

00528
68



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
MICROCELDA DE DETECCIÓN ENZIMÁTICA DE
GLUCOSA OXIDASA PARA LA DETERMINACIÓN DE
GLUCOSA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

MARIANA MUÑOZ GALVAN



*Facultad de
Química*

MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente **REBECA UGALDE VARGAS**

Vocal **FRANCISCA ITURBE CHIÑAS**

Secretario **JOSÉ ALEJANDRO BAEZA REYES**

1er sup. **LUZ SANDRA SANCHEZ DEL ANGEL**

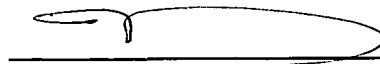
2do. sup. **VERONICA ESPINOZA CRUZ**

**LABORATORIO DE ELECTROQUÍMICA ANALÍTICA EN INVESTIGACIÓN Y
ENSEÑANZA EXPERIMENTAL**

EDIFICIO A . Laboratorios 3-E y 3-F

FAC. DE QUÍMICA . Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, CP 04510, México D. F.

Asesor: **Dr. JOSÉ ALEJANDRO BAEZA REYES**



Sustentante: **MARIANA MUÑOZ GALVAN**



CRÉDITOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que desde temprana edad inspiro en mi un gusto por la vida, a través de su enseñanza, tanto en el área de las artes, humanidades y ciencias. En donde he vivido desde las experiencias más bellas hasta los momentos más difíciles de mi vida, a través de estas vivencias he crecido y forjado a la persona que soy en la actualidad, que siempre la vera con un profundo amor y con la convicción de respetarla y defenderla.

A la Facultad de Química que me brindo desarrollo y desempeño académico a través de su planta de profesores, trabajadores e instalaciones, particularmente en el área de la Química de Alimentos.

Al Doctor Alejandro Baeza, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo en el Laboratorio de Electroquímica Analítica en Investigación y Enseñanza Experimental, en donde recibí la formación académica más valiosa para mí, al igual que su amistad y apoyo. Ya que gracias a su orientación, indicaciones y consejos, siempre pertinentes, tanto en el ámbito académico como personal, no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis abuelos Víctor Muñoz Luna y Teresa Galván Ríos, a mi madre Ana María Muñoz Galván y a mi tía María Lina Muñoz Galván, a mis tíos, tías y primos, por su cariño, apoyo y respeto, que me impulsaron a superarme, guiándome y mostrándome que la única vía del la realización humana es el conocimiento y la preparación.

Agradezco a mi esposo Eduardo Vizcaya Xilotl, por compartir su vida conmigo, por su comprensión y amor, también por asesorarme y dar sugerencias en cuanto la redacción y estilo del trabajo.

Agradezco a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Electroquímica Analítica en Investigación y Enseñanza Experimental: José Luis, Citlalli, Patricia, Adrián, Juan Manuel, Mónica, Edgar, Jorge, Lalito, Juanito, Xochiquetzall, Lemus, Francisco, Julio y Ángel, por los gratos momentos que vivimos tanto en el quehacer experimental como en los congresos y en las celebraciones.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ASPECTOS GENERALES DE LOS BIOSENSORES	3
Uso de Biosensores en la Industria Alimentaria	6
OPERACIÓN DE UN BIOSENSOR	
Biocomponente	8
La Reacción Biológica	11
Transductores	14
BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS	
Biosensores Amperométricos,	
Biosensores Conductimétricos y Biosensores Potenciométricos	18
BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA MONITOREAR LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA	
Biosensores Amperométricos	22
Aplicación Industrial de Biosensores para monitorear Glucosa	27
TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EMPLEADAS	
Voltamperometría Cíclica	30
Cronoamperometría	32
MICROCELDA DE DETECCIÓN ENZIMÁTICA	34
CARACTERÍSTICAS DE LA GLUCOSA	35
Isomerización de Monosacáridos (D-Glucosa)	37
Formas Cíclicas de la D-Glucosa	38
Características Físicas de la Glucosa	40
Análisis de Glucosa en Alimentos	41

Identificación y Cuantificación de Glucosa por Métodos Oficiales	41
Reacciones enzimáticas para la Cuantificación de Glucosa	43
Aplicaciones	45
CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA	
Número de Clasificación, Grupo, Nombre Sistemático, Origen,	45
Reacción que Cataliza	
Estructura Enzimática	
Funcionamiento de la Enzima	46
Definición de Unidad de Actividad	47
Especificidad	
Condiciones Óptimas de Utilización (pH Y Temperatura)	48
Inhibidores/ Activadores / Cofactores	49
Aplicación en Alimentos	
ANÁLISIS ENZIMÁTICOS DE GLUCOSA EN VINOS	50
OBJETIVO GENERAL	
OBJETIVOS PARTICULARES	
HIPÓTESIS	52
PARTE EXPERIMENTAL	
Materiales	53
Equipos	54
Diseño de la Microcelda de Detección Enzimática	55
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
Voltamperometría Cíclica H_2O_2	58
Peróxido de Hidrógeno Potencial de Reducción y Oxidación	59
Peróxido de Hidrógeno Potencial de Reducción	60
Cronoamperometría H_2O_2 Potencial de Reducción	61
Adición de Disolución de Glucosa Potencial de Reducción	62

Glucosa Oxidasa Potencial de Reducción	63
Cronoamperometría Glucosa Oxidasa Potencial De Reducción	64
Cronoamperometría H ₂ O ₂ Potencial de Oxidación	65
Cronoamperometría de la Reacción Enzimática que involucra a la GOD y Glucosa Potencial de Oxidación	66
Análisis Enzimático de Glucosa en Vino Tinto	68
Microensayo Enzimático	69

RESULTADOS

Voltamperometría Cíclica H ₂ O ₂	70
Peróxido de Hidrógeno Potencial de Reducción y Oxidación	71
Peróxido de Hidrógeno Potencial de Reducción	72
Cronoamperometría H ₂ O ₂ Potencial de Reducción	73
Adición de Disolución de Glucosa Potencial de Reducción	74
Glucosa Oxidasa Potencial de Reducción	75
Cronoamperometría H ₂ O ₂ Potencial de Oxidación	77
Cronoamperometría de la Reacción Enzimática que involucra a la GOD y Glucosa Potencial de Oxidación	78
Análisis Enzimático de Glucosa en Vino Tinto	79
Microensayo Enzimático	80

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Curvas de Calibración	81
Análisis Estadístico	94

CONCLUSIONES 95

BIBLIOGRAFÍA 97

ANEXO 1: El Vino Tinto 99

ANEXO 2: Tabla A1 103

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la Industria Alimentaria ha visto la necesidad de sustituir métodos y procesos analíticos, debido a que no cuentan con el desarrollo de instrumentos que sean de fácil aplicación, confiables y económicos, que brinden información sobre las características físicas y químicas de los constituyentes alimenticios, empleando métodos que por lo general requieren de la desnaturalización total o parcial del alimento, lo que ha generado un impedimento para poder determinar la cantidad real e interacción de los compuestos naturales o artificiales de los alimentos como aromatizantes, saborizantes, agentes antimicrobianos, alérgenos, glucosa, alcoholes, peróxido de hidrógeno, sulfatos, antibióticos, colesterol, glutamato y vitaminas^[1].

A pesar de ello la Industria alimentaria sigue utilizando métodos analíticos convencionales, como la cromatografía HPLC, FIA y la electroforesis capilar, los cuales son sencillos, requieren de un simple pretratamiento, pero necesitan dispositivos costosos como son: sistemas multidirector, columnas, químicos altamente puros y con fases móviles modificables; por el contrario los biosensores pueden ser incorporados con transductores numéricos y biocomponentes sencillos y compactos; siendo portadores de los aspectos básicos de la Química Analítica que son: selectividad, sensibilidad, precisión y rapidez.

Actualmente la tecnología de sensores y biosensores está reemplazando las prácticas ordinarias del análisis químico por métodos de rápida determinación, miniaturizados y automatizados. Siendo aplicados a la resolución de casi cualquier problema, mejorando la calidad en los laboratorios analíticos^[2].

El método enzimático que proponemos en el presente trabajo está basado en la elaboración de la Microcelda Electroanalítica de Detección Enzimática para ensayos con glucosa (figura 1), que en esencia es un biosensor, que puede ser incorporado con transductores numéricos y el biocomponente empleado es la Glucosa Oxidasa (GOD), donde la glucosa es una especie que puede ser determinada utilizando la función catalítica de la enzima.

La Microcelda Electroanalítica de Detección Enzimática es uno de los biosensores más sencillos en cuanto a su construcción y se encuentra dentro de aquellos denominados enzima-transductor o electrodo enzimático.

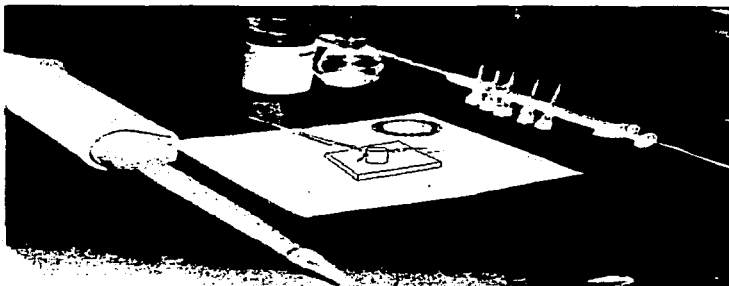


Figura 1 Unidades funcionales de la Microcelda de Detección Enzimática.

La reacción enzimática que involucra a la (GOD), oxígeno y glucosa seguido por la oxidación electrocatalítica de peróxido de hidrógeno y ácido glucónico, se representa de la siguiente manera:



En este sistema la enzima será monitoreada mediante Técnicas potencioestáticas, por la caída de la concentración de oxígeno debida a la producción de peróxido de hidrógeno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ASPECTOS GENERALES DE LOS BIOSENSORES

Los biosensores son instrumentos analíticos que transforman procesos biológicos en señales eléctricas y permiten su cuantificación. Los biosensores utilizan la especificidad de estos procesos: las enzimas por sus substratos y otros ligandos, los anticuerpos por sus antígenos, las lectinas por carbohidratos y los ácidos nucleicos por sus secuencias complementarias. Un biosensor modelo consta de varias partes interconectadas (Figura 2). La reacción biológica sucede habitualmente en estrecho contacto con el transductor eléctrico. Esta disposición asegura que la mayor parte de la reacción biológica sea detectada. La señal eléctrica obtenida se compara con una señal de referencia, normalmente producida por un sistema similar que carece del material biológico activo, y la diferencia entre ambas señales es amplificada, procesada, y mostrada o almacenada.

A menudo, las muestras se pueden analizar sin tratamientos previos. En este aspecto muestran ventajas sobre otros métodos analíticos <<tradicionales>>, como por ejemplo, el procedimiento básico de Kjeldahl que aún mantiene su posición como la técnica más fidedigna para la determinación de nitrógeno orgánico.

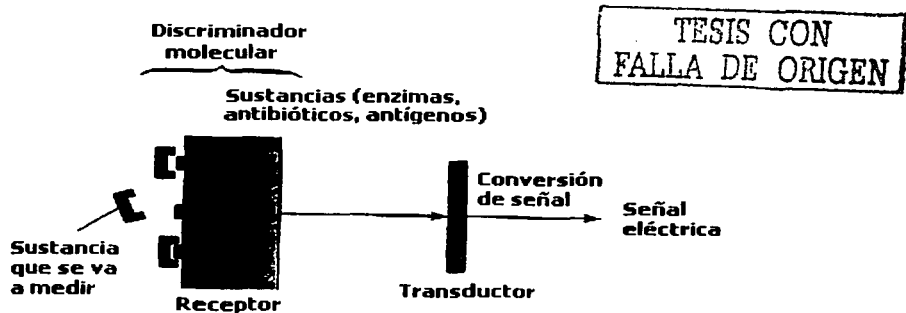


Figura 2 Unidades funcionales de un biosensor.

Los biosensores se clasifican de acuerdo a sus componentes y al tipo de análisis en donde se utilicen; además pueden construirse en un mismo dispositivo o pueden ser integrados con otros sistemas analíticos.

Para ser aceptados, los biosensores, deben tener ventajas frente al uso de biocatalizadores no unidos a soportes, que presentan la misma especificidad y poder discriminatorio. La principal ventaja está relacionada por lo general con la posibilidad de ser reutilizados. La repetida utilización de un sensor con el mismo material biológico asegura que el análisis de muestras similares producirá valores similares, de forma que se obvia la necesidad de una cuidadosa medición de la cantidad de material biológico del sensor para cada análisis. Esto evita la posibilidad de introducir errores por pipeteo o dilución deficiente. Las metodologías repetitivas y sin reactivos adicionales permiten el ahorro de los costos de reactivos, reduciendo el precio por ensayo. Además, el tiempo empleado en cada ensayo por el operador, así como la pericia que se requiere para los métodos de análisis <<tradicionales>> suponen, en muchos casos, incluso un costo superior al de los propios reactivos. Estas ventajas deberían ser suficientes para favorecer la gran inversión necesaria para el desarrollo de biosensores y para ofrecer precios competitivos para el usuario.

Cada tipo de biosensor tiene sus propias ventajas e inconvenientes (Tabla 1). No todos estos biosensores se han usado en aparatos comerciales. Exceptuando las tiras colorimétricas, los biosensores comerciales más importantes son los electroquímicos. Hay biosensores potenciométricos diseñados para detectar glucosa, lactato, glicerol, alcohol, lactosa, L-aminoácidos, y colesterol, algunos de los cuales usan transistores de efecto campo (Field Effect Transistors, FET). Se han lanzado al mercado aparatos amperométricos para detección de glucosa, otros carbohidratos de bajo peso molecular y alcohol. Fuertes indicios apuntan a que los biosensores ópticos irrumpirán con fuerza en el mercado en un futuro no muy lejano como lo evidencia la presentación del aparato Biacore, un aparato de resonancia de plasma superficial (surface plasmon resonance, SRP).

Tabla 1 Propiedades de varias configuraciones de biosensores.

Biosensor	Costo	Fiabilidad	Complejidad	Sensibilidad
Amperométricos	Bajo	Alta	alta	intermedia
Conductimétricos	Muy bajo	Intermedia	poca	intermedia
Pontociométricos	Bajo	Intermedia	intermedia	intermedia
Piezoeléctricos	Bajo	Baja	baja	baja
Termómetro	Alto	Alta	muy alta	alta
Óptico	Bajo	Intermedia	intermedia	intermedia

Biosensor	Velocidad de respuestas	Utilidad en general	Uso actual	Perspectivas futuras
Amperométricos	Intermedia	Escaso	abundante	importantes
Conductimétricos	Intermedia	Escaso	escaso	normales
Pontociométricos	Intermedia	Intermedia	intermedio	importantes
Piezoeléctricos	Rápida	Poca	escaso	escasos
Termómetro	Lenta	muy amplia	escaso	intermedias
Óptico	Intermedia	Escaso	abundante	importantes

Los campos en los que se pueden emplear biosensores se muestran en la Tabla 2. De estos datos, se puede deducir que es un área en expansión a gran velocidad. Es necesario advertir que en el pasado las previsiones en el campo de la industria de biosensores fueron sobreestimadas, pero se espera que aumenten en un futuro próximo. Es conocida hoy en día la existencia de dificultades sustanciales y de inversión a gran escala para producir estos aparatos analíticos robustos y fiables, capaces de operar en condiciones reales, aun cuando ya se hubiera fabricado un aparato de investigación muy prometedor.

Tabla 2 Utilización de los biosensores en diversos campos y crecimiento anual.

Campo	Porción de mercado (%)	Taza de crecimiento anual (%)
Diagnóstico clínico	53	25
Control de procesos industriales	11	50
Instrumental médico	11	30
Veterinaria/Agrícola	8	60
Defensa	6	45
Medio ambiente	5	35
Investigación	3	50
Robótica	2	30
Otros	1	30

Walker, J.M. y Gingold, E.B.; *Biología Molecular y Biotecnología*, 2ª edición. Ed. Acribia. España, 2000, capítulo 19.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

USO DE BIOSENSORES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Una de las áreas donde más se han aplicado los biosensores es en el análisis de alimentos, donde hay un número considerable y cada vez mayor de sustancias que se están produciendo a escala a partir de cultivos de células eucariotas y procariotas. La monitorización de estos delicados y caros procesos es esencial para reducir y mantener bajos los costos de producción. Además, pueden diseñarse biosensores específicos para medir la generación de un producto de fermentación, contenido de aditivos, en productos terminados, control de calidad, en materias primas.

Los biosensores disponibles comercialmente para aplicaciones en la industria de alimentos y bebidas están basados en tecnologías muy similares al propuesto en este trabajo, tales como electrodos para oxígeno o peróxido de hidrógeno con una enzima oxidasa.

Algunos biosensores han sido desarrollados para detectar glucosa, lactato, alcoholes, aminoácidos, aspartame, glutamato, lípidos y colesterol. Cada biosensor detecta uno o dos analitos sin tener que cambiar de biocomponente. Se ha observado que el ácido ascórbico y la vainillina son las interferencias más frecuentes^[1].

Los biosensores basados en transductores térmicos podrían ser utilizados para monitorear compuestos importantes para el control de la calidad de los alimentos, como son: ácido ascórbico, galactosa, ácido oxálico, antibióticos y podrían ser usados para la detección de contaminantes microbianos en alimentos^[5].

Además de las aplicaciones ya mencionadas los biosensores podrían ser utilizados en el monitoreo y determinación de parámetros bioquímicos de calidad para el cacahuete (argina), para cereales (lisina), vinos (etanol), productos lácteos (D-galactosa), carne (trimetilamina); en la industrias láctica: leche (proteínas, grasa, anticuerpos, hormonas, vitaminas), para la determinación de sustancias tóxicas o mutagénicas, tales como metales pesados, pesticidas, drogas; en la biotecnología para el control de procesos de manipulación genética de animales y plantas; en veterinaria para el control de alimentos para el ganado; en agricultura en la producción de granos así como de su empaquetado, almacenamiento y transporte. En la tabla 3 se pueden observar con más detalle los componentes de interés para la industria Alimentaria, que son analizados por medio de biosensores.

Tabla 3 Compuestos importantes para la industria de alimentos, que son factibles de analizar por medio de biosensores.

Componente de interés	Área de aplicación y comentarios
Orgánicos Aminoácidos, colesterol, carbohidratos, vitaminas, antibióticos, insecticidas, alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos, lípidos y lecitina.	Constituyentes o contaminantes en productos alimenticios.
Lisina	Indicador de daño nutricional debido a tratamiento térmico.
L-alanina	Enaltecedor de sabor.
Citrato	Componente de varias frutas y de todas las células vegetales y animales.
Catequinas, catecoles y taninos	Control de calidad en el procesamiento del té (sustancias astringentes).
Polifenoles	Aceite de oliva (gusto y estabilidad del aceite).
Acetadehido	Vinos, cerveza y yoghurts.
Acido maloláctico	Calidad del vino.
Trimetilamina, cadaverina e histidina	Carne, histamina en el vino tinto.
Nucleótidos: hipoxantinas, inosina, inosina-5-monofosfato	Frescura del pescado y carne.
Salicilato	Agente antimicrobiano, conservador.
Acido benzoico, ácido sorbico, tocoferoles	Conservadores.
Glutamato	Enaltecedor de sabor.
Lactato	Yogurt, cerveza, jugos de frutas y vinos.
Amigdalina	Azúcar que contiene cianuro en las almendras.
Edulcorantes artificiales (aspartame, sacarina, ciclamato, acesulfame, etc)	Postres y bebidas no alcohólicas.
Glucosinolatos	Heteroglicósidos que contienen nitrito y sulfuro.
Inorgánicos	Conservador de alimentos, prevención de la oxidación.
Sulfitos, dióxido de sulfuro	Vinagre, jugos de frutas, leche, bebidas no alcohólicas, agua mineral.
Potasio, sodio, calcio, magnesio, nitrato, nitrito, cloruro, sulfato, fluoruro, carbonato, zinc, mercurio	Vinagre, jugos de frutas, leche, bebidas no alcohólicas, agua mineral.
Toxinas y patógenos	Proteína A es un producto de <i>Staphylococcus aureus</i> .
Saxitoxina, neosaxitoxina, gonyautoxinas, brevetoxina, proteína A, virus de la hepatitis A, aflatoxinas, ciguatoxina	Proteína A es un producto de <i>Staphylococcus aureus</i> .
Tetrodotoxina	Envenenamiento con mariscos.
<i>Salmonella, E. coli, listeria, Campylobacter, staphylococcus, Yersinia, bacteriófagos.</i>	Presentes en alimentos procesados y botanas.

De la tabla anterior (tabla 3) podemos decir que la mayoría de los componentes analizados por medio de biosensores son de origen orgánico, pueden ser utilizados en una amplia variedad de aplicaciones entre ellas, en el monitoreo de la calidad, en la seguridad de los alimentos y otras con aplicación específica en el análisis de alimentos.

OPERACIÓN DE UN BIOSENSOR

BIOCOMPONENTE

La sustancia bioactiva proporciona al biosensor su selectividad y especificidad, también permite un reconocimiento y la detección rápida de moléculas específicas o reacciones químicas. Este reconocimiento molecular y su mecanismo de detección es posible debido a cambios químicos en el material biológico o inducidos por éste, que pueden ser monitoreados por el transductor físico.

Las sustancias bioactivas que pueden ser usadas son: enzimas o complejos multienzimáticos, organelos tejidos, ácidos nucleicos, antígenos, anticuerpos, algunas células bacterianas o de hongos y células de origen animal o vegetal ^[5].

Las sustancias bioactivas más usadas para la construcción de biosensores son las enzimas de tipo oxidasa ya que presentan alta estabilidad (tiempo de vida grande), no requieren coenzimas ni cofactores y favorecen la biocatálisis^[1].

La principal ventaja del uso de enzimas como parte de los biosensores se debe a su alta especificidad y, por ende, a su gran poder discriminatorio. Así, son capaces de detectar determinadas moléculas en mezclas complejas con otros materiales de similar estructura, que pudieran estar presentes en concentraciones parecidas o mayores a las de la molécula a detectar.

Actualmente se dispone comercialmente de un número grande de estos biocatalizadores altamente específicos y también es posible su aislamiento a partir de materiales biológicos mediante la utilización de técnicas sencillas. Para conocer con profundidad las grandes ventajas que han supuesto las mejoras introducidas en los procesamientos y la mayor especificidad analítica derivadas del uso de estos catalizadores, los ingenieros y científicos han de considerar la forma más eficiente de acoplar los componentes de la reacción.

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

Los primeros estudios que se llevaron a cabo con el uso de enzimas requerían la utilización de diversas técnicas que ayudasen a la comprensión de su actividad tales como la colorimetría, cromatografía, espectrofotometría, etc. Sin embargo en los últimos años se ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias en la instrumentación analítica, se trata de la construcción de dispositivos analíticos que por su simplicidad tanto en su construcción, manejo y costo, representan un método alternativo a los ya existentes. Estos dispositivos son los llamados sensores químicos: simples transductores de información química en información eléctrica u óptica.

Basados en mecanismos físicos y químicos muy variados cuando son utilizados como verdaderos instrumentos analíticos, no formando parte de sistemas instrumentales más complejos, los sensores químicos están diseñados para efectuar la medición analítica en el seno de la muestra, por ejemplo, en una corriente fluvial, una conducción industrial, un capilar sanguíneo o en el interior de una célula^[4].

Clasificación de los biosensores que emplean enzimas:

Biosensores enzimáticos convencionales. Se emplean una o más membranas, generalmente composites que contienen una o más enzimas inmovilizadas, cuya naturaleza física o química, permite la eliminación de interferencias, de esta manera se aísla al analito de interés para ser transformado en especies iónicas detectables potenciométrica o amperométricamente.

Biosensores que integran mediadores electrónicos. Son biosensores enzimáticos convencionales donde el cofactor enzimático es reemplazado por un mediador químico que al ser reciclado en el electrodo a través de su oxidación o reducción proporciona la señal de transducción del sistema. Las sustancias consideradas mediadores electroactivos y que se usan en la modificación de moléculas son: ferroceno y sus derivados, etosulfato de fenazina, benzoquinona, hexacianoferrato, sales conductoras (moléculas orgánicas planares con susceptibilidad a la deslocalización de orbitales II) tales como: sales de tetratianofulvalinio (TTF), N-metilfenazinio (NMP⁺), trimetilamonio (TEA), tetracianoquinodimetanida (TCNQ), 9-dicianometileno-2,4,7-trinitrofluoreno (DTF).

Bioelectrodos basados en competencia enzimática. En éste caso dos enzimas (una de ellas dependientes de NAD(P) y otra dependiente de oxígeno) son inmovilizadas sobre un electrodo sensible a oxígeno y a NAD(P)H. Ambas enzimas al estar en contacto con la muestra, compiten por el sustrato, cuya concentración es determinada mediante el análisis simultaneo del electrodo de trabajo de oxígeno y NAD(P)H.

Por lo anterior los biosensores que emplean enzimas como biocomponentes pueden hacer que los procesos sean más eficientes y, por consecuencia, originar ahorro en muchas formas. Dado su alto grado de especificidad y sus condiciones moderadas de operación, ayudan a que algunas operaciones en plantas industriales sean más eficientes. Esto significa que mayores cantidades de materias primas puedan ser analizadas en el mismo equipo y con menos energía, lo que lleva a expandir la capacidad de la planta sin gastos fuertes de inversión.

LA REACCIÓN BIOLÓGICA

Un factor importante de un biosensor es que retenga la máxima bioactividad y bioestabilidad de una molécula biológica, en todos los biosensores esto se efectúa en la superficie detectora, que consiste normalmente en una capa delgada de material biológico activo en íntimo contacto con el transductor eléctrico. En algunos casos el material biológico puede estar unido covalente o no covalentemente a la superficie pero normalmente forma parte de una delgada membrana que recubre la superficie detectora. Generalmente, la conversión de un proceso biológico en una señal electrónica es más eficiente cuando es mínima la distancia entre el lugar donde la reacción biológica sucede y el lugar donde la transducción electrónica ocurre. Además, es importante para retener actividad biológica que el material biológico no se pierda en las soluciones a analizar.

El analito da lugar entonces a la respuesta biológica, produciendo una respuesta electrónica. Esta respuesta electrónica varía con la respuesta biológica, la cual, varía con la concentración del analito unido. Excepto la relación logarítmica que existe en los biosensores potenciométricos, las respuestas biológicas y electrónicas son a menudo proporcionales.

Donde la constante de semisaturación es igual a la concentración del analito que da lugar a la mitad de la máxima respuesta electrónica posible (Figura 3). La respuesta es lineal, hasta el 95%, a concentraciones de analito superiores a aproximadamente una veinteaava parte de la constante de semisaturación.

Un biosensor que siga esta cinética puede ser usado en un intervalo grande y no lineal si presenta compensación electrónica.

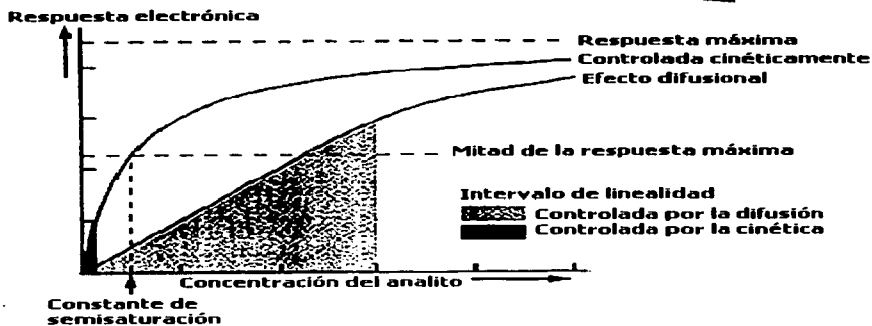


Figura 3 Intervalo de respuesta de un biosensor en condiciones de cinética biocatalítica y de control difusional

Cuando el analito reacciona como parte de la respuesta biológica (es decir, durante una reacción biocatalítica utilizando enzimas y/o células microbianas), un factor adicional es la difusión del analito desde el resto de la solución a la superficie de reacción. Si esa velocidad de difusión es menor que la velocidad a la que el analito reacciona, esto reducirá la concentración del analito que sufre la reacción. La velocidad de difusión aumenta al aumentar el gradiente de concentración. Donde la concentración del analito es la diferencia entre la concentración en la solución del analito y la concentración en la superficie detectora del biosensor, dividida por la distancia a través de la cual el analito debe difundir.

Al usar la mayoría de los biosensores biocatalizadores confinados por membranas, los gradientes de concentración no sólo dependen de la concentración del analito en la solución y en la membrana, sino también del grosor de la membrana; cuanto más gruesa es la membrana, mayor es la distancia de difusión desde la solución a la superficie detectora distal del biosensor, y mayor la cantidad de biocatalizador presente. Ambos efectos aumentan la impresión de que es la difusión la que controla el proceso. Así, estos

biosensores pueden ser diseñados para estar bajo control difusional o bajo control cinético modificando el grosor de la membrana. Cuando la velocidad de difusión del analito es menor que la velocidad a la que el biocatalizador reacciona, la respuesta electrónica disminuye debido a la menor cantidad de analito presente capaz de reaccionar. Se alcanza un estado de equilibrio cuando la velocidad de llegada del analito iguala a la velocidad de la reacción. La condición de equilibrio puede ser determinada globalmente por la velocidad de difusión, por la velocidad de reacción o por una dependencia intermedia.

Al depender la velocidad de difusión de la concentración global del analito, esta respuesta electrónica está relacionada linealmente con la concentración global del analito y, lo que es más importante y extraño, es independiente de las propiedades de la enzima. Así, el biosensor es lineal en un intervalo mucho más grande de concentraciones de sustrato (vea la Figura 2) y relativamente independiente de los cambios en el pH y la temperatura de la membrana biocatalítica, al menos mientras la difusión siga controlando el sistema. Habría que señalar, sin embargo, que bajo estas condiciones la respuesta es exclusiva de un sistema que contenga la misma cantidad de biocatalizador pero que no esté limitado por la difusión. La máxima sensibilidad a la concentración de analito se obtendría por utilización de membranas delgadas con gran actividad biocatalizadora y con una solución de analito bien agitada.

Las cinéticas de la mayoría de los biosensores son difíciles de predecir al depender de la difusividad en la solución y en el volumen del biocatalizador; la naturaleza, porosidad, y propiedades físicas de las membranas; la cinética intrínseca del biocatalizador; el proceso de transducción electrónica y su cinética; la forma bajo la cual el analito es presentado; y otros factores no específicos. En general, todas estas cinéticas se determinan experimentalmente utilizando el biosensor completo y, por tanto, es muy importante que la configuración del biosensor sea reproducible^[3].

TRANSDUCTORES

Un traductor se encarga de transformar la señal producida en el proceso de reconocimiento analito-receptor en una señal de tipo eléctrica. Cuando se lleva a cabo esta interacción puede existir una variación en la concentración de ciertos iones (H^+ , NH_4^+ , CN^- , I^- , etc.), especies gaseosas (O_2 , CO_2 , NH_3), o de la absorbancia u otros parámetros ópticos, de calor, masa, conductividad, transferencia de electrones. Si dicho cambio es generando en la proximidad del transductor podrá ser convertida por éste en una señal eléctrica cuantificable, previa amplificación y procesamiento digital. En la figura 4 se puede observar en forma de diagrama el principio general de operación de un biosensor.

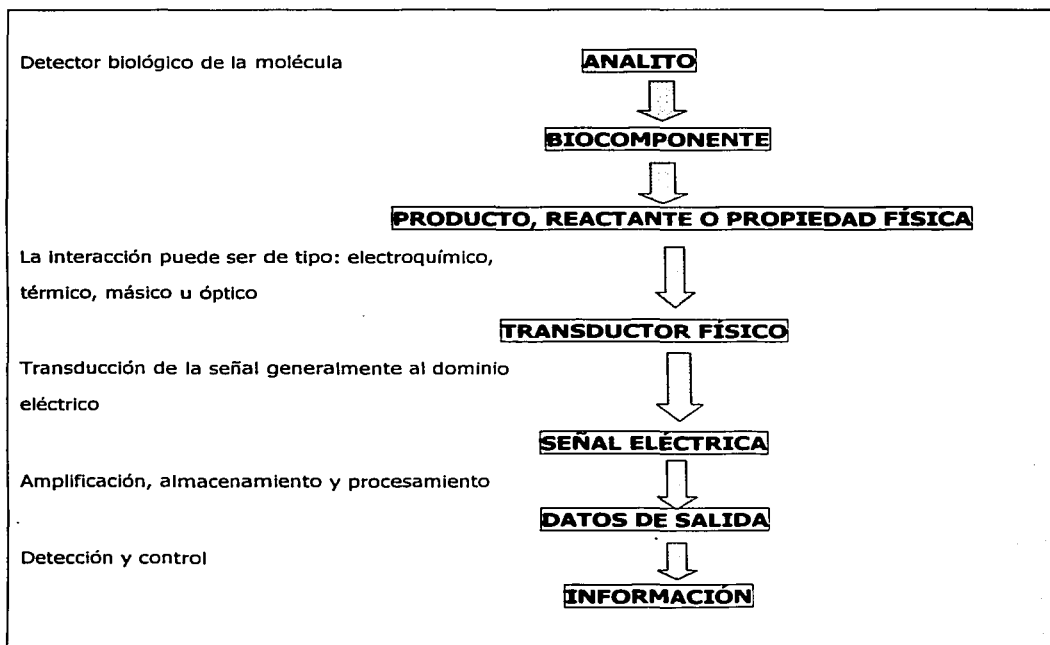


Figura 4 Principio general de operación de un biosensor

Los diferentes tipos de transductores que se emplean son los siguientes:

- **Ópticos.** Se monitorean los cambios en las propiedades ópticas, y pueden ser medidos por absorbanza, fluorescencia, luminiscencia química, interferometría, difracción o polarización. Los transductores ópticos se dividen en dos categorías: (1) modo extrínseco, la luz incidente pasa a través de la muestra e interactúa directamente con ella y (2) modo intrínseco, la luz incidente no pasa directamente a través de la muestra pero se propaga mediante una onda guía.
- **Piezoeléctrico.** Estos transductores son sensibles a cambios de densidad, elasticidad o conductividad eléctrica de la superficie en la que la onda acústica se propaga.
- **Eléctrico.** Existen 6 tipos de transductores eléctricos: potenciométrico, amperométrico, conductimétrico, capacitancia, impedancia y estado de oxidación. Los potenciométricos, que monitorean cambios de pH en el medio, y los amperométricos, que monitorean el potencial redox, son los más utilizados.
- **Térmicos.** Los transductores térmicos monitorean cambios de temperatura, y son útiles en sistemas que utilizan enzimas o microorganismos que catalizan reacciones acompañadas con modificaciones de calor^[5].
- **Electroquímicos.** Sobresale la utilización de transductores electroquímicos con los cuales se puede medir la concentración de peróxido de hidrógeno, oxígeno y la transferencia de electrones. Son simples, sensibles, fiables, de respuesta rápida, precisa y requieren de instrumentación de bajo costo. En estos se utilizan técnicas electroquímicas como son amperometría y potencimetría. Las reacciones enzimáticas de los sustratos regularmente incrementan la sensibilidad de este tipo de transductores, por lo que, esta combinación ha dado resultados exitosos en el empleo de más de 80 sustratos empleados como biocomponentes para la fabricación de biosensores electroquímicos, siendo estos en su mayoría de interés para la industria alimentaria.

En la Tabla 4 se muestran algunos ejemplos de los transductores anteriormente mencionados, señalando más detalladamente algunas de sus ventajas y desventajas, así como sus aplicaciones

Tabla 4 Ventajas y desventajas de diferentes sistemas de biosensores

Transductor	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Sistema óptico	Bajo costo, puede ser miniaturizado, libre de interferencias eléctricas	Requiere de una fuente de alta energía, solo aplica en un intervalo estrecho de concentración, interferencia por la luz del medio ambiente	Acetaldehído, alanina, malato, lactato, nitrato, glucosa, glicerol, etanol, xilitol, isocitrato, sorbitol, glutamato, galactosa.
Piezoeléctrico	Respuesta rápida, simple, estable, bajo costo, no requiere un especial manejo de la muestra	Baja sensibilidad en aplicaciones para muestras líquidas interferencia debidas a enlaces no específicos	Glucosa, <i>Salmonella</i> , <i>E. Coli</i> , <i>Candida</i> , otros microorganismos y toxinas microbianas.
Calorimétrico	Versatilidad, libre de interferencias ópticas tales como color y turbidez	Alto costo, requiere de una gran cantidad de enzima	Acido ascórbico, glucosa, lactato, triglicéridos, colesterol, galactosa, etanol, sucrosa, oxalato, lípidos, xantina e hipoxantina.
Electroquímicos:			
• Electrodo ion selectivo (ISE)	Simple, disponible	Respuesta lenta, requiere de un electrodo de referencia, susceptible al ruido electrónico	Glutamato, urea, nitrito, aminoácidos, glucosa (ISE basado en pH), colesterol y alcoholes (ISE basado en yoduro), Amigdalina (ISE basado en cianuro).
• Electrodo de O ₂	Simple, Alta sensibilidad	Baja sensibilidad	Principalmente desarrollado para glucosa, sulfito, glutamato, etanol, oxalato, L-aminoácido, tirosina, monoamina (junto con una oxidasa o una célula microbiana).
• Electrodo H ₂ O ₂	Simple, Alta sensibilidad	Baja selectividad	Sulfito, glucosa, colesterol, glutamato, nucleótidos, putresina, cadaverina, histamina, L-aminoácidos, aspartama, lactato, glutamina, alcoholes.
• Transistor de efecto de campo ion sensible (ISFET)	Bajo costo, producción de masa, estable, requiere una pequeña cantidad de material biológico, monitoreo de varios analitos simultáneamente	Sensible a la temperatura, fabricación de diferentes capas que han sido perfeccionadas	Glucosa, lactato, urea y varios iones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Posteriormente podremos observar la figura 5, que corresponde a un diagrama a manera de resumen de los biocomponentes y transductores más comúnmente usados en la construcción de biosensores y sus aplicaciones en la industria alimentaria.

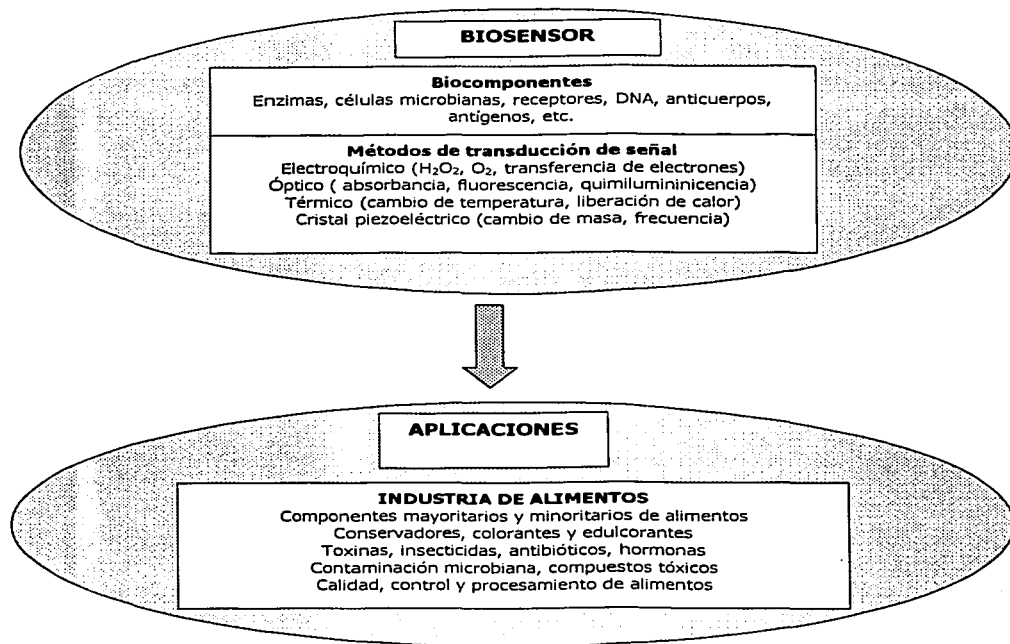


Figura 5 Biocomponentes y transductores comúnmente usados en la construcción de biosensores

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

Este tipo de sensores emplea el elemento de biorreconocimiento en combinación con transductores electroquímicos. Esto significa que el reconocimiento biológico debe transformarse en una señal medible electroquímicamente. Los electrodos pueden ser fácilmente miniaturizados y gracias a la avanzada tecnología de semiconductores y serigrafía estos sistemas pueden ser producidos masivamente. Estas características han hecho posible su gran desarrollo dentro del área de los biosensores, siendo en función del número de publicaciones y sensores comerciales el transductor más favorecido. Son de funcionamiento simple, sensibles, de bajo costo, respuesta rápida y son capaces de operar en soluciones turbias, tales como matrices de alimentos.

Se dividen en tres grupos:

(1) Biosensores amperométricos. En la detección amperométrica, el electrodo se somete a un potencial constante y se mide la corriente eléctrica generada por la conversión electroquímica de la especie redox presente en la disolución. Por tanto, en la interfaz electrodo-disolución se produce una transferencia de electrones entre la disolución y el electrodo. Determinan las corrientes eléctricas asociadas con los electrones involucrados en los procesos redox, basados por lo tanto, en la oxidación o reducción de un compuesto electroactivo en un electrodo mientras un potencial constante es aplicado a éste electrodo con respecto a un segundo electrodo. La corriente resultante es medida en uno de los dos electrodos y corresponde a una medida directa de la velocidad de la reacción electroquímica.

Las ventajas de las técnicas amperométricas como transductores son fundamentalmente la elevada sensibilidad y la rápida respuesta que producen. Los electrodos comúnmente utilizados están contruidos de materiales como platino, oro o carbono. Los inmunosensores amperométricos utilizan sistemas enzimáticos redox.

Biosensor electroquímico que está basado en electrodos de tinta de impresión (SPEs). Estos electrodos de tinta de impresión son de uso portátil, simple y su tecnología de fabricación no es costosa. Originalmente los SPEs eran utilizados para la determinación de glucosa en sangre, pero sus aplicaciones se han ampliado, incluyendo la determinación de otras biomoléculas, insecticidas, metales, aniones y contaminantes. También han sido utilizados para la producción de electrodos para iones específicos. Los biosensores de tinta de impresión son elaborados por la mezcla de un mediador y/o enzima con tinta de carbón; este biosensor consta de un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar, colocados generalmente sobre un soporte cerámico^[6].

(2) Biosensores conductimétricos, determinan cambios en la conductancia asociados con cambios en el ambiente iónico de las soluciones.

Los biosensores potenciométricos han sido reemplazados por los biosensores amperométricos debido a su mejor resolución. Sin embargo, los biosensores potenciométricos presentan ciertas ventajas cuando metabolitos de actividad electroquímica, tales como CO_2 , NH_3 y ácidos orgánicos son secretados por microorganismos; además los electrodos potenciométricos son más baratos que los electrodos amperométricos (por ejemplo, los electrodos para O_2 , H_2O_2)^[5].

(3) Biosensores potenciométricos. Usan electrodos selectivos para ciertos iones; determinan el potencial entre dos electrodos cuando hay un flujo de corriente entre ellos, para determinar cambios en la concentración de los iones escogidos (por ej., iones hidrógeno). Generalmente uno de los electrodos es la referencia y el otro es el indicador o de trabajo. Los aparatos potenciométricos más comunes son el de pH y el electrodo selectivo de iones.

Estos electrodos, caracterizados por una transferencia de carga a través de una interfase en condiciones de corriente cero y en conjunción con diversas enzimas, como marcadores de reacción de afinidad, permiten su utilización para la detección de distintos analitos. Por otro lado, la reducción de las dimensiones de los electrodos utilizados en los biosensores

potenciométricos pueden obtenerse mediante la utilización de dispositivos químicamente sensibles basados en semiconductores. Además de su pequeño tamaño, estos dispositivos pueden beneficiarse de las técnicas estandarizadas de fabricación a gran escala y utilizadas en la industria de semiconductores. El dispositivo representativo de este grupo es el ISFET (transductor de efecto de campo selectivo a iones).

En la figura 6 se ilustra un esquema de un biosensor de tipo ISFET, en donde se logra observar detalladamente cada una de sus partes.

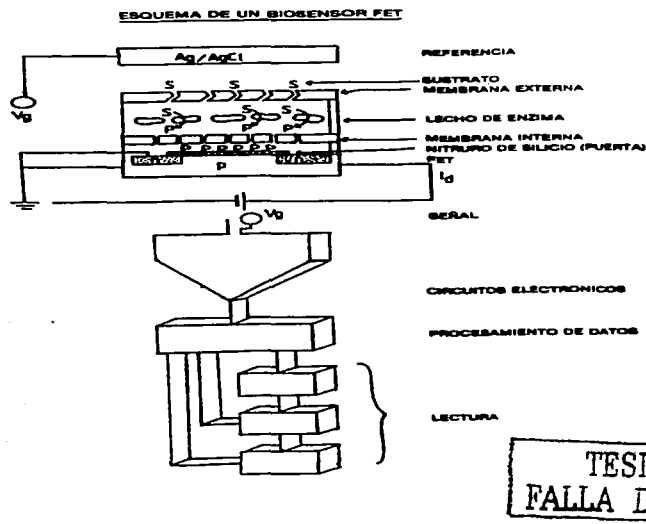


Figura 6 Esquema de un biosensor FET's.

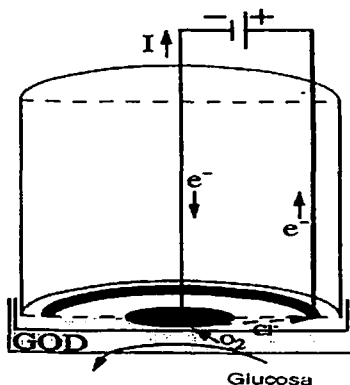
Durante los últimos años se han realizado esfuerzos para producir un biosensor electroquímico miniaturizado, usando unos dispositivos electrónicos convencionales llamados transistores de efecto de campo (FET's), ISFETs (dispositivos ion-selectivos) o CHEMFET (sensores químicos que miden la energía de reacción con moléculas simples).

Sin embargo, todavía no se han resuelto los problemas fundamentales en la construcción de este tipo de biosensores. Las tecnologías requeridas de inmovilización y fabricación necesitan un mayor desarrollo. La estabilidad térmica y química del elemento sensible tiene que ser investigada. En concreto, la encapsulación se ha convertido en un problema crucial mientras que las propiedades de conducción de la superficie del material sensor, tal como nitruro de silicio, se han demostrado que son difíciles de superar. Estos "chips" sensores (aproximadamente 30 mm de diámetro) son similares a los usados en los ordenadores excepto que la puerta metálica que controla la corriente del transistor es reemplazada por un material orgánico o biológico. El material sensible responde a un cambio en el medio circundante, bien sea gaseoso o líquido. La respuesta ejerce un efecto de campo sobre la corriente de fuente a sumidero en el FET. Usualmente esta corriente se mantiene constante mientras se registra la tensión de fuera necesaria para lograrlo.

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA MONITOREAR LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS

Las reacciones redox catalizadas por enzimas pueden formar la base de la mayoría de los biosensores si el flujo de electrones redox se puede determinar. 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 más sencillo biosensor. Este biosensor se usó para la determinación de glucosa y se basa en el electrodo de oxígeno de Clark. La Figura 7 muestra una sección de este sencillo biosensor amperométrico.

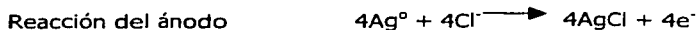


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7 Biosensor amperométrico de glucosa basado en un electrodo de oxígeno que utiliza glucosa-oxidasa (GOD)

Entre el cátodo central de platino y el ánodo circundante de plata/cloruro de plata se aplica un potencial de $-0,6$ V. El oxígeno molecular disuelto se reduce en el cátodo de platino y el circuito se cierra mediante una solución saturada de KCl. El compartimento del electrodo está separado del biocatalizador por una fina membrana de plástico, permeable sólo para el oxígeno, y a menudo, hecha de Teflón. Una membrana que es permeable sólo

a moléculas de bajo peso molecular, incluyendo los reactivos y los productos, mantiene próximo el biocatalizador al electrodo.



La glucosa se determina por la disminución de la concentración del oxígeno molecular disuelto cuando la glucosa-oxidasa cataliza la siguiente reacción redox:



Se pueden ajustar las condiciones de forma que la velocidad a la cual se pierde oxígeno del compartimiento que contiene el biocatalizador sea proporcional a la concentración de glucosa de la solución analizada. Se pueden usar otras oxidasas con esta configuración básica, incorporándolas a una membrana por inmovilización mediante tratamiento de la(s) enzima(s) disuelta(s) y una proteína diluyente con glutaraldehído en un soporte de nylon o celulosa. Un método alternativo para determinar la velocidad de reacción es detectar el peróxido de hidrógeno producido directamente, invirtiendo la polaridad de los electrodos y usando una membrana de acetato de celulosa en lugar de una de Teflón para retardar los aniones y permitir el paso del peróxido de hidrógeno (Figura 8b).

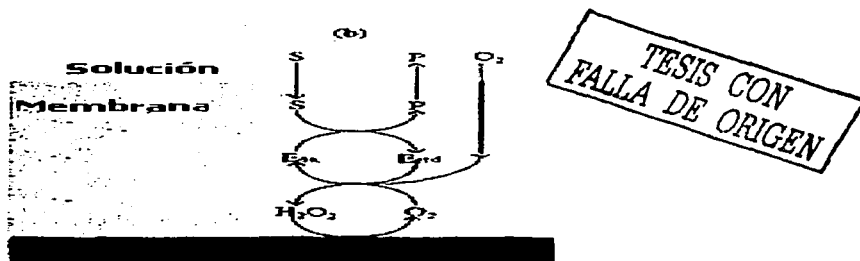
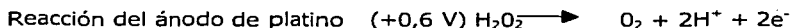


Figura 8 Mecanismos redox para la configuración (b) de un biosensor amperométrico.

Este tipo de electrodos se podrían incluso utilizar en la determinación de sustratos para los cuales no existen oxidasas directas. Éste es el caso de la sacarosa, que puede ser determinada incorporando una capa de invertasa sobre la de glucosa-oxidasa para producir glucosa, la cual sí puede ser determinada con su oxidasa. Las interferencias con la glucosa presente en las muestras se minimizan incluyendo una fina capa anti interferencia compuesta por glucosa-oxidasa y peroxidasa por encima de ambas capas que elimina la glucosa sin reducir significativamente la difusión de oxígeno hacia el electrodo. Una solución alternativa que permite analizar conjuntamente glucosa y sacarosa aprovecha el período de retardo que existe entre la detección de la glucosa existente en el medio y la que se produce por la acción de la invertasa sobre la sacarosa (Figura 9).

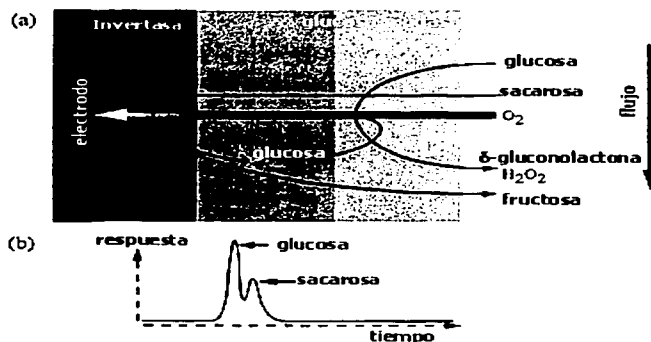


Figura 9 Membrana para sacarosa con capa anti-interferencia y controlada cinemáticamente. La muestra se introduce en un rápido pulso en la corriente.

Un avance importante en el desarrollo de biosensores microamperométricos proviene del descubrimiento de la capacidad del pirrol para polimerizarse mediante oxidación electroquímica en condiciones lo suficientemente suaves como para atrapar enzimas y mediadores en su superficie sin desnaturalizarlos. De esta forma, se puede recubrir la superficie de pequeños electrodos polimerizando pirroles junto con biocatalizadores y mediadores, utilizando métodos de microfabricación de microprocesadores, e incluso, disponiendo varios sensores en los mismos (Figura 10).

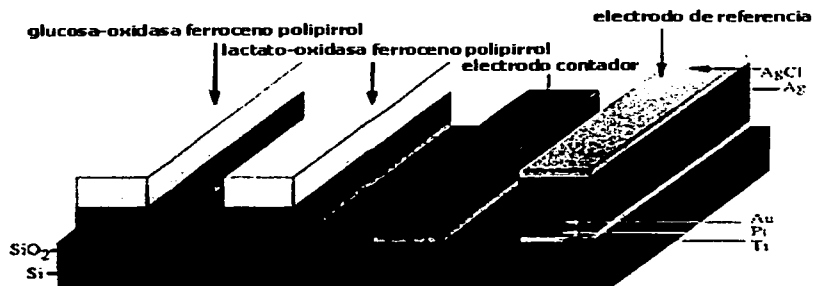
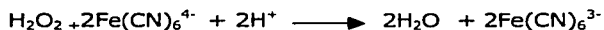
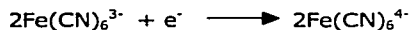


Figura 10 Microelectrodo combinado para detectar glucosa y lactato.

Se ha diseñado un biosensor que consiste en un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo de tinta de carbón que contienen una especie electrocatalítica, cobalto ftalocianina; el electrodo es cubierto con una capa de acetato de celulosa y la enzima (glucosa oxidasa), la especie electrocatalítica permite la detección de H_2O_2 en un potencial de 0.40 (V/Ag/AgCl). La capa de acetato de celulosa actúa como un soporte para la enzima y también como una membrana selectiva, lo cual excluye compuestos interferentes tales como ácidos ascórbico y el ácido úrico. Marcinkenviviene y Kulys (1993) utilizan también la producción de H_2O_2 para la determinación de glucosa, pero utilizan hexacianoferrato (II) como mediador, lo cual requiere de una enzima (peroxidasa de rabano, PO) adicional para su conversión a hexacianoferrato (III).



El hexacianoferrato (III) enlazado en la superficie es electroquímicamente reducido nuevamente a hexacianoferrato (II).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La señal proviene de la reducción electroquímica se observa a un potencial de 0.0V vs Ag/AgCl.

Koopal et al. (1994), desarrollaron un biosensor de Glucosa que consiste en la polimerización de pirrol sobre un electrodo de platino previamente cubierto con una capa de latex, el cual es posteriormente inmerso en una solución de enzima (GOD), una vez seco la membrana de latex-polipirro-GOD fue removida, tamizada y mezclada con grafito generando así el electrodo de trabajo, el electrodo de referencia es de Ag/AgCl y un auxiliar de carbono. La glucosa fue determinada amperométricamente a 0.35V.

Silber et al. (1996), exploraron la posibilidad de emplear glucosa deshidrogenasa; esta reacción requiere el factor NAD^+ como aceptor de electrones para generar NADH que es electroquímicamente oxidado para producir la respuesta a medir^[6].

Un biosensor que detecta la concentración de glucosa en sangre, construido y vendido para el control de los enfermos diabéticos, se basa en este sistema y presenta un aspecto muy similar al de un bolígrafo (Figura 11). El área detectora es un dispositivo con un electrodo de un solo uso que se acopla a la punta del aparato. Este electrodo está fabricado mediante deposición sobre una tira de plástico y consta de un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo de carbono con glucosa-oxidasa y un mediador de ferroceno derivado. Ambos electrodos están cubiertos con un tejido hidrofílico que permite el paso de moléculas de diversos tamaños para asegurar la difusión homogénea de la gota de sangre y evitar procesos de evaporación desigual. Los electrodos se mantienen secos hasta que se usan y duran una media de seis meses si se mantienen en su envoltorio de aluminio. Detectan concentraciones de glucosa de entre 2 y 25 mM en una gota de sangre y muestran el resultado en 30 segundos. Cientos de miles de personas con diabetes usan estos biosensores habitualmente en más de 50 países del mundo^[3].

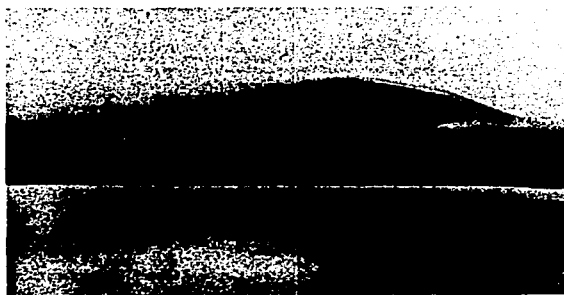


Figura 11 Los sensores *MediSense Exac Tech Companion y Pen*, junto con sus tiras reactivas. Fabricados por *MediSense Contract Manufacturing Ltd. Abingdon, Oxfordshire, UK.*

APLICACIÓN INDUSTRIAL DE BIOSENSORES PARA MONITOREAR GLUCOSA

Una aplicación industrial de estos biosensores se encuentra en el control de procesos biotecnológicos, en los que la determinación de glucosa es de gran interés, ya que este monosacárido no solo es la principal fuente de carbono sino que también es el sustrato limitante de crecimiento. Operacionalmente, un exceso en la concentración de glucosa puede ocasionar una sobreproducción de ácido láctico, lo cual se refleja en la distribución del pH. La concentración de glucosa puede ser usada para ajustar el metabolismo celular entre los estados glicolítico y oxidativo.

Los sistemas analíticos para monitorear la concentración de glucosa en procesos biotecnológicos tales como la fermentación deben cumplir tres requisitos: mantener la esterilidad, permitir la determinación en un amplio intervalo de concentración y proporcionar los resultados en un tiempo rápido. En el monitoreo de procesos que se efectúa en bioreactores, existen dos posibles estrategias disponibles usando biosensores.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. El biosensor es usado afuera del reactor, por ejemplo un sensor enzimático externo.
2. El biosensor es colocado *in situ* en el reactor.

La utilización de biosensores *in situ* puede ser ventajosa cuando se tienen dificultades en la extracción y transporte de la muestra, pero también presentan ciertas desventajas, tales como: el sensor debe poder ser esterilizado, el modo de operación no permite el tratamiento de la muestra o la manipulación de las condiciones del medio ambiente de la muestra con respecto al pH, capacidad amortiguadora o concentración de oxígeno, la recalibración del sensor se dificulta y es necesario para el proceso el control de temperatura y presión.

El uso de biosensores fuera del reactor pero en línea presenta grandes ventajas: no se requiere la esterilización del sensor, el pH puede ser ajustado por la adición de un amortiguador apropiado y la determinación de la temperatura puede realizarse fácilmente. Para estos procesos de monitoreo se requiere de técnicas eficientes de muestreo con la capacidad de obtener muestras repetitivas, esto se consigue con el uso de un sistema de análisis de inyección de flujo (FIA).

La posibilidad del uso de biosensores como sistemas de monitoreo en procesos biotecnológicos fue probada por la determinación de la concentración de glucosa utilizada en la fermentación de tres tipos de procesos:

1. La fermentación de un medio industrial por *E. Coli*.
2. La fermentación de malta para obtener cerveza con *Saccharomyces cerevisiae*.
3. La fermentación ácido láctica por *Lactobacillus plantarum*⁷¹.

A continuación se presenta una lista (tabla 5) de los biosensores que monitorean glucosa disponibles en el mercado para el uso de la industria de alimentos.

Tabla 5 Biosensores para monitorear Glucosa disponibles en el mercado.

Manufacturera/ instrumento	Compuesto de análisis	Comentarios
Yellow Springs Instruments (YSI) Analysers (Yellow Springs, OH, EE.UU.)	Glucosa, lactato, etanol, sucrosa, lactosa, glutamato	Los analitos son cuantificados entre 1 min. De inyección, H ₂ O ₂ es detectado electroquímicamente.
Glucoprocasseur (Solea-Tacussel, VillVilleubanne, Francia)	Glucosa y lactato	El principio de detección es similar al YSI analyser. Glucosa y L-lactato pueden ser ensayados cada 90 seg.
EKSAN Enzyme Analysers (patentado en la antigua URSS)	Glucosa, lactosa, sucrosa, L-Lactato, etanol y amino-ácidos	H ₂ O ₂ es detectado
ESAT Glucose Analyser (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)	Glucosa	Se detecta H ₂ O ₂ , cada membrana de glucosa oxidasa es útil para 2000 ensayos.
Apec glucose analyser (Danvers, MA, EE.UU.)	Glucosa	El consumo de oxígeno es detectado.
Biometra biosensors for HPLC (Biometra Biomedizinische analytik GMBH, Gotinga, Alemania)	Glucosa, metanol y etanol	Separación por HPLC con biosensor detección postcolumna.
Toyo Jozo Biosensors (Tokio, Japón)	Glucosa, lactato, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos.	Las enzimas son inmovilizadas en un electrodo para O ₂ .

En la tabla anterior se muestra que los biosensores son variados y ampliamente utilizados por la industria de alimentos. Este tipo de biosensores están basados en tecnologías, tales como electrodos para detectar concentraciones de oxígeno o peróxido de hidrógeno con una enzima oxidasa inmovilizada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA^[8]

En el método de Voltamperometría cíclica (VC) el barrido de voltaje puede ser de hasta 100 V s^{-1} . No obstante, en condiciones normales la velocidad de barrido de voltaje es cercana a $0.01 - 1 \text{ V s}^{-1}$. En un experimento de VC, el electrodo de trabajo puede ser de oro, platino, carbono, mercurio, o cualquier otro material conductor electroquímicamente inactivo dentro del intervalo de potencial que se va a barrer. Como ocurre con todas las técnicas de voltamperometría, se barre el voltaje y se mide simultáneamente la corriente resultante. Sin embargo no se emplean protocolos de pulsos de potencial o de muestreo especial de corriente. El barrido del voltaje no es unidireccional, como en la voltamperometría lineal.

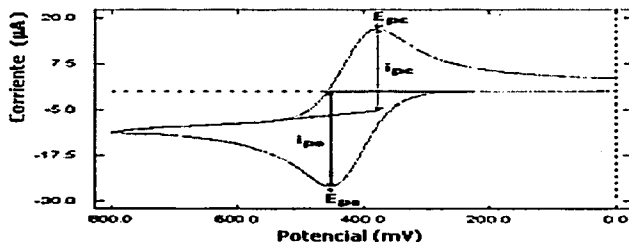


Figura 12 Voltamperograma cíclico.

Se definen los potenciales picos anódicos y catódicos y las corrientes de pico. Las corrientes de pico se miden a partir de la línea base extendiéndose hasta la región antes de que se inicie la electrólisis. El potencial se barre como se indica en la figura 12. Los ejes de voltaje de ambas gráficas son iguales. La parte "cíclica" que aquí se muestra se inicia al potencial de cero volts en relación con el potencial de referencia. El sentido del primer barrido se dirige hacia potenciales más positivos y da como lugar la oxidación del compuesto. Después se invierte el barrido. El pico catódico se debe a la reducción del material que se oxidó anteriormente durante el barrido. La oxidación original produce el pico anódico.

Antes de describir el origen de esta curva de forma extraña, es necesario proporcionar algunas definiciones y una explicación de las convenciones que se tuvieron en cuenta para la gráfica.

- En el eje horizontal, que corresponde al voltaje, se colocan los potenciales más negativos hacia la derecha y los más positivos hacia la izquierda. Esta convención surge de la polarografía. Sin embargo, también se emplea con frecuencia la convención opuesta, de modo que es preciso leer los rótulos del eje con cuidado.
- Cuando se colocan los potenciales más negativos hacia la derecha, las corrientes para la reducción se grafican en forma creciente (hacia arriba), como se observa en el voltamperograma de la figura 12. Estas se denominan **corrientes catódicas** y se representan por i_c . En consecuencia, las corrientes oxidativas (**anódicas**) i_a se grafican en forma descendente.
- El barrido de voltaje comenzó en cero y procedió hacia el lado positivo. El barrido de voltaje hacia potenciales más positivos se llama **barrido positivo**. El barrido de voltaje hacia potenciales más negativos se llama barrido negativo.
- Hay picos en las corrientes como se observa en la figura 12. el potencial al cual se alcanza el pico con la corriente catódica se llama **potencial de pico catódico** y se abrevia E_{pc} o $(E_p)_c$. El potencial de pico anódico se abrevia como se indica, E_{pa} .
- Las corrientes que corresponden a los picos se abrevian i_c e i_a y se refieren, respectivamente, a las corrientes de los picos catódicos y anódicos.
- Las corrientes de pico se miden como corrientes por encima de los niveles de fondo. La extrapolación del fondo se indica en la figura mediante las líneas punteadas. La magnitud (por encima del fondo) de cada corriente de pico (si las demás condiciones permanecen constantes) es proporcional a la concentración de la especie electroactiva que participa.

- La diferencia de voltaje entre los picos es inversamente proporcional al número de electrones que se transfieren. Algebraicamente,

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{0.059}{n} \quad \text{a } 25^{\circ}\text{C}$$

La ecuación es válida para los pares electroquímicos reversibles. Si la reacción no es reversible en el electrodo, entonces los picos estarán más distantes. De este modo la relación sólo es válida dentro del límite de la reversibilidad; de lo contrario, la ecuación describe el límite inferior para la separación de los picos. Teniendo esto en cuenta, se puede determinar el valor de n , el número de electrones transferidos en la reacción, a partir de voltamperogramas cíclicos.

Como se observa, las posiciones de los picos son muy útiles y permiten determinar los potenciales redox en pocos minutos. Cada par redox reversible produce un conjunto de picos (uno anódico y otro catódico) centrados en torno a E° . Por consiguiente un voltamperograma cíclico indica con rapidez la presencia de cualquier especie que experimente reacciones de oxidación-reducción en el electrodo, dentro de los límites fijados por la electrólisis del disolvente y la descomposición del electrodo. Sin embargo los potenciales formales deben ser suficientemente distintos para que se logre la resolución de los picos debidos a cada par redox.

CRONOAMPEROMETRÍA^[9,10,11]

Está constituida por dos etapas: un periodo de concentración o preelectrólisis, en el que el componente deseado se deposita anódica o catódicamente, y una etapa de electrólisis inversa en la cual se determina el componente. En la variante anódica del análisis por redisolución el metal o los metales considerados se reduce con un potencial controlado por un tiempo fijo en condiciones constantes de geometría y agitación. El electrodo de trabajo en algunos casos es un electrodo sólido inerte, tal como platino o carbón. La disolución anódica final o proceso de redisolución implica una exploración anódica lineal en la que se oxida el metal.

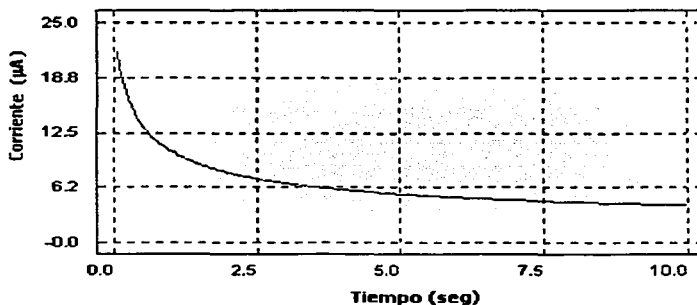
Esta técnica utiliza un potencial constante a un tiempo determinado al principio el aporte de la corriente es por parte de la corriente capacitiva, hasta que comienza a dominar la corriente de difusión y alcanza su valor máximo en la corriente límite de difusión en donde todo lo que llega al electrodo se electroliza, de ahí que el patrón de la curva se haga asintótica. Encontrando la solución para la ecuación de difusión en el caso donde esta presente un oxidante se tiene la ecuación de Cottrell:

$$i_d(t) = \frac{nFAD_0^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

Donde: **n** = número de electrones transferidos/molécula
F = constante de Faraday (96,500 C mol⁻¹)
A = área del electrodo (cm²)
D = coeficiente de difusión (cm² s⁻¹)
C = concentración (mol cm⁻³)

Nótese que el efecto de la disminución de la especie electroactiva cercana a la superficie es caracterizado por una función inversa de t^{1/2}.

En las mediciones prácticas de i-t, en las "condiciones de Cottrell", uno deberá ser precavido del instrumental y de las condiciones experimentales. En la figura 13 se muestra un Cronoamperograma, el cual ilustra más detalladamente la técnica anteriormente descrita.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 13 Cronoamperograma de corriente contra tiempo a un potencial constante de electrólisis.

En la figura anterior se observa un cronoamperograma a un potencial constante de electrólisis, en donde logramos distinguir una señal en color rojo, la cual nos indica diferentes valores de corriente (µA), con respecto al tiempo (sec).

MICROCELDA DE DETECCIÓN ENZIMÁTICA

La Microcelda Electroanalítica de Detección Enzimática como se observa en la figura 14, es un dispositivo que contiene una superficie reactiva proporcionada por la incorporación de una sustancia bioactiva (Glucosa Oxidasa), en la cual se genera una respuesta capaz de ser medida cuando ésta es puesta en contacto con una especie de interés (analito: glucosa). El aparato y la instrumentación asociada convierten la respuesta, cuantitativa, entre analito-superficie reactiva en unidades de concentración de analito. La transformación del analito por el transductor bioquímico en otra especie química (Peróxido de Hidrógeno), es convertida en una señal medible por el transductor físico (potenciostato-galvanostato, el programa Volta Master y MIMP).

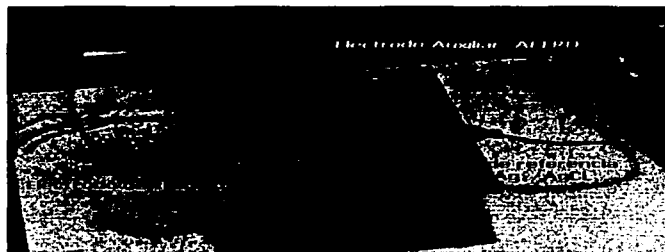


Figura 14 Microcelda de Detección Enzimática.

La Microcelda Electroanalítica de Detección Enzimática para ensayos con glucosa, que en esencia es un biosensor, puede ser incorporado con transductores numéricos y el bio-componente empleado a la Glucosa oxidasa (GOD), donde la glucosa es una especie que puede ser determinada utilizando la función catalítica de enzima. La reacción enzimática que involucra a la (GOD), oxígeno y glucosa seguido por la oxidación electrocatalítica de peróxido de hidrógeno y ácido glucónico, que se representa de la siguiente manera:



La reducción del oxígeno o la oxidación del peróxido de hidrógeno es realizada en un electrodo de platino a -600 y $+600$ mV/ECS, respectivamente.

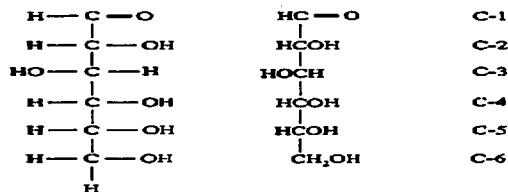
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CARACTERÍSTICAS DE LA GLUCOSA

La D-glucosa, el carbohidrato más abundante y también el compuesto orgánico más abundante (sí se consideran todas sus formas de combinación), pertenece a la clase de los carbohidratos denominados monosacáridos. Los monosacáridos son moléculas de carbohidratos que no pueden ser degradadas a moléculas de carbohidratos más simples por hidrólisis, por lo que son conocidos a menudo como azúcares simples. Estos pueden unirse para formar estructuras mayores, oligosacáridos y polisacáridos, que a su vez pueden ser convertidos en monosacáridos por hidrólisis ^[13].

La D-glucosa es al mismo tiempo un polialcohol y un aldehído. Es clasificada como una aldosa, término con el que se designan a los azúcares que contienen un grupo aldehído. La terminación *-osa* significa que es un azúcar, el prefijo *ald-* significa que posee un grupo aldehído. Cuando la D-glucosa se representa de forma abierta o vertical, como una cadena lineal, conocida como estructura acíclica, con el grupo aldehído en (posición 1) en la parte superior y en el grupo hidroxilo primario (posición 6) en la parte inferior, se observa que todos los grupos hidroxilo secundario se encuentran en átomos de carbono que poseen cuatro sustituyentes distintos.

En consecuencia, estos átomos de carbono son quiráticos. La glucosa posee cuatro átomos de carbono quiráticos: C-2, C-3, C-4 y C-5. A la glucosa existente en la naturaleza se le designa D-glucosa. Existe también una forma molecular que es la imagen en el espejo de la anterior denominada L-glucosa. Puesto que cada átomo de carbono quiral tiene una imagen en el espejo, existen 2ⁿ formas de estos átomos. Por tanto, en una aldosa de seis carbonos, existen 2⁴ o, lo que es lo mismo, 16 formas diferentes de los átomos de carbono que contienen grupos hidroxílicos secundarios, lo que permite la formación de 16 azúcares de seis carbonos con un grupo aldehído. Ocho de ellos pertenecen a la serie D (véase en la figura 16), otros ocho son sus imágenes en el espejo y pertenecen a la serie L.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 15 D- glucosa (cadena abierta o estructura acíclica).

Todos los azúcares que presentan el grupo hidroxilo en el átomo de carbono quirático con el número más alto (C-5 en este caso) en el lado derecho se les conoce arbitrariamente azúcares de la serie D, y a los que presentan ese grupo hidroxilo en el lado izquierdo se les denomina L- azúcares. En la figura 15 se recogen dos representaciones distintas de la D-glucosa en su forma abierta, acíclica (llamada proyección de Fischer), con los átomos de carbono numerados a la manera convencional. A la D-glucosa y a todos los demás azúcares que contiene seis átomos de carbono se les denomina hexosas, y es el grupo más común el de las aldosas.

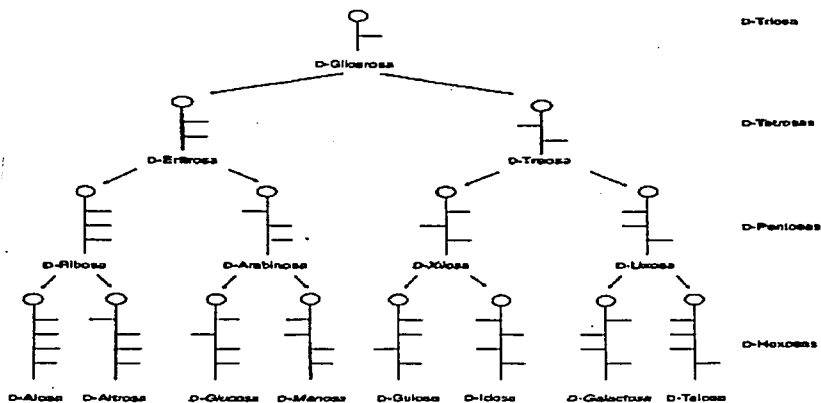


Figura 16 Estructuras de Rosanoff de las D-aldosas que contienen de 3 a 6 átomos de carbono.

En esta figura, el círculo representa el grupo aldehído, las líneas horizontales denotan la localización de cada uno de los grupos hidroxilo en su átomo de carbono quirállico, y en la parte inferior de las líneas verticales están los grupos hidroxilo primarios terminales no quirállicos. Esta forma abreviada de representar la estructura de los monosacáridos se denomina método de Rosanoff. Los azúcares cuyos nombres se encuentran en *itálica* en la figura 16 se hallan comúnmente en plantas, casi exclusivamente en forma combinada. Por tanto, forman parte de nuestra dieta en sus formas combinadas.

La D-glucosa es casi la única aldosa libre habitualmente en los alimentos naturales, y sólo en pequeñas cantidades.

ISOMERIZACIÓN DE MONOSACARIDOS (D-Glucosa) ^[13]

Las aldosas y cetosas sencillas que contienen el mismo número de átomos de carbono son isómeros entre sí; es decir una hexosa y una hexulosa poseen ambas la fórmula empírica $C_6H_{12}O_6$ y pueden interconvertirse una en otra por isomerización. La isomerización de monosacáridos implica tanto al grupo carbonílico como al hidroxílico adyacente. En esta reacción, una aldosa se convierte en otra aldosa (con la configuración opuesta en C-2) y la cetosa correspondiente, y a su vez la cetosa se convierte en dos aldosas correspondientes. Así pues, por isomerización, la D-glucosa, la D-manosa y la D-fructosa son interconvertibles entre sí (figura 17). Esta isomerización puede ser catalizada tanto por un ácido como por una base.

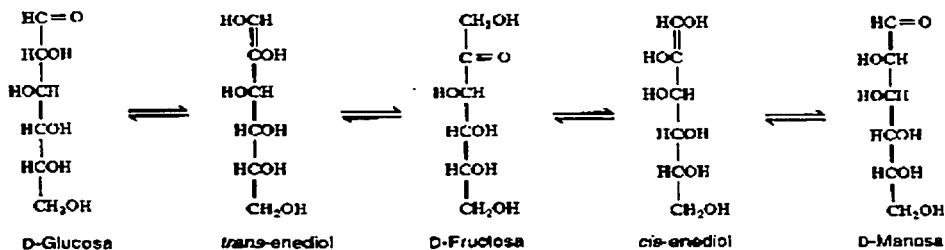


Figura 17 Interrelaciones de D-glucosa, D-manosa y D-fructosa vía isomerización.

FORMAS CÍCLICAS DE LA D-GLUCOSA [13].

La formación de hemiacetales puede darse dentro de la misma molécula de aldosa o cetosa, en las cuales la función carbonílica reacciona con una de los grupos hidroxilo convenientemente situado, tal como se ilustra en la figura 18 con la molécula de D-glucosa tumbada sobre un lado y plegada. El azúcar en forma de anillo de seis vértices resultante es denominado piranosa. Es preciso notar que para que el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la posición C-5 reaccione para formar el anillo, el C-5 debe rotar para situar su átomo de oxígeno hacia arriba. Esta rotación lleva al grupo hidroximetilo (C-6) a una posición por encima del plano del anillo de la D- glucopiranososa utilizada en la figura 17 es conocida como proyección de Haworth.

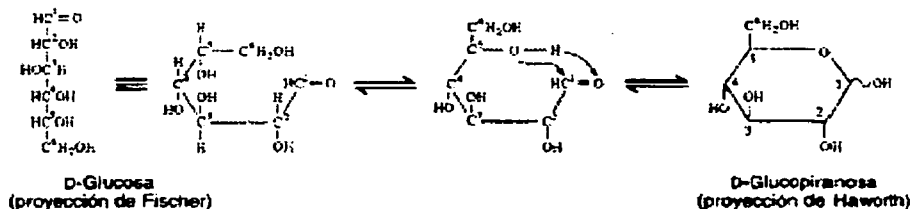
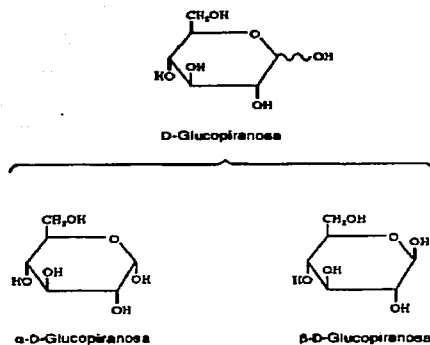


Figura 18 Formación de un anillo hemiacetalítico piranósico a partir de D-glucosa.

Cuando el átomo de carbono del grupo carbonilo está implicado en la formación del anillo, dando lugar a la constitución de un hemiacetal (piranosa), se transforma en quirálico. En los azúcares de la serie D, la configuración en la que el grupo hidroxilo está localizado por debajo del plano del anillo se denomina alfa. Por ejemplo, entonces, la α -D-glucopiranososa es la D-glucosa en la forma cíclica piranósica con la configuración del nuevo átomo de carbono quirálico, C-1 denominado átomo de carbono anomérico alfa. Cuando el nuevo grupo hidroxilo formado en C-1, está situado por encima del anillo está en la posición beta, y la estructura es denominada β -D-glucopiranososa. Esta forma de designación sirve para todos los azúcares de la serie D. Para los azúcares de la serie L, todo lo opuesto es válido – es decir el grupo anomérico está arriba en el anómero alfa y abajo en el anómero beta – (véase por ejemplo en la figura 19).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 19 La D-glucopiranosas es una mezcla de dos formas quirales.

Esto es así porque, siguiendo con el ejemplo, la α -D-glucopiranosas y la α -L-glucopiranosas son imágenes especulares una a la otra.

Utilizando la β -D-glucopiranosas como ejemplo, C-2, C-3, C-5 y al átomo de oxígeno del anillo se encuentran en un plano, mientras que C-4 está ligeramente elevado por encima del plano, y C-1 ligeramente por debajo del plano tal como se observa en la figura 20, esta conformación se le designa 4C_1 .

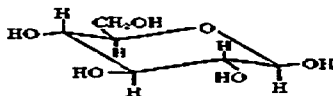


Figura 20 β -D-glucopiranosas en la conformación 4C_1 . Los grupos de mayor tamaño se encuentran en las posiciones ecuatoriales, mientras que todos los átomos de hidrógeno están en posiciones axiales.

Como ya se ha indicado la β -D-glucopiranosas tiene todos sus grupos hidroxilo en posición ecuatorial, pero cada una de ellos se sitúa ligeramente por encima o por debajo de la posición ecuatorial real. El grupo hidroxilo más voluminoso, C-6 en las hexosas, se sitúa casi siempre en una posición ecuatorial esféricamente libre.

Los anillos de azúcar hexagonales son muy estables, si los grupos laterales, tales como los hidroxilos y los hidroximetilos, están en posición ecuatorial. Por ello, la β -D-glucopiranosas al disolverse en agua produce una mezcla, que se equilibra rápidamente, de la forma abierta de la cadena y las formas cíclicas de cinco, seis y siete lados. A temperatura ambiente, las formas cíclicas de seis lados (piranosas) predominan, seguidas por las de cinco lados (furanosas) y sólo trazas de las siete lados. La disposición anomérica de cada anillo puede ser alfa o beta. La cadena abierta, la que contiene un grupo aldehído, constituye solo alrededor del 0.003 % del total de las formas presentes (Figura 21).

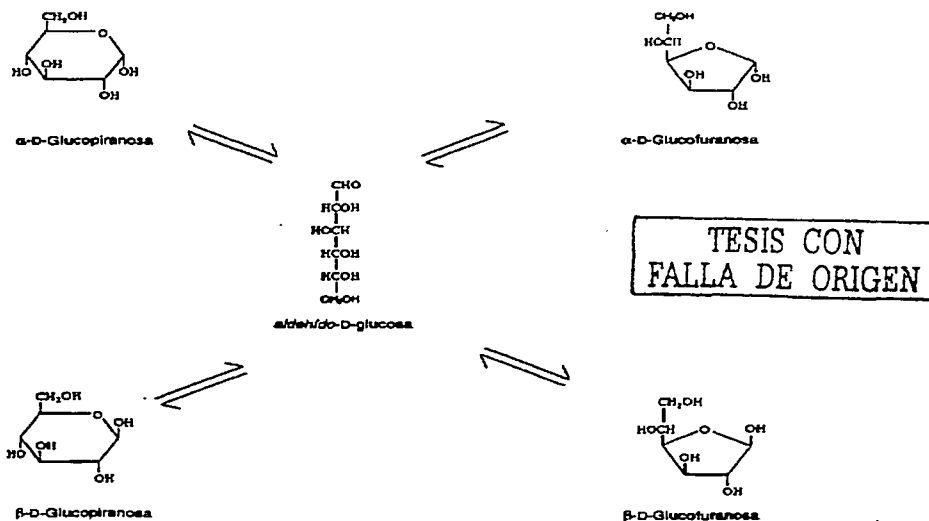


Figura 21 Interconversión de las formas cíclicas y acíclicas de la D-glucosa.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA GLUCOSA

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

ANALISIS DE GLUCOSA EN ALIMENTOS^[14]

La determinación de glucosa en productos alimenticios presenta especiales problemas para los analistas, principalmente debido a la relativa complejidad de las mezclas encontradas en los alimentos comunes. Otro aspecto importante, en la aplicación de los métodos analíticos, es el poco conocimiento que se tiene de la química de las reacciones involucradas, de tal manera que la mayoría de los métodos utilizados son de tipo empírico. Esto eventualmente puede llevar a confusiones en la conclusiones obtenidas de un análisis específico.

El análisis de glucosa se realiza principalmente para determinar:

- Calidad Nutricional
- Estabilidad química
- Verificación de la calidad
- Control de procesos, etc.

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA POR METODOS OFICIALES

Método polarométrico (En azúcar y jarabes).

La actividad óptica de los azúcares libres provee un método para la cuantificación de su concentración en solución. La precisión del método depende de la presencia de otras especies ópticamente activas en la solución. Los métodos basados en mediciones polarométricas han sido ampleamente utilizados para la cuantificación de sacarosa en presencia de otros azúcares, particularmente productos de hidrólisis.

Reducción de cobre

Los azúcares libres, principalmente los monosacáridos tienen propiedades reductoras importantes. Reducen las soluciones alcalinas de las sales metálicas produciendo el óxido o el metal libre. El analista ha hecho uso de esta propiedad, principalmente con sales de cobre y la mayoría de los procedimientos están basados en la determinación del óxido de cobre formado en esta reacción.

La reacción entre el azúcar y el sulfato de cobre parece no ser estequiométrica y el rendimiento de óxido de cobre depende de las condiciones de la reacción. Los principales factores que afectan la reacción son la velocidad de calentamiento, la alcalinidad del medio y la concentración del reactivo.

Lane-Eynon (Fehling)

Las aldosas son fácilmente oxidadas a ácidos aodónicos. La reacción es utilizada con frecuencia para la determinación cuantitativa de azúcares. El reactivo de Fehling es una solución alcalina de cobre (II) que oxida una aldosa a un aldonato, y en el proceso es reducido a cobre (I), el cual precipita como Cu_2O , de color rojo ladrillo. El proceso de oxidación del grupo aldehído de una aldosa a la sal del grupo ácido carboxílico, el agente oxidante es a su vez reducido, por lo que a las aldosas se les conoce también como azúcares reductores.

La determinación volumétrica en que se mezcla una cantidad conocida de solución azucarada con la solución alcalina de cobre, esta mezcla se calienta a ebullición y después de 15 minutos se agrega más solución azucarada con una bureta, hasta la desaparición del color azul del reactivo y el viraje de azul de metileno, que es utilizado como indicador. La cantidad de azúcar se determina comparando la cantidad de solución utilizada por el problema con la utilizada por una solución estándar.

Munson-Walker

En este método, el óxido cúprico producido es recuperado y se convierte en gravimétrico al pesarlo o en volumétrico al titular el óxido recuperado con permanganato de potasio. En ambos casos, la cantidad de azúcar se obtiene de unas tablas desarrolladas para tal fin.

Prueba de Barfoed (Identificación de monosacáridos)

También utiliza el poder reductor de los azúcares libres, principalmente los monosacáridos, de tal manera que es útil para diferenciar mono- de disacáridos. El reactivo está compuesto de acetato de cobre en medio ácido, que al reaccionar con los monosacáridos produce un precipitado rojo de óxido cuproso.

REACCIONES ENZIMÁTICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA^[14]

En algunas ocasiones se requiere la cuantificación específica glucosa presente en una mezcla alimenticia y los métodos descritos con anterioridad no son lo suficientemente específicos para la cuantificación de un único carbohidrato. En este sentido los métodos enzimáticos, generalmente acoplados a reacciones cuyo producto puede ser cuantificado espectrofotométricamente, han sido ampliamente estudiados.

Las reacciones enzimáticas tienen las siguientes características:

- Son muy específicas
- Han sido desarrolladas principalmente para conocer estructuras
- No requieren la separación de los azúcares
- Generalmente son reacciones acopladas

FALLA DE ORIGEN

Oxidación de D-glucosa catalizada por glucosa oxidasa^[13]

Un método sencillo y específico para la oxidación cuantitativa de D- glucosa a ácido D- glucónico es utilizando a la enzima Glucosa Oxidasa, que da lugar a la formación intermediaria de la lactona-1,5 (un éster intermolecular) del ácido (figura 22). La reacción es utilizada comúnmente para medir la concentración de D-glucosa en alimentos y otros materiales biológicos, incluida la sangre. El ácido D-glucónico es un constituyente natural de los zumos de frutas y de la miel.

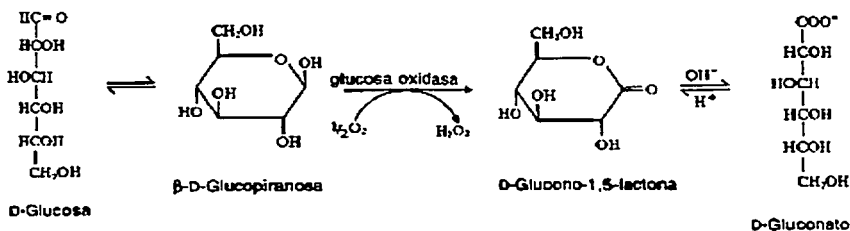


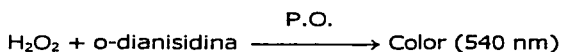
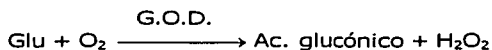
Figura 22 Oxidación de D-glucosa catalizada por glucosa oxidasa.

La reacción que se muestra en la figura 22 es utilizada también para la manufactura del ácido D-glucónico comercial y de su lactona.

Glucosa oxidasa/peroxidasa^[15]

La glucosa es oxidada por la Glucosa oxidasa ácido glucónico y peróxido de hidrógeno y así se puede determinar por reacción del peróxido de hidrógeno con reactivos para formar productos coloridos o utilizando detectores selectivos como son electrodos polarográficos de oxígeno (Okinda y Miwa, 1974) ^[15].

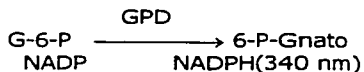
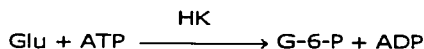
Glucosa oxidasa/peroxidasa (Glucostat). 10-100 mg/ml ^[14].



Hexocinasa/glucosa-6-P deshidro^[15].

El procedimiento enzimático con la hexocinasa para la glucosa es sensible y específico y se usa como basa para la determinación de otros azúcares de las alimentos (BCL, 1979). Consiste en la conversión de la glucosa en glucosa-6-fosfato (G-6-P) por adición de la hexocinasa y el trifosfato de adenosina (ATP). Este compuesto se puede oxidar en presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la coenzima nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP) a gluconato -6-fosfato en la reducción simultanea de NAP a su foema reducida NADPH. La concentración de NADPH, determina por espectrofotometría a 340 o 366 nm, es equivalente a la concentración inicial de glucosa ^[15].

Hexocinasa/glucosa-6-P deshidro. 0.1-1.0 mg/ml ^[14].



APLICACIONES

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

CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA [16,17,18]

NÚMERO DE CLASIFICACIÓN: (E:C) 1.1.3.4.

El primer dígito corresponde al tipo de enzimas, en este caso a las oxido reductasa. El segundo al grupo donador de electrones (CH-OH). El tercer número se relaciona con la molécula aceptora de electrones, que para la GOD es el O₂. Finalmente, el último dígito corresponde a la enzima que se trata; GOD.

GRUPO: Oxidorreductasa.

Dentro del grupo de oxirreductasas se encuentran enzimas que son ampliamente distribuidas en plantas, microorganismos y tejidos animales.

NOMBRE SISTEMÁTICO: β-D-Glucosa: Oxígeno-1-oxidorreductasa
Otros nombres:

β-D-Glucosa oxidasa

β-D-Glucosa: quinona oxidorreductasa

D-Glucosa oxidasa

D-Glucosa-1-oxidasa

ORIGEN

Esta enzima es producida por diversas cepas de hongos: *Penicillium notatum*, *Penicillium amasgasakiense*, *Penicillium sp.* *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.* y *Bombix mori*. La glucosa oxidasa también es liberada por la glándula de la faringe de las abejas.

REACCIÓN QUE CATALIZA

La enzima GOD cataliza la reacción entre la β -D-Glucosa y el oxígeno molecular formando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.



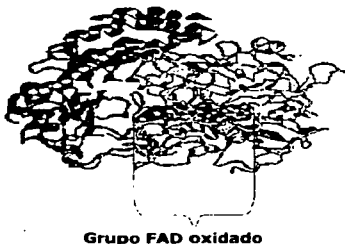
sustrato: β -D-Glucosa + O_2

producto: D-gluconolactona + H_2O_2

- Cataliza la oxidación de glucosa con consumo de oxígeno

ESTRUCTURA ENZIMÁTICA

La estructura química de esta enzima es de carácter proteica globular, es decir, posee una estructura cuaternaria como se muestra en la figura 23, el sitio activo de la enzima corresponde al grupo flavin-adenin-dinucleotido (FAD), en su forma oxidada (color oscuro).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 23 Estructura de la Glucosa Oxidasa.

FUNCIONAMIENTO DE LA ENZIMA

La reacción enzimática que se lleva a cabo se esquematiza en la figura 24.

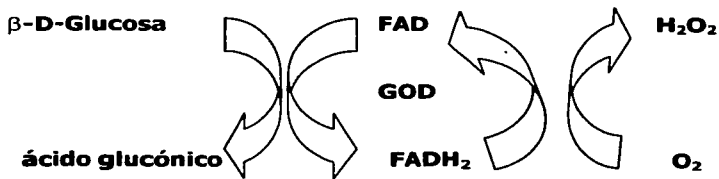


Figura 24 Funcionamientos de la enzima glucosa oxidasa.

La enzima GOD en presencia de la β -D-Glucosa, se forma el ácido glucónico. En esta reacción el sitio activo de la enzima (FDA) oxidado se reduce a FADH_2 . El cual no es activo, a continuación el O_2 del medio se reduce a H_2O_2 y el sitio activo pasa a su forma oxidada (FDA). En esta reacción redox se intercambian dos electrones.

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

(a) El H_2O_2 producto de la reacción se mide amperométricamente a través de su oxidación sobre la superficie del biosensor a un potencial anódico constante:



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

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

DEFINICIÓN DE UNIDAD DE ACTIVIDAD

La definición de unidad de actividad de la Glucosa Oxidasa, varía según la fuente de la enzima.

- GO-U: una unidad de glucosa oxidasa (GO) libera 1 μmol de H_2O_2 por minuto a $T= 25^\circ\text{C}$ y un $\text{pH}= 7$
- GO-U: una unidad de glucosa oxidasa (GO) es definida como la cantidad de enzima que oxidará 1 μmol de β -D-Glucosa por minuto a $T= 25^\circ\text{C}$ y un $\text{pH}= 4.1$
- GO-U: una unidad de glucosa oxidasa (GO) oxida 1 μmol de β -D-Glucosa a ácido D-gluconico y H_2O_2 por minuto a $T= 35^\circ\text{C}$ y un $\text{pH}= 5.1$

ESPECIFICIDAD

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

CONDICIONES ÓPTIMAS DE UTILIZACIÓN

pH

pH óptimo	pH máximo	Microorganismo
5	-	<i>P. amagasakiensis</i>
5	-	<i>P. paxille</i>
5	6	<i>A. niger</i>
4.6	5	<i>P. chrysosporium</i>
5	6	<i>P. chrysogenum</i>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TEMPERATURA (°C)

Temperatura óptima	Temperatura máxima	Estabilidad	Microorganismo
40	60	50	<i>A. Niger</i>
30	-	-	<i>P. vitale</i>

INHIBIDORES/ COFACTORES

La glucosa oxidasa es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza, una de las preparaciones comerciales de esta enzima es conocida como notatina. Aunque por lo general se le conoce como oxidasa se trata de una deshidrogenasa que requiere de Flavina-Adenina Dinucleótido (FDA) como coenzima.

Generalmente se combina con catalasa y FDA pero tiene que ser extraída de las células antes de ser usada, sin embargo esta enzima es relativamente cara, por lo que puede ser beneficioso emplearla en forma inmovilizada.

1. La GOD no es inhibida por la presencia de HCN, CO e indicadores que no contengan iones metálicos.

2. Otros aceptores de hidrógeno, como la tionina, azul de metileno y la quinina son reemplazados por el oxígeno. La habilidad para utilizar otros compuestos es característica de las enzimas deshidrogenasa pero no de las oxidasas en general.

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

- Cofactor: FDA
- Inhibidores: Hidroxiquinileína, Ag^+ , Br^- , $CuSO_4$, F, $FeSO_4$, $HgCl_2$, hidracina, hidroxilamina, fenilhidrazina, nitrato de sodio.

APLICACIÓN EN ALIMENTOS

La presencia de oxígeno causa cambios en los alimentos, tales procesos de oxidación son principalmente catalizados por enzimas. La GOD se utiliza para eliminar tanto la glucosa como el oxígeno de un alimento. El H_2O_2 formado en la reacción sirve en algunas ocasiones como oxidante, pero normalmente es a su vez destruido por la adición de catalasa.

La GOD es la enzima más utilizada como antioxidante para prevenir cambios en el color, aroma y sabor de los alimentos durante su procesado, transporte y almacenamiento. Por ejemplo se añade a las bebidas dulces basadas en cítricos, a la cerveza, el vino, salsas así como gran variedad de alimentos secos como las mezclas para repostería y a las sopas instantáneas.

La glucosa oxidasa se utiliza también para eliminar la glucosa residual de los huevos y la clara batida previniendo así las reacciones de pardeamiento (Maillard) y el desarrollo de olores y sabores desagradables^[17,18].

ANÁLISIS ENZIMÁTICOS DE GLUCOSA EN VINOS^[11]

Los aspectos más importantes en la elaboración de vinos pueden determinarse utilizando métodos enzimáticos. Su especificidad y simplicidad los convierte en una herramienta muy eficaz y varios métodos enzimáticos han sido recomendados por la OIV (Oficina Internacional del Vino), en París, la AOAC, el EU, ISO y otros organismos de estandarización. Los "Kits Enzimáticos para análisis biológico y de alimentos de Boehringer Mannheim" contienen reactivos seleccionados y multi analizados en cantidades apropiadas. El ensayo enzimático se realiza antes, durante y después del proceso de fermentación por las siguientes razones:

- Control de identidad y autenticidad de la materia prima
- Control de pureza
- Control del estado higiénico
- Determinación de control de parámetros nutricionales
- Control de conformidad de la receta
- Regulaciones oficiales, cumplimiento legal
- Manejo de la calidad

La relación de fructosa a glucosa remanente de azúcar residual será de 6:1 debido a que la fermentación de la fructosa ocurre más lentamente que la fermentación de la glucosa.

Un vino rico en azúcar puede obtenerse por agregado de sacarosa ó mezclando vinos con fermentación completa con jugo de uvas o con vinos parcialmente fermentados (bajo contenido de etanol y alto contenido de azúcar respectivamente). En este caso la reacción, fructosa / glucosa será 1:1. Los vinos con alto contenido de azúcares, necesitan ser estabilizados con SO₂ y en algunos casos por el agregado de ácido ascórbico (hasta 150 mg/L).

Los productos secundarios típicos de la fermentación causados por efectos colaterales de los azúcares y de la infección de uvas por *Botrytis cinera* o *Saccharomyces cerevisia* incluyen tanto glicerol (de 5 a 16 g/l) como ácido D-glucónico (hasta 2 g/L). En la Tabla 6 se presentan datos sobre analitos y ensayos disponibles para analizar glucosa y otros carbohidratos.

Para mayor información respecto a la composición, elaboración y características del vino tinto, se sugiere consultar el anexo 1 (El Vino Tinto).

Tabla 6 La tabla adjunta contiene datos sobre analitos, ensayos disponibles y varias referencias*.

Analito	Referencia *	Comentarios
Azucares		
D-Glucosa	IFU55,ISO 13965,EN 40, AOAC	La D-Glucosa es el azúcar más común en las uvas.
D-Glucosa / D-fructosa	OIV,IFU, EU, EN 1140,AOAC	La relación de glucosa/ fructosa indica cual azúcar se ha añadido.
Sacarosa / D-Glucosa	IFU56, EN12146	La sacarosa es hidrolizada rápidamente bajo condiciones ácidas, se agrega usualmente sacarosa al mosto para aumentar la concentración de etanol.
Sacarosa/ D-Glucosa /D-fructosa	IOCCC,D;AU,F	La sacarosa es hidrolizada rápidamente bajo condiciones ácidas, se agrega usualmente sacarosa al mosto para aumentar la concentración de etanol.
Almidón	Recom. Por AIJN, ISO 13965, D,CH	Se utilizan almidones parcialmente hidrolizados en bebidas suaves, se agregan al vino para aumentar el extracto seco (se pretende mejorar la calidad del vino).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

* Los siguientes organismos reconocen métodos enzimáticos:

IFU (Federación Internacional de Productores de Jugos), AIJN (Asociación para la Industria de Jugos y Néctares de Frutas y Vegetales de Estados Unidos), EN (Norma Europea), EU (Regulación Europea 2676/90), ISO (Organización Internacional de Estandarización), AOAC (Asociación Americana de Químicos Analíticos), OIV (Oficina Internacional del Vino), MEBAK (Comité Central Europeo para Bebidas).

OBJETIVO GENERAL

Diseño y caracterización de la Microcelda de Detección Enzimática de Glucosa Oxidasa para la determinación de Glucosa. Se pretende que la celda planteada en este proyecto sea de manejo sencillo, compacta (microescala) y altamente selectiva, lo que le daría muchas ventajas sobre los métodos ya existentes, por lo que puede remplazar las prácticas ordinarias en el análisis de alimentos, principalmente en el área de control de calidad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseño de una Microcelda de Detección Enzimática.
- En esta Microcelda se empleará como biocomponente la enzima Glucosa Oxidasa .
- Evaluar la actividad enzimática, así como de las condiciones ideales de temperatura y pH para la Glucosa Oxidasa (GOD), integrandola a la microcelda como biocomponente.
- En este sistema la enzima será monitoreada mediante Técnicas Electroquímicas (Voltamperometría cíclica y Cronoamperometría lineal).
- Aplicar la Microcelda Electroanalitica de Determinación enzimática para cuantificar glucosa en muestras de vinos comerciales.

HIPÓTESIS

A pesar de que existen diferentes métodos para la determinación de la glucosa, algunos de ellos resultan muy complejos e imprecisos, es por ello que se hace necesario un método para determinar la glucosa que resulte más preciso, selectivo, rápido y de bajo costo.

En la elaboración de la Microcelda electroanalitica de determinación enzimática para ensayos con glucosa oxidasa, la glucosa es una especie que puede ser determinada utilizando la función catalítica de enzima.

Suponemos que en este sistema la glucosa es monitoreada mediante técnicas potencioestáticas por la producción de peróxido de hidrógeno.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES

ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (GOD):

SIGMA: Proveniente de *Aspergillus Níger*, aproximadamente 20% de proteína. Una unidad oxida 1.0 μmol de β -D-glucosa a D-gluconolactato y peróxido de hidrógeno por minuto a pH de 5.1 a 35°C. Contenido 0.22g sólido; 47,500U/g.

DILUCIÓN DE GLUCOSA OXIDASA (GOD).

Se pesan 10 mg de GOD y se le adicionan 1ml de Buffer de Fosfatos (pH = 7), quedando una dilución de 10mg/ml de GOD, la cual se conserva en refrigeración, 10 mg de GOD equivalen a 2.1590 U/g de enzima en 1 ml, si se realizan en el experimento adiciones de 10 μl de disolución de enzima, esto equivale a 0.02159 U/g de GOD.

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO, en disolución al 30% (J.T Baker®)

P.M=34.01 g/mol

Lote:N46G10

ESPECIFICACIONES ACS

Ensayo con H_2O_2 por titulación de KMnO_4 5.4152M (datos experimentales obtenidos en el laboratorio por titulometría).

Condiciones de Almacenamiento:

Temperatura: 4°C

Aislado de la Luz Preferentemente.

PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN "STOCK" DE PERÓXIDO DE HODRÓGENO (H_2O_2)

Se realiza una adición de 10 μL H_2O_2 J.T Baker® a un matraz aforado de 10 ml, para obtener una concentración final 0.01 M.

PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE GLUCOSA

Se realiza una adición de 0.18 g de (+) – D- Glucosa Monohidratada en agua destilada a un matraz aforado de 10 ml, para obtener una concentración final de 0.11 M de Glucosa.

DISOLUCIÓN AMORTIGUADORA 0.1 M, pH= 7 de fosfatos.

PARA EL ANÁLISIS DE VINOS SE EMPLEARON LAS SIGUIENTES MARCAS:

Reservado **CONCHA Y TORO,**

Vino tinto, Cabernet Sauvignon, 2001
Producto de Chile Embotellado de Origen
Exportado y elaborado por:
VIÑA CONCHA Y TORO S.A

SANTA RITA

Vino tinto, Cabernet Sauvignon, 2001
Producto de Chile Embotellado de Origen
Exportado y elaborado por:
VIÑA SANTA RITA S.A

CALIFORNIA

Vino tinto
Producto de Aguascalientes, México.

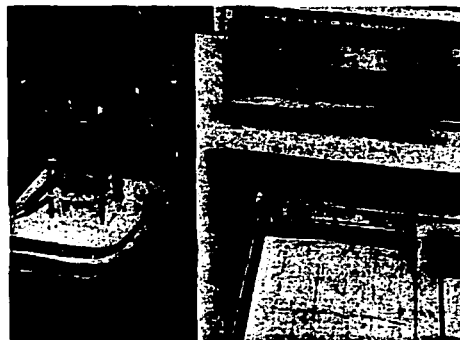
Ferriño, **SANGRE DE CRISTO**

Vino tinto
Producto de Ciénegas Coahuila, México
Embotellado de Origen
Elaborado por:
BODEGAS FERRIÑO S.A DE C.V.

EQUIPOS



(a)



(b)

Figura 25 Equipos empleados en la etapa experimental: (a) Potenciostato con equipo de computo (programa Volta Master) y Microcelda de Detención Enzimática, (b) Potenciostato Graficador Kotogawa y Microcelda de Detención Enzimática.

En la figura 25, podemos observar, algunos de los equipo empleados y el lugar de trabajo que es El Laboratorio de Electroquímica Analítica en Investigación y Enseñanza Experimental. Edificio A. Laboratorios 3-E y 3-F. Fac. De Química. Ciudad Universitaria.

Los equipos son:

POTENCIOSTATO-GALVANOSTATO

PGP201, Radiometer®, Copenhagen, ACOPLADO AL SOFTWARE Volta Master.

MIPM. Minipolarógrafo fabricado en el Laboratorio De Electroquímica Analítica En Investigación Y Enseñanza Experimental.

GRAFICADOR KOTOGAWA 3025.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISEÑO DE LA MICROCELDA DE DETECCIÓN ENZIMÁTICA

Inicialmente se propusieron varios diseños de celdas, el primero de ellos se puede observar en la figura 26.

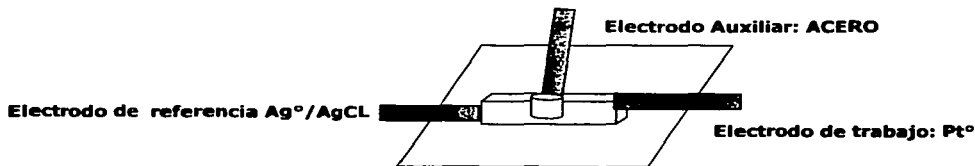


Figura 26 Diseño de la primera celda empleada.

En este diseño se colocaron dos placas de acrílico de 50 mm de grosor, una encima de otra, (la placa de la superficie superior es de menor tamaño), realizando tres especies de zanjas en donde se introducían los electrodos, los cuales convergen en una perforación central la cual es el recipiente en donde se introducen las sustancias analizadas.

El diseño de la segunda celda se muestra en la figura 27.

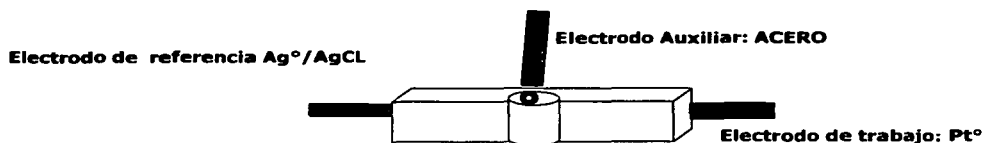


Figura 27 Diseño de la segunda celda empleada.

En este diseño se empleó una placa de acrílico de mayor grosor, aproximadamente 80 mm, en la cual se realiza una perforación central, la cual es el recipiente en donde se vierten los reactivos y las muestra a analizar, en ese punto convergen los tres electrodos los cuales se colocan realizando una perforación a la placa.

Ambos diseños fueron descartados porque su capacidad era muy pequeña (no mayor a 50 μ l). Eso provocaba que cuando se derramaba el contenido de la celda, no se podía realizar una adecuada limpieza y las muestras se contaminaban, de tal forma que no se podían obtener valores confiables para la cuantificación del analito.

Finalmente se construyó el diseño terminal (figura 28), con una capacidad de 300 μ l. Costa de una base de acrílico sobre la cual descansa un recipiente circular de acrílico, fijo a la base y con los electrodos incrustados, cuyas terminaciones externas están cubiertas con plástico para evitar que se oxiden o se rompan.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la celda de encuentran tres electrodos:

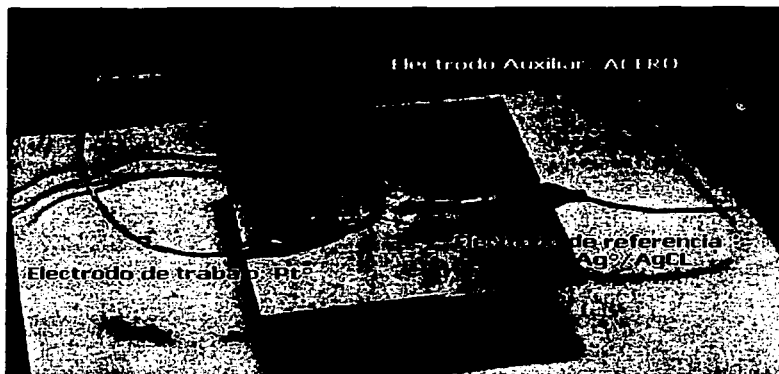


Figura 28 Diseño de la Microcelda de Detección Enzimática.

El electrodo de referencia, $\text{Ag}^\circ/\text{AgCl}$ es utilizado como quasi-referencia ya que se asegura que su superficie es mayor que la del electrodo de trabajo; conviene además, por su fácil construcción.

El electrodo Auxiliar, se escoge de acero inoxidable por mantenerse sin cambios dentro de su estructura frente a las condiciones de disolución de trabajo y su utilidad es cerrar el circuito.

El electrodo de trabajo, es de platino y es el que requiere de más cuidados, ya que se sabe es el catalizador para la reacción de dismutación del peróxido de hidrógeno sin embargo con una adecuada limpieza y pulida de la superficie, se minimiza el efecto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Voltamperometría Cíclica

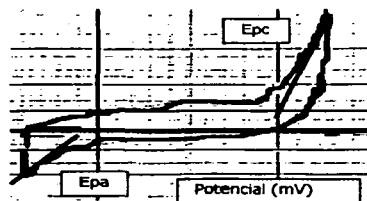
Procedimiento experimental

Se realiza una adición de buffer de fosfatos ($\text{pH} = 7$), a la Microcelda de Detección Enzimática, para obtener el voltamperograma correspondiente al dominio, posteriormente con la disolución "stock" preparada se hacen cinco adiciones consecutivas de $10 \mu\text{L}$ cada una, incrementándose la concentración de las diluciones resultantes en un intervalo de $0.909 \times 10^{-3} \text{ M}$ a $3.33 \times 10^{-3} \text{ M}$. En la tabla 7 se muestran detalladamente las condiciones operatorias para la técnica anteriormente descrita.

Tabla 7. Condiciones operatorias para la técnica de Voltamperometría Cíclica.

Amortiguador	Buffer de fosfatos 0.1 M PH= 7
Electrodo de trabajo	$E_{tr} = \text{Pt}^{\circ}$
Electrodo de referencia	$E_{Ref} = \text{Ag}/\text{AgCl}$,
Electrodo auxiliar	$E_{Aux} = \text{Acero}$.
Intervalo de potencial en el que se barre el voltaje	$E_0 = -300 \text{ mV}$, $E_1 = 900 \text{ mV}$, $E_2 = -300 \text{ mV}$
Velocidad	250 mV/s
I_{limite}	100mA
Graficador	$Y = 0.1 \text{ V/cm}$ $X = 0.25 \text{ V/cm}$

Con los valores de altura y concentración se efectúa la curva de calibración (determinaciones realizadas por triplicado). En la figura 29, se observa un ejemplo de voltamperograma obtenido por experimentación y se muestra la forma en que se midieron los valores de altura con los que se hicieron las curvas de calibración.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 29. Voltamperograma obtenido por experimentación.

Peróxido de Hidrógeno Potencial de Reducción y Oxidación

La finalidad del siguiente experimento es captar la señal del peróxido de hidrógeno, en potencial de reducción y oxidación, basándonos en las propiedades redox de dicho compuesto. Con la intención de demostrar que la determinación de H_2O_2 es posible mediante el empleo de la Microcelda de Detección Enzimática.

Procedimiento experimental (MIMP)

1. El experimento inicia fijando el $E = -1000$ mV.
2. Se adiciona buffer de fosfatos ($pH = 7$) a la Microcelda de Detección Enzimática.
3. Transcurridos 30 segundos se anotan los valores de i_d (μA) y el valor del E (mV).
4. Se vuelve a activar el cronómetro y después de pasar otros 30 segundos se anota una vez más el valor de i_d (μA) y el valor del E (mV).
5. Se realizan los pasos ya descritos hasta alcanzar un valor de $E = 1000$ mV.
6. Posteriormente se vuelve a ajustar $E = 0.0$ mV y con la disolución "stock" preparada se realizan tres adiciones de $10 \mu L$ cada una, incrementándose la concentración en un intervalo de $0.909 \times 10^{-3} M$ a $2.30 \times 10^{-3} M$, repitiendo los pasos mencionados hasta alcanzar un valor de $E = -1000$ mV.

En la figura 30, se muestran dos de las curvas compuestas anódicas y catódicas. La primera corresponde al dominio (Buffer de fosfatos) y la segunda a la primera adición de peróxido de hidrógeno indicando con las flechas la onda de reducción y oxidación.

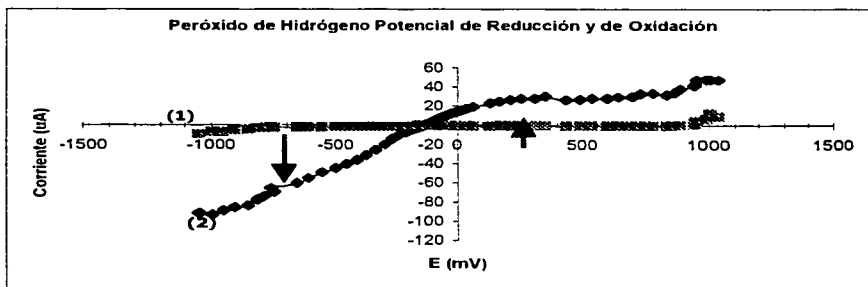


Figura 30. Curvas compuestas anódicas y catódicas de Buffer de fosfatos $0.1 M$, $pH = 7$ y Peróxido de Hidrógeno $1.66 \times 10^{-3} M$, en donde podemos observar la onda de reducción y oxidación del H_2O_2 . $E = -1000$ mV a $+1000$ mV. $E_{Tr} = Pt^{\circ}$, $E_{Ref} = Ag/AgCl$, $E_{Aux} = Acero$.

Peróxido de Hidrógeno Potencial de Reducción

La intención del siguiente experimento es lograr la determinación de H_2O_2 empleando la Microcelda de Detección Enzimática para definir el valor del potencial de reducción con el cual se trabajará.

Procedimiento experimental (MIMP)

1. El experimento inicia fijando el $E = 0.0$ mV.
2. Se adiciona buffer de fosfatos (pH = 7) a la Microcelda de Detección Enzimática.
3. Transcurridos 30 segundos se anotan los valores de i_d (μA) y el valor del E (mV).
4. Se vuelve a activar el cronómetro y después de transcurrir otros 30 segundos se anota una vez más el valor de i_d (μA) y el valor del E (mV).
5. Se realizan los pasos ya descritos hasta alcanzar un valor de $E = -1000$ mV.
6. Posteriormente se vuelve a ajustar $E = 0.0$ mV y con la disolución "stock" preparada se realizan cinco adiciones consecutivas de $10 \mu L$ cada una, incrementándose la concentración en un intervalo de concentración de $0.909 \times 10^{-3} M$ a $3.33 \times 10^{-3} M$, repitiendo los pasos para cada adición hasta alcanzar un valor de $E = -1000$ mV.

En la figura 31, se muestra la gráfica obtenida del dominio y la primera adición de peróxido de hidrógeno. Donde se indica con líneas, la forma de sustraer los valores de i_d a diferentes potenciales.

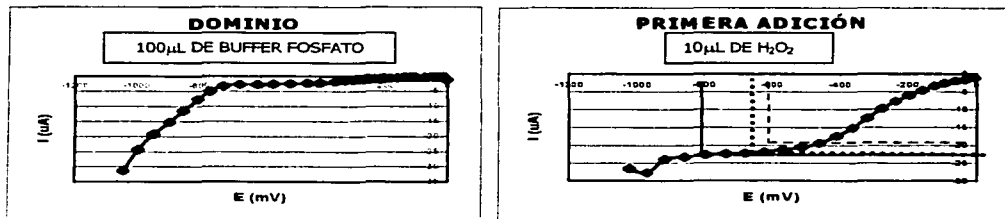


Figura 31. Curvas de corriente contra potencial, donde se observa la onda de reducción de peróxido de hidrógeno. De la disolución "stock" de concentración 0.01 M.

En la figura 31, se observa que en la gráfica de dominio no se forma la onda de reducción de H_2O_2 , en cambio en la gráfica de la primera adición, sí se forma, por lo que se estima que el intervalo de potencial de reducción de H_2O_2 , abarca desde -600 mV (- - - -), pasa por -700 mV (.....) y finaliza en -800 mV (———).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cronoamperometría de Peróxido de Hidrógeno Potencial de Reducción

Una vez definido el valor de potencial con el cual se trabajará, el siguiente paso consiste en definir que tiempo de muestreo es el más indicado para el experimento, por lo que se efectúa la técnica de cronoamperometría lineal a diferentes tiempos de muestreo (30 y 60 segundos).

Procedimiento experimental (Volta Master)

Se realiza una adición de buffer de fosfatos (pH = 7), a la Microcelda de Detección Enzimática. Con la disolución "stock", se realizan cinco adiciones consecutivas de 10 μL cada una, incrementándose la concentración de las diluciones resultantes en un intervalo de $0.909 \times 10^{-3} \text{ M}$ a $3.33 \times 10^{-3} \text{ M}$. En la tabla 8, se muestran detalladamente las condiciones operatorias para la técnica de Cronoamperimetría.

Tabla 8. Condiciones operatorias para la técnica de Cronoamperometría

Amortiguador	Buffer de fosfatos 0.1 M PH= 7
Electrodo de trabajo	E _{tr} = Pt ^o ,
Electrodo de referencia	E _{ref} = Ag/AgCL,
Electrodo auxiliar	E Aux= Acero.
Pulso de potencial	-700 mV
Tiempo de muestreo	30 y 60 segundos
Frecuencia	1 seg
Corriente mínima	-1 μA
Corriente máxima	1 μA
I _{range}	1 μA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la figura 32, se presenta el Cronoamperograma de peróxido de hidrógeno, donde se indica la manera de realizar la medición de la corriente para el tiempo de muestreo señalado en 30 segundos.

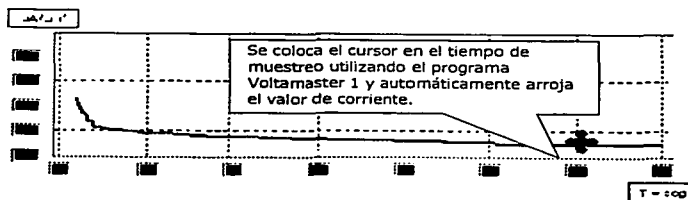


Figura 32. Medición de la i_d para el tiempo de muestreo 30 segundos.

Adición de Disolución de Glucosa Potencial de Reducción

El siguiente experimento se realiza con la intención de que en los diagramas, aparezca una señal similar o igual a la del dominio, ya que en el sistema sólo hay buffer y glucosa. Constatando así que hasta que no se le adicione la enzima Glucosa Oxidasa, ésta no podrá ser monitoreada mediante la técnica potencioestática, por la caída de la concentración de oxígeno debido a la producción de peróxido de hidrógeno o por la transferencia de un electrón desde la enzima al electrodo a través de un mediador químico.

Procedimiento experimental (MIMP)

1. El experimento inicia fijando el $E = 0.0$ mV.
2. Se adiciona buffer de fosfatos (pH = 7) a la Microcelda de Detección Enzimática.
3. Transcurridos 30 segundos se anotan los valores de i_d (μA) y el valor del E (mV).
4. Se vuelve a activar el cronómetro y después de transcurrir 30 segundos se anota una vez más el valor de i_d (μA) y el valor del E (mV).
5. Se realizan los pasos ya descritos hasta alcanzar un valor de $E = -1000$ mV.
6. Posteriormente se vuelve a ajustar $E = 0.0$ mV y con la disolución de Glucosa 0.11M preparada se realizan cinco adiciones consecutivas de $10 \mu\text{L}$ cada una, incrementándose la concentración en un intervalo de 0.01 M a 0.036 M, repitiendo los pasos para cada adición hasta alcanzar un valor de $E = -1000$ mV.

En la figura 33, se muestra la gráfica obtenida del dominio y la quinta adición de glucosa.

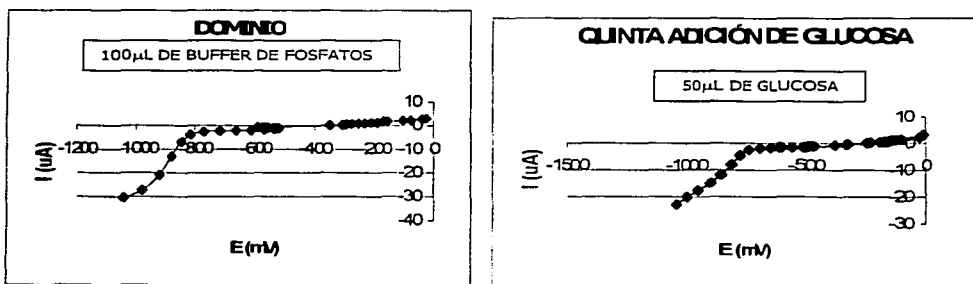


Figura 33. Curvas de corriente contra potencial, donde se observa la dilución de glucosa. En la figura anterior, se observa que los diagramas muestran señales muy parecidas.

Glucosa Oxidasa Potencial de Reducción

En la microcelda se empleará como biocomponente la enzima Glucosa Oxidasa GOD basándose en la reacción enzimática que involucra a la GOD, oxígeno, agua y glucosa, seguida por la oxidación electrocatalítica de peróxido de hidrógeno y ácido glucónico. En este sistema la enzima será monitoreada mediante la siguientes técnicas potencioestáticas, por la caída de la concentración de oxígeno debida a la producción de peróxido de hidrógeno.

Procedimiento experimental (MIMP)

1. El experimento inicia fijando el $E = 0.0$ mV.
2. Se adiciona buffer de fosfatos ($\text{pH} = 7$), a la Microcelda de detección enzimática.
3. Transcurridos 30 segundos se anotan los valores de i_d (μA) y el valor del E (mV).
4. Se vuelve a activar el cronómetro y después de pasar otros 30 segundos se anota una vez más el valor de i_d (μA) y el valor del E (mV).
5. Se realizan los pasos ya descritos hasta alcanzar un valor de $E = -1000$ mV.
6. Posteriormente se vuelve a ajustar $E = 0.0$ mV se adicionan $10\mu\text{L}$ de enzima **GOD** y con la disolución de Glucosa 0.11 M preparada se realizan cinco adiciones consecutivas de $10\mu\text{L}$ cada una, incrementándose la concentración en un intervalo de $16 \times 10^{-3}\text{M}$ a $34.37 \times 10^{-3}\text{M}$, repitiendo los pasos para cada adición hasta alcanzar un valor de $E = -1000$ mV.

En la figura 34, se muestra la gráfica obtenida del dominio y la quinta adición de un sistema en donde se emplea como biocomponente 0.0215 U/g de enzima Glucosa Oxidasa (GOD) en la celda de trabajo, junto con $100\mu\text{l}$ de buffer de fosfatos y glucosa.

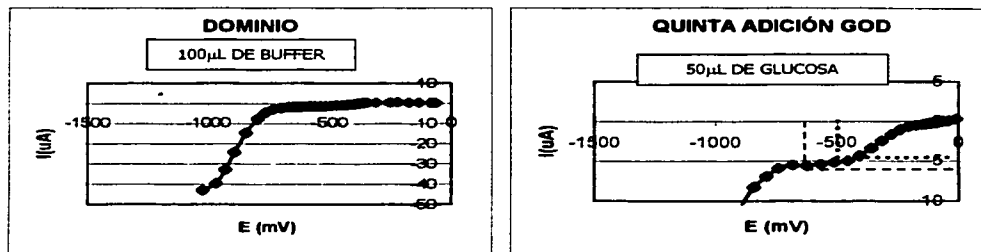


Figura 34. Curvas de corriente contra potencial, donde se observa la onda de reducción de peróxido de hidrógeno. En este ensayo se adiciona glucosa, empleando como biocomponente 0.0215 U/g de enzima Glucosa Oxidasa (GOD) en la celda de trabajo.

En la figura 34, se señala con líneas la forma de sustraer los valores de corriente a los potenciales seleccionados, también se observa que en la gráfica de dominio, no se forma la onda de reducción, en cambio en la gráfica de la quinta adición, sí se forma, por lo que se estima que el intervalo de potencial de reducción abarca desde -500 mV (-----), hasta -600 mV (.....).

Se sustraen los valores de i_d para cada uno de estos potenciales (-500 y -600 mV) y con los valores de concentración, se realizan curvas de calibración para cada potencial, para estimar el valor del potencial que se trabajara.

Cronoamperometría para Glucosa Oxidasa Potencial de Reducción

Procedimiento experimental

Se realiza una adición de buffer de fosfatos (pH = 7), a la Microcelda de detección enzimática, posteriormente se le adicionan 0.0215 U/g de GOD y finalmente con la disolución de Glucosa preparada se realizan cinco adiciones consecutivas de 10 μ L cada una, incrementándose la concentración, con los valores de i_d y concentración se realiza la curva de calibración (determinación realizada por quintuplicado).

En la tabla 9, se muestran detalladamente las condiciones operatorias para la técnica de Cronoamperimetría.

Tabla 9. Condiciones operatorias para la técnica de Cronoamperometría.

Amortiguador	Buffer de fosfatos 0.1 M PH= 7
Electrodo de trabajo	Etr = Pt ^o
Electrodo de referencia	Eref= Ag/AgCL
Electrodo auxiliar	E Aux= Acero.
Pulso de potencial	-500 mV
Tiempo de muestreo	60 segundos
Frecuencia	1 seg
Corriente mínima	-1 μ A
Corriente máxima	1 μ A
I_{rango}	1 μ A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De la misma manera que se muestra en la figura 32, se realiza la medición del valor de i_d .

Cronoamperometría para Peróxido de Hidrógeno Potencial de Oxidación

Procedimiento experimental (Volta Master)

Se realiza una adición de buffer de fosfatos (pH = 7), a la Microcelda de Detección Enzimática. Con la disolución "stock", se hacen cinco adiciones consecutivas de 10 μ L cada una, incrementándose la concentración de las diluciones resultantes en un intervalo de 0.909×10^{-3} M a 3.33×10^{-3} M.

En la figura 35, se presenta el Cronoamperograma de peróxido de hidrógeno, donde se indica la forma de realizar la medición de la corriente para el tiempo de muestreo indicado en 30 segundos. En la tabla 10 se muestran detalladamente las condiciones operatorias para la técnica de Cronoamperimetría.

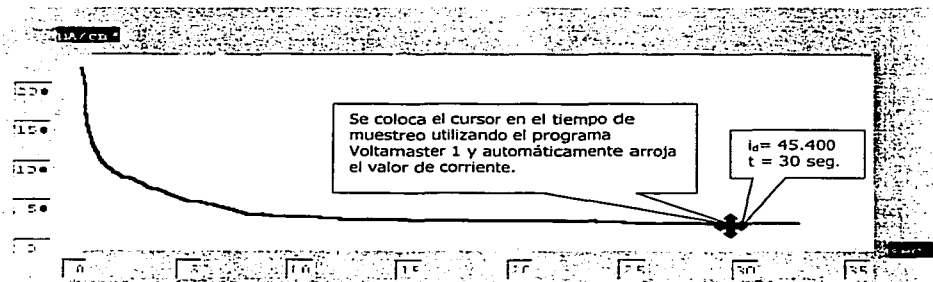


Figura 35. Cronoamperograma por oxidación de H_2O_2 , de la solución "stock".

Tabla 10. Condiciones operatorias para la técnica de Cronoamperometría para la oxidación de H_2O_2

Amortiguador	Buffer de fosfatos 0.1 M PH= 7
Electrodo de trabajo	$E_{tr} = Pt^{\circ}$
Electrodo de referencia	$E_{Ref} = Ag/AgCl$,
Electrodo auxiliar	$E_{Aux} = Acero$.
Pulso de potencial	600 mV
Tiempo de muestreo	30 segundos
Frecuencia	1 seg
Corriente mínima	-1 μ A
Corriente máxima	1 μ A
I_{rango}	1 μ A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cronoamperometría para la Reacción Enzimática que Involucra a la Glucosa Oxidasa y Glucosa seguida por la Oxidación Electrocatalítica de Peróxido de Hidrógeno

La determinación de glucosa mediante la Microcelda de Detección Enzimática, que es un biosensor de tipo amperométrico, es posible realizarla debido a que en la microcelda se empleará como biocomponente la enzima Glucosa Oxidasa GOD basándose en la reacción enzimática que involucra a la GOD, oxígeno, agua y glucosa, seguida por la oxidación electrocatalítica de peróxido de hidrógeno y ácido glucónico. En este sistema la enzima será monitoreada mediante la siguiente técnicas potencioestáticas, por la caída de la concentración de oxígeno debida a la producción de peróxido de hidrógeno.

Procedimiento experimental (Volta Master)

Se realiza una adición de buffer de fosfatos (pH = 7) a la Microcelda de Detección Enzimática, posteriormente se le adicionan 10 μ l de GOD equivalentes a 0.0215 U/g de enzima, finalmente con la disolución Glucosa 0.11M preparada se realizan cinco adiciones consecutivas de 10 μ L cada una, incrementándose la concentración, en un intervalo de concentración resultante es de 9.16×10^{-3} M a 34.37×10^{-3} M.

Con los valores de i_d y concentración se realiza la curva de calibración (determinación realizada por quintuplicado).

En la figura 36, se observa el Cronoamperograma por oxidación de H_2O_2 , de la solución glucosa, Buffer de fosfatos, 10 μ l de GOD, en la celda de trabajo, donde se indica la manera de realizar la medición de la corriente para el tiempo de muestreo seleccionado en 60 segundos.

En la tabla 11, se muestran detalladamente las condiciones operatorias para la técnica de Cronoamperimetría.

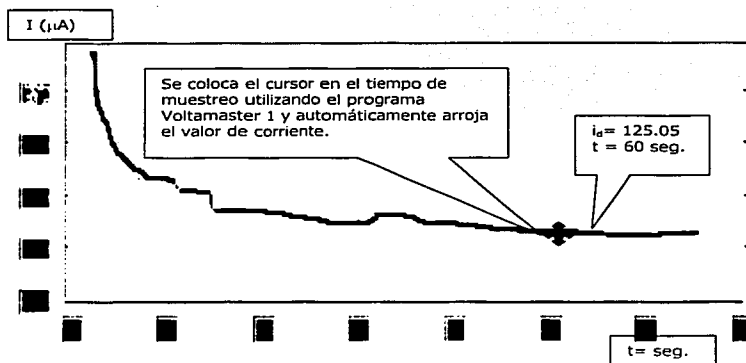


Figura 36. Cronoamperograma por oxidación de H_2O_2 , de la solución glucosa, Buffer de fosfatos y GOD.

Tabla 11. Condiciones operatorias para la técnica de Cronoamperometría para la oxidación de H_2O_2 por GOD, en disolución de Glucosa.

Amortiguador	Buffer de fosfatos 0.1 M PH= 7
Electrodo de trabajo	E _{tr} = Pt ^o ,
Electrodo de referencia	E _{Ref} = Ag/AgCL,
Electrodo auxiliar	E Aux= Acero.
Pulso de potencial	600 mV
Tiempo de muestreo	30 segundos
Frecuencia	1 seg
Corriente mínima	-1 µA
Corriente máxima	1 µA
I _{rango}	1 µA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis Enzimático de Glucosa en Vino Tinto

La finalidad del siguiente experimento es determinar la glucosa presente en muestras de vino tinto, empleando la Microcelda de Detección Enzimática, mediante la técnica electroquímica de cronoamperometría.

Procedimiento experimental

Las muestras de vino tinto analizadas fueron: vino tinto, marca Concha y Toro, vino tinto, marca Santa Rita, vino tinto, marca California y vino tinto, marca Sangre de Cristo. Para cada una de las muestras se efectúa por separado, el siguiente procedimiento experimental.

1. Se realiza una adición de buffer de fosfatos ($\text{pH} = 7$) a la Microcelda de Detección Enzimática.
2. Posteriormente se le adicionan $10 \mu\text{l}$ de GOD equivalentes a 0.0215 U/g de enzima.
3. Se hacen cinco adiciones consecutivas de vino tinto de $10 \mu\text{L}$ cada una, incrementándose la cantidad hasta $50 \mu\text{L}$.
4. Se hace un cronoamperograma para cada una de las adiciones, cada determinación se realiza por triplicado.
5. De los cronoamperogramas resultantes se extrae el valor de i_d , que corresponde a la adición de $30 \mu\text{L}$ de vino tinto a un tiempo de muestreo de 30 segundos.
6. Finalmente el valor de i_d del punto anterior, se extrapola en la curva de calibración de Glucosa / GOD para saber a que concentración de glucosa corresponde .

En la tabla 12, se muestran detalladamente las condiciones operatorias para la técnica.

Tabla 12. Condiciones operatorias para la técnica de Cronoamperometría para el análisis de glucosa en vino tinto.

Amortiguador	Buffer de fosfatos 0.1 M $\text{pH} = 7$
Electrodo de trabajo	$\text{Etr} = \text{Pt}^\circ$
Electrodo de referencia	$\text{ERef} = \text{Ag}/\text{AgCl}$
Electrodo auxiliar	$\text{E Aux} = \text{Acero}$.
Pulso de potencial	600 mV
Tiempo de muestreo	30 segundos
Frecuencia	1 seg
Corriente mínima	$-1 \mu\text{A}$
Corriente máxima	$1 \mu\text{A}$
I_{rango}	$1 \mu\text{A}$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Microensayo Enzimático para Glucosa Oxidasa

Este microensayo enzimático tiene la finalidad de evaluar la actividad de la enzima Glucosa Oxidasa.

Procedimiento experimental

1. Adiciono 0.0010 g de GOD a 900 μ l de Buffer de fosfatos 0.1 M (pH = 7).
2. Posteriormente adiciono 100 μ l de $K_3Fe[(CN)_6]$.
3. Activo de inmediato el cronómetro, trascurridos 30 segundos anotó el valor del potencial (mV) y el valor de pH.
4. El intervalo de tiempo es de 0 a 750 seg.
5. Al concluir el intervalo de tiempo, se lava la celda y se vuelve a iniciar el experimento, adicionando 0.0010 g de GOD a 800 μ l de Buffer de fosfatos 0.1 M (pH = 7), y a continuación, se adicionan 200 μ l de $K_3Fe[(CN)_6]$.
6. Así sucesivamente hasta adicionar 500 μ l Buffer de fosfatos 0.1 M (pH = 7) y 500 μ l de $K_3Fe[(CN)_6]$.

En la figura 37, se observa que la enzima Glucosa Oxidasa, si presenta actividad.

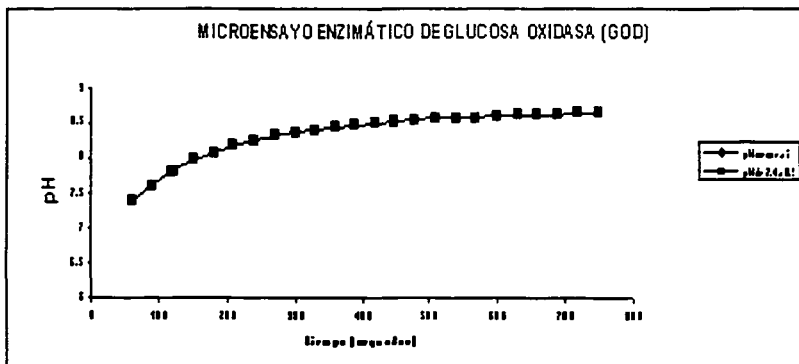


Figura 37. Se observa más notoriamente, que la GOD presenta actividad.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Voltamperometría Cíclica

En la figura 38, se muestran los voltamperogramas de peróxido de hidrógeno, obtenidos por experimentación, al realizar la técnica electroquímica de Voltamperometria cíclica descrita con anterioridad en la página 54.

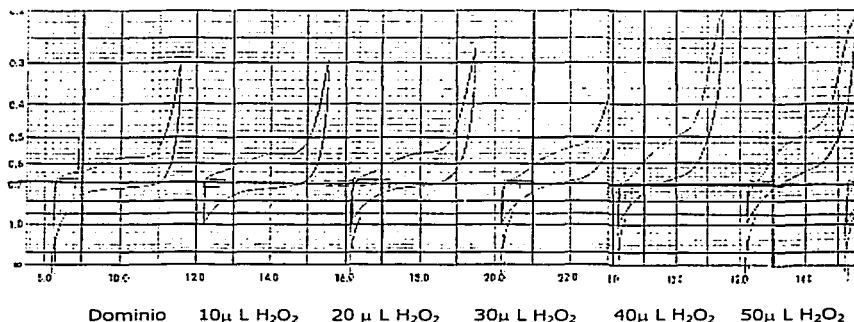


Figura 38. Voltamperogramas de peróxido de hidrógeno. De la disolución "stock" de concentración 0.01 M; se hicieron cinco adiciones para un intervalo de concentración de 0.909×10^{-3} M a 3.33×10^{-3} M, en la celda de trabajo.

En la figura 38, se definen los potenciales de pico anódico y catódico. El potencial se barre como se indica en la gráfica anterior. La parte cíclica que aquí se muestra se inicia al potencial de -300 mV en relación con el potencial de referencia. El sentido del primer barrido se dirige hacia potenciales más positivos y da como lugar la oxidación del compuesto. Después se invierte el barrido. El pico catódico se debe a la reducción del material que se oxidó anteriormente durante el barrido. La oxidación original produce el pico anódico.

Con los diagramas mostrados en la figura anterior, se demuestra que la determinación de peróxido de hidrógeno, es posible mediante el empleo de la técnica electroquímica de Voltamperometría Cíclica, utilizando la Microcelda de Detección Enzimática.

Peróxido de Hidrógeno Potencial de Reducción y Oxidación

En la figura 39, se presentan las curvas compuestas anódicas y catódicas de Buffer de fosfatos y peróxido de hidrógeno, obtenidas después de realizar el procedimiento experimental descrito en la página 59.

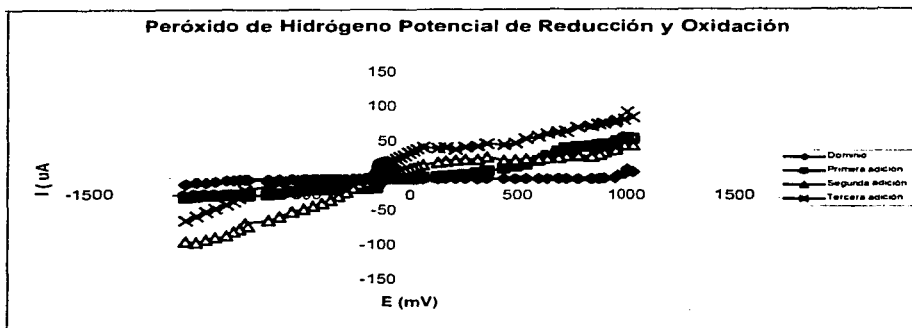


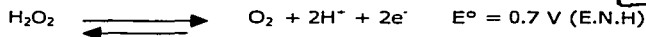
Figura 39. Curvas compuestas anódicas y catódicas de Buffer de fosfatos 0.1 M, pH= 7 y tres adiciones consecutivas de 10 μ l de Peróxido de Hidrógeno cada una, incrementándose la concentración, en donde podemos observar la onda de reducción y oxidación del H_2O_2 . E = -1000 mV a +1000mV ETr = Pt $^\circ$, ERef= Ag/AgCL, E Aux= Acero.

Con los resultados mostrados en la figura 39 se demuestra que la determinación de la señal del peróxido de hidrógeno, en potencial de reducción y oxidación, basándonos en las propiedades redox de dicho compuesto, es posible mediante el empleo de la Microcelda de Detección Enzimática.

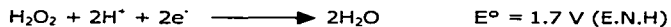
Propiedades redox del peróxido de Hidrógeno:

E l H_2O_2 tiene un comportamiento de anfólito que se establece en disolución.

Cuando actúa como reductor, el H_2O_2 se oxida a O_2 :



Cuando actúa como oxidante, se reduce a H_2O :



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Peróxido de Hidrógeno Potencial de Reducción

En la figura 40, se muestran las curvas obtenidas de corriente contra potencial, donde se observa la onda de reducción de peróxido de hidrógeno.

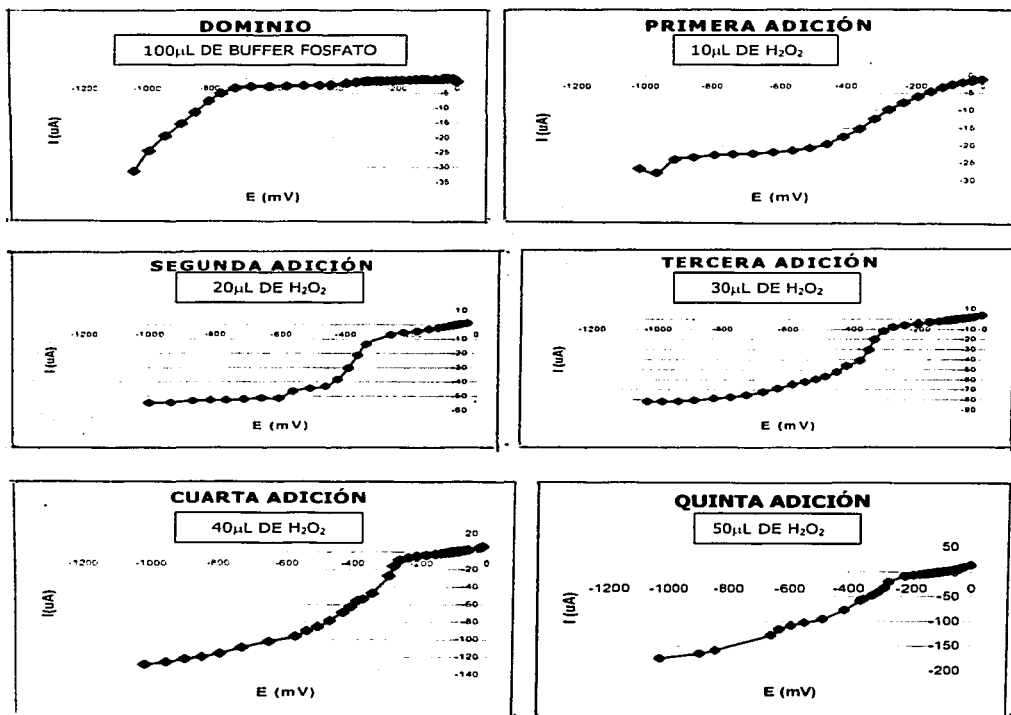


Figura 40. Curvas de corriente contra potencial, donde se observa la onda de reducción de peróxido de hidrógeno. De la disolución "stock" de concentración 0.01 M; se hicieron cinco adiciones para un intervalo de concentración de 0.909×10^{-3} M a 3.33×10^{-3} M, en la celda de trabajo.

En este experimento el peróxido de hidrógeno actúa como reductor oxidándose a oxígeno, por lo que la señal obtenida corresponde al O₂.

Se sustraen los valores de i_0 para cada uno de estos potenciales (-500 mV, -600 mV y -

700 mV), como se explica en la pagina 60 y con los valores de concentración, se realizan curvas de calibración para cada potencial, para estimar el valor del potencial con el que se trabajará.

También se observa que a medida que se incrementa la concentración de H_2O_2 el valor de i_d , de cada onda de reducción se incrementa.

Cronoamperometría de Peróxido de Hidrógeno Potencial De Reducción

La determinación de H_2O_2 empleando la Microcelda de Detección Enzimática, es posible debido a que el H_2O_2 (analito) se mide cronoamperométricamente, ya que se lleva a cabo su reducción, en el seno del biosensor.

En la figura 41 se presentan las curvas obtenidas en el cronoamperograma, donde se observa la onda de reducción de peróxido de hidrógeno,

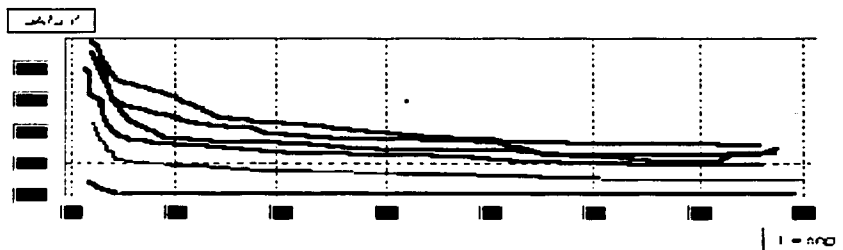


Figura 41 Cronoamperogramas por reducción de H_2O_2 , en la celda de trabajo.

Con los valores de i_d y concentración se realiza la curva de calibración (determinación realizada por quintuplicado).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Adición de Disolución de Glucosa Potencial de Reducción

En la figura 42, se indican las curvas obtenidas de corriente contra potencial, donde se observa una señal similar o igual al dominio en todos los diagramas, demostrando así, que hasta que no se adicione la enzima (GOD) al sistema (buffer – glucosa), no habrá producción de peróxido de hidrógeno, que es el producto de la reacción que cataliza la enzima, que nos interesa determinar.

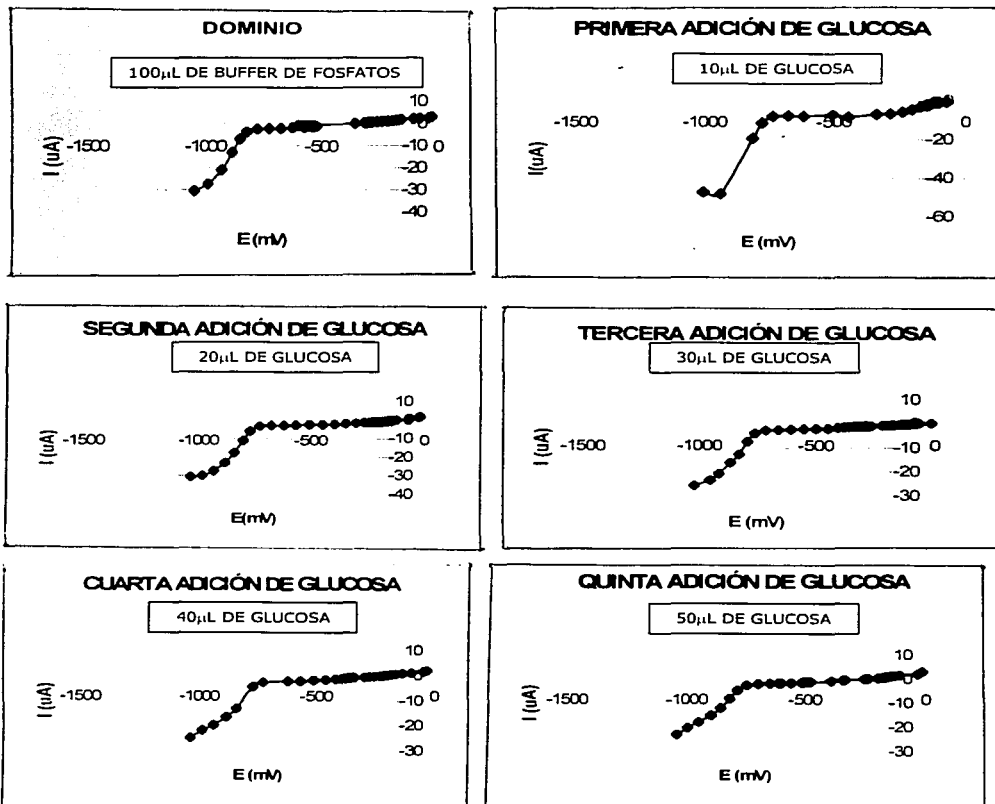
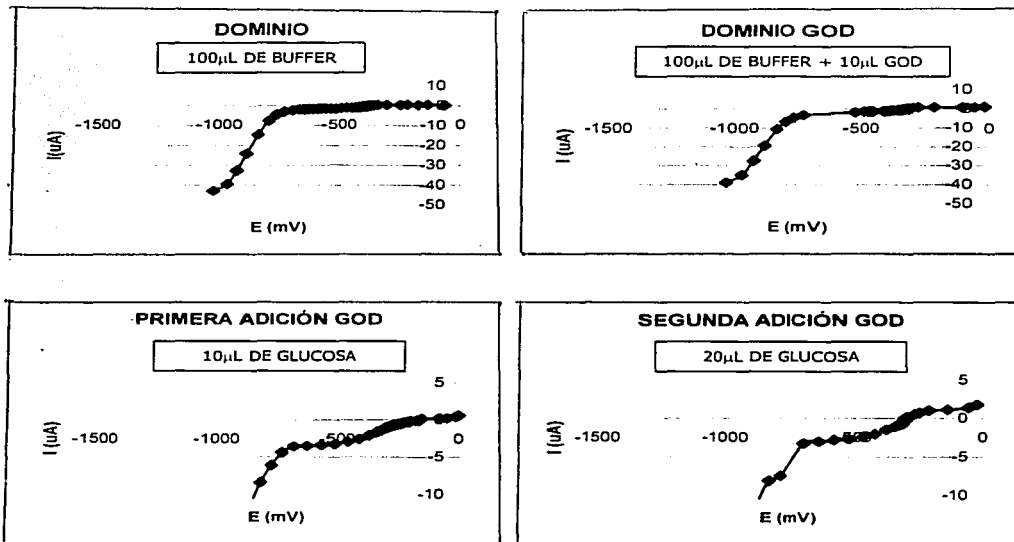


Figura 42. Curvas de corriente contra potencial, donde se observa la dilución de glucosa. 0.11 M, se hicieron cinco adiciones para un intervalo de concentración de 0.01 M a 0.036M, y buffer de Fosfato a $\text{pH}=7$, en la celda de trabajo.

Glucosa Oxidasa Potencial de Reducción

La determinación de glucosa se realiza siguiendo el decremento del oxígeno en el medio de disolución a medida que se lleva a cabo la oxidación de la glucosa. El procedimiento experimental se explica detalladamente en la página 63.

En la figura 43, se designan las curvas obtenidas de corriente contra potencial, donde se observa la onda de reducción de peróxido de hidrógeno.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

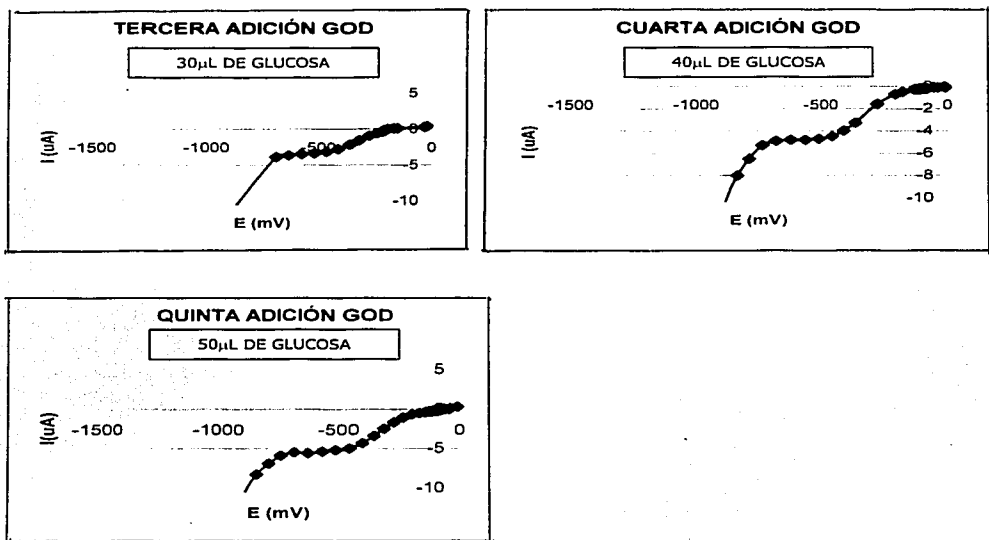


Figura 43. Ensayo con glucosa de concentración 0.11 M; se hicieron cinco adiciones consecutivas incrementando la concentración en un intervalo de 0.01 M a 0.36 M, empleando como biocomponente 0.0215 U/g de enzima Glucosa Oxidasa (GOD) en la celda de trabajo.

En la figura 43 se presentan los valores de i_d y potencial con los que se realizaron dos curvas de calibración a -500 mV y -600 mV, para estimar en cual de estos se logra detectar mejor la onda de reducción de H_2O_2 , donde la glucosa es una especie que puede ser determinada utilizando la función catalítica de la enzima.

En este sistema la glucosa es monitoreada por la presencia de la onda de reducción debida a la producción de H_2O_2 .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cronoamperometría para Peróxido de Hidrógeno Potencial de Oxidación

En la figura 44, se indican los cronoamperogramas obtenidos con la metodología descrita a detalle en la página 65, los cuales corresponden a la oxidación de peróxido de hidrógeno.

CRONOGRAMAS POR OXIDACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

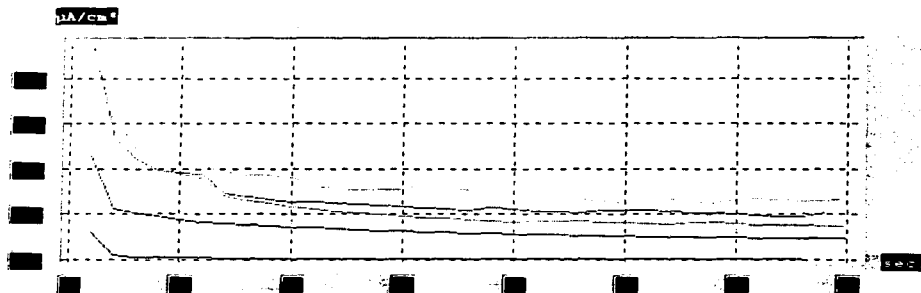


Figura 44.. Cronoamperogramas por oxidación de H_2O_2 , de la solución "stock" de concentración 0.01 M se hicieron por cada determinación una adición de Buffer de fosfatos de $100 \mu l$ y 5 adiciones de $10 \mu l$ de H_2O_2 para un intervalo de concentración de $0.909 \times 10^{-3} M$ a $3.33 \times 10^{-3} M$, en la celda de trabajo.

Con los cronoamperogramas presentados en la figura 44, demostramos que la determinación de peróxido de hidrógeno es posible mediante el empleo de la técnica electroquímica de cronoamperimetría lineal, a un $E = 600 mV$ y un tiempo de muestreo de 30 segundos, utilizando para ello la Microcelda de Detección Enzimática.

También se observa que en cada adición constante de disolución de H_2O_2 , el valor de corriente límite de difusión aumenta proporcionalmente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cronoamperometría para la Reacción Enzimática que Involucra a la Glucosa Oxidasa y Glucosa seguida por la Oxidación Electrocatálítica de Peróxido de Hidrógeno

En la figura 45, se muestra uno de los cronoamperogramas de la reacción enzimática que involucra a la glucosa oxidasa y glucosa seguida por la oxidación electrocatalítica de H_2O_2 , obtenidos con la metodología descrita a detalle en la página 66.

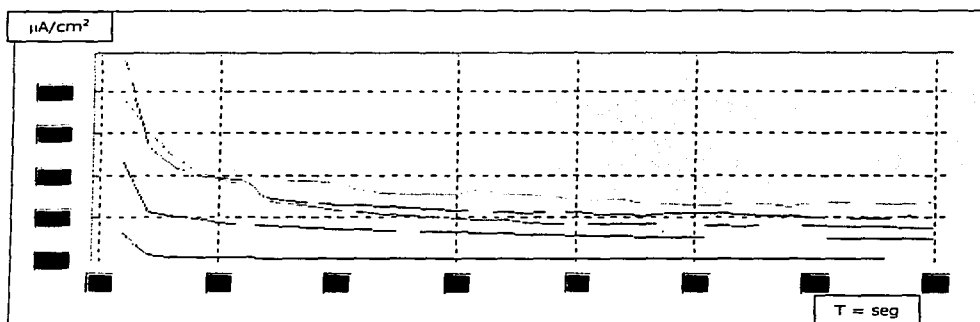
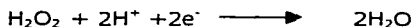


Figura 45. Cronoamperogramas de la reacción enzimática que involucra a la glucosa oxidasa y glucosa seguida por la oxidación electrocatalítica de H_2O_2 , de la solución glucosa de concentración 0.11 M se hicieron por cada determinación una adición de Buffer de fosfatos, 10 μl de GOD y 5 adiciones de 10 μl , de Glucosa para un intervalo de concentración de 0.01 M a 0.036 M, en la celda de trabajo.

Se demuestra que la determinación de glucosa mediante la Microcelda de Detección Enzimática, es posible realizarla debido a que el H_2O_2 que es el producto de la reacción se mide amperométricamente a través de su oxidación sobre la superficie del biosensor a un potencial anódico constante:



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

También se observa que en cada adición constante de disolución de Glucosa, el valor de corriente límite de difusión aumenta proporcionalmente.

Análisis Enzimático de Glucosa en Vino Tinto

En la figura 46, se muestran los cronoamperogramas de la reacción enzimática que involucra a la glucosa oxidasa y glucosa seguida por la oxidación electrocatalítica de H_2O_2 , obtenidos con las muestras de vino analizadas, la metodología experimental se describe detalladamente en la página 68.

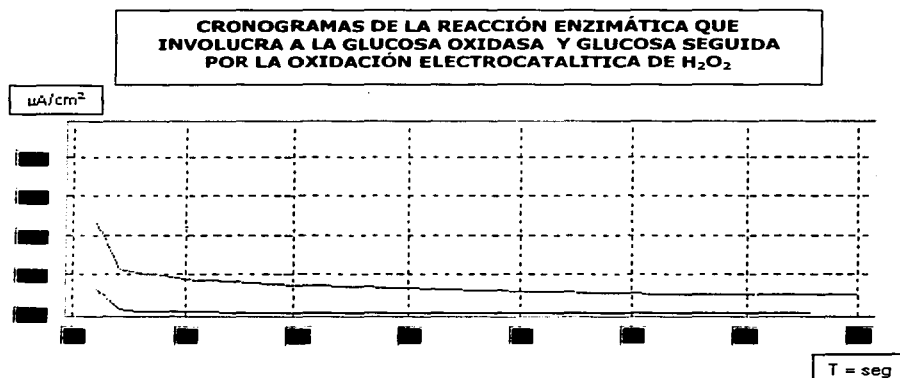


Figura 46 Cronoamperogramas adición de Buffer de fosfatos, $10 \mu l$ de GOD y 1 adiciones de $10 \mu l$, de Vino tinto (marca: Concha y Toro), en la celda de trabajo.

Se observa que en cada adición la constante de disolución de Glucosa, y el valor de corriente límite de difusión aumenta proporcionalmente.

Cabe mencionar que todos los vinos tintos analizados contenían entre el 12 –12.5 % de alcohol formado, por ello, para evaluar si la cantidad de glucosa presente en las muestras analizadas corresponde con la cantidad que debe tener regularmente el vino con estas características; se presenta a continuación en la tabla 13, el contenido de glucosa que debe presentar un vino tinto con este porcentaje alcohólico. Para mayor información sobre los azúcares presentes en el vino tinto, se sugiere consulte el anexo 1 (El vino Tinto).

Tabla 13 Contenido de azúcares presentes en las muestras de vinos analizadas

% alcohólico
Alcohol formado $12'40$

Glucosa gr/l
8

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Microensayo Enzimático para Glucosa Oxidasa

En la figura 47, observan los gráficos de actividad enzimática, que involucra a la glucosa oxidasa, obtenidos con la metodología descrita a detalle en la página 69.

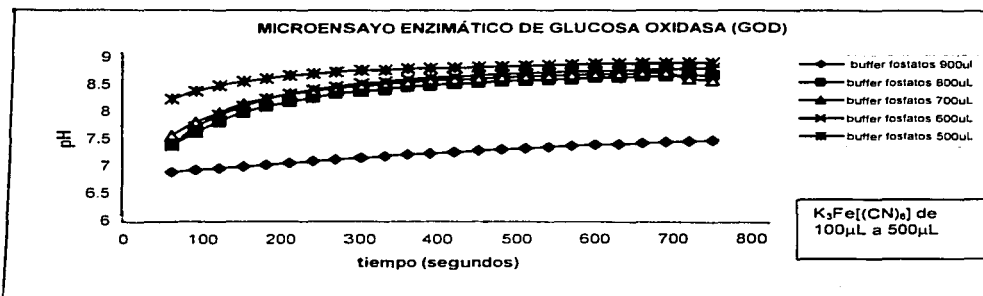


Figura 47. Se observan las cinco curvas de pH contra tiempo (seg) obtenidas del Microensayo Enzimático.

Los enzimas al ser proteínas, poseen propiedades que son muy sensibles al pH. De hecho, la mayoría de las proteínas solo son activas en un estrecho intervalo de pH, típicamente entre 5 y 9. Esto es el resultado de los efectos de pH sobre una combinación de factores: 1. La fijación del sustrato a la enzima; 2. La actividad catalítica de la enzima; 3. La ionización del sustrato y la variación de la estructura proteica (normalmente, sólo significativa a pH externos)^[19].

La función del ferricianuro de potasio, $K_3Fe[(CN)_6]$, en este experimento es como mediador enzimático, es decir, es una molécula de bajo peso molecular, capaz de transferir electrones entre el centro activo de la enzima y el electrodo. En primer lugar, el uso de un mediador induce ciertas ventajas siempre que el mediador no reaccione con el O_2 , haciendo que las mediciones sean virtualmente independientes de pO_2 . En segundo lugar el potencial de trabajo del electrodo enzimático está determinado por el E° , éste es ventajoso si el mediador tiene como base el E° ya que minimiza los cambios por interferencia, finalmente, si la oxidación del mediador reducido no involucra protones, puede hacer al electrodo enzimático relativamente insensible al pH. El uso de mediadores en conjunción con oxireductasas (como la Glucosa Oxidasa), hace que reaccionen rápidamente con la enzima reducida, que exhiba cinética heterogénea reversible, y que sea estable, tanto en forma oxidada como reducida^[20, 21, 22, 23].

ANÁLISIS DE RESULTADOS [24,25].

Curvas de Calibración Voltamperometría Cíclica

En la figura 48, se muestra la curva de calibración que resulta de los voltamperogramas observados en la figura 38.

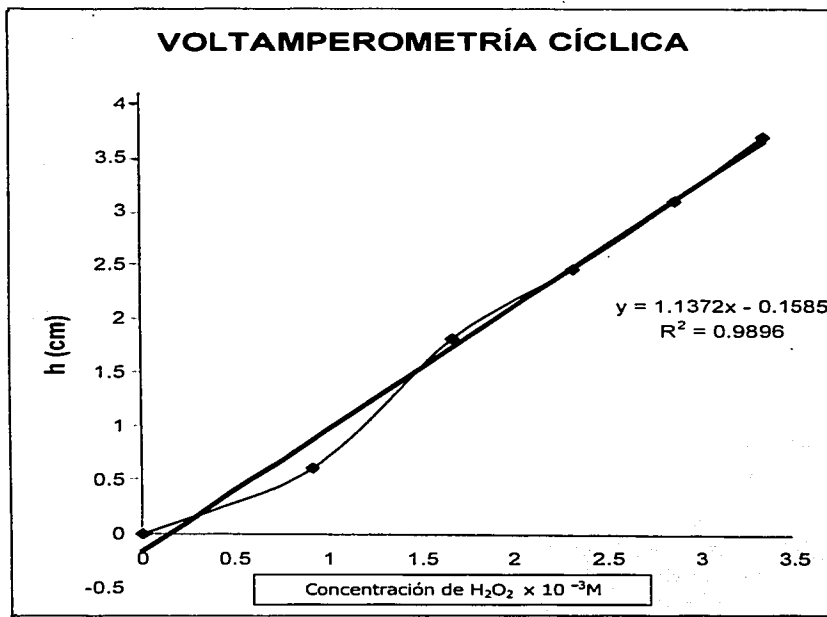


Figura 48. Curva de calibración de H₂O₂ en de Fosfatos 0.1M, pH = 7, de la disolución "stock" de H₂O₂ a una concentración 0.01M, se hicieron 5 adiciones de 10 μ l, por cada determinación.

Cada punto es el promedio de 3 repeticiones y presentan $\sigma = 1.01$.

$E_0 = -300\text{mV}$, $E_1 = 900\text{mV}$ $E = 300\text{mV}$; $E_{Tr} = \text{Pt}^\circ$, $E_{Ref} = \text{Ag/AgCl}$, $E_{Aux} = \text{Acero}$.

En la gráfica el coeficiente de correlación de la recta calculada en la figura 48, es de 0.9896, por lo que es un experimento en donde los datos semejan una correlación lineal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para constatar que el coeficiente de correlación es realmente significativo, se emplea la siguiente ecuación:

$$T = \frac{r / (n-2)^{1/2}}{(1-r^2)^{1/2}}$$

La hipótesis nula en este caso es que no existe correlación entre x y y . Si el valor calculado de t es mayor que el tabulado, la hipótesis nula se rechaza, es decir se concluye que existe una correlación significativa.

Para la curva de calibración calculada en la figura 48 el valor de $t = 13.75$

De la tabla A.1 (que se presenta en el anexo 2), el valor crítico de t para 3 grados de libertad es de 3.18 ($p = 0.05$), por lo tanto el valor calculado de t es por mucho, mayor que el tabulado, por lo que la hipótesis nula se rechaza; esto significa que existe una correlación realmente significativa.

Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y de la ordenada al origen son importantes, por lo que se calcularon los límites de confianza para la pendiente y para la ordenada en el origen de la recta de regresión calculada en la figura 48.

El valor de t para $(n-2) = 4$ y un nivel de confianza del 95 % es de 2.78. Entonces los límites de confianza al 95% para m y b son:

$$m = 1.1372 \pm 0.2151$$

$$b = -0.1585 \pm 0.4828$$

El límite de detección para esta recta es de 0.3268×10^{-3} M de H_2O_2 .

Curva de Calibración de la Cronoamperimetría para Peróxido de Hidrógeno Potencial de Reducción

En la figura 49, se muestran las curvas de calibración que resultan del ensayo realizado con H_2O_2 a un potencial de reducción, que se expone en la figura 40, realizando tres curvas de calibración a diferentes potenciales (-600 mV, -700 mV y -800 mV), para establecer el potencial de trabajo.

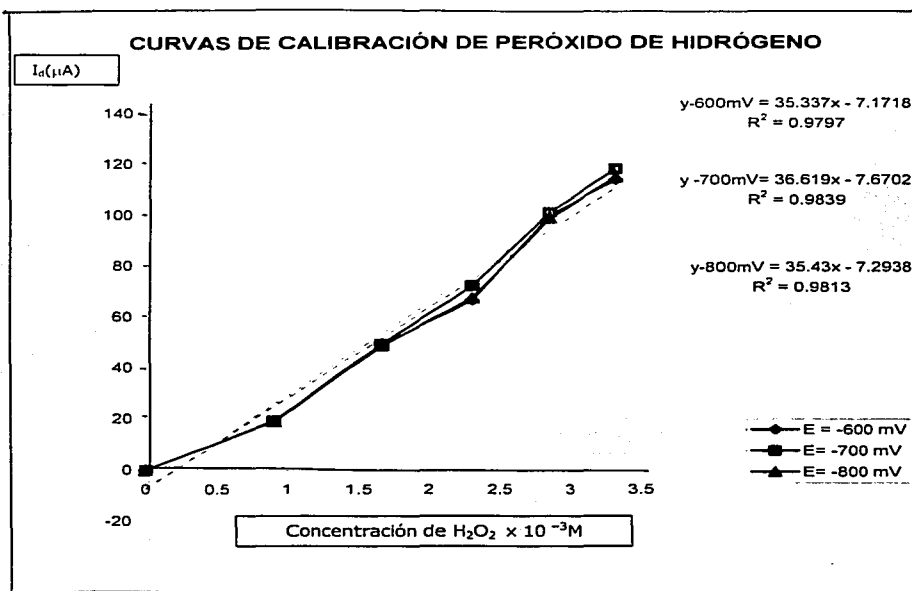


Figura 49. Curva de calibración de H_2O_2 en 1 Buffer de Fosfatos 0.1M, pH = 7, de la disolución "stock" de H_2O_2 a una concentración 0.01M, se hicieron 5 adiciones de 10 μl , por cada determinación. Cada punto es el promedio de 3 repeticiones y presentan $\sigma = 2.42$

$E_0 = -600$ mV; $E_0 = -700$ mV y $E_0 = -800$ mV.
 $E_{Tr} = Pt^\circ$, $E_{Ref} = Ag/AgCl$, $E_{Aux} = Acero$.

En la figura 49, se muestran los datos obtenidos para diferentes puntos. Se ve una variación lineal, que es corroborada por las ecuaciones de las rectas. De entre ellas la que tiene el mejor factor de correlación lineal es la que corresponde al potencial de -700 mV, cuyo $r^2 = 0.9839$. Por lo que, el siguiente paso consiste en determinar el tiempo de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

muestreo experimental, realizando determinaciones a diferentes tiempos de muestreo (30 y 60 segundos).

En la figura 50 se muestra la curva de calibración que emerge de los cronoamperogramas a diferentes tiempos de muestreo (30 y a 60 segundos).

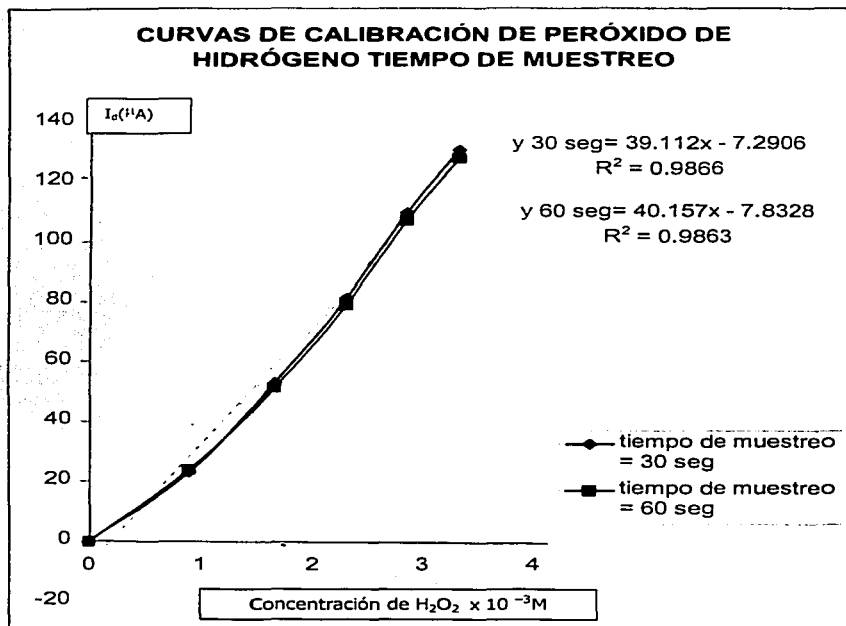


Figura 50. Curva de calibración de reducción de H_2O_2 en Buffer de Fosfatos 0.1M, pH = 7, de la disolución "stock" de H_2O_2 a una concentración 0.01M, se hicieron 5 adiciones de 10 μl , por cada determinación.

Cada punto es el promedio de 5 y presentan $\sigma = 5.18$ para un $t_{(muestreo)} = 30 \text{ seg}$

Cada punto es el promedio de 5 y presentan $\sigma = 5.70$ para un $t_{(muestreo)} = 60 \text{ seg}$

$E_0 = -700 \text{ mV}$; $E_{Tr} = Pt^\circ$, $E_{Ref} = Ag/AgCl$, $E_{Aux} = Acero$.

La figura 50, es análoga a la figura 49, pero en vez de realizar las determinaciones a diferentes potenciales se realizan a diferentes tiempos de muestreo: 30 y 60 segundos. El mejor tiempo de muestreo es el de 30 segundos, cuyo $r^2 = 0.9866$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Curva de Calibración de la Cronoamperometría para Glucosa con Glucosa Oxidasa a un Potencial de Reducción

La determinación de glucosa se realiza siguiendo el decremento del oxígeno en el medio de disolución a medida que se lleva a cabo la oxidación de la glucosa.

A continuación en la figura 51 se presentan las curva de calibración, correspondientes al ensayo de la figura 43, a un potencial de -500 mV y -600 mV.

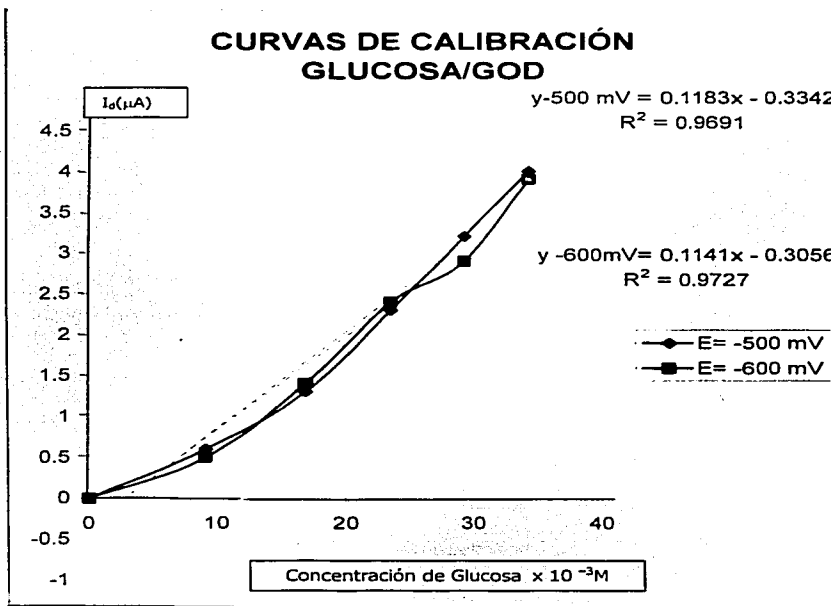


Figura 51. Curva de calibración de reducción de O_2 en Buffer de Fosfatos 0.1M, pH=7, más GOD en de la disolución de glucosa a una concentración 0.01M, se hicieron 5 adiciones de $10 \mu l$, por cada determinación.

Cada punto es el promedio de 5 repeticiones y presentan una $\sigma = 0.05$

$E_0 = -500$ mV; $t_{(muestreo)} = 30$ seg $E_{Tr} = Pt^0$, $E_{Ref} = Ag/AgCl$, $E_{Aux} = Acero$.

$E_0 = -600$ mV; $t_{(muestreo)} = 30$ seg $E_{Tr} = Pt^0$, $E_{Ref} = Ag/AgCl$, $E_{Aux} = Acero$.

Los resultados obtenidos en la figura 51, muestran las curvas de calibración donde se observa que a un potencial de -600 mV y un tiempo de muestreo de 30 segundos, son las condiciones experimentales para obtener el coeficiente de correlación de 0.9844, por lo que es un experimento en donde los datos semejan una correlación no completamente lineal.

La principal causa de error en los resultados, se debe, a que originalmente no esperábamos detectar la reducción, sino que debido a un error de instrumentación (ya que el transductor estaba detectando valores positivos como negativos y viceversa), creímos que la señal provenía de la oxidación de peróxido de hidrógeno.

Finalmente no se llevaron a cabo las medidas experimentales adecuadamente, ya que era necesario mantener la celda completamente cerrada y burbujear N_2 , para eliminar el O_2 atmosférico presente en el medio, el cual interfirió con la señal del O_2 producido por el peróxido de hidrógeno. obteniendo así datos experimentales alterados.

Curva de Calibración de la Cronoamperometría de Peróxido de Hidrógeno a un Potencial de Oxidación

En la figura 52, se muestran las curvas de calibración correspondientes a los cronoamperogramas por oxidación de H_2O_2 de la figura 44, en donde las rectas de regresión calculadas, emplean como tiempo de muestreo 30 segundos.

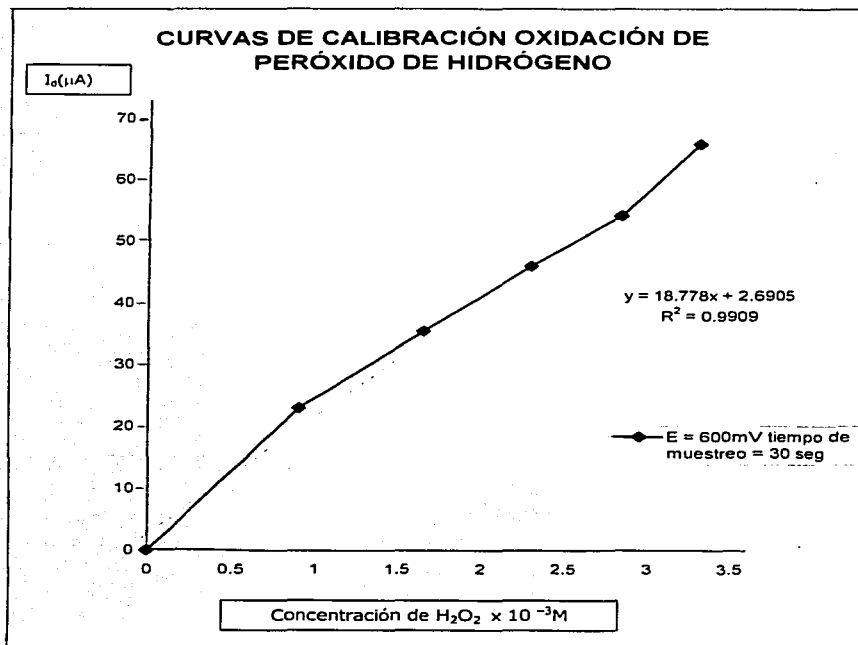


Figura 52 Curva de calibración de H_2O_2 en 100 μl de Buffer de Fosfatos 0.1M, pH = 7, de la disolución "stock" de H_2O_2 a una concentración 0.01M, se hicieron 5 adiciones de 10 μl , por cada determinación. Cada punto es el promedio de 5 repeticiones y presentan una $\sigma = 7.22$. $E = 600\text{mV}$ y $t = 30$ segundos. $E_{\text{Tr}} = \text{Pt}^\circ$, $E_{\text{Ref}} = \text{Ag}/\text{AgCl}$, $E_{\text{Aux}} = \text{Acero}$.

Para constatar que el coeficiente de correlación es realmente significativo se emplea la ecuación.

$$T = \frac{r / (n-2)^{1/2}}{(1-r^2)^{1/2}}$$

Para la curva de calibración calculada en la figura 52 el valor de $t = 20.77$

De la tabla A.1 (que se presenta en el anexo 2), el valor crítico de t para 4 grados de libertad es de 2.78 ($P = 0.05$), por lo tanto el valor calculado de t es ligeramente mayor que el tabulado, por lo que la hipótesis nula se rechaza; ésto significa que existe una correlación muy significativa.

Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y de la ordenada al origen son importantes, por lo que se calcularon los límites de confianza para la pendiente y para la ordenada en el origen de la recta de regresión calculada en la figura 52.

El valor de t para $(n-2) = 4$ y un nivel de confianza del 95 % es de 2.78. Entonces los límites de confianza al 95% para m y b son:

$$m = 18.778 \pm 7.28$$

$$b = 2.6905 \pm 8.50$$

El límite de detección para esta recta es de 0.4184×10^{-3} M de H_2O_2 .

Curva de Calibración Ponderada, Cronoamperometría de Peróxido de Hidrógeno (Potencial de Oxidación)

Para constatar que el experimento es reproducible, es decir que la Microcelda de Detección Enzimática logra detectar al peróxido de hidrógeno, se realizó la curva de calibración ponderada que se muestra en la figura 53.

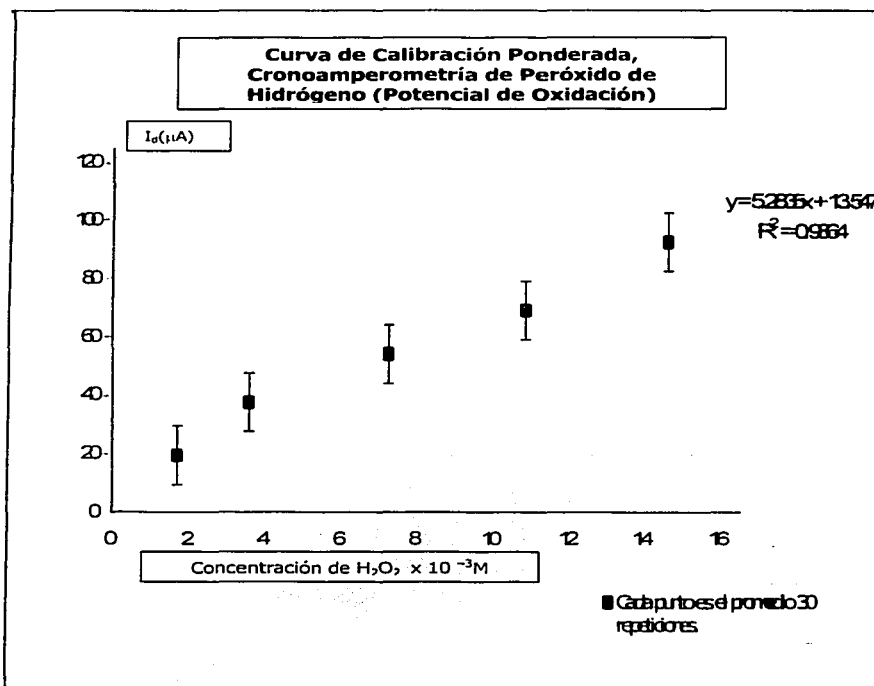


Figura 53 Curva de calibración ponderada de H_2O_2 en 100 μl de Buffer de Fosfatos 0.1M, pH = 7, de la disolución "stock" de H_2O_2 a una concentración 0.01M, se hicieron 5 adiciones de 10 μl . por cada determinación.

Cada punto es el promedio de 30 repeticiones y su $\sigma = 11.82$

$E = 600mV$; $t_{(muestreo)} = 30$; $E_{Tr} = Pt^\circ$, $E_{Ref} = Ag/AgCl$, $E_{Aux} = Acero$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Curva de Calibración para la Cronoamperometría de Glucosa con Glucosa Oxidasa

En la figura 54, se muestra la curva de calibración correspondiente al experimento descrito en la figura 45.

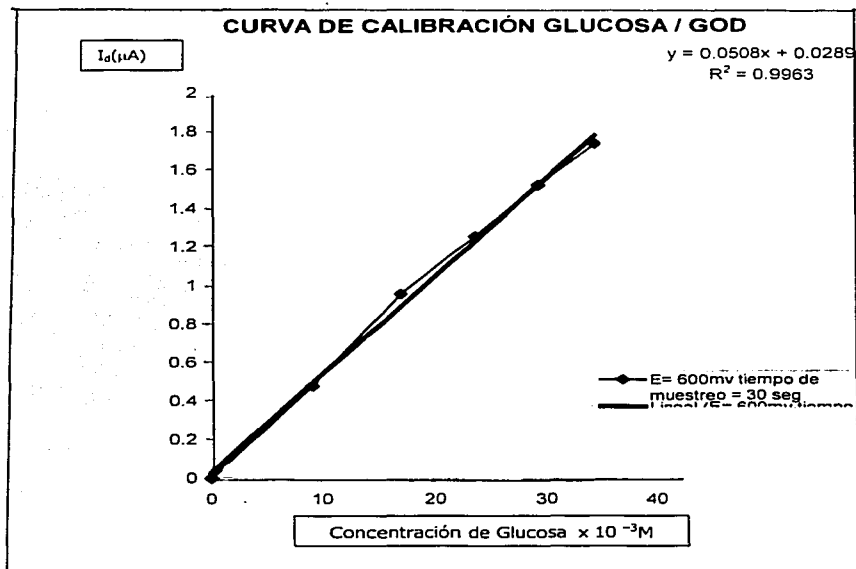


Figura 54. Curva de calibración de Buffer de Fosfatos, pH = 7, más GOD en la disolución de glucosa a una concentración 0.11M, se hicieron 5 adiciones de 10 μl , por cada determinación.

Cada punto es el promedio de 5 repeticiones y presentan $\sigma = 0.318$.

$E_0 = 600$ mV; $t_{(muestreo)} = 30$ seg $E_{Tr} = Pt^0$, $E_{Ref} = Ag/AgCl$, $E_{Aux} = Acero$.

La recta de regresión calculada en la recta de la figura 54, se utilizará en la práctica para estimar la concentración en la muestra problema por interpolación, por lo que se requiere que los valores experimentales se ajusten bien a una línea recta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como se observa en la figura 54, el coeficiente de correlación de la recta calculada es de 0.9963, lo que indica que es un experimento en donde los datos semejan una correlación lineal.

Para constatar que el coeficiente de correlación es realmente significativo se emplea la ecuación:

$$T = \frac{r / (n-2)^{1/2}}{(1-r^2)^{1/2}}$$

Para la curva de calibración calculada en la figura 54 el valor de $t = 32.79$.

De la tabla A.1 (que se presenta en el anexo 2), el valor crítico de t para 4 grados de libertad es de 2.78 ($P = 0.05$), por lo tanto el valor calculado de t es ligeramente mayor que el tabulado, por lo que la hipótesis nula se rechaza; ésto significa que existe una correlación significativa.

Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y de la ordenada al origen son importantes, por lo que se calcularon los límites de confianza para la pendiente y para la ordenada en el origen de la recta de regresión calculada en la figura 54.

El valor de t para $(n-2) = 4$ y un nivel de confianza del 95 % es de 2.78. Entonces los límites de confianza al 95% para m y b son:

$$m = 0.5591 \pm 0.1649$$

$$b = 0.0289 \pm 0.3569$$

El límite de detección para esta recta es de $0.2.716 \times 10^{-3}$ M de Glucosa.

Análisis Enzimático de Glucosa en Vino Tinto

Cálculo De Concentración De Glucosa

Los valores de X_0 se determinan fácilmente utilizando la ecuación de regresión de la figura 54 correspondiente a la Curva de calibración Glucosa / GOD, sustituyendo los valores de Y_0 , que corresponde a los valores obtenidos de i_d de cada una de las muestras de vinos tintos analizadas (Tabla 14).

Tabla 14. Valores de i_d obtenidos en cada determinación, de glucosa, en las diferentes marcas de vino tinto analizado.

Vino Tinto	i_d (μ A)	σ	Concentración de Glucosa $\times 10^2$ M	Concentración de Glucosa (g/l)
Concha y Toro.	0.942	0.082	1.885	2.939
Santa Rita	1.083	0.024	1.633	3.384
California	0.335	0.012	0.283	0.283
Sangre de Cristo	5.655	2.457	10.053	18.09

Se considera que la determinación de los métodos de análisis aplicados en el sector del vino para glucosa se obtiene $C \text{ g/l} = 8$ (Tabla 13).

Con los parámetros anteriores podemos deducir que el vino marca Sangre de Cristo, sobrepasa por mucho las especificaciones de glucosa. A continuación se presentan tres hipótesis:

1. Podría tratarse de un vino que no se ha fermentado en su totalidad hasta alcanzar el grado alcohólico de 12%.
2. También se podría tratar de una mezcla de vino de 12 % grado alcohólico con otro más rico en azúcares.
3. Finalmente se sospecha que ha sido enriquecido con sacarosa.

Estas hipótesis no han sido corroboradas, pues para determinar su condición real se tendría que verificar el proceso de fabricación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Microensayo Enzimático para Glucosa Oxidasa

En la figura 55, se presentan los gráficos de actividad enzimática, que involucra a la Glucosa Oxidasa, sustraídos de la figura 47.

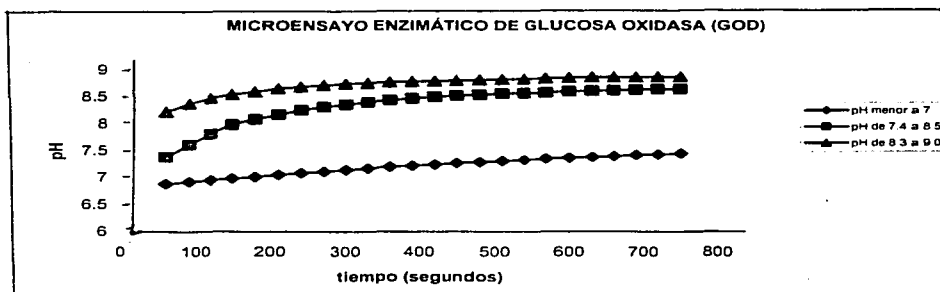


Figura 55. Se observan las tres curvas más representativas de la actividad enzimática de la GOD obtenidas del Microensayo Enzimático.

Las velocidades iniciales de muchas reacciones enzimáticas en función del pH muestran curvas en forma de campana. Estas curvas reflejan la ionización de ciertos restos de aminoácidos que han de encontrarse en un estado de ionización determinado a fin de que haya actividad enzimática^[20].

En la figura 55 se observan tres comportamientos distintos de actividad enzimática de Glucosa Oxidasa (GOD) a diferentes intervalos de pH:

1. En el intervalo de pH menor a 7, se observa que la actividad enzimática de la Glucosa Oxidasa (GOD), es nula, ya que el comportamiento que presenta en la gráfica es lineal.
2. En cambio, en el intervalo de pH de 7.4 a 8.5, se observa que la enzima GOD presenta mayor actividad, ya que muestra la curva en forma de campana más prolongada.
3. Finalmente en el intervalo de pH de 8.4 a 9.0, se observa actividad enzimática pero a menor escala ya que la curva que aparece en la gráfica es menos prolongada.

Los resultados anteriormente expuesto nos demuestran que el intervalo de pH más adecuado para la actividad enzimática de la enzima GOD es el de 7.4 a 8.5.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO^[25,26].

En la Tabla 15, se presenta un resumen de los resultados expuestos de todas las ecuaciones de correlación lineal; los coeficientes de correlación lineal; los errores asociados a la pendiente y ordenada al origen a un 95% de confianza; los límites de detección y coeficientes de variación (95% de confianza).

Técnica	Ecuación de regresión lineal	Errores de pendiente y ordenada al origen	r^2	Límite de detección (L.D)
Voltamperometría Cíclica	$I_d = 1.1372C - 0.1585$	$m = 1.1372 \pm 0.2151$ $b = -0.1585 \pm 0.4828$	0.9896	0.3268×10^{-3} M de H_2O_2 .
Cronoamperometría Oxidación del H_2O_2	$I_d = 18.778C + 2.6905$	$m = 18.778 \pm 7.28$ $b = 2.6905 \pm 8.50$	0.9909	0.4184×10^{-3} M de H_2O_2 .
Cronoamperometría Glucosa/ GOD	$I_d = 0.5591C + 0.0289$	$m = 0.5591 \pm 0.1649$ $b = 0.0289 \pm 0.3569$	0.9963	$0.2.716 \times 10^{-2}$ M de Glucosa

De acuerdo con los datos obtenidos en la curva de calibración ponderada (figura 53), para la determinación de H_2O_2 , el valor del coeficiente de correlación lineal que obtenemos es de 0.9864, con lo cual se demuestra que la Microcelda de Detección Enzimática, da una respuesta reproducible y repetitiva, ya que en este experimento cada punto es el promedio de 30 repeticiones y presenta una $\sigma = 11.82$, lo cual demuestra que, incluso se puede emplear a la Microcelda de Detección Enzimática como un sensor químico para analizar H_2O_2 .

En general las técnicas muestran curvas de calibración con rectas de linealidad aceptable, con coeficientes mayores a 0.98, por lo que las mejor técnica para la determinación de H_2O_2 y para la determinación de glucosa fue la cronoamperometría con potencial de oxidación.

Los límites de detección para H_2O_2 están en el orden de 1×10^{-3} M y los correspondientes a la determinación de glucosa están en valores del mismo orden.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CONCLUSIONES

Las técnicas electroquímicas presentadas, son una alternativa a los métodos colorimétricos, espectrofotométricos y espectroscópicos reportados en la literatura para la determinación de Glucosa.

La técnica electroquímica de cronoamperometría resultó útil por ofrecer la facilidad de trazar curvas de calibración; por realizarse en corto tiempo, no mayor a 30 segundos; ser selectiva al analito, debido al valor del potencial de trabajo (600 mV), además que permite la determinación del analito (H_2O_2), sin más preparación que medio de reacción de un electrolito soporte (Buffer de Fosfatos 0.1M,) a un pH controlado (pH= 7.) y en caso de las determinaciones con Glucosa Oxidasa, sólo fue necesario un medio con Glucosa (ya sea solución estándar o muestras de vino tinto) y la adición de 10 μL de enzima que equivalen a 0.02159 U/g de GOD.

La Microcelda Electroanalítica de Detección Enzimática es un dispositivo que presenta las siguientes ventajas:

- Análisis a microescala.

La Microcelda Electroanalítica de Detección Enzimática tiene una capacidad de 300 μL , en el procedimiento experimental sólo se utiliza un volumen no mayor a 160 μL , realizando las adiciones en el mismo espacio físico, incluyendo todo el arreglo del sistema con electrodos, por lo que la cantidad de reactivos como de residuos se minimizan.

- El tiempo de experimentación es muy corto, ya que el tiempo promedio de una curva de calibración cronoamperométrica no es mayor a 30 min.
- El costo es muy bajo, ya que se realiza con materiales que se encuentran accesibles en el mercado nacional, como acrílico y electrodos diseñados en el laboratorio.
- El mínimo manejo de la muestra, se requiere de micropipetas, ya que manejamos volúmenes muy pequeños, un sistema con variables controlables dentro del medio

de reacción, como una disolución reguladora de pH para evitar que la enzima se dañe perdiendo actividad y control de la temperatura.

- Variabilidad, la Microcelda de Detección Enzimática, mostró mucha eficiencia para la determinación de glucosa al incorporar Glucosa Oxidasa (GOD) como biocomponente, dándole un carácter de biosensor. También, se logró la determinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), proveniente de soluciones estandar, por lo que se puede emplear como sensor químico para este analito.
- Además la Microcelda de Detección Enzimática, sí responde al analizar muestras con contenido de glucosa, incluso se empleó para analizar muestras comerciales de vino tinto, por lo que puede proyectarse en el futuro su desarrollo a nivel industrial, reduciendo los costos significativamente, comparados con los biosensores para determinar glucosa que se emplean actualmente en la industria alimentaria.

En la Tabla 16 se muestran en forma resumida, las características que posee La Microcelda de Detección Enzimática.

Tabla 16 Características que posee La Microcelda de Detección Enzimática.

Características	Presenta
Específico	Sí
Reproducibile	Sí
Preciso	Sí
Exacto	Sí, con fácil calibrado
Sensibilidad adecuada	Sí, excepto en análisis traza
Respuesta rápida	Sí, (30segundos)
Miniaturizable	Sí,
Capaz de utilizar pequeños volúmenes de medida	Sí, (capacidad máxima 300 μ l)
Robusto	manejo muy sencillo
Estable	Sí, en cortos períodos

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Luong, John H. T. Bouvrette, Pierre and Male, Keith B; *Developments and applications of biosensores in food analysis*, TIBTECH, 15, 369-377 (1997).
- [2] Finley, John W; *Food Biosensor Analysis*, Trends in Food Science and Technology, 6, 250-251 (1995).
- [3] Walker, J.M. y Gingold, E.B.; *Biología Molecular y Biotecnología*, 2ª edición. Ed. Acribia. España, 2000, capítulo 19.
- [4] Ref. Alegret Salvador. *Biosensores. Su utilización en los campos Biomédicos, Ambiental e Industrial*. Departamento de Química, Universidad Autónoma de Barcelona. Industria Farmacéutica. Nov-Dic. 1990, España. Pag 33-39, 41-43.
- [5] Deshpande, S.S. and Rocco, R.M.; *Biosensors and their potential use in food quality control*. Food Tech., June, 146-150 (1994).
- [6] Hart, John P. And Wring, Stephen A.; *Recent developments in the desing and application on screen-printed electroquemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses*, Trends Anal.Chem., 16, 89-103 (1997).
- [7] Tothll,I.E.;Newman, J.D.; White S.F. and Turner, A.P.F.; *Monitoring of the glucose concentration during microbial fermentation using a novel mass-producible biosensor suitable for on-line use*, Enzyme Microb. Technol., 20, 590-596 (1997).
- [8] Rubinson, Judith F. y Rubinson, Kenneth A.; *Química Analítica Contemporánea*. Prentice Hall Hispanoamericana, 2000, capítulo 15, páginas 520-524.
- [9] Vassos, B.H; Edwing G.W; *Electroquímica Analítica*. Limusa Noriega Editores, México, 1998; capítulo 2, página 55.
- [10] Bard, J; *Eletroquímica methods, fundamentals and applications*. Ed. John Wiley and Sons, USA, 1980. capítulos 1,5 y 6, páginas 1-38, 136-175 y 213-221.
- [11] Hobardt H. Willard; Lynne L. Merritt,Jr.; John A. Dean; *Métodos Instrumentales de Analisis*. Ed. Continental, México, 1984; capítulo 22, página 694-700.
- [12] Morales Pérez, Adriana; *Construcción y evaluación de biosensores amperométricos basados en biocomposites*. Departamento de Química. Unidad de Química Analítica. Universidad Autónoma de Barcelona, España. Pag.16, 19, 22-26, 33, 124.
- [13] Owen R. Fennema. *Química de Alimentos*. Segunda edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España, 1990. Capítulo 4.
- [14] Iturbe Ch., Francisca. A y Valdivia L., Ma. de los Angeles. *Análisis físicoquímico de alimentos*. Dpto. de Alimentos y Biotecnología, FQ, UNAM, 1994.

- [15] Harold Egan, Ronald S. Kirk, Ronald Sawyer. *Análisis Químico de Alimentos de Pearson*. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V., México D.F. 1987, Capítulo 6.
- [16] Wiseman, A. *Manual de Biotecnología de los enzimas*. Editorial Acribia, Zaragoza España, 1991, pag. 303,349.
- [17] <http://www.brenda.uni-koeln.de>
- [18] <http://www.r-biopharm.com>
- [19] Donald Voet, Judith G. Voet.; *Bioquímica*. Ed. Omega, S.A., Barcelona, 1992, Capítulo 13.
- [20] M. Gillis, H. Durliat y M. Comtat; *Electrochemical Biosensors for Assays of L-Malic and D-Lactic Acids in Wines*, Am, J. Vitic. Vol 47, No. 1, 1996.
- [21] P.N. Bartlet, J.M. Cooper; *A review of enzymes in electropolymerized films*, Journal Electroanalytical Chemistry. 362 (1993)1-12.
- [22] Jane E. Frew, H. Allen O. Hill; *Electrochemical Biosensors*, Analytical Chemistry. Vol 59, No. 15, August, 1987.
- [23] Miguel Angel Lopez Gil, Fidel Ortega Ortiz de Apodaca; *Inmunosensores: herramientas analíticas con un gran potencial de futuro*, departamento de Química Analítica e Ingeniería Química de la Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares 28871 Madrid España. Schironia No.1- Noviembre, 2002.
- [24] Aranéo, A.; *Química Analítica Cualitativa*. Ed. Mc Graw Hill, 1981.
- [25] Miller, J. C.; Miller, J. N.; *Estadística para química analítica*. Addison-Wesley Iberoamericana, Segunda Edición, 1993. Capítulo 5, páginas 87-119.

ANEXO 1:

El Vino Tinto



El color del vino tinto no se debe a la pulpa de la uva, ya que en la mayoría de los casos es incolora. El color del vino tinto se obtiene fermentando el mosto obtenido de las uvas con su pulpa, hollejos y pepitas (partes sólidas del racimo), donde está contenida la materia colorante que da al mosto la característica tonalidad tinta. Este proceso se conoce como maceración, y va a determinar de forma decisiva las características propias de sabor y aroma del vino tinto, ya que aporta el color, taninos y cuerpo, además de los aromas primarios.

La elaboración comienza con el estrujado de la uva, que consiste en romper el hollejo para liberar el zumo. Al estrujado sigue el despallillado, para eliminar el escobajo del racimo y evitar el exceso de tanino, aspereza y metanol en el vino. Después se pasa a los depósitos de fermentación, en los que se debe dejar, como mínimo, un 20% de su capacidad vacío, ya que al fermentar, la masa aumenta de volumen y se produce espuma al hervir el mosto, lo cual podría producir reboses en los depósitos. En este proceso, las partes sólidas afloran a la superficie, formando lo que se llama el **sombrero**, que debe remojar frecuentemente con mosto en fermentación, para lograr la homogenización de la mezcla. Este es el **remontado**. Durante todo el proceso es vital controlar la densidad y temperatura, que no debe sobrepasar los 30°, ya que ambas son decisivas para una buena fermentación alcohólica y para conseguir el vino con las características deseadas.

Si se quieren obtener vinos jóvenes, deberán permanecer macerando alrededor de una semana, mientras que si los que se desean son caldos destinados a crianza, reserva o gran reserva, se debe llegar hasta los 20 días. Cuando la maceración ha terminado, el caldo es separado de los orujos, que se prensan obteniéndose **vino de prensa**, de peor calidad y la parte sólida se destina a destilación en las fábricas de alcohol para obtención de **alcohol vínico**.

Otra forma de conseguir el vino tinto es mediante la maceración carbónica, que consiste en causar la fermentación por medio de la introducción de racimos enteros de uva, sin

estrujado y despallado, en un depósito con CO₂ y sin apenas oxígeno. La uva, que está intacta, sufre una fermentación intracelular. Después de esta maceración se procede al estrujado y prensado. Este sistema produce vinos muy suaves, con bastante cuerpo e intenso color, muy afrutados, aptos para consumir como vinos jóvenes, no adecuados para crianza y que con el tiempo pierden estas cualidades.

El caldo se trasiega a los depósitos adecuados, donde sufrirá una segunda fermentación, la **maloláctica**, que proporciona finura y suavidad al transformar el ácido málico en ácido láctico, suave y sedoso. Posteriormente el vino se somete a varios trasiegos con el fin de clarificarlo y eliminar las lías.

La crianza es el proceso destinado a mejorar las características del vino. Los vinos destinados a crianza deben tener buenas cualidades, deben ser recios, con la adecuada aspereza, acidez y colores vivos e intensos. En la crianza vamos a distinguir varias fases:

a) El primer año de crianza se realiza en depósitos de acero inoxidable con el fin de decantar las partículas más finas que hayan quedado en suspensión, trasegándolo cada cierto tiempo.

b) Crianza en barricas de madera de roble de 225 litros, en las que puede permanecer varios períodos de tiempo según el tipo de vino que deseemos obtener. En esta fase la madera cederá al vino sus aromas y taninos, además retrasará su decadencia. Durante el tiempo de permanencia del vino en barrica, las condiciones de la bodega deben ser de humedad entorno al 80% , temperatura constante, más bien baja, penumbra, ausencia de ruidos y vibraciones. El método de envejecimiento es por el sistema de **soleras** o **criaderas**, en el cual las barricas se apilan unas sobre otras, hasta un tres o cuatro alturas, denominándose solera a la fila más baja y criaderas a las superiores. El vino se va extrayendo, en lo que se denomina **saca**, de las soleras, que se rellenan en un proceso descendente, con vino de la criadera inmediatamente superior o primera criadera, ésta se rellena con vino de la segunda criadera y así hasta llegar a la última criadera, que se rellena con vino nuevo. El vino se redondea, gana en suavidad, aparecen los aromas terciarios y el color vira a tonos teja. Al final de la crianza deben unificarse las calidades de vino mediante mezclas de caldos de la misma cosecha en la operación llamada **cabeceo**. Se clarifican , filtran y pasan a la crianza en botella.

c) Para el embotellado es fundamental la buena limpieza de las botellas y el uso de corchos de primera calidad. Una vez llenas las botellas, se trasladan a los botelleros, donde deben permanecer en posición horizontal para que el corcho esté permanentemente húmedo y no se seque, lo cual permitiría el paso de aire al interior y microorganismos que oxidarían y alterarían el vino. La zona de botelleros debe reunir las mismas cualidades en cuanto a humedad y temperatura de la zona de barricas. Es en este período el vino se afina, pierde astringencia y gana los aromas de esta fase reductora anaerobia. La duración de la crianza en botella puede durar varios años.

Tipos de vino

Existen tres tipos básicos de vino tinto en función de la edad:

Crianza: Son todos aquellos vinos que han madurado durante un año en barril y otro en botella.

Reserva: Vinos que han pasado al menos un año en barril, así como un mínimo de dos años en botella.

Gran Reserva: Caldos que han permanecido al menos dos años en barril y otros tres años en botella.

Azúcares Presentes en el Vino

La uva contiene un 15-25% de Glucosa y Fructosa, que poseen la misma fórmula empírica y se encuentran en cantidades casi iguales en la uva madura, con un ligero predominio de la Fructosa, siendo aproximadamente 0'95 la relación Glucosa/Fructosa, que disminuye durante la fermentación, pues las levaduras fermentan principalmente la Glucosa.

Tabla 17 Contenido de azúcares presentes en el vino.

	Glucosa gr/l	Fructosa gr/l	Glucosa/Fructosa
Mosto antes de fermentar	123	126	0'97
Alcohol formado 0'7º	111	125	0'88
Alcohol formado 5'3º	57	103	0'55
Alcohol formado 12'4º	8	32	0'25

Como se observa en la tabla 14, la mayor parte de azúcar que permanece tras la fermentación es la Fructosa, que tiene un poder edulcorante superior a la Glucosa, aproximadamente 2 veces mayor.

La uva apenas contiene Sacarosa, que es desdoblada en Glucosa y Fructosa por las levaduras durante la fermentación, por lo cual "el vino no contiene Sacarosa" . Su presencia por adicionamiento para enriquecer ciertos vinos, supone un fraude para el consumidor, aunque sea legal.

ANEXO 2

Tabla A.1
La distribución t

Valor de t para un intervalo de confianza de	90%	95%	98%	99%
Valor crítico de /t/ para valores de P de	0.10	0.05	0.02	0.01
Número de grados de libertad				
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

TESIS CON
 FALLA DE JACEN