

Análisis de impedancia bioeléctrica en diferentes concentraciones de Glucosa Oxidasa (GOx)

Christian Lexequías^{*1}, Bryan Urcia¹, Lucero Cisneros¹, Sara Diaz^{1,3}, Adriano Peña¹, Oscar Baltuano^{1,2} y Galo Patiño¹

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Grupo de Investigación INFISA, Lima, Perú

² Instituto Peruano de Energía Nuclear, Dirección de Investigación y Desarrollo, Lima, Perú.

³ Universidad Nacional de Educación Enrique Guzmán y Valle, Lima, Perú

Recibido 18 May 2021 – Aceptado 08 Ago 2021 – Publicado 09 Set 2021

Resumen

Esta investigación tiene como objetivo realizar el análisis del comportamiento eléctrico de la proteína glucosa oxidasa (GOx) y con ello poder establecer los parámetros a considerar en un equipo de impedancia para poder realizar lecturas de hemoglobina. A partir de la modificación de tiras reactivas *Accu-Chek*® fue posible obtener las lecturas correspondientes a GOx en 8 muestras, las cuales apoyaron al ajuste de rango de frecuencias óptimas para poder realizar análisis de impedancia bioeléctrica en material biológico. Los resultados del estudio ayudaron a tener una visión más clara para sentar las bases de un futuro equipo que pretenda detectar anemia debido a la relación del GOx con la Hemoglobina (HbA1c).

Palabras clave: Impedancia eléctrica, hemoglobina, Nyquist, glucosa oxidasa, proteínas.

Bioelectric impedance analysis at different concentrations of Glucose Oxidase (GOx)

Abstract

The objective of this research is to perform the analysis of the electrical behavior of the protein glucose oxidase (GOx) and thus to be able to establish the parameters to be considered in impedance equipment to be able to perform hemoglobin readings. From the modification of *Accu-Chek*® reagent strips, it was possible to obtain the corresponding GOx readings in 8 samples, which supported the adjustment of the optimal frequency range to be able to perform bioelectric impedance analysis in biological material. The results of the study helped to have a clearer vision to lay the foundations for a future kit that seeks to detect anemia due to the relationship of GOx with Hemoglobin (HbA1c).

Keywords: Electrical impedance, hemoglobin, Nyquist, glucose oxidase, proteins.

Introducción

El análisis de impedancia bioeléctrica o BIA por sus siglas en inglés (Bioelectrical impedance analysis) es una técnica que permite realizar estudios del comportamiento eléctrico de muestras biológicas [1]. A partir de una pequeña descarga de corriente aplicada a la muestra se logra medir mediante un equipo EIE la respuesta eléctrica ejercida por el material biológico, la cual es plasmada en los espectros de impedancia característicos (Bode y

Nyquist). Esta técnica es totalmente confiable y fue aplicada en estudios de tejidos vegetales [2], adiposos [3], musculares [4] y sanguíneos [5].

Durante un estudio en pequeñas muestras de tejido sanguíneo [6], se obtuvo como resultado gráficas que no habían sido vistas en los análisis más cercanos correspondientes a sangre en la literatura científica [7]. Por ello analizando cada componente utilizado durante la espectrometría de impedancias, se encontró que las tiras reactivas estaban embebidas con una pequeña cantidad de

*christian.lexequias@unmsm.edu.pe

© Los autores. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.



Glucosa Oxidasa (GOx) (Figura 1). Además, se observó que a cierto punto del rango de frecuencias la resistencia y reactancia en cada muestra tenían casi el mismo valor, dejando la investigación en cierta incertidumbre alrededor de dichas medidas. Debido a estas observaciones es que se ve la necesidad de hacer un análisis de impedancia en muestras de GOx para entender su relación con la sangre y observar su comportamiento eléctrico.

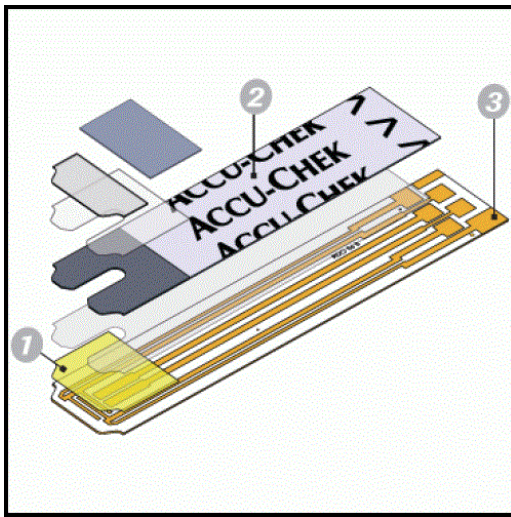


Figura 1: Diagrama explosionado de la tira reactiva *Accu-Chek*® Performa PK50 utilizado en la investigación. (1) Extremo reactivo con la enzima glucosa oxidasa. (2) Protector adhesivo de los electrodos interdigitados. (3) Salida de 6 contactos de oro para su conexión con un equipo de medición [8]

La Glucosa Oxidasa es una enzima utilizada comúnmente en procesos de glicación, como un método para determinar la cantidad de glucosa en las muestras clínicas como orina, sangre y líquido cefalorraquídeo [9]. El método de glicación en sangre consta de la unión del GOx a las partes exteriores de la célula sanguínea, ocasionando que estas usen como receptores de unión al tipo de hemoglobina A1c [10]. Este tipo de Hemoglobina forma parte del 8 % de la hemoglobina total siendo 30 % el valor en peso total de un eritrocito [11]. Esta forma de poder determinar la cantidad de hemoglobina en sangre es usada en pacientes controlados de diabetes mediante un equipo llamado glucómetro electroquímico; sin embargo, la OMS no recomienda su uso como un equipo de diagnóstico [12]. El principal motivo por el cual no se aprueba su uso como método de diagnóstico para diabetes es por el uso de GOx, ya que este al unirse al HbA1c tiene una relación directa con la anemia por deficiencia de hierro (anemia ferropénica), ocasionando así distorsiones en los valores de glucemia para pacientes con prevalencia de anemia. Además el error de medida ocasionado en los valores de

glucemia en un paciente sano son muy altos [13]. Debido a esto, en esta investigación hemos realizado un estudio sobre el comportamiento eléctrico del GOx fuera del contacto con el eritrocito y logrando con los datos obtenidos una base que ayude al desarrollo de un sistema para diagnosticar anemia a partir de un análisis en la impedancia de muestras sanguíneas.

Materiales y Métodos

Para esta investigación se hizo uso de un equipo de impedancia elaborado en el Laboratorio de Biofísica y Física Médica-INFISA. Este equipo fue bautizado con las siglas de MIVA (Módulo de Impedancia Variable para Análisis), siendo su principal visión realizar lecturas en muestras biológicas líquidas o acuosas de 0.6 μ L de tamaño.

Previo a las medidas de GOx, se realizó la calibración respectiva del MIVA. Para ello inicialmente se sacaron 4 muestras que corresponden a medidas obtenidas sin ningún electrodo conectado, obteniendo así sus respectivas gráficas de Bode (Figura 2) y Nyquist (Figura 3). Los valores utilizados son una amplitud potencial de 100 mV y un rango de frecuencias entre 100 kHz a 1 MHz.

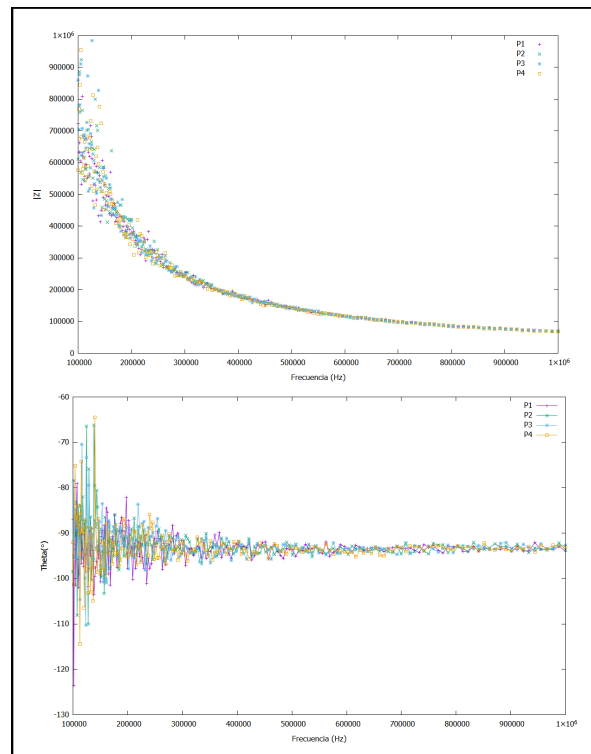


Figura 2: Representación gráfica del diagrama de Bode obtenido de las cuatro muestras medidas sin ningún electrodo conectado.

Muestras	Z	Theta(°)
P1	723664.54	-86.93
P2	611438.26	-98.49
P3	859976.66	-98.45
P4	575788.99	-92.06

Tabla 1: Datos del ángulo de fase (θ°) y modulo de impedancia ($|Z|$) aplicado a la de frecuencia de 100 kHz, mostrado en las gráficas que componen al diagrama de Bode (Figura 2) para las cuatro muestras medidas sin ningún electrodo conectado.

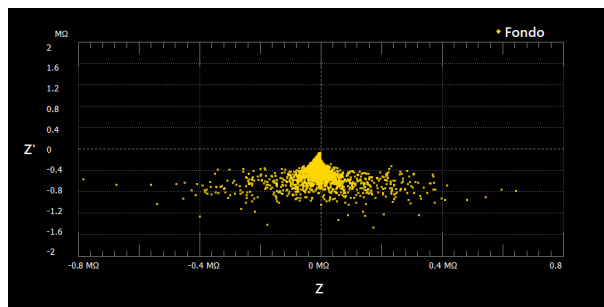


Figura 3: Diagrama de Nyquist obtenida del proceso experimental de realizar medida de impedancia sin ningún electrodo conectado, esta imagen en particular nos muestra como es que se observa el espectro haciendo uso del software controlador del MIVA sin necesidad de plotear los datos en algún software de visualización, como el GNUplot o Zview.

Frecuencia (Hz)	Z (Ω)	Z' (Ω)
1.0×10^5	74840.91	-617490.90
1.0×10^6	-3370.78	-67514.31

Tabla 2: Los datos resistivos real (Z) e imaginario (Z') de impedancia obtenidos para un rango de frecuencias (Hz) en medida sin ningún electrodo conectado, mostrado en la gráfica anterior (Figura 3).

Se puede observar en la gráfica de Nyquist (Figura 3) que se forma una campana de Gauss. Esta corresponde a un flujo eléctrico ejercido por una distorsión de medida en el conector de muestras del MIVA debido a la ausencia de electrodo y la corriente aplicada por el equipo. Luego de este breve análisis se procedió a realizar el uso de las tiras reactivas *Accu-Chek*® Performa PK50 como electrodos de medida. Para ello se decidió tomar 3 lecturas de fondo en 3 tiras reactivas distintas en las mismas condiciones que las medidas sin electrodo. El resultado de sus diagramas de Bode y Nyquist se muestran en las Figuras 4 y 5.

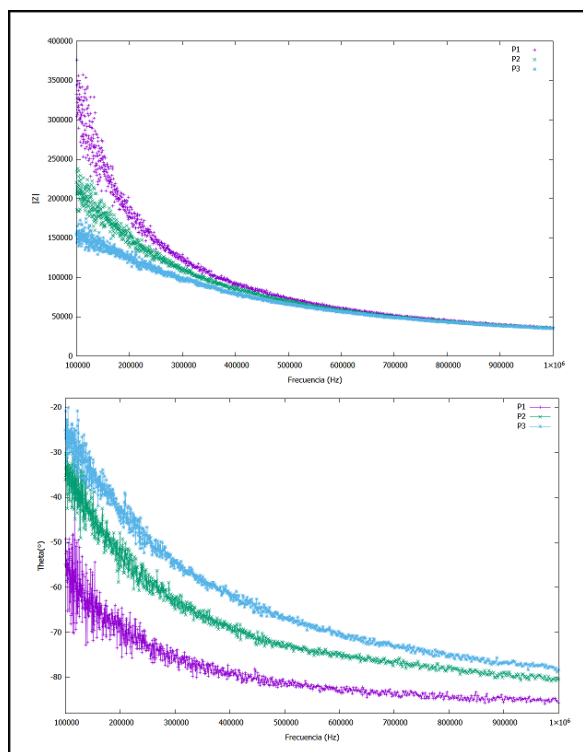


Figura 4: Representación gráfica del Diagrama de Bode obtenido en tres muestras de fondo medidas con el electrodo conectado.

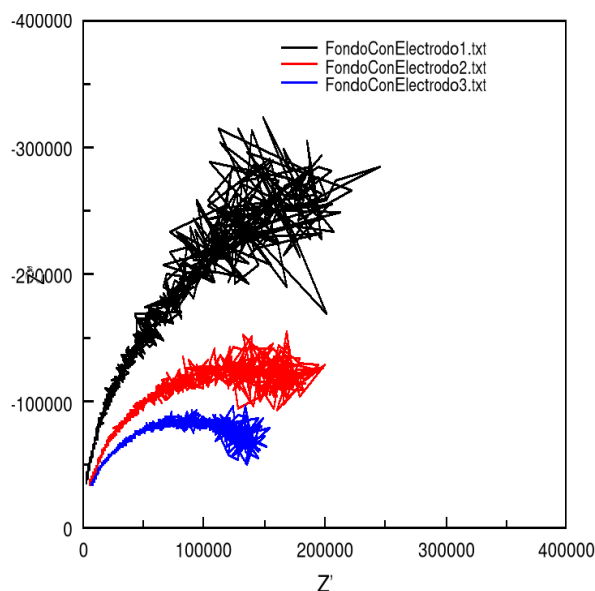


Figura 5: Representación gráfica del diagrama de Nyquist obtenido para tres muestras de fondo con el electrodo conectado en un rango de frecuencias de 100 kHz a 1 MHz.

Muestras	Z	Theta(°)
P1	332796.16	-54.88
P2	220697.39	-36.05
P3	154651.76	-25.04

Tabla 3: Datos del ángulo de fase (θ°) y modulo de impedancia ($|Z|$) aplicado a la de frecuencia de 100 kHz para tres muestras de fondo medidas con el electrodo conectado, mostrado en la Figura 4.

Muestras	Z (Ω)	Z' (Ω)
P1	191438.12	-272221.85
P2	178431.99	-129882.11
P3	140106.77	-65477.16

Tabla 4: Los datos resistivos real (Z) e imaginario (Z') de impedancia obtenidos para la frecuencia 100 kHz en tres muestras de fondo con el electrodo conectado, mostrado en la gráfica anterior (Figura 5).

En la gráfica (Figura 5) se puede notar una diferencia entre los valores de cada una de las 3 lecturas realizadas. Esto se debe a factores externos como el ruido provocado por el desuso del MIVA debido a la emergencia sanitaria en la que nos encontramos. Sin embargo, se puede notar en el diagrama de bode (Figura 4) que el módulo de impedancia se encuentra en una diferencia muy baja, siendo el mayor afectado el ángulo de fase. Debido a esto, gracias al programa Zview [14] se pudo obtener a partir de los datos obtenidos el diagrama de calibración óptimo (Figura 6) para poder realizar la experimento.

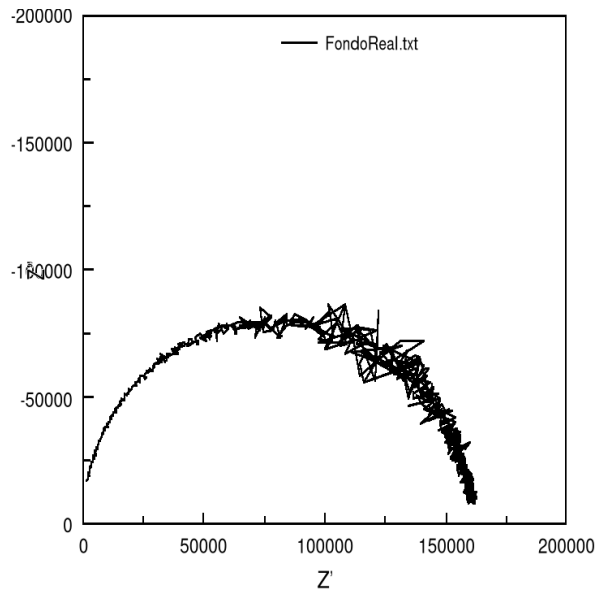


Figura 6: Representación gráfica del diagrama de Nyquist obtenido en un rango de frecuencias de 100 kHz a 1 MHz.

Frecuencia (Hz)	Z (Ω)	Z' (Ω)
1.0×10^5	137356.64	60715.07
1.0×10^6	7519.80	33763.02

Tabla 5: Los datos resistivos real (Z) e imaginario (Z') de impedancia obtenidos para un rango de frecuencias (Hz), mostrado en la gráfica anterior (Figura 6).

Una vez realizadas las calibraciones respectivas, se procedió a extraer la glucosa oxidasa de las tiras reactivas *Accu-Chek*® Active (Figura 7) con un protocolo que evite la contaminación de la muestra extraída. Una vez extraído el GOx se procedió a diluirlo en un frasco limpio con 3 mL de agua suministrado por una jeringa o inyectable. A la par se realizó la limpieza de 4 tiras reactivas *Accu-Chek*® Performa, dejándolos únicamente con el electrodo interdigitado expuesto y ni un solo componente que pudiera alterar las muestras.

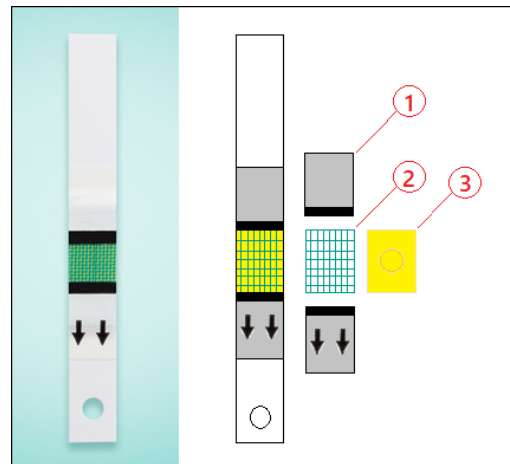


Figura 7: Tira reactiva *Accu-Chek*® Active [15].(1) Adhesivos protectores. (2) Filtro anticoagulante. (3) Glucosa Oxidasa.

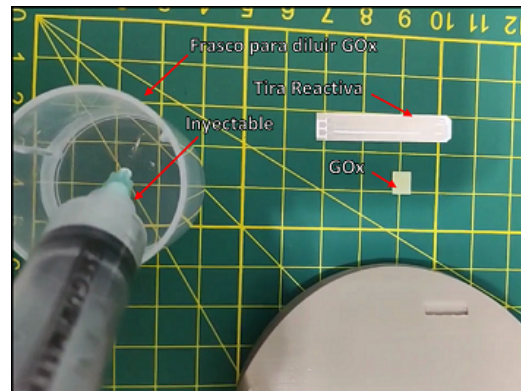


Figura 8: Imagen donde se puede observar los componentes usados durante la experimentación, esta captura de obtuvo de la bitácora grabada durante el proceso experimental.

Resultados y Discusión

A partir de la extracción de pequeñas muestras de GOx, se procedió a diluirlo en un frasco con agua para medirlo en el MIVA. Con el fin de realizar un análisis en concentraciones distintas de GOx, se tomo un proceso que consiste en diluir una primera muestra de glucosa oxidasa para la primera medida de impedancia; acto seguido, para una segunda medida se añadió a la primera muestra diluida una cantidad más de GOx y así sucesivamente hasta poder tomar 6 medidas distintas.

Se debe mencionar que se tuvo problemas técnicos en la medida número 2, quedando marcada una gráfica que no guarda relación en el diagrama de Bode (Figura 9) y en el diagrama de Nyquist no aparece gráfica alguna (Figura 10).

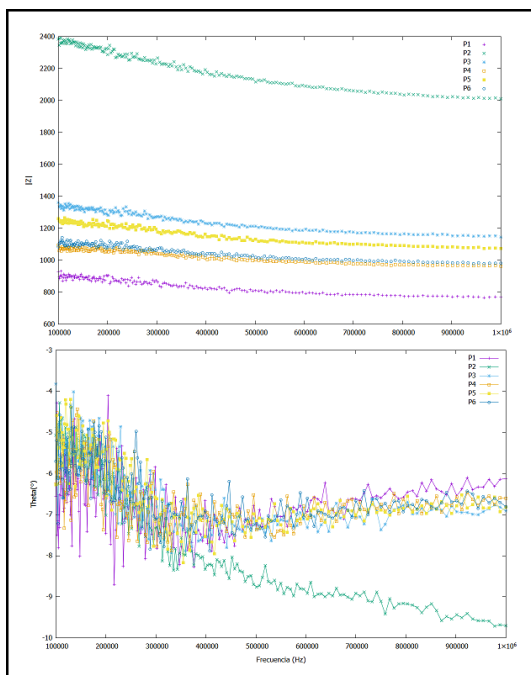


Figura 9: Representación gráfica del diagrama de Bode obtenido en un rango de frecuencias de 100 kHz a 1 MHz para 6 muestras de GOx.

Muestras	Z	Theta(°)
P1	925.50	-6.55
P2	2384.51	-5.06
P3	1359.81	-3.81
P4	1094.00	-6.25
P5	1260.53	-6.27
P6	1084.69	-5.70

Tabla 6: Datos del ángulo de fase (θ°) y modulo de impedancia ($|Z|$) aplicado a la de frecuencia de 100 kHz, mostrado

en las gráficas que componen al diagrama de Bode para 6 muestras de GOx (Figura 9).

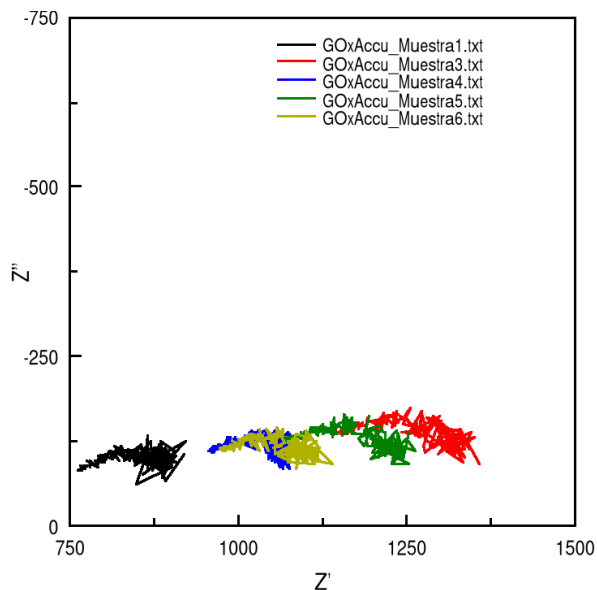


Figura 10: Representación gráfica del diagrama de Nyquist obtenido en un rango de frecuencias de 100 kHz a 1 MHz para 6 muestras de GOx. Se puede observar en este diagrama que falta la gráfica de la muestra P2 y esto se debe a que por problemas técnicos en el momento de medirlo su data de impedancia no salio dentro del diagrama complejo. Sin embargo se adjunta los valores complejos de la resistencia y reactancia en la Tabla 7.

Muestras	Z (Ω)	Z' (Ω)
P1	919.45	105.66
P2	2375.19	210.60
P3	1356.79	90.51
P4	1087.49	119.19
P5	1252.98	137.81
P6	1079.32	107.80

Tabla 7: Los datos resistivos real (Z) e imaginario (Z') de impedancia obtenidos para la frecuencia 100 kHz para 6 muestras de GOx, mostrado en la gráfica anterior (Figura 10).

Se puede observar en las gráficas anteriores (Figura 9 y Figura 10) que hay un cambio entre la resistencia y la reactancia que depende de la concentración de GOx. Para asegurar que existe esta diferencia, se decidió tomar 2 muestras más con el mismo método anterior pero con protocolos mucho más rigurosos como son el tiempo de medida, el uso de una aguja más fina para extraer la muestra diluida y el uso de guantes para evitar impurezas al tacto con el electrodo. El resultado de estas medidas se muestran en la Figura 11 y Figura 12.

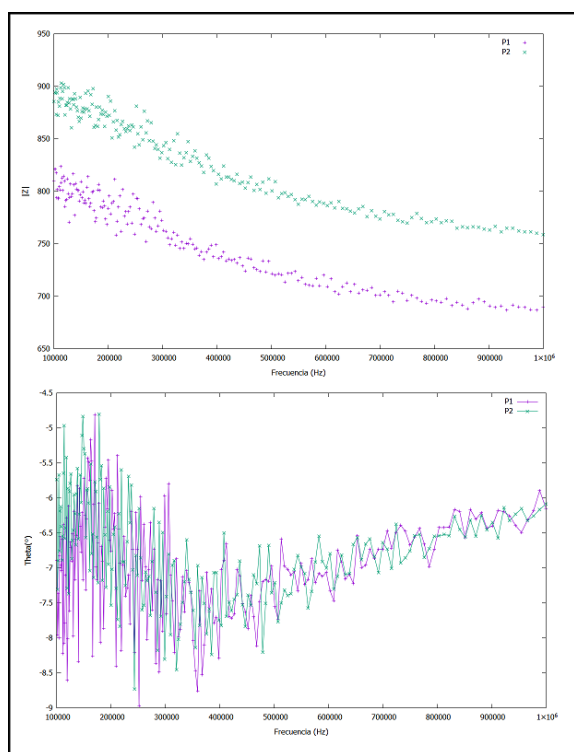


Figura 11: Representación gráfica del diagrama de Bode obtenido en un rango de frecuencias de 100 kHz a 1 MHz para dos muestras estables de GOx.

Muestras	Z	Theta(°)
P1	809.81	-6.89
P2	885.48	-5.73

Tabla 8: Datos del ángulo de fase (θ°) y modulo de impedancia ($|Z|$) obtenido en la frecuencia de 100 kHz para dos muestras estables de GOx, mostrado en las gráficas que componen al diagrama de Bode (Figura 11).

Muestras	Z (Ω)	Z' (Ω)
P1	803.96	97.14
P2	881.05	88.52

Tabla 9: Los datos resistivos real (Z) e imaginario (Z') de impedancia obtenidos para la frecuencia 100 kHz en dos muestras estables de GOx, mostrado en la gráfica anterior (Figura 12).

Con éxito se puede ver en las gráficas (Figura 12) que hay una diferencia observable que corresponde a la diferencia de concentración de GOx. Para mostrar que las medidas son realmente lecturas en glucosa oxidada, se procedió a realizar la medidas en agua pura para que estas concuerden con la literatura de impedancia en fluidos acuosos inertes [16]. Es en este proceso que se utilizan las 4 tiras reactivas que fueron limpiadas, mostrándose los resultados en la Figura 13 y Figura 10.

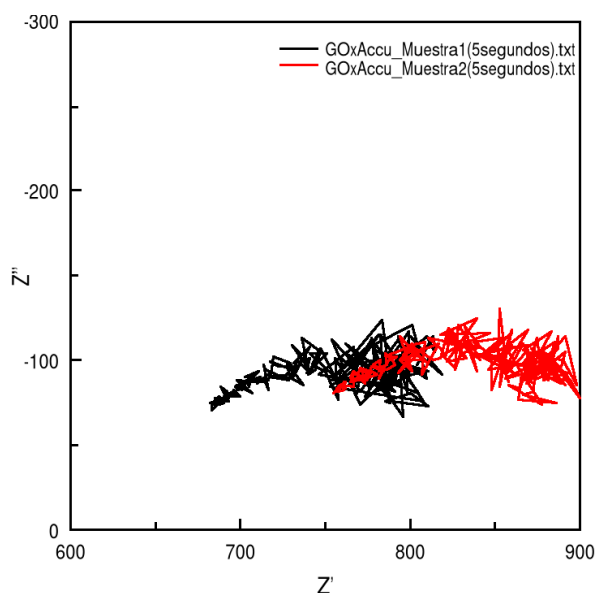


Figura 12: Representación gráfica del diagrama de Nyquist obtenido en dos muestras estables de GOx.

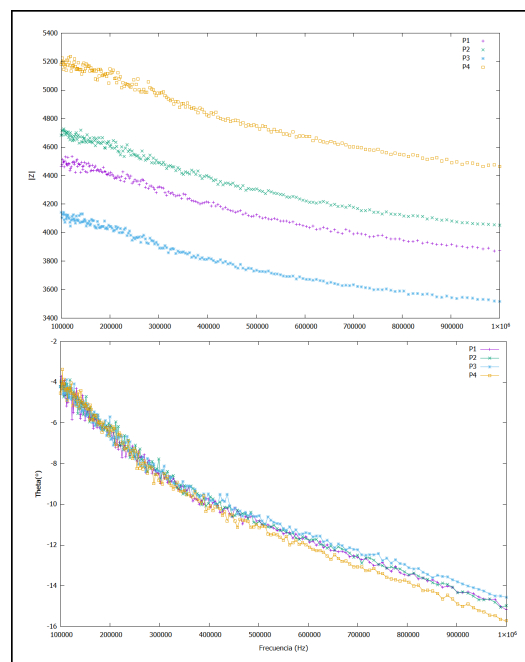


Figura 13: Representación gráfica del diagrama de Bode obtenido en un rango de frecuencias de 100 kHz a 1 MHz para cuatro muestras de agua con electrodos sin GOx.

Muestras	$ Z $	Theta($^{\circ}$)
P1	4464.15	-4.17
P2	4684.86	-4.20
P3	4141.80	-4.22
P4	5179.58	-4.53

Tabla 10: Datos del ángulo de fase (θ°) y modulo de impedancia ($|Z|$) aplicado a la de frecuencia de 100 kHz, mostrado en las gráficas que componen al diagrama de Bode para cuatro muestras de agua con electrodos sin GOx (Figura 13).

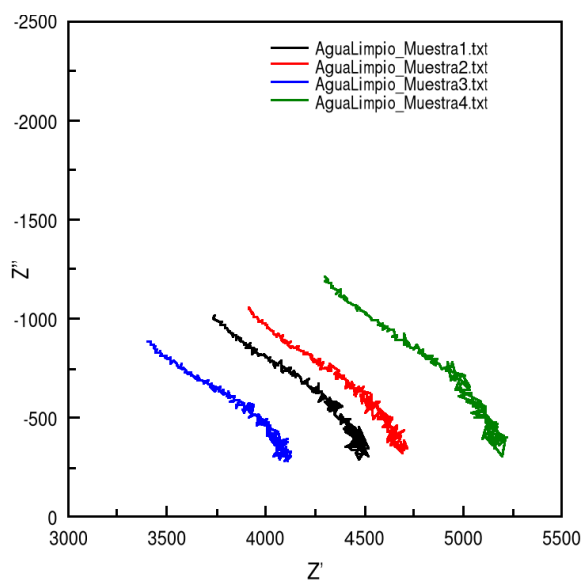


Figura 14: Representación gráfica del diagrama de Nyquist obtenido en cuatro muestras de agua con electrodos sin GOx.

Muestras	Z (Ω)	Z' (Ω)
P1	4452.28	325.38
P2	4672.22	343.89
P3	4130.53	305.32
P4	5163.34	409.79

Tabla 11: Los datos resistivos real (Z) e imaginario (Z') de impedancia obtenidos para la frecuencia 100 kHz, mostrado en la gráfica anterior (Figura 14).

Conclusiones

Con los resultados obtenidos se puede concluir que existe una diferencia notable en la impedancia de las distintas concentraciones de glucosa oxidasa. Ello nos ayuda a entender cómo una proteína dimérica (GOx) puede variar su lectura de impedancia de acuerdo a la cantidad que se pueda hallar en la muestra y por lo tanto es posible

mencionar que realmente podríamos estar leyendo hemoglobina en estudios anteriores, ya que el HbA1c es una hemoproteína y esta se termina enlazando con el GOx cuando cumple la función de glicación.

Los espectros de impedancia en Nyquist del GOx corresponden a un circuito de Randles [17]. Esto se debe a la reacción química que sucede al momento de ejercer una cantidad de corriente a la muestra. Gracias al software Zview y los valores obtenidos durante la experimentación se pudo bosquejar el circuito correspondiente al GOx (Figura 15).

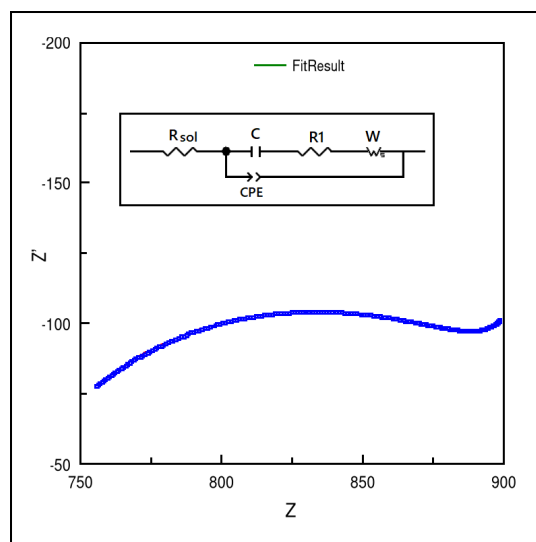


Figura 15: Representación gráfica del diagrama de Nyquist caracterizado para GOx y su circuito eléctrico modelado.

Elemento	Valor	Error(%)
Rsol	712.3 Ω	0.78
C	2.4×10^{-8} F	19.6
R1	232 Ω	9.1
Z_w	0.66 W	2.04
CPE	0.92 $\frac{s \cdot \Omega}{rad}$	4.75

Tabla 12: Se puede observar los correspondientes valores a cada elemento del circuito de la proteína GOx caracterizada con su porcentaje de error calculado, mostrado en la gráfica anterior (Figura 15).

Con este circuito modelado (Figura 15) se pudo fijar mejor los parámetros a considerar para las siguientes investigaciones. Ello quiere decir que el rango de frecuencias óptimos sería entre 100 kHz a 1 MHz para poder realizar lectura en material biológico (proteínas, eritrocitos, baterías, etc.) para muestras muy precisas como son 0,6 μ L. Además, se recomienda usar 100 mV como amplitud potencial durante la experimentación.

Finalmente, el rango de frecuencias de 10 kHz a 1 MHz resulta ser el más óptimo para realizar análisis en materiales biológicos en solución acuosa. Esto se debe a que el punto de inflexión característico del circuito de Randles aparece entre el rango de 140 kHz a 170 kHz, y que los rangos de frecuencias de los extremos bajo (de 10 kHz a 139 kHz) y alto (de 171 kHz a 1 MHz) establecidos pueden mostrar un mejor detalle gráfico del comportamiento bioeléctrico en una muestra biológica.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo recibido por parte del Dr. Sthy Warren Flores Doarta quien apoyo de una forma muy loable al proyecto, facilitando el acceso a una cantidad de herramientas necesarias para el estudio de investigación que son complicadas de obtener en estas épocas de emergencia sanitaria. Y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (VRIP UNMSM) por el apoyo institucional brindado para poder continuar con nuestro proyecto.

Apéndice (Anexos)

El MIVA es un equipo desarrollado a partir de un primer modelo de equipo EIE [6], el cual puede realizar lecturas en sangre. Este modelo tiene una mejora considerable para poder realizar lecturas en muestras biológicas acuosas o líquidas, se pretende presentar el artículo respectivo en un plazo que no supere al año 2021.



Figura 16: Modulo de Impedancia Variable para Análisis (MIVA).

Referencias

- [1] A. Malik. Aplicaciones clínicas del método de impedancia bioeléctrica (BIA). *Renut*, 4(12):624-628. <https://revistarenut.org/index.php/revista/article/view/132> (2010).
- [2] J. Caicedo-Eraso, F. Díaz-Arango y A. Osorio-Alturo. Espectroscopia de impedancia eléctrica aplicada al control de la calidad en la industria alimentaria. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(1), e951. Doi: https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:951 (2019).
- [3] A. Almagiá, P. Lizana, R. Rodriguez, L. Gallardo, C. Nieto, S. Verdejo, D. Ivanovic, O. Binvinat. Predicción de Porcentaje de Masa Adiposa a través de Impedancia Bio-Eléctrica y Método Antropométrico. *International Journal of Morphology*, 30(3), 872-876. Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022012000300018> (2012).
- [4] N. Garzón-Orjuela, M. Barrera-Perdomo, M. Gutiérrez-Sepúlveda, R. Merchán-Chaverra, A. León-Avenidaño, L. Caicedo-Torres, M. Hernández-Rodríguez, y A. Montaña-Palma. Análisis de la composición corporal mediante impedancia bioeléctrica octopolar en pacientes hospitalizados en Bogotá, Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina*, 67(3), 239-247. Doi: <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v67n3.68897> (2019).
- [5] J. Bernal, J. Sosa, M. Bernaln, C. Jiménez, G. Hernández, M. Gutiérrez, J. Huerta, C. Villagómez and P. Palomares. Magnetic Field Influence on Electrical Properties of Human Blood Measured by Impedance Spectroscopy. *Bioelectromagnetics*, 26(7), 564-570. Doi: <https://doi.org/10.1002/bem.20132> (2005).
- [6] C. Lexequias y B. Urcia. Desarrollo de un espectrómetro de impedancia eléctrica portátil para análisis y caracterización del tejido sanguíneo. *Revista de Investigación Física*, 24(1), pp.9-16. Doi: <https://doi.org/10.15381/rif.v24i1.20241> (2021).
- [7] J. Bernal, C. Guerrero y F. Hernández. Determinación de las propiedades eléctricas en tejido sanguíneo. Universidad Autónoma de Nuevo León, 510-515. <http://ingenierias.uanl.mx/29/index.html> (2005).
- [8] Medshop.co.nz. Accu-check performa strips pk 50. [online] Available at: <http://www.medshop.co.nz/accu-check-performa-strips-pk-50>. (2021).
- [9] J. Raba & H. Mottola. Glucose Oxidase as an Analytical Reagent. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 25(1), 1-42. Doi: <https://doi.org/10.1080/10408349508050556> (1995).

- [10] L. Aponte, R. Ramírez, S. Hernández & D. Somontes. Los procesos de glucosilación no enzimática. Revista Archivo Médico de Camagüey, **13**(6) [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\$arttext&pid=S1025-02552009000600020&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci$arttext&pid=S1025-02552009000600020&lng=es&tlng=es). (2009). https://www.researchgate.net/publication/260149031_Influence_of_Iron_Deficiency_Anemia_on_Hemoglobin_A1C_Levels_in_Diabetic_Individuals_with_Controlled_Plasma_Glucose_Levels (2014).
- [11] M. Forrellat-Barrios, P. Hernández-Ramírez, N. Fernández-Delgado & G. Pita-Rodríguez. ¿Se cumple siempre la relación hemoglobina-hematócrito? Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, **26**(4), 359-361. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\$arttext&pid=S0864-02892010000400012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci$arttext&pid=S0864-02892010000400012) (2010).
- [12] Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la diabetes. <https://www.who.int/diabetes/global-report/es/> (2016).
- [13] A. Christy, P. Manjrekar, R. Babu, A. Hegde & M. Rukmini. Influence of Iron Deficiency Anemia on Hemoglobin A1C Levels in Diabetic Individuals with Controlled Plasma Glucose Levels. Iranian Biomedical Journal. **18**, 88-92. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_8 (2009).
- [14] ZView®DataSheet. Windows, Scribner. <https://www.scribner.com/software/> (2021).
- [15] Tira reactiva Active *Accu-Chek* ® <https://www.accu-chek.com.pe/tiras-reactivas/tiras-accu-chekr-active> (2019).
- [16] J. Jorge, J. Pereira, M. Rodríguez, N. Barrios, D. Oliva y A. Navia. Impedance spectroscopy in water/oil emulsions in a range of intermediate frequencies. Revista Ingeniería UC, **25**(3). Universidad de Carabobo. <http://servicio.bc.uc.edu.ve/ingenieria/revista/v25n3/art07.pdf> (2018).
- [17] U. Retter & H. Lohse. Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Electroanalytical Methods*, 159–177. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_8 (2009).