

"CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION DE MEMBRANAS ENZIMATICAS PARA LA DETERMINACION DE DISACARIDOS, MEDIANTE UN ANALIZADOR ENZIMATICO"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

JUAN LEODEGARIO GARCIA ROJAS

Mtro. Biotecnología
Juan Leodegario García Rojas

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES, UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO; PROYECTO ACADÉMICO DE ESPECIALIZACIÓN, MAESTRIA Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA / UNAM

CUERNAVACA, MORELOS JUNIO DE 1990.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

**"CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION DE MEMBRANAS ENZIMATICAS PARA LA
DETERMINACION DE DISACARIDOS. MEDIANTE UN ANALIZADOR ENZIMATICO"**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

JUAN LEODEGARIO GARCIA ROJAS

Mtro. Biotecnología
Juan Leodegario García Rojas

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES, UNIDAD ACADÉMICA
DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO: PROYECTO
ACADÉMICO DE ESPECIALIZACIÓN, MAESTRIA Y DOCTORADO
EN BIOTECNOLOGIA / UNAM**

CUERNAVACA, MORELOS JUNIO DE 1990.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE

Capítulo	pag.
Presentación	1
Resumen	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1 Biosensores	5
2.2 Dispositivos electroquímicos	7
2.2.1. Sensores potenciométricos	7
2.2.2. Sensores amperométricos	7
2.2.3. Dispositivos no electroquímicos	8
2.3 Electroodos enzimáticos	10
2.3.1. Generalidades	10
2.3.2. Ventajas del uso de electroodos enzimáticos	10
2.3.3. Requisitos para construir un electroodo enzimático	11
2.3.4. Técnicas de inmovilización	12
2.3.5. Selección de soportes	15
2.4 Membranas enzimáticas	15
2.5 Oxidoreductasas para electroodos enzimáticos	18
2.6 Electroodo de peróxido de hidrógeno	18
2.7 Determinación de lactosa y sacarosa	20
3 Objetivos	22
4 Materiales y Métodos	23
4.1 Materiales	23
4.1.1. Reactivos	23
4.1.2. Equipo	24
4.1.3. Enzimas	24
4.1.4. Membranas	24
4.2 Métodos	25
4.2.1. Técnicas analíticas	25
4.2.1.1 Determinación de lactosa y sacarosa (métodos convencionales).	25
4.3 Procedimientos experimentales	26
4.3.1. Sistema de medición	26
4.3.2. Selección del adhesivo	27
4.3.3. Selección de membranas	31
4.3.4. Técnica de fabricación de membrana interna	32
4.4 Inmovilización de enzimas	32
4.4.1. Membrana enzimática para lactosa	32

4.4.2.	Membrana enzimática para sacarosa	38
4.5	Operación del sistema del electrodo enzimático	38
4.5.1.	Curvas de respuesta	40
5	Resultados y discusión	42
5.1	Determinación de lactosa	42
5.1.1.	Selección de soportes para inmovilización	42
5.2	Inmovilización	53
5.3	Estabilidad operacional	65
5.4	Mejoramiento en la metodología de construcción de membranas	69
5.5	Evaluación comparativa	74
6	Determinación de sacarosa	77
6.1	Selección de soportes para inmovilización	77
6.2	Inmovilización y estabilidad operacional	79
6.3	Evaluación comparativa	82
7	Conclusiones	90

PRESENTACION

Este trabajo fué llevado a cabo en el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología (CEINGEBI) de la UNAM. Su desarrollo estuvo apoyado parcialmente por el CONACYT mediante el donativo PVQ/QF/NAL/85/2744.

La asesoría académica para la realización de este trabajo estuvo a cargo del Dr. Enrique Galindo F. Investigador del CEINGEBI, UNAM.

RESUMEN

En este trabajo se presenta la construcción y caracterización de membranas enzimáticas para la detección de los disacáridos lactosa y sacarosa mediante un analizador enzimático.

El dispositivo final está basado en la detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), producto de la acción de las enzimas β -galactosidasa, invertasa, mutarotasa y glucosa oxidasa. La construcción de las membranas enzimáticas se realizó empleando como soportes membranas de acetato de celulosa y celofán. Se establecieron las metodologías tanto para la fabricación como para la inmovilización de las enzimas.

Para la determinación de lactosa se empleó una metodología por atrapamiento físico de las enzimas β -galactosidasa y glucosa oxidasa. Estas membranas presentan un rango lineal de 0-400 mg/dL realizando recalibraciones cada 30 determinaciones. Cuando se recalibran cada 5 determinaciones se obtuvo un rango lineal de 0-900 mg/dL. La estabilidad operacional de las membranas enzimáticas para lactosa fue de 600 análisis. Por otra parte, para la determinación de sacarosa empleando las enzimas invertasa, mutarotasa y glucosa oxidasa con una técnica de atrapamiento físico, se obtuvieron rangos lineales de detección de 0-600 mg/dL, la estabilidad de estas membranas es de 200 análisis sin pérdida considerable de sensibilidad. Usando una metodología de co-inmovilización por enlace covalente empleando glutaraldehído como agente químico, se obtuvo un rango lineal de 0-1000 mg/dL y una estabilidad de 500 análisis.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Una de las necesidades más importantes para la interpretación del comportamiento de los sistemas vivos o aquellos que emplean un elemento biológico, es la detección y cuantificación de sustancias orgánicas específicas. De la precisión y rapidez con que se lleve a cabo la determinación dependen desde la producción óptima de un antibiótico en un proceso fermentativo, hasta el diagnóstico adecuado de cierta enfermedad en un organismo. En la actualidad, los laboratorios, ya sea que se trate de investigación básica, industrial o clínica, requieren de métodos confiables de cuantificación y detección de sustancias.

La investigación clínica, analítica y biológica ha estado directamente involucrada en el desarrollo de métodos, técnicas e instrumentos capaces de determinar la identidad y concentración de sustancias químicas que afectan o alteran el estado armónico de un sistema. De los logros más importantes en esta búsqueda ha sido la reciente aparición de los biosensores, pequeños dispositivos portátiles o desechables capaces de ser usados para detectar sustancias orgánicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Los biosensores o electrodos biológicos en general, requieren de un elemento biológico inmovilizado en la superficie de un transductor eléctrico. Este instrumento convierte una señal química, producto de la acción del elemento biológico, en una señal eléctrica que puede ser cuantificada digitalmente.

Un biosensor adquiere diferentes nombres de acuerdo a la sustancia biológica inmovilizada en su superficie. Así, se han definido los electrodos microbianos (células), inmunosensores (antígenos o anticuerpos), electrodos enzimáticos (enzimas o en tejidos vegetales o animales), etc. Los biosensores con mayor éxito como métodos analíticos han sido los electrodos enzimáticos. Estos han despertado un gran interés comercial debido a las múltiples ventajas que representa su utilización en comparación con los métodos ópticos y a su alto potencial de comercialización. Estos dispositivos han tenido un desarrollo importante en gran parte gracias al desarrollo de las técnicas de inmovilización de enzimas.

En este trabajo se describe el diseño, construcción y caracterización de un sensor enzimático para la cuantificación de lactosa y sacarosa de importancia en la industria láctea y azucarera, respectivamente. El trabajo hace especial énfasis en la construcción de las membranas enzimáticas que se requieren para la determinación específica de estos azúcares. El dispositivo final (con dos y tres enzimas), está basado en la detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), producto de la acción de las enzimas β -galactosidasa y glucosa oxidasa, en el caso de lactosa y de la acción de invertasa, mutarotasa y glucosa oxidasa, en el caso de la sacarosa.

El trabajo fué dividido en varias etapas, la primera fué la selección del soporte para la inmovilización. La etapa siguiente consistió en la selección del pegamento adecuado para las condiciones en que debía usarse el soporte. La etapa posterior fué la adquisición comercial del sensor de platino; durante esta etapa se realizaron experimentos para garantizar que el soporte usado tuviera un espesor adecuado para el control de la difusión tanto de los productos de interés como de las moléculas que pudieran interferir la lectura del sensor.

Establecidas las condiciones de co-inmovilización de los sistemas enzimáticos para lactosa y sacarosa en sus respectivas membranas (usadas como soporte), se construyó el electrodo enzimático colocando las membranas enzimáticas en contacto con el transductor amperométrico sensible a peróxido de hidrógeno. La etapa final consistió en la caracterización del electrodo enzimático en cuanto a rangos lineales de detección, estabilidad operacional, evaluación comparativa con los métodos tradicionales para medición de lactosa y sacarosa y su uso en pruebas de campo con muestras problema que contienen estos disacáridos.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 BIOSENSORES

La tecnología biológica incorporada a la instrumentación analítica, química y clínica se ha desarrollado importantemente en los pasados veinte años. Producto de este desarrollo lo constituyen los denominados biosensores o electrodos biológicos (Russell y Rawson, 1986).

En la literatura, para nombrar estos dispositivos se han usado, entre otros términos, las palabras biosensores, electrodos biológicos y bioelectrodos. El término original los define como electrodos con membranas biocatalíticas o sensores bioelectroquímicos (Gronow, 1984). El diseño conceptual básico de un biosensor es realmente simple: un sistema biológico acoplado a un transductor electrónico en el cual se convierten las señales químicas en señales eléctricas. El componente biológico es normalmente una enzima o un anticuerpo, así como tejidos o células. El componente electrónico puede medir voltaje (potenciométrico), corriente (amperométrico), luz, sonido, temperatura o masa. En la figura 1 se ilustra la configuración básica de un sensor biológico. Estos sistemas han creado gran interés en el desarrollo de dispositivos para la detección cuantificación y monitoreo de sustancias biológicas (Lowe, 1984, 1985, Watson *et al.*, 1987/88). Actualmente, a través de biosensores es posible la determinación de sustratos, productos, inhibidores catalíticos y aún la actividad de las mismas enzimas (Galindo, 1986; Moore, 1987; Carr y Bower, 1980; Czaban, 1985).

Se reconoce que los dispositivos que aplican este principio de operación y que ya están disponibles comercialmente son baratos y confiables para el monitoreo de metabolitos, gases o iones en las áreas de diagnóstico, cirugía, e incluso en el hogar. En laboratorios centrales son de gran utilidad para llevar a cabo un cuidado adecuado de pacientes hospitalizados (Turner y Pickup, 1985, Watson, 1987/88). Las enzimas son los elementos biológicos que se han empleado en mayor proporción para el diseño y construcción de biosensores, ya sea en forma inmovilizada o soluble. Le siguen en importancia los microorganismos con una actividad metabólica o enzimática determinada, anticuerpos, tejidos animales o vegetales, organelos o bien

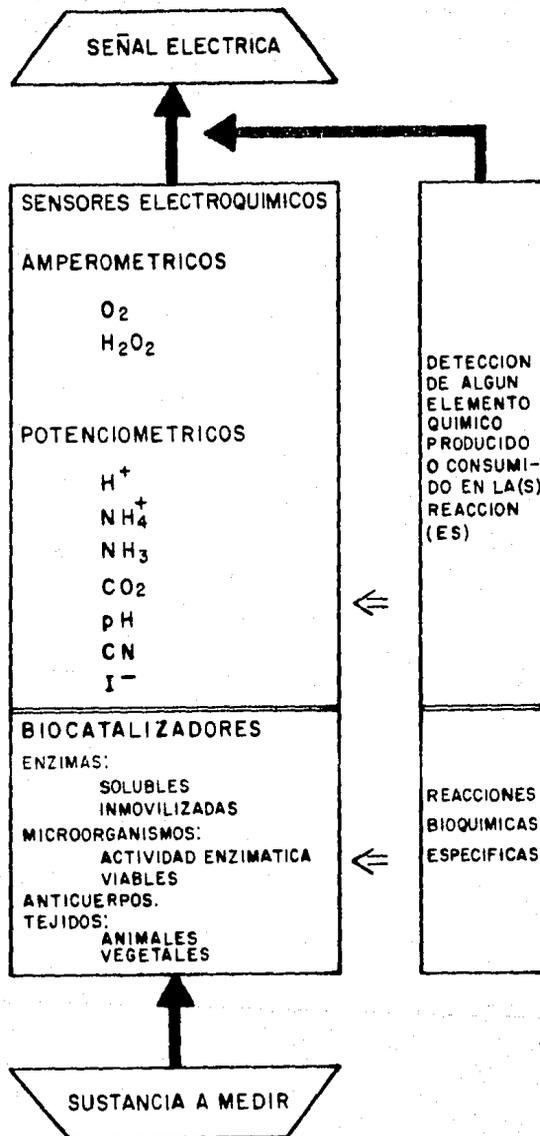


Figura 1. Configuración básica de un sensor biológico.

combinaciones de dos o más de estos elementos biológicos (Galindo, 1986; García, 1986).

2.2 DISPOSITIVOS ELECTROQUIMICOS

Los elementos electroquímicos que pueden ser empleados en la construcción de biosensores se clasifican en dos categorías; sensores amperométricos y sensores potenciométricos.

2.2.1. SENSORES POTENCIOMETRICOS

Los electrodos de pH, CO₂, NH₄, Na⁺ y K⁺ son ejemplos de los electrodos potenciométricos. La superficie selectiva se comporta como una batería generando una diferencia de potencial. Esta diferencia de potencial es una función logarítmica de la concentración del compuesto analizado y se mide en relación al potencial de un electrodo de referencia inerte como lo es el de Calomel o el de plata-cloruro de plata. En estos sensores, las determinaciones se realizan en el equilibrio; esto es, cuando no existe flujo de corriente. Esta característica se debe principalmente al hecho de que las membranas sensibles que utilizan son muy poco conductoras de corriente.

2.2.2. SENSORES AMPEROMETRICOS

A nivel comercial se encuentran disponibles de cuatro tipos de dispositivos amperométricos; los que detectan cationes, aniones, gases y los de platino que miden la generación de corriente provocada por sustancias electroactivas, como el H₂O₂. El ejemplo más conocido lo constituye el electrodo de Clark para detección de pO₂. En estos dispositivos se aplica un voltaje entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. Con ello se provocan reacciones de transferencia de electrones (Redox). Las reacciones de óxido-reducción producen un flujo neto de corriente, cuya magnitud es proporcional a la concentración del material electroactivo presente en la solución problema (Borman, 1987).

Una de las más recientes novedades ha sido el uso de los sensores amperométricos combinados con ferrocenos. Estos compuestos

actúan como medidores en la transferencia de electrones de las enzimas reducidas. El diseño permite la generación electroquímica de iones ferrocianuro (FeCN) que actúan como oxidantes para las enzimas inmovilizadas. El ión ferrocianuro que ha sido reducido puede volver a un estado oxidado con la ayuda de la polaridad del electrodo, permitiendo así el flujo de corriente.

2.2.3. DISPOSITIVOS NO ELECTROQUÍMICOS USADOS COMO SENSORES

Entre los sensores que no son propiamente electrodos y que pueden ser usados para la fabricación de sensores biológicos se encuentran los ópticos y los termométricos. En el primer caso, la interacción entre el biocatalizador y el sustrato o producto desconocido produce cambios en las propiedades ópticas del sistema. Dependiendo del dispositivo usado y de la reacción producida, el cambio de las propiedades ópticas puede ser medido por absorbancia, refracción o luminiscencia.

Recientemente se han reportado los sensores ópticos que usan anticuerpos inmovilizados con su respectivo antígeno. Los cambios ópticos producidos por esta interacción son medidos por la absorbancia de luz en el sistema.

Algunos inmunoensayos que emplean fluorescencia pueden ser convertidos en biosensores continuos, colocando los bioreactivos en un compartimiento miniaturizado que consiste en una fibra de diálisis hueca (Sutherland et al, 1984).

Los sensores ópticos presentan algunas ventajas. No son susceptibles a interferencias eléctricas y no requieren el uso de electrodos de referencia. Sin embargo, su principal desventaja es que, dependiendo del diseño, pueden ser susceptibles a interferencias por la luz ambiental.

Los sensores térmicos se basan en la teoría que afirma que todas las reacciones químicas pueden ser registradas indirectamente midiendo el calor generado por éstas. Estos biosensores utilizan un termistor y pueden aplicarse eficientemente con enzimas, células o tejidos (Gronow, 1984).

Otra importante área en la cual se ha puesto gran interés, es la explotación de la tecnología de los semiconductores. Los semiconductores que se han empleado son los transistores de efectos de campo (FET) y su principal atractivo es su potencialidad para ser miniaturizados e integrados a microcircuitos electrónicos (Caras, et al, 1980; Watson et al, 1987/88; Janata, 1985; Eddowes, 1987/88; Sibbald, 1988; Janata y Moss, 1976; Caras y Janata, 1980; Gronow, 1984; Higgins et al, 1985; Shultz y Meyerhoff, 1987; Van Brunt, 1987, Van Der Shoot, 1977/88; Aston y Turner, 1984; Corcoran y Rechnitz, 1985).

2.3 ELECTRODOS ENZIMATICOS

2.3.1 GENERALIDADES

La idea que revolucionó el área de análisis fué la de acoplar un electrodo común con una enzima inmovilizada. Esta idea fué descrita en 1962 por Clark y Lyons y hasta cinco años después, en 1967, Updike y Hicks se encargan de introducir el término "electrodo enzimático", desarrollando un sensor para detección de glucosa.

Los electrodos enzimáticos constituyen el mejor ejemplo de los electrodos biológicos. Estos sensores aprovechan las características de las enzimas, permitiendo el diseño de dispositivos con gran actividad catalítica y altamente específicos para el análisis de un sustrato en particular.

En la construcción de electrodos enzimáticos se emplean transductores tanto amperométricos como potenciométricos. Se han desarrollado electrodos para la detección de un gran número de analitos (Guilbault, 1982).

2.3.2 VENTAJAS DEL USO DE ELECTRODOS ENZIMATICOS

El empleo de un electrodo enzimático y en general de un electrodo biológico representa múltiples ventajas en relación a los métodos convencionales de análisis de sustancias. Entre ellas se pueden mencionar las siguientes:

a) Simplicidad de operación. Puesto que la preparación de las muestras y su manipulación se reducen al mínimo.

b) Altamente específicos. Esto se debe principalmente al uso de enzimas que únicamente reconocen un sustrato.

c) Uso mínimo de reactivos. Solo son requeridos para la calibración y el mantenimiento de las condiciones óptimas del sistema.

d) Medición rápida. Por tratarse de una medición directa basada en una señal eléctrica.

e) Medición independiente del color.

f) La enzima o cualquier parte biológica inmovilizada en la superficie de un soporte puede ser usada repetidas veces.

g) Medición en línea. Esto es que se pueden realizar determinaciones continuas cuando se requiere el registro continuo o la automatización de ciertos procesos.

Todas estas ventajas pueden ser atribuidas a los electrodos enzimáticos, principalmente porque combinan la sensibilidad y selectividad de un método enzimático, con la alta velocidad de respuesta de los transductores eléctricos. Todo esto en conjunto trae como consecuencia una reducción de los costos por muestra analizada (Galindo, 1986, García, 1986).

2.3.3 REQUISITOS PARA CONSTRUIR UN ELECTRODO ENZIMATICO

Para construir un electrodo enzimático es necesario tomar en cuenta cuatro aspectos importantes:

- a) Selección del soporte
- b) Fuente enzimática
- c) Inmovilización de la enzima
- d) Montaje de la enzima en el transductor apropiado.

De los puntos anteriores se ha considerado como de mayor importancia el que se refiere a la inmovilización de la enzima. Esta consideración se basa en que, de la estabilidad de la enzima inmovilizada depende en gran parte su reutilización. La enzima elegida preferentemente debe tener suficiente actividad catalítica y un alto grado de pureza para no permitir la interferencia de sustancias extrañas a la que se requiere analizar (Guilbault, 1976, Bautista, 1983, García, 1986).

De forma general, las enzimas catalizan una reacción que sigue una secuencia como la siguiente:



El electrodo enzimático requiere de un sensor que responda a cualquiera de los reactantes A o B o bien a los productos C o D. Los sensores electroquímicos que se requieren para la construcción de electrodos enzimáticos algunas veces son el único factor limitante por su capacidad para amplificar la reacción. Otros aspectos que se

incluyen en la construcción de electrodos enzimáticos son: el tipo y características de los componentes electrónicos y el diseño mecánico para que estos resulten fáciles de mantener y de operar.

Existen algunas formas básicas de construcción de los electrodos enzimáticos, las cuales se esquematizan en la figura 2. Si se dispone de membranas planas, el electrodo sensor debe tener preferentemente la punta plana, además de requerir de dispositivos mecánicos para fijarlos. En el caso de no ser plano, la membrana debe ser lo suficientemente flexible para ser adaptada con anillos de hule ("O" rings).

2.3.4 TECNICAS DE INMOVILIZACION

Un método o procedimiento de inmovilización es aquel por medio del cual se limita a las enzimas en una región de un espacio determinado. Las diferentes formas en las cuales se puede inmovilizar, tanto a enzimas como anticuerpos, incluyen métodos físicos y químicos. Un resumen esquemático se presenta en la Figura 3. El método a usar depende de las características del soporte y de lo que se requiere inmovilizar en él. Para células y organelos se recomienda el atrapamiento físico en matrices poliméricas. En cambio, las enzimas y anticuerpos se enlazan o entrecruzan covalentemente con reactivos bifuncionales o multifuncionales (Susuki y Karube, 1979, Guilbault, 1976, 1982, Hartemeier, 1985, Tramper, 1985, Jerker y Rolf, 1976, Zaborisky, 1977).

La inmovilización de enzimas se puede realizar por diversos métodos. Entre ellos destacan la copolimerización, el atrapamiento entre membranas o en geles y el enlace covalente a un soporte o matriz sólida. La difusividad de sustratos y productos, así como las dimensiones de la membrana son de primordial importancia puesto que influyen en las características de respuesta del electrodo.

El atrapamiento entre dos membranas sin el uso de reactivos bifuncionales o multifuncionales, algunas veces es adecuado y es función de que tales membranas no dejen escapar a la enzima. Es necesario que el método de inmovilización de las enzimas no altere negativamente el funcionamiento de estas, ya que siempre existe la posibilidad de que se produzcan cambios que conduzcan a un

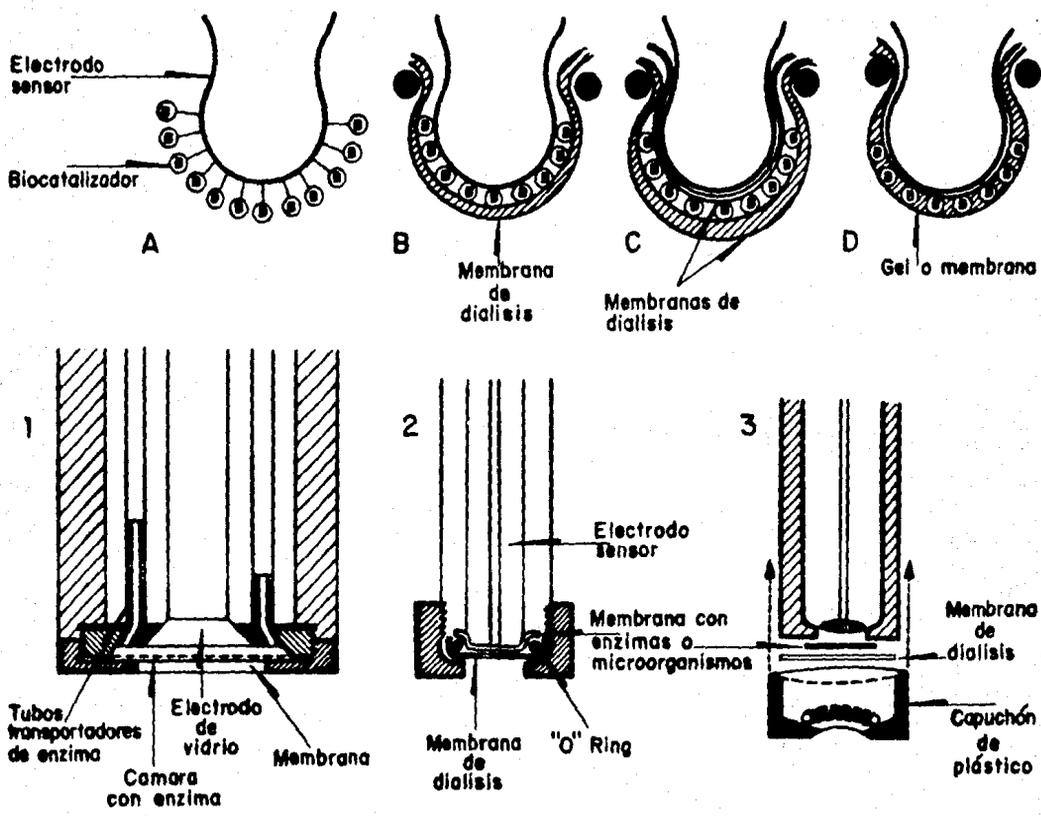


Figura 2. Formas basicas para construcción de electrodos biológicos.

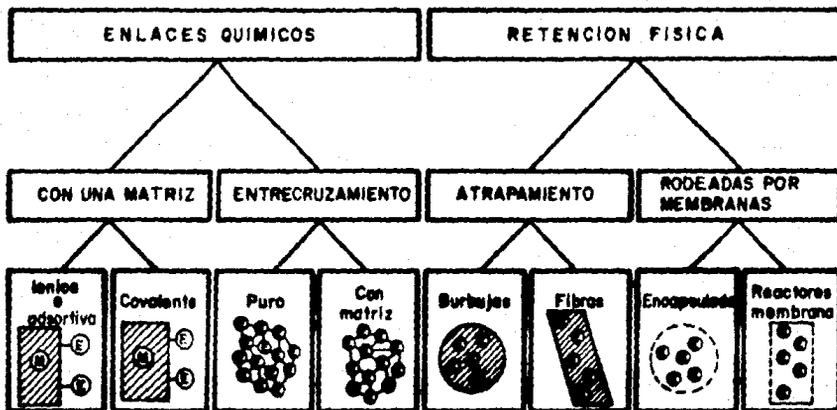


Figura 3. Resumen de las principales formas de inmovilización.

comportamiento diferente al observado cuando se encuentran en forma soluble.

Los métodos de enlace covalente y copolimerización de enzimas en soportes sólidos, algunas veces implican que el soporte mismo sea un componente del detector electroquímico. Este es el caso de la membrana de teflón de los electrodos de oxígeno o el bulbo de vidrio de los electrodos de pH. Los métodos de inmovilización físicos en geles, filtros o membranas son menos costosos y más simples que los de enlace covalente. En este último caso, es esperable que la enzima pueda sufrir pérdida de actividad en mucho mayor proporción que en el caso de los métodos de atrapamiento.

2.3.5. SELECCION DE SOPORTES

Una de las consideraciones básicas para la inmovilización de una enzima es la selección del soporte adecuado. En este proceso se deben tomar en cuenta los siguientes factores:

a) Propiedades mecánicas como son su rigidez y durabilidad para soportar agitación mecánica y compresión en caso de que el sistema lo requiera.

b) Forma física o su presentación; pudiendo ser gránulos, esferas, tubos, mallas, membranas, etc.

c) Resistencia al ataque químico y microbiano.

d) Alta hidrofiliidad.

e) La permeabilidad o capacidad del soporte para permitir la difusión de sustratos y productos a través del mismo.

f) Precio y disponibilidad.

2.4 MEMBRANAS ENZIMATICAS.

El diseño del primer electrodo enzimático (Clark y Lyons, 1962), se basó en el análisis electroquímico de sustancias por medio de enzimas atrapadas entre dos membranas. En este sistema, al menos una de ellas fué permeable a la sustancia que se requiere medir. La enzima o enzimas en contacto con su sustrato, producían o consumían una sustancia electroactiva que podía ser medida por medio de un electrodo polarográfico, potenciométrico o amperométrico (Grooms *et al.*, 1980).

A partir de este diseño, se ha descubierto que las membranas tienen una gran importancia en el diseño de electrodos enzimáticos y en general de electrodos biológicos. Algunas de las dificultades que se pueden presentar en el diseño de un electrodo enzimático pueden ser atenuadas con la utilización de una membrana con las características que resulten adecuadas en cuanto a material, espesor y tamaño de poro.

Entre las principales funciones de las membranas usadas en la construcción de electrodos se pueden listar las siguientes. (Clark, 1976):

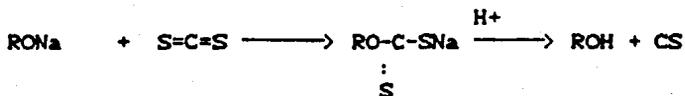
- a) Permiten que el electrodo este limitado por difusión
- b) Eliminan o disminuyen el efecto de la agitación.
- c) Sirven para excluir sustancias que interfieren la lectura.
- d) Eliminar el efecto de sustancias de alto peso molecular.
- e) Permiten la formación de una capa de reacción electroquímica, geoméricamente conocida o al menos fija y reproducible.
- f) Eliminan el efecto de sustancias oxidables o reducibles que pudieran interferir en la lectura.
- g) Controlan la cantidad de sustrato consumido por el electrodo.
- h) Controlan la velocidad de respuesta y linealidad del electrodo.
- i) Proporcionan un soporte o sustrato específico para la inmovilización de enzimas o cofactores.
- j) Permiten atrapar a una enzima o enzimas en virtud del peso molecular de estas.
- k) Proporcionan un exceso de actividad enzimática en una zona de reacción bien definida.

Empleando dos membranas entre las cuales se inmoviliza o atrapa una enzima o enzimas se construyen las membranas enzimáticas que pueden ponerse en contacto íntimo con un sensor para la detección de sustancias específicas.

Entre los materiales más usados para la fabricación de las membranas para inmovilizar ó atrapar enzimas se encuentran los derivados de celulosa.

El acetato de celulosa es un derivado de la celulosa. La celulosa tiene uniones glicosídicas que pueden romperse por la acción de los ácidos. Este tipo de rompimientos son los que permiten modificar sus propiedades y así obtener un polímero como el acetato de celulosa, el cual es barato y fácil de manipular (Morrison y Boyd, 1973). Este polímero (acetato de celulosa), es de gran importancia en múltiples áreas industriales y además es ampliamente usado en la construcción de membranas enzimáticas para electrodos biológicos.

El celofán es otro de los materiales importantes que se pueden emplear en la construcción de membranas enzimáticas. Este material a pesar de que se describe como "celulosa regenerada", está constituido por cadenas mucho más cortas que las de la celulosa. Esto se debe a una degradación de la celulosa por tratamiento alcalino. Su obtención es similar a cuando un alcohol es tratado con disulfuro de carbono e hidróxido de sodio, esta reacción forma un compuesto conocido como xantato:



De igual manera, la celulosa sufre una reacción que forma un xantato de celulosa soluble en álcali para finalmente dar una dispersión coloidal "viscosa" que precisamente recibe ese nombre. Al forzar esta solución a través de un filtro poroso a un baño ácido, se regenera la celulosa en forma de finos filamentos que dan un material conocido como rayón. Si en lugar del baño ácido se hace pasar a "viscosa" por una ranura estrecha, se regenera la celulosa en láminas delgadas que al tratarse con glicerol dan como resultado el celofán (Morrison y Boyd, 1973).

El acetato de celulosa y el celofán han sido dos materiales que se han perfeccionado y modificado para fabricar membranas que puedan cumplir los requerimientos en electrodos polarográficos y han sido patentados para estos fines.

2.5 OXIDOREDUCTASAS PARA ELECTRODOS ENZIMATICOS.

La importancia que actualmente representan las enzimas oxidoreductasas en bioanalítica se debe principalmente a que generan una sustancia, el peróxido de hidrógeno, el cual puede ser medido electroquímicamente. Al mismo tiempo, estas enzimas requieren el consumo de oxígeno como aceptor de los hidrógenos donados por el sustrato. El oxígeno también puede ser medido electroquímicamente (Clark, 1976).

Como consecuencia de la formación ó consumo de una especie electroactiva debido a la reacción enzimática, este tipo de enzimas han ayudado a que se simplifiquen los métodos electroanalíticos, aún cuando no todas las enzimas se han probado para electrodos enzimáticos; un resumen de las oxidasas que tienen uso potencial en electrodos polarográficos se presenta en la tabla 1. Las enzimas oxidoreductasas más empleadas para construcción de electrodos son: glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), para determinación de glucosa; galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9), para determinación de galactosa y lactosa; alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13), para determinación de alcohol; urato oxidasa (EC 1.7.3.3), para determinación de ácido úrico y colesterol oxidasa (EC 1.1.3.6), para determinación de colesterol. Las enzimas que no se han probado han sido por su limitación en relación a que requieren el uso de algún cofactor, lo cual las convierte en enzimas muy costosas.

2.6 ELECTRODO DE PEROXIDO DE HIDROGENO.

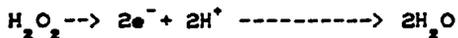
La primera medición de peróxido de hidrógeno en solución usando un electrodo con ánodo polarográfico fué reportada por Chance, en 1947. A este electrodo se le dió poca importancia para la determinación de peróxido hasta que su utilidad para la medición de los sustratos de las enzimas oxidoreductasas fué puesta en evidencia (Clark, 1962). Aún cuando para la determinación de peróxido de hidrógeno existen otros electrodos (de carbono y de oro, por ejemplo), el electrodo de platino (Pt) es el más comunmente usado.

Tabla 1. Oxidasas de uso potencial en electrodos enzimaticos

Sustrato	Enzima
Lactato	E. C. 1.1.3.2.
Malato	E. C. 1.1.3.3.
β -D-Glucosa	E. C. 1.1.3.5.
β -Naftil-carbonil	E. C. 1.1.3.7.
L-Galactonolactona	E. C. 1.1.3.8.
D-Xilosa	E. C. 1.1.3.10.
D-Glucosa	E. C. 1.1.3.11.
Piridoxina	E. C. 1.1.3.12.
β -Naftil carbinol	E. C. 1.1.3.--.
D-Xilopiranososa	E. C. 1.1.3.--.
N-Metilnicotinamida	E. C. 1.1.3.1.
Hipoxantina	E. C. 1.2.3.2.
Oxalato	E. C. 1.2.3.4.
Glioxilato	E. C. 1.2.3.5.
L-4,5 Dihidroorotato	E. C. 1.3.3.1.
Latosterol	E. C. 1.3.3.2.
D-Glutamato	E. C. 1.4.3.1.
L-Aminoacidos	E. C. 1.4.3.2.
D-Aminoacidos	E. C. 1.4.3.3.
Benzilamina	E. C. 1.4.3.4.
Fosfato de piridoxamina	E. C. 1.4.3.5.
Tiramina	E. C. 1.4.3.6.
D-Glutamato	E. C. 1.4.3.7.
Etanolamina	E. C. 1.4.3.8.
Spermidina	E. C. 1.4.3.aa
Sarcosina	E. C. 1.5.3.1.
N-metil-L-aminoacidos	E. C. 1.5.3.2.
N-metil-L-lisina	E. C. 1.5.3.4.
6-hidroxil-L-nicotina	E. C. 1.5.3.5.
6-hidroxil-D-nicotina	E. C. 1.5.3.6.
Nitroalifaticos	E. C. 1.7.3.1.
N-acetilindol	E. C. 1.7.3.2.
Hidroxilamina	E. C. 1.7.3.4.
Sulfito	E. C. 1.8.3.1.
2-Aminofenol	E. C. 1.10.3.4.
3-Hidroxiantranilato	E. C. 1.10.3.5.
Anion superoxido	E. C. 1.15.1.1

Clark, 1976.

El ánodo de platino en presencia de una especie electroactiva permite un flujo cercano a 1 V (contra un electrodo de referencia Ag/AgCl). El ánodo funciona como un aceptor de electrones y además, en contraste con el cátodo, constituye un electrodo de oxidación. La ecuación para la oxidación del peróxido de hidrógeno es la siguiente:



Aún cuando puede usarse un ánodo de platino grande, el flujo de corriente es dependiente de la velocidad con la que el líquido se mueve sobre la superficie del platino. Esto se conoce como el efecto de agitación que puede ser reducido ó eliminado haciendo mucho más pequeña el área de exposición. Sin embargo, conviene más eliminarlo usando membranas, debido a que normalmente las soluciones tienen que ser agitadas para garantizar la homogeneidad de la reacción y esto provoca el "efecto de agitación" (Clark, 1978).

Una limitación para la medición de H_2O_2 es la desaparición del mismo por reacciones no enzimáticas. Estas reacciones afectan la sensibilidad y la reproducibilidad del método. Por otra parte; la catalasa, enzima que es un contaminante común en preparaciones de oxidasas, también es fuente de error, aún en cantidades muy pequeñas. No obstante, los electrodos enzimáticos basados en peróxido de hidrógeno son muy comunes y todos los analizadores en el mercado Americano utilizan estos electrodos (Keyes et al, 1979).

2.7 DETERMINACION DE LACTOSA Y SACAROSA

El análisis cuantitativo de lactosa y sacarosa es muy importante a nivel industrial y tiene aplicaciones a nivel clínico. A nivel industrial, se trata de disacáridos ampliamente usados como constituyentes en las formulaciones de una gran cantidad de productos alimenticios. Además, son usados como sustratos en fermentaciones para la producción de metabolitos importantes en el área alimentaria y farmacéutica. Por otra parte, se ha encontrado que el 80% de pacientes con enfermedades relacionadas con tumores gastrointestinales malignos, excretan cantidades excesivas de al menos uno de estos dos disacáridos (Satch et al, 1978; Xu et al, 1990).

El análisis de estos azúcares se ha llevado a cabo comunmente

con métodos colorimétricos. Estos métodos, en general, son realizados por calentamiento en solución acuosa del disacárido con un ácido fuerte, convirtiéndose en furfural o en un derivado de furfural. El color desarrollado es producido por adición de un compuesto orgánico como el indol, orcinol, difenilamina o carbazol. No es objeto de este trabajo describir cada técnica convencional para medición de lactosa y sacarosa. Baste conocer que existen técnicas como la del carbazol (Gurin y Hood, 1939), basada en la reacción de Dische, el método de cisteína- H_2SO_4 reportado originalmente por Dische 1949, reacción de antrona reportada por Dreywood en 1946, el método del arsenomolibdato o de Nelson (Klein y Weissman, 1953), método del ferricianuro de Park y Johnson, 1944, método del DNS (ácido dinitrosalísílico), reportado por Summer y Howell, 1935.

No obstante la existencia de estos métodos, el análisis de lactosa y sacarosa en muestras complejas presenta problemas, ya sea en la identificación específica del azúcar o bien cuando se encuentran en bajas concentraciones. Estos problemas han mantenido latente la necesidad de desarrollar mejores métodos y técnicas capaces de medir lactosa y sacarosa. En este trabajo se pretende la construcción de un electrodo enzimático como método para determinación de lactosa y sacarosa, por las múltiples ventajas que representa el uso de estos dispositivos. Para el desarrollo de este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

CAPITULO 3

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Construcción y caracterización de un electrodo enzimático para determinación de los disacáridos lactosa y sacarosa.

Objetivos particulares

Desarrollo de la(s) metodología(s) de inmovilización y/o coinmovilización de enzimas para la determinación específica de los disacáridos lactosa y sacarosa.

Evaluación del principio funcional del sistema electroenzimático empleando un sensor electroquímico sensible a H_2O_2 .

Estudiar las características de respuesta de electrodo enzimático para cada uno de los disacáridos en estudio.

Analizar la eficiencia del electrodo enzimático en relación con los métodos convencionales para medición de estos disacáridos.

CAPITULO 4
MATERIALES Y METODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 REACTIVOS

Durante el desarrollo de la parte experimental se emplearon los reactivos que se listan a continuación:

<u>Nombre comercial</u>	<u>Procedencia</u>
Acetato de celulosa	Fluka, A. G., Suiza
Acetona	J. T. Baker
Acido dinitrosalicilico	Kodak, S. A.
Adhesivos:	
Acryfix	
(acrílico polimerizable sin solventes)	Stabilit
Apoxbond	Grupo PEGA, S. A.
Kola loca	Grupo CIANOMEX, S. A.
Permabond 101	
(cianoacrilatos)	Grupo PEGA, S. A.
Permabond 104	
(cianoacrilatos)	Grupo PEGA, S. A.
Permabond 747	
(cianoacrilatos)	Grupo PEGA, S. A.
Resilikon	
(sellador de silicón)	Industrias Resistol
Resistol 5000	Industrias Resistol
Superglue	Loctite Corporation
Tangit	
(pegamento especial para tubos de PVC)	Henkel, S. A.
Anillos de hule	
("O" rings)	Electro-Morelos
Ferricianuro de potasio	J. T. Baker
Ferrocianuro de potasio	J. T. Baker
Fosfato de potasio monobásico	J. T. Baker
Fosfato de potasio dibásico	J. T. Baker
Hidróxido de sodio	J. T. Baker
Membranas de celofán	International

Membranas de diálisis (corte 8000, espesor 9 μm)	Spectrapor
Membranas de diálisis benzoiladas (corte 2000)	Sigma Chemical Co.
Lactosa	Sigma Chemical Co.
2-propanol	J. T. Baker
Sacarosa	Merck, S. A.
Tartrato de sodio y potasio	J. T. Baker

4.1.2. EQUIPO

El equipo utilizado en este trabajo consistió principalmente en lo siguiente:

<u>Equipo</u>	<u>Especificación</u>
Agitador magnético	Corning Stirrer PC-353
Analizador enzimático	YSI, modelo 27-A
Balanza analítica	Bosh, S-2000
Colorímetro	Spectronic 20, Bausch & Lomb Co.
Graficador múltiple	Linseis, TYP 7045
Sensor electroquímico (Pt)	YSI, para detección de H_2O_2
Medidor de pH potenciómetro	Corning, Co. modelo 125

4.1.3. ENZIMAS.

Para la determinación específica de los sustratos lactosa y sacarosa se emplearon las enzimas listadas a continuación:

<u>Enzima</u>	<u>Procedencia</u>
β -galactosidasa	Sigma Chemical Co. (G 2513)
Glucosa oxidasa	Sigma Chemical Co. (G 8135)
Galactosa oxidasa	Sigma Chemical Co. (G 3385)
Invertasa	Sigma Chemical Co. (I 4753)
Mutarotasa	Sigma Chemical Co. (M 5526)

4.1.4. MEMBRANAS

<u>Soporte</u>	<u>Procedencia</u>
Membranas de diálisis benzoiladas	Sigma Chemical Co.
Membranas de diálisis	Spectrapor
Membranas YSI	YSI

Membranas fabricadas en el laboratorio a partir de:

Acetato de celulosa

Fluka, A.G., Suiza

4.2 METODOS

4.2.1 TECNICAS ANALITICAS

4.2.1.1. DETERMINACION DE LACTOSA Y SACAROSA.

(método convencional).

El método analítico convencional para la determinación de lactosa y sacarosa que fué usado para llevar a cabo el análisis comparativo con el electrodo fué el método del DNS (ácido dinitrosalicílico). Está basado en la reducción del ácido dinitrosalicílico por los azúcares reductores presentes en una solución acuosa. Esta reducción genera un compuesto nitroaminado el cual presenta color. El color desarrollado es amarillo y puede ser cuantificado en un espectrofotómetro, donde la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de grupos reductores.

PROCEDIMIENTO (Summer y Howell, 1935).

El reactivo DNS requiere ser preparado de acuerdo al procedimiento siguiente; se pesan 10 g del DNS, 16 g de NaOH y 300 g de tartrato de sodio y potasio. En un matraz aforado de un litro se agregan 500 ml aproximadamente de agua destilada y se disuelven los reactivos anteriores en el siguiente orden: hidróxido de sodio, tartrato de sodio y potasio y al final agregándose lentamente, el DNS. Una vez agregado todo el DNS se afora a un litro con agua destilada y se calienta ligeramente para alcanzar la disolución total. El reactivo preparado se debe guardar en frasco ámbar en refrigeración a 4°C. Bajo estas condiciones el reactivo tiene una vida media de 30 días.

El procesamiento de muestras con lactosa y sacarosa se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento siguiente:

1. - En tubos de ensaye de 10 x 15 mm. se preparan diluciones de las muestras problema (1/20).

2. - De las muestras problema diluidas se toma un mililitro y se transfiere a nuevos tubos de ensaye de 10 x 15 mm. y en los cuales se agrega un mililitro del DNS.

3.- Los tubos de ensaye con la mezcla del DNS y muestra problema se llevan a ebullición durante 5 min. Los tubos requieren ser tapados para evitar la evaporación de la muestra o la entrada del agua de ebullición.

4.- Una vez transcurridos los 5 minutos en ebullición los tubos se sacan del baño y se les agrega 10 ml de agua destilada, se mezclan y se dejan reposar durante 15 minutos.

5.- En cada procedimiento se requiere la construcción de una curva patrón ya sea con las soluciones de lactosa o con sacarosa. Para la curva patrón se prepara una solución con 2 mg/ml. De esta solución se toman alícuotas con tubos de ensaye para generar una curva patrón que incluya las concentraciones de, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2 y 2 mg/ml. Es necesario tener un blanco de reactivos con 1 ml de agua destilada y 1 ml de DNS.

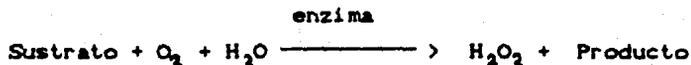
6.- Una vez agregados los 10 ml de agua destilada y reposados por 15 minutos, los tubos se leen a 540 nm en el espectrofotómetro contra el blanco de reactivos.

4.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Para establecer los procedimientos experimentales de este trabajo fué necesario un análisis previo de las principales características que debían satisfacerse en el diseño y construcción del electrodo enzimático. Se consideraron dos elementos importantes: las características del sistema electrónico de transducción-medición y la inmovilización de las enzimas.

4.3.1. SISTEMA DE MEDICION

El sistema de medición o detección de la señal química define en gran medida desde el mecanismo o forma de inmovilización, debido a que la forma del sensor y sus principales aditamentos determinan algunas veces, incluso los materiales que pueden ser usados en el proceso. El sistema sensor consistió de un electrodo de platino (Pt), el cual es sensible al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado en la reacción enzimática:



El sensor, junto con su sistema de ajuste y despliegue de la

lectura fué uno comercial, el analizador YSI 27-A (Yellow Springs Instruments), el cual despliega las lecturas después de inyectar las muestras problema en su cámara de inyección (ver figura 4). De acuerdo a las características del YSI 27- A, fué necesario adecuar tres parámetros: 1) membranas a usar para la inmovilización, 2) anillos de hule y 3) adhesivo a emplear.

Con respecto a los anillos de hule y membranas, estos no representaron gran problema. Sin embargo, en el caso del adhesivo, fueron necesarias muchas pruebas preliminares para la selección final del mismo. El adhesivo tenía que cubrir el requisito principal de mantener unidas las membranas entre sí, así como de éstas con el anillo de hule, todo ello en condiciones de alta humedad. El anillo de hule es un elemento importante para garantizar que las membranas enzimáticas se ajusten perfectamente a la superficie del sensor de platino (ver figura 5).

4.3.2 SELECCION DEL ADHESIVO

La selección del adhesivo para el pegado de membranas y anillo de hule fué llevado a cabo mediante la prueba de algunos de los más conocidos comercialmente (ver tabla 2).

Finalmente, se encontró que los pegamentos adhesivos conteniendo ésteres de cianoacrilatos fueron los más adecuados para el pegado entre membranas y de éstas con el anillo de hule. Los principales adhesivos fabricados en base de cianoacrilatos que se probaron fueron "Permabond 747", "Permabond 107" y "Permabond 101". Cabe mencionar que estos pegamentos no se encuentran en el mercado público. El que se usó finalmente fué el "Permabond 101" debido a su rapidez de secado (20 segundos) y a que no pierde su característica de adhesivo aún bajo condiciones drásticas de agitación en medios acuosos.



Figura 4. Características del sensor y auxiliares en la construcción del electrodo enzimático.

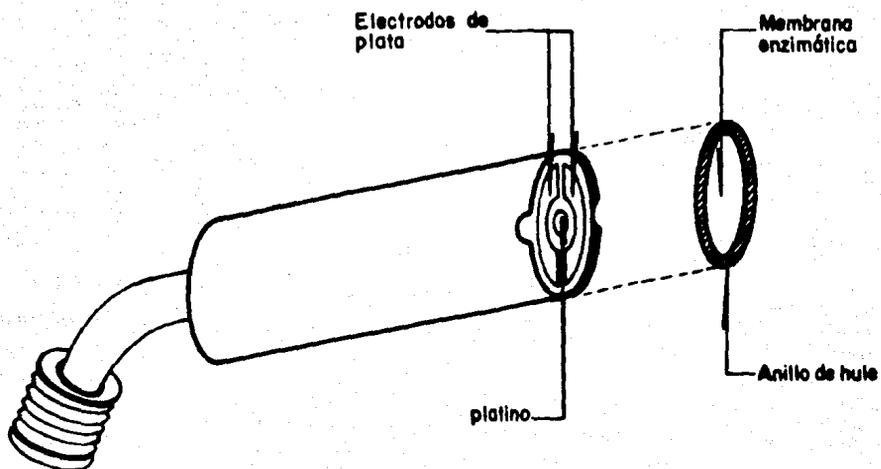


Figura 5. Diagrama de componentes del sensor y adaptacion de las membranas enzimaticas en su respectivo anillo de hule usado como soporte.

Tabla 2. Adhesivos probados durante la construcción de las membranas enzimáticas.

Nombre del adhesivo	Observaciones	Características en la construcción de membranas enzimáticas
Apoxibond	De facil hidratacion perdida de dureza.	Malo
Resilikon	Poco resistente; sellado no homogeneo y lento; muy facil de romper	Malo
Acryfrix	Fraguado lento y facil de hidratar	Malo
Kola Loka	Disuelve las membranas	Malo
Resistol 5000	Pegado heterogeneo y facil de hidratar	Malo
tangit	Sujeta mas que pega y facil de hidratar	Malo
Permabond 747	Pegado lento	Regular
Permabond 107	Bueno pero pegado lento	Regular
Permabond 101	Bueno	Bueno

4.3.3 SELECCION DE MEMBRANAS

En este sistema se requieren dos membranas; una que funciona como membrana interna, en contacto íntimo con el sensor y otra como membrana externa, en contacto con la solución de medición.

Por esta razón, la selección de las membranas fue un proceso que requirió garantizar que las membranas a usar fuesen adecuadas para controlar la respuesta del electrodo por limitación difusional. Además de lo anterior, estas membranas debían ser lo suficientemente selectivas para eliminar la interferencia de algunas sustancias como el ácido ascórbico, el ácido úrico, el ferrocianuro de potasio y otros. Adicionalmente, estas membranas debían ser adecuadas para mantener atrapadas o inmovilizadas las enzimas.

El criterio de selección de las membranas se basó inicialmente en pruebas con arreglos de las membranas sin enzimas, montadas en la superficie del sensor. Estos arreglos fueron evaluados en base a su espesor y a su capacidad de eliminar el paso de algunas sustancias que alteran la lectura del sensor.

Para seleccionar la membrana externa fueron probadas diferentes membranas de varios espesores: membranas de diálisis (spectrapor) SPC 1 con $18.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ de espesor, tubos de diálisis benzoilados con $27 \pm 0.9 \mu\text{m}$ de espesor, celofán $20.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$ de espesor, YSI (membrana usada en el bloque de temperatura del YSI 27-A) con $28.2 \pm 0.6 \mu\text{m}$ de espesor, polietileno con $39.6 \pm 1.9 \mu\text{m}$ de espesor. El espesor de estas membranas y los fabricados en el laboratorio fue determinado mediante el método de comparación de patrones en el Departamento de Metrología del Centro de Instrumentos (UNAM). Cada una de estas fue probada para garantizar un control de la respuesta del electrodo por limitación de la difusión de los sustratos y productos.

En el caso de la membrana interna requiere tener un espesor de entre 2 y 6 μm . Sin embargo, en el mercado difícilmente se encuentran membranas de acetato de celulosa con un espesor menor a 10 μm . Por esta razón, fue necesario fabricarla en el laboratorio debido a que requería un tamaño de poro que garantizara que difundiría a través de ella solo pequeñas moléculas cuyo tamaño fuese comparable al peróxido de hidrógeno (Taylor et al., 1977).

4.3.4 TÉCNICA DE FABRICACION DE LA MEMBRANA INTERNA

La técnica utilizada para fabricar la membrana de acetato de celulosa es una modificación de la técnica reportada por Taylor et al., (1977). La técnica es muy similar y sólo existen diferencias en los solventes requeridos para la fabricación de estas membranas.

Para la construcción de membranas de acetato de celulosa fué preparada una solución conteniendo aproximadamente 4% de acetato de celulosa (Fluka, A.G., Suiza) en ciclohexanona-acetona (1:1 v/v) y dejada en agitación (200 rpm) durante 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, de esta solución se tomaron alícuotas de 500 μ L y se depositaron cuidadosamente en recipientes cuyo diámetro es 9.8 cm, conteniendo agua destilada y dejadas en reposo durante 15 minutos con el fin de permitir la evaporación de los solventes. Una vez evaporados completamente los solventes (curado), las membranas formadas en la superficie del agua, se recuperan mediante el uso de una lámina de polietileno y se secan al aire (2 horas) en un medio libre de polvo (figura 8). Estas membranas presentan un espesor de $3.8 \pm 0.5 \mu$ m y se usan como membrana interna.

Tanto para la construcción de las membranas enzimáticas para determinar lactosa como para determinación de sacarosa se emplean procesos de inmovilización muy similares. Sin embargo, existen algunos aspectos importantes para la adecuada construcción de cada una de estas.

4.4 INMOVILIZACION DE ENZIMAS

4.4.1 MEMBRANA ENZIMATICA PARA LACTOSA

Para la construcción de la membrana enzimática para determinación de lactosa se emplean las siguientes enzimas:

Galactosa oxidasa tipo LV, de *Dactylium dendroides* (E.C. 1.1.3.9, 450U), β -galactosidasa, glucosa oxidasa.

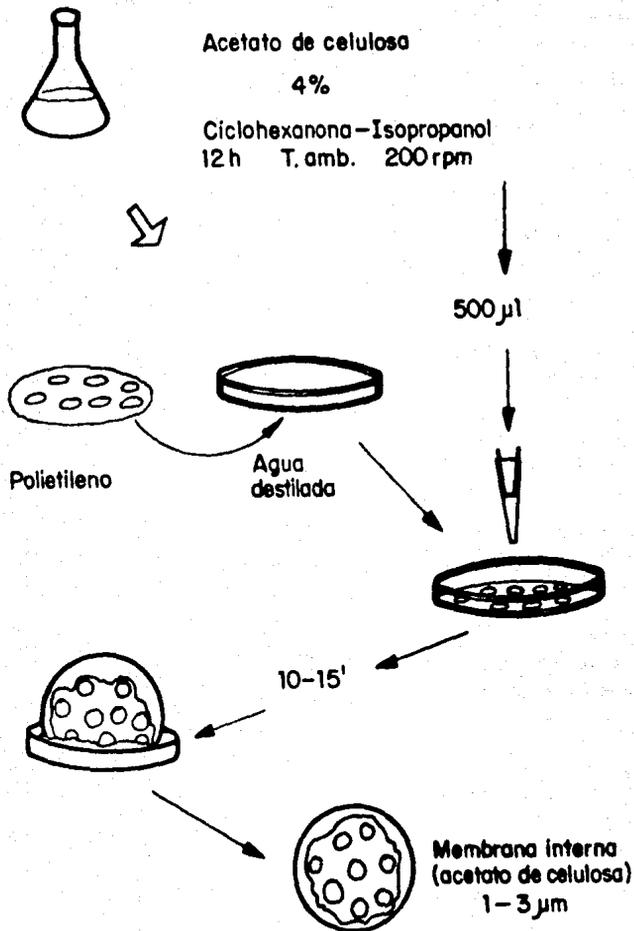
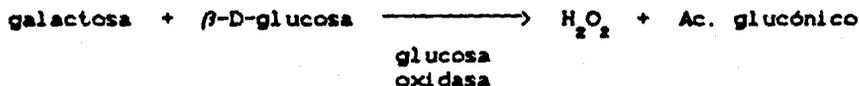
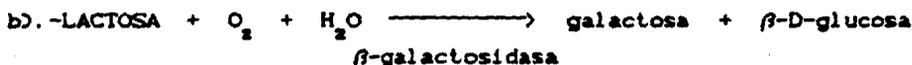
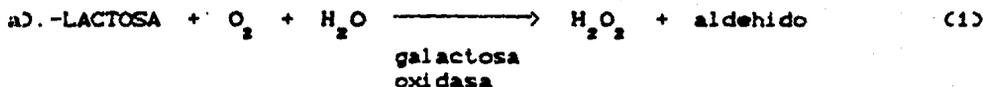


Figura 6. Método de fabricación de membranas de acetato de celulosa usadas como membrana interna en las membranas enzimáticas para detección de lactosa.

El principio de medición de lactosa está fundamentado en la hidrólisis de esta, la cual puede llevarse a cabo a través de dos mecanismos:



El proceso de inmovilización de las enzimas se llevó a cabo siguiendo las etapas siguientes:

- a). - Pegado de "O" rings a la membrana externa.
- b). - Inmovilización de la capa enzimática
- c). - Pegado de la membrana interna.

a). - PEGADO DE "O" RINGS (ANILLOS DE HULE), A LA MEMBRANA EXTERNA.

La membrana externa está constituida por una membrana de celofán de $20.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$ de espesor. El proceso de pegado de los anillos de hule a la superficie de la membrana se realiza manteniendo inmóvil el anillo por medio de jeringas hipodérmicas en cuyas agujas se sujeta. En estas condiciones, el anillo se puede manejar fácilmente y de esta manera se moja su superficie en el adhesivo (previamente colocado en una superficie lisa y libre de polvo). El anillo con el adhesivo es llevado inmediatamente después al celofán en donde se coloca ejerciendo ligera presión con las mismas agujas sujetadoras. Previamente, el celofán debe ser sometido a un proceso de "estiramiento en húmedo", con el cual se evita la formación de pliegues o "arrugas" en su superficie. Este proceso fue llevado a cabo con un dispositivo construido especialmente para este propósito (ver secuencia en la figura 7).

b). - INMOVILIZACION DE LA CAPA ENZIMATICA.

Las enzimas que se utilizaron para la determinación de lactosa fueron inmovilizadas por atrapamiento físico, es decir, sin la

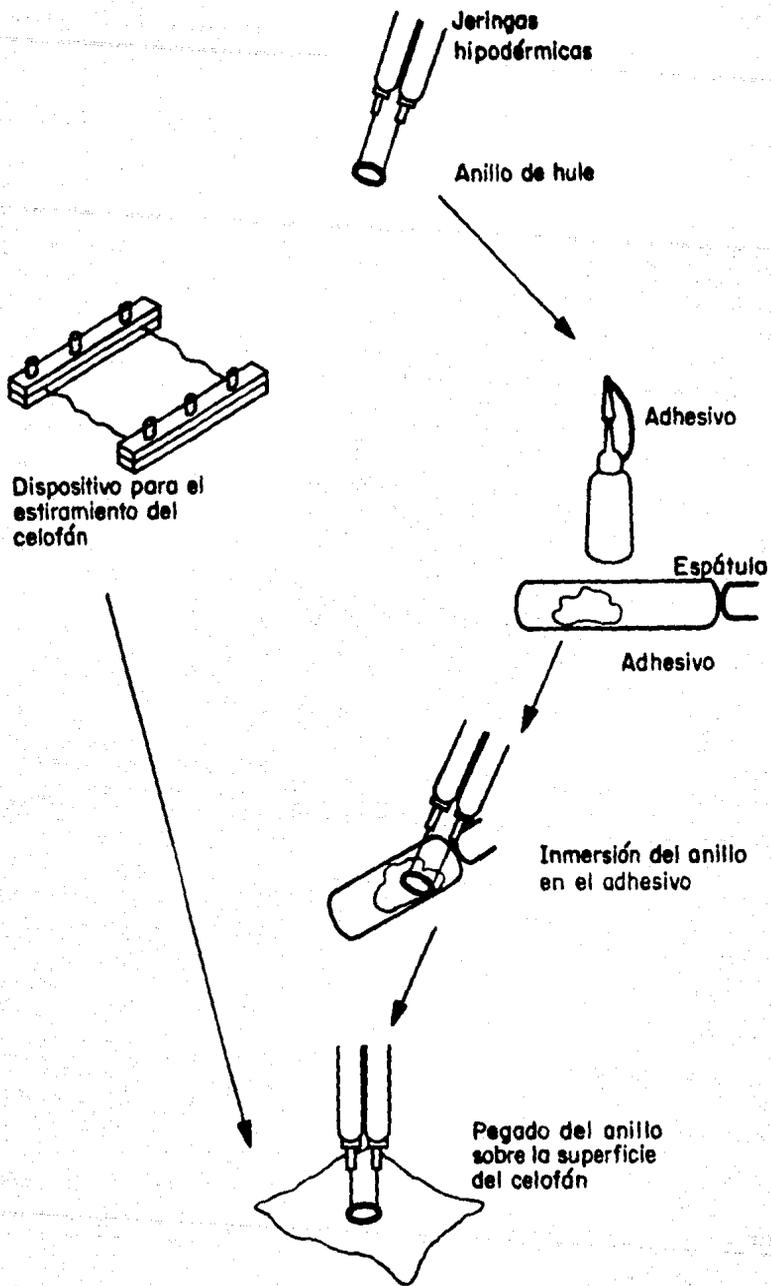


Figura 7. Procedimiento para el pegado de anillos de hule sobre la superficie de la membrana externa (celofán).

participación de agentes químicos. Inicialmente se probaron en forma liofilizada, sin embargo presentaron problemas de baja solubilidad y de la presencia de burbujas en la membrana enzimática. Finalmente, el procedimiento de inmovilización de las enzimas β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) de *Escherichia coli* y glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4) de *Aspergillus niger* se llevó a cabo simplemente colocándolas en forma soluble.

Ambas enzimas fueron pesadas y solubilizadas en un mismo vial con 100 μ L de un amortiguador de fosfatos 0.2M pH 6.9. De la solución enzimática (β -galactosidasa, y glucosa oxidasa), se toman con una micropipeta, diferentes volúmenes (2,4,6,8 y 10 μ L). Estos se colocan en la superficie del celofán previamente pegado en un anillo de hule. Estas condiciones se mantienen durante 2 horas aproximadamente a temperatura ambiente (25°C) hasta que se evapore el amortiguador.

c). - PEGADO DE LA MEMBRANA INTERNA.

Una vez que se ha evaporado el amortiguador, se sujeta el anillo de hule (con pinzas de cirugía), para depositar una ligera capa de adhesivo en la orilla que corresponde con el anillo. Inmediatamente después, se coloca la membrana interna de acetato de celulosa. El pegado de esta membrana requiere el uso de un dispositivo fabricado especialmente para evitar que la membrana presente arrugas y además evitar que el pegamento se escurra sobre las enzimas (ver secuencia en la figura 7).

De esta forma queda lista la membrana enzimática que para el caso de lactosa está constituida por una membrana externa (celofán) 20.4 \pm 0.7 μ m de espesor y una membrana interna (acetato de celulosa), 3.6 μ m de espesor) entre las cuales se encuentran atrapadas las enzimas. La membrana externa quedará en contacto con la solución problema y la membrana interna en contacto con el sensor de peróxido de hidrógeno (ver figura 8).

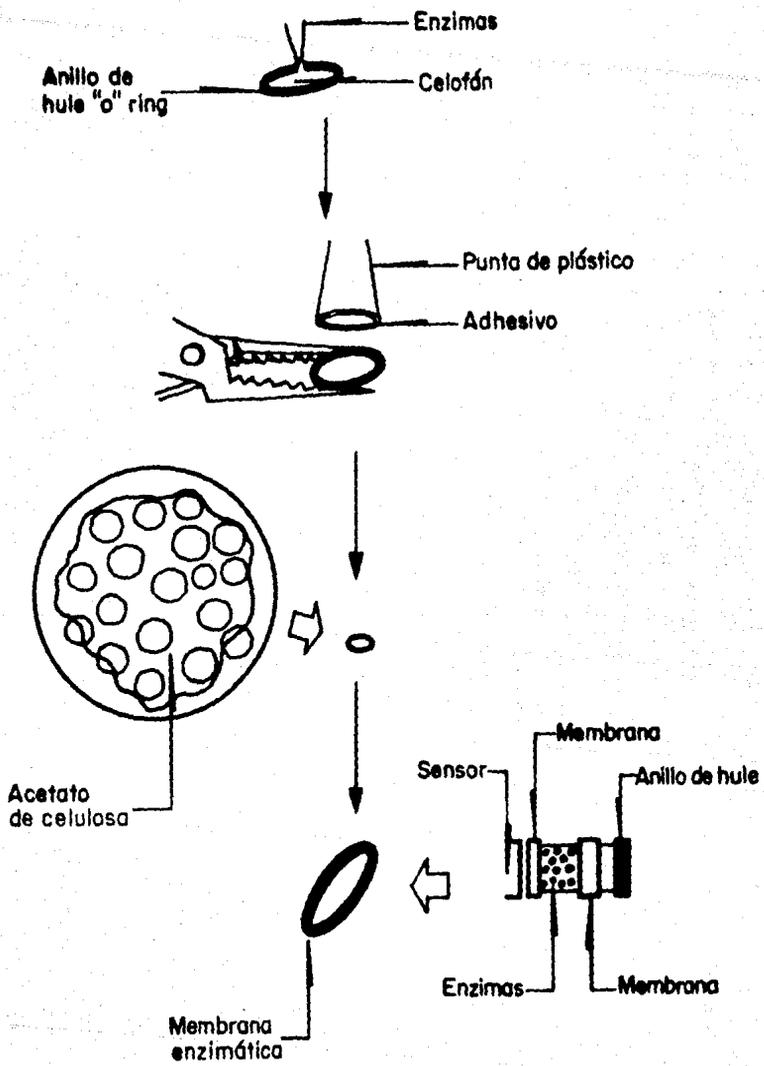
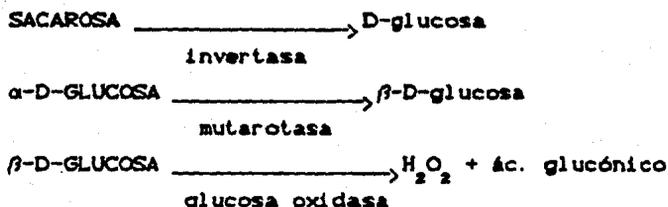


Figura 8. Secuencia seguida en el pegado de la membrana interna.

4.4.2. MEMBRANA ENZIMATICA PARA SACAROSA

En este caso, las enzimas que se emplearon fueron: invertasa, mutarotasa y glucosa oxidasa. El método de fabricación de esta membrana con tres enzimas requirió, al igual que el de la lactosa, de una membrana externa de celofán la cual fué pegada al anillo de hule con el mismo procedimiento descrito para el caso de lactosa.

El principio de medición de estas membranas enzimáticas se basa en la medición de la reacción final de tres enzimas, catalizando su conversión hasta H_2O_2 , de acuerdo a la secuencia siguiente:



En este caso la membrana interna no fué de acetato de celulosa, debido a que las pruebas con este material indicaron que el sistema parecía estar controlado por la reacción enzimática. Debido a esto, se probó un sistema celofán-celofán que fué el que dió mejores resultados.

Las enzimas fueron pesadas por separado y solubilizadas en un amortiguador de acetatos, pH 6, 0.1 M. El proceso de atrapamiento se llevó a cabo depositando cada enzima por separado y dejando evaporar el amortiguador antes de colocar la enzima siguiente. Ambas membranas enzimáticas, tanto para determinación de lactosa como de sacarosa, fueron almacenadas en viales de plástico y en refrigeración hasta su utilización.

4.5 OPERACION DEL SISTEMA DEL ELECTRODO ENZIMATICO

El ensamblaje final del sistema se lleva a cabo colocando las membranas enzimáticas en contacto con el transductor de platino sensible a peróxido de hidrógeno.

En la figura 0 se observa como el transductor (sensor) con la membrana enzimática previamente adaptada, se conecta al sistema de

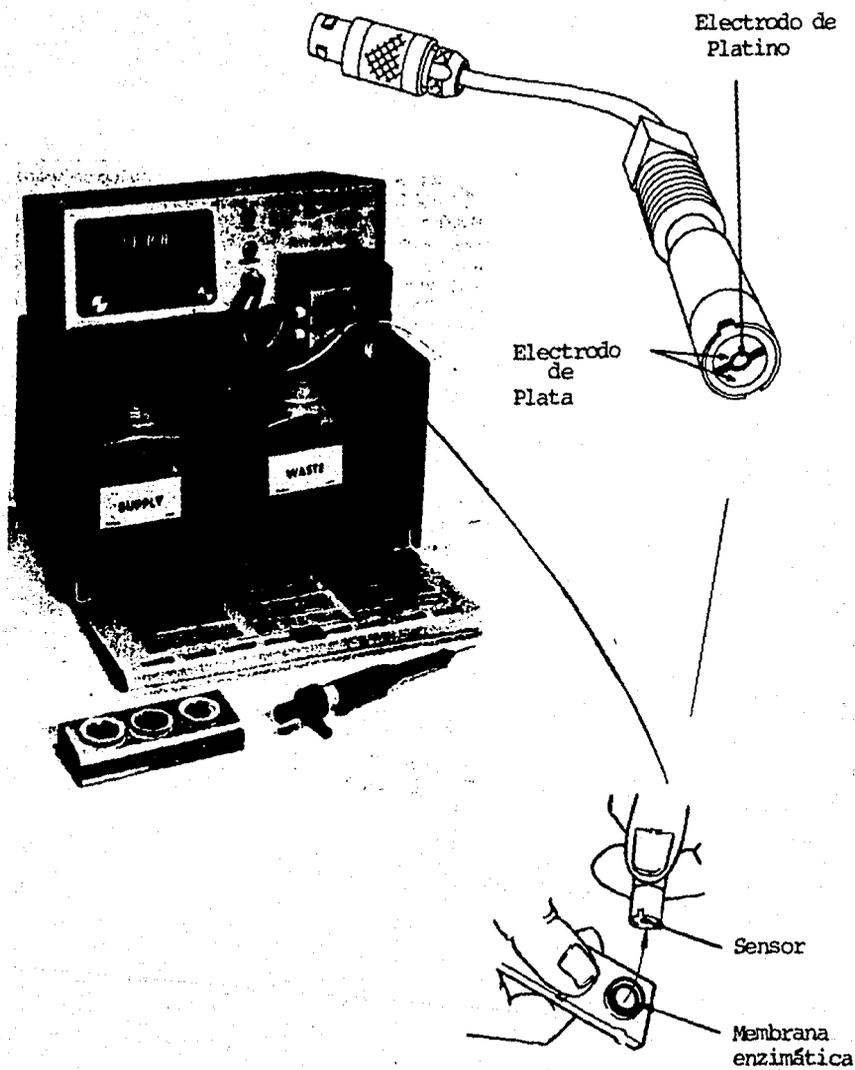


Figura 9. Colocación de la membrana enzimática y adaptación al sistema YSI 27 A.

registro (YSI 27-A), el cual proporciona una lectura en mg/dL. Debido a que las enzimas requieren de una temperatura adecuada para su funcionamiento, es necesario un sistema de control de temperatura, el cual está integrado en el analizador Yellow Spring y proporciona una temperatura de 37°C, pudiendo ser empleado a 27°C para algunas determinaciones que así lo requieren.

El sistema cuenta con una cámara de medición que tiene un volumen aproximado de 350 µl. En esta cámara y por medio de un puerto de inyección, se administran 25 µL de la solución problema (ver figura 10). La agitación se proporciona por medio de una membrana de silicón permeable al oxígeno, la cual es movida mecánicamente a un pulso por segundo mediante una bomba de aire tipo pecera. Esta misma bomba es la que garantiza la eliminación del amortiguador usado, llevándolo a un recipiente de desecho y tomando amortiguador limpio de un recipiente alimentador.

El sistema cuenta con un indicador luminoso en el despliegue, para señalar la operación que se encuentra realizando el usuario. Anexo a la pantalla de despliegue, el dispositivo cuenta con dos potenciómetros, uno para el ajuste a cero y que además indica cuando el sistema está listo para recibir la inyección de las muestras y otro para calibrar la membrana, de acuerdo a una solución patrón de calibración. El tiempo de análisis es de un minuto por muestra y de 40 segundos en el lavado.

4.5.1 CURVAS DE RESPUESTA

Las curvas de respuesta se obtienen tanto para la lactosa como para sacarosa al inyectar en el analizador (en cuyo sensor se ha colocado una membrana enzimática específica para uno u otro de estos sustratos), una serie de concentraciones en un rango de 0-900 mg/dL y de 0-1000 mg/dL, respectivamente. El perfil observado es la generación de peróxido de hidrógeno por la reacción enzimática, los perfiles de las curvas de respuesta son obtenidos gráficamente por adaptación a un sistema graficador.

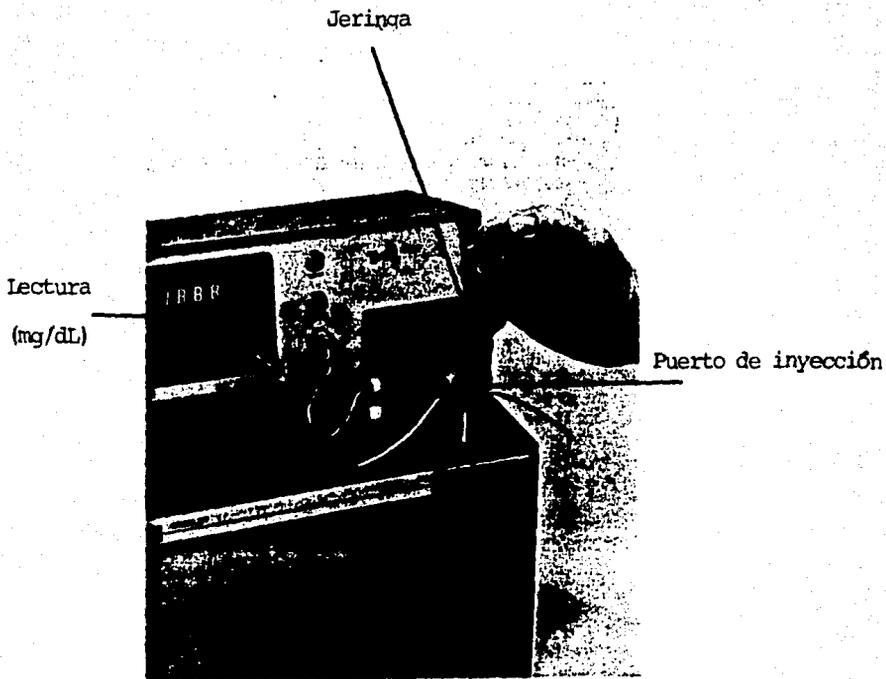


Figura 10. Vista frontal del analizador y su puerto de inyección de la muestra.

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 DETERMINACION DE LACTOSA

5.1.1 SELECCION DE SOPORTES PARA INMOVILIZACION

El principio de medición de lactosa está basado en la medición del H_2O_2 producido en alguna de las reacciones empleando galactosa oxidasa o bien β -galactosidasa y glucosa oxidasa.

El primer objetivo fué la selección de los soportes a utilizar para la inmovilización de las enzimas. Los principales parámetros considerados para la selección del soporte fueron; en primer lugar, que el soporte fuese permeable al sustrato (lactosa) o bien al principal producto que se requiere cuantificar después de la reacción, el peróxido de hidrógeno. Como segundo requisito importante que debía de cubrir el soporte, es que fuese adecuado tanto para limitar difusionalmente la respuesta del electrodo enzimático, como para evitar el paso de sustancias polarográficamente oxidables que interfieren en la lectura del sensor. Una consideración previa a la selección del soporte, fué la presentación física en que debía ser usado para lograr un buen acoplamiento con el sensor de Pt, una vez que se hubiesen inmovilizado las enzimas. El sistema comercial (Yellow Spring Instruments 27-A), emplea un arreglo de membranas que consiste de una membrana interna de acetato de celulosa y una membrana externa de policarbonato. Entre estas membranas se encuentran inmovilizadas las enzimas específicas para el sustrato. Como resulta obvio, el fabricante no especifica ni el espesor de cada una de las membranas, ni el método de inmovilización y mucho menos la cantidad de enzima empleada. Por estas razones se llevaron a cabo pruebas con algunos materiales que podrían ser usados como soporte, en base a que presentaban distintos espesores para la difusión libre de sustratos y productos (Tabla 3). Los materiales seleccionados fueron: tubos de diálisis benzoilados, membranas de diálisis "Spectrapor", y celofán del que se emplea en trabajos de odontología. Para definir cual de estos materiales podía emplearse en la construcción de las membranas enzimáticas y debido a que no se midió el tamaño de poro, se planteó una estrategia que permitió, además de establecer su funcionalidad como soporte enzimático, determinar su capacidad para limitar la difusión de

Tabla 3. Espesor de las membranas seleccionadas para ser usadas como soporte.

TIPO DE MEMBRANA	Valor medio (μm)	Incertidumbre (μm)
Tubos de diálisis	27	± 0.9
Spectrapor	18.6	± 0.7
Odontología	20.4	± 0.7
Poliétileno	39.6	± 1.9
Celofán 2	27.6	± 0.7
YSI	26.2	± 0.6
Acetato de celulosa (laboratorio)	3.6	± 0.3

moléculas o sustancias que alteran la lectura del sensor.

La estrategia mostrada en la figura 11, consistió en las pruebas (para uso como membrana externa) de cada membrana individualmente y en combinación con acetato de celulosa (membrana interna). Antes de la inmovilización de las enzimas se utilizó una proteína testigo sin actividad (albúmina) atrapada entre las dos membranas. Cada una de estas combinaciones se montaron en el sensor y se probaron, ferricianuro de potasio y ferrocianuro de potasio en concentraciones de 1,2,4 y 8 mg/dL y ácido urico en concentraciones de 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/dL. En todos los casos el dispositivo fué calibrado con agua destilada ajustando la sensibilidad a un valor de cero y así evaluar los efectos de cada sustancia. Algunos autores como, Aldons Farrance, (1981), Sostman (1981) reportan estas sustancias como las que más interfieren la lectura del sensor de H_2O_2 . El rango de concentración probado para cada una de ellas considera, dos concentraciones por debajo de la concentración normal que se puede encontrar en una muestra problema y una concentración alta. En la figura 12 se presentan los perfiles obtenidos con cada una de las membranas montadas en el sensor. Cada membrana se montó por separado, estando el analizador en programa automático; es decir, con tiempo de respuesta limitado a 1 minuto. Las lecturas significan la concentración desplegada en el analizador al inyectar cada concentración de ferricianuro de potasio.

Se definen dos grupos de membranas; A) Las que limitan adecuadamente el efecto del ferrocianuro, sobre el sensor "Spectrapor 1", "Spectrapor" 2 y los tubos de diálisis benzollados y B) aquellas que no son adecuadas para limitar el efecto de la difusión de esta molécula sobre el sensor: celofán y acetato de celulosa. En vista de estos resultados y por las características de las membranas del grupo A, es evidente que el espesor presenta una influencia importante en su capacidad para limitar el efecto de las sustancias que interfieren en las lecturas del sensor. En las membranas del grupo B, el celofán que tiene un espesor de $20 \pm 0.7 \mu m$, se esperaba que se comportara como las membranas del grupo A. En este caso se asume que el diámetro de poro, también es un parámetro importante para limitar los efectos de estas moléculas sobre el sensor. En la figura 13 se observan los perfiles de respuesta a ferrocianuro de potasio de cada membrana. Aquellas del grupo A se presentan sin cambios notables, es decir, continúan

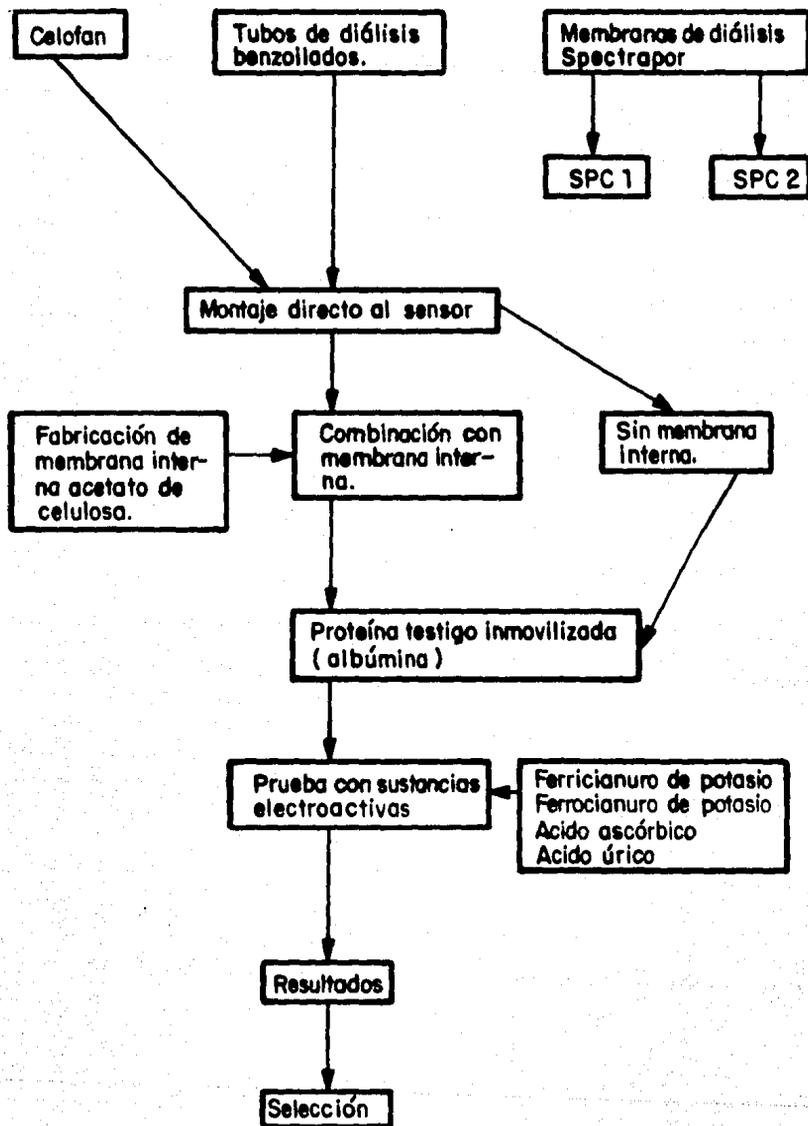


Figura 11. Estrategia para la selección de membranas internas y externas en la construcción de membranas enzimáticas.

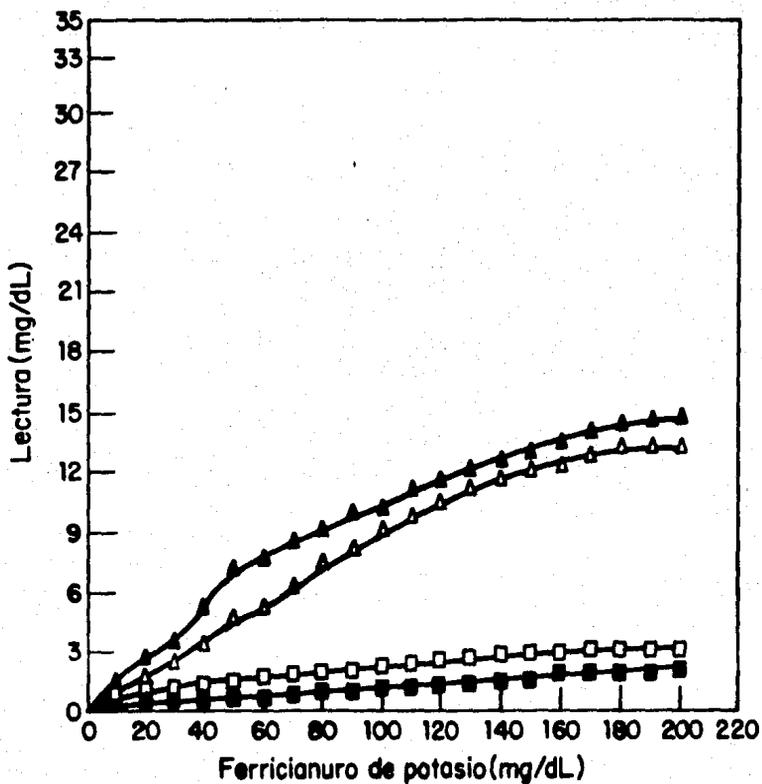


Figura 12. Perfiles de respuesta obtenidos con cada membrana al inyectar ferricianuro de potasio; (Δ) celofán, (▲) acetato de celulosa, (□) Spectrapor, (■) Tubos de diálisis benzoidados.

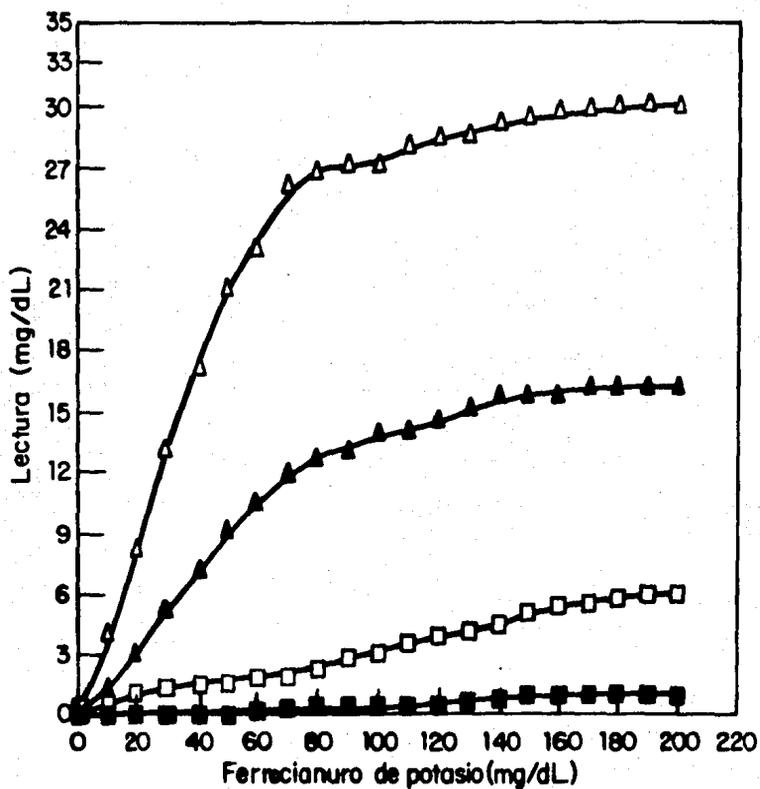


Figura 13. Perfiles de respuesta obtenidos con cada membrana al inyectar ferrocianuro de potasio; (Δ) celofán, (▲) acetato de celulosa, (□) Spectrapor, (■) Tubos de diálisis benzoilados.

presentando el comportamiento observado en el caso de la inyección de ferricianuro. Sin embargo, en las membranas del grupo B, el acetato de celulosa resultó mejor que el celofán, observándose que el efecto del ferrocianuro es más reducido por el acetato de celulosa.

Las otras dos sustancias que interfieren de manera importante en la lectura del sensor son el ácido úrico y el ácido ascórbico. En la figura 14 se pueden observar los perfiles que presentaron las diferentes membranas al inyectar ácido úrico. Tanto la membrana de celofán como la de acetato de celulosa presentaron el mismo comportamiento observado en el caso de las pruebas con ferrocianuro. Por otro lado, las membranas "Spectrapor 1" y "Spectrapor 2" aparecen como adecuadas para limitar el efecto del ácido úrico en el sensor. Los tubos de diálisis benzoilados limitan completamente el efecto de esta molécula sobre el sensor. Los resultados de las pruebas con el ácido ascórbico se presentan en la figura 15. Este ácido tiene mayor interferencia en el sensor, si se compara con las pruebas realizadas con ácido úrico y ferricianuro de potasio. Al igual que en las anteriores pruebas, las membranas "Spectrapor 1", "Spectrapor 2" y los tubos de diálisis benzoilados resultaron eficientes para limitar la difusión del ácido ascórbico y por tanto para limitar su efecto sobre el sensor. Por otro lado, el celofán y el acetato de celulosa mostraron ser ineficientes para ese propósito. La conclusión principal fué que las membranas que mostraron alta ineficiencia para limitar el efecto de interferencias de la mayoría de las sustancias evaluadas sobre el sensor, podían ser probadas como membranas externas y aquellas que limitan el paso de estas moléculas hacia el área sensible del sensor, podían ser usadas como membrana interna. La primera selección fué considerar las membranas "Spectrapor 1" y "Spectrapor 2" como una sola, debido a que aunque difieren 5 μm en espesor, de acuerdo a los resultados, esta diferencia no presenta ventaja.

A continuación, se procedió a las pruebas de las diferentes combinaciones entre membranas, esto es, arreglos de dos membranas en donde una de ellas funciona como membrana externa (la que está en contacto con la muestra problema) y otra como membrana interna (en contacto directo con el sensor). Se probaron los arreglos celofán-acetato de celulosa, Spectrapor-acetato de celulosa y tubos de diálisis benzoilados-acetato de celulosa. Los resultados se presentan en las figuras 16 y 17. El mejor arreglo para disminuir el efecto sobre

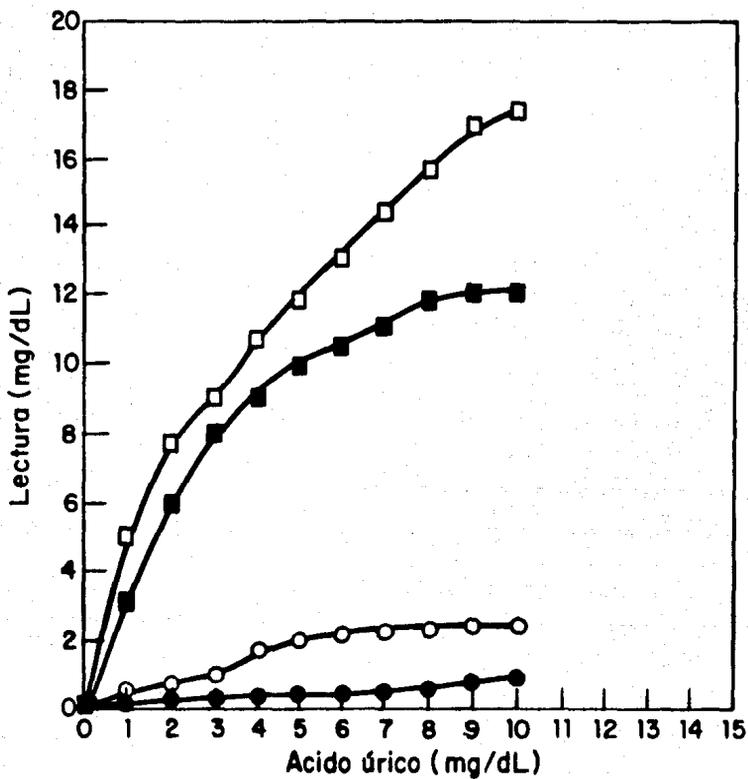


Figura 14. Perfiles mostrados por las membranas al inyectar ácido úrico; (□) celofán, (○) Spectrapor, (■) acetato de celulosa y (●) Tubos de diálisis benzoilados.

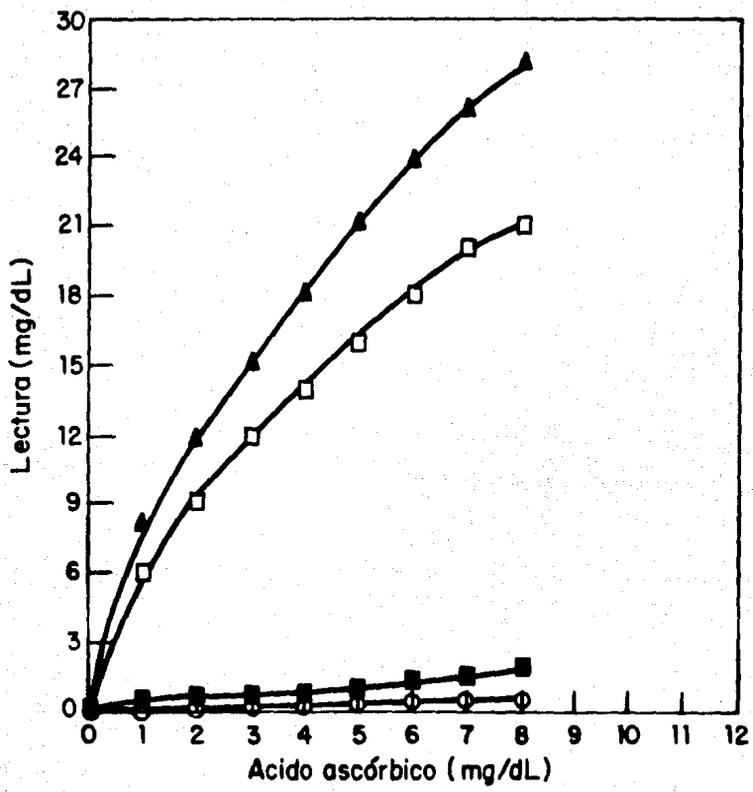


Figura 15. Perfiles presentados por las membranas al inyectar ácido ascórbico; (▲) celofán, (■) Spectrapor, (□) acetato de celulosa, (○) Tubos de diálisis benzollados.

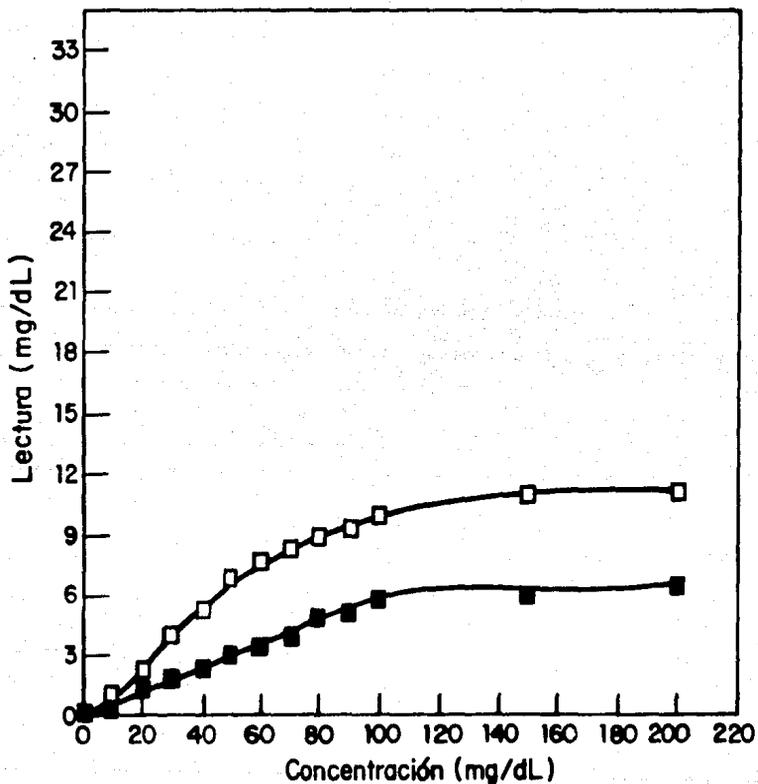


Figura 16. Evaluación del sistema celofán-acetato de celulosa en la respuesta del sensor a ferrocianuro y ferricianuro de potasio; (□) ferrocianuro, (■) ferricianuro de potasio.

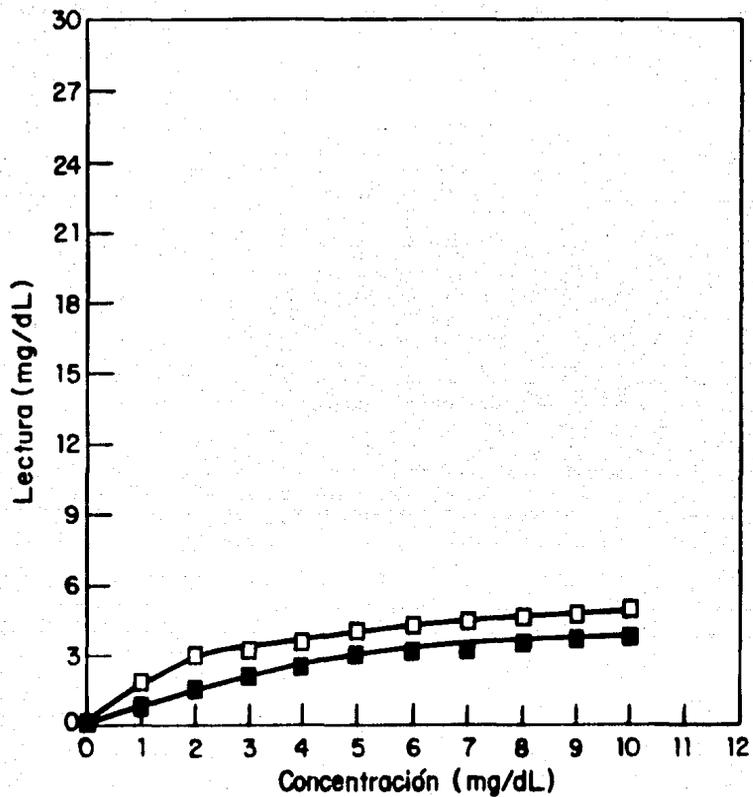


Figura 17. Evaluación del sistema celofán-acetato de celulosa en la respuesta del sensor al inyectar ácido úrico y ácido ascórbico; (□) ácido ascórbico, (■) ácido úrico.

el sensor de las sustancias interferentes resultó ser la combinación celofán-acetato de celulosa. Los otros arreglos probados logran disminuir su efecto; aunque en menor medida. En la figura 17 se observa que el arreglo celofán-acetato de celulosa permite una limitación del efecto interferente sobre el sensor, tanto del ferrocianuro como del ferricianuro de potasio. Al igual que cuando se evaluaron las membranas individualmente, el ferrocianuro tiene mayor efecto sobre el sensor que el ferricianuro. Este fenómeno, que se esperaba muy similar a las pruebas con los ferrocianuros, no se repitió en el caso de las pruebas con ácido ascórbico y ácido úrico. En la figura 17 se puede observar como el ácido ascórbico (que había mostrado mayor influencia que el ácido úrico en el sensor), se ve mayormente retenido al evaluarse con el sistema celofán-acetato de celulosa.

Partiendo de los resultados anteriores, se tomó la decisión de inmovilizar la enzima siguiendo el proceso mostrado en la figura 18. Los resultados se muestran en la tabla 4. En todos los casos, la calibración del dispositivo no fue posible. Cuando se inyectaba una concentración patrón de 500 mg/dL el máximo valor que se alcanzaba con el potenciómetro de ajuste de sensibilidad fue de 50 ± 4 mg/dL, es decir, las membranas enzimáticas obtenidas tenían una sensibilidad un orden de magnitud por debajo de la requerida para las determinaciones. Los resultados evidentemente no fueron satisfactorios para ninguno de los sistemas, debido muy probablemente a que las membranas no podían ser construidas en forma homogénea. Esto fue consecuencia de que la cantidad de enzima galactosa oxidasa inmovilizada resultaba ser una barrera difusional considerable, pues no siempre podía ser disuelta completamente entre las membranas donde se atrapó. Sin embargo, a pesar de lo anterior, el sistema de membranas que aparentemente mostraba mayores posibilidades seguía siendo el del celofán-acetato de celulosa. Debe considerarse que durante esta primera etapa no fue posible determinar sus perfiles ya que no se contaba con el dispositivo graficador. Además, en esta etapa la inmovilización se efectuaba empleando la enzima galactosa oxidasa en forma liofilizada (2 mg).

5.2 INMOVILIZACION

Hasta aquí, la conclusión principal fue que el sistema de membranas con posibilidades usando galactosa oxidasa para la

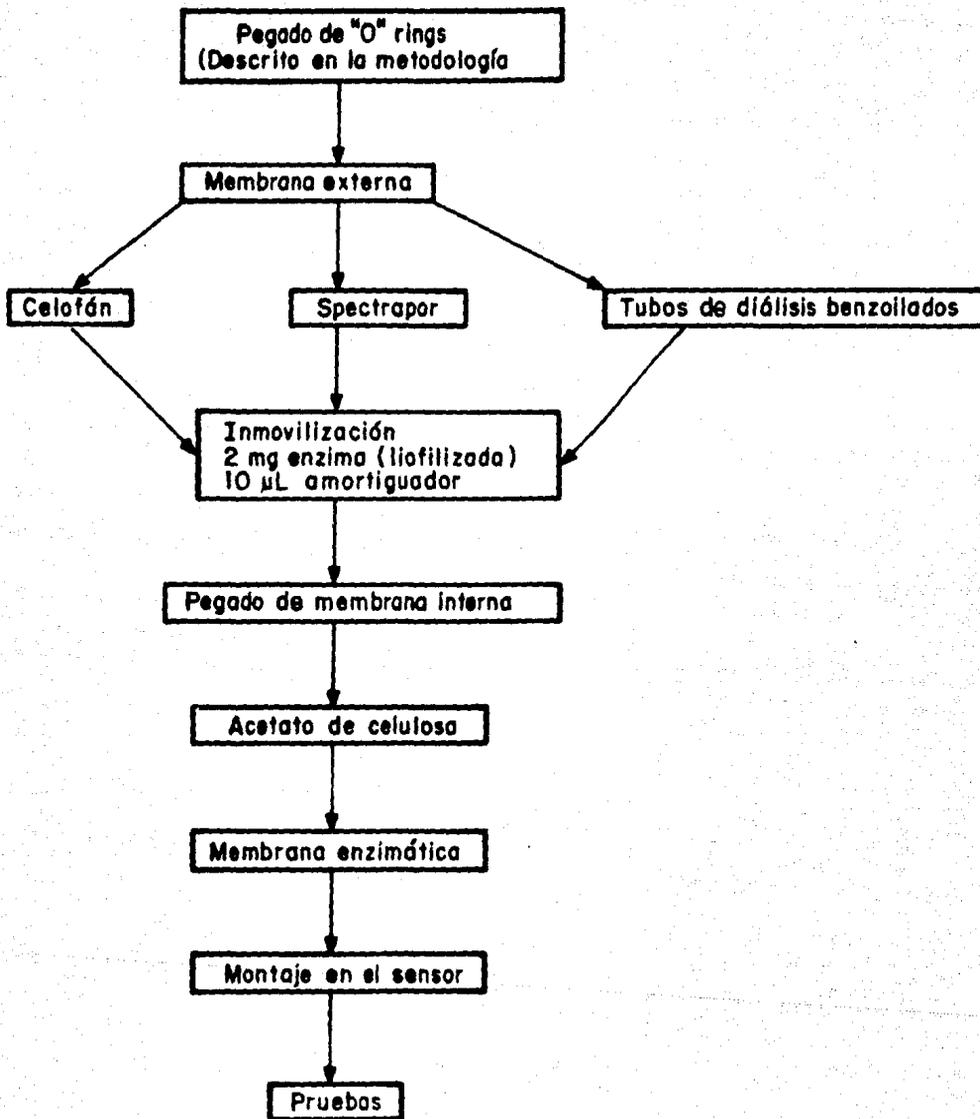


Figura 16. Estrategia inicial de inmovilización empleada en la construcción de membranas enzimáticas.

Tabla 4. Resultados obtenidos al inmovilizar la enzima galactosa oxidasa en forma liofilizada para la detección de lactosa.

Membranas usadas	Lactosa Inyección (mg/dL)	Lactosa Lectura (mg/dL)
Celofán - Acetato de celulosa	200	176 ± 7
	500	237 ± 3
	2000	289 ± 6

Spectrapor - Acetato de celulosa	500	237 ± 3
	2000	51 ± 9

Tubos de diálisis- Acetato de celulosa	200	50 ± 3
	500	77 ± 5
	2000	198 ± 11

determinación de lactosa), fué el constituido por celofán-acetato de celulosa. Por otra parte, se observó que ninguna de las membranas usadas individualmente para cubrir el electrodo, resultó suficiente para eliminar el efecto de los compuestos que interfieren la medición. Adicionalmente, se observó que de las sustancias evaluadas, el ferrocianuro de potasio y el ácido ascórbico son las sustancias con mayor interferencia en el sensor. Aún cuando resultó posible la determinación de lactosa, se tuvieron problemas con las membranas enzimáticas, debido principalmente al exceso de enzima utilizada en su construcción. A raíz de lo anterior se disminuyó considerablemente la concentración de enzima usada en el atrapamiento.

Una vez seleccionado el sistema celofán-acetato de celulosa y de acuerdo a la figura 18, se inmovilizó la lactosa oxidasa en una cantidad más baja (1 mg). Para evaluar el perfil de respuesta, se montó sobre el sensor una membrana comercial. El perfil de respuesta típico de esta membrana se muestra en la figura 19. Aquel obtenido con el sistema celofán-acetato de celulosa y con 1 mg de galactosa oxidasa se muestra en la figura 20.

Los resultados iniciales de las membranas construidas en el laboratorio no fueron satisfactorios. Sus perfiles indican un alto grado de inestabilidad de las lecturas, lo que es provocado (como después se demostró) por la elevada cantidad de enzima utilizada.

Debido a que este primer sistema no presentó resultados satisfactorios, se procedió a la coinmovilización de las enzimas β -galactosidasa y galactosa oxidasa (1 mg de c/u). En este sistema se pretendía aprovechar la acción de la galactosa oxidasa sobre galactosa, una vez que la β -galactosidasa hidroliza lactosa rindiendo glucosa y galactosa. Los resultados obtenidos con este nuevo sistema se muestran en la figura 22. Los perfiles son todavía irregulares y aunque no son representativos de la concentración inyectada, demostraron que el sistema con β -galactosidasa podría ser funcional. La irregularidad en los perfiles fué la consecuencia de que aún con 1 mg de cada enzima, esta se encontraba en exceso, constituyendo membranas enzimáticas no homogéneas e incluso con enzima que no es posible solubilizar. En este sistema se inyectaron concentraciones conocidas de galactosa (ver figura 23) y debido a la enzima empleada, la respuesta fué mucho mejor

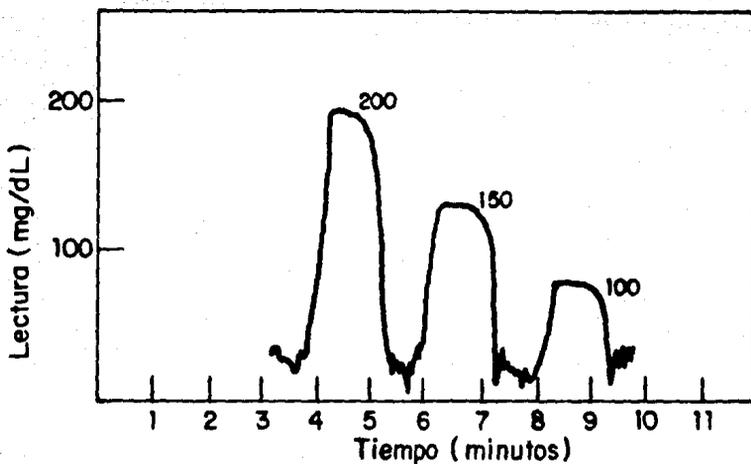


Figura 19. Perfil de respuesta típico de la membrana enzimática comercial (YSI), 100, 150 y 200 mg/dL.

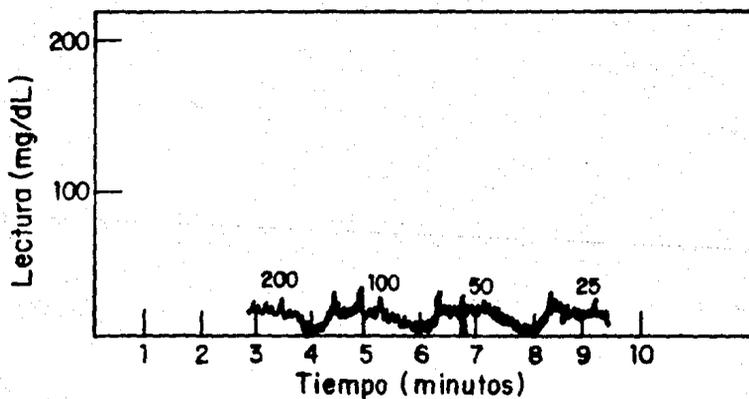
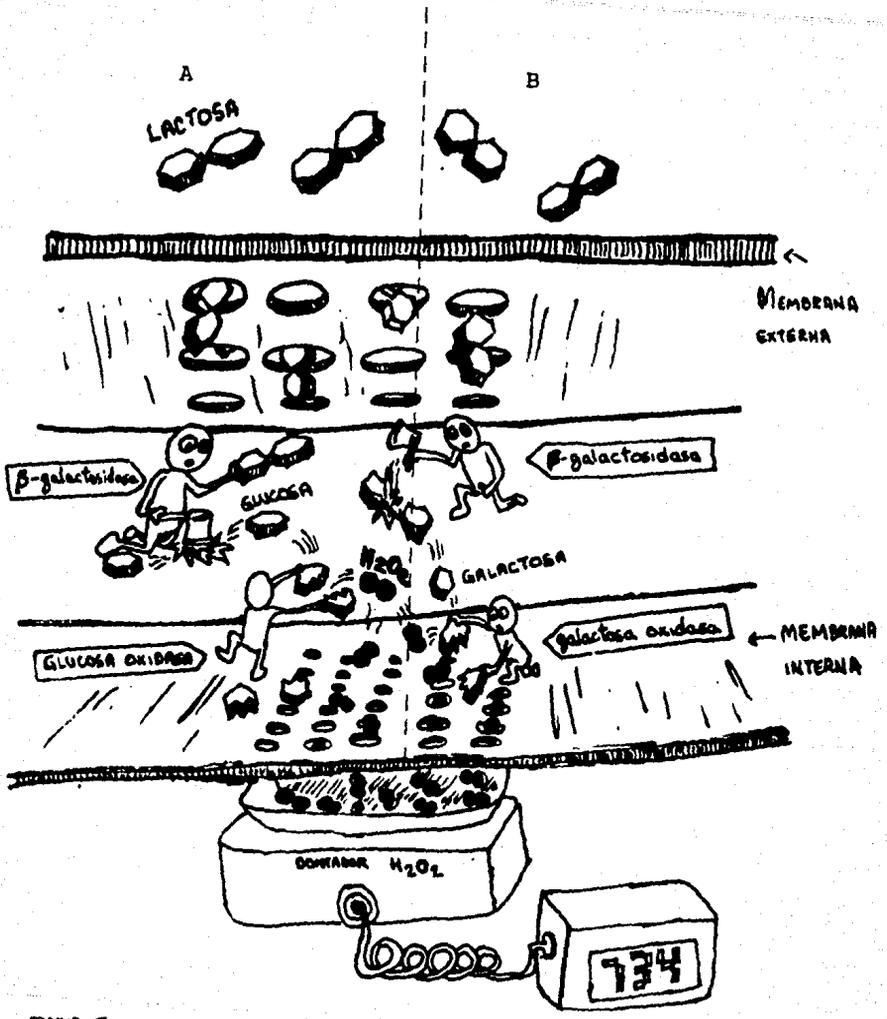


Figura 20. Perfil de respuesta obtenida con el arreglo acetato de celulosa-celofán y 1 mg de galactosa oxidasa inmovilizada en forma liofilizada, 25, 50, 100 y 200 mg/dL.



870919 E.

Figura 21. Estrategias seguidas en la construcción de membranas enzimáticas para determinación de lactosa.

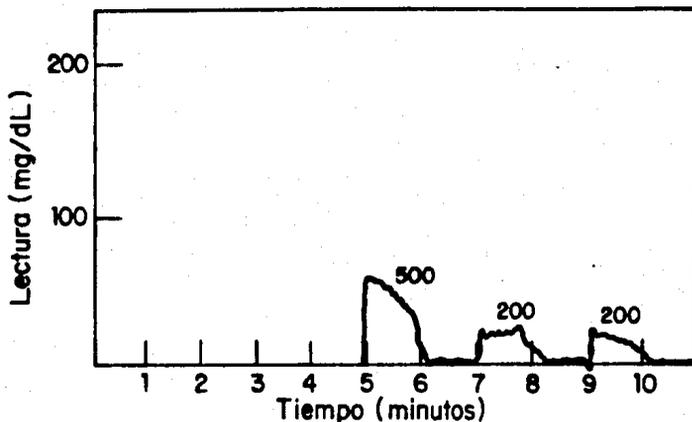


Figura 22. Perfil de respuesta observado con el arreglo acetato de celulosa-celofán y β -galactosidasa-galactosa oxidasa en concentraciones de 1 mg/dL de cada una e inmovilizadas en forma liofilizada, 200 y 500 mg/dL de lactosa.

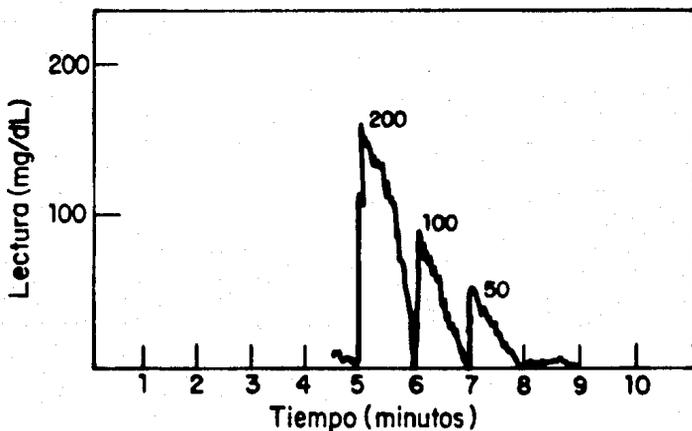


Figura 23. Perfil de respuesta observado con el arreglo acetato de celulosa-celofán y β -galactosidasa-galactosa oxidasa en concentraciones de 1 mg/dL de cada una e inmovilizadas en forma liofilizada, 50, 100 y 200 mg/dL de galactosa.

que al inyectar lactosa. En este momento del trabajo y aún cuando no constituía parte de los objetivos, se había logrado fabricar membranas enzimáticas para la detección específica de galactosa. Este fenómeno resulta natural debido a que la enzima usada para intentar la determinación de lactosa (galactosa oxidasa), es mucho más específica para galactosa que para lactosa.

Para evitar que las membranas enzimáticas presentaran el problema de heterogeneidad provocada por el exceso de enzima, se redujo la cantidad hasta 0.5 mg. Además, en las pruebas iniciales en este sistema, se utilizó la segunda opción (ver figura 21) que consistió en la co-inmovilización de β -galactosidasa y glucosa oxidasa. Desde las primeras pruebas con membranas de un espesor de 18.6 μm , los perfiles mostraron una alta reproducibilidad (figuras 24 a y b). Estos perfiles indicaron que el sistema β -galactosidasa-glucosa oxidasa podría ser más adecuado para la detección de lactosa. Al igual que en los casos anteriores, los perfiles todavía mostraron discontinuidad, aunque en menor grado. Las deformaciones naturales ocurridas en las membranas externas al ser colocadas en medios acuosos y la cantidad (todavía elevada, de enzima usada) no permitían un perfil de respuesta bien definido, ocasionado principalmente por problemas de transporte. Para resolver estos problemas se cambió la forma de inmovilización y se disminuyó considerablemente la cantidad de las enzimas, de acuerdo al esquema mostrado en la figura 25. En este caso se preparó una solución que contenía la mezcla de las enzimas diluidas en 100 μL de un amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 5.9. Esto implicó un cambio importante en la inmovilización, que consistió en depositar la mezcla de enzimas en solución, en vez de hacerlo en forma liofilizada. Además, con esta mezcla se mantenía una relación de unidades entre la glucosa oxidasa y la β -galactosidasa de 1:4.5, respectivamente. De esta mezcla de enzimas se tomaron alícuotas de 2, 4, 6 y 10 μL lo cual representaba 40 veces menos unidades (de cada una de las enzimas) respecto a las usadas previamente para construir las membranas enzimáticas (ver tabla 5).

Los resultados de las pruebas indicaron un nivel adecuado de detección de lactosa con el arreglo de membranas celofán-acetato de celulosa. Con este par de membranas se lograron obtener los perfiles que se muestran en la figura 26, los cuales resultaron mucho mejor definidos y con mucho mayor exactitud ($\pm 5\%$ en la lectura de las

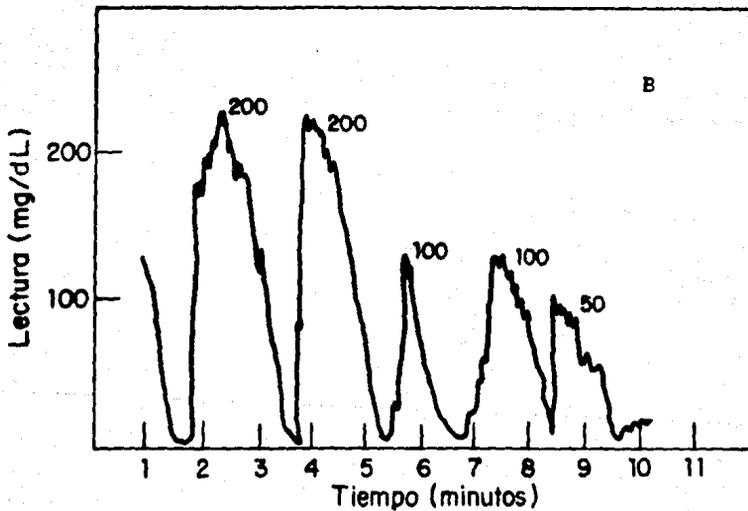
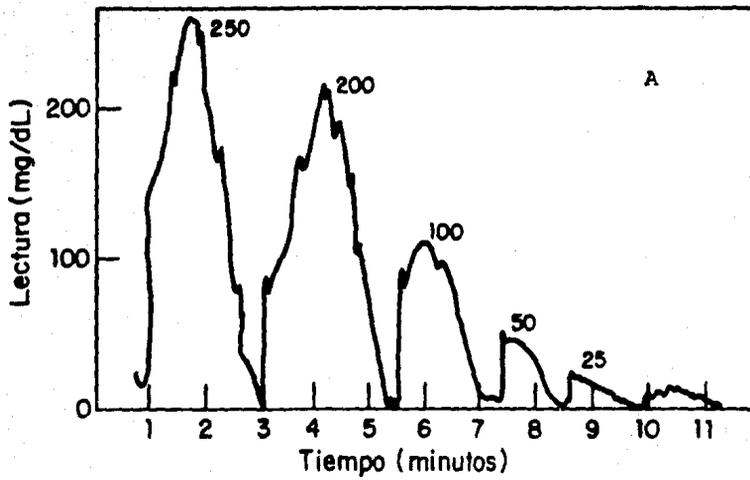


Figura 24 a y b. Perfiles observados al inmovilizar β -galactosidasa-glucosa oxidasa en un arreglo de acetato de celulosa-spectrapor con 0.5 mg de cada una en forma liofilizada.

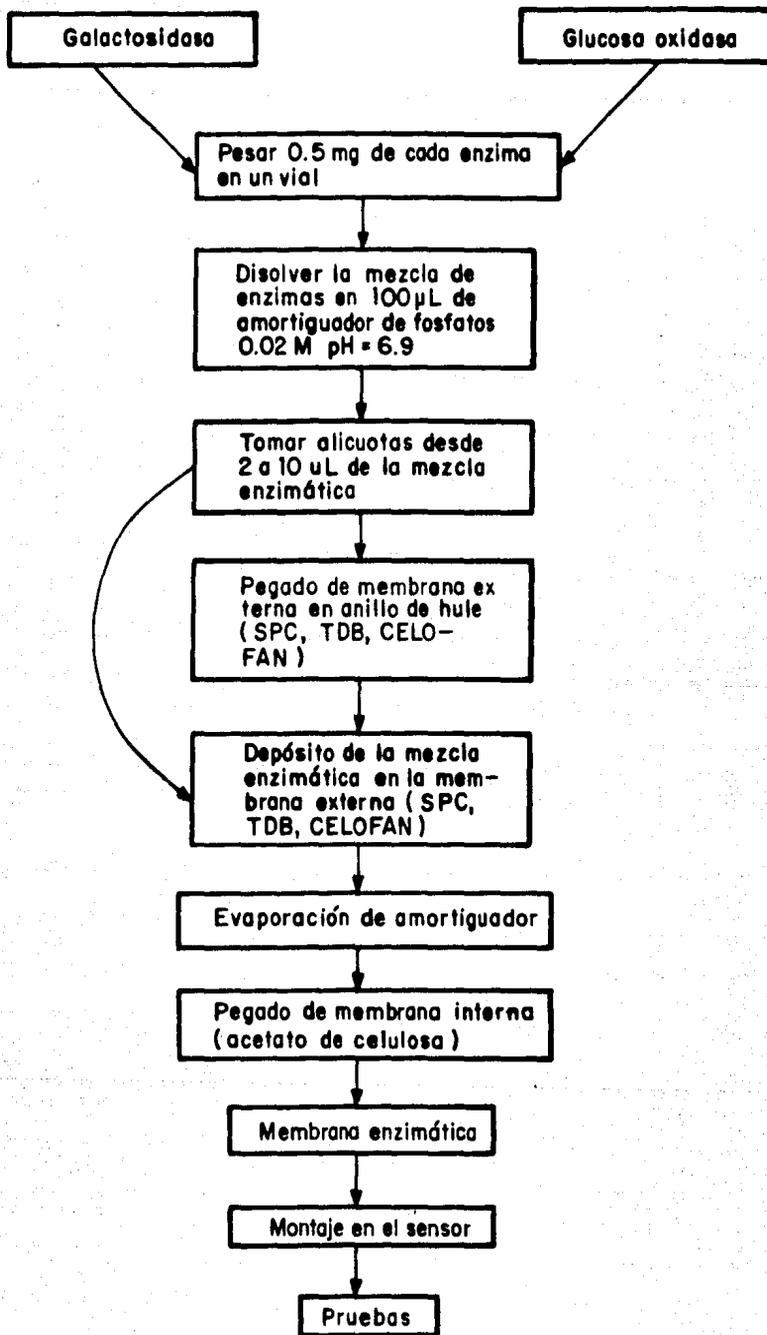


Figura 25. Segunda estrategia de inmovilización empleada en la construcción de membranas enzimáticas.

Tabla 5. Unidades de enzima y volúmenes equivalentes empleados para la construcción de membranas enzimáticas para determinar lactosa.

Volumen (μL)	UNIDADES		Peso de cada enzima (μg)
	β -galactosidasa	Glucosa oxidasa	
2	6.5	1.4	10
4	13.0	2.8	20
6	19.5	4.35	30
10	32.5	7.2	50

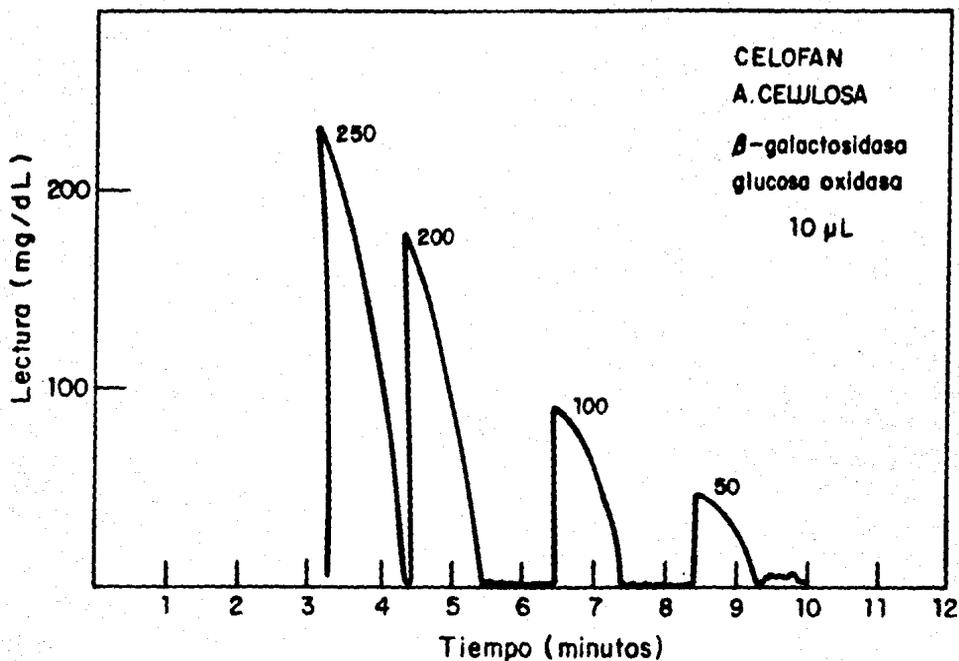


Figura 26. Perfiles de respuesta obtenidos con la membrana enzimática usando 10 μ l (7 U de glucosa oxidasa, 32 U de β -galactosidasa) de la solución enzimática.

soluciones de lactosa inyectadas.

Una comparación de los perfiles de respuesta de las membranas comerciales y las desarrolladas en este trabajo se muestra en la figura 27. Los perfiles son distintos, aunque hay que considerar que se trata de dos sistemas enzimáticos diferentes. En el comercial se usa la enzima galactosa oxidasa y en la membrana construida en el laboratorio se emplearon la β -galactosidasa y la glucosa oxidasa. En estas membranas continúa presentándose el problema de la inhomogeneidad, provocada muy probablemente por variaciones importantes en el espesor de las membranas enzimáticas. Una prueba indirecta de este fenómeno lo constituye el hecho de que al evaluarse con cada una de las alícuotas usadas para la construcción de las membranas (ver figura 28), se generen diferentes perfiles para una sola concentración de lactosa.

En la figura 28 se presentan los perfiles para 2, 4, 6 y 10 μL de alícuotas tomadas para la preparación de las membranas y que corresponden a las unidades de enzima mostradas en la tabla 5. Se observaron variaciones en función de la alícuota usada. Este fenómeno no se esperaba debido a que previamente se estableció que el proceso de lectura del sensor enzimático está controlado por difusión; por lo tanto, la cantidad de enzima no debería alterar la respuesta. Los resultados se pueden explicar en función de pliegues o deformaciones que se dan en la membrana enzimática, principalmente en el celofán al momento de hidratarse. Este sistema tiene problemas de transporte en el electrodo enzimático por no contar con un espesor uniforme en la membrana enzimática.

5.3 ESTABILIDAD OPERACIONAL

Aún con las limitaciones de la falta de homogeneidad en el espesor de las membranas, la determinación de su estabilidad operacional se realizó con una membrana construida con 6 μL de la solución conteniendo la mezcla de enzimas. Para ello, se llevaron a cabo mediciones sucesivas durante una semana. En estas condiciones y como se observa en la figura 29 las membranas enzimáticas presentaron una estabilidad operacional de al menos 8 días, con rangos lineales de detección de 0-400 mg/dL y tiempos de respuesta de un minuto. Hasta este momento, todas las determinaciones se habían realizado sin

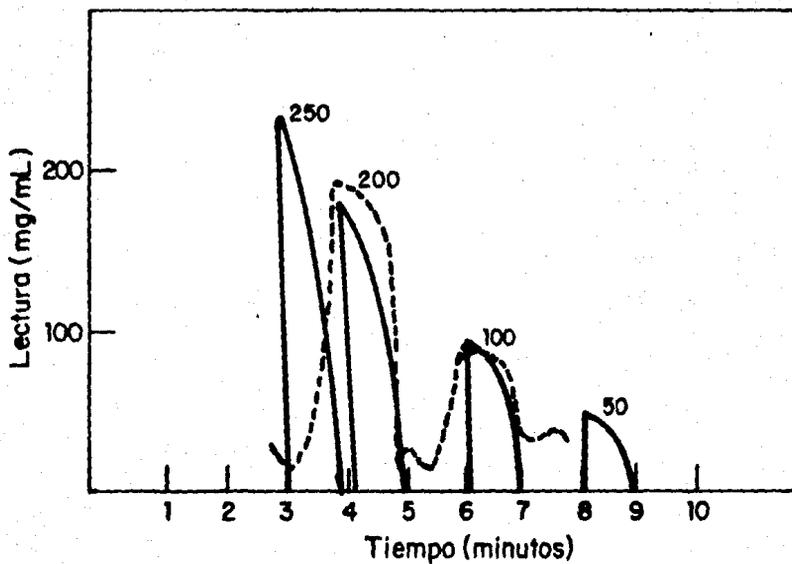


Figura 27. Perfiles de respuesta obtenidos con la membrana enzimática, en este caso se usaron 10 μ L de una solución de β -galactosidasa-glucosa oxidasa inmovilizadas en forma soluble. (—) membrana enzimática construida en el laboratorio, (---) membrana enzimática comercial (YSI).

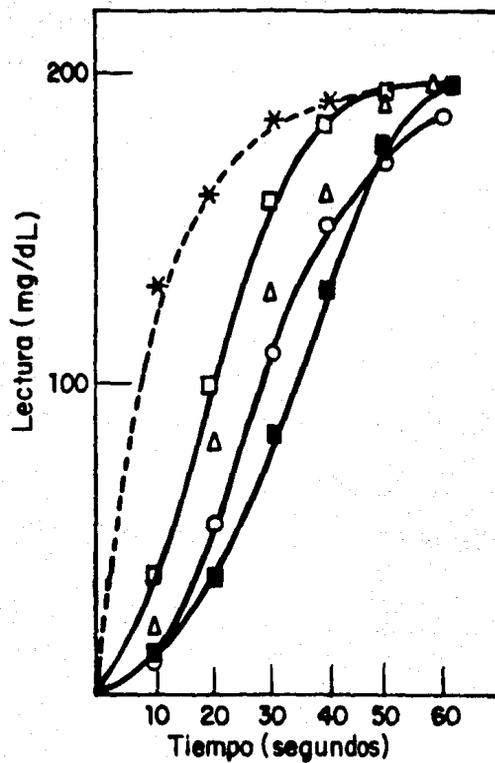


Figura 28. Perfiles de respuesta obtenidos con 2 (\square), 4 (\circ), 8 (\bullet) y 10 (Δ) μ L de β -galactosidasa-glucosa oxidasa. 200 mg/dL de lactosa inyectados.

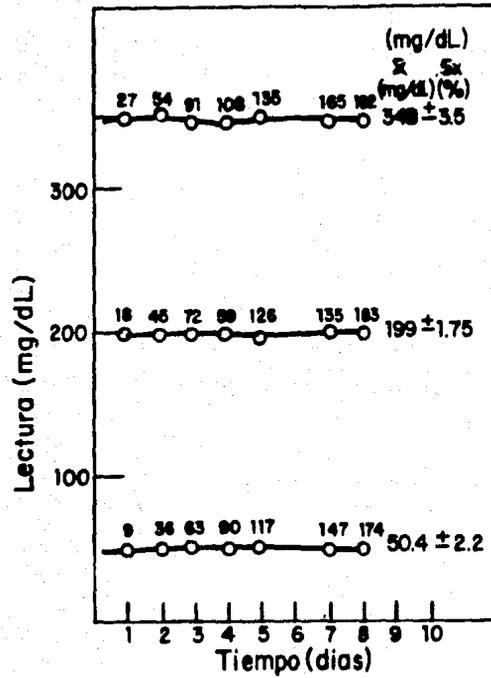


Figura 20. Estabilidad operacional observada durante 7 días de operación de la membrana enzimática con 6 μ L de las enzimas β -galactosidasa-glucosa oxidasa.

recalibración del analizador. Así se hicieron cerca de 30 determinaciones sucesivas con una calibración inicial del dispositivo. Este hecho, es importante resaltarlo puesto que con las membranas comerciales es necesario recalibrar el analizador al menos cada dos determinaciones. Esto significa que el rango lineal alcanzado en las primeras pruebas (400 mg/dL) podría ser potencialmente incrementado si se realizaban calibraciones más frecuentes (ver figura 30).

Los resultados de las pruebas con las membranas enzimáticas construidas con 8 μ L de la solución conteniendo la mezcla de enzimas y llevando a cabo calibraciones cada cinco mediciones se muestran en la figura 33. Fue posible incrementar el rango lineal de la detección de lactosa por arriba de 900 mg/dL. En la figura 31 se observa la evaluación de la estabilidad operacional en función de la concentración inyectada y el margen de error. Es importante destacar que cuando se emplea un sensor cuya sensibilidad no es posible ajustar electrónicamente, la determinación de la estabilidad operacional es función única y exclusivamente de la vida media de las enzimas inmovilizadas. Sin embargo, cuando se utiliza el analizador, la estabilidad operacional de las membranas (aún cuando también es función de la vida media de las enzimas), es calibrada al 100% de sensibilidad con una concentración patrón (200 mg/dL). Por esta razón, aún cuando la vida media de las enzimas disminuyera, la membrana es ajustada como si no hubiese pérdida de actividad y por lo tanto la estabilidad operacional tiene que ser evaluada en función del número de análisis.

Con esta condición, en la figura 31 se puede observar que las membranas pueden ser empleadas para 200 determinaciones sin pérdida de sensibilidad. Más de 250 determinaciones, provocan que la sensibilidad descienda hasta niveles no recomendables y que significan un error de 20-6%.

5.4 MEJORAMIENTO EN LA METODOLOGÍA DE CONSTRUCCIÓN DE MEMBRANAS.

Aún cuando ya se contaba con membranas reproducibles y adecuadas para la detección de lactosa; prevalecía el problema de la alta hidratación del celofán que no permitía la construcción de membranas enzimáticas homogéneas. Este hecho ocasionaba que la eficiencia en la construcción de membranas enzimáticas fuese muy baja. En promedio, solo la mitad de las construidas resultaban utilizables.

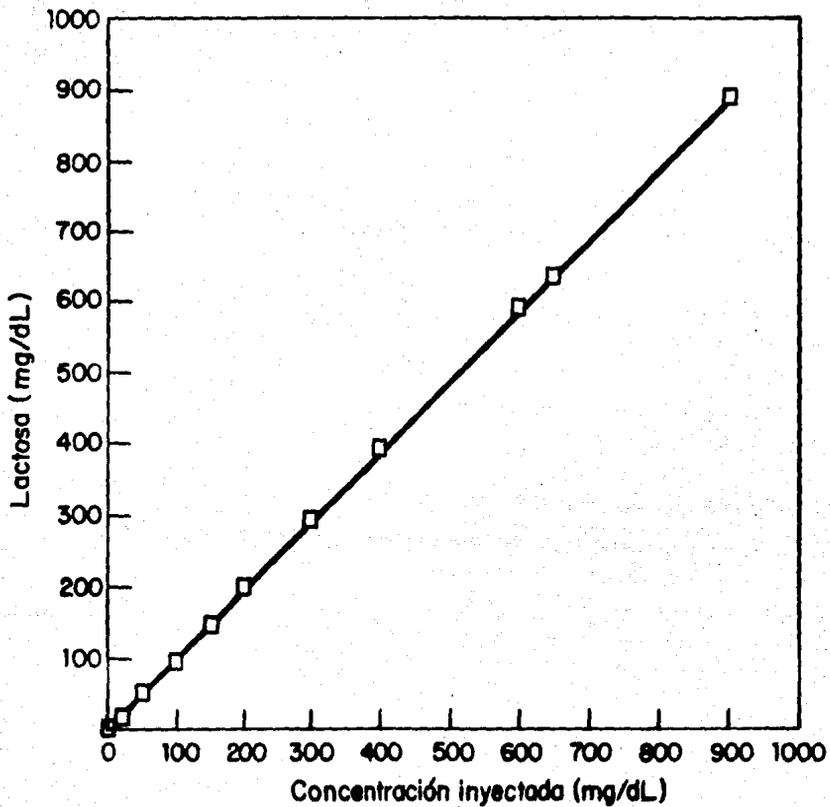


Figura 30. Rango lineal alcanzado cuando se recalibró el analizador cada cinco determinaciones de lactosa.

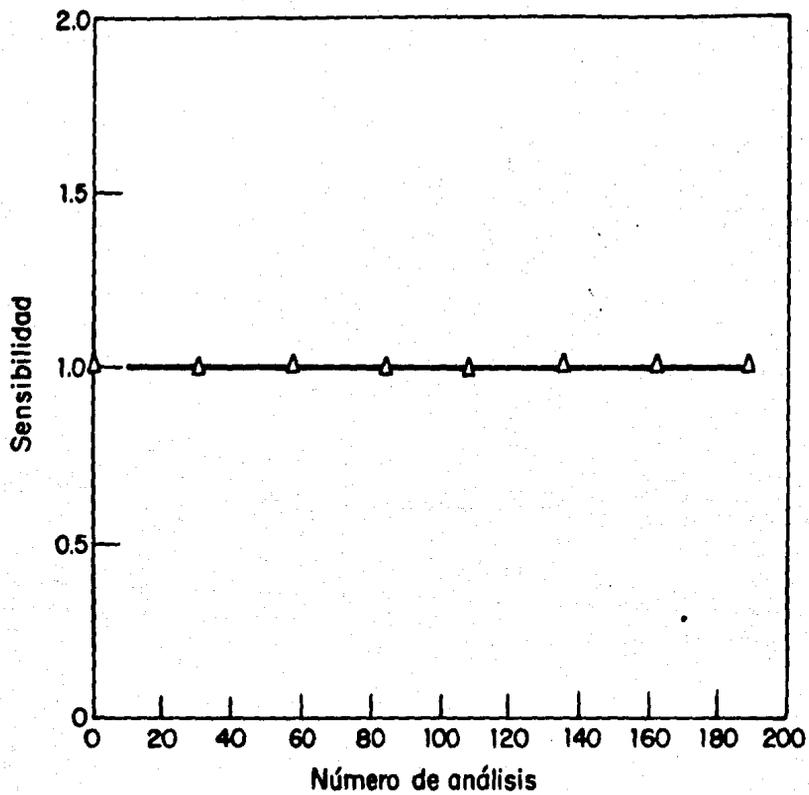


Figura 31. Estabilidad operacional en la determinación de lactosa en relación al número de análisis.

Mediante un dispositivo (descrito en la sección de materiales y métodos) se llevó a cabo lo que se denominó "estiramiento en húmedo" de las membranas de celofán. Con este proceso fué posible percatarse que el área de la membrana de celofán aumenta cerca de un 21% después de hidratarse. Este fenómeno ocasionaba que en las membranas enzimáticas se produjera un incremento en su área equivalente a 1200 μm aproximadamente.

Este fenómeno creaba bordes o pliegues que evidentemente generaban problemas para transferencia de masa y de reproducibilidad. Sin embargo, con el dispositivo para "estirar en húmedo", el celofán primeramente se hidrata y se estira, posteriormente se pegan en el los anillos de hule. De esta forma, la membrana una vez seca mantenía su forma y al hidratarse ya no se formaban los bordes. Con este procedimiento fué posible lograr membranas enzimáticas para la determinación de lactosa homogéneas y con una eficiencia cercana al 100%.

Una vez construidas las membranas en forma homogénea se procedió a realizar pruebas para evaluar la influencia del espesor de la capa enzimática. Para ello se prepararon membranas con 2, 4 y 6 μL de la solución con la mezcla de enzimas. El perfil de respuesta típico de estas membranas se muestra en la figura 32. Los perfiles que se generan para una misma concentración de lactosa inyectada con las diferentes cantidades de la mezcla de enzimas, son diferentes, lo cual a primera vista pudiera sugerir alguna influencia de la capa enzimática. Sin embargo, las lecturas finales en el estado de régimen permanente son muy reproducibles de acuerdo a la concentración inyectada, aún cuando se trate de concentraciones de enzima diferentes. Esto elimina el efecto que pudiese tener la cantidad de enzima en el espesor final de la capa enzimática y por lo tanto, en la respuesta del sensor. De esta manera, ni la concentración de enzimas usada, ni el espesor de la capa enzimática (que se puede considerar despreciable comparado con el espesor de las membranas), tienen efecto sobre la respuesta del electrodo enzimático. El principal determinante es sin duda el control difusional que proporciona el sistema de membranas empleado.

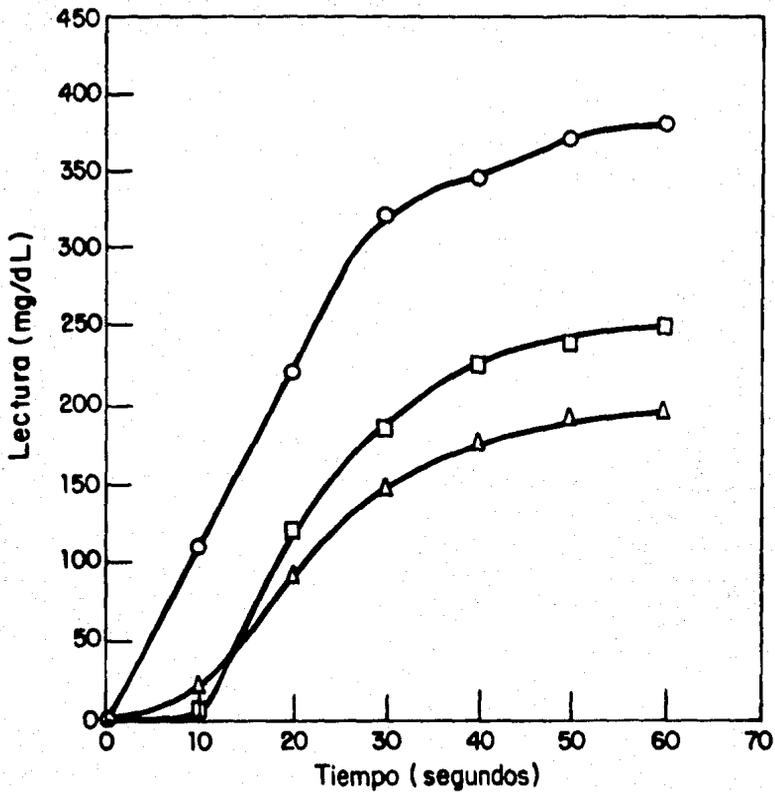


Figura 32. Perfil de respuesta empleando 2 μ L de la mezcla enzimática para (△) 200 , (◻) 250 y (○) 400 mg/dL de lactosa.

Las membranas fueron evaluadas en términos de su estabilidad operacional (ver figura 33) observándose que el número de análisis pudo ser aumentado de 200, hasta por arriba de 600 por membrana, sin pérdida apreciable de la sensibilidad y con un margen de error en las lecturas inferior al 5%.

Con los resultados descritos hasta el momento se cumplía con parte de los objetivos planteados en este trabajo. Se estableció una metodología de inmovilización, por atrapamiento, de las enzimas β -galactosidasa y glucosa oxidasa para la construcción de membranas enzimáticas que permiten la determinación de lactosa. Estas membranas presentan rangos lineales de 0-400 mg/dL recalibrando cada cinco determinaciones. El número de análisis que pueden efectuarse con estas membranas es cercano a 600 lo que garantiza una estabilidad de al menos 1 semana realizando en promedio 85 análisis por día sin pérdida apreciable de su sensibilidad.

5.5 EVALUACION COMPARATIVA

Además de la caracterización del electrodo enzimático en cuanto a estabilidad operacional y de acuerdo a los objetivos del trabajo, se realizó un análisis comparativo entre el método del DNS usado para determinar lactosa y el método del electrodo enzimático. Ello con el fin de establecer las probables ventajas o desventajas del uso de este método. Las pruebas fueron realizadas con muestras complejas. Se evaluaron tres diferentes presentaciones comerciales de leche y cuatro muestras de saborizantes preparados con suero de leche deslactosado proporcionadas por la empresa Givaudan, S.A.

El método convencional para determinación de lactosa seleccionado como patrón de comparación, fué el método de azúcares reductores conocido como DNS (ácido dinitrosalísílico) y descrito en la selección de materiales y métodos. Los resultados de esta evaluación se presentan en la tabla 6. En general, tanto las muestras de leche como los saborizantes presentaron valores muy por arriba de los valores esperados de lactosa. Las muestras de leche, presentaron valores altos muy probablemente debido a que este método cuantifica el contenido de azúcares reductores totales y por ello, los valores cuantificados de lactosa son mayores del rango reportado para estas leches que es del

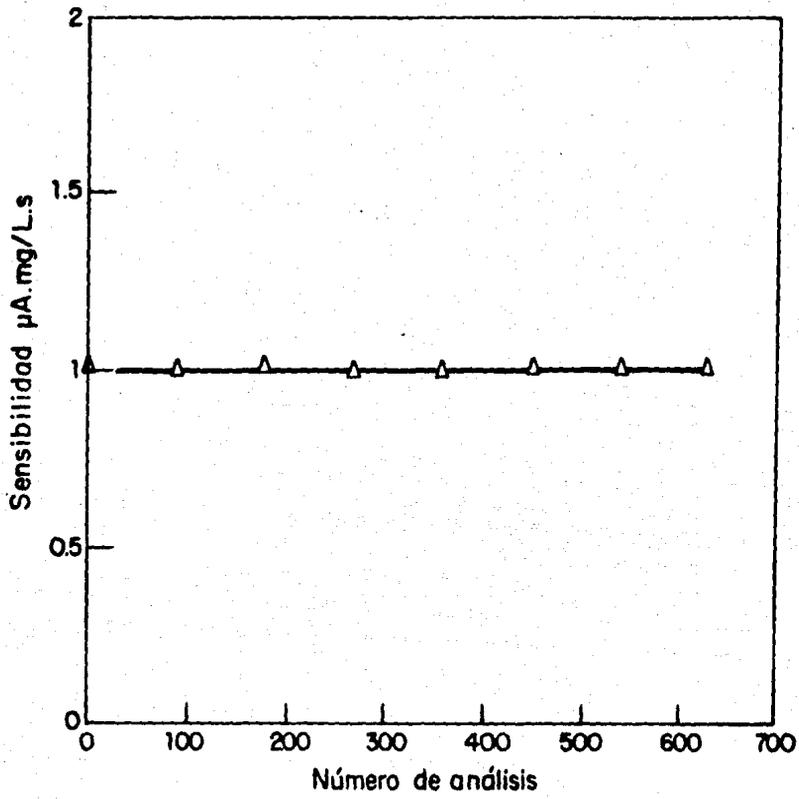


Figura 33. Estabilidad operacional evaluada para la determinación de lactosa.

Tabla 8. Análisis comparativo del método del analizador enzimático vs método de azúcares reductores (DNS).

MUESTRA	DNS g/L	ANALIZADOR ENZIMATICO g/L
Leche "Alpura"	53.8	40
Leche "Alpura 2000"	57.2	43
Leche "Mileche"	68.5	45.6
Sabor "Mango" preparado con suero liquido	25	5.8
Sabor "Mango" preparado con suero polvo	28.7	6.6
Sabor "Manzana" preparado con suero liquido	26.8	4.1
Sabor "Manzana" preparado con suero polvo	29.4	7.4

Muestras proporcionadas por Givaudan, S. A.

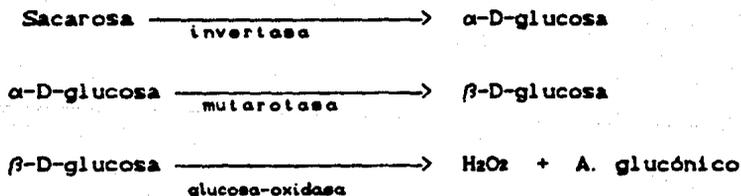
4-5%. El método del analizador enzimático muestra mayor congruencia con los resultados esperados y menor tiempo de análisis y sus valores se encuentran en el rango de concentración de lactosa reportado para las muestras de leche probadas. En la evaluación con las muestras de saborizantes, el problema que presentó el método convencional (DNS) fue más agudo. De acuerdo a la empresa Givaudan, estas muestras fueron preparadas con sueros de leche deslactosada. Sin embargo, cuando son determinadas con el método del DNS, los resultados indican contenidos de lactosa de entre un 2.5 a un 8 %. Finalmente se encontró que los datos estaban siendo alterados por el color de las muestras. El color que presentaban las muestras era muy similar al del reactivo usado en la determinación de lactosa (DNS) y por lo tanto los resultados del método para este tipo de muestras no fueron confiables.

Cuando se usó el analizador enzimático en la determinación de las muestras de leche, se obtuvieron resultados de entre un 0.5 a un 0.8 % de lactosa. Ello significa que se trata de muestras de suero prácticamente deslactosadas. El analizador enzimático demostró que el color de las muestras no afecta la determinación, además de mostrar menor tiempo de análisis y mayor especificidad.

6. DETERMINACION DE SACAROSA

6.1 SELECCION DE SOPORTES

En la determinación de sacarosa, el principio de medición se basa en la acción de tres enzimas catalizando su conversión a H_2O_2 de acuerdo a la siguiente secuencia:



Al igual que en el caso de las membranas para lactosa, el primer objetivo fue la selección de los soportes para inmovilización de las enzimas. Tomando en consideración que un buen arreglo de membranas para lactosa, fue el celofán (como membrana externa) y acetato de celulosa (como membrana interna), se realizaron las pruebas iniciales usando esta combinación. Los resultados se aprecian en la figura 34. En esta figura el valor final de lectura corresponde a 10 determinaciones por

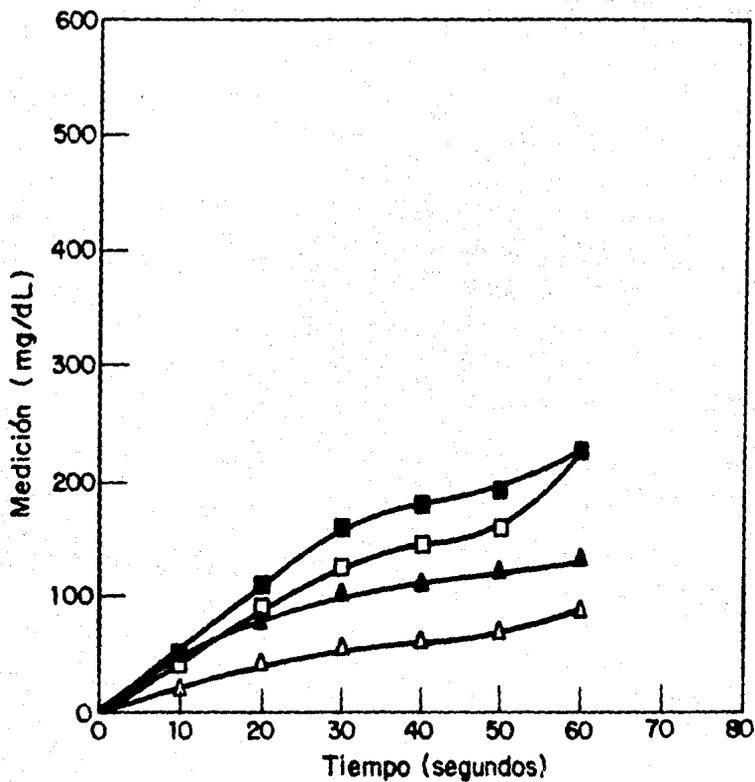


Figura 34. Perfiles de respuesta del electrodo enzimático para (▲) 200, (□) 300 y (■) 400 mg/dL de sacarosa.

cada concentración evaluada. Cuando se determinaban concentraciones por debajo de 100 mg/dL de sacarosa, el error de las mediciones fue del 2 al 7 %. Sin embargo, cuando se inyectaron concentraciones por arriba de 100 mg/dL, el error de la determinación aumentaba por arriba del 35 %. Pruebas posteriores mostraron resultados similares. Entre los parámetros que podían ser los responsables de ellos, se tenía por un lado el que el control difusional no fuese el adecuado. La influencia del amortiguador se descarto puesto que el electrodo enzimático cuantificaba concentraciones bajas de sacarosa. Considerando que el arreglo de membranas es responsable del control difusional, se probaron otros arreglos para la determinación de sacarosa. En consecuencia, se probaron los arreglos acetato-acetato y celofán-celofán. En las pruebas con el arreglo de membranas acetato-acetato, no se apreció ninguna respuesta del sistema enzimático a la presencia de sacarosa. Esto puede explicarse debido a que estas membranas, de acuerdo a la literatura (Taylor et al, 1977), presentan un diámetro de poro muy pequeño, en el orden de 1 a 3 Amstrongs. Por esta razón, se penso que tanto el sustrato como el producto no podían difundir hasta la zona de reacción y detección consecuentementeno se observaba ninguna respuesta. Al realizar las pruebas con el arreglo de membranas celofán-celofán los perfiles de respuesta se definieron como se esperaba. En las figuras 35 y 36 se observan los perfiles de generación de H_2O_2 en el electrodo enzimático cuando se inyectaron concentraciones de 100, 200, 300 y 600 mg/dL de sacarosa. La sensibilidad evaluada estadísticamente presentaba un margen de error en las determinaciones de entre 1 y 3 % (cada determinación fue realizada al menos 5 veces). Este error bien pudiera ser el propio experimental en el se incurre al pesar la sacarosa, al hacer las diluciones de la misma o en la inyección de las muestras al analizador. Estos resultados demostraron, la importancia del sistema de resistencia difusional usado en la construcción de membranas enzimáticas.

6.2 INMOVILIZACION Y ESTABILIDAD OPERACIONAL

En el análisis de estabilidad operacional se observo que los resultados en cuanto a sensibilidad y rango lineal de detección son adecuados. Sin embargo, el número de análisis que se podían efectuar con una membrana fue relativamente bajo (180 análisis), comparado con las membranas comerciales que alcanzan hasta 300 análisis (ver figura

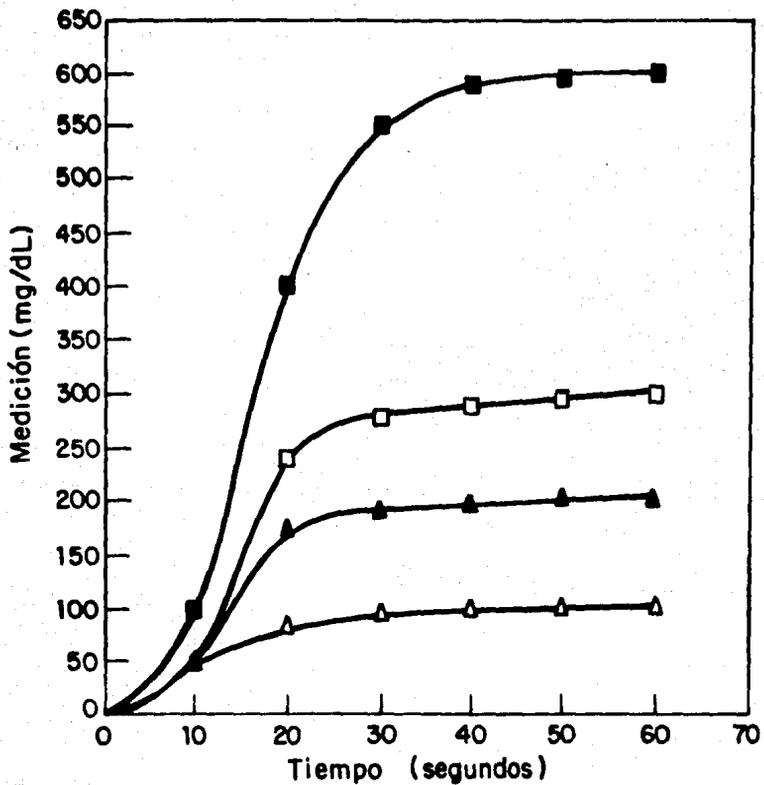


Figura 35. Perfiles de generación de peróxido de hidrógeno al inyectar (△) 100, (▲) 200, (□) 300 y (■) 600 mg/dL de sacarosa con el sistema de membranas celofán-celofán.

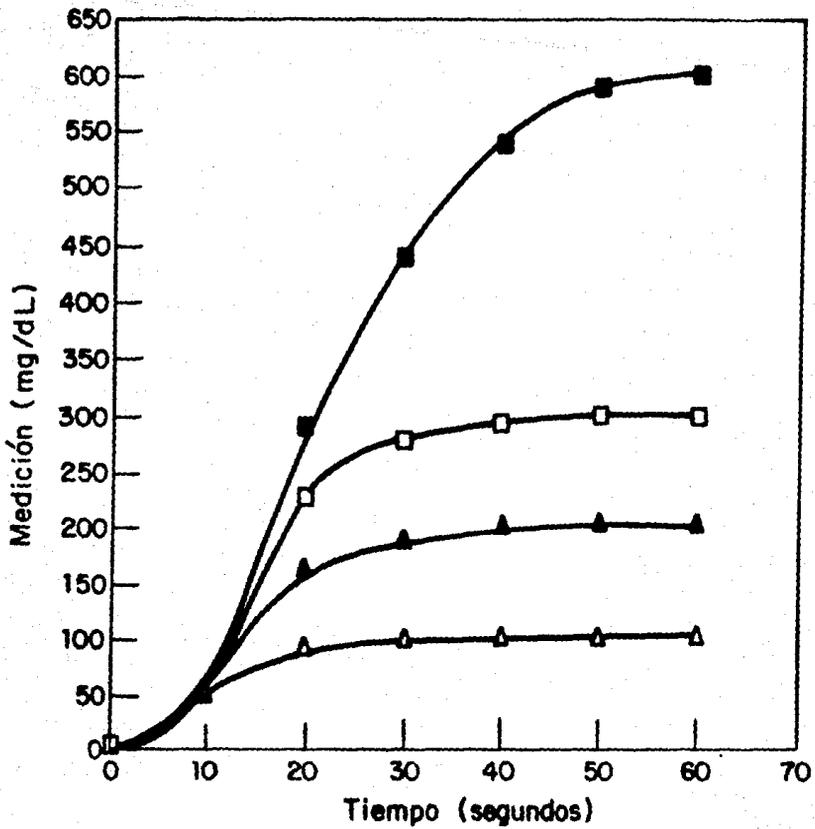


Figura 36. Perfiles de generación de peróxido de hidrógeno al inyectar (▲) 100, (▲) 200, (◻) 300 y (■) 600 mg/dL.

37). Las causas probables de este fenómeno podían ser que alguna de las enzimas estuviese perdiendo actividad o bien que el tamaño de poro del celofán fuera lo suficientemente grande para permitir que alguna de las enzimas se difundiera al exterior en vista de que se encuentran inmobilizadas por simple atrapamiento físico. Una Inmovilización por enlace covalente podría ayudar a resolver este problema.

En la inmovilización por enlace covalente se empleó como agente bifuncional al glutaraldehído, de acuerdo con la estrategia mostrada en la figura 38. Las membranas enzimáticas construidas con este proceso se montaron en el sensor de H_2O_2 y se probaron muestras de sacarosa en un rango de 0-800 mg/dL. En la figura 39 se muestran los perfiles para varias concentraciones de sacarosa. Estos perfiles se encuentran mejor definidos en comparación a los perfiles obtenidos para estas mismas concentraciones de sacarosa. Estos resultados confirman la importancia del espesor de las membranas (sistema de limitación difusional), que se emplean en la construcción de membranas enzimáticas para la determinación de sacarosa. Por otra parte, se observó que el método de inmovilización por enlace químico permite incrementar la estabilidad operacional. Los datos de la figura 40 evidenciaron que la estabilidad de las membranas se mantiene sin cambio durante un promedio de 500 análisis, los cuales son suficientes para que la membrana, si es empleada para 50 análisis por día pueda durar al menos 10 días. Las membranas comerciales establecen que las membranas para sacarosa tienen una vida media de 10 días, sin estipular el número de análisis que puedan efectuar.

6.3 EVALUACION COMPARATIVA

Para la evaluación comparativa del método del analizador enzimático en la determinación de sacarosa, el analizador fue trasladado a una fabrica de alcohol. El analizador fue evaluado siguiendo el transcurso de una fermentación alcoholica de 3 tinas de fermentación. El método convencional contra el cual fue comparado consistio en el tradicionalmente usado por la fabrica, este es el método de la solución de Soxhlet modificado por Fehling. En la figura 41 se presenta la cinética de consumo de azúcares seguida con el método convencional y con el analizador (como sacarosa). En la figura 42 se puede observar que entre el método de Fehling y el analizador no

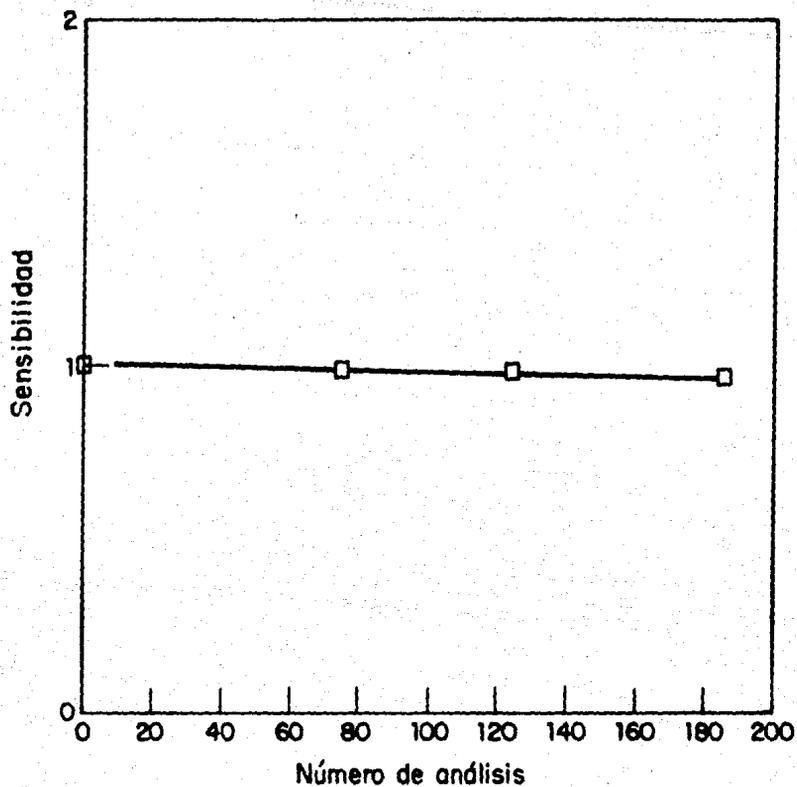


Figura 37. Estabilidad operacional en la determinación de sacarosa.

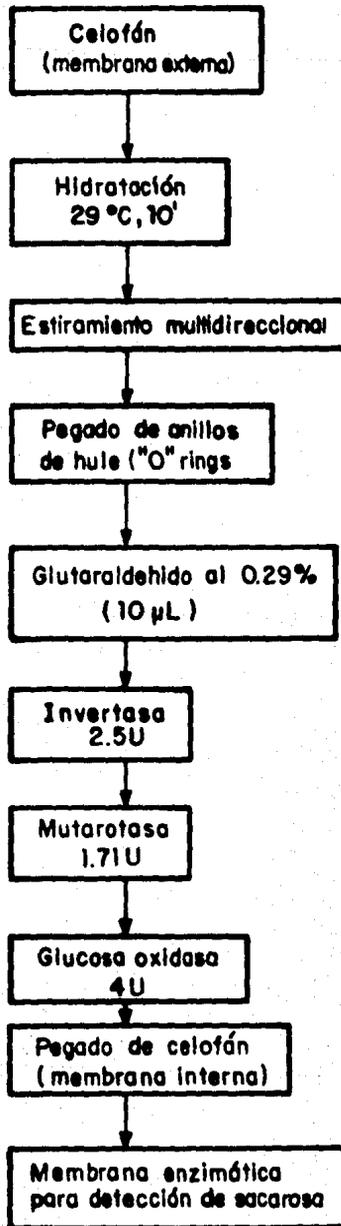


Figura 3B. Estrategia de inmovilización de enzimas por enlace covalente en la construcción de membranas enzimáticas para determinación de sacarosa.

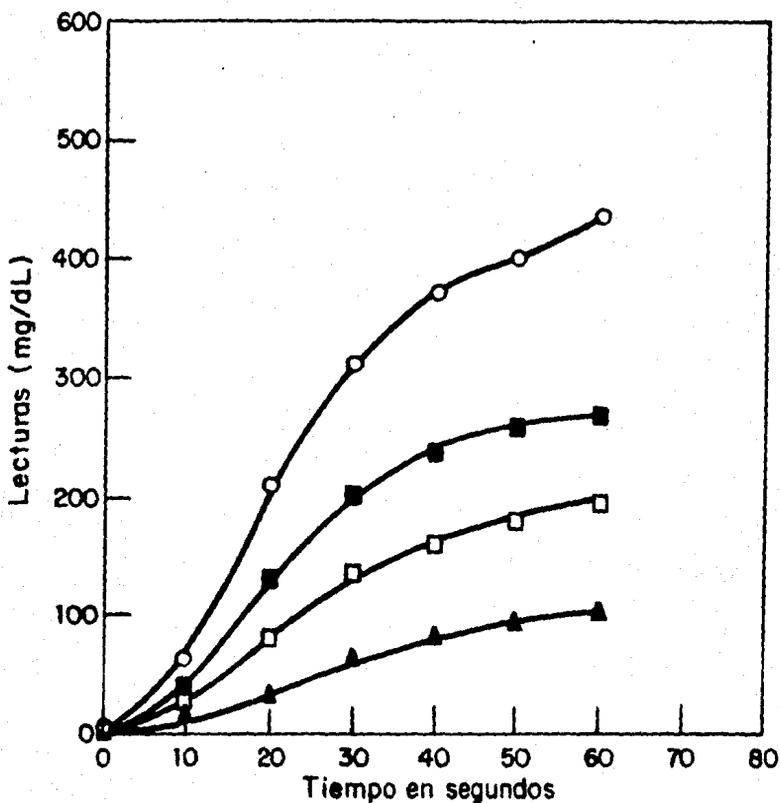


Figura 39. Perfiles de H₂O₂ obtenidos con membranas enzimáticas para sacarosa en las cuales se inmovilizaron las enzimas por enlace covalente. El sistema de membranas usado fue celofán-celofán; (▲) 100, (◻) 200, (■) 300 y (○) 500 mg/dL.

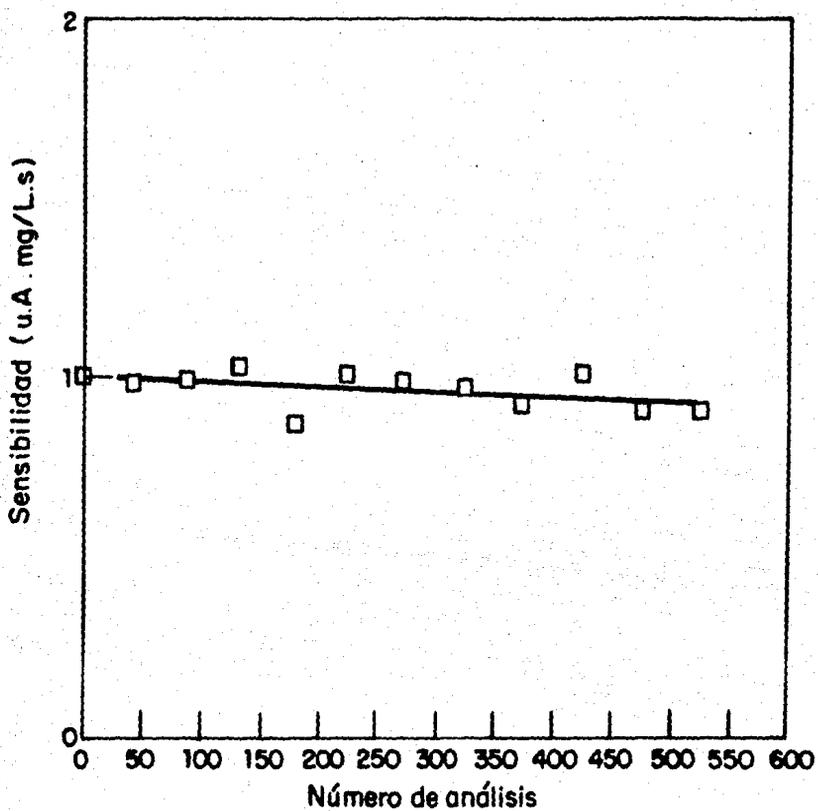


Figura 40. Estabilidad operacional evaluada para la determinación de sacarosa cuando las enzimas fueron inmovilizadas químicamente.

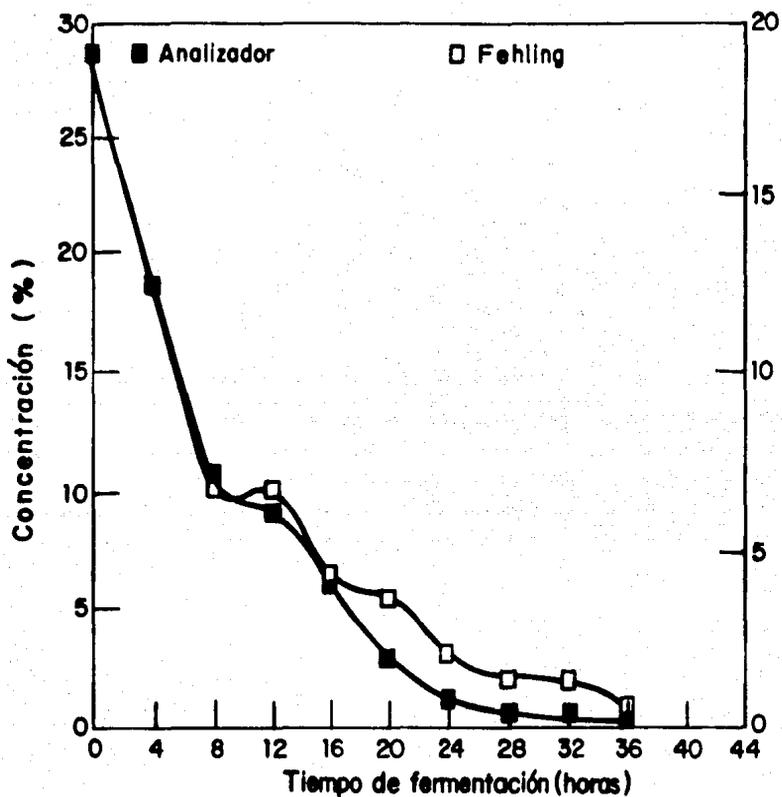


Figura 41. Seguimiento de una fermentación alcohólica empleando la técnica de azúcares reductores por Fehling y mediante el electrodo enzimático.

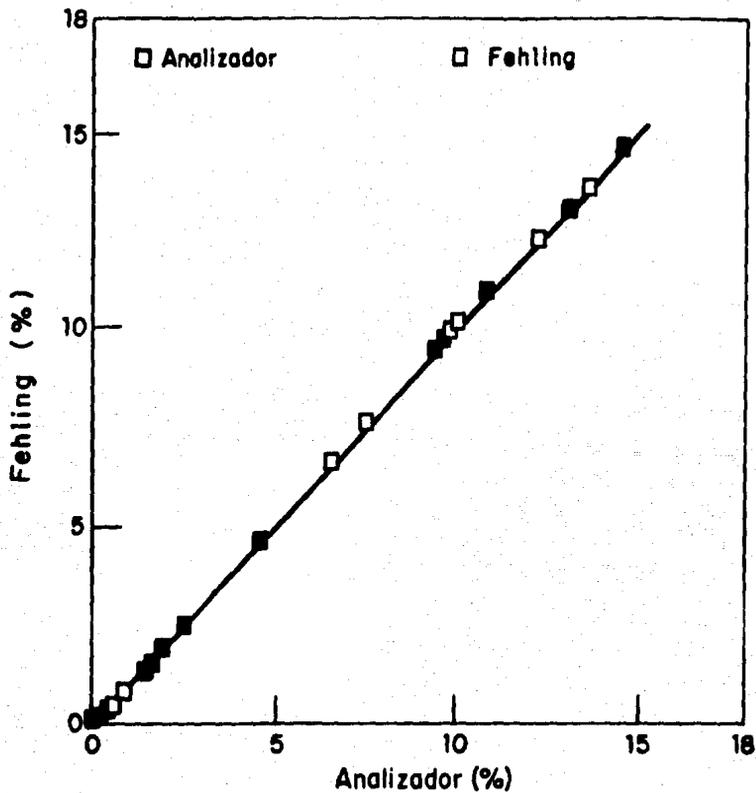


Figura 42. Correlación observada entre el método del analizador enzimático y el método de Fehling para determinación de sacarosa.

existen diferencias considerables. Desde luego el analizador tiene ventajas en cuanto al tiempo y simplicidad de la determinación. El método de Fehling no podría discriminar entre azúcares reductores no fermentables. El hecho de que en las tinajas de fermentación analizadas, los valores de azúcares cuantificados por el método de Fehling y mediante el analizador fueran muy parecidos, sugiere que los azúcares fermentables de ese lote fueron muy similares a los reductores totales. Sin embargo, se sabe que esta situación puede variar importantemente función del tiempo de zafra y del tiempo de almacenamiento de la melaza.

Es importante señalar que, por las características del sistema enzimático, este presenta la desventaja de que no solo determina sacarosa, sino que también cuantifica como sustancias interferentes la glucosa y fructosa que pueden estar presentes en el medio.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha desarrollado una metodología para la selección del material a usar en la construcción de membranas enzimáticas. Además en este trabajo se establecieron las metodologías de inmovilización de las enzimas β -galactosidasa-glucosa oxidasa y mutarotasa, invertasa y glucosa oxidasa para la determinación específica de lactosa y sacarosa respectivamente.

Durante la selección de los soportes para la inmovilización las pruebas con ferricianuro de potasio (figura 14), indicaron que existe una relación directa entre el espesor que presenta cada membrana y su capacidad para retardar la difusión de moléculas interferentes a través de ella. Las membranas con mayor espesor, tubos de diálisis benzoilados (TDB) y Spectrapor (SPC), con espesores de 27 y 23 μm respectivamente, resultaron adecuados para retener el paso de esta molécula y no afectar en 60 segundos la lectura del sensor.

Las membranas más delgadas (celofán y acetato de celulosa), con 20 y 3 μm no fueron adecuadas para limitar el efecto del ferricianuro de potasio sobre la lectura del sensor.

En la evaluación de los soportes usando ferrocianuro de potasio (figura 15), se observó que esta molécula es la que presenta el mayor efecto de interferencia sobre las lecturas del electrodo sensor. Al igual que usando ferricianuro, las membranas SPC y TDB resultaron las más adecuadas para disminuir su efecto sobre el sensor. Por otra parte, el celofán y acetato de celulosa no fueron adecuados para disminuir el efecto de esta molécula en las lecturas del sensor.

Cuando se evaluaron individualmente los distintos materiales a usar como soporte, en relación a su comportamiento con ácido ascórbico y ácido úrico (figura 16), se observó que el ácido ascórbico tiene mayor efecto que el ácido úrico sobre las lecturas del sensor. Al igual que en las pruebas con ferricianuro y ferrocianuro las membranas SPC y TDB fueron las mejores para limitar la difusión y por tanto inhibir el efecto del ácido ascórbico y ácido úrico sobre el sensor.

Aquellas membranas que mostraron las mejores características para la disminución del efecto de las distintas moléculas que interfieren en la lectura del sensor, podían ser usadas como membrana interna mientras que las que mostraron poca eficiencia para la disminución del efecto de interferencia de las moléculas evaluadas deberían ser usadas como membrana externa.

Al realizarse las pruebas con los distintos arreglos de dos membranas, el que resultó más eficaz para disminuir el efecto de interferencia de los compuestos usados fue el arreglo celofán (membrana externa), acetato de celulosa (membrana interna). Este arreglo fue el que se empleó en la construcción de las membranas enzimáticas para la determinación de lactosa.

En la construcción de membranas enzimáticas para la determinación de sacarosa, el arreglo celofán-celofán presentó mejores resultados que el arreglo celofán-acetato de celulosa en el control de la respuesta en el electrodo enzimático.

Se ha establecido una metodología de inmovilización por atrapamiento físico de las enzimas β -galactosidasa y glucosa oxidasa para la construcción de membranas enzimáticas que permiten la determinación específica de lactosa empleando un electrodo enzimático.

Las membranas enzimáticas para determinación de lactosa presentaron un rango lineal de 0-400 mg/dL realizando recalibraciones cada 30 determinaciones.

Cuando se efectuaron recalibraciones al menos cada cinco determinaciones, el rango lineal pudo ser aumentado por arriba de 600 mg/dL de lactosa.

La estabilidad operacional de las membranas enzimáticas para determinación de lactosa es de al menos 600 análisis, sin pérdida apreciable de la sensibilidad y con un margen de error inferior al 5%.

Se estableció una metodología de co-inmovilización por atrapamiento físico de las enzimas: invertasa, mutarotasa y glucosa oxidasa para la construcción de membranas enzimáticas específicas para la determinación de sacarosa.

Empleando las membranas enzimáticas con enzimas inmovilizadas por atrapamiento físico se obtienen rangos lineales de detección de 0-600 mg/dL.

La evaluación de la estabilidad operacional indicó que con estas membranas pueden efectuarse cerca de 200 análisis sin pérdida considerable de sensibilidad.

Se estableció una metodología de co-inmovilización por enlace covalente empleando como agente químico el glutaraldehído.

Las membranas enzimáticas construídas con el proceso anterior mostraron rangos lineales de 0-1000 mg/dL.

La estabilidad operacional indicó que las membranas se mantienen sin cambios significativos en la sensibilidad durante un promedio de 500 análisis.

La evaluación comparativa del método del analizador enzimático en el caso de sacarosa evidenció que entre el método del analizador y el método de Fehling no existen diferencias considerables en la determinación. El analizador tiene ventajas respecto al tiempo y simplicidad de la determinación.

REFERENCIAS

Aldons, J. y Farrance, I., (1981); "Paracetamol interference with YSI glucose analyzer", Clin. Chem., 27 (5), 782-783.

Aston, W.J. y Turner A. P. F., (1984). "Biosensor and biofuel cells", Biotechnol. and Genetic Engineering Reviews, 1, 89-120.

Bautista, E. D. (1983); "Diseño, construcción y aplicación de un electrodo microbiológico para la detección de penicilinas". Universidad Autónoma de Puebla, Escuela de Ciencias Químicas; Tesis de licenciatura.

Borman, S. (1987); "Biosensors: potentiometric and amperometric". Anal. Chem., 59, 1091-1098A.

Carr, W. P., y Bower, L. D., (1980); "Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry", John Wiley & Sons, New York.

Caras, S. y Janata, J., (1980). "Field effect transistor sensitive to penicillin", Anal. Chem., 52, 1935-1937.

Clark, L. C. Jr., y Lyons, C., (1982); "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery". Ann. N. Y. Acad. Sci., 102, 129-145.

Clark, L.C., (1976); "The hydrogen peroxide sensing platinum anode as an analytical enzyme electrode". En: Methods in Enzymology, 41, 448-470.

Corcoran, C. A. y Rechnitz, G. A., (1985); "Cell based biosensors", Trends in Biotech, 3 (4), 192-196.

Czaban, J.D., (1985); "Electrochemical sensors in chemical chemistry Yesterday, today, tomorrow", Anal. Chem. 57(2), 345A-350A.

Eddowes, M. J (1987/88); "Direct immunochemical sensing: basic chemical principles and fundamental limitations", Biosensors, 3, 1-15.

Galindo, F.E. (1986); "Electrodos biológicos", Ciencia y Desarrollo, Nov-Dic., (1986), 71, 37-54.

García, R.J.L (1986); "Diseño, construcción y caracterización de un electrodo enzimático sensible a glucosa", E.N.E.P. Iztacala UNAM, Escuela de Biología., Tesis de licenciatura.

Gronow, M., (1984); "Biosensors"; Trends in Biotech. 8 (8), 336-339.

Grooms, T.A., Clark, L.C. y Weiner, B.J., (1980); "The design of peroxide enzyme membrane polarographic sensors for clinical and industrial analysis", En: Enzyme Engineering, vol. 5, Westal & Royer, Plenum Press, New York, 217-223.

Guilbault, G. G.(1976), "Enzyme electrodes and solid surface fluorescence methods", En Methods in enzymology, Ed. Kolowick, S. y Kaplan, 44, Academic Press, N. Y. 461-466.

Guilbault, G. G.(1976), "Enzyme electrodes probes", Enzyme Microb. Technol, 2, 258-264.

Guilbault, G. G. (1982); "Analytical uses of immobilized enzymes" En: Enzyme Engineering, 6, Plenum Press, New York. 385-404.

Gurin, S. y Hood, D. B., (1939); "Carbazole reaction for hexoses", J. Biol. Chem., 131. 211-213.

Hartemeier, W. (1985); "Immobilized biocatalyst from simple to complex systems" Trends in Biotech. 3 (6) 149-153.

Higgins, I.J., Cardosi, M. and Turner, A. P., (1985); "Harnessing biologically catalysed electron transfer reactions for biosensors". Preprint, (Life Sciences), Plenum Press.

Janata, J. y Moss, S. D. (1976). "Chemically sensitive field effect transistors"; Bimed. Eng., July, 241-245.

Janata, J. (1985). "Chemically sensitive field effect transistors". En: Solid State Chemical Sensors (Eds. J. Janata and R. J. Huber), Academic Press, N. Y.

Jerker, P. y Rolf, A., (1976); "Immobilized enzymes to agar, agarosa and sephadex supports. *Methods in Enzymology*, 19, 261-273

Keyes, M. H., Semersky, D. N. y Gray, D. N., (1979); "Glucose analysis utilizing immobilized enzymes", *Enzyme Microb. Technol.*, 1, 91-94.

Lowe, C.R., (1984); "Biosensors", *Trends in Biotechnology*, 2, 59-65.

Lowe, C. R., (1985); "An introduction to the concepts and technology of biosensors", *Biosensors*, 1, 3-16.

Moore, A. W.(1987); "Biosensors a discussion document", *International Industrial Biotechnology*, Dec/Jan, 189-192.

Morrison, R. B. y Boyd, R. N., (1973); "Organic Chemistry", Allyn and Bacon, Inc., B. Y., 1127-1129.

Park, J. T., Johnson, M. J.,(1949); "Ferricyanide method", *J. Biol. Chem.* 181, 149-153

Russell, L. J., Rawson, K. M., (1986); " The commercialization of sensor technology in clinical chemistry; an outline of potential difficulties", *Biosensors*, 2, 301-318.

Sibbald, A., (1986); "Recent advances in field-effect chemical sensors", *J. Molecular Electronics*, 2, 51-83.

Shultz, J.S. Meyerhoff, M., (1987); "Status of monitoring in biotechnology", *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 897-899.

Satoh, I., Karube, I. y Suzuki, I., (1976); "Enzyme electrode for sucrose", *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 289-292.

Sostman, H. E. (1981); "Yellow Springs Instruments Co. Inc.", *Clin. Chem.* 27, (5), 283-284

Suzuki, J.S. y Karube, I., (1979); "Microbial electrodes for fermentation processes", *Ann. New York Acad. Sci.(Biochem. Eng.)*, 326, 265-269.

Susuki, S. y Karube, I., (1981); "Bioelectrochemical sensors based on immobilized enzymes, whole cells and proteins", *Appl. Biochem. Bioceng.*, 3, 145-174.

Summer, J.B., y Howell, S. F., (1935); "A method for determination of saccharase activity", *J. Biol. Chem.* 108, 51-53.

Sutherland, R. M., Dahne, C., Place, T.F. y Ringrose, A. S., (1984); "Biosensor based in optical fiber", *Clin. Chem.* 30, 1533-1535.

Taylor, P. J., Kmetec, E. y Johnson, M.J. (1977); "Design, construction and applications of a galactose selective electrode", *Ann. Chem.*, 10, 790-796.

Tramper, J., (1985); "Immobilizing biocatalyst for use in syntheses" *Trends in Biotechnol.* 3, (2), 45-50.

Turner, A.P.F y Pickup, J.C., (1985); "Diabetes mellitus: biosensors for research and management", *Biosensors*, 1, 85-115.

Urdike, S. J. y Hicks, G.P., (1967); "Glucose electrode based on an oxygen probe", *Nature*, 214, 995-1000.

Van Brunt, J., (1987); "Biosensors for bioprocesses", *Biotechnology*, 5 437-440

Van Der Shoot, B. H. y Bergveld, P., (1987/88); "ISFET based enzyme sensors", *Biosensors*, 3, 48-54.

Watson, L. D., Maynerd, P., Cullen, D. C., Sethi, R. S., Brettie, J. y Lowe, C. R., (1987/88); "A microelectronic conductimetric biosensor", *Biosensors*, 3 (2), 71-87.

Xu, Y., Guilbault, G. y Kuan, S., (1990); "Fast responding lactose enzyme electrode" *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 104-108.

Zaborsky, O., (1977); "Immobilized Enzymes", Edited by CRC, Press Inc. New York.