

21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

CONSTRUCCIÓN DE UN BIOSENSOR DE MATRIZ
RÍGIDA DE GLUCOSA OXIDASA-GRAFITO-RESINA
PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:

DULCE MARÍA HERNÁNDEZ LUIS

Asesora: Dra. Adriana Morales Pérez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVIATION II
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES
CUAUTITLAN, MEXICO

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos:

la TESIS: Construcción de un biosensor de matriz
rígida de Glucosa Oxidasa-Grafito-Resina para la determinación
de Glucosa.

que presenta la pasante: Dulce María Hernández Luis
con número de cuenta: 9056948-7 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 5 de Noviembre de 2000.

PRESIDENTE M. en C. José de Jesús Pérez Saavedra

VOCAL Q.F.B. Delia Reyes Jaramillo

SECRETARIO Dra. Adriana Morales Pérez

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Elia Granados Enriquez

SEGUNDO SUPLENTE Q. Sonia Rincon Arce

LA PRESENTE TESIS SE REALIZÓ EN LAS
INSTALACIONES DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN (UNAM) EN EL
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE LA SECCIÓN DE
QUÍMICA ANALÍTICA. CON FINANCIAMIENTO DEL
PROYECTO CONACyT J-32766E.

ÍNDICE

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II FUNDAMENTOS	5
2.1 AMPEROMETRÍA	5
2.2 BIOSENSORES	7
2.2.1 Transductor	10
2.2.2 Aglomerante	10
2.2.3 Biosensores de matriz rígida	11
2.3 PROPIEDADES DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA	13
2.3.1 Actividad enzimática	13
2.3.2 Estructura	14
2.3.3 Funcionamiento de la enzima	14
2.3.4 Especificidad	16
2.3.5 Mecanismo de acción	16
2.4 PROPIEDADES DE LA β -D-GLUCOSA	17
CAPÍTULO III DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN JUGOS	18
3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS JUGOS	18
3.2 APLICACIONES	19

CAPÍTULO IV OBJETIVOS E HIPÓTESIS	21
4.1 OBJETIVOS	21
4.2 HIPÓTESIS	21
CAPÍTULO V DESARROLLO EXPERIMENTAL	22
5.1 INTRODUCCIÓN	22
5.2 PARÁMETROS ÓPTIMOS PARA EL FUNCIONAMIENTO DE LOS BIOSENSORES	24
5.2.1 Determinación del potencial de trabajo	24
5.2.2 Determinación de la concentración del electrolito soporte	26
5.2.3 Determinación del pH de trabajo	26
5.2.4 Evaluación del efecto de la fuerza iónica	27
5.3 PARÁMETROS ANALÍTICOS	28
5.3.1 Determinación del intervalo de linealidad	28
5.3.2 Evaluación del tiempo de respuesta del biosensor	29
5.3.3 Tiempo de vida del biosensor	30
5.3.4 Estudio de interferencias	30
5.4 CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR DE GLUCOSA OXIDASA	31

5.5 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR	32
CAPÍTULO VI RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	33
6.1 REACTIVOS, EQUIPO, MATERIAL DE VIDRIO Y CUIDADOS	33
6.2 CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR	34
6.3 PARÁMETROS ÓPTIMOS PARA EL FUNCIONAMIENTO DEL BIOSENSOR	37
6.4 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR	39
6.5 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DEL NUEVO BIOSENSOR DE GLUCOSA OXIDASA	43
6.5.1 Tiempo de vida del biosensor	45
6.5.2 Estudios de reproducibilidad y repetibilidad	47
6.6 ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	48
CAPÍTULO VII APLICACIONES	50
7.1 APLICACIONES	50
7.2 CUANTIFICACIÓN	50

CAPÍTULO VIII CONCLUSIONES	54
8.1 CONCLUSIONES	54
CAPÍTULO IX BIBLIOGRAFÍA	55
CAPÍTULO X ANEXO 1 (REPORTE DEL SERVICIO SOCIAL)	57

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo de nuevas técnicas de análisis químico se han llevado a cabo estudios de investigación en los cuales se busca utilizar a las enzimas como promotoras de actividades biológicas de tal manera, que la actividad enzima-sustrato se pueda monitorear a lo largo del proceso para finalmente obtener una señal que permita la cuantificación de analito de interés. Normalmente en estos métodos de cuantificación la enzima se encuentra en solución.

Los primeros estudios que se llevaron a cabo con el uso de enzimas requerían la utilización de diversas técnicas que ayudasen a la comprensión de su actividad tales como la colorimetría, cromatografía, espectrofotometría, etc.; sin embargo, en los últimos años se ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias en la instrumentación analítica, se trata de la construcción de dispositivos analíticos que por su simplicidad tanto en su construcción, manejo y costo representan un método alternativo a los ya existentes. Estos dispositivos son los llamados *sensores químicos*: simples transductores de información química en información eléctrica u óptica. Basados en mecanismos físicos y químicos muy variados cuando son utilizados como verdaderos instrumentos analíticos no formando parte de sistemas instrumentales más complejos, los sensores químicos están diseñados para efectuar la medición analítica en el seno de la muestra, por ejemplo, en una corriente fluvial, una conducción industrial, un capilar sanguíneo o en el interior de una célula [1].

Para llevar a cabo la automatización ha sido necesario desarrollar diversas técnicas de inmovilización de enzimas, la unión de una enzima a un soporte insoluble es el método más antiguo, ello ha contribuido significativamente al campo de los *sensores enzimáticos o biosensores*. Las ventajas de las enzimas inmovilizadas en el análisis se pueden resumir como sigue [4]:

- Mayor estabilidad
- El catalizador es reutilizable
- La muestra se puede separar de la enzima para análisis posteriores
- Curvas de inactivación predecibles

El uso de enzimas inmovilizadas en los sistemas analíticos se puede dividir en dos grupos:

- a) Construcción de un reactor enzimático que produzca al estar presente el sustrato uno o más productos detectables, los cuales puedan cuantificarse por algún método analítico (por ejemplo potenciometría o espectrofotometría).
- b) La inmovilización de la enzima alrededor o sobre un transductor, el cual es capaz de detectar los cambios físicos o químicos en su entorno inmediato [14].

Un transductor se encarga de transformar la señal producida en el proceso de reconocimiento analito-receptor en una señal de tipo eléctrica. Cuando se lleva a cabo esta interacción puede existir una variación en la concentración de ciertos iones (H^+ , NH_4^+ , CN^- , I^- , etc.), o especies gaseosas (O_2 , CO_2 , NH_3) de la absorbancia u otros parámetros ópticos, de calor, masa, conductividad, transferencia de electrones. Si dicho cambio es generado en la proximidad del transductor podrá ser convertido por éste en una señal eléctrica cuantificable, previa amplificación y procesamiento digital (Figura

I.1). Los transductores más empleados son los del tipo electroquímico, porque son simples, sensibles, fiables, de respuesta rápida y precisan de instrumentación de bajo costo [8].

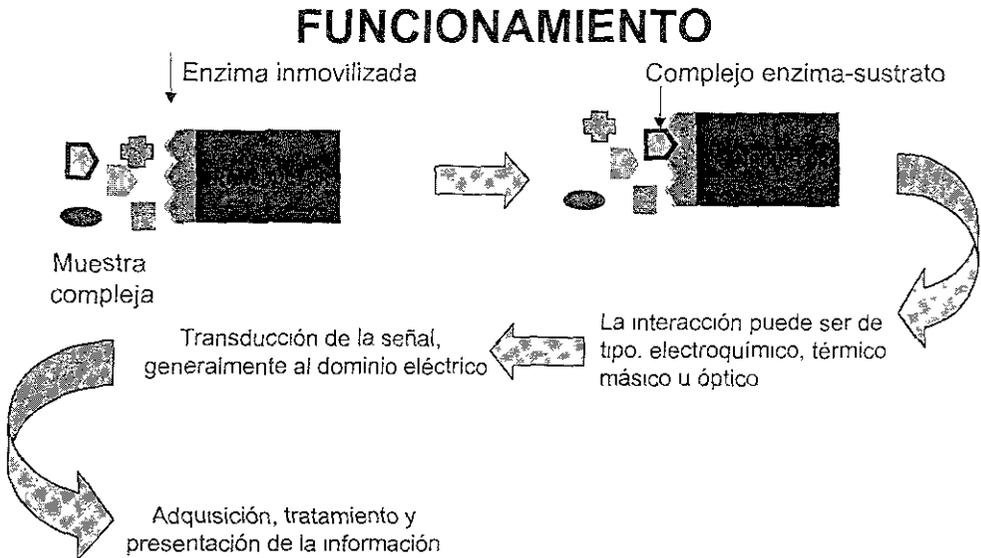


Figura I.1 Funcionamiento de un biosensor.

Dentro de los sensores más sencillos en cuanto a la construcción del mismo se encuentran aquellos denominados enzima-transductor o electrodo enzimático. Sobre un electrodo selectivo se inmoviliza la enzima, el electrodo selectivo (que funge en este caso como transductor) detectará la presencia del sustrato o del producto de la reacción enzimática. Se busca que en este tipo de configuración que sean pequeños, baratos, capaces de dar una salida continua de la señal y finalmente, que no requiere de reactantes externos distintos a los sustratos [8].

Un gran número de electrodos enzimáticos están basados en el electrodo de Clark, el cual mide la disminución de oxígeno en el entorno.

Para poder emplear este tipo de electrodo se requiere que la enzima requiera oxígeno para su funcionamiento, con lo cual se restringe su uso a enzimas oxido-reductasas. Tal es el caso de la detección de glucosa por medio de la enzima glucosa oxidasa. A medida que la reacción transcurre la concentración de oxígeno disminuye, este cambio puede ser registrado de forma continua por el electrodo. En la práctica el empleo del electrodo de Clark presenta diversas desventajas, la principal es que se requiere que en la celda donde se lleva a cabo la reacción enzimática este sellada, para que no interfiera el oxígeno del medio ambiente.

En el presente trabajo se aborda la construcción de un biosensor de glucosa oxidasa (GOD) basado en una matriz rígida, que sirva para la cuantificación de glucosa en diferentes muestras utilizando la amperometría. En el siguiente capítulo se dan los fundamentos de la amperometría, biosensores de la enzima GOD y el sustrato β -D-glucosa.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS

2.1 AMPEROMETRÍA

La amperometría consiste en la medición de la corriente (i) generada en una reacción electroquímica a un potencial constante. Si esta corriente se mide en la meseta, el proceso electroquímico está controlado por difusión, consecuentemente la corriente obtenida es directamente proporcional a la concentración de la especie electroactiva en solución. Para obtener el potencial al cual se lleva a cabo la amperometría se requiere realizar la técnica de voltamperometría lineal (figura II.1)

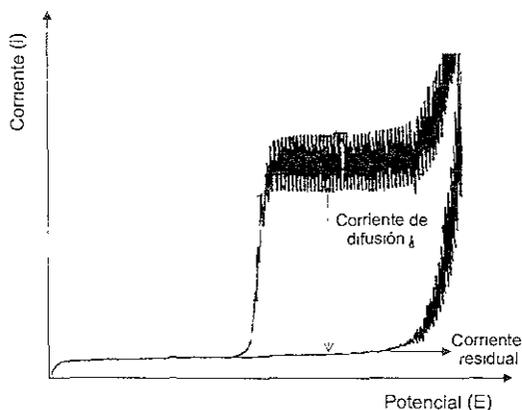


Figura II.1 Voltamperometría lineal para un proceso electroquímico de oxidación.

Cuando la corriente comienza a incrementarse el proceso electroquímico está controlado por transferencia de carga,

consecuentemente la corriente medida es igual a la diferencia de concentraciones entre las dos regiones:

$$\text{Corriente} \propto [C]_{\text{solución}} - [C]_{\text{electrodo}}$$

Cuando se alcanza el potencial óptimo, aquel donde se oxida o reduce toda la especie electroactiva en la superficie del electrodo, se obtiene la corriente límite o corriente de difusión. En este punto la concentración de la especie electroactiva en la interfase electrodo-solución tiende a cero. La expresión anterior se simplifica quedando:

$$\text{Corriente límite} \propto [C]_{\text{solución}}$$

Por lo tanto, las amperometrías deben llevarse a un potencial constante, que se encuentra en la meseta, de esta manera se asegura que la corriente medida es directamente proporcional a la concentración de la especie en solución.

Las técnicas amperometricas son sensible y puede emplearse para detectar respuestas a concentraciones de 10^{-5} M.

Una característica de la instrumentación amperométrica moderna es el control potencioestático del potencial del electrodo de trabajo acompañado por la medición de la corriente en ese electrodo. En un sistema de tres electrodos, el de referencia se sitúa próximo al de trabajo (indicador). El electrodo auxiliar (contraelectrodo) es el tercer en la celda electroquímica. La función del potencioestato es observar el potencial del electrodo de trabajo (como ánodo o cátodo) respecto al electrodo de referencia (es decir, percibir el potencial del electrodo de trabajo puesto que el potencial del de referencia es constante. Entre los electrodos de referencia y trabajo no circula

corriente; la impedancia de entrada es superior a $10^{11} \Omega$ ohms. Si el voltaje del par de electrodos referencia-trabajo es menor que la rampa de corriente directa (CD) proporcionada al amplificador, la retroalimentación al amplificador a partir del ciclo de control del amplificador operacional, proporcionará un voltaje correctivo que cambia el potencial aplicado entre el par de electrodos lo suficiente para compensar la resistencia de la celda y el electrolito soporte.

2.2 BIOSENSORES

Entre los nuevos instrumentos analíticos desarrollados se encuentran aquellos que incorporan un elemento biológico de reconocimiento molecular, el cual está íntimamente integrado en el transductor; a ésta se le conoce como BIOSENSOR.

Al construir un biosensor se busca que éste sea selectivo que presente una alta sensibilidad y selectividad. La selectividad depende del componente biológico en este caso una enzima, siendo una de sus cualidades es altamente selectiva y específica para la estructura del sustrato y el producto formado, de tal forma que solo ella actuó con fidelidad, lo que conlleva a respuestas máximas y potencialmente a menos interferencias por parte de contaminantes o sustancias presentes en la muestra [14]. La sensibilidad depende del material biológico así como del transductor. A parte de estas características, se busca que un biosensor cumpla los siguientes requisitos.

- Respuesta analítica medible
- Amplio intervalo de linealidad
- Exactitud y precisión
- Tiempo de vida extenso

Tiempo de respuesta corto

Respuesta continua

Para el buen funcionamiento del biosensor se requiere la máxima proximidad posible entre el material biológico y el transductor, ya que ello refleja el buen funcionamiento de los biosensores. Con esto se gana estabilidad en la señal analítica y un tiempo de vida prolongado.

El paso fundamental en el diseño de los biosensores es la inmovilización del material biológico en la superficie del transductor empleando algunas de las siguientes técnicas: entrecruzamiento químico, enlace covalente, retención a través de una membrana inerte, adsorción física sobre la superficie de un sólido y atrapamiento en una matriz polimérica. La inmovilización superficial se lleva a cabo mediante procedimientos de vía húmeda. Otra alternativa es mediante la inmovilización en una matriz rígida, la cual está constituida por el *composite* que es la combinación de por lo menos dos componentes diferentes para formar un nuevo material conservando las propiedades individuales de cada componente. En el caso de los composites conductores estos están constituidos por dos partes: la fase conductora en la que se utiliza polvo de grafito y la fase aislante en la cual se utilizan resinas de cualquier clase hasta líquidos altamente viscosos. Cuando al *composite* se le incorpora la enzima se da lugar al *biocomposite*.

Una de las áreas donde más se han aplicado los biosensores es en el análisis de alimentos, en donde es posible monitorear procesos de fermentación, contenido de aditivos en productos terminados, control de calidad en materias primas. En esta área los biosensores se han propuesto para medir parámetros bioquímicos de calidad para el cacahuete (arginina), para cereales (lisina), vinos (etanol), productos lácteos (D-galactosa), carne

(tiamina) y pescado (adenosina monofosfato, hipoxantina/ eosina, respiración microbiana), en biomedicina para la producción de anticuerpos y la elaboración de test clínicos, en el control ambiental, para la determinación de sustancias tóxicas o mutagénicas, tales como metales pesados, pesticidas, drogas, en la biotecnología para el control de procesos de manipulación genética de animales y plantas, en la veterinaria para el control de alimentos para el ganado, en la agricultura en la producción e granos así como de el empaquetado , almacenamiento y transporte. Los biosensores en esta área tienen un campo ilimitado, ya que la instrumentación está consolidada, y permite una alta frecuencia de análisis. Además, los biosensores por sus características de uso *in situ*, facilidad de uso, confiabilidad de estudio, van encontrando aplicaciones donde no pueden llegar los grandes equipos [1].

En el análisis de alimentos la aplicación de los biosensores como instrumentación de control de procesos industriales es un área en constante desarrollo. El monitoreo de estos procesos aportan, una mejora en la calidad del producto final y disminuyen los costos de producción, ya que permiten mantener el proceso en condiciones optimizadas.

La cuantificación de la glucosa a través de un biosensor enzimático es considerada una técnica innovadora que nos permite obtener resultados confiables. Al encontrarse la enzima GOD inmovilizada en una matriz rígida está en contacto directo con el sustrato en solución, y como la enzima presenta especificidad, en principio, no se requiere un tratamiento previo de la muestra, lo que permite ahorrar tiempo y el costo del análisis se minimiza.

El objetivo de este trabajo consiste en la construcción de un biosensor electroquímico de tipo amperométrico que nos sirva para la cuantificación de glucosa en jugos. El material biológico que se inmoviliza en el biocomposite

es la enzima GOD, como transductor se utiliza polvo de grafito y finalmente el aglomerante es una resina comercial. El proceso de polimerización se da a una temperatura de 40⁰ C. Al construir este biosensor se pretende que sea específico para la glucosa y que cumpla con los requisitos antes señalados, sensibilidad, estabilidad, tiempo de respuesta corto.

2.2.1 Transductor

Un transductor es un ente capaz de transformar una respuesta fisicoquímica producida en el proceso de reconocimiento analito-receptor en una señal eléctrica. Los diferentes tipos de transductores que se emplean se resumen de la manera siguiente; los de tipo electroquímico, óptico (por fibras), termistor y piezoeléctricos. Los más empleados son los de tipo electroquímico, porque son simples, sensibles, fiables y de respuesta rápida y precisan de instrumentación de bajo costo. En términos generales la fase conductora (transductor) más utilizada en los biosensores es el polvo de grafito.

2.2.2 Aglomerante

Se considera un aglomerante a aquella sustancia cuya función es crear el contacto íntimo entre el transductor y el material biológico, a la unión del transductor y el aglomerante se le denomina composite, los aglomerantes utilizados son resinas de cualquier tipo y aún se pueden utilizar líquidos altamente viscosos. Entre las resinas comerciales más utilizadas se encuentran las epóxicas (epotek H77), metacrilato (araltid). El uso de una u otra resina depende de las características requeridas para cada biosensor. Por ejemplo, para la construcción de un biosensor bienzimático es preferible

el empleo de metacrilato, ya que es posible incorporar mayor cantidad de material biológico.

2.2.3 Biosensores de matriz rígida

A lo largo del desarrollo de los biosensores se han construido de diversas formas según las necesidades y demandas que se generan al avanzar la tecnología. Actualmente es posible encontrar biosensores de tan diversas características que podemos englobar en dos categorías, aquellos de pasta blanda y los inmersos en una matriz rígida. Los primeros son fáciles de prepara y tienen un costo de preparación reducido; sin embargo, presentan una serie de inconvenientes debido precisamente a su naturaleza como pueden ser una baja estabilidad química y física de la superficie del electrodo. La consistencia de estos materiales se ve mermada en determinados solventes electrolíticos, especialmente en los de naturaleza no polar, provocando un deterioro en las características analíticas del dispositivo. La rápida degradación de estos materiales y la imposibilidad de regenerar la superficie del electrodo son las principales causas de que el uso de este tipo de electrodos quede restringido prácticamente al nivel de laboratorio.

Por el contrario, los electrodos basados en composites de matriz rígida resuelven en su totalidad estos problemas de estabilidad, a su vez que también son fáciles de construir y de bajo costo.

Se dice que es un biosensor de matriz rígida cuando la parte biológica esta inmersa en un composite rígido en este caso basado en grafito y auxiliado por una resina epóxica, los cuales proporcionaran la suficiente rigidez (terminado el proceso de curado) de tal forma que es posible ampliar

el tiempo de vida útil y la integridad del biosensor. Para poder obtener un biosensor de matriz rígida se debe someter el biocomposite ya inmerso en el cuerpo de PVC, a una temperatura entre los 35 a 45° C con la finalidad de no desnaturalizar a la enzima y dañar a los componentes del composite, dentro de las características más sobresalientes de este tipo de biosensores podemos mencionar:

- a) Al ser un proceso básicamente por vía seca proporciona un gran interés desde el punto de vista tecnológico.
- b) Antes de curar los biocomposites son pastas moldeables, con lo que se facilita su fabricación de biosensores de distintas configuraciones (cilíndrica, plana). Estos mismos materiales, debidamente optimizados en viscosidad, pueden ser empleados en tecnología planar de capas gruesas (thick film), de las cuales la técnica serigráfica (screen-printing) se ha afianzado como la forma más idónea en la fabricación masiva de biosensores.
- c) Una vez curados los biocomposites son rígidos y presentan una gran estabilidad física. Así, por ejemplo, estos materiales se pueden tornear, mecanizar, horadar, etc. Una característica mecánica interesantes que a los biocomposites rígidos se les puede pulir, por lo que la superficie activa de un biosensor una vez agotada es posible regenerarla por un simple proceso de pulido.
- d) Estos biomateriales presentan una gran estabilidad química. Es decir, seleccionando adecuadamente la matriz polimérica y añadiendo aditivos podemos preparar materiales electroactivos inertes respecto a la solución de trabajo y a diferentes componentes de las muestras a analizar. En definitiva, podemos utilizar estos materiales en medios no acuosos (o parcialmente acuosos) que es un campo muy atractivo para los biosensores.

- e) Los biocomposites presentan una gran estabilidad biológica. El material biológico ocluido en el composite mantiene su actividad en largos periodos.
- f) Finalmente, los composites presentan una superficie formada por granos conductores (grafito) rodeadas de zonas aislantes (polímero). Es decir, la superficie de estos materiales es similar a la de un haz de microelectrodo, por lo que presentan una señal de magnitud similar a los macroelectrodos pero con una mejor relación señal/ruido, parecida a los microelectrodos.

2.3 PROPIEDADES DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (GOD)

La enzima se presenta en cristales blancos amorfos, con una actividad enzimática de 125 unidades/mg de proteína. Con un peso molecular de 150,000 D. Posee un punto isoeléctrico cercano a 4.2

2.3.1 Actividad enzimática

La enzima GOD cataliza la reacción entre la β -D-glucosa y el oxígeno molecular formando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. La fuente de obtención es principalmente de: *Penicillium notatum*, *Penicillium Amagasakiense* y *Aspergillus niger*. El número clave de esta enzima (E.C) es 1.1.3.4. El primer dígito corresponde al tipo de enzima, en este caso a las oxidorreductasas. El segundo al grupo donador de electrones (CH-OH). El tercer número se relaciona con la molécula aceptora de electrones, que para la GOD es el O₂. Finalmente, el último dígito corresponde a la enzima que se trata; GOD.

La fuente de obtención de la enzima GOD con que se trabajará es de *Aspergillus niger*, e indica el marbete que una unidad de enzima oxida un μmol de $\beta\text{-D-Glucosa}$ a ácido glucónico y H_2O_2 por minuto a un pH de 5.5 a 35°C .

2.3.2 Estructura enzimática

La estructura química de esta enzima es de carácter proteica globular, es decir, posee una estructura cuaternaria como se muestra en la figura II.2 el sitio activo de la enzima corresponde al grupo flavin-adenin-dinucleotido (FAD) en su forma oxidada (color obscuro).

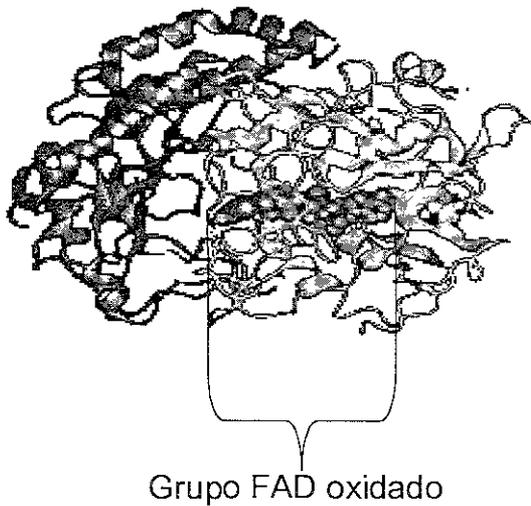


Figura II.2 Estructura de la glucosa oxidasa.

2.3.3 Funcionamiento de la enzima

La reacción enzimática que se lleva a cabo se esquematiza en la figura II.3

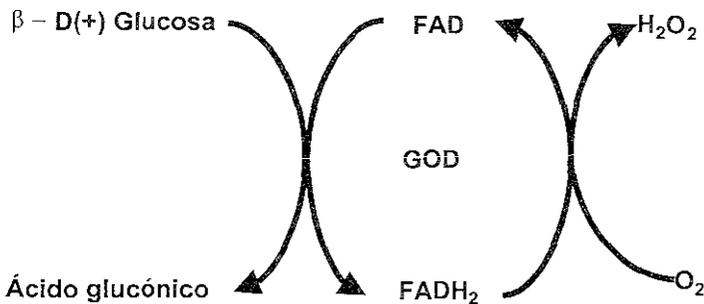
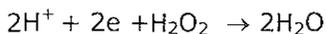


Figura II.3 Funcionamiento de la enzima glucosa oxidasa.

La enzima GOD en presencia de la β-D-glucosa se forma el ácido glucónico. En esta reacción el sitio activo de la enzima (FAD) oxidado se reduce a FADH₂. El cual no es activo, a continuación el O₂ del medio se reduce a H₂O₂ y el sitio activo pasa a su forma oxidada (FAD). En esta reacción redox se intercambian dos electrones.

Cuando se inmoviliza la enzima GOD en una matriz rígida el esquema mostrado anteriormente es el mismo; la diferencia radica en que la determinación de glucosa mediante biosensores de tipo amperométrico, es posible realizarla por dos caminos:

(a) El H₂O₂ producto de la reacción se mide amperométricamente a través de su oxidación sobre la superficie del biosensor a un potencial anódico constante:



Existiendo una relación lineal entre la corriente producida y la concentración de glucosa, permitiendo así la determinación analítica de este sustrato.

(b) Otra alternativa para la determinación de glucosa es seguir el decremento del oxígeno en el medio de disolución a medida en que se lleva acabo la oxidación de la glucosa, para ello se debe contar con una celda electroquímica sellada de tal forma que el oxígeno del medio ambiente no interfiera en la determinación. Generalmente se emplea la primera opción. [16].

2.3.4 Especificidad

La gran mayoría de las enzimas tiene la capacidad de catalizar reacciones específicas, es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de sustrato que debe reunir ciertas características para que pueda ser utilizado como tal. La especificidad comienza cuando la enzima sólo reconoce entre los isómeros D o L. Como sustrato, la enzima GOD utiliza al primero, de lo cual se establece que la enzima presenta una especificidad estereoquímica y una especificidad de grupo ya que el sustrato interactúa en el grupo FAD.

2.3.5 Mecanismos de acción

El estudio acerca del mecanismo de acción de la glucosa oxidasa incluye las siguientes observaciones:

1. La GOD no es inhibida por la presencia de HCN, CO e indicadores que no contengan iones metálicos.
2. Otros aceptores de hidrógeno, como la tionina, azul de metileno y la quinona son reemplazados por el oxígeno. La habilidad para utilizar otros

compuestos es característica de las enzimas deshidrogenasas pero no de las oxidasas en general.

3. Los narcóticos inhiben la capacidad de oxidación de las enzimas, lo cual se observa para las deshidrogenasas pero no para las oxidasas.

2.4 PROPIDADES DE LA GLUCOSA

La glucosa es un monosacárido que en su estado puro se presenta en forma de cristales incoloros o polvo blanco granular, es inodoro, de sabor dulce, con un punto de fusión de 146°C , es soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol y tiene una rotación óptica $D = 52.5$ [2].

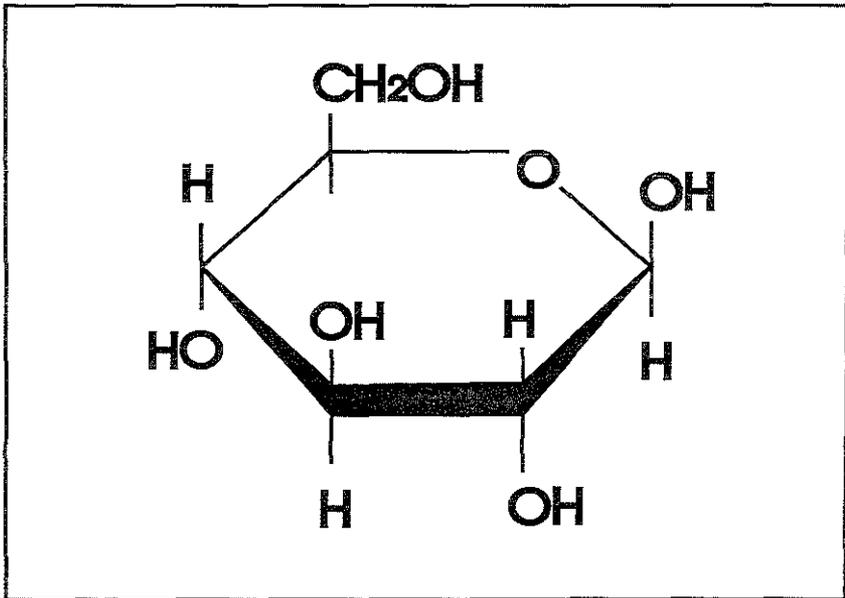


FIGURA II.3 Estructura de la β -D-glucosa (proyección de Hawort)

CAPÍTULO III

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN JUGOS

3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS JUGOS

Dentro de los azúcares más comúnmente empleados en la industria se incluyen la D-glucosa, D-fructosa, la sacarosa, la sacarosa invertida, la β -maltosa, la α y β -maltosa y algunos derivados como el D- manitol. La glucosa se vende comercialmente en forma de solución concentrada, se utiliza ampliamente en la industria, principalmente en la panificación y en la producción de bebidas tales como, jugos, néctares, zumos, refrescos, etc. [5].

El código alimentario define a las bebidas refrescantes como aquellas preparadas con agua potable, carbonatadas o no conservadores, colorantes, saborizantes naturales y/o artificiales, edulcorantes, extractos vegetales y/o frutales, etc.

De manera general el jugo fresco de naranja contiene por cada 100g 11.8% de sólidos, 0.30 % de cenizas, 0.06% de extracto etéreo, 0.065% de proteínas, 0.05 % de fibra cruda, 10.75 de carbohidratos y aporta 41 calorías al organismo [10].

La elaboración de zumos y néctares se debe ajustar a los siguientes principios generales: Se admiten como edulcorantes el azúcar, la glucosa, fructosa y la miel. Contendrán un 8% en peso como mínimo de azúcares totales expresados en sacarosa [9].

En el proceso de elaboración de los jugos, las proteínas se desnaturalizan en la pasteurización, lo mismo sucede con el extracto etéreo. Los sólidos presentes corresponden a algunos minerales presentes en la fruta como pueden ser Mg, Na y Li. Las enzimas corresponden a residuos de compuestos orgánicos como lípidos y terpenos como parte de los aceites esenciales de la fruta [12].

Dentro de los componentes de mayor importancia en un jugo se encuentra la enzima pectinesterasa, la cual causa la coagulación de la materia suspendida en el jugo cítrico y la sedimentación rápida, el líquido claro sobrenadante está desprovisto del sabor del sabor cítrico característico debido a la pérdida de lípidos y aceites esenciales disueltos. Generalmente las enzimas se inactivan en el jugo original por medio del calentamiento a 88°C o más. [10]

3.2 APLICACIONES

La cuantificación de la glucosa en la producción de bebidas es una medida de calidad debido al poder edulcorante de este monosacárido ya que esta le confiere estabilidad al sabor final del producto, máxime cuando se emplea en la preparación de bebidas ácidas y/o se desea enmascarar algún sabor desagradable en algunas frutas cuando éstas se tratan térmicamente [5].

El presente estudio se complementa con la aplicación directa del biosensor en el análisis directo de una muestra real, para el caso se eligieron al azar cinco jugos de marca comercial y de un solo sabor naranja (tabla I.1).

Tabla I.1 Información nutrimental reportada en los marbetes 1.- Amí, Júmex. 2.- Tampico citrus punch, Lala. 3.- Pascualin. 4.- Boing. 5.- Frutsi, jugos del valle.

CONTENIDO	1	2	3	4	5
PORCIÓN ml	250	240	250	240	200
CONTENIDO ENERGÉTICO Kcal	120	110	120	110	100
PROTEÍNAS (g)	0	0	0	0	0
GRASAS (g)	0	0	0	0	0
CARBOHIDRATOS TOTALES (g)	30	25	30	28	28
AZÚCARES (g)	----	25	25	28	25
SODIO (mg)	65	10	45	36	38
VITAMINA C (%)*	50	100	20	10	30
VITAMINA A (%)*	----	----	15	10	20
VITAMINA B1(%)*	----	----	10	10	20

*Los porcentajes de requerimientos diarios están basados en una dieta de 2000 calorías.

De acuerdo con datos reportados por la FDA y la USDA por cada caloría hay un 20% de azúcar pero, no especifica que porcentaje corresponde cada uno de los azúcares presentes, ya que la glucosa y demás edulcorantes no son sustancias consideradas tóxicas. No existe una ley o reglamento que regule la cantidad que se puede adicionar a un jugo, solo existe la adecuación de cada productor con respecto a la mejor formulación de sus productos y que corresponde en gran medida a la oferta y a la demanda en el mercado y con respecto a que tipo de consumidor está dirigido.

La determinación y cuantificación de glucosa en un producto terminado o durante el proceso de manufactura es un factor de importancia, ya que podría ayudar reduciendo tiempo y costos de análisis y de operación y no por ello sacrificar la calidad del análisis, ya que cada productor sería capaz de adecuar el monitoreo de acuerdo a sus necesidades.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 OBJETIVOS:

- ✓ Construir un biosensor basado en un biocomposite rígido de glucosa oxidasa-grafito-resina (GOD-grafito-resina)
- ✓ Establecer las condiciones de trabajo óptimas para el adecuado funcionamiento del biosensor
- ✓ Desarrollar una técnica analítica sensible que nos permita cuantificar glucosa en muestras comerciales (jugos de naranja).

4.2 HIPÓTESIS:

La cuantificación de glucosa en muestras comerciales de jugos mediante un biosensor de glucosa oxidasa de tipo amperométrico podrá ser una cuantificación fiable, selectiva, rápida y de bajo costo.

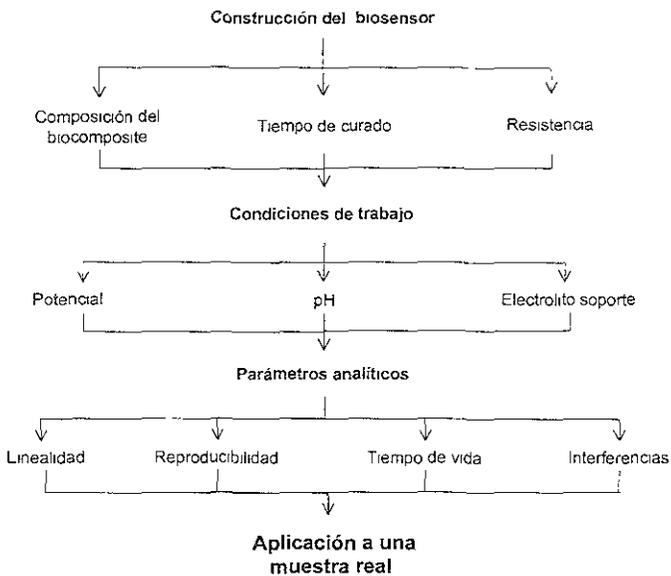
CAPÍTULO V

DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se describe el desarrollo experimental que se siguió a lo largo de todo el trabajo y se divide en las siguientes partes:

DESARROLLO EXPERIMENTAL



Con lo referente a las condiciones de trabajo del biosensor se determinan cada uno de los factores que intervendrán en el estudio,

tales como, el potencial al cual se llevaran a cabo las medidas amperométricas, el pH y la concentración del electrolito soporte.

En la construcción del biosensor, nos referimos a la preparación del biocomposite variando la cantidad presente del componente biológico en él, todo esto en el seno de una matriz polimérica adecuada.

En la evaluación de la respuesta del biosensor, se someten éstos a las condiciones ya establecidas anteriormente, se analizan gráficamente y se determina que biosensor posee una mejor respuesta (sensibilidad).

En el estudio de parámetros analíticos se determina el intervalo de linealidad, el tiempo de respuesta, tiempo de vida el límite de detección superior e inferior, la reproducibilidad y la repetibilidad.

Con respecto al estudio de interferencias se establece la composición, características y la cantidad presente de cada una de las sustancias que constituyen a la muestra a analizar, con la finalidad de establecer cual de ellas puede afectar el estudio y de que manera.

En las aplicaciones se pretende llevar a cabo la cuantificación de glucosa en muestras reales a partir de los biosensores construidos anteriormente, y que por principio es uno de los objetivos principales de este trabajo.

A continuación se describen cada una de las partes que constituyen la metodología

5.2 PARÁMETROS ÓPTIMOS PARA EL FUNCIONAMIENTO DE LOS BIOSENSORES

Como se ha descrito anteriormente el funcionamiento de los biosensores depende de las condiciones presentes en el sistema a estudiar, dichas condiciones están dadas por los siguientes factores; concentración, pH del electrolito soporte y potencial de trabajo.

La evaluación de los distintos factores se llevó a cabo a partir de los resultados obtenidos durante el servicio social en donde se trabajo con un biosensor de alcohol oxidasa (AO), que al igual que la enzima GOD utilizan el oxígeno presente en el medio de disolución para llevar a cabo la reacción biocatalítica del sustrato a su correspondiente producto (acetaldehído para el etanol y ácido glucónico para la glucosa) y con la producción de peróxido de hidrógeno el cuál se mide amperométricamente a través de su oxidación sobre la superficie del transductor a un potencial anódico en un intervalo de 1000 a 1200 mV. Existe una relación lineal entre la corriente producida y la concentración de glucosa permitiendo así la determinación analítica del sustrato. De igual forma ambas enzimas poseen su máxima actividad a similares condiciones de pH y concentración del medio.[1]

5.2.1 Determinación del potencial de trabajo

El biosensor empleado en el presente estudio es de tipo amperométrico, por lo que es necesario mantener constante el potencial al cual se llevaran a cabo las determinaciones. Por lo tanto, es importante e indispensable conocer, para cada tipo de enzima el potencial que se aplicará para poder seguir adecuadamente la señal

analítica. Para determinar este potencial se utiliza, normalmente, la técnica electroquímica de voltamperometría lineal.

Regeneración de la enzima a su forma activa

Detección de un producto electroactivo

Regeneración de un mediador químico redox

Regeneración del cofactor enzimático

Por ejemplo, empleando la enzima peroxidasa (HRP) la señal obtenida se asocia a la regeneración de la enzima a su forma activa, reducida.

En el caso de emplear la enzima alcohol oxidasa, la señal puede provenir de:

- a) Seguir anódicamente la producción de peróxido de hidrógeno.
- b) La regeneración de un mediador químico.

Finalmente, cuando se utilizan enzimas deshidrogenasas, la señal obtenida se debe a la reoxidación del cofactor enzimático, que para éstas es el β -nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD).

En el caso particular de esta tesis, la señal analítica que se sigue es la producción de peróxido de hidrógeno, producto electroactivo que se forma cuando reacciona la enzima GOD con β -D-glucosa. Para determinar el potencial al cual se forma este producto se utilizó la voltamperometría lineal.

5.2.2 Determinación de la concentración del electrolito soporte

En el presente estudio el tipo y concentración de electrolito soporte a utilizar es de gran importancia ya que la buena elección de éstos minimiza o anula la desnaturalización de la enzima.

El electrolito soporte que estará en contacto con el biosensor durante todo el proceso de análisis debe ser tal que garantice la estabilidad del biocomposite y la respuesta apropiada del mismo. Como ya se ha mencionado anteriormente se eligió una solución buffer de fosfatos ya que la literatura reporta que la mayoría de las enzimas son inertes a este tipo de soluciones [1]. Aun con ello es necesario evaluar la actividad a diferentes concentraciones manteniendo fijo el valor de pH, la concentración de NaCl y el potencial de trabajo con la finalidad de conocer como se ve afectada la respuesta del biosensor frente a este factor.

5.2.3 Determinación del pH de trabajo

En general, las enzimas son activas en un intervalo limitado de pH. Usualmente cada enzima tiene un pH óptimo porque, al igual que las proteínas, las enzimas poseen muchos grupos ionizables de forma que los cambios de pH pueden alterar su conformación, su capacidad de unión con el sustrato y la actividad catalítica de los grupos que forman el centro activo. [11]

La actividad enzimática está condicionada al pH del medio. La mayoría de las enzimas presentan la mayor actividad enzimática [3] en un intervalo de pH de 5 a 8. En consecuencia es necesario controlar este

parámetro, pero no solamente para garantizar la actividad máxima de la enzima sino que también no se vea alterado el biocomposite en el cual está inmersa la enzima.

Por estudios previos [8] se sabe que la resina epotek H77 a pH inferiores de 6 y superiores de 8 se lamina, es decir, se forman escamas en la superficie del biosensor que está en contacto con la solución. Por estas razones se decidieron estudiar únicamente el intervalo de pH comprendido entre 6 y 8 para evaluar simultáneamente los dos factores, manteniendo constantes, la concentración del electrolito soporte a un mismo potencial de trabajo fijo.

5.2.4 Evaluación del efecto de la fuerza iónica

La fuerza iónica constituye una medida no solo de la concentración, sino también del número de cargas eléctricas provenientes de los cationes y aniones aportados por la sal. Las sales ejercen efectos muy marcados en la solubilidad de las enzimas y esto esta relacionado con la fuerza iónica que desarrollan. Dentro de un cierto intervalo de bajas concentraciones las sales incrementan la solubilidad de las enzimas, fenómeno que recibe el nombre de "solubilización por salado" [3].

La solubilidad de cualquier soluto depende de la afinidad o tendencia que tenga, ya sea por moléculas de su misma especie, o bien por moléculas de disolvente. La solubilidad aumenta cuando se reduce el grado de interacción de las propias moléculas del soluto, o que trae consigo que se produzca un mayor contacto entre el soluto y el disolvente y por lo tanto se asegure una buena conductividad iónica.

Las sales de iones divalentes tales como el MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ y K_2SO_4 producen la precipitación de las enzimas y en general de todas las proteínas; sin embargo, las sales de iones monovalentes como el NaCl , el NH_4^+ y el KCl no son capaces de hacerlo. [5]

Por todo lo anterior se eligió la sal de NaCl . Para la evaluación de este factor se prepararon soluciones de electrolito soporte a una concentración y pH fijos variándose la concentración de NaCl en un intervalo de 0.05 a 0.5 M, para posteriormente determinar como la respuesta se ve afectada por la fuerza iónica del medio.

5.3 PARÁMETROS ANALÍTICOS

5.3.1 Determinación del intervalo de linealidad

El estudio del intervalo de linealidad de la respuesta de los biosensores, con las proporciones óptimas del biocomposite, construidos a lo largo del presente trabajo se lleva a cabo por el método de adiciones continuas. En 25 mL de electrolito soporte con agitación continua y constante se sumergen los tres electrodos: referencia, auxiliar y el biosensor. Después de obtener una señal de fondo estable, se adicionan con micropipeta diferentes volúmenes del sustrato (glucosa) para determinar el intervalo de linealidad, a partir de la representación gráfica de la corriente frente a los valores de la concentración de glucosa.

El límite de detección del amperímetro a las condiciones de operación es de $0.01 \mu\text{A}$ en donde ésta corresponde a la relación señal/ruido de tres (Señal/ruido=3). El límite superior de respuesta

lineal (LSRL), así como el límite inferior de linealidad (LIRL), se determinan gráficamente. La sensibilidad corresponde a la pendiente de la curva de calibración[7].

5.3.2 Evaluación del tiempo de respuesta del biosensor

Establecidas las condiciones de trabajo (potencial, electrolito soporte, pH y fuerza iónica) se proceden a determinar el tiempo de respuesta del biosensor. Experimentalmente se coloca el biosensor en el electrolito soporte junto con el electrodo de referencia y el auxiliar, y se espera hasta obtener una señal de fondo estable posteriormente, se realiza una adición del sustrato y se determina el tiempo en que tarda en alcanzarse el 98% de la señal analítica. Bibliográficamente se reporta [7] que el tiempo de respuesta cuando el material biológico se encuentra inmovilizado en un biocomposite puede estar comprendido entre los treinta segundos hasta los diez minutos.

Los factores que determinan el tiempo de respuesta del biosensor son los siguientes:

- a) La disponibilidad del centro activo para interactuar con el sustrato. Es decir, la disponibilidad del centro activo de la enzima depende directamente de las interacciones químicas que se den entre la resina, polvo de grafito y enzima. Cuando se da el proceso de curado existe una desnaturalización del material biológico, en este sentido no es posible disminuir dichas interacciones.
- b) De la rapidez con que difunda el sustrato del seno de la solución a la interfase del biosensor. En este punto se busca optimizar el transporte del sustrato hacia el biosensor, controlando la velocidad

de agitación, el tamaño de la barra magnética y la colocación del biosensor dentro de la celda electroquímica.

5.3.3 Tiempo de vida del biosensor

El estudio de vida del biosensor es un factor que nos muestra el tiempo útil de uso. Es decir, el tiempo en el cual se obtiene estadísticamente la misma señal analítica. La pérdida de la respuesta del biosensor obedece a los siguientes factores:

- (a) Exista una deficiente inmovilización de las enzimas
- (b) Pérdida de la enzima por efecto del pulido vigoroso
- (c) Pérdida de la enzima por destrucción del biocomposite

Independientemente de cualquiera de los factores que la ocasionen es indispensable realizar el estudio y conocer el intervalo de tiempo en el cual la respuesta analítica es estadísticamente la misma. Además de evaluar el tiempo de vida del biosensor se establece la reproducibilidad y la repetibilidad de la señal analítica, ambos con los mismos límites de confianza preestablecidos anteriormente. Estos estudios se realizan simultáneamente.

5.3.4 Estudio de interferencias

Las aplicaciones que se le pueden dar al biosensor de glucosa oxidasa son muy variadas, que van desde el área clínica hasta el control de alimentos y bebidas, en este caso en particular se pretende cuantificar la cantidad de glucosa presente en jugos comerciales, para

ello es necesario conocer la composición de la muestra, generalmente esta información es posible conocerla consultando el marbete del envase el cual, nos proporciona directamente el productor, la información cualitativa y cuantitativa es el primer paso para que se nos muestre un panorama en general de las sustancias que componen la muestra (aditivos, edulcorantes, colorantes, saborizantes, antioxidantes, etc). El segundo paso es la revisión bibliográfica de cada una de las sustancias, el conocimiento de las características fisicoquímicas de cada una de ellas, específicamente las propiedades redox. Al tener inmovilizada la enzima en el biocomposite se asegura una alta especificidad al sustrato; sin embargo, la superficie del biosensor también está constituida por polvo de grafito, en la cual se pueden dar procesos electroquímicos. Consecuentemente es necesario eliminar todas las especies químicas, diferentes al sustrato, con propiedades redox que puedan oxidarse o reducirse al potencial al cual se lleva a cabo la amperometría. Por otra parte se busca que no exista un tratamiento previo de la muestra; es decir, que solo se lleven a cabo diluciones por medio de la prueba de ensayo y error hasta lograr que se obtenga una señal que se encuentre dentro del intervalo de respuesta lineal y que dicha señal sólo provenga de la interacción enzima-sustrato.

5.4 CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR GLUCOSA OXIDASA

Con la finalidad de establecer una adecuada respuesta por parte del biosensor se construyen diferentes biosensores en los cuales se varia la cantidad de la enzima manteniendo constante la proporción del grafito, endurecedor y la resina, el aumento en la cantidad de enzima presente trae consigo el aumento de la resistencia de los biosensores porque las proteínas son materiales no conductores. La resistencia que

exhibe el transductor (grafito-epotek H77) a utilizar oscila entre 3 y 5 K Ω . Aunque también la resistencia depende de la cantidad de grafito presente se sabe que la resina epotek H77 solo acepta un máximo del 20% de éste un incremento en la cantidad afectaría el proceso de curado.

Para encontrar la proporción óptima en la composición del biocomposite deben de cubrirse tres aspecto: a) que la resistencia sea la mínima, b) que la respuesta del biosensor sea la máxima a las condiciones del sustrato y c) que no se destruya la superficie del biosensor con el uso.

5.5 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR

Como se menciona con anterioridad, con la finalidad de establecer una adecuada respuesta por parte del biosensor se construyeron dos de éstos con diferentes contenidos de enzima manteniendo constante la proporción del composite (resina-grafito) y sometiénolos a las mismas condiciones de análisis. Para establecer el biocomposite óptimo se evalúa la estabilidad de la señal para una adición del sustrato, la rapidez en la respuesta y la integridad del biocomposite. Si existen dos biocomposites que cumplan los requisitos anteriores, se elige aquel que presenta la mayor respuesta analítica para una concentración constante del sustrato.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 REACTIVOS, EQUIPO, MATERIAL DE VIDRIO Y CUIDADOS

REACTIVOS

- ❖ Agua desionizada.
- ❖ Fosfato dibásico de sodio-heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Merck.
- ❖ Fosfato monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) Merck.
- ❖ Hidróxido de sodio (NaOH) Merck.
- ❖ Cloruro de sodio (NaCl) Monterrey
- ❖ Resina Epotek H77
- ❖ Polvo de grafito
- ❖ Enzima Glucosa oxidasa (*Aspergillus niger*) Worthington
Biochemical Corporation 125 U/mg lote 57A 847
- ❖ β -D-Glucosa (Merck)

EQUIPO:

- ❖ Balanza analítica, METTLER-TOLEDO. AB204
- ❖ Potenciómetro, METTLER-TOLEDO Delta 340
- ❖ Sistema desionizador de agua MILL-Q Water system
- ❖ Agitador magnético, COORNIG-PC353
- ❖ Unidad Amperométrica BAS
- ❖ Electrodo de Calomel saturado
- ❖ Electrodo de platino
- ❖ Biosensor de glucosa oxidasa

MATERIAL DE VIDRIO

- ❖ Celda electroquímica
- ❖ Matraz volumétrico de 500, 100 y 50 ml.
- ❖ Pipeta volumétrica de 25, 10 y 5 ml.
- ❖ Micropipeta de 200 μ l.
- ❖ Vaso de precipitados de 50, 100 y 250 ml.
- ❖ Vidrio de reloj

CUIDADOS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN

- a) La solución buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$) debe de mantenerse en refrigeración cuando no sé este utilizando, esto con la finalidad de retardar el crecimiento de hongos y/o bacteria en la solución.
- b) La solución estándar de glucosa deberá mantenerse en refrigeración para evitar la formación de hongos y bacterias.
- c) Durante la experimentación los biosensores deberán pulirse antes de cada curva de calibración con una lija del número 500 y con un poco de agua desionizada.
- d) Entre cada curva de calibración la celda electroquímica deberá de lavarse perfectamente y enjuagarse al final con agua desionizada.

6.2 CONSTRUCCION DEL BIOSENSOR

Para la construcción del biosensor se siguen dos pasos; el primero corresponde a la preparación del composite, en donde se pesaron los siguientes componentes:

- a) 0.7g de resina epotek H77
- b) 0.1g de endurecedor
- c) 0.2g de polvo de grafito

Se mezclan perfectamente los componentes anteriores (composite) hasta obtener una pasta homogénea, concluido este proceso se procede a incorporar la enzima GOD (biocomposite). Nuevamente se mezcla todo perfectamente. A continuación el biocomposite se introduce en la cavidad del cuerpo del biosensor (figura VI.1).

CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR



	\varnothing^*	longitud*
Disco de cobre	5	
Tubo de PVC	6	18

* mm

Figura VI.1 En la figura se muestra la técnica de construcción de un biosensor.

Finalmente se procede a realizar el proceso de curado, que se lleva a cabo a 40°C durante 5 días. Esta temperatura no puede ser más alta porque pierde la rigidez el tubo de PVC. En la tabla VI.1 se muestra la composición final de cada uno de los biosensores preparados.

TABLA VI.1 Componentes correspondientes a cada serie de biosensores elaborados.

BIOSENSOR	GOD %	COMPOSITE (g)
1 A	3	0.4
1 B	3	0.4
2 A	1	0.4
2 B	1	0.4

Al finalizar el tiempo de curado, se pulen los biosensores con una lija del número 500 y con agua hasta tener una superficie especular. Posteriormente se hidratan los biosensores, colocándose verticalmente y con la parte del biocomposite hacia abajo en un vaso de precipitados que contiene agua desionizada de tal manera que ésta no cubra el biosensor durante 48 horas, con la finalidad de activar a la enzima.

Las diferentes cantidades de enzima adicionada al composite corresponden a la necesidad de construir un biosensor óptimo en donde al obtener las correspondientes respuestas se pueda elegir de ser posible a aquel que contenga la mínima cantidad de enzima pero que muestre resultados confiables.

Al finalizar el tiempo de curado se obtuvieron biosensores de matriz rígida, los cuales presentaron una gran estabilidad física. Lo cual se comprobó en el momento de llevar a cabo el pulido en el cual no se observó desprendimiento del biocomposite.

6.3 PARÁMETROS ÓPTIMOS PARA EL FUNCIONAMIENTO DEL BIOSENSOR

En el servicio social (ver anexo 1) se trabajo con el biosensor de alcohol oxidasa (AO). Este biosensor funciona en forma equivalente al de GOD, ya que en ambas reacciones enzimáticas se produce peróxido de hidrógeno y con este producto es con el que se realizara el seguimiento de la reacción enzimática. Por lo tanto son extrapolables los resultados obtenidos en el servicio social.

Para determinar las condiciones óptimas de funcionamiento del biosensor de AO, como son: el potencial al cual se llevan a cabo las amperometrías, la concentración del electrolito soporte y pH se describen a continuación como se obtuvieron estos parámetros. En el anexo 1 se describe detalladamente el procedimiento que se siguió.

En cuanto al potencial de trabajo se llevo a cabo una voltamperometría lineal (VL), en la cual se determino el potencial óptimo de trabajo. Primeramente se realizó la VL del electrolito soporte, con el fin de establecer que éste no contiene impurezas electroactivas y así asegurar que la respuesta obtenida en presencia del sustrato se debe únicamente a la respuesta del biosensor. A continuación se adicionó etanol al electrolito soporte y se obtuvo la VL. Es importante señalar que en ambas VL se utilizó como electrodo de trabajo el biosensor. Los resultados obtenidos se muestran en la figura VI.2.

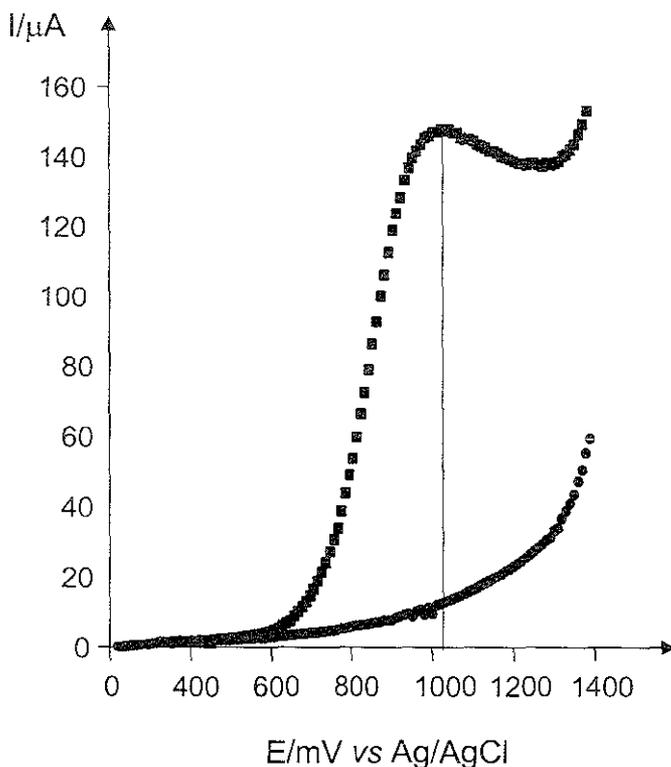


Figura VI.2 Voltamperograma lineal para el biosensor de glucosa oxidasa. Como electrolito soporte se utilizó una solución buffer de fosfatos 0.1 M en NaCl 0.1 M pH=6.0

De acuerdo con la figura anterior se observa que al potencial al cual la oxidación del peróxido de hidrógeno, formado en la reacción enzimática que se lleva a cabo entre la enzima AO y etanol, se obtiene a un potencial de 1050 mV vs Ag/AgCl. Teóricamente se debía haber obtenido una meseta, la cual no se obtiene debido a la oxidación en cuestión se encuentra cerca del muro de oxidación del agua.

En cuanto a los parámetros restantes se muestran los resultados con las condiciones de trabajo óptimas, donde el biosensor posee su mayor actividad.

Tabla VI.2 Condiciones óptimas de trabajo del biosensor

FACTOR	VALOR ÓPTIMO
PH	6.0
CONC. DE NaCl	0.1 M
CONC. ELECTROLITO SOPORTE	0.1 M
POTENCIAL*	1050mV

*El potencial esta referido con respecto a un electrodo de Ag/AgCl. El electrolito soporte corresponde a una solución buffer de fosfatos, la fuerza iónica se impone con la sal monovalente, NaCl.

Los valores o parámetros mostrados en la tabla VI.1 son los que a lo largo de este trabajo se mantendrán de manera constante, con ello se garantiza que el biosensor en sí desarrolla su máxima actividad sin arriesgar la pérdida o degradación de la enzima, así como la protección del mismo biosensor, es decir, que no se produzca reblandecimiento de la superficie o escamación y por lo tanto la pérdida como entidad física. Para mantener la actividad del biosensor de manera uniforme es necesario pulir la superficie con una lija del número 500 y con un poco de agua, esto se realiza antes de realizar cada una de las curvas.

6.4 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR

A partir de este apartado se trabaja ya con los biosensores de GOD. Una vez que se lleva el proceso de curado los biosensores se hidratan colocándolos sumergidos en un poco de agua durante cuatro o cinco días, esto con la finalidad de ayudar en la activación de la enzima y posteriormente llevar a cabo la caracterización de los mismos.

Para activar en forma completa al biosensor se realizan curvas de calibración puliendo la superficie de éste, hasta obtener pendientes similares para cada uno de los biosensores. Con ello se establece que la actividad de la enzima ha llegado a su máximo con lo cual es posible comparar los resultados y determinar que biosensor aporta la mejor respuesta, así como la cantidad de enzima que es necesaria para realizar la determinación.

Para evaluar la respuesta de los biosensores y finalmente escoger a aquel que nos proporcione una respuesta confiable se realizaron curvas de calibración, cada una por triplicado y para cada uno de los biosensores, dichas curvas se realizaron por el método de adiciones continuas. Para ello se coloca cierta cantidad de electrolito soporte en la celda electroquímica, se colocan los electrodos (el auxiliar y referencia) junto con el biosensor, al obtener una señal de fondo estable se adiciona con micropipeta el sustrato y finalmente se registra la señal.

Durante este proceso se observa de manera visual si existe o no alguna modificación en la superficie del biosensor (esto se realiza después de realizar cada curva de calibración), aparentemente se obtuvieron biosensores rígidos y físicamente estable es necesario evaluar en esta etapa cualquier alteración lo cual de ocurrir nos indicaría un proceso de curado deficiente.

Bajo los requisitos mencionados se probaron los biosensores construidos (ver tabla VI.1). Las curvas de calibración obtenidas se muestran en la figura VI.3.

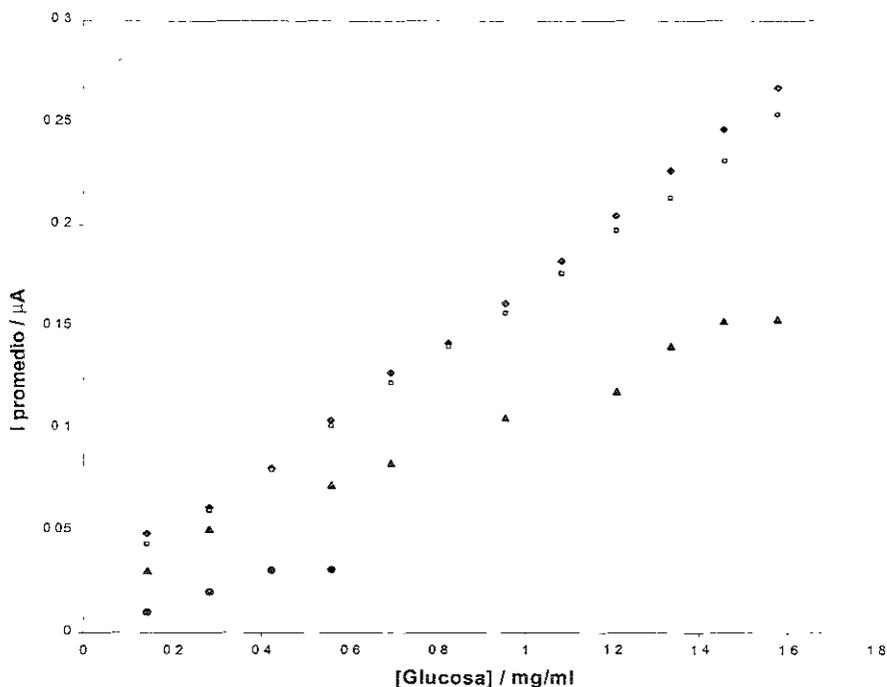


Figura VI.3 Curvas de calibración de glucosa para los cuatro distintos biosensores construidos. Como electrolito soporte se utilizó solución buffer 0.1 M, en NaCl 0.1 M a pH=6.0 a un potencial de 1050 mV. \blacklozenge biosensor 1A, \square biosensor 1B, \blacktriangle biosensor 2A y \bullet biosensor 2B. Las curvas que se representan corresponden a valores promedio y los biosensores se encuentran activados

Como se observa en la figura VI.3 los biosensores correspondientes a las series 2 A y 2 B presentan respuestas diferentes aún cuando la cantidad de enzima es la misma para ambos casos (1%). Lo que nos lleva a pensar que la cantidad de enzima es deficiente (ver tabla IV.1) por lo que no se obtiene una respuesta continua y constante, a pesar de llevar a cabo la experimentación de la misma forma que para los biosensores de la otra serie. Los biosensores de la serie 1 poseen respuestas similares, siendo más alta en comparación con los de la serie 2, lo que es de esperarse ya que contienen mayor

cantidad de enzima (3%). Demostrándose que al haber un mayor porcentaje de enzima en el biocomposite, la interacción enzima-sustrato se lleva a cabo sin ninguna dificultad, obteniéndose así una mayor sensibilidad de la respuesta y por lo tanto el intervalo de linealidad es más amplio. En la tabla VI.3 se muestran las pendientes y los intervalos obtenidos.

TABLA VI.3 Resultados obtenidos de las curvas de calibración mostradas en la figura VI.3 con el biosensor de GOD.

BIOSENSOR	LSRL (mg/ml)	LIRS (mg/ml)	SENSIBILIDAD (μA ml/mg)
1 A	1,7050	0.1632	0.0602
1 B	1,7102	0.1632	0.0605
2 A	1,5961	0.1632	0.0325
2 B	0,5993	0.1632	0.0154

El tiempo de respuesta se determinó visualmente y de manera simultánea a la experimentación en donde se determinó que al cabo de 30 segundos se obtiene una lectura estable entre cada adición, garantizando así obtener lecturas confiables. Del mismo modo se observó que la superficie del biosensor no presentó daño alguno, ya que al momento de realizar cada una de las curvas se comprobó la rigidez y la integridad física del biosensor.

A partir de los resultados obtenidos anteriormente, se decidió construir un nuevo biosensor, con el porcentaje de enzima óptimo que nos proporcionará una respuesta confiable para la cuantificación de la glucosa. Este porcentaje óptimo de enzima es el que pertenece a los biosensores 1A y 1B. Para la construcción del nuevo biosensor se sigue el mismo procedimiento descrito en el apartado 6.2

6.5 EVALUACION DE LA RESPUESTA DEL NUEVO BIOSENSOR DE GLUCOSA OXIDASA (GOD)

Fue necesario preparar nuevos biosensores, el biocomposite es igual al reportado en la tabla VI.1 de la serie 1. Estos nuevos biosensores se etiquetaron como C1 y C2. Es importante señalar que estuvieron sin funcionar por más de nueve meses almacenados, debido a la huelga en la UNAM. Transcurrido este tiempo se procedió a realizar la confiabilidad de la respuesta, con el fin de asegurar que la enzima se encuentre activa y que los datos reportados sean confiables. Para ello se induce la activación sometiendo al biosensor a las condiciones ya establecidas (mencionadas en el apartado 6.3) y repitiendo las curvas de calibración hasta que estas muestren una uniformidad de la respuesta, es decir, las pendientes sean similares, así como el tiempo de respuesta y el intervalo de linealidad. En la figura VI.4 se muestran las curvas de calibración promedio (25 curvas de calibración por biosensor).

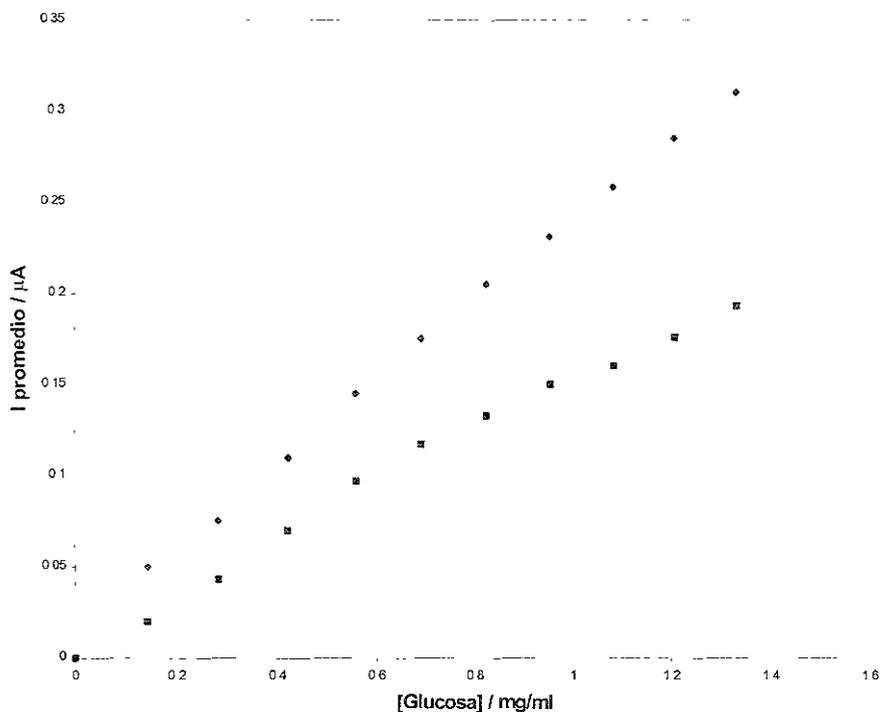


Figura VI.4 Curvas de calibración promedio de glucosa. Como electrolito soporte se utilizó solución buffer 0.1 M, en NaCl 0.1 M a pH=6.0 a un potencial de 1050 mV. ♦ biosensor C1 y ■ biosensor C2.

Los resultados mostrados en la figura VI.4 demuestran que el biosensor de la serie C1 responde mejor, ya que la sensibilidad y el intervalo de linealidad obtenido es equivalente a la serie 2 (ver figura VI.1). Con respecto al biosensor C2, la respuesta no es la esperada, es menor con respecto al biosensor C1. Puliendo la superficie del biosensor C2 no se llega a obtener la pendiente esperada. Lo cual se puede deber a que la enzima haya perdido actividad o por una deficiente inmovilización. Aún cuando se construyeron de la misma manera y el mismo día no hay que descartar los posibles errores en la construcción. El periodo de almacenamiento no afecta la actividad de la enzima ya

que como lo demuestra la actividad de las dos series, existe respuesta de la enzima al entrar en contacto con el sustrato (glucosa). A pesar de que se trató de activar la enzima para la serie C2 y no fue posible, se decidió trabajar únicamente con el biosensor de la serie C1 por sus características ya mencionadas.

En la tabla VI.4 se muestran las pendientes promedio (que corresponden a 25 curvas de calibración por biosensor) para los dos biosensores.

TABLA VI.4 Resultados estadísticos para los biosensores C1 y C2 de GOD. La pendiente corresponde al promedio de 25 curvas de calibración por biosensor. Como electrolito soporte se utiliza una solución de fosfato 0.1 M y NaCl 0.1M a pH= 6.0. El potencial de trabajo es de 1050 mV.

BIOSENSOR	Pendiente ($\mu\text{A ml/mg}$)	Coef. De correlación (R^2)
C1	0.9466	0.9986
C2	0.4743	0.9856

6.5.1 Tiempo de vida del biosensor

La evaluación del tiempo de vida del biosensor se realizó de manera concurrente; es decir, durante el desarrollo de la investigación, para ello se compararon las curvas de calibración construidas en diferentes días las cuales corresponden a cuatro meses diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en la figura VI.5.

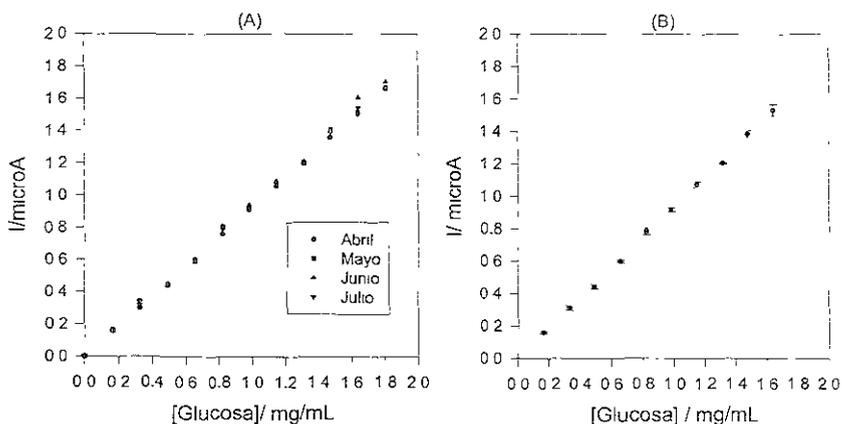


Figura VI.5 Curvas de calibración de Glucosa empleando un biosensor de matriz rígida de GOD para el biosensor C1. Como electrolito soporte se utilizó solución buffer 0.1 M, en NaCl 0.1 M a pH=6.0 e imponiendo un potencial de 1050 mV. (A) Corresponde a las cuatro meses que se realizó el estudio, las curvas de calibración se obtienen cada semana, mostrándose el promedio de cada mes. (B) Gráfica con barras de error obtenida a partir de los resultados mostrados en la figura VI.3A

Tabla VI.5 Parámetros estadísticos obtenidos para las curvas de calibración promedio de cada mes. La pendiente está expresada en $\text{mgmL}^{-1}\mu\text{A}$.

	Abril	Mayo	Junio	Julio	C.V.*
Pendiente	0.9445	0.9354	0.9483	0.9429	1.245
Intercepto	0.0003	0.0004	0.0003	0.0003	0.521
R ²	0.9975	0.9968	0.9958	0.9956	

C.V = Coeficiente de variación

Como se observa tanto en la figura VI.5 y la tabla VI.5 los parámetros estadísticos de las curvas son similares. De acuerdo con la bibliografía la linealidad entre los sistemas se evalúan de acuerdo a los siguientes criterios: $R^2 \geq 0.98$ y $C.V. \leq 5\%$. Por lo que podemos decir que la linealidad del sistema se ajusta a los criterios establecidos [7].

Con estos resultados se observa que el biosensor mantiene durante cuatro meses el intervalo de respuesta, lo que garantiza que el biosensor tiene un tiempo de vida media de por lo menos cuatro meses. Es importante señalar que a lo largo del trabajo el biosensor no sufrió daños físicos en la superficie aún cuando se le pulió antes de cada curva, los cuidados que se tuvieron durante esta etapa fue mantenerlos hidratados durante los días que no se usaron, como se ha descrito en el apartado VI.2.

6.5.2 Estudios de reproducibilidad y repetibilidad

La reproducibilidad se evaluó para el biosensor C1. Para ello nos abocaremos a la figura VI.4 y la tabla VI.4. Los parámetros estadísticos obtenidos (pendiente y C.V.). Demuestran que existe reproducibilidad de la señal, ya que las pendientes obtenidas son equivalentes estadísticamente (ver tabla VI.6). Además, el cálculo del CV es menor al 5%, valor que se reporta en la bibliografía.

Tabla VI.6 Resultados obtenidos para cada biosensor de un mismo lote con un contenido de enzima del 3%. La pendiente está expresada en $\text{mgmL}^{-1}\mu\text{A}$.

Biosensor	1*	2*	3*	4*	5*	Pendiente	C.V.
C1	0.1470	0.1471	0.1469	0.1470	0.1470	0.9466	0.7342

*corresponde a una misma adición de sustrato de 0.5587 mg/ml de glucosa para diferentes curvas promedio.

La repetibilidad de la respuesta del biosensor se evaluó con el biosensor de la serie C1 con el que se realizó todo el estudio en el presente trabajo; para ello se comparan las curvas construidas a lo largo de todo el trabajo, y nos referiremos a la figura VI.5 y la tabla VI.5. Como se puede observar las cuatro curvas muestran una

pendiente y coeficiente de correlación muy similar, de tal modo que el coeficiente de variación, obtenido la pendiente es igual a 1.245%, nos confirma que al ser menor el valor obtenido con respecto al esperado (de 5%) se presentan verdaderas replicas del ensayo al estimar a la muestra; es decir, existe la repetibilidad de la respuesta por parte del biosensor de la serie C1.

6.6 Estudio de interferencias

Como se menciona anteriormente, el estudio de cada una de las sustancias presentes en la muestra comercial nos demuestra la posibilidad de que el ácido ascórbico (vitamina C) si puede interferir en la determinación de la glucosa en las muestras. Esta vitamina es capaz de oxidarse en la superficie del biosensor o en el sistema ya que como se mantiene una agitación constante del mismo para proveer el oxígeno con el cual será posible la actividad enzimática, esté mismo oxígeno facilita la oxidación del ácido ascórbico, con lo cual la señal obtenida correspondería a la señal de la actividad enzima-sustrato más la señal de la oxidación de la vitamina C.

Para este estudio se prepararon dos soluciones estándar de ácido ascórbico(véase tabla VI.7):

1. La primera que corresponde a la menor cantidad de vitamina C presente en las muestras; es decir, 10^{-4} M (solución 1)
2. En este experimento la concentración de ácido ascórbico (solución 2) corresponde a la mayor cantidad ($3 \cdot 10^{-4}$ M)

Se monta el sistema como, cuando ya se tiene una señal de fondo estable se le adiciona 1 mL de la primera solución estándar se toma la

lectura correspondiente, esta determinación se hace por triplicado, y lo mismo se realiza para la segunda solución estándar.

TABLA VI.7 Resultados obtenidos de las determinaciones puntuales de ácido ascórbico. Estándar 1 corresponde a una concentración de 10^{-4} M, el estándar 2 corresponde a una concentración de $3 \cdot 10^{-4}$ M. El estudio se realizó por triplicado, como electrolito soporte una solución buffer de fosfatos 0.1M, en NaCl 0.1 M a pH 6.0 a un potencial de trabajo de 1050 mV.

Ácido ascórbico estándar	RESPUESTA (μ A)
Solución 1	NO HUBO RESPUESTA
Solución 2	NO HUBO RESPUESTA

A lo largo de éste estudio se comprobó que la cantidad de ácido ascórbico (vitamina C) es despreciable con respecto a la cantidad de glucosa que se tendría a las mismas condiciones, por lo que no se obtiene respuesta por parte del biosensor, cabe mencionar que la solución estándar se manejo de la misma manera que la muestra, es decir, que ninguna de las dos se protegió de la luz, ya que hay que recordar que ésta oxida a la vitamina en un periodo de 3-5 minutos, considerando el tiempo de preparación del estándar y de dilución de la muestra más el tiempo que transcurre en obtenerse la señal de fondo estable, es posible que la enzima ya se encuentre degradada en el momento de su cuantificación, aún cuando esta lograra oxidarse en la superficie del biosensor ya sea por la luz o el oxígeno del medio. La aplicación de un potencial constante de 1050 mV no hace posible su cuantificación ya que tampoco está presente la enzima correspondiente. Por lo que podemos decir que el ácido ascórbico no interfiere en la respuesta del biosensor y solo se obtiene una respuesta cuando interactúa en el medio la enzima y el sustrato.

CAPÍTULO VII

APLICACIONES

7.1 APLICACIONES

Las aplicaciones que se le pueden dar a un biosensor de glucosa oxidasa son muy amplias y en áreas tan complejas desde el punto de vista analítico. En el presente trabajo la aplicación es directamente en la cuantificación de glucosa presente en muestras comerciales (jugos sabor naranja). En estos productos además de la glucosa se encuentra otros azúcares como la sacarosa, maltosa, fructosa. La importancia de determinar glucosa radica en este tipo de muestras sea posible cuantificarla, sin un tratamiento previo de la muestra [4].

El estudio de nuevos métodos de cuantificación se lleva a cabo con la finalidad de reemplazar a los ya existentes. Con la garantía de ofrecer análisis rápidos, confiables y baratos. La determinación y cuantificación de glucosa presente en una muestra es un análisis rutinario pero no por eso sencillo.

7.2 CUANTIFICACIÓN

En el presente trabajo para hacer la determinación se llevaron a cabo curvas de calibración con un estándar de glucosa de una concentración de 0.1M. Las curvas se realizaron por triplicado y en días diferentes con la finalidad de evaluar la repetitibilidad, reproducibilidad y el tiempo de vida del biosensor. Se tuvo que repetir este experimento, debido a que se construyó un nuevo biosensor. Los resultados obtenidos se muestran en la figura VII.1.

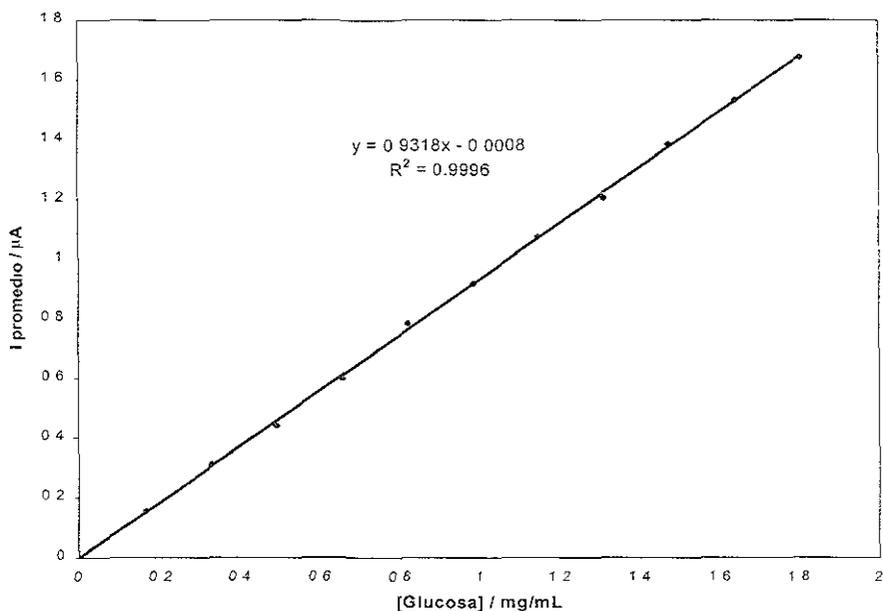


Figura VII.1 Curva de calibración promedio de glucosa. Como electrolito soporte se utilizó solución buffer 0.1 M, en NaCl 0.1 M a pH=6.0 a un potencial de 1050 mV.

De acuerdo con los resultados obtenidos se llega a la conclusión de que la respuesta del biosensor es reproducible y repetitiva. Una vez realizado lo anterior se analizó la muestra para lo cual no se necesitó llevar a cabo un tratamiento previo. El único procedimiento que se realizó fue lo siguiente, dado que el marbete de la muestra no reporta la cantidad total de glucosa sino de azúcares totales se prepararon varias diluciones con la finalidad de determinar cuál era la adecuada, de tal manera que la respuesta esperada se encontrara dentro de la curva de calibración. Una vez determinado lo anterior se prepara la muestra con la dilución correcta, empleando como diluyente la solución buffer de fosfatos para conservar la naturaleza del medio de trabajo. Se monta el sistema y ya que se obtiene una señal de fondo estable se realizan

cuatro adiciones de 0.2 μ l cada una de la solución estándar se toman la lecturas correspondientes y la quinta adición se hace con la muestra (0.2 μ l) se toma la lectura correspondiente, se realiza la cuantificación y se determina el contenido en la muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VII.1

TABLA VII. 1 Resultados obtenidos en la cuantificación de glucosa en jugos de marcas comerciales. 1.- Amí, 2.- Tampico citrus punch, 3.- pascualin, 4.- Boing.

JUGO	Gramos / ración	KCal	% glucosa
1	4.1934	15.7477	9.8423
2	27.1391	101.7716	63.0727
3	18.8680	70.7549	44.2219
4	21.0860	79.0717	49.4198

En la literatura se reporta que el contenido de azúcares presentes en un jugo comercial independientemente del tipo de éste es una mezcla de fructosa y glucosa en donde el porcentaje de este último no deberá exceder el 60% y no ser menor del 40 % el resto representa el contenido de fructosa [5]. El contenido energético reportado no debe exceder de 160 Kcal, en cuanto al contenido en gramos la USDA y la FDA recomiendan que en bebidas la cantidad de azúcares no debe ser mayor a los 40 gramos por ración [12].

Como se observa en la tabla VII.1 los resultados encontrados, a excepción de los dos primeros, se encuentran dentro de los parámetros establecidos; sin embargo, los resultados demuestran que no existe uniformidad de contenido en la elaboración del producto ya que como se describió anteriormente (ver tabla I.1) las sustancias presentes así como las cantidades son muy distintas, lo que concuerda con lo ya establecido en donde el contenido de azúcares totales. Por tanto, el de glucosa varía dependiendo del estándar establecido por cada productor.

Aunque en este trabajo de investigación se logro la cuantificación de la glucosa en jugos comerciales es necesario realizar otra técnica analítica, en estos mismos jugos, para establecer que los resultados obtenidos son fiables, además de validar el método.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

8.1 CONCLUSIONES

1. Es posible construir un biosensor de glucosa oxidasa (GOD), basado en un biocomposite rígido
2. La actividad de la enzima glucosa oxidasa (GOD) no se ve afectada por periodos largos de almacenamiento, por lo menos en 4 meses.
3. El funcionamiento del biosensor es posible en un medio de electrolito soporte de fosfatos a 0.1 M en NaCl 0.1 M a pH 6 a un potencial de 1050 mV.
4. El intervalo de linealidad para el biosensor se encuentra entre 0.17 a 1.91 mg/ml de glucosa.
5. El biosensor si responde a la presencia de la glucosa presente en una muestra comercial de jugo no siendo necesario algún tratamiento previo de la muestra ni el uso de reactantes externos para poner de manifiesto al analito de interés.
6. Es posible llevar a cabo la cuantificación de glucosa en muestras comerciales, aunque para ello falta realizar estudios más específicos sobre las características de las muestras y las formulaciones del productor.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Alegret Salvador. Biosensores. *Su utilización en los Campos Biomédico, Ambiental e industrial Departamento de Química*, Universidad Autónoma de Barcelona. Industria Farmacéutica. Nov-Dic. 1990 España. Pag. 33-39, 41-43.
- [2]. Barcelo. *Diccionario de especialidades químicas*. Tercera edición, México D.F. Pag. 376, 357,498.
- [3]. Badui Dergal S., *Química de los Alimentos*, Editorial Alhambra Mexicana, primera edición, México, 1981. Pág. 53,68,80
- [4]. Charley H., *Tecnología de alimentos*, Editorial Limusa, Primera edición en español, 1987,México. Pág. 27, 29, 36-41, 128-133.
- [5]. Cheftel H., *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos Vol. I*, Editorial Acribia, Segunda edición, Zaragoza España, 1992,pág.153, 162-167, 267, 290-293.
- [6]. D. Hicks, *Production and packaging of Non-Carbonated fruit juices and fruit beverages*, Editorial Van Nostrand Reinhold, Primera edición, New York USA, 1992, pág. 38, 43,47, 58, 59
- [7]. Fernández G. *Estadística*. Editorial Alambra. Segunda edición. México D.F. 1992. pág 123-129

- [8]. Morales Pérez Adriana, *Construcción y evaluación de biosensores amperométricos basados en biocomposites*. Departament de Química. Unitat de Química Analítica. Universitat Autònoma de Barcelona, España. Pág. 16, 19, 22-26,33, 124,
- [9]. Kirck T. *Nuevo manual de la industria alimentaria*, Vicente Ediciones, primera edición, 1993, Madrid España, pág. 367-374, 382.
- [10]. Norman W. Desrosier, *Elementos de tecnología de alimentos*, Compañía Editorial Continental, segunda edición, México, 1996,Pág. 278, 279, 555
- [11]. P. Gacesa y J. Hubble, *Tecnología de las enzimas*, Editorial Acribia, Primera edición en español, Zaragoza España, 1990, pág. 112-115, 160-163, 177.
- [12]. Robinson David, *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*, Editorial Acribia, primera edición, Zaragoza España, 1991, pág 352-355, 402, 406, 418.
- [13]. Saghobk V. *La nutrición en los alimentos*, Konemann. Primera edición, España, 1989, pág 87, 96, 156-9.
- [14]. Wagner G., Guilbault G., *Food and Analysis*, Editorial Marcel Dekker, Inc.,primera edición, USA, pág.42-48, 58, 61.
- [15]. Wiseman. A, *Manual de Biotecnología de enzimas*, editorial Acribia, segunda edición, Zaragoza España, 1985, pág. 134-139, 145
- [16]. Zhirman B. *Las Enzimas. El Manual Moderno*. Segunda edición. México, 1997, pág 134-9.

CAPÍTULO X
ANEXO I "REPORTE DE SERVICIO SOCIAL"
(98-12/41-4009)

**DETERMINACIÓN DE ANALITOS DE INTERÉS MEDIANTE
SENSORES ELECTROQUÍMICOS DE MATRIZ RÍGIDA**

RESPONSABLE: DRA. ADRIANA MORALES PÉREZ

PRESENTAN:
HERNÁNDEZ LUIS DULCE MARÍA
RIVERA TELLEZ GIRÓN BEATRIZ
CARRERA: Q.F.B.

EL PRESENTE PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL SE REALIZÓ EN LAS INSTALACIONES DE LA FAÇULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN (UNAM), EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE LA SECCIÓN DE QUÍMICA ANALÍTICA, BAJO LA SUPERVISIÓN DE LA DRA. ADRIANA MORALES PÉREZ. CON FINANCIAMIENTO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) CON EL PROYECTO 27044A

ÍNDICE

Objetivos	60
Introducción	62
Desarrollo Experimental Equipo y reactivos	67
Metodología	68
Construcción del biosensor de Alcohol oxidasa	68
Evaluación de las condiciones experimentales	69
Resultados	71
Conclusiones	75
Bibliografía	76

OBJETIVO ACADÉMICO.

1. Construir y caracterizar un biosensor amperométrico de matriz rígida basado en un biocomposite constituido por la enzima alcohol oxidasa (AO). Que sirva como una técnica analítica alternativa para la cuantificación de etanol en bebidas alcohólicas.
2. Aplicar los conocimientos teóricos y habilidad práctica adquiridas en las asignaturas de la licenciatura de Q.F.B. Principalmente Análisis I, II y III, Química Orgánica I, II y III, Bioestadística, Fisicoquímica I y II, y Bioquímica, para el estudio de los dispositivos analíticos (Biosensores).

OBJETIVO SOCIAL.

1. Desarrollar una técnica analítica altamente sensible que permita cuantificar etanol en bebidas alcohólicas con un menor costo de análisis, pero con la sensibilidad y selectividad que exhibe la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

OBJETIVOS DEL PROGRAMA.

1. Elaborar biosensores desarrollados en un biocomposite de polvo de grafito + resina epóxica + la enzima (alcohol- oxidasa).
2. Observar el comportamiento del biosensor a través de la técnica de polarografía lineal empleando diferentes electrolitos soportes, así como distinta fuerza iónica y pH.

INTRODUCCIÓN.

El interés por analizar diversas especies químicas ha provocado el desarrollo de nuevos instrumentos analíticos que no requieren grandes costos de instalación y mantenimiento, y que a su vez simplifiquen el estudio de los analitos, sin arriesgar la confiabilidad en la cuantificación.

Entre los nuevos instrumentos analíticos desarrollados se encuentran aquellos que incorporan un elemento biológico de reconocimiento molecular, el cual está íntimamente integrado en el transductor; a éste se le conoce como BIOSENSOR.

El contacto íntimo con el transductor hace posible transformar la interacción del analito con el elemento biológico en una señal que el transductor se encarga de captar y traducir, generalmente al dominio eléctrico u óptico para posteriormente amplificarlo y obtener la señal analítica [3].

En el diseño de los biosensores el material biológico se puede inmovilizar superficialmente sobre el transductor empleando alguna de las siguientes técnicas: entrecruzamiento químico, enlace covalente, retención a través de una membrana inerte, adsorción física sobre la superficie de un sólido y atrapamiento en una matriz polimérica. El componente biológico se inmoviliza sobre la superficie del transductor buscando la máxima proximidad posible entre estos dos componentes, ya que ello refleja el buen funcionamiento de los biosensores. Con esto se gana estabilidad en la señal analítica, nula pérdida en la actividad biológica y un tiempo de vida prolongado. La inmovilización superficial se lleva a cabo mediante procedimientos de vía húmeda. Otra alternativa es mediante la inmovilización en una matriz rígida. La cual

está constituida por el *composite* que es la combinación de por lo menos dos componentes diferentes para formar un nuevo material, conservando las propiedades individuales. En el caso de los *composites* conductores estos están constituidos por dos partes: la fase conductora en la que se utiliza polvo de grafito y la fase aislante en la cual se utilizan resinas de cualquier clase hasta líquidos altamente viscosos. Al incorporar el material biológico al *composite* se da lugar al *biocomposite* [2].

Al construir un biosensor se logra una alta selectividad y sensibilidad. La selectividad esta en función del material biológico, y la sensibilidad depende del material biológico así como del transductor. Aparte de estas características, se busca que un biosensor cumpla con los siguientes requisitos: respuesta analítica medible, amplio intervalos de linealidad, exactitud y precisión, tiempo de vida extenso, tiempo de respuesta corto, respuesta continua.

Las aplicaciones de los biosensores amperométricos están principalmente enfocado al análisis de alimentos, otro importante campo es en la biomedicina; los biosensores en esta área tienen un campo ilimitado, ya que la instrumentación está consolidada, y permite una alta frecuencia de análisis. Además, los biosensores por sus características de uso *in situ*, facilidad de uso, mínimo tratamiento de la muestra, bajo costo, reducción de tiempos de análisis, confiabilidad de estudio, etc., van encontrando aplicaciones donde no pueden llegar los grandes equipos [3].

En el ámbito ambiental se han utilizado para detectar y medir sustancias tóxicas o mutagénicas; Por ejemplo pesticidas presentes en

aguas de riego. Otro campo explotado por los biosensores es en los procesos fermentativos.

Para realizar una determinación amperométrica es necesario conocer las condiciones de trabajo con ello nos referimos al tipo de electrolito soporte, pH adecuado, potencial de trabajo y fuerza iónica, ya que cada uno de estos factores aporta estabilidad al sistema en estudio. En cuanto al electrolito soporte (solución buffer) se busca que éste junto con el pH impuesto aporten estabilidad a la enzima, es decir, no provoquen su degradación y además, sea inerte a ella, la fuerza iónica se establece con la finalidad de disminuir la resistividad del medio finalmente el potencial al cual se llevara a cabo el estudio deberá ser tal que mida la corriente generada por la actividad enzimática [4].

Para llevar a cabo el estudio en el presente trabajo se hicieron una serie de consideraciones con la finalidad de optimizar el desarrollo experimental.

Como electrolito soporte se decidió trabajar con el buffer de fosfatos, ya que la literatura reporta que es inerte a la mayoría de las enzimas.

En el buffer de fosfatos se disuelve conjuntamente el NaCl con el objetivo de disminuir la resistividad del medio de trabajo y minimizar el transporte por migración del analito.

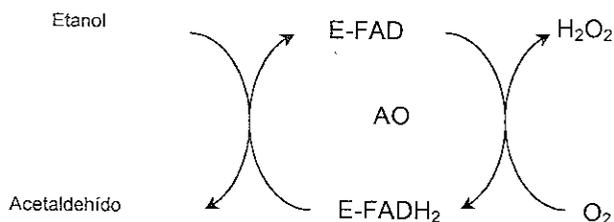
En el pH de trabajo se propone trabajar un intervalo de 6 -8 debido a que a pH's inferior a 6 y superior a 8. La mayoría de las enzimas se desnaturalizan y la resina presente en el biosensor se lamina, es decir, se forman escamas en la superficie que esta en

contacto con la solución.

El potencial al cual se llevaron a cabo las mediciones se fijó en 1050 mV, ya que a este potencial la cantidad de interferencias es mínima, no existe la posibilidad de que la enzima se desnaturalice y la sensibilidad del sistema es la máxima [7].

La cuantificación de etanol a través de un biosensor enzimático es considerada una técnica innovadora que nos permite obtener resultados confiables; ya que al contar con la enzima AO inmovilizada en una matriz rígida y que ésta se encuentra en contacto directo con el sustrato en solución no se requiere tratamiento previo de la muestra lo que también nos permite ahorrar tiempo y el costo del análisis se minimiza.

La reacción enzimática que se sigue por medio del biosensor es la siguiente:



La enzima alcohol oxidasa (AO) cataliza la reacción enzimática de alcoholes primarios a su aldehído respectivo, en presencia de oxígeno. El centro activo redox de esta enzima es el grupo flavín adenín dinucleótido (FAD), la forma activa del grupo FAD es la oxidada. Cuando reacciona la enzima con el sustrato el grupo FAD se reduce; la regeneración de ésta

a la forma oxidada se lleva a cabo mediante el oxígeno; cosubstrato natural aceptor de electrones de las enzimas oxidasas, por lo que para estas enzimas es indispensable el oxígeno en el medio de trabajo, ya que de éste depende la catálisis enzimática y en último término el buen funcionamiento del biosensor [1].

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

REACTIVOS:

- ✓ Agua desionizada.
- ✓ Fosfatos dibásico de sodio-heptahidratado. MERCK. G.R.
- ✓ Fosfato monobásico de sodio. MERCK. G.R.
- ✓ Etanol absoluto. MERCK. G.R.
- ✓ Hidróxido de sodio. BAKER. R.A.
- ✓ Cloruro de sodio. MONTERREY. R.A.
- ✓ Cloruro de potasio. BAKER. R.A.

EQUIPO:

- ✓ Balanza analítica, METTLER-TOLEDO. AB204.
- ✓ pH-metro. METTLER. Delta 340.
- ✓ Sistema desionizador de agua. MILL-Q. Water system.
- ✓ Agitador magnético. COORNIG- PC353 stirper.
- ✓ Unidad amperométrica BAS
- ✓ Electrodo de calomel saturado
- ✓ Electrodo de platino
- ✓ Biosensor alcohol oxidasa (AO)

MATERIAL DE VIDRIO.

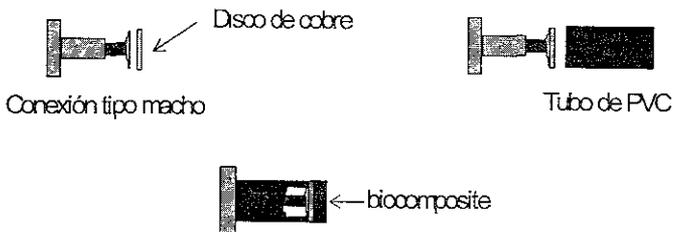
- ✓ Celda electroquímica
- ✓ Matraz volumétrico de 500ml.
- ✓ Pipeta volumétrica de 25ml.
- ✓ Micropipeta de 200 μ l.
- ✓ Vasos de precipitados de 50ml y 100ml.

✓ Piseta.

METODOLOGÍA

1.- Construcción del biosensor alcohol oxidasa (AO).

El biosensor consta dos partes fundamentales: a) el cuerpo y b) el biocomposite. El cuerpo consta de un tubo cilíndrico de PVC de 6 mm de diámetro interno y 18 mm de longitud. Se introduce una conexión tipo macho, a la que previamente se solda una placa de cobre de 2mm. de diámetro, quedando en el extremo una cavidad de 3mm en la cual se deposita el biocomposite. En la siguiente figura se muestra la construcción del cuerpo del biosensor [7].



1a. -Preparación del biocomposite

Los componentes del composite están constituidos de dos partes: la fase conductora y la fase aislante, en este estudio tenemos como fase conductora polvo de grafito y a la fase aislante una resina comercial altamente viscosa (Epotek H77). La enzima a utilizar es la alcohol oxidasa (AO).

Para la preparación del biocomposite se pesaron los siguientes componentes:

- a) 0.7 g de resina epotek
- b) 0.1 g de endurecedor
- c) 0.2 g de polvo de grafito
- d) 3.5% de enzima alcohol oxidasa (AO)

Una vez pesados los componentes se mezclan los tres primeros, hasta obtener una pasta homogénea y de esta pasta se pesan 400 mg (que corresponde a la cantidad aproximada que se puede depositar dentro del cuerpo), posteriormente se le adiciona la enzima (14 mg) y se mezclan perfectamente. Finalmente se llenan los cuerpos para formar el biosensor. Se etiquetan y se colocan a 40° C en la estufa durante 5 días.

Al finalizar el tiempo de curado, se pulen los biosensores con una lija del número 500 y con agua hasta obtener una superficie plana. Posteriormente se hidratan los biosensores con la finalidad de activar a la enzima.

2.Evaluación de las condiciones experimentales.

Los factores que afectan la respuesta del biosensor AO son: la concentración de electrolito soporte (ES), la fuerza iónica (μ) y el pH. Por lo cual se propuso trabajar manteniendo constante dos de los factores y variando solo uno hasta completar el estudio en el cual se hayan variado todos y cada uno de los factores. Para el caso del ES se trabajaran las siguientes concentraciones; 0.01 M, 0.1 M y 0.5 M. A este electrolito soporte se le impondrán tres diferentes pH's 6, 7, y 8. Finalmente a cada una de las soluciones anteriores se les fijará una fuerza iónica empleando NaCl a tres concentraciones distintas 0.05 M, 0.1 M y 0.5 M

La metodología experimental es la siguiente:

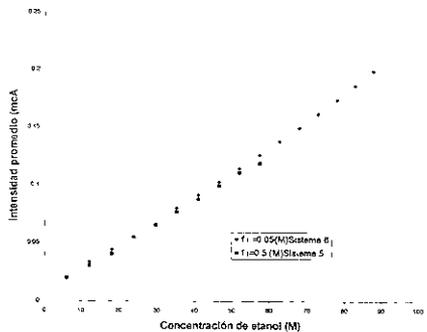
- I.- Calibrar el amperímetro conforme al manual de uso.
- II.- Colocar en la celda electroquímica 25 mL del electrolito soporte.
- III.- Adicionar 200 μl de etanol al sistema en agitación constante y tomar la lectura de cada adición al cabo de 30 segundos, anotando la intensidad (I) correspondiente.
- IV.- Elaborar la curva de calibración, graficando $I' = f(\text{Concentración de etanol})$.
- V.- Realizar el análisis estadístico correspondiente para la evaluación de las condiciones óptimas de estudio

RESULTADOS

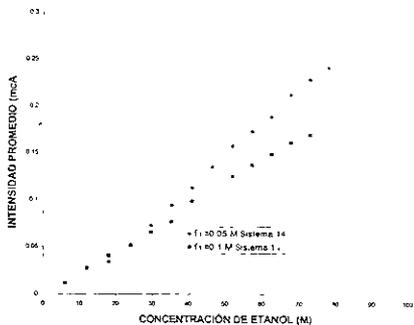
Los resultados obtenidos en la presente investigación se muestran en la siguiente tabla (E.S = electrolito soporte/M), m=pendiente promedio $\mu\text{Amg}^{-1}\text{mL}$, C.V= coeficiente de variación (%), I= corriente promedio).

Sist.	[E.S]	pH	μ (M)	m	C.V.	R ²	C.V.	I (μA)	C.V.
1	0.01	8	0.1	0.0019	11.34	0.9940	0.242	0.080	0.002
2	0.01	7	0.1	0.0020	3.18	0.9960	0.319	0.076	0.002
3	0.01	6	0.1	0.0021	0.50	0.9960	0.234	0.070	1 934
4	0.01	8	0.5	0.0016	16.34	0.9844	1.078	0.055	~0
2	0.01	7	0.5	0.0020	0.003	0.9991	1.49E-6	0.076	~0
6	0.01	6	0.5	0.0020	0.9	0.9985	0.065	0.074	2 706
7	0.01	8	0.05	0.0021	3.42	0.9970	0.154	0.083	1.57E-6
8	0.01	7	0.05	0.0022	0.003	0.9982	5.97E-06	0.080	~0
9	0.01	6	0.05	0.0033	2.52	0.9942	0.138	0.125	0.885
10	0.1	8	0.1	0.0022	0.95	0.9966	0.050	0.087	0.002
11	0.1	7	0.1	0.0024	1.38	0.9964	0.054	0.076	0.002
12	0.1	6	0.1	0.0037	1.98	0.9986	0.078	0.125	~0
13	0.1	8	0.05	0.0025	1.66E-06	0.9972	1.49E-06	0.073	~0
14	0.1	7	0.05	0.0035	1.32	0.9981	0.033	0.094	1.39E-6
15	0.1	6	0.05	0.0024	1.24	0.9969	0.051	0.076	0 002
16	0.1	8	0.5	0.0020	1.36	0.9988	0.045	0.052	~ 0
17	0.1	7	0.5	0.0020	5.02	0.9975	0.156	0.073	~ 0
18	0.1	6	0.5	0.0040	9.03	0.9884	0.444	0.097	21.74
19	0.5	8	0.1	0.0017	7.28	0.9893	1.288	0.059	0.0032
20	0.5	7	0.1	0.0022	4.27	0.9948	0.144	0.073	~0
21	0.5	6	0.1	0.0021	0.56	0.9946	0.264	0.077	1.648
22	0.5	8	0.05	0.0022	0.31	0.9973	0.044	0.083	1.57E-6
23	0.5	7	0.05	0.0021	1.23	0.9963	0.086	0.073	~0
24	0.5	6	0.05	0.0021	8.03	0.9927	0.534	0.072	0.885
25	0.5	8	0.5	0.0022	9.77	0.9929	0.251	0.073	~0
26	0.5	7	0.5	0.0019	3.06	0.9976	0.129	0.073	~0
27	0.5	6	0.5	0.0020	2.04	0.9977	0.024	0.076	0.844

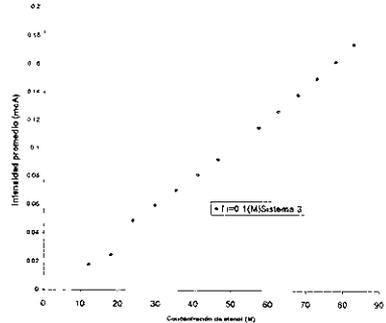
CURVA DE CALIBRACIÓN DE ETANOL, E.S =0.01M, pH=7.0



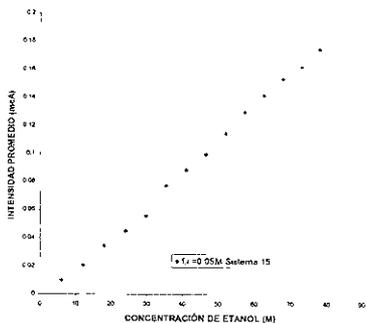
CURVA DE CALIBRACIÓN DE ETANOL, E.S = 0.1M, pH=7



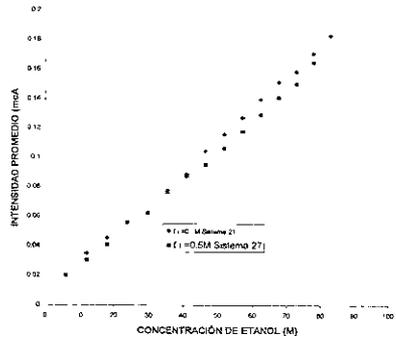
CURVA DE CALIBRACIÓN DE ETANOL, E.S =0.01M, pH=6.0



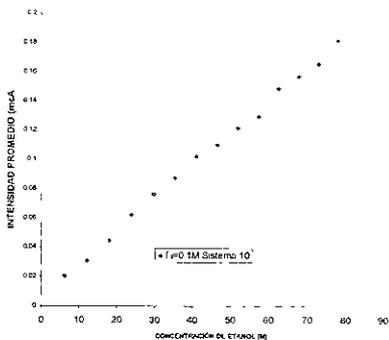
CURVA DE CALIBRACIÓN DE ETANOL, E.S =0.1M, pH=6.0

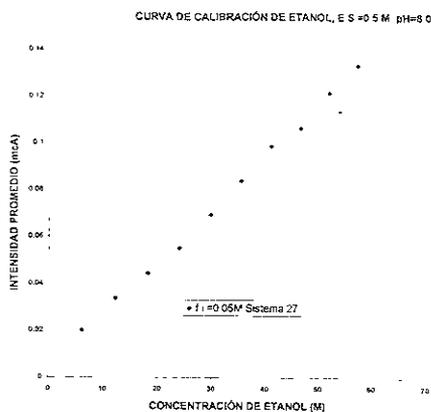


CURVA DE CALIBRACIÓN DE ETANOL, E.S =0.5M, pH=6.0



CURVA DE CALIBRACIÓN DE ETANOL, E.S =0.1M, pH=6.0





Como se observa en la tabla anterior tenemos que la concentración del electrolito soporte viable para el estudio va de 0.01 hasta 0.5 M.

1. Tenemos un intervalo de pH óptimo de 6 a 7.
2. Encontramos que las concentraciones de la fuerza iónica es adecuada en el intervalo de 0.05 a 0.1 M.
3. De la misma forma tenemos que la intensidad fijada para una concentración puntual esta entre 0.07 a 0.08 μA , habiendo una diferencia de solo 0.01 μA .

CONCLUSIONES

Fue posible construir un biosensor de AO, cual cumplió con la característica de ser estable, confiable y de fácil uso.

Las condiciones de trabajo, determinadas experimentalmente, en las cuales se obtiene la máxima señal analítica y donde ésta es estable son las siguientes:

- a) Es posible realizar el estudio para el biosensor alcohol oxidasa (AO) a un intervalo de pH entre 6 y 7.
- b) La fuerza iónica deberá imponerse entre una concentración de 0.05 a 0.1 M.
- c) La concentración de electrolito soporte es independiente ya que no modifica de ninguna manera el estudio.
- d) La sensibilidad del aparato es muy alta, siendo confiable el estudio a las condiciones óptimas establecidas. Asegurándonos que teniendo en una muestra comercial una cantidad mínima de etanol ésta será detectada.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Albery W. J., Craston D. H. , *Amperometric Enzime Electrodes: Theory and Experiment*. In Turner A.P.F et al ref 4 pág 180-210. 1987.
- [2] Field M. P. Abuknesha R.A., *Biosensors & Bioelectron.*, 1984, 9, 373.
- [3] Coule P. R., Sechaud., Bardeletti G., *Enzime Electrode Analyzer for the Food Industry. Biotechnology in the food industry.*, Proc. Conference London, 1986.
- [4] Jonsson G., Gorton L., *Electroanalysis*, 1991, 3, 740.
- [5] Miller J. C. Miller J. N., *Estadística para Química Analítica*, Addison-Wesley Iberoamericana, primera edición. España pág 47.
- [6] Harris C. D., *Análisis Químico Cuantitativo. Edit. Iberoamericana*, primera edición en español, 1992, México, pág.257, 329-330, 439.
- [7] Morales Pérez Adriana, *Construcción y evaluación de biosensores amperométricos basados en biocomposites*. Departament de Química Unitat de Química Analítica. Universitat Autònoma de Barcelona. 1996 pág. 23, 31, 39, 45.