

Nº 211
R.E.S.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EMPLEO DE TECNICAS DE ANALISIS POR INYECCION
EN FLUJO (FIA) CON BIOSENSORES PARA LA
DETERMINACION DE PARAMETROS EN VINOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

MARIA DEL PILAR CAÑIZARES MACIAS

CD. UNIVERSITARIA

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
ANTECEDENTES	5
Métodos de flujo continuo	5
SISTEMA FIA	11
Características de la señal FIA	11
CONSIDERACIONES GENERALES DEL FIA	13
Difusión axial y radial	13
Coeficiente de dispersión	15
APLICACIONES DEL FIA	20
PROTEINAS Y ENZIMAS	23
Reacción enzimática	25
BIOSENSORES	28
Enzimas inmovilizadas	28
DETERMINACIÓN ENZIMATICA DEL GRADO ALCOHOLICO	30

PARTE EXPERIMENTAL	32
Sistema FIA	32
Inmovilización de la enzima Alcohol Oxidasa en alginato	34
RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
Determinación de acetaldehído	36
Determinación de H_2O_2	38
Pruebas de actividad de la enzima Alcohol Oxidasa inmovilizada en alginato	41
Acoplamiento del sistema FIA-Biosensor de etanol	47
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFIA	56

INTRODUCCION

Los métodos analíticos se desarrollan buscando cumplir uno o varios de los siguientes parámetros :

- precisión
- exactitud
- especificidad
- cantidad mínima detectable
- tiempo
- costo
- etc.

de los anteriores el tiempo y el costo están relacionados con el método analítico seleccionado, así como la precisión y la exactitud con el concepto de error del método. La cantidad mínima detectable y la especificidad dependerá del tipo de análisis que se practica.

Cuando se realiza el análisis de una muestra se requiere cumplir con tres parámetros que se relacionan entre sí: precisión, costo y tiempo. El método de análisis seleccionado puede proporcionar dos de estos parámetros pero nunca los tres. Es así, por ejemplo, que si se busca precisión, o el tiempo para llevar a cabo el análisis es largo o el costo elevado, si por otra parte, lo que se requiere es rapidez, o la precisión es baja o el costo alto. Por lo tanto, si se busca bajo costo, o la precisión es mala o los tiempos de análisis son largos.

Cuando los análisis que deseamos realizar, son los correspondientes al control de proceso de una industria química, se introduce un nuevo factor que es

el número de muestras. Mientras mayor sea el número de muestras que se tomen, mucho más fiel será el modelo que se haga del proceso, sin embargo esto afecta el costo y el tiempo.

Dado la importancia que ha cobrado el tema de la calidad y el control total de la calidad, es hoy más importante que nunca, el que el modelo del proceso reproduzca con mayor fidelidad la realidad de la planta industrial, lo que significa un mayor número de muestras manteniendo un bajo nivel de error en los resultados obtenidos.

A esto se une otro de los problemas clásicos de la toma de muestras en química analítica: la integridad y conservación de la muestra. Esto lleva a preguntarnos lo siguiente: ¿ Es la muestra que se toma representativa del proceso?. ¿ No se altera la muestra al retirarla del proceso? ¿ Es o no crítico el tiempo que transcurre entre la toma de muestra y cuando ésta es analizada?. Esta serie de interrogantes ha conducido a considerar el hecho de que es más fiel la reproducción del proceso cuando el análisis y muestreo se encuentran integrados a éste, como los métodos de análisis en línea (on-line), que los que se encuentran fuera del proceso o que se realizan en un laboratorio alejado del reactor o de la planta industrial, llamados métodos fuera de línea (off-line).

Es entonces que la industria moderna requiere de métodos de análisis que permitan analizar muchas muestras, con una alta precisión y al menor costo posible.

Es así como a mediados de la década de los 70's se desarrolló un sistema que posee las características requeridas: el "Análisis por Inyección en Flujo" (FIA: Flow Injection Analysis)(1).

El éxito que este sistema ha podido tener ha hecho que las áreas de aplicación del sistema FIA se hayan incrementado enormemente, actualmente se ha reportado el empleo de métodos de análisis FIA en áreas como la agricultura, análisis clínicos, medicina(2), industria farmacéutica, y en los últimos años en la industria alimentaria.

En la industria vitivinícola el FIA puede ser una importante herramienta de trabajo (3,4), ya que es necesario el análisis de muchas muestras por unidad de tiempo, en las que es indispensable medir diversos parámetros, como lo son el grado alcohólico, pH, acidez total, azúcares reductores, etc.

Para la determinación del grado alcohólico existen métodos ya establecidos como la ebulloscopia, la destilación, y la oxidación química; sin embargo todos ellos requieren de largos tiempos de análisis y además el gasto de reactivos es elevado y la precisión muchas veces no es tan buena como se desearía(5).

Una forma en la que los sistemas FIA permiten la determinación del grado alcohólico de vinos o destilados, logrando además de velocidad de análisis, bajo costo, y altísima especificidad (6), es a través del empleo de biosensores, los cuales consisten en la incorporación de una enzima específica inmovilizada dentro del sistema (7). Con ello se obtiene la máxima especificidad que las enzimas permiten con la alta sensibilidad, automatización y bajo costo de los sistemas FIA.

OBJETIVOS

El desarrollo y optimización de métodos de análisis por técnicas FIA permitirá evaluar en una forma clara, las ventajas en cuanto a precisión, especificidad o selectividad y capacidad de análisis (número de muestras por unidad de tiempo) de esta nueva metodología.

El empleo de biosensores permitirá demostrar la especificidad en la respuesta a un componente en particular, sin importar la matriz en la que este se encuentre y esto sin requerir de procedimientos de "limpieza".

El desarrollo de la tesis permitirá adquirir experiencias en esta metodología nueva en México.

ANTECEDENTES

Métodos de flujo continuo

El término de métodos de flujo continuo se aplica al procedimiento analítico en donde la concentración del analito es medida sin que se detenga el flujo del gas o líquido en el que éste está contenido.

Las muestras son introducidas sucesivamente y a intervalos regulares dentro de un canal por el cual fluye el líquido con el o los reactivos para finalmente pasar a través de una celda de flujo y un sistema de detección que la mayoría de las veces es algún tipo espectrofotómetro.

Dentro de los métodos de análisis de flujo continuo se encuentra el "Análisis Continuo Segmentado" (SFA:Segmented Flow Analysis) y el "Análisis por Inyección en Flujo" (FIA).

El SFA fue descrito en 1957 por Skeggs (8); en este método las muestras son aspiradas secuencialmente y el flujo es segmentado por burbujas de aire; también existe un ciclo de lavado entre muestra y muestra así como la eliminación de las burbujas de aire antes de llegar a la celda y detector. El papel de las burbujas de aire es prevenir el mezclado entre muestras, evitar la dispersión o dilución de la muestra dentro del flujo, así como generar un flujo turbulento por compresión de las burbujas y de esta forma llegar al equilibrio químico.

El FIA fue introducido en 1974 como un procedimiento analítico, que a diferencia del SFA, está basado en la inyección de una muestra líquida dentro de

otro líquido que funciona como portador sin que exista una división de éste por burbujas de aire, ni ciclos de lavado (9,10,11).

En el sistema FIA, la muestra inyectada es transportada a lo largo del sistema hasta un detector que continuamente registra una señal proporcional a la concentración (12,13,14) (figura 1).

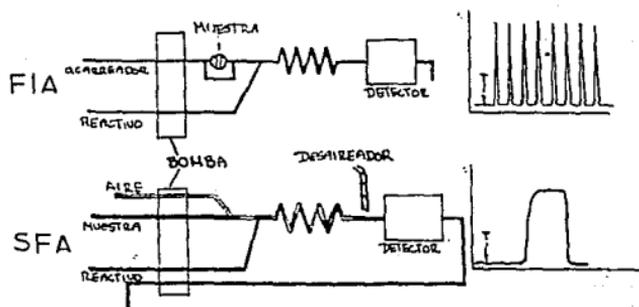


FIG.1

Los métodos SFA como los FIA permiten la miniaturización y automatización de los procesos manuales de la química en disolución. Cualquier proceso de análisis que se lleve a cabo en disolución, podrá ser adaptado a SFA o FIA (figura 2).

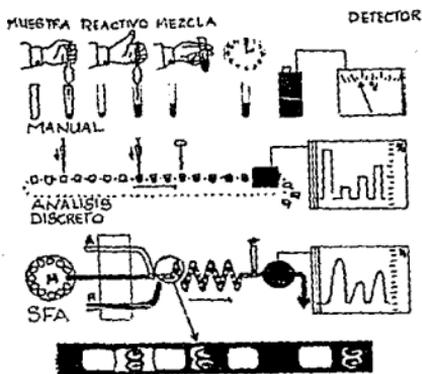


FIG.2

COMPARACION ENTRE LOS DOS TIPOS PRINCIPALES DE ANALISIS

CONTINUO:

SEGMENTADO (SFA) Y NO SEGMENTADO (FIA) (figura 3)

PARAMETROS	SFA	FIA
Introducción de muestra	Aspiración	Inyección
Volumen de muestra	0.2-2 ml	10-100 μ l
Tiempo de respuesta	2-30 min	3-60 seg
Diámetro interno del tubo	2mm	0.5-0.7 mm
Detección realizada	en régimen de equilibrio	dispersión controlada
Capacidad	80 muestras/hora	300 muestras/hora
Precisión	1 a 2%	1 a 2%
Gasto de reactivos	elevado	bajo
Ciclo de lavado	esencial	no esencial
Análisis cinético continuo	no es posible	stopped-flow

No Hay

Hoja

No. 8.

Valoraciones	no	si
Datos suministrados	altura del pico	altura del pico ancho del pico area del pico

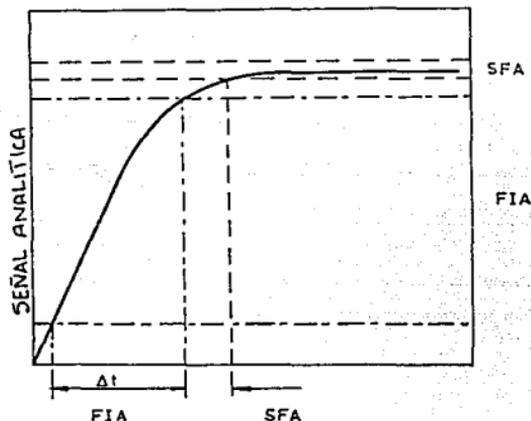


FIG.3

Debido a que el FIA posee mayores ventajas que el SFA se ha intentado adaptar al FIA los métodos clásicos de análisis; para esto es necesario conocer los parámetros principales que intervienen en el FIA.

El sistema FIA se basa en el control de la dispersión física que presenta la muestra a lo largo del sistema. Esta dispersión es ocasionada, principalmente, por las características geométricas del mismo, como son: la longitud del sistema, la longitud del reactor así como el radio del tubo utilizado y el volumen. Otra característica importante que afecta a la dispersión es el aspecto hidrodinámico

que involucra la velocidad de flujo, la velocidad lineal, así como el tiempo de residencia y el tiempo de regreso a la línea base de la señal FIA.

De esta manera, si se logra controlar la dispersión se obtienen resultados reproducibles, precisos y rápidos.

SISTEMA FIA

El sistema FIA consta, básicamente, de los siguientes componentes:

- a) Una bomba peristáltica que impulsa al acarreador a través de tubos capilares y controla la velocidad de flujo.
- b) Una válvula de inyección que introduce la muestra al flujo acarreador de manera reproducible.
- c) Un reactor, el cual puede variar de tamaño.
- d) Un detector que registra continuamente la presencia del producto de reacción, dando una señal típica de FIA (15).

Sin embargo, la complejidad del sistema va a depender del número de pasos u operaciones que se deban llevar a cabo para generar un producto detectable, es así como se han diseñado diferentes técnicas como es el FIA-invertido y el "stopped-flow" (16,17,18).

Características de la señal FIA:

Los parámetros de medición (análisis cuantitativo) se toman de la señal que se obtenga (figura 4). Así, los parámetros que se registran son:

- a) la altura (H), el ancho (W) y/o el área (A) del pico, los cuales están relacionados con la concentración del analito, siendo la altura la medición más usual.
- b) El tiempo de residencia, T , que se define como el lapso entre la inyección y el máximo de la señal. Este parámetro es diferente al del tiempo de viaje, t_a , el

cual es el periodo entre la inyección y el inicio de la señal, la diferencia entre estos dos parámetros, $t' = T - t_a$, es muy pequeña y es característica de la curva de FIA.

c) El tiempo de regreso, T' , que es el periodo que transcurre entre que aparece el máximo de la señal hasta que regresa a la línea base.

d) El tiempo de regreso de línea base a línea base, Δt , el cual es el intervalo que va desde el inicio de la señal hasta el regreso a la línea base.

Por lo tanto:

$$T + T' = t_a + \Delta t$$

$$\Delta t = t' + T'$$

En ciertos casos, (cuando se hace una titulación por FIA) es más conveniente medir el ancho del pico en lugar de la altura (19,20).

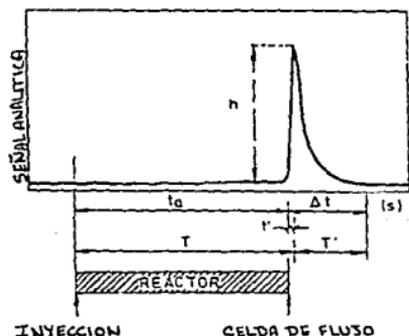


FIG.4

CONSIDERACIONES GENERALES DEL FIA

La forma del pico que se obtiene esta relacionada con la dispersión física del analito y reactivos dentro del sistema FIA.

Existen dos mecanismos que contribuyen a la dispersión de la muestra inyectada: el transporte conveccional y el transporte difusional (21).

- 1) El transporte conveccional, en el FIA, ocurre bajo condiciones de flujo laminar .
- 2) El transporte difusional se da por la presencia de un gradiente de concentración ocasionado por el flujo laminar, esto genera dos tipos de difusión: axial y radial (22,23) (figura 5).

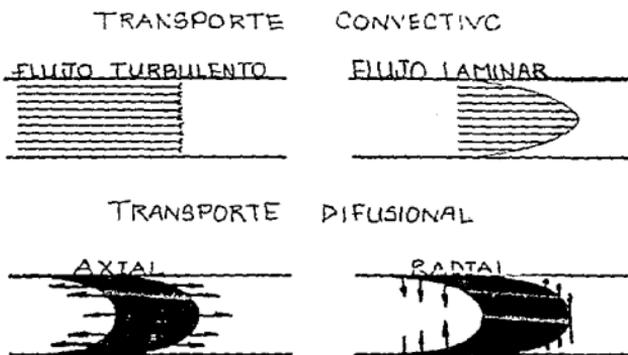


FIG.5

La difusión axial se genera por un gradiente de concentración horizontal, al aumentar la diferencia de concentración, la dispersión crece. Por otra parte, la difusión radial es perpendicular a la dirección del flujo y tiende a balancear la

concentración para de esta forma disminuir la dispersión. Este tipo de difusión juega el papel de las burbujas de aire en el SFA, generando un flujo turbulento, pero con la ventaja de que no es necesario llegar al equilibrio químico para obtener una señal analítica válida.

En el sistema FIA, por lo general, no se alcanza la difusión de tipo radial ya que los tiempos de análisis son muy cortos (figura 6).

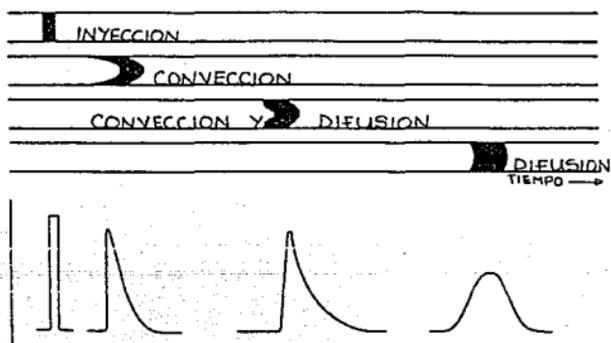


FIG.6

Coefficiente de dispersión

Una muestra homogénea en solución, antes de ser inyectada dentro del sistema FIA, tiene una concentración C^0 . Al inyectar un volumen de esta en el flujo acarreador se forma una zona de dispersión que depende, principalmente, de la geometría del reactor y del flujo.

De esta manera, la señal se deforma y se registra como un gradiente de concentraciones con un máximo (C^{\max}) (figura 7).

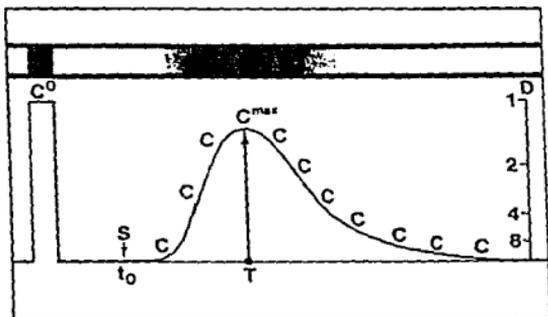


FIG.7

En el diseño del sistema FIA es importante saber cuanto de la muestra se diluye y el tiempo que tarda desde que es introducida al sistema hasta llegar al detector. Con este propósito, Růzicka propuso en 1977 un modelo para medir la dispersión (24,25), definió el coeficiente de dispersión como el cociente entre la concentración de la muestra antes y después del proceso de dispersión

$$D = C_0 / C_{max}$$

C_0 : concentración del analito sin diluir

C_{max} : concentración del analito al pasar por el sistema FIA

por lo tanto, la dispersión se calcula por la altura del pico y siempre es mayor que 1.

Es necesario establecer ciertos límites de dispersión para que los resultados obtenidos sean reproducibles y confiables, es así como la dispersión se ha clasificado en limitada, media y alta (26,27,28).

Los valores para los diferentes tipos de dispersión son:

Limitada: $1 < D < 3$ cuando no se requiere de reacción química

Media: $3 < D < 15$ cuando se requiere de reacción química

Alta: $D > 15$ para valoraciones por FIA

Con una dispersión media, no es requisito que se lleve a cabo todo el mezclado en el reactor, solo lo necesario para asegurar que se registra una señal, por lo tanto, no es indispensable alcanzar el equilibrio químico para obtener resultados analíticos válidos, haciendo los tiempos de análisis más cortos lo que permite analizar un mayor número de muestras por unidad de tiempo.

La dispersión también se ve afectada por los siguientes parámetros:

- a) Volumen de muestra
- b) Longitud del reactor
- c) Velocidad de flujo

d) Geometría del reactor

a) Volumen de muestra:

Cuando la muestra reacciona completamente se obtiene un solo pico angosto y alto. Al disminuir la cantidad de muestra que se inyecta la dispersión aumenta, por otra parte, si el volumen inyectado es muy grande no existe un mezclado adecuado y se obtiene una señal con una meseta o dos picos (29).

b) Longitud del reactor:

Al aumentar la longitud del reactor, el tiempo de residencia de la muestra aumenta, así como la difusión de tipo axial y por lo tanto la dispersión (30) (figura 8).

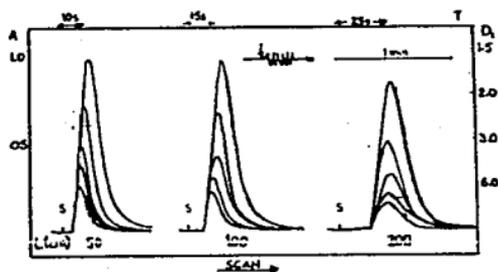


FIG.8

c) Velocidad de flujo:

Una disminución en la velocidad de flujo ocasiona un aumento en la dispersión, de esta forma si la velocidad aumenta la dispersión disminuye (figura 9).

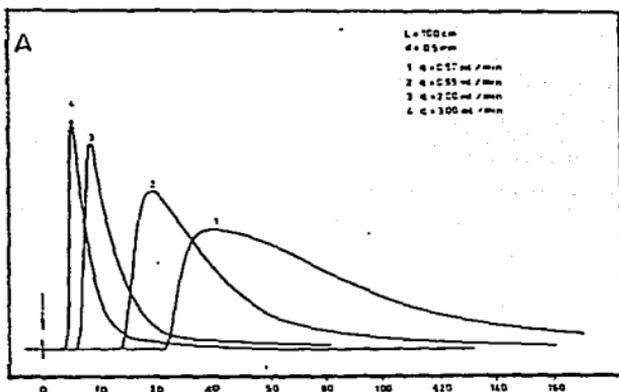


FIG.9

d) Geometría del reactor:

La función del reactor es incrementar el mezclado de tipo radial y reducir el perfil de la velocidad parabólica, formada por la dirección axial.

Se pueden emplear diversos reactores, esto dependiendo del tipo de reacción que se requiera (31) (figura 10).

El tipo más usual es el de geometría de "serpentin" esto hace que el flujo secundario formado dentro de él promueva el mezclado de la muestra y reactivos en dirección radial (32,33) (figura 11).

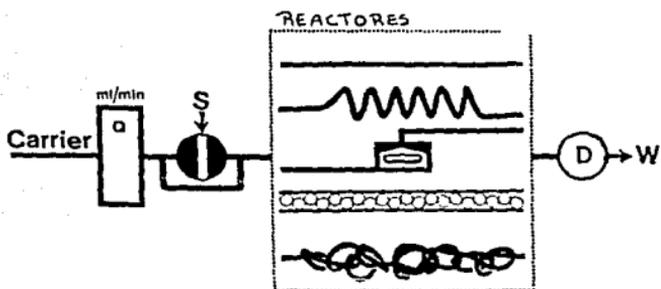


FIG.10

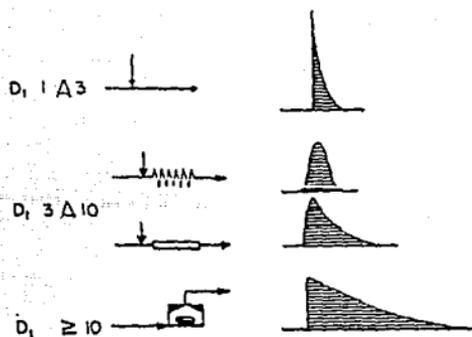


FIG.11.

APLICACIONES DEL FIA

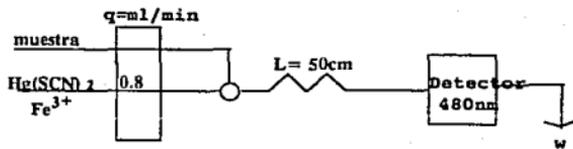
Ejemplos:

1. Determinación de cloruros

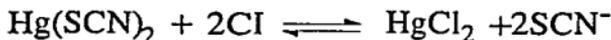
Reactivo: El flujo acarreador se prepara disolviendo 0.626g de tiocianato de mercurio (II), 30.3g de nitrato de hierro (III), 4.72g de ácido nítrico concentrado y 150 ml de metanol aforando con agua desionizada a un litro.

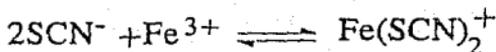
Disoluciones estándar: Partiendo de una disolución de cloruros de 1000 ppm, se realizan diluciones para obtener disoluciones estándares en un rango de 5-75 ppm de cloruro.

El flujo acarreador se impulsa a través del sistema y los estándares de cloruros se inyectan sucesivamente por y por cuadruplicado (figura 12).



El procedimiento analítico se basa en la siguiente reacción:





El flujo acarreador contiene $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ y $\text{Fe}(\text{III})$. El cloruro de la muestra inyectada reacciona con el $\text{Hg}(\text{SCN})_2$, liberando al ion SCN^- , el cual reacciona con el $\text{Fe}(\text{III})$ para formar el complejo $\text{Fe}(\text{SCN})_2^+$ de color rojo que se mide espectrofotométricamente a 480 nm. La altura del pico es proporcional a la concentración de cloruros presentes.

2. Determinación fotométrica de fosfatos mediante FIA normal y FIA invertido.

Reactivos:

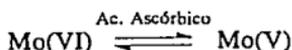
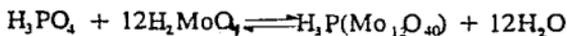
- ◆ Disolución de heptamolibdato amónico 0.005 M en ácido nítrico 1.00 M.
- ◆ Disolución de ácido ascórbico al 0.5% conteniendo un 10% de glicerina.
- ◆ Disolución patrón de fosfato de 1g/L. A partir de esta se preparan diluciones de 5 a 30 g/ml de fosfato.

La determinación analítica de fosfatos se basa en la formación del heteropoliácido con molibdato (coloración amarilla) que incrementa el poder oxidante de éste y entonces es reducido por el ácido ascórbico de $\text{Mo}(\text{VI})$ a $\text{Mo}(\text{V})$ (azul de molibdeno), la intensidad del color es proporcional a la concentración de fosfatos.

El ácido ascórbico posee un potencial redox igual a 0.17v y el $\text{Mo}(\text{VI})$ igual a 0.48 v, por lo tanto la reacción es posible y además cuantitativa.

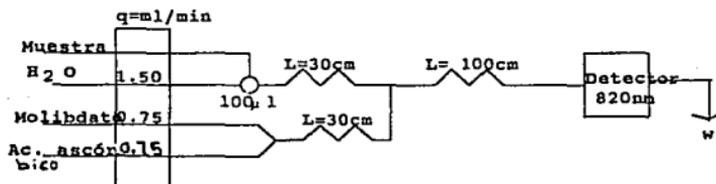
La formación del heteropoliácido de molibdeno aumenta el poder oxidante del Mo(VI) haciendo que la reacción redox con el ácido ascórbico sea más fuerte.

Reacciones:



El producto de reducción se mide a 820 nm.

FIA normal:



En la configuración de FIA normal, la muestra se inserta en una corriente de agua, para evitar señales parásitas, que confluye con otra corriente mezcla de molibdato y ácido ascórbico, dando lugar al heteropoliácido y la posterior reducción del molibdato a lo largo del reactor L3, midiéndose continuamente en el detector fotométrico a 820 nm.

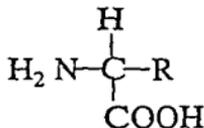
En la configuración de FIA invertido, la muestra circula continuamente por el sistema, inyectándose en ella la mezcla de reactivos cuando se requiera determinar el analito. Este tipo de configuración tiene como ventaja principal el ahorro de reactivos.

FIA invertido:

PROTEÍNAS Y ENZIMAS

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes de la células, -el peso molecular oscila entre 12,000 y 1,000,000 daltons- y constituyen más del 50% del peso seco de las mismas.

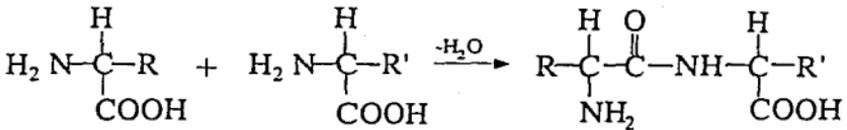
Todas las proteínas, desde las que aparecen en las bacterias más antiguas hasta las que se encuentran en los seres superiores, están conformadas por el mismo conjunto básico de 20 aminoácidos, los cuales poseen como denominador común(excepto la prolina) un grupo carboxilo libre y un grupo amino libre en el carbono alfa; difieren entre sí en la estructura de las cadenas laterales (grupos R):



por medio de los grupos R se pueden clasificar a los aminoácidos en cuatro grupos (a pH fisiológico [6-7]): 1) no polares; 2) polares sin carga; 3) polares con carga negativa (aminoácidos ácidos); 4) polares con carga positiva (aminoácidos básicos).

La combinación de los aminoácidos, unidos covalentemente (unión peptídica), forman cadenas de péptidos que a la vez se unen para formar las proteínas.

UNION PEPTIDICA:



Las proteínas son los instrumentos mediante los cuales se expresa la información genética. Al igual que existen en el núcleo de la célula millares de genes, existen, en correspondencia, millares de proteínas que llevan una función característica determinada por el gen, lo que las hace extremadamente versátiles en sus funciones.

Las proteínas difieren unas de otras debido a que cada una posee una secuencia diferente de aminoácidos, lo que le confiere a una proteína actividad enzimática, hormonal, de anticuerpo u otra función biológica.

Dentro de las proteínas más variadas y con mayor grado de especialización se encuentran las enzimas.

Las enzimas actúan como catalizadores capaces de aumentar en gran medida la velocidad de reacciones químicas específicas, sin que se consuman en el proceso. Cada enzima puede catalizar solamente un tipo específico de reacción química, por lo tanto, se necesitan centenares de enzimas diferentes en el metabolismo de cualquier clase de célula.

Las enzimas superan notablemente a los catalizadores confeccionados por el hombre en la especificidad reactiva, su eficacia catalítica radica en la capacidad de reacción en condiciones suaves de temperatura y de pH.

La diferencia más importante con los catalizadores sintéticos estriba en que las reacciones catalizadas enzimáticamente tienen un rendimiento del 100% y no existen subproductos (35,36).

Reacción enzimática

Las enzimas se unen al sustrato correspondiente para formar un complejo enzima-sustrato (ES) transitorio, que se descompone y forma la enzima libre y los productos. A medida que aumenta la concentración de sustrato S, la actividad catalítica de una concentración fija de enzima E aumentará de forma hiperbólica, hasta acercarse a una velocidad máxima característica, V_{max} , en la que toda la enzima se encuentra, esencialmente, en forma de complejo (ES) y se halla, por lo tanto, saturada con el sustrato S. La concentración de sustrato que proporciona la mitad de la V_{max} es lo que se define como la constante de Michaelis-Menten, K_m , y es característica de cada enzima cuando actúa sobre un sustrato determinado (figura 13).

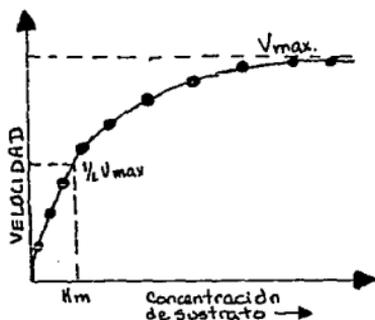


FIG.13

La ecuación de Michaelis- Menten:

$$V_o = V_{max}[S] / K_m + [S]$$

V_o = velocidad inicial si la concentración de sustrato es $[S]$

V_{max} = velocidad máxima

K_m = constante de Michaelis-Menten de la enzima para un sustrato en particular

relaciona la velocidad de reacción enzimática con la concentración de sustrato y con la V_{max} , mediante la constante K_m .

La velocidad de reacción se ve afectada por dos clases de inhibidores: competitivos y no competitivos.

Un inhibidor competitivo compite con el sustrato por la unión al sitio activo de la enzima, pero, una vez unido, no puede ser transformado por la enzima. Esta inhibición puede anularse o aminorarse, simplemente, aumentando la concentración de sustrato. La V_{max} no se altera, pero el valor de K_m dependerá de la concentración del inhibidor. En la inhibición no competitiva, el inhibidor se une a la enzima en un sitio diferente al que se une el sustrato, alterando la conformación de la enzima de modo que se produce la inactivación reversible del sitio catalítico. En este tipo de inhibición la K_m no se altera pero la V_{max} disminuye (37).

Por otra parte, las enzimas, al igual que todas las proteínas, se desnaturalizan irreversiblemente por altas concentraciones de sales, etanol, pH muy ácidos o muy básicos y altas temperaturas. Es por esto que las reacciones

enzimáticas tienen máxima actividad en condiciones suaves de temperatura y pH (37° y pH 7-7.5, generalmente).

BIOSENSORES

Enzimas inmovilizadas

A partir de la década de los 50's se introdujo una nueva metodología para el estudio de las reacciones enzimáticas: la inmovilización de enzimas.

Por medio de esta técnica se observó que la enzima se encuentra en condiciones más similares a su medio ambiente, ya que en solución interfieren otros factores que perjudican la actividad enzimática como es la presencia de grasas, carbohidratos u otras proteínas. Generalmente, las enzimas inmovilizadas son más estables a cambios de pH, calor, concentración de sales y almacenaje que las que se encuentran en disolución acuosa.

Por otra parte, las enzimas inmovilizadas, frecuentemente, son insolubles en disolución acuosa, por lo que pueden volverse a utilizar, después de la reacción catalítica, almacenándolas por varios meses, lo cual es la característica más importante de este sistema (38).

Existen diferentes métodos para inmovilizar enzimas (39), estos dependen del tipo de enzima y de la reacción que ésta catalice (40,41), entre los más importantes se encuentran: adsorción (42), atrapamiento en una red polimérica (lattice entrapment) (43), entrecruzamiento (crosslinking) (44,45), microencapsulación (46), enlace químico (47) e inmovilización con agentes de protección que permiten que la enzima tenga un tiempo de vida media más larga (alginato) (48).

Los análisis enzimáticos, con enzimas inmovilizadas, por lo general, se realizan con técnicas de flujo continuo, es así como en el FIA se utiliza este sistema para lograr que las determinaciones sean más específicas.

Con este propósito se han diseñado diferentes modelos de reactores para enzimas inmovilizadas, principalmente por enlace covalente, debido a que este tipo de inmovilización resiste el arrastre mecánico causado por el paso continuo del flujo (49,50).

El método por enlace covalente consiste en la unión de una especie química (glutaraldehído, generalmente) que funciona de agente entrecruzador entre un soporte y la enzima. Entre los soportes más utilizados se encuentran, la celulosa, polímeros sintéticos o materia inorgánica como vidrio o acero inoxidable, los cuales, en muchos casos, necesitan ser activados para unirles el agente entrecruzador que va a reaccionar con los grupos activos de la enzima.

Este sistema posee como ventaja principal, que reduce apreciablemente la inactivación por la presencia de un inhibidor competitivo. Por otra parte, la desventaja más importante es que es un método en donde la cantidad de enzima enlazada es muy poca (51,52).

Es así, como se han intentado nuevos métodos de inmovilización de enzimas para ser utilizados en el sistema FIA que permitan mayor cantidad de enzima enlazada y por lo tanto mayor actividad. Uno de los métodos que se intentan acoplar corresponde a la inmovilización con alginato, el cual consiste en el atrapamiento de la enzima dentro de una red que se forma entre los grupos carboxilato (COO^-) del alginato y el Ca^{2+} que se utiliza durante la inmovilización.

Esta técnica posee las ventajas antes mencionadas y puede ser una buena opción en el sistema FIA.

DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA DEL GRADO ALCOHÓLICO

Para determinar el grado alcohólico en vinos existen diferentes modelos FIA donde se trabaja con enzimas en solución y enzimas inmovilizadas.

En los trabajos más recientes sobre este último punto se utiliza la enzima alcohol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.1) inmovilizada en vidrio, la cual oxida al etanol utilizando NAD^+ , obteniéndose acetaldehído y NADH , este último es el que se determina espectrofotométricamente a 340 nm (53,54).

Reacción:



Existen otras enzimas que utilizan al etanol como sustrato, entre ellas se encuentra la enzima Alcohol Oxidasa (E.C. 1.1.3.13).

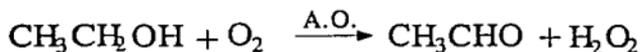
La enzima Alcohol Oxidasa cataliza siempre la misma reacción, las características estructurales (en lo que se refiere al por ciento de cada aminoácido, residuo N-terminal, cantidad de grupos SH por molécula, etc.), como las condiciones de reacción (pH y temperatura óptimas de reacción, punto isoeléctrico, etc.), difieren dependiendo de la fuente de procedencia.

La enzima Alcohol Oxidasa proveniente de la levadura *Pichia pastoris* tiene un peso molecular de 675,000 daltons, absorbe a 370 y 440 nm y su temperatura y pH óptimos son respectivamente: 37°C y 7.5.

Dentro de su estructura tiene 65 grupos -SH por molécula, los cuales son sensibles a agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno; se ha comprobado que al poner en contacto a la enzima con H_2O_2 a una concentración 0.8 mM

durante veinte minutos a 30°C la enzima pierde actividad en un 50%. Para proteger a la enzima de la oxidación se adiciona un agente reductor como el mercaptoetanol o el ditioneitol a una concentración 1mM (55,56).

La reacción que cataliza es la siguiente:



De esta manera el etanol se puede cuantificar indirectamente por medio del acetaldehído y/o el peróxido e hidrógeno que se forma.

Una manera para determinar el acetaldehído es haciendolo reaccionar con la 2,4-dinitrofenilhidrazina para dar la hidrazona correspondiente que a pH básico se determina espectrofotométricamente a 500-540nm.

Por otro lado el peróxido de hidrógeno se puede cuantificar al hacerlo reaccionar con el TiO_2 y así formar un complejo amarillo que se determina espectrofotométricamente a 410 nm (57,58,59).

PARTE EXPERIMENTAL

Sistema FIA

A)Equipo:

- a.1. Espectrofotómetro UV-Vis Varian modelo Cary 1 acoplado a una computadora PC EPSON EL 2.
- a.2. Bomba peristáltica de cuatro canales Gilson Minipuls 2
- a.3. Válvula de seis pasos Rheodyne Tipe 50

B)Reactivos:

b.1 Disoluciones patrón de acetaldehído (Merck, 99%) en agua desionizada (25,35,50,75,100,125 ppm).

b.2. Disolución de hidróxido de sodio 4N

Se pesan aproximadamente 160 gramos de hidróxido de sodio

y se afora a 1litro con agua desionizada.

b.3. Disoluciones patrón de peróxido de hidrógeno 30% (Merck) con agua desionizada (1,5, 10,20,60,100,140,180,220,260,300 ppm)

b.4. Disolución de 2,4-dinitrofenilhidrazina 1.5mM (Sigma RT)

Se pesan 29.7 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina en un matraz aforado de 100ml, se adicionan 50ml de agua desionizada y 8ml de HCl concentrado, se agita hasta disolver la 2,4-dinitrofenilhidrazina y se afora a 100ml con agua desionizada.

b.5. Disolución de dióxido de titanio 1500ppm (Sigma RT)

Se pesan 50mg de TiO_2 y se disuelven con 5ml de H_2SO_4 concentrado por medio de una digestión de microondas (Microdigestor 300 Prolabo) a una potencia de 25 durante 5 minutos. Se digieren 150mg de TiO_2 y se disuelven en 100ml de agua desionizada.

INMOVILIZACION DE LA ENZIMA ALCOHOL OXIDASA EN ALGINATO

Reactivos

1. Enzima Alcohol Oxidasa (Provesta enzymes)

Alcohol oxigen oxidorreductasa (E.C 1.1.3.13) de Pichia pastoris

Actividad 137u/ml

Concentración de proteína 54.72mg/ml

Actividad específica 25u/mg

Definición de Unidad: una unidad puede oxidar 1.0mmol de etanol a acetaldehído y H_2O_2 por minuto a pH 7.5 a 25°C.

2. Tris (hidroximetilaminometano) 0.1M pH 7.5 (Merck RA)

Se pesan 12.1g de Tris-base que se disuelven con 5ml de HCl concentrado en 1 L de agua desionizada (ajustar el pH).

3. Cloruro de calcio 50mM (7.35g/L) y 10mM (1.47g/L) en Tris 0.1M y pH 7.5

4. Alginato (Ac.algínico, sal de sodio Tipo VII (1g/30ml) en Tris 0.1M pH 7.5

Preparación de la enzima inmovilizada:

A la disolución de alginato se le añade 1ml de la enzima Alcohol oxidasa y se agita con un agitador magnético hasta que se homogenice la disolución lo

que se determina por la ausencia de grumos.

Se forman microesferas de la enzima inmovilizada en el alginato, al gotear la disolución a través de una aguja de jeringa de 0.3 mm, por medio de una bomba peristáltica en un recipiente conteniendo una disolución de CaCl_2 50mM enfriado a 0°C por un baño de hielo.

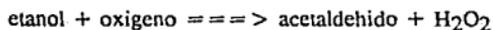
Se dejan las microesferas en esta disolución por dos horas y posteriormente en la disolución de CaCl_2 10mM toda la noche.

El Ca^{2+} forma puentes con los grupos COO^- del alginato para que así la enzima quede atrapada en la red que se forma. Mientras mayor sea la concentración de Ca^{2+} y el tiempo de contacto más puentes se forman y el poro de la red es menor impidiendo que exista menor intercambio enzima-sustrato. De esta manera, el Ca^{2+} del CaCl_2 controla el poro de la microesfera y le da resistencia. Finalmente se lava con agua destilada fría en un filtro Buchner y se dejan secar en un vidrio de reloj a temperatura ambiente agitando periódicamente con una espátula.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para estudiar la conversión de etanol por medio de la enzima Alcohol oxidasa (A.O) inmovilizada en alginato se estudiaron diferentes sistemas dentro de la configuración FIA.

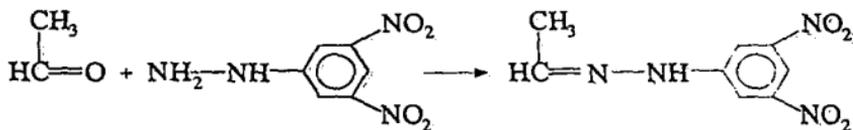
La reacción que cataliza la enzima A.O es la siguiente:



en base a esto se diseñaron dos sistemas FIA para determinar acetaldehído y peróxido de hidrógeno, como indicadores de la capacidad de conversión del biosensor.

Determinación de acetaldehído

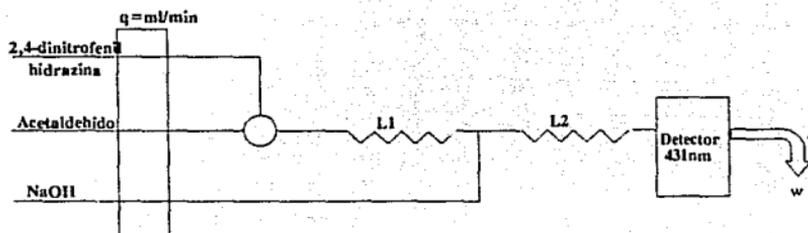
La determinación de acetaldehído se basa en la siguiente reacción:



la hidrazona formada es color café y estable por cinco minutos (60).

Se obtuvo el espectro de absorción UV-VIS para la hidrazona en un rango entre 190-750 nm, encontrando el máximo de absorción a 433nm.

Siguiendo este esquema se diseñó el siguiente sistema FIA:



Se analizaron diferentes longitudes para L1 y L2 en un intervalo entre 30 y 250cm, donde los mejores resultados se obtuvieron para L1=150cm y L2=100cm.

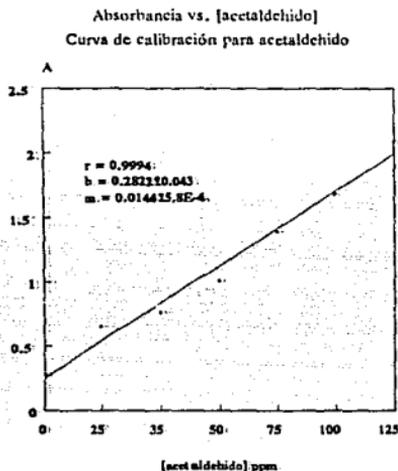
El volumen inyectado de 2,4-dinitrofenilhidrazina que mejor resultado proporcionó fue 220ml.

De igual manera se estudiaron diferentes velocidades de flujo y concentraciones de los reactivos. En base a esto, las condiciones óptimas de análisis que se obtuvieron fueron las siguientes:

REACTIVOS	CONCENTRACION	VELOCIDAD DE FLUJO
-----------	---------------	--------------------

2,4 Dinitrofenil hidrazina	1.5mM	1 ml/min
Acetaldehido	ppm	1 ml/min
NaOH	4N	1 ml/min

La linealidad del sistema se obtuvo analizando por triplicado disoluciones estándares de acetaldehído y con las cuales se obtuvo la curva de calibración:

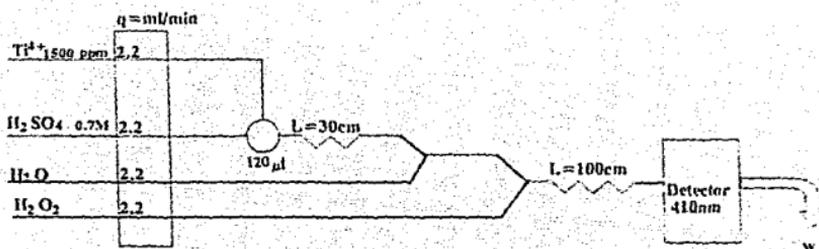


El sistema es lineal en todo el rango de concentraciones, pero la pendiente es muy pequeña lo que implica poca sensibilidad en el sistema y por lo tanto, cuando la diferencia de concentraciones de acetaldehído es pequeña, el sistema no es capaz de detectarla.

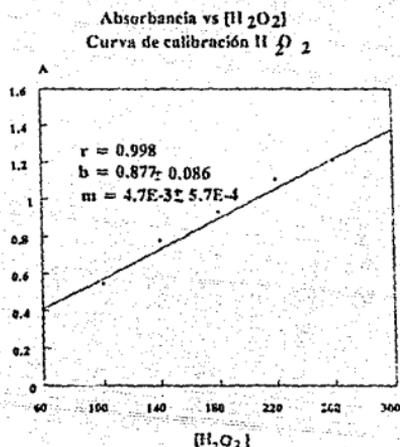
Determinación de peróxido de hidrógeno

La determinación de H_2O_2 se basó en la formación de un complejo amarillo entre el H_2O_2 y el Ti^{4+} . Se corrió el espectro de absorción UV-VIS en el rango entre 190-750 nm donde el máximo de absorción fue a 410nm.

El primer sistema FIA que se utilizó para determinar H_2O_2 fue el reportado por M. Muñoz et.al (61):



La linealidad del sistema se obtuvo analizando estándares de H_2O_2 por triplicado y con los cuales se realizó la curva de calibración:

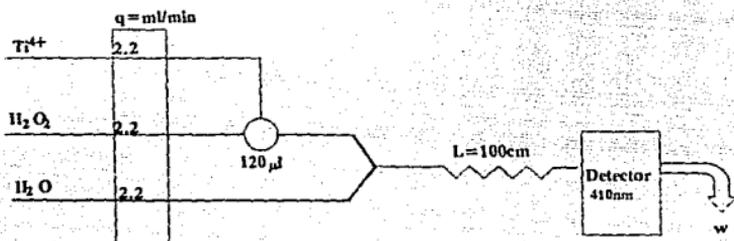


FIA modelo 1

Existe linealidad dentro del sistema en un rango de concentraciones de H_2O_2 entre 60 y 220 ppm y la pendiente es aproximadamente diez veces más pequeña que para acetaldehído; en base a esto se diseñó otro sistema FIA para

detectar concentraciones más pequeñas de H_2O_2 y aumentar de esta forma la sensibilidad de la determinación.

El sistema FIA que mejores resultados dió se muestra a continuación:



Las condiciones de análisis que finalmente dieron mejores resultados fueron las siguientes:

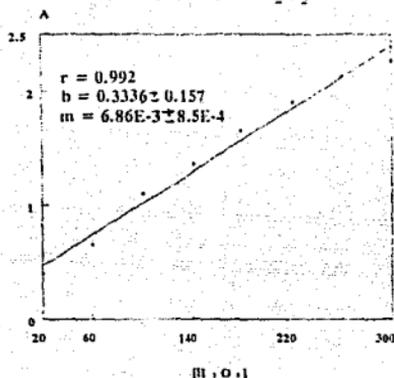
$L = 100 cm$

Volumen de muestra (Ti) inyectado = $120 \mu l$

Velocidad de flujo = $2.2 ml/min$ (la misma para cada reactivo)

La linealidad del sistema se midió con las mismas disoluciones patrón que para el modelo anterior, obteniéndose la curva de calibración correspondiente:

Absorbancia vs H_2O_2
Curva de calibración H_2O_2



FIA modelo 2

La sensibilidad del sistema aumenta, ya que es capaz de determinar concentraciones de H_2O_2 en un rango de concentraciones de 20 a 260ppm, aunque la precisión es más baja que para el sistema anterior de H_2O_2 .

Por otra parte, aunque el coeficiente de dispersión es menor en este segundo sistema ($D=1.67$) que en el primero ($D=3.34$) se optó por el segundo sistema para determinar la formación de H_2O_2 , debido a que es capaz de detectar concentraciones más pequeñas de H_2O_2 , lo cual era necesario para determinar la conversión de etanol por la enzima A.O. ya que no se sabía que tan grande era el intercambio enzima-sustrato-producto.

Los sistemas FIA que se diseñaron para detectar acetaldehído y peróxido de hidrógeno se utilizaron para la determinación de la conversión enzimática de etanol.

Pruebas de actividad para la enzima A.O. inmovilizada en alginato

Antes de introducir el biosensor de etanol al sistema FIA se tuvieron que hacer pruebas de actividad a la enzima A.O, para que de esta forma se pudieran establecer las condiciones óptimas para la inmovilización de la misma.

Se midió la actividad enzimática según el método de Provesta enzymes dando una actividad igual a 869u/ml. La actividad es menor que la reportada en el reactivo (1371u/ml), por lo tanto, en la técnica de inmovilización se añadió más enzima a la misma cantidad de alginato y obtener así mayor actividad enzimática por gramo de alginato: 2ml de suspensión enzimática por gramo de alginato.

La actividad enzimática que se obtuvo fue:

$$869\text{u}/1\text{ml enz.} * 2\text{ml enz.}/1\text{g alg.} = 1738\text{u}/\text{galg.}$$

Para medir la conversión de la enzima A.O inmovilizada en alginato se realizaron varias pruebas a distintas concentraciones de etanol.

La actividad enzimática se determinó por medio de cromatografía de gases bajo las siguientes condiciones de análisis:

-Cromatógrafo de gases Varian Serie 1400 con detector de ionización de flama

-Columna empacada de Carbowax 20M (10%)-Chromosorb 100/120 (6ft.*1/4 O.D)

-Temp. del horno 50°C

-Temp. del inyector 100°C

-Temp. del detector 100°C

El primer ensayo que se realizó fue con etanol al 1% y al 2% (v/v).

Se puso en contacto a la enzima inmovilizada con las disoluciones de etanol,inyectándole al cromatógrafo de gases $1\mu\text{l}$ de muestra cada 5 minutos por 2 horas. La curva de actividad se realizó graficando: área de acetaldehído vs. tiempo de reacción (CURVA 1).

De acuerdo a la curva de actividad de la enzima se observa que con una concentración de etanol al 2% la reacción enzima- sustrato llega a la velocidad máxima antes que con la disolución al 1%, por lo tanto la velocidad de transformación en la disolución al 2% en un principio es mayor, pero como llega a la velocidad máxima antes, la cantidad de acetaldehído formado,finalmente, es menor que para la disolución al 1%.

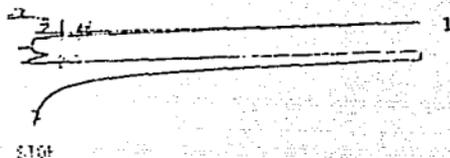
En base a lo anterior, se decidió entonces trabajar con concentraciones menores al 1% para no saturar a la enzima.

Las disoluciones que se utilizaron fueron: 2×10^{-3} , 12×10^{-3} y $50 \times 10^{-3}\%$ (v/v), las condiciones de análisis fueron las mismas que para el experimento anterior.

Se observa que en las tres curvas de actividad la velocidad inicial es la misma para las tres concentraciones, pero conforme pasa el tiempo la diferencia en la velocidad de reacción es más notoria entre las distintas disoluciones de etanol (CURVA 2)

1) ACETALDEHIDO

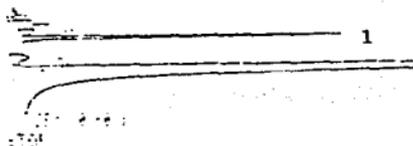
2) ETANOL



AREA

1) 1197100

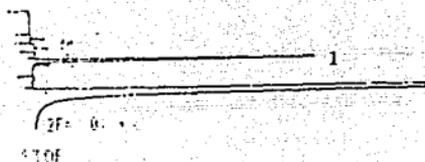
Cromatograma a los 30 min. de reacción de la enzima A.O inmovilizada en alginato con etanol al 2% v/v.



AREA

1) 809900

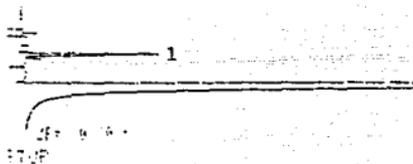
Cromatograma a los 30 min. de reacción de la enzima A.O inmovilizada en alginato con etanol al 1% v/v.



AREA

1)2980600

Cromatograma a los 90 min. de reacción de la enzima A.O inmovilizada en alginato con etanol al 1% v/v.

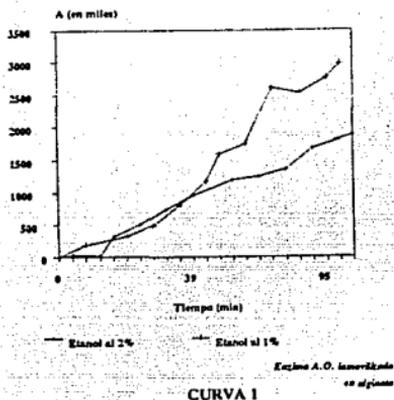


AREA

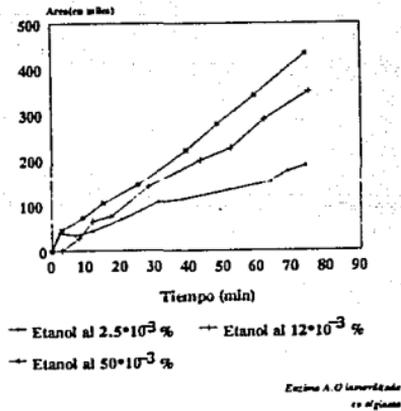
1)1683400

Cromatograma a los 90 min. de reacción de la enzima A.O inmovilizada en alginato con etanol al 2% v/v.

Area vs Tiempo Actividad enzimática



Area vs. Tiempo Actividad enzimática



Por lo tanto, se pudo ver que la enzima inmovilizada es capaz de distinguir entre dos concentraciones diferentes después de que ha estado en contacto un tiempo t con el etanol.

Otro de los puntos que es importante resaltar, es que la enzima no pierde actividad por la presencia de H_2O_2 , como está reportado para sistemas estáticos, por lo que se podría pensar que el alginato la protege un poco de este tipo de inhibición (a concentraciones bajas de etanol).

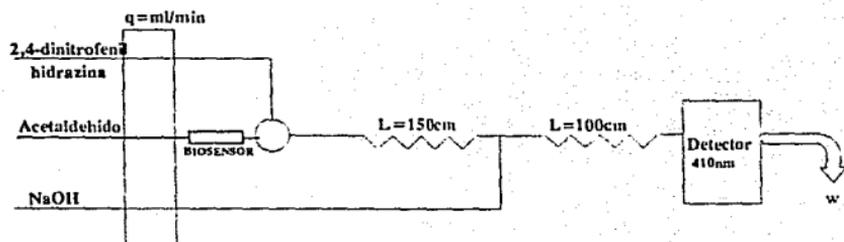
Por otra parte en el caso de la disolución al 2%. lo anterior, no se puede asegurar del todo ya que la pérdida de actividad puede deberse tanto a la alta concentración de H_2O_2 , que se forma, como a la alta concentración de sustrato que ocasiona que se llegue antes a la velocidad máxima.

Con estos resultados, fue posible establecer las condiciones óptimas para utilizar la enzima inmovilizada como biosensor específico de etanol y acoplarla al sistema FIA que ya había sido diseñado para la determinación de los productos de reacción.

Acoplamiento del sistema FIA-Biosensor de etanol

En primer término se utilizó un reactor de volumen muy grande (10ml) lo cual ocasiona mucha dispersión, sin embargo los resultados mostraron que sí existía reacción enzimática.

El primer sistema que se montó fue para determinar la formación de acetaldehído. Las condiciones de análisis cambiaron un poco debido al volumen del reactor que ocasionó un cambio en la presión interna del sistema; el sistema FIA que se utilizó fue el siguiente:



El único parámetro que se cambió fue la velocidad de flujo a 2.2ml/min para las disoluciones de etanol y de 2,4- dinitrofenilhidrazina y de 0.9ml/min para el hidróxido de sodio.

Las disoluciones de etanol se prepararon con CaCl_2 5mM en amortiguador TRIS 0.1M pH 7.5, para reproducir de este modo las condiciones óptimas de reacción de la enzima, además de evitar, con la presencia de CaCl_2 , que las perlas de alginato pierdan consistencia. •

El primer ensayo que se realizó se hizo pasando continuamente una disolución de etanol al 20% (v/v) a través del biosensor midiendo absorbancia en función del tiempo:

A	Tiempo (min)
3.000	2.0
2.500	4.0
1.850	8.0
1.500	10.0

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

A	Tiempo (min)
1.250	16.0
1.000	20.0
0.800	23.0
0.700	27.5
0.700	29.0

La segunda disolución que se pasó por el biosensor fue etanol al 2% (v/v):

A	Tiempo(min)
0.3842	1.24
0.3900	2.62
0.3772	4.03
0.3767	6.85

La tercera disolución fue etanol al 4% (v/v):

A	Tiempo(min)
0.4319	1.15
0.4405	2.05
0.4944	5.13
0.4586	8.41
0.4759	10.46

La cuarta disolución fue etanol al 12% (v/v):

A	Tiempo(min)
0.3800	2.5
0.4200	5.0
0.4800	7.0
0.5020	9.0
0.5224	13.5
0.5232	23.0

Los resultados mostraron que la enzima pierde actividad después de aproximadamente 1 hora y media, por lo tanto aunque se aumente la concentración de etanol, la enzima ya no es capaz de transformar el etanol en la misma proporción, así que la diferencia en las concentraciones de etanol no son apreciables aunque sí existe conversión de etanol a acetaldehído pero siempre en la misma proporción.

Esto dió lugar a dos hipótesis:

1. La enzima perdió actividad a causa de la alta concentración de etanol (20%) ocasionando inhibición por sustrato.
2. Debido a la alta concentración de sustrato, se produjo gran cantidad de H_2O_2 , lo cual ocasionó la pérdida de actividad enzimática sin llegar a inhibirla del todo.

Para saber cual de las dos hipótesis se podía descartar, se inmovilizó a la enzima A.O con catalasa; esta enzima descompone al H_2O_2 en H_2O + O_2 para que de esta forma la enzima no pierda actividad por la formación del H_2O_2 .

La forma de inmovilización es la misma que para la enzima A.O sola. En este caso se añadieron 3 ml de catalasa/g de alginato. La suspensión enzimática de catalasa se preparó de la siguiente manera:

Catalasa E.C 1.11.1.6 de *Aspergillus niger*, Suspensión en sulfato de amonio 3.2 M, pH 6; 36 mg prot./ml, 6900 u/mg prot.

Para quitar el sulfato de amonio y que este no interfiriera en la reacción de la catalasa se siguió el siguiente procedimiento:

1. Se añadieron 0.275ml de la suspensión enzimática, por cada 5 ml de

buffer de fosfatos pH 7.5 0.001M; esta suspensión se pasó por una membrana de ultracentrifugación manteniendo el volumen constante.

Finalmente, se obtuvieron en los 3 ml de catalasa que se adicionaron en la inmovilización, 27311.54u de catalasa/g de alginato contra las 1738u de A.O.

Se realizaron los mismos ensayos con las dos enzimas inmovilizadas para las distintas concentraciones de etanol, obteniéndose los mismos resultados, lo cual permitió descartar la segunda hipótesis.

Con base en esto, se continuó con el análisis del vino blanco (Vino Padre Quino 8.8° G.L).

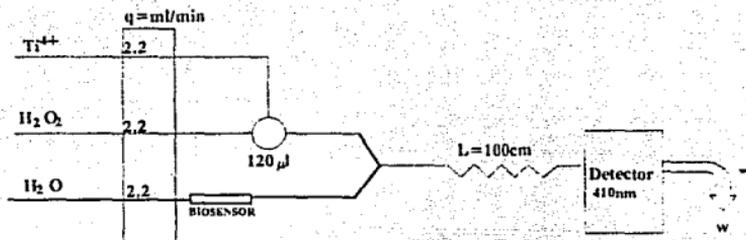
Las disoluciones que se prepararon fueron: 8×10^{-3} y 8×10^{-2} % (v/v).

La diferencia en las concentraciones no se aprecian en los resultados ya que para las dos concentraciones la formación de acetaldehído es prácticamente la misma (para 8×10^{-3} % $A=0.4113$ y para 8×10^{-2} % $A=0.4523$, dando una concentración de acetaldehído aproximada de 11.28ppm y 14.04ppm respectivamente).

Se hizo una dilución más para obtener una concentración de vino blanco 0.8% (v/v), la absorbancia resultante no fue mucho mayor: $A=0.5598$, lo que corresponde a una concentración aproximada de acetaldehído de: 21.25ppm.

Se realizaron los mismos ensayos pero ahora utilizando el sistema FIA para determinar el H_2O_2 . y un reactor de volumen menor (15cm por 4mm D.I) por lo que no hubo necesidad de cambiar ninguno de los parámetros de las condiciones de análisis además de que se elimina el problema de difusión causado por el volumen del reactor.

El modelo FIA que se diseñó fue el siguiente:



La conversión de etanol a H_2O_2 es muy poca dando una absorbancia promedio, después de 15 minutos, igual a 0.2946 que equivaldría aproximadamente a 9.70ppm de H_2O_2 para una concentración de vino $8 \times 10^{-3} \%$ (v/v).

Se realizó el análisis para una concentración de vino $8 \times 10^{-2} \%$ (v/v) obteniéndose una absorbancia promedio, después de 15 min, igual a 0.3306 que equivale a una concentración de 13.20ppm.

Con estos dos sistemas se observó que aunque el sistema FIA para determinar acetaldehído tiene una señal de fondo muy alta, es más preciso que el sistema para H_2O_2 . Por otra parte, la conversión del biosensor, a las diluciones de etanol que se utilizaron, es suficiente para ser determinada por el sistema FIA del acetaldehído.

CONCLUSIONES

Los dos diseños FIA que se utilizaron para la determinación de acetaldehído y de peróxido de hidrógeno son reproducibles pero muy poco sensibles. A pesar de su poca sensibilidad son buenos detectores de la conversión de etanol por la enzima A.O inmovilizada en alginato.

Se comprobó que el sistema FIA es una técnica de bajo costo debido a la poca cantidad de reactivos que se utiliza, además de ser rápida, ya que es capaz de determinar muchas muestras por unidad de tiempo: 90 muestras/hr para H_2O_2 y 70 muestras/hr para acetaldehído.

Por medio de estos sistemas se observó que existe conversión enzimática de la enzima A.O inmovilizada en alginato y que además ésta conversión es reproducible.

Para concentraciones de etanol que no difieren mucho entre sí, la transformación de éste por medio del biosensor no es apreciable, lo cual puede deberse tanto a que existe poca superficie de contacto entre la enzima y el sustrato como por la baja sensibilidad de los dos diseños FIA que se utilizaron para medir la conversión.

Para continuar con esta línea de trabajo sería necesario tomar en cuenta algunos de los siguientes parámetros:

1) En primer lugar, la optimización en cuanto a la enzima inmovilizada, ya que se requiere mayor superficie de contacto entre la enzima y el sustrato, por lo que se podría pensar en disminuir el diámetro de las esferas.

2) Otro aspecto importante es lo que se refiere al reactor utilizado para la

conversión enzimática. Se necesita, ya sea un reactor de longitud mayor o un reactor que permita tener a las enzimas inmovilizadas en la disolución de etanol o vino con agitación constante. Este último parámetro trae como consecuencia mayor difusión dentro del sistema FIA, que podría ser compensada, quizás, por una mayor conversión enzimática.

3) Otra posibilidad para determinar el grado alcohólico en vinos, es utilizando otro tipo de inmovilización, como es la inmovilización por enlace covalente, que permite mayor contacto entre la enzima y el sustrato y al mismo tiempo proporciona resistencia al desgaste ocasionado por el paso del flujo continuo que existe en el sistema FIA.

4) Por otra parte, si la sensibilidad del sistema de detección aumentara, aunado a una mejor conversión por parte del biosensor, a lo mejor, se podría determinar concentraciones de etanol con solo una unidad de diferencia.

BIBLIOGRAFIA

1. Ruzicka J. and Hansen E. Anal.Chim.Acta. 78(1975)145
2. Ramsing L,Ruzicka J.et al.Anal.Chim.Acta.114(1989)165
- 3.Lázaro F. Luque de Castro M.D. and Valcárcel M. Anal.Chem. 59(1987)1859
4. Lázaro F. Luque de Castro M.D. Analyst. vol. 3 1986.
5. Amerine and Ough C.S. Methods for analysis of musts and wine.Cap. 3. John Wiley and Sons. 1980.
6. Lázaro F. Luque de Castro et al. Anal.Chim.Acta. 185(1986)57
7. Kaplan C. Methods in Enzymology. Tomo XLIV. Immobilized enzymes. Cap.II,VII.
8. Valcárcel M. and Luque de Castro. FIA. Principles and applications Chap.I. John Wiley and Sons. 1987.
9. Ruzicka J.and Hansen E. Anal.Chim.Acta.106(1979)207
10. Valcárcel M. and Luque de Castro. FIA.....op cit. Chap. 2
11. Ruzicka J.and Hansen E. Chemical Analysis.A series of monographs on Analytical Chemistry and its applications.
Vol.62 FIA Chap. I. John Wiley and Sons. 1988.
12. Ibidem
13. Ruzicka J. and Hansen E. Anal.Chim.Acta.78(1975)145

14. Stewart W.B. Ruzicka J. et al. *Anal.Chim.Acta.* 81(1976)371
15. Ruzicka J. et al. *Chemical Analysis.....op cit.* p.79-83, 156- 166
16. Ruzicka J. and Hansen E. *Anal.Chim.Acta.* 99(1978)37
17. Valcárcel M. and Luque de Castro. *FIA.....op cit.* p 212-215
18. Ruzicka J. and Hansen E. *Chemical Analysis....op cit* p.15-22
19. Hansen E. and Ruzicka J. *Journal of Chemical Education.* 56(1979)677
20. Valcárcel M. and Luque de Castro. *FIA.....op cit.* p.257-261
21. Valcárcel M. and Luque de Castro. *FIA.Principles....op cit* p.41-44
22. Reijn J.M. and Poppe H. *Anal.Chem.* 56(1984)943
23. Valcárcel M. and Luque de Castro. *FIA.....op cit* Chap.2
24. Ruzicka j. and Hansen E. *Chemical Analysis...op cit.* p.23-42
25. Ruzicka J. and Hansen E. *Anal.Chim.Acta.* 78(1975)145
26. Ruzicka J. and Hansen E. *Anal.Chim.Acta.* 88(1977)1
27. Ruzicka J. and Hansen E. *Anal.Chim.Acta.* 114(1980)19
28. Panton and Mottola et al. *Anal.Chem.* 53(1981)1713
29. Reijn J.M. and Poppe H. *Anal.Chem.* 56(1984)943
30. Ruzicka J. and Hansen E. *Anal.Chim.Acta.* 99(1978)37
31. Ruzicka J. and Hnsen E. *Chemical Analysis.....op cit.* p.31- 36

32. Ibidem
33. Ruzicka J. and Hansen E. *Anal. Chim. Acta.* 99(1978)37
34. Valcárcel M. and Luque de Castro M. D. *FIA.....* op cit p.354- 358
35. Lennhinger. *Bioquímica. Ed. Omega 2ª edición. 1981. Cap.9*
36. Harper H. *Manual de Química Fisiológica. Ed. El Manual Moderno. 1978. Cap. 8, 15*
37. Ibidem
38. Hasselberg. *Uses of enzymes and immobilized enzymes. 1979. Cap. 3, 9*
39. Ibidem
40. Holme D. and Hazel P. *Analytical Biochemistry. 1983. Chap. 8*
41. Huitrón C. *Biología de enzimas. UNAM 1983. Simposio Internacional sobre biotecnología.*
42. Massom M. and Townshend A. *Anal. Chim. Acta.* 171(1985)185
43. Hasselberg. *Uses of enzymes.....* loc cit.
44. Massom M. and Townshend A. *Anal. Chim. Acta.* 171(1985)185
45. Illanes A. *Simposio Interamericano sobre Biotecnología. Univ. Valparaíso, Chile. 1983*
46. Johansen F. and Flink K. *Biotechnology Letters. Vol. 8(1986)121*
47. Hasselberg. *Uses of enzymes.....* loc cit.

48. Barzana E., Klivanov A. et al. Enzymatic production of acetaldehyde in a gas-solid bioreactor
49. Valcárcel M and Luque de castro M.D. FIA.....op cit p.345- 357
50. Ruzicka J. and Hansen E.Chemical Analysis.....op cit p.215- 219
51. Hasselberg. Uses of enzymes.....loc cit
52. Holme D.and Hazel P.Analytical.....loc cit.
53. Lázaro F,Luque de Castro, et al.Anal.Chem.59(1987)1859
54. Lazaro F.et al.Anal.Chim.Acta.185(1986)165
55. Rameshv, Patel N. et al. Archives of Biochemistry and Biophisics. 20(1981)481
56. Courdec R. and Baratti J.Agric.Biol.Chem.44(1980)2279
57. Vogel's.Textbook of Practical Organic Chemistry.
58. Kaplan L. Química Clínica. Ed. Panamericana.1988 p.1110- 1130,1284-1287
59. Snell and Snell. Colorimetric Methods of Analysis.3^aed.
Vol.2
60. Kaplan L.Química Clínica.....loc cit.
61. Muñoz M.,Alonso J. et al.Analyst.115(1990)315