléculas biológicas tales como enzimas, antibióticos y fármacos, entre otras, y los sensores químicos, que reaccionan ante la presencia de gases. Un importante grupo de estos últimos, están basados en principios electroquímicos.

En la actualidad, el progreso en este campo está dirigido hacia el desarrollo de

sensores sólidos, esto es, de aquellos que no contienen una fase líquida macroscópica. Esto se debe, principalmente, al hecho de que los sensores con electrolitos líquidos son usualmente algo voluminosos y, además, suelen tener pérdidas de electrólito, por goteo o por filtración, provocando la corrosión de algunas partes del aparato, lo que limita su tiempo de vida y afecta a sus funciones.

Un sensor electroquímico simple consiste en un electrodo sensor (cátodo) y un electrodo contador (ánodo) separados por una delgada capa de electrolito. El gas que se pone en contacto con el sensor, reacciona en la superficie del electrodo sensor oxidándose o reduciéndose.

Entre los electrodos de gases podemos encontrar electrodos de funcionamiento potenciométrico, que son aquellos que dan origen a la aparición de una f.e.m, y electrodos de funcionamiento amperométrico (tres electrodos, siendo el indicador siempre constante) en los que se genera una corriente eléctrica. En ambos casos, la magnitud eléctrica medida es proporcional a la concentración del gas.

No todos los sensores electroquímicos tienen las mismas características en cuanto a comportamiento y fiabilidad. Entre las esenciales está que siempre ha de ser selectivo para un gas determinado. En la actualidad se encuentran comercializados sensores electroquímicos válidos para medir, en un rango de pocas ppm, gases tales como hidrógeno, dióxido de carbono, dióxido de nitrógeno, cloruro, sulfato de hidrógeno, dióxido de sulfuro [44].

Su utilización se ha limitado por el momento, al control de procesos. Su vida media suele oscilar entre uno y tres años (para algunos, los fabricantes facilitan una especificación de dosis de exposición al gas – como el sensor de amoníaco de 5.000 ppm/hora – o temporal – un número de horas, si el sensor está expuesto constantemente –).

2.8.1 Sensores de electrólito sólido polimérico

Existen varias formas para la preparación de un sensor electroquímico de estado sólido, una de las más importantes está basada en la sustitución del electrólito líquido por un “*electrolito polimérico sólido*” (spe.)

En este tipo de sensores el electrodo de trabajo está colocado directamente en la superficie del electrólito o en íntimo contacto con éste. El spe. proporciona una conexión electrolítica entre el electrodo de trabajo y los otros electrodos de la célula electroquímica (electrodo de referencia y contra-electrodo). El electrodo de trabajo puede estar en contacto directo con la muestra sin ninguna barrera de difusión interpuesta adicional (membrana). El transporte de la sustancia electroactiva hacia el electrodo es rápida, lo cual refleja unas favorables propiedades dinámicas y estáticas del sensor (respuesta cuantiosa y rápida). Los sensores contruidos a partir de un electrolito polimérico sólido permiten detectar sustancias en fase gaseosa, lo cual es considerado como la mayor contribución de estos sensores para la química electroanalítica.

La reacción electroquímica del sensor y, en consecuencia, la generación de la corriente eléctrica en un circuito amperométrico o del potencial en un circuito potenciométrico, ocurre en la fase límite; es decir, donde el medio, el electrodo de trabajo y el polímero están simultáneamente en contacto. De este modo, las propiedades de esta interfase ejercerán una influencia decisiva en la respuesta del sensor. Dichas propiedades dependen de la clase de polímero, de su estado físico-químico y de las características del electrodo de trabajo (tipo de material, geometría, pre-tratamiento, conexión eléctrica) [44,45].

En la actualidad, el spe. más utilizado en sensores electroquímicos es un copolimero de poly (tetrafluoretileno) con poly (sulphonylfluoride vinyl eter), manufacturado por DuPont y conocido con el nombre comercial de Nafion. Éste es un intercambiador catiónico que contiene grupos sulfo-hidrofílicos firmemente unidos a la columna vertebral de hidrocarbano, cuyas cargas están compensadas por los contraiones (H^+). El contraión esta relacionado con la disociación del agua presente en la estructura del polímero y es la causa de la conductividad iónica del polímero. El agua requiere estar unida, en la capa de hidratación, a los iones presentes y así el polímero es un sólido que contiene fase liquida no macroscópica.

Las dimensiones geométricas de una membrana Nafion y sus propiedades eléctricas, principalmente su conductividad, dependen en gran medida de la cantidad de agua que contenga el polímero. El contenido máximo de agua se corresponde con 22 moléculas de agua por cada grupo sulfo del polímero y esto se logra hirviendo la membrana en agua. No obstante, este número disminuye hasta

14 moléculas cuando el polímero solo se pone en contacto con la fase gaseosa saturada del vapor de agua. El contenido de agua de la membrana, varía cuando lo hace la humedad del medio circundante. Por tanto, la respuesta de la Nafion del sensor en la fase gaseosa depende de la humedad relativa del medio.

La membrana polimérica es permeable a cationes y compuestos polares, siendo su tamaño y propiedades eléctricas las que determinan su paso a través del polímero. Sin embargo, es prácticamente impermeable a aniones y especies no polares. El transporte, a través de la membrana, de los compuestos permeables, se produce como consecuencia de la existencia de diferencias de concentración, de un potencial eléctrico y de presión hidrostática [46,47].

a) Métodos de preparación de los spe. y sus características

Previo a la construcción del electrodo, la membrana Nafion se somete a uno de los siguientes tratamientos de limpieza: lavado con etanol, hervido en ácido nítrico o perclórico, o abrasión mecánica. Para la elaboración de un sensor que emplee un spe. como base, hay que depositar sobre la membrana una fina capa de material del electrodo. Entre los materiales más comúnmente empleados se encuentran: platino (Pt), paladio (Pd), oro (Au), plata (Ag) y cadmio (Cd). A continuación se relacionan algunos de los mecanismos más utilizados para esta deposición.

1. *Platinado al vacío*: Este procedimiento permite obtener electrodos de diferentes morfologías superficiales sobre el spe. Sin embargo, es necesario destacar que estos electrodos tienen poca estabilidad mecánica y son muy sensibles a las variaciones en la humedad relativa del medio, ya que al cambiar ésta se alteran las dimensiones de la membrana y el depósito metálico puede deteriorarse. La evaporación al vacío (*sputtering*) es uno de los métodos más empleados para preparar sensores planos sobre una superficie inerte (cristal, cerámica). Estos electrodos, denominados electrodos producidos "fotolitográficamente" pueden ser preparados también mediante la técnica de "screen-printing". Para mejorar la adhesión del metal al soporte, se procede a la previa formación de un intermediario de capa bifuncional ("silanization")
2. *Deposición química del metal desde una disolución*: En este método se coloca, sobre la membrana, una disolución acuosa conteniendo iones del metal a depositar

(sales de platino, oro, etc) y, a continuación, se le adiciona una cierta cantidad de una disolución reductora adecuada (p. ej., NaBH_4 en NaOH). De ese modo el metal se reduce y queda depositado sobre la membrana polimérica.

3. *Método de impregnación*: Un electrodo, de un material indicado y una forma determinada (p. ej. una fina malla metálica) puede adherirse a la superficie de la membrana polimérica, si la temperatura es lo suficientemente elevada. Para facilitar el contacto entre el metal y la membrana, el electrodo puede sumergirse en una disolución que contenga el electrólito; al evaporarse el disolvente, el metal del electrodo queda adherido a la membrana. Asimismo, el electrodo puede también prepararse impregnando la superficie de la membrana con un metal, o con una mezcla de metales, pulverizados (p. ej., Pt, Pd, Cu)

También han sido descritos otros métodos de preparación, de reducida aplicabilidad práctica. Así, por ejemplo, se ha descrito la preparación de electrodos de grafito “pintados”, a partir de una suspensión coloidal, sobre la propia membrana polimérica [47].

b) Principales diseños y sus aplicaciones

La mayor parte de los sensores suelen ser de funcionamiento amperométrico, esto es, el potencial del electrodo de trabajo se mantiene constante por el uso de un potencióstato. En ocasiones, los sensores de estado sólido son utilizados como células galvánicas en las que el potencial entre el electrodo de trabajo y el contra-electrodo viene controlado por la reacción electroquímica que tiene lugar (sensores de funcionamiento potencióstático). En ambos casos (amperométricos y potenciométricos) la corriente que se establece entre el electrodo de trabajo y el contra-electrodo se corresponde con la concentración del analito.

Como se indicó con anterioridad, los sensores de base polimérica suelen utilizar membranas Nafion, cuyo funcionamiento está basado en la conductividad del protón (ciclo del protón H^+). Por lo general, estos sensores se utilizan con analitos cuya reacción electroquímica involucre protones, bien en los reactivos o en los productos (los sensores de gases son un ejemplo típico tabla 2.4). Durante la reducción o la oxidación del analito, los electrones viajan a través de un conductor

externo mientras que los protones son transportados a través del polímero.

Tabla 2.4. Gases detectados por sensores de estado sólido de electrolitos poliméricos.

Gas	Reacción Electrodo indicador
H_2	$H_2 \longrightarrow 2H^+ + 2e^-$
CO	$CO + H_2O \longrightarrow CO_2 + 2H^+ + 2e^-$
SO_2	$SO_2 + 2H_2O \longrightarrow SO_4^{2-} + 4H^+ + 2e^-$
O_2	$O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$
NO_2	$NO_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NO + 2H_2O$

La gran variedad de sensores de base polimérica existentes puede clasificarse en dos grandes grupos: el primero de ellos incluye a aquellos sensores que contienen una fase líquida y el segundo, los sensores de estado sólido. Éstos últimos pueden, a su vez, dividirse en: sensores en volumen (en los cuales el electrodo está dispuesto en la superficie del polímero) y sensores planos.

Sensores de fase líquida:

De forma general, en estos sensores una de las caras de la membrana está en contacto directo con el espacio donde se produce la detección y en contacto eléctrico con el electrodo de trabajo. La otra cara está en contacto con la disolución del electrolito, que en algunos casos podría ser agua con el único fin de que la citada membrana permanezca humedecida. El electrodo de referencia y el contra-electrodo están sumergidos en dicha disolución (estos sensores son utilizados para detectar sustancias líquidas o gaseosas)

Sensores de estado sólido:

Este tipo de sensores es muy utilizado para la detección de gases. El sensor más simple de los de este tipo es una célula galvánica, donde el electrodo de trabajo está expuesto al gas (muestra) y el contra-electrodo está colocado en el medio de referencia. El analito es oxidado o reducido sobre el electrodo de trabajo y los electrones involucrados en la reacción electroquímica son consumidos en la reacción que ocurre en el contra-electrodo. Por tal motivo, el medio de referencia debe incluir un componente electro-activo adecuado. Este componente puede ser

generado, algunas veces, en una célula electroquímica auxiliar que forme parte del sensor; por ejemplo, se puede generar hidrógeno por la electrólisis del agua, como componente activo, cuando se detecta oxígeno. Los electrodos de base platino son los más utilizados en estos sensores por su alta actividad catalítica.

La necesidad de contar con un medio de referencia supone una dificultad para el uso de los sensores galvánicos. A veces es posible solucionar este problema con una adecuada selección del electrodo de trabajo y del contra-electrodo. Así, en la detección de bajas concentraciones de hidrógeno en aire, el electrodo de trabajo de platino adopta un potencial mixto debido a dos acontecimientos simultáneos: la oxidación del hidrógeno, controlada por la difusión del gas hacia la superficie del electrodo, y la reducción del oxígeno, controlada por la cinética del proceso electroquímico [50]. Se ha demostrado que este potencial mixto depende del área geométrica de la superficie del electrodo de platino, esto es, de su mayor o menor rugosidad (caracterizada por el factor de rugosidad, RF). El parámetro fundamental del comportamiento del electrodo es la relación entre la velocidad de reducción del oxígeno y el transporte de hidrógeno a través de las caras adyacentes a la superficie del electrodo, el cual puede ser controlado mediante el factor de rugosidad. Cuanto mas pequeña sea esta relación, mayor será la sensibilidad del electrodo a los cambios de concentración del hidrógeno. Por lo que, electrodos de diferentes factores de rugosidad arrojaran diferentes valores de potencial para una misma muestra.

Teniendo en cuenta esto último, es posible afirmar que para la detección de hidrógeno en aire, será necesario un sensor con un electrodo de trabajo de bajo RF (oxidación del hidrógeno) y con un contra-electrodo con un alto valor de RF. Ambos electrodos han de estar expuestos al gas, por lo que no se requerirá de un medio de referencia. La diferencia de potencial entre ambos electrodos puede ser utilizada bien en la determinación potenciométrica o bien en la amperométrica, de hidrógeno en aire.

De los diferentes polímeros Nafion que se comercializan y que pueden ser usados para este fin, se pueden mencionar las series 900 y 2000. Éstas están reforzadas con un polímero sulfónico de baja resistencia (cara aniónica) y con un polímero carboxílico de alta selectividad al transporte de iones (cara catiónica)

Dado que los cambios ocurridos en las propiedades del spe. como consecuencia

de la variación del contenido de agua en el polímero, causan una dependencia no deseada de la respuesta del sensor con los valores de humedad relativa del medio, este efecto puede ser utilizado para determinar valores de la humedad relativa del aire. Así, por ejemplo, se puede emplear un sensor amperométrico que contenga una membrana Nafion para poner en contacto ambos electrodos; en ese caso, la corriente eléctrica generada es proporcional a la humedad relativa del aire.

Por otra parte, el hecho de que la membrana Nafion sea permeable a los protones, pero una barrera eficiente para el transporte de aniones, permite su empleo en la construcción de un sensor sólido de pH, con un electrodo de trabajo de dióxido de iridio y uno de Ag/AgCl como electrodo de referencia. El paso de los aniones hacia el cátodo viene impedido por la membrana Nafion [44,46,48].

2.9 Pilas de Combustible

Una pila de combustible es un dispositivo electroquímico que, mediante una reacción de combustión, convierte la energía química almacenada en unos reactivos (combustible y oxígeno) en energía eléctrica, de forma continua y con una alta eficiencia.

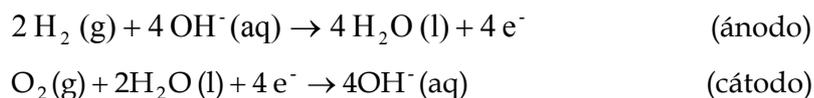
La principal característica de una pila de combustible es que el aporte de los reactivos se realiza desde el exterior en forma continua, por lo que ésta funciona mientras se mantenga la alimentación del combustible y del oxígeno.

En las pilas de combustible suele emplearse oxígeno puro o formando parte del aire, siendo el hidrógeno el combustible más utilizado, ya que permite obtener valores altos de densidad de corriente [49].

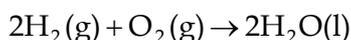
Al ser los reactivos gases, los electrodos de la pila de combustible deben ser porosos para facilitar la difusión del gas correspondiente y dar una mayor área electroquímica que facilite las reacciones. Ambos electrodos: el ánodo, donde el combustible se oxida, y el cátodo, donde el oxígeno se reduce, se encuentran separados por un electrólito conductor cuya naturaleza sirve de base para la clasificación de estas pilas de combustible. Los electrodos están conectados eléctricamente por medio de un circuito externo de transporte de la corriente (flujo de electrones) mientras que en el electrólito la carga es transportada por el flujo de iones. En electrólitos ácidos, el transportador mayoritario es el protón (H^+) y en los

electrólitos alcalinos, el ión hidroxilo (OH⁻)

Cuando se emplea hidrógeno como combustible, puesto que el oxidante es oxígeno, las reacciones que tienen lugar en la pila, con un electrólito alcalino, a una temperatura dada, son las siguientes:



siendo la reacción global:



reacción que es equivalente a la combustión isotérmica del H₂ a la temperatura a la que funciona la pila. La alta eficiencia de las pilas de combustible es debida a que éstas son esencialmente elementos galvánicos isotérmicos.

2.10 Ecuación de Nernst

Como se ha mencionado con anterioridad, en una pila de combustible tiene lugar una reacción electroquímica a consecuencia de la cual se obtiene energía eléctrica. El trabajo eléctrico producido por su funcionamiento es el derivado de la f.e.m. generada, que origina un desplazamiento de los electrones por el circuito eléctrico externo, bajo la influencia de una d.d.p. Dicho trabajo será máximo cuando la f.e.m. de la pila corresponda a la del equilibrio, E_0 . Es decir, la f.e.m. que alcanzaría la pila en ausencia de paso de corriente a su través, cuando su proceso electroquímico transcurre de forma reversible.

De acuerdo con la termodinámica, $\Delta\bar{G}$ se identifica con el trabajo total desarrollado por un mol de iones del sistema, distinto del trabajo de expansión de dicho sistema. Por tanto se tendrá:

$$\Delta\bar{G} = -qE_0 = -nFE_0 \quad (2-1)$$

siendo q la carga eléctrica desplazada como consecuencia del movimiento de los

iones, los cuales llevan asociada una carga n . Esta ecuación (2-1) expresa la equivalencia entre un parámetro termodinámico, tan importante como es el cambio en la energía de Gibbs, y el potencial de equilibrio de la pila, E_0 . Dicho cambio en la energía de Gibbs está relacionado, a su vez, con el estado termodinámico de las sustancias participantes en la reacción redox, a través del potencial químico de éstas (2-2), por lo que se puede escribir:

$$\Delta\bar{G} = \left(\sum_P v_P \mu_P^* - \sum_R v_R^* \mu_R^* \right) + \left(\sum_P v_P RT \ln a_P - \sum_R v_R RT \ln a_R \right) \quad (2-2)$$

lo que es equivalente a:

$$\Delta\bar{G} = \Delta\bar{G}^* + RT \ln \frac{\left(\prod a^v \right)_P}{\left(\prod a^v \right)_R} \quad (2-3)$$

siendo $\Delta\bar{G}^*$ la variación de energía de Gibbs estándar de la reacción redox y “ a ” la actividad de cada uno de los intervinientes en la reacción redox. Combinando las ecuaciones (2-1) y (2-3) se obtiene que el valor del potencial de la pila es:

$$E_0 = E_0^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\left(\prod a^v \right)_P}{\left(\prod a^v \right)_R} \quad (2-4)$$

expresión que es conocida como la *Ecuación de Nernst* y que permite obtener la f.e.m. de equilibrio de una pila (para $I=0$), cualesquiera que sean las actividades de reactivos y productos en el proceso redox. La constante E_0^0 representa la f.e.m. normal de equilibrio de la pila, esto es, cuando todas las actividades de reactivos y productos son la unidad. Dicho parámetro depende únicamente de la temperatura y de la escala de actividades que se elija. E_0 y E_0^0 vienen expresadas en voltios [50].

2.11 Termodinámica de las disoluciones de gases en líquidos

2.11.1 Disolución ideal y disolución diluida ideal

En el estudio fisicoquímico de los sistemas es importante establecer, como referencia, un estado ideal para el que las leyes que lo rijan sean altamente sencillas. En el caso de las disoluciones, dicho estado de referencia es la *disolución ideal*, que se define como aquella disolución en la que todos sus componentes “i” son volátiles y cumplen, en todo el intervalo de concentraciones, la ley de Raoult

$$p_i = x_i p_i^\circ \quad (2-5)$$

siendo p_i y p_i° , respectivamente, la presión parcial del componente “i” en el vapor, en equilibrio con la disolución a una cierta temperatura T y a la fracción molar x_i , y la presión de vapor de dicho componente “i” cuando éste se encuentra puro en el líquido ($x_i = 1$), a la misma temperatura, T, de la disolución. La figura 2.16 ilustra el caso para una disolución binaria (disolvente más un soluto)

Teniendo en cuenta la ecuación (2-5) se obtiene para el potencial químico de cada componente en dicha *disolución ideal*, la siguiente expresión:

$$\mu_i = \mu_i^\circ(T, p) + RT \ln x_i \quad (2-6)$$

que establece una dependencia lineal entre el potencial químico, μ_i , y $\ln x_i$. En esta expresión, $\mu_i^\circ(T, p)$ es el potencial químico del componente “i” puro, que es una función de la temperatura y la presión. Las ecuaciones (2-5) y (2-6) representan un comportamiento límite de las disoluciones y se toman como base para la definición de *disolución ideal*.

El concepto rígido de *disolución ideal*, donde cada constituyente debe obedecer la ley de Raoult en el intervalo total de composición, se flexibiliza para dar paso al de *disolución diluida ideal*, en donde la ley de Raoult se cumple solo para el disolvente “i”, cuando éste está presente en el medio en gran proporción (disolución muy diluida), mientras que para el soluto (o solutos) “j” es aplicable,

en dicha zona muy diluida, la ley de Henry, que obedece a la ecuación lineal:

$$p_j = K_j x_j \quad (2-7)$$

en donde la constante de proporcionalidad K_j , que recibe el nombre de constante de la ley de Henry, depende de la naturaleza del componente "j" considerado. La figura 2.16 ilustra esta situación para el caso para una disolución binaria.

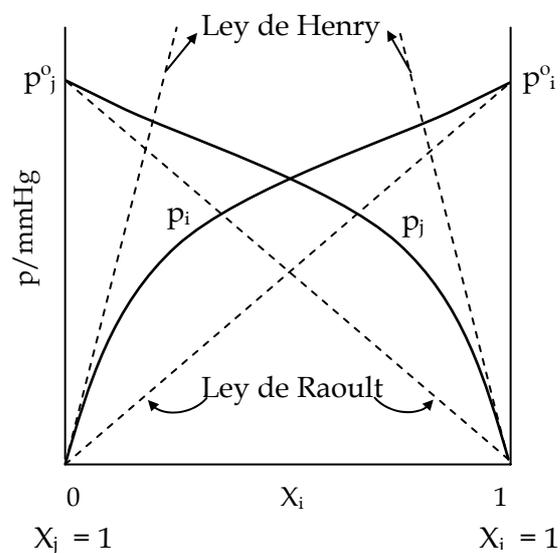


Figura 2.16

Presiones de vapor de los componentes "i" y "j" sobre la disolución (líneas de trazo continuo), junto con los valores que corresponderían a estas presiones de vapor de acuerdo a las leyes de Henry y de Raoult (líneas de trazo discontinuo)

A partir de esta ecuación (2-7), el potencial químico que presenta el soluto "j" en la *disolución diluida ideal*, se puede obtener que vendrá dado por:

$$\mu_j = \mu_j^*(T,p) + RT \ln x_j \quad (2-8)$$

donde $\mu_j^*(T,p)$ sería el potencial químico hipotético que el soluto "j" tendría en estado puro, esto es, cuando $x_j = 1$, si se cumpliera la ley de Henry en dicha situación ($x_j = 1$). El valor de este hipotético potencial químico estándar unitario depende de la temperatura y de la presión, pero no de la concentración. Su valor correspondería al que se calcularía en el punto de intersección de la línea de Henry con el eje $x_j = 1$ de la figura 2.13; en dicho punto, la presión de vapor del

componente "j" valdría K_j .

La Ley de Henry también puede expresarse en función de otras unidades de concentración. Ya que la aplicabilidad de la ecuación (2-7) está restringida a las disoluciones muy diluidas, la fracción molar, para n_i y n_j moles de disolvente y soluto, respectivamente, puede aproximarse según:

$$x_j \approx \frac{n_j}{n_i} \quad (2-9)$$

y, por tanto, la ley de Henry puede expresarse como:

$$p_j = K_j^{(m)} m_j \quad (2-10)$$

donde m_j es la molalidad de "j" y $K_j^{(m)}$, constante de la ley de Henry en la escala de molalidad, tendría un valor diferente al de K_j . La aproximación que supone el empleo de las ecuaciones (2-9) y (2-10) es tanto mejor cuanto más diluida sea la disolución a la que ésta se aplique.

A partir de la ecuación (2-10) el potencial químico para una *disolución diluida ideal* puede expresarse en la forma:

$$\mu_j = \mu_j^{**}(T,p) + RT \ln m_j \quad (2-11)$$

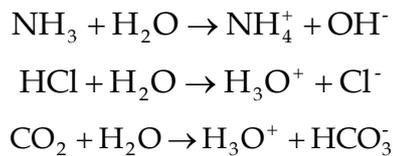
siendo $\mu_j^{**}(T,p)$ el valor hipotético del potencial químico estándar unitario de "j" cuando $m_j = 1$, si se cumpliera la ecuación (2-10) para dicha molalidad unidad. Este hipotético potencial químico estándar unitario es, también, función de la temperatura y de la presión, pero no de la concentración.

Los valores de ambos potenciales químicos estándar unitarios hipotéticos son diferentes entre sí, pero puede obtenerse fácilmente que la relación entre ellos viene dada por la expresión:

$$\mu_j^{**} = \mu_j^* + RT \ln\left(\frac{M_d}{1000}\right) \quad (2-12)$$

donde M_d es la masa molecular del disolvente.

Las disoluciones de gases en líquidos siempre exhiben un comportamiento de *disoluciones diluidas ideales*, ya que su solubilidad es baja y, en ocasiones, muy baja. No obstante, es importante señalar que cuando el gas reacciona con el disolvente, la disolución resultante no cumple la ley de Henry puesto que, en ese caso, la solubilidad del gas en el disolvente aumenta de manera muy importante. Esto ocurre con gases tales como NH_3 , HCl , CO_2 al disolverse en agua, ya que tienen lugar las siguientes reacciones:



En tales situaciones, la ley de Henry sería aplicable, únicamente, para las especies moleculares.

A la misma razón obedece la gran solubilidad del O_2 y CO_2 en la sangre, muy superior a la que tienen en el agua, debido a su reacción con la hemoglobina para formar oxihemoglobina y carboxihemoglobina, respectivamente

Por el contrario, la presencia de electrólitos en la disolución, cuando se trata de disolventes polares, provoca una disminución de la solubilidad del gas, lo que conduce a que éste se libere de la disolución, por la interacción que tiene lugar entre los iones y los dipolos del disolvente, que origina una disminución de la cantidad de disolvente “libre” en la disolución [50,51].

2.11.2 Disoluciones de gases en líquidos

Como se observa en la figura 2.17, gases como el Nitrógeno, el Helio y el Hidrógeno (éste último, inclusive, a presiones elevadas –superiores a 500 atm–), presentan valores experimentales para la fracción molar del gas disuelto, que

exhiben una dependencia lineal frente a su presión parcial sobre el líquido, a 25,0 °C. El O₂ no sigue este comportamiento, ni siquiera a presiones bajas.

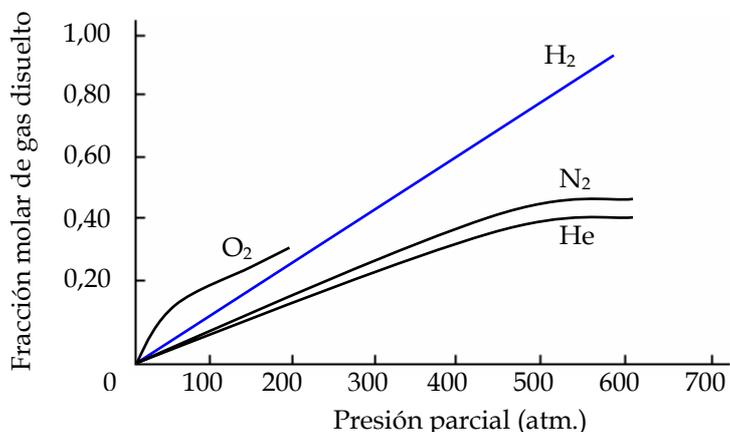


Figura 2.17 Solubilidad de varios gases en función de su presión parcial sobre el líquido, a 25,0 °C.

Estos resultados experimentales de solubilidad de gases en líquidos fueron, precisamente, los que sirvieron a W. Henry para, en 1903, establecer la ley que lleva su nombre (ecuación (2-3)). Dicha ley, puede escribirse también de la forma:

$$x_j = \frac{1}{K_j} p_j \quad (2-13)$$

que establece que la solubilidad del gas, expresada bajo la forma de fracción molar, x_j , es proporcional a la presión parcial del gas sobre el líquido. Esta ley se cumple satisfactoriamente siempre que las presiones no sean demasiado elevadas o las temperaturas demasiado bajas.

Ahora bien, aunque mediante la ley de Henry pueda expresarse la solubilidad de gases en líquidos, la forma más general de presentar los valores de dicha solubilidad es mediante el uso de dos coeficientes empíricos: el coeficiente de absorción α_j , propuesto por Bunsen en 1857, o el de solubilidad, β_j , propuesto por Ostwald en 1888.

Este último coeficiente, cuyo uso está mucho menos extendido que el primero,

viene definido como el volumen de gas, medido a la presión y temperatura de la experiencia, disuelto en una unidad de volumen de líquido. Es decir:

$$\beta_j = \frac{v_j}{V_{\text{disoluc.}}} \quad (2-14)$$

Por su parte, el coeficiente de Bunsen se define como el volumen del gas disuelto, medido en condiciones normales (C.N.: 0 °C y 1 atm) – tras extraerlo de la disolución en la que se encuentra disuelto– por unidad de volumen de disolvente, cuando la presión parcial de dicho gas sobre la disolución es de 1 atm. Esto es:

$$\alpha_j = \frac{v_j^0}{V_{\text{disolv.}}} \quad (2-15)$$

en esta expresión $V_{\text{disolv.}}$ está medido a la temperatura del experimento, mientras que v_j^0 lo está en C.N., siendo por tanto su valor:

$$v_j^0 = \frac{n_j^0 RT_0}{p_0} \quad (2-16)$$

n_j^0 representa los moles de gas disueltos, $T_0 = 273,15$ K y $p_0 = 1$ atm. v_j^0 vendrá expresado en litros si $R = 0,082058$ atm · l · mol⁻¹ · K⁻¹.

El valor de $V_{\text{disolv.}}$ se determina mediante:

$$V_{\text{disolv.}} = \frac{n \cdot M}{\rho} \quad (2-17)$$

siendo n el número de moles de disolvente, M su masa molecular y ρ su densidad.

$V_{\text{disolv.}}$ vendrá expresado en litros si ρ se expresa en g · lit⁻¹.

Sustituyendo (2-16) y (2-17) en (2-15) se tiene:

$$\alpha_j = \frac{n_j^0 RT_0 / p_0}{nM / \rho} \quad (2-18)$$

Teniendo en cuenta que la fracción molar del gas "j" en la disolución viene dada por:

$$x_j^0 = \frac{n_j^0}{n + n_j^0} \quad (2-18a)$$

puesto que la disolución de cualquier gas en un líquido es siempre muy diluida, puede aceptarse la aproximación $n + n_j^0 \approx n$, quedando la ecuación anterior de la forma:

$$x_j^0 \approx \frac{n_j^0}{n} \quad (2-18b)$$

Combinando esta última ecuación con la ecuación (2-10), que expresa la solubilidad del gas según la ley de Henry, se obtiene, cuando la presión parcial del gas sobre la disolución es p_j :

$$\frac{n_j^0}{n} \approx \frac{1}{K_j} p_j \quad (2-19)$$

Utilizando este valor de $\frac{n_j^0}{n}$ en la ecuación (2-14), se obtiene la siguiente relación entre la constante de la ley de Henry K_j y el coeficiente de absorción de Bunsen, α :

$$\alpha_j K_j \approx \left(\frac{RT_0 p_j}{p_0} \right) \left(\frac{\rho}{M} \right) \quad (2-20)$$

Sustituyendo los valores numéricos de $R (= 0,082058 \text{ atm} \cdot \text{lit} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$, $T_0 (= 273,15 \text{ K})$, $p_0 (= 1 \text{ atm})$ y teniendo en cuenta que, de acuerdo con la definición de α_j , $p_j = 1 \text{ atm}$, se tiene que, para disoluciones acuosas ($M = 18,015 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) la ecuación anterior se reduce a:

$$\alpha_j K_j \approx 1,2442 \rho \quad (2-21)$$

donde la densidad del disolvente, ρ , viene expresada en $\text{g} \cdot \text{lit}^{-1}$ y la constante de la ley de Henry, K_j , en atm.

La solubilidad del gas, S , expresada en moles por unidad de volumen de disolvente, esto es como molalidad, vale:

$$S = \frac{n_j^0 \rho}{nM} \quad (2-22)$$

expresión que comparada con la (2-17) conduce a:

$$\alpha_j = \left(\frac{RT_0}{p_0} \right) S = 22,414 S \quad (2-23)$$

cuyo uso resulta más conveniente para el análisis de dicha solubilidad.

Si el gas que se estudia se comporta como ideal, la relación entre los dos coeficientes: de Bunsen y Oswald, se obtiene de manera inmediata, puesto que:

$$\frac{v_0 P_0}{T_0} = \frac{vP}{T} \quad (2-24)$$

por lo que, tras reemplazar los valores conocidos de P_0 y T_0 , despejar v y sustituir en la ecuación (2-13) se obtiene la relación

$$\beta = \alpha \left(\frac{T}{273,15} \right) \quad (2-25)$$

donde la temperatura viene expresada en grados Kelvin.

En la tabla 2.5 se recogen, a diferentes temperaturas, valores de los coeficientes de Bunsen en agua para algunos gases, incluido el hidrógeno [50,51]

Tabla 2.5 Coeficientes de Bunsen a diferentes temperaturas, para algunos gases disueltos en agua

Gas	T (°C)			
	0	20	25	40
H ₂	0,0214	0,0182	0,0175	0,0165
O ₂	0,0490	0,0310	0,0283	0,0235
CO	0,0353	0,0232	0,0215	0,0179

2.12 Cálculo de la concentración del hidrógeno disuelto

Como se ha señalado con anterioridad, para un determinado volumen de disolución acuosa de H₂, V_{disoluc.}, a 25,0 °C y 1 atm, la solubilidad de ese gas, expresada como fracción molar de H₂, x_{H₂}, vendrá dada, de acuerdo con la ecuación (2-18b), por:

$$x_{H_2} = \frac{n_{H_2}}{n_{H_2} + n_{H_2O}} \approx \frac{n_{H_2}}{n_{H_2O}} \quad (2-26)$$

donde n_{H₂} es el número de moles de H₂ que se encuentran disueltos en el citado volumen (ya que n_{H₂O} >> n_{H₂}, al ser muy baja la solubilidad del H₂)

Puesto que para una disolución acuosa muy diluida, el volumen de la disolución, V_{disoluc.}, es aproximadamente igual al volumen del disolvente, V_{H₂O}, de (2-26) se obtiene:

$$n_{H_2} = x_{H_2} \cdot n_{H_2O} = x_{H_2} \frac{g_{H_2O}}{M_{H_2O}} = x_{H_2} \frac{V_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}}{M_{H_2O}} \approx x_{H_2} \frac{V_{disoluc.} \cdot \rho_{H_2O}}{M_{H_2O}} \quad (2-27)$$

siendo M_{H_2O} y ρ_{H_2O} , respectivamente, la masa molecular y la densidad del disolvente. A partir de esta ecuación (2-27) puede calcularse el valor de la concentración molar de hidrógeno en la disolución. Para ello, si se toma un volumen de disolución $V_{disoluc.} = 1000 \text{ cm}^3$, el número de moles de H_2 que estarían disueltos en dicho volumen sería su molaridad, por lo que:

$$C_{H_2} \approx x_{H_2} \frac{1000 \cdot \rho_{H_2O}}{M_{H_2O}} \quad (2-28)$$

Si bien en la definición del coeficiente de Bunsen, el volumen del gas disuelto viene medido en C.N., en la práctica dicho coeficiente suele expresarse en otras condiciones ($25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1 atm , α_j^{25}). En tal caso, la ecuación (2-18) para el hidrógeno en la disolución quedaría escrita, en forma más general, como:

$$\alpha_{H_2}^{25} = \frac{n_{H_2} RT}{P V_{disolv.}} \quad (2-29)$$

por lo que el número de moles de H_2 valdrá:

$$n_{H_2} = \frac{P (\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{disolv.})}{RT} \quad (2-30)$$

y, sustituyendo este valor en (2-27), la fracción molar de H_2 será igual a:

$$x_{H_2} = \frac{P (\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{disolv.}) M_{H_2O}}{\rho_{H_2O} \cdot V_{H_2O} \cdot RT} \quad (2-31)$$

valor que sustituido en (2-29) conduce, finalmente, a:

$$C_{H_2} = \frac{P(\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{\text{disolv.}})}{RT V_{\text{disoluc.}}} \quad (2-32)$$

que permite calcular la concentración molar de gas disuelto a partir del valor del coeficiente de Bunsen de dicho gas (recogido en la bibliografía para un gran número de gases) y de magnitudes controlables experimentalmente.

No obstante, suele ser habitual que la concentración del gas disuelto se exprese como volumen de gas por unidad de volumen de disolución (concentración volumen/volumen, v/v). Así, si tenemos en cuenta que el volumen que ocupan los moles de H₂ que corresponden a una determinada concentración, se obtiene multiplicando éstos por la masa molecular del H₂ y dividiendo por la densidad del gas en (g/l) a 25,0 °C, esta concentración v/v será igual a:

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{n_{H_2}}{V_{\text{disoluc.}}} \cdot \frac{M_{H_2}}{\rho_{H_2}} \quad (2-33)$$

Una forma más sencilla de calcular esta concentración de H₂ (v/v), consiste en aplicar directamente el coeficiente de Bunsen a 25,0 °C, a la siguiente ecuación:

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{V_{H_2}^{25}}{V_{\text{disoluc.}}} \quad (2-34)$$

obteniéndose:

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{\text{disolv.}}}{V_{\text{disoluc.}}} \quad (2-35)$$

2.13 Determinación experimental de la concentración del hidrógeno disuelto

Los cálculos anteriormente realizados son válidos en el supuesto caso de que el H₂ se comportase como lo haría un soluto no volátil, esto es, si permaneciese en la

disolución. Sin embargo, la determinación experimental del hidrógeno disuelto en una determinada muestra líquida se realiza midiendo la cantidad de dicho gas que se encuentra en la fase gaseosa en equilibrio con la disolución. En efecto, cuando la disolución conteniendo hidrógeno se introduce en la célula de medida, tiene lugar un *escape* del hidrógeno desde la disolución hacia la fase gas en contacto con ella. Este *escape* cesa cuando se equilibran los valores del potencial químico del gas en ambas fases, disolución y atmósfera gaseosa. Así pues, es necesario determinar qué cantidad de gas hidrógeno disuelto en la disolución, abandona ésta para pasar a la fase gas en donde será medido.

Al introducir un volumen conocido de disolución acuosa de H_2 , $V_{disoluc.}$, en un recipiente herméticamente cerrado (célula de medida), se produce una disminución del volumen de la atmósfera gaseosa, en una cuantía de $V_{disoluc.}$. Esto tiene como consecuencia que la presión ejercida por la atmósfera gaseosa sobre la disolución, aumente desde el valor inicial de $p_{inic.} = 1 \text{ atm}$, hasta uno final, p_{final} , cumpliéndose para dicha fase gaseosa que:

$$p_{inic.} V_{inic.} = nRT = p_{final} V_{final}$$
$$p_{final} = p_{inic.} \frac{V_{inic.}}{V_{final}} = p_{inic.} \frac{V_{inic.}}{V_{inic.} - V_{disoluc.}} \quad (2-36)$$

siendo $V_{inic.}$ el volumen del recipiente vacío.

En el instante inicial, en la fase gas sólo hay aire y vapor de agua, mientras que en la fase líquida sólo hay H_2 y disolvente. Transcurrido un cierto tiempo, una parte del H_2 disuelto, junto con vapores del disolvente, *escapa* hacia la atmósfera sobre la disolución, mientras que parte del aire se disuelve en el agua. Una vez alcanzado el equilibrio, la presión total sobre la disolución (aproximadamente igual a la p_{final} considerada anteriormente, pues ni el H_2 ni el vapor del disolvente escapados supondrán cantidades importantes que, además, se verán parcialmente compensadas por el aire que se disuelve en el líquido) vendrá dada por la suma de las presiones parciales de todos los gases y vapores presentes:

$$P_{total} \approx p_{final} = p_{aire} + p_{H_2(escapado)} + p_{H_2O} \quad (2-37)$$

de acuerdo con la ley de Dalton, la presión parcial del H₂ en la fase gas vale:

$$P_{H_2(\text{escapado})} = y_{H_2(\text{escapado})} \cdot P_{\text{total}} \quad (2-38)$$

siendo $y_{H_2(\text{escapado})}$ la fracción molar del hidrógeno que ha pasado a la atmósfera gaseosa.

A su vez, esa presión parcial del H₂ sobre la disolución, de acuerdo con la ley de Henry, vale:

$$P_{H_2(\text{escapado})} = K_{H_2} \cdot x_{H_2(\text{residual})} \quad (2-39)$$

donde $x_{H_2(\text{residual})}$ es la fracción molar de H₂ que se mantiene disuelto.

Igualando ambas (2-38) y (2-39) se tiene:

$$y_{H_2(\text{escapado})} \cdot P_{\text{total}} = K_{H_2} \cdot x_{H_2(\text{residual})} \quad (2-40)$$

El cálculo del número de moles de gas que abandona el líquido, $n_{H_2(\text{escapado})}$, permite hallar las fracciones molares del H₂ en la fase líquida, $x_{H_2(\text{residual})}$ y en la atmósfera sobre la disolución, $y_{H_2(\text{escapado})}$.

La fracción molar en la fase líquida, $x_{H_2(\text{residual})}$, viene dada por:

$$x_{H_2(\text{residual})} = \frac{n_{H_2(\text{residual})}}{n_{H_2(\text{residual})} + n_{H_2O}} \approx \frac{n_{H_2} - n_{H_2(\text{escapado})}}{n_{H_2O}} \quad (2-41)$$

ya que $(n_{H_2} - n_{H_2(\text{escapado})})$ representa el número de moles de hidrógeno que aún permanecen en la disolución y $n_{H_2(\text{residual})}$ en el denominador puede despreciarse al ser $n_{H_2O} \gg n_{H_2(\text{residual})}$. Sustituyendo n_{H_2} por el valor dado por la ecuación (2-27), igualando $V_{\text{disoluc.}}$ con V_{H_2O} y despreciando la cantidad de disolvente que se

evapora, se obtiene:

$$x_{\text{H}_2(\text{residual})} = x_{\text{H}_2} - \frac{n_{\text{H}_2(\text{escapado})} \cdot M_{\text{H}_2\text{O}}}{V_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \rho_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (2-42)$$

La fracción molar de H_2 que abandona el líquido y pasa a la fase gas, $y_{\text{H}_2(\text{escapado})}$ viene dada por:

$$y_{\text{H}_2(\text{escapado})} = \frac{n_{\text{H}_2(\text{escapado})}}{n_{\text{total}}} \quad (2-43)$$

siendo n_{total} el número de moles totales correspondientes a todos los gases presentes en la fase gaseosa (aire + H_2 + vapor de agua), el cual se calcula aplicando la ecuación del gas ideal a la mezcla (ya que la presión a la que está sometida esta mezcla de gases es moderada: $P_{\text{total}} \approx p_{\text{final}}$ y, por tanto, no debe diferir apenas de 1 atm; y la temperatura es relativamente alta, $T = 298,15 \text{ K}$) según:

$$n_{\text{total}} = \frac{P_{\text{total}} \cdot V_{\text{final}}}{RT} = \frac{P_{\text{final}} (V_{\text{inic.}} - V_{\text{disoluc.}})}{RT} \quad (2-44)$$

Sustituyendo este valor en (2-43) se tiene:

$$y_{\text{H}_2(\text{escapado})} = \frac{n_{\text{H}_2(\text{escapado})} RT}{p_{\text{final}} (V_{\text{inic.}} - V_{\text{disoluc.}})} \quad (2-45)$$

Sustituyendo los valores de estas fracciones molares (ecuaciones (2-42) y (2-45)) en la ecuación (2-40), se obtiene finalmente:

$$\left[\frac{n_{\text{H}_2(\text{escapado})} RT}{p_{\text{final}} (V_{\text{inic.}} - V_{\text{disoluc.}})} \right] P_{\text{total}} = K_{\text{H}_2} \left[x_{\text{H}_2} - \frac{n_{\text{H}_2(\text{escapado})} M_{\text{H}_2\text{O}}}{V_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \rho_{\text{H}_2\text{O}}} \right] \quad (2-46)$$

Esta expresión puede simplificarse teniendo en cuenta la ecuación (2-28), así como que $P_{\text{total}} \approx p_{\text{final}}$ y que cuando la $p_{\text{H}_2} = 1 \text{ atm}$ (condición contemplada en la definición del coeficiente de Bunsen), el producto $K_{\text{H}_2} x_{\text{H}_2}$ vale la unidad. Bajo tales consideraciones dicha ecuación queda reducida a:

$$\frac{n_{\text{H}_2(\text{escapado})} RT}{V_{\text{inic.}} - V_{\text{disoluc.}}} = 1 - \frac{n_{\text{H}_2(\text{escapado})}}{n_{\text{H}_2}} \quad (2-47)$$

A partir de esta ecuación (2-47) se puede calcular cuántos moles de H_2 abandonan la disolución para pasar a la atmósfera sobre dicha disolución, hasta alcanzar el equilibrio termodinámico. Este número es:

$$n_{\text{H}_2(\text{escapado})} = \frac{n_{\text{H}_2} (V_{\text{inic.}} - V_{\text{disoluc.}})}{n_{\text{H}_2} RT + (V_{\text{inic.}} - V_{\text{disoluc.}})} \quad (2-48)$$

Que expresado en tanto por ciento valdrá:

$$\frac{n_{\text{H}_2(\text{escapado})}}{n_{\text{H}_2}} \cdot 100 = \frac{V_{\text{inic.}} - V_{\text{disoluc.}}}{n_{\text{H}_2} RT + (V_{\text{inic.}} - V_{\text{disoluc.}})} \cdot 100 \quad (2-49)$$

En consecuencia, la cantidad de hidrógeno que queda retenida en la disolución sin pasar a la fase gas, puede calcularse por diferencia entre el número total de moles de H_2 disueltos inicialmente, n_{H_2} , y el de los que escapan a la fase gas, $n_{\text{H}_2(\text{escapado})}$, $(n_{\text{H}_2} - n_{\text{H}_2(\text{escapado})})$

Asimismo, conocido $n_{\text{H}_2(\text{escapado})}$, a través de la medida experimental, puede determinarse el n_{H_2} mediante las ecuaciones (2-47) ó (2-48) y, una vez conocido este número y haciendo uso de la ecuación (2-26), puede calcularse la solubilidad del H_2 , expresada como fracción molar, x_{H_2} .

Parte experimental

3. Parte experimental

3.1 Diseño del burbujeador. Método de saturación

La saturación del agua *Millipore*®, de la orina, tanto artificial como biológica, o en su caso de determinadas disoluciones acuosas, utilizada en la preparación de las disoluciones patrón, se realizó mediante su burbujeo con gas hidrógeno. El proceso se mantuvo durante el tiempo necesario para garantizar que la atmósfera sobre la disolución estuviese formada, exclusivamente, por hidrógeno y vapor de agua. El burbujeo, realizado siempre a la misma temperatura, con similar intensidad y durante un tiempo idéntico, garantizó la reproducción de la presión parcial de hidrógeno sobre la disolución y, por tanto, que una misma masa de dicho gas estuviese disuelta en un mismo volumen de agua.

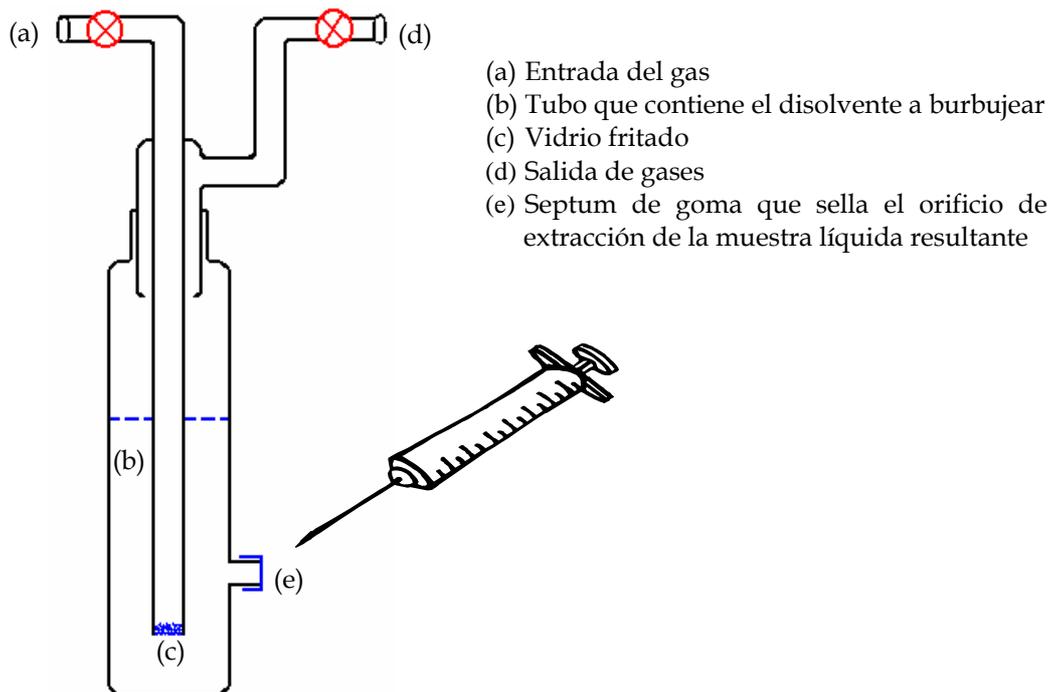


Figura 3.1 Esquema del burbujeador

Para obtener las disoluciones acuosas de hidrógeno a las concentraciones

requeridas para este trabajo, fue necesaria la construcción de un burbujeador, en vidrio, acorde con nuestras necesidades (figura 3.1). El gas se burbujea a través de una pequeña placa de vidrio fritado, (c), soldada al extremo de uno de los tubos de la doble llave de entrada-salida (a-d) acoplada al tubo (b) en donde se introduce el líquido que queremos saturar con hidrógeno. Para un mejor control, ambas ramas de salida van provistas de una llave esmerilada de cierre. Dicho tubo (b) presenta un orificio de 6 mm de diámetro cerca de su base (sellado con un septum de goma) por el cual se extrae la muestra líquida resultante con ayuda de una jeringuilla hipodérmica. Para garantizar el cierre hermético del burbujeador, todas las uniones esmeriladas se sellan usando grasa de silicona Merck.

Puesto que el hidrógeno es un gas cuyo manejo en recintos cerrados puede resultar peligroso, se tomó la precaución de situar la bala de hidrógeno utilizada para el burbujeo, en el exterior del edificio; asimismo, el correspondiente desahogo del referido burbujeo se colocó hacia el exterior del laboratorio.

3.2 Control de las variables de medida

3.2.1 Temperatura

La temperatura de trabajo fue siempre 25,0 °C. Para su control durante el burbujeo, el burbujeador se mantuvo sumergido en un baño termostato-criostato HETO, modelo 23DT, de 30 litros de capacidad, provisto de un termómetro HETO que permite fijar y mantener la temperatura con una precisión de $\pm 0,1$ °C. Como medida de control suplementario, se dispuso de un termómetro adicional, de lectura vertical, con escala de -10,0 a 110,0 °C dividida en 0,1 unidades.

Para las medidas en fase gaseosa hechas tanto con el sensor potenciométrico como con el amperométrico, el control de esta variable, a 25,0 °C, se realizó manteniendo introducida la célula de trabajo en un baño termostático con agua. Dicho termostato va provisto de un sistema de calefacción a impulsos, controlado por un relé que se encuentra conectado a un termómetro de contacto de mercurio. Al igual que durante el burbujeo, un termómetro de lectura vertical con escala de -10,0 a 110,0 °C, dividida en 0,1 unidades, permitió el control adicional de la temperatura del baño.

La rápida respuesta del sensor amperométrico en las medidas en disolución nos permitió prescindir del baño termostático para el control de la temperatura, puesto que esta no presentaba modificaciones durante el breve tiempo que duraba la medida y, además, el laboratorio de trabajo se mantuvo termostataado a 25,0 °C, mediante la utilización de varias lámparas de infrarrojo conectadas a un relé accionado por un sensor termométrico con precisión de $\pm 0,1$ °C. La homogeneidad térmica del laboratorio se consiguió con la ayuda de un ventilador de techo que trabaja a velocidad controlada.

3.2.2 Presión ambiental. Calibrado del barómetro

Para garantizar que la presión parcial del H₂ gas sobre la disolución acuosa saturada de dicho gas es 1 atm (tal y como exige la definición de coeficiente de Bunsen del gas), el tubo de salida de gases del burbujeador se mantiene abierto a la atmósfera. Así, el H₂ excedente, no disuelto, pasa primero a la fase gaseosa situada encima de la disolución, para salir a continuación hacia el exterior del burbujeador arrastrando consigo, en su salida, al aire que inicialmente se encontraba sobre la disolución. De ese modo, tras unos minutos de burbujeo, el único gas que se encuentra en esa fase gaseosa sobre la disolución que está siendo burbujeadada con H₂, es el propio H₂. En consecuencia, que el burbujeador esté abierto a la atmósfera, asegura que la presión (parcial) de H₂ coincide con la presión total (atmosférica)

Por tanto, la presión parcial del H₂ gas sobre el líquido y, consecuentemente, la cantidad de dicho gas que se disuelve, dependen directamente del valor que adopte, en cada momento, la presión externa ambiental. Por otra parte, el valor de la presión parcial del O₂, que se considera como un valor constante en el proceso de cálculo, asimismo depende del valor de la presión externa ambiental.

Por consiguiente, la presión atmosférica es una de las variables que influye en el proceso de medida, tanto durante el burbujeo del hidrógeno como durante la propia medida del potencial del sensor en la célula y debe ser conocida y controlada.

Con objeto de llevar a cabo el seguimiento de dicha variable, se utilizó un altímetro-barómetro electrónico de gran precisión, *alpin-el*, marca Eschenbach

(Nürnberg, Alemania). Este aparato puede funcionar como altímetro, con una precisión de 0,5 m, facilitando el valor de la altura, sobre el nivel del mar, que posee un lugar determinado, a partir del conocimiento de la presión atmosférica de dicho sitio y de la QNH (presión atmosférica a nivel del mar en el momento de la medida). También puede servir como barómetro, con una precisión de 0,1 mmHg y la capacidad para detectar variaciones de presión de 0,02 mmHg, calculando la presión atmosférica de un lugar, en un instante dado (QFE), a partir del conocimiento de su cota sobre el nivel del mar.

Para realizar las medidas diarias de presión es imprescindible, por tanto, conocer con exactitud la altura a la que está situado el laboratorio respecto del nivel del mar. Dicho valor de cota del laboratorio del departamento de Química Física en la Facultad de Farmacia, en el que se realizaron las medidas con el hidrógeno, se determinó de la manera siguiente:

- Primero se procedió a la calibración del instrumento, en la estación de observación meteorológica de la “cabecera 30” del aeropuerto Tenerife Norte. Para ello, y una vez allí, se introdujeron en el *alpin-el* los valores de la altura sobre el nivel del mar (que es perfectamente conocida), así como el valor confiable de QNH, para las condiciones meteorológicas del momento, datos ambos que nos fueron facilitados por el observador meteorológico de servicio del aeropuerto.

- Calibrado el aparato, se comprobó el correcto funcionamiento de sus funciones altímetro y barómetro, midiendo *in situ* ambos parámetros y comparándolos con los que, en ese mismo instante, eran medidos por el observatorio meteorológico.

- Inmediatamente a continuación, nos trasladamos hasta la universidad (lo que supuso tan solo un lapso de unos 5 minutos, por lo que el cambio en el valor del QNH puede considerarse despreciable), y se midió la altura del laboratorio sobre el nivel del mar. Este valor resultó ser de 571,5 m.

Con base en ese dato, se realizaron las determinaciones diarias de los correspondientes valores de la presión atmosférica en el laboratorio. Este proceso de calibración se repitió con una periodicidad de 3 meses a fin de comprobar el buen funcionamiento del altímetro-barómetro.

3.3 Medidas con un sensor potenciométrico de hidrógeno

3.3.1 Diseño y funcionamiento del sensor potenciométrico

Este “*Sensor de Hidrógeno*” es una célula electroquímica construida a partir de una membrana sólida de un electrólito polimérico (s.p.e), cuyas caras se revisten con diferentes metales, entre los que se incluye el platino como metal inerte.

Esta membrana se comercializa reforzada con un copolímero intercambiador catiónico sulfónico-carboxílico de compuestos perfluorinados (Nafion 90209, Dupont Co, Polymer Products). El metalizado de esta membrana (Pt-spe), que lleva a cabo nuestro grupo de investigación, se realiza mediante un proceso de sputtering o metalizado por bombardeo iónico. Con este procedimiento, se consigue que las partículas de los diferentes metales empleados no se distribuyan de manera homogénea a través del espesor del recubrimiento metálico del polímero; por el contrario, este procedimiento garantiza que tenga lugar el predominio de un determinado metal en las proximidades de la superficie del recubrimiento [4]. La membrana, metalizada de esta forma, tiene una elevada estabilidad química, puesto que presenta una única morfología en la que los lugares de intercambio, tanto de iones como de agua, constituyen fases separadas del fluorocarbón que forma parte del material básico de refuerzo. Además, las buenas propiedades electroquímicas que presenta el polímero electrolítico, eliminan problemas asociados con la solubilidad de los reactivos, facilita la transferencia de masa de éstos hacia o desde la superficie del electrodo y, en general, mejora las limitaciones típicas de una célula electroquímica [52].

El polímero metalizado (a la que, a partir de ahora, designaremos como membrana Pt-spe) funciona como célula electroquímica, pues una de sus caras actúa de cátodo y la otra, de ánodo. Su gran ventaja es que el hidrógeno y el oxígeno pueden ser adsorbidos directamente desde la fase gaseosa, para oxidarse y reducirse, respectivamente, sobre cada una de ambas caras.

En la figura 3.2 se representa, en esquema, este sensor de hidrógeno. La membrana Pt-spe así preparada (a), se emplaza entre dos piezas rectangulares (b) de plástico (de 2,5 cm x 1,5 cm), que se mantienen unidas entre sí mediante dos

pequeños tornillos metálicos (c) que sirven, al mismo tiempo, para facilitar la conexión eléctrica con el voltímetro durante la medida de la f.e.m que se genera. Estas piezas plásticas presentan un orificio central amplio que permite el contacto de ambas caras de la membrana Pt-spe con el exterior. Alrededor del orificio de una de esas piezas plásticas se suelda un pequeño tubo de vidrio (d), de terminación esmerilada, para que el sensor pueda ser acoplado a la célula de trabajo que contiene la muestra. El otro orificio permite que la cara opuesta quede expuesta y en contacto con el aire del laboratorio.

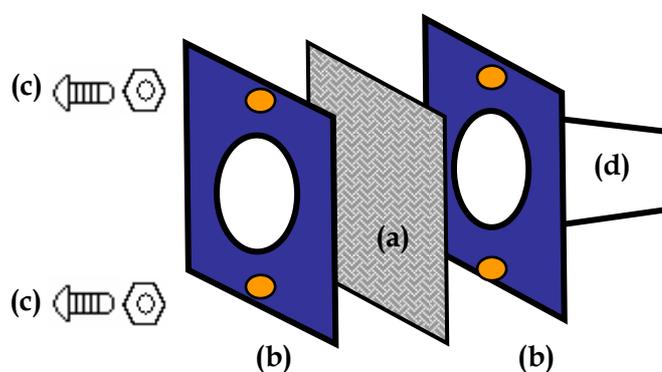


Figura 3.2 Diseño del sensor de hidrógeno empleado

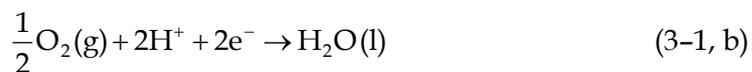
- (a) Membrana polimérica revestida de platino (membrana Pt-SPE)
- (b) Piezas plásticas que confinan la membrana
- (c) Tornillos de sujeción (con tuerca) y terminales eléctricos
- (d) Tubo esmerilado de vidrio para acoplar a la célula de trabajo

Durante la medida, la superficie de la membrana Pt-spe que funciona como ánodo, permanece en contacto con la fase gaseosa que se encuentra en equilibrio con la muestra líquida que se desea analizar. Para evitar que los vapores del disolvente alcancen la superficie de la membrana Pt-spe y alteren la medida correspondiente, se coloca una membrana de teflón sobre la boca del tubo esmerilado (d). Esta membrana de teflón permite, sin embargo, el paso a su través del H_2 gas [53].

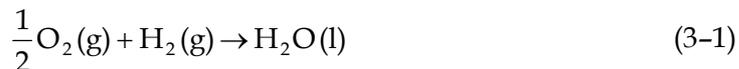
Como ya se indicó en el capítulo precedente de esta Tesis, la mayor parte del hidrógeno disuelto en la muestra a estudiar, abandona el líquido y se adsorbe sobre el ánodo, oxidándose a protones según la reacción:



estos protones circulan a través del polímero sólido conductor del sensor (SPE) hasta alcanzar la otra cara de la membrana Pt-spe, que actúa como cátodo. Al cortocircuitar la membrana Pt-SPE, los electrones circulan por el conductor electrónico externo hasta alcanzar el cátodo del sensor, donde son consumidos en la reducción del oxígeno procedente del aire del laboratorio, según la reacción:



En consecuencia, la reacción global en el sensor (suma de las 3-1, a y b) es la formación de agua a partir de oxígeno e hidrógeno, según



La fuerza electromotriz generada por esta reacción, cuya medida sirve de base para el sensor de hidrógeno, se determina con un voltímetro de alta impedancia de entrada ($>10^9 \Omega$). Esta f.e.m. puede ser expresada, caso de serle aplicable, mediante la ecuación de Nernst (2-26):

$$E = E^0 - \frac{2.303RT}{2F} \log \frac{a_{\text{H}_2\text{O}}}{P_{\text{H}_2} \cdot P_{\text{O}_2}^{1/2}} \quad (3-2\text{a})$$

Que, en el caso que nos ocupa, queda reducida, exclusivamente, a una función de la concentración del hidrógeno presente en la fase gaseosa, de la forma:

$$E = E^* + \frac{2.303RT}{2F} \log C_{\text{H}_2} \quad (3-2)$$

puesto que la concentración de oxígeno (procedente de la atmósfera del laboratorio) es muy elevada y puede considerarse que permanece constante

durante todo el proceso de medida (el consumo de oxígeno, por la reacción (3-1), es extremadamente pequeño) y la actividad del agua, presente como disolvente, se mantiene también constante. E^* es un potencial estándar aparente (expresado, al igual que E , en mV) que incluye, entre otros, al factor de cambio de unidades desde presión parcial del H_2 (p_{H_2} , expresada en atm) a concentración de H_2 (C_{H_2} , expresada en mol/dm³), a la presión parcial del oxígeno, p_{O_2} , y a la actividad del agua, que se mantienen constantes durante la medida. El factor 2 que figura en el denominador de (3-2) responde al número de electrones transferidos en la reacción red-ox por cada mol de hidrógeno oxidado.

A la vista de la ecuación (3-2), si la respuesta del sensor obedeciese a un comportamiento nernstiano, la representación gráfica de los potenciales medidos, para diferentes concentraciones de hidrógeno disuelto, debería ser lineal, con una pendiente positiva de, prácticamente, 30 mV (correspondiente al factor $2,303RT/2F$, siendo $T = 298,15$ K).

Después de cada medida y durante el tiempo de almacenamiento, los sensores descansan cortocircuitados para permitir que se restablezca el equilibrio entre ambos electrodos y que su diferencia de potencial recupere el valor de reposo.

3.3.2 Diseño y funcionamiento de la célula de medida

En la figura 3.3 puede verse el diseño actual de la célula de trabajo. Éste es el resultado de sucesivas modificaciones que han tenido por objeto optimizar la medida del potencial generado por el sensor.

Como base de la célula de medida, se utiliza un erlenmeyer de boca esmerilada, de 25,0 ml de capacidad, con un orificio de 6 mm de diámetro practicado cerca de su base. Éste queda sellado durante el experimento, mediante un septum de goma a través del cual y utilizando una jeringuilla hipodérmica, se introduce la muestra.

Entre el erlenmeyer y el sensor se coloca una llave de gases de punzón que permite poner en contacto, tras su apertura, la fase gaseosa del interior del vial, en equilibrio con la muestra líquida, y la cara de la membrana que funciona como ánodo. Un agitador magnético situado en el interior del vial permite controlar la velocidad con la que el gas abandona la disolución. Todos los experimentos se

realizaron a una velocidad de agitación de 500 rpm.

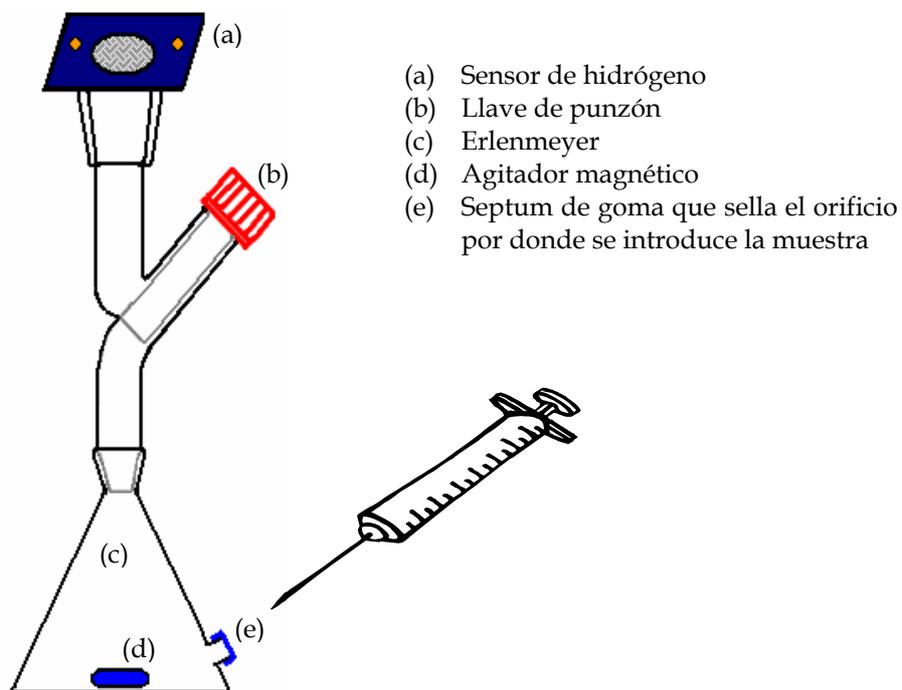


Figura 3.3 Sensor de hidrógeno acoplado a la célula de trabajo

El erlenmeyer, la llave de gases y el sensor se conectan a través de bocas esmeriladas. El sellado hermético de la célula de trabajo se realizó usando grasa de silicona Merck.

La temperatura de la muestra se controla sumergiendo la célula en un baño termostataado. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25,0 °C.

La toma de valores de f.e.m. se hizo, de forma simultánea, con un voltímetro de alta impedancia de entrada y con un equipo informático. Este último sistema de medida permitió, además del registro de los datos, observar en la pantalla del monitor, en tiempo real, la evolución de la curva de potencial frente al tiempo, producida por el experimento.

3.3.3 Determinación de la humedad relativa

Como ya se ha comentado con anterioridad en el epígrafe 2.8, la respuesta de este sensor electroquímico se ve afectada por las variaciones de humedad originadas

por los cambios climatológicos. Para conocer y hacer un seguimiento del valor de la humedad relativa ambiente a la que se encuentran expuestos los sensores, se utilizaron dos termohigrómetros digitales, modelo TFA, con precisión de $\pm 6\%$ y resolución del 1% , trabajando en el rango de humedad relativa entre el 30% y el 90% y de temperatura entre 0 y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Debido a los cambios climatológicos y a la utilización de lámparas infrarrojas para el mantenimiento de la temperatura del laboratorio, la humedad ambiente era difícil de mantener constante entre $50 - 55\%$, valor para el que los sensores presentan un funcionamiento óptimo. Estas condiciones favorables para los sensores, se lograron almacenándolos, cortocircuitados, dentro de una urna de cristal en cuyo interior se mantuvo el grado de humedad requerido; en ocasiones, haciendo una aportación extra de vapor de agua y, en otras, introduciendo en la urna gel de sílice como agente desecante. Durante el proceso de medida de la f.e.m. del sensor, se controló la humedad relativa, colocando uno de los termohigrómetros sobre una rejilla, encima del baño termostático en donde se mantenía sumergida la célula de trabajo. Puesto que la precisión de estos higrómetros no es elevada, sus registros fueron contrastados y corregidos respecto del mismo ambiente de referencia.

En los días de siroco, en los que la humedad del laboratorio descendió hasta valores muy bajos ($30 - 35\%$), fue necesario extremar las medidas incrementando la humedad del laboratorio mediante pulverización de agua.

3.3.4 Medida del potencial eléctrico. Registro de datos

El potencial eléctrico se midió, simultáneamente, por dos caminos diferentes:

a) Multivoltímetro digital

El circuito equivalente que se corresponde con el montaje de un multímetro para la medida de f.e.m. de una célula galvánica, E , puede ser representado mediante el esquema que se recoge en la figura 3.4. En dicho esquema, R_{cel} representa la resistencia de la célula galvánica que se pretende medir (debida a los electrodos y al electrólito bien en disolución o bien sólido); E es la f.e.m. real de la célula y Z_{volt} es la impedancia de entrada del multivoltímetro que se usa para hacer la medida

Despreciando la pequeña resistencia que presentan los cables de conexión desde el multivoltímetro hasta la célula galvánica que se desea medir, la aplicación de la Ley de Ohm permite establecer que la corriente que circula por el sistema global de medida es igual a:

$$i = \frac{E}{Z_{\text{volt}} + R_{\text{cel}}} \quad (3-3)$$

puesto que Z_{volt} y R_{cel} , están conectados en serie.

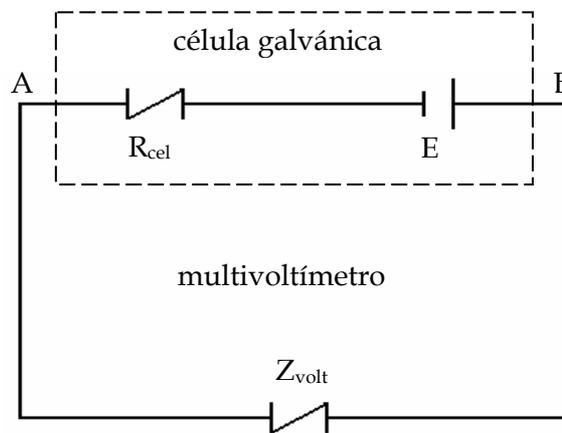


Figura 3.4 Esquema del circuito equivalente correspondiente a la medida de f.e.m. con un multivoltímetro

La diferencia de potencial entre los extremos A y B de la célula (que es el valor que lee el multivoltímetro empleado) vendrá dada por:

$$V_A - V_B = E - i R_{\text{cel}} \quad (3-4)$$

es decir, el valor del potencial de la célula que se lee en el multivoltímetro, es igual a la diferencia entre la f.e.m. real de la célula y la caída óhmica de potencial ocasionada por la resistencia del aparato de medida.

Combinando ambas ecuaciones 3-3 y 3-4 se obtiene:

$$V_A - V_B = E \left(1 - \frac{R_{\text{cel}}}{Z_{\text{volt}} + R_{\text{cel}}} \right) \quad (3-5)$$

Es decir, como se deduce de la simple observación de esta ecuación (3-5), la medida de la diferencia de potencial, $V_A - V_B$, coincidirá con el valor de la f.e.m. de la célula, E , únicamente si el segundo sumando que aparece dentro del paréntesis es tan pequeño que puede considerarse como igual a cero. Tal posibilidad se consigue cuando Z_{volt} es mucho mayor que R_{cel} . Por ello, para que las medidas posean una buena precisión, es imprescindible que el término Z_{volt} sea 3 ó 4 órdenes de magnitud superior al valor de R_{cel} . Por tanto, si se tiene en cuenta que el valor de la resistencia que presentan las membranas está entre 1 y $3 \cdot 10^6 \Omega$, se hace necesario utilizar un aparato de medida con una impedancia de entrada del orden de 10^9 ó $10^{10} \Omega$, como mínimo. Sólo de esta forma se puede suponer despreciable el valor de R_{cel} frente al de Z_{volt} .

En este trabajo de Tesis Doctoral, las medidas se realizaron usando dos multivoltímetros digitales, KEITHLEY modelos 197 y 197A, respectivamente, Autoranging Microvolt DMM. Ambos aparatos poseen una resolución de $1,0 \mu\text{V}$ en la escala de $200,00 \text{ mV}$ y una impedancia de entrada superior a $10^9 \Omega$, lo que resulta suficiente para poder obtener medidas con una precisión del orden del 0,1 %. Con independencia del multivoltímetro usado, éste se colocó en el interior de una jaula de Faraday, al objeto de amortiguar las oscilaciones en las lecturas, como consecuencia de perturbaciones que puedan venir provocadas por cualquier carga eléctrica externa al sistema (tal es el caso de la proximidad de personas o/y objetos al sistema de medida, al transformarse su energía cinética en energía electrostática).

Sustituyendo valores numéricos en la ecuación (3-5) se obtiene que:

$$V_A - V_B = 0,9990 E \quad (3-6)$$

esto quiere decir que el valor (de d.d.p.) que aparece en la pantalla del multivoltímetro utilizado, difiere en un 0,1% del valor real de la f.e.m. de la célula que se está midiendo.

b) Equipo informático

El segundo procedimiento utilizado en la medida de la f.e.m. de la célula galvánica, se basa en el uso de una tarjeta de adquisición de datos, CIO-DAS1401/12, cuya ganancia e intervalo de selección se elige a través de la combinación de un interruptor bipolar / unipolar y un amplificador de ganancia programable. El intervalo bipolar es de $\pm 0,01$ V y el unipolar de 0 a $\pm 0,01$ V [54]. Dicha tarjeta está instalada en un ordenador que se conecta en serie con el multivoltímetro y con la célula de medida. Los datos recogidos por la tarjeta son procesados mediante un programa informático específico, diseñado en entorno Windows por el servicio de electrónica de la Universidad de La Laguna. Algunos detalles relativos a dicho programa se presentan en el Apéndice I.

El mencionado programa permite, además de medir y memorizar los valores de f.e.m., visualizar en el monitor, en tiempo real, la representación gráfica de tales valores frente al tiempo de medida. Tal circunstancia presenta la ventaja de poder actuar sobre la toma de datos, e incluso interrumpirla cuando se alcanza un valor máximo estable, correspondiente al *plateau* de la curva que se selecciona como dato experimental. El programa recoge y archiva, además, todos aquellos datos referentes a la muestra y a los parámetros de medida, que son necesarios para los cálculos posteriores.

3.4 Medidas con un sensor amperométrico de hidrógeno

Junto con las medidas potenciométricas, en este Trabajo de Tesis Doctoral también se hicieron medidas de hidrógeno gaseoso en fase gas y en disolución utilizando un sensor amperométrico comercializado por UNISENSE A/S[®], modelo H2-500.

3.4.1 Diseño y funcionamiento del sensor amperométrico

Unisense A/S posee una amplia gama de microsensores diseñados para diferentes usos en investigación, así como para ser utilizados en una amplia variedad de muestras, tales como sedimentos, tejidos, suelos y diverso material biológico. Estos microsensores soportan altas presiones (hasta 600atm) y presentan tiempos

de respuesta muy pequeños (tiempo mínimo = 50ms). Su respuesta depende, por otra parte, de la temperatura y del tiempo de actividad (la permeabilidad de la membrana de silicona varía en función del tiempo de trabajo).

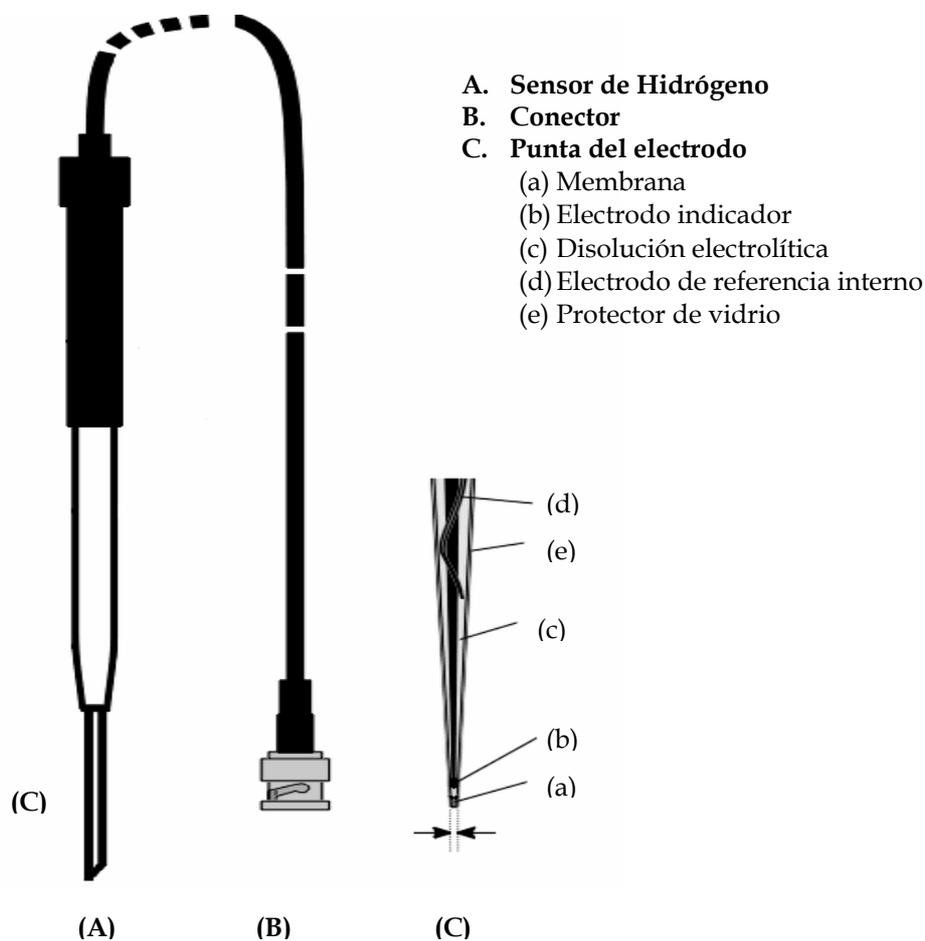


Figura 3.5 Esquema del sensor amperométrico *Unisense*®

El sensor de hidrógeno H2-500, empleado para este trabajo de Tesis Doctoral, es de tipo Clark. Esto es, se trata de una célula de 3 electrodos: un electrodo de referencia, un electrodo indicador, o medidor, de Pt y un contra-electrodo. Todos ellos dispuestos en el reducido espacio que constituye la punta del electrodo (figura 3.5), la cual está resguardada por un protector cilíndrico de plástico. Este protector puede retirarse para su utilización, pero dada la fragilidad de esta punta del electrodo todas las medidas realizadas en este trabajo se han llevado a cabo sin retirar dicha protección.

El sensor de hidrógeno H2-500, está diseñado para trabajar sumergido en diferentes fluidos, e incluso en muestras biológicas semisólidas, si bien hemos podido comprobar que midiendo en la fase gaseosa pueden, también, obtenerse resultados con un buen nivel de precisión, aunque su respuesta es, obviamente, más lenta.

Este sensor permite hacer medidas confiables y rápidas en un amplio rango de concentración de H₂, debido a su rápida respuesta, a su pequeño tamaño y a su alta sensibilidad. La única limitación que presenta se deriva de la presencia, en el medio, de sulfuro de hidrógeno, sustancia ésta que interfiere la medida de este sensor, si bien su sensibilidad frente al H₂ es diez veces superior a la que posee frente al H₂S.

El electrodo indicador de Pt se encuentra embebido en una disolución electrolítica de tipo orgánico (una sal apropiada disuelta en un disolvente orgánico). Este electrólito se mantiene separado de la muestra problema mediante el uso de una membrana de silicona situada en el extremo del cuerpo principal de vidrio del sensor, evitando de ese modo que pueda tener lugar la contaminación de dicho sensor, aunque su presencia no impide el tránsito, a su través, del hidrógeno que se desea medir.

El hidrógeno procedente de la muestra, difunde pues a través de la membrana de silicona, atraviesa la disolución electrolítica hasta, finalmente, alcanzar el ánodo de platino sobre el cual se oxida, según:



polarizándose frente al electrodo de referencia interno. El flujo de electrones desde el ánodo hacia el contra-electrodo es una función lineal de la cantidad de hidrógeno disuelto.

Puesto que, habitualmente, la concentración problema de H₂ disuelto es muy baja, es muy importante que el límite de detección del sensor sea lo más bajo posible. Por ello, en el diseño estándar de un sensor de hidrógeno prima optimizar su sensibilidad, en perjuicio, en muchos casos, de la estabilidad de éstos frente a la agitación. Generalmente, el límite de detección de este tipo de sensor está en el entorno del 0.02% de hidrógeno (0.1 μM en disolución acuosa). No obstante, si este

sensor H2-500 tuviese una mayor superficie para el intercambio de H₂ (tubo de vidrio, cerrado por la membrana de silicona, de mayor diámetro) sería presumible que su sensibilidad se viese incrementada.

Finalmente señalar que sensores tan sensibles como éstos, lo son también a cualquier perturbación, inmediata o próxima. Por este motivo, controlar una adecuada agitación de la muestra durante las medidas experimentales se torna muy importante si se pretende que los resultados encontrados sean confiables y repetibles [55].

3.4.2 Célula de medida

Cuando se utilizó este sensor para las medidas en fase gas, se manejó la misma célula de trabajo descrita en el apartado relativo a las medidas con el sensor potenciométrico y que se muestra en la figura 3.3. Esto es, un erlenmeyer de boca esmerilada, de 25,0 mL de capacidad, con un orificio en su base sellado mediante un septum, a través del cual y utilizando una jeringuilla hipodérmica, se introduce la muestra. Entre el erlenmeyer y el sensor, se encuentra, igualmente, una llave de gases de punzón que permite poner en contacto, tras su apertura, la fase gaseosa del interior del vial -en equilibrio con la muestra líquida- y el sensor, el cual se acopla a dicha llave mediante un septum de goma convenientemente perforado.

Durante la realización de estas medidas, la temperatura de la muestra se controló sumergiendo la célula en un baño termostatado a 25,0 °C.

Cuando se utilizó este sensor para las medidas en el seno de disolución, dado su pequeño tiempo de respuesta no fue necesario guardar ningún tipo de precaución especial para evitar el escape del H₂. Por lo que, simplemente, se utilizó como célula de trabajo un tubo de ensayo de 12 mL de capacidad, de tal forma que al introducir en él el sensor provisto de su protector plástico, la muestra quedaba, aunque no de forma estanca, sí aislada de la atmósfera del laboratorio, tal y como se puede apreciar en la fotografía que se muestra en la figura 3.6. Esto obligó a disminuir el volumen total de la disolución bajo estudio a 8 mL.



Figura 3.6 Sensor amperométrico *Unisense*[®] introducido en la célula de trabajo

La rápida respuesta de este sensor también nos permitió prescindir del baño termostático para el control de la temperatura, puesto que esta no presentaba modificaciones durante el breve tiempo que duraba la medida.

3.4.3 Medida de la corriente eléctrica

Este sensor amperométrico, H2-500, es capaz de generar una intensidad de corriente de polarización muy baja, del orden de los picoamperios (10^{-12} amperios). Por ello, *Unisense* ha desarrollado un picoamperímetro, de alta calidad, para ser acoplado al citado sensor y poder, de ese modo, transformar la medida de corriente que éste suministra, en el equivalente valor de potencial eléctrico, en base al conocimiento de la impedancia del sistema de medida empleado. El PA2000, que puede trabajar a temperaturas comprendidas entre 10 - 30°C y bajo diferentes condiciones de humedad relativa [56].

Se trata de un picoamperímetro versátil, diseñado para uso diario en el laboratorio, que puede ser acoplado tanto a micro como a minisensors

amperimétricos que, al igual que el H2-500, pertenecen al grupo del tipo Clark. Sus características principales son:

- está dotado de dos canales de entrada y otros dos de salida independientes, lo que permite realizar medidas simultáneas con dos sensores diferentes. Cada canal presenta una polarización de $-2.5V$ a $+2.5V$ y puede ser ajustado de manera independiente;
- posee un tiempo de respuesta inferior a 50 milisegundos;
- va provisto de cuatro escalas de medida (desde 200 pA hasta 200 nA) con un factor de paso de 10 entre cada una de ellas;
- permite medidas con un nivel de resolución de $0,05pA$, en un rango de señal comprendida entre 0 y ± 1 mA (10^6 pA) y una salida analógica de potencial entre 0 y $\pm 10V$.

3.4.4 Registro de datos

El registro y almacenamiento de los valores de intensidad de corriente obtenidos con el picoamperímetro PA2000, se realiza a través del paquete informático *Profix*, realizado en entorno Windows, suministrado también por *Unisense A/S*.

En un primer paso, la señal analógica procedente del picoamperímetro se convierte en señal digital por medio de una tarjeta de adquisición de datos (*Unisense Data Adquisición DI-700*) que se conecta a uno de los puertos USB de un ordenador auxiliar.

A continuación, el programa informático del *Profix* almacena el dato de intensidad de corriente, así como el valor de potencial eléctrico que provoca ese paso de corriente, que el programa calcula a partir del valor de la impedancia del sistema objeto de medida.

Por último, el antes citado programa realiza la representación gráfica, frente al tiempo de medida, de los valores de potencial eléctrico así calculados y la muestra en la pantalla del ordenador auxiliar, en tiempo real, para su visualización y posible actuación sobre el experimento.

3.5 Métodos operatorios

3.5.1 Descripción de un experimento típico con muestras de agua que contienen Hidrógeno burbujeado

Con objeto de ilustrar y facilitar la comprensión de las medidas experimentales llevadas a cabo en esta Tesis Doctoral, bajo este epígrafe se describe el procedimiento experimental seguido para realizar las medidas potenciométricas y amperométricas en disoluciones acuosas de hidrógeno.

a) Medida potenciométrica

Se comienza conectando el sensor que se va a utilizar al voltímetro e incorporándolo a la célula de trabajo, tal y como se aprecia en la figura 3.2. Posteriormente se espera, durante un tiempo de unos 15 min. aproximadamente, a que la señal que presenta inicialmente, y que denominamos *potencial de reposo* del sensor, se estabilice. Es entonces cuando se considera que el sensor en cuestión se encuentra en disposición de medir.

Mientras esto ocurre, y de manera simultánea, se hace pasar hidrógeno por los 42,0 mL de agua *Millipore*®, introducidos en el burbujeador durante el tiempo que, como ya se indica a lo largo de esta Memoria, se considera suficiente para saturarlo de hidrógeno a una temperatura de 25,0 °C.

Finalizado el burbujeo se extrae, a través del septum del burbujeador y con ayuda de la jeringuilla, un volumen de disolución saturada ligeramente mayor que el requerido (procurando que dicho volumen esté libre de burbujas). Sin pérdida de tiempo, se inyecta en la célula de trabajo, a través de su septum, el volumen exacto que se desea y se desecha el resto. La célula de trabajo, que ya contiene el volumen de agua *Millipore*®, libre de hidrógeno necesario para que tras la mezcla se consiga una determinada concentración de muestra, se mantiene dentro del termostato, a 25 °C, antes y después de inyectar la muestra líquida, para facilitar que se alcance más rápidamente el equilibrio termodinámico entre las fases líquida y gas, en el interior de dicha célula.

Seguidamente, se toma como *cerro relativo* el potencial de reposo (*“reset”*), se pone en marcha la toma de datos en el voltímetro y en el ordenador (ambos programados previamente para recoger valores a intervalos regulares de tiempo – generalmente cada minuto–) y se abre la llave de punzón para poner en contacto la fase gaseosa en equilibrio con la disolución, con la cara de la membrana Pt-spe que actúa como ánodo.

La fotografía de la figura 3.7 permite apreciar el montaje de medida instalado en nuestro laboratorio.

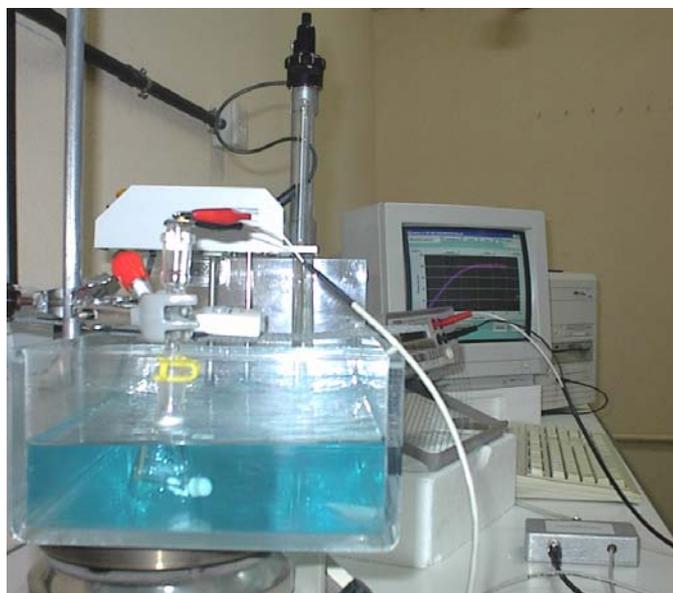


Figura 3.7 Montaje para las medidas potenciométricas instalado en nuestro laboratorio

En la pantalla del ordenador auxiliar, va dibujándose, en tiempo real, el registro del potencial eléctrico medido, en mV, frente al tiempo de experimentación. Dicha representación define una curva de trazado parabólico característico, que alcanza un valor máximo estable, o *plateau*, el cual se hace corresponder con el valor representativo del contenido en hidrógeno de la fase gaseosa de la célula, en equilibrio con la fase líquida de la muestra.

Se ha observado que el agua *Millipore*®, o cualquier disolución libre de hidrógeno, genera en este sensor una pequeña y variable d.d.p., que introduce

fluctuaciones indeseables en el valor final del potencial medido para la muestra. Dicha d.d.p es la que corresponde al *cero de hidrógeno disuelto* –que varía con el tiempo–. Es por ello que, inmediatamente antes de cada medida, como la anteriormente descrita, siempre se realiza otra medida previa usando un volumen igual de agua *Millipore*®, o en su caso de la correspondiente disolución, libre de hidrógeno, con objeto de eliminar dichas fluctuaciones. De tal forma, que la diferencia entre los valores del potencial medido en ambos casos se corresponde, únicamente con la concentración de hidrógeno en la disolución.

Así pues, en el caso que nos ocupa, el valor del potencial asignado al hidrógeno disuelto en una muestra determinada, resulta de la diferencia aritmética entre los dos valores máximos alcanzados al medir el agua *Millipore*® libre de hidrógeno y la muestra acuosa hidrogenada, siempre que las medidas se lleven a cabo con el mismo sensor y en iguales condiciones de presión, humedad relativa y temperatura (figura 3.8)

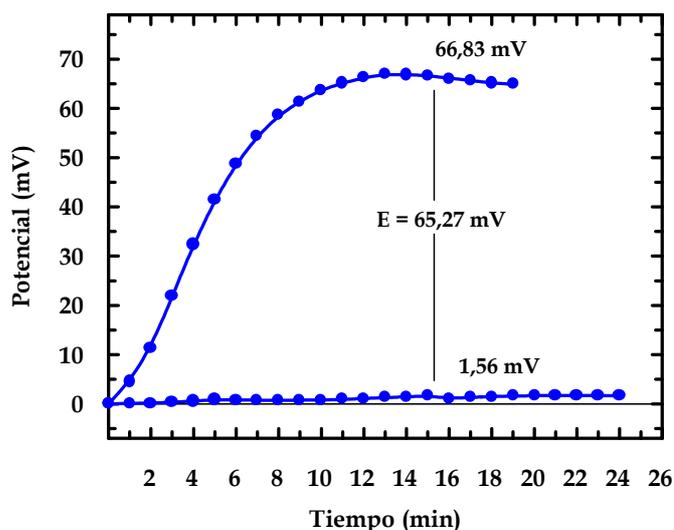


Figura 3.8 Curva de potencial obtenida con 10,0 ml de una muestra acuosa saturada de hidrógeno y otra de agua *Millipore* (temperatura = 25,0 °C; presión atmosférica = 713,8 mmHg y humedad relativa de almacenamiento = 52 %)

Dada la variabilidad en la respuesta que facilita este sensor, para cada muestra de disolución hidrogenada, la medida del potencial eléctrico se repite varias veces manteniendo, en todos los casos, constantes los valores de las diferentes variables termodinámicas. El dato experimental que finalmente se asigna a una

determinada concentración de hidrógeno disuelto es la media aritmética entre todas las diferencias halladas entre el valor de potencial de cada muestra y su medida previa correspondiente.

Finalizada la medida experimental, se deja que la membrana Pt-spe elimine todo el hidrógeno adsorbido y vuelva a su potencial de reposo, antes de iniciar una nueva medida con ese sensor. El tiempo necesario para ello varía con la concentración de hidrógeno presente en la muestra medida, oscilando entre los 10 min. y una hora.

b) Medida amperométrica

La primera operación que se realiza es el ajuste del picoamperímetro, PA2000. Para ello se le introduce el valor de polarización estándar (+80) y se ajusta el valor del cero en la pantalla. A continuación se conecta el sensor H2-500 al picoamperímetro, se selecciona la escala de medida y se procede a calibrar dicho sensor. A tal fin, se comienza por polariza el sensor, con lo que la señal de potencial aumenta rápidamente, manteniendo dicho aumento durante algunos minutos. Transcurrido ese tiempo, la pendiente comienza a disminuir hasta que se dibuja un *plateau*, lo que suele tardar algunas horas. Una vez alcanzado el valor estable de potencial, se está en disposición de iniciar el proceso de calibración propiamente dicho. Para ello se utilizan dos disoluciones: una de agua Millipore, que representa el *cero de hidrógeno disuelto*, y otra con una concentración de H₂ conocida, por ejemplo al 50% desde el valor de la saturación. Esta concentración, al igual que la del resto de las disoluciones empleadas para llevar a cabo las medidas experimentales, solo se podrá considerar constante durante algunos minutos, ya que el hidrógeno se va insolubilizando y, en consecuencia, escapando de la muestra con la consiguiente disminución de la concentración de H₂ disuelto en dicha muestra.

La calibración debe repetirse diariamente a no ser que el sensor se mantenga polarizado durante el tiempo necesario para realizar un determinado estudio (toda una tanda de medidas). La calibración tendrá que repetirse solo si, una vez finalizado un grupo de medidas, dicho sensor se desconecta y se mantiene así durante un largo periodo de tiempo (que entre una medida y la siguiente transcurra un tiempo superior a una semana, aproximadamente)

Una vez finalizado el proceso de ajuste del picoamperímetro y de calibración del sensor, pueden comenzar las medidas de las muestras hidrogenadas.

b.1) Medidas en fase gaseosa

La metodología seguida para realizar estas medidas es muy similar a la descrita anteriormente para las medidas potenciométricas.

De manera simultánea a las operaciones de preparación, el agua *Millipore*® es burbujeada hasta saturación. Posteriormente, el volumen de disolución saturada a utilizar es extraído con la ayuda de una jeringuilla y, finalmente, introducido a través del septum inferior en la célula de medida, la cual lleva acoplada, en su parte superior, el sensor mediante otro septum convenientemente perforado. Al igual que antes, la mezcla del agua saturada de H₂ y libre de hidrogeno se realiza en la propia célula de medida. Seguidamente se pone en marcha el proceso de recogida de datos, habiendo anotado previamente el valor del *potencial de reposo* que mostraba el sensor antes de introducir las disoluciones en el interior de la célula de trabajo.

En el caso del electrodo *Unisense*®, no se observó que el agua, la orina, o en su caso las disoluciones utilizadas en determinados casos, cuando no contenían hidrógeno solubilizado, generasen señal eléctrica alguna. Es por ello que, en las medidas amperométricas, antes de la medida de una muestra no se realizó otra medida previa idéntica, pero sin hidrógeno, como hubo de hacerse con el sensor *spe*. De tal forma que el valor del potencial asignado al hidrógeno disuelto en una muestra determinada, resulta de la diferencia aritmética entre el valor máximo alcanzado al medir la muestra hidrogenada y el valor del *potencial de reposo* registrado.

b.2) Medidas en disolución

Como ya se comentó en el apartado 3.4.2, en este tipo de medidas se utilizó una célula de trabajo no herméticamente cerrada, aunque el diseño de esta célula si permite mantener durante la medida la disolución aislada de la atmósfera del laboratorio. Por lo tanto, tras registrar el *potencial de reposo* del sensor, se mezclan diligentemente en la propia célula la disolución saturada, procedente del

burbujeador, y el agua *Millipore*® libre de hidrógeno, y se introduce la punta del sensor sin retirar el protector de plástico. A partir de este momento se comienza a registrar y almacenar en el ordenador los pasos de corriente generados por la reacción.

En la fotografía de la figura 3.9 puede observarse el montaje completo del sistema de medida.



Figura 3.9 Montaje de las medidas amperométricas en disolución, instalado en nuestro laboratorio

El registro del potencial eléctrico, calculado a partir de las medidas de corriente, frente al tiempo define una curva de trazado parabólico similar a la encontrada en la medida potenciométrica aunque, en este caso, en el cuarto cuadrante de la representación cartesiana. Trasladada esta representación al primer cuadrante, el valor máximo estable se hace corresponder con el contenido en hidrógeno de la disolución. Dicha curva se va dibujando, en tiempo real, sobre la pantalla del ordenador auxiliar Figura 3.10.

El valor correspondiente a cada muestra bajo estudio viene dado por la diferencia entre el valor de reposo (polarización) y el de potencial medido. A

diferencia de como ocurriera con el sensor potenciométrico, dada la baja variabilidad observada en la respuesta de este sensor amperométrico, el número de medidas a realizar sobre una misma muestra pudo reducirse de forma considerable (en ocasiones solo fue necesario hacer dos medidas)

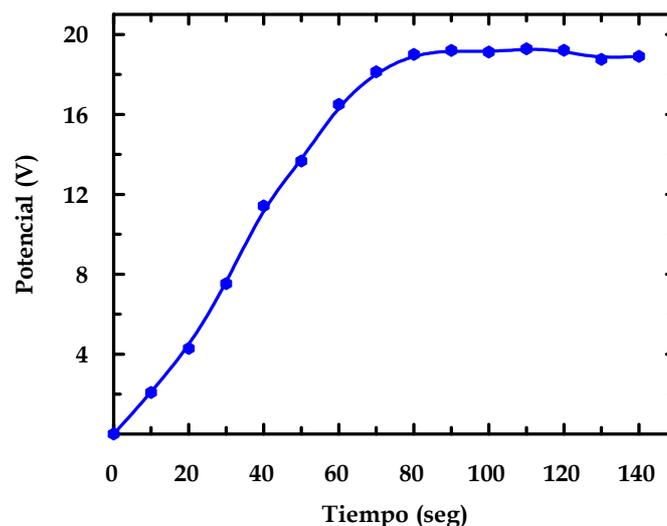


Figura 3.10 Curva de potencial obtenida para una dilución desde la saturación del 70 %, muestra de 8,0 ml de agua medida a 25,0 °C.

Una vez finalizada la medida, el electrodo se lava con abundante agua destilada y se almacena. En caso de que aparezca cualquier depósito insoluble, puede lavarse con una solución 0,01M de HCl, o con etanol 96% y abundante agua destilada.

3.5.2 Descripción de un experimento típico con muestras de orina que contienen Hidrógeno biológico

Como se mencionó en el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral, investigaciones previas a este trabajo, llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación del Departamento de Química Física [43], mostraron evidencias de que el hidrógeno generado en el intestino de los humanos es eliminado disuelto en la orina. Aquellos estudios preliminares han constituido la base sobre la que sustentar el

trabajo de Tesis Doctoral que aquí se presenta y cuyo objetivo científico principal es confirmar, definitivamente, que el hidrógeno es eliminado, también, por vía renal.

Asimismo, constituye también un objetivo importante de este trabajo, determinar que la cantidad excretada por esta vía renal es suficientemente significativa como para servir de base para el establecimiento de una analítica clínica específica, que contribuya a la diagnosis de los trastornos gastrointestinales que cursan con producción de este gas.

Por lo anteriormente señalado, en el presente epígrafe se describe el procedimiento experimental seguido por nosotros, para la medida de hidrógeno disuelto en orina, tanto para el caso de sujetos sanos como para aquellos que, conocemos de antemano, presentan una patología gastrointestinal.

En primer lugar, debe señalarse que las personas sometidas a esta prueba que aquí se presenta, cumplieron, en general, las normas que exige el “test de hidrógeno espirado” que realiza la unidad de Pediatría del Hospital Universitario de Canarias. Esto es, observaron una dieta pobre en azúcares al menos durante todo el día precedente a la realización de la prueba, no estuvieron sometidos a tratamiento con antibióticos durante, como mínimo, la semana anterior a la realización de la prueba y permanecieron en ayunas desde las diez de la noche del día previo, así como durante todo el tiempo que duró el ensayo.

Los experimentos se llevaron a cabo tras ingerir bien la lactosa contenida en 250 ml de leche entera, o bien una disolución acuosa preparada con 0,5 ml de lactulosa (Duphalac ®) por Kg de peso (hasta un máximo de 20 ml de lactulosa)

La primera recogida de una muestra de orina, la denominada *orina basal*, se realizó inmediatamente antes de la ingestión del azúcar correspondiente. Esta orina permitió conocer el contenido de hidrógeno residual que poseía el sujeto después de transcurrido el período de *semi-ayuno*. Las posteriores recogidas de las muestras de orina se llevaron a cabo en función del tipo de azúcar suministrado. En el caso de leche, la primera recogida de muestra tras la ingesta, se realizó a las dos horas, tiempo que se consideró suficiente para que hubiese tenido lugar la digestión completa de dicha leche. Las restantes muestras de orina se recogieron a cada una de las horas siguientes. Para el caso de la lactulosa, puesto que se utiliza para la detección de un posible establecimiento de flora bacteriana en el intestino

delgado, hábitat situado antes de su localización natural (colon), se recogieron a cada una de las horas siguientes a la ingestión. La recogida de las muestras, en ambos casos, finalizó cuando se detectó que el hidrógeno dejaba de ser eliminado (en todos los casos, después de 5 ó 6 horas a partir de la ingesta).

Las muestras de orina se recolectan en frascos de vidrio pyrex, con tapa plástica roscada provista de un cierre hermético. Estos frascos se mantienen almacenados en una nevera, a 4 °C aproximadamente, para disminuir en lo posible la tendencia a escapar que presenta el hidrógeno disuelto en la orina, durante el proceso de la micción. Al igual que el burbujeador y la célula de trabajo, el frasco de recogida de la orina presenta un orificio, practicado cerca de su base, sellado con un septum de goma por el que posteriormente se hacen las extracciones de las alícuotas de orina, por medio de una jeringuilla.

Los frascos, llenos de orina, se almacenan también en nevera hasta el momento de la medida, para aumentar la solubilidad del hidrógeno y evitar, de ese modo, pérdidas de gas disuelto en las muestras durante el almacenamiento.

Las medidas de muestras conteniendo hidrógeno biológico fueron realizadas utilizando el sensor *Unisense*®, por la posibilidad de introducirlo directamente en la muestra, lo que permite una mayor sensibilidad en las medidas; porque disminuye el tiempo necesario para obtener la propia medida; y porque presenta una mayor operatividad dada la sencillez y simplicidad de la célula de trabajo.

El procedimiento, por tanto, es el mismo que se ha descrito para las medidas amperométricas en el seno de la disolución (epígrafe b.2). Se registra el *potencial de reposo* que presenta inicialmente el sensor y se pone en marcha la toma de datos con el programa informático.

Como paso previo, se atemperó la orina a 25 °C, mediante la inmersión del frasco de vidrio recolector que contenía la muestra, en un baño termostático. Tras ello, se extrajeron del referido frasco, con la ayuda de una jeringuilla, los 10,0 ml de muestra de orina que se introdujeron en la célula de trabajo.

Los valores de potencial que se registraron dibujaron curvas de potencial eléctrico frente al tiempo, de trazado parabólico, que alcanzaron un valor máximo estable (figura 3.11), cuya diferencia aritmética con el *potencial de reposo* se hizo corresponder con el contenido de hidrógeno para la muestra de orina en cuestión.

De ese modo se obtuvieron los contenidos de hidrógeno disuelto en cada una de las muestras de orina, tanto en las denominadas como *orina basal*, como en las correspondientes a los diferentes tiempos de recolección tras la ingesta de cualquiera de los azúcares con los que se ha trabajado.

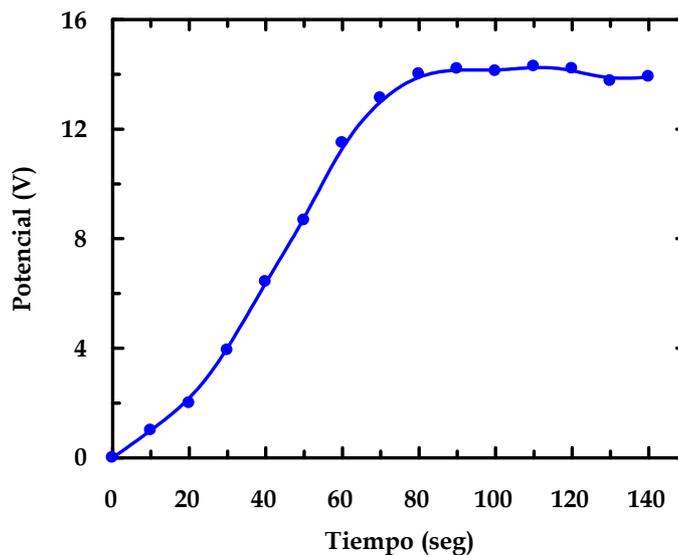


Figura 3.11 Curva de potencial obtenida para una muestra de orina de un sujeto sano tras la ingesta de un vaso de leche entera, medida a 25,0 °C, con el sensor amperométrico.

Una vez finalizadas las medidas, todo el material en contacto con las orinas se limpió con una solución jabonosa, se aclaró con abundante agua y finalmente con agua *Millipore*®.

Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

4.1 Medidas del hidrógeno disuelto en agua, usando un sensor potenciométrico

4.1.1 Volumen de muestra

El primer paso en la investigación que se aborda en esta Tesis Doctoral es, inevitablemente, establecer cuál debe ser el volumen de muestra a utilizar en cada medida experimental. Para ello hay que tener en cuenta las diferentes variables que inciden en la medida experimental, así como otras cuestiones que guardan relación con el propio sistema de medida y con el diseño de la célula de trabajo. Entre ellos, pueden mencionarse los siguientes:

- En primer lugar hay que tener presente que la muestra que va a ser medida es una disolución de H_2 gas. Como es de sobra conocido, este gas es de difícil manejo en lo que respecta a su estanqueidad, presentando una alta tendencia a escapar del interior de cualquier recipiente en el que éste se halle almacenado. Tal circunstancia hace imposible que las muestras medidas puedan ser posteriormente reutilizadas. Así pues, sobre cada muestra sólo se puede hacer una medida. Tal circunstancia, unida al hecho de la necesaria reiteración de las medidas en aras de conseguir una repetibilidad de resultados, condiciona el volumen máximo a emplear en cada ensayo experimental.

- No obstante lo anterior, hay que tener en cuenta que la solubilidad de los gases en líquidos es bastante baja. Consecuentemente, el volumen de muestra a utilizar no puede reducir su tamaño en exceso, ya que de hacerse así se corre el riesgo de tener que manejar cantidades de H_2 excesivamente pequeñas que conllevarían a que su cuantificación fuese acompañada de gran error, invalidando de ese modo la bondad del procedimiento de medida experimental. Así pues, hay que buscar un volumen de muestra que sea lo suficientemente grande como para que la lectura de potencial eléctrico obtenida sea una cantidad representativa, cuya medida pueda realizarse acompañada de un error asumible.

- Ahora bien, en el procedimiento de medida y posterior cálculo de resultados se ha considerado que la presión total de la fase gaseosa, en el interior de la célula,

se mantiene constantemente igual a la presión atmosférica. Es decir, que la cantidad de H_2 que pasa de estar disuelto en el líquido a estar como gas sobre la citada disolución de muestra, es lo suficientemente pequeña como para no alterar el valor de dicha presión. En otras palabras, desde la óptica de la presión del gas sobre el líquido de muestra, el volumen de la muestra tiene que ser pequeño para que la cantidad de H_2 insolubilizado también lo sea y no afecte al valor de la presión total en el interior de la célula.

Por todo lo anterior, se realizaron ensayos preliminares con diferentes volúmenes de muestra a fin de seleccionar el de valor óptimo.

En la figura 4.1 se presentan, a modo de ilustración, algunas de las curvas de potencial eléctrico frente al tiempo de experimentación, obtenidas para los diferentes volúmenes de muestra ensayados, en el caso de disoluciones acuosas saturadas de H_2 .

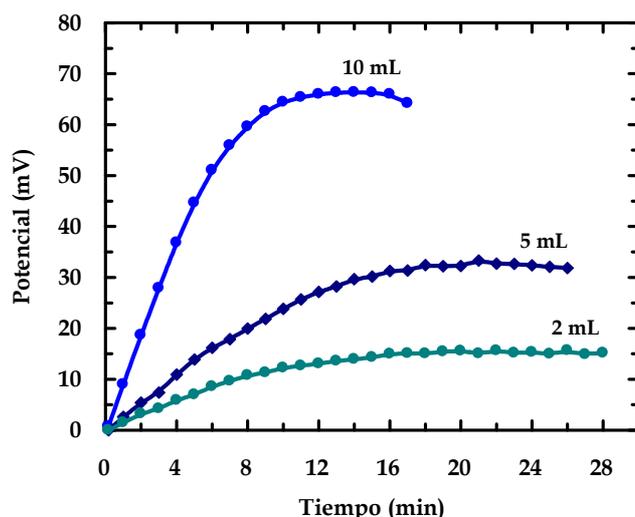


Figura 4.1 Respuesta del sensor potenciométrico para los diferentes volúmenes de agua saturada de hidrógeno (temperatura = 25,0 °C, todas las medidas están hechas con el mismo sensor)

De la observación de esta figura se desprende que cuanto mayor es la cantidad de muestra utilizada, mayor es el valor de potencial eléctrico medido. Conclusión de todo punto presumible, ya que la concentración de hidrógeno en la fase gas, en equilibrio con la muestra líquida, debe aumentar al hacerlo el volumen de muestra (ecuación 3-2), como consecuencia de que una mayor cantidad de hidrógeno, inicialmente disuelto, escapará hacia la fase gas y será, consecuentemente, medida.

No obstante, también se observa en la gráfica que todas las curvas encontradas definen claramente un valor máximo, estable, que hace posible, al menos en principio, que puedan ser utilizadas como base para la determinación de la cantidad de H₂ presente en la muestra.

Ahora bien, es necesario analizar con más detalle estos valores. Para ello, en la tabla 4.1 se recogen los que corresponden a los promedios calculados a partir de las diferentes medidas hechas para cada volumen de muestra ensayado.

Tabla 4.1 Valores promedio de los máximos de potencial eléctrico, obtenidos para diferentes volúmenes de muestra acuosa saturada de H₂ (temperatura = 25,0 °C).

Volumen de agua saturada de H ₂ (mL)	Valores de potencial máximo (mV)
2,0	14,40 ± 10,32
5,0	37,21 ± 9,39
10,0	68,00 ± 2,22

Como puede apreciarse, la dispersión de valores máximos obtenida para cada uno de los volúmenes de muestra considerados es elocuente. En el caso del volumen menor, 2,0 mL, la desviación estándar que acompaña a las medidas es considerable ($\pm 10,32$ mV) y equivale a una fluctuación del 71,7% en los resultados experimentales, dato éste que es completamente inaceptable.

La situación mejora sustancialmente al aumentar el volumen hasta 5,0 mL ($\pm 9,39$ mV, lo que equivale a un 25,2%) si bien dicho valor continúa siendo inaceptable. Así pues, aunque en principio para un volumen de muestra de 5,0 mL la respuesta eléctrica obtenida es suficientemente importante (en torno a 30 mV) como para pensar que ésta podría ser utilizada con garantías, el error que la acompaña (25,2%) es mucho mayor que el aceptado para este tipo de medidas, por lo que la utilización de un volumen tan pequeño no es aconsejable.

El resultado encontrado para un volumen de muestra de 10,0 mL sí resulta adecuado. En efecto, la dispersión de los valores medidos es del orden del error inherente al propio procedimiento de la medida potenciométrica (± 2 mV) y representa una fluctuación de los datos experimentales del 3,3%.

En consecuencia, a la vista de estos resultados parece aconsejable aceptar un volumen de 10,0 mL de muestra como volumen óptimo, pues permite un manejo adecuado y con garantías suficientes para obtener resultados del potencial medido, con buena precisión. Por ello, el volumen de muestra manejado en todos los experimentos realizados con el sensor potenciométrico y recogidos en esta Memoria de Tesis Doctoral, ha sido de 10,0 mL.

4.1.2 Tiempo de saturación con H₂.

Con objeto de elaborar la correspondiente curva de calibración con este sensor sobre la base de las medidas del potencial eléctrico medido para disoluciones acuosas hidrogenadas (agua *Millipore*® como disolvente) cuya concentración puede ser conocida con rigor, se procedió a la preparación de un conjunto de disoluciones acuosas patrón, obtenidas todas ellas por dilución a partir de disoluciones stock que se prepararon saturadas de H₂ a 25,0 °C.

Para la adecuada preparación de cada disolución acuosa stock, saturada de H₂, fue necesario optimizar el tiempo de burbujeo con este gas. Es decir, el tiempo que se estima suficiente para alcanzar la saturación del disolvente a la temperatura del estudio (25,0 °C) y que, en consecuencia, ésta pueda servir de base para la preparación de las diferentes disoluciones acuosas patrón que se utilizarán en la elaboración de la curva de calibración buscada.

La determinación de este tiempo óptimo se llevó a cabo burbujeando, a 25,0 °C y durante tiempos diferentes, aunque con similar intensidad de burbujeo, volúmenes de 42,0 mL de agua *Millipore*®. Estos experimentos se realizaron en días en los que la presión atmosférica se mantuvo dentro de un estrecho intervalo de valores (714,0 y 717,0 mmHg), y que se corresponde, además, con el rango más frecuente de presiones atmosféricas en la ubicación de nuestro laboratorio.

Tras el burbujeo del agua *Millipore*®, se obtuvieron las curvas de potencial eléctrico frente al tiempo, con varias alícuotas de 10,0 mL extraídas de cada uno de los 42,0 mL de agua *Millipore*® correspondientes a cada tiempo de burbujeo, y se calculó el valor promedio. Dichos resultados numéricos promedio encontrados para el valor del potencial eléctrico correspondiente al *plateau* de las curvas así obtenidas, para los diferentes tiempos de burbujeo con hidrógeno ensayados, se

presentan en la tabla 4.2 y, para una mejor visualización, aparecen representados en la figura 4.2.

Tabla 4.2 Valores promedio del potencial eléctrico medido sobre muestras de 10,0 mL, burbujeadas con hidrógeno a 25,0 °C durante tiempos crecientes (Presión atmosférica = 714,0 - 717,0 mmHg).

Tiempo de burbujeo (min.)	Valores de potencial (mV)
1,0	11,71 ± 0,82
2,0	24,38 ± 0,15
5,0	57,22 ± 2,38
8,0	68,03 ± 1,55
10,0	68,51 ± 1,98
15,0	68,91 ± 2,62

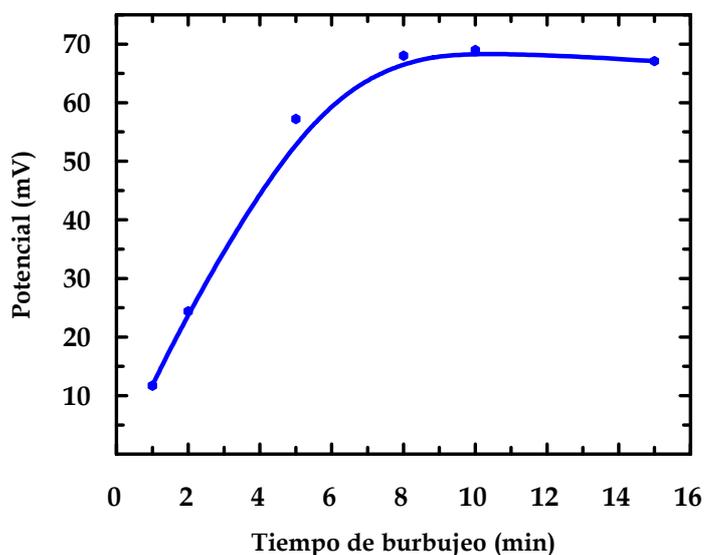


Figura 4.2 Representación gráfica de los valores de la tabla 4.2.

De la observación de la figura 4.2 puede apreciarse que a medida que el tiempo de burbujeo con hidrógeno aumenta, crece el valor del potencial eléctrico medido, hasta que se alcanza un valor de tiempo de burbujeo a partir del cual el potencial medido se mantiene constante e independiente de dicho tiempo. Este valor

máximo constante para el potencial eléctrico, comienza a definirse a partir de un tiempo de burbujeo de unos 8 minutos (con fluctuaciones que están en el orden de magnitud de la incertidumbre inherente al procedimiento de medida, $\sigma = \pm 2$ mV). Es decir, para tiempos inferiores a 8,0 minutos, la disolución que se obtiene no se encuentra saturada, pues el valor del potencial eléctrico medido (que es el reflejo de la cantidad de hidrógeno presente en la fase gas en equilibrio con la disolución acuosa situada en el interior de la célula de medida, y que, a su vez, está relacionada directamente con la cantidad de hidrógeno que se desprende desde dicha disolución) está situado en la zona ascendente de la curva encontrada.

A la vista de estos resultados, hay que concluir que para tiempos de burbujeo iguales o superiores a los 8 minutos, puede considerarse que los 42,0 mL de agua *Millipore*® se encuentran saturados de hidrógeno, a 25,0 °C. En consecuencia, al objetivo de trabajar con un cierto margen de seguridad, el tiempo de burbujeo empleado en este trabajo de Tesis Doctoral fue de 10 minutos, ya que el uso de tiempos mayores no se justifica en función de los valores de potencial obtenidos.

Evidentemente, estos resultados obtenidos a partir de las medidas de potencial con el sensor potenciométrico sirven, igualmente, en la preparación de las disoluciones acuosas hidrogenadas utilizadas para llevar a cabo las curvas de calibración con el sensor amperométrico, tanto en fase gas como en disolución.

4.1.3 Influencia de la presión atmosférica sobre el sensor Pt-spe

Como resulta lógico, si durante un mismo tiempo se burbujea, con similar intensidad, hidrógeno sobre volúmenes iguales de un mismo líquido, a la misma temperatura y presión, se tiene la certeza de que existirá una misma presión parcial del gas sobre el líquido y, por consiguiente, que una misma masa de este gas se disolverá en ambos volúmenes de líquido. La masa de gas disuelto será máxima cuando se alcance el nivel de saturación del líquido.

Puesto que el burbujeo de las muestras líquidas se lleva a cabo liberando el excedente de hidrógeno a la atmósfera, el valor de la presión parcial del gas sobre el líquido coincidirá con el de la presión externa, o sea con la presión atmosférica existente en ese momento. En consecuencia, el valor de la presión atmosférica correspondiente al momento del burbujeo, influye en la cantidad de gas

solubilizado, esto es, en la mayor o menor cantidad de hidrógeno que, en ese momento, se disuelva en el volumen de agua elegido. De ahí la importancia de conocer qué relación de dependencia existe entre dicho valor de la presión atmosférica y la solubilidad del gas.

Dado que es evidente que la presión atmosférica no es una variable experimental que pueda ser controlable por el experimentador, se hace necesario realizar estudios en los que el valor de esta variable se modifique, mientras el resto de ellas se mantiene inalterable: volumen de agua en el interior del burbujeador, temperatura y tiempo de burbujeo, humedad del sensor. De esta manera puede cuantificarse la posible influencia ejercida por esta magnitud.

En la figura 4.3 se representan los resultados obtenidos en este estudio con disoluciones acuosas de H_2 de diferentes concentraciones, expresadas como *porcentaje de dilución desde la saturación* de la muestra (el valor del 0% de dilución corresponde a la muestra totalmente saturada) y para los diferentes valores de presión atmosférica existente en los días en los que se realizaron los ensayos (un rango de presiones atmosféricas relativamente amplio). En todos los *porcentajes de dilución desde la saturación* analizados (0, 50, 70 y 80%) se aprecia con claridad una distribución aleatoria de valores en torno al promedio resultante (destacado por una línea, en color azul, en las gráficas que se muestran en la mencionada figura 4.3) de todos los medidos experimentalmente.

Este resultado permite concluir que el efecto de las variaciones en la presión atmosférica es lo suficientemente pequeño como para quedar enmascarado dentro del error experimental que acompaña a este tipo de medidas. Así pues, puede estimarse aceptable prescindir de la consideración de que exista relación o tendencia alguna, entre las medidas de concentración de H_2 de la muestra líquida, a través de la determinación del potencial eléctrico, y las de presión atmosférica a la cual se realizan las medidas, al menos en el intervalo de valores de presión aquí ensayado.

La existencia de fluctuaciones en las medidas experimentales realizadas, que se observa en la figura 4.3, viene propiciada por la variabilidad experimental de la membrana del sensor, pero no puede ser atribuida a ningún efecto de la presión atmosférica a la cual se ha realizado el burbujeo del hidrógeno. En cualquier caso, estos resultados permiten afirmar que, mientras las variaciones de presión

atmosférica no sean importantes y se mantengan dentro del orden de magnitud anteriormente ensayado, la cantidad de hidrógeno solubilizado en la muestra líquida, durante un determinado tiempo de burbujeo, puede considerarse que es prácticamente la misma. Ahora bien, a la vista de este resultado, se hace necesario considerar la imprescindible obligación de realizar un amplio número de medidas experimentales con cada muestra, para obtener un valor promedio que pueda considerarse representativo.

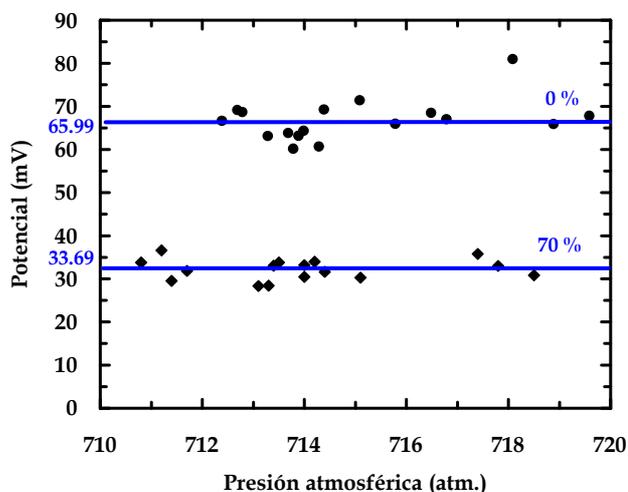


Figura 4.3 a

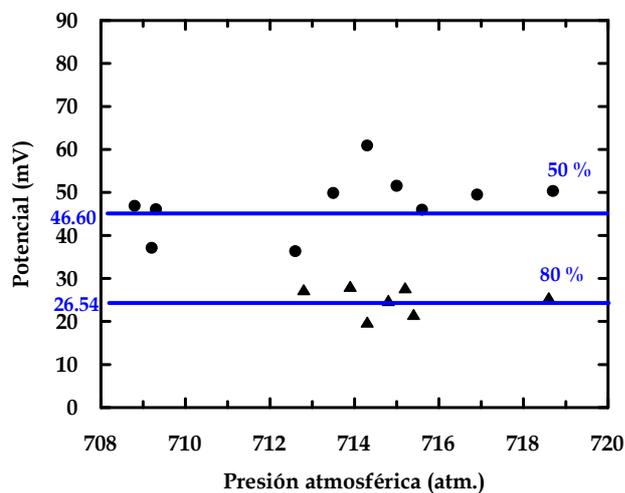


Figura 4.3 b

Figura 4.3 Potenciales obtenidos con muestras de 10,0 mL, en un amplio rango de presiones atmosféricas y diferentes *porcentajes de dilución desde la saturación*: a) sin diluir y 70,0%; b) 50,0% y 80,0% (temperatura = 25,0 °C)

Por ello, los valores que se ofrecen como datos experimentales en este trabajo de Tesis Doctoral, se corresponden con los de la media aritmética obtenida a partir de todas las medidas experimentales realizadas sobre una misma muestra.

4.1.4 Grado de humedad relativa de la membrana polimérica

Puesto que el sensor electroquímico contiene un electrólito sólido, puede esperarse que las variaciones de humedad del ambiente en el que se almacena el sensor y/o se realizan las medidas (por ejemplo, como consecuencia de los cambios climatológicos que tengan lugar) afecten su respuesta potenciométrica.

Con objeto de estudiar si el comportamiento de los sensores potenciométricos aquí empleados se ve afectado por las diferentes condiciones de humedad bajo las cuales se lleva a cabo el almacenamiento de éstos, se diseñó una serie de experimentos en los que ésta variaba, mientras el valor de la presión atmosférica se mantenía dentro de un estrecho intervalo de ± 3 mmHg (variación que es la más frecuente en La Laguna, a lo largo de un día de trabajo)

Tomando muestras de 10,0 mL de agua saturada de hidrógeno, se midieron los valores de potencial, en mV, para el amplio rango de humedades que se indican en la tabla 4.3. Esos valores corresponden a las condiciones de almacenamiento de los sensores, dentro de una urna, durante las horas previas a su utilización.

Tabla 4.3 Valores promedio de potencial, obtenidos en un amplio rango de porcentajes de humedad relativa de almacenamiento de los sensores potenciométricos (volumen de muestra = 10,0 mL, temperatura = 25,0 °C, presión atmosférica = 712,5 - 715,0 mmHg)

% Humedad de almacenamiento de los sensores	Valores de potencial
25	64,12 \pm 4.71
30	71,86 \pm 2.98
35	73,18 \pm 4.70
40	70,99 \pm 0.69
43	62,71 \pm 1.88
44	59,81 \pm 1.31

48	57,14 ± 4.59
49	49,03 ± 2.66
51	58,01 ± 4.93
54(*)	62,36
57	67,68 ± 5.43
60	61,35 ± 3.21
61	58,51 ± 2.61
64	61,99 ± 2.79
66(*)	54,47
68	29,54 ± 2.20
70(*)	51,67
72(*)	27,51
75	32,89 ± 8.45
77	24,76 ± 5.79

(*) con esta muestra solo se realizó una medida de potencial eléctrico

Puesto que, como se ha explicado en el capítulo 3, cada medida del potencial de una muestra con el sensor potenciométrico lleva asociada una medida previa idéntica, aunque libre de hidrógeno, la cual hemos denominado *cero de hidrógeno disuelto*, cada uno de los resultados mostrados en esta tabla 4.3 corresponde al valor promedio, calculado con las diferencias entre los potenciales de cada muestra y el de su medida previa con agua *Millipore*®, realizadas sobre un mismo porcentaje de humedad relativo de almacenamiento. Dichos valores están representados, frente al % de humedad, en la gráfica de la figura 4.4.

La observación de esta gráfica permite constatar la importancia que tiene, en la respuesta del sensor, el grado de humedad que posee su membrana. Así, puede verse cómo al incrementarse la humedad de almacenamiento se va reduciendo progresiva y considerablemente el valor de potencial medido, para un mismo volumen de agua saturada con H₂ y a la misma temperatura. En esta gráfica se observa que cuando el sensor es almacenado en condiciones de relativa sequedad, esto es, cuando la humedad se encuentra en torno al 35 %, se obtiene un valor máximo de la lectura de su potencial.

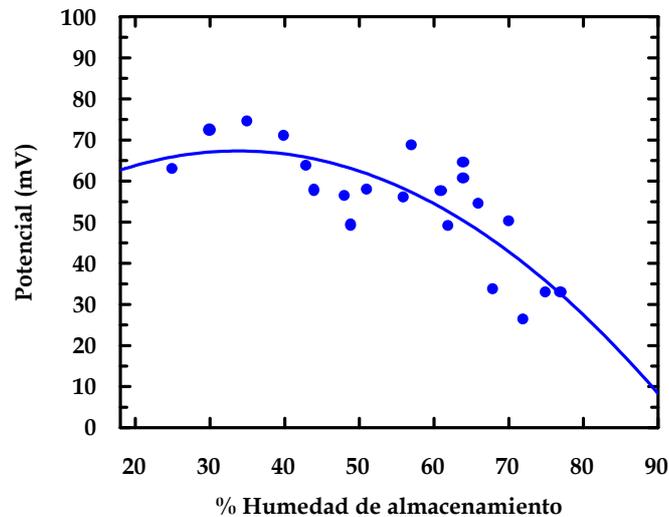


Figura 4.4 Influencia de la humedad relativa de almacenamiento sobre el potencial medido con los sensores potenciométricos empleados.

El ajuste polinómico de estos datos así encontrados define una curva de trazado parabólico en forma de campana. A la vista de dicho ajuste, podría predecirse una disminución de las medidas de potencial si se extrema la sequedad durante el proceso de almacenamiento. Sin embargo, los experimentos de confirmación de esa predicción no han sido llevados a cabo. En primer lugar, porque como se ha comprobado, la sequedad severa produce el deterioro de las membranas en el sensor y, en segundo lugar, porque porcentajes de humedad ambientales por debajo del 25 % constituyen casos muy excepcionales en nuestro laboratorio de la Universidad de La Laguna.

Al observar estos resultados, parecería deducirse que las membranas miden valores máximos de potencial cuando son almacenadas en condiciones de baja humedad (35 %). Sin embargo, puesto que antes de proceder a la medida de la disolución hidrogenada, se realiza una medida previa con agua *Millipore*®, para establecer el *cero de hidrógeno disuelto*, y dado que esta medida suele durar una media hora, aproximadamente, este tiempo es suficiente para re-hidratar, al menos parcialmente, de nuevo la membrana. Esta operación, por tanto, “enmascara” el grado de hidratación que posee la membrana en el momento de realizar las medidas que están recogidas en la tabla 4.3 y figura 4.4 por lo que se hace necesario idear otro tipo de experimentos que permitan identificar cuál es, en realidad, el grado de humedad de las membranas a fin de introducir rigor en el

estudio de esta variable operativa.

Con el fin de probar la aseveración anterior, al tiempo que estudiar otros posibles efectos que pudieran influir sobre las lecturas de potencial al medir las muestras, se repitió un nuevo barrido de humedades, aunque en esta ocasión sin realizar la medida previa del *cero de hidrógeno disuelto*. Los valores así encontrados aparecen recogidos en la tabla 4.4, conjuntamente con los anteriormente obtenidos tras realizar la medida previa en agua, pero sin realizar la diferencia aritmética con el potencial registrado en dicha medida previa, a los efectos de estudiar únicamente el efecto que la hidratación de la membrana conlleva.

Tabla 4.4 Valores de potencial obtenidos a diferentes porcentajes de humedad de almacenamiento: a) con medida previa de agua *Millipore*® y b) sin medida previa (volumen de muestra = 10,0 mL, temperatura = 25,0 °C, presión atmosférica = 712,5 - 715,0 mmHg)

% Humedad de almacenamiento de los sensores	Potencial con medida previa de agua (mV)	Potencial sin medida previa de agua (mV)
35	74,21 ± 10,05	41,23 ± 8,79
37	-	54,37 ± 6,23
40	72,10 ± 4,36	59,78 ± 5,02
45	-	66,15 ± 3,71
50	-	62,78 ± 2,81
51	58,12 ± 7,45	68,10 ± 2,96
54	63,82 ± 3,26	72,85 ± 5,47
55	-	81,49 ± 4,78
57	61,51 ± 5,85	68,13 ± 6,89
58	-	77,66 ± 3,43
59	-	78,25 ± 2,89
60	61,58 ± 4,84	68,25 ± 5,01
64	63,34 ± 4,71	47,41 ± 4,78
65	-	43,69 ± 6,89
67	-	50,21 ± 3,91
68	33,01 ± 5,56	41,25 ± 4,89
70	53,06	51,02
75	31,04 ± 14,94	50,91 ± 10,98
80	-	45,75 ± 9,81

Asimismo, para una mejor visualización de esta comparación, en la figura 4.5 se han representado gráficamente estos resultados (es decir, los obtenidos midiendo directamente las muestras, sin realizar la medida previa de agua, por lo que el porcentaje de humedad de almacenamiento de la membrana coincide con el valor que, en realidad, posee ésta en el momento de la medida del hidrógeno; línea de trazado en rojo) junto con los recogidos en la primera columna de la tabla 4.4 (esto es, los encontrados tras realizar la medida previa del *cero de hidrógeno disuelto* – pero sin de efectuar la diferencia aritmética con dicho valor de cero– en cuyo caso, el porcentaje de humedad a la que ha sido almacenada la membrana no coincide con el que realmente tiene ésta a la hora de realizar la medida del hidrógeno –al haberse rehidratado–; línea de trazado en azul).

Al observar la figura de ambas curvas superpuestas, puede apreciarse cómo los resultados obtenidos evidencian, de manera concluyente, la influencia de la hidratación de la membrana, que tiene lugar como consecuencia de la medida previa de agua. Dicha influencia se traduce en la modificación tanto de la forma de la representación gráfica resultante, como de la posición del máximo de potencial encontrado.

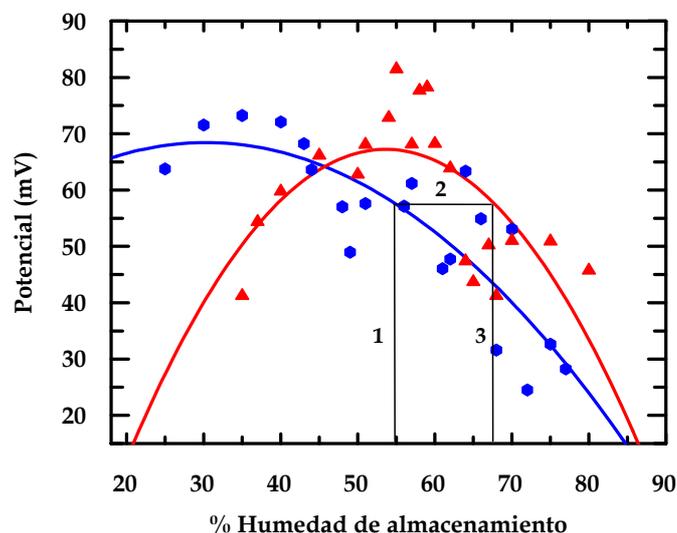


Figura 4.5 Comportamiento del sensor potenciométrico frente al porcentaje de humedad de almacenamiento, para dos situaciones de medida: a) con medida previa de agua (trazado azul); b) sin medida (trazado rojo) (volumen de muestra = 10,0 mL, temperatura = 25,0 °C, presión atmosférica = 712,5 - 715,0 mmHg).

Así, se puede afirmar que:

1. La práctica de realizar la medida previa de agua suaviza, considerablemente, las pendientes de las ramas ascendente y descendente de la campana (trazada en azul). Este resultado posee una gran trascendencia ya que permite contar con un intervalo de humedad relativa mucho más amplio para el trabajo experimental.
2. La posición del máximo de potencial en cada caso, se corresponde con un diferente % de humedad de almacenamiento del sensor. Cuando no se hace la medida previa del agua, este máximo se sitúa en torno al 55 %, mientras que si dicha medida se realiza, el citado máximo se desplaza hasta la posición del 35 %. Esto lleva a concluir que, efectivamente, la medida previa del agua ejerce un importante efecto de re-hidratación de la membrana que desplaza el máximo de la campana hacia la izquierda (en una cuantía de unas 10 - 15 unidades) lo que hace suponer, en primera instancia, aunque erróneamente, que las condiciones de humedad óptimas para el trabajo son menores a las que realmente se requieren.
3. Del análisis de la zona por encima del 45 % de humedad de almacenamiento, se evidencia que la sobre-hidratación de la membrana (línea de trazo azul) conduce a lecturas de potencial menores de las esperadas. Esta circunstancia puede venir justificada por el hecho, ya comentado anteriormente, de que al proceder a la medida previa de agua pura, el grado de humedad de la membrana del sensor se incrementa, por lo que el valor "real" de esta humedad se corresponde con porcentajes superiores a los de almacenamiento, que se han supuesto como valores de partida.

Así, por ejemplo, en base a la figura 4.5, es posible sugerir cuál debe ser el verdadero valor del porcentaje de humedad de la membrana del sensor en el momento de la medida de una muestra con hidrógeno. En efecto, de acuerdo con la trayectoria que se ha señalado en la referida figura (tramos marcados con los números 1, 2 y 3), el grado de humedad "real" de la membrana del sensor debe estar en torno al 68% si el valor de potencial medido es de 55,0 mV. En consecuencia, dado que el grado de humedad al que estuvo almacenado este sensor fue del 55,0%, la medida previa en agua le produce una hidratación

adicional de un 13%, aproximadamente. Hay que señalar que la diferencia entre ambas curvas, con y sin medida previa de agua pura, va siendo, evidentemente, cada vez menor a medida que aumenta la humedad de almacenamiento, puesto que la respuesta del sensor viene determinada por la capacidad límite de hidratación de la membrana.

4. Cuando se almacena por debajo del 40 % de humedad, los resultados encontrados reflejan que, por el contrario, la hidratación produce un aumento considerablemente importante del potencial medido, puesto que el verdadero porcentaje de humedad que posee la membrana no es el de almacenamiento sino mayor (en torno al 50 - 55 %).

No obstante lo indicado con anterioridad, el análisis de la figura 4.5 permite realizar otras consideraciones que resultan de gran importancia a la hora de decidir cuales son las condiciones óptimas de trabajo para este sensor. Y es que, a pesar de que la medida previa de agua reduce (a partir del 45 %) numéricamente la lectura de potencial de la muestra, con el consiguiente aumento del error relativo de la medida, su realización presenta dos importantes ventajas: en primer lugar, proporciona un mayor intervalo de humedades de almacenamiento; y en segundo, posibilita que variaciones moderadas en el grado de humedad de la membrana (durante su manipulación fuera de la urna, o asociadas a cambios climatológicos) no afecten de manera sensible su registro de potencial.

Hay que añadir a las ventajas anteriormente expuestas que, tal y como se explicó en el capítulo 3, en su epígrafe 3.5.1, dicha práctica resulta, además, recomendable porque nos permite eliminar la señal eléctrica que el agua o cualquier disolución libre de hidrógeno genera en la membrana polimérica y que, como ya se ha dicho en otras ocasiones, hemos denominado valor del *cero de hidrógeno disuelto*. Dicha señal confiere indeseables fluctuaciones a los valores del potencial correspondientes a las muestras con hidrógeno disuelto.

Esta última afirmación se hace más patente al mirar hacia los datos recogidos en la tabla 4.5.

Tabla 4.5 Valores del potencial calculados (columna derecha) a partir de los obtenidos, para cada muestra de 10,0 mL saturada (columna central) y su correspondiente medida previa de agua (columna de la izquierda) (temperatura = 25,0 °C, humedad de almacenamiento = 54 %, presión atmosférica = 712,0 - 714,0 mmHg)

Potencial para 10 mL de agua (mV)	Potencial para 10 mL de muestra saturada (mV)	Diferencia Aritmética (mV)
19,61	79,63	60,02
2,66	66,83	64,17
-3,22	59,72	62,94
-1,24	67,72	68,96
-3,52	59,49	63,01
Valor promedio	66,68 ± 8,20	63,82 ± 3,26

En ella se aprecia como el primer valor de potencial, que aparentemente aparece como excepcionalmente elevado (79,63 mV) respecto a los demás obtenidos para 10,0 mL de muestra, eleva el valor de la desviación estándar de la medida global (promedio) hasta $\pm 8,20$. Sin embargo, cuando se halla la diferencia aritmética respecto del valor medido en agua (19,61 mV), el valor de la medida disminuye sensiblemente (hasta 60,02, situándose incluso por debajo del valor promedio correspondiente al conjunto de medidas realizadas sobre esa muestra), así como el de dicha desviación (hasta $\pm 3,26$, valor que se encuentra en el mismo orden de la desviación aceptada, $\pm 2,85$, para este trabajo). Esta disminución apreciable de la desviación estándar de las medidas, o lo que es lo mismo, la disminución de la dispersión de los resultados experimentales encontrados con ocasión de la medida inicial del agua pura, hace esta práctica recomendable.

Antes de finalizar este epígrafe, es conveniente volver sobre los resultados recogidos en la figura 4.5 y resaltar que la respuesta del sensor es máxima (unos 75 mV) cuando el grado de humedad de almacenamiento está en el entorno del 35% y se lleva a cabo la medida previa de agua. No obstante, no es recomendable mantener este tipo de membranas por debajo del 50% de humedad, durante periodos largos, ya que la deshidratación que ello conlleva produce efectos muy negativos sobre su funcionamiento [57].

Por todo lo anteriormente señalado, en este trabajo de Tesis Doctoral, todos los resultados que se presentan obtenidos con el sensor potenciométrico, se han

obtenido almacenando estos sensores en un ambiente del 50 - 55 % de humedad relativa y, además, realizando siempre la medida previa del agua pura, o sea con un contenido de humedad relativa de su membrana en torno al 65%.

4.1.5 Curva de Calibración

Conocido el tiempo de burbujeo necesario para lograr la saturación del agua colocada en el burbujeador y decidido el volumen de muestra más apropiado para utilizar en la célula de medida, así como las condiciones de humedad más adecuadas para optimizar el rendimiento del sensor, se está en disposición de obtener la curva de calibración. Ésta se elaboró a partir de la medida del potencial eléctrico generado por varias disoluciones acuosas de hidrógeno a diferentes concentraciones de ese gas.

Tales disoluciones se obtuvieron diluyendo, con agua *Millipore*® libre de hidrógeno (V_{H_2O}), diversos volúmenes de agua saturada de hidrógeno (V_{sat}), en función de la concentración final buscada. La mezcla de ambos líquidos se realiza en el interior de la propia célula de trabajo. Para ello se introdujo, previamente, el agua *Millipore*® libre de H_2 en la célula, se cerró ésta y se termostató a 25,0 °C. A continuación se añadió, procedente del burbujeador, el volumen de agua saturada de hidrógeno necesaria para obtener la concentración deseada, expresada como *porcentaje de dilución desde la saturación*.

Los diferentes *porcentajes de dilución desde la saturación* utilizados se eligieron de manera que se cubriese una amplia escala de concentraciones a intervalos regulares. Además, se procuró siempre tomar, con la jeringuilla, volúmenes de disolución saturada que se correspondiesen con números enteros, dada la mayor precisión que puede tenerse al medir éstos frente a los valores fraccionarios.

Las concentraciones molares y en unidades v/v para cada una de las disoluciones que conforman la curva de calibración, se calcularon utilizando las expresiones matemáticas 2-32 y 2-34, respectivamente, ya vistas con anterioridad en el epígrafe 2.12.

Tabla 4.6 Disoluciones acuosas de hidrógeno empleadas para elaborar la curva de calibración del sensor potenciométrico (Volumen de muestra = 10,0 mL; temperatura = 25,0 °C; presión atmosférica = 708,0 - 720,0 mm Hg)

Porcentaje de dilución	$[V_{H_2O} + V_{Sat.}]$ (mL)	C_{H_2} (mol/l)	C_{H_2} (v/v)	C_{H_2} ppm (v/v)
70	7,0 + 3,0	$2,152 \cdot 10^{-4}$	$5,265 \cdot 10^{-3}$	5265
80	8,0 + 2,0	$1,435 \cdot 10^{-4}$	$3,510 \cdot 10^{-3}$	3510
90	9,0 + 1,0	$7,173 \cdot 10^{-5}$	$1,755 \cdot 10^{-3}$	1755
95	9,5 + 0,5	$3,587 \cdot 10^{-5}$	$8,775 \cdot 10^{-4}$	877,5
98	9,8 + 0,2	$1,435 \cdot 10^{-5}$	$3,510 \cdot 10^{-4}$	351,0
98,5	9,85 + 0,15	$1,073 \cdot 10^{-5}$	$2,633 \cdot 10^{-4}$	263,3

La tabla 4.6 muestra la correspondencia entre los diferentes *porcentajes de dilución desde la saturación* de las disoluciones empleadas y sus concentraciones expresadas mediante ambas unidades. En la última columna se ha expresado la concentración de la disolución en ppm (partes por millón, volumen/volumen) ya que son las unidades generalmente utilizadas en la determinación de hidrógeno en el aire espirado.

En todos los casos, con excepción de la saturación (muestra sin diluir), el volumen de la disolución final (10,0 mL) se alcanza mezclando el volumen de disolución saturada de H_2 ($V_{sat.}$), extraído del saturador mediante la jeringuilla, con el correspondiente volumen de agua *Millipore*® libre de hidrógeno, (V_{H_2O}). El cálculo de estas concentraciones, a partir de las ecuaciones 2-32 y 2-34, se ha realizado bajo la suposición de que ambos volúmenes son aditivos, lo cual no supone una aproximación muy drástica ya que, en nuestras condiciones de trabajo, tanto las disoluciones iniciales como las finales resultantes presentan un comportamiento idealmente diluido, dada la baja solubilidad del H_2 .

A continuación, a modo de ilustración, se presenta el cálculo correspondiente a la disolución del 70% de *dilución desde la saturación*. La muestra, de 10,0 mL, está constituida por una mezcla de 3,0 mL de disolución acuosa saturada de hidrógeno

($V_{\text{sat.}} = V_{\text{disolv.}} = 3,0 \text{ ml}$) -que se inyecta en la célula usando la jeringuilla- y 7,0 mL de agua *Millipore*® libre de hidrógeno ($V_{\text{H}_2\text{O}} = 7,0 \text{ ml}$) que se adiciona, al inicio, a la célula de trabajo. Así pues, la ecuación (2-32):

$$C_{\text{H}_2} = \frac{P(\alpha_{\text{H}_2}^{25} \cdot V_{\text{disolv.}})}{RT V_{\text{disoluc.}}} \quad (2-32)$$

tras sustituir el volumen total de disolución por la suma de los volúmenes de agua y de disolución saturada, queda de la siguiente forma:

$$C_{\text{H}_2} = \frac{P(\alpha_{\text{H}_2}^{25} \cdot V_{\text{sat}})}{RT(V_{\text{H}_2\text{O}} + V_{\text{sat}})}$$

que, al reemplazar los correspondientes valores numéricos, permite obtener:

$$C_{\text{H}_2} = \frac{1 \cdot 0,01755 \cdot 3}{0,08206 \cdot 298,15 \cdot (7 + 3)} = 2,152 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$$

Su concentración de hidrógeno, expresada como v/v (volumen de H_2 en el volumen de la disolución) se calcula haciendo uso de la ecuación 2-33:

$$C_{\text{H}_2} (\text{v/v}) = \frac{n_{\text{H}_2}}{V_{\text{disoluc.}}} \cdot \frac{M_{\text{H}_2}}{\rho_{\text{H}_2}} \quad (2-33)$$

la cual, tras introducir los valores numéricos correspondientes, lleva al valor de:

$$C_{\text{H}_2} (\text{v/v}) = 2,152 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L} \cdot \frac{2,0158 \text{ g/mol}}{0,08239 \text{ g/L}} = 5,265 \cdot 10^{-3}$$

Al mismo valor de concentración de hidrógeno v/v y, quizás, de forma más sencilla, se llega aplicando la ecuación (2-35):

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{v_{H_2}^{25}}{V_{\text{disoluc.}}} = \frac{\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{\text{sat}}}{V_{\text{disoluc.}}} = \frac{\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{\text{sat}}}{V_{H_2O} + V_{\text{sat}}} \quad (2-35)$$

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{0,01755 \cdot 3 \text{ ml}}{(7 + 3) \text{ ml}} = 5,265 \cdot 10^{-3}$$

Tal como se ha indicado con anterioridad en esta Memoria de Tesis Doctoral, las medidas de potencial eléctrico del sensor potenciométrico no se realizan en el seno de la disolución sino que se llevan a cabo en la fase gaseosa, esto es, sobre la disolución. Por tanto la medida que se obtiene se corresponde con el potencial de una pila que contiene el hidrógeno insolubilizado procedente de los 10,0 mL de muestra líquida. Consecuentemente, resulta necesario conocer cuál es la concentración del referido gas H₂ en dicha fase gaseosa, que se encuentra en equilibrio con la correspondiente disolución, en el interior de la célula de trabajo. Para realizar dicho cálculo, la ecuación (2-35) anterior debe transformarse en la:

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{v_{H_2}^{25}}{V_{\text{fase gas.}}} = \frac{\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{\text{sat.}}}{V_{\text{fase gas.}}} \quad (4-1)$$

puesto que en el denominador deberá aparecer el valor del volumen ocupado por la fase gas en el interior de la célula de trabajo, ya que es en dicha fase en la que se encuentra disperso el hidrógeno.

Esta nueva expresión (4-1) puede ser perfectamente asumida debido a que, como se verá más adelante, el 99,99% del hidrógeno que se encuentra inicialmente disuelto en los 10,0 mL de disolución saturada, termina pasando a la atmósfera gaseosa de la célula de trabajo.

Este volumen de la fase gaseosa se determinó por diferencia de pesada entre la célula totalmente llena con agua *Millipore*® y la célula conteniendo tan solo 10,0 mL de agua. Una vez obtenida la diferencia, ésta se dividió por la densidad del agua a la temperatura de trabajo, 25,0 °C.

Ya que en este estudio de Tesis Doctoral se usaron tres células de trabajo diferentes y que, obviamente, la capacidad de todas ellas no es “exactamente” la misma, se realizó un análisis para determinar cómo las pequeñas diferencias de volumen existentes entre todas ellas, podrían influir sobre los valores de potencial medidos para una misma disolución.

Los distintos valores encontrados para el volumen de la fase gaseosa sobre la disolución, correspondientes a dichas tres células, están recogidos en la tabla 4.7. Como puede verse, estos valores se sitúan en torno a un valor promedio de $30,28 \pm 0,33$ mL. Es decir, con oscilaciones respecto a dicho valor promedio del 1%, aproximadamente. Asimismo, para ilustrar cómo estas pequeñas diferencias en el valor del volumen de la fase gaseosa sobre la disolución afectan a los valores de potencial eléctrico medidos (potencial que es función de la concentración del hidrógeno presente en la fase gaseosa; valor éste que, a su vez, viene afectado por el del volumen de la referida fase gaseosa), en la tabla 4.7 aparecen recogidos, también, los potenciales obtenidos usando los volúmenes correspondientes a cada una de las células en particular, para el caso de dos *porcentajes de dilución desde la saturación* diferentes (70 y 90%). Como puede apreciarse fácilmente, la dispersión de las medidas eléctricas es sensiblemente inferior a la de los volúmenes. En efecto, éstas se amortiguan hasta alcanzar el 3 y 2,5 ‰, respectivamente, para ambos porcentajes. Es decir, esas pequeñas diferencias de volumen detectadas superan la capacidad de resolución del sensor potenciométrico.

Tabla 4.7. Influencia del volumen de la fase gaseosa de las células de trabajo utilizadas, sobre los valores de potencial medidos con el sensor potenciométrico

Célula de Medida	Volumen de fase gaseosa (mL)	Potencial para muestras al 70 % (mV)	Potencial para muestras al 90 % (mV)
1	30,13	94,32	59,98
2	29,98	94,15	60,21
3	30,75	94,88	59,86

A la vista de estos resultados, se decidió trabajar indistintamente con las diferentes células y utilizar en los cálculos, como volumen de fase gaseosa, el valor

promedio aritmético de 30,28 mL obtenido con todos ellos.

Una vez definido el volumen de la fase gaseosa, se puede calcular la concentración de hidrógeno insolubilizado utilizando la ecuación (4-1). Los valores obtenidos para los *porcentajes de dilución desde la saturación* manejados se muestran en la tabla 4.8. A continuación, como ilustración, se detallan estos cálculos para una dilución del 70,0 % de dilución.

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{sat.}}{V_{fase\ gas.}} = \frac{0,01755 \cdot 3\ mL}{30,28\ mL} = 1,739 \cdot 10^{-3}$$

Las concentraciones que aparecen en la tabla 4.8 están calculadas bajo la suposición de que todo el hidrógeno, inicialmente disuelto en los 10,0 mL de disolución de muestra, se insolubiliza y pasa a la fase gaseosa para ser medido allí. Para corroborar esta última suposición, se realizó el cálculo, utilizando las ecuaciones (2-48) y (2-49), del número de moles de hidrógeno que escapa desde la disolución hacia la fase gaseosa en cada concentración y del tanto por ciento que dicha cantidad supone respecto de la inicialmente disuelta en la disolución de muestra, respectivamente.

Tabla 4.8 Concentración de hidrógeno en la fase gaseosa para los diferentes *porcentajes de dilución desde la saturación* estudiados, expresada en concentración v/v y en partes por millón v/v

Porcentaje de dilución	C_{H₂} v/v	C_{H₂} ppm v/v
70	1,739 10 ⁻³	1739
80	1,159 10 ⁻³	1159
90	5,797 10 ⁻⁴	579,7
95	2,898 10 ⁻⁴	289,8
98	1,159 10 ⁻⁴	115,9
98,5	8,695 10 ⁻⁵	86,95

Seguidamente se ilustra este cálculo con el ejemplo de una disolución del 70,0% de dilución desde la saturación.

El número de moles de hidrógeno inicialmente disueltos en esta disolución será:

$$n_{H_2} = \frac{P(\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{sat.})}{RT} = \frac{1 \cdot 0,01755 \cdot 3 \cdot 10^{-3}}{0,08206 \cdot 298,15} = 2,151949 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

Por otra parte, la ecuación (2-48) quedará expresada de la forma:

$$n_{H_2(\text{insolub})} = \frac{n_{H_2} \cdot (V_{inic.} - V_{disoluc.})}{n_{H_2} \cdot RT + (V_{inic.} - V_{disoluc.})} = \frac{n_{H_2} \cdot (V_{fase\ gas})}{n_{H_2} \cdot RT + (V_{fase\ gas})} \quad (2-48)$$

Tras sustituir los valores numéricos se obtiene:

$$n_{H_2(\text{insolub})} = \frac{2,151949 \cdot 10^{-6} \cdot 30,28}{(2,151949 \cdot 10^{-6} \cdot 0,08206 \cdot 298,15) + (30,28)}$$

$$n_{H_2(\text{insolub})} = 2,151946 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

$$\frac{n_{H_2(\text{insolub})}}{n_{H_2}} \cdot 100 = \frac{2,151946 \cdot 10^{-6} \text{ mol}}{2,151949 \cdot 10^{-6} \text{ mol}} \cdot 100 = 99,99\% \quad (2-49)$$

El valor encontrado, análogo al del resto de los porcentajes de dilución estudiados, ilustra, tal como se ha venido señalando a lo largo de esta Memoria, que prácticamente la totalidad de la cantidad inicial de hidrógeno presente en la disolución de muestra se insolubiliza pasando a la fase gaseosa.

Ahora bien ¿cuánto tiempo debe transcurrir para que tenga lugar este proceso de tránsito del hidrógeno desde una fase a la otra? La respuesta a esta pregunta puede obtenerse mediante el concurso de un sencillo experimento.

Este consistió en medir la concentración de hidrógeno que aún permanecía disuelta, en una serie de muestras de agua, cuyos porcentaje de dilución desde la saturación eran inicialmente iguales (70 %), tras permanecer expuestas a la atmósfera del laboratorio (y sometidas a una agitación continua de 550 rpm) durante tiempos crecientes. Las medidas se llevaron a cabo en disolución, por lo

tanto con el sensor amperométrico, pero en la célula de trabajo utilizada en las medidas potenciométricas, aunque esta vez sin llave de punzón.

Los potenciales eléctricos generados están recogidos en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Valores de potencial registrados con muestras de igual concentración inicial de hidrógeno disuelto, tras ser expuestas a la atmósfera del laboratorio durante tiempos crecientes

Tiempo (min)	Potencial (mV)	H ₂ residual (%)
0	22,01	100
2	3,42	15,53
5	0,095	0,43
10	0,042	0,19
20	0,004	0,018

Como puede comprobarse, el diseño de la célula para las medidas potenciométricas permite que, a los 20 minutos de comenzada una medida, la concentración del hidrógeno inicialmente disuelto en la muestra, se haya reducido drásticamente (hasta un 0,02 %). Es decir, se puede asegurar que, transcurrido ese tiempo, el 99,98% del gas inicialmente disuelto se ha insolubilizado y pasado a la fase gaseosa, en equilibrio con la líquida.

Así pues, a la vista de estos resultados y teniendo en cuenta que el tiempo medio de duración de una medida con el sensor Pt-spe gira en torno a los 20,0 min, puede afirmarse que, efectivamente, tal y como se ha venido manteniendo en diversos pasajes de esta Memoria, el hidrógeno abandona masivamente la disolución, para pasar a la fase gaseosa en el interior de la célula y que esto ocurre en un tiempo no superior al empleado en el transcurso de la medida.

Conocidas las concentraciones de hidrógeno en la fase gaseosa de cada una de las disoluciones estudiadas, se está en disposición de relacionar los potenciales eléctricos obtenidos con el logaritmo decimal de estas concentraciones, tal y como prevé la ecuación de Nernst (caso de que este sensor potenciométrico presente un comportamiento nernstiano). En la tabla 4.10 se muestran los valores promedio de potencial registrados en la fase gaseosa, sobre las disoluciones de las diferentes concentraciones ensayadas.

Tabla 4.10 Valores de potencial medidos experimentalmente y del logaritmo decimal de la concentración de H₂ en la fase gaseosa, para los diferentes *porcentajes de dilución desde la saturación* utilizados en la elaboración de la curva de calibración (Volumen de muestra = 10,0 mL; temperatura = 25,0 °C; humedad de almacenamiento = 50 - 55%; presión atmosférica = 708,0 - 720,0 mm de Hg)

Porcentaje de dilución	Log. C _{H₂} ppm v/v	Potencial (mV)
70	3,240	94,54
80	3,064	80,95
90	2,763	59,91
95	2,462	41,40
98	2,064	17,58
98.5	1,939	12,46

En la figura 4.7 se han representado gráficamente los potenciales obtenidos frente al logaritmo decimal de las concentraciones del hidrógeno, en ppm (v/v), insolubilizado hacia la fase gaseosa, sobre la disolución, para los diferentes disoluciones acuosas patrón preparadas.

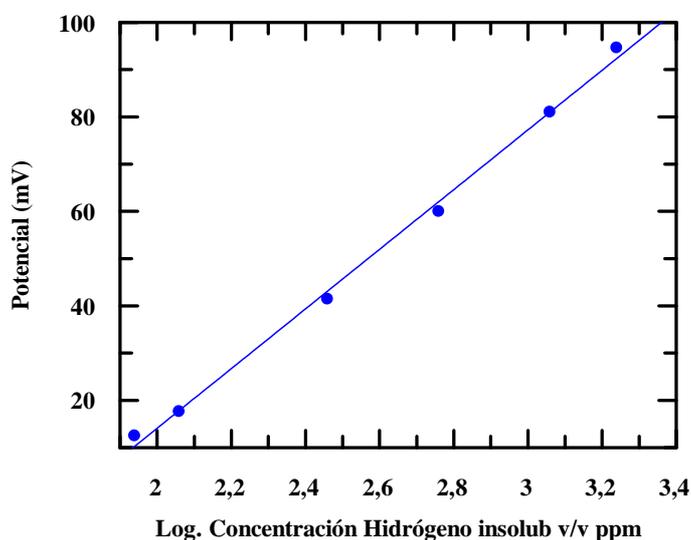


Figura 4.6 Curva de Calibración, potencial frente al logaritmo de la concentración de H₂ insolubilizado, en las distintas disoluciones estudiadas, para el sensor Pt-spe (Volumen de muestra = 10,0 mL; temperatura = 25,0 °C; humedad de almacenamiento = 50 - 55%); presión atmosférica = 708 - 720 mm Hg).

Dicha representación define, en esta zona de concentraciones de hidrógeno moderadas, una línea recta que responde a la ecuación lineal:

$$E = -112,18 + 63,08 \cdot \text{Log}C_{\text{H}_2} \quad (4-2)$$

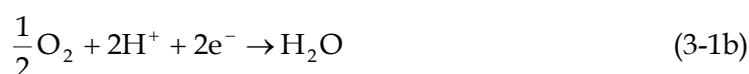
Del análisis de esta representación se puede concluir, en primer lugar, que, dentro del intervalo de concentraciones estudiadas, el comportamiento del sensor con el logaritmo decimal de la concentración de hidrógeno es lineal, presentando además un excelente coeficiente de correlación (0,998). Ahora bien, la pendiente definida (63,08 mV/década) no se corresponde con el valor teórico previsto por la ecuación de Nernst (30 mV/década), por lo que, al menos en principio, no se puede asumir un comportamiento nernstiano para este sensor, Pt-spe.

En segundo lugar, hay que señalar, al observar con detalle la figura, que a medida que las disoluciones van siendo más concentradas en hidrógeno, esto es, el *porcentaje de dilución desde la saturación* se va haciendo más pequeño, se pierde la linealidad en favor de un trazado exponencial ascendente del potencial eléctrico de equilibrio que alcanza el sensor frente al logaritmo de la concentración de H₂ en la fase gas. De hecho, para porcentajes de dilución inferiores al 50 % el referido trazado exponencial ya se aprecia con claridad. No obstante, para el caso particular que se presenta en esta Tesis Doctoral, se dispone para trabajar de un amplio intervalo de concentraciones en el cual el comportamiento es lineal. De igual forma, para diluciones superiores al 98,5% la linealidad también se pierde, razón por la cual se obtiene un valor de -112,18 mV para la ordenada en el origen.

En tercer lugar, es importante resaltar que el valor obtenido en este trabajo para la pendiente de la ecuación lineal de calibración es, aproximadamente, el doble del previsto por la ecuación de Nernst. En efecto, en la reacción red-ox que tiene lugar sobre este sensor potenciométrico se intercambian 2 electrones, por lo que el valor de dicha pendiente, según Nernst, debería ser de 30 mV.

Otros autores, *R. Bouchet, E. Siebert, y G. Vilter* [58], han obtenido resultados similares con pendientes, de la variación lineal del potencial frente al logaritmo de la presión parcial de hidrógeno en la muestra, que exceden del valor teórico previsto por la ecuación de Nernst, cuando estas presiones parciales son inferiores

a los 60,80 mmHg. Para justificar esta respuesta no nernstiana, dichos autores han acudido al concepto de potencial mixto. Como es sabido, el potencial mixto se define como aquel que alcanza el electrodo de trabajo, de platino, bajo condiciones de circuito abierto, cuando se produce una reacción acoplada de transferencia de carga opuesta, tal y como sucede al medir el potencial resultante de la oxidación del hidrógeno y la reducción del oxígeno, ocurridas ambas de manera simultánea:



Está experimentalmente probado que en estas condiciones, el potencial del electrodo alcanza un valor estacionario cuando la corriente anódica de la reacción (3-1, a) iguala a la corriente catódica de la (3-1, b) [58].

Según lo anterior, durante la medida potenciométrica, el potencial mixto viene determinado simultáneamente, por la velocidad de difusión del protón a través de la membrana, que a su vez es controlada por la velocidad de oxidación del H_2 , y por la velocidad de reducción del oxígeno.

La contribución de las reacciones (3-1, a) y (3-1, b) al potencial mixto viene determinada por el factor de rugosidad (RF) de la membrana del spe. El factor de rugosidad es un parámetro que define el grado de rugosidad que presenta la capa de metal depositada sobre la membrana, con respecto a su área [59]. Dicho grado depende del método de platinizado utilizado en la preparación del electrodo. Así, según *Opekar* [60], cuanto mayor es el factor de rugosidad de la membrana, menor es la velocidad de difusión del protón y por tanto menor la contribución de la velocidad de oxidación del hidrógeno al potencial.

La asunción del modelo del potencial mixto para explicar el valor de la pendiente obtenida por nosotros para la recta de calibración, obligó a calcular el valor de la presión parcial de hidrógeno en la atmósfera gaseosa de la célula de medida, para comprobar si ésta era lo suficientemente baja como para que la aplicación de tal modelo quedase justificada.

4.1.6 Cálculo de la presión parcial del hidrógeno en el interior de la célula de medida

Como ya se ha mencionado en el capítulo 2, la presión parcial de equilibrio del hidrógeno en la fase gaseosa sobre la disolución, viene determinada por la Ley de Henry:

$$p_{H_2(\text{insolb.})} = K_{H_2} \cdot x_{H_2(\text{residual})} \quad (2-7)$$

siendo K_{H_2} , la constante de Henry para el hidrógeno a la temperatura de trabajo y $x_{H_2(\text{residual})}$ la fracción molar de H_2 que queda disuelto en la muestra. Esta fracción molar viene dada por la ecuación (2-41):

$$\begin{aligned} x_{H_2(\text{residual})} &= \frac{n_{H_2(\text{residual})}}{n_{H_2(\text{residual})} + n_{H_2O}} \approx \frac{n_{H_2} - n_{H_2(\text{insolb.})}}{n_{H_2O}} = \\ &= \frac{(n_{H_2} - n_{H_2(\text{insolb.})}) \cdot M_{H_2O}}{m_{H_2O}} \end{aligned} \quad (2-41)$$

siendo $n_{H_2(\text{insolb.})}$ los moles de H_2 , inicialmente disueltos en la disolución de muestra, que se insolubilizan y pasan a la fase gaseosa de la célula, en equilibrio con la disolución, y n_{H_2O} los moles de disolvente.

Si la ecuación (2-41) se sustituye en la (2-7) se llega a una expresión:

$$p_{H_2(\text{insolb.})} = K_{H_2} \frac{(n_{H_2} - n_{H_2(\text{insolub})}) M_{H_2O}}{V_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}} \quad (4-3)$$

que permite calcular la presión parcial del H_2 sobre la disolución a partir del conocimiento de los moles de hidrógeno insolubilizado, dato éste que puede ser calculado haciendo uso de la ecuación (2-48).

A continuación se ilustra este cálculo de la presión parcial de H₂ en la atmósfera gaseosa de la célula de trabajo, con el ejemplo de una muestra de 10,0 mL formada por 3,0 mL de disolución acuosa saturada de H₂ y 7,0 mL de agua *Millipore*® libre de hidrógeno, a la temperatura de 25,0 °C, para la cual $K_{H_2} = 5,374 \cdot 10^7$ [61]. Aplicando la ecuación (4-3):

$$p_{H_2} = 5,374 \cdot 10^7 \text{ atm} \frac{(2,151949 \cdot 10^{-6} \text{ mol} - 2,151946 \cdot 10^{-6} \text{ mol})18,016 \text{ g/mol}}{10\text{mL} \cdot 1\text{g/mL}}$$

$$p_{H_2} = 2,905 \cdot 10^{-4} \text{ atm} = 0,221 \text{ mm de Hg}$$

En la tabla 4.11 se muestra el conjunto de valores de presión parcial de hidrógeno en la fase gaseosa en la célula, durante la medida del potencial, calculados para cada uno de los *porcentajes de dilución desde la saturación* estudiados.

Tabla 4.11 Valores de presión parcial de hidrógeno en la fase gaseosa de la célula de medida, para cada una de las concentraciones estudiadas (Volumen de muestra = 10,0 mL; temperatura = 25,0 °C; humedad de almacenamiento de los sensores = 50 - 55 %; presión atmosférica = 708,0 - 720,0 mmHg).

Porcentaje de dilución	C _{H₂} v/v	Presión Parcial (mmHg)
70	1,739 10 ⁻³	2,208 10 ⁻¹
80	1,159 10 ⁻³	1,224 10 ⁻¹
90	5,797 10 ⁻⁴	3,059 10 ⁻²
95	2,898 10 ⁻⁴	7,648 10 ⁻³
98	1,159 10 ⁻⁴	1,224 10 ⁻³
98,5	8,695 10 ⁻⁵	6,883 10 ⁻⁴

Estos resultados muestran con claridad que, aunque en el interior de la célula de trabajo el paso de hidrógeno desde la disolución de muestra hasta la fase gaseosa es masivo durante la medida del potencial eléctrico generado (superior al

99%, como ya se ha visto en otro apartado de este capítulo), la aportación a la presión total de dicha fase gaseosa que realiza la presencia adicional de este gas, es extraordinariamente pequeña y siempre inferior al 0,3‰ (lo cual es un resultado de todo punto previsible, dado que, como es de sobra conocido, los gases presentan una solubilidad muy baja en los líquidos). Así pues, dentro del intervalo de concentraciones en el que se ha trabajado, los valores de la presión parcial de hidrógeno son en todos los casos muy bajos. Tal circunstancia permite, de una parte, desestimar la posible toma en consideración de la influencia que el cambio de presión durante la medida del potencial eléctrico pudiese ejercer sobre la propia medida y, de otra, que es posible acudir al modelo del potencial mixto para justificar el comportamiento no nernstiano observado para este sensor potenciométrico.

4.2. Medidas del hidrógeno disuelto en agua, usando un sensor amperométrico. Electrodo de *Unisense*®

4.2.1 Variables experimentales. Volumen de muestra

El volumen de muestra utilizado en las medidas con el sensor amperométrico fue seleccionado siguiendo el mismo criterio que en el caso del sensor potenciométrico. Esto es, que fuese un volumen lo suficientemente grande como para que el potencial medido sea una cantidad representativa, acompañada de un error relativamente pequeño. Pero teniendo en cuenta que el objetivo final de esta investigación es utilizar este sensor para determinar el hidrógeno disuelto en la orina de una persona, el volumen de la muestra a medir debe ser lo suficientemente pequeño como para permitir la realización de varias medidas sobre diferentes alícuotas provenientes de una misma muestra de orina.

Ahora bien, en esta ocasión se tuvo presente que la célula de trabajo posee solamente una capacidad total de 12,0 mL y que se iba a introducir en ella el sensor de *Unisense*® con su cilindro protector de plástico. Por ello, el volumen de muestra seleccionado tuvo que ser menor que el manejado en las medidas potenciométricas.

Así pues, teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, el volumen de muestra utilizado en estas medidas amperométricas fue 8,0 mL.

4.2.2 Tiempo de saturación con H₂

Al igual que para la elaboración de la curva de calibración en agua con el sensor potenciométrico, las curvas de calibración en agua con el sensor de *Unisense*[®], medidas en fase gaseosa y en disolución, requirieron de la preparación de disoluciones patrón obtenidas por dilución a partir de disoluciones stock que se prepararon saturadas de H₂ a 25,0 °C. En consecuencia, el procedimiento de burbujeo del agua *Millipore*[®] y el tiempo utilizado (10,0 min.) en dicho proceso, es el mismo que el usado en las medidas con el sensor Pt-spe.

4.2.3 Influencia de la presión atmosférica

Como se ha visto con anterioridad en otro epígrafe de esta Memoria de Tesis Doctoral (epígrafe 4.1.3), la presión atmosférica influye durante el proceso de burbujeo, con hidrógeno, del disolvente hasta alcanzar su saturación. Esto es, influye en la preparación de las muestras, con independencia de cual sea el procedimiento posteriormente seguido para realizar la medida experimental del potencial eléctrico generado en la célula de trabajo. Como consecuencia de ello, el estudio de la influencia de la presión atmosférica en los valores de potencial obtenidos, realizado anteriormente para el Pt-spe, sigue teniendo plena vigencia para este sensor amperométrico.

4.2.4 Humedad relativa de almacenamiento

Por otra parte, puesto que la membrana del electrodo de *Unisense*[®] no es de Nafion, las variaciones de la humedad en el medio no le afectan o, en todo caso, no en la misma medida en que le ocurría al sensor Pt-spe. Por tal motivo, en estas medidas no fue necesario realizar un estudio de esta variable paralelo al realizado con el sensor potenciométrico. En el Anexo 2 se presenta, entre otras especificaciones, el amplio intervalo de humedad en el que este electrodo trabaja en condiciones óptimas.

4.2.5 Curva de calibración

Las muestras utilizadas se obtienen, al igual que en el caso de las medidas potenciométricas, diluyendo con volúmenes variables de agua *Millipore*® libre de hidrógeno, (V_{H_2O}), volúmenes variables de disolución acuosa saturada de hidrógeno, ($V_{sat.}$), procedentes del burbujeador. Esta dilución, al igual que sucediese en los casos anteriormente descritos, se realiza en la propia célula de medida. También en esta ocasión se trabajó con *porcentajes de dilución desde la saturación* muy similares a los utilizados con el sensor Pt-spe.

El cálculo de las concentraciones correspondientes a cada uno de los porcentajes de dilución que conforman la curva de calibración, se llevó a cabo, obviamente, utilizando las mismas expresiones matemáticas 2-32 y 2-34. En la tabla 4.12 se presentan las concentraciones de H_2 disuelto en las muestras para cada uno de dichos porcentajes. En la última columna de la tabla se presentan los valores de concentración expresados en ppm (v/v) que, como ya se ha mencionado con anterioridad en varias ocasiones, son las unidades habitualmente utilizadas para referir la concentración del hidrógeno en el *Test del aire espirado*.

Tabla 4.12 Hidrógeno disuelto en las muestras de los diferentes porcentajes de dilución estudiados, expresados en concentración molar, en concentración v/v y en partes por millón v/v (Volumen de muestra = 8,0 mL; temperatura = 25,0 °C).

Porcentaje de dilución	$[V_{H_2O} + V_{Sat.}]$ (mL)	C_{H_2} (mol/L)	C_{H_2} (v/v)	C_{H_2} ppm (v/v)
70	5,6 + 2,4	$2,152 \cdot 10^{-4}$	$5,265 \cdot 10^{-3}$	5265
80	6,4 + 1,6	$1,435 \cdot 10^{-4}$	$3,510 \cdot 10^{-3}$	3510
90	7,2 + 0,8	$7,173 \cdot 10^{-5}$	$1,755 \cdot 10^{-3}$	1755
95	7,6 + 0,4	$3,587 \cdot 10^{-5}$	$8,775 \cdot 10^{-4}$	877,5
98	7,84 + 0,16	$1,435 \cdot 10^{-5}$	$3,510 \cdot 10^{-4}$	351,0
99	7,92 + 0,08	$7,173 \cdot 10^{-6}$	$1,755 \cdot 10^{-4}$	175,5
99,5	7,96 + 0,04	$3,587 \cdot 10^{-6}$	$8,775 \cdot 10^{-5}$	87,75

A modo de ejemplo ilustrativo se muestra, nuevamente, el cálculo de la

concentración molar, a partir de la ecuación (2-32), y concentración en volumen de H₂/volumen de disolución, utilizando la ecuación (2-34), de hidrógeno para un porcentaje de dilución desde la saturación del 70 %. Esta disolución, de 8,0 mL, está formada por 2,4 mL de disolución acuosa saturada (V_{sat.} = 2,4 ml) y 5,6 mL de agua Millipore® libre de hidrógeno (V_{H₂O} = 5,6 ml)

La ecuación (2-32):

$$C_{H_2} = \frac{P(\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{sat.})}{RT V_{disoluc.}} = \frac{P(\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{sat.})}{RT(V_{H_2O} + V_{sat.})} \quad (2-32)$$

conduce, tras sustituir los correspondientes valores numéricos, a:

$$C_{H_2} = \frac{1 \cdot 0,01755 \cdot 5,6}{0,08206 \cdot 298,15 \cdot (5,6 + 2,4)} = 2,152 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Valor éste que aplicado en la ecuación (2-33) permite obtener una concentración de H₂, expresada en v/v, de:

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{n_{H_2}}{V_{disoluc.}} \cdot \frac{M_{H_2}}{\rho_{H_2}} \quad (2-33)$$

$$C_{H_2} (v/v) = 2,152 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L} \cdot \frac{2,0158 \text{ g/mol}}{0,08239 \text{ g/L}} = 5,265 \cdot 10^{-3}$$

Al mismo valor de concentración v/v de hidrógeno se hubiese llegado utilizando, de manera directa, la ecuación (2-35):

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{v_{H_2}^{25}}{V_{disoluc.}} = \frac{\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{sat.}}{V_{disoluc.}} = \frac{\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{sat.}}{V_{H_2O} + V_{sat.}} \quad (2-35)$$

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{0,01755 \cdot 5,6 \text{ mL}}{(2,4 + 5,6) \text{ mL}} = 5,265 \cdot 10^{-3}$$

Tabla 4.13 Valores de potencial registrados para cada una de las concentraciones de hidrógeno disuelto, correspondientes a los diferentes porcentajes de dilución utilizados para la curva de calibración (temperatura = 25,0 °C).

Porcentaje de dilución	C _{H₂} ppm (v/v)	Potencial (V)
70	5265	19,31
80	3510	12,44
90	1755	5,72
95	877,5	1,90
98	351,0	0,51
99	175,5	0,26
99,5	87,75	0,11

Conocidas las concentraciones de hidrógeno disuelto en cada una de las disoluciones (tabla 4.13), se está en condiciones de representar los valores de potencial registrados frente a dichas concentraciones. En esta ocasión, por tratarse de un sensor amperométrico, se obtiene una representación lineal (figura 4.8) al representar el valor del potencial eléctrico medido frente a la concentración, directamente. El valor de la desviación estándar para las medidas amperométricas es el propio error del electrodo, $\pm 0,05 \cdot 10^{-6}$.

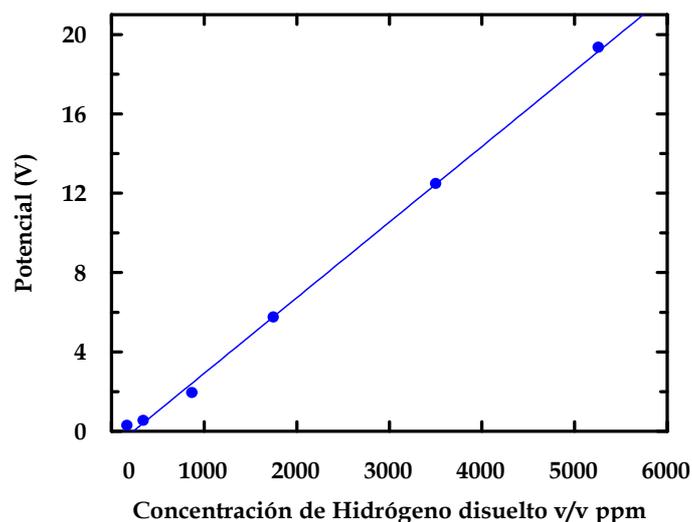


Figura 4.7 Curva de Calibración, potencial frente a la concentración de hidrógeno disuelto, en los distintos porcentajes de dilución estudiados, para el sensor *Unisense*® (Volumen de muestra = 8,0 mL; temperatura = 25,0 °C)

Cuando se realiza el ajuste matemático la ecuación de la recta de calibrado que se obtiene es:

$$E = -0,7262 + 3773,1 \cdot 10^{-6} \cdot C_{H_2} \quad (4-4)$$

Cuando se analiza esta representación se observa, en primer lugar, que este sensor posee una muy buena respuesta lineal (coeficiente de correlación = 0,999) dentro del intervalo de concentraciones estudiado. Sin embargo es necesario matizar que tal respuesta lineal se encuentra únicamente si, durante la medida amperométrica, la muestra se mantiene bajo agitación constante (a 500 rpm), ya que ello permite mantener la difusión del gas hacia el electrodo de trabajo del sensor. Tal afirmación ha sido comprobada experimentalmente mediante ensayos alternativos realizados en ausencia de agitación. Los resultados obtenidos en esta ocasión, que aparecen representados gráficamente en la figura 4.9, conducen a una representación que no responde a una línea recta sino, como puede verse fácilmente en la figura, a una línea de trazado parabólico.

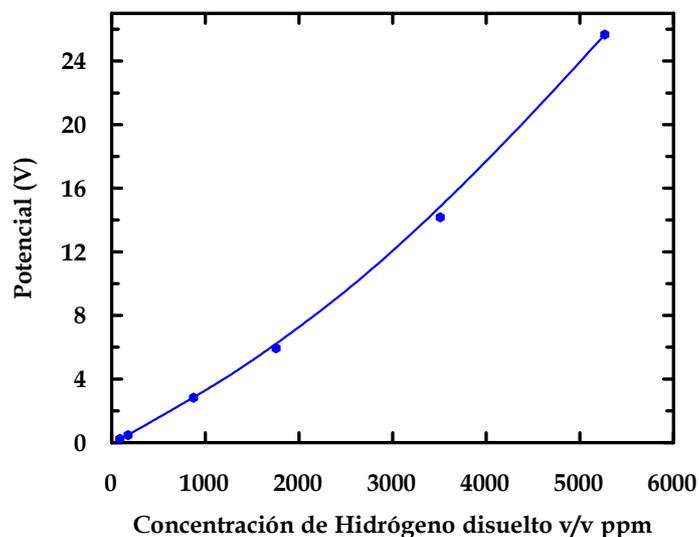


Figura 4.8 Potencial frente a concentración de hidrógeno disuelto, para los distintos porcentajes de dilución estudiados, sin agitación magnética (sensor *Unisense*®).

Por otro lado, al igual que sucediese con las medidas potenciométricas, para diluciones inferiores al 70,0 % -esto es, disoluciones con alto contenido en hidrógeno disuelto- se pierde la linealidad de la representación gráfica,

produciéndose un ascenso exponencial del potencial con dicha concentración de H₂. Sin embargo, este comportamiento no afecta al trabajo objeto de esta Tesis Doctoral puesto que concentraciones tan elevadas de hidrógeno en orina son altamente improbables. De igual forma, también en el caso de este sensor, para diluciones superiores al 99,5% –esto es, cuando la cantidad de hidrógeno presente en la disolución es muy pequeña– tampoco se mantiene la linealidad, de ahí que se encuentre un valor de -0,73 V para la ordenada en el origen.

Finalmente conviene volver sobre el procedimiento de medida seguido con este sensor amperométrico. Como se ha indicado con anterioridad, este sensor está diseñado para medir en la disolución, con tiempos de respuesta muy cortos. Esta rapidez en la obtención de la medida experimental permite manejar las muestras líquidas, que contienen el hidrógeno disuelto, sin excesivas precauciones en cuanto se refiere a su estanqueidad.

Esta afirmación queda patente en los resultados obtenidos en un experimento, muy similar al comentado en el epígrafe 4.1.5, encaminado a determinar la pérdida de hidrógeno, inicialmente solubilizado en la muestra, durante el tiempo que dura una medida, en este caso amperométrica. Por tanto, en esta ocasión, también se midió la concentración de hidrógeno que aún permanecía disuelta en una serie de muestras de agua, cuyos porcentaje de dilución desde la saturación eran inicialmente iguales (70 %), tras permanecer expuestas a la atmósfera del laboratorio (y sometidas a una agitación continua de 550 rpm) durante tiempos crecientes. Las medidas se llevaron a cabo en disolución, por lo tanto con el sensor amperométrico, y en contraposición al experimento del epígrafe 4.1.5, se utilizó la célula de trabajo utilizada en las medidas amperométricas. Los potenciales eléctricos generados están recogidos en la tabla 4.14.

Tabla 4.14 Valores de potencial registrados y sus correspondientes porcentajes de H₂ residual para muestras de igual concentración inicial de hidrógeno disuelto, tras ser expuestas a la atmósfera del laboratorio durante tiempos crecientes.

Tiempo (s)	Potencial (V)	H ₂ residual (%)
0	18,08	100
15	17,52	96,9
30	16,51	91,3

60	15,59	86,2
75	14,27	78,9

Estos resultados permiten comprobar que el diseño de esta célula evita el abandono masivo desde la disolución del hidrógeno (como ocurría en las medidas potenciométricas) a lo largo del tiempo que dura la medida (unos 50 segundos).

Hay, además, que tener en cuenta que, tal y como ya se ha comentado, la célula de trabajo utilizada en estas medidas consiste en un tubo cilíndrico donde encaja el protector de plástico del sensor, aislando a la disolución de la atmósfera del laboratorio, por lo que durante la medida el hidrógeno sólo tiene posibilidad de escapar hacia el pequeñísimo espacio que existe entre la punta del sensor y el protector plástico, dificultando aún más su insolubilización respecto a las condiciones extremas del experimento. Es por ello que los porcentajes residuales de H₂ expuestos en la tabla 4.14 siempre serán inferiores a los reales.

Tal circunstancia, unida al hecho de que el sensor de *Unisense*® puede ser usado para medir, con suficiente sensibilidad, disoluciones de mayor *porcentaje de dilución desde la saturación* que las que se pueden medir con el Pt-spe, así como que las referidas muestras a medir sean de menor volumen, convierten a este sensor en más adecuado para las medidas de hidrógeno disuelto en orina.

4.3 Determinación del Coeficiente de Bunsen del hidrógeno

Las curvas de calibración, en agua, presentadas en este trabajo para ambos sensores, se han podido obtener porque la concentración de hidrógeno disuelto puede ser calculada a partir del valor del coeficiente de Bunsen del hidrógeno en agua a 25,0 °C, puesto que éste es un valor conocido y recogido en la bibliografía. Sin embargo, como ya se ha indicado varias veces a lo largo de esta Memoria, el objetivo del trabajo propuesto es medir cantidades de H₂ disuelto en orina. Para ello, resulta imprescindible disponer de una curva análoga de calibración para estos sensores, pero referida a disoluciones de H₂ en orina. La elaboración de tal curva de calibración con muestras de orina, presenta el inconveniente de que la solubilidad del hidrógeno en dicho líquido es desconocida. No existe en la

bibliografía referencia alguna relativa al coeficiente de Bunsen del hidrógeno en orina que permita calcular las concentraciones del gas en estas muestras.

Por esta razón, hubo que diseñar un procedimiento que permitiese determinar la solubilidad del hidrógeno en cualquier líquido (por ejemplo orina), expresada como coeficiente de Bunsen, a la temperatura de trabajo. El método que finalmente se aceptó para tal fin, se basa en el hecho evidente de que el potencial medido en la fase gaseosa depende, exclusivamente, de la concentración del gas en el volumen de dicha fase gaseosa, con independencia del disolvente en el que dicho gas pudiese encontrarse antes de insolubilizarse para pasar a la referida fase gaseosa. Es decir, el líquido en el que el gas está inicialmente disuelto actúa a modo de “recipiente” de capacidad conocida (igual a la solubilidad del gas en dicho líquido). Por tanto, la ecuación de calibración obtenida a partir de las medidas en la fase gaseosa para un determinado sensor, partiendo de muestras de hidrógeno disuelto en diferentes disoluciones, acuosas o no acuosas, incluida la orina, deberá ser siempre la misma.

Si el planteamiento anterior es correcto, a partir de la ecuación correspondiente a la curva de calibración en agua para el hidrógeno insolubilizado en la fase gaseosa, es posible calcular el valor de la concentración del gas en el volumen de dicha fase y a partir de este valor, utilizando la ecuación (4-1), calcular el del coeficiente de Bunsen de ese gas en el líquido en el que originalmente se encontraba disuelto.

4.3.1 Coeficiente de Bunsen del hidrógeno en disoluciones acuosas

Con el fin de verificar la bondad del método propuesto, se determinaron por este procedimiento los coeficientes de Bunsen del hidrógeno, a 25,0 °C, en diferentes disoluciones acuosas que contenían los siguientes electrólitos: NaCl (1,1M), NaOH (0,05M) y BaCl₂ (0,2M), para las cuales los coeficientes de Bunsen están recogidos en la bibliografía [61].

Para ello, tal como se procedió con anterioridad, se burbujearon con hidrógeno, hasta la saturación, 42,0 mL de dichas disoluciones y, posteriormente, se midieron en la fase gaseosa, usando ambos sensores, los potenciales de estas disoluciones a diversos *porcentajes de dilución desde la saturación*, para cada una de ellas.

a) Medida Potenciométrica

Los valores de potencial obtenidos con este sensor para las diferentes *diluciones desde la saturación* ensayadas, se presentan en la tabla 4.15. Estos valores corresponden a la media aritmética de todas las medidas realizadas para cada porcentaje estudiado. Asimismo, en la tercera columna se presentan las concentraciones de hidrógeno calculadas usando la ecuación (4-2) y en la cuarta columna, los coeficientes de Bunsen, junto con sus respectivas desviaciones estándar, hallados mediante la ecuación (4-1) para el H₂ en cada disolución.

Tabla 4.15 Valores del coeficiente de Bunsen (α_j) del hidrógeno, a 25,0 °C, en disoluciones acuosas conteniendo diferentes electrólitos

Disolución y porcentaje de dilución	E (mV)	C _{H₂} ppm v/v	$\alpha_j \cdot 10^3 \pm \Delta\delta$
NaCl (1,1M) 80 %	76,54	911,61	13,64 ± 0,55 10 ⁻³
BaCl ₂ (0,2M) 70 %	88,65	1511,86	15,40 ± 0,75 10 ⁻³
NaOH (0,05M) 93 %	33,27	203,87	8,87 ± 0,74 10 ⁻³

La comparación entre los valores de los coeficientes de Bunsen experimentales obtenidos con este método y los valores teóricos extraídos de la bibliografía [61] se presenta en la tabla 4.16.

Tabla 4.16 Valores del coeficiente de Bunsen del hidrógeno, a 25,0 °C, obtenidos por el método propuesto y extraídos de la bibliografía, para las disoluciones acuosas de electrólitos estudiadas

Disolución	$\alpha_j \cdot 10^3$ Teórico	$\alpha_j \cdot 10^3$ Experimental	Desviación Stándar
NaCl (1,1M)	13,80	13,64	0,113
BaCl ₂ (0,2M)	15,40	15,41	0,003
NaOH (0,05M)	8,90	8,87	0,021

Como puede apreciarse, hay una excelente concordancia entre los valores aquí obtenidos -por aplicación del método propuesto- y los recogidos en la bibliografía. Ello permite concluir que este método puede ser aplicado con suficientes garantías de precisión, para la determinación del valor del coeficiente de Bunsen del hidrógeno en cualquier disolución acuosa que contenga cualquier electrólito. Así pues, si tenemos en cuenta que una orina es, esencialmente, una disolución acuosa de varios solutos (unos electrolíticos y otros no), puede aceptarse, al generalizar el resultado anterior, que el método propuesto es aplicable también en el caso de dicha disolución. Por tanto, que es válido para determinar la solubilidad del hidrógeno en orina, expresada a través de su coeficiente de Bunsen (es evidente que este método podría extenderse, también, para determinar el coeficiente de Bunsen de cualquier otro gas).

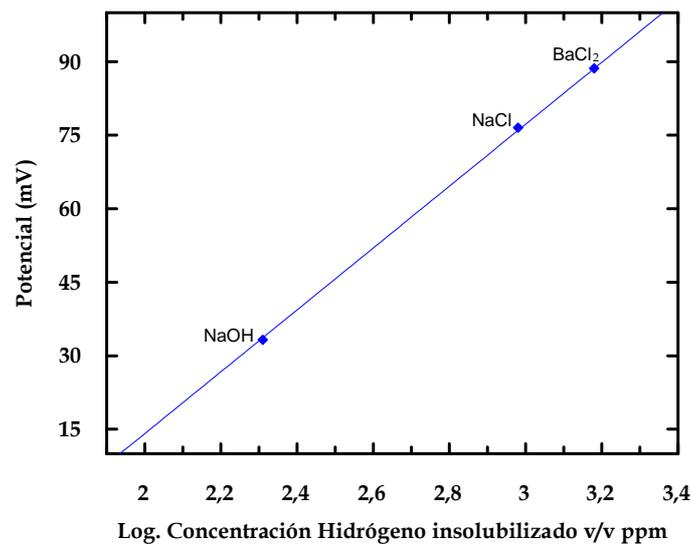


Figura 4.9 Localización de los valores de potencial obtenidos para las disoluciones acuosas de hidrógeno en presencia de diferentes electrolitos, sobre la recta de calibración del sensor potenciométrico.

La figura 4.10 muestra la inclusión de los datos de potencial de la tabla 4.14 en la recta de calibración obtenida en agua pura (figura 4.7). Como puede comprobarse, dichos valores se ajustan perfectamente a esta recta. Es decir, estos valores satisfacen también la ecuación (4-2) de calibración obtenida, confirmando de ese modo la suposición planteada inicialmente al proponer este método de determinación del coeficiente de Bunsen de gases.

b) Medida Amperométrica

Como ya se ha indicado con anterioridad, el sensor de *Unisense*® está diseñado para medir el hidrógeno en el seno de la disolución. Es por ello que, para poder aplicar el método descrito en el epígrafe precedente, tuvo que comprobarse previamente si este sensor tenía capacidad para detectar y medir con precisión el hidrógeno insolubilizado en la fase gaseosa. Como ya se explicó en el capítulo 3, epígrafe 3.4.2, fue necesario, primero, acoplar este sensor *Unisense*® a la célula de trabajo utilizada para las medidas potenciométricas –por medio de un septum de goma convenientemente perforado– y, en segundo lugar, calcular el volumen de la fase gaseosa en esta nueva situación, en la que debe considerarse, también, el volumen del cilindro protector de la punta del sensor (despreciando el volumen de dicha punta), que debe adicionarse al manejado en las medidas potenciométricas (30,28 mL). El valor del volumen resultante fue de 33,10 mL.

Tal y como se esperaba, la sensibilidad del sensor disminuyó drásticamente al medir en la atmósfera de la célula. Sin embargo, aumentando al máximo la sensibilidad del pico-amperímetro (utilizando la escala más pequeña de 2000 pA) fue posible llevar a cabo estas medidas con resultados perfectamente reproducibles y cuantitativamente significativos.

Al igual que se hizo con el sensor potenciométrico, Pt-spe, se registró el potencial de diversas disoluciones acuosas de hidrógeno a diferentes diluciones desde la saturación para obtener la correspondiente curva de calibración. Asimismo, se realizaron medidas con disoluciones acuosas conteniendo los mismos electrólitos y concentraciones que en el caso del sensor potenciométrico. En esta ocasión, no obstante, los porcentajes de dilución empleados para confeccionar la curva de calibración fueron menores a los utilizados con el Pt-spe ya que, midiendo en la fase gaseosa con el sensor amperométrico, la sensibilidad también es menor.

En la tabla 4.17.a se muestran los resultados encontrados para construir la curva de calibración. Las concentraciones (en ppm, v/v) fueron calculadas utilizando la ecuación (4-1), al igual que en el caso de las medidas potenciométricas. A continuación, a modo de ilustración, se presenta uno de estos

cálculos; concretamente, el correspondiente al *porcentaje de dilución desde la saturación* del 95,0 %.

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{v_{H_2}^{25}}{V_{\text{fase gas.}}} = \frac{\alpha_{H_2}^{25} \cdot V_{\text{sat.}}}{V_{\text{fase gas.}}} \quad (4-1)$$

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{0,01755 \cdot 0,5 \text{ ml}}{33,10 \text{ ml}} = 2,651 \cdot 10^{-4}$$

Tabla 4.17.a Valores de potencial y concentración para las disoluciones acuosas de H₂, a diferentes diluciones desde la saturación, empleadas para construir la curva de calibración del sensor *Unisense®*, midiendo en la atmósfera gaseosa.

Porcentaje de dilución	C_{H₂} ppm (v/v)	Potencial (mV)
10	4771,59	51,60
30	3711,23	38,80
50	2650,88	26,95
70	1590,53	15,30
80	1060,35	9,30
90	530,18	4,10
95	265,10	1,60

Las tablas 4.17.b, 4.16.c y 4.16.d muestran los resultados de potencial registrados y las concentraciones de H₂ (calculadas con la ecuación (4-1)) correspondientes a las mismas disoluciones acuosas, en presencia de electrolitos, usadas en las anteriores medidas potenciométricas.

Tabla 4.17.b Disolución: NaCl (1,1M)

Porcentaje de dilución	C_{H₂} ppm (v/v)	E (mV)
80	833,78	7,30
70	1250,67	11,80
60	1667,56	16,30

Tabla 4.17.c Disolución: BaCl₂ (0,2M)

Porcentaje de dilución	C_{H₂} ppm (v/v)	E (mV)
90	465,23	3,50
80	930,45	8,70
70	1395,68	13,75

Tabla 4.17.d Disolución: NaOH (0,05M)

Porcentaje de dilución	C_{H₂} ppm (v/v)	E (mV)
80	537,73	4,20
70	806,59	7,18
50	1344,32	13,04

En la figura 4.11 se ha representado la recta definida por los valores de potencial recogidos en la tabla 4.17.a, junto con los correspondientes a las disoluciones acuosas en presencia de los diferentes electrólitos (tabla 4.17.b, 4.17.c y 4.17.d). Estos últimos permiten el cálculo del coeficiente de Bunsen del hidrógeno para cada una de las disoluciones, a partir de la ecuación de la recta.

En dicha figura 4.10 se observa que todos los valores medidos quedan sobre una línea recta que responde a la ecuación:

$$E = -1,69 + 11005,24 \cdot C_{H_2} \quad (4-5)$$

A partir de dicha ecuación se puede despejar la concentración de H_2 insolubilizado que se corresponde con el potencial registrado para las diferentes disoluciones que aparecen en las tablas 4.16 b, c y d. Calculadas dichas concentraciones, se pueden determinar los coeficientes de Bunsen del H_2 en dichas disoluciones, mediante la ecuación (4-1).

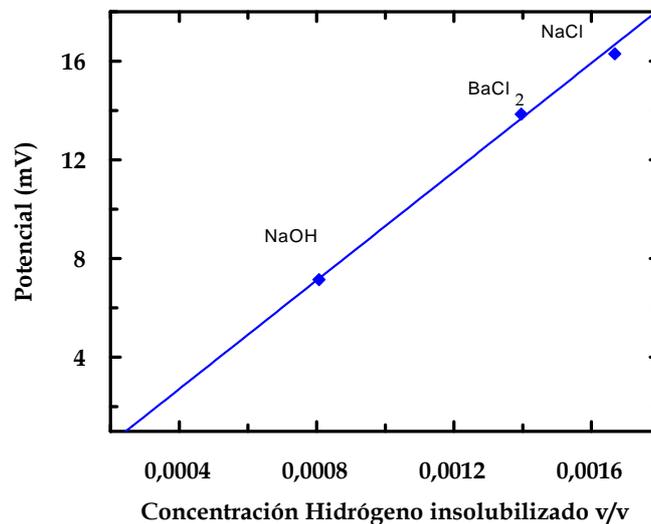


Figura 4.10 Curva de calibración del sensor amperométrico *Unisense*®, para el hidrógeno insolubilizado en la fase gaseosa, junto con los valores de potencial obtenidos para las disoluciones acuosas de H_2 conteniendo electrolitos

La comparación entre los valores experimentales de los coeficientes de Bunsen obtenidos de esta forma y los extraídos de la bibliografía, se presenta en la tabla 4.18. Como puede comprobarse, la concordancia entre ambos es bastante buena, con desviaciones del mismo orden de magnitud que las encontradas al medir con el sensor potenciométrico.

Tabla 4.18 Valores del coeficientes de Bunsen del H₂, a 25,0 °C, para diferentes disoluciones acuosas, obtenidos por el método aquí propuesto y recogidos de la bibliografía.

Disolución	$\alpha_j \cdot 10^3$ Teórico	$\alpha_j \cdot 10^3$ Experimental	Desviación estándar
NaCl (1,1M)	13,8	13,53	0,191
BaCl ₂ (0,2M)	15,40	15,58	0,127
NaOH (0,05M)	8,90	8,86	0,028

A efectos comparativos, en la tabla 4.19 se muestran los coeficientes de Bunsen obtenidos con ambos sensores, para las disoluciones acuosas de H₂ en presencia de los mismos electrolitos y a las mismas concentraciones.

Tabla 4.19 Comparación entre los valores del coeficientes de Bunsen del hidrógeno obtenidos aplicando nuestro método y con ambos electrodos para las diferentes disoluciones estudiadas, y los valores teóricos recogidos de la bibliografía.

Disolución	Sensor potenciométrico	Sensor amperométrico	Teórico
	$\alpha_j \cdot 10^3$	$\alpha_j \cdot 10^3$	$\alpha_j \cdot 10^3$
NaCl (1,1M)	13,64	13,53	13,80
BaCl ₂ (0,2M)	15,41	15,58	15,40
NaOH (0,05M)	8,87	8,86	8,90

Estos resultados permiten reafirmar lo anteriormente señalado al comentar las medidas potenciométricas: que el método aquí propuesto puede ser utilizado para obtener resultados con una precisión suficiente, independientemente del sensor utilizado, siempre y cuando la medida sea del hidrógeno insolubilizado y, por tanto, se realice en la fase gaseosa.

4.3.2 Coeficiente de Bunsen del hidrógeno en orina

Una vez comprobada la bondad del método propuesto para la determinación de la solubilidad del hidrógeno en disoluciones conteniendo distintos electrólitos y, puesto que la orina es una disolución acuosa que contiene diferentes solutos (electrólitos y no electrólitos), el siguiente paso de esta investigación fue calcular el coeficiente de Bunsen del H₂ en orina artificial y en orina humana –al objeto de comparar ambos resultados– suponiendo para ello, por extensión, que el método propuesto es también válido en presencia de solutos no electrolíticos.

Las muestras de orina humana utilizadas se obtuvieron de sujetos sanos –consecuentemente, no sometidos a ningún tipo de medicación– y en ayunas. De la misma forma que se procedió con las muestras acuosas, las de orina se burbujearon con H₂, a 25,0 °C, hasta la saturación. Previamente se determinó el tiempo necesario para que los 42,0 mL de orina humana que se introducen en el burbujeador se encontraran saturados. En la tabla 4.20 se ve que dicho tiempo (1,0 minutos) es sensiblemente muy inferior al obtenido para el caso del agua (8,0 minutos). No obstante, para garantizar la saturación, todas las muestras de orina que se utilizaron en esta investigación fueron burbujeadas durante 3,0 minutos.

Tabla 4.20 Valores de potencial obtenidos para muestras de de orina humana, burbujeadas con H₂ durante tiempos crecientes (Volumen de muestra = 10,0 mL; temperatura = 25,0 °C).

Tiempo de burbujeo (min.)	Valores de potencial (mV)
0,33	35,36
0,66	44,31
1,0	54,22
3,0	54,12
5,0	53,87

Para la preparación de las muestras de orina a diferentes *porcentajes de dilución desde la saturación*, se aceptó como “orina libre de hidrógeno” aquella que se recogería de un sujeto sano, después de un periodo de ayuno lo suficientemente

prolongado como para que el sensor dé una lectura de 0,0 mV.

Puesto que el cálculo de la concentración de hidrógeno en la orina requiere del conocimiento previo del coeficiente de Bunsen correspondiente, se procedió a su determinación aplicando el método descrito con anterioridad, si bien en esta ocasión sólo se utilizó el sensor amperométrico, ya que fue éste el que posteriormente se empleó en las medidas con orinas procedentes de sujetos. Para ello se midieron, a 25,0 °C, los potenciales para las muestras de 10,0 mL de orina, a diferentes porcentajes desde dilución de la saturación, preparadas mezclando volúmenes variables de orina libre de hidrógeno, (V_{Orina}) y de orina saturada de H_2 , ($V_{\text{Orina (sat)}}$), extraída ésta última del burbujeador. A continuación se calcularon las concentraciones de hidrógeno haciendo uso de la ecuación de la curva de calibración (4-5) y, posteriormente, el coeficiente de Bunsen del H_2 en orina utilizando la ecuación (4-1). La tabla 4.21 se presentan los valores de potencial registrados para los porcentajes estudiados, junto con el valor del coeficiente de Bunsen hallado para cada uno de ellos, de manera independiente. Como valor final para el coeficiente de Bunsen del hidrógeno en orina humana, a 25,0 °C, se aceptó el de la media aritmética de todos ellos, $12,74 \cdot 10^{-3}$, valor que ha sido el manejado en esta Tesis. Con el fin de confirmar este valor para el coeficiente de Bunsen, se realizaron algunas medidas con el sensor potenciométrico, Pt-spe, al porcentaje de dilución desde la saturación del 70 %. El valor encontrado fue de $12,73 \cdot 10^{-3}$, de lo cual se puede derivar que este resultado es el adecuado.

Tabla 4.21 Valores del coeficiente de Bunsen del hidrógeno obtenidos en orina humana, para los distintos porcentajes de dilución estudiados.

Porcentaje de dilución	Sensor amperométrico	
	E (mV)	$\alpha_j \cdot 10^3$
50	19,80	12,94
60	15,09	12,62
80	6,60	12,47
90	2,59	12,89
Valor medio		12,74

Seguidamente, a los únicos efectos de ilustrar lo anterior, se detallan los cálculos realizados para determinar el coeficiente de Bunsen del H₂ en orina, para el caso concreto de una muestra diluida al 60 %. El potencial medido con el sensor *Unisense*® fue de 15,09 mV, valor que sustituido en la ecuación de calibración (4-5), conduce a:

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{15,09\text{mV} + 1,69}{11005,24} = 1,5247 \cdot 10^{-3}$$

Conocida la concentración de hidrógeno, el coeficiente de Bunsen se calcula sustituyendo ésta en la ecuación (4-1) según:

$$\alpha_{H_2}^{25}(\text{Orina}) = \frac{C_{H_2} (v/v) \cdot V_{\text{fase gas.}}}{V_{\text{Orina (sat.)}}} = \frac{1,5247 \cdot 10^{-3} \cdot 33,10}{4\text{ml}} = 0,01262$$

Con objeto de evaluar la incidencia que sobre el valor del coeficiente de Bunsen, así obtenido, pueden tener todas aquellas variables que no pueden ser controladas en una orina humana, se determinó, a 25,0 °C, con el mismo sensor amperométrico y por el mismo procedimiento, el valor de este coeficiente en una orina artificial. Esta fue suministrada por Ward's Natural Science Establishment, Inc y contiene: Tegosept M., Alizarin Yellow, Thymol, y agua, además de cantidades similares a las de una orina humana estándar de glucosa, cuerpos cetónicos, fosfatos, albúmina y vitamina C. Los resultados encontrados se recogen en la tabla 4.22.

Tabla 4.22 Valores del coeficiente de Bunsen del hidrógeno obtenidos en orina artificial para los porcentajes de dilución estudiados.

Porcentaje de dilución	Sensor amperométrico	
	E (mV)	$\alpha_j \cdot 10^3$
50	19,05	12,47
70	10,73	12,45
90	2,45	12,44
Valor medio		12,46

Como se hiciese en el caso de la orina humana, el valor final del coeficiente de Bunsen para el hidrógeno en la orina artificial a 25,0 °C, se obtuvo de la media aritmética de todos ellos ($12,46 \cdot 10^{-3}$). Como puede apreciarse, los resultados encontrados para ambos tipos de orina son bastante próximos entre sí (con diferencias en torno al 2%). En consecuencia, se consideró adecuado utilizar orina humana en la elaboración de la curva de calibración correspondiente.

4.3.3 Curva de calibración de hidrógeno disuelto en orina

El sensor seleccionado para estas medidas fue el de *Unisense*®, por la posibilidad de introducirlo directamente en la muestra, lo que permite una mayor sensibilidad en las medidas; porque disminuye el tiempo necesario para obtener la propia medida; y porque presenta una mayor operatividad dada la sencillez y simplicidad de la célula de trabajo.

El procedimiento operativo seguido con los diferentes *porcentajes de dilución desde la saturación* estudiados fue el mismo que ya ha sido descrito en el epígrafe 4.2.2. Una vez registrados los potenciales, se calcularon las concentraciones (en ppm, v/v) de hidrógeno de cada una de las disoluciones de muestra de H₂ en orina, utilizando la expresión matemática 2-35 y como valor del coeficiente de Bunsen del hidrógeno en orina humana el de $12,74 \cdot 10^{-3}$ aquí determinado en el epígrafe anterior. La tabla 4.23 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 4.23 Valores de potencial obtenidos para las diferentes concentraciones de hidrógeno disuelto en muestras de orina a diferentes porcentajes de dilución desde la saturación (Volumen de muestra = 8,0 mL; temperatura = 25,0 °C)

Porcentajes de dilución	C _{H₂} v/v ppm	E (V)
70	3820,80	14,54
80	2547,20	9,37
90	1273,60	3,70
95	636,80	1,50
98	254,72	0,19

Al igual que en ocasiones precedentes, a continuación se ilustran los cálculos para una muestra diluida al 90,0 %:

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{v_{H_2}^{25}}{V_{\text{disoluc.}}} = \frac{\alpha_{H_2, \text{Orina}}^{25} \cdot V_{\text{Orina (sat)}}}{V_{\text{disoluc.}}} \quad (2-35)$$

$$C_{H_2} (v/v) = \frac{0,01274 \cdot 0,8 \text{ ml}}{8 \text{ ml}} = 12,736 \cdot 10^{-4}$$

Para una mejor visualización de los datos de la tabla anterior, éstos se han representado gráficamente en la figura 4.12. En dicha figura se aprecia que también en esta ocasión, el potencial que mide el sensor amperométrico varía linealmente con la concentración del H₂ disuelto en la orina, viniendo representados todos esos datos por la ecuación de la recta:

$$E = -0,97 + 3980,76 \cdot 10^{-6} \cdot C_{H_2} \quad (4-6)$$

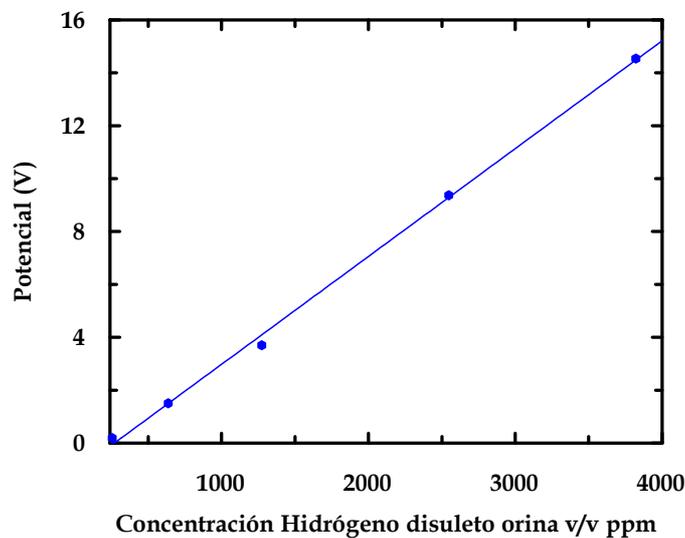


Figura 4.11 Variación del potencial eléctrico con la concentración (expresada en partes por millón) de hidrógeno disuelto en orina (sensor *Unisense*®; temperatura = 25,0 °C)

Con el mismo sensor se llevaron a cabo medidas de potencial para *porcentajes de dilución desde la saturación* muy similares a los anteriores, pero utilizando, en esta

ocasión, orina artificial. Los valores encontrados están representados gráficamente, frente a la concentración de hidrógeno disuelto –calculada a partir del valor $12,45 \cdot 10^{-3}$ encontrado para el coeficiente de Bunsen en orina artificial– en la figura 4.13. Como se aprecia al observar dicha figura, la línea recta descrita por tales valores (cuya ecuación de ajuste está indicada en la parte interna superior de la figura) prácticamente coincide con la encontrada para el caso de la orina humana (presentando pequeñas desviaciones tanto en la ordenada en el origen –inferior al 9%– como en la pendiente –menor del 3%–). Tal concordancia viene a incidir en la idea anteriormente manejada, de que la utilización de orina humana, en lugar de una estándar artificial, no introduce variaciones apreciables en cuanto a los resultados.

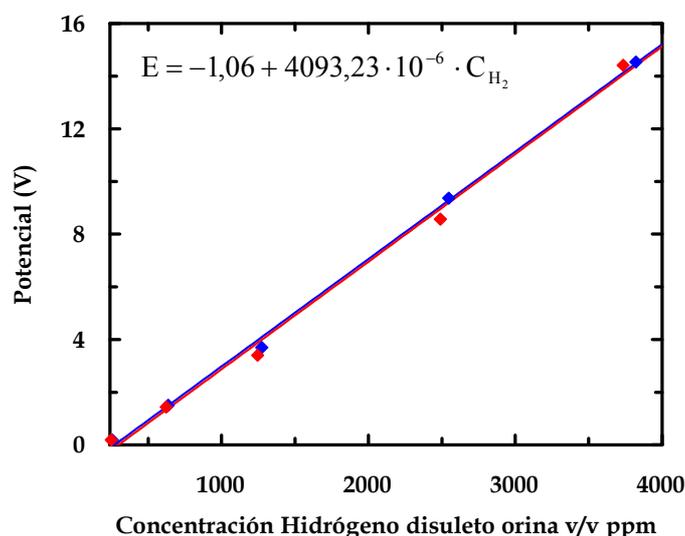


Figura 4.12 Valores de potencial frente a la concentración (expresada como partes por millón) de hidrógeno disuelto en muestras de orina artificial (en rojo) y de orina humana (en azul) (Volumen de muestra = 8,0 mL; temperatura = 25,0 °C)

4.4. Detección de hidrógeno biológico disuelto en orina

Esta parte del trabajo está referida a los experimentos dirigidos a determinar la concentración del hidrógeno disuelto en muestras de orina humana. Hidrógeno que procede de la fermentación de azúcares por las bacterias residentes en el intestino grueso.

Puesto que hasta el momento actual se desconocía que el hidrógeno podía excretarse disuelto en la orina, es evidente que tampoco se conoce cuál es el nivel normal de eliminación de dicho gas por esta vía. Ese fue, por tanto, el primer objetivo marcado en esta última parte. Para cubrirlo, el trabajo se comenzó con orinas de individuos sanos (se entiende por individuo sano, aquel que no tiene diagnosticada ninguna patología gastrointestinal).

Acorde con las razones expuestas en el epígrafe 4.3.2, el sensor seleccionado para estas medidas fue el de *Unisense*®.

4.4.1 Medida de hidrógeno disuelto en la orina de sujetos sanos

a) Tras la ingesta de lactosa

Se realizaron medidas de potencial con el sensor de *Unisense*® introducido en las muestras de 8,0 mL de orina, obtenidas de voluntarios sanos, antes y después de ingerir 250,0 mL de leche entera. La primera de estas muestras se recogió al cabo de dos horas de realizada la ingesta y las siguientes muestras, en intervalos de una hora, hasta cubrir un período total de 5,5 horas.

Debe señalarse que, en líneas generales, los individuos que facilitaron las muestras de orina, cumplieron las normas que exige el *Test de hidrógeno espirado*, ya comentadas en un capítulo anterior. Esto es, haber llevado una dieta pobre en azúcares durante, al menos, el día anterior a la toma de la muestra; no estar sometido a tratamiento con antibióticos; y permanecer en ayunas las horas previas a dicha toma, así como durante todo el tiempo que duró el ensayo.

Para todos estos experimentos se aprovechó el período de ayuno que supone el descanso nocturno, recogiendo la primera orina de la mañana (antes de la toma de la leche). Esta primera toma se denominará, a partir de ahora, como orina basal.

Se registraron los valores de potencial de las orinas basales y de las sucesivas recolectadas a intervalos de tiempos crecientes, contados a partir de la ingesta de la lactosa.

Los resultados de las medidas de potencial de las orinas basales fueron muy bajos, confirmando que, cuando se cumplen los requisitos anteriormente

comentados, los niveles de hidrógeno en las muestras basales son tan pequeños que, prácticamente, son indetectables por el sensor.

Para la transformación de estos potenciales en concentraciones (expresadas en ppm) se utilizó la ecuación (4-6). Ahora bien, el hecho de que la curva de calibración no pase por el origen de coordenadas hace que para una concentración de hidrógeno de 0,0 ppm se obtenga un valor de potencial de 0,97 V y no el valor lógico de cero. Por ello, se recurrió a determinar el incremento de las ppm de hidrógeno que presenta una determinada muestra de orina, respecto del valor de la orina basal (cuyo potencial, aunque muy pequeño, no es cero) calculadas ambas usando con la ecuación de calibración (4-6).

La representación gráfica de estos incrementos de concentración (en ppm) frente al tiempo (figura 4.14), muestra la evolución del hidrógeno excretado por vía renal tras la ingestión de una dosis de 250,0 mL de leche entera, equivalente a 12,5 gramos de lactosa, aproximadamente. Dicha evolución comienza, en todos los casos, con un ascenso de la presencia del gas en la orina a partir de las 2 horas de producida la ingesta, hasta alcanzar un valor máximo, en torno a las cuatro horas. Posteriormente, la trayectoria decae como consecuencia del agotamiento del H₂ producido, hasta volver a los niveles iniciales.

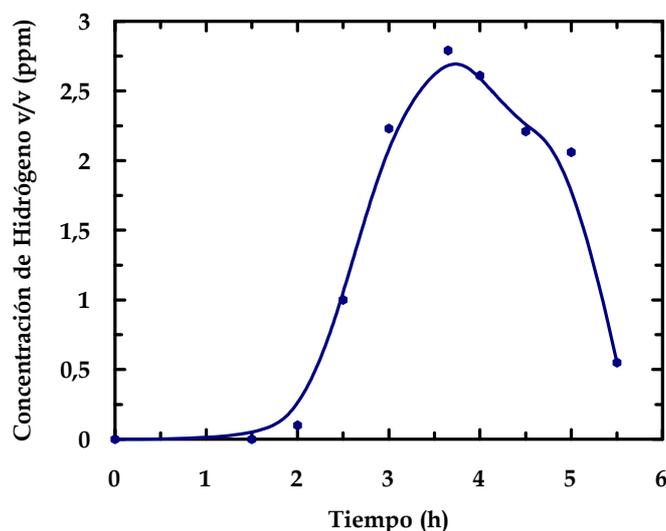


Figura 4.13 Evolución del hidrógeno excretado en la orina, tras la ingestión de una dosis de 250,0 mL de leche entera, para un sujeto sano

Una vez que se comprobó que el patrón de esta evolución del hidrógeno liberado en la orina se cumplía para todos los sujetos sanos estudiados, las muestras recogidas en los sucesivos experimentos se limitaron a la orina basal y a la correspondiente al valor máximo (orina de cuatro horas). De la misma forma, se procedió con aquellos voluntarios que eran niños y que, por tanto, presentaban cierta dificultad para que se les pudiese recoger la orina a intervalos cortos de tiempo.

En la gráfica 4.15 se muestran los resultados obtenidos con las orinas de seis voluntarios sanos adultos y tres niños, de diferentes edades. En este caso se han eliminado los puntos y se han trazado curvas para facilitar la visualización de la evolución en el tiempo, de los incrementos de la concentración de hidrógeno hallado.

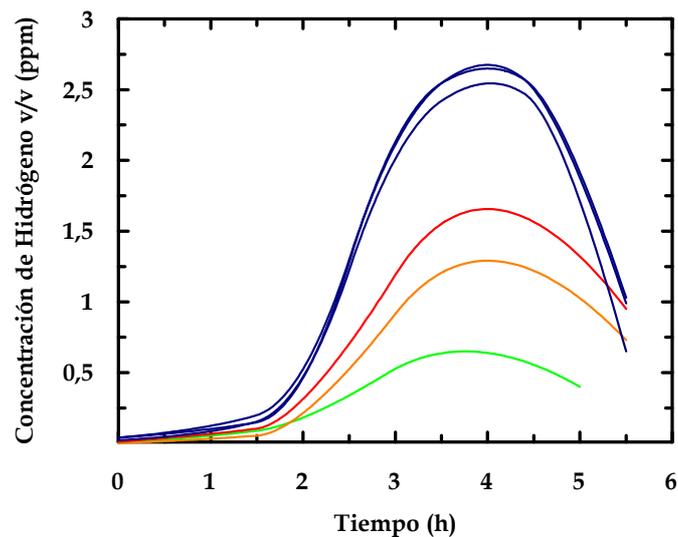


Figura 4.14 Evolución del hidrógeno excretado en la orina tras una dosis de 250,0 mL de leche entera para sujetos sanos de distintas edades: líneas azul oscuro (adultos), rojo (15 años), naranja (10 años), verde (4 años)

El análisis de estas curvas permite afirmar:

1. Que la cantidad de hidrógeno eliminada por orina para los tres niños aumenta significativamente con la edad. Este resultado es completamente lógico y esperado, si tenemos en cuenta que dicha cantidad viene determinada por la producción de la enzima lactasa –producción que disminuye con la edad [9]–, y por la cantidad de flora bacteriana presente en

el intestino grueso que, obviamente, es menor en individuos de menor tamaño. Se sabe que el intestino grueso es la región más altamente colonizada de todo el tracto digestivo, alcanzándose recuentos de más de 10^{12} bacterias/g de contenido intestinal [62]. Estos datos avalan la metodología seguida por nosotros puesto que son acordes con nuestros resultados.

2. Que el valor máximo obtenido a las 4 horas para los tres adultos es muy similar, independientemente de las diferentes contribuciones que sobre la cantidad de hidrógeno eliminado, para cada individuo, tienen la cantidad de flora bacteriana presente en su intestino grueso y la producción personal de la enzima lactasa. Puesto que los valores de concentración de H_2 para los tres sujetos adultos están entre 2,50 y 2,80 ppm, estos resultados nos permite aceptar aquellas concentraciones, en torno a las 3 ppm, como valores normales de hidrógeno en la orina en un sujeto adulto y sano.

Cuando se representan los resultados de la figura 4.15 en forma de diagrama de barras, tal y como se muestra en la figura 4.16, se puede apreciar con mayor claridad que el valor máximo de hidrógeno correspondiente a las 4 horas crece con la edad.

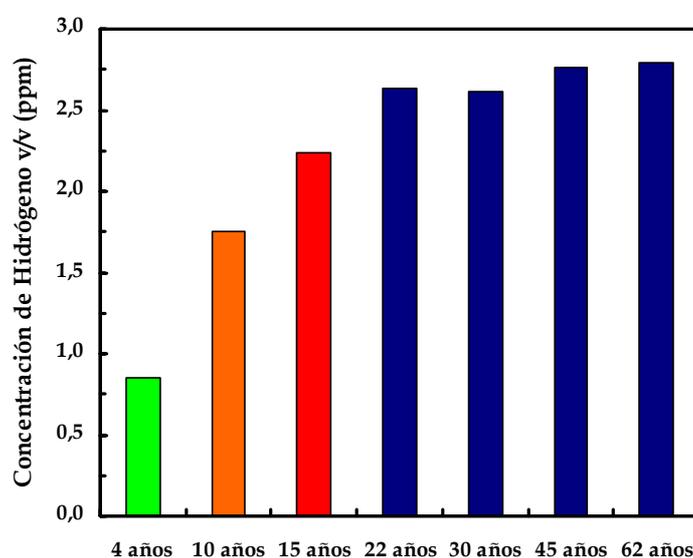


Figura 4.15 Variación con la edad de la concentración de hidrógeno eliminado por orina a las 4 horas de la toma de 250,0 mL de leche entera para diferentes individuos sanos

En esta investigación no se ha dispuesto de suficientes niños voluntarios como para estimar, para cada edad, la concentración de hidrógeno en orina a partir de la cual considerar que un niño pueda no ser sano. Sin embargo, tanto la experiencia obtenida en los últimos años con el *Test de hidrógeno espirado*, realizado en el Hospital Universitario de Canarias (Tenerife), como nuestros resultados con niños que presentan intolerancia a la lactosa, muestran que éstos, independientemente de la edad, presentan valores de hidrógeno mayores que el correspondiente al valor normal de los adultos.

Cuando se comparan los resultados, para un mismo individuo sano, obtenidos en el Hospital Universitario de Canarias (Tenerife) con el *Test de hidrógeno espirado* y mediante el presente procedimiento, se observa que la evolución temporal del hidrógeno eliminado por ambas vías, pulmonar y renal, son coincidentes. Esto es, la excreción de H₂ comienza a partir de las 2 horas de la ingesta y alcanza un máximo valor a las cuatro horas, aproximadamente. Esto indica que la accesibilidad del H₂ a ambas vías de eliminación es muy similar

-puesto que el gas no sufre ningún tipo de metabolismo en el organismo humano que pudiese retardar su aparición, como ocurre por ejemplo con el etanol, el cual se metaboliza en el hígado y surge en orina en forma de acetaldehído 2 horas y media después que en el aliento-. De igual forma, el descenso al unísono de los niveles en ambas vías a partir de las 4 horas indica, también, que las concentraciones del gas en aliento y orina son directamente proporcionales a los niveles existentes en sangre.

Como sabemos, el hidrógeno eliminado por vía pulmonar se expulsa, primordialmente, a través de una espiración forzada y no durante la respiración normal. Por lo que, también, se podría decir que el hidrógeno se está "acumulando" en el último tercio de los pulmones durante los 20 minutos que median entre dos espiraciones forzadas consecutivas, en el transcurso de la prueba. Si la cantidad detectada por medio del *Test de hidrógeno espirado* es de 4 ppm para un periodo de 20 minutos, en 2 horas éste ascendería a un total de 12 ppm (v/v). Mientras que la cantidad de gas acumulada en la orina es de tan sólo 3,0 ppm (v/v) durante las mismas 2 horas que transcurren entre la segunda (*orina de 2 h*) y la cuarta micción (*orina de 4 h*) tras la ingesta de la dosis de lactosa.

Estos resultados confirman que la llegada del gas hasta el aire alveolar

presenta menos restricciones que en el riñón, lo cual no es de extrañar porque el alveolo es una barrera diseñada para el intercambio gaseoso.

b) Tras la ingesta de lactulosa

Como ya se explicó en el Capítulo 2, cuando existe proliferación de bacterias en el intestino delgado, el hidrógeno comienza a ser liberado antes de transcurridas las dos horas tras la ingesta de la dosis de leche, puesto que el azúcar fermenta antes de alcanzar el intestino grueso. Es sobre esta circunstancia sobre la que se basa el diagnóstico de las infecciones gastrointestinales, a través de la realización del *Test de hidrógeno espirado*, en el aliento. El uso de un azúcar para el cual el organismo no sintetiza, para su hidrólisis, una enzima específica, como es el caso de la lactulosa, permite además que la cantidad del gas producida sea masiva.

Siguiendo el mismo criterio y metodología anteriormente descritos, se realizaron medidas de potencial en muestras de 8,0 mL de orina de voluntarios sanos, obtenidas antes y después de la ingesta de una dosis de 0,5 mL de lactulosa (la cual se dispensa con el nombre comercial de *Duphalac*[®]) por cada Kg de peso del sujeto en cuestión, disuelta en 250,0 mL de agua. Las micciones se recogieron a cada hora, hasta un período total de 5 horas.

Al igual que para las medidas con lactosa, los individuos sometidos a este estudio cumplieron, en general, las normas que exige el *Test de hidrógeno espirado* y, de igual modo, se aprovechó el período de ayuno que supone el descanso nocturno, de tal forma que la muestra basal coincidiese con la primera orina de la mañana.

Nuevamente, los valores de potencial de las orinas basales y de aquellas correspondientes a intervalos de tiempos crecientes, tras la ingesta del azúcar, se transformaron en concentraciones (en ppm v/v) mediante la ecuación de la curva de calibración de hidrógeno en orina (ecuación (4-6)). La representación gráfica (figura 4.17) de dichas concentraciones frente al tiempo, muestra la evolución del hidrógeno excretado por vía renal para el caso de tres de los voluntarios adultos sanos estudiados.

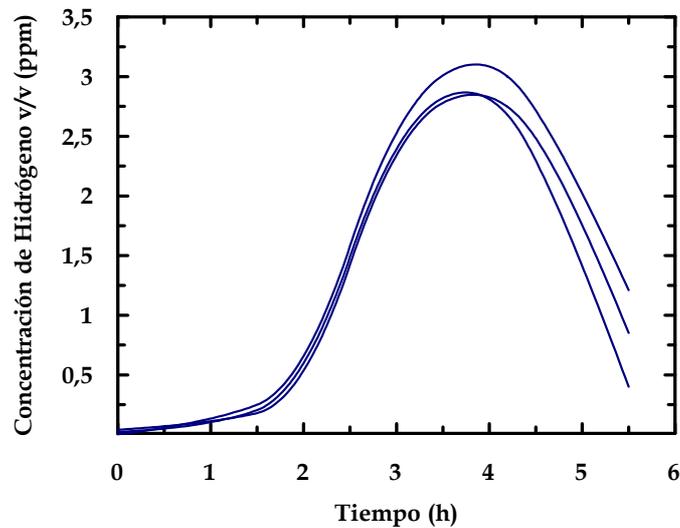


Figura 4.16 Evolución, en el tiempo, del contenido de hidrógeno en la orina tras la ingesta de 20,0 mL de Duphalac[®], para tres sujetos sanos

Al igual que en los resultados encontrados con la lactosa, los niveles de hidrógeno comienzan a incrementarse a partir de la segunda hora después de la ingesta, alcanzando también un valor máximo alrededor de las cuatro horas, para decrecer seguidamente. Este máximo no tiene por qué ser de la misma magnitud que el que aparece cuando se ingiere la lactosa. De hecho, difiere para ambos azúcares debido, entre otras, a las siguientes razones: se administran dosis distintas de ambos azúcares y, además, la lactulosa no es un azúcar metabolizable mientras que la lactosa sí lo es. Como puede observarse, el valor máximo obtenido a las 4 horas es muy similar para todos los voluntarios adultos (valor medio de 3,00 ppm), independientemente de las diferentes contribuciones a la cantidad de hidrógeno producido que, para cada individuo, guardará relación con la cantidad de flora bacteriana presente en su intestino grueso.

Los experimentos con lactulosa no se llevaron a cabo con niños sanos, ya que los niveles de hidrógeno eliminados con un azúcar no metabolizable sólo dependen de la cantidad de flora bacteriana. Los resultados obtenidos hubiesen mostrado, simplemente, un valor inferior para el máximo, pero no hubiesen aportado ninguna información adicional.

Siguiendo el mismo criterio utilizado para las medidas con lactosa, una vez que se comprobó que la curva de eliminación de hidrógeno era similar para todos los sujetos sanos estudiados, las muestras recogidas se limitaron a la orina basal y a la

de cuatro horas.

4.4.2 Medidas con orinas de sujetos que presentan alguna patología gastrointestinal

Para estos experimentos se contó con la colaboración del Departamento de Pediatría del Hospital Universitario de Canarias (Tenerife), en donde se lleva a cabo el diagnóstico de la intolerancia a la lactosa e infección intestinal mediante el *Test de hidrógeno espirado* en el aliento. Este Departamento se prestó amablemente a colaborar y nos suministró algunas de las muestras utilizadas. Otras muestras nos fueron facilitadas directamente por personas voluntarias, diagnosticadas como pacientes intolerantes a la lactosa, conocedores de que se estaba desarrollando esta línea de investigación.

a) Intolerantes a la lactosa

En esta ocasión, por los motivos anteriormente aducidos, solamente se recogieron la orina basal y la de cuatro horas tras la ingesta de 250,0 mL de leche entera. Estas muestras se midieron dentro de las 48 horas siguientes a su recolección. Es importante advertir que los resultados sólo se dieron por válidos cuando el valor del potencial para la orina basal fue prácticamente cero, hecho éste que indicaba que no había hidrógeno residual y que, por tanto, el registrado a las cuatro horas era originado, exclusivamente, a consecuencia de la dosis de azúcar suministrada. La tabla 4.23 recoge, directamente, los valores de las concentraciones de hidrógeno eliminado correspondientes al pico de máxima eliminación (a las 4 horas), calculadas a partir de las medidas de potencial registrado, para un grupo de individuos intolerantes a la lactosa, comprendidos en un amplio intervalo de edades. Los resultados evidencian un aumento muy significativo de la concentración del hidrógeno eliminado por dichos sujetos, respecto del valor que se ha considerado para individuos sanos en esas edades. Los valores correspondientes a los individuos sanos también se presentan en la última columna de la tabla 4.23.

Para una mejor visualización comparativa, los resultados de esta tabla 4.24 se

han representado gráficamente, en forma de diagrama de barras, en la figura 4.18. Dicha representación permite apreciar con mayor claridad las diferencias entre los valores registrados para sujetos sanos e intolerantes. Dado que, como ya se ha visto con anterioridad, no hay diferencias apreciables entre los valores encontrados para los sujetos adultos, los resultados correspondientes a dichos adultos aparecen unificados en la figura, mientras que para los niños se han representado separados, puesto que los niveles de hidrógeno liberados durante la infancia varían, marcadamente, con la edad.

Tabla 4.24 Concentración de hidrógeno eliminado en la orina de 4 horas de sujetos intolerantes a la lactosa y su comparación con el valor registrado en individuos sanos.

Edad (años)	C_{H_2} v/v ppm	
	S. intolerantes	S. sanos
5	4,27	0,85
9	4,14	1,76
43	6,03	2,76
59	5,27	2,78
65	6,53	2,78

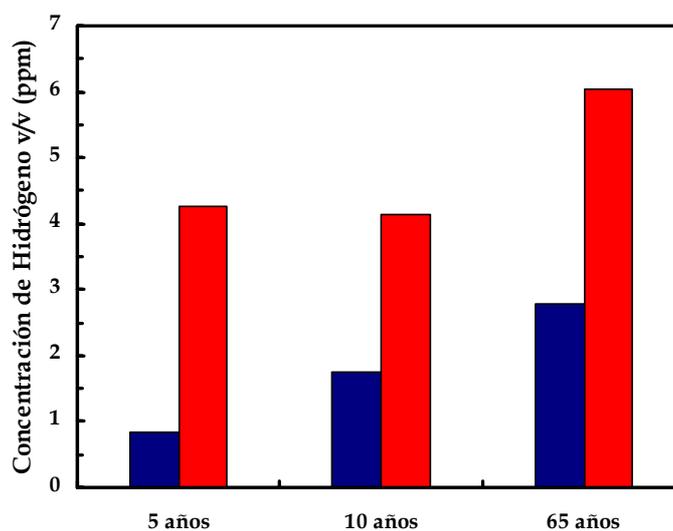


Figura 4.17 Comparación del hidrógeno eliminado después de cuatro horas de producida la ingesta, para sujetos sanos (azul) e intolerantes a la lactosa (rojo), de distintas edades

Estos resultados permiten concluir que la medida del potencial generado por el hidrógeno excretado en la orina es una herramienta útil para el diagnóstico de la intolerancia a la lactosa, ya que la diferencia entre niveles de gas detectados es suficientemente significativa y son concordantes con los obtenidos utilizando el *Test de hidrógeno espirado* en el aliento.

A nivel ilustrativo, en la figura 4.19 se muestran los resultados obtenidos en el departamento de pediatría del Hospital Universitario de Canarias (Tenerife), con el *Test de hidrógeno espirado*, para un niño de 9 años intolerante a la lactosa.

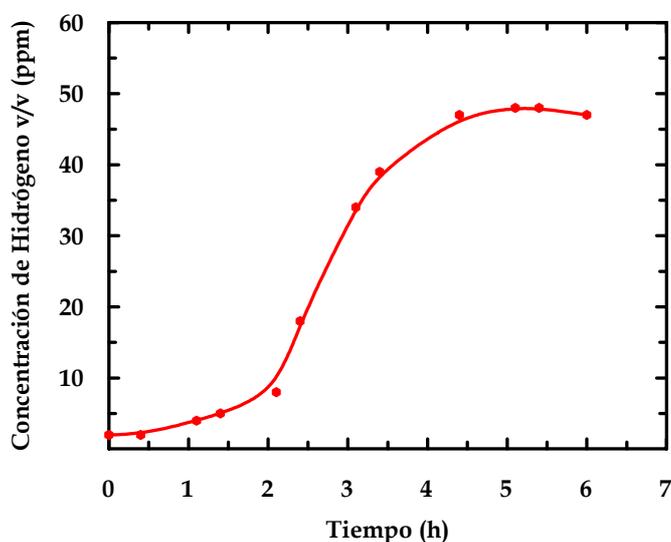


Figura 4.18 Evolución, con el tiempo, del contenido de hidrógeno en el aliento de un niño de 9 años, intolerante a la lactosa, tras la ingesta de leche (datos facilitados por el Hospital Universitario de Canarias - Tenerife)

Al igual que ocurre con los resultados encontrados por nosotros, los niveles de hidrógeno eliminado aumentan hasta alcanzar un máximo a las 4 horas de la toma de la leche, aunque la cantidad media es sensiblemente mayor.

b) Infección intestinal

Puesto que, cuando existe proliferación de bacterias en el intestino delgado, el momento en el que comienza el hidrógeno a ser liberado, tras la ingesta de la dosis del azúcar es anterior al correspondiente a un sujeto sano, las muestras recogidas a

los voluntarios que presentaban los síntomas característicos de una infección intestinal, fueron tres: la orina basal, la de una hora y la de cuatro, tras la ingesta de la dosis de Duphalac®. Al igual que para los intolerantes a la lactosa, éstas se midieron dentro de las 48 horas siguientes a su recogida.

Las concentraciones de hidrógeno calculadas a partir de los potenciales medidos en la orina de un niño de 7 años y en la de un adulto de 27 años, se muestran en la figura 4.20. En ella se puede observar como los valores de potencial ya son importantes desde la primera hora tras la ingestión del azúcar, mientras que para un individuo sano (curva azul celeste) a dicho tiempo aún no se detecta presencia de gas. Además, se observa que, al igual que sucediese en los casos anteriormente vistos en esta Memoria de Tesis Doctoral, el máximo sigue apareciendo en torno a las 4 horas de realizada la ingesta del azúcar.

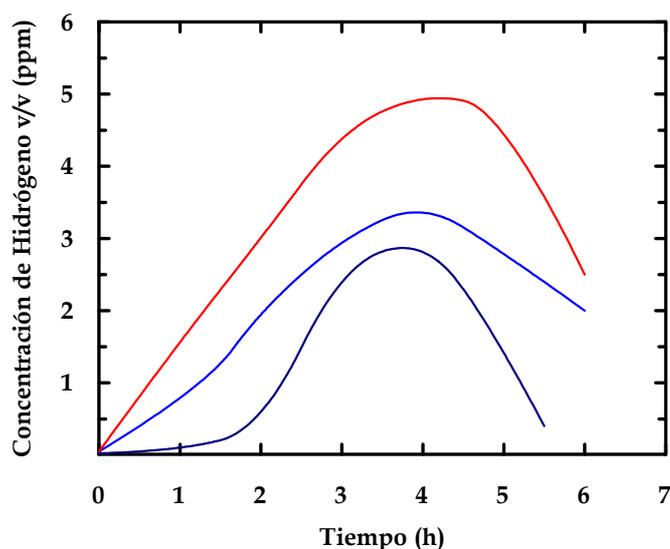


Figura 4.19 Eliminación de hidrógeno en orina para dos sujetos que presentaban una infección gastrointestinal (azul celeste: niño 7 años; rojo: adulto) y para un sujeto sano (azul: adulto sano)

Estos resultados permiten, nuevamente, concluir que la medida del potencial generado por el hidrógeno excretado en la orina es una herramienta útil para el diagnóstico de las infecciones intestinales.

Una vez más, a modo ilustrativo se muestran los valores de concentración de H_2 obtenidos en el Hospital Universitario de Canarias (Tenerife) para el mismo

niño, durante el mismo proceso infeccioso, utilizando el *Test de hidrógeno espirado* en el aliento (figura 4.21). Al igual que ocurre con nuestros resultados, las concentraciones de H₂ detectado comienzan a aumentar desde la primera hora tras la ingesta y se obtiene el valor máximo de excreción a las 4 horas, si bien, al igual que en los casos anteriormente comparados, las cantidades eliminadas son ahora mucho mayores.

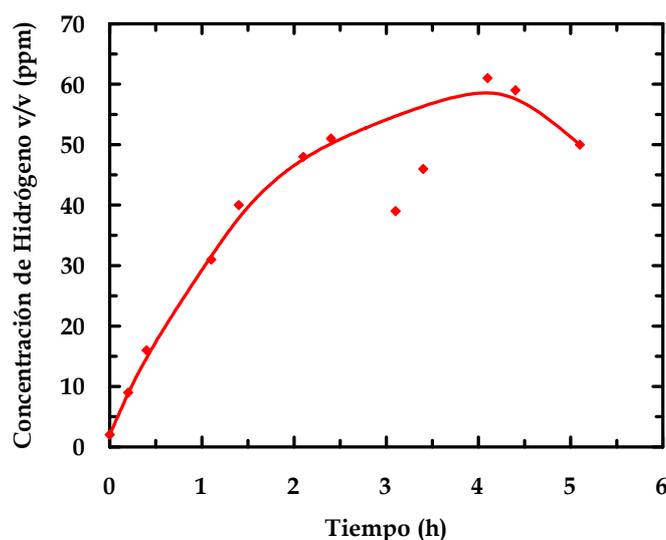


Figura 4.20 Eliminación de hidrógeno en el aliento para un niño de 7 años que presenta una infección gastrointestinal (datos facilitados por el Hospital Universitario de Canarias - Tenerife).

4.5 Acumulación del hidrógeno en orina

Hasta este momento, todos los resultados presentados han sido obtenidos a partir de muestras de orinas recogidas tras el descanso nocturno (orina basal) y a intervalos cortos de tiempo entre dos tomas de muestra consecutivas -una o dos horas o, como máximo, cuatro horas-. Evidentemente, en todos los casos el hidrógeno acumulado hasta ese momento es eliminado con cada micción.

Es lógico pensar que si los periodos de tiempo de recogida de la muestra se prolongan, debería observarse un fenómeno de acumulación del gas en la orina. Fenómeno cuyo estudio resulta importante realizar.

Para analizar este posible efecto acumulativo, se midieron, en días sucesivos,

concentraciones de hidrógeno en las orinas de un sujeto sano recogidas a tiempos crecientes, superiores a las cuatro horas, hasta un total de 11 horas sin orinar, tras la ingesta de la misma dosis que en los casos previos; o sea, un vaso de leche (lactosa).

Puesto que para estos estudios se requiere que el sujeto pase muchas horas sin orinar ni ingerir alimentos, se aprovechó el descanso nocturno para los tiempos más elevados (entre 7 y 11 horas) tomando, en ese caso, como orina basal la última micción antes de ir a dormir. Para los tiempos cortos (4, 5 y 6 horas) la orina basal fue la de primera hora de la mañana, como se había hecho habitualmente.

En la figura 4.22 se muestran los valores de concentración de H_2 obtenidos en estos experimentos. Adviértase que cada punto se corresponde con un periodo de tiempo sin orinar y, por tanto, se ha obtenido en un día diferente y con una orina basal diferente. En la curva se señala, en un color distinto, el valor de concentración de hidrógeno a las cuatro horas. Es decir, el valor correspondiente al máximo de la curva de eliminación de la figura 4.14. Los resultados permiten comprobar que mientras no se orine, el gas sigue acumulándose hasta alcanzar un valor máximo (4 ppm para una dosis de 250,0 mL de leche entera) que se mantiene constante a partir de las 6 horas y media, aproximadamente. Este tiempo es, precisamente, el que requiere la digestión completa de cualquier alimento.

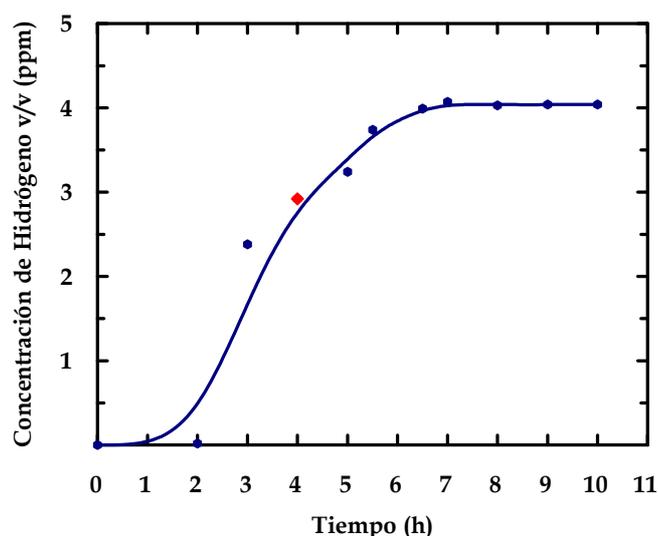


Figura 4.21 Eliminación de hidrógeno disuelto en la orina de un sujeto sano, para distintos tiempos de recogida de la muestra

Este fenómeno, de acumulación del gas en la orina, permite manejar un dato que puede ser importante a la hora de disponer de variantes del mismo protocolo, puesto que podría ser útil para ciertos pacientes bajo determinadas circunstancias. Así, por ejemplo, permite la posibilidad de, habiendo recogido la orina basal e ingerido la dosis del azúcar antes de acostarse, recoger como muestra a medir la primera orina de la mañana, independientemente de las horas que se lleve sin orinar, puesto que, como se ha visto, se alcanza un valor máximo que se mantiene constante.

Esta modalidad del protocolo presenta el inconveniente de que el ayuno que supone el descanso nocturno, hay que trasladarlo a la tarde-noche del día anterior. No obstante, en ciertos casos los individuos lo prefieren, porque la recogida de las muestras se realiza en casa, mientras que, de otra manera, hay que recoger la muestra (micción) a media mañana (situación similar a la que se presenta en el caso del *Test del aliento* realizado en el Hospital Universitario de Canarias – Tenerife).

4.6 Importancia de la dieta sin carbohidratos antes del análisis

Los hidratos de carbono son los sustratos a partir de los cuales las bacterias intestinales producen el hidrógeno que, posteriormente, puede ser detectado en el aliento y, como se ha demostrado en esta Tesis Doctoral, también en la orina. Es evidente que para poder relacionar una determinada cantidad de hidrógeno eliminado por la orina con una dosis concreta de azúcar, el individuo debe someterse al análisis libre de hidrógeno residual, lo cual se pone de manifiesto a través de la medida de orina basal. Esto se consigue, en un sujeto sano, simplemente con una dieta sin la presencia de estos nutrientes en la cena del día anterior a la prueba.

En aquellos sujetos que tienen un tránsito intestinal lento, baja motilidad intestinal o problemas de estreñimiento, el período de dieta antes del análisis debe ser mayor para evitar que el hidrógeno residual dé lugar a falsos positivos.

Para ilustrar cómo afectan estos problemas al resultado final del análisis, se presentan, en la tabla 4.25, la concentración de hidrógeno de la orina basal y la de

4 horas de un individuo no intolerante a la lactosa pero que presenta un tránsito intestinal lento, tras periodos crecientes sin ingerir hidratos de carbono. Los resultados muestran cómo los valores de hidrógeno en la orina basal descienden a medida que se incrementa dicho tiempo, hasta alcanzar valores normales cuando el sujeto permanece 24 horas sin ingerir hidratos de carbono. De igual forma, la última columna de la tabla 4.25 refleja cómo afecta el hidrógeno residual al resultado final del análisis.

Tabla 4.25 Concentración de hidrógeno eliminado por la orina de un sujeto sano sometido a diferentes periodos de dieta

Tiempo de dieta	Concentración de H ₂ v/v (ppm)	
	Orina Basal	Orina de 4h
Cena	103,24	21,10
Almuerzo y cena	5,78	4,77
24 horas	0,25	2,76

4.7 Propuesta de un protocolo alternativo como herramienta útil para el diagnóstico de ciertas patologías gastrointestinales

La investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral permite proponer un protocolo alternativo al actual *Test de hidrógeno espirado* en el aliento, como herramienta útil para el diagnóstico de las patologías gastrointestinales estudiadas. Propuesta que se desglosa en dos partes: el período de dieta y la recogida de la muestra.

a) Período de dieta.

Nuestros resultados revelan que para sujetos sanos y con una motilidad intestinal normal, es suficiente la cena libre de hidratos de carbonos y el ayuno nocturno previo a la prueba. Por el contrario, para sujetos intolerantes a la lactosa con una

motilidad intestinal normal, aunque este tiempo suele ser suficiente, es conveniente extenderlo al almuerzo anterior. Son aquellas personas con problemas de estreñimiento las que mayor tiempo tienen que mantener la dieta sin hidratos de carbono, siendo evidente que lo ideal es conseguir que evacuen antes de someterse al análisis.

En definitiva, la propuesta que se hace es que el período de dieta se acomode a las particularidades del paciente, siendo el médico quien, finalmente, debe determinarlo. De forma general, el almuerzo y sobre todo la cena sin hidratos de carbono, sería lo más conveniente, no viendo necesario extender dicho periodo de dieta, salvo casos excepcionales, a los tres días previos al análisis, como actualmente se hace necesario para el *Test de hidrógeno espirado*.

b) Recogida de la muestra

b.1) Posibles intolerantes a la lactosa

Tras el período de dieta previamente determinado y el ayuno nocturno, el paciente recoge su orina basal en un frasco de vidrio de cierre hermético (que debe serle suministrado). Es conveniente, almacenar el frasco en nevera al objeto de enfriar la orina, en el momento de la recogida, y minimizar, así, la insolubilización del hidrógeno.

Una vez recogida la muestra, el frasco, cerrado cuidadosamente, debe ser guardado nuevamente en nevera hasta el momento del análisis. Seguidamente, el paciente tiene que ingerir los 250,0 mL de leche –que no tiene que ser entera, necesariamente, puesto que no es la grasa la que da origen a la producción del hidrógeno por las bacterias intestinales–.

Desde ese momento, el individuo no puede ingerir ningún tipo de alimento, con excepción de agua. En torno a las cuatro horas desde la ingesta, el paciente debe recoger la segunda muestra y, de igual forma, guardarla en nevera. Ambas muestras sin analizar, pueden ser almacenadas por un periodo nunca superior a las 48 horas.

b.2) Posible infección intestinal

Al igual que para el caso de la intolerancia a la lactosa, el paciente tiene que mantener tanto el período de dieta como el ayuno. Debe recoger su orina basal y guardarla en nevera. Seguidamente, tiene que ingerir una dosis de 0,5 mL de lactulosa por cada Kg de su peso, diluida en 250,0 mL de agua.

En el entorno de la primera hora desde la ingesta, debe recoger la segunda muestra. A las tres horas, contadas a partir de ésta segunda (por tanto, a las cuatro después de la ingesta) recogerá la última muestra. Todas ellas deben ser guardadas, inmediatamente después de su recolección, en nevera. Tampoco en este caso, el sujeto puede ingerir ningún tipo de alimento durante el tiempo que dura la prueba, a excepción de agua (que, a veces, es recomendable para facilitar la micción).

Aquellas otras recomendaciones recogidas actualmente en el protocolo para realizar el *Test de hidrógeno espirado* en el aliento, referentes a: no ingerir alcohol ni bebidas carbonatadas o gasificadas durante el periodo de dieta; no haber estado sometido a tratamiento con antibióticos la semana anterior; y no utilizar enemas o laxantes en los tres días previos a la prueba, se mantienen en el protocolo aquí propuesto.

Resumen y Conclusiones

5. Resumen y conclusiones

Con el presente trabajo de Tesis Doctoral que aquí se presenta, se ha pretendido encontrar las condiciones óptimas, así como una metodología de trabajo adecuada, para hacer efectivos unos ensayos de analítica clínica que resulten aplicables para el diagnóstico de las patologías gastrointestinales que cursan con un notable incremento en la producción de bio-hidrógeno. Estos ensayos se basan en la determinación electroquímica de la porción de ese gas H_2 que es excretado del organismo a través de la vía renal, disuelto en la orina.

La medida electroquímica se ha realizado mediante el empleo de dos sensores diferentes: uno de respuesta potenciométrica y otro de respuesta amperométrica. En ambos casos, fue necesario analizar, desde una base experimental, todas y cada una de las variables físicas y fisicoquímicas que intervienen en el proceso de medida, a fin de conocer cuál es su incidencia en el mismo y, en consecuencia, para tratar, en unos casos, de exaltar y, en otros, mitigar esa influencia para obtener, finalmente, una medida confiable a partir de la cual determinar la cantidad de hidrógeno que se excreta disuelta en la orina.

Como herramienta complementaria, se obtuvo la correspondiente curva de calibración, potencial eléctrico frente a concentración de H_2 –bien insolubilizado en la fase gaseosa sobre la disolución, bien disuelto en la misma – para cada uno de los sensores. En ambos casos se alcanzaron representaciones lineales cuando la cantidad de hidrógeno presente en el sistema a medir era baja, perdiéndose dicha linealidad cuando las concentraciones de hidrógeno presente eran elevadas.

Asimismo, las citadas curvas de calibración resultaron muy útiles, también, a la hora de determinar la solubilidad –a través de la determinación del coeficiente de Bunsen– del hidrógeno en orina humana. En esa ocasión, sin embargo, las medidas con ambos sensores debieron realizarse en la fase gaseosa en equilibrio con la disolución de muestra de partida. Tal circunstancia condujo, por otra parte, a realizar una propuesta sencilla y ágil, al tiempo que con un buen nivel de precisión en lo que hace referencia a los resultados obtenidos, para un nuevo método de determinación de solubilidades de gases en líquidos.

Finalmente, de la aplicación de todo lo anterior a la medida en muestras de orina de pacientes (tanto sanos como afectados de una patología gastro-intestinal

diagnosticada), se formalizó la propuesta para un protocolo ágil, sencillo y confiable que permita complementar, en el plazo corto y –si es posible– posteriormente sustituir –en el medio plazo– las actuales pruebas clínicas (de una mayor complejidad que la que acompaña al método que aquí se presenta) por esta nueva prueba, en la búsqueda del necesario diagnóstico.

Sobre la base de los resultados encontrados en este trabajo de Tesis Doctoral, se presentan, a continuación y de forma resumida, las siguientes conclusiones y aportaciones derivadas del mismo:

Sensor potenciométrico:

1. Para tiempos de burbujeo con hidrógeno, iguales o superiores a 8,0 minutos, puede considerarse que 42,0 mL de agua de calidad *Millipore*® alcanzan la saturación, a 25,0 °C. En consecuencia, el tiempo de burbujeo empleado para garantizar la saturación de las muestras acuosas manejadas en este estudio, fue 10 minutos.
2. Mientras las variaciones de presión atmosférica no sean importantes (y se mantengan dentro del intervalo 710 – 720 mmHg), las medidas de f.e.m. del sensor y, por tanto, la cantidad de hidrógeno disuelto en la muestra durante un determinado tiempo de burbujeo, son independientes del valor de dicha presión atmosférica.
3. No obstante, dada la variabilidad en la respuesta que muestra este sensor, se hace necesario realizar varias medidas para cada concentración de la muestra y utilizar la media aritmética de todas ellas como dato experimental representativo.
4. Asimismo, la determinación del valor “*cero de hidrógeno disuelto*” (esto es, la lectura de potencial correspondiente al disolvente puro, o en su caso de la disolución de partida) se torna necesario realizar puesto que confiere indeseables fluctuaciones a los valores del potencial. Dicho valor es posteriormente deducido del correspondiente a la disolución de muestra y obtener así el valor del potencial atribuible, únicamente, a la presencia del H₂ disuelto.
5. Dada la influencia decisiva que sobre el comportamiento de la membrana tienen las variaciones de la humedad ambiental, se hizo necesario almacenar

los sensores dentro de una urna de cristal, bajo un estricto control del porcentaje de humedad relativa de almacenamiento (50-55%), durante las horas previas a su utilización.

6. La realización de la medida previa con agua pura sobre-hidrata la membrana polimérica del sensor, desplazando el valor al cual se obtiene una respuesta máxima de dicho sensor, hacia porcentajes de menor humedad relativa de almacenamiento (35%). Además, por encima del 45 % de humedad de almacenamiento, se obtienen lecturas de potencial menores de las esperadas.
7. No obstante, la medida previa con agua pura se mantuvo, puesto que además de amortiguar las fluctuaciones señaladas en la conclusión número 4, no es recomendable mantener este tipo de membranas por debajo del 50% de humedad, ya que la deshidratación que ello conlleva produce efectos muy negativos sobre su funcionamiento.
8. La variación del potencial eléctrico medido, con el logaritmo de la concentración de hidrógeno en la muestra, en el intervalo aquí estudiado, no posee la respuesta lineal prevista por la ecuación de Nernst. Por el contrario, la línea de calibración obtenida, presenta un trazado parabólico bien definido. No obstante, en la zona correspondiente a concentraciones bajas de H_2 , sí se observa una respuesta lineal aunque de pendiente superior al valor nernstiano de 30 mV, resultado que puede interpretarse sobre la base de la estabilización de un potencial mixto para la muestra bajo estudio.
9. Los resultados obtenidos en la determinación del coeficiente de Bunsen del H_2 en diferentes disoluciones acuosas, a 25°C, confirman que el método que aquí se propone es adecuado para obtener valores precisos de este parámetro fisicoquímico.
10. Este sensor potenciométrico posee una buena sensibilidad en fase gaseosa, al tiempo que una elevada especificidad hacia el H_2 .

Sensor amperométrico *Unisense*[®]:

11. Dada la baja dispersión de las respuestas que facilita este sensor, el número de medidas que fue necesario realizar para cada concentración de hidrógeno, fue mucho menor que en el caso del sensor potenciométrico –en ocasiones bastó con hacer, simplemente, dos medidas y utilizar la media aritmética de ambas

como dato experimental-.

12. Dentro del intervalo de concentraciones bajas en muestras acuosas (y de orina humana) el comportamiento de este sensor, con la concentración de hidrógeno, es lineal. Esta linealidad se pierde, al igual que sucede en el caso del sensor potenciométrico, a partir de un determinado porcentaje de dilución desde la saturación (70,0 %), observándose, a partir de ese momento, un ascenso exponencial del potencial.
13. La solubilidad del H₂, expresada como coeficiente de Bunsen de acuerdo al método propuesto en este trabajo, puede ser determinada, también, a partir de medidas con este sensor. Ahora bien, para ello es necesario realizar tales medidas sobre el hidrógeno insolubilizado. Es decir, sobre el H₂ presente en la fase gaseosa y no sobre el disuelto en el seno de la disolución (como es el sistema habitual de medida empleado con este sensor amperométrico). Los resultados así obtenidos poseen un buen nivel de confiabilidad, por lo que puede concluirse que el método aquí propuesto es independientemente del tipo de sensor utilizado.
14. Para tiempos de burbujeo con hidrógeno, iguales o superiores a 1,0 minuto, puede considerarse que 42,0 mL de orina (tanto artificial como biológica) alcanzan la saturación, a 25,0 °C. En consecuencia, el tiempo de burbujeo empleado para garantizar la saturación de las muestras acuosas manejadas en este estudio, fue 3 minutos.
15. Los valores encontrados para el coeficiente de Bunsen del hidrógeno en orina humana y en orina artificial, a 25,0 °C, son lo suficientemente próximos como para considerar que la utilización de orina humana, en lugar de una artificial, para la elaboración de la curva de calibración, es posible y adecuada.
16. La evolución temporal del hidrógeno eliminado por un sujeto sano, a través de ambas vías: la pulmonar y la renal, tras la ingesta de una dosis de azúcar (lactosa o lactulosa) coinciden plenamente. Esto es, en ambos casos se produce, a partir de las 2 horas desde la ingesta, un aumento de la cantidad de gas eliminado, hasta alcanzar un máximo, en torno a las cuatro. Asimismo, la cantidad de gas excretada, en el caso de un sujeto sano, es suficiente como para ser detectada y valorada electroquímicamente.
17. Los resultados de la eliminación de hidrógeno, tras la ingesta de un vaso de

leche, en un sujeto que presente una intolerancia (diagnosticada) a la lactosa, revelan que un valor superior a 3,0 ppm en la concentración de hidrogeno en su orina, una vez transcurridas cuatro horas desde la ingesta, es conclusivo del padecimiento de dicha intolerancia a la lactosa.

18. Cuando, al cabo de una hora desde la ingesta del azúcar, se observa un aumento considerable en la producción de hidrógeno gas (y, consecuentemente, se detecta disuelto en la orina), puede considerarse que dicho sujeto está afectado de una infección intestinal.
19. Los resultados evidencian que, en el ser humano, la valoración del hidrógeno eliminado por la vía renal, disuelto en la orina, puede ser utilizada en el análisis clínico para el diagnóstico de patologías gastrointestinales (intolerancia a la lactosa e infecciones bacterianas intestinales).

Bibliografía

6. Bibliografía

1. **Esteso, M.A., Raposo, R.R. y Podestá, J.J.** *2nd European Biophysics Congress.* Orleans (Francia), 10-4, Juillet (1997)
2. **Esteso, M.A., Raposo, R.R. y Podestá, J.J.** *2nd European Biophysics Congress.* Orleans (Francia), 10-20, Juillet (1997)
3. **Esteso, M.A., Raposo, R.R. y Podestá, J.J.** *3rd Congreso Iberoamericano de Biofísica.* Buenos Aires (Argentina), Septiembre (1997)
4. **Podestá, J.J., Estrella, C.N., and Esteso, M.A.** *Sensors and actuadores.* **32**, 27-31 (1996)
5. **Raposo, R.R., Calviño, E., Podestá, J.J. y Esteso, M.A.** *4to Congreso Iberoamericano de Biofísica.* Alicante (España), P-92, Octubre (2000)
6. **Calviño, E., Raposo, R.R., Podestá, J.J. y Esteso, M.A.** *4to Congreso Iberoamericano de Biofísica.* Alicante (España), P-91, Octubre (2000)
7. **Berne, R. and Levy, M.** *"Fisiología"*. Primera edición. Mosby - Year Book de España S.A. (1992)
8. **Cummings, J.H.** *Lancet.* **1**, 1206-1209 (1983)
9. **Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., y Painter, P.R.** *"Microbiología"*. Segunda edición. Reverté S.A. (1991)
10. **Devlin, T.M.** *"Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas"*. Tercera edición. Reverté S.A. (1999)
11. **Brock, D.T., Smith, W.D., and Madigan, M.T.** *"Microbiología"*. Cuarta edición. Prentice Hall (1987)
12. **Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.** *"The Prokaryotes"*. Segunda edición. Springer - Verlag (1992)
13. **Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J.A., y Piédrola-Agulo, G.** *"Microbiología y Parasitología Médica"*. Segunda edición. Salvat (1984)
14. **Philippe Myer,** *Fisiología Humana,* Edit. Salvat 459-586 (1985)

15. Schmidt R.F.; Thews G., *Fisiología Humana*, Edit. McGraw Hill 805-833 (1993)
16. Guyton Hall, *Tratado de fisiología médica*, Edit. McGraw Hill 323-340 (1996)
17. Calloway, D.H., and Murphy, E.L. *Ann. New York Acad. Sc.* **150**, 82-95 (1968)
18. Christl, S.U., Murgatroyd, P.R., Gibson, G.R., and Cummings, J.H. *Gastroenterology.* **102**, 1269-1277 (1992)
19. Levitt, M.D., Berggren, T., Hastings, J., and Bond, J.H.J. *Lab. Clin. Med.* **84**, 163-167 (1974)
20. Levitt, M.D., and Ingelfinger, F.J. *Ann. NY Acad. Sci.* **150**, 65-81 (1965)
21. Flourie, B.F., Etanchaud, F., Florent, C., Pellier, P., Bouhnik, Y., and Rabaud, J.C. *Gut.* **31**, 684-685 (1990)
22. Parés, R., y Suárez, A. "Bioquímica de los microorganismos". Reverté S.A. (1997)
23. Strayer, L. "Bioquímica". Segunda edición. Reverté S.A. (1982)
24. Newcomer, A.D., and McGill, D.B. *Gastroenterology.* **50**, 340-346 (1966)
25. Kerry, K.R., and Anderson, C.M. *Lancet.* 981-982 (1964)
26. Soeparto, P., Stobo, E.A., and Walker-Smith, J.A. *Arch. Dis. Childh.* **47**, 56-61 (1972)
27. Douwes, A.C., Fernandes, J., and Degenhart, H.J. *Arch.. Dis. Childh.* **53**, 939-942 (1978)
28. Harrison, M., and Walker-Smith, J.A. *Gut.* **18**, 48-52 (1977)
29. Strocchi, A., and Levitt, M.D. *Gastroenterology.* **102**, 1424-1426 (1992)
30. Newcomer, A.D., McGill, D.B., Thomas, P.J. and Hofmann, A.F. *New Engl. J. Med.* **293**, 1232-1236 (1975)
31. Cafferata, N.B., y Cafferata, L.F.R. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* **10**, 599-606 (1986)
32. Levitt, M.D. *New Engl. J. Med.* **281**, 122-127 (1969)
33. Bond, J.H., and Levitt, M.D. *J. of Clinical Investigation.* **51**, 1219-1225 (1962)
34. Metz, G., Gassull, M.A., Leeds, A.R., Blendis, L.M., Jenkins, D.J.A. *Clinical Science and Molecular Medicine.* **50**, 237-240 (1976)

35. **Ladas, S., PaPanikos, and Arapakis, G.** *Gut.* **23**, 968-973 (1982)
36. **Robb, T. A., and Davidson, G.P.** *Clinica Chimica Acta.* **111**, 281-285 (1981)
37. **Chrisman, N.T., and Hamilton, L.H.** *Journal of Chromatographic.* **229**, 259-265 (1982)
38. **Corbett, C. L., Thomas, S., Read, N.W., Hombson, N., Bergman, I., and Holdsworth, C. D.** *Gut.* **22**, 836-840 (1981)
39. **Bartlett, K., Dobson, J.V., and Eastham, E.** *Clinical Chimica Acta.* **108**, 189-194 (1980)
40. **Doménech, E.** Comunicación privada, Unidad Departamental de Pediatría, Universidad de La Laguna
41. Gas measurement instruments limited. Inchinnan Estate, Renfrew PA4 9RG, Scotland
42. **Podestá, J.J., Gutiérrez Navarro, A.M., Estrella, C.N., y Estesó, M.A.** *Res. Microbiol.* **148**, 87-93 (1997)
43. **Esteso, M.A., Raposo, R.R., and Podestá, J.J.** *European Biophysics Journal.* **26** (1) (1997)
44. **Bond, J.H., and Levitt, M.D.** *J. of Clinical Investigation.* **51**, 1219-1225 (1962)
45. **Metz, G., Gassull, M.A., Leeds, A.R., Blendis, L.M., Jenkins, D.J.A.** *Clinical Science and Molecular Medicine.* **50**, 237-240 (1976)
46. **Ladas, S., PaPanikos, and Arapakis, G.** *Gut.* **23**, 968-973 (1982)
47. **Lakshminarayanaiah N.,** *Membrane Electrodes.* Edit. Academic Press, INC 50-90, 315-335 (1976)
48. **Robb, T. A., and Davidson, G.P.** *Clinica Chimica Acta.* **111**, 281-285 (1981)
49. **Castellan, G.W.** "*Fisicoquímica*". Segunda edición. Addison - Wesley (1987)
50. **Sanz Pedrero, P.** (coordinador general), "*Fisicoquímica para Farmacia y Biología*". Masson - Salvat Medicina (1992)
51. **Villullas, H.M., Ticianelli, E.A., Macagno, V.A. y Gonzáles, E.R.** "*Electroquímica. Fundamentos y aplicaciones en un enfoque interdisciplinario*". Editorial Universidad Nacional de Córdoba. U.N.C (Argentina), (2000)

52. **Kita, H., Fujikawa, K., and Nakajima, H.** *Electrochim. Acta.* **29**, 1721-1724 (1984)
53. Catálogo EMS, ANAME Instrumentación Científica
54. Catálogo de la empresa fabricante
55. Manual del Sensor de Hidrógeno de Unisense
56. Manual de operación del PA 2000
57. Cataálogo "Nafion, membranes perfluorinadas". Nafion 961
58. **R. Bouchet, E. Siebert, and G. Vitter.** *Journal of the Electrochemical Society.* **147**, (8) 3125-3130 (2000).
59. **Opekar, F., Langmaier, J., Samec, Z.** *J. Electroanal. Chem.* **379** 301-306 (1994)
60. **Opekar, F., Stulík, K.** *Analytica Chimica Acta,* **385** 151-162 (1999)
61. *International Critical Table. Vol III, 255-261 (1928)*
62. **Robertfroid MB, Bornet F, Bouley C, Commings JH.** *Colonic microflora: Nutrition and health. Nutr Rev,* **53** 127-130 (1995).

Apéndice

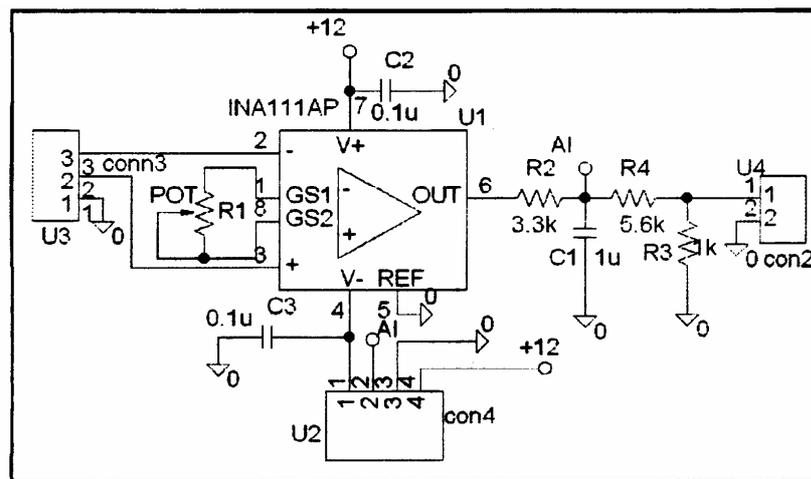
Apéndice 1

Circuito para acondicionar la señal del sensor de hidrógeno a una tarjeta de adquisición de datos DAS-08.

Este circuito se construyó con la intención de no cargar excesivamente al sensor de hidrógeno que poseía una resistencia de salida elevada. Para ello se empleó un amplificador de instrumentación INA111 de Burr-Brown alimentado desde la tarjeta de adquisición con +12 y -12 V. A su salida se conectó una red para hacer que, con una ganancia de 10, obtuviese una tensión máxima para la tarjeta de 5 V, para una señal de entrada de 750 mV (salida máxima del sensor). Así mismo se le dotó de una salida auxiliar para realizar la medida del sensor a través de un voltímetro (así no se carga el sensor directamente con el voltímetro)

La ganancia del amplificador de instrumentación mencionado responde a la expresión siguiente $=1+50k/R_G$. Para una ganancia 10 se tiene una $R_G = 5,5 k$, empleando una resistencia variable de 10k. Para la red divisora se escogieron los valores que aparecen en el esquema adjunto. También se empleó un condensador de 1 μF para evitar ruidos, así como en la entrada de la tarjeta de adquisición.

El circuito aparece en detalle en la siguiente figura:



Apéndice 2

Características técnicas del Electrodo de Hidrógeno

Rango de temperatura	-10 °C - 60 °C
Resistente al agua	si
Coefficiente de Temperatura	2 - 3 % por °C
Rango de Presión Atmosférica	0 - 1 atm
Limite de Detección	0,3 µM en agua
Interferencia	H ₂ S (10 %)
Tiempo de respuesta (90%)	< 35 s
Respuesta	lineal
Humedad relativa	0 % - 90 %