



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“CUANTIFICACION DE B-D- GLUCOSA EN SUEROS GLUCOSADOS COMERCIALES EMPLEANDO UN BIOSENSOR BIENZIMATICO DE GOD-HRP DE TIPO AMPEROMETRICO”

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: BEATRIZ RIVERA TELLEZ GIRON

Asesora: DRA. ADRIANA MORALES PEREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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 comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Cuantificación de 3-D- glucosa en sueros glucosados comerciales empleando

un biosensor bienzimático de GOD-HRP de tipo amperométrico.

que presenta la pasante Beatriz Rivera Tellez Girón.

con número de cuenta: 8706837 -9 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 24 de Septiembre de 2001

PRESIDENTE M en C. José de Jesús Pérez Saavedra

VOCAL O.F.B. Elia Granados Enriquez

SECRETARIO Dra. Adriana Morales Pérez

PRIMER SUPLENTE M en C. Julio Cesar Botello Pérez

SEGUNDO SUPLENTE Q. Ruth Martínez Resendiz

AGRADECIMIENTOS.

Primeramente agradezco a **Dios** los padres que me concedió, porque sin merecerlo, ha derramado de su amor infinito en nosotros ayudándonos en los momentos de tristeza y enfermedad; dándonos a cada instante de su fuerza e iluminación que es el aliciente para superar los pedruscos de la vida.

A mis padres **Micaela Tóllez G y Ángel Rivera** agradezco su amor, cuidados y dedicación que me han brindado incondicionalmente. Porque no escatimaron en su tiempo y enseñanzas para que pudiera dar desde mi primer paso hasta mis estudios universitarios. Sé que en ellos puedo confiar plenamente, porque siempre me darán lo mejor. Por todo ello quiero que esta tesis que representa mi trabajo y esfuerzo sea una homenaje a las personas que más amo.

A mis hermanas **Patty y Wendy** agradezco todo el tiempo que han invertido en escuchar mis tristezas y desilusiones, mis alegrías y locuras. Porque de ellas siempre he recibido apoyo y comprensión que sólo las verdaderas amigas pueden proporcionar, sin condiciones ni conveniencias.

Agradezco a mis hermanos **Miguel A. e Israel** porque en los momentos de gran problemática son los brazos fuertes de la familia que ayudan a que no nos desplomemos. Porque están dispuestos a levantar el ánimo con la palabra de aliento.

A **Donald y Wilson** agradezco la alegría y el amor sin condiciones que siempre me brindaron. Porque fueron los que siempre estuvieron a mi lado acompañándome en las duras noches de desvelo de finales de semestre. Porque en los peores momento de tensión siempre estaba dispuestos a dar un silencioso consuelo.

A **Cecilia López, Guadalupe Téllez e Isabel Sánchez** les agradezco por todo el amor que me demostraron desde niña. No solo por lo material que me proporcionaron, sino porque siempre me hicieron sentir lo especial que era para ellas, porque siempre se preocupaban por mi bien estar, porque he recibido de ellas el buen consejo

Quiero agradecer especialmente a la **Sra. Estelita Pacheco de Santander** por obsequiarme un poquito de su tiempo y compartir conmigo de su gran sabiduría, la cual guardo y atesoro con gran cariño. Porque con sus palabras llenas de dulzura y con su gran paciencia, me brindo el ánimo necesario para terminar mi desarrollo y la oportunidad de concluir la investigación del presente trabajo

Agradezco a la **Sra. Patty Santander Pacheco** por su tiempo al escuchar mis dudas e inquietudes, porque siempre he recibido de ella el buen consejo y la palabra de aliento. Le doy las gracias por ser siempre el "hada madrina" que está presente cuando más la necesito en mis peores momentos de angustia.

A mis amigos **Bertha, Socorro, Oswaldo, Eduardo y Roxana** les agradezco su amistad y buenos momentos que vivimos durante el tiempo que cursamos el C.C.H.

A mis amigas **Sandy, Dulce, Nancy, Mónica y Ale** les agradezco de todo corazón a cada una de ellas la ayuda y el apoyo que en su momento me proporcionaron a lo largo de la carrera; porque con su amistad contribuyeron para que mi estancia en la F.E.S.C fuera mucho más agradable.

A la Profa. **Ma. Esther Revuelta** le agradezco la ayuda limpia y sincera que siempre me proporcionó. Porque siempre tuvo la palabra indicada para sacarme de mi error, dándome la motivación para seguir adelante. Por último quiero hacerle un reconocimiento, pues sin su participación, hubiera sido difícil recomenzar y concluir el presente trabajo.

Deseo agradecerle a mi asesora **Adriana Morales Pérez** por la oportunidad que me dio al darme éste proyecto. Porque nunca me limitó en el desarrollo de la investigación y siempre estuvo dispuesta a escuchar con calma y paciencia mis propuestas. Le agradezco su comprensión durante la enfermedad de mi mamá

Agradezco a la Sección de química analítica por haberme recibido con cordialidad durante todo este tiempo. Gracias a la **Profa. Lupita Caballero**, a **Julio Botello** y a todos aquellos con los que conviví en el laboratorio durante la parte experimental de mi tesis. A los sinodales agradezco su tiempo y paciencia para la corrección del presente trabajo.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA SECCIÓN DE QUÍMICA ANALÍTICA, EN EL LABORATORIO L-114. CON FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO CONACYT E-32766-J

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 GENERALIDADES	1
1.2 BIOSENSORES	2
1.2.1 Componente biológico	3
1.2.2 Transductor	3
1.2.3 Inmovilización del componente biológico	4
1.3 BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS	5
1.4 BIOSENSORES BIENZIMÁTICOS	7
1.5 APLICACIONES	7
1.6 OBJETIVOS	8

CAPÍTULO II

2. ASPECTOS TEÓRICOS	9
2.1 INTRODUCCIÓN	9
2.2 FUNCIONAMIENTO GENERAL DEL BIOSENSOR DE GOD-HRP	9
2.3 PROPIEDADES DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA	10
2.3.1 Actividad enzimática	10
2.3.2 Estructura de la enzima	11
2.3.3 Funcionamiento de la enzima	11
2.3.4 Especificidad	13
2.4 PROPIEDADES DE LA ENZIMA PEROXIDASA	13
2.4.1 Estructura de la enzima	13
2.4.2 Funcionamiento de la enzima	14
2.5 PROPIEDADES DE LA β -D-GLUCOSA	16
2.6 AMPEROMETRÍA	16

CAPÍTULO III

Página

3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 INTRODUCCIÓN	18
3.2 MATERIALES	18
3.3 CONSTRUCCIÓN DE LOS BIOSENSORES	19
3.3.1 Preparación del biocomposite	20
3.4 CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXPERIMENTACIÓN	20
3.4.1 pH de trabajo	21
3.4.2 Concentración del electrolito soporte	22
3.4.3 Determinación del potencial de trabajo	23
3.4.4 Determinación de la temperatura de trabajo	24
3.5 RESUMEN DE LA EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO PARA EL BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE GOD-HRP	25
3.6 CARACTERIZACIÓN DEL BIOSENSOR	26
3.6.1 Intervalo de linealidad	26
3.6.2 Reproducibilidad	27
3.6.3 Estudio de interferencias	28

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	30
4.1 LINEALIDAD	30
4.2 REPRODUCIBILIDAD	33
4.3 ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	38

	Página
CAPÍTULO V	
5. APLICACIONES	40
5.1 INTRODUCCIÓN	40
5.2 ASPECTOS GENERALES DE LOS SUEROS GLUCOSADOS	41
5.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	42
CAPÍTULO VI	
6. CONCLUSIONES	45
CAPÍTULO VII	
7. BIBLIOGRAFÍA	46
CAPÍTULO VIII	
8. ANEXOS	48
A-8.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	48
A-8.1.1 Buffer de fosfatos 0.1M pH = 6.0 NaCl 0.1M	48
A-8.1.2 β -D-glucosa estándar	48
A-8.2 ESTUDIOS ESTADÍSTICOS	49
A-8.2.1 análisis de varianza para la regresión lineal Simple	49
A-8.2.2 Análisis de varianza bifactorial (ANAEVA)	50

	Página
A-8.3 KIT DE GLUCOSA 635 DE SIGMA-ALDRICH	51
A-8.4 ARTÍCULO	52

Capítulo I

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 GENERALIDADES.

La necesidad del seguimiento o control e procesos tan complejos como las que se utilizan en la mayoría del área industrial, biotecnológica, biomédica o ambiental; ha impulsado el desarrollo de una amplia variedad de técnicas analíticas de gran sofisticación, auxiliadas por sistemas informáticos de adquisición y tratamiento de señales analíticas

Junto a los grandes equipos automatizados de análisis, se ha impulsado otra estrategia en la instrumentación analítica. Se trata del desarrollo de pequeños dispositivos analíticos que por su simplicidad, sensibilidad, fiabilidad y bajo costo, son alternativos a los grandes equipos

Nacidos hace unos veinte años, los sensores químicos que incorporan materiales biológicos en su construcción son conocidos como **Biosensores**, basándose casi exclusivamente en enzimas y transducción electroquímica se han comercializado muy recientemente

Los biosensores son piezas claves de lo que ya se conocen como bioinstrumentación analítica. Constituye un campo multidisciplinario de investigación y desarrollo, además de un mercado muy atractivo. Originalmente, los biosensores fueron diseñados para ser competitivos dentro del mercado de los análisis químicos o pruebas clínicas efectuadas fuera del laboratorio, realizadas en la consulta médica o por el mismo paciente, como el biosensor comercial para la detección de glucosa en sangre para el control de la diabetes

Sin embargo el área de la biomedicina no es la única en emplear los biosensores, el área de la industria de los alimentos también demanda métodos rápidos para estimar la caducidad, además de la industria de la biotecnología en la cual es necesario controlar de manera confiable los productos en medios muy complejos [1]

1.2 BIOSENSORES.

Un biosensor es un instrumento analítico que incorpora un elemento biológico de reconocimiento molecular, el cual está íntimamente integrado en el transductor. Este 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, y amplificarla. En la figura 1.1 se muestra el funcionamiento de un biosensor, desde que interacciona con el analito hasta la obtención de la señal analítica.

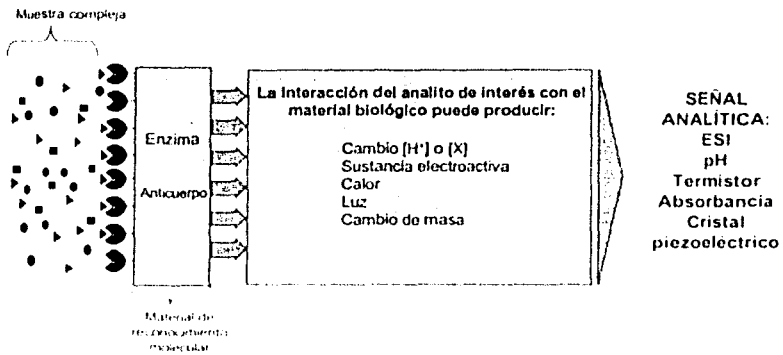


Figura 1.1 Representación esquemático del funcionamiento de un biosensor

Al construir un biosensor se logra una alta selectividad y sensibilidad. La selectividad está en función del componente biológico y la sensibilidad depende del material biológico así como el transductor.

Además de las características anteriores, se busca que un biosensor cumpla con las siguientes especificaciones:

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

- Tiempo de respuesta corta.
- Respuesta continua.

Para poder cumplir con los requerimientos necesarios para obtener un biosensor "ideal" es necesario tomar en cuenta el componente biológico, el transductor y sobre todo que, la inmovilización del componente biológico sobre el transductor sea eficiente.

1.2.1 Componente biológico.

Desde que Clark y Lyon [2] introdujeron en 1962 el concepto de electrodo de enzima "soluble" En 1971 Updike y Hicks [3] construyeron un dispositivo de tipo amperométrico, basado en el trabajo de Clark y Lyon, para determinar glucosa, empleando la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en un gel. A partir de estos trabajos pioneros, las enzimas son los elementos de reconocimiento molecular más extensamente utilizados en la construcción de biosensores, debido a alta sensibilidad y selectividad que presentan.

En un principio las investigaciones se orientaron hacia la utilización de enzimas aisladas. Solo se trataba de seleccionar enzimas de alta actividad, estables durante periodos razonables, con buena selectividad, que pudieran ser utilizadas en medios compatibles con la muestra (pH, fuerza iónica, temperatura, etc.) y con el transductor apropiado. Y en esta dirección se han desarrollado la mayoría de esfuerzos. Desafortunadamente son muy pocas las enzimas que cumplen los requisitos anteriores [4].

1.2.2 Transductor.

Un transductor tiene como función transformar una respuesta fisicoquímica producida en el proceso de reconocimiento analito-receptor en una señal eléctrica. Cuando un analito interacciona específicamente con un receptor biológico hay un cambio en la interfase. Si dicho cambio es generado en la proximidad del

transductor podrá ser convertido por éste en una señal eléctrica cuantificable, previa su amplificación y procesamiento digital.

Los diferentes tipos de transductores se dividen en: electroquímico, óptico (por fibras), termistor y piezoeléctrico. Los transductores más empleados son los de tipo electroquímico, pues demuestran ser simples, sensibles, fiables y de respuesta rápida, además precisan de instrumentación de bajo costo.

Las técnicas instrumentales asociadas a los transductores de tipo electroquímico son: amperometría, potenciometría y la conductimetría [5].

1.2.3 Inmovilización del componente biológico.

Como se mencionó anteriormente, el buen funcionamiento de los biosensores depende en gran medida de la inmovilización del componente biológico sobre la superficie del transductor.

Cuando se inmoviliza el componente biológico sobre el transductor, el objetivo que se busca es la máxima proximidad entre estos dos componentes. Las técnicas de inmovilización para mantener en proximidad los dos componentes son abundantes; sin embargo, hay que tomar en cuenta que dependen del tipo de material biológico que se va a emplear (tabla 1.1)

La inmovilización de tipo químico, el inconveniente que presentan radica en el tiempo que se requiere para realizar la inmovilización, generalmente este oscila entre 3 y 4 horas. En cuanto a los procesos de tipo físico el principal problema es ocasionado por el material biológico, el cual generalmente es soluble en agua, con lo cual provoca que el tiempo de vida del biosensor sea de horas, ya que el material biológico difunde hacia la solución. En ambos procesos la inmovilización es de tipo superficial

Tabla 1.1 Fundamentos de las técnicas más empleada en la inmovilización del componente biológico.

TÉCNICAS.	FUNDAMENTO.
Químicos	
Entrecruzamiento químico	Se emplea un agente bifuncional (glutaraldehído) que provoca el entrecruzamiento entre éste y la proteína (lisina). Esta técnica es cara e ineficaz.
Enlace covalente	Se requiere un tratamiento previo del soporte, y esto trae consigo una pérdida en la actividad, sin embargo, la inmovilización es definitiva y por lo tanto existe una alta reproducibilidad.
Atrapamiento en una matriz polimérica	El componente biológico se inmoviliza a través de una oclusión en una matriz polimérica. Habitualmente se deposita el polímero sobre la superficie sensora conjuntamente con el material de reconocimiento molecular. Entre los polímeros más empleados se encuentran el PVC, poliacrilamida y poliestirenos.
Físicos	
Adsorción	Es la adsorción física sobre el transductor. Entre los adsorbentes más empleados se encuentran la arcilla, la albumina, el vidrio, la celulosa y el grafito. La desventaja que presenta es la pérdida continua de la especie adsorbida.
Retención a través de una membrana inerte	Se emplea una membrana de diálisis que permite la permeabilidad del sustrato y productos, pero es impermeable al material biológico, sin alterar a éste.

Una manera de solucionar los inconvenientes mencionados anteriormente es por medio de una inmovilización en volumen, que se logra mediante la formación de una matriz rígida. Ésta se encuentra compuesta por el componente biológico, el cual está inmerso en un **composite** rígido. A su vez este **composite** está constituido por una resina, la cual polimeriza, y polvo de grafito. La presencia de la resina proporciona rigidez al sistema, de tal forma que es posible ampliar el tiempo de vida útil y la integridad del biosensor, la función del polvo de grafito es ser el transductor, cuando se construyen biosensores de tipo electroquímico. Al **composite** se le adiciona el material biológico y se da lugar al **biocomposite**. Al realizar este tipo de inmovilización se logra mayor tiempo de vida del dispositivo, ya que el material biológico queda inmerso en el proceso de polimerización [5.6].

1.3 BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS.

Los biosensores electroquímicos son bastante sencillos por lo general. Entre estos biosensores se incluyen, los biosensores del tipo amperométrico que determinan las corrientes eléctricas asociadas con los electrones involucrados en

los procesos redox. Las reacciones redox catalizadas por enzimas forman la base de la mayoría de los biosensores, al determinar el flujo de electrones de la reacción redox. En condiciones normales, se aplica un voltaje constante entre dos electrodos y la corriente debida a la reacción de los electrodos se determina. En este principio se basa el primer y mas sencillo biosensor que se empleo para la determinación de glucosa [7].

Los biosensores basados en transductores amperométricos van asociados a enzimas oxidoreductasas. En el electrodo de Clark [2], el biocatalizador va acoplado sobre un electrodo de platino polarizado convenientemente para detectar el peróxido de hidrógeno o el cofactor NADH. Este tipo de biosensores presentan serias limitaciones, ya que la corriente o intensidad no depende solamente del sustrato, sino tambien, en el caso de las oxidasas, de la presión parcial de oxígeno. Los potenciales requeridos para reducir al oxígeno u oxidar al peróxido de hidrógeno o al NADH son bastante extremos, lo que conlleva a la posible interferencia de especies electroactivas

Una segunda generación de biosensores amperométricos radica en la incorporación de un mediador químico con propiedades redox que sustituye la función del oxígeno u oxida al NAD^+ , con la ventaja de que ahora el potencial de trabajo viene determinado por el mediador que, al estar escogido convenientemente, reduce significativamente el número de interferencias

Una tercera generación de biosensores amperométricos explora la transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo. Para que esto se lleve a cabo es necesario que la enzima se encuentre en contacto directo con el transductor, esto se consigue si se inmoviliza directamente la enzima sobre el transductor. Además de este requerimiento, es necesario que la cinética de la reacción enzimática sea rápida y finalmente que la transferencia de electrones entre el electrodo y la enzima también sea lo suficientemente rápida

1.4 BIOSENSORES BIENZIMÁTICOS.

Cuando no se dispone de una enzima adecuada, para la detección satisfactoria de un analito, el empleo de más enzimas que estén relacionadas y que siguen una secuencia determinada, pueden convertir un sustrato en un producto susceptible de ser detectado por el sensor interno del biosensor. La enzima adicional presente en una preparación bienzimática puede servir para eliminar interferencias o para amplificar la señal por ciclaje del sustrato [4]

Cuando se habla de dos enzimas inmovilizadas en el mismo composite, se dice que el funcionamiento de este biosensor es relativamente simple. Después de ser adicionado el sustrato específico para una de las enzimas, y se lleva a cabo la reacción enzimática, el producto de dicha reacción será el sustrato para la segunda enzima. Uno de los problemas que presentan los biosensores bienzimáticos es, la necesidad de que el tiempo que tarda en difundir hacia el seno de la solución el producto de la primera reacción enzimática sea mayor que el tiempo que necesita la segunda enzima para transformarlo. Aun así, el estudio de los biosensores bienzimáticos en los últimos años se ha incrementado, debido a la posibilidad de aumentar la sensibilidad cuando se emplea más de una enzima. Este incremento en la sensibilidad se ha asociado a una mayor eficiencia en las reacciones enzimáticas.

1.5 APLICACIONES.

Actualmente el campo de la aplicación para los biosensores, está principalmente enfocado al área clínica. Sin embargo existe un desplazamiento progresivo hacia la medicina veterinaria, industria biotecnológica y proceso de alimentos, seguimiento y control de parámetros ambientales y agricultura. Se supone que la utilización del biosensor en el campo de la defensa militar es importante aunque poco divulgado [5].

La cuantificación rápida y eficaz de la β -D-glucosa es de gran interés en diferentes áreas de investigación. El área de la biomedicina se ha enfocado al monitoreo de este hidrato de carbono presente en sangre sobre todo en situaciones críticas o de cuidados intensivos y durante procesos quirúrgicos. En la industria de los alimentos, crece el interés de los bromatólogos por conocer las cantidades de cada uno de los azúcares presentes en muchos de los productos de interés; sin embargo, hay que considerar que la composición de muchos alimentos es extremadamente compleja, por lo que se necesitan análisis más precisos [8].

Por ello el objetivo primordial de la presente investigación es la cuantificación de la β -D-glucosa empleando una técnica sencilla, rápida, económica y sobre todo confiable.

1.6 OBJETIVOS.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- ✓ Elaboración de un biosensor amperométrico bienzimático basado en un biocomposite de glucosa oxidasa-peroxidasa-grafito-epoxi
- ✓ Establecer las condiciones óptimas a las cuales se llevará a cabo la experimentación con los biosensores bienzimáticos
- ✓ Desarrollar una técnica sensible que permita la cuantificación de la β -D-glucosa en diferentes muestras comerciales
- ✓ Realizar una comparación entre la técnica analítica propuesta y una técnica tradicional establecida (espectrofotometría UV/Vis)

Capítulo II

2. ASPECTOS TEÓRICOS.

2.1 INTRODUCCIÓN.

Como se mencionó anteriormente, el presente trabajo tiene como finalidad la construcción de un biosensor de glucosa oxidasa-peroxidasa-grafito-resina, así como su evaluación en el laboratorio, y su posterior aplicación en muestras comerciales.

Para ello, primeramente se requiere comprender el funcionamiento general del biosensor bienzimático de glucosa oxidasa-peroxidasa, y algunos de los aspectos generales de las enzimas y sustrato; así como algunos fundamentos de la técnica a emplear.

2.2 FUNCIONAMIENTO GENERAL DEL BIOSENSOR DE GOD-HRP.

El biosensor bienzimático reportado por Jonsson-Pettersson [9] hace uso de las enzimas glucosa oxidasa (GOD) y peroxidasa de rábano (HRP) En este artículo inmovilizan químicamente las enzimas GOD y HRP sobre una barra de grafito ultrapuro empleando glutaraldehído y albumina de suero bovino. Como electrolito soporte utilizan una solución de fosfatos 0.1M a pH de 6.0 El tiempo de vida reportado para estos biosensores es de 40 días, posteriormente se pierde el 50% de la respuesta inicial

Con base en este artículo, se construirá un biosensor bienzimático utilizando una inmovilización en volumen, es decir empleando una resina a la cual se le incorpora el polvo de grafito y las enzimas GOD y HRP. Con este tipo de configuración se busca que el tiempo de vida de este biosensor sea mayor con respecto al reportado por Jonsson-Pettersson

El funcionamiento teórico de un biosensor amperométrico de GOD-HRP-grafito-resina de matriz rígida, se esquematiza en la figura 2.1.

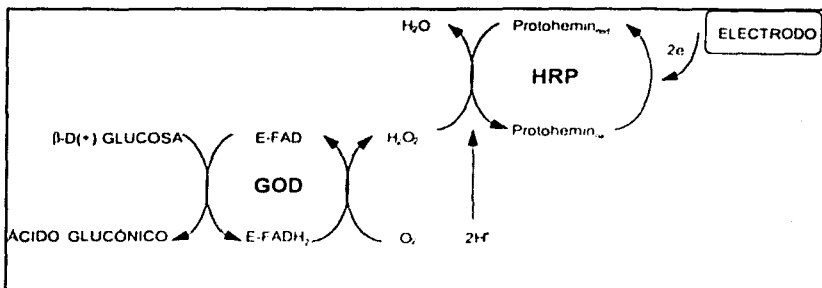


Figura 2.1 Funcionamiento teórico del biosensor bienzimático de GOD-HRP.

Después de ser adicionada la β -D-glucosa al medio de trabajo, la enzima glucosa oxidasa (GOD) reacciona, produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Posteriormente la enzima peroxidasa (HRP) transforma el peróxido de hidrógeno a agua y la enzima se oxida. Aplicando un potencial de -300 mV se regenera la enzima a su forma activa. En el presente estudio la señal analítica corresponde a la regeneración de la enzima HRP a su forma activa (reducida), la cual es directamente proporcional a la concentración de β -D-glucosa adicionada [5,10].

2.3 PROPIEDADES DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA.

La enzima glucosa oxidasa (GOD) se presenta en cristales blancos amorfos, con una actividad de 125 unidades/mg de proteína. Con un peso molecular de 150.000 Daltons. Posee un punto isoelectrico cercano a 4.2 [11].

2.3.1 Actividad enzimática

La enzima glucosa oxidasa cataliza la reacción entre la β -D-glucosa y el oxígeno molecular formando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, la enzima se obtiene 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 el grupo al que pertenece la enzima, en este caso a las oxidorreductasas, el segundo a la subclase de enzima, el tercero a la sub-subclase y el cuarto es para la enzima en específico. 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 de la enzima.

La estructura química de esta enzima es de carácter proteico globular, es decir, posee una estructura cuaternaria como se muestra en la figura 2.2. El sitio activo de la enzima corresponde al grupo flavin-adenin-dinucleotido en su forma oxidada (FAD).



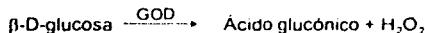
Figura 2.2 A la izquierda se muestra la estructura tridimensional de la glucosa oxidasa. A la derecha la estructura del sitio activo (FAD) [12]

2.3.3 Funcionamiento de la enzima.

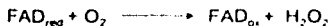
En presencia de la $\beta\text{-D-glucosa}$ que es el sustrato específico para la enzima GOD, el grupo FAD se reduce a FADH_2 , y por medio de el oxígeno se regenera el sitio activo a su forma original y así pueda transformar más $\beta\text{-D-glucosa}$. Esta

reacción es de tipo redox, produciéndose H_2O_2 . A continuación se muestran las reacciones químicas que se llevan a cabo.

Reacción global

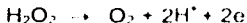


Reacciones parciales



La determinación de β -D-glucosa mediante biosensores de tipo amperométrico, es posible realizarla por tres caminos:

(a) El H_2O_2 producto de la reacción enzimática se cuantifica amperométricamente a través de su oxidación sobre la superficie del biosensor a un potencial anódico (E), el cual normalmente oscila entre 800 a 1200 mV vs Ag/AgCl [5]:



Existiendo una relación lineal entre la corriente producida y la concentración de β -D-glucosa, permitiendo así la determinación analítica de ésta

(b) Otra alternativa para la determinación de β -D-glucosa es seguir el decremento del oxígeno en el medio de disolución a medida en que se lleva a cabo la oxidación de la β -D-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, para llevar a cabo el seguimiento es necesario aplicar un potencial fijo catódico extremo (-700 mV vs Ag/AgCl) muro de reducción del agua

(c) Utilizar un electrodo selectivo a oxígeno, conocido como electrodo de Clark. Los inconvenientes de éste radican principalmente en la interferencia del oxígeno del medio ambiente.

(d) Emplear una segunda enzima cuyo sustrato sea el peróxido de hidrógeno formado en la reacción enzimática de β -D-glucosa con la GOD. Siendo este el objetivo de la presente tesis.

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 glucosa oxidasa presenta una especificidad absoluta pues tiene como único sustrato a la β -D-glucosa [11]; sin embargo, la presencia de otros reductores, como el ácido ascórbico, el glutatión o la catalasa pueden descomponer el peróxido de hidrógeno, interfiriendo en el análisis [8]

2.4 PROPIEDADES DE LA ENZIMA PEROXIDASA.

Las peroxidases son enzimas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno. La enzima peroxidasa del rábano picante (EC1.1.11.7) tiene un peso molecular de 40×10^3 g/mol. Es una proteína globular constituida de una cadena sencilla de polipéptidos, dos iones de Ca^{2+} y ocho cadenas de carbohidratos neutros [5]. Los potenciales redox medidos a pH = 7 en diferentes peroxidases están situados entre los -0.109 V de la obtenida del nabo y los -0.27V de la obtenida del rábano picante [8].

2.4.1 Estructura de la enzima.

La enzima peroxidasa de rábano (HRP) es una molécula que contiene ocho grupos de oligosacáridos situados en la superficie y unidos a residuos de asparragina a través de enlaces glicosilamina, y la estructura terciaria de esa proteína monomérica mantenida por cuatro puentes de disulfuro [8]. El bajo peso molecular de la proteína, aunado a su conformación estructural, da como resultado

que el sitio activo redox, es el complejo hierro-protoporfirina IX o también llamado "protohemin IX", no se ubique en el centro de la proteína, siendo posible entonces la transferencia electrónica entre el electrodo y el grupo protohemin IX sea rápida, en comparación a otras enzimas oxidasas, donde el sitio activo se localiza en el centro de la proteína. En la figura 2.4 se muestra la estructura de HRP así como del sitio activo.

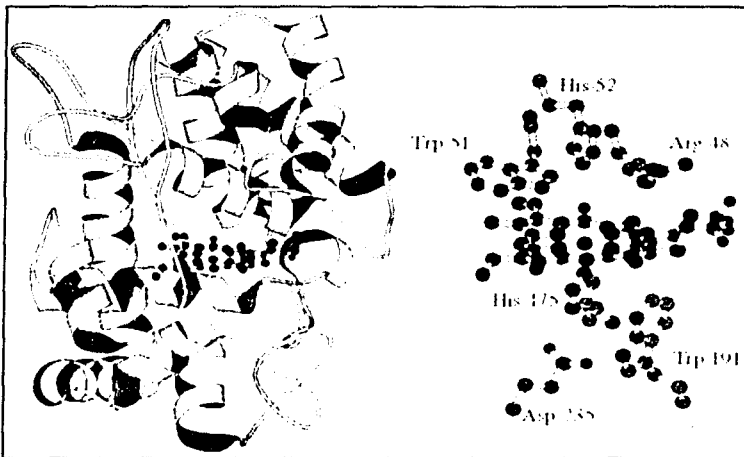


Figura 2.4 A la izquierda se muestra la estructura tridimensional de la enzima HRP, y a la derecha la estructura orgánica de el sitio activo PROTOHEMIN IX [13]

2.4.2 Funcionamiento de la enzima.

En presencia del peróxido de hidrógeno el sitio activo de la enzima HRP (protohemin IX) se oxida y el sustrato se reduce a agua. Posteriormente, aplicando un potencial adecuado el grupo protohemin IX se regenera a su forma activa (reducido). En la naturaleza la regeneración de la enzima a su forma activa, reducida, es mediante el fenol o fenoles sustituidos (4-clorofenol, 2,4 diclorofenol,

pirocatecol, 2-cresol, 2-toluidina) [13]. En la figura 2.5 se esquematiza el funcionamiento de la enzima HRP.

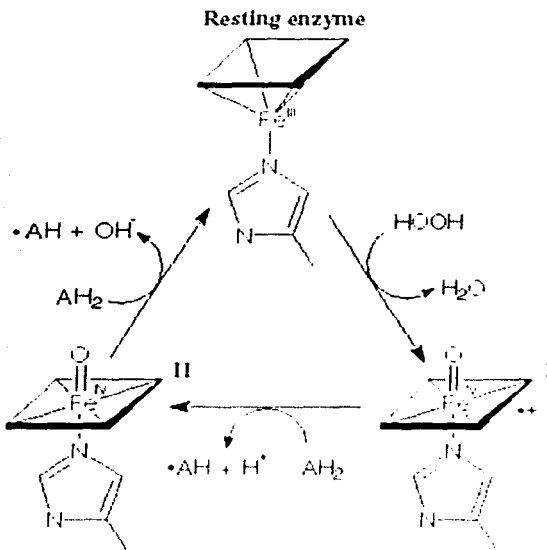
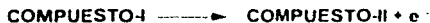


Figura 2.5 Funcionamiento de la enzima peroxidasa de rábano en la naturaleza. AH_2 representa al fenol o fenoles sustituidos [13]

En la reacción enzimática entre la HRP y el peróxido de hidrógeno se transfieren dos electrones. Dicha transferencia ocurre en dos pasos consecutivos. El primero involucra la reducción del peróxido de hidrógeno a agua con la formación del compuesto-I [13]



el compuesto-I cede un electrón para dar lugar al compuesto-II



y finalmente, a partir del compuesto II se obtiene la HRP oxidada. En esta reacción se transfiere el segundo electrón.



El compuesto I y II son intermediarios inestables de la reacción redox. Se sabe que el hierro del grupo protohemin IX en el compuesto II tiene una valencia de 4⁺ [14].

2.5 PROPIEDADES DE LA β-D-GLUCOSA.

La β-D-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 [15] Su estructura se muestra en la figura 2.6.

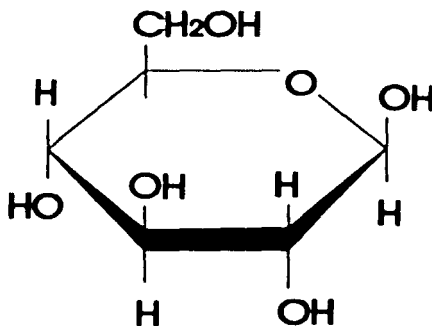


Figura 2.6 Proyección de Hawort de la β-D-glucosa [11].

2.6 AMPEROMETRÍA

La amperometría es propiamente la medición de la corriente eléctrica generada por un proceso de excitación-respuesta, esta respuesta (i) está en función de la concentración de la solución estándar, para llevar a cabo esta determinación es necesario aplicar un potencial fijo (E). La amperometría es muy sensible y puede emplearse para detectar respuestas a concentraciones de 10^{-5} M o menores. La corriente está gobernada por las velocidades de los procesos, tales como la transferencia de masa del oxidante desde el seno de la solución a la superficie del electrodo y la transferencia de electrones en la superficie del electrodo [11].

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 muy 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, percibe el potencial del electrodo de trabajo puesto que el potencial del de referencia es constante). El par de electrodos referencia-trabajo se conecta a través de un circuito por el cual no circula ninguna corriente, la impedancia de entrada es superior a $10^{11} \Omega$. 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 [11].

Capítulo III

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 INTRODUCCIÓN.

Para desarrollar una técnica analítica con los biosensores amperométricos bienzimáticos de GOD-HRP, es primordial elegir el potencial al cual se van a realizar las mediciones de intensidad correspondientes a las concentraciones de β -D-glucosa estándar, y principalmente tener bien establecidas las condiciones óptimas para la experimentación (como son: concentración de el electrolito soporte, pH, temperatura de experimentación, concentración del sustrato, etc.)

En este capítulo se presentan los materiales, equipos y sustancias a emplear, así como, una breve explicación de las condiciones generales que permitieron la construcción de los biosensores bienzimáticos de GOD-HRP, y su evaluación, para posteriormente aplicarlos en muestras comerciales.

3.2 MATERIALES.

REACTIVOS.

- Enzima Glucosa Oxidasa. Worthington biochemical corporation, con número de lote: 57A847, 125u/mg de proteína.
- Enzima Peroxidasa de rábano Worthington biochemical corporation con número de referencia: 56P741, 667u/mg de proteína.
- Polvo de grafito, Aldrich Chemical Tamaño de partícula entre 0.5 a 1.2 micras
- Resina EpoTek H77 (parte A monómero, parte B endurecedor)
- β -D-Glucosa Merck
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4). Merck
- Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) Baker.
- Cloruro de sodio (NaCl) Monterrey.

EQUIPO.

- Balanza analítica. Mettler Toledo AB204.
- pH-metro. Mettler Delta 340.
- Agitador magnético.
- Unidad amperométrica Bass LC-4C.
- Electrodo de Ag/AgCl. Radiometer.
- Electrodo de platino.
- Biosensores de GOD-HRP.

MATERIAL DE VIDRIO.

- Celda electroquímica de tres electrodos.
- Vasos de precipitados.
- Matraces Volumétricos
- Pipetas Volumétricas
- Micropipeta.

3.3 CONSTRUCCIÓN DE LOS BIOSENSORES.

En un biosensor de matriz rígida el componente biológico (en este caso las enzimas GOD y HRP), se encuentran inmersas en un composite (es la unión del transductor y el aglomerante), que en este caso son el polvo de grafito y la resina epóxica respectivamente. Estos proporcionan la suficiente rigidez (al terminar el proceso de curado) permitiendo ampliar el tiempo de vida útil y la integridad del biosensor, ya que la enzima queda atrapada en el proceso de polimerización.

Los biosensores están constituidos principalmente de dos partes fundamentales: a) el cuerpo y b) el biocomposite.

Al cuerpo del biosensor, que está conformado por un tubo cilíndrico de PVC de 6 mm de diámetro interno y 18 mm de longitud, se le introduce una conexión tipo macho, a la que previamente se le ha soldado un disco de cobre de 2 mm de diámetro, quedando en el extremo opuesto una cavidad de 3 mm de profundidad.

(Ver figura 3.1). En la cavidad del cuerpo se introduce el biocomposite (composite más las enzimas GOD y HRP) presionando para no dejar aire en su interior.

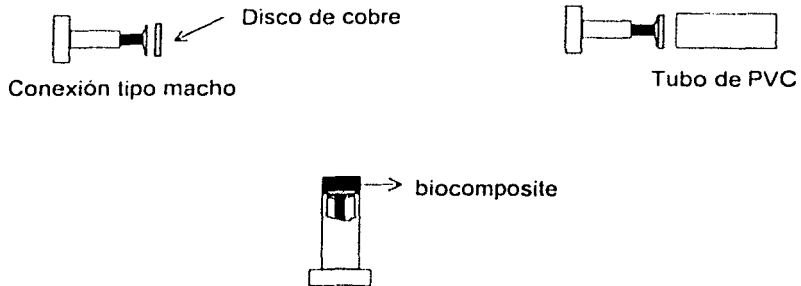


Figura 3.1 Esquematización de la construcción del biosensor.

Finalmente se introducen los biosensores a la estufa con una temperatura aproximada de 40 °C durante 5 días, tiempo en el cual se da el proceso de curado. A continuación se procede a pulir la superficie del biosensor de matriz rígida con papel de lija del número 500 hasta obtener una superficie especular.

3.3.1 Preparación del biocomposite.

El composite conductor se encuentra integrado en su misma fase el material conductor (polvo de grafito), y el soporte (el aglomerante empleado fue la resina comercial Epotek H77), posteriormente se le adiciona el material biológico (las enzimas HRP y GOD) para dar lugar al **biocomposite**. El cual presenta una superficie formada por granos conductores (grafito), rodeadas de zonas aislantes (polimero) y el material biológico se encuentra ocluido entre estos. A continuación se describe la preparación del biocomposite

- 1) 281.8 mg de resina epóxica (parte A) se mezclan con 42.3 mg de un agente endurecedor (parte B).

- 2) Posteriormente se adiciona a la pasta anterior 75.9 mg de polvo de grafito, y se mezcla perfectamente la pasta. A esto se le conoce como composite.
- 3) Una vez uniforme la pasta, se le integrara el componente biológico (las enzimas HRP y GOD), mezclando hasta homogeneizar perfectamente. El contenido de las enzimas que se les ha adicionado a cada biosensor se encuentra descrito en la tabla 3.1, así como la etiqueta que se les ha designado.

Tabla 3.1 Contenido de enzima adicionada a cada uno de los biosensores elaborados, y la etiqueta que se les ha designado.

BIOSENSORES	Contenido de GOD (mg).	% de GOD.	Contenido de HRP (mg).	% de HRP.
R1	6	1.5	4	1.0
R2	6	1.5	4	1.0
N1	2	0.5	2	0.5
N2	2	0.5	2	0.5

3.4 CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXPERIMENTACIÓN.

3.4.1 pH de trabajo.

La mayoría de las enzimas se ven afectadas en su actividad con las variaciones de pH en el medio. Cuando el medio se torna muy ácido o básico afectan los enlaces iónicos que contribuyen a las estructuras terciaria y cuaternaria, con lo que se altera la conformación de la proteína y su actividad catalítica de los grupos que forman el centro activo, modificando su capacidad de unión con el sustrato. Muchas enzimas se desactivan, y por lo común se desnaturalizan de manera irreversible [11,16].

Por esta razón es importante conocer el pH al cual la enzima presenta su máxima actividad, siendo uno de los factores a controlar en una experimentación. La mayoría de las enzimas presentan la mayor actividad enzimática en un intervalo de pH entre 5 y 8; sin embargo, cada enzima tiene un pH óptimo dependiendo de su naturaleza. La enzima glucosa oxidasa presenta un pH óptimo reportado de 5.6, y la peroxidasa de rábano presenta un pH óptimo de 6.0 [17].

Para el trabajo de experimentación no solo se tomó en cuenta los pH de las enzimas, sino también las condiciones que favorecen a la resina que forma parte del composite. Estudios anteriores [5] indican que a pH inferiores de 6.0 y superiores de 8.0 se lamina la resina Epotek H77, es decir, se forman escamas en la superficie que se encuentra en contacto con el medio. Tomando en consideración lo anterior, se decidió que el pH del electrolito soporte sea de 6.0.

3.4.2 Concentración del electrolito soporte.

Como se mencionó anteriormente, el pH es un factor relevante en la actividad enzimática; sin embargo, el pH óptimo de trabajo también depende de la naturaleza y de la fuerza iónica del buffer [18]. Por ello, la selección del buffer depende del pH óptimo al que se va a trabajar, que en nuestro caso es un pH de 6.0.

El electrolito soporte es de gran importancia para los estudios realizados con biosensores, ya que se encontrará en contacto con la superficie del biosensor durante todo el proceso de análisis, y por lo tanto debe de garantizar la estabilidad de los componentes del biocomposite (esencialmente las enzimas presentes), y facilitando la señal analítica. En la bibliografía se reporta [17,19-20] que el buffer de fosfatos es ideal para trabajar con enzimas, ya que es inerte a estas sustancias, y que a una concentración entre 0.03 y 0.25M no se ven afectadas las enzimas (tanto GOD como HRP), sin embargo, en la mayoría de los estudios relacionados con enzimas y biosensores [5,11,18] reportan el uso de buffer de fosfatos 0.1M, con una concentración de cloruro de sodio o potasio entre 0.5 a 0.1M. Por ello, se decidió emplear como electrolito soporte una solución de fosfatos 0.1M. Con esta concentración se asegura un buen amortiguamiento en el pH. Además se adiciona NaCl de 0.1M con la finalidad de disminuir la resistencia del medio [11]. La preparación del buffer de fosfatos 0.1M en NaCl 0.1M a pH de 6.0, se realizó como se indica en el anexo A-8 1 1

3.4.3 Determinación del potencial de trabajo.

Los biosensores estudiados en el presente proyecto son del tipo amperométrico, esto significa, que para su funcionamiento es necesario aplicar un potencial adecuado al cual se medirá la corriente generada. A un potencial óptimo, la señal obtenida empleando la enzima peroxidasa (HRP), después de adicionado el sustrato, es asociada a la regeneración de la enzima a su forma activa, es decir reducida [5].

Por lo anterior, es importante conocer para cada tipo de enzima, el potencial al cual se pueda seguir adecuadamente la señal analítica. Para determinar el potencial de trabajo se emplean técnicas electroquímicas, como son la voltamperometría cíclica y lineal. Esta técnica se utiliza principalmente para caracterizar las propiedades redox de los compuestos, y para estudiar los mecanismos de las reacciones redox. A continuación se muestra el voltamperograma cíclico que se realizó para un biosensor de HRP.

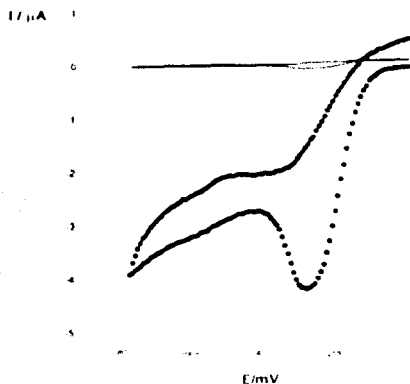


Figura 3.2 Voltamperometría cíclica para la peroxidasa (HRP) Se empleó como electrolito soporte: buffer de fosfatos 0.1M con NaCl 0.1M a pH de 6.0 (línea continua). Los símbolos corresponden al biosensor

Como puede observarse, en la parte superior del gráfico no presenta ningún pico de reducción en el intervalo de potenciales de 0 a -800mV , y tan solo se encuentra una línea continua horizontal, ésta experimentación se realizó con un sensor de grafito-epoxy (sin enzima); y el pico que se observa está ubicado en un potencial de -301.5 mV vs Ag/AgCl , éste se realizó con un biosensor HRP corresponde a la enzima peroxidasa. Por lo tanto las amperometrias se realizarán a un potencial de reducción de -300mV

3.4.4 Determinación de la temperatura de trabajo.

La velocidad de reacción de las enzimas se ve incrementada con la temperatura, pero sólo en el intervalo en que la enzima es estable y retiene su capacidad catalítica; en casos extremos cuando se incrementa en exceso la temperatura, se favorece la desnaturalización de la enzima y consecuentemente esta enzima pierde su capacidad catalizadora. Por ello cada enzima tiene un intervalo óptimo de temperatura en el cual se logra la mayor actividad. La mayoría de las enzimas tienen un intervalo óptimo de temperatura entre 30 y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se inactivan a más de $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ [15]

Tomando en consideración que tenemos que conocer la temperatura a la cual la actividad de las enzimas presentes en los biosensores de matriz rígida sea mayor, se procedió a realizar curvas de calibración por triplicado, las cuales se construyeron haciendo adiciones continuas de 0.2 mL de glucosa estándar a un sistema de 25 mL de buffer a un potencial constante de -300 mV para las dos series de biosensores GOD-HRP construidos, cambiando la temperatura del buffer de fosfatos desde $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $44\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se gráfica para obtener la pendiente de cada curva de calibración a las diferentes temperaturas trabajadas, los resultados obtenidos se muestra en la figura 3.3.

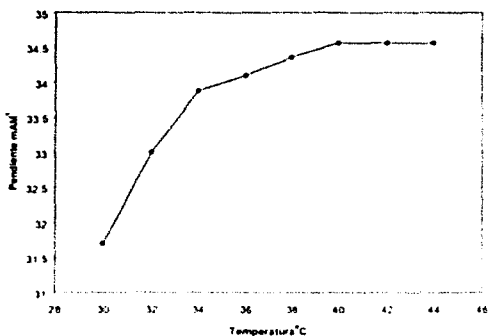


Figura 3.3. Variación de la pendiente por efecto de las temperaturas obtenidas para el biosensor bienzimático de (HRP-GOD). Se empleó como electrolito soporte buffer de fosfatos 0.1M con NaCl 0.1M a pH de 6.0

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 3.3 se llega a la conclusión que a partir de 40°C no existe variación de la sensibilidad con la temperatura, además de que se obtiene el valor más alto. Por lo cual todos los experimentos se llevarán a cabo a una temperatura de 42°C

3.5 RESUMEN DE LA EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO PARA EL BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO DE GOD-HRP.

Las condiciones óptimas de experimentación, obtenidas de la investigación descrita anteriormente, se resumen en la tabla 3.2

Tabla 3.2 Condiciones experimentales de trabajo para el biosensor amperométrico de GOD-HRP

CONDICIONES.	VALOR.
Electrolito soporte	Buffer de fosfatos 0.1M, con NaCl 0.1 M
pH	6.0
Potencial	-300 mV
Temperatura.	42°C

3.6 CARACTERIZACIÓN DEL BIOSENSOR.

3.6.1 Intervalo de linealidad.

Al evaluar la linealidad se demuestra la capacidad del sistema para asegurar que la respuesta analítica es proporcional a la concentración del analito en estudio dentro de un intervalo determinado de concentraciones.

El estudio de linealidad para las dos series de biosensores construidos se llevan a cabo por el método de adiciones continuas. En 25 mL de electrolito soporte con agitación constante y moderada, se sumergen los tres electrodos: referencia (Ag/AgCl), auxiliar (platino) y el biosensor (GOD-HRP), a continuación se le aplica un potencial fijo de -300mV empleando una unidad amperométrica. Una vez que se obtiene una señal estable que se utilizara como línea base, se realizan adiciones de 0.2 mL de β -D-glucosa estándar 0.1M, cada 30 segundos, registrando cada uno de los valores de corriente medida después de cada adición, hasta que el sistema se sature y la lectura que registre el amperímetro no se modifique. Antes de emplear el biosensor se limpia la superficie con un papel de lija del No. 500 humedecido. Todos los experimentos se efectúan a las condiciones óptimas mostradas en la tabla 3.2

La representación gráfica por triplicado entre la corriente obtenida y los valores de concentración de β -D-glucosa adicionados, para cada uno de los biosensores, nos dará el intervalo de linealidad del sistema. Los parámetros estadísticos que se tomaron en consideración fueron: pendiente, intercepto, coeficiente de correlación y un análisis de varianza para la regresión lineal simple (ANADEVA), que se llevo a cabo como lo indica en anexo A-9.2.1, y en el cual se planteo como hipótesis nula la falta de relación lineal entre la concentración de β -D-glucosa y la intensidad obtenida. El límite superior y el límite inferior de la respuesta lineal se determinan gráficamente. La sensibilidad corresponde a la pendiente de la curva de calibración.

3.6.2 Reproducibilidad.

La reproducibilidad es el grado de concordancia entre determinaciones repetidas cuando se han introducido variaciones en las condiciones de trabajo. De esta manera se puede evaluar la reproducibilidad entre analistas, equipo, laboratorios, días, etc.

En el presente estudio el interés fundamental es evaluar la señal de las dos series de biosensores durante el tiempo de experimentación. La evaluación de la reproducibilidad de la señal analítica se dividió en 3 categorías.

- a) la superficie de los cuatro biosensores
- b) el tiempo de experimentación (en días y meses)
- c) la construcción de los biosensores.

Al evaluar la reproducibilidad de la superficie de los biosensores se procedió primeramente a realizar curvas de calibración por triplicado puliendo la superficie del biosensor con papel de lija del No. 500, posteriormente se realizaron por triplicado nuevas curvas de calibración para el mismo biosensor pero esta vez no se pulió la superficie, solamente se limpio la superficie lavándola con agua destilada. Este estudio se realizó para cada uno de los biosensores construidos (R1, R2, N1 y N2).

La reproducibilidad entre el tiempo de trabajo (días y meses) se obtuvo realizando las curvas de calibración por triplicado para los cuatro biosensores durante los tres meses que duro la experimentacion (tiempo de uso de los biosensores). En el caso de la reproducibilidad de la construcción de los biosensores, se pretende comparar las intensidades registradas entre el biosensor R1 con la señal del biosensor R2, que tienen el mismo contenido de enzima, pero fueron construidos por separado. Se realiza el mismo tratamiento para los biosensores de la serie "N"

Experimentalmente se siguió el mismo procedimiento con el cual se elaboraron las curvas de calibración para la linealidad del sistema. Los parámetros estadísticos que se tomaron en consideración fueron análisis de varianza bifactorial (ANADEVA) entre superficie de los biosensores y las dos series de

biosensores, análisis de varianza bifactorial (ANADEVA) entre los meses de experimentación y las dos series de biosensores.

Las ANADEVAS bifactoriales se construyeron como se indica en el anexo A-8.2.2 Además de las representaciones gráficas entre la corriente medida y el tiempo en días con límites de confianza del 99%, se presenta un diagrama de barras que muestra el comportamiento de las pendientes de las curvas de calibración para los cuatro biosensores durante los tres meses de experimentación

3.6.3 Estudio de interferencias.

El estudio de las especies interferentes esta en función de la naturaleza de las enzimas presentes en el biosensor y de la aplicación que se le de a éste. Para el estudio de interferencias es necesario definir perfectamente el tipo de muestra en las cual se desea emplear el biosensor, y los componentes presentes en la formulación. En nuestro caso, se ha decidido emplear sueros orales e intravenosos que contienen principalmente β -D-glucosa, cloruro de sodio y potasio y, en algunos casos, citratos como lo muestra la tabla 3.3

Tabla 3.3 Información del contenido de sustancias reportadas en los marbetes de los diferentes sueros glucosados que se van a emplear en la aplicación de los biosensores de GOD-HRP

SUEROS	Contenido de β -D glucosa (gramos)	Contenido de NaCl (gramos)	Contenido de KCl (gramos)	Contenido de citrato de sodio (gramos)	Agua Cbp (mL)
Suero "vida oral"	20	3.5	1.5	2.9	1000
Pedialyte	2	0.35	0.15	0.29	100
Dextrabott 5%	5	.	.	.	100
Dextrabott 5% soln salina isot	5	0.9	.	.	100
Electrolit	5	0.35	0.15	0.29	100

*Estas sustancias no se encuentran presentes en el suero

Con el fin de establecer si el citrato de sodio es una sustancia interferente se elaboraron placebos cargados. Para lo cual se preparó una solución que contenga β -D-glucosa estándar 0.1M y citrato de sodio dihidratado 8.9×10^{-3} M (que es la concentración de citratos que corresponde al contenido en la muestra de sueros). Para asegurar que una concentración mayor no interfiera se elaboró un segundo placebo cargado con una concentración de citratos 1.3×10^{-2} M e igual concentración de β -D-glucosa (tabla 3.4)

Tabla 3.4 Contenido de estándares para la preparación de placebos cargados que se emplearán en el estudio de interferencias. En todos los casos los sistemas se llevaron a un volumen de aforo de 50 mL con solución buffer.

	β -D-GLUCOSA ESTÁNDAR.	CITRATO DE SODIO.
Placebo cargado A.	900.8 mg	132.2 mg
Placebo cargado B.	900.8 mg	198.3 mg

Posteriormente se realizaron curvas de calibración por triplicado, para cada uno de los biosensores, y se realizó adicionando 0.2 mL de placebo cargado, cada 30 segundos y registrando la intensidad obtenida. La experimentación se realizó a las condiciones experimentales óptimas.

Capítulo IV

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

4.1 LINEALIDAD.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de trabajo (resumidas en la tabla 3.2), se procedió a elaborar las curvas de calibración por triplicado para cada biosensor, puliendo la superficie de cada biosensor antes de cada curva. Al graficar los valores obtenidos de intensidad (μA) en función de la concentración de $\beta\text{-D-glucosa}$ estándar (Molar). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.1.

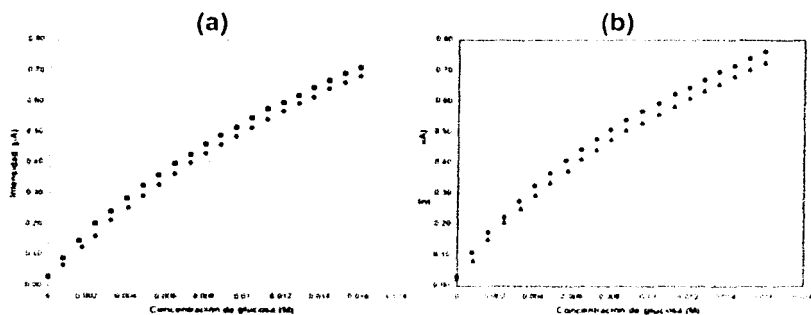


Figura 4.1 Respuesta promedio para los biosensores GOD-HRP, puliendo la superficie de los biosensores (a) curvas de calibración para el biosensor con 1.5% de GOD y 1.0% de HRP \blacklozenge biosensor R1 y \blacksquare biosensor R2 (b) curvas de calibración para el biosensor con 0.5% de GOD y 0.5% de HRP \blacktriangle biosensor N1 y \bullet biosensor N2

Como puede observarse no existe un comportamiento lineal en todo el intervalo de concentración de $\beta\text{-D-glucosa}$ en el cual se llevó a cabo el estudio. Sin embargo, se observa que en los gráficos anteriores existe un segmento en los cuales se vuelve lineal el comportamiento de las curvas. Por lo que al limitar el intervalo de concentración de $\beta\text{-D-glucosa}$ de 5.6×10^{-3} a 16×10^{-3} M, se obtienen los gráficos que a continuación se muestran en la figura 4.2.

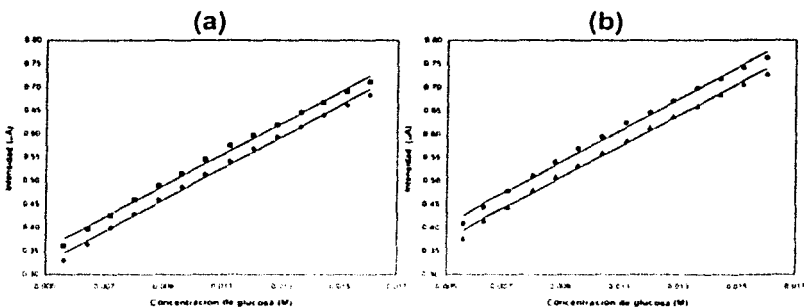


Figura 4.2 Curvas de calibración realizadas para los biosensores GOD-HRP, en un intervalo de concentración de β -D-glucosa de 0.0056 a 0.016M, puliendo la superficie de los biosensores. (a) curvas de calibración para el biosensor con 1.5% de GOD y 1.0% de HRP. \blacklozenge biosensor R1 y \blacksquare biosensor R2 (b) curvas de calibración para el biosensor con 0.5% de GOD y 0.5% de HRP \blacktriangle biosensor N1 y \bullet biosensor N2

En ambos gráficos se aprecia que existe una relación lineal entre la corriente y la concentración de β -D-glucosa estándar. A partir de estas curvas se determina que el intervalo de linealidad se ubica entre 0.0056M el límite inferior y 0.016M el límite superior, y la sensibilidad de la respuesta obtenida (la pendiente de la curva de calibración) se encuentra entre 33.2304 y 33.7277 $\mu\text{A M}^{-1}$.

Al someter los valores de las curvas de calibración a una regresión lineal se obtuvieron los parámetros estadísticos que se muestran en la tabla 4.1

Tabla 4.1 Parámetros estadísticos de la curva estándar de calibración para cada uno de los biosensores de GOD-HRP. Con un contenido de enzima de 1.5% GOD y 1.0% HRP, para la serie "R" y 0.5% GOD y 0.5% HRP, para la serie "N"

BIOSENSORES	R1	R2	N1	N2
Pendiente ($\mu\text{A M}^{-1}$)	33.7277	33.4561	33.2304	33.6008
Intercepto (μA)	0.1565	0.1891	0.2078	0.2374
Coef. Correlación. (R^2)	0.9976	0.9974	0.9975	0.9970

Los coeficientes de correlación (R^2) calculados para los diferentes biosensores van de 0.9970 a 0.9976; lo cual indica que aproximadamente el 99.7% de la variación total en las intensidades experimentales es explicada por la ecuación de la regresión lineal obtenida.

Para poder corroborar estadísticamente el comportamiento lineal que siguen las curvas en el intervalo de linealidad establecido, se decidió someter los valores experimentales a un análisis de varianza para la regresión lineal simple (ANADEVA) para cada uno de los biosensores, y verificar si el 0.3% de la variación total que no es explicada por la ecuación de la regresión lineal, es significativa. En la tabla 4.2 se resumen los resultados obtenidos mediante la construcción de las ANADEVAS, para las dos series de biosensores construidos.

Tabla 4.2 Resumen de las ANADEVAS para la regresión lineal simple, realizadas para cada uno de los biosensores de GOD-HRP. Las curvas de calibración se construyeron a las condiciones experimentales establecidas

BIOSENSORES	F _{CALCULADA}	F _{99TABLAS}
R1	2484.3917	9.33
R2	2315.9693	
N1	2360.2426	
N2	2011.7470	

Como puede observarse el valor obtenido de tablas al 99% de confianza es mucho menor que los valores calculados, por lo que, en todos los casos se rechaza la hipótesis nula (ver anexo A-9.2.1) y, por lo tanto, se concluye que estadísticamente las dos variables (concentración de β -D-glucosa estándar e intensidad) están relacionadas linealmente en el intervalo de linealidad seleccionado, con una confiabilidad del 99%. Así mismo, con esta prueba se verifica que el 0.3% de la variación total no explicada por la ecuación obtenida, no es significativa; por lo que es aceptable la ecuación de la regresión lineal obtenida, pues demuestra que existe proximidad del ajuste de la ecuación de regresión lineal a los valores de intensidad obtenidos experimentalmente.

4.2 REPRODUCIBILIDAD.

El estudio de reproducibilidad de la señal del biosensor, se realizó construyendo curvas de calibración por triplicado, puliendo y sin pulir la superficie de dichos biosensores, para cada una de las series construidas, en el intervalo de linealidad seleccionado y con las condiciones experimentales establecidas (ver tabla 3.2). Los gráficos obtenidos experimentalmente, se promedian y se resumen en la figura 4.3.

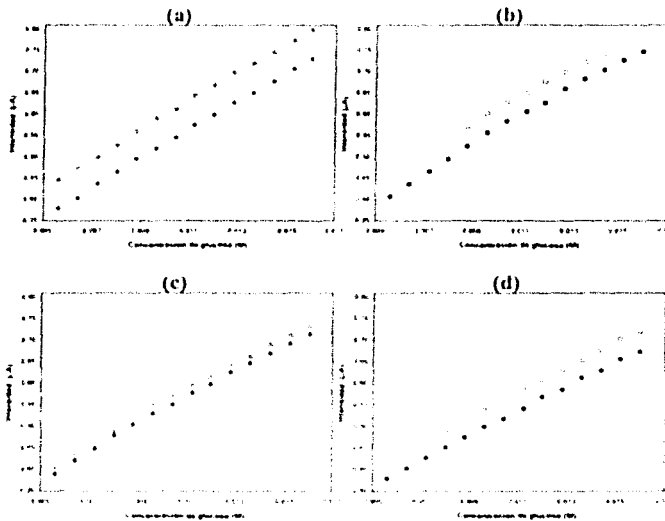


Figura 4.3 Curvas de calibración promedio en un intervalo de concentración de β -D-glucosa de 0.0056 a 0.016M, realizadas para la reproducibilidad de la señal (a) Biosensor R1: ◆ puliendo la superficie y △ sin pulir la superficie (b) Biosensor R2: ■ puliendo la superficie y ○ sin pulir la superficie (c) Biosensor N1 ▲ puliendo la superficie y △ sin pulir la superficie (d) Biosensor N2 ● puliendo la superficie y ○ sin pulir la superficie

Al hacer la comparación entre las curvas obtenidas puliendo y sin pulir la superficie del biosensor, pueden ser diferenciadas una de la otra en forma visual.

Sin embargo, ambas curvas son paralelas entre si y sus pendientes son muy similares, además de tener un coeficiente de variación menor al 2%, como lo muestra la tabla 4.3.

Tabla 4.3 Pendientes promedio (μAM^{-1}) obtenidas de las curvas de calibración empleando las dos series de biosensores GOD-HRP. Con un contenido de enzima de 1.5% GOD y 1.0% HRP, para la serie "R" y 0.5% GOD y 0.5% HRP, para la serie "N"

BIOSENSORES	R1	R2	N1	N2
PULIENDO	33.747	32.963	30.955	30.815
SIN PULIR	34.422	33.766	31.59	31.579
Coef. de variación (%)	1.40	1.70	1.43	1.73

A partir de la información de la tabla 4.3 se procedió a realizar la prueba estadística de ANADEVa bifactorial, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4 ANADEVa bifactorial para las pendientes obtenidas de las curvas de calibración realizadas para cada uno de los biosensores de GOD-HRP

F.V	G.L	S.C	M.C	F _{CALCULADA}	F _{99TABLAS}
Superficie	1	1.378	1.378	0.8850	11.26
Biosensor	3	2.839	2.839	0.6080	7.59
Superficie-biosensor	3	3.919	3.919	0.8393	7.59
Error	8	12.452	12.452		

*F.V= factor variable, G.L= grados de libertad, S.C= suma de cuadrados, M.C= cuadrado medio

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza bifactorial reportados en la tabla 4.4, la F tablas es mayor que la F calculada por lo que se acepta la hipótesis nula (ver anexo A-8.2.2) demostrando que no existen diferencias estadísticas entre las pendientes de las dos series de biosensores construidos y sus superficies (pulidas y sin pulir). Sin embargo, al ser paralelas las curvas de calibración, sus intensidades muestran cierta diferencia una de la otra. Para corroborar que esta diferencia es despreciable se procedió a efectuar una

ANADEVA para las diferentes intensidades obtenidas a una concentración de β -D-glucosa de 0.0104M en el sistema.

Tabla 4.5 ANADEVA bifactorial para las intensidades obtenidas a una concentración de β -D-glucosa de 0.0104M en el sistema, para los cuatro biosensores de GOD-HRP construidos

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F.CALCULADA	F.TABLAS 99
Superficie.	1	0.003	0.0029	0.145	11.26
Biosensor.	3	0.102	0.0338	1.711	7.59
Superficie-biosensor.	3	0.062	0.0208	1.052	7.59
Error	8	0.158	0.0198		

*F.V= factor variable, G.L= grados de libertad, S.C= suma de cuadrados, M.C= cuadrado medio

De acuerdo a los resultados reportados en la tabla 4.5, los valores de las F calculadas que se obtuvieron son menores a las reportadas en tablas, por lo que se determina, con una confianza del 99%, que estadísticamente no hay diferencias entre las intensidades reportadas a una concentración de glucosa fija obtenidas con los 4 biosensores construidos (R1, R2, N1 y N2). Por lo tanto, se asume que la respuesta del biosensor es independiente de la superficie con la que se trabaje, es decir, que sin importar si se pule la superficie o si no se pule la superficie del biosensor los datos obtenidos de intensidad tendrán una desviación tan pequeña que se pueden considerar que son reproducibles. La información anterior nos lleva a concluir que existe reproducibilidad en la señal obtenida experimentalmente, independientemente del biosensor con el que se trabaje o de la superficie que se maneje.

Las dos series de biosensores elaborados con diferente contenido de enzima (1.5% de GOD y 1.0% de HRP para la serie "R" y, 0.5% de GOD y 0.5% de HRP para la serie "N"), se emplearon continuamente por un periodo de 3 meses, realizándose hasta 14 curvas de calibración por sesión. El estudio de tiempo de uso de los biosensores, que se obtuvo al graficar la intensidad promedio, a una concentración de glucosa fija y, el tiempo de experimentación se muestran en la figura 4.4

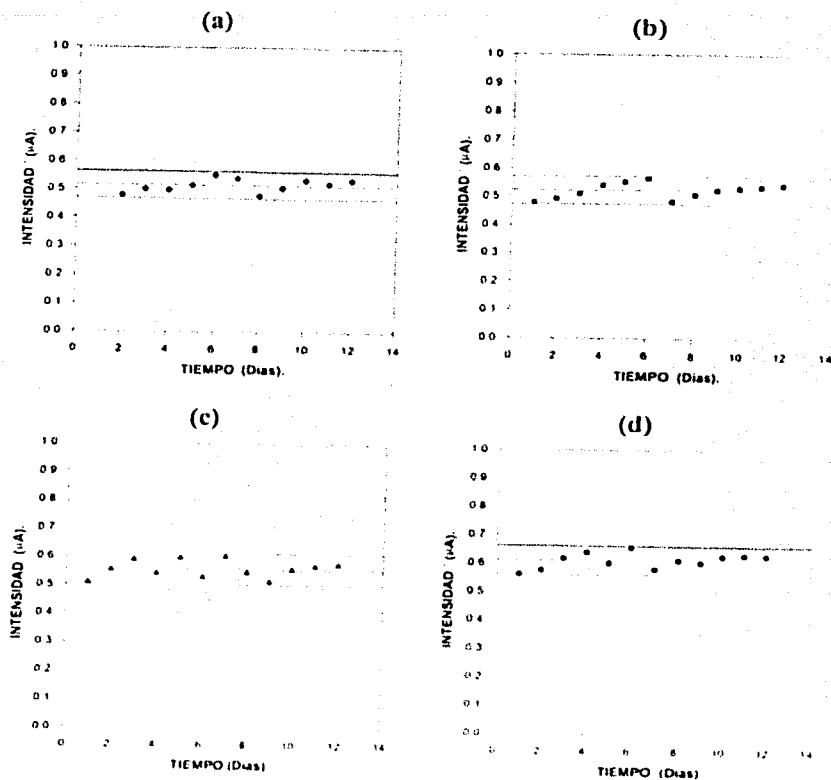


Figura 4.4 Tiempo de respuesta de los biosensores GOD-HRP. Las intensidades fueron obtenidas a una concentración fija de glucosa de 0.0104M en el sistema y, se pulió la superficie de los biosensores (a) ◆ Biosensor R1, (b) ■ Biosensor R2, (c) ▲ Biosensor N1 y (d) ● Biosensor N2. Las líneas continuas representan los límites de confianza al 99%, y la línea discontinua es el valor medio

Como puede observarse las intensidades promedio registradas difieren ligeramente de el valor medio, sin embargo, estos valores se encuentran dentro de

los intervalos de confianza al 99%. Con respecto a las pendientes promedio obtenidas por mes, presentan una ligera variación entre ellas, como lo muestra la figura 4.5.

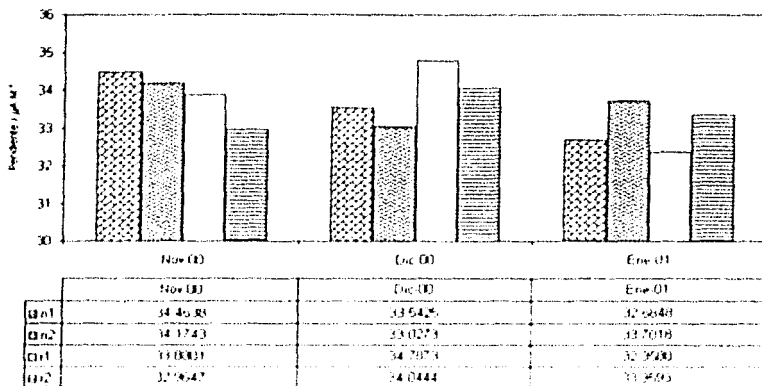


Figura 4.5 Diagrama de barras que muestran las pendientes promedio obtenidas de las curvas de calibración realizadas para los biosensores GOD-HRP (con un contenido de enzima de 1.5% GOD y 1.0% HRP, para la serie "R" y 0.5% GOD y 0.5% HRP, para la serie "N"), puliendo la superficie

Para poder corroborar que la diferencia entre las pendientes promedio por mes, para cada uno de los biosensores, es poco significativa se elaboró un análisis de varianza al 99%, la cual se muestra en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 ANADEVa bifactorial para las pendientes obtenidas para los cuatro biosensores de GOD-HRP construidos, durante los 3 meses de experimentación

F.V.	GL	SC	MC	F.CALCULADA	F. TABLAS 99
Mes	2	864.1635	432.0818	3.3292	5.61
Biosensor	3	1085.8451	361.9484	2.7888	4.72
Mes-biosensor	6	1219.1445	203.1908	1.5656	3.67
Error	24	3114.8470	129.7853		

*F.V= factor variable, G.L= grados de libertad, S.C= suma de cuadrados, M.C= cuadrado medio

Estadísticamente se demostró que, no es relevante la variación que existe entre las pendientes reportadas durante los tres meses de experimentación, y tampoco existe diferencia significativa entre las señales analíticas reportadas de los diferentes biosensores construidos.

De acuerdo a los resultados reportados anteriormente se demuestra la reproducibilidad existente en la respuesta de los cuatro biosensores durante los tres meses de uso

4.3 Estudio de interferencias.

Como ya se había mencionado con anterioridad, para el estudio de interferencias es necesario tener en conocimiento el tipo de muestras la cual se va a aplicar los biosensores. En nuestro caso, los diferentes tipos de sueros seleccionados contienen principalmente β -D-glucosa, cloruro de sodio y potasio; y en algunos casos citrato de sodio. De estas sustancias presentes en los sueros, los cloruros tanto de sodio como de potasio se encuentran presentes en el electrolito soporte, por lo que están integrados en las condiciones óptimas de trabajo. El citrato de sodio no está reportado en la bibliografía como una sustancia electroactiva que pudiera causar interferencia en la respuesta del biosensor, sin embargo, no se sabe acerca de su comportamiento en la superficie del biosensor GOD-HRP, que pudiera modificar la señal analítica. Para poder verificar que no interfiera el citrato de sodio con el estudio, se elaboraron placebos cargados, es decir, sueros elaborados con glucosa estándar y citrato de sodio dihidratado (a las concentraciones proporcionales a las del suero original), posteriormente se realizaron curvas de calibración a las condiciones experimentales óptimas. Los resultados se muestran en la tabla 4.7

Tabla 4.7 Estudio de interferencia realizado para el citrato de sodio, empleando placebos cargados. El placebo cargado (A) contiene 132.2 mg de citrato, y el placebo cargado (B) contiene 198.3 mg de citratos. Las intensidades que se muestran son a una concentración fija de glucosa estándar de 0.01014M empleando las dos series de biosensores GOD-HRP. Con un contenido de enzima de 1.5% GOD y 1.0% HRP, para la serie "R" y 0.5% GOD y 0.5% HRP, para la serie "N"

BIOSENSORES	Intensidad glucosa estándar.	Intensidad placebo (A).	Intensidad placebo (B).
R1	0.56	0.54	0.55
R2	0.55	0.55	0.55
N1	0.59	0.58	0.59
N2	0.58	0.56	0.56

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla anterior no se observa una diferencia entre las intensidades obtenidas en los diferentes sistemas. Además la ANADEVa bifactorial de la tabla 4.8, demuestra que estadísticamente no existe una diferencia significativa entre las intensidades obtenidas con la β -D-glucosa estándar, y las que se obtuvieron con los placebos con un contenido de β -D-glucosa y citratos

Tabla 4.8 ANADEVa bifactorial para el estudio de interferencia obtenidas para los cuatro biosensores de GOD-HRP contruidos

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F. CALCULADA	F. TABLAS 99
Placebo	2	0.0006	0.0003	0.93	5.61
Biosensor	3	0.0032	0.0011	3.25	4.72
plac-biosensor	6	0.0023	0.0004	1.16	3.67
Error	24	0.0080	0.0003		

*F.V = factor variable, G.L = grados de libertad, S.C = suma de cuadrados, M.C = cuadrado medio

Por lo tanto concluimos que el citrato de sodio no es una sustancia interferente en la respuesta de los biosensores de GOD-HRP y, por lo tanto, su presencia no afectará en los estudios que se realicen con los sueros glucosados

Capítulo V

5. APLICACIONES.

5.1 INTRODUCCIÓN.

Los únicos monosacáridos que se presentan substancialmente en forma libre en los animales y plantas son la β -D-glucosa y la D-fructuosa, habiéndose detectado a veces algunos otros en las plantas en cantidades muy pequeñas. El oligosacárido más abundante en los tejidos de las plantas es la sacarosa, y debido a su elevada solubilidad y a su dulzura es un ingrediente importante para la industria de los alimentos. Los monosacáridos y los oligosacáridos influyen en la dulzura de los alimentos, las bebidas, conservas, así como en las propiedades de los productos de repostería, éstos representan una fuente importante de energía, por esta razón su determinación precisa en los alimentos va siendo cada vez más importante.

Para analizar los monosacáridos todavía se utilizan métodos existentes desde hace mucho tiempo que se basan en el empleo del reactivo de Fehling para la valoración de los azúcares reductores totales, o por medio de la rotación óptica, aunque la presencia de otros azúcares reductores desconocidos puede inducir a errores. De forma creciente, se han ido introduciendo técnicas instrumentales como la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta eficacia, así como el análisis enzimático, particularmente para el control de calidad de industrias dedicadas a la manufactura de alimentos. Los análisis con enzimas son particularmente útiles para cuantificar componentes minoritarios, como por ejemplo la lactosa en la mantequilla. Los análisis con enzimas también son particularmente útiles para calcular las cantidades de azúcares individuales presentes en una mezcla, por ejemplo glucosa, sacarosa y fructuosa presentes frecuentemente en los productos como miel y algunos jarabes [8].

Como puede apreciarse, una de las principales aplicaciones para el uso de biosensores amperométricos enzimáticos es el análisis de los alimentos. Existen numerosas publicaciones [1, 4, 5, 11 y 18] que describen el análisis de diferentes muestras de interés, así como el tipo de enzima utilizada y la configuración del

biosensor que se empleo. Sin embargo no es el único campo importante de investigación para los biosensores, también se encuentra la biomedicina. En los centros sanitarios ambulatorios los biosensores se emplean para pruebas diagnósticas y el control de ciertas enfermedades (Ej. Diabetes Mellitus)

Debemos de recordar que la glucosa es el azúcar que se encuentra normalmente en la sangre; por lo tanto, desde el punto de vista médico es importante como fuente de energía, que puede administrarse por vía intravenosa, a pacientes incapaces de ser alimentados por vía bucal [21]. En la práctica hospitalaria se emplea en la administración al paciente de soluciones de glucosa inyectable, debido a que la glucosa proporciona un nutriente fácilmente metabolizado. Durante los periodos de inanición las inyecciones intravenosas de soluciones isotónicas de glucosa proporcionan líquidos y carbohidratos, así mismo, son empleados en problemas de gastroenteritis [22]

5.2 ASPECTOS GENERALES DE LOS SUEROS GLUCOSADOS.

La solución de glucosa inyectable es una solución incolora, clara, con un pH de 3.5 a 6.5 determinada en una fracción de la solución diluida en agua a una concentración de no más de 5% de glucosa. Los sueros glucosados orales vienen en dos presentaciones:

- a) Como un polvo amorfo con un contenido del 2% de β -D-glucosa, 90 mEq /L de sodio, 20 mEq /L de potasio y 30 mEq / L de citratos. Éste se disuelve en un litro de agua hervida para ser administrado
- b) Como una solución que contienen del 2 al 5% de β -D-glucosa, 75 mEq /L de sodio, 20 mEq /L de potasio y 30 mEq / L de citratos. La solución puede ser transparente o colorada además en algunos casos se adiciona un saborizante

La β -D-glucosa generalmente es administrada por vía intravenosa, sobre todo cuando se requiere de la protección del hígado permitiendo la regeneración hepática en caso de daño del órgano, por formación de glucógeno, así como para suplementar una dieta rica en carbohidratos, tal como sucede en las

enfermedades infecciosas, insuficiencia renal (uremia); sin embargo, las soluciones orales han reemplazado a las soluciones intravenosas en el tratamiento de la deshidratación causada por diarreas, especialmente en lactantes y niños [23].

La β -D-glucosa en una proporción adecuada permite una mejor absorción de sodio y a su vez agua, así como una fuente rica en calorías. El citrato que contienen algunas soluciones hidratantes permite la corrección temprana de la acidosis metabólica en niños deshidratados por diarrea y disminuye la frecuencia y gravedad de los vómitos [22].

La β -D-glucosa es un alimento natural y en pequeñas proporciones provoca muy pocos fenómenos indeseables; sin embargo, en exceso por vía intravenosa puede producir hipernatremia, edema o convulsiones, y por vía oral si se ingiere 25% o más resulta irritante para la mucosa gástrica, provocando náuseas y vómito [22 y 23].

La farmacopea reporta que el contenido de β -D-glucosa en sueros glucosados no debe ser menor del 95% y no más del 105% con respecto a lo indicado en el marbete.

5.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.

Como se había mencionado en el capítulo anterior, las muestras que emplearemos para la aplicación de los cuatro biosensores, son 5 diferentes sueros glucosados, tres de ellos son soluciones rehidratantes orales y los dos restantes son sueros intravenosos. Los productos estudiados son incoloros y no tienen sabor por la adición de un saborizante.

En los estudios anteriores de reproducibilidad se concluyó que las señales analíticas obtenidas experimentalmente son estadísticamente iguales para los cuatro biosensores de GOD-HRP construidos. Con base en lo anterior se decidió realizar el estudio de aplicación solamente para el biosensor de GOD-HRP "R2".

Para determinar el contenido de glucosa en las muestras de los sueros elegidos al azar, se efectuó adicionando 2.6 mL del suero problema en los 25 mL.

del electrolito soporte, y la intensidad que registra el amperímetro se interpola en la curva de calibración estándar obtenida para el biosensor GOD-HRP "R2" que se muestra en la figura 5.2 gráfica (a). Este estudio se realiza por triplicado para cada suero, y las condiciones experimentales óptimas son las mismas a las cuales se evaluaron las dos series de biosensores de GOD-HRP anteriormente.

Las intensidades obtenidas con los sueros glucosados con un contenido de glucosa de 5g son superiores a los intervalos de linealidad de la curva de calibración estándar, por ello se procedió a realizar diluciones en cada uno de los sueros empleando buffer de fosfatos 0.1M en NaCl 0.1M a pH de 6.0. Los sueros anteriormente mencionados son: dextrabott al 5%, dextrabott 5% solución isotónica y Electrolit[®], como puede observarse en la información reportada en el capítulo 3 (tabla 3.3).

Con el fin de tener un método de comparación se adquirió un kit comercial de la casa Sigma-Aldrich (635) específico para β -D-glucosa (ver anexo A-8.3).

Los resultados obtenidos por ambos métodos se resumen en la tabla 5.1.

Tabla 5.1 Resultados obtenidos experimentalmente en la cuantificación de glucosa en 5 marcas de sueros glucosados, empleando el biosensor de GOD-HRP "R2" y empleando además un método alternativo espectrofotométrico.

SUEROS.	Concentración del marbete	Biosensor de GOD-HRP. "R2"	Método espectrofotométrico.
suero*vida oral [®]	2.0	2.0 ± 0.01	2.1 ± 0.05
Pedialyte [®]	2.0	2.0 ± 0.01	2.0 ± 0.04
Dextrabott 5%	5.0	4.95 ± 0.04	5.0 ± 0.01
Dextrabott 5% soln salina isot	5.0	5.0 ± 0.01	5.1 ± 0.04
Electrolit [®]	5.0	5.0 ± 0.07	5.0 ± 0.03

* El contenido es en gramos de β -D-glucosa / 100 mL de suero comercial.

Para poder corroborar estadísticamente que los resultados obtenidos empleando el biosensor bioenzimático son equivalentes estadísticamente a los obtenidos por el método espectrofotometría UV/Vis, se construyó una ANADEV. Con la cual se comparan los resultados obtenidos por ambos métodos para los sueros glucosados con un contenido de 2g β -D-glucosa /100mL de suero (*vida

oral" y Pedialyte[®]). Además se realizó otra ANADEVAS que comparara los dos métodos y los sueros glucosados con un contenido de 5g β -D-glucosa/100mL (Dextrabott 5%, Dextrabott 5% solución salina isotónica y Electrolit[®]). El resumen de las dos ANADEVAS se muestra en la tabla 5.2

Tabla 5.2 Resumen de los resultados obtenidos de las dos ANADEVAS bifactoriales que comparan los dos métodos de cuantificación para la β -D-glucosa y las dos concentraciones de glucosa de las 5 marcas de sueros glucosados que se emplearon experimentalmente

CONCEPTO.	F _{calculada}	F _{crítico99}
Suero 2g/100ml - métodos 1 y 2.	0.0637	8.53
suero 5g/100ml - métodos 1 y 2	0.4016	5.61

Con la tabla anterior se comprueba que los resultados de la cuantificación de β -D-glucosa en los diferentes sueros obtenidos empleando el biosensor de GOD-HRP son estadísticamente semejantes a los obtenidos con el Kit de glucosa de la casa Sigma-Aldrich. Por lo tanto, en base a los resultados estadísticos se puede decir que la cuantificación de β -D-glucosa por medio de los biosensores bienzimáticos es confiable.

Capítulo VI

6. CONCLUSIONES.

Después de analizar los resultados obtenidos en el presente trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

- ❖ Es posible la construcción de un biosensor amperométrico bienzimático basado en GOD-HRP-epoxi-grafito.
- ❖ El buen funcionamiento del biosensor es posible en un buffer de fosfato 0.1M en NaCl 0.1M a un pH de 6, con un intervalo de temperatura entre 38 y 40°C, sin que se vea afectada la señal, y con un potencial fijo de -300mV.
- ❖ El intervalo de linealidad para el biosensor de GOD-HRP se encuentra entre 0.0056M y 0.016M.
- ❖ La sensibilidad de la respuesta obtenida para el biosensor de GOD-HRP se encuentra en un intervalo de 33 2304 y 33 7277 μ AM⁻¹.
- ❖ Se llegó a la conclusión que el proceso de pulir la superficie o dejarla sin pulir, estadísticamente no afecta la respuesta del biosensor.
- ❖ Se demostró que la respuesta del biosensor GOD-HRP no tubo cambios significativos, durante los tres meses de experimentación.
- ❖ El citrato de sodio no provoca interferencia en la señal analítica obtenida con el biosensor de GOD-HRP, cuando se utiliza en la cuantificación de β -D-glucosa en suero comerciales.
- ❖ Se observó que el biosensor de GOD-HRP da una señal analítica cuantificable en presencia de los sueros glucosados, sin ser necesario el tratamiento de la muestra.
- ❖ Fueron comparados los resultados obtenidos con los biosensores, y los obtenidos por medio de espectrofotometría UV/Vis, y no se encontró diferencia estadística significativa.

Capítulo VII

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Moliné Margarita. "Los sensores químicos: una aportación a la instrumentación analítica". Educación química. Octubre de 1997.
2. T. Edwards, ed. Chemical Sensor. Blackie & Sons, Glasgow, U.K, pag 326, 1996.
3. S.J. Updike & G P. Hicks. The enzyme electrode. Nature 214. 986-8
4. Alegret Salvador. "Biosensores. Su utilización en los campos biomédico, ambiental e industrial". Industria farmacéutica. Barcelona, España. Diciembre 1990.
5. Morales Pérez Adriana. "Construcción y evaluación de biosensores amperométricos basados en biocomposites" UAB. España 1996.
6. Página web <http://www.tecnicas.com>
7. Walker J.M. "Biología molecular y biotecnología". 2ª edición. Editorial Acribia Zaragoza España 1997.
8. Robinson David "Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos" Editorial Acribia. España 1991
9. Jonson-Pettersson G. Electroanalysis, 1991, 3, 741
10. Página web [http //www Otri- universidad complutense de Madrid. com](http://www.Otri-universidad.complutense.de.Madrid.com)
11. Hernandez Luis Dulce Maria "Construcción de un biosensor de matriz rígida de glucosa oxidasa-grafito-resina para la determinación de glucosa". UNAM 2001
12. Página Web para GOD [http //www orion1 paisley.ac uk/marco/ Enzyme_Electrode/ chapter3/ chapter3_ page7.htm](http://www.orion1.paisley.ac.uk/marco/Enzyme_Electrode/chapter3/chapter3_page7.htm).
13. Página Web para HRP [http //www chem admu.edu ph/~nina/rosby/main.htm](http://www.chem.admu.edu.ph/~nina/rosby/main.htm)
14. Cardoso M. F. Electroanalysis, 1991, 3, 741
15. Badur Salvador "Química de los alimentos". Pearson educación 1ª edición. México 1999
16. D. Centonze, F. Palmisano, L. Torsi. "Journal of analytical chemistry". January 1997 497-501

17. Whitaker John R. "Principles of enzymology for the food sciences". Marcel Dekker. EEUU. 1982.
18. Montoya Montelongo Noemí. "Cinética de oxidación de glucosa en medio acuoso catalizada por la enzima glucosa oxidasa". FES C. UNAM. 1995.
19. Barba Utrera Sonia. Econews. Tecnología de biosensores y su aplicación. Revista 2 . III trimestre 1999.
20. Boyer Paul. "The enzymes" Academic press New York. EEUU 1983.
21. Toporek Milton. "Principios de bioquímica" Interamericana. México. 1987.
22. Remington. "Farmacia". tomo 2. 19 edición . Panamericana. Buenos Aires, Argentina 1998.
23. Litter Manuel. "Compendio de farmacología". El ateneo. 3ª. Edición. Argentina, 1984.
24. Daniels, Wayne. "Bioestadística". Limusa. México. D.F. 1987.
25. Weimer Richard. "Estadística". CECSA. 2ª. Reimpresión. México D.F. 1999.

Capítulo VIII

8. ANEXOS.

A-8.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

A-8.1.1 BUFFER DE FOSFATOS 0.1M, NaCl 0.1M pH = 6.0.

1. Una vez calibrada la balanza analítica, se procede a pesar 1.04 g. de K_2HPO_4 (polvo), 12.92 g de KH_2PO_4 (cristales) y 5.87g de NaCl (cristales)
2. Posteriormente se disuelven los cristales y el polvo en agua desionizada y se vierten en un matraz volumétrico de 1Ll., llevando hasta el volumen de aforo con agua desionizada.
3. Por último se ajusta a pH de 6.0 con NaOH.
4. Se etiqueta y se conserva en refrigeración.

A-8.1.2 β -D-GLUCOSA ESTÁNDAR.

1. Una vez calibrada la balanza analítica, se procede a pesar 1.8 g de β -D-glucosa estándar.
2. Posteriormente se disuelven el polvo en buffer de fosfatos 0.1M pH 6.0 y se vierten en un matraz volumétrico de 100 mL., llevando hasta el volumen de aforo con el mismo buffer de fosfatos 0.1M pH 6.0.
3. Se etiqueta y se conserva en refrigeración.

A-8.2. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS.

A-8.2.1 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA REGRESIÓN LINEAL SIMPLE (ANADEVA) [24].

Una vez que se ha obtenido la regresión lineal, debe evaluarse para determinar si describe adecuadamente la relación entre las dos variables y si puede utilizarse convenientemente con fines de predicción y estimación.

N = número de datos

Prueba de hipótesis.

H₀: "X" y "Y" no están relacionadas linealmente.

H_A: "X" y "Y" están relacionadas linealmente.

Variable "X"	Variable "Y"
A1	B1
A2	B2
A3	B3
Suma de A. (ΣA)	Suma de B. (ΣB)
Pendiente A. (mA)	Pendiente B. (mB)

Suma de cuadrados.

$$SC_{total} = (B_1^2 + B_2^2 + \dots + B_n^2) - (\Sigma B^2 / N)$$

$$SC_{explicada} = (A_1^2 + A_2^2 + \dots + A_n^2) - (mA^2 / N)$$

$$SC_{inexplicada} = SC_{total} - SC_{explicada}$$

Tabla ANADEVA para la regresión lineal simple.

Fuente de variación.	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio.	R.V.	F _{crítica}
Regresión lineal	SC _{explicada}	1	SC _{explicada} / 1	CM _{explicada}	
Residual	SC _{inexplicada}	n-2	SC _{inexplicada} / (n-2)	CM _{inexplicada}	
Total	SC _{total}	n-1			

A-8.2.2 ANÁLISIS DE VARIANZA BIFACTORIAL (ANADEVA) [25].

Se puede emplear la ANADEVa bifactorial si cada tratamiento tiene dos medidas asociadas con él y son válidas las siguientes condiciones:

- Las muestras ab de n medidas son aleatorias e independientes
- Las muestras ab provienen de poblaciones normales
- Las poblaciones de las que proceden la muestras tienen varianzas iguales.

Prueba de hipótesis:

Para el factor T:

H_0 : No hay diferencia entre las medias t de los diferentes niveles del factor T

H_A : Al menos dos medias de los niveles del factor T difieren.

Para el factor V:

H_0 : No hay diferencia entre las medias v de los diferentes niveles del factor V

H_A : Al menos dos medias de los niveles del factor V difieren.

Para la interacción de los factores A y V:

H_0 : Las variables T y V no interactúan para afectar la variable de respuesta.

H_A : Las variables T y V interactúan para afectar la variable de respuesta.

FACTOR DE ESTUDIO "T"

	Factor T1	Factor T2
Factor V1	X111 X112 X113	X211 X212 X213
Factor V2	X121 X122 X123	X221 X222 X223

**FACTOR DE ESTUDIO
"V"**

a= número de T.(Ej 2)

b= número de V.(Ej 2)

r= número de X por cada factor.(Ej 3)

	T1	T2	TOTAL
M1	ΣX_{11}	ΣX_{21}	ΣV_1
M2	ΣX_{12}	ΣX_{22}	ΣV_2
TOTAL	ΣT_1	ΣT_2	$\Sigma V = \Sigma T$

ANADEVA.

Factor de Varianza (FV).	Grados de Libertad (GL).	Suma de Cuadrados (SC).	Cuadrado Medio (CM).	F _{EXPERIMENTAL} .	F _{-CRITICA DE TABLAS} .
Factor (T).	a-1	I - FC	SC T/GLT	CM T / CM.error	
Factor (V).	b-1	II - FC	SC V/GLV	CM V / CM.error	
Interacción (T-M).	(a-1)(b-1)	III - I - II + FC	SC.inter/GL.inter	CM.inter. / CM.error	
Error exp.	(r-1) (ab)	IV - III	SC.error/GL.error		
TOTAL	ΣGL				

$$FC = (\Sigma V = \Sigma T)^2 / abr$$

$$I = [(\Sigma T1)^2 + (\Sigma T2)^2] / br$$

$$II = [(\Sigma V1)^2 + (\Sigma V2)^2] / ar$$

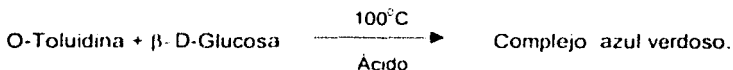
$$III = [(\Sigma X11)^2 + (\Sigma X21)^2 + (\Sigma X12)^2 + (\Sigma X22)^2] / r$$

$$IV = [\Sigma (X11..)^2 + \Sigma (X21..)^2 + \Sigma (X12..) ^2 + \Sigma (X22..) ^2]$$

A-8.3 FUNDAMENTO.DEL KIT DE GLUCOSA 635 DE SIGMA-ALDRICH.

Método: colorimétrico.

Principio:



Procedimiento:

Volumen de muestra	Volumen de reactivo	Longitud de onda	Tiempo
100 µl	5 ml	640 nm	13 min.

A-8.4 ARTÍCULO

GLUCOSE DETERMINATION IN COMMERCIAL SERUMS BY MEANS OF AN AMPEROMETRIC BIENZYMATIC SENSOR WITH A RIGID MATRIX

Rivera B, Morales-Pérez A*.

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, Sección de Química Analítica, Av Primero de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Estado de México. CP 54750 México. Tel (525)6232013, Fax (525)8682491. Email mpa@servidor.unam.mx

ABSTRACT

The objective of the present work consists on the construction and optimization of an amperometric bienzymatic biosensor of type for the quantification of glucose in commercial serums. The biosensor is based on the combined immobilization of the enzymes glucose oxidase (GOD) and horseradish peroxidase (HRP) in a biocomposite of rigid matrix. The response is linear between 5.6 mM to 16 mM. For the studies of the lifetime, it was determined experimentally that in a period of 3 months, the signal of the bienzymatic biosensor is under the confidence limits of 99%. Finally, it was possible to quantify glucose in a series of commercial serums using this approach and a good correlation was observed when our method was compared with a reference one.

Keywords: Biosensors, Glucose quantification, Horseradish peroxidase, glucose oxidase, graphite-epoxy biocomposite

INTRODUCTION

Bienzymatic sensors with immobilized biologic material in one biocomposite are rather simple: when the specific substrate for one of the enzymes is added, the enzymatic reaction takes place and the product of this reaction is the substrate for the second enzyme. In the last few years, the study of bienzymatic biosensors has increased due to the fact that using more than one enzyme increases the sensitivity [1-9]. This increased sensitivity is associated to a greater efficiency in enzymatic reactions. In bienzymatic biosensors, the second enzyme is responsible for the analytical signal; therefore, the second enzyme determines the detection limits [10-11].

Electrical communication between redox centers of enzymes and common electrodes is essential in amperometric biosensors. As to

most redox enzymes with high molecular weight, direct electrical communication between redox centers of enzymes and electrode interfaces is prevented by the thick insulating protein shell surrounding the active site. A kinetic barrier for electron transfer results from distance of the redox active site from the electrode surface. However, use of an electron transfer mediator offers an effective means to establish electrical communications between redox protein and electrodes. Though direct electrical communications between redox proteins with low molecular weight such as peroxidases (cytochrome c peroxidase, horseradish, microperoxidase, lactoperoxidase and fungal peroxidase) and common electrodes are observed, generally, it is a slow process. In contrast, electron transfer via mediator is more effective in the bioelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at peroxidases-based biosensors and high sensitivity to submicromolar H_2O_2 is observed [6]. However, the use of chemical mediators (ferrocene and its derivatives [12], quinones [13], Meldola blue [14], methylene blue [15], phenazine methosulfate [16]) is restricted to superficial immobilization; usually using glutaraldehyde and albumin from bovine serum. This causes the biosensors to have a life of about 30 days at the most. One way of solving this problem is to immobilize the biological material in a rigid matrix biocomposite [17-22]. By using this technique, the effective life of the biosensor is considerably increased [23] and maximum proximity is achieved between the active site of the enzyme and the electrode (graphite).

The objective of this study is to incorporate the enzymes glucose oxidase (GOD) and horseradish peroxidase (HRP) in a biocomposite of rigid matrix for the quantification of glucose in commercial serums. The proposed biosensor is shown in figure 1.

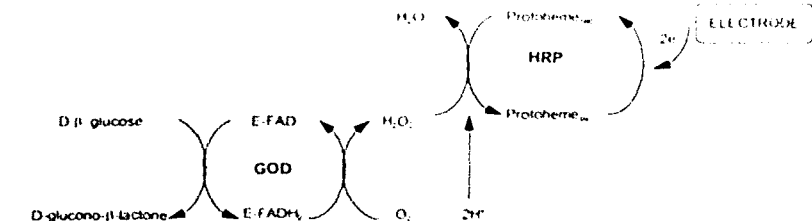


Figure 1 Mechanism of bienzyme based biosensor for glucose.

Glucose detection is based in the amperometric response resulting from the electrochemical regeneration of the prosthetic group of the HRP to its active form (protoheme reduced (protoheme_{red})).

EXPERIMENTAL

Apparatus

All experiments were carried out at controlled temperature using a thermostat-equipped bath (Lauda). LC-4C amperometric unit (Bioanalytical Systems) was used.

Reactives

The biocomposite was prepared with graphite powder (Aldrich) with a particle size of less than 50 μm , epoxic commercial resin (Epo-Tek H77) and enzymes GOD (E.C 1.1.3.4 obtained from *Aspergillus niger*) and HRP (EC 1.11.1.7, obtained from *radish*) both from Worthington Biochemical Co. The Glucose solution (Merck) was made fresh daily. The support electrolyte used was NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 (Sigma) adjusting the pH with HCl or NaOH solutions (Sigma). All reactives were analytic grade and deionized water was used (18 Ω ohms).

Electrodes

A Calomel Saturated Electrode (SCE) was used as reference, a platinum wire as an auxiliary electrode (both from Tacussel), and the working electrode was the bienzymatic biosensor. All potentials are reported for SCE.

Biocomposite

A biosensor for glucose was constructed as follows: 13.5 mg of GOD, 8.5 mg of HRP, 151.9 mg of graphite powder and 650.3 mg of epoxy resin Epo-Tek H77 are perfectly homogenized. The resulting paste is introduced in the body of the biosensor, built as described by Cespedes *et al* [19]. The biocomposite is cured at 323 K for 6 days. Then it is polished until a mirror-like finish is attained.

RESULTS AND DISCUSSION

Working potential

From previous studies [22] it was determined that the potential at which the protoheme group from the HRP enzyme is regenerated to its active form (reduced) is -300 mV, when it is immobilized in a

biocomposite of rigid matrix. Therefore, the amperometric studies were conducted at this potential value.

Temperature

Temperature is one of the factors that most affect enzymes. It has been reported [24] that the maximum enzymatic activity for the enzymes GOD and HRP in solution is at 310 °K. Therefore, the studies were conducted between 298 °K and 321°K. A calibration curve was run for each temperature. The results are shown in figure 2.

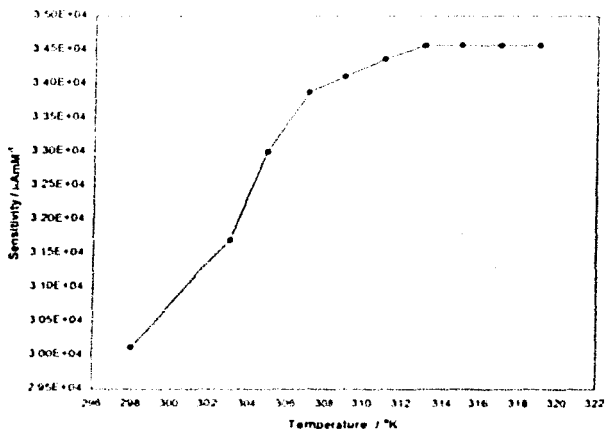


Figure 2 Effect of the temperature in the response of the biosensor Support Electrolyte: Phosphate solution 0.1 M pH=6.5

As it can be observed, the sensitivity increases with temperature. After 313°K the response of the biosensor is no longer depending on the changes in the temperature. Hence, the experiments were carried out at 315°K.

pH and Temperature

Enzymatic activity is strongly related to pH. Therefore, pH is a variable that needs to be efficiently controlled so that, within the limitations brought about by immobilizing the enzyme in the biocomposite, maximum activity is achieved. However, the pH will not only affect the response of the enzyme, but also the resin that will be

used to obtain the biocomposite of rigid matrix. Therefore, the pH selected has to conform to two requirements: a) the response of the biosensor has to be the maximum possible and b) that the biocomposite won't be destroyed. By previous studies [25], we know that the resin epotek H77 laminates if pH is less than 6.0 or higher than 9.0. Therefore, the experiments were carried out at a pH interval of between 6.0 and 8.5 with increments of 0.5 pH units. The NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 system was used as the support electrolyte and to buffer the pH. The present work will assess the effect of the pH as well as the support electrolyte response in the bienzymatic biosensor. The concentration of the support electrolyte used were 0.01, 0.1 and 0.5 M. Table 1 shows the values of the average slope values, obtained from 5 calibration curves.

Table 1 Average sensitivities (μAmM^{-1}) with deviation standard. In all cases the support electrolyte (S.E) is a NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 solution at different concentrations and different pH values

S.E (M)	pH=6.0	pH =6.5	pH =7.0	pH =7.5	pH =8.0	pH =8.5
0.01	28576	27888	28093	27276	26442	25337
	±390	±241	±267	±250	±276	±273
0.1	31023	34739	33216	31150	28663	25980
	±175	±100	±99	±196	±308	±191
0.5	31278	34705	32630	32218	28850	25008
	±264	±118	±253	±276	±308	±274

It can be observed that when the pH is buffered at a value of 6.5 and the support electrolyte concentration is 0.1 or 0.5 M, the highest sensitivity is achieved.

Once the optimum pH value and support electrolyte concentration is achieved, the effect of an inert salt in the biosensor response was assessed. Usually, the role of the inert salt (NaCl or KCl), is to decrease the resistance of the medium. The results are shown in table 2.

Table 2 Average slope values (μAmM^{-1}) In all cases, the support electrolyte (S.E) is a solution of NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , buffered at pH 6.5

NaCl (M)	S.E = 0.1M	S.E= 0.5M
0.0	34739 ± 100	34705 ± 120
0.1	34729 ± 103	34250 ± 240
0.5	34122 ± 130	32745 ± 220

When the NaCl concentration is 0.5 M and regardless of the support electrolyte concentration, the sensitivity decreases if compared to the system where no NaCl is present. When the support electrolyte concentration is 0.5 M, the sensitivity is lower with different concentrations of NaCl as compared with the system when the support electrolyte is 0.1 M. A higher sensitivity is observed when the support electrolyte concentration is 0.1 M and it doesn't change with a salt concentration of 0.1 M or if the salt is absent. From the information obtained in tables 1 and 2, the experimental conditions where the highest sensitivity is obtained are: Phosphate solution 0.1 M as support electrolyte adjusting the pH value at 6.5 and adding NaCl 0.1 M, applying a Potential of -300 mV and maintaining a temperature of 315 °K. These will be the experimental conditions for the following studies.

Linearity Interval

From figure 3a, it can be noted that the bioenzymatic biosensor responds within an interval of concentrations of 0.8 mM to 24 mM of glucose. After a concentration of 18 mM, there are no more significant changes in the current after adding glucose; this is an indication that the enzyme has been saturated. With these results, it was determined that the linearity interval lies between 5.6 and 16 mM of glucose (Figure 3b). The detection limit for the instrument lies between 0.5 mM ($S/N=3$).

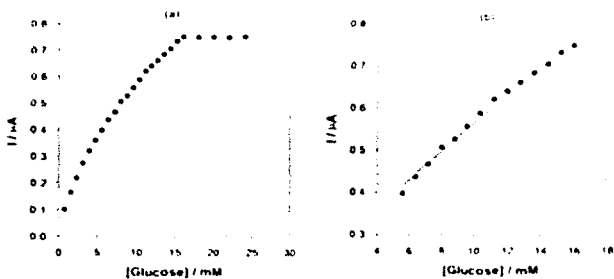


Figure 3 Response of the biosensor to glucose additions Support electrolyte phosphate solution 0.1 M, $\text{pH}=6.5$ in NaCl 0.1 M $T=315$ °K

Reproducibility and half life time.

Two series of biosensors were prepared and labeled as N and R, in order to establish its elaboration from different biocomposites to be

equivalent. Punctual current measurements were done for a glucose concentration of 10.4 mM in the system. Figure 4a shows the results. As it can be observed, after 10 successive measurements, the current values are within the confidence limits established at 99% (continuous lines) for the two series of biosensors that were manufactured. To assess the time in which the response is equivalent, study was conducted as in the reproducibility studies. Figure 4b shows the results in three months. The current is within the confidence interval of 99% for both series of biosensors.

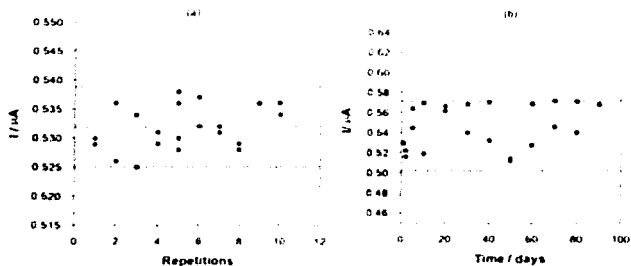


Figure 4. Study of the variation of current a)Reproducibility and b)Half Life time: (○) Biosensors of N series. (●) Biosensors of R series. The continuous lines correspond to the 99% confidence intervals. The dotted lines show the average value. Experimental conditions are described in Figure 3

In order to establish the difference in the current values shown in figure 4b, a variance analysis (ANOVA) was done. Results are shown in table 4.

Table 4. ANOVA for the information has shown in figure 4b

	Calculate F	F from tables at 99%
Month-biosensors	0.67	4.82

Therefore, the results obtained for the currents shown in figure 4b, are statistically equivalent. In order to establish if the biocomposite is homogeneous and the enzymes were adequately immobilized. Punctual current values were obtained for two conditions: When the surface of the device was polished, and when it was not. The results

for these experiments are not shown. Then, an ANOVA analysis was performed results are shown in table 5.

Table 5. ANOVA study, only the N series was used when polished or not the surface of the biosensor.

	Calculate F	F from tables at 99%
Biosensor-surface	0.84	4.07

As the calculated F is smaller than the F from tables, it can be established that the response of the biosensor does not depend on the condition of the surface. With this result it is possible to state that the enzymes were adequately immobilized and that the biocomposite is homogenous.

GLUCOSE DETERMINATION IN A COMMERCIAL SERUMS

Once the optimal experimental conditions were established, glucose was quantified in mexican commercial serums. Each measurement was repeated 5 times. Furthermore, the quantification was verified by means of a standard method (Kit Sigma 635) and statistical studies were done. The results are shown in table 6.

Table 6 Glucose quantification in serums Method 1 (Bienzomatic biosensor) Method 2 (Spectrophotometric method) The glucose levels are reported as glucose grams per 100 mL of serum

Sample	Label	Method 1	Method 2
1	2	2.0 ± 0.01	2.1 ± 0.05
2	5	5.0 ± 0.07	5.0 ± 0.03
3	2	2.0 ± 0.01	2.0 ± 0.04
4	5	4.95 ± 0.04	5.0 ± 0.01

As it can be observed, the data is consistent for both methods and therefore, to what the serum label states. It can be concluded that the bienzymatic biosensor is a feasible option to quantify glucose in serum. Using a biosensor has the advantage of a much shorter time of analysis: about 2 minutes.

CONCLUSIONS

It is possible to successfully incorporate two enzymes in one rigid biocomposite. It was demonstrated that temperature, pH and the concentration of the support electrolyte affect the response of the biosensor. It was found that the maximum response is obtained at

315°K at a pH value of 6.5 when buffering with a phosphate solution 0.1 M, adding NaCl 0.1 M. The analytical signal was reproducible when doing repetitive measurements. The half time life was at least 3 months. The response was found to be within the 99% confidence limits. Finally, it was possible to quantify glucose in serum and the results obtained are equivalent to results of a spectrophotometric method.

ACKNOWLEDGEMENTS

A. Morales-Pérez thanks the National Council of Science and Technology CONACyT for the support through the grant E-32766-J.

REFERENCES

- [1] Scheller F., Schubert F., Pfeiffer D., Hintsche R., Dransfeld I., Renneberg R., Wollenberger U., Riedel K., Pavlova M., Kühn M., Müller H., 1989, *Analyst*, 114, 653.
- [2] Kulys J., Schmid R., *Biosensors & Bioelectron.*, 1991, 6, 1, 43.
- [3] Gibson T. D., Hulbert J. N., Parker S. M., Woodward J. R., Higgins I. J., 1991 *Biosensors & Bioelectron.*, 7, 10, 701.
- [4] Buttler T., Gorton L., Jarskog H., Marko-Varga G., Hahn-Hagerdal N., 1994, *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 3, 322.
- [5] Marko-Varga G., Johansson K., Gorton L., 1994, *J. Chromatogr.*, 660, 1-2, 153.
- [6] Liu H., Ying T., Sun K., Li H., Qi D. 1997. *Anal. Chim. Acta*, 344, 187.
- [7] Abass A. K., Hart J. P., Cowell D. *Sensors and Actuators B*, 2000, 62, 148.
- [8] Vidillo J. C., Garcia E., Castillo J. R. *Sensors and Actuators B*, 1999, 57, 219.
- [9] Jönsson-Pettersson G., 1991, *Electroanalysis*, 3, 741.
- [10] Scheller F., Schubert F., Pfeiffer D., Hintsche R., Dransfeld Y., Rennerberg R., Wollenberger U., Riedel K., Pavlova M., Kühn M., Müller H., 1989, *Analyst*, 114, 653.
- [11] Scheller F., Schubert F., Rennerberg R., Müller H., Jänchen M., Weise H., 1985, *Biosensors*, 1, 135.
- [12] Mulchandani A., Wang C. L., Weetall H. H., 1995, *Anal. Chem.*, 32, 375.
- [13] Sánchez P. D., Blanco P. T., Álvarez J. M. F., Smith M. R., O'Kennedy R., 1990, *Electroanalysis*, 2, 303.

- [14] Liu H., Zhang X., Wei J., Wu X., Qi D., Liu Y., Dai M., Yu T., Deng J. 1996, *Anal. Chim. Acta*, 329, 97.
- [15] Liu H., Qian J., Liu Y. Yu T., Deng J. 1996, *Talanta*, 43, 111.
- [16] Qian J., Liu H., Liu T., Yu T., Deng J, 1995, *J. Electroanal. Chem.*, 397, 157.
- [17] Céspedes F., Martínez-Fàbregas E., Alegret S., 1993, *Anal. Chim. Acta.*, 284, 21.
- [18] Alegret S., Céspedes F., Martínez-Fàbregas E., Martorell D., Morales A., Centelles E., Muñoz J., 1996, *Biosensors & Bioelectronics*, 11, 35.
- [19] Céspedes F., Martínez-Fàbregas E., Alegret S., 1994, *Electroanalysis*, 6, 759.
- [20] Morales A., Céspedes F., Martínez-Fàbregas E., Alegret S., 1998, *Electrochimica Acta*, 43, 23, 3575.
- [21] Galán-Vidal C.A., Muñoz J., Domínguez C., Alegret S., 1995, *Trends in Analytical Chemistry*, 14, 225.
- [22] Morales A., Céspedes F., Muñoz J., Martínez-Fàbregas E., Alegret S. 1996, *Anal. Chim. Acta*, 332, 131.
- [23] Morales A., Céspedes F., Alegret S., 2000, *Materials Science & Engineering C.*, 7, 99.
- [24] Worthington Von Editor Worthington Enzymes Manual. Worthington Biochemical Co 1993., New Jersey USA,
- [25] Céspedes Mulero F., Tesis Doctoral: Desarrollo de materiales compuestos grafito-epoxy de matriz modificada química y biológicamente, y su utilización en la construcción de biosensores amperométricos 1993. Universitat Autònoma de Barcelona, España.