

00528
6

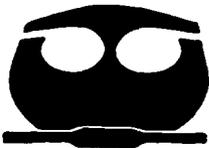
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTAD DE QUIMICA

**DESARROLLO DE UN SISTEMA SENSOR PARA DETERMINAR
D-GLUCOSA EN JUGOS DE FRUTA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
ADRIANA NOEMI ANGELES CAÑAS



MÉXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Elba Rojas Escudero
Vocal	Prof. Arturo Navarro Ocaña
Secretario	Prof. María del Pilar Cañizares Macías
1 er suplente	Prof. Berta Julieta Sandoval Guillén
2 do suplente	Prof. Evangelina Camacho frias

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio 105, Departamento de Química Analítica, Posgrado
Facultad de Química, UNAM

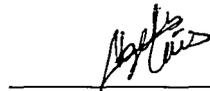
ASESORA:

Dra. María del Pilar Cañizares Macías



SUSTENTANTE

Adriana Noemi Angeles Cañas



Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma México, "Nuestra máxima casa de estudios" y a la Facultad de Química, por permitirme desarrollarme profesionalmente.

A la Dra. Pilar Cañizares por su tiempo, paciencia, sus enseñanzas, asesorías y consejos que hicieron posible el desarrollo de esta tesis.

A la Profa. Elba Rojas y al Prof. Arturo Ocaña, por su tiempo en la revisión y corrección de esta tesis.

A todos los integrantes del laboratorio 105, Posgrado de la Facultad de Química, Minerva, Fernando, Araceli y Gustavo, por los momentos compartidos, los conocimientos que intercambiamos y por los diferentes cambios de opinión que nos ayudaron a mejorar.

A todos los maestros que conocí a lo largo de la carrera, que siempre me ayudaron con sus asesorías, enseñanzas y experiencias para afrontar problemas reales y buscar su solución.

Este trabajo lo dedico principalmente a mi familia

A mis padres el Sr. Jorge Angeles y la Sra. Silvia Cañas que siempre han estado conmigo a lo largo de mi carrera, que tuvieron confianza en mi y me apoyaron dándome su amor y cariño.

A mis hermanas Itzel, Tatiana y Shai, que siempre han estado conmigo dándome su apoyo y cariño.

A todas las personas que me apoyaron

A la Dra. Pilar Cañizares que me brindó su amistad en todo el tiempo que permanecí en su laboratorio.

A todos mis compañeros y amigos que conocí durante la carrera, por la amistad que me dieron durante todos estos años de escuela y por todas las risas, tristezas, juegos, conocimientos y experiencias que compartimos juntos en nuestras aulas de clase.

INDICE

Resumen	1
Objetivos	3
Capítulo 1 Antecedentes	4
1.1 Análisis por Inyección en Flujo	4
1.1.1 Generalidades	4
1.1.2 Conceptos Básicos	4
1.1.3 Diagrama	6
1.2 Enzimas	9
1.2.1 Generalidades	9
1.2.2 Aplicación de las enzimas en la industria	11
1.2.2.1 Propiedades de la enzima Glucosa oxidasa	12
1.3 Inmovilización de enzimas	13
1.3.1 Generalidades	13
1.3.2 Clasificación de los métodos de inmovilización	14
1.3.3 Efectos de la inmovilización sobre la actividad de la enzima	17
1.4 Biosensores y Sistemas Enzimáticos	18
1.4.1 Generalidades	18
1.4.2 Medida de la velocidad de reacción en configuraciones de flujo continuo	19
1.5 Glucosa en jugos de fruta	20
1.5.1 Generalidades	20
1.5.2 Clasificación de bebidas	21
1.5.3 Métodos de análisis para glucosa en jugos de fruta	22
1.6 Glucosa en vinos	24
1.6.1 Generalidades	24
1.6.2 Métodos de análisis para glucosa en vinos	24
1.7 Fundamento de la reacción	26

Capítulo 2 Desarrollo Experimental	28
2.1 Reactivos	28
2.2 Instrumentos y aparatos	29
2.3 Disoluciones	29
2.3.1 Normalización de disoluciones	32
2.4 Inmovilización de la enzima	32
2.5 Preparación del reactor enzimático	33
2.6 Configuración de flujo en continuo para cuantificar glucosa	34
2.7 Preparación de muestras	35
Capítulo 3 Resultados y Discusión de Resultados	37
3.1 Estudio del espectro de absorción del producto de la reacción	37
3.2 Optimización de los parámetros FIA para formar el ion triioduro a partir de H_2O_2	38
3.3 Optimización de los parámetros FIA para la cuantificación enzimática de glucosa	41
3.4 Elaboración de la curva de calibración para glucosa	44
3.5 Límite de detección, límite de cuantificación y precisión del método propuesto para la cuantificación de glucosa	48
3.6 Corrección de la curva de calibración para el H_2O_2	50
3.7 Curva de calibración de H_2O_2 midiendo a 353 nm	51
3.8 Comparación de las curvas de calibración de glucosa y H_2O_2 . Estudio de la actividad enzimática	52
3.9 Análisis de muestras	53
3.9.1 Análisis de vinos	53
3.9.1.1 Estudio de interferencias	55
3.9.1.1.1 Etanol	55
3.9.1.1.2 Ácido ascórbico	56
3.9.1.1.3 Optimización de la concentración de yodato	59

3.9.2 Análisis de bebidas refrescantes	60
3.9.3 Análisis de jugos de frutas	61
Conclusiones	66
Bibliografía	68

RESUMEN

La D-glucosa o también llamada dextrosa es un monosacárido que sirve como principal fuente de energía para la mayor parte de los organismos, además de estar presente en una gran variedad de alimentos naturales, alimentos procesados y medicamentos. La determinación de glucosa en alimentos es un análisis rutinario que se realiza dentro de la industria alimentaria como parámetro de control de calidad de materia prima, especificación de etiquetado y valor nutrimental del producto terminado. Dentro de los alimentos donde se realiza este análisis se pueden mencionar vinos y jugos de fruta. Este trabajo propone una metodología de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) para determinar glucosa en jugos de fruta. Las características de este método son: instrumentación sencilla y de bajo costo, análisis directos y reproducibles y fácil acoplamiento de un reactor enzimático, que al utilizar enzimas inmovilizadas beneficia el análisis por ser reusables y de alta especificidad.

El fundamento de la metodología FIA propuesta se basó en la reacción de oxidación entre el peróxido de hidrógeno con el ion yoduro. Cuando la muestra que contiene glucosa pasa a través del reactor enzimático, adaptado al sistema FIA, donde se encuentra inmovilizada la enzima glucosa oxidasa (GO) en vidrio de poro controlado (CPG) la glucosa se oxida para formar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este último en presencia del ion yoduro forma el ion triyoduro el cual se mide por espectrometría a 353 nm. La señal analítica obtenida es proporcional a la cantidad de peróxido formado y a su vez corresponde a la concentración de glucosa presente en la muestra.

Se optimizaron los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA y los parámetros fisicoquímicos de la actividad de la enzima. Con las condiciones óptimas se realizó una curva de calibración para cuantificar la concentración de glucosa, utilizando como catalizador el molibdato de amonio para favorecer la formación del ion triyoduro y aumentar la sensibilidad de la determinación. El intervalo lineal encontrado fue de 0.038 a 6.66 mM, con un límite de detección de 0.014 mM y límite de cuantificación de 0.042 mM. La precisión del método, expresada como desviación estándar relativa es 1.43 %.

Se realizó el estudio de las interferencias presentes en los jugos de fruta, bebidas refrescantes y vinos (ácido ascórbico y etanol). Para corroborar la validez del método propuesto, además del análisis estadístico, se realizaron fortificaciones a las muestras con dos diferentes concentraciones de glucosa.

OBJETIVO GENERAL

- **Desarrollar un sistema enzimático en flujo para determinar la concentración de glucosa en jugos de frutas, bebidas refrescantes y vinos, como parámetro de control de calidad de materia prima y producto terminado. Proponiendo una metodología específica, sencilla, precisa y de bajo costo.**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Establecer los parámetros hidrodinámicos óptimos de un sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) caudal, volumen de inyección y longitud del reactor para cuantificar concentraciones de glucosa.**
- **Establecer las condiciones óptimas para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en vidrio de poro controlado.**
- **Determinar las condiciones óptimas de la actividad de la enzima inmovilizada que incluyen pH y temperatura.**
- **Evaluar, bajo las condiciones ya establecidas en el sistema FIA, la concentración de glucosa en jugos de frutas, vinos y refrescos.**
- **Determinar la precisión, límite de cuantificación, límite de detección e intervalo lineal del método desarrollado.**
- **Realizar pruebas de fortificación en las muestras para validar el método propuesto en la cuantificación de glucosa.**

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Análisis por Inyección en Flujo

1.1.1 Generalidades

El Análisis por Inyección en Flujo (FIA) constituye una reciente (1975) e importante innovación metodológica en Química Analítica que se caracteriza por un fundamento simple, una instrumentación de bajo costo, un manejo sencillo y cómodo, y una gran capacidad para lograr resultados rápidos, precisos y exactos.

El FIA es una clara alternativa de los métodos químico analíticos desarrollados manualmente. En definitiva se trata de sustituir material de vidrio (vasos, pipetas, buretas, matraces) por tubos, bombas, válvulas, con claras ventajas respecto a la forma de trabajo habitual. El FIA reduce el tiempo de análisis y origina resultados reproducibles. Al tratarse de un sistema cerrado, se minimiza el contacto entre el operador y reactivos tóxicos, así como se protegen a los reactivos y muestras frente a los gases atmosféricos (CO_2 , Humedad, O_2).

1.1.2 Conceptos básicos

Para entender el principio del sistema FIA, es necesario nombrar los siguientes conceptos:

- Dispositivos Automáticos.- son aquellos que originan unas acciones programadas, para ser llevadas a cabo en unos puntos del proceso, sin la intervención humana. El sistema no toma decisiones y la secuencia de las operaciones es siempre la misma. No tiene incorporado un sistema de retroalimentación.
- Dispositivos Automatizados.- son aquellos que realizan la acción de automatizar. Se diseñan para que un sistema de realimentación les permita tomar decisiones sin la intervención humana. El sistema se autocontrola y autoajusta. La secuencia de operaciones es distinta para cada muestra.

Se considera como método automático el que implica la eliminación total o parcial de la intervención humana en un método analítico. Este se clasifica en tres tipos:

- Métodos Automáticos Discontinuos.- cada muestra se mantiene en forma separada en un receptáculo, donde se lleva a cabo la reacción y pasa al detector.
- Métodos Automáticos Continuos.- la concentración del analito es medida sin interrumpir un flujo de líquido o gas.
- Métodos Robotizados.- se basan en el uso de un mini-robot controlado por un microprocesador.

Dentro de los métodos Automáticos Continuos, se encuentran los segmentados y los no-segmentados. En el método continuo segmentado (CFA) las muestras son aspiradas secuencialmente y entre ellas se sitúan burbujas de aire que separan (segmentan) el flujo establecido, incluido un ciclo de lavado. Las burbujas de aire se eliminan antes de que alcancen la celda del detector. En cambio en el método continuo no-segmentado, el flujo no está segmentado por burbujas de aire, la muestra es inyectada en vez de aspirada y en el momento de la detección no se alcanza el equilibrio físico (homogeneización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). Estas son las características del método que se denomina como Análisis por Inyección en Flujo (FIA). La ausencia de burbujas de aire en el sistema FIA constituye una gran ventaja dentro del análisis de muestras ya que evita la contaminación mutua entre muestras sucesivamente inyectadas.

Los elementos esenciales para montar un sistema FIA se describen a continuación y el esquema se muestra en la figura 1.

- a) Una unidad de propulsión, que establece un flujo de caudal lo más constante posible de una disolución, que lleva disuelto un reactivo o es un simple portador. Puede ser una bomba peristáltica.
- b) Un sistema de inyección, que permite insertar o introducir en el flujo un volumen exacto de muestra con gran producibilidad de operación y sin interrumpir al mismo.
- c) Una zona de tubo, que se llama comúnmente "reactor" que es donde tiene lugar el transporte con o sin proceso adicional. Puede ser un tubo recto o en forma de serpentín o una cámara de mezcla.

- d) Una celda de flujo, incorporada a un instrumento de medida (fluorímetro, fotómetro, potenciómetro, etc.) que traduce la señal continua a un registrador o a un microprocesador.
- e) El flujo que sale del sistema de detección se desecha.

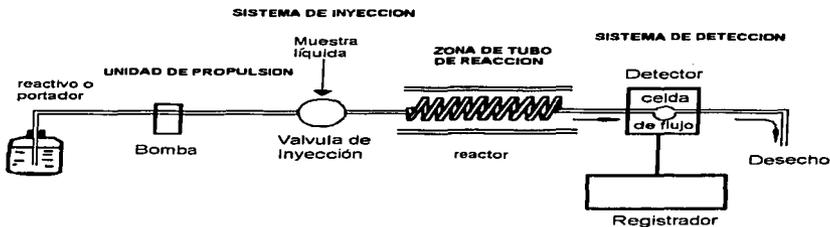


Figura 1. Esquema general de un sistema FIA

1.1.3 Diagrama

La representación esquemática de los registros FIA, cuya señal analítica (absorbancia, intensidad de fluorescencia, potencial, etc.) esta en función del tiempo, se llama diagrama. La figura 2 muestra una lectura típica de un análisis realizado por sus características esenciales;

- a) La altura del pico, h , que se relaciona con la concentración del componente de la muestra inyectada.
- b) El tiempo de residencia, T , que se define como el tiempo transcurrido desde la inyección hasta que se alcanza la máxima señal.
- c) Tiempo de arranque, t_a , es el tiempo que pasa desde la inyección hasta que se inicia el aumento de la señal desde la línea base.
- d) Tiempo de retorno, T' , es el tiempo comprendido entre el momento en que se alcanza la máxima señal y el instante en que la señal vuelve a la línea base.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- e) El tiempo en el que aparece la señal, Δt , se define como el período en el cual la señal se registra y vuelve de nuevo a la línea base.

Para que un diagrama quede definido, al menos de manera semicuantitativa, es preciso conocer el tiempo de arranque, t_a , las coordenadas del máximo de la curva, (T, h) y el tiempo que pasa la muestra por el detector Δt .

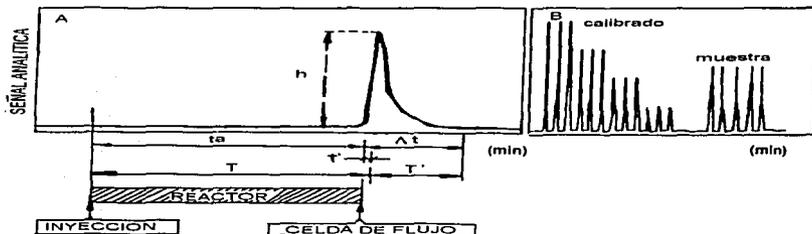


Figura 2. Señales analíticas (Diagrama). A) registro rápido, donde se presentan los parámetros más importantes de una señal de FIA. B) Inyección de cuatro estándares por triplicado y de una muestra por quintuplicado.

Los fundamentos de los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA están relacionados con la dispersión, que se define como la dilución que sufre un volumen de muestra inyectada en el flujo de un sistema determinado. Ésta se caracteriza por el perfil de concentración que adquiere el bolo de muestra inyectado al sistema sin interrumpir su flujo. El diagrama es una representación de la dispersión dentro de la celda del detector y por consiguiente podrá evaluarse mediante los parámetros que caracterizan la forma del pico en el diagrama. (1, 2, 3)

Desde el punto de vista analítico-práctico existen dos parámetros importantes del diagrama que conviene controlar en el sistema FIA: la altura (h) del pico y el tiempo de retorno a la línea base (T'), ya que son los que definen dos aspectos decisivos para el método analítico: la sensibilidad y la capacidad de muestreo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuanto mayor es la dispersión (mayor dilución) menor es la altura de los picos, lo que indica menor sensibilidad analítica y por lo tanto será mayor el tiempo de retorno indicando menor capacidad de muestreo.

La forma de los picos estará definido por el tipo de transporte que se presenta dentro del tubo, que incluyen difusión y convección. La forma del diagrama realizado bajo condiciones habituales no responde a una distribución gaussiana, debido a que el tiempo que debe transcurrir a la máxima respuesta debe de ser muy alto o utilizar caudales muy bajos. Por lo que la forma de la señal esta dado por el transporte de difusión-convección. Cuando el reactor es muy corto y/o el caudal muy grande (tiempos de residencia muy pequeños) el proceso esta regido por la convección y por el contrario cuando la longitud del reactor es muy grande y/o el caudal muy bajo (tiempo de residencia pequeño) el proceso esta regido por la difusión. A medida que crece el tiempo de residencia, la dispersión o dilución del bolo de muestra va incrementándose.

Otros factores que influyen dentro de la dispersión son: a) el volumen de muestra, cuando es muy grande existe una proporción del bolo que no ha sufrido dilución y en consecuencia se origina la aparición de un hombro en el pico del diagrama, b) el caudal, que al aumentar, el tiempo de arranque y el ancho de la banda de la señal disminuyen y por lo tanto la dispersión será menor, y c) la longitud del reactor, cuando tiene la forma de un serpentín, la fuerza centrífuga originada al circular un fluido por su interior, crea un tipo de flujo radial favoreciendo la homogeneización. Cuando se aumenta la longitud del reactor, se aumenta el tiempo de residencia y el ancho de la banda de la señal y por lo contrario cuando se disminuye el diámetro interno del tubo disminuye la dispersión.

La tendencia de las metodologías por Análisis por Inyección en Flujo es disminuir los pasos de pretratamiento de las muestras y miniaturizar las metodologías de forma automatizada para que los errores de manipulación sean menores y aumente la precisión de los resultados, ya que es posible llevar a cabo varias determinaciones de una misma muestra en un tiempo menor de análisis, esto conlleva a una disminución de reactivos y de desechos.

La versatilidad de aplicación de esta técnica, involucra el campo de análisis de alimentos, donde se ha determinado cloruros en leche y nitritos en agua (4), la

concentración de glucosa en diferentes alimentos como son helados, miel, jarabes de glucosa, jugos de frutas y vinos (5). En el campo de análisis clínicos se ha determinado glucosa en sangre y suero (6), así como en urea y penicilina (7).

1.2 Enzimas

1.2.1 Generalidades

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores, es decir, aceleran la velocidad con la que las reacciones se llevan a cabo sin alterar el equilibrio y son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos. Una de sus principales características es que son muy específicas, lo que es de gran importancia en la industria. La especificidad de las enzimas tiene la capacidad de discriminar entre diferentes sustratos, incluso si estos son isómeros ópticos, y solo los sustratos que tiene el grupo idéntico al de la enzima, serán reconocidos por ésta. Desde el punto de vista fisicoquímico y como consecuencia de su estructura proteica, la actividad catalítica de las enzimas depende del pH y de la temperatura de reacción (8).

Como todas las proteínas, la estructura tridimensional de las enzimas incluyen un grupo amino terminal y un grupo carboxilo terminal, los cuales al polimerizarse con otra molécula eliminan una molécula de agua, para formar un enlace CO-NH, que se conoce como enlace peptídico.

El centro activo de una enzima es la región que se une al sustrato y contiene los residuos que participan directamente en la producción y ruptura de enlaces.

A menudo el sitio activo es una hendidura de la enzima, en la que encajan las moléculas del sustrato, el cual tiene una alta especificidad en el enlace, ya que depende de la disposición definida por los átomos del centro activo. El modelo que se ha propuesto para esta unión es la relación de una llave y una cerradura, formando un cambio en la superficie de la enzima. Causando por ello un cambio conformacional en la molécula de la enzima. El modelo de ajuste inducido sugiere que el centro activo es flexible y por tanto capaz de acomodarse al sustrato según se aproxima,

mantiéndose exactamente en la posición espacial correcta para reaccionar de modo que se aumenta la concentración efectiva de sustrato en un espacio muy delimitado (9).

Las enzimas siendo consideradas como catalizadores biológicos, siguen las reglas generales de la catálisis. Sin embargo, presentan una característica que no se observa en los catalizadores no enzimáticos, este fenómeno se conoce como "saturación del sustrato". Cuando se tienen concentraciones pequeñas de sustrato se observa una variación lineal con la velocidad inicial de reacción, lo que implica una reacción de primer orden; sin embargo, a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial también crece hasta alcanzar un valor constante para cualquier valor de concentración de sustrato, bajo estas condiciones la reacción es de orden cero, es decir, depende solamente de la concentración de la enzima presente. El modelo de cinética enzimática más simple y mejor conocido es el de Michaelis-Menten desarrollado en 1913 que toma en cuenta el fenómeno de saturación del sustrato. La teoría de Michaelis-Menten se ha desarrollado para las reacciones en que existe un solo sustrato y supone la formación de un complejo enzima-sustrato que posteriormente da lugar al producto.

Dentro de la cinética enzimática es importante conocer el valor de K_m , que es la constante de Michaelis-Menten que equivale a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es la mitad de la velocidad máxima y también indica la afinidad que tiene la enzima por el sustrato, menor sea su valor, menor será la concentración de sustrato para la cual la enzima alcanza su valor máximo de velocidad (10).

Las enzimas pueden ser de origen:

- Vegetal; como son la papaina, bromelina, peroxidasa, etc
- Animal; como son la quimosina, tripsina, hidantoinasa, etc
- Microbiano; como son la glucosa isomerasa, glucosa oxidasa, lactasa, etc

Su clasificación se basa en la naturaleza de las reacciones químicas que catalizan. De acuerdo con el reporte del Comité de Nomenclatura nombrado por la Unión Internacional de Bioquímica (1984) se asignó a cada enzima un nombre y un número de 4 partes que caracteriza a cada enzima, por ejemplo, glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4.).

La Comisión de Enzimas (EC) dividió las enzimas en seis grupos. La tabla 1 muestra esta clasificación y el tipo de reacción que cataliza (11).

Tabla 1. Clasificación de las enzimas de acuerdo con el tipo de reacción.

CLASIFICACIÓN	TIPO DE REACCIÓN QUE CATALIZA
Oxidoreductasas	Reacciones de oxidación-reducción
Transferasas	Transferencia de grupos funcionales
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
Liasas	Eliminación de grupo para formar dobles enlaces
Isomerasas	Isomerización
Ligasas	Formación de enlace acoplada con la hidrólisis de ATP

1.2.2 Aplicación de las enzimas en la industria alimentaria.

Por razones fundamentalmente toxicológicas, las enzimas industriales son producidas por un número reducido de microorganismos, que son los reconocidos generalmente como seguros por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, de entre los que destacan *Bacillus subtilis* y *Aspergillus niger*.

La mayor parte de las enzimas en alimentos tienen el papel de aditivos, como por ejemplo disminuir la viscosidad, mejorar la filtración, evitar la turbidez, clarificar, mejorar la digestibilidad, mejorar la textura, evitar la cristalización y mejorar las características organolépticas del alimento, entre otras aplicaciones.

El uso de una enzima o del acoplamiento de dos o más de ellas pueden cuantificar más de treinta sustancias o el producto de las mismas y algunas son de gran importancia en el control de calidad de los alimentos, por ejemplo: el ácido ascórbico, láctico y cítrico, almidón, colesterol, lactosa, glucosa, fructosa por mencionar algunas (8). En el presente trabajo se utilizó la enzima glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), que esta clasificada dentro de las enzimas oxido-reductasas, por lo que la información se enfocara principalmente en ésta y en sus propiedades.

1.2.2.1 Propiedades de la enzima glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) (12)

Nombres sistemáticos: β -D-glucosa, oxígeno 1-oxidoreductasa, dextrosa.

Es específica para β -D-glucosa

Su origen es de *Aspergillus niger*

Peso molecular 149000 g/mol

Es estable en un intervalo de pH de 3.5 - 8.0 y pH óptimo de 5.6

Pierde actividad en $\text{pH} > 8$ y $\text{pH} < 2$

Pierde actividad a temperaturas mayores de 39 °C

Es inhibida por exceso de H_2O_2

Km de 0.0096 M (determinada con glucosa a 20 °C en presencia de catalasa y buffer de fosfatos 0.2 M a pH 5.6)

Es la enzima más utilizada como antioxidante para prevenir cambios en el color, aroma y sabor de los alimentos durante su procesado, transporte y almacenamiento. Se añade a bebidas basadas en cítricos, a la cerveza, vino, salsas y algunos alimentos secos, como son sopas instantáneas. Elimina la glucosa residual de los huevos y la clara batida, previniendo así las reacciones de pardiamiento (Reacción de Maillard) así como el desarrollo de sabores y olores desagradables.

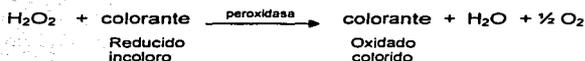
Además de las aplicaciones antes mencionadas también se utiliza en la determinación enzimática de glucosa, así como en la producción de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno a partir de glucosa, de acuerdo a la siguiente reacción 1:



Reacción 1. Oxidación de la glucosa por medio de la enzima glucosa oxidasa.

La reacción catalizada por la glucosa oxidasa emplea oxígeno molecular para oxidar a la D-(+)-glucosa, dando lugar a la producción de peróxido de hidrógeno. Un método establecido para determinar glucosa en alimentos tiene como principio la utilización de un colorante redox como es la o-Dianisidina y la enzima peroxidasa (EC 1.11.1.7.), donde la determinación es espectrofotométrica y se mide a 540 nm,

siguiendo la formación de un producto colorido, que es directamente proporcional a la concentración de glucosa presente en una muestra, reacción 2:



Reacción 2. Reducción del colorante, para cuantificar la cantidad de peróxido formado en la oxidación de la glucosa

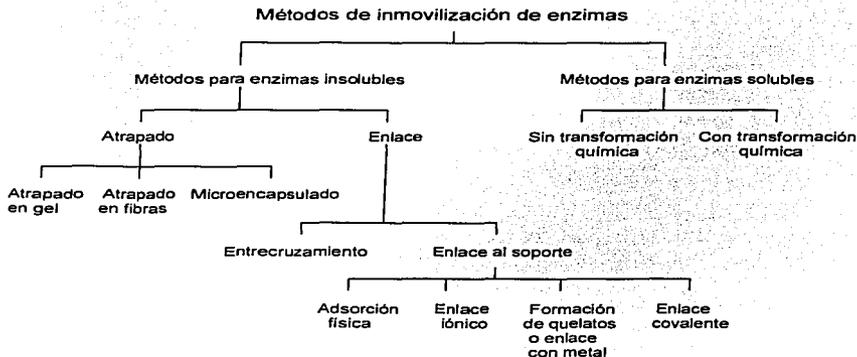
Aunque este método es muy específico para glucosa, no menciona los tratamientos previos que se realizarían a diferentes muestras, así como las posibles interferencias que presentaría. Cabe mencionar que el tiempo de reacción para las muestras es de 30 minutos (13).

1.3 Inmovilización de enzimas

1.3.1 Generalidades

El empleo de enzimas inmovilizadas ofrece a los investigadores en las diferentes áreas de estudio las ventajas de su reutilización y mayor estabilidad. La inmovilización de las enzimas es una técnica que alcanzó su máximo desarrollo durante los setentas. El objetivo de la técnica de inmovilizar enzimas, consiste en retener una enzima por medio de diversos mecanismos como son: atrapamiento en la matriz de un polímero, de un gel o de una microcápsula; adherirla a un soporte sólido ya sea por mecanismos de absorción, por intercambio iónico o bien por enlace covalente entre un soporte activado y algún grupo funcional de la enzima. En todos estos casos se pretende recuperar la enzima al final de la reacción para ser reutilizada posteriormente y, de ser posible, emplearla en un reactor de funcionamiento continuo. El costo de la enzima se ve considerablemente reducido, por lo que en ausencia de actividades contaminantes, representa una verdadera alternativa para la aplicación industrial de las enzimas.

1.3.2 Clasificación de los métodos de inmovilización



Métodos para enzimas insolubles

a) **Atrapado.** Se basa en la localización de la enzima dentro de una red espacial de matriz polimérica o de una membrana de forma que se evite la liberación de la proteína sin impedir la penetración del sustrato. Este método incluye:

- *Atrapado en geles.*- este método se basa en la localización de la enzima dentro de los espacios intersticiales de geles poliméricos entrecruzados insolubles en agua. El más usado es la poliacrilamida.
- *Atrapado en fibras.*- la enzima es atrapada dentro de las microcavidades de las fibras sintéticas, de forma que las moléculas de la enzima están atrapadas en fibras producidas continuamente mediante técnicas de hilado en húmedo. Las fibras sintéticas soportan los medios ácidos y básicos débiles, las fuerzas iónicas altas y algunos disolventes orgánicos. El más usado es el acetato de celulosa.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

- *Microencapsulado.*- Con siste en atrapar la enzima en membranas poliméricas semipermeables esféricas cuyos diámetros oscilan entre 1 y 100 micras. La enzima esta físicamente dentro de la membrana y las moléculas de producto y sustrato deben difundir a través de ésta libremente.

b) Enlace. Se basa en la adsorción de la enzima, esto es, la enzima es adherida a una superficie con actividad que implica la combinación de uniones iónicas, puentes de hidrogeno y de van der Waals, entre otras. Este método incluye:

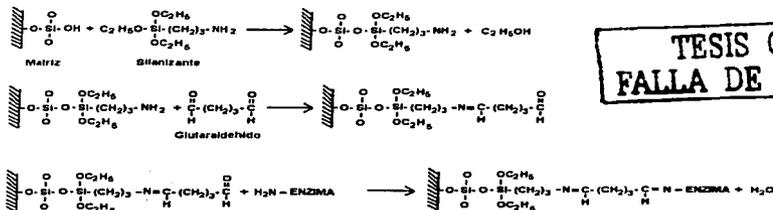
- *Entrecruzamiento.* Se basa en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de la enzima, mediante reactivos bi - o multifuncionales, que dan lugar a la formación de agregados tridimensionales entrecruzados totalmente, insolubles en agua pero que no necesitan el uso de soportes adicionales.

- *Enlace al soporte.* El soporte ideal para la aplicación dada es aquel que aumente la interacción con el sustrato, disminuya la inhibición por el producto, cambie el pH óptimo aparente hasta el valor deseado, detenga el crecimiento microbiano y sea fácilmente recuperable para volver a utilizarlo. En el caso que se emplee en un reactor, el soporte deberá ser estable en disolución y no deteriorarse en las condiciones de la reacción. Los factores que influyen en la unión con la enzima son diámetro del poro y la superficie. Los métodos se clasifican en:

- *Adsorción física.* Se basa en la adsorción física de las moléculas de la enzima en la superficie de una matriz sólida, poniendo en contacto una disolución acuosa de la enzima con el soporte. La enzima es adsorbida por polímeros orgánicos, vidrio, sales minerales, óxidos de metal y varios compuestos de silicio como bentonita y sílice coloidal.
- *Enlace iónico.* Se basa en la unión iónica de las moléculas de la enzima a soportes sólidos que contienen restos de interacciones electroestáticas, las cuales se adhieren a resinas intercambiadoras como son la carboximetil y la DEAE-Sephadex.
- *Enlace con metal.* Usa metales de transición como una forma de activar la superficie del soporte, permitiendo el acoplamiento directo de la enzima sin

transformación química previa del soporte a través de la formación de quelatos. Los mas utilizados son vidrio, quitina y celita (14).

- **Enlace covalente.** Existen dos maneras de ligar covalentemente una enzima a un soporte: una consiste en activar un polimero con un grupo reactivo y la otra, usar un reactivo bifuncional que actúe como puente entre enzima y polimero. En la molécula de la enzima, los grupos que más comúnmente intervienen en la unión son los oxidrilos y los amino, y menos frecuentes los sulfhidrilos. Entre las formas más comunes de polímero activado están los geles acuosos, como por ejemplo, la celulosa o la poli(acrilamida), a los que se ha incorporado grupos diazo, carbodimida y azida. Dentro de los reactivos bifuncionales, consiste en juntar en la misma mezcla polímero, enzima y reactivo, el más utilizado es el glutaraldehído, que se une a la enzima por medio del grupo amino terminal formando el enlace peptídico (15). Las principales reacciones que se llevan a cabo con este tipo de inmovilización se presentan en la figura 3.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Reacciones de la inmovilización de la enzima en vidrio de poro controlado.

Esta es la técnica que se emplea en este trabajo de investigación, debido a que el diámetro del poro es el apropiado para evitar presión en el tubo de teflón donde se empaqueta la enzima glucosa oxidasa inmovilizada, que se acopla al sistema de Análisis por Inyección en Flujo.

Métodos para enzimas solubles

Para poder utilizar una enzima en su estado nativo, es decir soluble, de forma continua durante mucho tiempo, se han diseñado métodos físicos de confinado que utilizan membranas semipermeables, fibras huecas o membranas de ultrafiltración. Estos métodos se dividen en:

- Inmovilización sin modificación química de la enzima. Se utiliza una membrana impermeable a las moléculas de la enzima, aunque permeable al producto y en algunos casos a las moléculas del sustrato. Este método se adapta a la conversión de sustratos de alto peso molecular insolubles o solubles en agua, permitiendo el contacto directo con la enzima soluble con el sustrato.
- Inmovilización con modificación química de la enzima. Son preparaciones de conjugados de enzima-polímero soluble en agua que permite la elección de la membranas de ultrafiltración de mayor porosidad con la consiguiente mayor velocidad de difusión de los productos y por lo tanto la reducción de la inhibición por el producto final. El más utilizado es la celulosa.

1.3.3 Efectos de la inmovilización sobre la actividad de la enzima

Cuando una enzima es inmovilizada la actividad de la preparación es diferente a la de la enzima en su forma natural. Las tres principales razones de esto son:

- Efectos conformacionales. La inmovilización puede causar perturbaciones estructurales en la proteína, reduciendo la eficiencia catalítica de la enzima. Además, la inmovilización puede limitar el acceso del reactivo al centro activo de la enzima, reduciendo su actividad.
- Efectos de partición. Cuando las concentraciones de reactivo o de otros compuestos relacionados con la actividad de la enzima pueden ser diferentes en la superficie del soporte de la matriz con respecto al resto de la disolución. Estos efectos pueden surgir por interacciones electroestáticas o hidrofóbicas.
- Efectos difusionales o de transferencia de masa. Pueden ser de dos tipos, internos o externos. La resistencia externa proviene de la presencia de una película de líquido inmóvil alrededor de la partícula de la enzima inmovilizada y la

resistencia interna a la transferencia de masa que surge cuando las enzimas quedan atrapadas en polímeros (16).

1.4 Biosensores y Sistemas Enzimáticos

1.4.1 Generalidades

Un Biosensor es la combinación de un material biológicamente activo de especificidad característica (por ejemplo enzimas, antibióticos, microorganismos o DNA) con un sensor químico o electrónico, para convertir un compuesto biológico en una señal eléctrica. Se han propuesto biosensores para medir desde los niveles de glucosa sanguíneos hasta la frescura del pescado.

El principio del biosensor se basa en inmovilizar una enzima muy cerca de un sensor que pueda medir una disminución en uno de los sustratos o un aumento en uno de los productos de la reacción catalizada por el biosensor. El sustrato monitorizable puede ser oxígeno y su producto, iones de amonio, hidrógeno, calor, luz o incluso directamente electrones. El sensor puede consistir en un simple electrodo de carbono o hasta una celda fotoeléctrica.

Muchos de estos biosensores ya han sido fabricados, siendo de los más sencillos el que sirve para cuantificar glucosa a base de glucosa oxidasa y un electrodo de oxígeno cuya principal aplicación es en el área de análisis clínicos (17). Este biosensor se basa en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en una capa de gel de poliacrilamida que rodea a un electrodo de oxígeno de platino. Cuando la disolución de glucosa se pone en contacto con el electrodo, la glucosa se difunde a través de la capa de enzima y se convierte en gluco lactona (en equilibrio con ácido glucónico) y peróxido de hidrógeno, haciendo disminuir la concentración de oxígeno en la capa de gel alrededor del electrodo. La velocidad de la reacción, que se registra como la velocidad a la que disminuye la concentración de oxígeno detectada por el electrodo, es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. Estos electrodos tienden a ser grandes y relativamente aparatosos, por lo que en los últimos años se han desarrollado biosensores en los que la enzima este ligada directamente al

electrodo, que sean menos voluminosos y que utilicen menos cantidad de muestra, pero con la misma sensibilidad, reproducibilidad y precisión en el análisis de la muestra.

Los sistemas biosensores en flujo se diferencian básicamente de los biosensores porque en ellos no existe ningún proceso que se integre con la detección sino que las etapas necesarias para adecuar las características de la muestra a las del detector donde se lleva a cabo la medida del analito, ocurren previamente en zonas más o menos alejados del punto de detección; es decir, en los sistemas biosensores las etapas de separación, reacción y detección tienen lugar secuencialmente en el espacio y en el tiempo. Por lo que los reactores enzimáticos acoplados a una configuración de flujo continuo forman un sistema biosensor. Las características de los sistemas biosensores en las que superan a los biosensores:

- a) posibilidad de llevar a cabo medidas simultáneas de muestra y blanco.
- b) capacidad para medir simultánea o secuencialmente varios analitos sin necesidad de utilizar instrumentos que permitan la multidetección.
- c) la versatilidad que ofrecen para llevar a cabo medidas cinéticas basadas en la velocidad de reacción.

1.4.2 Medida de la velocidad de reacción en configuraciones de flujo continuo.

El problema más importante que presentan los sistemas biosensores es la imposibilidad de desarrollar métodos basados en la velocidad de reacción. Puesto que la reacción progresa cuando él, o los sustratos, están en el reactor enzimático, la modalidad de flujo detenido no es apta en este caso. No obstante, la versatilidad de los sistemas de inyección en flujo, permite con una mínima manipulación, que el bolo inyectado pase secuencialmente por el reactor enzimático y por el reactor tantas veces como se requiera, de forma que se vayan obteniendo valores de señal analítica cada vez mas mayores. La forma más común de llevar a cabo los métodos cinéticos basados en la velocidad de reacción utilizando sistemas biosensores es el cambio interactivo del sentido del flujo y los sistemas abierto – cerrado. La inversión del sentido del flujo mediante programación del giro de la bomba peristáltica en uno y otro sentido permite el paso del bolo de muestra de forma interactiva por el reactor enzimático y por el detector tantas veces como se requiera. Por lo tanto, para determinar la cinética de una

reacción enzimática, es necesario detener el flujo del sistema y dejar que se llegue al equilibrio, lo que en un sistema de análisis en continuo no es recomendable hacer (18).

1.5 Glucosa en jugos de fruta

1.5.1 Generalidades

Los monosacáridos influyen en la dulzura de los alimentos y las bebidas, además de que representan una importante fuente de energía, forman parte de la estructura de las plantas así como una fuente de almacenamiento de los organismos.

En el caso de los jugos de frutas la importancia del análisis de los monosacáridos radica en conocer la composición de los mismos, esto debido a que el contenido de azúcares presentes en la fruta no es constante ya que dependen del tiempo de cosecha, factores ambientales, variedad y madurez de la fruta, por lo que es necesario tener patrones idénticos para lograr la homogeneidad del producto terminado. Esto es de importancia tanto para el productor de jugos, que busca la calidad de su producto, como para el consumidor, que busca valor nutricional y buen sabor en el producto que consume (19).

El proceso general para elaborar un jugo de fruta consiste en seleccionar la fruta, lavarla y extraer el jugo, exprimiéndola en molinos de martillos con hojas sin filo que dan la desintegración máxima de los tejidos y altos rendimientos de jugo (el equipo varía según el tipo de fruta). Después el jugo se filtra, en algunos casos se clarifica, se pasteuriza por el método rápido (72 °C por 15 seg) y se envasa en latas o en botellas y se sella (20).

En algunos casos los jugos se fortifican con ácido ascórbico, esto con el fin de reponer la cantidad que se pierde a lo largo del proceso de elaboración. Además es de gran interés para el consumidor en cuanto al ámbito nutricional en su dieta diaria.

En otros casos, algunas veces el SO₂ es usado como conservador para jugos de fruta porque es más efectivo contra las esporas de hongos y las bacterias. Aunque se presentan casos en los cuales el origen del SO₂ proviene del proceso de desinfección de utensilios y equipo, principalmente en pequeñas fabricas de jugos (21).

Dentro del análisis rutinario de los jugos de fruta se incluyen las determinaciones de sólidos totales, acidez, cenizas, alcalinidad de las cenizas, azúcares reductores, conservadores, pH, vitamina C y traza de metales, entre otros (22).

1.5.2 Clasificación de bebidas.

Por definición, según la norma correspondiente:

- Bebidas de... (sabores diferentes) Son aquellas elaboradas con un mínimo de 10 % y un máximo de 25 % de jugos o pulpas de frutas, verduras o legumbres y que cumplan con que además de agua potable contenga un máximo de un 2 % de alcohol etílico, edulcorantes, saboradores, dióxido de carbono y otros aditivos autorizados por la secretaria de salud (23).
- Refrescos de...(sabores diferentes) Son aquellos que contiene menos del 10 % y como mínimo 6% de jugos o pulpas de fruta, verduras o legumbres y que cumplan con que además de agua potable contenga un máximo de un 2 % de alcohol etílico, edulcorantes, saboradores, dióxido de carbono y otros aditivos autorizados por la secretaria de salud (23).
- Refrescos con sabor de...(diferentes frutas) es aquel que puede contener jugos o pulpas de fruta en cantidad menor al 6 % y que cumplan con que además de agua potable contenga un máximo de un 2 % de alcohol etílico, edulcorantes, saboradores, dióxido de carbono y otros aditivos autorizados por la secretaria de salud (23).
- Jugo de fruta: jugo sin fermentar pero fermentable destinado al consumo humano, obtenido por procedimiento mecánico a partir de frutas sanas y maduras, conservado por medios físicos exclusivamente. El jugo puede ser turbio o claro. El jugo puede haber sido concentrado y después reconstituido con agua para conservar los factores esenciales de composición y calidad del jugo. La adición de azúcares o ácidos puede permitirse (24).
- Néctar de fruta: producto no pulposo o pulposo sin fermentar pero fermentable, destinado al consumo directo, obtenido mezclando zumo de fruta y/o toda la parte comestible de frutas sanas y maduras concentrado y sin concentrar, con agua o con azucares o miel y conservado por medios físicos exclusivamente. Podrá permitirse la

adición de ácidos. El contenido de fruta y/o jugo de fruta en el producto no será normalmente inferior al 30 % (24).

- Refresco de vino (cooler): bebida derivada del vino compuesta de vino blanco, rosado, tinto y agua mineral o carbónica, con extractos o esencias naturales de frutos naturales de frutos y con adición o no de azúcares. El grado alcohólico del terminado debe estar comprendido entre 3 y 7 grados y podrá contener partículas de pulpa o corteza de frutos (25).

1.5.3 Métodos de análisis para glucosa en jugos de frutas.

La determinación precisa de la glucosa en los jugos de fruta y bebidas refrescantes va siendo cada vez más importante. Para analizarlos todavía se usan métodos que se basan en las el poder reductor de los monosacáridos (22). Estas propiedades reductoras cuantifican los monosacáridos por la medición de la reducción del Cu (II) al Cu (I). El reactivo de Fehling consiste en tartrato cúprico alcalino y se convierte en óxido cuproso insoluble al calentarse a ebullición con una solución del azúcar reductor, aunque la presencia de otros azúcares reductores desconocidos puede inducir a errores, por lo que se han ido introduciendo técnicas instrumentales más específicas para este análisis. De esta forma se han publicado resultados del contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en jugos de cítricos y otras frutas, observándose que la cantidad encontrada de estos azúcares en las frutas varía considerablemente entre los distintos cultivos (26).

El método oficial para el análisis de glucosa es el citado en el AOAC (27). Es un método polarimétrico, que se basa en el poder de refracción de la glucosa, no es muy confiable si se requiere un análisis muy específico en la muestra que se analiza.

De forma creciente, se han ido introduciendo técnicas instrumentales como la cromatografía de gases (19), la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) (28); técnicas analíticas como el infrarrojo (29), fluorimétricas (30) y colorimétricas acopladas con análisis enzimáticos (31, 32), particularmente para el control de calidad de las industrias dedicadas a la manufactura de alimentos que requieren análisis específicos y precisos para la cuantificación de glucosa. Considerando la especificidad que brindan las enzimas, cuando la glucosa oxidasa oxida a la glucosa, el peróxido de hidrógeno

formado puede cuantificarse por medio de la formación de compuestos coloridos o por medio de detectores selectivos para medir amperométricamente la cantidad de peróxido de hidrógeno formado (33).

Para analizar la glucosa por cromatografía de gases, primero es necesario preparar el derivado volátil del analito y posteriormente separar el gran número de anómeros formados, lo que puede requerir de gran tiempo para su elusión. Los monosacáridos pueden analizarse una vez reducidos y acetilados como acetatos de alditol. En la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) la detección de los carbohidratos está restringido a la medida de cambios inespecíficos del índice de refracción (26). En ambas técnicas el costo, de preparación de muestras y de análisis, es elevado por lo que se buscan otras alternativas de análisis que se ajusten a la economía de la empresa.

Un ejemplo de una publicación donde se menciona una determinación de glucosa por un método enzimático, es el realizado por Ukeda y colaboradores donde las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa son inmovilizadas por separado en una micro - lámina utilizando como soporte glutaraldehído (32). La determinación se basa en la formación de un complejo colorido cuando el peróxido de hidrógeno formado, por la oxidación de la glucosa por medio de la GO, oxida al ABTS, por medio de la enzima peroxidasa, el cual absorbe a 415 nm. La curva de calibración que reportan tiene un intervalo lineal de 0.1 –1.05 mM con un coeficiente de correlación de 0.999 y una desviación estándar de 2 %.

También se han realizado determinaciones en continuo adaptando al sistema FIA diferentes tipos de detectores y diferentes métodos de inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (34, 35, 36). Un artículo que muestra un ejemplo de esta adaptación es el citado por Dremel y colaboradores (37) que aplican el análisis de glucosa a vinos y jugos de frutas. La enzima glucosa oxidasa es inmovilizada en una lámina de carbón activado donde es adsorbida teniendo como soporte al glutaraldehído. El principio de la determinación se basa en una medición de fluorescencia la cual depende de la concentración de peróxido de hidrógeno, que se genera cuando se inyecta al sistema diferentes concentraciones de glucosa. Este método presentó un intervalo lineal de 0.1-500 mM de glucosa con una desviación estándar relativa de 2%. Sin embargo

menciona que a pesar de no existir interferencias en cuanto a sustancias reductoras como son los sulfitos y el ácido ascórbico, estas deben a la viscosidad de los jugos de frutas el cual es un factor que influye en las determinaciones, debido al alto contenido de pulpa dentro de las muestras que obstruyen los tubos por lo que es necesario realizar lavados entre el análisis de muestras y evitar se acumule en la placa.

1.6 Glucosa en vinos

1.6.1 Generalidades

En esencia, los vinos son el producto de la fermentación de los azúcares, del tipo de las hexosas (glucosa/fructosa) que se encuentran en el mosto de las uvas, mediante células de levaduras intactas para formar alcohol etílico y dióxido de carbono. Se clasifican según el país, la variedad de uva que se emplea, el color y el grado de dulzura. Las condiciones climáticas, así como la fecha en que se realice la vendimia, afectan gravemente el contenido de azúcares del grano de la uva, así como factores de variedad de uvas, forma de cultivo, riqueza de elementos en el suelo y madurez de la uva. La glucosa y la fructosa son los azúcares presentes en el mosto, de los cuales la primera es mas rápidamente fermentable que la segunda (38).

Dentro del análisis rutinario que se realiza a los vinos se menciona la determinación de fuerza alcohólica; acidez total, volátil y fija; cenizas; azúcares reductores; sulfitos, entre otros. El mosto se trata con sulfitos para inhibir la fermentación bacteriana y se agrega al vino blanco para evitar que se forme el color café por oxidación (22).

1.6.2 Métodos de análisis para glucosa en vinos.

El análisis de glucosa aplicado a los vinos es de importancia en el área de control de calidad, ya que se verifica la maduración de las uvas, el periodo de la vendimia y el proceso de producción del mosto, la fermentación del mismo y del vino terminado. Así como el mejoramiento de los procesos, y la certificación de exportación. Dentro de los análisis que se aplican al vino, se encuentran la determinación de glucosa y fructosa

que se utiliza para conocer la sequedad y fermentación del vino, esto es, el conocimiento de si todavía se tiene azúcar sin fermentar. Los vinos jóvenes dan frecuentemente la impresión de contener pequeñas cantidades de azúcar después de concluida la fermentación, solo el análisis químico permite dictaminar si el azúcar fermento o no por completo y el porcentaje en que esta permitido según la clase de vino (39).

El análisis común que se realiza es la determinación de azúcares reductores totales con el procedimiento de Fehling, el cual se encuentra establecido en la norma mexicana NMX-V-006-1983 (40), y también en la AOAC el método establecido, que al igual que los jugos de fruta, es una determinación polarimétrica, lo que también implica análisis poco preciso y poco confiable (27). De igual forma se han desarrollado métodos enzimáticos que, brindan especificidad en las determinaciones de glucosa (6, 37, 41).

Uno de los métodos enzimáticos más comunes es el método citado por el reglamento de la Comunidad Económica Europea (CEE) que permite determinar específicamente glucosa (42). La reacción se basa en que la glucosa con adenosin trifosfato (ATP) en presencia de hexocinasa (HK) produce glucosa - 6- fosfato. Con la adición de glucosa -6- fosfato deshidrogenasa (G - 6 - PDH) y en presencia de la forma oxidada de la nicotinamida adenin trinucleótido (NADP) se forma ácido glucónico - 6 - fosfato y NADPH, la cantidad de ésta es medida a una absorbancia de 340 nm y es un equivalente de la cantidad de glucosa originalmente presente en la muestra.

También se han realizado determinaciones en continuo utilizando una configuración FIA con un espectrofotómetro (43). El fundamento de la determinación se basa en la formación de un complejo colorido producido por la formación de cobre (I) con 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina. A este sistema se le incorporó una unidad de diálisis para eliminar las interferencias de color en las muestras de vino. Los resultados presentan dos intervalos lineales de concentración, esto para los diferentes tipos de vinos, así como una desviación estándar relativa de 2.1 % y frecuencia de muestreo de 14 - 18 muestras por hora.

La mayoría de los estudios realizados para determinar la concentración de glucosa en vinos, no reportan interferencias provocadas por los componentes del vino que incluyen sulfitos, taninos u otros azúcares. A lo largo de este trabajo se observará

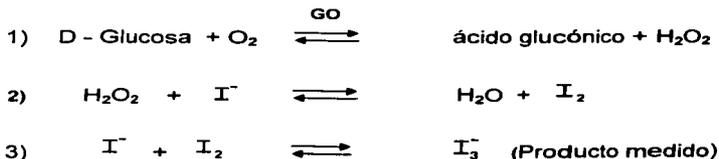
que la composición de los vinos es tan compleja que no fue posible aplicar la metodología propuesta para el análisis de vinos. Sin embargo, donde no se presentaron problemas es en el análisis de muestras de jugos de frutas y bebidas refrescantes, esto considerando que las muestras fueron tratadas con un agente oxidante para eliminar las interferencias provocadas por el ácido ascórbico en los jugos y de igual forma a los vinos por contener sulfuros que es un agente reductor similar al ácido ascórbico.

1.7 Fundamento de la reacción

El método enzimático propuesto para cuantificar glucosa se basa en el método de yodo para determinar peróxido de hidrógeno en disolución (44). El peróxido de hidrógeno reacciona con el ion yoduro para formar, en una rápida conversión, el ion triyoduro que es un compuesto colorido que se mide espectrofotométricamente.

En el sistema FIA, el peróxido de hidrógeno se forma de la oxidación de la glucosa por medio de la enzima inmovilizada glucosa oxidasa. Después, el peróxido de hidrógeno formado, reacciona con el ion yoduro que se oxida a yodo y que junto con el yoduro en exceso, forman el ion triyoduro que absorbe a una longitud de onda de 353 nm. La concentración de triyoduro formada es proporcional a la concentración de glucosa en las muestras.

La secuencia de las reacciones que se llevan a cabo dentro de la configuración de flujo continuo son:



Esta reacción se lleva a cabo a pH 6 y temperatura de 40 °C. Estas condiciones de trabajo son óptimas para la enzima inmovilizada

En el presente trabajo, se desarrolló una nueva metodología de análisis para cuantificar glucosa en jugos de fruta que se inició con la optimización de los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA, basándonos en la cuantificación de peróxido de hidrógeno para proseguir con la realización de una curva de calibración para glucosa. Se realizó el estudio de las interferencias en el análisis para jugos y vinos, y posteriormente se determinó glucosa en diferentes muestras de bebidas.

CAPITULO 2

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

- Acetato de sodio anhidrido de Química Dinámica
- Ácido acético glacial 99.9% de J.T.Baker
- Ácido ascórbico de Sigma
- Ácido cítrico anhidrido 99.6% de J.T.baker
- Ácido nítrico 65.9 % de J.T.Baker
- Ácido oxálico dihidratado 100.8% de J.T.Baker
- Ácido sulfúrico 98.2% de J.T.Baker
- Alcohol etílico 96° de Productos Mena
- 3 – aminopropiltrióxido – silano 99 % de Aldrich
- Dextrosa anhidra de J.T.Baker
- Enzima glucosa oxidasa (GO) de *Aspergillus niger* (actividad 6000 unidades/g sólido) de Sigma
- Fosfato dibásico de sodio 100.17% de Mallinckrodt
- Fosfato monobásico de potasio 99.5% de Mallinckrodt
- Glutaraldehído grado II 25 % de Sigma
- Molibdato de amonio tetrahidratado 81.4% de Sigma
- Permanganato de potasio de J.T.Baker
- Peróxido de hidrógeno 30% de Mallinckrodt
- Vidrio de poro controlado (CP 240 – 200, malla 120 – 200, diámetro de poro 242 Å) de Sigma
- Yodato de potasio 99.9% de J.T.Baker
- Yoduro de potasio granular 99.8 % de J.T.Baker

2.2 Instrumentos y Aparatos

- Balanza analítica, precisión ± 0.1 mg, Ohaus, USA
- Bomba peristáltica con cabezal de 4 canales, Minipuls 3, Gilson, Francia
- Celda de flujo de cuarzo con 18 μL de volumen interno, Hellma
- Espectrofotómetro UV-VIS, CARY 1, Varian, Australia
- Mangueras de bomba de tygon, Technicon C, Francia
- Parrilla eléctrica con control de temperatura y agitador, Thermolyne, nuova II, modelo SP18425, USA
- pH metro, Orion, Modelo 35617-02, Singapore
- Tubo de teflón de 0.5 mm de diámetro interno
- Ultrasonido, Bransonic, Modelo 251 OR-MY, USA
- Válvula de inyección de baja presión, Rheodyne, Francia

2.3 Disoluciones

Disolución de ácido nítrico 5%

Se tomó una alícuota de 5 mL de ácido nítrico y se deslizó por las paredes del cuello de un matraz volumétrico de 100 mL que contenía aproximadamente 50 mL de agua destilada. Se llevó a la marca con agua destilada.

Disolución amortiguadora de acetatos 0.05 M pH 5

Se pesaron 0.1325 g de acetato de sodio, se disolvieron en aproximadamente 50 mL de agua destilada, se introdujo el electrodo combinado de vidrio para la medición de pH dentro de esta disolución y se agregó continuamente una disolución de ácido acético al 1% (1 mL de ácido acético en 100 mL de agua destilada) hasta alcanzar el valor de pH 5. Una vez alcanzado este valor, el volumen se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la marca con agua destilada.

Disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.5, pH 7 y pH 6

Se pesaron aproximadamente 3.4028 g por triplicado de fosfato monobásico de potasio y se disolvieron en un volumen de aproximadamente 50 mL de agua destilada. Para cada disolución, por separado, se introdujo el electrodo combinado de vidrio para la medición de pH y se adicionó continuamente una disolución 0.1 M de fosfato dibásico de sodio (aproximadamente 6.7 g en 250 mL de agua destilada) hasta alcanzar el pH deseado. Cada disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 250 mL y llevo a la marca a cada disolución con agua destilada. Todas las disoluciones se conservaron en refrigeración hasta su utilización.

Disolución del portador (disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6, yoduro de potasio 0.05 M y molibdato de amonio 0.005%)

Se pesaron aprox. 0.8306 g de yoduro de potasio y aprox. 0.0056 g de molibdato de amonio y se disolvieron en 150 mL de una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 6. Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 250 mL y se llevó a la marca con la disolución amortiguadora. La disolución se conservó en refrigeración.

Disolución de ácido sulfúrico 9 N

Se midieron aproximadamente 57 mL de ácido sulfúrico concentrado y trabajando en campana de extracción, se adicionó gradualmente el ácido por las paredes del vaso de precipitados, colocando en un baño de hielo, que contenía 100 mL de agua destilada. Después se transfirió a un matraz volumétrico de 250 mL y se llevó a la marca con agua destilada.

Disolución de permanganato de potasio 0.1 M

Se pesaron 0.6326 g de permanganato de potasio y se disolvieron en un volumen de 400 mL.

Disolución de yodato de potasio 0.283 mM

Se pesaron 0.0157 g de yodato de potasio y se disolvieron en 250 mL con agua destilada en un matraz volumétrico.

Disolución madre de peróxido de hidrógeno

Se tomo 1 mL de una disolución de H_2O_2 al 30 % y se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la marca con agua destilada.

Estándares para la curva de calibración de H_2O_2

En matraces volumétricos de 250 mL y de 100 mL se colocó una alícuota de 1 mL de la solución madre de H_2O_2 normalizada, para obtener disoluciones patrón de 0.4 mM y 1 mM, respectivamente. Se tomó una alícuota de 1 mL de la concentración de 0.4 mM y se realizaron diluciones en volúmenes de 10 mL, 50 mL y 100 mL, para obtener las disoluciones estándar de 0.04 mM, 0.008 mM y 0.004 mM, respectivamente. A partir de la concentración 1 mM se realizaron diluciones de 0.1 mM y 0.01 mM, tomando una alícuota de 1 mL y diluyendo a 10 mL y 100 mL, respectivamente.

Disolución madre de glucosa

Se pesaron aproximadamente 0.2 g de glucosa y se llevó a la marca en un matraz volumétrico de 100 mL con agua destilada, para obtener una concentración de 11.11 mM de glucosa.

Estándares para la curva de calibración de glucosa

De la disolución madre de glucosa se tomó una alícuota de 25 mL y se diluyó en 50 mL para tener una dilución patrón de 5.55 mM. De ésta se tomaron alícuotas de 2 mL, 4 mL, 2 mL, 1 mL, 2 mL, 15 mL, 5 mL y 15 mL y se llevó a la marca de aforo en los volúmenes de 250 mL, 250 mL, 100 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 25 mL y 25 mL, para tener concentraciones de glucosa en un intervalo de 0.038 mM a 6.66 mM.

Es importante mencionar que las curvas de calibración, tanto para el peróxido de hidrógeno como para la glucosa se realizaron en concentración de mM, con el fin de poder compararlas y determinar cuantas milimoles de glucosa se transforman a peróxido de hidrógeno a lo largo del sistema FIA.

Para el análisis de las muestras se empleó las unidades de concentración de miligramo por litro (mg/L), realizando la conversión correspondiente, debido a que la concentración de glucosa en las etiquetas se reporta en g/ 100 g de muestra.

2.3.1 Normalización de disoluciones

- Normalización de la disolución de permanganato de potasio

Se pesó 0.1103 g de ácido oxálico dihidratado y se colocó en un matraz erlenmeyer de 250 mL, se agregó 85 mL de agua destilada y 25 mL de ácido sulfúrico 9 N. Esta mezcla se calentó y al momento en que se inició la ebullición se efectuó la titulación agregando el permanganato hasta el momento que ocurrió el vire de la disolución de incoloro a rosa pálido. La titulación se realizó por triplicado.

- Normalización de la disolución madre de peróxido de hidrógeno

En un matraz erlenmeyer se colocó 10 mL de la disolución de peróxido de hidrógeno, 25 mL de ácido sulfúrico 9 N y 75 mL de agua destilada. La mezcla se tituló con la disolución normalizada de permanganato de potasio hasta el vire de la disolución de incoloro a rosa pálido. La titulación se realizó por triplicado.

2.4 Inmovilización de la enzima (15)

1) Limpieza del vidrio

Se pesó 2.0012 gramos de vidrio de poro controlado, se adicionó 50 mL de HNO_3 al 5 % y se calentó a ebullición en parrilla eléctrica por 30 min. Transcurrido este tiempo se filtró sobre placa porosa, se lavó con agua destilada y se secó a 95 °C.

2) Activación del vidrio

a) Silanización

Se tomaron 5 mL de 3-aminopropiltriethoxi-silano al 99 % y se añadieron a 45 mL de la disolución amortiguadora de acetatos 0.05 M y pH 5. Esta disolución se añadió al vidrio seco y se calentó en parrilla eléctrica con agitación a 90 °C por 2 horas.

Después el vidrio se filtró sobre placa porosa, se lavó con agua destilada y se secó a 95 °C. El vidrio silanizado seco se guardó protegido de la luz, hasta su utilización.

b) Acoplamiento con glutaraldehído

Se tomaron 25 mL de glutaraldehído grado II 25% y se le añadió 50 mL de la disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 8.5. De esta disolución se tomaron 15 mL y se agregaron al vidrio silanizado y se mantuvo en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó con agua destilada y se filtró.

3) Inmovilización de la enzima

Se pesó 0.5070 gramos del vidrio preparado y se le añadió 6 mL de la disolución amortiguadora de fosfatos (0.1 M y pH 7), se mezcló con 0.2494 gramos de enzima glucosa oxidasa y se colocó en baño de hielo con agitación eventual por dos días. Se filtró y se lavó con agua destilada. Se almacenó a 4°C en disolución amortiguadora de fosfatos pH 7 hasta su uso.

2.5 Preparación del reactor enzimático

A un tubo de teflón de aproximadamente 2 mm de diámetro interno y 3 cm de longitud, se le colocó un pedazo de algodón en uno de los extremos para evitar la salida de la enzima. Con una pipeta pasteur se tomó una alícuota de la enzima inmovilizada (aproximadamente 0.0173 g) y por medio de una jeringa colocada en el extremo del tubo donde estaba el algodón, se aspiró la alícuota de la enzima y se hizo pasar a lo largo del tubo de teflón. La figura 4 representa el esquema del reactor enzimático que se adaptó al sistema FIA.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Reactor enzimático. Enzima inmovilizada empacada en un tubo de teflón

2.6 Configuración de flujo continuo para cuantificar glucosa

La figura 5 muestra la configuración FIA utilizada para cuantificar glucosa.

Al sistema FIA se inyectan 95 μL de una muestra que contiene glucosa, dentro de la disolución portadora que tiene un caudal de 0.36 mL/min. La mezcla pasa a lo largo del reactor enzimático, mantenido a temperatura constante de 40 $^{\circ}\text{C}$, donde la glucosa se oxida por medio del oxígeno formando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, que al reaccionar con el ion yoduro, presente en el portador, forma el ion triyoduro a lo largo del reactor R (200 cm) para llegar al detector donde se determina a 353 nm. Las señales analíticas obtenidas forman una señal transiente con un máximo (altura del pico) que es proporcional a la concentración del ion triyoduro y por lo tanto a la concentración de glucosa presente en la muestra.

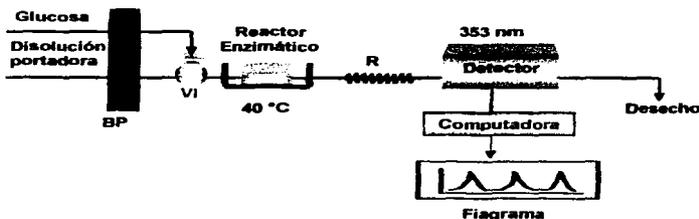


Figura 5. Configuración FIA utilizada para la cuantificación de glucosa. Donde BP es la bomba peristáltica, VI es la válvula de inyección, R es el reactor y el Detector es un espectrofotómetro UV-VIS.

Esta misma configuración, sin el reactor enzimático, se utilizó para cuantificar el peróxido de hidrógeno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.7 Preparación de muestras

Las muestras analizadas fueron vinos, refrescos y jugos de fruta. La preparación para cada muestra fue la siguiente:

Vinos. Se prepararon 3 disoluciones para cada muestra. En cada matraz volumétrico de 100 mL se colocaron aproximadamente 20 mL de la disolución amortiguadora de fosfatos pH 6, se adicionó 1 mL de la muestra, 5 mL de la disolución de yodato de potasio 0.2 M y se homogeneizó. Posteriormente a dos de ellas se les fortificó con 100 mg/L y 250 mg/L de glucosa. Se llevaron a la marca con disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.

Bebidas refrescantes alcohólicas y no alcohólicas. Las muestras se desgasificaron antes de ser analizadas colocándolas en un baño de ultrasonido por 10 min. Después se prepararon 3 disoluciones para cada muestra colocando en un matraz volumétrico de 100 mL aproximadamente 20 mL de la disolución amortiguadora de fosfatos pH 6, adicionando 1 mL de muestra, 5 mL de la disolución de yodato de potasio 0.2 M y se homogeneizó. Posteriormente a dos de ellas se les fortificó con 100 mg/L y 250 mg/L de glucosa. Se llevaron a la marca con disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.

Jugos de frutas. Se pesó 1 mL de cada muestra antes del análisis. Después se prepararon 3 disoluciones para cada muestra. En cada matraz volumétrico de 100 mL se colocó aproximadamente 20 mL de la disolución amortiguadora de fosfatos pH 6, se adicionó 1 mL de muestra, 5 mL de la disolución de yodato de potasio 0.2 M y se homogeneizó. Posteriormente a dos de ellas se les fortificó con 100 mg/L y 250 mg/L de glucosa. Se llevaron a la marca con disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.

Todas las disoluciones se dejaron reposar por 15 minutos, antes de ser inyectadas al sistema FIA.

Las muestras se ajustan a la marca de aforo con la disolución amortiguadora de fosfatos pH 6 para mantener el pH de la disolución ligeramente ácido, y así favorecer la reacción de reducción del ácido ascórbico presente en las muestras y garantizar la formación del ion yoduro que forma parte del portador.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Estudio del espectro de absorción del producto de la reacción

Una vez inmovilizada la enzima, de acuerdo a la metodología ya descrita, se tomó de esta suspensión una alícuota de aproximadamente 1 mL y se colocó en una mezcla formada por 10 mL de disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5, 2 mL de yoduro de potasio 0.1 M y 2 mL de una disolución de glucosa. La mezcla se mantuvo en agitación a 35 °C. Las condiciones de pH y temperatura se establecieron a partir de las condiciones óptimas de la enzima que se mencionan en la bibliografía (12). Después de unos minutos se observó una coloración amarillenta, se tomó una muestra de este producto, se colocó en una celda de cuarzo y se midió el espectro de absorción en un espectrofotómetro UV-VIS. En la figura 6 se muestra el espectro de absorción del producto formado y los espectros de absorción de las disoluciones de glucosa y disolución amortiguadora de acetatos.

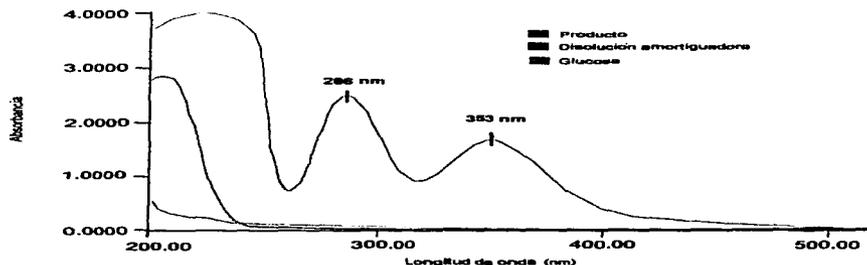


Figura 6. Espectros de absorción del producto de la reacción, de la disolución de glucosa y de la disolución amortiguadora.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El producto de la reacción es el ion triyoduro, que presenta dos máximos de absorción, a 286 nm y a 353 nm. Estos resultados indican que efectivamente se lleva a cabo la reacción de oxidación de la glucosa para dar como producto peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con el ion yoduro y así formar el triyoduro que es un compuesto colorido. Se escogió la longitud de onda de 286 nm, debido a que es la que presenta un máximo de absorción de mayor respuesta en comparación con el de 353 nm, para establecer los parámetros hidrodinámicos para la cuantificación de glucosa. El otro máximo de absorción se utilizó como una alternativa dentro del análisis de muestras que presentaron interferencias a 286 nm.

3.2 Optimización de los parámetros FIA para formar el ion triyoduro a partir de H₂O₂

Para poder establecer los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA se utilizó una disolución de peróxido de hidrógeno, para comprobar que se puede cuantificar el peróxido de hidrógeno en una muestra con la reacción de formación del ion triyoduro. La determinación consistió en inyectar a un sistema FIA, configuración mostrada en la figura 7, una disolución patrón de peróxido de hidrógeno 0.0008 M dentro de un portador de disolución amortiguadora de acetatos pH 5. Esta mezcla reacciona posteriormente con yoduro de potasio 0.1 M a lo largo del reactor R donde se oxida para formar el yodo. El yodo formado, con el exceso de yoduro forma el triyoduro que se determinó a 286 nm al pasar por el detector. Se obtiene una señal transiente, cuyo máximo de absorción es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno.

Se realizó un estudio de los parámetros hidrodinámicos del sistema. Las condiciones iniciales de análisis que se utilizaron fueron, un caudal de 0.7 mL/min, para no tener un flujo muy alto que ejerciera presión en el sistema y ni muy bajo para que el análisis no fuese lento, un volumen de inyección de 150 μ L, considerando volúmenes pequeños y longitud del reactor de 100 cm., considerando la concentración del reactivo. Y a partir de las señales obtenidas se eligió el intervalo estudiado para la optimización de cada uno de estos parámetros hidrodinámicos del sistema FIA.

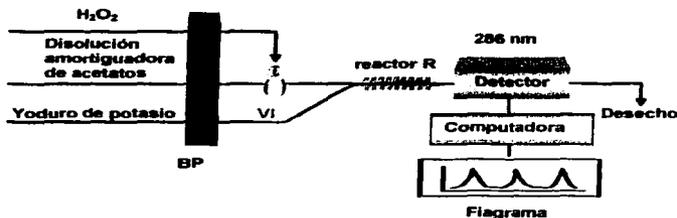


Figura 7. Configuración propuesta para la optimización de los parámetros FIA para formar el ion triyoduro a partir de H_2O_2 . Donde BP, bomba peristáltica; VI, válvula de inyección.

El criterio de selección de los valores óptimos se estableció como un compromiso entre la forma del pico, la altura de éste y el tiempo de análisis. En la tabla 2 se muestran los intervalos estudiados. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada parámetro.

Tabla 2. Intervalos estudiados y condiciones óptimas de los parámetros hidrodinámicos de la configuración FIA para determinar H_2O_2 .

Parámetros Hidrodinámicos	Intervalo estudiado	Valor óptimo
Longitud del reactor (cm)	30 – 200	100
Caudal (mL/min)	0.3 – 1	0.36
Volumen de inyección (μ L)	50 – 250	95

La figura 8 muestra una representación de las señales obtenidas, 1) muestra la señal obtenida con las condiciones iniciales y 2) la señal obtenida una vez optimizado el sistema.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

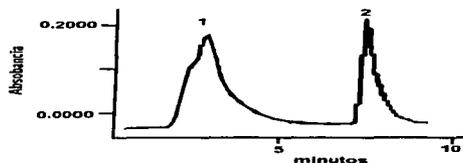


Figura 8 . Representación de las señales obtenidas en la optimización de los parámetros hidrodinámicos para determinar peróxido de hidrógeno. 1) condiciones iniciales (caudal: 0.7 mL/min, volumen de inyección: 150 μ L, reactor: 100 cm) y 2) condiciones óptimas (caudal: 0.36 mL/min, volumen de inyección: 95 μ L, reactor: 100 cm)

Con los parámetros hidrodinámicos optimizados se realizó una primera curva de calibración, con disoluciones sin valorar, a 286 nm. En la figura 9 se muestra el diagrama obtenido y la figura 10 muestra su representación grafica.

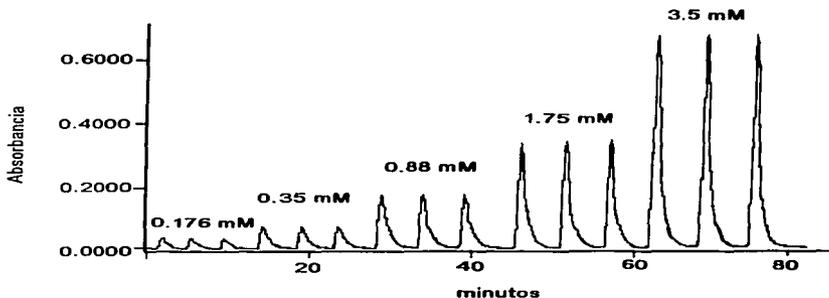


Figura 9. Diagrama de la curva de calibración. Inyección por triplicado de diferentes disoluciones de H_2O_2 . Longitud de onda: 286 nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

H ₂ O ₂ (mM)	Absorbancia
0.176	0.0359
0.35	0.0737
0.88	0.1794
1.75	0.3538
3.5	0.6929

$$y = 0.1972 X + 0.0045$$

$$r = 0.999$$



Figura 10. Curva de calibración para H₂O₂. Intervalo lineal 0.176 mM - 3.5 mM.

Estas pruebas confirman la existencia de la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el yoduro, lo que nos indica que la reacción es cuantificable.

3.3 Optimización de los parámetros FIA para la cuantificación enzimática de glucosa

Después de establecer los parámetros hidrodinámicos para la cuantificación de H₂O₂, se prosiguió a adaptar el reactor enzimático a la configuración FIA (figura 7) para la cuantificación de glucosa. El reactor enzimático se conecta después de la válvula de inyección, de esta forma al inyectar una muestra que contenga glucosa la oxidación de ésta se lleva a cabo a lo largo del reactor enzimático formando el peróxido de hidrógeno que reacciona con el ion yoduro a lo largo del reactor R formando el ion triyoduro que se determina en el detector UV-VIS.

Los primeros resultados mostraron picos negativos (absorbancias por debajo de la línea base), lo que indicaba que no existía reacción de oxidación entre la glucosa y la enzima glucosa oxidasa o la dilución era mayor que la cantidad oxidada de glucosa. Por lo tanto, fue necesario adaptar un baño con temperatura controlada a la enzima y

optimizar la temperatura de reacción. El efecto de este parámetro fisicoquímico se muestran en la figura 11 y se observa que la absorbancia aumentaba gradualmente conforme se aumentaba la temperatura del reactor enzimático, hasta alcanzar la temperatura a la cual se presenta mayor absorbancia, lo que indica que esta temperatura es la óptima para la reacción. La temperatura de reacción reportada en la bibliografía es de 35 °C y a temperaturas mayores de 39 °C se presentaba inactivación de la enzima. La temperatura óptima encontrada para la enzima inmovilizada es de 40 °C, esto es lógico considerando que la enzima esta empacada en un tubo de teflón y la transferencia de calor del medio al interior proporciona la temperatura adecuada.

Temperatura (°C)	Absorbancia
20	0.0055
25	0.0067
30	0.0142
35	0.0166
40	0.0198

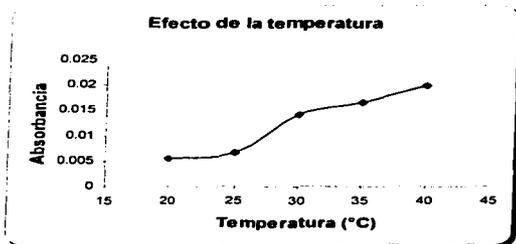


Figura 11. Efecto de la temperatura en el reactor enzimático.

Así mismo se realizó el análisis para determinar el pH óptimo para la enzima inmovilizada. Los resultados se muestran en la figura 12, donde se observa que existe una disminución en la absorbancia desde pH 4 hasta pH 5.65, este comportamiento indicó que la reacción no se estaba llevando a cabo entre la enzima y la glucosa, lo que provocaba que el bolo de muestra se diluyera y presentara una disminución en la absorbancia. El pH óptimo para la reacción de la enzima inmovilizada lo da una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 6.

pH	Absorbancia
4.0	0.0453
5.0	0.0215
5.65	0.0152
6.0	0.1138
6.5	0.0997
7.0	0.0911

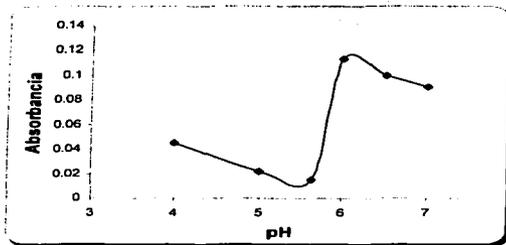


Figura 12. Efecto del pH en el reactor enzimático.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de actividad para la enzima se simplificó la configuración inicial (figura 7) modificando de dos caudales a uno solo, esto es, unir la disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6 con la disolución de yoduro de potasio 0.1 M para disminuir la dilución de la muestra y aumentar la respuesta de las señales analíticas.

Los primeros resultados mostraron que los picos no eran uniformes porque presentaban, durante el descenso a la línea base, una serie de "hombros" lo que indicaba que había una saturación de los reactivos de la reacción, por lo que se realizó una optimización de la concentración de yoduro de potasio encontrándose que la concentración debía disminuirse a la mitad, es decir, la concentración final utilizada fue de 0.05 M.

Se verificó el tiempo de reacción a lo largo del reactor R estudiando un intervalo entre 100 y 200 cm de longitud. Se observó que con un reactor de 200 cm se lograban señales con mayor absorbancia lo que indicaba que se estaba favoreciendo la homogeneización del bolo de muestra. Con estas condiciones se prosiguió a realizar la curva de calibración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.4 Elaboración de la curva de calibración para glucosa

Para verificar que no existen interferencias entre la glucosa y los reactivos del portador se realizó un análisis con una concentración de glucosa de 5.55 mM sin el reactor enzimático (1) y con el reactor enzimático (2), en la configuración FIA. Los resultados se muestran en la figura 13, donde 1) se observa que no existe reacción entre la glucosa y los reactivos del portador siendo la señal igual al blanco y 2) se observa que la absorbancia aumenta lo que indica que se lleva a cabo la oxidación de la glucosa.

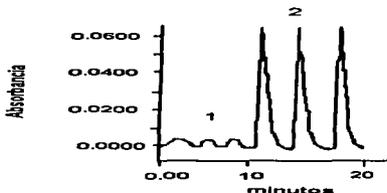


Figura 13. Diferencia entre las señales obtenidas en el análisis de glucosa con concentración de 5.55 mM. 1) sin el reactor enzimático y 2) con reactor enzimático en la configuración FIA.

Una vez optimizados todos los parámetros y confirmando que la reacción se lleva a cabo por medio de la enzima, se prosiguió a realizar una curva de calibración de glucosa. A partir de la disolución madre de 5.55 mM, se realizaron las diluciones correspondientes para tener un intervalo de concentraciones de 0.55 mM a 5.55 mM. Cada concentración de glucosa se inyectó al sistema FIA por triplicado, los resultados se muestran en la figura 14. La representación gráfica se muestra en la figura 15.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

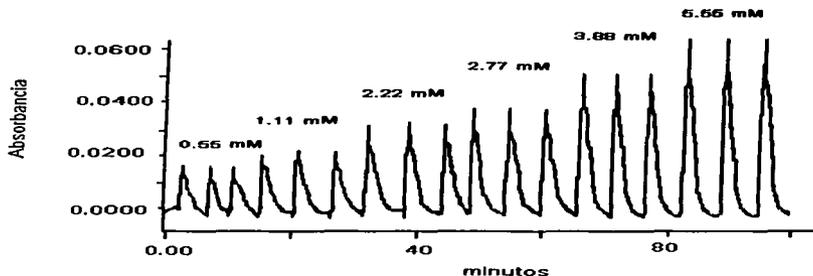


Figura 14. Diagrama de la curva de calibración. Inyección por triplicado de diferentes disoluciones estándar de glucosa. Longitud de onda: 286 nm.

Glucosa (mM)	Absorbancia
0.55	0.0142
1.11	0.0191
2.22	0.0292
2.77	0.0335
3.88	0.0471
5.55	0.0642

$$y = 0.0101x + 0.0075$$

$$r = 0.998$$

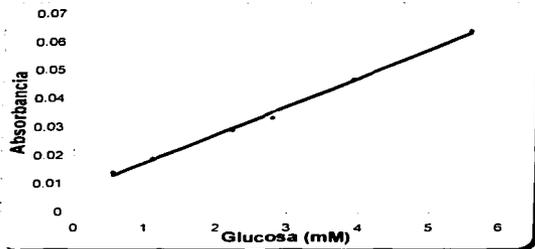


Figura 15. Curva de calibración de glucosa. Intervalo lineal de 0.55 mM – 5.55 mM

Con los valores de la curva de calibración se hizo el análisis de una muestra de vino. Primero se realizó un espectro de absorción de un vino blanco diluido 1:100 para determinar si dentro de los componentes del vino se encontraba alguno que presentara

respuesta en la misma longitud de onda donde se realiza la determinación y causara interferencias en el análisis. El resultado obtenido se muestra en la figura 16.

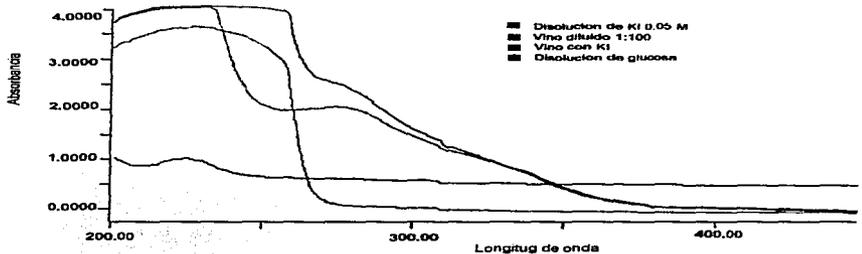


Figura 16. Espectros de absorción de los reactivos, de la glucosa y de una muestra de vino blanco.

Como se observa en los espectros de absorción, el vino presenta un máximo de absorción dentro del intervalo de 250 - 300 nm, la mezcla del vino con yoduro presenta un aumento en la absorbancia dentro del mismo intervalo. Estos resultados indican que existe interferencia para realizar la determinación en la longitud de onda de trabajo (286 nm), por lo que se cambió a la otra longitud de onda de medición, 353 nm. Sin embargo, se observó que los valores de absorbancia (de la curva de calibración) eran bajos y en consecuencia, cuando se analizaran concentraciones bajas de glucosa a 353 nm no se tendrían resultados confiables porque su sensibilidad sería baja, debido a que la absorptividad a 353 nm es menor que a 256 nm (fig. 6). Para aumentar las señales analíticas se adicionó molibdato de amonio a la disolución portadora (45), este funciona como catalizador en la formación del ion triyoduro en presencia de H_2O_2 en disolución, por lo que es posible cuantificar glucosa en concentraciones bajas de glucosa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se realizó la curva de calibración para glucosa con la adición de molibdato de amonio a 353 nm. La disolución final del portador tuvo una concentración de 0.005% de molibdato de amonio, a concentraciones mayores de éste se obtenían los mismos resultados. Los resultados de las pruebas mostraron que las señales presentaban mayor absorbancia y por consiguiente mayor sensibilidad por aumento del valor de la pendiente en comparación con la curva de calibración determinada a 286 nm (figura 14) para 286 nm se tiene una pendiente de 0.0101 y a 353 nm se tiene una pendiente de 0.0573, 5 veces mayor. El diagrama muestra en la figura 17 y su representación gráfica se muestra en la figura 18.

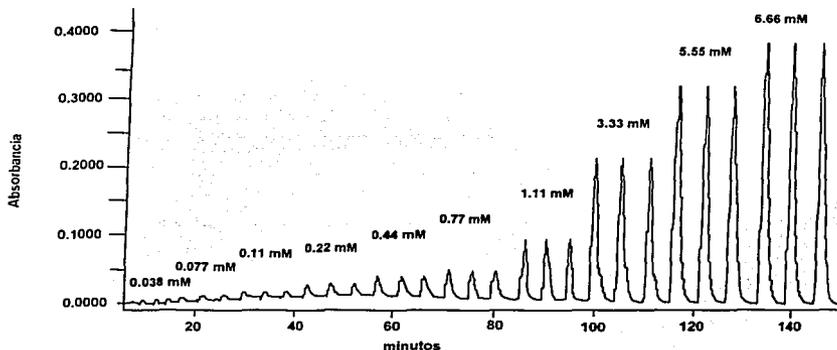


Figura 17. Diagrama obtenido para la curva de calibración de glucosa. Inyección por triplicado de diferentes concentraciones de glucosa, utilizando molibdato de amonio como catalizador. Longitud de onda de 353 nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mM glucosa	Absorbancia
0.038	0.0086
0.077	0.0098
0.111	0.0128
0.222	0.0224
0.444	0.0285
0.777	0.0484
1.111	0.0695
3.333	0.206
5.555	0.3287
6.666	0.3812

$$y = 0.0573x + 0.0065$$

$$r = 0.999$$

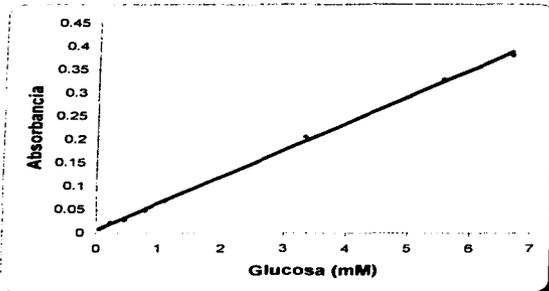


Figura 18. Curva de calibración para cuantificar glucosa. Intervalo lineal de 0.038 mM a 6.666 mM.

En este sistema se realizan 12 determinaciones por hora, que equivale al análisis de 4 muestras por triplicado en una hora.

3.5 Límite de detección, límite de cuantificación y precisión del método propuesto para cuantificar glucosa

Se realizó el estudio del límite de detección, límite de cuantificación y la precisión del método, de acuerdo a lo establecido por J. C. Miller (46)

a) Límite de detección y límite de cuantificación

El análisis se realizó inyectando al sistema, bajo las condiciones óptimas, un blanco de agua destilada, que es el medio donde esta disuelta la glucosa.

Resultados de 7 inyecciones al sistema FIA.

$$\bar{X} = 0.00148 \text{ mM}$$

$$S = 0.00405$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Donde \bar{X} es el promedio y S es la desviación estándar de las determinaciones.

$$\text{Limite de Detección} = \bar{X} + 3 S = 0.014 \text{ mM}$$

$$\text{Limite de Cuantificación} = \bar{X} + 10 S = 0.042 \text{ mM}$$

b) Precisión

La tabla 3 muestra los valores obtenidos para calcular la precisión del método, la cual se expresa como la desviación estándar relativa (der). El análisis consiste en inyectar al sistema 7 veces una disolución de estándar de glucosa de concentración conocida, que no sea un punto de la curva de calibración. Se inyectó la disolución de 2.22 mM y la absorbancia de cada inyección se interpoló en la ecuación de la curva de calibración.

Tabla 3. Determinación de la precisión del método Valores de una concentración de 2.22 mM

Absorbancia	Glucosa (mM)
0.1347	2.24
0.1338	2.22
0.1330	2.21
0.1330	2.21
0.1364	2.27
0.1363	2.26
0.1380	2.29

Promedio = 2.24 mM

Desviación estándar = 0.0314

$$\text{der} = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Desviación estándar relativa = 1.4 %

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.6 Corrección de la curva de calibración para peróxido de hidrógeno

Se realizó la curva de calibración para H_2O_2 a 353 nm y utilizando molibdato de amonio como catalizador para hacer una comparación con la curva de calibración de glucosa y valorar la cantidad glucosa que la enzima inmovilizada transforma en sistema FIA.

a) Valoración de la disolución madre de H_2O_2

Para conocer la concentración real de la disolución del peróxido de hidrógeno se realizó una valoración por patrón secundario utilizando una disolución de permanganato de potasio previamente normalizado por patrón primario con ácido oxálico. Los resultados de la valoración se muestran en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Normalización del permanganato de potasio

Peso del ácido oxálico (g)	Volumen de $KMnO_4$ gastado (mL)	Concentración de $KMnO_4$ (M)
0.1104	35.0	0.01001
0.1096	34.7	0.00994
0.1110	35.2	0.01006

Promedio = 0.01 M de $KMnO_4$

Normalizada la disolución $KMnO_4$, se prosiguió a realizar la valoración de la disolución de peróxido de hidrógeno.

Tabla 5. Valoración del Peróxido de Hidrógeno

Volumen de $KMnO_4$ gastados (mL)	Concentración de H_2O_2 (M)
40.3	0.1007
40.2	0.1005
40.2	0.1005

Promedio = 0.1 M de H_2O_2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.7 Curva de calibración de H₂O₂ a 353 nm

Siguiendo la configuración de la figura 5, se prosiguió a realizar la curva de calibración para la cuantificación del peróxido de hidrógeno con la adición de molibdato de amonio y una longitud de onda de 353 nm. Se prepararon las disoluciones estándar en un intervalo de concentración de 0.004 mM a 0.2 mM. Los resultados se muestran en la figura 19.

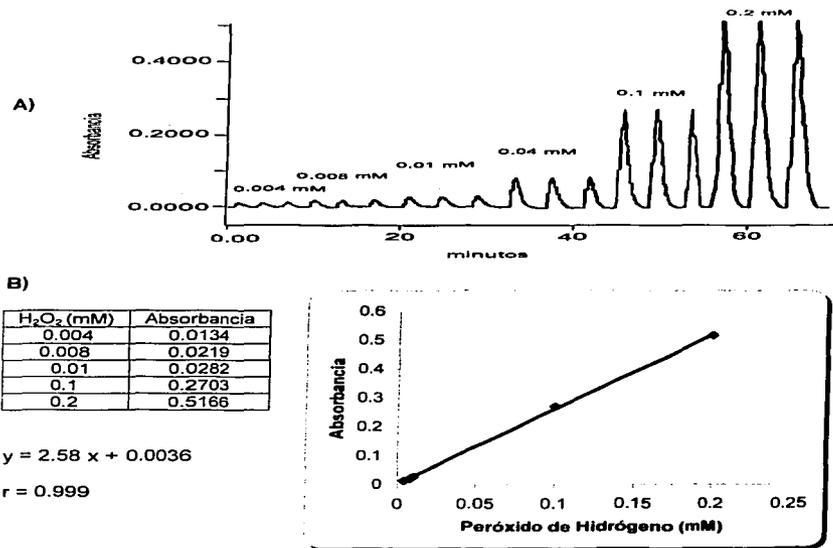


Figura 19. A) Señales analíticas de la curva de calibración para la cuantificación de peróxido de hidrógeno, B) Curva de calibración para cuantificar H₂O₂. Longitud de onda 353 nm.

3.8 Comparación de las curvas de calibración de glucosa y H_2O_2 . Estudio de la actividad enzimática

El objetivo por el cual se realizó la curva de calibración de peróxido de hidrógeno es para intercalarla con la curva de calibración de glucosa, para conocer las moles de glucosa que la enzima está transformando y conocer su actividad real.

La unidad de actividad se define como: 1 unidad de glucosa oxidasa que oxida 1 micromol de D-glucosa a ácido glucónico y H_2O_2 por minuto a pH 5.1 y 35 °C. (Definición establecida en la etiqueta de la enzima).

Para poder relacionar las curvas es necesario conocer el tiempo que tarda la enzima en transformar la glucosa inyectada al sistema en continuo. Es decir, el tiempo que tarda en llegar a la absorbancia máxima antes de regresar a la línea base. Este parámetro se calculó tomando el tiempo de arranque (T_a), que indica que el producto llegó al detector, hasta el momento en que llega a la altura máxima de pico (T). La diferencia entre estos es el tiempo de transformación. La determinación se realizó por triplicado considerando la curva de glucosa y la de peróxido de hidrógeno. El resultado fue un ΔT de 54.39 segundos que equivale a **0.9065 minutos**.

Considerando que la enzima tiene 6000 unidades en un gramo:

Se pesaron 0.2494 gramos de enzima por lo que se tienen 1496.4 unidades enzimáticas, las cuales están contenidas en 0.5070 gramos de vidrio controlado, por lo que se tienen 2951.47 unidades enzimáticas/ gramo de vidrio.

Ahora, 2951.47 unidades se encuentran en un gramo de enzima y se pesaron 0.017 gramos de enzima, lo que indica que se tienen 50.175 unidades.

En teoría el **reactor enzimático debió trabajar con 50.175 unidades**.

Realizando la comparación de las curvas, la glucosa de concentración 3.33 mM dio una absorbancia de 0.206, sustituyendo este valor en la ecuación de la curva de

calibración del peróxido de hidrógeno (Figura 19) se tiene un valor de 0.078 mmoles de H_2O_2 .

Es decir, 3.33 mmol/L de glucosa equivalen a 0.078 mmoles de H_2O_2 . Una mmol de glucosa se transforma a 0.023 mmol de H_2O_2 . Estas mmoles reaccionaron en un tiempo de 0.9065 minutos, por lo que se tiene 0.026 mmol/min.

El reactor enzimático trabajó realmente con 26 micromoles / minuto, lo que indica que la enzima trabajó en un 51.8 % de su actividad. Esta disminución de su actividad se puede deber a las condiciones a las cuales trabaja la enzima inmovilizada.

A pesar de esta disminución en su actividad, la enzima mostró resultados reproducibles durante el desarrollo del análisis experimental.

3.9 Análisis de muestras

3.9.1 Análisis de vinos

Los vinos analizados son de diferentes marcas comerciales y se eligieron al azar.

- Liebfraumilch, vino blanco, Alemán, 9.0 % de alcohol
- Oppenheimer Krottenbrunnen, vino blanco, Alemán, 9.5 % de alcohol
- Paternina, vino blanco seco, España, 12 % de alcohol
- Paternina, vino tinto, España, 12 % de alcohol
- Bartles Jaymes Premium, Durazno Peach, Bebida alcohólica preparada, 5 % de alcohol

Considerando el cambio de longitud de onda, el análisis de las muestras se realizó a la longitud de onda de 353 nm. El tratamiento que recibió cada muestra fue una dilución de 1:100. Primero se hizo el estudio de un vino que consistió en inyectar al sistema FIA, sin colocar el reactor enzimático, una muestra de vino (Liebfraumilch, vino blanco Alemán 9.0 % de alcohol) y otro estudio colocando el reactor enzimático. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 20.

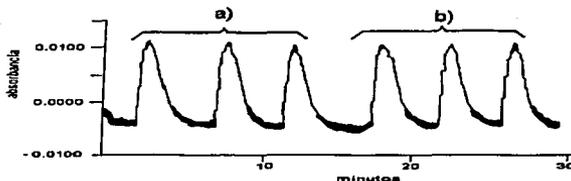


Figura 20. Análisis del blanco para la muestra de vino blanco. a) Señal obtenida sin utilizar el reactor enzimático; b) Señal obtenida utilizando el reactor enzimático.

Como se observa en los resultados, las señales obtenidas tienen los mismos valores de absorción colocando o no el reactor enzimático, lo que indica que no se está llevando a cabo la oxidación de la glucosa por medio de la enzima. Una propuesta que se hizo para conocer el por qué sucedía este comportamiento, fue realizar pruebas de adiciones estándar. Para este caso se cambió la nomenclatura de la concentración, las fortificaciones se nombrarán en mg de glucosa por litro de disolución (mg/L).

El análisis consistió en agregar una concentración conocida de glucosa a la disolución de la muestra de vino. Se comenzó con la adición de 500 mg/L de glucosa a la muestra de vino. Los resultados se muestran en la figura 21 y se observa en las señales obtenidas que la absorción disminuyó en lugar de aumentar la señal con la adición del estándar. Ante estos resultados, se realizaron pruebas para identificar las posibles interferencias que provocaban la disminución en las señales analíticas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

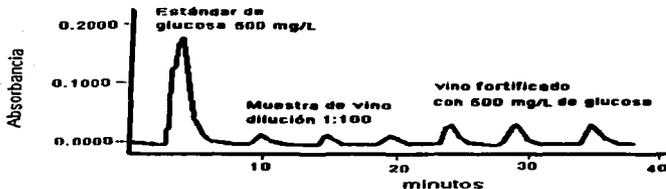


Figura 21. Señales obtenidas para un estándar de glucosa 500 mg/L, una muestra de vino blanco (dilución 1:100) y la muestra de vino con adición estándar.

3.9.1.1 Estudio de interferencias

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.9.1.1.1 Etanol

Aunque los vinos analizados no contienen cantidades altas de etanol (entre 5% y 15%), se realizó una prueba de interferencia, adicionando etanol a los estándares de glucosa para verificar si éste era la causa de la disminución de las señales. La preparación de las muestras consistió en realizar estándares de glucosa de 100 mg/L y 500 mg/L con una concentración final de 5% de etanol. La razón por la cual se utilizó la concentración de 5% es porque en la preparación de las muestras, los vinos se diluyen 1:100, las diluciones tienen un porcentaje de etanol entre 0.05 y 0.15%. La cantidad utilizada de etanol en el análisis es suficiente para observar si interfiere en la disminución de la absorbancia durante el análisis de las muestras. Los resultados se muestran en la figura 22.

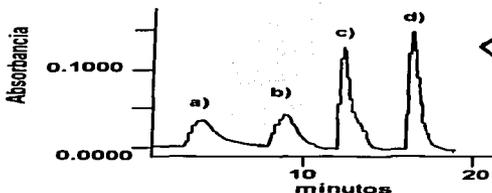


Figura 22. Efecto del etanol en una muestra de vino blanco. a) Disolución estándar de glucosa de 100 mg/L con 5% de etanol, b) Disolución estándar de glucosa de 100 mg/L, c) Disolución estándar de glucosa de 500 mg/L con 5% de etanol, d) Disolución estándar de glucosa de 500 mg/L.

Se observa que a pesar de que existe una pequeña disminución en la absorbancia en las disoluciones estándar de glucosa adicionadas con 5% de etanol, no existe una diferencia aparente en las señales obtenidas, por lo que se concluye que el etanol no es la interferencia de que la altura de las señales se vea disminuida.

3.9.1.1.2 Ácido ascórbico

La presencia de ácido ascórbico en una muestra que contiene glucosa disminuye la absorbancia en las determinaciones (resultados mostrados en la figura 23), esto debido a que el peróxido de hidrógeno es un oxidante fuerte y el ácido ascórbico es un reductor más fuerte que el yoduro, por lo que en la disolución existe una competencia por el peróxido de hidrógeno formado por la enzima glucosa oxidasa. Debido a esto, es necesario eliminar la presencia del ácido ascórbico que puede estar presente como antioxidante en vinos y como parte de la composición de las frutas en muestras de jugos de frutas. Se adicionó a las muestras yodato de potasio antes de que se inyectaran al sistema FIA para eliminar el ácido ascórbico. Se eligió el yodato de potasio porque es un reactivo que no forma productos secundarios que puedan reaccionar con los reactivos del portador y en consecuencia no presentaría interferencias en el análisis. Por información en la literatura, los datos de potenciales estándar (47) se encontró que el ion yodato al reducirse forma como productos agua y el ion yoduro, que ya se

encuentra como parte del portador. La elección también se basó en el potencial estándar y pH de la reacción, como se muestra en la reacción 3.

<i>Reacciones</i>	<i>Potenciales</i>
1) Yodato / Yodo $\text{IO}_3^- + 6 \text{H}^+ + 6 \text{e}^- \longrightarrow \text{I}^- + 3 \text{H}_2\text{O}$	$E^\circ(\text{v}) = 1.08$
2) Yodato / Yodo $2 \text{IO}_3^- + 12 \text{H}^+ + 10 \text{e}^- \longrightarrow \text{I}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$	$E^\circ(\text{v}) = 1.19$
3) Ácido ascórbico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \text{ (reducido)} \longrightarrow \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6 \text{ (oxidado)} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$	$\text{pH} = 1.05 \quad E^\circ(\text{v}) = 0.326$ $\text{pH} = 5 \quad E^\circ(\text{v}) = 0.126$ $\text{pH} = 7 \quad E^\circ(\text{v}) = 0.185$ $\text{pH} = 8.7 \quad E^\circ(\text{v}) = -0.012$
4) Peróxido de hidrógeno $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$	$E^\circ(\text{v}) = 1.77$
5) Reacción del ácido ascórbico y el yodato $\text{IO}_3^- + 6 \text{H}^+ + 6 \text{e}^- \longrightarrow \text{I}^- + 3 \text{H}_2\text{O}$	
<u>3 (C₆H₈O₆ (reducido))</u> \longrightarrow <u>C₆H₆O₆ (oxidado) + 2 H⁺ + 2 e⁻)</u>	
$\text{IO}_3^- + 3 \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \text{ (red)} \longrightarrow 3 \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6 \text{ (ox)} + \text{I}^-$	

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Reacción 3. Estudio cualitativo de la secuencia de las reacciones que ocurren en disolución. Valores de potencial estándar de las especies en disolución.

Como puede observarse los potenciales de yodato para formar yoduro y yodo son muy cercanos, lo que indica que la primera reacción que se lleva a cabo es la del yodo. Sin embargo, la estandarización para la formación de triyoduro se lleva a cabo a pH 7-8 (48). Por lo tanto, el pH 6 al cual se está trabajando, favorece la formación de

yoduro que forma parte del portador. La cantidad de yodo que se llega a formar por la oxidación del ácido ascórbico se diluye en la disolución del portador, esta señal no es visible y no interfiere con las determinaciones.

Lo anterior se comprueba con los resultados mostrados en la figura 23, donde se observan las pruebas realizadas con la adición de yodato de potasio: A) cuando se inyecta al sistema una disolución que contiene ácido ascórbico y yodato de potasio, la señal es igual a un blanco (F), lo que indica que no hay presencia de yodo en la disolución; comparando el estándar de glucosa, B) y el estándar de glucosa con yodato de potasio (C) se observa que las señales son iguales y que el yodato no interfiere con el análisis. Cuando se añade ácido ascórbico al estándar de glucosa se observa una disminución en la absorbancia (D), lo que indica competencia por el peróxido de hidrógeno formado. Cuando se añade yodato de potasio a esta disolución que contiene el estándar de glucosa con ácido ascórbico se observa que la señal aumenta (E) obteniéndose la misma señal que para el estándar de glucosa (B) lo que indica que se eliminó el ácido ascórbico presente en la disolución.

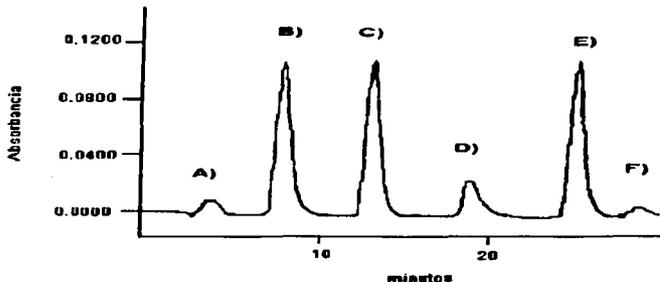


Figura 23. Comparación de las señales obtenidas. A) Disolución de ácido ascórbico y yodato de potasio, B) Estándar de glucosa de 500 mg/L, C) Estándar de glucosa de 500 mg/L con yodato de potasio, D) Disminución de la señal debida a la presencia de ácido ascórbico en una disolución estándar de glucosa de 500 mg/L, E) Eliminación del ácido ascórbico por reacción con yodato en una disolución estándar de glucosa y F) Inyección de agua destilada, blanco de la reacción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el estudio de interferencias debidas al ácido ascórbico, es importante considerar que este se oxida fácilmente en el medio ambiente (luz y O_2). Para estabilizar la disolución es necesario que el ácido ascórbico este disuelto en una disolución de ácido cítrico al 0.5 %. Para realizar las pruebas de estabilización del ácido cítrico con la glucosa se encontró que un porcentaje de ácido cítrico de tan solo 0.005% es suficiente para mantener estable la disolución de ácido ascórbico durante las mediciones.

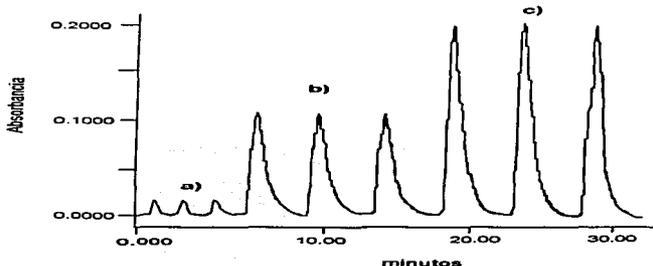
3.9.1.1.3 Optimización de la concentración de yodato.

Para conocer la concentración de yodato de potasio que se necesita para reaccionar con el ácido ascórbico presente en las muestras de vinos y jugos, se consideró el porcentaje citado en la etiqueta de los jugos. Se estableció que el yodato tiene que estar en exceso para asegurar que todo el ácido ascórbico reaccione. La estequiometría de la reacción, como se observa en la reacción 3 parte 5, indica que por cada mol de yodato reaccionan 3 moles de ácido ascórbico. Si se considera que un jugo contiene aproximadamente 10 mg de ácido ascórbico por 100 gramos de jugo, se tendrían 0.0567 mmoles de ácido ascórbico por litro. Si se considera la dilución 1:100 que se realiza a las muestras antes de ser inyectados al sistema, se requerirían 0.000189 mmol/L de yodato para eliminar el ácido ascórbico presente. La concentración de yodato de potasio que se utilizó es de 0.0283 mM, para asegurar que todo el ácido ascórbico se elimina en las muestras. El tiempo para reducir todo el ácido ascórbico presente en la muestra fue de 15 minutos. Este tiempo se optimizó con los diferentes resultados obtenidos en el experimento.

Se realizó el análisis de otra muestra de vino. El análisis demostró que aún con la adición del yodato de potasio, las señales de la muestra fortificada tenían menor absorbancia en comparación con el estándar de glucosa, lo que indica que existen muchas sustancias que interfieren en la reacción (reductores como sulfitos, taninos, fenoles, etc.). Por lo que se concluyó que este método no es apropiado para cuantificar glucosa en vinos.

3.9.2 *Análisis de bebidas refrescantes*

La muestra de bebida refrescante alcohólica que se analizó fue un Cooler, el cual es un preparado de vino de durazno con gas. Se le realizó el espectro de absorción a una muestra diluida 1:100 a la longitud de onda de 353 nm. El resultado del espectro de absorción demostró que no existía interferencia alguna a esta longitud de onda, por lo que se prosiguió al análisis. La figura 24 muestra los resultados obtenidos, donde se observan: a) las señales obtenidas de la muestra diluida sin el reactor enzimático adaptado al sistema FIA, b) las señales de la misma muestra pero acoplado al reactor enzimático en el sistema FIA, donde se observa el aumento de la absorbancia que indica la reacción de oxidación de la glucosa en la muestra y c) las señales de la muestra con la fortificación estándar de glucosa de 500 mg/L, donde se observa que se recuperó la glucosa adicionada.



TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

Figura 24. Señales obtenidas para el análisis de la muestra de "cooler", a) Muestra diluida sin el reactor enzimático, b) Muestra diluida con el reactor enzimático y c) Muestra diluida fortificada con una disolución estándar de glucosa de 500 mg/L.

La concentración de glucosa determinada para esta muestra fue de 488.5 mg/L y su porcentaje de recuperación fue de 94.90 %. Como se esperaba una recuperación mayor para esta muestra se concluyó que debido a que la cantidad de glucosa dentro de la muestra es alta y la adición representa un total de 938 mg/L (5.22 mM) de glucosa, el valor está muy cerca del límite de la curva de calibración (figura 7), por lo

que aumenta el error en la cuantificación. Por esta razón se realizaron otras dos adiciones de estándar de glucosa de 100 mg/L y de 250 mg/L, que al sumar con los mg/L de la muestra entran en un punto intermedio de la curva de calibración. Los porcentajes de recuperación con estas fortificaciones fueron 98.72 % y 99.56 % respectivamente.

Dentro de las bebidas de frutas no alcohólicas se analizaron 2 muestras de frutsi, después de pesar 1 mL de éstos, se realizó su respectivo tratamiento. La tabla 6 muestra los resultados del peso de las muestras y los porcentajes de recuperación de las fortificaciones realizadas.

Tabla 6. Densidad de las muestras, concentración de glucosa encontrada y porcentajes de recuperación de las muestras comerciales analizadas.

MUESTRAS	Peso (gramos)	[Glucosa] (g / 100 g jugo)	% Recuperación	
			100 mg/L	250 mg/L
Frutsi (limón)	1.0310	3.79	105.5	99.5
Frutsi (mora azul)	1.0381	5.06	105.1	104.2

3.9.3 *Análisis de jugos de frutas*

- Jugo de uva, Marca Jumex
- Jugo de manzana, Marca Jumex
- Néctar de manzana, Marca Herdez
- Jugo de uva, Marca Herdez
- Jugo de naranja, Marca Herdez

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En el análisis de este tipo de muestras se consideró que también contienen ácido ascórbico, por lo que se empleó la misma concentración de yodato de potasio para eliminar la interferencia causada por el ácido ascórbico. La tabla 7 muestra los datos de

la densidad de cada muestra expresada en g/mL, este valor se utiliza para reportar la concentración de glucosa en los jugos como g de glucosa en 100 g de jugo.

Tabla 7. Densidades de las muestras comerciales analizadas.

Muestra	Peso (g)*
Jugo de uva (Jumex)	1.0523
Jugo de manzana (Jumex)	1.046
Néctar de manzana (Herdez)	1.0313
Jugo de uva (Herdez)	1.0382
Jugo de naranja (Herdez)	1.0185

* Peso equivalente a 1 mL de muestra.

La figura 25 muestra un ejemplo de las señales analíticas obtenidas para una muestra de jugo y sus respectivas fortificaciones, en donde se observa el comportamiento de la muestra al adicionarle las concentraciones de glucosa de 100 mg/L y de 250 mg/L. La absorbancia aumenta, lo que equivale a la glucosa adicionada. La tabla 7 muestra los porcentajes de recuperación de las muestras analizadas.

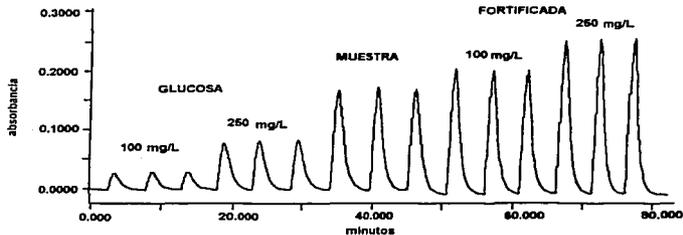


Figura 25. Señales analíticas de las disoluciones de un estándar de glucosa, de una muestra y de las fortificaciones con estándar de glucosa que se realizaron a la muestra.

Se observan las diferencias en las señales, lo que indica que se eliminó al ácido ascórbico de la muestra, la interferencia en la cuantificación de glucosa.

Tabla 8. Porcentajes de recuperación de las muestras comerciales fortificadas con glucosa 100 mg/L y 250 mg/L.

Muestras comerciales	[Glucosa] (g / 100 g jugo)	% Recuperación	
		100 mg/L	250 mg/L
Jugo de uva (Jumex)	4.7	98.9	92.67 *
Jugo de manzana (Jumex)	3.4	100.2	103.55
Nectar de manzana (Herdez)	2.9	105.3	97.4
Jugo de uva (Herdez)	4.6	96.08	96.4
Jugo de naranja (Herdez)	2.05	95.39	98.55

* El valor obtenido es bajo debido a que en este análisis el reactor enzimático había perdido su actividad inicial.

Se comprobó que el reactor enzimático disminuía su actividad en un 41.7 % cada 40 inyecciones. Esto para el análisis de la curva de calibración y el análisis de muestras de jugos de frutas y bebidas refrescantes. En el caso del análisis de los vinos su actividad disminuía cada 5 inyecciones, debido a la compleja composición de los vinos que prácticamente inhibió la actividad de la enzima.

La tabla 9 muestra el análisis de costos existente entre el método enzimático propuesto y dos diferentes métodos utilizados para cuantificar glucosa. El estudio implica el análisis de una determinación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9. Comparación de los métodos utilizados para cuantificar glucosa.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS			
	Colorimétrico (12)	Análisis por Inyección en Flujo	Cromatografía de Gases (49)
Reacción	Glucosa \xrightarrow{GO} H ₂ O ₂ + PDO + o-Dianisidina	Glucosa $\xrightarrow{\text{yoduro} + \text{yodo}}$ H ₂ O ₂ + ion triyoduro	Carbohidratos $\xrightarrow{\text{oxima}}$ derivado sililado
Reactivos	Glucosa oxidasa (GO) Peroxidasa (PDO) Acetato de sodio o-Dianisidina Enzima en disolución	Glucosa oxidasa (GO) Yodato de potasio Yoduro de potasio Fosfato de sodio Reactivos de inmovilización	Clorhidrato de hidroxilamida en medio básico y reactivos sililantes
Equipo *	Espectrofotómetro UV	Espectrofotómetro UV	Cromatógrafo de gases y detector de ionización en flama
Tiempo de análisis	30 minutos	5 minutos	15 minutos
Costo del equipo *	7000	7000	15000
Costo total de análisis por una muestra *	1.716	0.009	4
Número de muestras analizadas en 5 años	29200	175200	58400
Costo de inversión por muestra (en 5 años)**	50107.2	1576.8	233600

* se considera el costo en dólares.

** Tiempo de depreciación del equipo

Las ventajas que presentó el método FIA propuesto, en comparación con otros métodos de análisis (Colorimétrico y Cromatografía de gases) son: 1) utiliza un volumen de muestra de solo 95 µL, 2) el tiempo de análisis es corto, 5 minutos por

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

determinación, 3) no requiere de un tratamiento previo laborioso de la muestra, 4) el empleo de enzimas inmovilizadas permite la reutilización de estas reduciendo costos al igual que con los reactivos utilizados, que no son tóxicos. Además, el sistema FIA puede ser automatizado con el fin de reducir los errores que se cometen en la manipulación de un gran número de muestras.

La cuantificación de glucosa en muestras de vino por el sistema FIA no fue posible por las diferentes interferencias presentes en las muestras, por lo que es necesario continuar con este trabajo y llegar a aplicar esta técnica en una gran variedad de muestras reales.

CONCLUSIONES

- ✓ Los parámetros hidrodinámicos óptimos para el análisis de cuantificación de glucosa en el sistema FIA son: Caudal de 0.36 mL/min, volumen de inyección de 95 μ L y longitud del reactor de 200 cm.
- ✓ En el análisis de cuantificación para la glucosa, la frecuencia de muestreo es de 12 determinaciones por hora.
- ✓ El intervalo lineal de la curva de calibración para la cuantificación de glucosa fue de 0.038 mM a 6.66 mM con una precisión, expresada como desviación estándar relativa, de 1.4 % con un límite de detección de 0.014 mM y límite de cuantificación de 0.042 mM.
- ✓ El empleo de molibdato de amonio como catalizador en la formación del ion triyoduro permite detectar bajas concentraciones de glucosa, aumentando la sensibilidad del sistema.
- ✓ Las condiciones óptimas para la actividad de la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en vidrio de poro controlado son: temperatura de 40 °C y pH 6, que indica que el método de inmovilización pudo cambiar la estructura tridimensional de la enzima modificando sus condiciones de actividad nativa.
- ✓ La enzima inmovilizada tuvo una actividad del 51.8% con respecto a lo esperado, ya que trabaja en un flujo continuo donde no hay homogeneización ni física ni química del bolo de muestra inyectado.

- ✓ En el análisis de las muestras comerciales, el etanol no presentó interferencias. La interferencia debida al ácido ascórbico, se eliminó adicionando un agente oxidante (yodato). El producto formado de esta reacción forma parte de la disolución del portador.
- ✓ La disolución utilizada permite llevar a cabo el análisis de las muestras sin interferencias en los conductos del sistema FIA debidas a la viscosidad de las muestras.
- ✓ En muestras de vino no es posible aplicar el método propuesto para cuantificar glucosa, debido a la compleja composición de las muestras.
- ✓ El método enzimático propuesto permite determinar específicamente glucosa en jugos de frutas y refrescos de diferentes marcas comerciales, sin embargo es necesario realizar este análisis aplicándolo a una mayor diversidad y número de muestras.
- ✓ Los porcentajes de recuperación muestran la especificidad con la que se determinó la concentración de glucosa, por medio de la enzima glucosa oxidasa inmovilizada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Luque de Castro, M., Valcárcel, C. *Análisis por Inyección en Flujo*. Departamento de Química Analítica, Universidad de Córdoba, Córdoba, España, 1984, pp. 12-63
2. Calatayud, J. *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals*. Taylor & Francis, Gran Bretaña, 1996, pp. 25-67
3. Ruzicka, J. *Flow Injection Analysis*. Chemical Analysis, Vol. 62, 2ª ed, Wiley-Interscience, USA, 1988, pp. 15 - 87
4. Cañizares, P. Análisis por Inyección en Flujo: herramienta clave para la automatización analítica. *Sociedad Química de México*. **2002**, 46, 2, 167 - 174
5. Moody, G., Sanghera, G. Amperometric enzyme electrode system for the flow injection. Analysis of glucose. *Analyst*. **1986**, 111, 605 - 609
6. Katsumata, H. Sekine, T. A new flow -injection determination of glucose based on the redox reaction of hydroquinone with iron (III) in the presence of 1,10-phenanthroline. *Talanta*. **2000**, 51, 1197 - 1205
7. Koncki, R., Walcerz, I. Enzymatically modified ion-selective electrodes for flow injection analysis. *J. Pharm. Biom. Anal.* **1999**, 19, 633 - 638
8. García, G. *Biotecnología Alimentaria*. Limusa, México, 1993, pp. 103 - 123
9. Stryer, L. *Bioquímica*. Tomo 1, Reverté, 3ª ed, España, 1990, pp. 185 - 210
10. López, A. *Tecnología Enzimática*. UNAM, México, 1987, pp. 29 - 36
11. Chaplin, M. *Enzyme Technology*. Cambridge, Gran Bretaña, 1990, pp.2 - 10
12. Kaplan, N. *Methods in Enzymology*. Vol. 1. Academic Press, EEUU, 1955, pp. 340 - 345
13. Southgate, D. *Determination of Food Carbohydrates*. Elsevier Applied Science, 2ª ed, London, 1991, pp. 143 - 147
14. Wiseman, A. *Manual de Biotecnología de los Enzimas*. Acribia, España, 1985, pp. 139 - 199
15. Kaplan, N. *Methods in Enzymology*. Immobilized Enzymes, Vol. 44, Klaus Mosbach, EEUU, 1976, pp. 138 - 148

16. Gasesa, P. *Tecnología de las Enzimas*. Acribia, España, 1990, pp. 89 – 102
17. Trevan, M. *Biotechnología: principios básicos*. Acribia, España, 1990, pp. 242 – 253
18. Cañizares, P. Desarrollo de sensores y sistemas sensores en configuración de flujo no segmentado. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, España, 1995
19. Fitelson, J. Detection of adulteration in fruit juices by qualitative. Determination of carbohydrates by Gas – Liquid Chromatography. *J. AOAC*. **1970**, 53, 6, 1193 - 1197
20. Desrosier, W. *Elementos de Tecnología de Alimentos*. Continental, México, 1987, pp. 284 – 302
21. Tressier, D. *Fruti and Vegetable Juice: processing technology*. The Avi Publishing, 2ª ed, London, 1971, pp. 217 – 227
22. Kirk, R. *Composición y análisis de alimentos de Pearson*. Continental, 2ª ed, México, 1996, pp. 288 – 399, 473 – 494
23. NMX – F – 489 – 1983. Alimentos.- Bebidas no alcohólicas – Bebidas y Refresco – Clasificación y definiciones.
24. Codex Alimentarius, Vol. 6, Zumos de fruta y productos afines, 2ª ed, 1992
25. Madrid, V. *Tecnología del Vino y Bebidas Derivadas*, AMV, España, 1991, pp. 262 – 277
26. Robinson, D. *Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos*. Acribia, España, 1991, pp. 5 – 13
27. Official Methods of Analysis. A.O.A.C. 15ª ed, 1990, pp. 774 – 1016
28. Wei, Y., Ding, M. Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *J. Chromatography A*. **2000**, 904, 113 – 117
29. Rambla, F., Garrigues, S. PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices. *Anal. Chim. Acta*. **1997**, 344, 41 – 53
30. Sierra, J., Galvan, J. Fluorimetric-enzymatic determination of glucose based on labeled glucose oxidase. *Anal. Chim. Acta*. **1998**, 368, 97 – 104

31. Boujtita, M., Boitard, M. Development of renewable surface biosensor to meet industrial needs for measurement of glucose in fruit juices. *Biosensors and Bioelectronics*. **1999**, *14*, 545 – 553
32. Ukeda, H., Fujita, Y. Immobilized enzyme-based microtiter plate assay for glucose in foods. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3858 – 3863
33. Scout, A. *Biosensors for Food Analysis*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K, 1998, pp. 115 – 123
34. Centonze, D., Zambonin, C. Determination of glucose in nonalcoholic beverages by a biosensors coupled with microdialysis fiber samples. *J. AOAC*. **1997**, *80*, 4, 829 – 833
35. Ramanathan, K., Jonsson, R. Sol-gel based thermal biosensor for glucose. *Anal. Chim. Acta*. **2001**, *427*, 1 – 10
36. Chang, S., Holm, E. Carbohidrates. *Anal Chem*. **1995**, *67*, 12, 131R – 150R
37. Dremel, B., Schaffar, B. Determination of glucose in wine and fruit juice. Based on a fibre-optic glucose biosensor and flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*. **1989**, *225*, 293 – 301
38. Gerhard, T. *Tecnología del Vino*. Omega, España, 1985, pp. 5 – 20
39. Amerine, M. *Methods for Analysis of Must and Wines*. Wiley-Interscience. EEUU, 1980, pp. 32 – 44
40. NMX - V- 006 -1983. Bebidas alcohólicas – Azúcares reductores directos y totales – Métodos de prueba
41. Hennier, G., Mascaro, L. Enzimatic - ultraviolet determination of glucose and fructose in wine. *J. Assoc. off. Anal. Chem.* **1985**, *68*, 5, 1021 – 1024
42. Madrid, V. *Métodos de Análisis Comunitarios Aplicables en el Sector del Vino*. AMV, España, 1991, pp. 95 – 99
43. Araújo, A., Lima, J. Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugars in wines. *Talanta*. **2000**, *52*, 59 – 66
44. Boltz, D. *Colorimetric Determination of Non Metals*. Chemical Analysis, Vol. 8, EEUU, 1978, pp. 301 – 305
45. Cohen, I., Purcell, T. Analysis of the oxidant in photooxidation reactions. *Environ. Sci. Technol.* **1967**, *1*, 3, 247 – 252

-
46. Miller, J. *Estadística para Química Analítica*. 2ª ed, Addison – Wesley, Iberoamericana, USA, 1993, pp. 87 – 119
 47. Skoog, D. *Química Analítica*. Apéndice 4. Mc. Graw – Hill, 6 ed, México, 1995
 48. Harris, D. *Análisis Químico Cuantitativo*. Reverté, 2 ed, México, 2001, pp. 422 - 423
 49. Alarcón Jiménez, Ana Luisa. Optimización de las reacciones de siliación para carbohidratos y su análisis por cromatografía de gases. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, 2003