



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UN SISTEMA ENZIMATICO DE
MONITOREO DE ABUSO DE TEMPERATURA

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A N
GONZALEZ RUIZ MARTHA BEATRIZ
LORENZO CHONTAL MANUEL



MEXICO



2004

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Profra. Zoila Nieto Villalobos
Vocal	Profra. María Elena Cañizo Suárez
Secretario	Profr. José Mariano García Garibay
1er. Suplente	Profra. Gabriela Alatorre García
2o. Suplente	Profra. Maricarmen Quirasco Baruch

Planta Piloto 2, Departamento de Biotecnología, UAM Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

Asesor

Dr. José Mariano García Garibay

Supervisor técnico

M. en C. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Sustentantes

González Ruíz Martha Beatriz

Lorenzo Chontal Manuel

A Dios, por haberme otorgado el misterioso don de la existencia, por estar presente en la luz y en la oscuridad.

A mis padres Teresa e Ismael, por haber guiado mis pasos en cada etapa de la vida, por todos los sacrificios realizados, por cada hora de paciente espera y cada gramo de confianza depositado en mí.

A mi hermana Tere, por haber tomado mi mano siempre que el camino era incierto, por cada instante de franca alegría, por ser el baúl donde vertía mis secretos, mis lágrimas, y obtenía la fuerza necesaria para recomenzar.

A mi hermano Carlos, por ser a la vez el segundo padre y el amigo, por representar mi ejemplo de sabiduría y rectitud, por todos los silencios convertidos en pláticas amenas, enriqueciendo mi alma y mostrándome la verdad.

A mi hermana Claudia por todas esas maravillosas palabras de aliento, por ser el impulso para seguir adelante, por todas las caminatas bajo la luna, por mostrarme todos los tesoros increíbles que pueden encontrarse con fortaleza y decisión.

A Eduardo y Daniel, porque sin saberlo me han mostrado que la madurez no implica abandonar los juegos y las carcajadas.

A José Luis, Luis Antonio y Karlla, por haber llegado a mi vida y haber engrandecido así mi pequeña familia.

A mamá Josefina, tío Carlos y tía Pilar, por transformar con su compañía cada mañana en una fiesta, por su inmenso apoyo.

A todos los miembros de mi gran familia, tíos, primos y sobrinos, por cada momento ameno compartido.

A todos aquellos que no están presentes, que ya han partido hacia un nuevo Universo; tal vez alguna vez pueda contarles todas las historias que quedaron sin decir.

A mis eternos amigos Raquel, Manuel, Armando, Cinthya, Ángel, Jerson y Emmanuel, por cada uno de los grandes momentos, por los espacios que hicimos nuestros en todos estos años, por las pláticas y las risas, por haber salvado muchos días malos y haberme mostrado lo mejor de la universidad.

A todas las personas que el tiempo y la distancia me impiden recordar, pero que han trazado de alguna manera mi sendero y me han forjado para convertirme en lo que soy.

Y a ti, Javier, por haberte presentado ante mí en los bosques de esta tierra, por haber traído la luz brillante de los días antiguos para mí, por disipar mis tinieblas, por regalarme los instantes más hermosos y por haber elegido permanecer a mi lado más allá de los confines del mundo.

BEATRIZ

A Dios, por estar siempre conmigo y por guiar mis pasos.

A mis padres, por su infinito amor, por los valores que me enseñaron, por todas las veces que resucitaron la esperanza en mi corazón cuando todo parecía perdido y por todo el apoyo que me han dado, siempre les estaré agradecido y los llevaré en mi corazón a donde quiera que vaya.

A mi hermano, por su gran apoyo, por ser mi eterno aliado, por recordarme siempre nuestro objetivo y por compartir conmigo tantas cosas en las épocas buenas y aún en las malas.

Al mis tíos y primos, por los buenos momentos que pasamos y especialmente para todos aquellos que me apoyaron en todo momento, como lo son a los miembros de las familias Lorenzo Valdés, Lorenzo Domínguez y Chontal Moreno porque su apoyo fue crucial para alcanzar mis objetivos.

A mis abuelos, por todo el cariño y apoyo que han dado durante toda mi vida.

A Raquel, por hacer que mi estancia en la facultad fuera la más maravillosa, por ser tan buena conmigo, por compartir conmigo muchos de los mejores momentos de mi vida y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A Emmanuel, por su incomparable lealtad y por brindarme su amistad, mejor amigo que tú no hay.

A Bety, por ser tan buena amiga y una gran compañera de trabajo, aunque nos dejemos de ver, toda la vida te recordaré a ti y también a Javier, para ustedes mis mejores deseos y que vivan muy felices.

A mis mejores amigos de la facultad: Héctor, Bety, Javier, Omar, Moisés, Emmanuel Rubio, Manuel, Ana Laura, César Pacheco, Cinthya y Ángel por los buenos momentos que pasamos, por enseñarme tantas cosas y porque los lazos de amistad que nos vinculan son irrompibles.

A todas las personas con las que me llevé bien en lo que va de mi vida:

Porque aunque no los recuerdo bien a todos, con ellos viví algunos de los mejores momentos, por todas la aventuras que pasamos pero sobretodo por alegrarme con su paso por mi vida.

Para todos aquellos que no recuerdo pero que por mínima que fuera su aportación, me tendieron la mano para que alcanzara mis metas.

Y aún para todos aquellos que hicieron lo posible por obstaculizar mi camino, porque en lugar de desanimarme me han dado el coraje para llegar hasta este día, en el que simplemente les digo ¡Gracias!

MANUEL

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Alma Cruz Guerrero por su gran apoyo a lo largo de toda la investigación

Al Dr. Mariano García Garibay por todas las facilidades y apoyo académico brindados durante nuestra estancia en la UAM

A los miembros de nuestro jurado por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis

A la UNAM por su excelente personal académico que nos formó como profesionistas al servicio de nuestra sociedad

A todos los miembros de la Planta Piloto 2 de la UAM Iztapalapa que de una forma u otra colaboraron en la realización de este proyecto

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Objetivo	5
2.2. Hipótesis	5
3. ANTECEDENTES	6
3.1. La refrigeración y el abuso de temperatura	6
3.1.1. Carne y productos cárnicos	11
3.1.2. Pescado	14
3.1.3. Leche y productos lácteos	15
3.1.4. Los productos vegetales	18
3.2. Los indicadores de abuso de temperatura	19
3.3. Sistemas enzimáticos para uso en dispositivos indicadores de abuso de temperatura	24
3.3.1. La enzima β -galactosidasa	24
3.3.2. El sistema enzimático colorimétrico GOD-PAP de Spinreact®	27
3.4. Materiales de soporte para uso en dispositivos indicadores de abuso de temperatura	28
3.4.1. Grenetina	28
3.4.2. Poliacrilamida	30
3.5. El papel del agua en la catálisis enzimática	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1. Determinación de la actividad enzimática a 9°C	36
4.2. Sistema enzimático β -galactosidasa-ONPG	36
4.2.1. Uso de n-pentadecano como soporte	36
4.2.1.1. Determinación de la estabilidad de emulsiones de agua en aceite mineral	36
4.2.1.2. Determinación cualitativa de la actividad enzimática en aceite mineral	37
4.2.1.3. Construcción de películas de n-pentadecano	37
4.2.1.3.1. Método de superficie con agua fría	38
4.2.1.3.2. Método de placas de vidrio	38
4.2.1.4. Determinación cualitativa de la actividad enzimática en n-pentadecano	40
4.2.1.5. Preparación de emulsión de β -galactosidasa en n-pentadecano	40
4.2.1.6. Preparación de emulsión de ONPG en n-pentadecano	40
4.2.1.6.1. Determinación de la estabilidad de emulsiones de 3% de agua en n-pentadecano con 0.52% ONPG a distintas concentraciones de DMSO	41
4.2.1.6.2. Determinación de la actividad enzimática en presencia de 5% DMSO	41

4.2.1.7. Construcción del sistema enzimático	41
4.2.1.8. Efecto del n-pentadecano sobre la estabilidad del color del ONP	42
4.2.2. Uso de poliacrilamida como soporte	42
4.2.3. Uso de grenetina como soporte	43
4.2.3.1. Determinación del tiempo de transición de gel a líquido en función de la concentración de grenetina (Parte 1)	43
4.2.3.2. Construcción del sistema enzimático en grenetina	44
4.2.3.2.1. En sistemas abiertos	44
4.2.3.2.2. En sistemas sellados	45
4.2.3.3. Determinación del tiempo de transición de gel a líquido en función de la concentración de grenetina (parte 2)	47
4.2.3.4. Construcción del sistema enzimático en gel de grenetina al 1.3%	48
4.2.3.4.1. Con n-pentadecano como aislante	48
4.2.3.4.2. Con grenetina al 1.3% como aislante	48
4.2.3.5. Efecto del tiempo transcurrido desde la preparación hasta la utilización de la enzima sobre la gelificación de la solución enzimática en grenetina al 1.3%	49
4.3. Sistema enzimático β -galactosidasa-X-gal	49
4.4. Sistema enzimático β -galactosidasa-lactosa-GOD-PAP	50
4.4.1. Uso de poliacrilamida como soporte	50
4.4.2. Uso de grenetina como soporte	51
4.4.2.1. Método de placas de vidrio para la construcción de películas de grenetina	51
4.4.2.2. Construcción del sistema enzimático en grenetina al 10%	52
4.5. Sistema enzimático GOD-PAP-glucosa	53
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
5.1. Determinación de la actividad enzimática a 9°C	54
5.2. Sistema enzimático β -galactosidasa-ONPG	55
5.2.1. Uso de n-pentadecano como soporte	55
5.2.1.1. Determinación de la estabilidad de emulsiones de agua en aceite mineral	55
5.2.1.2. Determinación cualitativa de la actividad enzimática en aceite mineral	56
5.2.1.3. Construcción de películas de n-pentadecano	58
5.2.1.3.1. Método de superficie con agua fría	58
5.2.1.3.2. Método de placas de vidrio	58
5.2.1.4. Determinación cualitativa de la actividad enzimática en n- pentadecano	59
5.2.1.5. Preparación de emulsión de β -galactosidasa en n- pentadecano	60
5.2.1.6. Preparación de emulsión de ONPG en n-pentadecano	61

5.2.1.6.1. Determinación de la estabilidad de emulsiones de 3% de agua en n-pentadecano con 0.52% ONPG a distintas concentraciones de DMSO	63
5.2.1.6.2. Determinación de la actividad enzimática en presencia de 5% DMSO	64
5.2.1.7. Construcción del sistema enzimático	65
5.2.1.8. Efecto del n-pentadecano sobre la estabilidad del color del ONP	67
5.2.2. Uso de poliacrilamida como soporte	68
5.2.3. Uso de grenetina como soporte	73
5.2.3.1. Determinación del tiempo de transición de gel a líquido en función de la concentración de grenetina (parte 1)	73
5.2.3.2. Construcción del sistema enzimático en grenetina	74
5.2.3.2.1. En sistemas abiertos	74
5.2.3.2.2. En sistemas sellados	78
5.2.3.3. Determinación del tiempo de transición de gel a líquido en función de la concentración de grenetina (parte 2)	83
5.2.3.4. Construcción del sistema enzimático en gel de grenetina al 1.3%	84
5.2.3.4.1. Con n-pentadecano como aislante	84
5.2.3.4.2. Con grenetina al 1.3% como aislante	85
5.2.3.5. Efecto del tiempo transcurrido desde la preparación hasta la utilización de la enzimática sobre la gelificación de la solución enzima en grenetina al 1.3%	85
5.3. Sistema enzimático β -galactosidasa-X-gal	86
5.4. Sistema enzimático β -galactosidasa-lactosa-GOD-PAP	88
5.4.1. Uso de poliacrilamida como soporte	88
5.4.2. Uso de grenetina como soporte	89
5.4.2.1. Método de placas de vidrio para la construcción de películas de grenetina	89
5.4.2.2. Construcción del sistema enzimático en grenetina al 10%	89
5.5. Sistema enzimático GOD-PAP-glucosa	90
5.6. Comparación entre los sistemas enzimáticos desarrollados y los sistemas comerciales	92
6. CONCLUSIONES	98
7. BIBLIOGRAFÍA	100
8. ÍNDICE DE FIGURAS	103

1. RESUMEN

Cuando un alimento refrigerado se saca del dispositivo frigorífico y se expone a temperaturas elevadas ($>10^{\circ}\text{C}$) durante un tiempo prolongado se dice que se comete un abuso de temperatura, que puede dar lugar a alteraciones en el alimento. En la actualidad existen diversos tipos de sistemas que permiten saber si un alimento ha sido sometido a un abuso de temperatura; entre ellos se encuentran los indicadores de temperatura crítica (CTI por sus siglas en inglés) que muestran la exposición por arriba o por debajo de una temperatura de referencia. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un sistema enzimático del tipo CTI a una temperatura de referencia de 10°C , en el que una enzima y su sustrato se encontraran separados en películas o capas de diferentes materiales de soporte, aislados entre sí por una capa de material con la propiedad de fundir a la temperatura de referencia, permitiendo el contacto entre enzima y sustrato para dar como producto un compuesto colorido, indicador del abuso de temperatura.

La enzima utilizada fue la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* que presentó actividad a 9°C , propiedad que resultó fundamental para realizar los ensayos requeridos en esta investigación. El primer sustrato utilizado fue el orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) que es hidrolizado por la enzima y produce un compuesto de color amarillo llamado ortonitrofenol (ONP). Se usó n-pentadecano como aislante y material de soporte. Las películas de este material fueron construidas por el método de las placas de vidrio. Tratándose de un medio no acuoso, se adicionó un 3% de agua necesaria para que existiera actividad enzimática por medio de la preparación de emulsiones w/o conteniendo enzima o sustrato. Sin embargo, no fue posible la formación de emulsiones estables para construir el sistema. La acetona no funcionó como cosolvente y el dimetil sulfóxido (DMSO), a pesar de estabilizar las emulsiones, tampoco pudo ser utilizado debido a que hidrolizó el ONPG. Además, en este sistema se observó una gran dificultad para la apreciación del color amarillo debido a la presencia del n-pentadecano, por lo que fue necesario cambiar el material de soporte.

En el siguiente sistema se utilizó poliacrilamida como material de soporte y n-pentadecano como aislante; el sistema se construyó en películas. En este caso se apreció un incremento en la intensidad del color amarillo, pero dicho color desapareció totalmente a las 24 horas a temperatura de refrigeración, incluso cuando la concentración de poliacrilamida se elevó hasta 15%. Esto llevó nuevamente a cambiar el material de soporte.

La grenetina fue el material elegido como nuevo soporte. En este caso se tuvo el mismo problema de pérdida de color que en el sistema de poliacrilamida, pero se solucionó cambiando la forma de los sistemas: en lugar de usar películas se emplearon tubos, en los que la enzima y el sustrato fueron colocados en capas; posteriormente se sellaron para evitar la pérdida de color por arrastre de vapor del ONP. Desafortunadamente no se pudo conseguir la separación total entre enzima y sustrato, pues aunque la temperatura era inferior a 10°C el medio era de color amarillo. En un ensayo alternativo se utilizó grenetina como aislante, pero no funcionó.

Ante los problemas que se presentaron con el ONPG se sustituyó este sustrato por X-Gal, que al ser hidrolizado por la β -galactosidasa produce un precipitado azul. El sistema se construyó en películas, usando poliacrilamida como material de soporte y n-pentadecano como aislante. Al exponer el sistema a temperatura ambiente se obtuvo un color azul índigo de gran intensidad y estabilidad, haciendo de este sistema uno de los mejores.

Por último se construyó un sistema con el sistema enzimático GOD-PAP de Spinreact® y glucosa como sustrato. Para su elaboración se utilizó poliacrilamida como soporte y n-pentadecano como aislante. En este sistema la aparición del color rosa fue notoria y su estabilidad fue grande.

En conclusión, los mejores sistemas fueron β -galactosidasa/X-Gal en poliacrilamida y GOD-PAP/glucosa en grenetina, pues en ellos el color se produce a temperatura ambiente y se mantiene estable por grandes periodos de tiempo.

2. INTRODUCCIÓN

La disminución de la temperatura es una de las técnicas más empleadas para lograr que un alimento permanezca sin riesgo a la hora de ser consumido y sin alterar sus características sensoriales. Al bajar la temperatura se retardan las reacciones químicas y la actividad de las enzimas presentes en los alimentos (6), a la vez que se retarda o se detiene la proliferación de microorganismos patógenos, productores de toxinas y causantes de deterioro. Mientras menor sea la temperatura de almacenamiento, menor es la velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas, así como la proliferación microbiana. De hecho, a una temperatura suficientemente baja, que depende de la naturaleza del alimento, no se multiplica casi ningún microorganismo, y como cada microorganismo tiene una temperatura óptima y una temperatura mínima por debajo de la cual no hay proliferación, la temperatura a la que se almacena un alimento determinado influye en el tipo de flora predominante (6). El almacenamiento de los alimentos a una temperatura baja (por encima de su punto de congelación) se denomina refrigeración, y comercialmente se efectúa a temperaturas que varían entre los 4 y los 7°C (3). Con este método de conservación los alimentos no sufren modificaciones importantes con rapidez y pueden conservar sus características sensoriales y sanitarias durante un tiempo limitado, pues la refrigeración no destruye a las enzimas y microorganismos: solamente los retarda (6). Pero todos los beneficios de la refrigeración se pierden cuando ésta no es continua, si se rompe la cadena de frío; es decir, cuando el alimento refrigerado se saca del dispositivo frigorífico y se expone a temperaturas más elevadas. Como mantener un alimento en refrigeración implica un mayor costo que mantenerlo a temperatura ambiente, muchas veces la cadena del frío se rompe al almacenar, transportar o distribuir los alimentos. Es entonces cuando se presenta un abuso de temperatura al mantener el alimento a temperaturas superiores a los 16°C, justo en la "zona de peligro" donde los microorganismos proliferan rápidamente (3). Cuando el mantenimiento del alimento a esa temperatura trae como consecuencia una mayor actividad enzimática y el desarrollo de microorganismos de deterioro, el resultado final

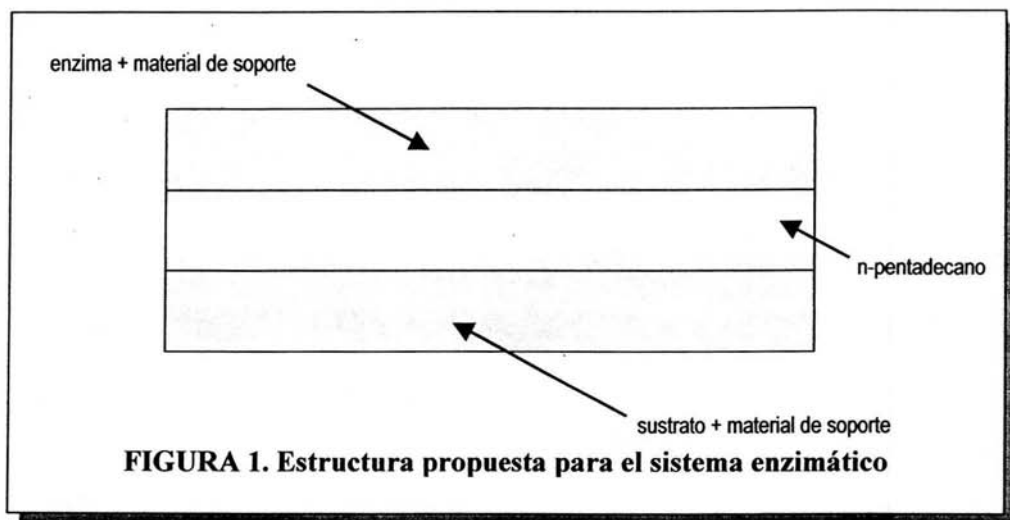
es un producto que presenta cambios indeseables y no es aceptado por el consumidor, o un alimento con una vida útil mucho menor. Además, mantener un producto a esa temperatura puede dar lugar a la proliferación de microorganismos patógenos o a la producción de sustancias metabólicas tóxicas, sin que las características sensoriales del alimento se alteren; es ahí cuando se presenta el peligro. Pero, ¿cómo saber si se ha presentado un abuso de temperatura cuando no sea evidente en las características del alimento? Esto puede lograrse mediante el desarrollo de un sistema enzimático que permita detectar si se ha roto la cadena del frío.

Para ello se propone el uso de n-pentadecano, que es una parafina de bajo punto de fusión (9.9°C) (4). Es sólida a temperatura de refrigeración y funde al romperse la cadena del frío, lo cual puede detectarse usando una reacción enzimática que dé como producto un compuesto colorido. Se propone colocar la enzima y el sustrato por separado en películas o en capas de diferentes soportes (n-pentadecano, poliacrilamida y gretina) separadas por una película de n-pentadecano a temperatura de refrigeración, tal como se muestra en la figura 1. Si la temperatura se eleva por arriba de 10°C, la parafina se funde y entran en contacto la enzima y el sustrato, llevándose a cabo la reacción enzimática, produciendo así la coloración deseada. De esta forma es posible detectar que ha habido un abuso de temperatura.

Los sistemas de reacción propuestos para producir el color en el sistema de la figura 1 fueron los siguientes:

- a) La enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* que actúa sobre el sustrato orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) en presencia de agua, produciendo ortonitrofenol (ONP) que es amarillo.
- b) La enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* que actúa sobre el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) en presencia de agua, produciendo un compuesto que es azul índigo.
- c) La enzima glucosa oxidasa que actúa sobre la glucosa en presencia de oxígeno y agua, produciendo peróxido de hidrógeno y gluconato. El peróxido producido reacciona a su vez con fenol y 4-aminofenazona produciendo quinona, que es de color rosa; esta última reacción es catalizada por la

enzima peroxidasa. El conjunto de todas las enzimas y todos los sustratos excepto la glucosa, se encuentran disponibles de manera comercial en el sistema enzimático GOD-PAP de Spinreact.



2.1. Objetivo

Desarrollar un sistema que permita, mediante una reacción enzimática, detectar un incremento de temperatura por arriba de la refrigeración en alimentos refrigerados.

2.2. Hipótesis

Si se colocan la enzima (β -galactosidasa o sistema enzimático GOD-PAP) y su sustrato (ONPG/X-gal o glucosa, respectivamente) por separado en un soporte sólido, aislados uno del otro por una capa de parafina que funde a 9.9°C, entonces cuando la temperatura se eleve por encima de la de refrigeración se llevará a cabo una reacción enzimática colorida que permita detectar abuso de temperatura.

3. ANTECEDENTES

3.1. La refrigeración y el abuso de temperatura

Los alimentos consumidos por el hombre proceden de los reinos vegetal (semillas, tallos, hojas, raíces, frutos, bulbos y tubérculos), animal (leche, tejido muscular, vísceras, huevos y miel) y mineral (agua y ciertas sustancias minerales) (20). Aproximadamente el 50% de los alimentos son susceptibles de descomposición dado su elevado contenido en agua (25). Los alimentos se clasifican de forma muy general en perecederos y no perecederos. Los perecederos son aquellos cuya composición y contenido de humedad (actividad acuosa superior a 0.9) estimulan el crecimiento de microorganismos de deterioro, patógenos o productores de toxinas, o la posibilidad de ser sometidos a cambios enzimáticos o químicos; a excepción de la miel, los alimentos de origen animal son altamente perecederos. Los no perecederos, en cambio, no permiten el desarrollo microbiano porque son demasiado secos, demasiado ácidos o presentan un alto contenido de azúcar o de sal; además experimentan cambios químicos o enzimáticos lentos o nulos (14). El deterioro se reconoce por cambios en las características sensoriales del producto (olor, color, textura y sabor). La baja estabilidad de los alimentos perecederos se debe a la acción de uno o más de los siguientes agentes:

- a) Los microorganismos, que utilizan los alimentos humanos como fuente de energía para realizar sus funciones vitales y edificar sus propias estructuras. Los alimentos perecederos contienen gran riqueza en nutrientes, elevada actividad de agua (a_w) y un pH adecuado para el desarrollo de una gran variedad de microorganismos. Cuando la carga de estos microorganismos alcanza ciertos niveles, tienen lugar profundas modificaciones sensoriales (emanación de olores anómalos, aparición de limosidad, acumulación de ácidos, etc.) o fisicoquímicas (como precipitación de las proteínas). Estas modificaciones convierten el alimento en no apto para el consumo, siendo rechazado por el consumidor. Se dice

entonces que el alimento se encuentra deteriorado. Además, los metabolitos producidos se acumulan en los alimentos y pueden ser tóxicos para el hombre. Además existen ciertos microorganismos (o sus toxinas) que al ser ingeridos con los alimentos pueden dar lugar a la aparición de enfermedades (20). Un producto deteriorado puede no presentar desarrollo de microorganismos patógenos o productores de toxinas, pero suele ser muy desagradable al paladar. En cambio, un producto contaminado con microorganismos patógenos o productores de toxinas puede presentar las mismas características sensoriales que si se encontrara inocuo.

- b)** Las enzimas, que son agentes alterantes intrínsecos contenidos en los alimentos de origen animal y vegetal. Cuando los tejidos que constituyen los alimentos forman parte de los seres vivos, sus sistemas enzimáticos están bajo control. Sin embargo, cuando las células mueren se inactivan los mecanismos que controlan la actividad de estas enzimas. Éstas, al ponerse en contacto con sus sustratos, dan lugar a la total destrucción de los tejidos (20).
- c)** Las reacciones químicas, que también ocasionan la alteración de los alimentos. El organismo vivo es capaz de neutralizar estos procesos, pero una vez que ha muerto es imposible evitar se desencadenen reacciones entre los propios constituyentes de los alimentos o con sustancias de origen extrínseco (como el oxígeno atmosférico), dando lugar a la acumulación de sustancias que originan el rechazo del alimento por el consumidor, o que incluso pueden ser perjudiciales para el hombre. Estas reacciones constituyen una serie de fenómenos muy complejos que se ven favorecidos por diversos factores de origen físico o químico. Entre los primeros cabe destacar la luz solar (que facilita la autooxidación de las grasas y ocasiona la aparición de ciertos aromas anómalos y de decoloraciones superficiales en los alimentos), y las altas temperaturas (que favorecen reacciones de pardeamiento no enzimático o desnaturalización de proteínas). Entre los agentes químicos se encuentran los ácidos y las bases (poderosos agentes desnaturalizantes de las proteínas), los metales pesados (que facilitan las reacciones de autooxidación y

que pueden ser tóxicos a concentraciones elevadas) y el oxígeno atmosférico (que participa en todas las reacciones oxidativas) (20).

El papel de la tecnología alimentaria es alcanzar la seguridad y calidad en la producción de alimentos. Su principal objetivo es ampliar la vida útil de los alimentos (conservación de alimentos) para lo cual es necesario luchar contra los agentes alterantes. Por ello se han desarrollado diversos métodos de conservación de productos alimenticios. De todos ellos, el control de la temperatura ocupa el primer lugar (14). Los métodos de conservación basados en el control de la temperatura pueden clasificarse en los que emplean temperaturas elevadas (esterilización, pasteurización, escaldado) y los que emplean bajas temperaturas (refrigeración, congelación).

La base de la conservación de alimentos por frío es la dependencia respecto a la temperatura de los agentes responsables de la alteración de los alimentos: el crecimiento microbiano, la actividad de las enzimas y las reacciones químicas, cuyas velocidades suelen disminuir con el descenso de la temperatura (25). La aplicación del frío en sus dos modalidades (refrigeración y congelación) permite alargar la vida útil de los alimentos, ya sean frescos o procesados, durante periodos de tiempo relativamente largos con una mínima repercusión en sus características nutritivas y sensoriales (20).

Tabla 1. Grupos de microorganismos según su crecimiento en función de la temperatura

Grupo	Intervalo de temperaturas en °C para el crecimiento		
	MÍNIMO	ÓPTIMO	MÁXIMO
Psicrófilos	-10 a 5	15 a 20	25 a 30
Psicrótrofos	5 o menos	25 a 35	
Mesófilos	10 a 15	30 a 35	35 a 45
Termófilos	45	50 a 65	75 a 80

Fuente: Tscheuschner, Horst-Dieter. *Fundamentos de tecnología de los alimentos*

Los microorganismos presentes en los alimentos pueden ordenarse en tres grupos en función de sus temperaturas óptimas de crecimiento (tabla 1); estos valores pueden estar sujetos a variaciones (25). Por debajo de la temperatura mínima el crecimiento se detiene, aunque es posible cierta supervivencia con un metabolismo fuertemente reducido.

La refrigeración es la reducción y el mantenimiento de la temperatura de los alimentos por encima de su punto de congelación, siendo las temperaturas más habituales las comprendidas entre -1 y 8°C . A esta temperatura se detiene el crecimiento de microorganismos termófilos y mesófilos (que tienen una temperatura óptima superior a la empleada en este proceso de conservación), se disminuye el crecimiento de microorganismos psicrófilos y psicrótrofos, así como la velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas. Es importante señalar que al no ser muy grande el descenso de temperatura, todos estos fenómenos no se evitan completamente. Por lo tanto, la refrigeración de los alimentos alarga su vida útil durante un periodo de tiempo limitado (generalmente días o semanas) que depende de las características del producto y de la temperatura de almacenamiento (20). Las principales ventajas de la refrigeración sobre otros métodos de conservación son las siguientes (21):

- a) Máxima prolongación de la vida útil de los productos frescos
- b) Mínima modificación de las características sensoriales y del valor nutritivo
- c) Amplia esfera de empleo
- d) Costos razonables
- e) Ausencia de acciones nocivas para la salud

La mayoría de microorganismos patógenos son mesófilos e incapaces de crecer por debajo de 10°C . Por lo tanto, el empleo correcto de la refrigeración reduce mucho la alteración y los riesgos sanitarios de los alimentos. Para entender la importancia de la conservación de los alimentos perecederos por refrigeración se mencionarán sus aspectos más importantes en tres grandes grupos de alimentos: los vegetales, los cármicos y los lácteos. Pero antes es necesario hacer énfasis en el hecho de que en todos los tipos de alimentos se deben respetar las tres reglas en la aplicación de cualquier método de conservación por frío (2). Dichas reglas fueron formuladas en 1934 por Alexandre Monvoisin y son:

- a) aplicación a un alimento sano
- b) refrigeración rápida
- c) refrigeración continua (mantenimiento de la cadena del frío)

En condiciones ideales, la refrigeración de los productos perecederos comienza en el momento de la cosecha o el sacrificio y se mantiene durante el transporte, la conservación en bodegas, la venta y el almacenamiento anterior al consumo. Esto no es motivado exclusivamente por el peligro de descomposición bacteriana sino también por cuestiones de higiene y seguridad en el producto (22). Para que la refrigeración sea efectiva, además de respetar las reglas de Monvoisin es necesario controlar ciertos factores, entre los que se encuentran los siguientes (20 y 22):

- a) *Temperatura.* Cada alimento tiene una temperatura de refrigeración óptima de acuerdo con sus características principales (composición, características fisiológicas). Los refrigeradores, las cámaras y las bodegas que han sido diseñadas correctamente, proporcionan suficiente capacidad refrigeradora y aislamiento para mantener el lugar frío a una temperatura que no fluctúa más de $\pm 1.2^{\circ}$ C de la que ha sido seleccionada.
- b) *Circulación de aire y humedad.* La correcta circulación del aire ayuda a alejar el calor de la proximidad de la superficie de los alimentos hacia los serpentines y placas de refrigeración. Pero el aire que circula no debe estar demasiado húmedo ni demasiado seco. El aire con un elevado contenido de humedad puede causar la condensación de humedad en la superficie de los alimentos fríos. Si esta condición se extrema, se desarrollarán hongos en la superficie a la temperatura normal de refrigeración. Por otra parte si el aire está demasiado seco provocará la pérdida excesiva de humedad en el alimento. Todos los alimentos difieren hasta cierto punto con respecto a su susceptibilidad de ser atacados por hongos y su tendencia a deshidratarse, y para cada uno hay que encontrar un equilibrio óptimo. La mayoría de los alimentos se conserva mejor a temperaturas de refrigeración cuando la humedad relativa del aire está entre 85 y 90% aproximadamente.

3.1.1. CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS

La conservación de la carne y sus productos por medio del frío es el procedimiento más importante de preservación aplicado a estos artículos sin que pierdan su calidad (15). De hecho, el abastecimiento de la población con carne y productos cárnicos de alto valor no sería realizable sin la utilización de sistemas de tratamiento por frío. Con la refrigeración de la carne se persigue fundamentalmente conseguir la inhibición del crecimiento microbiano. El metabolismo y multiplicación de los diversos microorganismos durante la refrigeración de la carne es muy variable. La mayoría de los microorganismos patógenos (salmonelas, estafilococos, clostridios, etc.) no se pueden multiplicar a una temperatura inferior a 5°C, por lo que la carne refrigerada es un alimento seguro. Los que sí pueden desarrollarse a esa temperatura (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Aeromonas hydrophyla*) disminuyen su velocidad de crecimiento, y serán controlados mediante un eficiente tratamiento térmico culinario por parte del consumidor. Además, la refrigeración permite controlar la actividad de las enzimas proteolíticas o lipolíticas, ya sean tisulares o producidas por microorganismos durante el sacrificio y manipulación previas a la aplicación de frío. Por último, la refrigeración de la carne permite reducir las reacciones con el oxígeno ambiental que originan el enranciamiento oxidativo de las grasas, sobre todo cuando se combina con un empaque que evite el contacto entre la carne y el O₂ (21). Para que la carne y productos cárnicos refrigerados exhiban características óptimas de calidad es necesario cumplir las siguientes condiciones: una alta calidad inicial, baja carga microbiana en la superficie de la carne y la aplicación lo más rápida posible de las bajas temperaturas. Es importante señalar que una refrigeración óptima consigue conservar la calidad, pero en ningún caso puede mejorarla; por lo tanto, la calidad inicial de la carne es un punto con influencia decisiva sobre la calidad del producto final (15).

La carne, debido a su composición química y a su gran contenido de agua, constituye un excelente sustrato para una gran variedad de microorganismos. Cuando la carne se obtiene de animales sanos, sacrificados en

buenas condiciones higiénicas, los microorganismos contaminantes se localizan únicamente en la superficie. Sólo se encuentran en la profundidad de las masas musculares cuando la carne procede de animales enfermos o cuando los manipuladores trabajaron sin asepsia, cuando el sacrificio del animal fue inadecuado y cuando el siguiente proceso de refrigeración se llevó a cabo con mucha lentitud (19).

La carne fresca tiene una microflora muy heterogénea, debido a que la contaminación inicial de la carne es un hecho totalmente aleatorio; los microorganismos que contaminan la carne proceden de distintos puntos durante todo el proceso de obtención. Durante la refrigeración, las bajas temperaturas retrasan la reproducción de los microorganismos (19). La vida útil de la carne refrigerada es de no más de dos semanas en presencia de oxígeno. Conservando la carne en refrigeración se inhibe o retrasa el desarrollo de ciertas especies de microorganismos de deterioro, patógenos o productores de toxinas. Pero si se rompe la cadena de frío y la carne es expuesta a temperaturas más elevadas, el aumento de la temperatura provoca un incremento en la actividad bioquímica de dichas bacterias, favoreciendo su desarrollo.

El crecimiento de los microorganismos psicrótrofos responsables del deterioro es normalmente lento entre 0 y 4°C, pero cuando la temperatura es algo más elevada se desarrollan perfectamente: es el caso particular de *Pseudomonas* (2). El deterioro de la carne bajo estas condiciones se desarrolla con la aparición de olores anómalos y sustancias viscosas, cambios debidos a los metabolitos resultantes del crecimiento microbiano: aldehídos, cetonas, ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos, alcoholes, compuestos azufrados, hidrocarburos, amoniaco, etc. (21).

La refrigeración inhibe la actividad de los microorganismos productores de intoxicaciones o infecciones alimentarias, cuya multiplicación se produce alrededor de los 37°C y para desarrollarse rápidamente necesitan una temperatura mínima relativamente elevada.

Las bacterias mesófilas que crecen en la carne sometida a abuso de temperatura comprenden algunas especies de bacilos (*Salmonella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Enterobacter* y *Clostridium*) y de cocos (*Staphylococcus*

y *Micrococcus*) (19). Las temperaturas en que los microorganismos patógenos y productores de toxinas que contaminan la carne quedan inhibidos son las siguientes (2):

- a) Estafilococos (producción de toxinas): 10°C
- b) *Clostridium botulinum* A y B (producción de toxinas): 10°C
- c) Estafilococos (multiplicación): 6.7°C
- d) *Clostridium perfringens* (multiplicación): 6.5°C, aunque a partir de 20°C para abajo su crecimiento es mucho más lento
- e) Salmonelas (multiplicación): 5.2°C
- f) *Clostridium botulinum* E (producción de toxinas): 3.3°C

Los productos cárnicos frescos son aquellos elaborados a partir de carne con o sin grasa, picada, adicionada o no con condimentos, especias y aditivos, y que no se someten a tratamientos de desecación, cocción ni salazón. Pueden ir embutidos o no. En este grupo se incluyen las hamburguesas y la carne picada como tal, así como los pasteles elaborados a partir de carne adicionada con especias, elaborados tanto a base de vacuno y cerdo como de ave (21). Todos los productos cárnicos frescos deben ser conservados bajo refrigeración hasta el momento de su consumo para asegurar su calidad microbiológica.

En el caso de los productos cárnicos tratados por calor (mortadela, salchichas, jamón cocido) se realiza una cocción en baño de agua a una temperatura de aproximadamente 72°C. A la temperatura mencionada se inactivan las enzimas cárnicas que pudieran causar alteraciones posteriores en los productos y se favorece la destrucción de las formas vegetativas de los microorganismos. Pero las esporas microbianas y fúngicas no se destruyen y pueden llegar a desarrollarse en caso de que posteriormente se den las condiciones de temperatura favorables. Por esa razón, después del tratamiento térmico se procede al enfriamiento rápido de los productos a 0-4°C. El enfriamiento rápido es importante por razones sanitarias y tecnológicas: si el producto queda mucho tiempo expuesto a temperaturas entre 20 y 40°C (temperatura óptima para muchos microorganismos) se

favorece la reactivación de los que sobrevivieron al tratamiento térmico; además es posible el deterioro del producto como consecuencia de la actividad microbiana y enzimática que continúa bajo el rango de temperaturas mencionadas. Obviamente, después del enfriamiento rápido debe seguir un almacenamiento a temperaturas que nunca, hasta el momento del consumo, deben superar los 10°C (21).

3.1.2. PESCADO

El pescado es uno de los alimentos más perecederos, por lo que se necesita un manejo más cuidadoso desde que se captura hasta que se expende o industrializa. El tiempo que dura este periodo y la manera de manipular el pescado en dicho intervalo de tiempo determina poderosamente el grado de alteración del mismo. En la alteración del pescado participan fenómenos enzimáticos, oxidativos y bacterianos. La rapidez con que se desarrollan cada uno de ellos durante el almacenamiento del pescado depende, en primer lugar, de los principios de conservación de alimentos, y en segundo lugar del tipo de pescado y los métodos de captura utilizados. No obstante, la acción microbiana es siempre el factor que adquiere mayor relevancia en la alteración del pescado fresco, sin duda debido a los elevados valores de pH y a_w , y a la riqueza de nutrientes disponibles para el crecimiento bacteriano.

La alteración microbiana del pescado se describe comúnmente como un proceso proteolítico. Aunque indudablemente tiene lugar un cierto grado de hidrólisis proteica, al menos en los estadios iniciales, parece que el proceso de alteración también implica la utilización por los microorganismos de compuestos nitrogenados no proteicos solubles. No obstante, puede utilizarse la ribosa producida como consecuencia de la degradación del ATP.

Los tipos de bacterias predominantes y que componen el 80% de la microbiota del pescado, son las bacterias Gram negativas de los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Vibrio*. En pescados de zonas tropicales y subtropicales puede haber un predominio de microorganismos Gram positivos

como *Bacillus*, *Micrococcus* y corineformes. Una situación similar se da en peces de agua dulce en los que predominan los Gram positivos en las especies de agua caliente, y los Gram negativos en las especies de agua fría. Aunque en pescado de agua dulce de regiones frías también pueden existir Gram positivos, la cantidad de Gram negativos siempre prevalecerá. Desde el punto de vista sanitario existen dos especies bacterianas que pueden formar parte de la microflora normal del pescado, son el *Clostridium botulinum* del tipo E y de los tipos no proteolíticos B y F, y *Vibrio parahaemolyticus*.

Como el pescado comienza a alterarse inmediatamente después de su captura, es imprescindible que se aplique una manipulación cuidadosa lo antes posible para lograr mantener el grado de frescura inicial tanto como sea posible. Una manipulación cuidadosa implica tener presentes tres principios generales: enfriar el pescado lo mas pronto posible después de la captura, evitar abusos de temperatura y mantener un elevado grado de limpieza tanto en cubierta como en la bodega del barco. Si la manipulación a bordo y la estiba se realizan en forma adecuada se contribuye notablemente a mantener la frescura del pescado.

La operación más crítica de la manipulación del pescado a bordo es, por lo general, lograr un rápido enfriamiento. La conservación del pescado a bordo requiere de una buena refrigeración y un manejo adecuado para evitar que el producto sufra daños físicos. El estibado en cajas ofrece la posibilidad de separar el pescado de diferentes capturas y mantiene el pescado refrigerado dentro de la caja incluso durante el desembarco y el transporte (21).

3.1.3. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

Cuando la leche llega a la central lechera, quesería, etc., contiene siempre una abundante microbiota procedente de diversas fuentes. Existen microorganismos termófilos, mesófilos y psicrótrofos; de éstos la mayoría son termolábiles, pero algunos son termodúricos. Entre esta diversidad unos poseen β -galactosidasa y son

capaces, por tanto, de metabolizar activamente la lactosa que es el principal carbohidrato de la leche; algunos elaboran proteasas, pudiendo atacar a las proteínas de la leche, y otros producen lipasas por lo que pueden degradar la materia grasa; existen otros que no se pueden desarrollar bien en la leche, comportándose ésta como mero vehículo, y otros son los patógenos que pueden causar serios problemas al consumidor.

Si se hace un análisis detallado de la microbiología de la leche y los productos lácteos se hará inevitable caer en la redundancia; por ello se manejará una clasificación funcional de los microorganismos más importantes en Lactología, es decir, atendiendo a los efectos que pueden producir en la leche y productos lácteos. Se han clasificado en: bacterias lácticas, bacterias esporuladas, bacterias psicrótrofas, bacterias de origen fecal, microorganismos patógenos y misceláneos.

- a) **Bacterias lácticas.** La importancia de este grupo debe manejarse desde dos puntos de vista totalmente opuestos, ya que pueden comportarse como microorganismos deterioradores o como beneficiosos. La acción deteriorativa se debe a que metabolizan la lactosa produciendo ácido láctico que, al acumularse en la leche, ocasiona un descenso del pH y que cuando alcanza un valor de 4.6 (a temperatura ambiente) origina una precipitación en las caseínas, con lo que se produce una alteración de la leche. Normalmente la leche cruda es el producto más afectado. Por lo tanto, en la leche cruda es necesario detener la multiplicación de las bacterias lácticas, lo que se consigue eficazmente mediante la refrigeración, ya que son bacterias mesófilas o termófilas y dejan de multiplicarse activamente por debajo de los 8–10° C.
- b) **Bacterias esporuladas.** Entre la microbiota de la leche pueden existir formas esporuladas, principalmente del género *Clostridium* y *Bacillus*. En Lactología la importancia de la presencia de esporas en la leche tiene dos vertientes: una en relación con las leches esterilizadas y otra con los quesos duros y semiduros. En cuanto a leches esterilizadas es de suma importancia destruir todas las esporas con el tratamiento térmico para evitar la modificación de las propiedades sensoriales y la pérdida de valor nutritivo. En quesos las esporas de *Clostridium tyrobutyricum* cobran gran importancia, ya que al germinar y

multiplicarse los microorganismos, generan gas como uno de los productos de su metabolismo, que es perjudicial para los quesos originándose un hinchamiento conocido como hinchamiento tardío.

- c) *Bacterias psicrótrofas*. Estas bacterias son francamente termolábiles, mucho más que las bacterias lácticas, por lo que su tasa se reduce a valores estadísticamente despreciables durante los tratamientos térmicos. Sin embargo, las proteasas y lipasas extracelulares elaboradas por algunas cepas, en especial las *Pseudomonas*, son termorresistentes, no desactivándose totalmente ni siquiera con los tratamientos térmicos utilizados en la esterilización. La consecuencia de la gran termoestabilidad de las lipasas y las proteasas producidas por las bacterias psicrótrofas es que pueden seguir actuando, si las condiciones de temperatura de almacenamiento y pH del producto son favorables en los productos ya elaborados, dando lugar a degradaciones del material proteico y lipídico en los productos y derivados lácteos que se almacenan durante largos periodos de tiempo.
- d) *Bacterias de origen fecal*. La presencia de altas tasas de estos microorganismos constituye un índice de obtención y manipulación de la leche en condiciones higiénicas deficientes. En medio de cultivo bilis-lactosa-peptona, los coliformes producen CO_2 y H_2 ; además producen ácido láctico, acético y fórmico, así como alcohol (13). En la leche metabolizan la lactosa produciendo entre otros compuestos ácido láctico y dióxido de carbono. El primero, junto al producido por las bacterias lácticas, origina un aumento en la acidez de la leche, lo cual como se vio antes es de gran importancia para la leche cruda. Este efecto se contrarresta con una refrigeración adecuada. La producción excesiva de dióxido de carbono puede dar lugar al hinchamiento del queso, lo que se conoce como hinchamiento temprano.
- e) *Microorganismos patógenos*. Los más importantes son *Escherichia coli* enteropatógena, *Listeria monocytogenes* y los del género *Salmonella*.
- f) *Misceláneo*. En éste grupo se ha incluido una serie de microorganismos que participan en la maduración de ciertos tipos de quesos o en los procesos fermentativos de determinados productos lácteos. Estos

microorganismos son *Brevibacterium linnens*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* y *Candida kefyr* (21).

Así mismo, la leche puede sufrir deterioro lipolítico por lipasas endógenas y esta reacción de hidrólisis es dependiente de la temperatura (17).

3.1.4. LOS PRODUCTOS VEGETALES

Las hortalizas y frutas tienen muchas semejanzas con respecto a su composición, métodos de cosecha, peculiaridades de almacenamiento y procesamiento. En efecto, muchas hortalizas pueden ser consideradas frutas en sentido botánico exacto. Botánicamente las frutas son aquellas partes de las plantas que almacenan las semillas. Por lo tanto, productos como tomates, pepinos, berenjenas, chiles, pimientos, elotes y otros, tendrían que ser clasificados sobre esta base como frutas. Sin embargo, la diferencia entre frutas y hortalizas fue hecha sobre la base de su uso. Las clases de plantas que se consumen generalmente durante el transcurso de la comida principal son consideradas como hortalizas. Las que comúnmente se comen como postre son consideradas como frutas. Esta es la diferencia hecha por los productores de alimentos, por ciertas leyes de compraventa y por el público consumidor.

Cuando las hortalizas están madurando en el campo cambian de día en día. Hay un momento en el que la hortaliza está en su punto más alto de calidad en textura, color y sabor. Esta alta calidad puede pasar rápidamente y puede perderse en un solo día. La cosecha y el procesamiento de las hortalizas, incluidos tomates, maíz y chícharos son estrictamente controlados para conocer el punto máximo de calidad.

Después de ser cosechada la hortaliza puede pasar rápidamente más allá del punto máximo de calidad. Esto es independiente del deterioro microbiano. En el elote, en 24 horas a temperatura ambiente, pierde el 26% del total de azúcares, lo que significa una pérdida correspondiente en dulzor. Incluso si se almacena inmediatamente

con refrigeración a 0° C, el 8% del azúcar se pierde en 24 horas y el 22% en 4 días. Parte de este azúcar seguramente se convierte en fécula y parte se quema durante el proceso de respiración. En forma similar, chícharos y frijoles pueden perder más del 50% de su azúcar en un día a temperatura ambiente; las pérdidas son menores en refrigeración pero también en dicha condición siempre se efectúa un cambio grande en lo dulce y fresco de sabor, alrededor de 2 o 3 días. No todas las pérdidas de azúcar son debidas a su consumo durante la respiración o a su conversión en fécula. Los espárragos pueden convertir una parte de su azúcar en tejido fibroso después de la cosecha y esto contribuye a una consistencia más leñosa.

Junto con la pérdida de azúcar, la evolución de calor puede ser un problema serio si grandes cantidades de hortalizas apiladas son transportadas o conservadas durante su procesamiento. A temperatura ambiente, algunas hortalizas liberan calor a razón de 1.27×10^2 kJ/kg por día; esto es suficiente para que cada tonelada de hortalizas derrita 362.872kg de hielo por día. Como el calor destruye además las hortalizas y favorece el desarrollo de los microorganismos, las hortalizas cosechadas se deben enfriar rápidamente antes de procesarse.

El enfriamiento sólo baja el grado de deterioro pero no lo impide y las hortalizas reaccionan de manera diferente a la resistencia en el almacenaje en frío. Cada hortaliza tiene su temperatura máxima para el almacenaje, la cual puede estar entre 0 y 10° C. Un almacenaje más frío que 7.5°C en el caso de pepinos, por ejemplo, puede traer resultados como picaduras, porciones blandas y deterioro general. Lo que sucede a una temperatura demasiado baja es que el metabolismo normal de las hortalizas vivas se altera y se presentan varias anomalías, así como que se mengua la resistencia frente a la invasión de microorganismos que se hayan presentes y que pueden crecer durante el almacenaje a bajas temperaturas (22).

3.2. Los indicadores de abuso de temperatura

En una era de consumidores informados, elaborar un producto alimenticio exitoso se ha vuelto un trabajo muy complejo. Los consumidores esperan características sensoriales y nutricionales superiores y una imagen

saludable del producto (un producto que sea seguro). Además, prefieren los productos mínimamente procesados, con pocos o ningún aditivo, que se conserven por mucho tiempo y convenientes para preparar y usar (24).

El Instituto Internacional de Refrigeración (IIR) y la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO)¹ calculan que de toda la producción agrícola mundial en 1996 estimada en 4,500 millones de toneladas (incluyendo pescado y productos marinos) sólo 350 millones de toneladas son refrigeradas; esta cantidad equivale tan solo al 40% en peso de los alimentos consumidos por los 1.2 billones de habitantes de los países industrializados en ese año. Por lo anterior es lógico suponer que las pérdidas alimenticias son considerables. De acuerdo con datos del IIR, las pérdidas mundiales se encontraban en el rango de 25 a 30% en 1996. En ese año las pérdidas mundiales en productos vegetales fueron de 30 a 40%. En términos energéticos, la producción mundial en el mencionado año fue equivalente a 19,900 kJ *per cápita* por día, de los cuales sólo 11,370 kJ *per cápita* por día fueron aprovechados por los consumidores. Del resto de energía (8,530 kJ *per cápita* por día), la mitad correspondía a la alimentación animal y semillas para la siembra siguiente; la otra mitad (más de 4,000 kJ *per cápita* por día) correspondía a pérdidas ocurridas durante el almacenamiento, transporte y ventas al menudeo.

Esto no puede ser tolerado actualmente, especialmente con productos perecederos, cuya seguridad depende de las condiciones posteriores al procesamiento, y en una era donde los avances tecnológicos permiten mantener los alimentos a bajas temperaturas desde el punto de producción hasta las manos del consumidor. Todas las medidas propuestas hasta ahora para asegurar la seguridad alimentaria universal (es decir, asegurar que alimentos suficientes, tanto en calidad como en cantidad, se encuentran disponibles para cada habitante de nuestro planeta) se han enfocado en incrementar la producción (por ejemplo, aumentando la superficie de tierra bajo cultivo); sin embargo, también es importante reducir las pérdidas post-procesamiento. Es aquí donde la refrigeración puede contribuir a la seguridad alimentaria.

¹ Nota informativa sobre refrigeración y alimentos publicada por el Instituto Internacional de la Refrigeración en noviembre de 1996 (www.iir.com).

El almacenamiento, la manipulación y la distribución de los productos perecederos son reconocidos como puntos críticos de control (CCPs) muy importantes. Monitoreando y controlando efectivamente estos CCPs es posible obtener productos seguros y que cumplan con las exigencias de los consumidores, reduciendo al mínimo las pérdidas.

Una vez que el alimento deja la etapa de procesamiento, la conservación de sus características por largo tiempo depende del ambiente dentro y fuera del empaque. Los parámetros más importantes a considerar son: composición de la atmósfera, humedad relativa, estrés mecánico o por presión, luz y temperatura. Los cambios en las condiciones externas pueden provocar un cambio dentro del empaque con subsecuentes efectos sobre la calidad (24).

Para maximizar la calidad, el control de las condiciones externas debe llegar hasta el punto de consumo. Sin embargo, en la mayoría de los casos el control por parte del fabricante es mínimo una vez que el producto llega a la cadena de distribución. En el mejor de los casos (para las pocas compañías que tienen sus propios sistemas de distribución) este control cesa a nivel del local o centro de distribución. Durante las fases de almacenamiento y transporte, con mucha frecuencia las condiciones de temperatura no son las ideales y pueden ocurrir abusos de temperatura, y como las velocidades de reacción que están relacionadas con la pérdida de los atributos de calidad generalmente son fuertemente dependientes de la temperatura, se provoca una pérdida acelerada de la calidad al exponer los productos a altas temperaturas, dando lugar a productos no aceptables antes o al nivel de ventas al menudeo.

Para evitar el abuso de temperatura, lo que se requiere es una forma efectiva para monitorear individualmente la condición de temperatura de los productos alimenticios durante la distribución, para indicar su estado de calidad o su potencial de no ser seguros. Los indicadores de abuso de temperatura pueden cubrir estos requerimientos (24).

Un indicador de abuso de temperatura puede ser definido como un dispositivo simple y barato que pueda mostrar un cambio fácilmente medible y dependiente del tiempo y la temperatura, que refleje completa o parcialmente la historia térmica del producto al cual se encuentra asociado.

El principio de operación de un dispositivo de este tipo es un cambio irreversible que puede ser mecánico, químico o enzimático, y que generalmente se expresa como una respuesta visible en forma de una deformación mecánica, desarrollo o movimiento de color. La velocidad del cambio debe ser dependiente de la temperatura, y la lectura obtenida dar información acerca de las condiciones de almacenamiento a las que el sistema ha sido expuesto.

FIGURA 2. Clasificación de los indicadores de tiempo-temperatura según Taoukis y Labuza (24)

Dispositivos indicadores de abuso de temperatura

- a) Indicadores de temperatura crítica (CTIs)
- b) Integradores tiempo – temperatura crítica (CTTIs)
- c) Indicadores o integradores tiempo – temperatura (TTIs)

Los indicadores pueden ser clasificados de acuerdo con la información que proporcionan, su funcionalidad y su principio de operación. Se han propuesto muchas clasificaciones para estos sistemas, pero en el presente trabajo se hará mención a la clasificación de tres categorías propuesta por Taoukis y Labuza (24) que se muestra en la figura 2.

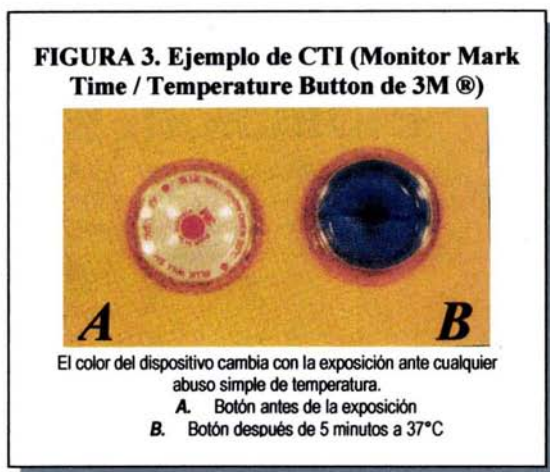
Los Indicadores de Temperatura Crítica (CTIs) muestran la exposición por abajo o por arriba de una temperatura de referencia. Cuando la exposición es por arriba de la temperatura de referencia se dice que se

comete un abuso de temperatura. Estos dispositivos no muestran el historial completo de exposición por abajo o por arriba de la temperatura crítica, simplemente indican que el producto ha sido expuesto a una temperatura indeseable por un tiempo suficiente para causar un cambio crítico en su seguridad o calidad, como resultado de reacciones fisicoquímicas o biológicas que muestran un cambio repentino de velocidad. Algunos ejemplos son el deterioro irreversible de textura causado por cambios de fase, tales como el descongelamiento de alimentos congelados o el congelamiento de productos frescos o refrigerados, la fusión de chocolates, la desnaturalización de una proteína importante por arriba de la temperatura crítica y el crecimiento de un microorganismo patógeno arriba de una temperatura crítica tal como 7.2°C. Los CTIs fueron el primer tipo de indicadores desarrollados. Un ejemplo de CTI está disponible en 3M®. Se trata de un botón de exposición a la temperatura (figura 3) que indica la exposición en 5 minutos con el cambio completo de color en 2 horas a cualquier temperatura de abuso seleccionada en el rango de -17 a 66°C (24).

Los Integradores Tiempo-Temperatura Crítica (CTTIs) indican una respuesta que refleja la exposición tiempo - temperatura acumulativa arriba de una temperatura crítica de referencia. Son útiles para reacciones importantes en calidad o seguridad que ocurren a velocidades medibles sólo arriba de una temperatura crítica. Su respuesta puede ser traducida a un tiempo de exposición equivalente bajo la temperatura crítica, por ejemplo, el crecimiento microbiano o la actividad enzimática que son mínimos por debajo de la temperatura crítica. Combinaciones de más de un CTTI pueden dar una aproximación muy cercana a la historia real tiempo - temperatura del alimento (24).

Los Indicadores o Integradores Tiempo-Temperatura (TTIs) dan una respuesta continua dependiente de la temperatura. Integran en una medida sencilla el historial completo de tiempo - temperatura desde el tiempo de activación y pueden ser usados para indicar una temperatura efectiva promedio durante la distribución. Esta temperatura puede ser correlacionada teóricamente con reacciones de pérdida de calidad continuas y dependientes de la temperatura.

En el caso de la presente investigación se trata de desarrollar un CTI cuya temperatura de referencia sea 10°C, de forma que se pueda detectar cuando un producto refrigerado ha sido sometido a abuso de temperatura.



3.3. Sistemas enzimáticos para uso en dispositivos indicadores de abuso de temperatura

3.3.1. LA ENZIMA β -GALACTOSIDASA

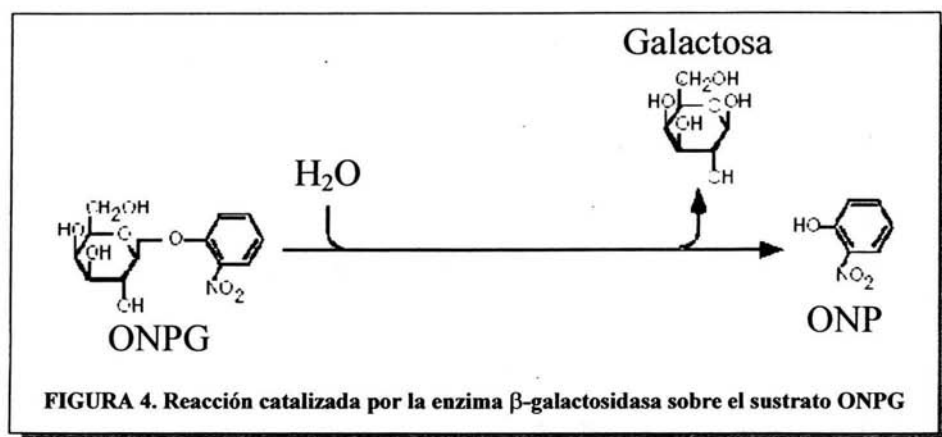
La enzima lactasa o β -galactosidasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de la lactosa, mediante la ruptura del enlace β (1-4) que une a los monosacáridos, por inclusión de una molécula de agua, resultando así en los respectivos D-glucosa y D-galactosa (9).

La utilización de lactasa en la industria láctea se da principalmente con el objeto de producir leche para personas con problemas de intolerancia a este disacárido, pero además existen intereses técnicos que cada vez adquieren más importancia para fabricantes de productos lácteos, y que dan a esta enzima un potencial de utilización todavía mayor (9 y 12).

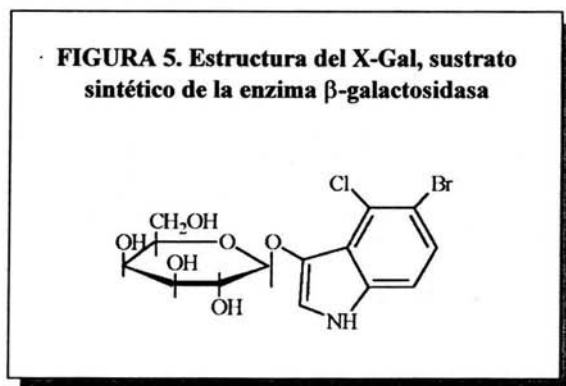
Las β -galactosidasas microbianas se han venido utilizando en forma comercial desde la década de los cincuenta en algunos países, pero en forma más importante desde principios de la década de los ochentas, en que apareció un gran número de productos con actividad de lactasa. Las fuentes de obtención de los productos enzimáticos con fines comerciales se limitan a los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, y a las levaduras *Kluyveromyces marxianus* (*K. fragilis*), *Kluyveromyces lactis* y *Candida kefyr*. El desarrollo de técnicas biotecnológicas tanto de producción como de purificación, permite que actualmente se disponga de diversas preparaciones enzimáticas comerciales a partir de estos microorganismos (9). De estos microorganismos, *Kluyveromyces marxianus* es el más usado en estudios encaminados a descubrir su utilización en el suero. La proteína celular, la producción de alcohol y de β -galactosidasa son los temas de los que más frecuentemente se estudia. La cepa más utilizada para estos estudios es la NRRL-Y-1109, debido a su gran capacidad para utilizar la lactosa como fuente de carbono y por lo tanto tiene una gran capacidad para producir la enzima β -galactosidasa (11), esto la hace tener un alto potencial desde el punto de vista económico (8). En el caso de la presente investigación se utilizó la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, cuyas condiciones óptimas de reacción son: pH 5.0 y temperatura de 50-55°C (10).

La actividad de las enzimas en general se expresa por medio de las unidades internacionales. Una unidad internacional (1U) de enzima es la cantidad que cataliza la formación de 1 μ mol de producto por minuto bajo condiciones determinadas. La concentración de enzima en una preparación no pura se expresa en términos de unidades por mililitro (23). La actividad de las β -galactosidasas es medida usualmente empleando un sustrato sintético: el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG). El mecanismo de acción de las enzimas sobre este sustrato es similar al de lactosa como sustrato, excepto por la interacción fuerte del sitio activo con la relativamente hidrofóbica parte aglucón (*o*-nitrofenol) en relación con la interacción con la parte del azúcar (galactosa). Existe evidencia de que el modelo del mecanismo de hidrólisis del ONPG por parte de la lactasa, ha

El producto de la hidrólisis de ONPG por la lactasa ha sido determinado (16). En términos generales la lactasa hidroliza el enlace β (1-4) de la molécula de ONPG produciendo o - nitrofenol y galactosa, como se muestra en la figura 4.



Además del ONPG existen otros sustratos sintéticos para la β -galactosidasa. Uno de ellos es el X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido), cuya estructura se muestra en la figura 5. Este sustrato es usado en biología molecular para detectar cepas bacterianas productoras de la enzima. La β -galactosidasa hidroliza al X-Gal formando un precipitado azul índigo. De esta forma, las bacterias que son positivas para esta enzima producen colonias azules cuando crecen en presencia del sustrato. El color azul índigo del producto de la reacción hace pensar que el sustrato X-Gal es adecuado para ser utilizado en dispositivos indicadores de abuso de temperatura.

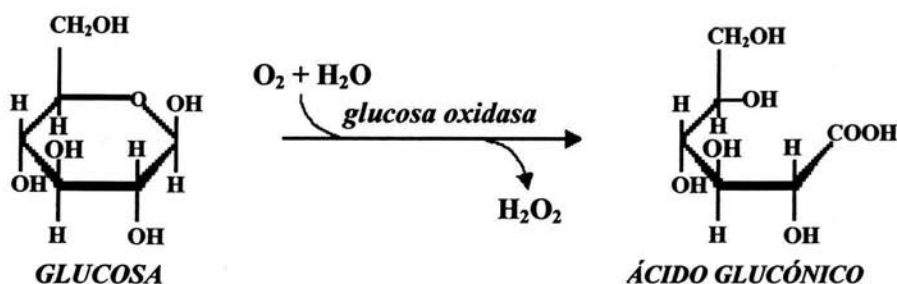


3.3.2. EL SISTEMA ENZIMÁTICO COLORIMÉTRICO GOD-PAP DE SPINREACT®

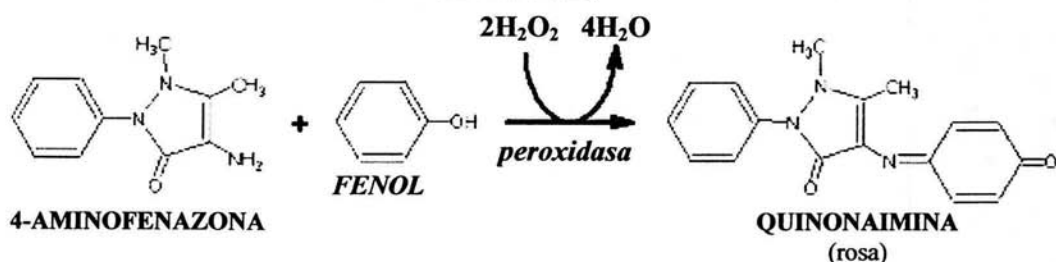
El sistema enzimático GOD-PAP es utilizado para la cuantificación de glucosa *in vitro*. Se trata de una versión comercial del método de Trinder, cuyo fundamento es que la glucosa es oxidada por la enzima glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico con la liberación de peróxido de hidrógeno (reacción 1 de la figura 6). Para poder seguir espectrofotométricamente el curso de esta reacción, es necesario acoplar a la misma una segunda reacción enzimática indicadora. En el caso del sistema GOD-PAP se adiciona al medio la enzima peroxidasa (PAP), que elimina el peróxido de hidrógeno a medida que se forma, convirtiéndolo en agua y oxígeno; también se adiciona 4-aminofenazona y fenol, que reaccionan para producir quinonaimina, que es de color rosa y puede ser medida espectrofotométricamente a 505nm (reacción 2 de la figura 6).

FIGURA 6. Reacciones del sistema enzimático GOD – PAP de Spinreact®

Reacción 1



Reacción 2



3.4. Materiales de soporte para uso en dispositivos indicadores de abuso de temperatura

3.4.1. GRENETINA

El colágeno es una proteína fibrosa, que contribuye muy significativamente a las singulares funciones del tejido conectivo de la piel, los cartílagos, los huesos, etc. La unidad estructural del colágeno es el tropocolágeno, una proteína con forma de varilla (15Å de diámetro y 3,000Å de longitud) formada por tres cadenas polipeptídicas (llamadas cadenas α) superenrolladas en una triple hélice. Cada cadena α forma una hélice con giro a la izquierda y tres restos por vuelta. El superenrollamiento de las tres cadenas para formar la triple hélice tiene giro a la derecha.

Triple hélice. Las cadenas contienen 100 restos de aminoácidos de composición variada. Esta composición aminoacídica de las cadenas α es la causante de la existencia de al menos cuatro tipos de colágeno (tabla 2). En cada uno de los tejidos suele haber mas de un tipo de colágeno.

Tipo	Triple hélice	Distribución
I	2 cadenas $\alpha 1(I)$ idénticas + una cadena $\alpha 2$	Piel, tendones, huesos
II	3 cadenas $\alpha 1(II)$	Cartílagos y discos intervertebrales
III	3 cadenas $\alpha 1(III)$	Vasos sanguíneos, útero
IV	3 cadenas $\alpha 1(IV)$	Membrana basal, glomérulos renales

Del colágeno a la grenetina. Las principales materias primas de la industria del colágeno son la piel de cerdo, el cuero de vaca y los huesos. Generalmente para la elaboración de gelatina comestible se parte de la piel de cerdo.

La materia prima tiene que ser pretratada manteniéndola durante 8 a 12 semanas sumergida de 15 a 20°C en una suspensión de Ca(OH)_2 del 2 al 5%, seguido de una neutralización con un ácido mineral diluido (< 5%, pH 3.5 a 4.5) durante 20 a 48 horas a temperatura ambiente, seguido de un lavado.

La gelatina neutralizada se extrae a una temperatura entre 50 y 60° C. El proceso alcalino se usa ampliamente para pretratar el cuero vacuno y el ácido para la piel de cerdo. A la gelatina obtenida por el método ácido se le denomina tipo A y a la preparada por el método alcalino de tipo B.

El pretratamiento despolimeriza al colágeno, rompiendo los enlaces cruzados inter e intramoleculares. El tratamiento alcalino hidroliza los enlaces entre la glutamina y la asparagina, por lo que el punto isoeléctrico de la gelatina preparada por este método es de aproximadamente 5, en contraste con el que ofrece la gelatina obtenida por el método ácido que es de 9 aproximadamente.

La extracción a temperaturas elevadas sigue rompiendo enlaces entrecruzados, pero sobre todo, destruye los puentes de hidrógeno que juegan un papel clave en la estabilización de la estructura del colágeno. La gelatina extraída se somete luego a clarificación, filtración, evaporación, esterilización y secado, para obtener un producto en forma de polvo.

La estabilidad térmica del colágeno, está relacionada con su contenido de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina). Cuanto más elevado sea el contenido de iminoácidos, mayor es la estabilidad de las hélices. El colágeno se desnaturaliza a temperaturas mayores a 40°C para dar una mezcla de especies con una, dos o tres cadenas polipeptídicas enrolladas al azar. Un enfriamiento controlado, hasta temperaturas por debajo de fusión, conduce a la recuperación de una estructura helicoidal reformada.

El repliegue inicial es rápido y afecta a las regiones Gly-I-I de las cadenas polipeptídicas, dando origen a una sola vuelta de una hélice a la izquierda. Esta "nucleación" a lo largo de la cadena polipeptídica se estabiliza estructuralmente por la formación de puentes de agua. Luego el polipéptido nucleado se pliega formando bucles, con las regiones nucleadas alineadas para formar cordones de tres hebras y alinean sus regiones nucleadas con las de otras cadenas polipeptídicas. A concentraciones suficientemente altas son posibles alineamientos

intercatenarios, y pueden darse asociaciones de cadenas polipeptídicas que formen moléculas de colágeno estructuradas en triple hélice.

En ambos casos, una vez alineadas las regiones nucleadas, el resto de la cadena o de las cadenas comienzan a renaturalizarse a una velocidad que depende de la temperatura de enfriamiento. Un enfriamiento con un ΔT elevado, provoca también una renaturalización rápida que conduce a que ciertas zonas no estén disponibles para la formación de estructuras helicoidales. Así, se obtienen colágenos restaurados con diversos grados de perfección.

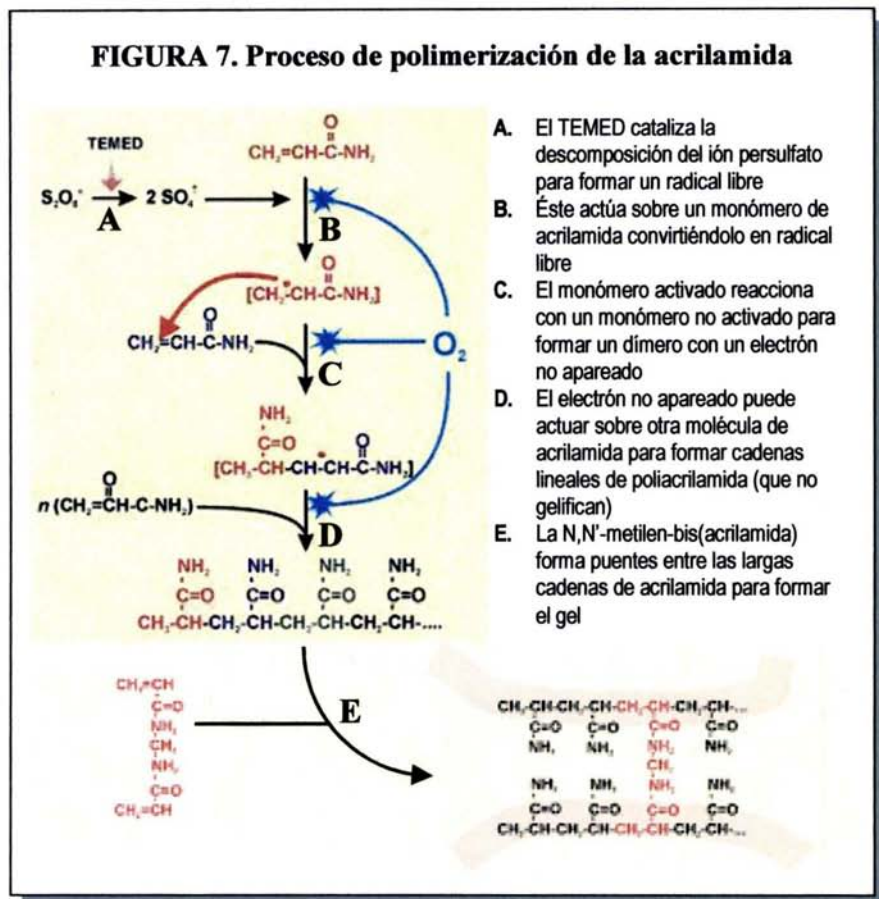
La gelificación de la grenetina. La gelificación de las disoluciones de gelatina se corresponde con la restauración de la estructura del colágeno por parte de las moléculas desordenadas de gelatina; sin embargo, la gelatina comercial tiene una composición y una estructura heterogéneas, relacionadas con el proceso de obtención y con la materia prima. La gelatina puede contener cadenas polipeptídicas de pesos oscilantes entre 30,000 y 300,000Da. La composición de aminoácidos es variada: por ejemplo, la obtenida por tratamiento alcalino contiene más grupos carboxilo que la obtenida por el tratamiento ácido. Por consiguiente, en una disolución de gelatina el proceso de restauración es limitado. La nucleación afecta a la unión para el establecimiento de la red tridimensional del gel. Durante el posterior enfriamiento, se produce un ordenamiento adicional, vía asociaciones inter e intracatenarias. El enrollamiento y replegamiento de ciertas regiones dan origen a la restauración de la estructura típica del colágeno y eso refuerza y da rigidez al gel. El gel resultante es una red abierta formada a través de una asociación de las cadenas en la zona de unión, ricas en grupos imino, reforzadas por regiones en las que se ha reconstruido la estructura helicoidal del colágeno (26).

3.4.2. POLIACRILAMIDA

La poliacrilamida es la matriz más utilizada para llevar a cabo la separación de proteínas por electroforesis, pues es estable y no reacciona con las muestras o retarda su movimiento. Esta matriz está compuesta de

acrilamida copolimerizada con *N,N'*-metilen-bis(acrilamida) en presencia de radicales libres. El proceso de polimerización se muestra en la figura 7 (5).

FIGURA 7. Proceso de polimerización de la acrilamida



- El TEMED cataliza la descomposición del ión persulfato para formar un radical libre
- Éste actúa sobre un monómero de acrilamida convirtiéndolo en radical libre
- El monómero activado reacciona con un monómero no activado para formar un dímero con un electrón no apareado
- El electrón no apareado puede actuar sobre otra molécula de acrilamida para formar cadenas lineales de poli(acrilamida) (que no gelifican)
- La *N,N'*-metilen-bis(acrilamida) forma puentes entre las largas cadenas de acrilamida para formar el gel

La polimerización de la acrilamida ocurre cuando el persulfato de amonio (iniciador) es disuelto en agua, y con lo cual se forman radicales sulfato libres (figura 7A). El compuesto tetrametilendiamina (TEMED) es usado como catalizador de la formación del gel debido a su habilidad para existir en forma de radical libre; gracias a esto permite la descomposición del persulfato y la iniciación de la polimerización. Cuando estos radicales libres entran en contacto con la acrilamida se forman largas cadenas poliméricas de la manera descrita en la figura 7. Las

cadenas poliméricas de acrilamida no gelificarán mientras la *N,N'*-metilen-bis(acrilamida) no se encuentre presente, pues ésta última formará los enlaces entre las cadenas de acrilamida (figura 7E) (5).

Los tamaños de poro de la matriz de poliacrilamida dependen de la concentración de acrilamida, bis(acrilamida) y catalizadores (5). La velocidad de polimerización depende de la concentración de los iniciadores. La concentración de iniciadores también influye en la longitud de la cadena polimérica e incluso puede alterar la estabilidad mecánica del gel. La polimerización se detiene cuando desaparecen los radicales libres del medio, por lo que el oxígeno, al secuestrar los radicales libres, inhibe el proceso de polimerización, como se ilustra en la figura 7. Los geles de poliacrilamida tienen la propiedad de ser completamente transparentes, por lo que se piensa que pueden ser usados como soporte de sistemas indicadores de abuso de temperatura.

3.5. El papel del agua en la catálisis enzimática

El agua, aún en bajas cantidades, es un ingrediente esencial para la catálisis enzimática: permite a la enzima desplegar movimientos conformacionales indispensables para la actividad enzimática (7). En el pasado, los estudios acerca del desempeño de las enzimas sólo se hacían en medios acuosos y no se prestaba mucha atención a las reacciones enzimáticas en medios no acuosos. El estudio de la actividad enzimática en medios no acuosos, como disolventes orgánicos, ha cobrado interés en los últimos años ya que se han descubierto muchas aplicaciones, entre ellas el uso de sustratos en fase gas (7), así como la posibilidad de usar a las enzimas inmovilizadas sobre soportes de agar o sílica, lo cual se traduce en ahorro de recursos por la posibilidad de reutilización de la enzima (12). Se han hecho muchos estudios encaminados a comprender la forma en que funcionan las enzimas en ambientes deshidratados, abordando el problema desde los puntos de vista estructural y cinético, los cuales han puesto en evidencia la alta capacidad de las enzimas para conservar su actividad y su selectividad en ese tipo de medios (18). Esto ha originado que se tengan varias expectativas sobre futuras aplicaciones biotecnológicas en medios orgánicos, por toda una serie de ventajas que esto implicaría. Algunas de

las ventajas que hacen atractivo el uso de enzimas en disolventes orgánicos son la alta solubilidad que pueden presentar algunos sustratos, la habilidad de las enzimas para actuar sintéticamente en lugar de degradativamente bajo estas condiciones (18), ya que la ausencia de agua elimina la hidrólisis competitiva; del mismo modo, la especificidad por el sustrato, la regioselectividad y la estereoselectividad de la enzima pueden ser controladas por variaciones en el medio de reacción (18), el aumento de la termoestabilidad de las enzimas y la posibilidad de recuperar el producto por simple evaporación del disolvente, entre otras.

Los primeros sistemas estudiados con disolventes orgánicos estaban constituidos por mezclas de agua con disolventes hidrofílicos, o con disolventes hidrofóbicos para formar sistemas de dos fases líquidas. No fue sino hasta la publicación del trabajo clásico de Zaks y Klivanov en la década de los 80's cuando se estableció claramente la posibilidad de efectuar una reacción enzimática con lipasa pancreática en un medio orgánico verdaderamente no acuoso: la reacción de transesterificación de tributirina con 1-heptanol, donde la primera funcionaba simultáneamente como medio de reacción y sustrato; la enzima fue adicionada como polvo, y la única cantidad de agua en el sistema era la adsorbida en la enzima. Este descubrimiento es un verdadero parteaguas en la tecnología enzimática, y estableció aspectos muy relevantes en el entendimiento de la funcionalidad de las enzimas: primero, que aunque las reacciones enzimáticas pueden realizarse en sistemas no acuosos, hay un mínimo de agua indispensable para que la enzima mantenga su actividad catalítica (7). Debido a lo anterior, la esterificación y transesterificación catalizadas por lipasas en medios no acuosos (por ejemplo disolventes orgánicos) fueron el área de mayor investigación en la década de los ochenta (7). El segundo hecho relevante del trabajo de Zaks y Klivanov, relacionado con la rigidización de la estructura de la enzima en ausencia de agua, fue la posibilidad de llevar a cabo la reacción a 100°C sin que se desnaturalizara, lo cual es factible por el hecho de que una enzima prácticamente libre de agua, o con muy bajos niveles de hidratación, se encuentra rígida, y al reducir su movilidad se incrementa su termoestabilidad en disolventes orgánicos, incluso recientemente se demostró que enzimas que requieren muy poca agua para mantener su actividad catalítica pueden ser activas a

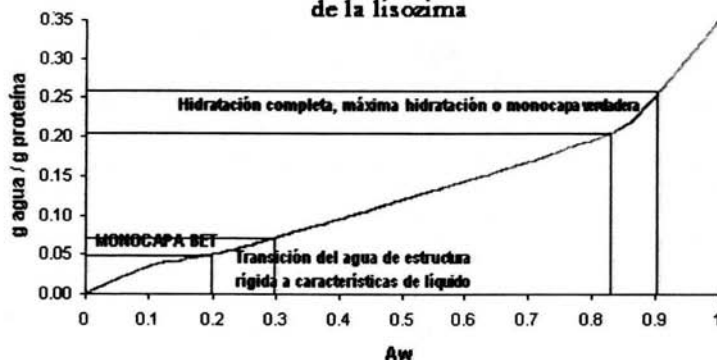
temperaturas cercanas a 200°C; así, a medida que se incrementa la cantidad de agua de la enzima su actividad aumenta y su termoestabilidad decrece (7).

Como se mencionó antes, las funciones de la enzima son fuertemente dependientes del agua presente en el sistema. Como un indicador primario de disponibilidad de agua se usa el concepto de actividad acuosa (a_w). Este parámetro determina la posición del equilibrio en reacciones de hidrólisis en medios con poca agua, así como la enantioselectividad en reacciones de esterificación catalizadas por lipasas. Por definición la a_w determina el equilibrio de la distribución del agua entre los componentes del sistema (1). También la termoestabilidad de una enzima es fuertemente dependiente de su nivel de hidratación correlacionado claramente con el valor de a_w . Esto refuerza el hecho de que el nivel de hidratación de una enzima es altamente dependiente de su capacidad de ligar agua de acuerdo con la composición de las cadenas laterales de los aminoácidos expuestos en la superficie de la proteína, y el mejor parámetro para conocer el nivel de hidratación es la a_w . La relación entre la a_w y el nivel de hidratación se puede establecer para una proteína en particular mediante su isoterma de adsorción.

Las isotermas de adsorción típicas de las proteínas tienen formas sigmoidales, que pueden dividirse claramente en tres regiones, que corresponden a estados relativos de ligamiento de agua. En la primera región (primera porción de curva ascendente a la izquierda en la figura 8) el agua está fuertemente ligada a la proteína por interacciones con los grupos cargados de las cadenas laterales de los aminoácidos; la movilidad del agua es 100 veces menor que el agua libre; no existe en esta etapa actividad enzimática. Esta agua está fuertemente ligada a la proteína, de manera que no puede ser removida por solventes, ni aún por los más polares como el etanol; esta agua no migra hacia el solvente y tampoco se intercambia con el agua menos ligada de los niveles superiores de hidratación cuando la enzima está en un solvente orgánico. A medida que se incrementa el nivel de hidratación, la movilidad del agua aumenta; al llegar al nivel superior de hidratación en esta etapa, en la segunda región (parte más horizontal de la curva) el arreglo del agua en la superficie de la proteína empieza a cambiar de una estructura rígida ("sólida") a una estructura de mayor movilidad (menos ordenada) característica de los líquidos; en esta región se encuentra la llamada monocapa de B.E.T. (ver figura 8), que de acuerdo a las

interpretaciones que se han hecho corresponde a la cantidad de agua adsorbida necesaria para completar la primera etapa de hidratación. En la segunda etapa de hidratación se forman y crecen agregados de moléculas de agua hasta cubrir por completo los grupos polares de las cadenas de aminoácidos de la superficie de la proteína; en esta región la movilidad de la proteína aumenta con el grado de hidratación, y para la lisozima la actividad enzimática empieza a manifestarse en los niveles más altos de esta etapa. Después inicia la condensación de agua en las regiones no polares de la superficie de la proteína, en los cuales no hay agregados de agua. En la tercera etapa de hidratación se sigue condensando agua en las regiones menos interactivas de la superficie de la proteína, la cuál es agua menos ligada, y la movilidad de la proteína va en aumento a medida que aumenta el grado de hidratación en forma paralela a la actividad enzimática. A un nivel de hidratación de 0.38 gH₂O/g proteína se forma una monocapa verdadera de agua que cubre la superficie completa de la proteína; a partir de este nivel ocurre la hidratación máxima o completa, el agua va adquiriendo configuración idéntica a la del agua libre al igual que su capacidad calorífica, y la movilidad de la proteína es total, es decir, despliega movimientos de dominios los cuales son cruciales para la actividad de la enzima mediante eventos que originan fuerzas fluctuantes entre la proteína y el sustrato; la lisozima presenta en este nivel de hidratación 1/10 de la actividad enzimática de la enzima diluida. Finalmente, en la tercera región (línea ascendente de la derecha) el agua se comporta como agua libre o agua en exceso (7).

FIGURA 8. Isoterma de adsorción basada en datos de la lisozima



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Determinación de la actividad enzimática a 9°C

Se partió de la enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* debido a que es una lactasa comercial liofilizada. De esta forma la enzima pudo ser utilizada en el sistema no acuoso sin interferencias. El fabricante reporta que la temperatura óptima de actividad de la enzima es de 37°C, por lo que fue necesario determinar la actividad de la enzima a 9°C, temperatura a la cual se rompe la cadena de frío. La determinación de la actividad enzimática se realizó por el método espectrofotométrico en ONPG, midiendo la absorbancia del producto de la reacción (ONP) a 420nm en celdas de plástico, usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. La reacción se llevó a cabo utilizando como medio 2.7mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.6, conteniendo además sulfato de magnesio 1mM y sulfato de manganeso 0.1mM. Se adicionaron 0.1mL de solución de la enzima (1.5mg/mL) y 0.2mL de solución de ONPG 0.034M.

4.2. Sistema enzimático β -galactosidasa-ONPG

4.2.1. USO DE N-PENTADECANO COMO SOPORTE

4.2.1.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EMULSIONES DE AGUA EN ACEITE MINERAL

Por razones económicas se realizaron pruebas preliminares para encontrar las condiciones de reacción óptimas en aceite mineral, cuyo costo es menor que el del n-pentadecano, esperando que se tuviera un comportamiento similar en ambos medios. Se evaluó la estabilidad de varias emulsiones agua en aceite (w/o) de

la siguiente manera: se prepararon emulsiones con distintas proporciones de agua y aceite mineral, adicionando al agua cristal violeta como indicador visual. Cada emulsión fue estabilizada en un sonicador Cole-Parmer 8890 durante 10 minutos, al término de los cuales se determinó el tiempo de ruptura de la emulsión (el tiempo al cual la fase acuosa evidenciada por el cristal violeta se separaba del aceite mineral).

4.2.1.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN ACEITE MINERAL

a) SIN ACETONA

En tubos de ensayo se efectuó la reacción enzimática en 0.97mL de aceite mineral utilizando 0.03mL de solución de ONPG 0.0756M, lo cual equivale a una concentración de sustrato de 0.017%. Se utilizaron tres concentraciones diferentes de enzima: 0.1, 0.3 y 0.5%. La actividad enzimática se evaluó cualitativamente observando la aparición de la coloración amarilla correspondiente al producto ONP.

b) CON ACETONA

El experimento de la sección 4.2.1.2.a. se repitió adicionando 1% de acetona como cosolvente.

4.2.1.3. CONSTRUCCIÓN DE PELÍCULAS DE N-PENTADECANO

En esta etapa se probaron dos métodos para efectuar la construcción del sistema deseado con películas de n-pentadecano. A continuación se mencionan los aspectos más relevantes de cada uno.

4.2.1.3.1. Método de superficie con agua fría

Se llenó una caja Petri con agua fría hasta la mitad de su capacidad. Se agregó gota a gota 1mL de n-pentadecano que contenía ONP como indicador visual de homogeneidad. De esta forma, se buscaba que el n-pentadecano se extendiera sobre la superficie del agua formando la película. La caja tapada fue mantenida durante 10 minutos a 4°C.

4.2.1.3.2. Método de placas de vidrio

Para el montaje del sistema de placas de vidrio se utilizaron dos portaobjetos, dos empaques de hule para electroforesis de 0.75mm de espesor y dos broches para papel, como se muestra en la figura 9A.

El montaje del sistema se realizó colocando las placas de vidrio separadas por los empaques como se muestra en la figura 9B. Los broches fueron colocados de tal manera que ejercieran presión para evitar la separación de las placas.

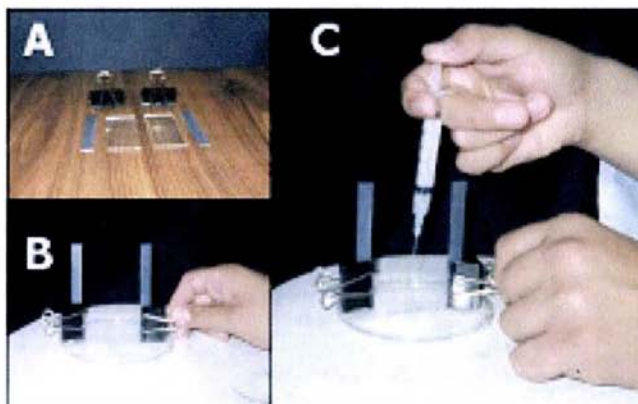
El siguiente paso para completar el dispositivo consistía en sellar la parte inferior del espacio entre las placas. Esto se realizó de diversas maneras, las cuales se mencionan a continuación:

- a) **Sellado por inmersión en baño de parafina fundida.** En un tubo de ensayo de 25x150mm se colocó parafina comercial en forma de hojuelas hasta tres cuartas partes de su capacidad. El tubo se colocó en baño de agua calentando hasta la fusión completa de la parafina. La parafina fundida fue vertida en una caja Petri; la base del sistema de placas fue sumergida brevemente en ella y fue retirada para favorecer la solidificación de la misma.
- b) **Sellado por inmersión en baño de silicón caliente.** Una caja Petri fue llenada con barras de silicón en trozos de 1cm de largo. La caja fue colocada sobre una parrilla eléctrica Corning, calentando hasta la

fusión total del silicón. La base del sistema fue introducida brevemente en el silicón fundido y fue retirada para permitir el enfriamiento y solidificación de éste.

- c) **Sellado con pistola de silicón.** La base del sistema fue sellada con silicón caliente, usando una pistola fundidora de barras de silicón marca VL, modelo GM-160E.

FIGURA 9. Construcción de películas de n-pentadecano



- A. Material utilizado en el sistema de placas de vidrio para la construcción de películas de n-pentadecano
- B. Montaje del sistema, realizado colocando las placas de vidrio separadas por los empaques y aseguradas con los broches.
- C. Dosificación del n-pentadecano en el espacio entre placas después de sellar la parte inferior

Después de sellar el sistema se procedió a dosificar el n-pentadecano por la ranura que quedó en la parte superior del sistema, tal como lo muestra la figura 9C. Una vez que el depósito (espacio entre placas) estuvo lleno de n-pentadecano, el sistema completo fue colocado a temperatura de refrigeración durante 15 minutos para permitir la completa solidificación de la parafina. Finalmente, el sistema fue desmontado cuidadosamente para evitar la ruptura de la película, y la película fue extraída y mantenida en refrigeración.

4.2.1.4. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN N-PENTADECANO

Se realizó el ensayo de determinación cualitativa de la actividad enzimática mencionado en la sección 4.2.1.2. sustituyendo el aceite mineral por n-pentadecano. Posteriormente se adicionó al medio un 0.5% más de ONPG sólido y se evaluó cualitativamente la actividad enzimática por medio de la aparición del color amarillo característico del producto de la reacción (ONP).

4.2.1.5. PREPARACIÓN DE EMULSIÓN DE β -GALACTOSIDASA EN N-PENTADECANO

Se prepararon en tubos de ensayo de 13x100mm con tapa de rosca emulsiones de 3% de agua en n-pentadecano conteniendo 0.5% de enzima y 1% de acetona, condiciones adecuadas encontradas en los estudios con aceite mineral. De la misma forma se prepararon emulsiones de 3% de agua en n-pentadecano con 0.5% de enzima. En ambos casos, la estabilización de la emulsión se llevó a cabo en un sonicador Cole-Parmer 8890 durante 10 minutos.

4.2.1.6. PREPARACIÓN DE EMULSIÓN DE ONPG EN N-PENTADECANO

Se preparó una emulsión de 3% de agua en n-pentadecano conteniendo 0.52% de ONPG en polvo. Se adicionaron 0.1mL de dimetil sulfóxido (DMSO) como cosolvente. La emulsión obtenida fue mezclada con la emulsión de enzima preparada en la sección 4.2.1.5. y se evaluó cualitativamente la actividad enzimática.

4.2.1.6.1. Determinación de la estabilidad de emulsiones de 3% de agua en n-pentadecano con 0.52% ONPG a distintas concentraciones de DMSO

Se realizaron pruebas de determinación del tiempo de ruptura de emulsión a distintas concentraciones de DMSO. Las emulsiones fueron preparadas con 3% de agua en n-pentadecano; éstas contenían 5.2mg de ONPG. La estabilización de la emulsión se llevó a cabo en un sonicador Cole-Parmer 8890 durante 10 minutos.

4.2.1.6.2. Determinación de la actividad enzimática en presencia de 5% DMSO

Se realizó la determinación de la actividad enzimática por el método espectrofotométrico con ONPG, tal como se indica en la sección 4.1., pero adicionando 0.1mL de solución de enzima (12.25mg/mL), lo cual equivale a 0.041% de enzima. Además, al medio se adicionó 5% de DMSO.

4.2.1.7. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO

Con una de las emulsiones formadas en el segundo juego de la sección 4.2.1.5. (sin acetona) se construyó una película por el método mencionado en la sección 4.2.1.3.2. Se prepararon emulsiones con 3% de agua en n-pentadecano, conteniendo 0.52% de ONPG y 5% de DMSO. Dichas emulsiones fueron estabilizadas por sonicación de la manera antes descrita y con una de ellas se construyó una película por el método mencionado en la sección 4.2.1.3.2. Con las películas formadas de enzima y de sustrato se construyó el sistema completo, cuyo montaje se llevó a cabo como se muestra en la figura 9C (sec. 4.2.1.3.2.).

4.2.1.8. EFECTO DEL N-PENTADECANO SOBRE LA ESTABILIDAD DEL COLOR DEL ONP

Este ensayo se realizó con el fin de determinar si la presencia de n-pentadecano enmascara el color del ONP. Para ello se preparó una solución inicial de ONP en agua a una concentración de 0.5mM. De esta solución se tomaron dos alícuotas de 200µL cada una, y fueron vertidas en tubos de ensayo de 13x100mm. A la primera alícuota (A) se adicionaron 800µL de agua. A la segunda (B) se adicionaron 800µL de n-pentadecano. Los colores de ambas alícuotas fueron evaluados mediante apreciación visual.

4.2.2. USO DE POLIACRILAMIDA COMO SOPORTE

Se prepararon geles de poliacrilamida a las concentraciones y condiciones que se muestran en la tabla 3. En todos los casos, los geles fueron preparados de la siguiente manera: en un vaso de precipitados de 10 mL se mezclaron el agua destilada, la solución de acrilamida al 30% y la solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.6. A esta mezcla se adicionó la cantidad de enzima o sustrato requerida y se disolvió completamente colocando el vaso en una parrilla de agitación magnética. Una vez formada la solución, se adicionó la solución de persulfato de amonio al 10% para después adicionar el TEMED. La solución final fue dosificada en el sistema de placas (sec. 4.2.1.3.2.) usando separadores de diferentes espesores, para posteriormente permitir la gelificación. Con cada gel de enzima (E) y su correspondiente gel de sustrato (S) se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

- **Control positivo.** El gel de enzima y el de sustrato fueron superpuestos a temperatura ambiente y protegidos con plástico adherente para alimentos. Se evaluó cualitativamente la actividad enzimática mediante la apreciación visual del color amarillo característico del producto de la reacción.
- **Control negativo.** El gel de ONPG fue protegido con plástico adherente y mantenido bajo las mismas condiciones que el control positivo.

- **Sistema completo.** El gel de enzima y el de sustrato fueron colocados separados por una película de n-pentadecano puro construida por el método de las placas de vidrio. El sistema, construido a temperatura de refrigeración, fue expuesto a temperatura ambiente para evaluar cualitativamente la actividad enzimática.

TABLA 3. Preparación de geles de poliacrilamida

Gel	E ₁	S ₁	S ₁ '	E ₂	S ₂	E ₃	S ₃	S ₃ '
Concentración de poliacrilamida (%)	5	5	5	5	5	10	10	15
Solución de acrilamida al 30% (mL)	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	2.55
Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.6 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	1.25	1.25
Agua destilada (mL)	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	2.0	2.0	1.15
Solución de persulfato de amonio 10% (μL)	25	25	25	50	50	50	50	50
TEMED (μL)	2.5	2.5	2.5	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Espesor (cm)	0.02	0.02	0.02	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075
Concentración de β-galactosidasa (%)	0.5	0	0	0.5	0	0.5	0	0
Concentración de ONPG (M)	0	0.034	0.017	0	0.017	0	0.017	0.034

E: Gel con enzima, S: gel con sustrato

4.2.3. USO DE GRENETINA COMO SOPORTE

4.2.3.1. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE TRANSICIÓN DE GEL A LÍQUIDO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GRENETINA (PARTE 1)

Se prepararon por triplicado cinco tubos conteniendo 10mL de solución de grenetina en las concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5%. Para cada tubo se pesó la cantidad de grenetina correspondiente, se aforó con agua destilada, se llevó a cabo el calentamiento del tubo en baño de agua a ebullición hasta disolución completa de la grenetina. Las soluciones se colocaron a temperatura de refrigeración (8°C) y se registró el tiempo de gelificación (tiempo al cual ya no había movilidad alguna en la superficie del medio). Después de la gelificación, los tubos fueron colocados a temperatura ambiente (25°C) inclinados con la boca hacia abajo formando un ángulo de 40° con la mesa de trabajo. Se registró el tiempo de ruptura del gel (tiempo al cual la solución de grenetina se deslizó por la

pared del tubo inclinado). El tiempo de transición de gel a líquido fue calculado como la diferencia entre el tiempo al cual cada sistema fue colocado a temperatura ambiente y el tiempo de ruptura del gel.

4.2.3.2. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO EN GRENETINA

4.2.3.2.1. En sistemas abiertos

Se prepararon soluciones de grenetina a las concentraciones de 2, 3, 4 y 5%. Para cada concentración de grenetina se prepararon 10mL de solución. En todos los casos se pesó la cantidad de grenetina correspondiente y una parte del agua de aforo fue adicionada a la misma para hidratarla. El resto del agua fue calentada a ebullición con microondas durante 2 minutos y fue adicionada a la grenetina hidratada. La solución se agitó hasta la disolución completa de toda la grenetina y se dejó enfriar a 37°C o menos antes de adicionar la enzima o el sustrato.

Con las soluciones de grenetina preparadas se elaboraron diferentes cantidades de soluciones de enzima y sustrato, ambos a una concentración de 0.5%. Con las soluciones finales a distintas concentraciones de grenetina se realizaron diversos ensayos de actividad enzimática, tal como se explica a continuación: 1mL de la solución de enzima en grenetina al 2% en tubo de vidrio de 8x75mm fue sometido a temperatura de refrigeración para permitir la gelificación de la grenetina; 1mL de solución de ONPG en grenetina al 2% fue vertido sobre el gel de enzima a temperatura de refrigeración y se evaluó cualitativamente la actividad de la enzima.

Con las soluciones de enzima y ONPG en grenetina al 2% se construyeron por separado películas por el método de las placas de vidrio y finalmente se realizó un control positivo con las películas obtenidas, de manera similar a los realizados con los geles de poliacrilamida (sección 4.2.2.).

Se vertieron 2mL de solución de enzima en grenetina al 3% en una caja Petri de vidrio de 5cm de diámetro, y la caja fue sometida a temperatura de refrigeración hasta la gelificación completa de la grenetina. A continuación

se adicionaron 2mL de solución de grenetina al 2% manteniendo la caja a temperatura de refrigeración, y se esperó el tiempo suficiente para que esta segunda capa de grenetina gelificara completamente. Fueron vertidos 2mL de solución de ONPG en grenetina al 2% sobre la caja Petri que ya contenía las dos capas anteriores, manteniendo a temperatura de refrigeración hasta gelificación completa. Una vez que se tuvo la caja Petri con las tres capas de gel formadas, se expuso a temperatura ambiente y se evaluó cualitativamente la actividad enzimática.

Se vertieron 0.5mL de solución de enzima al 4% en una caja de cartón recubierto con plástico adherente de 2cm de lado, y la caja fue sometida a temperatura de refrigeración hasta la gelificación completa de la grenetina. Después se adicionaron 0.6mL de solución de grenetina al 2% como aislante y se permitió su gelificación a temperatura de refrigeración. A continuación se adicionaron 0.5mL de solución de ONPG en grenetina al 2%. Se permitió la gelificación de la última capa de grenetina a temperatura de refrigeración y el sistema completo se expuso a temperatura ambiente para evaluar cualitativamente la actividad enzimática. El mismo procedimiento se utilizó para preparar un sistema en el que la enzima se encontrara disuelta en grenetina al 5%.

4.2.3.2.2. En sistemas sellados

a) EN CAJAS PETRI

Se prepararon 7.5 mL de ONPG 0.5% en grenetina al 2% y se colocaron en una caja Petri de 5cm de diámetro. Se permitió la gelificación total del sistema a temperatura de refrigeración y se extendieron sobre la superficie del gel 2mL de n-pentadecano, permitiendo que solidificara a temperatura de refrigeración. Por otro lado, se prepararon 7.5mL de enzima 0.5% en grenetina al 2% y se colocaron sobre el n-pentadecano sólido. Se permitió la gelificación de esta última capa de grenetina a temperatura de refrigeración y la caja fue sellada con

parafilm. El sistema se mantuvo a esta temperatura por 15 minutos, al término de los cuales se colocó a temperatura ambiente y se evaluó cualitativamente la actividad de la enzima.

También se elaboraron un control positivo (igual al sistema pero sin la capa intermedia de n-pentadecano) y un control negativo (el cual constaba de una capa de ONPG en gel cubierta por una capa de grenetina al 2%).

b) EN TUBOS DE 25x150MM

Se prepararon 7.5 mL de ONPG 0.5% en grenetina al 2% y se colocaron en un tubo de ensayo de 25x150mm. Se permitió la gelificación del sistema a temperatura de refrigeración. Una vez que se alcanzó la gelificación total, se extendió sobre la superficie del gel 1mL de n-pentadecano y a temperatura de refrigeración se esperó hasta que solidificara. Por otro lado, se prepararon 7.5 mL de enzima 0.5% en grenetina al 2% y se colocaron sobre el n-pentadecano sólido. Se permitió la gelificación del sistema a temperatura de refrigeración. Posterior a la formación del gel, la boca del tubo fue sellada con parafilm. El sistema se mantuvo a esta temperatura por 20 horas, al término de las cuales se colocó a temperatura ambiente.

También se elaboraron un control positivo, el cual era igual que el sistema completo pero sin n-pentadecano, y un control negativo, el cual constaba de una capa de ONPG en gel cubierta por una capa de grenetina al 2%.

c) EN TUBOS DE 5.5MM DE DIÁMETRO

Se procedió de la misma manera que en el sistema en tubo (sec. 4.2.3.2.2.b) con la diferencia de que en esta ocasión se utilizó como soporte de la reacción un tubo de 5.5mm de diámetro. Cuando el sistema estuvo listo, se selló la parte superior de éste con parafilm. Todo el sistema fue envuelto en papel aluminio para protegerlo de la luz. Las cantidades que se utilizaron de cada componente fueron las siguientes: 1mL de ONPG 0.5% en

grenetina al 2%, 50 μ L de n-pentadecano y 1mL de enzima 0.5% en grenetina al 2%. También en este caso se hicieron un control positivo y uno negativo.

El sistema anterior y sus controles fueron repetidos pero en medio inclinado y con menor cantidad de soluciones de enzima y sustrato (700 μ L de cada una) con el fin de aumentar la superficie de contacto y facilitar la migración del n-pentadecano a la superficie.

Todos los sistemas se colocaron a temperatura de refrigeración durante 48 horas. Al término de ese tiempo se evaluó la intensidad del color para cada uno de los casos y posteriormente el sistema de reacción se colocó a temperatura ambiente para hacer las observaciones pertinentes.

4.2.3.3. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE TRANSICIÓN DE GEL A LÍQUIDO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GRENETINA (PARTE 2)

Con el fin de determinar la concentración de grenetina que permitiera obtener un gel firme y a la vez con el menor tiempo de transición de gel a líquido, se llevó a cabo un experimento similar al descrito en la sección 4.2.3.1. pero esta vez las concentraciones de grenetina empleadas se ubicaban entre 1 y 2%. Para ello se prepararon cinco tubos conteniendo 10mL de solución de grenetina a las siguientes concentraciones: 1.2, 1.4, 1.6 y 1.8%. Las soluciones fueron preparadas de igual manera que en el experimento anterior (sec. 4.2.3.1.). Se determinó el tiempo de gelificación de igual manera que en el experimento anterior, así como el tiempo al cual el medio pasó de gel a líquido a temperatura ambiente (tiempo de transición de gel a líquido). Al igual que en el experimento anterior cada concentración fue ensayada por triplicado.

4.2.3.4. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO EN GEL DE GRETINA AL 1.3%

4.2.3.4.1. Con n-pentadecano como aislante

Se construyó un sistema similar a la sección 4.2.3.2.2.b en tubo de ensayo de 8x75mm, pero usando una concentración de gretina de 1.3%, considerada como óptima en el ensayo la sección 4.2.3.3. La capa inferior del sistema estaba compuesta por 950 μ L de ONPG 0.5% en gretina al 1.3%. La capa intermedia constaba de 150 μ L de n-pentadecano, y la capa superior de 950 μ L de enzima 0.5% en gretina al 1.3%. Al igual que en el sistema mencionado, se permitió la gelificación de cada capa a temperatura de refrigeración antes de la adición de la siguiente. Una vez que las tres capas hubieron gelificado, la boca del tubo fue sellada con parafilm. El sistema se mantuvo a esta temperatura por 4 días, al término de los cuales se colocó a temperatura ambiente. También se construyeron un control positivo y uno negativo.

Se hizo un sistema idéntico al anterior (incluidos los controles negativo y positivo) pero con la diferencia de que se construyó inclinado.

4.2.3.4.2. Con gretina al 1.3% como aislante

Se repitió el sistema de la sección 4.2.3.4.1. cambiando el n-pentadecano por 500 μ L de gretina al 1.3%.

**4.2.3.5. EFECTO DEL TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA PREPARACIÓN HASTA LA UTILIZACIÓN DE LA ENZIMA
SOBRE LA GELIFICACIÓN DE LA SOLUCIÓN ENZIMÁTICA EN GRETINA AL 1.3%**

Se prepararon 7mL de solución de enzima 0.5% en gretina al 1.3% y se colocaron a temperatura ambiente. A partir de esta solución madre se tomaron muestras de 1mL y se colocaron en tubos de ensayo de 8x15mm a temperatura de refrigeración de acuerdo con los tiempos de inicio de refrigeración (t_0) que se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. Tiempos de inicio de refrigeración de soluciones de β-galactosidasa en gretina al 1.3%	
Tubo	Tiempo de inicio de refrigeración t_0 (min)
1	0.6
2	5.0
3	10.0
4	15.0
5	20.0
6	35.0

Se registró el tiempo de gelificación (tiempo transcurrido desde que la solución fue colocada a temperatura de refrigeración hasta que no hay movilidad en la superficie del medio) para cada tubo y se evaluó la consistencia de los geles a las 24 horas.

4.3. Sistema enzimático β -galactosidasa-X-gal

Se prepararon geles de poliacrilamida al 5% de la manera descrita en la sección 4.2.2. de acuerdo con las condiciones que se muestran en la tabla 5. Como se observa en la tabla, el sustrato ONPG fue sustituido por el sustrato X-gal. Los geles de enzima (E) y sustrato (S) obtenidos fueron fraccionados en ocho partes y con las fracciones resultantes se llevaron a cabo un control positivo, un control negativo y un sistema completo.

Gel	E	S
Concentración de poliacrilamida (%)	10.00	5.00
Solución de acrilamida al 30% (mL)	1.70	0.34
Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.6 (mL)	1.25	0.25
Agua destilada (mL)	2.00	0.40
Solución de persulfato de amonio 10% (μ L)	50.00	10.00
TEMED (μ L)	5.00	2.00
Espesor (cm)	0.075	0.075
Concentración de β -galactosidasa (%)	0.50	0
Concentración de X-gal (M)	0	0.0006

E: Gel con enzima, S: gel con sustrato

4.4. Sistema enzimático β -galactosidasa-lactosa-GOD-PAP

4.4.1. USO DE POLIACRILAMIDA COMO SOPORTE

Esta vez los sustratos sintéticos de la β -galactosidasa empleados en todos los casos anteriores fueron sustituidos por su sustrato natural: la lactosa. Se prepararon geles de poliacrilamida al 5% de la manera descrita en la sección 4.3 de acuerdo con las condiciones que se muestran en la tabla 6. Se utilizó lactosa Merck®.

Gel	E₁	S₁	E₂	S₂
Concentración de poliacrilamida (%)	10.00	10.0	25	10.0
Solución de acrilamida al 30% (mL)	1.70	1.70	4.25	1.70
Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.6 (mL)	1.25	1.25	0	1.25
Agua destilada (mL)	2.00	2.00	0	2.00
Solución de persulfato de amonio 10% (μ L)	50.00	50.00	50.00	50.00
TEMED (μ L)	5.00	5.00	5.00	5.00
Sistema enzimático GOD-PAP (mL)	0	0	0.75	0
Espesor (cm)	0.075	0.075	0.075	0.075
Concentración de β -galactosidasa (%)	0.50	0	0.50	0
Concentración de lactosa (%)	0	5.00	0.00	5.00

Para probar la eficacia del sistema, se realizó un ensayo que consistió en incubar los geles E₁ y S₁ durante 30 minutos a temperatura ambiente, uno encima de otro para favorecer la reacción enzimática. Para hacer evidente la producción de glucosa a partir de la reacción efectuada se adicionaron 0.5mL de sistema enzimático GOD-PAP y se realizaron las observaciones pertinentes. Para este ensayo también se llevó a cabo un control negativo que consistió en un gel S₁ adicionado con 0.5mL del sistema enzimático GOD-PAP. Con los geles E₂ y S₂ se realizó un control positivo de la manera descrita en la sección 4.2.2.

4.4.2. USO DE GRENETINA COMO SOPORTE

4.4.2.1. MÉTODO DE PLACAS DE VIDRIO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE PELÍCULAS DE GRENETINA

El método de placas de vidrio para la construcción de películas de n-pentadecano descrito en la sección 4.2.1.3.2. no es útil para construir películas de grenetina debido a que la grenetina queda adherida a los vidrios y se fracciona al separarlos, dando lugar a la formación de "medios geles" (sec. 5.2.3.2.). Para construir películas de grenetina por el método de placas de vidrio fue necesario aplicar ciertas variaciones al método original, mismas que se ilustran en la figura 10. Los pasos a seguir en este caso fueron los siguientes:

- A. Además del material descrito en la sección 4.2.1.3.2. (dos portaobjetos, dos broches de presión para papel, dos separadores de plástico de 0.12cm de espesor y pistola de silicón) fue necesario tener plástico adherente para alimentos.
- B. Cada portaobjetos fue cubierto por una de sus caras con el plástico adherente, dejando una pestaña para facilitar la posterior extracción de la película, como se muestra en la figura 10B.
- C. Los separadores son colocados entre los vidrios como se muestra en la figura 10C, colocando los broches a presión para asegurar el sistema. Los portaobjetos deben ser colocados con la cara recubierta de plástico adherente hacia adentro.
- D. La parte inferior del sistema es sellada con abundante silicón, de manera que no existan fugas. Es necesario dejar de cada lado del sistema un exceso de silicón (a manera de pestaña) que facilite su posterior desprendimiento para extraer la película del dispositivo.

- E.** Las pestañas de plástico adherente son dobladas hacia fuera del sistema, de manera que quede libre el espacio entre placas, como se ilustra en la figura 10E.
- F.** Después de dosificar la solución de grenetina en el espacio entre placas y permitir su gelificación manteniendo el dispositivo a temperatura de refrigeración el tiempo suficiente para que ésta se lleve a cabo, se retiran los broches del sistema de placas para comenzar con la extracción de la película.
- G.** Se retira el sello de silicón jalando por una de las pestañas dejadas a los lados.
- H.** Se retiran los separadores y las dos pestañas de plástico adherente se doblan hacia el mismo lado, de manera que se pueda retirar uno de los portaobjetos para obtener la película de grenetina completa.



4.4.2.2. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO EN GRENETINA AL 10%

Se prepararon 10mL de solución de grenetina al 10% de la siguiente manera: la grenetina sólida fue hidratada con una parte del agua de aforo. El resto del agua fue calentada a ebullición con microondas durante 2 minutos y

fue adicionada a la grenetina hidratada. La solución se agitó hasta disolución completa de la grenetina y se enfrió a 37°C. Con la solución anterior se prepararon 1.5mL de solución al 5% de lactosa Merck y se construyó una película por el método de las placas de vidrio para grenetina (sec. 4.4.2.1.) utilizando separadores de 0.12cm de espesor.

Se prepararon 10mL de solución de grenetina al 16.67% siguiendo el mismo procedimiento empleado para la solución de grenetina al 10%. En 0.8mL de la solución anterior a 37°C se disolvieron 7.5mg de enzima (equivalentes a 0.5%) y se adicionaron 0.6mL de sistema enzimático GOD-PAP, de manera que la concentración final de grenetina fue del 10%. Con la solución resultante se construyó una película por el método de las placas de vidrio para grenetina (sec. 4.4.2.1.) utilizando separadores de 0.12cm de espesor.

Con el gel conteniendo la enzima y el sistema enzimático GOD-PAP, y con el gel de lactosa se realizaron un control negativo y un control positivo como se explica en la sección 4.2.2.

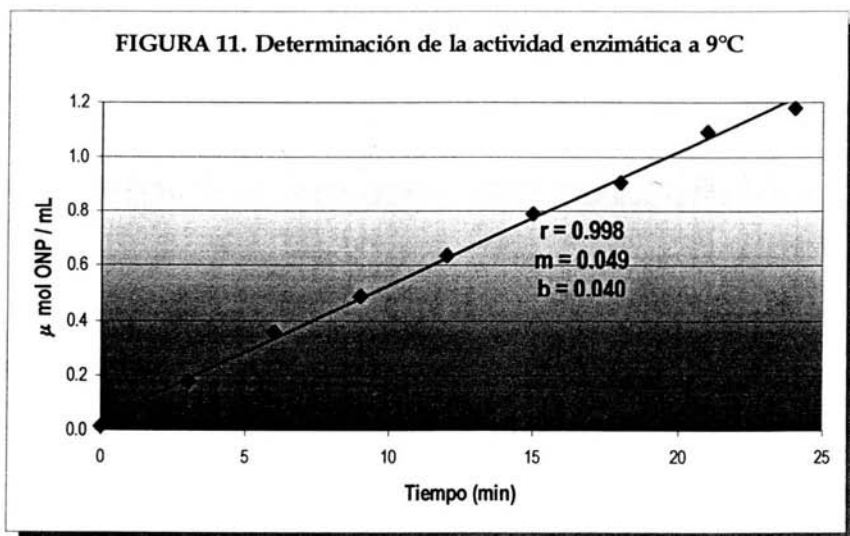
4.5. Sistema enzimático GOD-PAP-glucosa

Se mezclaron 0.6mL del sistema enzimático GOD-PAP con 0.9mL de solución de grenetina al 16.67%, preparada de la manera descrita en la sección 4.4.2.2. Con la mezcla resultante se elaboró un gel por el método de las placas de vidrio para grenetina (sec. 4.4.2.1.). Por otro lado, se prepararon 1.5mL de solución al 5% de dextrosa en grenetina al 10%, y con la solución resultante también se construyó un gel por el método de las placas de vidrio para grenetina (sec. 4.4.2.1.). Ambos geles se construyeron con separadores de 0.12cm de espesor. Con el gel GOD-PAP y el gel de dextrosa se realizaron un control positivo y un sistema completo con n-pentadecano como se explica en la sección 4.2.2. El control negativo no fue necesario debido a que ambos geles eran completamente incoloros.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación de la actividad enzimática a 9°C

Con el fin de saber si la enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* presenta actividad a 9°C (temperatura óptima de 37°C), se realizó la determinación de su actividad por el método descrito en la sección 4.1. Con los datos obtenidos de la determinación de la actividad enzimática se realizó una gráfica que muestra la concentración de producto (ONP) obtenido a través del tiempo (figura 11). Como se observa, sí existe actividad enzimática a esa temperatura. Los datos de la gráfica corresponden a la porción lineal de la curva de cinética enzimática. Por lo tanto, la pendiente equivale a la velocidad inicial de la enzima. Bajo las condiciones estudiadas, la enzima presentó una velocidad inicial de $0.049 \mu\text{mol ONP}/\text{mL}\cdot\text{min}$. La presencia de actividad a 9°C, que es una temperatura aproximada a la que se rompe la cadena de frío, indica que la enzima en cuestión es adecuada a los propósitos de la investigación.



5.2. Sistema enzimático β -galactosidasa-ONPG

5.2.1. USO DE N-PENTADECANO COMO SOPORTE

5.2.1.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EMULSIONES DE AGUA EN ACEITE MINERAL

Debido a que la enzima se encuentra deshidratada y es necesaria la presencia de agua para que exista actividad catalítica, fue necesario adicionar agua al sistema no acuoso por medio de la preparación de una emulsión aceite mineral – agua (w/o). Para conocer la máxima cantidad de agua que puede incorporarse al sistema no acuoso para formar la emulsión, fue necesario evaluar la estabilidad de varias emulsiones w/o. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12. Como se puede observar, la estabilidad de la emulsión decreció a medida que aumentó la cantidad de agua. La emulsión que permaneció estable por más tiempo fue la que contenía 3% de agua (567 segundos ó 9.45 minutos de estabilidad).

Tomando como base la emulsión con 3% de agua, se realizó otro ensayo adicionando 1% de acetona con el fin de aumentar el tiempo de ruptura de la emulsión. El resultado fue un aumento considerable en la estabilidad de la emulsión desde 9.45 minutos hasta 26 minutos, lo cual se aprecia en la figura 13. En todos los casos, las emulsiones presentaban un aspecto turbio blanquizco.

FIGURA 12. Determinación de la estabilidad de emulsiones w/ o

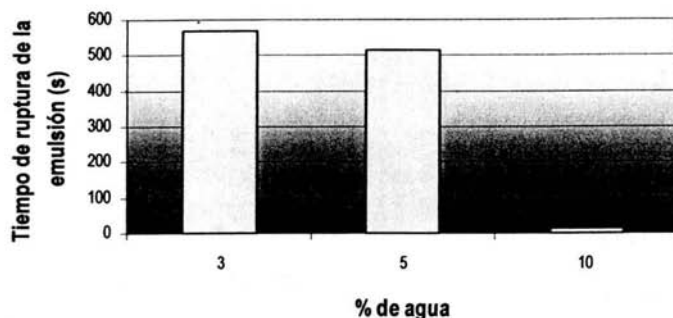
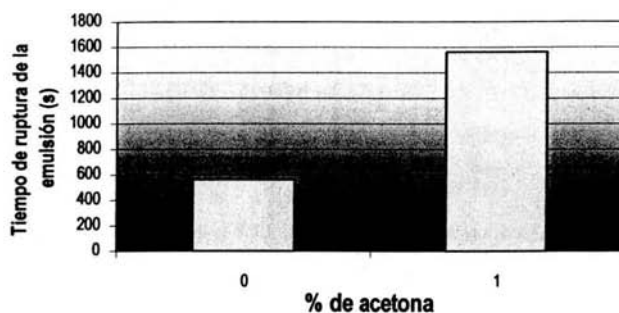


FIGURA 13. Determinación de la estabilidad de emulsiones w/o con 3% de agua en presencia de acetona



5.2.1.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN ACEITE MINERAL

Para saber si la máxima cantidad de agua que era posible adicionar a la emulsión para que permaneciera estable era suficiente para que la enzima presentara actividad en el sistema no acuoso, se realizó un ensayo de determinación de la actividad enzimática de manera cualitativa (evaluando visualmente la aparición del color amarillo del producto de la reacción) en presencia y ausencia de acetona. El ensayo se realizó mezclando la

enzima y el sustrato con agua en aceite mineral. Los resultados obtenidos para cada caso se detallan a continuación.

a) SIN ACETONA

Para las tres diferentes concentraciones de enzima (0.1, 0.3 y 0.5%) se detectó actividad por la aparición de un color amarillo tenue. En los tres casos fue evidente la precipitación del producto de la reacción.

b) CON ACETONA

El experimento anterior se repitió adicionando 1% de acetona pensando que cumpliera una doble función: por una parte aumentar la estabilidad de la emulsión, como se comprobó en el punto 4.2.1.1. de la presente investigación; por otra parte se esperaba que actuara como cosolvente, evitando así la precipitación del producto de la reacción para obtener una coloración uniforme. El resultado fue que en el tubo que contenía 0.1% de enzima la coloración amarilla no fue evidente. En los otros dos tubos (0.3 y 0.5% de enzima) sí se presentó la coloración amarilla de una manera evidente, pero el problema de la precipitación del ONP persistió. Todo lo anterior indica que la función de la acetona sólo es aumentar la estabilidad de la emulsión, y no así la solubilidad del producto en el sistema. Sin embargo, como la finalidad del sensor es detectar el abuso de temperatura se decidió restar importancia a la precipitación del ONP, hecho que finalmente sería evidente a los ojos del consumidor.

5.2.1.3. CONSTRUCCIÓN DE PELÍCULAS DE N-PENTADECANO

Se probaron diversos métodos para construir las películas de n-pentadecano. A continuación se mencionan los aspectos más relevantes de cada uno.

5.2.1.3.1. *Método de superficie con agua fría*

El n-pentadecano adicionado gota a gota sobre la superficie del agua fría se extendió formando la película, la cual solidificó al mantener el sistema en refrigeración. La película obtenida presentó una forma completamente irregular y una superficie rugosa. Pero el problema más grave radicó en que el ONP migró desde el n-pentadecano hacia el agua. Por lo tanto, este método se descarta, pues este fenómeno puede ocurrir tanto con la enzima como con el ONPG.

5.2.1.3.2. *Método de placas de vidrio*

El sistema de placas de vidrio fue mostrado en la figura 9 (sec. 4.2.1.3.2.). Su base fue sellada por distintos métodos, obteniéndose los siguientes resultados:

- a) **Sellado por inmersión en baño de parafina fundida.** Este método fue eficaz para sellar el sistema de placas de vidrio, pero presentó algunos inconvenientes: era necesario fundir la parafina en un baño de agua caliente (lo cual implicaba trabajo adicional), el material que se puso en contacto con la parafina tuvo que ser lavado con agua caliente para eliminar todos los residuos de la misma y el sello de parafina en el sistema no pudo ser removido con facilidad a la hora de extraer la placa formada, provocando un tiempo excesivamente largo de manipulación de la misma, con la consiguiente fusión del n-pentadecano.

- b) **Sellado por inmersión en baño de silicón caliente.** El resultado fue un sistema de sellado eficaz, más rápido de realizar que el anterior y fácil de retirar a la hora de extraer la película del dispositivo. Además, la película formada presentó una forma perfectamente rectangular. Sin embargo, fue necesario emplear grandes cantidades de silicón para llenar la caja. Además, cada vez que se necesitaba construir una película era necesario calentar el silicón hasta fundirlo, lo cual a la larga provocó cambios en la consistencia y apariencia del mismo, haciendo el sello quebradizo y difícil de retirar. La caja, junto con todo el silicón deteriorado, quedó completamente inservible para posteriores ensayos.
- c) **Sellado con pistola de silicón.** En este caso, el sellado fue eficaz y el sistema muy sencillo e higiénico, pero la película en el lado del sello de silicón adquirió una forma irregular. Este último problema no presenta mucha relevancia, ya que las películas obtenidas fueron útiles para la investigación.

Después de sellar el sistema por el mejor método (con pistola de silicón), se dosificó el n-pentadecano y se permitió que la película solidificara. La extracción de la película fue fácil y rápida, por lo que se obtuvieron películas completas y uniformes, sin que se presentara fusión del n-pentadecano por una prolongada manipulación.

5.2.1.4. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN N-PENTADECANO

Por razones económicas, las pruebas preliminares para encontrar las condiciones de reacción se realizaron en aceite mineral, cuyo costo es menor. Al sustituir el aceite mineral por n-pentadecano, que es finalmente el medio de reacción necesario para lograr el objetivo de la investigación, el resultado fue la ausencia de coloración amarilla. En el n-pentadecano, una concentración de 0.017% de ONPG no fue suficiente para dar lugar a la formación de producto en cantidad tal que pudiera apreciarse a simple vista. Por lo tanto, se adicionó al medio un 0.5% más de ONPG sólido, dando como resultado la aparición de una coloración amarillo tenue, tal como se muestra en la figura 14.

FIGURA 14. Determinación cualitativa de la actividad enzimática en n-pentadecano



0.5% de enzima + 3% de agua + 0.52% de ONPG

5.2.1.5. PREPARACIÓN DE EMULSIÓN DE β -GALACTOSIDASA EN N-PENTADECANO

Las emulsiones que contenían acetona no se formaron: se observó formación de una película blanquecina en las paredes del tubo. Las condiciones encontradas en el aceite mineral no son reproducibles en n-pentadecano, por lo que el uso de la acetona como cosolvente y estabilizante quedó descartado. La formación de emulsiones sin acetona no mostró un comportamiento constante, ya que en algunos casos la emulsión se obtenía y en otros se formaba la película blanquecina. A pesar de que las condiciones de sonicación (nivel de agua, diámetro de los tubos, profundidad del tubo en el agua, posición del tubo en el tanque y tiempo de sonicación) fueron controladas de la mejor manera posible, no se observó un comportamiento uniforme.

Se tomó un tubo con una de las emulsiones no formadas que no contenían acetona y el líquido fue decantado a un tubo limpio. Se adicionaron 0.52% de ONPG en polvo tanto al líquido transferido al nuevo tubo como al residuo sólido que quedó adherido a las paredes del tubo original. El líquido permaneció incoloro, mientras que en

el residuo sólido se presentó aparición de color amarillo intenso. De todo lo anterior es posible concluir que el residuo blanquecino corresponde a la totalidad de la enzima.

5.2.1.6. PREPARACIÓN DE EMULSIÓN DE ONPG EN N-PENTADECANO

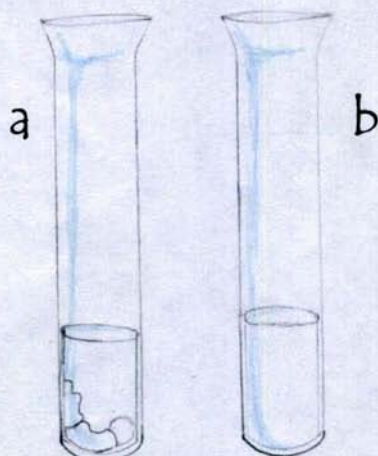
La adición de 0.52% de ONPG en polvo al medio trae como consecuencia el problema de formación de una pasta que se adhiere a las paredes del tubo y no logra incorporarse al n-pentadecano, como se ilustra en la figura 15a.

Para solucionar el problema se adicionaron al tubo con la pasta 0.1mL de dimetil sulfóxido (DMSO), sabiendo que otros sustratos sintéticos de la lactasa con estructura similar al ONPG² presentan la propiedad de ser solubles en este compuesto. Al adicionar 0.1mL de DMSO al tubo que contenía la pasta adherida a las paredes, se encontró que dicha pasta desaparecía completamente, lo cual se puede observar en la figura 15b.

Al mezclar la emulsión de ONPG con una de las emulsiones de enzima que sí se formaron en la sección 5.2.1.5. se presentó separación de fases, siendo evidente la aparición de color amarillo intenso en la fase inferior, correspondiente al DMSO con agua, tal como se muestra en la figura 16.

² Green- β -D-Gal (*N*-meilindolil- β -D-galactopiranosido), Purple- β -D-Gal (5-yodo-3-indolil- β -D-galactopiranosido), Red- β -D-Gal (5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido)

FIGURA 15. Preparación de emulsión de ONPG en n-pentadecano



- a. Pasta de ONPG y agua formada en n-pentadecano
b. Al adicionar DMSO al medio la pasta desaparece, pues el ONPG se disuelve por completo.

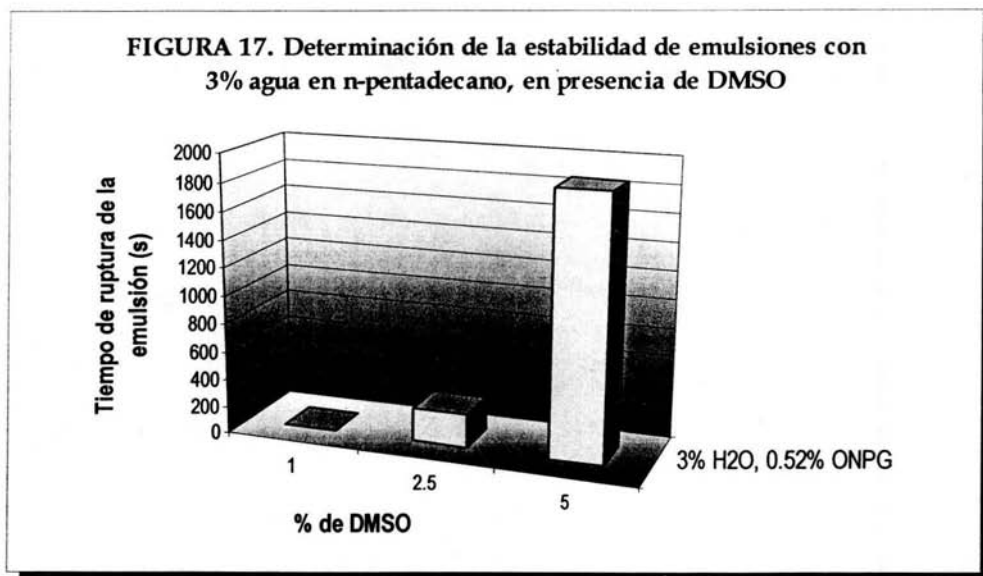
FIGURA 16. Determinación cualitativa de la actividad enzimática en n-pentadecano con 5% de DMSO



0.5% de enzima + 3% de agua + 0.52% de ONPG
+ 5% de DMSO

5.2.1.6.1. Determinación de la estabilidad de emulsiones de 3% de agua en n-pentadecano con 0.52% ONPG a distintas concentraciones de DMSO

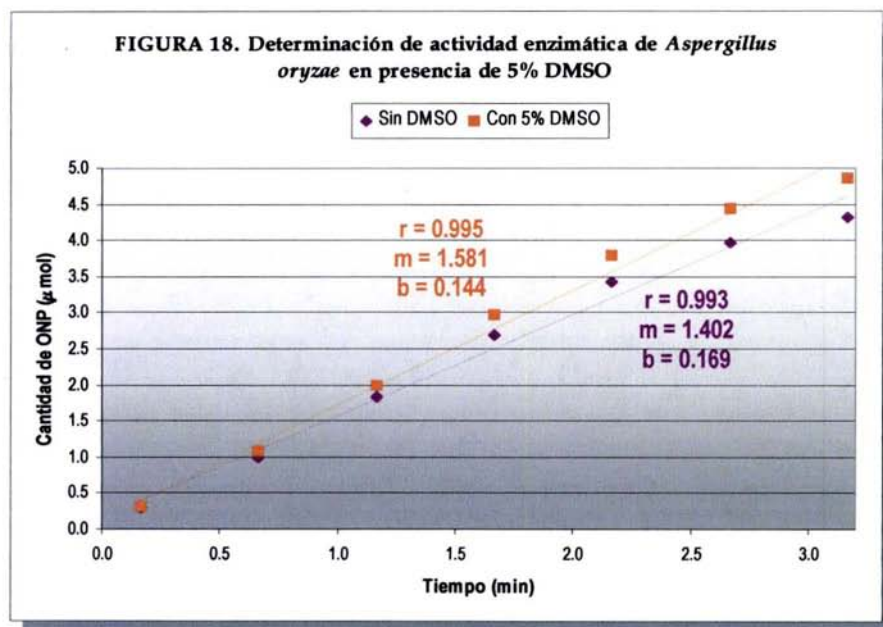
Como la emulsión se desestabiliza con una concentración tan alta de DMSO, se realizaron pruebas de determinación del tiempo de ruptura de emulsión a distintas concentraciones de DMSO, con la finalidad de encontrar la mínima cantidad de DMSO que disolviera 5.2mg de ONPG sin desestabilizar la emulsión. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17. En todos los casos el ONPG se disolvió completamente.



Como se observa en la figura 17, la emulsión más estable fue aquella con 5% de DMSO. Se pensó que con una emulsión que permanecía estable durante más de 30 minutos, y que a la vez contenía al sustrato totalmente disuelto, sería posible obtener películas homogéneas de n-pentadecano para así obtener el sistema deseado.

5.2.1.6.2. Determinación de la actividad enzimática en presencia de 5% DMSO

Con la finalidad de saber si la presencia de DMSO afectaba la actividad de la enzima, se realizó la determinación cuantitativa de dicha actividad. Los resultados obtenidos de esta determinación se muestran en la figura 18. El coeficiente de correlación "r" obtenido en ambos casos indica que los datos corresponden a la porción lineal de la curva de cinética enzimática, por lo que la pendiente obtenida de la regresión lineal equivale a la velocidad inicial.



La tendencia lineal de los datos puede apreciarse si se observa la figura 18. Bajo las condiciones estudiadas, la velocidad inicial de la enzima experimentó un aumento de 11.32% cuando se encontraba en presencia de DMSO. Por lo anterior, se pensaba que el DMSO podía ser utilizado como cosolvente y estabilizante de la emulsión de ONPG en el n-pentadecano. Sin embargo, era necesario conocer el efecto del DMSO en el sistema enzimático (ver sec. 5.2.1.7.).

5.2.1.7. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO

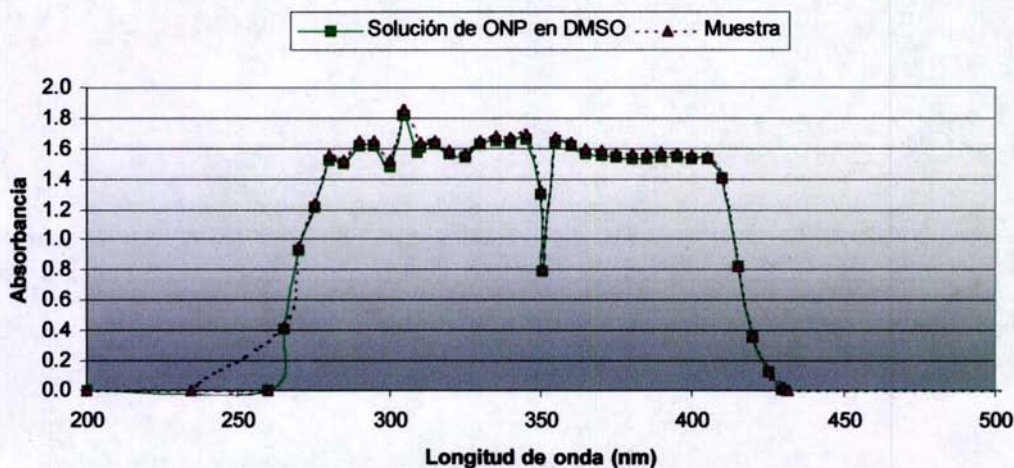
Cuando se prepararon las emulsiones de ONPG con DMSO, se observó un comportamiento similar al de las emulsiones de enzima (sec. 5.2.1.5.), es decir, las emulsiones no siempre se formaban. El sistema enzimático fue construido con una de las emulsiones de ONPG formadas. Cuando el sistema, construido a temperatura de refrigeración, fue expuesto a temperatura ambiente, no se presentó coloración amarilla correspondiente a la formación de ONP. Con el fin de minimizar las fuentes de variación en la preparación de las emulsiones de ONPG se intentó preparar una solución inicial de DMSO (1,250 μ L), agua (750 μ L) y ONPG (130mg). Se pensaba que al sonicar esta mezcla se obtendría una solución completamente homogénea a partir de la cual se tomarían alícuotas para formar emulsiones con n-pentadecano. Sin embargo, al comenzar con la preparación de esta solución se descubrió un hecho importante: la mezcla DMSO-agua, totalmente incolora, se transformó en una solución amarillo intenso al adicionar el ONPG, como se muestra en la figura 19.



Para determinar si el color amarillo se debía a la presencia de ONP en la solución se corrieron los espectros de UV-visible para una solución de ONP en DMSO y para la muestra (que es la mezcla DMSO-agua-ONPG).

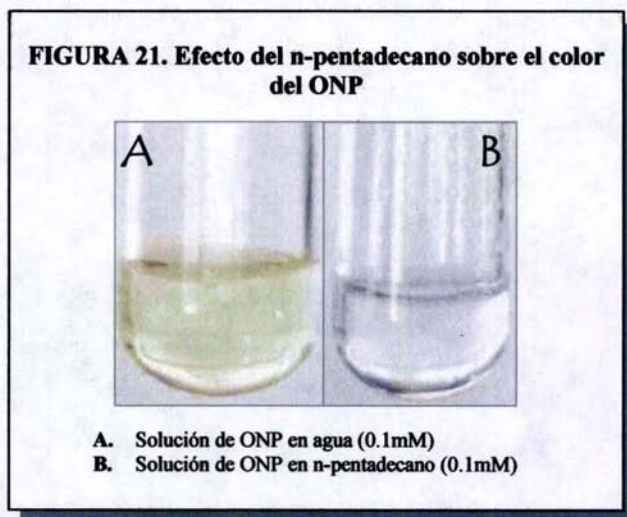
Los espectros obtenidos se muestran en la figura 20. Los resultados muestran que el ONP disuelto en DMSO presenta el mismo espectro que la sustancia muestra, lo cual indica que ésta corresponde a ONP (ONPG hidrolizado). Por lo tanto, de alguna manera está ocurriendo una hidrólisis del ONPG presente al adicionar DMSO y agua. Por todo lo anterior se concluye que el DMSO no puede ser utilizado junto con el ONPG; si el ONPG sufre hidrólisis, al no haber ONPG disponible, cuando se monta el sistema completo con la enzima ya no se registrará aumento en la intensidad del color. Además, al adicionar n-pentadecano a la mezcla DMSO-agua-ONPG en la proporción requerida, se observó la desaparición del color amarillo. Debido a este fenómeno de enmascaramiento del color por la presencia de n-pentadecano, la hidrólisis del ONPG por el DMSO no había sido notada en ensayos anteriores.

FIGURA 20. Espectro UV-visible para el ONP



5.2.1.8. EFECTO DEL N-PENTADECANO SOBRE LA ESTABILIDAD DEL COLOR DEL ONP

En muchos de los ensayos anteriores se observó un fenómeno de suma importancia para la presente investigación: el n-pentadecano enmascara el color amarillo correspondiente a la presencia de ONP. Desde que se realizó el ensayo cualitativo de actividad enzimática en n-pentadecano (sec. 5.2.1.4.) no se percibió el color del ONP: fue necesario utilizar una concentración muy elevada de ONPG (0.52%) para que el color obtenido al final de la reacción fuera perceptible. La hidrólisis del ONPG por el DMSO no fue detectada al adicionar DMSO a la mezcla ONPG-agua-n-pentadecano (sec. 5.2.1.6.) ni al determinar la estabilidad de emulsiones agua – DMSO en n-pentadecano con ONPG (sec. 5.2.1.6.1.). Dicha hidrólisis únicamente fue detectada cuando se preparó una mezcla de DMSO, agua y ONPG (sec. 5.2.1.7.) porque sólo entonces se percibió el color amarillo. De hecho, cuando dicha mezcla fue adicionada con n-pentadecano el color amarillo desapareció. Por todo lo anterior se realizó este ensayo, en el que se deseaba demostrar que el color amarillo desaparecía al adicionar n-pentadecano. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21.



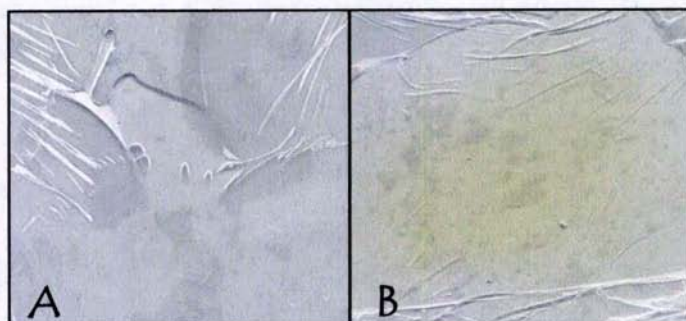
Como se observa en la figura 21, cuando el ONP se encuentra en agua el color amarillo es perfectamente perceptible. En cambio, cuando se encuentra en n-pentadecano, el color desaparece completamente. Por esa razón el producto de la reacción enzimática (y de la hidrólisis química del ONPG) no era perceptible cuando se pretendía usar n-pentadecano como soporte.

5.2.2. USO DE POLIACRILAMIDA COMO SOPORTE

Como no se pudieron obtener emulsiones estables de enzima y ONPG en n-pentadecano que al ser mezcladas dieran lugar a la formación del producto amarillo, se descartó la posibilidad de usar esta parafina como soporte. Había llegado el momento de probar un nuevo material de soporte, y se eligió la poliacrilamida. El primer paso fue jugar con las condiciones de preparación de los geles de poliacrilamida de manera que se encontraran las óptimas.

El gel S₁ (5% de poliacrilamida con ONPG 0.034M) presentó coloración amarilla debida a la hidrólisis del ONPG durante el proceso de mezclado y disolución. El ONPG es sensible a la luz y a las temperaturas elevadas, por lo que el largo proceso de disolución del sustrato en la solución amortiguadora y de polimerización de la acrilamida a temperatura ambiente trajo como resultado la hidrólisis fototérmica del sustrato y la consiguiente aparición de color amarillo. Además, la polimerización de la acrilamida nunca se llevó a cabo. Por esa razón se construyó el gel S₁' con ONPG a la mitad de la concentración original (0.017M en lugar de 0.034M). Además, el ONPG se mantuvo en baño de hielo durante la disolución completa en la solución amortiguadora, y el sistema de placas fue protegido de la luz durante la polimerización de la acrilamida, con lo que se evitó en gran parte la hidrólisis del ONPG. Sin embargo, el gel de ONPG obtenido fue muy poco rígido, lo que trajo consigo problemas en la manipulación. Por el contrario, el gel de enzima (gel E₁) no presentó problemas de polimerización. El control negativo y el control positivo realizados con los geles de enzima y de ONPG obtenidos (geles E₁ y S₁') se muestran en la figura 22.

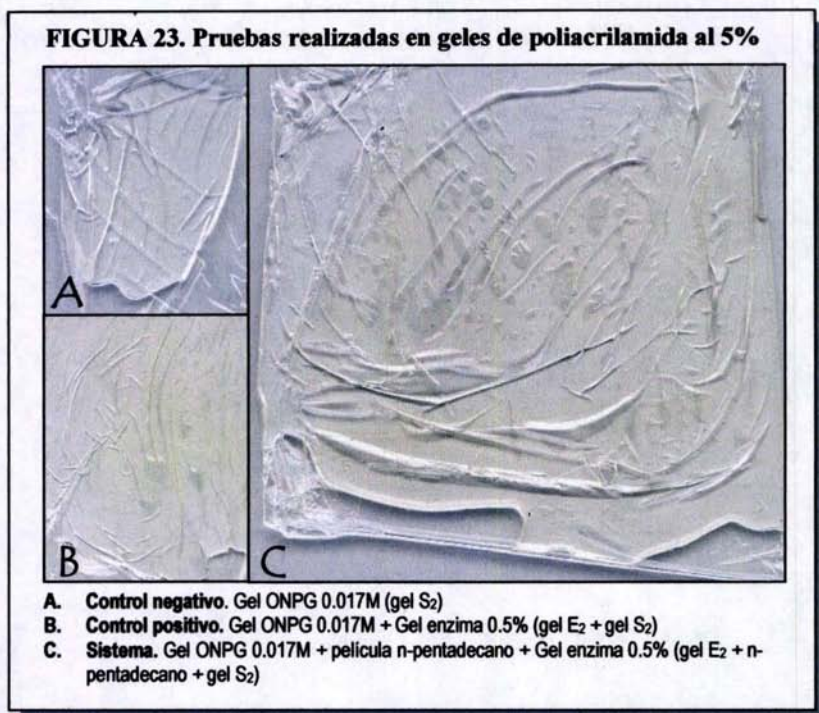
FIGURA 22. Pruebas realizadas en gels de poliacrilamida al 5%



- A. Control negativo.** Gel ONPG 0.017M (gel S₁)
B. Control positivo. Gel ONPG 0.017M + Gel enzima 0.5% (gel E₁ + gel S₁)
Ambos gels elaborados con 25μL persulfato de amonio 10% y 2.5μL TEMED

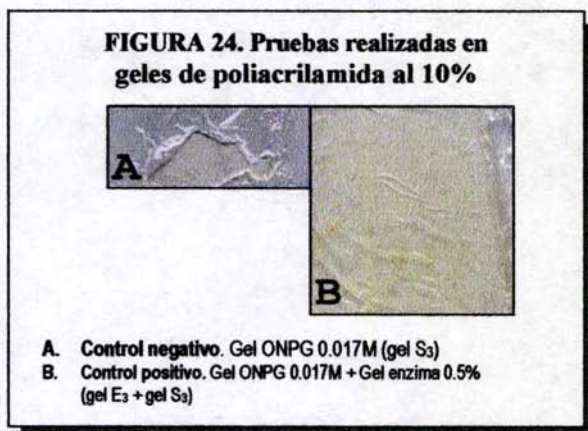
La ausencia de color en el control negativo muestra que no ocurrió una hidrólisis significativa del ONPG al mantenerlo a baja temperatura y protegido de la luz durante el proceso de fabricación del gel. La aparición del color amarillo en el control positivo se registró a los 2 minutos de contacto entre los gels. En el caso del sistema completo, pasaron 20 minutos de exposición a temperatura ambiente sin que se presentara indicio alguno de color amarillo, aún cuando la película aislante de n-pentadecano fundió. El control positivo fue realizado inmediatamente después de la elaboración de los gels, pero el sistema completo fue construido después de haber mantenido el gel de ONPG unas horas en solución amortiguadora (lo cual es necesario para evitar la desecación del gel). La poca o nula rigidez del gel provocó que el sustrato migrara a la solución amortiguadora. Por lo tanto, al ser muy baja la cantidad de ONPG retenido en el gel, en el sistema completo no se produjo ONP en cantidad suficiente para que el color fuera evidente. La poca rigidez y la gran dificultad para manipular el gel de ONPG llevó a la construcción de nuevos gels de enzima (E₂) y sustrato (S₂) aumentando la concentración de los agentes polimerizantes (50μL de persulfato de amonio al 10% y 5μL de TEMED) y aumentando el espesor del

gel a 0.075cm. El control negativo, el control positivo y el sistema obtenidos con estos nuevos geles se muestran en la figura 23.



La coloración amarilla en el control negativo es muy tenue debido a la poca hidrólisis del ONPG llevada a cabo durante la elaboración del gel. El color amarillo que se observa en el control positivo de la figura 23B aparece de forma instantánea después del contacto entre los geles. En el caso del sistema completo, que fue fabricado a temperatura de refrigeración, se observó la aparición del color amarillo que muestra la figura 23C después de 5 minutos a temperatura ambiente. En todos los casos el color amarillo desapareció a las 24 horas después de haber sido producido. Probablemente esto se debía a que la baja concentración de poliacrilamida en el gel no permitía retener al producto de la reacción, por lo que se prepararon nuevos geles al 10% de poliacrilamida tanto de enzima (gel E₃) como de sustrato (gel S₃). El gel S₃ presentaba mayor rigidez que los anteriores y, por lo tanto,

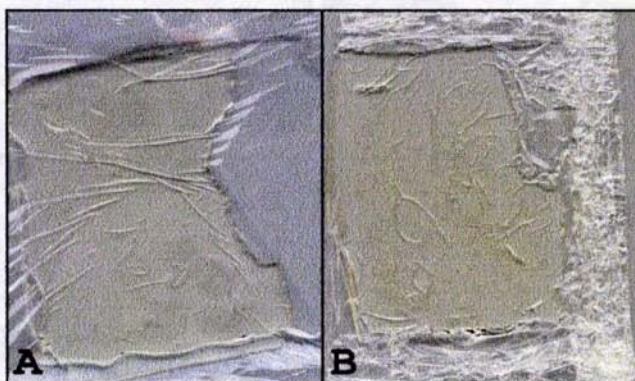
era más manipulable. Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas con estos geles se muestran en la figura 24. El control negativo presentó coloración amarillo muy tenue, igual que en las pruebas anteriores. El control positivo presentó la coloración amarilla inmediatamente después del contacto entre los geles, con una intensidad superior a la de las pruebas anteriores, como se observa en la figura 24B. Esto pone de manifiesto el hecho de que al aumentar la concentración de poliacrilamida en el gel se reduce el tamaño de poro y es mayor la retención tanto del sustrato ONPG como del producto ONP. En el caso del sistema completo construido con los geles al 10%, se presentó aparición de color amarillo muy tenue a los 7.42 minutos de exposición a temperatura ambiente.



Las pruebas anteriores fueron repetidas utilizando los geles E₃ y S₃ después de 20 horas de haber sido preparados, obteniéndose los resultados que se presentan en la figura 25. El color que presentó el control positivo se obtuvo a los 3 minutos de contacto entre los geles; la aparición del color tardó más que en los geles nuevos debido al ligero aumento de la hidrólisis del ONPG con el tiempo y a la creciente fuga del mismo en la solución amortiguadora donde se guardaba el gel. Ambos fenómenos condujeron a la disminución del ONPG disponible para que se llevara a cabo la reacción enzimática. Lo mismo sucedió en el caso del sistema completo, donde la aparición del color amarillo sucedió a los 8 minutos de exposición a temperatura ambiente. Tanto en los

geles al 10% nuevos, como en los que llevaban 20 horas desde su preparación, el color amarillo producido desapareció a las 24 horas a temperatura de refrigeración.

FIGURA 25. Pruebas realizadas en geles de poliacrilamida al 10% con 20 horas de haber sido preparados



- A. **Control positivo.** Gel ONPG 0.017M + Gel enzima 0.5% (gel E₃ + gel S₃)
B. **Sistema.** Gel ONPG 0.017M + n-pentadecano + Gel enzima 0.5% (gel E₃ + n-pentadecano + gel S₃)

Con el fin de obtener una coloración más intensa, se aumentó la concentración de sustrato al doble, pero fue necesario aumentar también la concentración de poliacrilamida a 15% para que fuera posible la formación del gel (gel S₃'). El control negativo así elaborado presentó una coloración muy tenue, prueba del control estricto llevado a cabo durante el proceso. En el control positivo construido con los geles S₃' (ONPG 0.034M) y E₃ (enzima al 0.5%) se obtuvo aparición de color amarillo a los 2 minutos de contacto. Sin embargo, a las 24 horas de refrigeración dicho color desapareció completamente. El sistema completo elaborado con los geles mencionados presentó color amarillo a los 4 minutos de exposición a temperatura ambiente; el color producido en este caso tampoco fue estable más de 24 horas. La desaparición del ONP se debe a que este compuesto presenta la

particularidad de ser arrastrado por el vapor de agua³ y puesto que la forma del sistema supone una gran superficie, la cantidad de agua que se evaporaba llevaba consigo una gran cantidad de ONP, a tal grado que el color amarillo ya no era perceptible en la película y es por eso que este sistema no puede ser considerado adecuado para ser utilizado como CTI.

5.2.3. USO DE GRENETINA COMO SOPORTE

5.2.3.1. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE TRANSICIÓN DE GEL A LÍQUIDO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GRENETINA (PARTE 1)

Los resultados obtenidos de la determinación del tiempo de transición de gel a líquido a las distintas concentraciones ensayadas se muestran en la tabla 7. Los datos que se muestran en dicha tabla corresponden al promedio de las tres determinaciones realizadas en cada caso.

TABLA 7. Determinación del tiempo de transición de gel a líquido en función de la concentración de grenetina			
Tubo	Concentración de grenetina (%)	Tiempo de gelificación (min)	Tiempo de transición gel-líquido (min)
1	1	56.20	3.29
2	2	17.85	30.17
3	3	11.31	>60
4	4	7.97	>60
5	5	6.83	>60

El gel correspondiente a la concentración de 1% de grenetina presentó muy poca rigidez. El gel era tan blando que aún después de 1 hora a temperatura de refrigeración hubo movimiento en la superficie del medio. A partir de la concentración de 3% de grenetina los geles formados resistieron más de 1 hora a temperatura ambiente sin

³ Nota sobre información tecnológica publicada por la Agencia para Sustancia Tóxicas y Registro de Enfermedades (Servicio de Salud Pública de EUA) en julio de 1992.

romperse, presentando alta rigidez y maleabilidad. El gel correspondiente a una concentración de grenetina de 2% permanece en forma de gel 30.17 minutos a temperatura ambiente, además de ser un gel rígido y maleable. Por todo lo anterior se deduce que las concentraciones de 2, 3, 4 y 5% de grenetina pueden ser usadas en la construcción de geles maleables para la formación del sistema enzimático deseado.

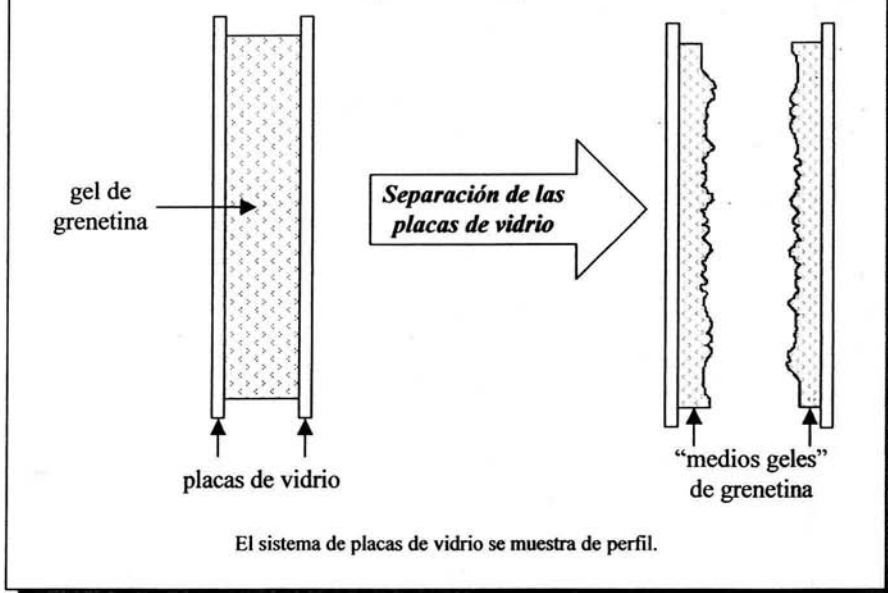
5.2.3.2. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO EN GRENETINA

5.2.3.2.1. En sistemas abiertos

Con las concentraciones de grenetina ensayadas en el punto anterior se realizó un ensayo con el fin de evaluar cualitativamente la actividad enzimática en el nuevo material de soporte. La primera concentración ensayada fue la correspondiente a 2% de grenetina. Cuando la segunda fase (sustrato) fue vertida a temperatura de refrigeración sobre el gel de la enzima, se observó de manera instantánea la aparición de coloración amarilla en la interfase. Al colocar el tubo a temperatura ambiente la intensidad del color fue aumentando a través del tiempo, hasta obtener color amarillo intenso en todo el medio a los 15 minutos. Una vez obtenido el color amarillo intenso, el tubo sellado con parafilm fue mantenido a temperatura de refrigeración para evaluar la intensidad del producto obtenido. El color permaneció estable por más de 21 días bajo las condiciones mencionadas. Por todo lo anterior puede afirmarse que la enzima presenta actividad en el soporte empleado.

Como se obtuvieron resultados exitosos en gel de grenetina al 2%, se construyeron películas por el método de placas de vidrio (sec.4.2.1.3.2.) con el nuevo material de soporte y se elaboró con ellas un control positivo. Una vez que los geles se formaron dentro del sistema de placas a temperatura de refrigeración, se encontró que al ejercer la fuerza necesaria para separar las placas de vidrio y extraer el gel, una parte de éste quedó adherida a uno de los vidrios y la otra parte al segundo vidrio, de forma que quedaron dos geles con aproximadamente la mitad del espesor original cada uno, como se muestra en la figura 26.

FIGURA 26. Ruptura del gel de grenetina en el sistema de placas de vidrio
(sec. 3.2.1.3.2.)



El control positivo elaborado con los "medios geles" a temperatura de refrigeración presentó aparición de color amarillo intenso a los 3 minutos de contacto.

Pensando en aumentar la concentración de grenetina para obtener un gel más consistente y maleable se trabajó con grenetina al 3%. Pensando en la posibilidad de omitir el uso del n-pentadecano, se probó el uso de grenetina al 2% como aislante. El sistema fue construido en una caja Petri de manera que se pudieran obtener películas de aproximadamente 0.1cm de espesor sin tener que utilizar el sistema de placas que, como se observó en el punto anterior, no permitía la obtención de películas completas de grenetina. Después de que la tercera capa de grenetina (correspondiente al sustrato ONPG) fue vertida en la caja y mantenida a temperatura de refrigeración hasta su gelificación completa, el sistema ya presentaba una coloración ligeramente amarilla. Esto demuestra que la grenetina al 2%, bajo las condiciones utilizadas, no funciona como un aislante eficaz que permita evitar el contacto entre la enzima y el sustrato a temperatura de refrigeración: la grenetina a esa

concentración permite en cierto grado la difusión del sustrato debido a su alto contenido de agua. De esta manera, el sustrato encuentra el sitio activo de la enzima y se lleva a cabo la reacción aún a temperatura de refrigeración. Cuando la caja fue colocada a temperatura ambiente, a los 5 minutos se presentó la aparición de color amarillo intenso acompañado del olor característico del producto de la reacción. La caja con el producto obtenido fue almacenada a temperatura de refrigeración para evaluar la estabilidad del color. La intensidad del color disminuyó a través del tiempo, hasta que a los 20 días el sistema era incoloro.

Con el fin de disminuir en lo posible la difusión del sustrato hacia la enzima, la concentración de la gretina en el gel de enzima fue aumentada. No se aumentó la concentración en el gel de sustrato debido a que la gretina a mayor concentración requiere ser mantenida a una temperatura más elevada (más de 30°C) para mantenerse líquida y el ONPG sufre hidrólisis a dicha temperatura. Además se aumentó el espesor de la capa aislante de gretina al 2%. La caja Petri de 5cm de diámetro fue cambiada por una caja de cartón recubierta con plástico adherente para disminuir el tamaño del sistema y con ello la cantidad de material requerido. Después de verter en el sistema la última capa de gretina (correspondiente al ONPG) a temperatura de refrigeración, pasaron 16 minutos y el sistema presentó solamente pequeñas zonas amarillas. Eso significa que se logró disminuir en gran medida el grado de difusión del sustrato hacia la enzima, pero no lo suficiente para evitar la reacción antes de exponer el sistema a temperatura ambiente. Por lo tanto, el gel de gretina al 2% no puede ser utilizado como aislante del sistema aunque se aumente la concentración del gel de enzima.

Cuando el sistema completo fue colocado a temperatura ambiente, se observó aparición de color amarillo evidente a los 5 minutos, aún cuando el medio se mantuvo sólido. Después de 20 minutos de exposición a temperatura ambiente, el color que presentaba el sistema era amarillo intenso. Sin embargo, cuando el sistema fue colocado a temperatura de refrigeración después de una hora de haber sido mantenido a temperatura ambiente con el fin de evaluar la estabilidad del color producido, a las 24 horas el color se perdió completamente. En el sistema con la enzima disuelta en gretina al 5% el comportamiento fue exactamente el mismo.

Como en los ensayos anteriores y en los de la sección 5.2.2. se perdía el color obtenido, se efectuó un experimento con la finalidad de determinar si la hermeticidad de los sistemas de grenetina (sellado) o el nivel de llenado de los mismos (llenado) afectaban de alguna manera la estabilidad del color amarillo característico del producto de la reacción. Para ello, en cajas Petri de vidrio de 5cm de diámetro, con capacidad para 20mL, se prepararon mezclas de grenetina al 2% y ONP 0.393 mg/mL. Cada caja recibió un tratamiento distinto de acuerdo con lo que se muestra en la tabla 8. En los casos en que las cajas fueron selladas, dicho sellado se hizo con parafilm. En todos los casos las cajas fueron mantenidas a temperatura de refrigeración durante el tiempo que duró el experimento.

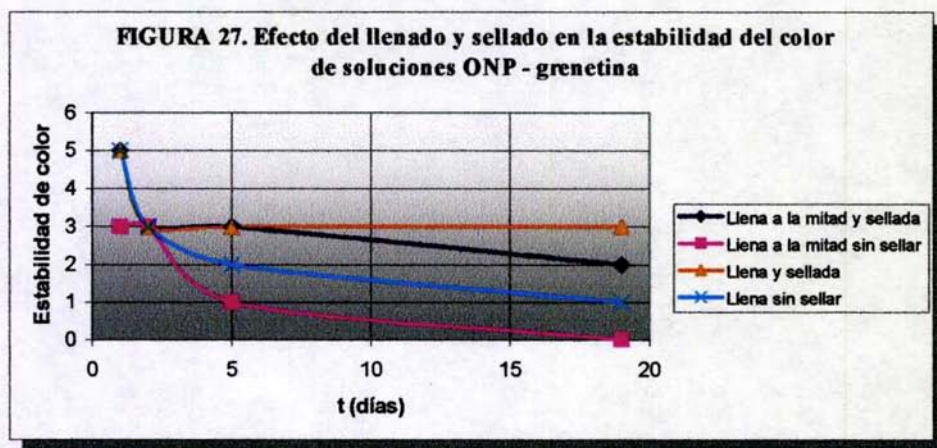
TABLA 8. Tratamientos a los que fueron sometidos diversos sistemas de grenetina al 2% y ONP 0.393 mg/mL				
No. de caja	1	2	3	4
Tratamiento	Llena a la mitad y sellada	Llena a la mitad sin sellar	Llena y sellada	Llena sin sellar

Posteriormente se evaluó la estabilidad del color en función del tiempo de acuerdo con la siguiente escala:

- 0 = Ausencia de color
- 1 = Vagamente perceptible
- 2 = Poco intenso
- 3 = Intensidad regular
- 4 = Intenso
- 5 = Muy intenso

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27. En dicha figura se observa que el color se pierde más rápidamente cuando la caja se encuentra llena hasta la mitad y no se encuentra sellada. El ONP tiene la propiedad de ser muy soluble en el vapor de agua, de manera que si el sistema no se encuentra sellado ocurren fugas de agua en forma gaseosa, arrastrando al compuesto colorido. Además, cuando la caja se encuentra llena a la mitad, al ser mayor el espacio de cabeza es mayor la cantidad de aire (y por ende de vapor de agua) contenido en la caja, por lo que el ONP es arrastrado en mayor cantidad que si la caja se encuentra

completamente llena. Como el sellado se realizó con parafilm no se logró la hermeticidad completa, y las pequeñas fugas que se presentaron favorecieron la pérdida del compuesto. Obviamente, lo contrario ocurre cuando el sistema se encuentra sellado (pues no hay fugas de ninguna clase) y completamente lleno (el espacio de cabeza es menor). Debido al fenómeno de arrastre del ONP con el vapor de agua, la estabilidad del color en los sistemas en película era tan baja, pues en forma de película es mucho mayor la superficie de contacto entre el aire y el medio. Al aumentar la superficie de contacto, aumenta la cantidad de ONP que se pierde y con ello la velocidad de pérdida del color. Por lo tanto, al trabajar con ONPG como sustrato el sistema enzimático no puede ser construido en forma de película debido a que el producto de la reacción (ONP) no es estable bajo esas condiciones.



5.2.3.2.2. EN SISTEMAS SELLADOS

En la sección anterior (5.2.3.2.1.) se llegó a la conclusión de que la estabilidad del ONP es mayor en los sistemas que se encuentran perfectamente sellados y de que no es posible trabajar en película. Por lo tanto, en esta sección se probaron diversos sistemas sellados para la construcción del sistema enzimático.

a) EN CAJAS PETRI

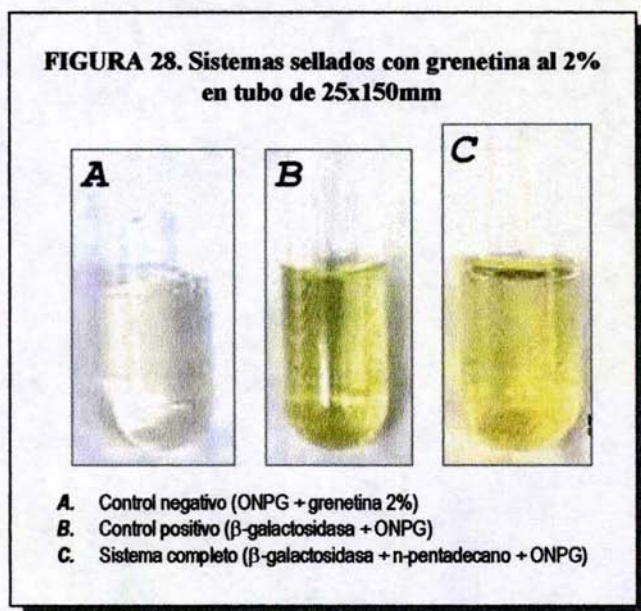
El control positivo dio color al contacto entre las fases y al cabo de 15 minutos la distribución del color en el medio era homogénea. El color se mantuvo estable durante más de 19 días a temperatura de refrigeración. El control negativo se mantuvo incoloro el tiempo que duró el experimento. El sistema completo presentó una coloración amarillo tenue aún a temperatura de refrigeración, debido a que la capa intermedia de n-pentadecano presentaba algunas fugas. Al exponer el sistema a temperatura ambiente, el n-pentadecano se fundió y las capas de enzima y de sustrato entraron en contacto, produciéndose color amarillo intenso al cabo de 3 minutos. Dicho color fue intenso en todo el sistema, pero se encontraba distribuido en el medio de una manera heterogénea debido a que algunas burbujas de n-pentadecano no lograron salir a la superficie. Después de 5 días a temperatura de refrigeración el color amarillo mantuvo su intensidad y su distribución en el medio era homogénea. Después de 18 días el color aun mantenía su intensidad. Por todo lo anterior se concluye que el sistema sellado en caja Petri permite que el color permanezca estable durante un tiempo prolongado debido a que es sencillo realizar un sellado eficiente. Sin embargo, al ser tan grande la superficie de contacto entre las capas de enzima y sustrato es muy difícil aislarlas completamente mediante una simple barrera de n-pentadecano, por lo que no es posible conseguir que el sistema se mantenga incoloro por mucho tiempo a temperatura de refrigeración.

b) EN TUBOS DE 25x150MM

Con el fin de minimizar la probabilidad de fugas se propuso este sistema en el que la superficie de contacto enzima-sustrato fuera menor. Los resultados obtenidos en los tubos de 25x150mm se muestran en la figura 28. El comportamiento del control positivo fue similar al de la caja Petri, con la diferencia de que por la longitud de la columna de grenetina el color amarillo tardó más en distribuirse por todo el medio; en el caso particular de este

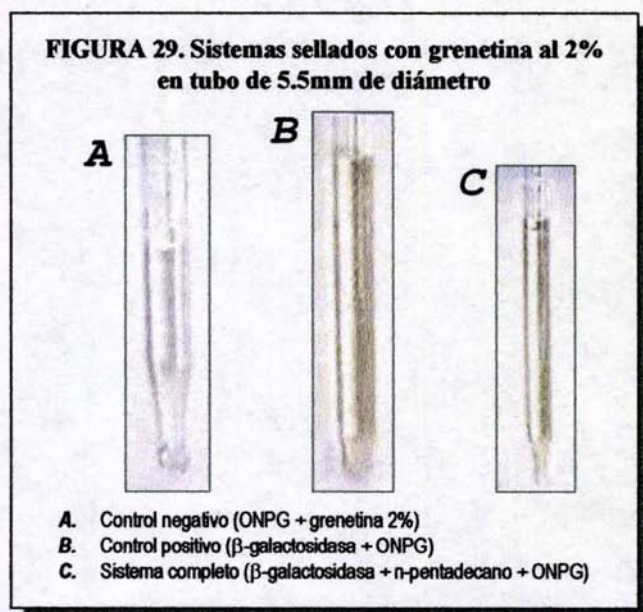
experimento tardó 24 horas, aunque desde los 3.83 minutos apareció una coloración amarillo intenso en la interfase. El control negativo se mantuvo incoloro por 20 días.

En el sistema completo se apreció que parte del n-pentadecano fue desplazado al adicionar la solución de enzima. El sistema se mantuvo incoloro por algún tiempo, pero a las 20 horas se observó una coloración amarillo tenue en la interfase ONPG-n-pentadecano, lo cual es indicativo de la existencia de fugas. Por otra parte, la fase superior, que corresponde a la enzima, nunca gelificó. Al exponerse a temperatura ambiente, el n-pentadecano tardó 10 minutos en subir a la superficie y el color amarillo se intensificó por todo el medio a los 41 minutos. En la figura 28C se observa una capa en la superficie del medio en el tubo que corresponde al n-pentadecano. En todos los casos el color se mantuvo estable por más de 20 días.



c) EN TUBOS DE 5.5MM DE DIÁMETRO

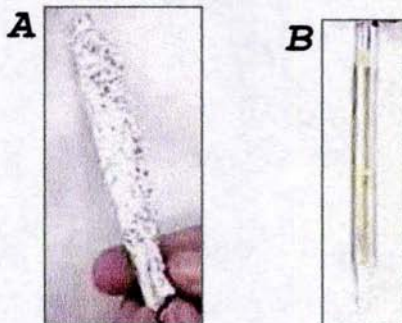
Este sistema se propuso con el fin de reducir al mínimo las fugas en el sistema, darle una imagen mas estética y a la vez ahorrar materias primas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 29. El control positivo presentó una coloración amarillo intenso en la interfase al entrar en contacto las fases. Al cabo de 5.92 minutos el color estaba distribuido homogéneamente por todo el medio. A los 5 días el color se mantuvo estable. El control negativo se mantuvo incoloro los 5 días que duró el experimento.



En cuanto al sistema completo, se mantuvo 3 días en refrigeración protegido de la luz, como se observa en la figura 30A. Sin embargo, al extraer el sistema del refrigerador se observó una ligera coloración amarillo tenue indicativa de la presencia de fugas, lo cual se aprecia en la figura 30B. En dicha figura se pueden observar perfectamente las tres fases del sistema: la superior de enzima, la intermedia de n-pentadecano y la inferior de ONPG. A temperatura ambiente se observó la fusión del n-pentadecano a los 3 minutos de exposición, mientras

que a los 5 minutos se formó una gran miscela en el centro del sistema. A los 23 minutos la miscela de n-pentadecano llegó a la superficie del sistema, en el minuto 35 la interfase presentó una coloración amarillo intenso y a los 40 minutos el color ya estaba distribuido por todo el medio. El color se mantuvo estable los 5 días que duró el experimento. En la figura 29C se observa la fase superior correspondiente al n-pentadecano.

FIGURA 30. Sistema completo en tubo de 5.5mm de diámetro a temperatura de refrigeración



- A.** Forma de conservación del sistema completo en refrigeración
B. Sistema completo recién expuesto a temperatura ambiente

En el sistema inclinado se presentó el mismo problema de las fugas y del tiempo largo para que se diera la reacción. El tiempo al cual todo el sistema alcanzó una coloración amarillo intenso (35 minutos) fue ligeramente menor que en el sistema vertical y podría ser adecuado para algunas aplicaciones, aunque sigue siendo demasiado largo para fines de la presente investigación.

5.2.3.3. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE TRANSICIÓN DE GEL A LÍQUIDO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GRENETINA (PARTE 2)

Este experimento ya se había realizado con anterioridad, pero con concentraciones de grenetina de 1, 2, 3, 4 y 5% (sec. 5.2.3.1.). En dicho experimento se encontró que el gel de grenetina al 1% presentaba una consistencia muy blanda y que el gel al 2% tardaba más de media hora a temperatura ambiente para fundirse. Con el fin de aumentar la velocidad de difusión de la enzima y el sustrato se repitió el experimento, pero esta vez buscando una concentración de grenetina menor a la que se estaba utilizando (2%) y que al mismo tiempo cumpliera con las condiciones de gelificar con facilidad, producir un gel rígido y fundir en menos de 15 minutos fuera del refrigerador. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 9. Los datos que se presentan en dicha tabla corresponden al promedio de las tres determinaciones realizadas para cada caso.

Tubo	Concentración de grenetina (%)	Tiempo de gelificación (min)	Tiempo de transición gel-líquido (min)
1	1.2	26.48	7.50
2	1.3	22.00	8.41
3	1.4	20.97	12.72
4	1.6	16.62	17.65
5	1.8	13.40	21.47

La concentración elegida fue 1.3% en primer lugar por el corto tiempo de fusión pero sobre todo por la consistencia de los geles que forma, ya que el gel de 1.2% a pesar de tener un tiempo menor de fusión tiende a formar geles demasiado blandos.

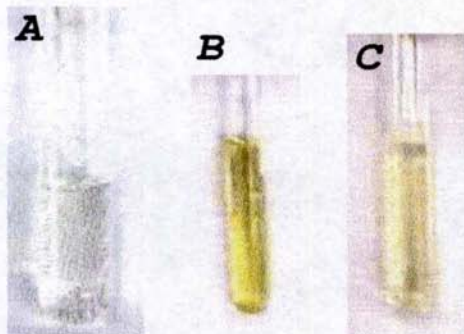
5.2.3.4. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO EN GEL DE GRENETINA AL 1.3%

Una vez que se determinó la concentración óptima de grenetina que permitiera obtener un gel rígido con el menor tiempo de transición de gel a líquido a temperatura ambiente, se construyeron sistemas enzimáticos utilizando la concentración encontrada, esperando aumentar el grado de difusión de la enzima y el sustrato y con ello disminuir el tiempo de reacción.

5.2.3.4.1. Con *n*-pentadecano como aislante

Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura 31. El control positivo, elaborado en tubo de ensayo de 8 x 75mm, presentó una coloración amarillo tenue a los 8 minutos de contacto a temperatura de refrigeración. Cuando fue expuesto a temperatura ambiente, el medio fundió a los 3.75 minutos y la producción de color intenso fue instantánea. Por otro lado, el sistema completo presentó fugas y adquirió una coloración amarillo tenue en refrigeración. El sistema inclinado presentó el mismo comportamiento.

FIGURA 31. Sistemas sellados con grenetina al 1.3% en tubo de 8x75mm



- A.** Control negativo (ONPG + grenetina 2%)
- B.** Control positivo (β -galactosidasa + ONPG)
- C.** Sistema completo (β -galactosidasa + *n*-pentadecano + ONPG)

5.2.3.4.2. Con grenetina al 1.3% como aislante

Se montó un sistema como el descrito en la figura 1 pero usando grenetina como material de soporte y también como aislante. El sistema completo presentó coloración amarillo tenue a temperatura de refrigeración, lo cual indica que la grenetina a la concentración utilizada no sirve como aislante en el sistema, ya que permite que la difusión se lleve a cabo con facilidad. Otro aspecto que llama la atención es que la fase donde se encontraba la enzima nunca gelificó.

5.2.3.5. EFECTO DEL TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA PREPARACIÓN HASTA LA UTILIZACIÓN DE LA ENZIMA SOBRE LA GELIFICACIÓN DE LA SOLUCIÓN ENZIMA EN GRENETINA AL 1.3%

En el ensayo anterior (sec. 5.2.3.4.) así como en el caso de ensayos en tubo sellado (sec. 5.2.3.2.2.) se tuvo el problema de que la fase que contenía a la enzima nunca gelificó. Estos dos casos tienen en común que el tiempo que transcurrió entre la preparación de la solución y la utilización de la misma fue relativamente largo. Para determinar si el tiempo de utilización influye en la gelificación se recurrió a hacer este experimento, del que los resultados se muestran en la tabla 10. Todas las muestras fueron tomadas de una solución madre de grenetina al 1.3% conteniendo 0.5% de enzima.

Como se observa en la tabla 10, entre mayor fue el tiempo transcurrido entre la preparación de la solución de enzima en grenetina hasta su refrigeración, mayor fue el tiempo que tardó en gelificar. De hecho, cuando la solución fue mantenida solamente 10 minutos a temperatura ambiente, al someterla a refrigeración nunca se alcanzó a obtener un gel con la consistencia deseada. A partir de los 15 minutos a temperatura ambiente, al someter a refrigeración ya nunca se formó el gel. Este comportamiento es debido a que la enzima liofilizada fue extraída de un cultivo de *Aspergillus oryzae*, por lo que es muy probable que no se encuentre libre de proteasas. Al ser la grenetina una proteína, las proteasas presentes en la β -galactosidasa probablemente rompen ciertos

enlaces peptídicos y dañan su estructura, evitando que se forme el gel. Entre mayor tiempo es mantenida la solución a temperatura ambiente, mayor es el daño que sufre la estructura de la gretina, hasta que llega el momento en que es incapaz de formar una red tridimensional. Por lo tanto, se deduce que el tiempo máximo que una solución de enzima y gretina puede ser mantenida a temperatura ambiente es de 5 minutos. Si se mantiene bajo esas condiciones por más tiempo ya no se podrá efectuar la gelificación.

TABLA 10. Efecto del tiempo transcurrido desde la preparación hasta la refrigeración de soluciones de enzima en gretina al 1.3% sobre la gelificación

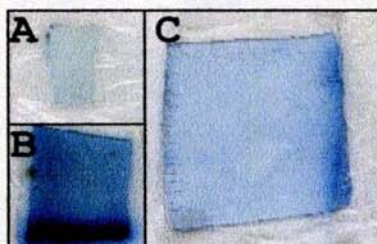
<i>Tubo</i>	<i>Tiempo de inicio de refrigeración T₀ (min)</i>	<i>Tiempo de gelificación T_G (min)</i>	<i>Consistencia del gel</i>
1	0.74	25.38	Rígido
2	5.00	27.43	Rígido
3	10.00	1440.00	Muy blando
4	15.00	>1440.00	Líquido
5	20.00	>1440.00	Líquido
6	35.00	>1440.00	Líquido

T₀ es el tiempo que la solución de enzima en gretina permanece a temperatura ambiente antes de ser sometida a refrigeración
T_G es el tiempo al cual el gel ya se ha formado completamente (ya no hay movimiento en la superficie)

5.3. Sistema enzimático β -galactosidasa-X-gal

Con el fin de obtener un color más evidente y una estabilidad mayor, se cambió el sustrato ONPG por X-Gal, el cual da lugar a la formación de un producto color índigo. El soporte utilizado fue poliacrilamida al 5% y el sistema se armó en películas, utilizando el método de las placas de vidrio que se describe en la sección 4.2.1.3.2. Los resultados obtenidos al realizar las pruebas con los geles de X-Gal 0.006M (gel S) y enzima 0.5% (gel E) se muestran en la figura 32.

FIGURA 32. Pruebas realizadas en geles de poliacrilamida al 10%



- A. Control negativo.** Gel X-Gal 0.006M (gel S)
B. Control positivo. Gel β -galactosidasa 0.5% + gel X-Gal 0.006M (gel E + gel S)
C. Sistema. Gel β -galactosidasa 0.5% + n-pentadecano + gel X-Gal 0.006M (gel E + n-pentadecano + gel S)

El control negativo mantuvo una coloración azul cielo durante mas de 25 días, sin sufrir modificaciones significativas durante este periodo de tiempo. Por otro lado, en el control positivo se apreció la aparición de color azul indigo y de un precipitado del mismo color a los 9 minutos de contacto. El tiempo de estabilidad del color de éste sistema es el mismo que el del control negativo. En el sistema completo se aprecia un color azul tenue a los 9 minutos de exposición a temperatura ambiente. Después de la obtención del color, el sistema se volvió a almacenar a temperatura de refrigeración. A las 24 horas se observó un aumento significativo en la intensidad del color, pasando del azul tenue inicial al color mostrado en la figura 32C. El color obtenido al final en el sistema completo se mantuvo estable más de 25 días a temperatura de refrigeración.

5.4. Sistema enzimático β -galactosidasa-lactosa-GOD-PAP

5.4.1. USO DE POLIACRILAMIDA COMO SOPORTE

En el ensayo de efectividad del sistema elaborado con los geles de enzima (E_1) y lactosa (S_1) después de la adición de la solución del sistema enzimático GOD-PAP se observó la aparición instantánea de un color rojo sepia en el gel de enzima y en el residuo de la solución empleada. El color aumentó su intensidad con el paso del tiempo. La aparición de este color es debida a que uno de los productos de reacción entre la lactasa y una molécula de lactosa, es una molécula de glucosa que al reaccionar con las enzimas del sistema GOD-PAP, produce la coloración rosa característica, que conforme transcurre la reacción aumenta su intensidad. Con el fin de evaluar la estabilidad del color el control positivo se colocó en refrigeración por 24 horas y el resultado de la evaluación fue la permanencia del color después del tiempo estipulado.

En el caso del control negativo se observó también una coloración rojiza. Esto se debe a la gran cantidad de glucosa que se encuentra presente en la lactosa.

Al momento de preparar el gel con la enzima y el sistema GOD-PAP (gel E_2) se apreció una ligera coloración rosa que desapareció al polimerizar la acrilamida. Cuando se llevó a cabo el control positivo entre los geles de enzimas (E_2) y de lactosa (S_2) pasaron 96 horas de contacto entre los geles sin que se observara aparición de color, por lo que fue necesaria la adición de 0.1 mL de solución GOD-PAP para corroborar la presencia de glucosa en el sistema; el resultado fue la presencia del color rojo sepia característico. La aparición de color era esperada ya que en los geles se tenía por un lado una mezcla de enzimas y por otro un sustrato (lactosa) que al sufrir hidrólisis enzimática generaría otro sustrato (glucosa) para otra reacción enzimática (sistema GOD-PAP-glucosa). Sin embargo, no se presentó color, sino hasta la adición de la solución del sistema GOD-PAP. Esto podía deberse a que de alguna manera uno de los sustratos de las enzimas del sistema GOD-PAP se había agotado.

5.4.2. USO DE GRENETINA COMO SOPORTE

5.4.2.1. MÉTODO DE PLACAS DE VIDRIO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE PELÍCULAS DE GRENETINA

Al aplicar al método de placas de vidrio para la construcción de películas de n-pentadecano las variaciones descritas en la sección 4.4.2.1. fue posible obtener películas de grenetina completas y de manera sencilla, evitándose el problema de la formación de "medios geles" que se describe en la sección 5.2.3.2.

5.4.2.2. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO EN GRENETINA AL 10%

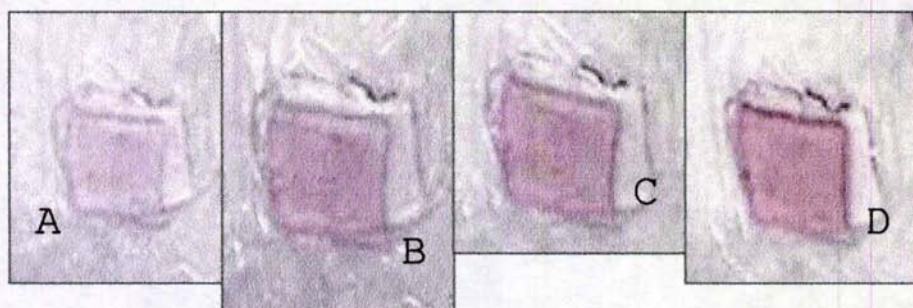
En la sección 5.2.3.4.2. se concluyó que la grenetina no podía ser usada como aislante debido a que permitía un alto grado de difusión del sustrato hacia la enzima. Como la capa aislante del sistema enzimático no pudo ser de grenetina, sólo quedaba como alternativa hacerla de n-pentadecano. Para dar mayor consistencia al gel de grenetina que servía como soporte se aumentó la concentración de grenetina a 10%. Pero la solución de grenetina al 10% preparada presentó coloración amarillo evidente, por lo que se descartó el uso de ONPG como sustrato en este medio: el producto de la hidrólisis enzimática del ONPG presenta el mismo color que la grenetina. Por lo tanto, se utilizó el sustrato natural de la enzima: la lactosa. Para hacer colorida la reacción, se empleó el sistema enzimático GOD-PAP para que actuara sobre la glucosa producida por la hidrólisis enzimática de la lactosa, produciendo una coloración rojiza. La solución de grenetina conteniendo la enzima β -galactosidasa y el sistema GOD-PAP presentó una coloración ligeramente rosa al ser introducida en el sistema de placas de vidrio; después de 5 minutos de permanecer en refrigeración para que se llevara a cabo la gelificación de la grenetina, el color rosa se intensificó. El control positivo realizado con los geles de enzima-GOD-PAP y lactosa no presentó diferencia alguna con la intensidad del control negativo aún después de 10 minutos de contacto. Para aclarar este fenómeno se realizó una mezcla de solución de grenetina al 10% con el sistema GOD-PAP, misma

que resultó incolora. Al adicionar β -galactosidasa a la mezcla anterior se obtuvo una coloración rojiza similar a la que presentó el gel. La enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* contiene residuos de glucosa en una cantidad tan alta que agotan los sustratos (fenol y 4-aminofenazona) del sistema enzimático GOD-PAP, produciendo coloración rosa intenso aún antes de que se lleve a cabo la hidrólisis enzimática de la lactosa. La glucosa producida a partir de dicha hidrólisis resulta despreciable comparada con la que contiene la enzima, por lo que el color del control positivo fue igual al del control negativo. Por lo tanto, no es posible utilizar la enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* junto con el sistema enzimático GOD-PAP para los fines de la presente investigación.

5.5. Sistema enzimático GOD-PAP-glucosa

Como alternativa al uso de la enzima β -galactosidasa con su sustrato lactosa, se construyó un sistema utilizando como enzima el sistema GOD-PAP y como sustrato la dextrosa. Como ambos geles resultaron completamente incoloros, no fue necesario realizar un control negativo. Los resultados obtenidos en el control positivo se muestran en la figura 33. Se presentó color rosa tenue a los 0.33 minutos de contacto entre los geles (figura 33A). Como se observa en las figuras 33B y 33C, el color se intensificó con el tiempo hasta obtener un máximo a los 2 minutos a temperatura ambiente (figura 33D). El color así obtenido se mantuvo estable durante 20 días a temperatura de refrigeración.

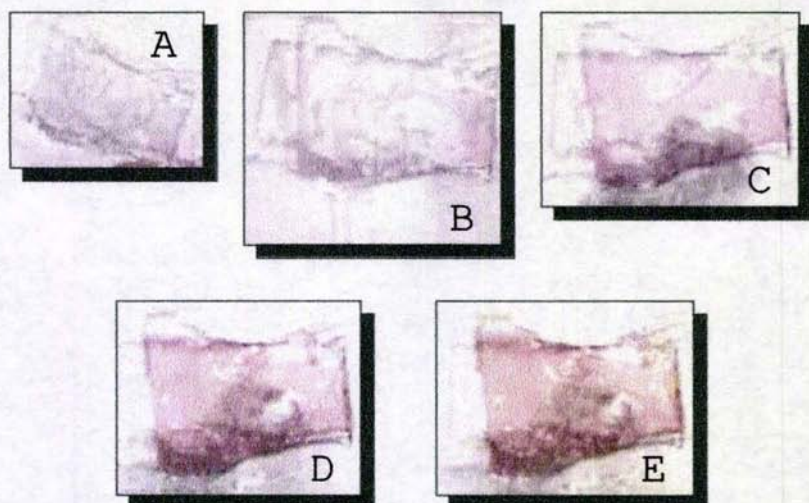
FIGURA 33. Control positivo GOD-PAP-glucosa



Desarrollo de color obtenido a distintos tiempos
A. 0.33 min, B. 0.67 min, C. 1.00 min, D. 2.00 min

El sistema completo tampoco presentó problemas de aparición de color antes de tiempo, lo que prueba la gran capacidad del n-pentadecano para funcionar como aislante. El sistema se mantuvo incoloro durante 30 minutos a temperatura de refrigeración, al término de los cuales se colocó a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 34. Al momento de la exposición a temperatura ambiente (figura 34A) el sistema era incoloro. Se presentó aparición de color rosa 1 minuto después de la exposición a temperatura ambiente, cuando el n-pentadecano comenzó a fundir (figura 34B); a los 3.50 minutos el sistema era rosa con pequeñas zonas incoloras, donde el n-pentadecano aún funcionaba como aislante (figura 34C) y seguía intensificándose con el tiempo. Después de 13 minutos, el sistema era rosa en toda la superficie (figura 34D), y a los 26min, momento al cual se obtuvo la máxima coloración, fue almacenado a temperatura de refrigeración para evaluar la estabilidad del color producido, mismo que se mantuvo durante más de 28 días.

FIGURA 34. Sistema completo GOD-PAP-glucosa



Tiempos de exposición a temperatura ambiente:
A. 0.67 min, B. 1.00 min, C. 3.50 min, D. 13.0 min, E. 26.0 min

5.6. Comparación entre los sistemas enzimáticos desarrollados y los sistemas comerciales

Los indicadores de abuso de temperatura desarrollados en el presente trabajo pertenecen al tipo de dispositivos más simples según la clasificación de Taoukis y Labuza (24): los CTIs (Indicadores de Temperatura Crítica) que sólo muestran la exposición del producto por arriba de una temperatura de referencia, que en este caso fue de 10°C. En la tabla 11 se muestra una comparación entre varios aspectos de los sistemas enzimáticos desarrollados, así como la sección en que fueron presentados y discutidos los resultados correspondientes a cada uno.

El primer sistema fue el formado por la enzima β -galactosidasa y el sustrato ONPG. Cuando se intentó usar n-pentadecano como soporte no se logró obtener una emulsión estable, por lo que al montar el sistema y exponerlo a temperatura ambiente no hubo desarrollo de color. Las dificultades presentadas en el desarrollo de este sistema, así como su elevado costo en caso de que hubiera funcionado, hacen que no pueda ser considerado como un sistema adecuado. Cuando se utilizó poliacrilamida como soporte se obtuvo un sistema en el que el color se desarrollaba a los cuatro minutos de exposición a temperatura ambiente, pero que no duraba estable más de un día. Como el uso de películas de poliacrilamida aumentaba la superficie de contacto sistema-aire, era mayor la cantidad de ONP arrastrado por el vapor de agua, por lo que se perdió más rápidamente el color. Por lo anterior, el sistema de películas de poliacrilamida no pudo ser considerado adecuado, a pesar de su costo moderado. En todos los casos en que se utilizó grenetina como soporte se presentó desarrollo de color a temperatura de refrigeración, pues como la grenetina debió ser adicionada a temperatura ambiente sobre la capa previamente solidificada de n-pentadecano, gran parte de éste fundió y por densidad migró a la superficie del sistema, permitiendo el contacto enzima-sustrato aún a temperatura de refrigeración. Como este fenómeno puede dar lugar a falsos positivos (eliminación de productos que jamás fueron sometidos a abuso de temperatura) todos los sistemas de grenetina fueron descartados, a pesar de ofrecer costos tan bajos como 95 centavos. La grenetina presentó un papel muy pobre como aislante en lugar de n-pentadecano, permitiendo que la reacción se efectuara a tal grado que el medio presentó color amarillo intenso en refrigeración.

En el caso de los sistemas β -Galactosidasa / GOD-PAP / lactosa, es posible que la glucosa presente en la enzima liofilizada consumiera los sustratos del sistema enzimático GOD-PAP. Por esa razón, al montar el sistema y exponerlo a temperatura ambiente no se presentaba cambio alguno en la coloración inicial. También estos sistemas tuvieron que ser descartados.

El sistema β -Galactosidasa / X-gal, que fue construido sobre un soporte de poliacrilamida, se mantuvo completamente incoloro a temperatura de refrigeración, prueba de la estabilidad de los reactivos empleados en su

construcción y de la habilidad del n-pentadecano para funcionar como aislante. Al ser expuesto a temperatura ambiente, el sistema presentó desarrollo de color a los 9 minutos y una estabilidad del color desarrollado mayor a 25 días. Este sistema puede ser considerado como muy adecuado para ser usado de forma comercial, excepto por un pequeño detalle: el costo por sistema es muy elevado (8.75 pesos).

El último sistema probado fue el GOD-PAP / glucosa, que fue construido sobre grenetina al 10% en forma de película. Este sistema se mantuvo completamente incoloro a temperatura de refrigeración y, al ser expuesto a temperatura ambiente, presentó desarrollo de color después de un minuto. El color se mantuvo estable durante más de 28 días. El costo del sistema es de 5.80 pesos, lo que lo hace adecuado para su uso comercial.

Un sistema comercial de tipo CTI para indicar abuso de temperatura se encuentra disponible en 3M (figura 3). No se dispone de datos técnicos sobre este dispositivo, pero se sabe que presenta cambio de color en 5 minutos a temperatura ambiente con cambio completo en 2 horas a cualquier temperatura de referencia entre los -17 y los 66°C . Este amplio rango de temperaturas ya presenta una gran ventaja sobre los sistemas desarrollados, cuya única temperatura de referencia es de 10°C .

Otro sistema comercialmente disponible es un indicador basado en difusión: el Monitor-Mark ® de 3M (24), que consiste en un cojín saturado con una mezcla química (depósito). El cojín se encuentra superpuesto al final de un largo soporte poroso (carril). Antes de ser usado, el cojín se encuentra separado del carril por una película que funciona como barrera. Al remover la barrera se activa el sistema, y si la temperatura se encuentra por arriba del punto de fusión de la mezcla química comienza la difusión. Un ejemplo de mezcla química usada es el estearato de butilo (punto de fusión de 12°C) mezclado con colorante azul. Al fundir la mezcla comienza a moverse a través del carril. La respuesta del indicador es la distancia que ha recorrido el "frente azul". El avance de la sustancia puede ser visto a través de aberturas a lo largo del carril. Estandarizando el tiempo que corresponde a una determinada distancia, se puede conocer cuánto tiempo ha sido expuesto el sistema a una temperatura superior a la de referencia (24). El principio del Monitor-Mark ® es mucho más simple que el de los sistemas aquí desarrollados (que son de tipo enzimático), pero el comercial tiene una vida útil de varios años si se

mantiene a bajas temperaturas antes de la activación. Los sistemas desarrollados en este trabajo no requieren ser activados, pero tienen una vida útil mucho menor (por ejemplo, el sistema GOD-PAP / glucosa sólo dura 1 mes, que es el tiempo de estabilidad de la mezcla de enzimas y sustratos GOD-PAP de Spinreact®). Además, la información proporcionada por el Monitor-Mark® arroja mayor cantidad de datos sobre el historial térmico del producto que los sistemas desarrollados. En el caso del sistema GOD-PAP / glucosa, se podría hacer una adaptación semi-cuantitativa mediante el desarrollo de una escala de color que permitiera conocer de forma aproximada la cantidad de glucosa que ha reaccionado con el sistema GOD-PAP.

Entre los sistemas de tipo enzimático comercialmente disponibles no se conoce de la existencia de uno que utilice los mismos sistemas enzimáticos que los desarrollados en la presente investigación. Se sabe que el Time Temperature Monitor de I-Point® está basado en un cambio de color causado por una disminución de pH resultante de una hidrólisis enzimática sobre un sustrato lipídico (24). Antes de la activación, el indicador consiste en dos compartimentos separados (en forma de minibolsas plásticas): uno contiene la enzima lipolítica en solución acuosa (lipasa pancreática); el otro contiene el sustrato lipídico (como tricaprionato de glicerina) suspendido en fase acuosa con un indicador de pH. El indicador es activado rompiendo la barrera que separa los dos compartimentos por ejerción de una presión mecánica, mezclando la enzima y el sustrato. La hidrólisis causa liberación de un ácido (ácido capríco), provocando un cambio de color en el indicador de pH. El cambio de color puede ser apreciado visualmente (si el indicador está dirigido a consumidores) o medido instrumentalmente por un colorímetro portátil (si el indicador está dirigido a productores). El Time Temperature Monitor de I-Point® tiene una vida útil de 1.5 años a 4°C antes de la activación. Como se observa, este sistema está basado en una reacción enzimática distinta a las empleadas en los sistemas propios. Este sistema también requiere activación y, acoplado a un método instrumental adecuado, puede dar la historia térmica completa del producto al cual se encuentra asociado, a diferencia de los sistemas desarrollados que sólo indican que el producto ha sido expuesto a una temperatura superior a los 10°C.

El costo es una de las principales razones por las que los productores de la industria de alimentos se han mostrado reacios al uso de los indicadores de abuso de temperatura. En el caso de los indicadores comerciales, los costos varían desde los 40 a los 85 centavos de peso. En el caso de los propios, los mejores sistemas presentaron costos de 8.75 pesos (sistema β -galactosidasa / X-gal) y 5.80 pesos (sistema GOD-PAP / glucosa). Los sistemas desarrollados (que pueden considerarse en etapa de prototipo) se encuentran a un nivel un poco más alto que los costos de los comerciales, y con la mejora de sus características este costo podría reducirse a un punto que fueran accesibles. Lo importante es centrarse en hacer ver a los productores que la inversión en un dispositivo indicador de abuso de temperatura puede evitar muchas pérdidas económicas en productos que pierden sus características de calidad al ser expuestos a temperaturas elevadas.

6. CONCLUSIONES

- La enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* presentó actividad a una temperatura de 9°C, por lo que es útil para fines de la investigación.
- La emulsión más estable en aceite mineral fue la que contenía 3% de agua y 1% de acetona.
- La enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* presentó actividad en aceite mineral con 3% de agua.
- La coloración más intensa en aceite mineral se presentó con una concentración de enzima de 0.5% y 0.017% de ONPG.
- En n-pentadecano fue necesario adicionar 0.52% de ONPG para que la coloración amarilla fuera evidente.
- La presencia de 5% de DMSO propicia la hidrólisis del ONPG, por lo que no puede ser usado como cosolvente en el sistema β -galactosidasa – ONPG.
- El sistema β -galactosidasa – ONPG no pudo ser construido usando n-pentadecano como soporte debido a que no se lograron emulsiones de enzima y sustrato estables.
- El mejor método para la construcción de películas de n-pentadecano y poliacrilamida fue el de placas de vidrio, pero para hacer películas de grenetina fue necesario aplicar una variación al método cubriendo la cara interna de los vidrios con plástico adherente.
- Para que el color amarillo sea evidente en el sistema β -galactosidasa – ONPG sobre poliacrilamida, la concentración del gel de 0.5% de enzima debe ser de 10% de poliacrilamida y de 15% de poliacrilamida para ONPG 0.034M.
- En el sistema β -galactosidasa – ONPG usando poliacrilamida como soporte, el color obtenido no fue estable por más de 24 horas, ya que el sistema fue construido en película provocando que el ONP fuera arrastrado con el vapor de agua por la gran superficie que deriva de ésta forma geométrica.
- Una concentración de ONPG de 0.034M inhibe la polimerización de la acrilamida al 5%.

TABLA 11. Comparación entre los sistemas enzimáticos (CTI's) desarrollados

Sistema (enzima/sustrato)	Material de soporte	Material aislante	Forma del sistema	Tiempo de desarrollo de color (min)	Estabilidad de color (días)	Desarrollo de color a temperatura de refrigeración	Costo (\$)	Sección	
β -Galactosidasa / ONPG	n - pentadecano	n - pentadecano	Película	No se desarrolló	-	-	16.90	5.2.1.7.	
	Poliacrilamida	n - pentadecano	Película	4.00	1	☆	6.80	5.2.2.	
	Grenetina 2.0%	n - pentadecano	Capa circular (diámetro 5cm)	3.00	>18	★ (tenue)	29.60	5.2.3.2.2.a	
	Grenetina 2.0%	n - pentadecano	Cilíndrica (diámetro 25mm)	41.00	>20	★ (tenue)	24.10	5.2.3.2.2.b	
	Grenetina 2.0%	n - pentadecano	Cilíndrica recta (diámetro 5.5mm)	40.00	>5	★ (tenue)	1.60	5.2.3.2.2.c	
	Grenetina 2.0%	n - pentadecano	Cilíndrica inclinada (diámetro 5.5mm)	40.00	>5	★ (tenue)	1.25	5.2.3.2.2.c	
	Grenetina 1.3%	n - pentadecano	Cilíndrica (diámetro 8mm)	-	-	★ (intenso)	2.60	5.2.3.4.1	
	Grenetina 1.3%	Grenetina 1.3%	Cilíndrica recta	-	-	★ (intenso)	0.95	5.2.3.4.2	
	β -Galactosidasa / X - Gal	Poliacrilamida	n - pentadecano	Película	9.00	>25	☆	8.75	5.3.
		β -Galactosidasa GOD-PAP/ Lactosa	Poliacrilamida	Película	No se desarrolló	-	-	6.50	5.4.1.
Grenetina 10%			n - pentadecano	Película	No se desarrolló	-	-	6.30	5.4.2.2.
GOD-PAP/Glucosa	Grenetina 10%	n - pentadecano	Película	1.00	>28	☆	5.80	5.5.	

☆ No hubo desarrollo de color a temperatura de refrigeración. ★ Si se desarrolló color a temperatura de refrigeración.

- Para aumentar la estabilidad del color amarillo en sistemas con grenetina es necesario sellarlos, para impedir que el ONP sea arrastrado por el vapor de agua y el color se pierda.
- En los sistemas β -galactosidasa – ONPG en capas de grenetina, se obtuvo un efecto indeseable, ya que desarrollaron color a temperatura de refrigeración, debido a que el n-pentadecano migraba a la superficie y permitía el contacto entre la enzima y el sustrato.
- El sistema β -galactosidasa – X-GAL permaneció incoloro a temperatura de refrigeración, desarrolló color a los 9 minutos de exposición a temperatura ambiente y el color permaneció estable más de 25 días, lo que hace de este sistema uno de los mejores, excepto por su elevado costo (8.75 pesos).
- No es posible acoplar el sistema β -galactosidasa – lactosa con el sistema enzimático GOD-PAP, pues tanto la enzima como la lactosa contienen restos de glucosa que agotan los reactivos del kit y provocan el desarrollo de color antes de tiempo.
- El sistema GOD-PAP – glucosa permaneció incoloro a temperatura de refrigeración, desarrolló color después de 1 minuto a temperatura ambiente y el color permaneció estable durante más de 28 días; lo anterior, aunado a su bajo costo (5.80 pesos) lo convierte en el mejor sistema desarrollado.
- Los mejores sistemas desarrollados fueron los de β -galactosidasa – X-GAL en poliacrilamida y el de GOD-PAP – glucosa en grenetina, ya que en ambos no se obtiene color a temperatura de refrigeración con lo que se descarta la presencia de falsos positivos, se obtiene el color característico a una intensidad perceptible y además dicho color es estable por mucho tiempo, sin embargo es necesario optimizarlos para hacerlos más accesibles económicamente hablando.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bell, G., Anja, E. Janssen, M., Halling, P. "Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities". *Enzyme and Microbial Technology*. 20 (6): 471-477, 1997.
2. Bourgeois, C.M., Mescle, J. F., Zucca, J. *Microbiología alimentaria Vol. I: Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. España, Edit. Acribia, 1994. pp. 385-396.
3. Charley, H. *Tecnología de alimentos*. México, Edit. Limusa, 1997. pp. 68-71.
4. Dean, J. *Lange Manual de Química Tomo III*. 13ª ed. México, Edit. Mc Graw Hill, 1989. pp. 7-758.
5. Dunbar, Bonnie S. *Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques*. EUA, Edit. Plenum Press, 1990. pp. 14-17.
6. Frazier, W.C., Westhoff, D.C. *Microbiología de los alimentos*. 4ª edic. España, Edit. Acribia, 1993. pp. 159-164.
7. García-Garibay, M., Bárzana, E. "El papel del agua en la catálisis enzimática". *Biotechnología*. 5 (3): 98-102, 2000.
8. García-Garibay, M., Bárzana, E., Gómez-Ruiz, L., Espinoza, P. "Evaluation of the production of lactase simultaneously to pectinase or inulase". *Biotechnology letters*. 14 (11): 1053-1058, 1992.
9. García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. "Uso de β -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos". *Revista de investigación clínica*. Suplemento 48: 51-61, 1996.
10. García-Garibay, M., Quintero, R., López-Munguía Canales, A. *Biotechnología alimentaria*. México, Edit. Limusa, 1993. p. 158.
11. García-Garibay, M., Torres, J., López-Munguía Canales, A., Casas, L. "Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus*". *Biotechnology letters*. 9 (6): 417-420, 1987.

12. Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L., Batista-Viera, F. "Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods". *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*. 4: 313–327, 1998.
13. Henneberg, W., Demeter, K.J., Elbertzhagen, H. *Elementos de microbiología lactológica*. 6ª ed. España, Edit. Acribia, 1971. p. 99.
14. Hobbs, B.C., Roberts, D. *Higiene y toxicología de los alimentos*. 3ª ed. España, Edit. Acribia, 1997. pp. 173-191.
15. Jasper, W., Placzek, R. *Conservación de la carne por frío*. España, Edit. Acribia, 1978. pp. 1-2, 7-8, 34, 54-59.
16. Ladero, M., Santos, A., García, J.L., Carrascosa, A.V., Pessela, B.C.C., García-Ochoa, F. "Studies on the activity and the stability of β -galactosidases from *Thermus* sp strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*". *Enzyme and microbial technology*. 30 (2): 392–405, 2002.
17. Luquet F. M. *Leche y productos lácteos tomo 1: vaca-oveja-cabra*. España, Edit. Acribia, 1991. pp. 181-192, 195-202.
18. Moo-Yeal, L., Dordick, J. "Enzyme activation for nonaqueous media". *Biotechnology*. 13 (5): 376–384, 2002.
19. Noskova, G.L. *Microbiología de las carnes conservadas por el frío*. España, Edit. Acribia, 1975. pp. 13-27, 59-74.
20. Ordoñez, J., Cambero, M., Fernández, L., García, M., García de Fernando, G., Hoz, L. de la, Selgas, M. *Tecnología de los alimentos: componentes de los alimentos y procesos*. Vol. I, tomo 2. España, Edit. Síntesis, 1998. pp. 130-132, 194-196.
21. Ordoñez, J., Cambero, M., Fernández, L., García, M., García de Fernando, G., Hoz, L. de la, Selgas, M. *Tecnología de los alimentos: alimentos de origen animal*. Vol. II, tomo 3. España, Edit. Síntesis, 1998. pp. 226-227, 229-231, 259-261.

22. Potter, N. *La ciencia de los alimentos*. México, Edit. Harla, 1978. pp. 207-210, 217-219, 537, 550-555.
23. Segel, I. *Cálculos de bioquímica*. España, Edit. Acribia, 1982. pp. 367-368.
24. Taoukis, P.S., Fu, B., Labuza, T.P. "Time-temperature indicators". *Food Technology*. 45 (10): 71-81, 1991.
25. Tscheuschner, Horst-Dieter. *Fundamentos de tecnología de los alimentos*. España, Edit. Acribia, 2001. pp. 307-345.
26. Wong. *Química de los alimentos: mecanismos y teoría*. España, Edit. Acribia, 1995. pp. 109-110, 114-116.

8. ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estructura propuesta para el sistema enzimático	5
2. Clasificación de los indicadores de tiempo-temperatura según Taoukis y Labuza (24)	22
3. Ejemplo de CTI (Monitor Mark Time /Temperature Button de 3M ®)	24
4. Reacción catalizada por la enzima Reacción catalizada por la enzima β -galactosidasa sobre el sustrato ONPG	26
5. Estructura del X-Gal, sustrato sintético de la enzima β -galactosidasa	26
6. Reacciones del sistema GOD-PAP	27
7. Proceso de polimerización de la acrilamida	31
8. Isoterma de adsorción basada en datos de la lisozima	35
9. Construcción de películas de n-pentadecano	39
10. Método de placas de vidrio para la construcción de películas de grenetina	52
11. Determinación de la actividad enzimática a 9°C	54
12. Determinación de la estabilidad de emulsiones w / o	56
13. Determinación de la estabilidad de emulsiones w / o con 3% de agua en presencia de acetona	56
14. Determinación cualitativa de la actividad enzimática en n-pentadecano	60
15. Preparación de emulsión de ONPG en n-pentadecano	62
16. Determinación cualitativa de la actividad enzimática en n-pentadecano con 5% de DMSO	62
17. Determinación de la estabilidad de emulsiones con 3% agua en n-pentadecano, en presencia de DMSO	63
18. Determinación de actividad enzimática en presencia de DMSO	64
19. Preparación de solución inicial de ONPG, DMSO y agua	65
20. Espectro UV-visible para el ONP	66
21. Efecto del n-pentadecano sobre el color del ONP	67
22. Pruebas realizadas en geles de poli(acrilamida) al 5%	69
23. Pruebas realizadas en geles de poli(acrilamida) al 5%	70
24. Pruebas realizadas en geles de poli(acrilamida) al 10%	71
25. Pruebas realizadas en geles de poli(acrilamida) al 10% con 20 horas de haber sido preparados	72
26. Ruptura del gel de grenetina en el sistema de placas de vidrio (sec. 3.2.1.3.2.)	75
27. Efecto del llenado y sellado en la estabilidad del color de soluciones ONP - grenetina	78
28. Sistemas sellados con grenetina al 2% en tubo de 25x150mm	80
29. Sistemas sellados con grenetina al 2% en tubo de 5.5mm de diámetro	81
30. Sistema completo en tubo de 5.5mm de diámetro a temperatura de refrigeración	82
31. Sistemas sellados con grenetina al 1.3% en tubo de 8x75mm	84
32. Pruebas realizadas en geles de poli(acrilamida) al 10% con X-gal	87
33. Control positivo GOD-PAP-glucosa	91
34. Sistema completo GOD-PAP-glucosa	92