



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN INGENIERÍA QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN JUGOS DE
FRUTA CON ELECTRODOS ENZIMÁTICOS

MARÍA EMILIA RISTOFF

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2013

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Ingeniería Química durante el período comprendido entre el 4 de Septiembre de 2007 y el 20 de Agosto de 2013, bajo la dirección de la Dra. Silvana Beatriz Saidman y la co-dirección del Dr. Jorge Enrique Lozano.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... , mereciendo la calificación de(.....)

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

A mi querida madre

A mi gran amor y compañero de la vida, mi esposo Rober

AGRADECIMIENTOS

A mi adorado esposo, Rober. Gracias por acompañarme, brindarme tu apoyo y amor incondicional y hacerme sentir en cada momento que estabas al lado mío a pesar de la distancia. Gracias infinitas mi amor, gracias por apoyar cada decisión que he tomado y acompañarme en el camino. TE AMO con el corazón, TE AMO con todo mi ser!

A mi hermosa familia: Mamá, Papá, Martín y Juan Cruz. Gracias por ser mi sostén durante toda mi vida y en esta etapa. Por el acompañamiento, el apoyo y el amor, gracias por tanto, gracias por todo. Los amo con todo el corazón!

Mami, a vos un gracias más que especial por ser tan grande y tan incondicional. Te amo con todo mi corazón, estoy y estaré siempre enormemente agradecida con vos por todo el esfuerzo puesto en mi y en la familia. Sos una gran luchadora y una mujer admirable, un ejemplo a seguir!

A mi Abu Coca, gracias por estar siempre presente en cada momento de mi vida, preocupándote por mis cosas, cuidándome y brindándome tanto amor! Te amo!

A mi Tía Beatriz, gracias por tu presencia incondicional en todas las etapas de mi vida y por tu gran amor!

A Noe, mi cuñadita querida! Gracias por estar siempre, por tu preocupación y apoyo! Te quiero mucho!

A mis tíos María Elina y Sergio, gracias por todo su amor, y por estar siempre acompañándome.

A mis primos Ana y Franco, a mi amorcito hermoso Tobías. Los amo! Gracias!

A mis tíos Guillermina, Gerardo y Paula, y a todos mis primos.

A mi otra familia: Rober, Delcia, Del, Lu, Caro, Marti y Agus, siempre presentes con la palabra de apoyo y el amor, gracias! Gracias a la familia de Buenos Aires por todas las oraciones y el apoyo!

A mis amigos Martina y Juan, gracias por su apoyo y preocupación! Los quiero!

A mi director de tesis Jorge, gran profesional y por sobre todas las cosas excelente persona. Gracias por enseñarme, guiarme en el camino de la investigación y permitirme trabajar con absoluta libertad.

A mi directora Silvana, gracias por el aporte de sus conocimientos para poder llevar adelante todas las tareas relacionadas con esta Tesis.

Al grupo de Alimentos el cual integré, gracias por la ayuda brindada.

A Nora Pascual y a las secretarias de PLAPIQUI por hacerme las cosas mucho más simples.

A Viviana Sorrivas por colaborar con tareas relacionadas con mi Tesis.

A Ariel Targa por ayudarme en la puesta a punto del circuito eléctrico de mi banco de trabajo.

Al personal del taller de PLAPIQUI y del taller de vidriería.

A Marcelo Caputo por su preocupación y apoyo constantes.

Al CONICET, PLAPIQUI y UNS, por haberme proporcionado los medios para llevar a cabo todas las tareas para el desarrollo de esta Tesis.

RESUMEN

El objetivo general de la presente tesis fue el diseño y la construcción de un biosensor amperométrico para determinar glucosa en jugos de fruta (utilizando el de manzana como modelo) que sea económico, de fácil construcción y que tenga respuesta rápida. Con tal fin se construyó un electrodo de pasta de carbono que consistió en un cilindro de teflón con un contacto eléctrico de acero inoxidable. Los materiales de la pasta de carbono fueron una mezcla de polvo fino de grafito y parafina, a los cuales se agregó la enzima glucosa oxidasa (GOx) y el ferroceno, como mediador. Se estudiaron diferentes condiciones de operación del biosensor tales como el pH del medio de reacción, el potencial aplicado y la carga de enzima en la pasta de carbono, siendo las condiciones óptimas seleccionadas: medio de reacción (buffer de fosfatos pH 7), potencial de trabajo (0.16 V) y carga enzimática (10%).

Se determinó la actividad enzimática de la enzima tanto libre como luego del proceso de inmovilización, y se estudió la cinética de la enzima en el electrodo, la cual se corresponde con la cinética típica de Michaelis-Menten, siendo los valores de los parámetros cinéticos $k'_m = 0.0195 \text{ M}$ e $i_{\max} = 35.5 \mu\text{A}$.

A continuación se construyó la curva de calibración cuyo intervalo lineal de concentraciones de glucosa fue de 0.1 mM a 4.48 mM, con una sensibilidad de 0.61 $\mu\text{A}/\text{mM}$ y un valor del límite de detección de 0.05 mM, valores completamente aceptables para el biosensor en cuestión. También se evaluaron características del sensor como su tiempo de respuesta, que fue menor a 12 segundos en todos los casos y la repetibilidad y la precisión intermedia dando en ambos casos muy buenos resultados.

Posteriormente se evaluó la estabilidad del sensor bajo diferentes condiciones de almacenamiento con y sin inmersión en la solución buffer y tanto bajo refrigeración

como a temperatura ambiente. Todos los resultados fueron altamente satisfactorios y concuerdan con los esperados para el biosensor y más aún teniendo en cuenta la simpleza respecto de los materiales empleados y a la construcción del mismo.

Otro estudio fue la evaluación de las interferencias debidas a sustancias electroquímicamente activas en el jugo de fruta, en este caso de manzana, que puedan afectar a la señal de la glucosa. Como posibles interferentes se estudiaron: ácido ascórbico, sacarosa, fructosa, almidón, ácido málico y ácido cítrico. Sólo el ácido ascórbico fue una sustancia interferente, debiendo eliminarse este compuesto del jugo como paso previo a la determinación de glucosa con el biosensor. Se estudiaron dos técnicas de eliminación: eliminación enzimática del ácido ascórbico y eliminación por oxidación directa con oxígeno del aire ambiente. Ambas técnicas dieron excelentes resultados en la eliminación de este compuesto.

Finalmente se procedió a la determinación de glucosa en muestras reales, para lo cual se emplearon dos jugos de manzana: uno comercial y uno concentrado obtenido directamente de fábrica. Para validar los resultados obtenidos con el biosensor se utilizó un glucómetro digital. En todos los casos los errores en las determinaciones respecto a los valores obtenidos con el glucómetro fueron menores al 4%, lo que indica el muy buen desempeño del biosensor.

ABSTRACT

The main objective of the present Thesis was the design and construction of an amperometric biosensor to determine glucose in fruit juices (using apple juice as a model), considering this type of bio-electrodes are relatively cheap, simple to develop, set up and run and characterized by a fast response. The used carbon paste electrode consisted in a Teflon cylinder with stainless steel electric contact. Carbon paste was a mixture of graphite in fine powder and liquid paraffin, to which the enzyme glucose oxidase (GOx) and ferrocene as mediator was added. Several operation conditions were studied such as reaction medium pH, working potential and enzymatic load in the carbon paste, being the optimal conditions selected phosphate buffer (pH 7) as reaction medium, a working potential of 0.16 V, and 10% enzymatic load.

Enzymatic activity of both free enzyme and enzyme after the immobilization process was determined. Furthermore the kinetic of the enzyme in the electrode was studied, and the result shows that it follows a typical Michaelis-Menten kinetic, with $k'_m = 0.0195$ M and $i_{max} = 35.5$ μ A.

The calibration curve shown that the linear range of glucose concentration was in the range 0.1 mM to 4.48 mM, with a sensitivity of 0.61 μ A/mM and a detection limit of 0.05 mM. These values are completely acceptable for this kind of biosensor. Sensor characteristics, including response time (<12 sec. in all cases), intermediate precision and repeatability were evaluated.

Stability of the sensor under different storage conditions was also evaluated. Results were highly satisfactory and consistent, considering used materials and simplicity of construction.

Interferences from electrochemically-active substances in apple juice, which may affect glucose signal, were carefully considered. The possible studied interfering substances were: ascorbic acid, sucrose, fructose, starch, malic acid and citric acid. Only the ascorbic acid was observed to be an interfering substance, which must be removed from juice previously to the determination of glucose with the biosensor. Two removal techniques for ascorbic acid were assayed: enzymatic removal and elimination by direct oxidation with air. Both techniques showed to be appropriate for ascorbic acid elimination.

Finally, the determination of glucose in real samples was carried out, using two apple juices samples, a ready to drink commercial one, and a concentrated juice directly obtained from a factory. To validate the results obtained with the biosensor a digital glucometer was used. In all cases the errors in the determinations were lower than 4%, demonstrating the very good performance of the biosensor.

INDICE

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biosensores	2
1.1.1 Clasificación de los biosensores	4
1.1.1.1 Clasificación respecto al Receptor: elemento de reconocimiento biológico	5
1.1.1.1.1 Elemento de reconocimiento biocatalítico	5
1.1.1.1.2 Biocomplejo o elemento de reconocimiento por bioafinidad.....	6
1.1.1.2 Clasificación de acuerdo al modo de detección.....	6
1.1.1.2.1 Transductores electroquímicos	7
1.1.1.3 Clasificación de acuerdo al analito o reacciones que son monitoreadas	9
1.1.1.3.1 Monitoreo directo del analito	9
1.1.1.3.2 Control indirecto del inhibidor o activador del receptor bioquímico ...	9
1.2 Los carbohidratos	9
1.2.1 Generalidades	9
1.2.2 La glucosa.....	10
1.2.3 Métodos de determinación de carbohidratos	12
1.3 El jugo de manzana	14
1.4 Objetivos	15
CAPÍTULO 2	17
DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA	17
2.1 Introducción	17
2.2 Inmovilización enzimática. Métodos de inmovilización	18

2.3 Materiales y métodos.....	20
2.3.1 Preparación de la pasta de carbono.....	24
2.3.2 Sistema de trabajo.....	25
2.4 Resultados y discusión.....	30
2.5 Conclusiones.....	33
CAPÍTULO 3.....	34
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GO_x LIBRE E INMOVILIZADA	34
3.1 Introducción.....	34
3.2 Determinación de la actividad enzimática.....	35
3.3 Materiales y métodos.....	37
3.3.1 Ensayo enzimático de GLUCOSA OXIDASA (EC 1.1.3.4)	37
3.3.2 Preparación de las soluciones necesarias para llevar a cabo el ensayo de actividad.....	38
3.4 Resultados y discusión.....	43
3.5 Conclusiones.....	45
CAPÍTULO 4.....	47
CONDICIONES ÓPTIMAS DE OPERACIÓN DEL BIOSENSOR PARA DETERMINAR GLUCOSA EN JUGO DE MANZANA	47
4.1 Introducción.....	47
4.2 Condiciones óptimas de trabajo	47
4.2.1 pH óptimo del medio de reacción.....	48
4.2.2 Concentración óptima de enzima en la pasta de carbono	48
4.2.3 Potencial óptimo de trabajo	48
4.3 Materiales y métodos.....	49

4.3.1 Preparación de las soluciones buffer de fosfatos.....	49
4.3.2 Preparación de las soluciones de glucosa.....	50
4.3.3 Preparación de las distintas pastas de carbono.....	50
4.3.4 Preparación del electrodo sensor.....	50
4.3.5 Preparación del sistema de trabajo.....	50
4.3.6 Mediciones electroquímicas.....	51
4.4 Resultados y discusión.....	53
4.4.1 Concentración óptima de enzima en la pasta de carbono.....	56
4.4.2 pH óptimo del medio de reacción.....	57
4.4.3 Potencial óptimo aplicado al electrodo de trabajo.....	58
4.5 Conclusiones.....	62
CAPÍTULO 5.....	63
CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	63
5.1 Introducción.....	63
5.2 Definiciones.....	63
5.3 Cinética del estado estacionario.....	65
5.3.1 Cinética de enzimas inmovilizadas.....	69
5.4 Materiales y métodos.....	71
5.4.1 Preparación de las soluciones y material necesario.....	71
5.4.2 Cinética enzimática. Cálculo de V_{max} y k_m :.....	71
5.5 Resultados y discusión.....	72
5.6 Conclusiones.....	75
CAPÍTULO 6.....	77
CURVA DE CALIBRACIÓN, CARACTERÍSTICAS DE LA CALIBRACIÓN Y PROPIEDADES ANALÍTICAS DEL BIOSENSOR.....	77

6.1	Introducción	77
6.2	Curva de calibración para la glucosa	78
6.3	Características analíticas de la calibración	79
6.3.1	Intervalo lineal	79
6.3.2	Límite de detección (LOD).....	79
6.3.3	Sensibilidad	82
6.4	Materiales y métodos.....	82
6.4.1	Curva de calibración.....	82
6.4.2	Características analíticas de la calibración	83
6.4.2.1	Intervalo lineal	83
6.4.2.2	Límite de detección (LOD).....	83
6.4.2.3	Sensibilidad	83
6.5	Resultados y discusión.....	84
6.5.1	Curva de calibración.....	84
6.5.2	Intervalo lineal.....	85
6.5.3	Sensibilidad	86
6.5.4	LOD	87
6.6	Conclusiones.....	87
CAPÍTULO 7		89
CARACTERÍSTICAS DEL BIOSENSOR: TIEMPO DE RESPUESTA, REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA Y ESTABILIDAD		89
7.1	Introducción	89
7.2	Características del biosensor	89
7.2.1	Tiempo de respuesta en el estado estacionario	89
7.2.2	Repetibilidad y precisión intermedia.....	90

7.2.3 Estabilidad del electrodo sensor y de la pasta de carbono.....	91
7.3 Materiales y métodos.....	93
7.3.1 Tiempo de respuesta	93
7.3.2 Repetibilidad y precisión intermedia.....	94
7.3.3 Estabilidad	96
7.4 Resultados y discusión.....	99
7.4.1 Tiempo de respuesta	99
7.4.2 Repetibilidad y precisión intermedia.....	101
7.4.3 Estabilidad	104
7.4.3.1 Estabilidad operacional.....	104
7.4.3.2 Estabilidad durante el almacenamiento	107
7.5 Conclusiones.....	114
CAPÍTULO 8.....	117
ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS	117
8.1 Introducción	117
8.2 Materiales y métodos.....	119
8.2.1 Estudio de las interferencias	119
8.2.2 Eliminación de interferencias	121
8.2.2.1 Eliminación enzimática del ácido ascórbico	122
8.2.2.2 Eliminación del ácido ascórbico por oxidación directa con O ₂ en presencia de aire ambiente.....	128
8.3 Resultados y discusión.....	129
8.3.1 Estudio de interferencias	129
8.3.2 Eliminación enzimática del ácido ascórbico	131
8.3.2 Eliminación del ácido ascórbico por oxidación directa con el O ₂ del aire	135

8.4 Conclusiones.....	138
CAPÍTULO 9.....	141
APLICACIÓN DEL BIOSENSOR A MUESTRAS REALES.....	141
9.1 Introducción.....	141
9.2 Materiales y métodos.....	143
9.2.1 Método de referencia.....	144
9.3 Resultados y discusión.....	147
9.4 Conclusiones.....	149
CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJO A FUTURO.....	150
REFERENCIAS	153

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Esquema tipo de un biosensor	4
Figura 1.2	Diferentes configuraciones de los anómeros de la glucosa	11
Figura 2.1	Resumen gráfico de los distintos tipos de inmovilización	19
Figura 2.2	Método de preparación de la pasta de carbono final mediante mezclado en mortero durante un período de 30 minutos.....	24
Figura 2.3	Electrodo de pasta de carbono	26
Figura 2.4	Electrodo de referencia.....	27
Figura 2.5	Contraelectrodo de platino.....	28
Figura 2.6	Potenciostato utilizado en todas las determinaciones amperométricas	28
Figura 2.7	Sistema de medición: Biosensor.....	29
Figura 2.8	Micrografía SEM de la enzima liofilizada	31
Figura 2.9	Micrografía SEM de la pasta de carbono/parafina	31
Figura 2.10	Micrografía SEM pasta de carbono final (10000x).....	32
Figura 3.1	Incremento de la absorbancia en el tiempo para la reacción de la GOx libre	43
Figura 3.2	Incremento de la absorbancia en el tiempo para la GOx “desorbida” de la pasta de carbono	44
Figura 4.1	Diagrama densidad de corriente vs. Tiempo para inyecciones sucesivas de glucosa. Potencial aplicado 0.3 V; solución buffer de fosfatos 0.1 M pH 7; 8% GOx en la pasta	52
Figura 4.2	Densidades de corriente en función de la carga enzimática en la pasta para pH 6 y una concentración de glucosa de 4.95 mM.....	54

Figura 4.3	Densidades de corriente en función de la carga enzimática en la pasta para pH 7 y una concentración de glucosa de 4.95 mM.....	55
Figura 4.4	Densidad de corriente en función del pH para %GOx: 10, [glucosa]: 4.95 mM	57
Figura 5.1	Representación de la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato, para una reacción enzimática típica	67
Figura 5.2	Curva de saturación de la enzima para adiciones sucesivas de glucosa en buffer fosfatos.....	72
Figura 5.3	Representación de Hill para la curva de saturación de la GOx	73
Figura 5.4	Representación de Lineweaver-Burk.....	74
Figura 6.1	Curva de calibración para la glucosa obtenido con el biosensor de pasta de carbono a 0.16 V en solución buffer de fosfatos 0.1M a pH 7 (n = 2).....	84
Figura 7.1	Esquema ilustrativo de la determinación del tiempo de respuesta.....	93
Figura 7.2	Fotografía de la superficie sensora del electrodo de trabajo	98
Figura 7.3	Estudio de la Repetibilidad del electrodo de pasta de carbono	102
Figura 7.4	Análisis de Precisión Intermedia del biosensor amperométrico para determinar glucosa en jugos de manzana	104
Figura 7.5	Estabilidad operacional del sensor sin regeneración superficial	105
Figura 7.6	Estabilidad del electrodo sensor en función del uso con pulido superficial	106
Figura 7.7	Estabilidad en el tiempo del electrodo sensor almacenado bajo condiciones de refrigeración (3 °C) sumergido en solución buffer de fosfatos pH 7	108
Figura 7.8	Estabilidad en el tiempo del electrodo almacenado bajo condiciones de refrigeración (3 °C) en seco.....	110

Figura 7.9 Estabilidad del electrodo sensor almacenado en condiciones de temperatura ambiente (20 ± 2 °C), en seco	112
Figura 7.10 Estabilidad de la pasta de carbono almacenada bajo condiciones de refrigeración (3-5 °C)	113
Figura 8.1 Oxidación enzimática del ácido ascórbico en presencia de la enzima Ascorbato oxidasa	123
Figura 8.2 Preparación de las esferas de alginato de sodio con la enzima inmovilizada	124
Figura 8.3 Esferas de alginato de sodio con la enzima inmovilizada inmersas en la solución de CaCl_2	125
Figura 8.4 Eliminación enzimática de ácido ascórbico en función del tiempo, partiendo de la concentración de ácido correspondiente al jugo de manzana puro.....	132
Figura 8.5 Eliminación de AA. Comparación de los resultados obtenidos con las dos técnicas empleadas, para concentraciones equivalentes a una solución de 4% de jugo de manzana	137
Figura 9.1 Imagen del glucómetro digital utilizado como método de referencia (Contour – Bayer).....	146

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Transductores aplicables a biosensores	7
Tabla 1.2 Composición aproximada de los componentes del jugo de manzana	15
Tabla 2.1 Mediadores electroquímicos y sus potenciales de oxidación utilizados con diferentes enzimas	23
Tabla 3.1 Especificaciones técnicas de la GOx incluidas en el certificado de análisis del proveedor (Sigma-Aldrich).....	35
Tabla 3.2 Volúmenes de reactivos utilizados para la determinación de la actividad	40
Tabla 3.3 Volúmenes de reactivos utilizados para la determinación de la actividad	41
Tabla 4.1 Tiempos de respuesta del biosensor para una concentración de glucosa 4.95 mM	58
Tabla 4.2 Resultados DMS para ambos pH y potenciales aplicados, para 5% de GOx en la pasta	60
Tabla 4.3 Resultados DMS para ambos pH y potenciales aplicados, para 8% de GOx en la pasta	60
Tabla 4.4 Resultado DMS para ambos pH y potenciales aplicados, para 10% de GOx en la pasta	60
Tabla 4.5 Resultados comparaciones múltiples pH y carga enzimática, para 0.1 V	61
Tabla 4.6 Resultados comparaciones múltiples pH y carga enzimática, para 0.16 V	61

Tabla 4.7 Resultados comparaciones múltiples pH y carga enzimática, para 0.2 V	61
Tabla 4.8 Resultados comparaciones múltiples pH y carga enzimática, para 0.3 V	61
Tabla 7.1 Coeficiente de variación experimental y coeficientes de Horwitz para análisis de repetibilidad	101
Tabla 7.2 Coeficiente de variación experimental y coeficientes de Horwitz para análisis de Precisión Intermedia	103
Tabla 8.1 Concentración de los compuestos en estudio para una concentración igual a la de una solución al 4% de jugo de manzana	120
Tabla 8.2 Estudio de las interferencias para valores de concentraciones correspondientes a las de un 4% de jugo de manzana (NI: No Interfiere) – Concentración glucosa: 0.00448M	130
Tabla 9.1 Concentración de glucosa en los diferentes jugos estudiados (dilución 5/50)	148

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de biosensores comenzó en 1962 cuando Clark y Lyons propusieron que las enzimas podían inmovilizarse en un detector electroquímico para formar un electrodo enzimático. En la última década, la investigación relacionada a los biosensores para diversas aplicaciones ha recibido gran atención, ya que estos se están convirtiendo en una herramienta imprescindible no sólo en medicina, sino también en control de calidad de alimentos, ya sea el control final de la calidad o durante alguna etapa de su procesamiento.

El jugo de manzana está fundamentalmente constituido por glucosa, fructosa y en menor cantidad por sacarosa. Si la materia prima no ha alcanzado el grado de madurez necesario, también aparece almidón que complica el proceso de clarificación por filtrado. El monitoreo de la calidad de la fruta y la relación de composición de monosacáridos en el jugo permite detectar la adulteración con otras frutas u optimizar el proceso de cortes entre variedades de la misma fruta. La determinación de carbohidratos en alimentos, particularmente en jugos de fruta, se realiza generalmente por análisis rutinarios convencionales, que consumen mucho tiempo y esfuerzo (Southgate, 1991). Una manera de superar estas dificultades es a través del uso de biosensores específicos.

A manera de introducción de esta tesis, en primer lugar se presenta una reseña acerca de los biosensores, se detallan sus características y las diferentes maneras de clasificarlos. Además se hace una descripción de los carbohidratos, su clasificación, los métodos de determinación más frecuentemente utilizados por la industria alimenticia y

su rol en los alimentos, así como también se hace una breve introducción acerca del jugo de manzana, cuyo análisis es el objetivo de este trabajo.

1.1 Biosensores

Un sensor químico, según la IUPAC (Thévenot, 1999), es un dispositivo que transforma la información química en una señal analítica y útil. Los sensores químicos usualmente contienen dos componentes básicos conectados en serie: un sistema de reconocimiento químico (receptor) y un transductor fisicoquímico. Los biosensores son sensores químicos en los que el sistema de reconocimiento utiliza un mecanismo bioquímico.

El sistema de reconocimiento biológico traduce la información desde un dominio bioquímico, usualmente la concentración de un analito, en una señal de salida química o física con una sensibilidad definida. El principal propósito del sistema de reconocimiento es proveer al sensor un alto grado de selectividad por el analito que desea medirse.

El transductor es la parte del sensor que sirve para transferir la señal desde el dominio de salida del sistema de reconocimiento al dominio eléctrico. Un transductor provee transferencia bidireccional de la señal (de una señal no eléctrica a una eléctrica y viceversa). La parte transductora de un sensor es también llamada detector, sensor o electrodo, pero el término transductor es el que se prefiere utilizar para evitar confusiones. Los transductores se clasifican según el tipo de elemento de reconocimiento o por el modo de transducción electroquímica.

Una definición rigurosa de un biosensor propuesta por la IUPAC indica que es un dispositivo que operando en forma autónoma es capaz de proveer información analítica selectiva cuantitativa o semi-cuantitativa utilizando un elemento de

reconocimiento biológico (enzimas, anticuerpos, etc.) que está en contacto directo con el elemento transductor. La IUPAC recomienda que debe distinguirse claramente de un sistema analítico que incorpora pasos adicionales de separación, tal como la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), o el procesado de una muestra mediante la incorporación de un reactivo específico.

La diversidad de sistemas de reconocimiento molecular y de transductores electroquímicos que pueden ser incorporados en cada biosensor es muy amplia.

Características ideales que debería tener un biosensor:

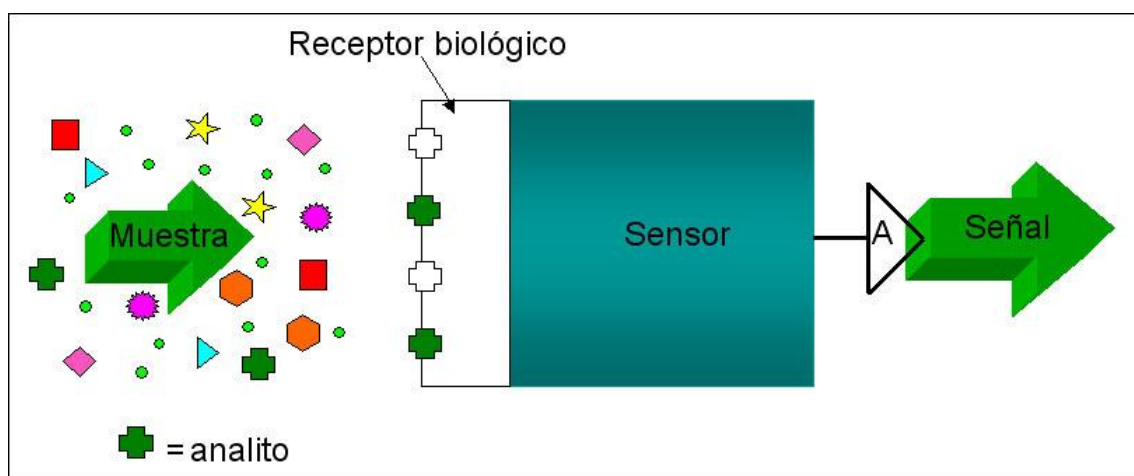
- Sensibilidad: Elevada $\Delta S / \Delta C_{\text{analito}}$ ($S = \text{señal}$).
- Calibración sencilla.
- Respuesta lineal: $\Delta S / \Delta C_{\text{analito}}$ constante en un amplio intervalo de concentraciones.
- Sin histéresis: señal independiente de la historia previa de las mediciones.
- Selectividad: respuesta sólo a los cambios en la concentración del analito objeto de estudio.
- Respuesta dinámica: rápida respuesta a la variación de la concentración del analito.
- Estabilidad a largo plazo: electrodo no sujeto a la formación de incrustaciones, u óxido que interfiera en la señal; estabilidad de la molécula biológica.

Los biosensores tienen diferentes propiedades inherentes, que pueden agruparse como propiedades analíticas, propiedades operacionales y propiedades de diseño. Dentro de las propiedades analíticas se encuentran su alta sensibilidad, su especificidad, y necesitar de un reducido tratamiento de la muestra, entre otras. Algunas de las

propiedades operacionales de los biosensores son su fácil manejo, bajo mantenimiento, respuesta rápida y confiable y bajo costo. Respecto de las propiedades de diseño se incluyen: sistema fácilmente automatizable, desechable/reutilizable, sistema robusto e integrado, entre otras.

En la Fig. que se muestra a continuación puede apreciarse el esquema de un biosensor en general.

Figura 1.1 Esquema tipo de un biosensor



Esquema simple que permite comprender el funcionamiento de un biosensor cualquiera sea su tipo. Se muestra el receptor biológico que pueden ser enzimas, ácidos nucleicos, entre otros de los mencionados. En la Fig., el sensor representa tanto el electrodo como el transductor, del cual se obtiene la señal deseada que será registrada posteriormente.

1.1.1 Clasificación de los biosensores

Los biosensores pueden ser clasificados de acuerdo al elemento de reconocimiento biológico que utilizan, de acuerdo al modo de detección de la señal o también de acuerdo al analito o a las reacciones que monitorean (Thévenot, 1999).

1.1.1.1 Clasificación respecto al Receptor: elemento de reconocimiento biológico

1.1.1.1.1 Elemento de reconocimiento biocatalítico

En este caso, el biosensor se basa en una reacción catalizada por macromoléculas, las cuales están presentes en su entorno biológico original, han sido aisladas previamente o han sido sintetizadas. Tiene lugar un consumo continuo del sustrato debido a la presencia del biocatalizador inmovilizado en el sensor y pueden obtenerse respuestas transitorias o estacionarias. Tres tipos de catalizadores son comúnmente usados:

- Enzimas (mono o multienzimáticos)
- Células enteras (microorganismos, tales como bacterias, hongos, células eucariotas o levaduras) u organelas celulares o partículas (mitocondria, pared celular)
- Tejidos (láminas de tejido animal o vegetal)

Los biosensores biocatalíticos son los más conocidos y estudiados y han sido los que con más frecuencia se han aplicado a matrices biológicas desde el trabajo pionero de Clark y Lyons, quienes propusieron en el año 1962 que las enzimas podían ser inmovilizadas en un detector electroquímico para formar un electrodo enzimático (Wang, 2001). Dentro de los biosensores biocatalíticos, aquellos que utilizan enzimas son los más frecuentemente utilizados.

Las ventajas de utilizar enzimas como elementos de reconocimiento son su elevada sensibilidad, respuesta específica, bajo tiempo de ensayo, fácil manejo.

Las desventajas de los biosensores enzimáticos son su vida limitada y que su estabilidad depende fuertemente del medio.

1.1.1.1.2 Biocomplejo o elemento de reconocimiento por bioafinidad

La operación del biosensor se basa en la interacción del analito con macromoléculas o ensamblajes moleculares organizados que han sido aislados de su entorno biológico original o han sido sintetizados. Usualmente se alcanza el equilibrio y no continúa el consumo neto de analito por el agente inmovilizado. Estas respuestas en el equilibrio son monitoreadas por el detector integrado. Dentro de este tipo de biosensores se encuentran aquellos basados en la interacción Anticuerpo-antígeno y sistemas del tipo Receptor/antagonista/agonista. Las moléculas receptoras pueden ser anticuerpos (inmunosensores), ácidos nucleicos (genosensores) u hormonas.

Los biosensores basados en biocomplejos, a pesar de mostrar un comportamiento prometedor, aún no han alcanzado la etapa de desarrollo avanzada que se ha logrado con los sistemas que se basan en biocatalizadores. Como están basados en reacciones de equilibrio, generalmente presentan un comportamiento lineal en un intervalo de concentraciones muy pequeño y frecuentemente no permiten el control continuo de la concentración del analito. Además, la operación de estos biosensores pueden ser dificultosa en una matriz biológica porque su capa de detección tiene que estar en contacto directo con la muestra o porque puede no ser posible incorporar una membrana externa para separar el elemento sensor de la matriz de la muestra.

1.1.1.2 Clasificación de acuerdo al modo de detección

En la tabla que se muestra a continuación se detallan los distintos tipos de transductores que pueden ser utilizados en biosensores.

Tabla 1.1 Transductores aplicables a biosensores

Transductor	Medida
Electroquímico	Conductimétrico
	Amperométrico
	Potenciométrico
Nanométrico	Mecánico
	Fotónico
	Eléctrico
Piezoeléctrico	Onda acústica en masa
	Microbalanza de cristal de cuarzo
	Onda acústica superficial
Óptico	IR;UV/V; Dispersión; Refracción; Luminiscencia
	Onda evanescente
	Interferometría
	Resonancia de plasmón de superficie
	Fibra óptica

Los más ampliamente empleados en esta área son los transductores electroquímicos, razón por la cual sólo serán brevemente descritas las características principales de esta clase de transductores (Thévenot, 1999).

1.1.1.2.1 Transductores electroquímicos

Amperometría

La amperometría se basa en la medición de la corriente resultante de la oxidación o reducción electroquímica de una especie electroactiva. Usualmente se realiza manteniendo constante con respecto a un electrodo de referencia el potencial de un electrodo de trabajo de Pt, Au o C o de una serie de electrodos. La corriente resultante se correlaciona directamente con la concentración de la especie electroactiva o su velocidad de producción o consumo dentro de la capa biocatalítica adyacente.

Como las velocidades de las reacciones biocatalíticas usualmente son de primer orden con respecto a la concentración de analito en el seno de la solución, las corrientes de estado estacionario son proporcionales a dicha concentración.

Ventajas: Robustos, sensibles, rápidos, económicos, automatización sencilla.

Desventajas: sensible a interferencias.

Potenciometría

Las mediciones potenciométricas implican la determinación de la diferencia de potencial entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia o bien entre dos electrodos de referencia separados por una membrana permselectiva, cuando no circula una corriente significativa entre ellos. El transductor puede ser un electrodo ión-selectivo (ISE), que es un sensor electroquímico basado en una película delgada o una membrana selectiva como elemento de reconocimiento.

Ventajas: fácil operación, económicos y versátiles

Desventajas: Tienen menor sensibilidad que los transductores amperométricos.

Conductimetría

Muchas reacciones enzimáticas y muchos receptores biológicos de membrana pueden ser monitoreados por conductimetría iónica o dispositivos impedimétricos, usando microelectrodos interdigitados. Debido a que la sensibilidad de la medición está afectada por la conductancia paralela de la solución muestra, por lo general se realiza una medida diferencial empleando un sensor con la enzima y otro idéntico sin enzima.

Ventajas: Económicos, confiables, fácil automatización.

Desventajas: Falta de selectividad

1.1.1.3 Clasificación de acuerdo al analito o reacciones que son monitoreadas

Como se mencionó al inicio de este capítulo, los biosensores también pueden ser clasificados de acuerdo a los analitos o reacciones que monitorean. Debe claramente diferenciarse entre el monitoreo directo del analito, y el monitoreo indirecto de inhibidores (Thévenot, 1999).

1.1.1.3.1 Monitoreo directo del analito

El monitoreo directo del analito ha sido la mayor aplicación de los biosensores. Sin embargo, el mismo biosensor puede ser una herramienta útil también para la determinación directa de la actividad de enzimas o células vivas mediante la medición, en forma continua o secuencial, de la producción o el consumo de un determinado compuesto.

1.1.1.3.2 Control indirecto del inhibidor o activador del receptor bioquímico

En forma alternativa, los biosensores han sido desarrollados para el monitoreo indirecto de sustancias pesticidas orgánicas o inorgánicas que inhiben las propiedades biocatalíticas del biosensor. Sin embargo, el sistema es usualmente irreversible. Su potencial uso, especialmente para monitoreo ambiental, es a menudo utilizado como un sistema de alerta que no requiere la medición exacta de la concentración del analito.

1.2 Los carbohidratos

1.2.1 Generalidades

Los carbohidratos son la mayor clase de compuestos naturales orgánicos. El término carbohidrato expresa una composición elemental, hace mucho tiempo determinada, de $C_x(H_2O)_y$ que contiene carbono, hidrógeno y oxígeno. Son

carbohidratos los diferentes azúcares, almidones, celulosa, hemicelulosa, pectinas y numerosas gomas, los cuales son todos importantes para el mantenimiento de la vida de animales y plantas.

Aunque la estructura de muchos hidratos de carbono parece ser muy compleja, por lo general la química de estas sustancias implica sólo dos grupos funcionales, un grupo carbonilo de un aldehído o una cetona y un hidroxilo de algún alcohol.

Los azúcares simples o monosacáridos son los bloques constructores de los hidratos de carbono. Son moléculas de peso molecular bajo y son polihidroxi aldehidos o cetonas con cinco, seis, siete u ocho átomos de carbono y son clasificados apropiadamente como pentosas, hexosas, heptosas u octosas, respectivamente. También pueden ser designados por nombres más específicos, como aldohexosas o ketohexosas para denotar el tipo de compuesto carbonilo que presentan. Se representan por la forma empírica general $C_n(H_2O)_n$ y cuando dos monosacáridos se unen, dan lugar a un disacárido. Todos los monosacáridos son azúcares reductores.

De 2 a 10 monosacáridos unidos forman la clase de los oligosacáridos, son solubles en agua y muy abundantes en la naturaleza. Si son más de diez monosacáridos unidos se conocen como polisacáridos, que son polímeros de alto peso molecular.

Un ejemplo de monosacárido es la D-glucosa, el azúcar más abundante de todos. La celulosa y el almidón son dos polisacáridos ambos polímeros de la D-glucosa.

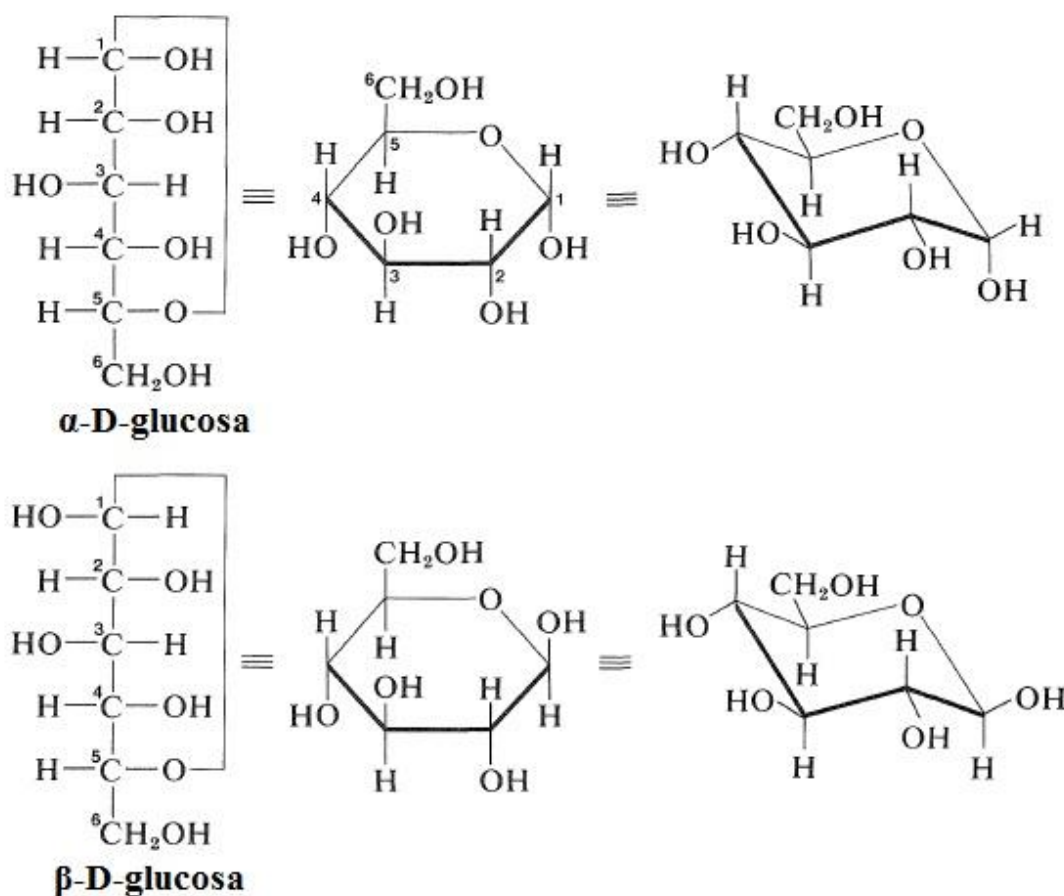
Algunos polisacáridos son lineales, mientras que otros poseen una estructura ramificada.

1.2.2 La glucosa

La D-glucosa es un monosacárido con forma molecular $C_6H_{12}O_6$ y es la aldohexosa (seis carbonos con un grupo terminal aldehído). La glucosa se encuentra en

frutas, plantas, miel, en la sangre de animales, y combinada en muchos glucósidos, disacáridos y polisacáridos. En esta molécula, el carbono 1 es asimétrico, por lo que existen dos estereoisómeros, dependiendo de si el grupo $-OH$ de la molécula está debajo (α) o encima (β) del átomo relativo de carbono, tal como se muestra en la siguiente Fig.

Figura 1.2 Diferentes configuraciones de los anómeros de la glucosa



Respecto a la mutarrotación de las formas anoméricas de la glucosa, las formas cristalinas de α y β glucosa son muy estables, pero en solución cada forma cambia lentamente a una mezcla en equilibrio de ambas. Este proceso puede observarse por el decrecimiento en la rotación óptica del anómero α y un incremento para el anómero β . Este fenómeno es conocido como mutarrotación y es común en azúcares reductores.

En el equilibrio, para el caso de la glucosa, están presentes aproximadamente 64% de anómero β y 36% de anómero α . Esta preponderancia del anómero β se debe a que ésta configuración es más estable (Roberts, 1977).

Existen enzimas específicas para la glucosa: glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa y glucosa deshidrogenasa. La enzima más ampliamente utilizada en aplicaciones analíticas es la glucosa oxidasa. Esta enzima oxida a la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno usando oxígeno molecular como aceptor de electrones (Yildiz, 2005).

Es muy importante el control de la glucosa en los alimentos, ya sea meramente para el control de la calidad del producto o para informar sobre su contenido en el alimento y evitar así posibles problemas de salud.

1.2.3 Métodos de determinación de carbohidratos

Dada la importancia de los carbohidratos se han desarrollado diferentes métodos para su determinación en alimentos. Entre los métodos más importantes y más ampliamente utilizados podemos mencionar los siguientes: Fehling, Benedict y Somogyi entre otros. Todos ellos se basan en el mismo principio. Todos los azúcares con un grupo aldehído libre o un grupo cetónico se clasifican como azúcares reductores y se transforman fácilmente en enedíoles (reductonas) al calentarlos en soluciones alcalinas. Dichos enedíoles son altamente reactivos y se oxidan muy fácilmente en presencia de oxígeno u otros compuestos oxidantes, por lo tanto, los azúcares en solución alcalina rápidamente reducen iones oxidantes como Ag^+ , Hg^+ , Cu^{2+} y $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ y los azúcares se oxidan formando mezclas complejas de ácidos. Esta acción reductora es la que se utiliza tanto en determinaciones cualitativas como cuantitativas. Respecto a cada uno de los test en particular, los test de Fehling y Benedict permiten

confirmar o no la presencia de azúcares reductores. En ambos, se inicia la reacción en una solución de sulfato de cobre en solución alcalina de citrato de color azul oscuro. Luego de la ebullición, la presencia de azúcares reductores se confirmará por la coloración rojo ladrillo de la solución con formación de un precipitado. En el caso del test de Somogyi, la determinación de azúcares reductores se basa en el principio de que cuando un azúcar reductor es calentado en una solución de tartrato de cobre alcalino (reactivo del método), se reduce el cobre desde el estado cúprico a cuproso formándose óxido cuproso. Cuando este óxido cuproso es tratado con ácido arseno-molibdico (reactivo del método), tiene lugar la reducción de éste ácido a molibdeno dando una coloración azul al medio. La concentración de azúcares reductores se determina por comparación con una curva de calibración usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm.

Tanto estos métodos químicos-colorimétricos, como la utilización de HPLC, entre otros, son ensayos convencionales que requieren mucho tiempo y esfuerzo por parte del operador no entregando resultados en forma inmediata, son técnicas que necesitan en muchos casos pasos previos de extracción de la muestra, muchas de ellas requieren un operador entrenado. Además, cuando una determinación de azúcares es crítica, es necesario aplicar dos o más de estos métodos en paralelo, ya que ciertas sustancias presentes en las muestras pueden causar interferencias. Por ejemplo, en el test de Somogyi todas las sustancias con propiedades reductoras u oxidantes pueden causar interferencias (Fournier, 2001).

Para evitar los inconvenientes que traen consigo las técnicas convencionales surge la idea de emplear biosensores para determinar distintos componentes de los jugos y otros alimentos, ya que la principal ventaja de un biosensor es el rápido tiempo de

respuesta que permite una medición en línea, cuestión muy importantes para el control de la calidad y análisis de aseguramiento de la calidad.

1.3 El jugo de manzana

Argentina es el quinto productor mundial de jugo concentrado de manzana, ubicándose como líder del Hemisferio Sur en este producto. Las exportaciones argentinas concentran el 10% del comercio mundial, siendo el cuarto exportador en el orden internacional (Ablin A., 2011; Ablin A., 2012)

Más de la mitad de la producción argentina de manzanas (en promedio es de un millón de toneladas anuales) se destina a la industria, 90% de cuya producción se exporta en promedio a los Estados Unidos como primer destino.

Cabe mencionar que la industria requiere aproximadamente 7 kg de manzana para obtener 1 kg de jugo concentrado.

Dependiendo del uso final, se definen dos tipos de jugos concentrados de manzana. El jugo “clarificado” alcanza una concentración entre 70° - 71 °Brix y es utilizado en la industria del jugo y por los productores de gaseosas como edulcorante; y el jugo denominado “Cloudy” cuya concentración oscila los 45 °Brix y está principalmente destinado a la producción de jugos y néctares.

Argentina cuenta con alrededor de 17000 hectáreas de manzanos plantadas en Río Negro, que originan el 90% de la producción total, y el 10% restante se completa con la producción de Neuquén y Mendoza (Ablin, 2011).

En la tabla 1.2 se muestra la composición aproximada del jugo de manzana (Camerlingo, 2007).

Tabla 1.2 Composición aproximada de los componentes del jugo de manzana

Componente	Concentración [g/L] (L:litro)
<i>Agua</i>	860-900
<i>Azúcares</i>	100-120
<i>Fructosa</i>	46-70
<i>Sacarosa</i>	27
<i>Glucosa</i>	20
<i>Acido málico</i>	3-7
<i>Pectina</i>	1-5
<i>Almidón</i>	0.5-5
<i>Polifenoles</i>	1
<i>Proteínas</i>	0.6
<i>Vitaminas (Principalmente Ácido Ascórbico)</i>	0.05
<i>Cenizas</i>	2

Estas concentraciones resultan muy variables dependiendo de la variedad de la manzana que se utilice, la época y el lugar de la cosecha, entre otros parámetros, pero nos sirven para tener una referencia de las concentraciones aproximadas.

1.4 Objetivos

El objetivo general de la presente tesis es el diseño y la construcción de un biosensor amperométrico de rápida respuesta y bajo costo, utilizable en la industria de los alimentos, en particular para determinar glucosa en jugo clarificado de manzana.

Dentro de este objetivo general están contenidos los siguientes objetivos específicos:

- Selección de un soporte adecuado y del método de inmovilización de la enzima, estudio de su actividad en el soporte.

- Construcción del biosensor y búsqueda de las condiciones óptimas para la detección de glucosa
- Obtención de la curva de calibración y análisis de la cinética enzimática en el electrodo.
- Análisis de las características analíticas del biosensor, tales como su estabilidad, precisión intermedia y repetibilidad, tiempo de respuesta, entre otras.
- Estudio de interferencias producidas por sustancias presentes en el jugo de manzana, y eliminación de las mismas en caso de haberlas.
- Aplicación en muestras reales y comparación con algún método de referencia.

CAPÍTULO 2

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL BIODENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

2.1 Introducción

El desarrollo de biosensores amperométricos es una de las principales áreas de interés en investigación respecto a la determinación de sustancias. Tal como se mencionó en el capítulo 1, numerosos métodos colorimétricos, HPLC, electroforesis de capilaridad, entre otros, son reportados para la determinación de glucosa. Estos métodos consumen mucho esfuerzo por parte del operador, así como también consumen tiempo y son métodos costosos.

Los biosensores que contienen enzimas han sido ampliamente aplicados en química y biología debido a su elevada sensibilidad y su selectividad además de su bajo costo y las posibilidades de miniaturización y automatización (Yildiz, 2005). En análisis de alimentos, la mayoría de los biosensores electroquímicos se basan en la amperometría en combinación con oxidasas. Los electrodos amperométricos y las enzimas oxidasas han mostrado muy buenos resultados por la facilidad de las mediciones asociado con la elevada selectividad de las reacciones enzimáticas (Mello, 2002).

El diseño del biosensor comienza con el estudio y la selección de los componentes que formarán parte del mismo, elección de las técnicas que serán empleadas en el desarrollo del sensor y estudio de la factibilidad de las mismas.

En este capítulo se presentan los diferentes estudios que se llevaron a cabo para el diseño y la construcción del biosensor amperométrico para determinar glucosa en

jugos de manzana. Entre estos estudios se encuentran la elección de los materiales de construcción del biosensor, la inmovilización de la enzima en el soporte adecuado, y la puesta a punto del equipo (biosensor) que será utilizado para la realización de las actividades involucradas en la presente tesis.

2.2 Inmovilización enzimática. Métodos de inmovilización

Se entiende por enzima inmovilizada aquella física o químicamente asociada con (o contenida en) un soporte o matriz.

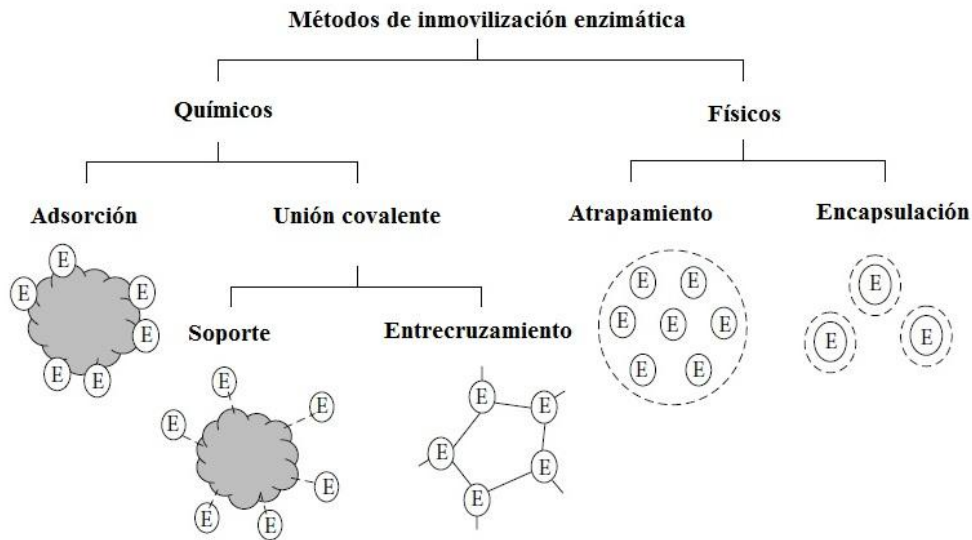
Desde el desarrollo del primer sensor enzimático para glucosa descrito por Clark y Lyons en el año 1962, en el cual la glucosa oxidasa fue inmovilizada entre dos membranas, se han publicado numerosos trabajos relacionados con los métodos de inmovilización y el desarrollo de biosensores. Diversos receptores biológicos tales como enzimas, anticuerpos, células o tejidos, con alta actividad biológica, pueden ser inmovilizados en una delgada capa de la superficie del transductor mediante la utilización de diferentes procedimientos (Thévenot, 1999).

Las propiedades deseables de un soporte son: elevada resistencia mecánica, física y biológica, insolubilidad, hidrofiliidad, regenerabilidad, bajo costo.

Las técnicas empleadas para la inmovilización del material biológico se pueden dividir en métodos físicos y métodos químicos.

En la Fig. 2.1 se resumen gráficamente los diferentes tipos de inmovilización existentes. Es importante mencionar que dentro de cada uno de estos métodos existen numerosas variantes, y además también es posible utilizar combinaciones de los diferentes métodos de inmovilización (Taher, 2011).

Figura 2.1 Resumen gráfico de los distintos tipos de inmovilización



La inmovilización por atrapamiento o inclusión de la enzima en una matriz se utiliza en gran medida en la fabricación de electrodos enzimáticos compuestos.

Los materiales compuestos son el resultado de la mezcla de dos o más componentes con características diferentes entre sí, y que le dan al material final propiedades físicas, químicas y mecánicas distintas a las de cada componente por separado.

Cuando una enzima es inmovilizada su actividad se modifica. Las razones de ello son numerosas, pero podemos distinguir tres influencias principales: efectos conformacionales, de partición y difusionales.

La inmovilización puede causar modificaciones estructurales en la proteína, reduciendo la eficacia catalítica de la enzima. El proceso de inmovilización también puede limitar el acceso al centro activo de la enzima, reduciendo así su actividad.

Los efectos de partición ocurren cuando las concentraciones de reactivos son diferentes en la superficie del soporte y en el seno de la solución.

Los efectos difusionales o de transferencia de masa pueden ser internos o externos. Alrededor de una partícula de catalizador en una solución de sustrato, se forma una película de líquido estático, de espesor variable en función de la agitación del medio. El sustrato debe atravesar por difusión molecular esta película para llegar al sitio activo de la enzima. Si la velocidad de conversión catalítica es mayor que la velocidad de difusión del reactivo en esta capa, la concentración de reactivo en la superficie será menor que en la solución. La resistencia interna a la transferencia de masa surge cuando las enzimas son inmovilizadas en polímeros, donde el sustrato debe además difundir al interior del soporte (Gacesa, 1990).

2.3 Materiales y métodos

Para la determinación de glucosa en jugos de frutas se diseñó y construyó un biosensor amperométrico. El electrodo sensor es un electrodo de pasta de carbono. La pasta de carbono está constituida por una mezcla de grafito en polvo que actúa como elemento conductor, parafina líquida (UVASOL-MERCK, Germany) que cumple el rol de aglomerante, ferroceno (cat. F408, ALDRICH, Germany) como mediador electroquímico (FcH) y la enzima Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (tipo X-S, G7141, SIGMA ALDRICH, USA) (GO_x).



En el diseño se eligió trabajar con un biosensor de segunda generación, es decir, se incorpora en la pasta de carbono un mediador electroquímico, sustancias redox que facilitan la transferencia de electrones entre el electrodo y la enzima. En este caso se seleccionó el ferroceno como mediador electroquímico, ya que como se indicará más adelante en la tesis es uno de los mediadores más ampliamente utilizados en la fabricación de biosensores y en consecuencia uno de los más estudiados.

El método más comúnmente usado para la determinación de la concentración de glucosa es mediante la aplicación de biosensores que utilicen la enzima glucosa oxidasa (Stoces, 2011). En estos sistemas, el aceptor más común de electrones es el O_2 , generándose H_2O_2 como producto de la reacción enzimática, tal como se muestra en la reacción que se presenta a continuación.



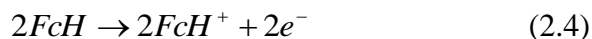
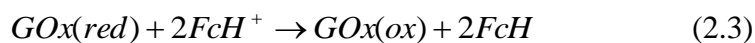
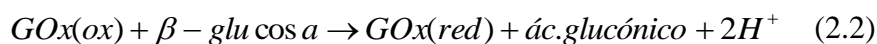
En estos casos, la reacción enzimática se vuelve completamente dependiente de la concentración de oxígeno en el medio el cual actúa como aceptor de electrones. Sin embargo, este método es altamente sensible a muchas especies interferentes presentes en los jugos de frutas. Además, los dispositivos que utilizan oxidasas y oxígeno del medio como aceptor fisiológico de electrones incorporarían errores en las señales resultantes debido a las fluctuaciones en la concentración de oxígeno con consecuentes limitaciones estequiométricas (Wang, 2001; Cass, 1984; Pandey, 2003). Esta limitación (conocida como “déficit de oxígeno”), se debe a que las concentraciones normales de oxígeno son de un orden de magnitud más bajo que los niveles fisiológicos de glucosa (Wang, 2001).

Con el objetivo de resolver este problema, muchos mediadores electroquímicos fueron empleados como aceptores de electrones en el desarrollo de sensores amperométricos de glucosa (Patel, 2003). Los electrodos enzimáticos que utilizan mediadores electroquímicos son menos sensibles a la aparición de interferencias provocadas por sustancias electroquímicamente activas, debido a que operan a potenciales de electrodo menores (Chaubey, 2001; Cui, 2001).

Como se mencionó previamente los mediadores electroquímicos facilitan la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo. La velocidad directa de transferencia de electrones desde el centro activo hacia el electrodo es usualmente muy baja (Yabuki, 1994) debido a que las enzimas poseen una cubierta de proteína que rodea al centro activo. Por lo tanto si se logra aumentar esta velocidad de transferencia de electrones, se podría trabajar a potenciales más bajos o más negativos donde las contribuciones de especies interferentes fácilmente oxidables son minimizadas o incluso, en algunas ocasiones, eliminadas completamente. Como resultado de estos estudios, en la actualidad las mediciones realizadas con biosensores se han convertido en gran medida en mediciones independientes de la concentración de oxígeno en el medio gracias a la utilización de estos mediadores, y como consecuencia de ello pueden llevarse a cabo a potenciales más bajos.

El ferroceno es uno de los más eficientes mediadores en la transferencia de electrones que se emplea en la construcción de sensores amperométricos (Patel, 2003).

Por lo tanto, al incorporar ferroceno como mediador electroquímico, las reacciones redox que ocurren en el biosensor son:



El uso de estos mediadores, también llamados catalizadores electroquímicos, ha sido uno de los principales factores que han contribuido al desarrollo de los biosensores (Luiz de Mattos, 2005). En la siguiente tabla se muestra una lista de los mediadores electroquímicos más utilizados, su potencial redox y la enzima empleada.

Tabla 2.1 Mediadores electroquímicos y sus potenciales de oxidación utilizados con diferentes enzimas

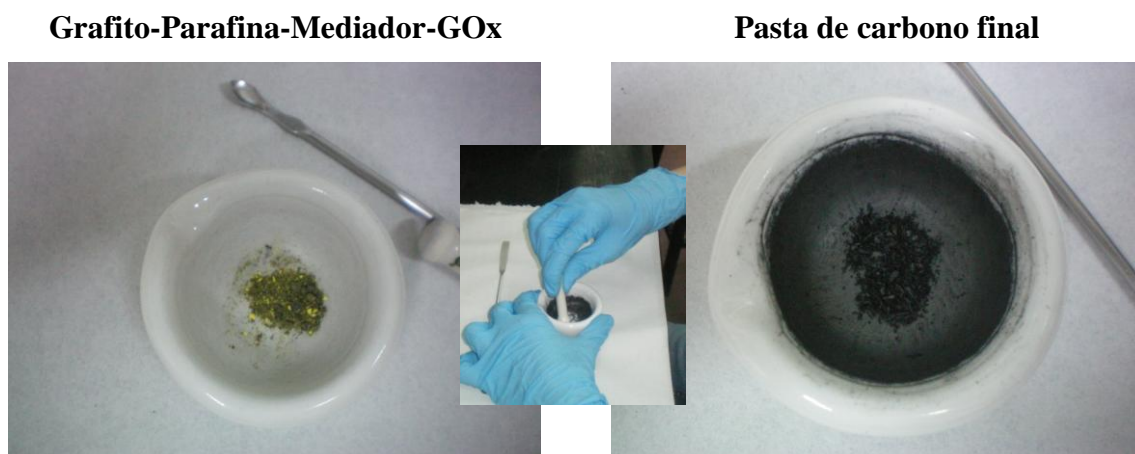
Enzyme	Mediator	Redox potential (versus SCE)
Glucose oxidase	1,1-dimethyl ferrocene	100
	Ferrocene	165
	Vinyl ferrocene	250
	Ferrocene carboxylic acid	275
	Hydroxy methyl ferrocene	185
	[Ru(CN) ₆] ⁴⁻	685
	Benzoquinone	39
	NMP	-161
	TTF	300
	TCNQ	127
	[Fe(CN) ₆] ⁴⁻	180
	Cholesterol oxidase	Hydroxy methyl ferrocene
Ferrocene carboxylic acid		275
Lactate oxidase	[Fe(CN) ₆] ⁴⁻	180
	Ferrocene carboxylic acid	280
Pyruvate oxidase	Hydroquinone	60
	Ferrocene carboxylic acid	275
Xanthine oxidase	Ferrocene carboxylic acid	275
	[Fe(CN) ₆] ⁴⁻	180
Lactate dehydrogenase	Ferrocene carboxylic acid	275
	[Fe(CN) ₆] ³⁻	180
NADH dehydrogenase	TMPD	-10
	Ferrocene carboxylic acid	275
Alcohol dehydrogenase	[Fe(CN) ₆] ³⁻	180
	TMPD	-10
	Ferrocene carboxylic acid	275
Glucose dehydrogenase	<i>N</i> -methyl phenazine	-156
	Ferrocene carboxylic acid	275
	1,1-dimethyl ferrocene	100
	<i>N</i> -ethyl phenazine	-172
Galactose oxidase	TMPD	-10
	Ferrocene carboxylic acid	275
	1,1-dimethyl ferrocene	100

2.3.1 Preparación de la pasta de carbono

La preparación de la pasta de carbono se lleva a cabo en dos etapas. En la primera de estas etapas, se pesan cantidades exactas de grafito en polvo y parafina, y se homogeneiza en mortero por un período de 30 minutos. Así se obtiene lo que llamamos “pasta de carbono inicial”. Esta pasta no contiene material biológico (en nuestro caso la enzima), por lo cual puede ser almacenada por largos períodos de tiempo sin problemas de degradación. En segundo lugar, y al momento de ser utilizada, se prepara la “pasta de carbono final”, la cual se obtiene mezclando una porción de la pasta de carbono inicial con el mediador electroquímico y la enzima, en proporciones determinadas, nuevamente en mortero y por un lapso de 30 minutos. De esta manera obtenemos la pasta de carbono que será utilizada en el biosensor.

En la Fig. 2.2 se muestra el proceso de inmovilización de la enzima, y se puede observar la pasta final resultante.

Figura 2.2 Método de preparación de la pasta de carbono final mediante mezclado en mortero durante un período de 30 minutos



Otro aspecto que se ha estudiado en detalle es la homogeneidad de la pasta obtenida. Es fundamental que se logre en este paso una completa homogeneización de

todos los componentes en la pasta, ya que ello nos permitirá obtener electrodos con señales completamente reproducibles.

La dispersión de la enzima en la pasta de carbono fue caracterizada usando microscopía electrónica de barrido (SEM, LEO EVO40) (Sorrivas, 1986). Las muestras fueron secadas al aire y recubiertas con oro y se metalizaron con oro en una evaporadora de metales en plasma de Argón, marca Pelco 91000 con aproximadamente 200 Angstrom de espesor. Se tomaron imágenes, con el microscopio electrónico de barrido de la superficie del grafito/parafina antes y después de la inmovilización de la enzima.

Otro aspecto de gran importancia en la preparación de la pasta fueron las cantidades de grafito y parafina a utilizarse. La pasta de carbono inicial contiene 5 g de polvo fino de grafito (aproximadamente 77%) y 1.8 mL de parafina líquida (aproximadamente 23%) (Patel, 2003; Kulys, 1999).

El uso de pasta de carbono como material de electrodo ofrece grandes ventajas sobre los materiales sólidos como base del sensor: (1) es una matriz conveniente para la incorporación de componentes biológicos, (2) permite un íntimo contacto entre enzimas, mediadores y sitios de detección permitiendo una rápida transferencia de electrones, (3) es versátil, estable y su superficie puede ser fácilmente renovada con buena reproducibilidad (Rondeau, 1999).

2.3.2 Sistema de trabajo

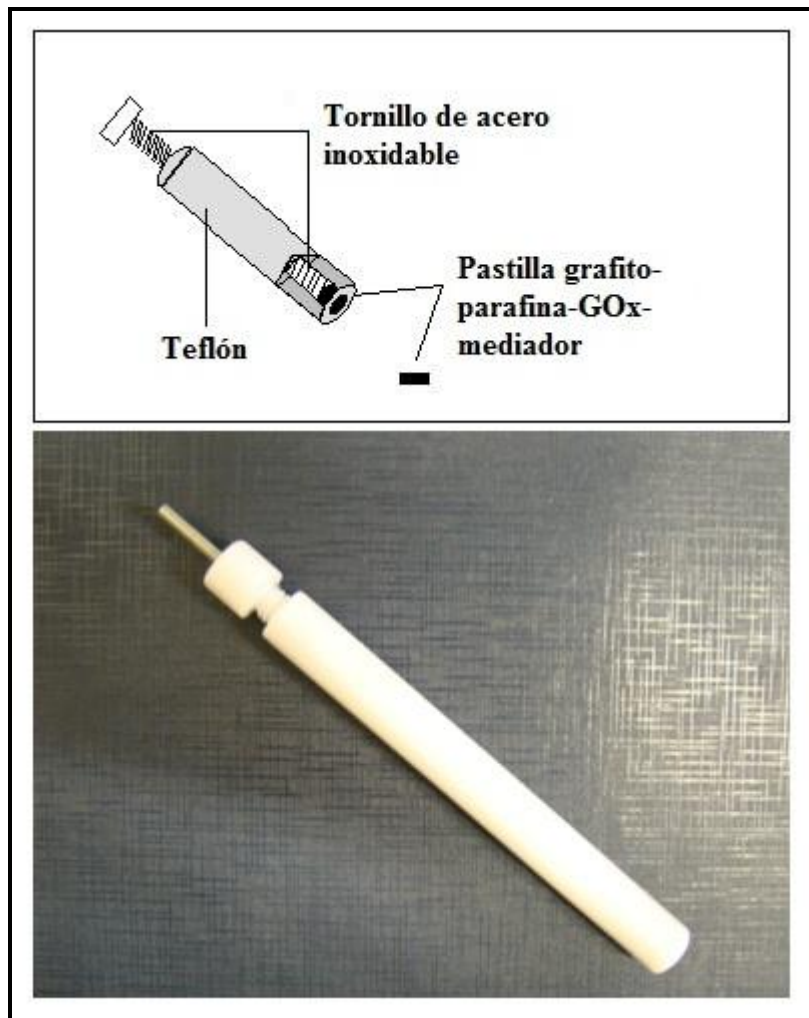
El sistema de trabajo consta de tres partes fundamentales para el funcionamiento.

Sistema de electrodos

Está formado por tres electrodos: Electrodo de trabajo o electrodo sensor, electrodo de referencia y contraelectrodo.

El **electrodo sensor** es básicamente un cilindro de teflón anular dentro del cual se enrosca un cable de acero inoxidable de 0.3 cm de diámetro perfectamente coincidente con el diámetro interno del cilindro de teflón. Este cable de acero actúa como contacto eléctrico. Sobre la base del electrodo se coloca la pasta de carbono y se presiona con el tornillo de acero inoxidable. En la Fig. 2.3 se puede observar el esquema de este electrodo.

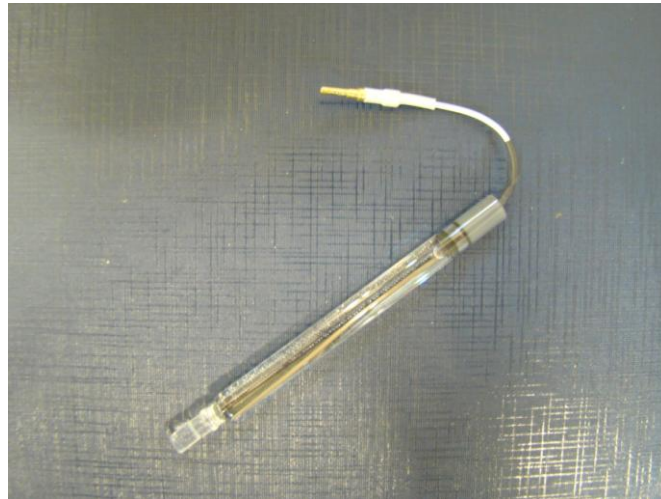
Figura 2.3 Electrodo de pasta de carbono



La superficie sensora tiene un área de 0.07 cm^2 . Es en este electrodo donde sucede la reacción electroquímica en estudio.

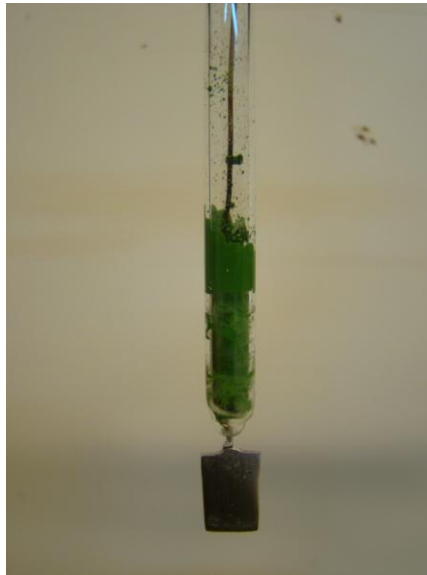
El **electrodo de referencia** es un electrodo de Ag/AgCl comercial, que permite establecer y controlar un potencial conocido para la realización del estudio.

Figura 2.4 Electrodo de referencia



El **contraelectrodo** es un electrodo de platino, formado por una chapa de platino de $8 \times 15 \text{ mm}^2$, unido a un cable de cobre por medio de una soldadura realizada con platino recubierto en su totalidad con una funda de vidrio que impide que el cobre tenga contacto con el medio de reacción. Es también conocido como **electrodo auxiliar** y se emplea para cerrar el circuito eléctrico.

Figura 2.5 Contraelectrodo de platino



Potenciostato

Dispositivo a través del cual se aplica el potencial deseado al electrodo de trabajo para que tenga lugar la reacción enzimática en cuestión. El equipo empleado es un potenciostato Metrhom 641 VA Detector, Switzerland.

Figura 2.6 Potenciostato utilizado en todas las determinaciones amperométricas

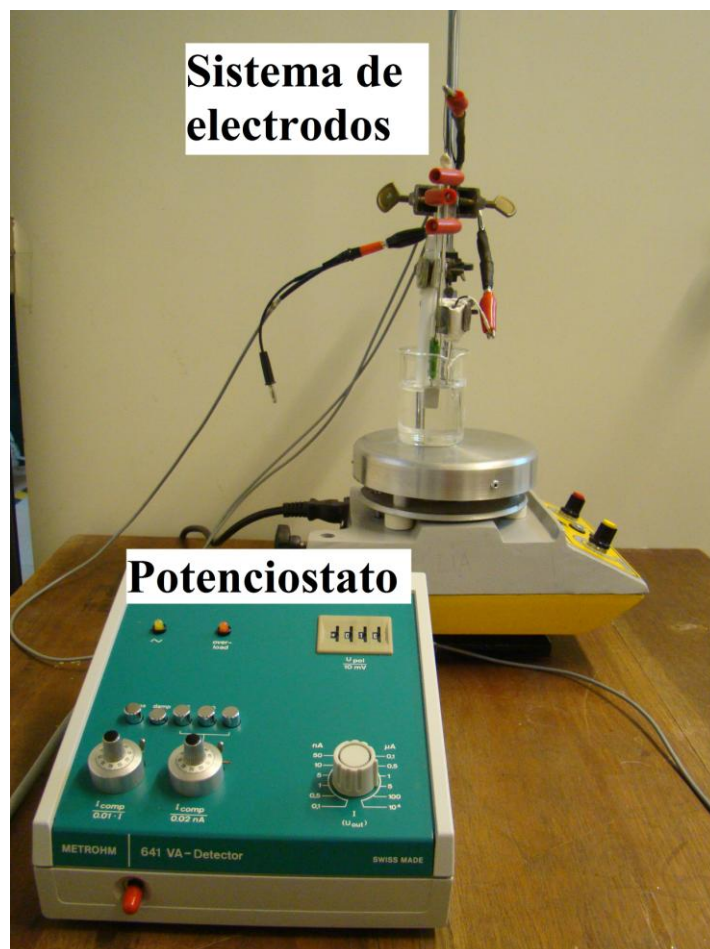


Sistema de adquisición de datos

Tal como su nombre lo indica, es el sistema que nos provee toda la información de cada una de las determinaciones realizadas. Es importante mencionar que se debió realizar una adaptación del sistema de adquisición de datos, ya que el software empleado en dicho sistema correspondía a un software de cromatografía, y los resultados obtenidos se reportaban como “altura de la columna”, resultados que no nos eran de utilidad. Es por esto, que al momento de poner a punto el sistema se realizó una calibración para obtener la relación existente entre la variable “altura de la columna” y la variable “Potencial (V)” que es la que nos interesa.

En la Fig. 2.7 se muestra una fotografía con el sistema de medición conectado.

Figura 2.7 Sistema de medición: Biosensor



2.4 Resultados y discusión

Con respecto al comportamiento de la pasta de carbono, las proporciones seleccionadas de grafito y parafina resultaron tanto mecánicamente como conductivamente excelentes.

Es muy importante mencionar que se debe tener especial cuidado al seleccionar las cantidades de estos dos componentes. El grafito actúa como elemento conductor en el electrodo sensor, y por lo tanto si las concentraciones de grafito son bajas, no habría suficiente conducción en el electrodo, pero por el contrario, si la concentración es muy elevada, sería mecánicamente intratable la pasta por la falta de cohesión de la misma. De manera similar ocurre con la parafina. Altas concentraciones provocarían gran cohesión en la pasta pero baja conductividad, y bajas concentraciones generarían falta de cohesión.

Como se mencionó en el apartado anterior, una cuestión de importancia es el proceso de inmovilización, ya que la pasta resultante debe ser perfectamente homogénea. Es por ello que se ha seleccionado un tiempo de mezclado en mortero de los componentes que integran la pasta de 30 minutos, en el cual se considera que todos los compuestos han sido distribuidos en forma completamente uniforme en la pasta.

A continuación se muestran las micrografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido. Se tomaron micrografías de los componentes por separado y de la pasta final con el fin de conocer la estructura de los mismos.

Figura 2.8 Micrografía SEM de la enzima liofilizada

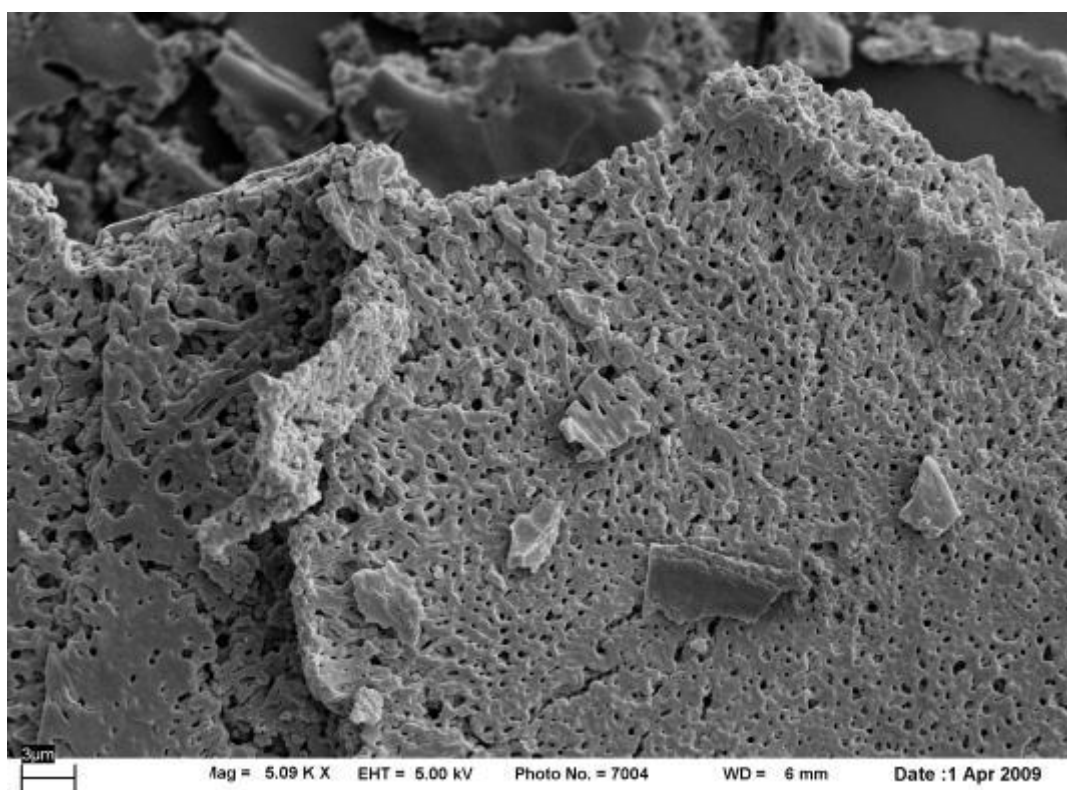


Figura 2.9 Micrografía SEM de la pasta de carbono/parafina

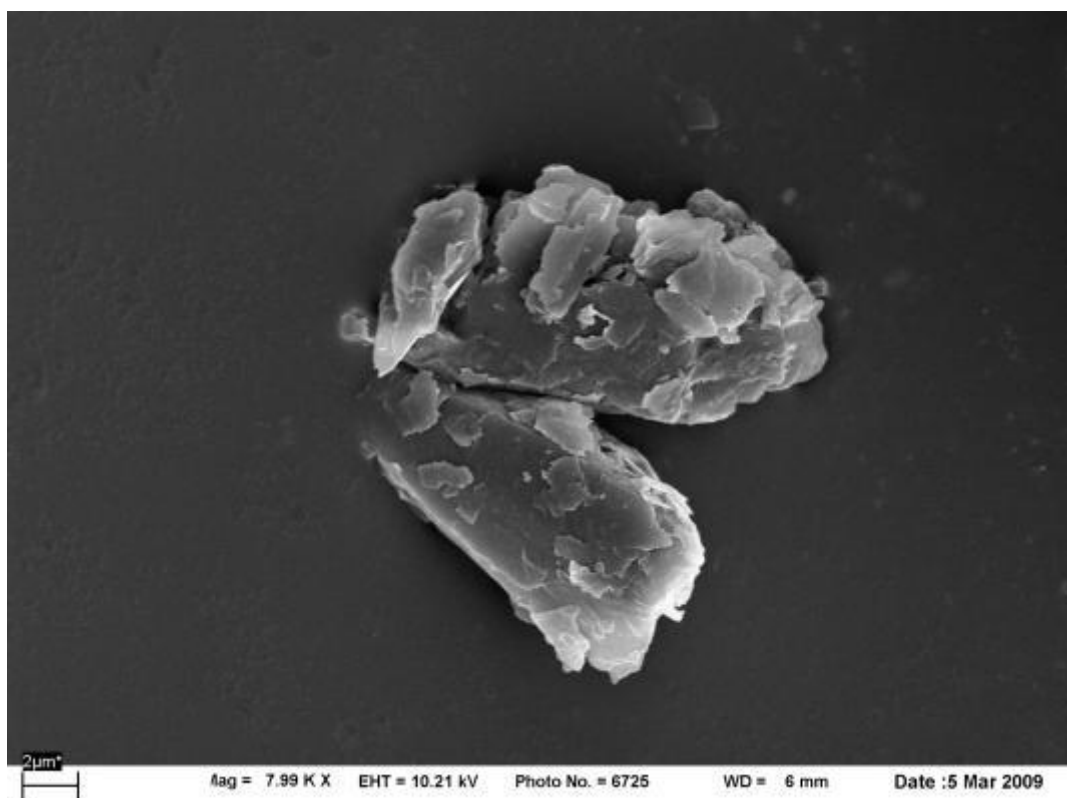
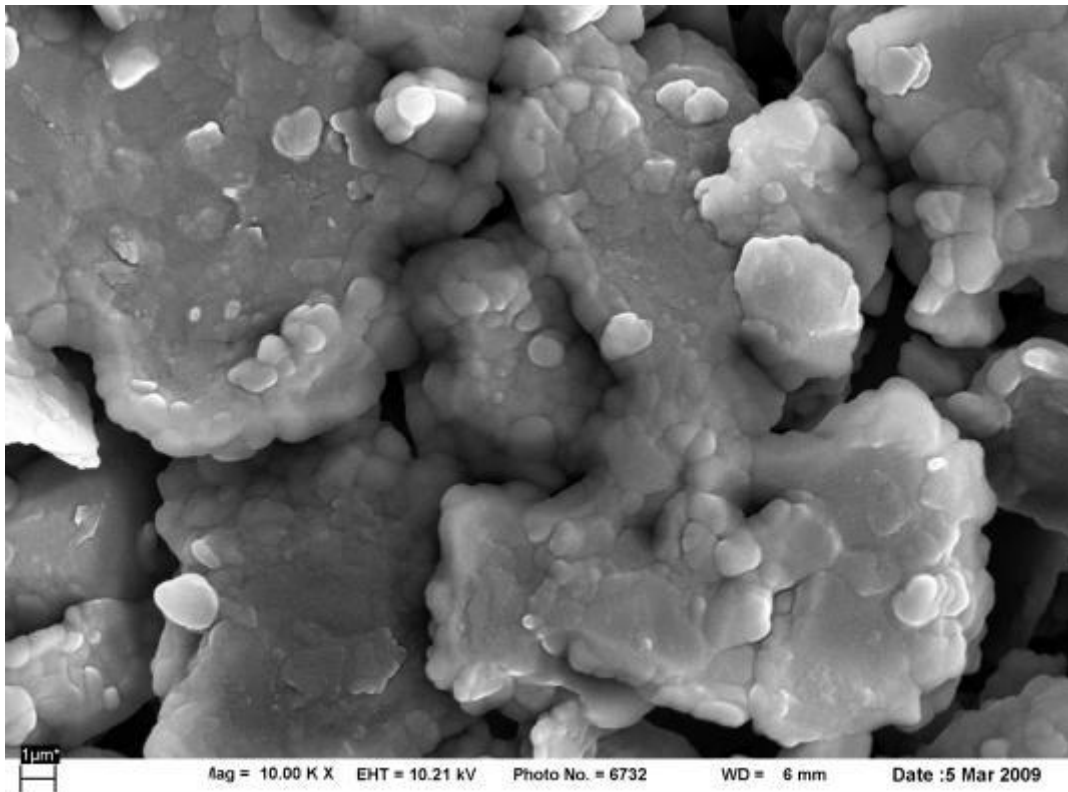


Figura 2.10 Micrografía SEM pasta de carbono final (10000x)



En las Figs. 2.8 y 2.9 se pueden observar las características superficiales de la enzima GOx y de la pasta de carbono/parafina respectivamente, mientras que en la Fig. 2.10 se muestran las características superficiales de la pasta de carbono lista para ser utilizada.

Con respecto a la puesta a punto del sistema global, se logró la completa adaptación del sistema de adquisición de datos cromatográfico mediante la obtención de un patrón de calibrado que nos permite fácilmente correlacionar el parámetro “Altura del pico” con nuestro parámetro de interés “Potencial”. Además se conectó el equipo, se eliminaron los ruidos en la línea, y se realizaron las primeras pruebas, verificándose que el sistema muestra un óptimo funcionamiento, encontrándose completamente preparado para su utilización.

2.5 Conclusiones

A partir de lo expuesto en este capítulo se puede concluir que:

- Los componentes seleccionados para la construcción del electrodo sensor son adecuados, ya que como se mencionó, las partículas inmovilizadas mecánicamente en la matriz grafito/parafina son muy estables
- La inclusión de un mediador electroquímico permitirá trabajar a potenciales más bajos, lo que reducirá considerablemente el riesgo de interferencias.
- El método de inmovilización seleccionado resulta conveniente y satisfactorio, ya que es un método sencillo y se obtiene un depósito tridimensional de la enzima, con lo cual se logra una excelente homogeneidad en todo el soporte.
- El sistema se adaptó a los requerimientos y se puso a punto el biosensor.

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GO_x LIBRE E INMOVILIZADA

3.1 Introducción

La glucosa oxidasa (GO_x) es una flavoproteína que cataliza la oxidación de β-D-glucosa en presencia de oxígeno molecular a δ-gluconolactona, con la subsecuente hidrólisis espontánea a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Zoldák, 2004).

La glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* es usada comercialmente para varias aplicaciones. La aplicación más importante es en biosensores para la determinación cuantitativa de glucosa en bebidas, cuerpos fluidos, y licores fermentados. Es también ampliamente usada en química de los alimentos para la producción de ácido glucónico en preservación de alimentos (Tongbu, 1996).

Las características de la enzima dadas por el fabricante en el certificado de análisis, se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Especificaciones técnicas de la GOx incluidas en el certificado de análisis del proveedor (Sigma-Aldrich)

Nombre del producto	Glucosa oxidasa de <i>Aspergillus niger</i>
Temperatura de almacenamiento	-20 °C
Apariencia	Polvo amarillo
Solubilidad	Soluciones de 1 mg/ml en buffer acetato de sodio 0.05M, pH 5.1
Proteína en Biuret	Aproximadamente 75% (65 a 85%)
Actividad enzimática	100000 a 250000 Unidades/g. sólido, (146000 Unidades/g.sólido)
Definición de Unidad	Una unidad oxidará 1 micromol de Beta-D-glucosa a D-ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por minuto a pH 5.1 a 35 °C

En este capítulo se tiene como objetivo determinar la actividad enzimática tanto de la enzima libre como de la enzima luego de haber sido inmovilizada en la pasta de carbono. En términos generales, se define la unidad de actividad enzimática U, como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato en un minuto.

3.2 Determinación de la actividad enzimática

Existen una gran variedad de técnicas para la determinación de actividades enzimáticas. Las más ampliamente utilizadas son sin duda aquellas que involucran métodos colorimétricos. Dentro de estos métodos la espectrofotometría es generalmente la técnica más utilizada para este fin.

El principio de la espectroscopía consiste básicamente en que si un sustrato o un producto absorben luz a una determinada longitud de onda, entonces la reacción puede ser monitoreada siguiendo los cambios en la absorbancia a esa longitud de onda. La absorbancia A está dada por:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (3.1)$$

donde

I_0 : intensidad de la luz incidente

I : intensidad de la luz transmitida a través de la muestra

La absorbancia se relaciona con la concentración de la sustancia que absorbe la luz en la muestra por medio de la **ley de Lambert-Beer**.

$$A = \varepsilon cl \quad (3.2)$$

donde

ε : coeficiente de extinción molar

c : concentración molar

l : longitud de la trayectoria de la luz a través de la muestra

De ésta manera, a partir de la definición de una unidad de actividad enzimática, podemos conocer la actividad de la enzima en cuestión.

Para análisis enzimáticos, la temperatura de la mezcla de reacción debería mantenerse ± 0.2 °C respecto de la temperatura óptima empleada en el método, lo que implica la necesidad de usar acoplado al espectrofotómetro un baño termostatzado con circulación de agua (Trevor Palmer, 1984).

Dentro de este método colorimétrico existen variadas técnicas, las cuales involucran diferentes reactivos, que son de gran utilidad para conocer la actividad enzimática de la glucosa oxidasa.

Dos de los métodos más frecuentemente encontrados en la bibliografía fueron:

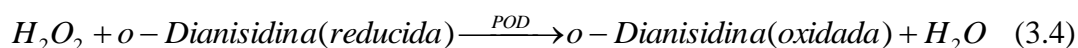
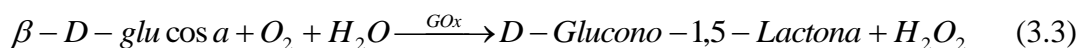
- Método colorimétrico basado en la reacción de Trinder (Rauf, 2006).
- Ensayo enzimático de la Glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) (Sigma, 1996).

3.3 Materiales y métodos

Para llevar a cabo los objetivos planteados en este capítulo, se eligió seguir el procedimiento descrito por Sigma en el año 1996, debido básicamente a que el proveedor de la enzima con la que se trabajó utiliza dicha técnica para realizar los ensayos de actividad cuyos resultados reporta en el certificado de análisis del producto (tabla 3.1).

3.3.1 Ensayo enzimático de GLUCOSA OXIDASA (EC 1.1.3.4)

Principio del método: En este ensayo se producen dos reacciones enzimáticas consecutivas:



donde

POD: Peroxidasa

En la primera de ellas, la glucosa oxidasa cataliza la reacción entre la glucosa, agua y el oxígeno presente en el medio, dando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como uno de los productos. En la segunda reacción, el H_2O_2 y la O-dianisidina reducida (cromóforo), en presencia de la enzima peroxidasa, dan como producto O-dianisidina oxidada de color rojizo.

Se monitorea la absorbancia de la reacción en un espectrofotómetro UV-Visible Record marca SHIMADZU, conectado a un baño termostatzado regulado para mantener una temperatura constante de 35 °C, a una longitud de onda constante de 500 nm durante un período de 5 minutos (período de respuesta lineal de la reacción enzimática). La lectura se convierte posteriormente a unidades de actividad a través de una relación simple.

Las determinaciones se llevaron a cabo en solución buffer de acetato de sodio 50 mM, a pH= 5.1. Bajo estas condiciones la enzima es completamente soluble.

Del mismo modo se determinó la actividad enzimática de GOx luego del proceso de inmovilización. Debe explicarse que no se estudió la actividad de la enzima en el soporte, sino la actividad que la enzima mantiene después de haber ocurrido el proceso de inmovilización, es decir, la enzima es “desorbida” o extraída de la pasta de carbono donde se encuentra retenida. Esta extracción de la enzima resulta relativamente sencilla gracias a la solubilidad que presenta la GOx en las condiciones del medio de reacción.

3.3.2 Preparación de las soluciones necesarias para llevar a cabo el ensayo de actividad

Se prepararon las siguientes soluciones:

Reactivo A: Buffer de acetato de sodio 0.05 M pH 5.1

La solución buffer de acetato de sodio fue preparada utilizando tablas de preparación destinadas a tal fin.

Se utilizó agua destilada previamente hervida durante un período de 10 minutos, para eliminar los gases disueltos en el agua, ya que estos gases pueden afectar el valor de pH final de la solución reguladora.

Tal y como indica el procedimiento de preparación del buffer, se prepararon dos soluciones: (1) Solución A: ácido acético 0.2 M, utilizando ácido acético glacial (ANHEDRA, reactivo analítico, Argentina), (2) Solución B: acetato de sodio 0.2 M, usando como reactivo acetato de sodio trihidratado (3460-01, J.T.BAKER, México).

A partir de las tablas antes mencionadas se mezclaron ciertos volúmenes de solución A y B de acuerdo al pH deseado y posteriormente se agregó igual volumen de agua destilada para ajustar la molaridad deseada de la solución reguladora.

Reactivo B: Solución de o-dianisidina 0.21 mM

La solución de cromóforo se preparó diluyendo 50 mg de o-dianisidina dihidroclorada (D 3252-5G, SIGMA ALDRICH, USA) en 7.6 mL de agua destilada. Luego se diluyó 1 mL de esta solución con 100 mL del buffer de acetato.

Reactivo C: Solución de sustrato β -D(+) glucosa 10% (w/v)

Se pesaron 2.5 g de dextrosa anhidra (ANEDRA, China), se disolvieron en un pequeño volumen de agua destilada y posteriormente se enrasó el matraz a 25 mL con agua destilada.

Reactivo D: o-dianisina 0.17 mM y solución de glucosa 1.72% (w/v) (Reacción Cocktail)

Se preparó este reactivo inmediatamente antes de su uso. Consiste en la mezcla de 24 mL de reactivo B con 5 mL de reactivo C. Para efectuar las réplicas correspondientes se triplicaron los volúmenes de cada reactivo.

Reactivo E: Solución de enzima peroxidasa (POD)

Inmediatamente antes de usar, se preparó la solución de POD, peroxidasa *Horseradish* (tipo II, P8250-5KU, SIGMA ALDRICH, USA). Se necesita una solución que contenga 60 Purpurogallin unidades/ml de peroxidasa, en agua destilada.

Se pesaron 0.0013 g de sólido y se agregaron 5 mL de agua destilada.

Reactivo F: Solución enzimática de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (tipo X-S, G7141, SIGMA ALDRICH, USA). Se preparó una solución enzimática inicial conteniendo 0.2 mg de sólido/ml de reactivo A. Luego, inmediatamente antes de usar se tomaron 0.1 mL de la solución inicial y se agregaron 5 mL de reactivo A.

El procedimiento de la técnica fue el siguiente:

Se tomaron los siguientes reactivos (mL) y se colocaron en cubetas de cuarzo:

Tabla 3.2 Volúmenes de reactivos utilizados para la determinación de la actividad

	Test	Blanco
Reactivo D (mL)	2.9	2.9
Reactivo E (mL)	0.1	0.1

Se mezcló inmediatamente para lograr la completa homogeneización de la muestra y se colocaron las cubetas en el espectrofotómetro termostatzado para equilibrar la temperatura en 35 °C.

Luego se agregaron a las cubetas los siguientes volúmenes de reactivos:

Tabla 3.3 Volúmenes de reactivos utilizados para la determinación de la actividad

	Test	Blanco
Reactivo F (mL)	0.1	-----
Reactivo A (mL)	-----	0.1

Se mezcló rápidamente para lograr la inversión, se colocaron las cubetas dentro del espectrofotómetro y se registró el incremento de la absorbancia durante 5 minutos, tal como se explicó previamente. A partir de la pendiente de la recta obtenida se calcula la actividad enzimática, mediante la siguiente ecuación:

$$Unidades / mL_{enzima} = \frac{(\Delta A_{500nm} / \min)(3.1)}{(7.5)(0.1)} \quad (3.5)$$

donde

3.1= Volumen de muestra en mL

7.5= coeficiente de extinción milimolar de la o-dianisidina oxidada a 500 nm

0.1= volumen de enzima usada en mL

Mediante un cambio se unidades se obtiene la actividad de la enzima en Unidades/g.sólido.

Se modificó la preparación del reactivo F indicada previamente cuando lo que se desea determinar es la actividad de la enzima retenida en el soporte. En primer lugar se

preparó la pasta de carbono necesaria para este análisis siguiendo el patrón previamente detallado en el capítulo 2. Como se mencionó previamente, se determinó la actividad de la enzima luego de la “desorción” de la misma de la pasta de carbono donde fue previamente inmovilizada. Es decir se busca determinar el posible efecto negativo que el proceso de mezclado e inmovilización pudiera producir en la actividad, si es que lo hay. Es por ello que el elemento biológico fue extraído del soporte (pasta de carbono), midiendo luego la actividad enzimática de la enzima desorbida de la pasta. Una vez que la enzima es extraída de la pasta de carbono, se procede de la misma manera que para el caso de la enzima libre, tal y como lo indica el método “**Ensayo enzimático de GLUCOSA OXIDASA (EC 1.1.3.4)**”.

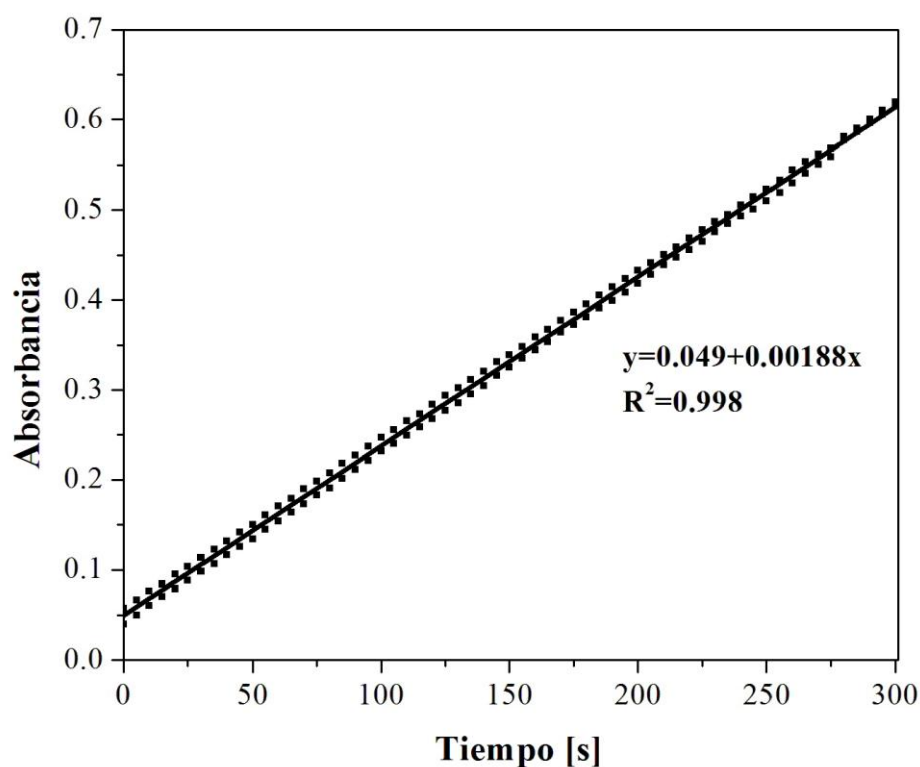
Una manera relativamente sencilla de llevar a cabo la extracción de la enzima de la pasta de carbono, es a partir de la solubilización de la enzima. Se conoce que para las condiciones del medio de reacción empleadas en el procedimiento de determinación de actividad (buffer de acetato de sodio 50 mM, pH 5.1), la enzima es completamente soluble. Por lo tanto, se prepara en un tubo de ensayo la solución de Enzima Glucosa Oxidasa *Reactivo F*, pero teniendo en cuenta que ahora la enzima está en la pasta de carbono, y se procede a agitar vigorosamente el tubo, con ayuda de un agitador de tubos, durante aproximadamente 5 minutos, lo que provoca la disolución de la enzima en la solución. Se mide la actividad del sobrenadante resultante, que corresponde a la actividad de la enzima luego de su inmovilización y posterior extracción del soporte.

La pasta de carbono se preparó el mismo día en que fue llevada a cabo la experiencia. El objetivo es medir la actividad de la enzima sin pérdidas como por ejemplo disminución de la actividad debido al almacenamiento.

3.4 Resultados y discusión

En la Fig. 3.1 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo correspondiente a la enzima libre, tal como fue entregada por el proveedor. La experiencia se realizó por duplicado y se ajustaron linealmente los datos correspondientes.

Figura 3.1 Incremento de la absorbancia en el tiempo para la reacción de la GOx libre



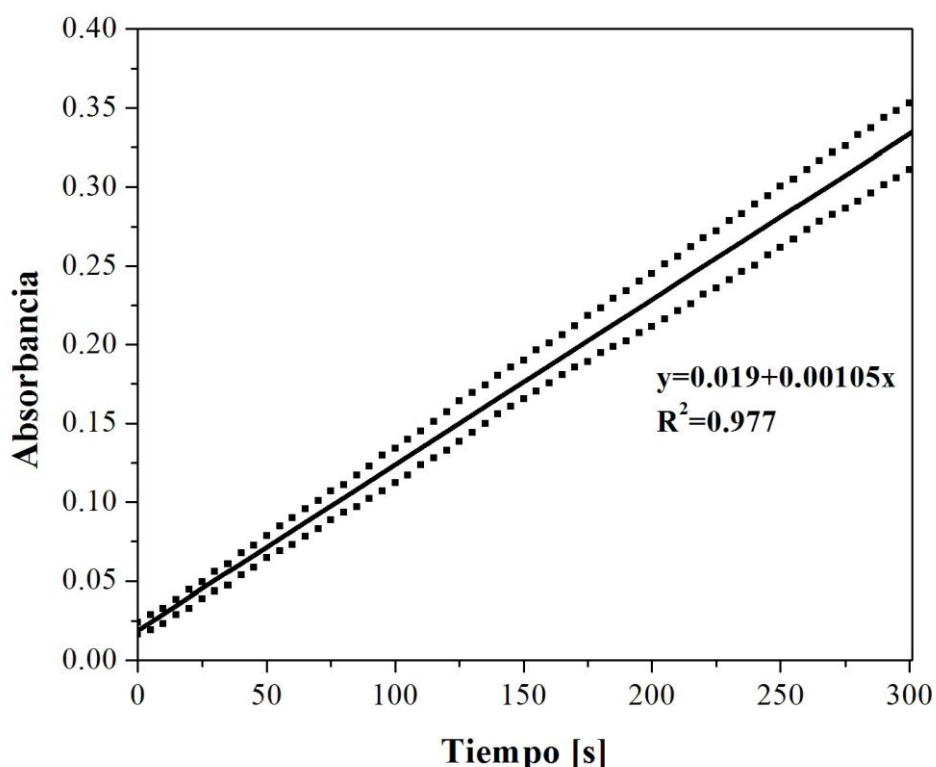
A partir de la pendiente de la recta obtenida se determinó el valor de actividad de la enzima GOx libre: **115000 unidades/g.sólido**

En el certificado de análisis del proveedor, se reporta que la actividad enzimática del producto debe estar comprendida en el rango desde 100000-250000 unidades/g.sólido.

La actividad calculada por medio de la técnica experimental se encuentra dentro del rango de actividad reportado por el proveedor, lo que indica que la enzima se encuentra en óptimas condiciones para ser utilizada.

Para la enzima “desorbida” del soporte, al igual que en el caso de la enzima libre, se llevó a cabo la experiencia de actividad enzimática con 2 repeticiones y se ajustaron linealmente los datos resultantes. A partir de la pendiente de la recta obtenida, se calculó la actividad de la enzima luego de su “desorción”. En la Fig. 3.2 se muestra el incremento en la absorbancia a medida que la reacción enzimática avanza:

Figura 3.2 Incremento de la absorbancia en el tiempo para la GOx “desorbida” de la pasta de carbono



Realizando los cálculos se determinó la actividad de la enzima luego del proceso de inmovilización y posterior desorción: **Actividad de la enzima desorbida: 67000 Unidades/g.sólido**

Con los valores obtenidos podemos decir que la enzima luego de la inmovilización mantiene aproximadamente un 60% de la actividad inicial.

Fue necesario también en el caso de la enzima que fue extraída del soporte, realizar la medición de la absorbancia de los restantes compuestos que conforman la pasta de carbono a la longitud de onda correspondiente, para comprobar que los valores de absorbancia obtenidos en la determinación corresponden únicamente al avance de la reacción enzimática, es decir, si alguno de los compuestos que conforman la pasta se hubiese solubilizado junto con la enzima, verificar que éste no absorbió radiación a 500 nm, lo que pueda resultar en un valor erróneo de la actividad enzimática. Los compuestos que fueron analizados son: polvo fino de grafito y ferroceno.

Se efectuaron las disoluciones correspondientes de estos dos compuestos, y se midió la absorbancia a la longitud de onda especificada, encontrándose valores no significativos para ambos casos.

3.5 Conclusiones

Respecto a la determinación de la actividad enzimática de la Glucosa Oxidasa libre, los resultados obtenidos indican que la actividad está dentro del rango reportado por el fabricante. Por lo tanto, la enzima está apta para ser utilizada en la fabricación del electrodo.

Si hablamos de la actividad de la GOx luego de su inmovilización y posterior “desorción” del soporte, los resultados muestran que si bien se observa una disminución en la actividad (60% del valor libre), el valor obtenido es elevado. Es importante tener en cuenta que este porcentaje es, probablemente aún más alto, debido a que hay que realizar la “desorción” de la enzima de la pasta de carbono, y es casi imposible llegar a disolver la totalidad de la enzima retenida en la pasta.

Los resultados indican que tanto el proceso de inmovilización de la enzima como los materiales seleccionados para la construcción del electrodo resultan sumamente adecuados, ya que la actividad mantenida por la enzima posteriormente a su inmovilización es elevada.

CAPÍTULO 4

CONDICIONES ÓPTIMAS DE OPERACIÓN DEL BIOSENSOR PARA DETERMINAR GLUCOSA EN JUGO DE MANZANA

4.1 Introducción

Tal como se expuso en el capítulo 2, se diseñó y construyó un biosensor amperométrico para determinar glucosa en jugos de manzana. Se decidió que el electrodo sensor o de trabajo sea un electrodo de pasta de carbono, que consiste en un cilindro de teflón anular dentro del cual se enrosca un cable de acero que actúa como contacto eléctrico. La base del electrodo es la superficie sensora donde se encuentra la pasta de carbono colocada a presión (Fig. 2.4).

Una vez que fue construido el electrodo sensor y puesto a punto el equipo de trabajo, fue necesario hacer un estudio de las condiciones óptimas para el funcionamiento del biosensor, estudio que se describe y analiza en el presente capítulo.

4.2 Condiciones óptimas de trabajo

Una vez seleccionados los componentes de la pasta de carbono y el método de inmovilización de la enzima, resta realizar la optimización de las variables que afectan la respuesta del biosensor. Estas variables son el pH de la solución buffer utilizada, la concentración de la enzima en la pasta y el potencial aplicado al electrodo sensor.

4.2.1 pH óptimo del medio de reacción

Como se mencionó, una de las variables que se debe optimizar es el pH de la solución buffer de fosfatos que es el medio donde ocurre la reacción, ya que la actividad de las enzimas depende fuertemente del pH.

En este capítulo se presenta el estudio de la respuesta del biosensor utilizando soluciones buffer de fosfatos 0.1 M de pH 5, 6 y 7.

Ensayos realizados para estudiar la actividad de la glucosa oxidasa con oxígeno como aceptor de electrones mostraron que esta enzima presentó su máxima actividad a valores de pH cercanos a 5, mientras que con otros aceptores no fisiológicos la máxima actividad enzimática se observó alrededor de pH 7.5 (Cass, 1984). Por esta razón la respuesta del biosensor fue analizada en el intervalo de pH que va desde 5 a 7.

4.2.2 Concentración óptima de enzima en la pasta de carbono

Otra variable fue la concentración de enzima en la pasta de carbono. La variación de la carga enzimática permite modificar el rango de linealidad en el cual opera el sensor. Se prepararon pastas con distintas concentraciones de GOx, 5%, 8% y 10%, analizándose y comparándose los resultados obtenidos en cada uno de los casos.

4.2.3 Potencial óptimo de trabajo

La tercer variable objeto de estudio fue el potencial de trabajo del biosensor. Cuando se aplica un potencial adecuado al electrodo de trabajo se producen las reacciones de óxido-reducción dadas por (2.2) (2.3) y (2.4), generándose una corriente eléctrica proporcional a la concentración de glucosa.

Es por ello que también forma parte de este capítulo el estudio de la influencia que tiene el potencial aplicado al electrodo sobre la respuesta entregada por el sistema. Los potenciales evaluados fueron 0.1 V, 0.16 V, 0.2 V y 0.3 V.

4.3 Materiales y métodos

La optimización de las distintas variables se realizó por medio de determinaciones amperométricas.

4.3.1 Preparación de las soluciones buffer de fosfatos

Se prepararon diferentes soluciones buffer de fosfatos 0.1 M de pH 5, 6 y 7. El modo de preparación fue el siguiente:

- En primer lugar se hirvió agua destilada durante 10 minutos para eliminar los gases disueltos
- Solución A (NaH_2PO_4 0.2 M). Se disolvieron 13.8 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua destilada completando a 500 mL.
- Solución B (Na_2HPO_4 0.2 M). Se disolvieron 26.825 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada completando a 500 mL.

De tablas se leyeron los volúmenes de soluciones A y B necesarios para alcanzar el pH deseado y se agregó el mismo volumen en agua destilada con el fin de obtener una solución 0.1 M.

Las soluciones A y B son estables por un período de tiempo mayor que el buffer preparado.

4.3.2 Preparación de las soluciones de glucosa

Se disolvieron 4.5 g de dextrosa anhidra en solución buffer de fosfatos 0.1 M completando a 50 mL. De esta manera se obtuvo una solución de glucosa de concentración 0.5 M.

Las soluciones de glucosa utilizadas para las determinaciones fueron preparadas 24 horas antes de los ensayos y se almacenaron a temperatura ambiente durante ese período para que se establezca el equilibrio anomérico entre las formas α y β de D-glucosa (Florescu, 2005; Luiz de Mattos, 2005).

4.3.3 Preparación de las distintas pastas de carbono

Para cumplir con los objetivos planteados en este capítulo, se prepararon 3 pastas de carbono con concentraciones diferentes de enzima: 5%, 8% y 10%, según el procedimiento detallado en el capítulo 2 apartado 2.3.1.

4.3.4 Preparación del electrodo sensor

El electrodo de trabajo o electrodo sensor se preparó colocando una pequeña porción de la pasta de carbono en la base del cilindro de teflón presionando con el tornillo de acero sobre un papel de filtro para que la pasta quede perfectamente adherida en la base del electrodo. Finalmente se realizó el pulido de la superficie utilizando papel de filtro para que la misma quede perfectamente lisa.

4.3.5 Preparación del sistema de trabajo

Una vez preparado el electrodo sensor, se procede a comenzar con las determinaciones electroquímicas.

El electrodo de pasta de carbono, el electrodo de referencia Ag/AgCl y el contraelectrodo de platino, fueron sumergidos en un vaso de precipitados conteniendo un volumen exacto de 50 mL de solución buffer de fosfatos al pH correspondiente a cada determinación.

4.3.6 Mediciones electroquímicas

Se realizaron distintas determinaciones amperométricas aplicando un potencial constante el electrodo sensor. Una vez que la línea de base se estabilizó se procedió a la inyección de glucosa.

Para cada condición de pH, carga enzimática y potencial aplicado se registraron las densidades de corriente en el estado estacionario para una concentración de glucosa en el medio de reacción de 4.95 mM (~ 0.05 M). Esta concentración final se obtuvo al inyectar un volumen de 0.5 mL de glucosa a un volumen inicial de 50 mL de buffer, bajo continua agitación mecánica a velocidad constante en todos los casos.

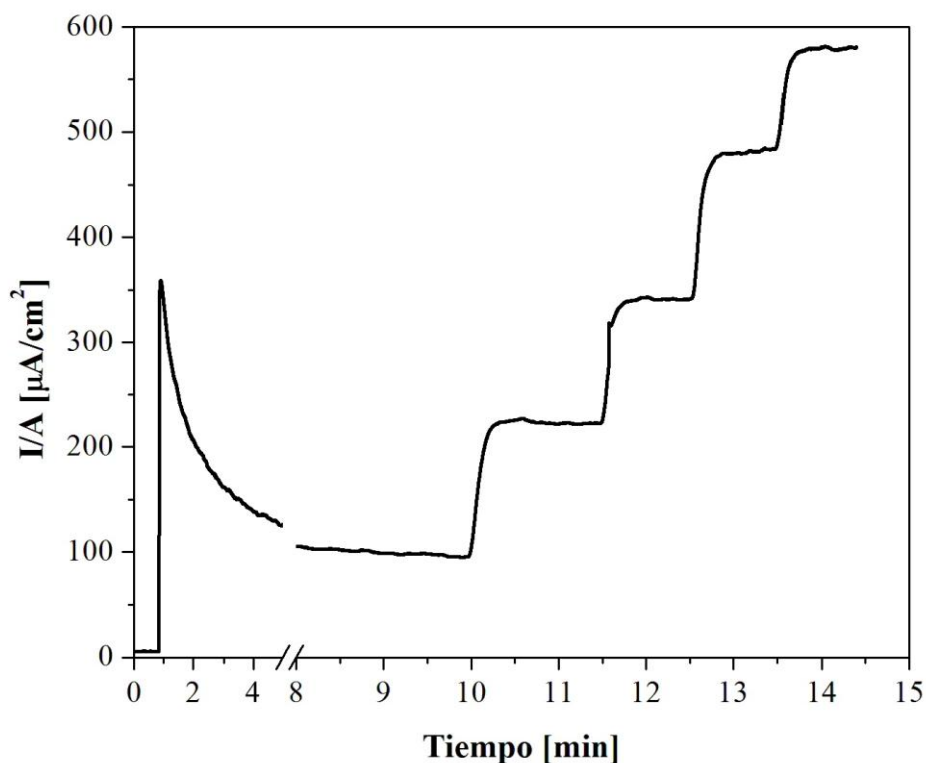
Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo bajo condiciones de temperatura ambiente.

Las densidades de corriente obtenidas en cada caso fueron comparadas y analizadas con la finalidad de extraer de ellas las mejores condiciones de trabajo posibles para el biosensor de glucosa.

En la Fig. 4.1 se muestra un amperograma típico obtenido con el biosensor de glucosa. En este ensayo se utilizó un sensor con 8% de GOx, el medio de trabajo fue un buffer de fosfatos a pH 7 y el potencial aplicado fue de 0.3 V.

Figura 4.1 Diagrama densidad de corriente vs. Tiempo para inyecciones sucesivas de glucosa.

Potencial aplicado 0.3 V; solución buffer de fosfatos 0.1 M pH 7; 8% GOx en la pasta.



Tal como se observa en la Fig. previa, se aplicó el potencial de 0.3 V transcurrido aproximadamente 1 minuto desde el comienzo del ensayo. Se permitió la estabilización de la corriente de base y luego de 10 minutos se comenzaron a realizar las inyecciones de glucosa. Cada escalón representa la variación de densidad de corriente cuando se adiciona la glucosa y tienen lugar las reacciones redox en cuestión. En esta experiencia se realizaron 4 inyecciones sucesivas de 0.5 mL de una solución de glucosa 0.5 M.

Como análisis complementario al estudio previamente realizado se llevó a cabo un análisis estadístico que permite definir por completo las óptimas condiciones en las que se trabajará con el biosensor.

Para comprobar las diferencias existentes entre las distintas condiciones de operación del sensor objeto de análisis, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Para los casos para los cuales las diferencias entre análisis fueran altamente significativas se realizaron además comparaciones múltiples entre los resultados empleando el método DMS.

4.4 Resultados y discusión

Al evaluar los resultados obtenidos para una solución buffer de fosfatos 0.1 M de pH 5, se observó que las respuestas obtenidas con el biosensor presentaron cierta inestabilidad y poca precisión intermedia entre repeticiones, razón por la cual fue descartada en el análisis la solución buffer correspondiente a este valor de pH. Es posible que la causa de estas grandes diferencias entre réplicas se deba principalmente a la solubilidad de la enzima en estas condiciones. Si bien se conoce que la enzima es completamente soluble en buffer de acetato de sodio a pH 5, se cree que en las condiciones en las que se realizó la determinación (buffer de fosfatos 0.1 M, pH 5), la enzima presenta cierta solubilidad por lo cual es lógico que las respuestas sean distintas ya que la concentración de la enzima en la pasta estaría cambiando.

Por el contrario, los ensayos a pH 6 y 7 dieron resultados reproducibles entre las réplicas para todas las condiciones de carga enzimática y potencial aplicado.

Se realizaron comparaciones múltiples entre los resultados obtenidos del análisis de las condiciones de trabajo del biosensor los cuales fueron representados gráficamente.

En las Figs. 4.2 y 4.3 se muestran las respuestas obtenidas para pH 6 y 7 respectivamente, variando la carga enzimática en la pasta y potencial aplicado al

biosensor. Cada determinación se realizó por duplicado, representándose los promedios obtenidos para cada una de ellas.

Figura 4.2 Densidades de corriente en función de la carga enzimática en la pasta para pH 6 y una concentración de glucosa de 4.95 mM

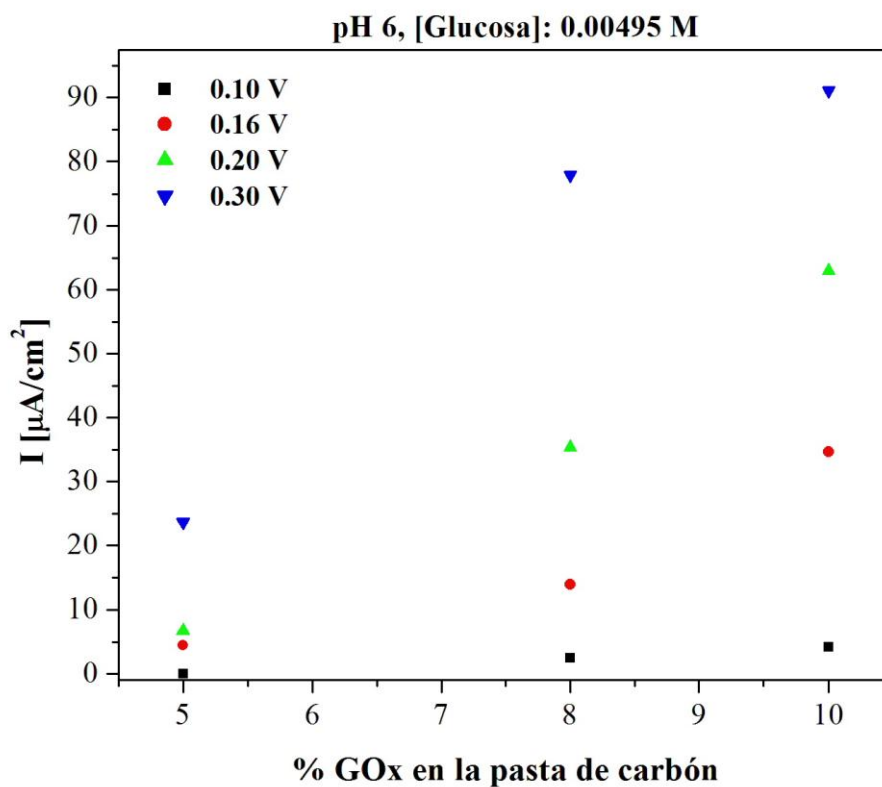
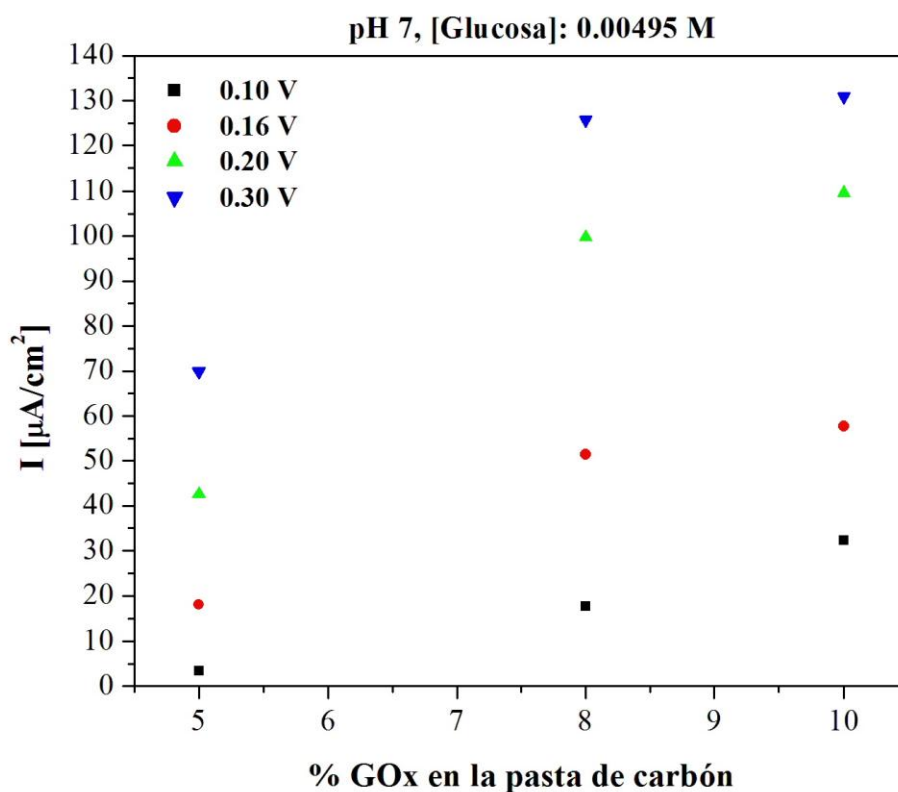


Figura 4.3 Densidades de corriente en función de la carga enzimática en la pasta para pH 7 y una concentración de glucosa de 4.95 Mm



En las Figs. previas se observa en ambos casos que para un mismo porcentaje de enzima en la pasta de carbono, a medida que aumenta el potencial aplicado se incrementa a su vez la densidad de corriente obtenida.

Además, si se comparan las distintas concentraciones de enzima en la pasta, puede verse que se obtienen densidades de corriente mayores a medida que aumenta la carga enzimática, resultados que se corresponden con lo esperado.

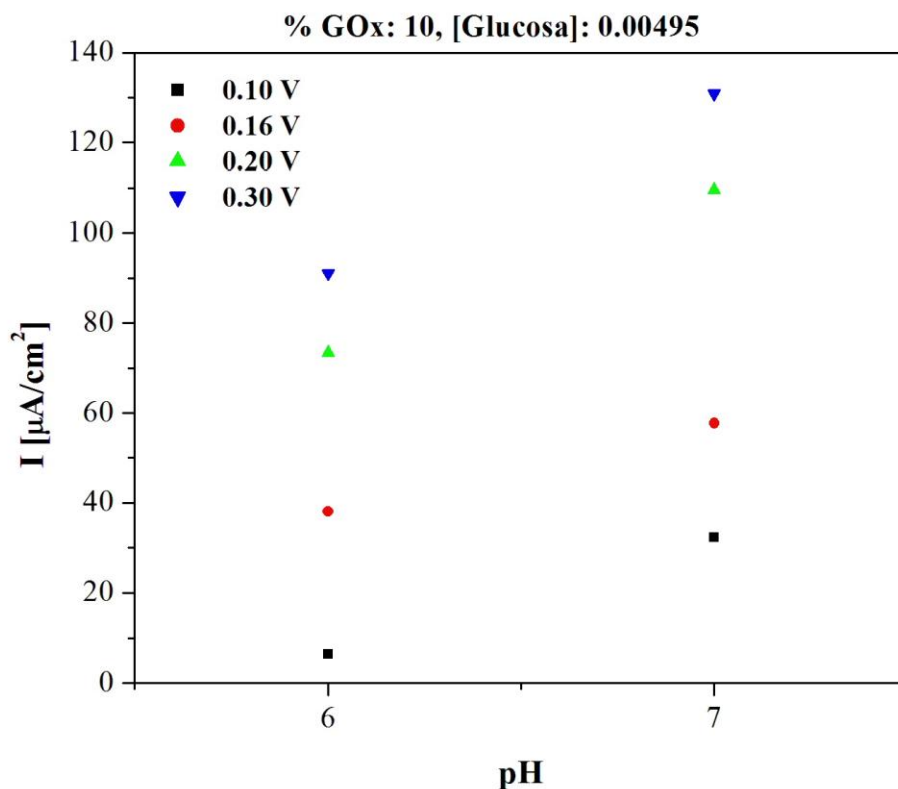
4.4.1 Concentración óptima de enzima en la pasta de carbono

En primer lugar analizamos los resultados correspondientes a las distintas concentraciones de enzima en la pasta de carbono. Al observar las Figs. 4.2 y 4.3, claramente se aprecia que para 10% de enzima las respuestas entregadas por el biosensor resultan superiores respecto a las correspondientes a 5% y 8%, para todos los potenciales estudiados. Es por ello que finalmente se decidió trabajar con 10% de enzima en la pasta de carbono.

Ya elegido el porcentaje de enzima que hace óptimo el funcionamiento del biosensor, nos queda analizar el potencial óptimo y el pH de la solución buffer utilizado.

Para ello, en la Fig. 4.4 se muestra la comparación de las diferentes respuestas que fueron obtenidas ante una inyección de glucosa de 0.00495 M, utilizando 10% de enzima en la pasta, a pH 6 y 7, y para todos los potenciales analizados.

Figura 4.4 Densidad de corriente en función del pH para %GOx: 10, [glucosa]: 4.95 mM



4.4.2 pH óptimo del medio de reacción

Si se comparan las Figs. 4.2 y 4.3 entre sí, podemos observar claramente que a pH 7 las densidades de corriente obtenidas para cada concentración de GOx en la pasta y para cada potencial aplicado al biosensor son mayores que a pH 6, resultados claramente visibles también en la Fig. 4.4.

Además, se analizó el tiempo de respuesta. El tiempo de respuesta es el tiempo que transcurre desde la adición de la glucosa hasta la obtención del 95% de la respuesta.

En la siguiente tabla se muestran los tiempos de respuesta (en segundos) para cada caso.

Tabla 4.1 Tiempos de respuesta del biosensor para una concentración de glucosa 4.95 mM

	0.1 V	0.16 V	0.2 V	0.3 V
pH 6	17.4 s	25.2 s	26.4 s	17.4 s
pH 7	10.1 s	15.6 s	18.0 s	12.6 s

Como se puede observar en la tabla 4.1, para todos los potenciales aplicados, al adicionar un volumen de 0.5 mL de glucosa 0.5 M al medio de reacción, los tiempos de respuesta fueron claramente inferiores para el buffer de fosfatos a pH 7.

Es por estos motivos que se selecciona el buffer de fosfatos 0.1 M correspondiente al pH 7 como medio óptimo de reacción. Además, en bibliografía se encontró que la máxima selectividad para la detección de glucosa se obtiene cuando se usa solución buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7, idénticas condiciones a las seleccionadas en este estudio (Liu, 2007).

4.4.3 Potencial óptimo aplicado al electrodo de trabajo

Como se pudo observar en las Figs. 4.2, 4.3 y 4.4, el valor de densidad de corriente aumenta continuamente con el incremento del potencial de operación. Esto nos llevaría a pensar que 0.3 V sería el potencial óptimo de trabajo, ya que es el potencial para el cual se obtuvieron las señales de corriente más altas. En primer lugar es necesario mencionar que como se explica en el capítulo 1, el jugo de manzana está constituido por distintos compuestos. La presencia de compuestos electroquímicamente activos puede originar interferencias en la respuesta del sensor debido a la oxidación de los mismos al potencial de trabajo (Jia, 2010; Cui, 2001; Jawaheer, 2003). A mayores potenciales existen riesgos más elevados de aparición de interferencias. Es por ello que a la hora de seleccionar el potencial de trabajo debemos tener en cuenta este

inconveniente y elegir como óptimo un potencial relativamente bajo al cual se obtengan densidades de corrientes fácilmente medibles y estables. Es por esta razón que el potencial óptimo seleccionado fue de 0.16 V (vs Ag/AgCl).

Seleccionadas las condiciones operacionales que gráficamente aparentan ser las más adecuadas para el funcionamiento óptimo del biosensor, es importante hacer una aclaración relevante. Cuando se seleccionó la carga enzimática, el potencial y el pH de la solución buffer, sólo se tuvieron en cuenta los valores de las señales de corrientes obtenidas en cada uno de los casos para llevar a cabo la comparación. Por ejemplo, se observó que las señales para un 10% de enzima en la pasta fueron superiores a los dos casos restantes. De todos modos, la incógnita que se plantea en este punto es si realmente las diferencias entre las respuestas obtenidas bajo las diferentes condiciones son verdaderamente diferencias significativas.

Para comprobar esto es que se efectuó un análisis de la varianza, ANOVA. En el caso en que el ANOVA resulte altamente significativo, se realizará un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método DMS.

El ANOVA correspondiente a pH 6 y bajo todos los niveles de GOx en pasta y potencial aplicado mostró que hay evidencias de que existen diferencias altamente significativas entre los distintos tratamientos. Iguales resultados fueron obtenidos en el ANOVA para pH 7. Es por ello que el paso siguiente fue realizar el análisis de comparaciones múltiples.

En primer lugar se compararon los resultados para los dos valores de pH y todos los potenciales de estudio, para cada uno de los porcentajes de carga enzimática y se presentan en las tablas 4.2, 4.3 y 4.4.

Tabla 4.2 Resultados DMS para ambos pH y potenciales aplicados, para 5% de GOx en la pasta

5% Gox	pH 6	pH 6	pH 6	pH 6	pH 7	pH 7	pH 7	pH 7
Tratamientos	0.1 V	0.16 V	0.2 V	0.3 V	0.1 V	0.16V	0.2 V	0.3 V
Resul. DMS	a	b	c	e	b	d	f	g

Tabla 4.3 Resultados DMS para ambos pH y potenciales aplicados, para 8% de GOx en la pasta

8% Gox	pH 6	pH 6	pH 6	pH 6	pH 7	pH 7	pH 7	pH 7
Tratamientos	0.1 V	0.16 V	0.2 V	0.3 V	0.1 V	0.16V	0.2 V	0.3 V
Resul. DMS	a	b	d	f	c	e	g	h

Tabla 4.4 Resultado DMS para ambos pH y potenciales aplicados, para 10% de GOx en la pasta

10% Gox	pH 6	pH 6	pH 6	pH 6	pH 7	pH 7	pH 7	pH 7
Tratamientos	0.1 V	0.16 V	0.2 V	0.3 V	0.1 V	0.16V	0.2 V	0.3 V
Resul. DMS	a	c	e	f	b	d	g	h

NOTA: Letras diferentes implican diferencias significativas entre los tratamientos

Al observar las comparaciones, podemos ver que solamente para 5% de enzima hay un caso en el cual no hay diferencias significativas entre los tratamientos que corresponde a pH 6 y 0.16 V vs pH 7 y 0.1 V. Este resultado implica que en esas dos condiciones no existen diferencias significativas entre las densidades de corriente obtenidas, y que por lo tanto aplicando un potencial menor para un pH 7 se obtienen los mismos resultados que a un potencial más alto en el caso de pH 6. En todos los restantes casos las diferencias entre los ensayos son significativas.

Por otra parte, en la tabla 4.5, 4.6, 4.7 y 4.8 se muestran los resultados del análisis de comparaciones múltiples teniendo en cuenta variaciones en el pH y en las concentraciones de enzima en la pasta para cada uno de los potenciales aplicados.

Tabla 4.5 Resultados comparaciones múltiples pH y carga enzimática, para 0.1 V

0.1 V	5% GOx	8% GOx	10% GOx	5% GOx	8% GOx	10% GOx
Tratamientos	pH 6	pH 6	pH 6	pH 7	pH 7	pH 7
Resul. DMS	a	b	c	b	d	e

Tabla 4.6 Resultados comparaciones múltiples pH y carga enzimática, para 0.16 V

0.16 V	5% GOx	8% GOx	10% GOx	5% GOx	8% GOx	10% GOx
Tratamientos	pH 6	pH 6	pH 6	pH 7	pH 7	pH 7
Resul. DMS	a	b	d	c	e	f

Tabla 4.7 Resultados comparaciones múltiples pH y carga enzimática, para 0.2 V

0.2 V	5% GOx	8% GOx	10% GOx	5% GOx	8% GOx	10% GOx
Tratamientos	pH 6	pH 6	pH 6	pH 7	pH 7	pH 7
Resul. DMS	a	b	d	c	e	f

Tabla 4.8 Resultados comparaciones múltiples pH y carga enzimática, para 0.3 V

0.3 V	5% Gox	8% Gox	10% Gox	5% Gox	8% Gox	10% Gox
Tratamientos	pH 6	pH 6	pH 6	pH 7	pH 7	pH 7
Resul. DMS	a	c	d	b	e	f

Nuevamente, al observar las comparaciones para cada potencial en particular y teniendo como variables la concentración de GOx en la pasta y el pH del medio de reacción, podemos ver que hay un solo caso en el cual las diferencias entre tratamientos son no significativas. Para un potencial de 0.1 V, pH 6 y 8 % de enzima le corresponde un resultado similar al obtenido para 0.1 V, pH 7 y 5 % de enzima. Esto claramente

indica que la enzima presenta mejores condiciones de actividad cuando el pH del medio de reacción corresponde al pH de neutralidad.

4.5 Conclusiones

Como conclusiones del presente capítulo podemos señalar:

- Tanto el análisis gráfico como el análisis estadístico confluyen en los mismos resultados
- El biosensor ha mostrado un excelente desempeño cuando el medio de reacción es un buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7
- Con 10% de enzima en la pasta, las respuestas obtenidas con el biosensor fueron ampliamente superiores respecto a las señales obtenidas con 5% y 8% de enzima inmovilizada.
- Se seleccionó como potencial óptimo de trabajo del sensor 0.16 V vs. Ag/AgCl. Si bien las mayores señales fueron obtenidas a 0.3 V, a 0.16 V se obtuvieron señales estables y fácilmente medibles. Además, trabajar a potenciales más bajos reduciría la probabilidad de interferencias en las señales debido a la presencia de sustancias electroquímicamente activas en el jugo de manzana.

En resumen, las condiciones óptimas que fueron seleccionadas permiten un muy buen funcionamiento del biosensor el cual ha respondido según las expectativas esperadas, teniendo tiempos de respuesta muy bajos (menor a 15 segundos) y proporcionando señales muy estables.

CAPÍTULO 5

CINÉTICA ENZIMÁTICA

5.1 Introducción

Las enzimas son catalizadores complejos, constituidas por proteínas globulares, que a temperatura en torno a los 37 °C, aceleran la velocidad de las reacciones químicas en un factor 10^{12} a 10^{20} respecto a la de las reacciones no catalizadas.

La eficacia catalítica de las enzimas a baja temperatura es lo que las hace importantes en la tecnología de los alimentos. La gran capacidad catalítica de las enzimas es consecuencia de la reducción de la energía de activación de las reacciones en la que intervienen. Asimismo, las bajas energías de activación de las reacciones enzimáticas indican que una reducción de la temperatura tiene relativamente poco efecto sobre las velocidades de reacción.

Otra importante característica de las enzimas además de su eficacia catalítica es su especificidad. Los catalizadores industriales no poseen esta especificidad de reacción, lo que impide su uso para modificar componentes específicos de un alimento.

5.2 Definiciones

Centro activo: Es la porción de una molécula enzimática en la que se fija el sustrato y es el lugar donde ocurre la reacción.

Energía de activación: En la teoría del estado de transición, es la cantidad de energía libre necesaria para llevar un mol de moléculas (sustrato) de la mezcla de reacción hasta el estado de transición. Las enzimas y otros catalizadores actúan disminuyendo esta barrera para la reacción, pero no alteran el punto de equilibrio.

Cinética enzimática: Comprende el estudio de los parámetros que influyen la velocidad de las reacciones químicas catalizadas por enzimas y la interpretación de los datos en términos de los mecanismos moleculares posibles.

Cinética del estado estacionario: Es la cinética tipificada por la ecuación de Michaelis-Menten. La enzima se combina con el sustrato para formar un complejo, que se descompone luego para dar el producto y la enzima libre, capaz de entrar en otro ciclo catalítico.

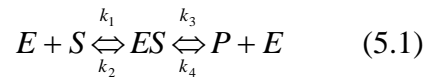
Especificidad: La especificidad de las enzimas los diferencia de los catalizadores no biológicos. Las enzimas muestran varios grados de especificidad:

- Baja especificidad: La enzima no discrimina entre sustratos, sino que se muestra específica únicamente para el enlace a atacar.
- Especificidad de grupo: La enzima es específica para un enlace químico particular adyacente a un grupo determinado.
- Especificidad absoluta: la enzima solo ataca a un sustrato y cataliza solo una reacción.
- Especificidad estereoquímica: Por regla general, las enzimas muestran una infalible y completa estereoespecificidad en la catálisis y pueden distinguir entre isómeros ópticos o geométricos.

La especificidad en las enzimas es muy importante en el procesamiento de alimentos, donde a menudo es deseable modificar sólo un componente determinado.

5.3 Cinética del estado estacionario

El esquema más simple para representar cinéticamente una reacción enzimática es



donde

E: enzima

S: sustrato

ES: complejo enzima-sustrato, a menudo llamado complejo de Michaelis

P: producto de la reacción enzimática

k_1 , k_2 , k_3 y k_4 : constantes de velocidad de cada una de las etapas de la reacción global.

La velocidad de formación del producto viene dada por

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] - k_4[P][E] \quad (5.2)$$

Durante la etapa inicial de una reacción enzimática típica, la concentración de producto es esencialmente cero. Entonces

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] = v \quad (5.3)$$

La concentración del complejo de Michaelis es inicialmente cero, y alcanza un nivel máximo rápidamente. En un instante determinado $[ES]$ es aproximadamente constante, por lo cual se puede aceptar que existen condiciones de estado estacionario.

Es decir:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_3[ES] \approx 0 \quad (5.4)$$

Reordenando

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = k_m \quad (5.5)$$

donde

k_m : constante de Michaelis-Menten

La concentración total de enzima esta dada por

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (5.6)$$

Combinando (5.5) y (5.6)

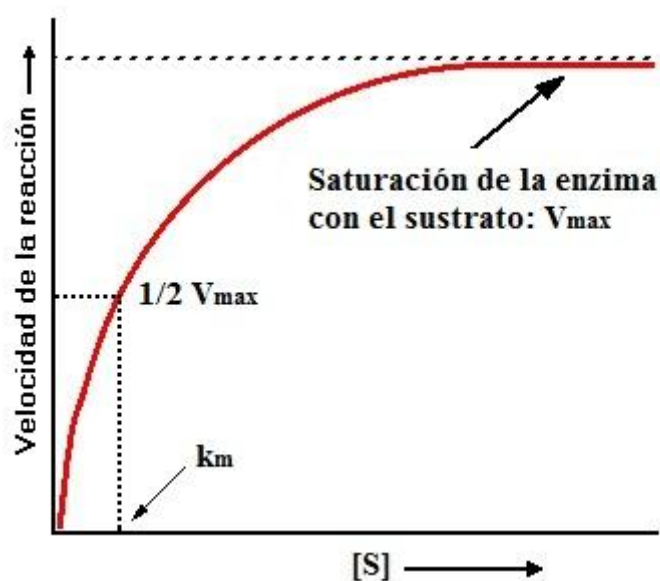
$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{k_m + [S]} \quad (5.7)$$

La velocidad de Michaelis-Menten será:

$$v = \frac{k_3[E_0][S]}{(k_m + [S])} \quad (5.8)$$

Para reacciones enzimáticas típicas, cuando $[S] \gg k_m$, la velocidad de Michaelis-Menten alcanza un valor máximo, denominado V_{\max} , tal y como se observa en la Fig. 5.1. Se dice entonces que la enzima está saturada de sustrato. Un valor de $[S]$ veinte veces mayor que k_m se considera suficiente para obtener una aproximación válida de V_{\max} .

Figura 5.1 Representación de la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato, para una reacción enzimática típica



En estas condiciones, el denominador de la ecuación (5.8) es aproximadamente igual a $[S]$, ya que el valor de k_m puede ser despreciado. Se anulan los términos $[S]$ del numerador y denominador, y se obtiene:

$$v = k_3[E_0] = V_{\max} \quad (5.9)$$

A partir de esta ecuación se comprueba que V_{\max} es independiente de $[S]$, es decir, la reacción es de orden cero respecto al sustrato.

La constante de Michaelis se expresa en unidades de concentración y se refiere a una concentración determinada de sustrato. Cuando $[S]$ es igual a k_m la velocidad se hace igual a la $V_{\max}/2$. Por lo tanto, el valor de k_m expresa la concentración de sustrato para semisaturar a la enzima.

Los dos parámetros más importantes de la teoría de Michaelis-Menten son k_m y V_{\max} .

La expresión más conocida de la cinética de Michaelis-Menten es:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{k_m + [S]} \quad (5.10)$$

Ambos parámetros de la expresión suelen determinarse por la representación de Lineweaver-Burk, cuya representación se obtiene invirtiendo la ecuación (5.10):

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{k_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (5.11)$$

Antes de estudiar la cinética enzimática, se debe comprobar que la cinética de la enzima sea Michaeliana. Existe un grupo de enzimas, llamadas *enzimas reguladoras* que son proteínas oligoméricas y normalmente no cumplen con la clásica cinética de Michaelis-Menten. Las enzimas reguladoras alostéricas suelen mostrar una curva de

saturación de tipo sigmoideo cuando se representa la velocidad inicial frente a la concentración de sustrato.

Por lo tanto, antes de realizar el cálculo de las constantes cinéticas (k_m y V_{max}), es necesario en primer lugar verificar si los datos se corresponden con la cinética de Michaelis-Menten. Para ello se puede utilizar la ecuación de Hill para calcular el parámetro “x”, que nos da una idea del grado de desviación de la cinética Michaeliana. La ecuación de Hill viene dada por la siguiente expresión:

$$\log\left(\frac{i_{max}}{i} - 1\right) = \log k_m - x \log[S] \quad (5.12)$$

Si el parámetro “x” se aleja del valor unitario, esto indicará que existe una desviación respecto de la cinética de Michaelis-Menten.

Otra cuestión importante a tener en cuenta en el estudio de la cinética enzimática es que para las enzimas inmovilizadas la constante de Michaelis tiene otra interpretación diferente al caso de la enzima en su estado libre, que será explicado en la siguiente sección.

5.3.1 Cinética de enzimas inmovilizadas

La cinética enzimática ha sido diseñada básicamente para reacciones en disolución, en las cuales las enzimas y el sustrato se encuentran en libertad para moverse desordenadamente. En estas condiciones, es de esperar que la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato se encuentre controlada por difusión. Sin embargo, las reacciones enzimáticas a menudo no ocurren en disolución, sino en interfases en las que las enzimas están inmovilizadas, y sus sustratos deben llegar hasta su centro activo para ser transformados en productos.

Como se explicó en el capítulo 2, apartado 2.2, el comportamiento cinético de una enzima inmovilizada puede ser significativamente diferente al de la enzima libre, debido a ciertos cambios conformacionales y a la ocurrencia de efectos de partición y difusionales (presencia de capa difusiva o capa de Nernst). Es por ello que la actividad inicial de la enzima inmovilizada es generalmente menor que la de la enzima libre. El comportamiento cinético de las enzimas inmovilizadas debe ser caracterizado por parámetros cinéticos que pueden estar influenciados por los factores previamente mencionados y por lo tanto, debe identificarse y evaluarse estos efectos. Es por ello que los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada se indican con un apóstrofe de modo tal de diferenciarlos de los correspondientes a la enzima libre. En algunas publicaciones estos parámetros son llamados parámetros aparentes.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, la ecuación de Michaelis-Menten para enzimas inmovilizadas está dada por:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{k_m^* + [S]} \quad (5.13) \quad \text{Ecuación de Michaelis-Menten}$$

$$\text{con } k_m^* = \left(k_m + \frac{xV_{\max}}{D} \right) \frac{RT}{RT + xzFV}$$

donde:

k_m^* : constante de Michaelis para enzimas inmovilizadas

x: espesor de la capa de Nernst

D: coeficiente de difusión

T: temperatura [K]

z: valencia del sustrato

F: constante de Faraday

R: constante universal de los gases

V: gradiente de potencial en torno al soporte de la enzima

5.4 Materiales y métodos

5.4.1 Preparación de las soluciones y material necesario

La solución buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7 y la solución de glucosa 0.1 M se prepararon siguiendo la metodología descrita en el capítulo 4 apartados 4.3.1 y 4.3.2 respectivamente.

La pasta de carbono empleada se preparó según el método presentado en el capítulo 2, utilizando 10% de enzima Glucosa oxidasa, porcentaje que fue seleccionado según el análisis presentado en el capítulo 4.

5.4.2 Cinética enzimática. Cálculo de V_{max} y k_m :

Se calcularon las constantes cinéticas de la enzima GOx inmovilizada utilizando como sustrato glucosa. En primer lugar, mediante la aplicación de la ecuación de Hill y la representación gráfica de la misma, se calculó el parámetro “x” para verificar que la cinética sea Michaeliana.

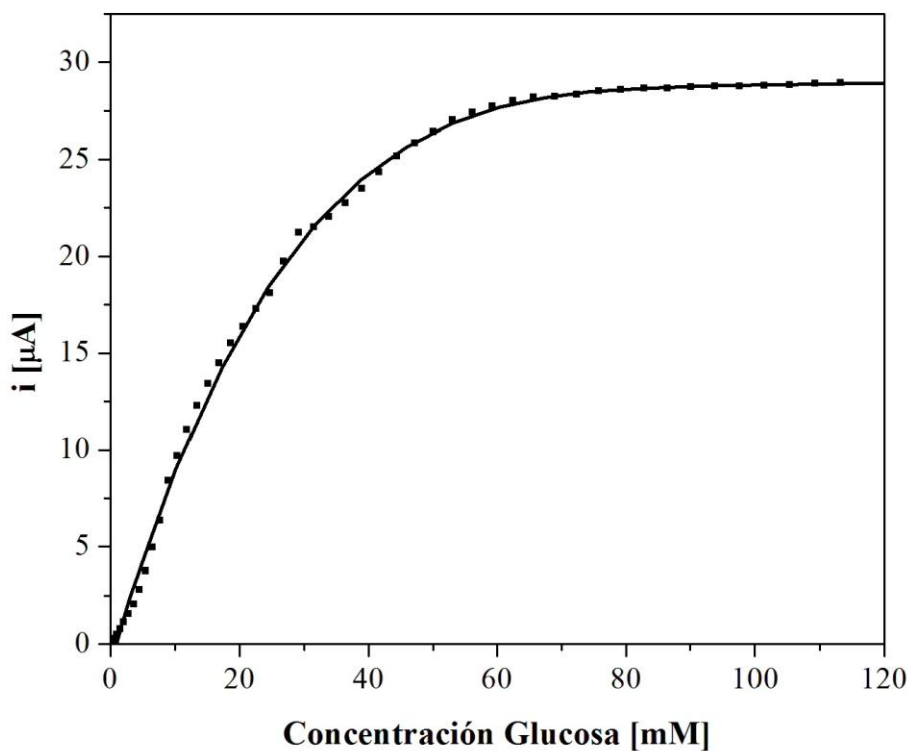
El cálculo de los parámetros cinéticos se realizó a partir de datos de las densidades de corriente obtenidas con un electrodo enzimático de pasta de carbono (grafito-parafina-GOx-Ferroceno), en solución buffer de fosfato 0.1 M a pH 7, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un contraelectrodo de platino. El potencial al cual se llevaron a cabo las determinaciones fue de 0.16 V. Se inyectaron de manera sucesiva volúmenes de 0.01 mL de una solución 0.5 M de glucosa al medio de reacción en

continua agitación sobre un volumen inicial de buffer fosfatos de 50 mL en el cual se encuentran sumergidos los 3 electrodos. El final del ensayo se determinó una vez que no se apreciaron variaciones significativas en las densidades de corrientes al inyectar glucosa en el medio de reacción.

5.5 Resultados y discusión

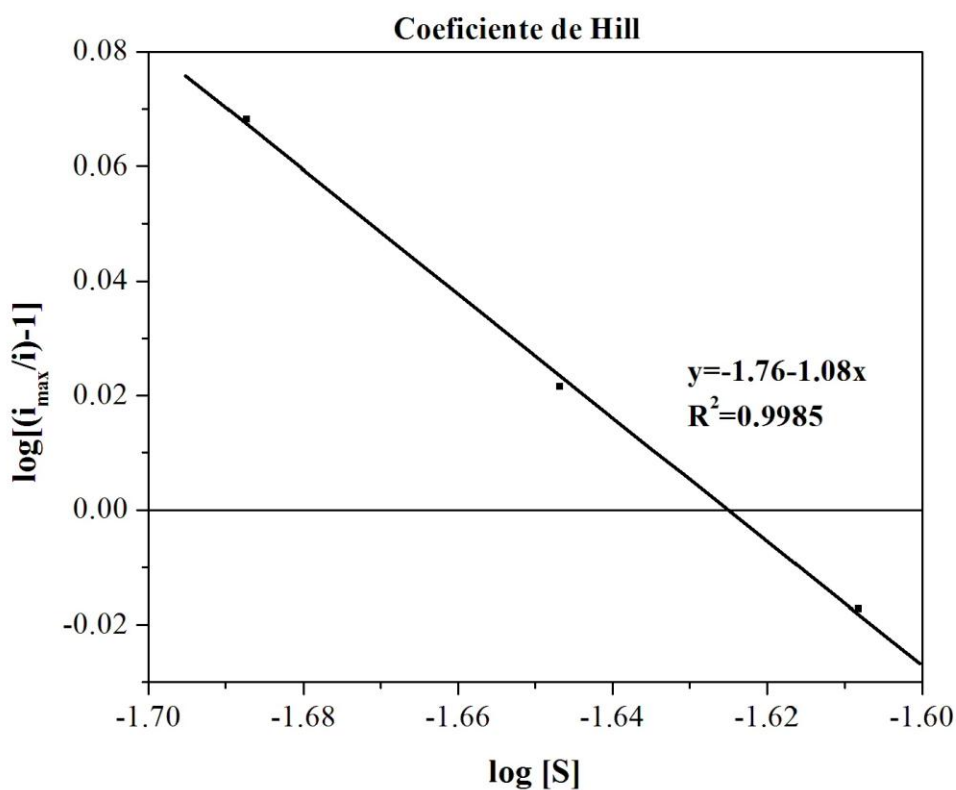
En la Fig. 5.2 se muestra la variación de la intensidad de corriente estacionaria, como función de la concentración de glucosa. Se observa una curva típica de cinética enzimática.

Figura 5.2 Curva de saturación de la enzima para adiciones sucesivas de glucosa en buffer fosfatos



Previamente a la determinación de las constantes cinéticas, es importante asegurar que la cinética se corresponde con la de Michaelis-Menten, para poder ajustar los datos con la ecuación correspondiente. En la Fig. 5.3 se muestra el gráfico de Hill correspondiente del cual se extrae el valor del coeficiente de Hill. Este gráfico fue obtenido a partir de la utilización de la ecuación 5.12. Puede observarse que el valor de “x” es muy próximo a 1 (corresponde a la pendiente cambiada de signo), lo que significa que la curva de saturación de la GOx en el electrodo está representada por la forma hiperbólica característica de las cinéticas Michaelianas. Esto nos permite utilizar cualquiera de las linealizaciones disponibles de la ecuación de Michaelis-Menten (Revista de Educación Bioquímica, 2006).

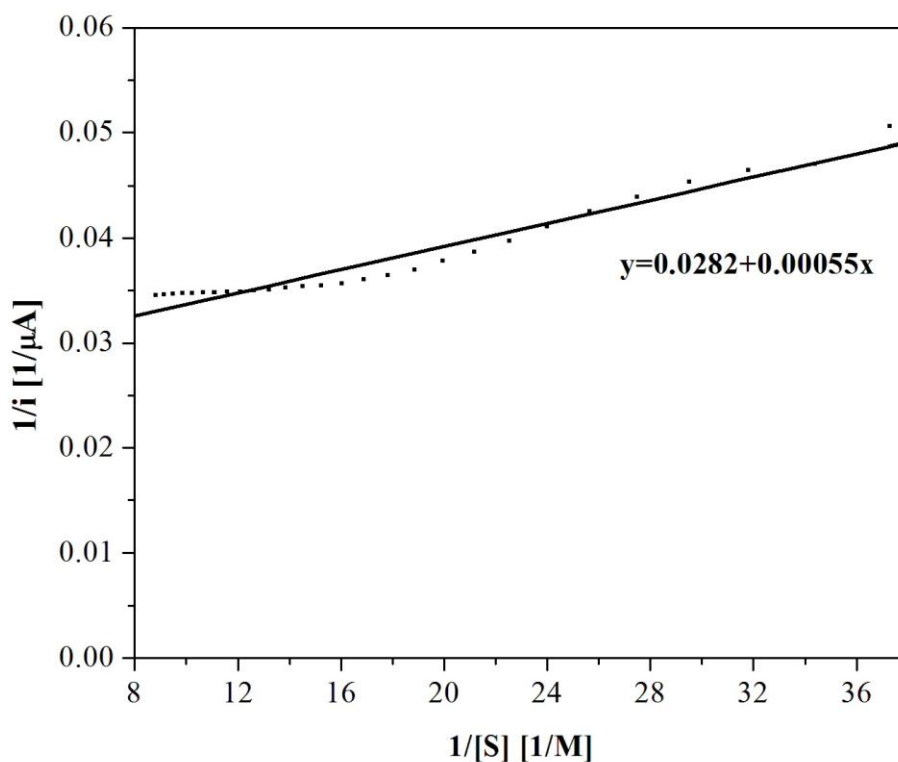
Figura 5.3 Representación de Hill para la curva de saturación de la GOx



Se eligió utilizar la linealización de Lineweaver-Burk, a partir de la cual se calcularon las constantes cinéticas de la enzima Glucosa oxidasa en el electrodo. Para utilizar esta linealización hay que seleccionar de manera adecuada los datos a linealizar. Para ello se tomaron los datos experimentales para las concentraciones de sustrato más altas, es decir, cuando la enzima se encuentra cerca de la saturación.

En la Fig. 5.4 se muestra la linealización realizada.

Figura 5.4 Representación de Lineweaver-Burk



A partir de la ecuación de la recta resultante de la linealización de los datos, se determinaron los valores de las constantes de Michaelis-Menten:

k_m : 0.0195 M (constante de Michaelis-Menten para la enzima inmovilizada)

i_{max} : 35.5 μ A

Al observar la curva de saturación de GOx (Fig. 5.2), se puede ver que para una concentración de 0.0195 M (correspondiente al valor de k_m) la velocidad de reacción es aproximadamente 16.3 μ A, valor muy próximo a la mitad de la velocidad máxima determinada por medio de la linealización de Lineweaver-Burk.

El valor de k_m reportado en bibliografía para la GOx es 0.0087 M (Yildiz, 2005), valor claramente más bajo que el correspondiente a la enzima inmovilizada en la pasta de carbono, lo que nos indica que la velocidad de reacción de la enzima es mucho más baja cuando se encuentra inmovilizada que en su estado libre. En otras palabras, k_m es un parámetro inversamente proporcional a la afinidad de la enzima por el sustrato, e indica que la enzima libre tiene mayor afinidad por el sustrato que la enzima en la pasta, resultado esperado para este ensayo.

5.6 Conclusiones

La enzima Glucosa oxidasa inmovilizada mecánicamente en una pasta de carbono utilizada como material de electrodo presenta una cinética típica Michaeliana. A partir de esto se pudieron obtener los distintos parámetros que caracterizan el comportamiento cinético de la enzima en el electrodo.

Con respecto al valor de la constante de Michaelis aparente, se puede observar que el valor obtenido para la enzima en el electrodo es claramente mayor que para el caso de la enzima libre. Esto indica que la enzima en estado libre es más afín al sustrato que la enzima en la pasta de carbono. En otras palabras, un mayor valor de la constante de Michaelis aparente para la enzima en la pasta indica menor velocidad de reacción con respecto a la enzima en su estado libre.

El resultado obtenido en este capítulo concuerda con el esperado para el caso de una enzima inmovilizada en un soporte, porque tal como se explicó, las enzimas inmovilizadas tienen en general menor actividad y mayores valores de k_m respecto a las enzimas libres, siendo una de las posibles razones la menor disponibilidad de sitios activos de la enzima inmovilizadas frente a la enzima libre.

CAPÍTULO 6

CURVA DE CALIBRACIÓN, CARACTERÍSTICAS DE LA CALIBRACIÓN Y PROPIEDADES ANALÍTICAS DEL BIOSENSOR

6.1 Introducción

En el capítulo 4 se estudiaron las condiciones que hacen óptimo el funcionamiento del biosensor. Para las condiciones seleccionadas como óptimas, el biosensor muestra un excelente desempeño, las respuestas son estables y debido al potencial relativamente bajo utilizado, se evitarían posibles riesgos de interferencias debidas a la presencia de sustancias electroquímicamente activas en el jugo de manzana.

Tal y como se explicitó anteriormente, el objetivo general de esta tesis consiste en el diseño, construcción y estudio de las características de un biosensor amperométrico para ser aplicado en la determinación de glucosa en jugos de manzana. Para poder conocer la concentración de este analito en el jugo es necesaria la construcción de una curva de calibración para este carbohidrato. En el caso de un biosensor una curva de calibración representa la relación entre la concentración de analito (sustrato de la enzima) y la corriente relacionada a esa concentración. Como es característico de los electrodos enzimáticos, éstos presentan un período inicial en el cual la velocidad de la reacción es de primer orden respecto a la concentración de sustrato, es decir, la velocidad de la reacción es lineal respecto a la concentración.

En el presente capítulo se muestra el desarrollo de la curva de calibración para la glucosa y se presenta el estudio completo de los parámetros analíticos de la calibración, tales como la sensibilidad, el límite de detección y el intervalo lineal de concentraciones para la glucosa.

La curva de calibración fue realizada bajo las condiciones óptimas presentadas en el capítulo 4, y en todos los casos los ensayos fueron efectuados a temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

6.2 Curva de calibración para la glucosa

Una curva de calibración se define como una relación funcional entre valores de la variable observada (respuesta o señal), y la concentración de analito (Currie, 1995 (IUPAC)). La curva de calibración muestra la relación que existe entre la concentración de un determinado analito y la respuesta que éste genera.

Se requieren un mínimo de 5 concentraciones diferentes para la construcción de la curva de calibración (U.S. Department of Health and Human Service, 2011).

Por tratarse de electrodos enzimáticos y tal como lo describe el modelo cinético de Michaelis-Menten, cuando las concentraciones de sustrato son pequeñas la reacción está regida por un proceso cinético de primer orden, debido a lo cual existe una relación lineal entre la concentración de sustrato y la velocidad de la reacción enzimática. Es por ello que es deseable realizar la calibración en esta región por la simplicidad de la relación lineal. Este tipo de calibración, para el cual se construye una curva para el biosensor se denomina “Método de calibración externo”.

Una vez construida la curva de calibración para la glucosa es posible conocer la concentración de glucosa en la muestra real (jugo de manzana) utilizando el biosensor construido. Este procedimiento consiste en medir con el biosensor la corriente que genera una alícuota de jugo al ser inyectada en la solución de reacción. Ese valor de corriente obtenido es proporcional a la concentración de glucosa en el jugo de manzana, proporcionalidad determinada por la curva de calibración del biosensor para la glucosa.

6.3 Características analíticas de la calibración

6.3.1 Intervalo lineal

Una vez construida la curva de calibración debe determinarse el intervalo de concentraciones de glucosa donde dicha curva presenta una respuesta lineal frente a la corriente, es decir, el intervalo lineal de la curva de calibración.

Para determinar esta característica de la curva es necesario adoptar un criterio general que permita determinar hasta que punto puede considerarse la linealidad de la curva en cuestión.

Un criterio general que permite obtener el intervalo lineal de concentraciones del biosensor es mediante el coeficiente de correlación de la regresión lineal obtenida para la curva de calibración. Este criterio considera que no existe pérdida en la linealidad de la curva cuando el coeficiente de correlación es igual o mayor a 0.99 ($r > 0.99$).

6.3.2 Límite de detección (LOD)

La capacidad de detección es una importante característica del rendimiento de un proceso de medición. En química, una característica representativa de un método analítico es la concentración más baja o la masa de un analito (el componente de muestra analizada) que puede ser detectada con un grado de certeza especificado. Es decir, es la mínima concentración de analito que puede ser detectada por el método pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones del ensayo. Esta cantidad no nos indica por encima de que valor es cuantificable el analito en cuestión.

El concepto de límite de detección (LOD) ha sido y sigue siendo en la actualidad uno de los más conflictivos en el área de la química analítica. Tal vez el concepto más utilizado en la actualidad se refiere al límite de detección como la mínima

concentración, cantidad o señal detectable del analito, definido por la IUPAC (IUPAC, 1976) en primer lugar como

$$y_D = \mu_b + k_D \sigma_b \quad (6.1)$$

donde

y_D : Límite de detección en el dominio de la señal,

μ_b : Valor esperado de la media del blanco (muestra libre de analito)

σ_b : Desviación estándar del blanco

k_D : Factor de proporcionalidad

Las cantidades estadísticas μ_b y σ_b están relacionadas a un gran número de observaciones y son desconocidas, por lo tanto, en la práctica química normalmente son aproximadas por las cantidades de la muestra. Es decir, se asumen que μ_b es \bar{y}_b , y que σ_b es s_b .

Sin embargo en la práctica, una tarea más importante es conocer las concentraciones equivalentes del valor de señal LOD. Para este propósito se utiliza la pendiente de la curva de calibración lineal, $y = q_0 + q_1 x$, expresada como la dependencia de la señal “y” en función de la concentración “x”. De esta forma la expresión para el límite de detección es:

$$LOD = (y_D - \bar{y}_b) / q_1 = (k_D S_b) / q_1 \quad (6.2)$$

Cabe destacar que el modelo de calibración debería escribirse en términos estadísticos utilizando variables en letras mayúsculas, pero normalmente se ignora en la literatura química para lograr una mayor simplicidad.

Tradicionalmente se ha aceptado en esta aproximación que el factor de proporcionalidad para el cálculo del límite de detección tome un valor igual a 3 (ACS Committee on Environmental improvement, 1980), y en este caso se denomina este análisis como “Enfoque Tradicional”.

A partir de ello la ecuación para el cálculo de LOD resultante se describe a continuación:

$$LOD = 3S_b / q_1 \quad (6.3)$$

Este enfoque es imperfecto respecto a la teoría estadística contemporánea debido principalmente a los siguientes inconvenientes (Mocák, 1997):

- (1) la distribución normal se utiliza para pequeños sets de observaciones, suponiendo igualdad entre $\mu_b = \bar{y}_b$ y $\sigma_b = s_b$
- (2) en la calibración se considera un valor exacto de intercepción suponiendo que $q_0 = \bar{y}_b$

A pesar de estos errores debido a las suposiciones realizadas para simplificar el cálculo de estos dos parámetros, el enfoque tradicional aún sigue utilizándose gracias a su gran simplicidad y a su uso a largo plazo (Mokác, 2009).

6.3.3 Sensibilidad

Según la IUPAC, en metrología y en química analítica se define la sensibilidad como el cociente entre la señal medida y la concentración de analito. En los casos en los cuales se trabaja con curvas de calibración, la definición previa indica que la sensibilidad queda representada por la pendiente de la curva a una determinada concentración de analito. En caso de que el ajuste de la calibración se corresponda con una línea recta, la sensibilidad coincide con la pendiente de la misma.

6.4 Materiales y métodos

Todas las soluciones y pastas utilizadas para la realización de las determinaciones descritas en el presente capítulo fueron preparadas de acuerdo a lo detallado en el capítulo 4, apartado 4.3.

Las determinaciones amperométricas realizadas fueron llevadas a cabo en las condiciones óptimas de trabajo del biosensor, las cuales fueron estudiadas y presentadas en el capítulo 4, siempre trabajando en condiciones de temperatura ambiente.

6.4.1 Curva de calibración

Para la construcción de la curva de calibración se realizaron inyecciones sucesivas de volúmenes crecientes de una solución de glucosa de concentración 0.5 M, sobre un volumen inicial de buffer de fosfatos (medio de reacción) de 50 mL. Se registraron las variaciones en la señal de corriente resultante de cada una de las inyecciones en el estado estacionario y se construyó la curva de calibración graficando la señal de corriente obtenida como una función de la concentración de glucosa correspondiente a esa señal, con el posterior ajuste lineal de los datos.

6.4.2 Características analíticas de la calibración

6.4.2.1 Intervalo lineal

Tal como fue explicado previamente, esta característica de la calibración se determinó teniendo en cuenta el intervalo de linealidad de la curva de calibración con la consideración de que una curva no pierde linealidad mientras su coeficiente de regresión se mantenga en un valor igual o superior a 0.99.

6.4.2.2 Límite de detección (LOD)

El límite de detección se determinó teniendo en cuenta la mínima concentración de glucosa medida en la calibración. Como se mencionó previamente, para el cálculo del límite de detección hace falta conocer la desviación estándar y la media de la señal correspondiente al blanco. Como estos parámetros son desconocidos para un experimento real, se realizó una aproximación de estos valores con la desviación estándar y la media de la mínima concentración de la curva de calibración ($n = 2$).

6.4.2.3 Sensibilidad

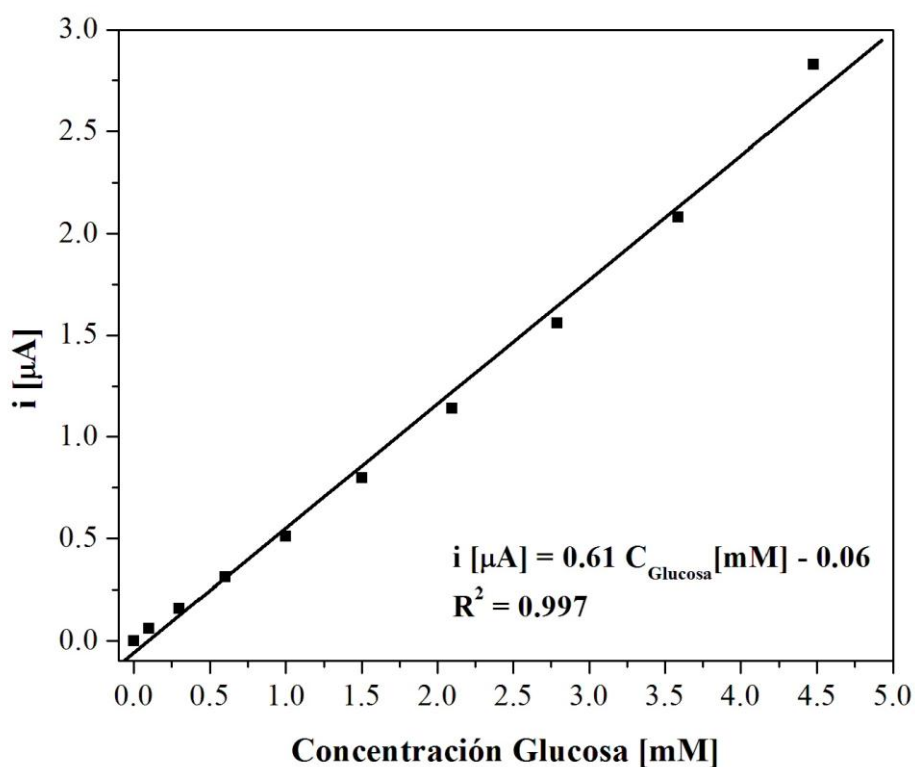
Tal y como fue explicado previamente, cuando la curva de calibración está representada por un ajuste lineal de los datos, la sensibilidad queda determinada por la pendiente de la recta obtenida. Es decir, esta característica es conocida una vez que la expresión de la curva de calibración es conocida.

6.5 Resultados y discusión

6.5.1 Curva de calibración

En la Fig. 6.1 se muestra la curva de calibración para la glucosa obtenida con el biosensor para un potencial de 0.16 V y en solución buffer de fosfatos a pH 7 como medio de reacción.

Figura 6.1 Curva de calibración para la glucosa obtenido con el biosensor de pasta de carbono a 0.16 V en solución buffer de fosfatos 0.1M a pH 7 (n = 2).



Para la construcción de la curva de calibración se utilizaron 10 concentraciones diferentes de glucosa y se ajustaron los datos realizando una regresión lineal simple mediante el método de mínimos cuadrados.

La pendiente de la curva de calibración obtenida mediante el ajuste de los datos con un modelo lineal fue $0.61 \mu\text{A}/\text{mM} \pm 0.02$ y la ordenada al origen fue $-0.06 \mu\text{A} \pm 0.04$.

El coeficiente de regresión que fue obtenido, $r = 0.997$, indica que el incremento de la corriente está explicado en un 99% por el aumento de la concentración de glucosa a través de una relación lineal en el rango de concentraciones que va desde 0.1 mM a 4.48 mM.

6.5.2 Intervalo lineal

Como se mencionó previamente, se considera que una curva no pierde la linealidad cuando el coeficiente de regresión es igual o superior a 0.99.

En el caso de la curva de calibración obtenida para la glucosa, en todo el rango de concentraciones involucrado, el coeficiente de regresión tiene un valor de 0.997. Por lo tanto el intervalo lineal está comprendido entre concentraciones que van desde aproximadamente 0.1 mM a 4.48 mM.

El intervalo lineal del sensor es aproximadamente el mismo que el correspondiente a un biosensor que utiliza silicatos como soporte para la inmovilización de la enzima y que a su vez trabaja a un potencial 9 veces más positivo (Liu, 2007), lo que conlleva grandes posibilidades de producirse interferencias. Así mismo, en otro trabajo en el que el material de electrodo es polipirrol/cerámica de carbono y que trabaja en condiciones similares de ensayo, el intervalo de respuesta lineal se presenta hasta un valor de concentración de glucosa de 1.3 mM (Tian, 2002), valor claramente inferior al correspondiente al electrodo de pasta de carbono construido.

Es decir, el biosensor de pasta de carbono tiene un amplio intervalo lineal de respuestas pese a que los materiales para su construcción son sumamente sencillos y a su relativa fácil construcción.

6.5.3 Sensibilidad

La sensibilidad del biosensor queda representada por la pendiente de la curva de calibración. En este caso, la sensibilidad tuvo un valor de $0.61 \pm 0.02 \mu\text{A}/\text{mM}$ ($8.71 \mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$).

Cabe mencionar en este apartado que se ha demostrado que la presencia de ferroceno como mediador electroquímico incrementa la performance del biosensor. Otros autores han comprobado experimentalmente que la utilización de un mediador electroquímico aumenta los valores de sensibilidad resultantes a potenciales más bajos con respecto al mismo electrodo sin presencia de mediador. Además, se reporta que se han obtenido sensibilidades mucho más elevadas con biosensores que fueron preparados mediante la inmovilización de ferroceno con copolímeros de siloxano y GOx en electrodos de pasta de carbono (Fiorito, 2001).

El valor de la sensibilidad obtenido fue comparado con el correspondiente a un electrodo sensor con similares características al aquí presentado, pero que incorpora 5% de ORMOSIL en su composición y que trabaja a un potencial de 0.35 V. La sensibilidad obtenida en este último caso fue de $13 \mu\text{A}/(\text{mM}\cdot\text{cm}^2)$ (Pandey, 2003). Si bien el valor referenciado es mayor que el obtenido en este trabajo, hay que tener en cuenta que el biosensor de ORMOSIL trabaja a un potencial muy superior respecto al correspondiente potencial de trabajo del biosensor de pasta de carbono, lo que provoca una variación importante en la sensibilidad resultante.

6.5.4 LOD

Mediante la utilización de la ecuación (6.3) correspondiente al “Enfoque Tradicional”, fue calculado el valor del límite de detección también llamado límite de determinación.

Tal y como lo describe el método, se tomó como estimación del valor de la desviación estándar del blanco, S_{bl} , la correspondiente desviación estándar de las señales que fueron obtenidas para la concentración más baja incluida en la curva de calibración, S_y .

El valor de la desviación estándar S_y fue 0.0102 μA y el valor de k_D fue definido previamente como 3.

Por lo tanto, teniendo en cuenta estos datos, se calculó el límite de detección para el biosensor de glucosa, cuyo valor fue de 0.05 mM.

6.6 Conclusiones

Respecto a la curva de calibración para la glucosa se puede concluir que la misma presenta una tendencia claramente lineal en el rango de concentraciones que va desde 0.1 a 4.48 mM de glucosa. El ajuste de los datos experimentales explica el 99% de la variación de la intensidad de corriente, i , como función de la variación de la concentración de analito, en el rango de concentraciones previamente.

En el rango de concentraciones cubierto por la curva de calibración, el coeficiente de regresión para el ajuste lineal correspondiente fue superior a 0.99 por lo que ese rango de concentraciones representa el intervalo lineal de la respuesta del biosensor. En comparación con datos encontrados en la bibliografía, referenciados en la sección de “Resultados y discusión” del presente capítulo, el intervalo lineal encontrado para la curva de calibración resulta muy satisfactorio, ya que se trabaja a potenciales

mucho menores que en los casos referenciados y se obtienen resultados similares o incluso un rango mucho más amplio.

La mínima concentración detectable de analito para el biosensor de glucosa desarrollado (LOD) fue de 0.05 mM. Este valor nos indica la concentración de glucosa que puede ser detectada con razonable certeza utilizando el biosensor de glucosa desarrollado o también definido como la más baja concentración de un analito que el procedimiento analítico puede detectar confiablemente, pero no necesariamente cuantificada en las condiciones de experimentación.

CAPÍTULO 7

CARACTERÍSTICAS DEL BIOSENSOR: TIEMPO DE RESPUESTA, REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA Y ESTABILIDAD

7.1 Introducción

En el capítulo 6 fueron analizadas todas las características analíticas que están relacionadas a la curva de calibración obtenida para la glucosa, tales como el intervalo lineal de concentraciones de glucosa para la curva de calibración, la sensibilidad y el límite de detección (LOD).

En el presente capítulo se presentará el estudio de las características del biosensor que nos brindan información acerca de la performance del mismo. Dentro de estas características se encuentran el tiempo de respuesta, la repetibilidad y precisión intermedia y la estabilidad del electrodo en diferentes condiciones de almacenamiento. Como análisis adicional en este capítulo también se realiza un análisis de la estabilidad de la pasta de carbono almacenada a temperatura de refrigeración (3 °C), es decir, se estudia la estabilidad de la pasta de carbono que aún no ha sido utilizada para evaluar la conveniencia de preparar una cantidad relativamente importante de material.

7.2 Características del biosensor

7.2.1 Tiempo de respuesta en el estado estacionario

El tiempo de respuesta es una característica del biosensor que está representada por el tiempo necesario para alcanzar el 90% de señal de estado estacionario transcurrido desde la inyección del analito en el medio de reacción. Este tiempo nos indica la rapidez o espontaneidad del proceso de medición.

El tiempo de respuesta dependerá del analito, co-sustrato y de las velocidades de transporte del producto a través de diferentes capas o membranas. Por lo tanto, el espesor y la permeabilidad de estas capas son parámetros esenciales. En nuestro caso particular no fue utilizada ninguna membrana, pero si cabe mencionar que como en todo sistema donde hay una interfase existe una capa de difusión cercana a la superficie del electrodo que influye en el tiempo de respuesta del sensor.

Además, también existe una dependencia de los tiempos con las condiciones de mezclado de la muestra en celdas de medición batch, en los cuales el tiempo de mezcla puede no ser despreciable (Thévenot, 1999).

7.2.2 Repetibilidad y precisión intermedia

La repetibilidad se define como la cercanía entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma magnitud por medir, realizadas en las mismas condiciones de medición.

Las condiciones de repetibilidad implican que los resultados de las pruebas se obtienen con el mismo método aplicado a idénticos objetos de prueba, en el mismo laboratorio y por el mismo operador, con el mismo aparato y en un tiempo muy corto entre los distintos análisis.

La repetibilidad puede expresarse de manera cuantitativa en función de las características de dispersión de los resultados (Llamosa, 2007).

Por otra parte, las condiciones para la evaluación de la precisión intermedia permiten la variación de factores como los operadores y aparatos, en un período de tiempo más largo en un mismo laboratorio, mientras que las condiciones de repetibilidad como se mencionó previamente, intentan mantener constantes todos esos factores. Es importante mencionar que para la determinación de la precisión intermedia

deben variarse necesariamente algunos de los factores que causan variabilidad pero no todos.

Algunos de los factores que causan variabilidad en los resultados de pruebas en los laboratorios son: operadores, equipo, reactivos y materiales, técnicas de muestreo, períodos de tiempo, entre otros.

Muchas veces suelen confundirse los conceptos de repetibilidad y reproducibilidad. Las condiciones de reproducibilidad estipulan que se aplique el mismo método a idénticos objetos de prueba en diferentes laboratorios, lo que necesariamente implica que sean diferentes los operadores y los equipos y que haya diferencias en otros factores, como el entorno del laboratorio, las políticas de gestión y control de la calidad e incluso que haya interpretaciones divergentes del procedimiento del método de prueba en sí (Murphy, 2010).

Los datos para evaluar la precisión intermedia se registran en las condiciones de medición que se encuentran entre condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Esto significa por ejemplo, diversos analistas, el mismo instrumento, dentro de un período de tiempo intermedio, etc.

7.2.3 Estabilidad del electrodo sensor y de la pasta de carbono

Las enzimas inmovilizadas ofrecen muchas ventajas respecto de las enzimas no inmovilizadas debido a la facilidad de su reutilización, recuperación y purificación (Han, 2005). La estabilización de enzimas y otras proteínas es un proceso de gran interés en un gran número de áreas donde se requiere estabilidad durante la operación.

Es importante definir en primer lugar los diferentes tipos de estabilidad. Las enzimas pueden ser sometidas a un proceso de estabilización durante el almacenamiento, y esto se realiza tanto para el caso de enzimas presentes en solución,

como para enzimas inmovilizadas en algún tipo de soporte, tal como la superficie de un biosensor.

La estabilidad de almacenamiento puede definirse como la retención de la actividad inicial de una enzima, proteína o de un dispositivo cuando es almacenado bajo condiciones específicas luego de su fabricación. En la determinación de la estabilidad durante el almacenamiento resulta fundamental el estado de almacenamiento o lo que es lo mismo, las condiciones de almacenamiento del sensor. Cuando hablamos de las condiciones de almacenamiento del electrodo hacemos referencia a si el electrodo es almacenado en seco o sumergido en alguna solución, el pH de esta solución, la composición del buffer y la presencia o no de aditivos que favorezcan la mejora de la performance del biosensor.

La estabilidad operacional puede definirse como la retención de la actividad de una enzima o proteína cuando se encuentra en uso, es decir, la estabilidad del sensor en las condiciones de operación del mismo.

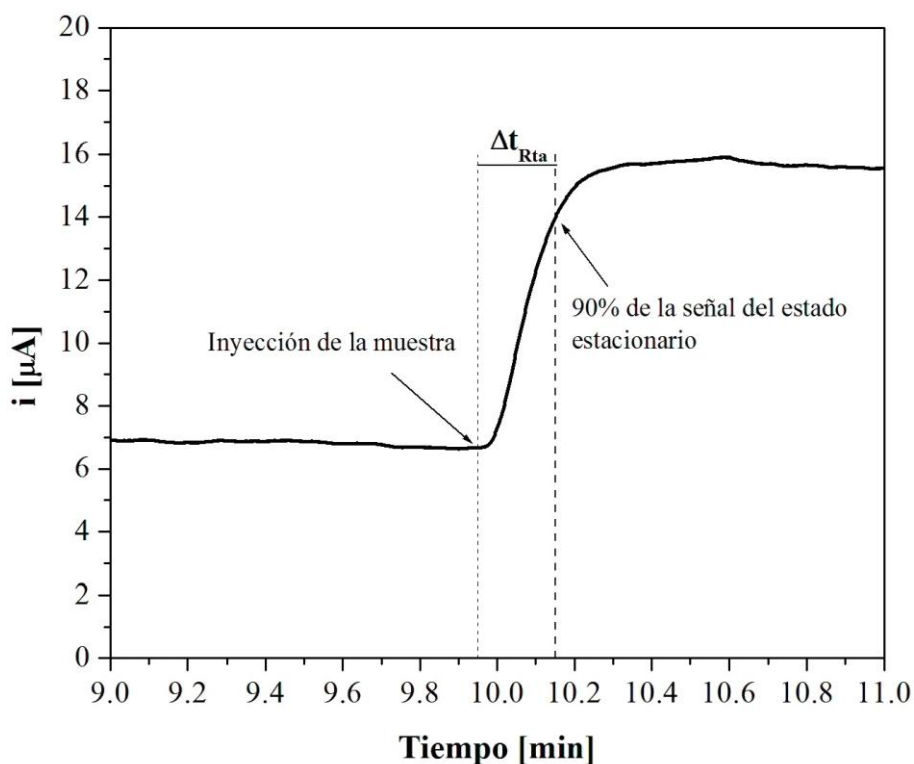
En este capítulo se presentará el estudio de la estabilidad operacional del sensor, y de la estabilidad de almacenamiento bajo diferentes condiciones. Además, se realizó un estudio adicional en el cual fue determinada la estabilidad de almacenamiento de la pasta de carbono final sin uso, es decir, una pasta que fue preparada y almacenada y en cada determinación fue tomada una pequeña cantidad de dicha pasta con la que fue preparado el electrodo y realizadas las determinaciones. El resto de la pasta permaneció en almacenamiento.

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Tiempo de respuesta

El tiempo de respuesta se determinó como el tiempo necesario para que la señal producida por la presencia del analito alcance el 90% de su valor de estado estacionario. Un esquema que muestra gráficamente la manera en que se determina el tiempo de respuesta se presenta en la Fig. 7.1.

Figura 7.1 Esquema ilustrativo de la determinación del tiempo de respuesta



Para la determinación del tiempo de respuesta se realizaron 13 ensayos en los cuales se midió el tiempo que le tomó al sistema alcanzar la señal correspondiente al 90% de la señal de estado estacionario. Estos valores fueron promediados y se determinó la desviación estándar correspondiente para expresar el tiempo de respuesta como función de este parámetro estadístico.

De esta manera el tiempo de respuesta del biosensor se expresó como:

$$\bar{X}_{t.respuesta} \pm 2\sigma_t \quad (7.1)$$

Cabe mencionar que en todos los ensayos llevados a cabo para la realización de la presente tesis, la velocidad de agitación se mantuvo constante, utilizándose el mismo agitador magnético y pastillas de agitación del mismo tamaño para eliminar cualquier discrepancia en los resultados debido a diferencias en el proceso de agitación.

Como fue explicado en el capítulo 4, la velocidad de agitación óptima se buscó de manera tal que no se produzcan vórtices en la superficie del medio de reacción que ocasionarían fluctuaciones en la respuesta del biosensor.

7.3.2 Repetibilidad y precisión intermedia

De acuerdo a la definición de repetibilidad, para la determinación de este parámetro fue necesario realizar determinaciones bajo condiciones idénticas de trabajo. Es decir, los ensayos se llevaron a cabo el mismo día, y fueron realizados en el mismo laboratorio por el mismo operador empleando el mismo equipamiento, soluciones electrolíticas y pasta de carbono.

Por el contrario, para la determinación de la precisión intermedia, fue necesaria la variación de alguna o algunas de las condiciones de ensayo, pero no todas. En este caso se varió el día de las mediciones, la pasta de carbono y las soluciones buffer y de glucosa utilizadas, pero las mediciones las realizó el mismo operador en el mismo laboratorio utilizando el mismo equipamiento.

Para el estudio de estos dos parámetros del biosensor se efectuaron distintos ensayos para concentraciones de glucosa dentro del intervalo lineal de la curva de calibración.

Para la evaluación de la precisión del método se utilizó el Coeficiente de Variación (CV). Los coeficientes de variación obtenidos para cada concentración fueron comparados con los correspondientes coeficientes de variación de Horwitz, que da una idea del máximo valor de CV permitido para una dada concentración de analito.

El coeficiente de variación experimental se calculó como:

$$CV\% = \frac{\sigma}{\bar{x}} 100 \quad (7.2)$$

donde

σ = desviación estándar

\bar{x} = media de las señales respuesta

Según Horwitz en la determinación de cualquier tipo de muestra, la precisión interlaboratorios (precisión intermedia) del método analítico en cuestión se considera aceptable cuando el coeficiente de variación experimental es inferior al calculado mediante la siguiente expresión.

$$CV\% = 2^{(1-0.5\log(c))} \quad (7.3)$$

donde

c = concentración del analito en g/mL.

El CV% obtenido con la expresión (7.3) sólo es aplicable para casos en los cuales las condiciones de ensayo son diferentes, es decir, se utiliza para casos en los cuales las determinaciones son llevadas a cabo en distintos laboratorios, o con distintos analistas o casos en los cuales alguna de las condiciones de experimentación se ha variado en las distintas determinaciones realizadas, es decir, dicha ecuación es aplicable bajo condiciones de precisión intermedia.

En el caso de la repetibilidad, para la cual se necesitan condiciones idénticas en las distintas determinaciones, el valor máximo del CV% de Horwitz aceptable debería ser la mitad o 2/3 del correspondiente CV% de Horwitz interlaboratorio (precisión intermedia).

Es decir:

$$CV\% = 0.5 \left[2^{(1-0.5 \log(C))} \right] \quad \text{ó} \quad CV\% = \frac{2}{3} \left[2^{(1-0.5 \log(C))} \right] \quad (7.4)$$

Los valores calculados con la ecuación de Horwitz, tanto para análisis interlaboratorios como para análisis intralaboratorio, se consideran límites razonables de variabilidad que permiten comparar y calificar la precisión de cualquier método analítico en función de la concentración del analito (Horwitz, 1982).

7.3.3 Estabilidad

Los aspectos estudiados en este capítulo relacionados con la estabilidad del biosensor fueron:

- Estabilidad operacional (como función del número de determinaciones y como función del tiempo de uso).

- Estabilidad del sensor durante el almacenamiento
- Estabilidad de la pasta de carbono final almacenada bajo condiciones de refrigeración.

Se estimó la estabilidad operacional del biosensor en términos de usos repetitivos y en término de horas de uso permitiéndose en este último caso la realización de pequeños pulidos superficiales en el caso que fuera necesario. Las determinaciones amperométricas para la determinación de esta característica se llevaron a cabo trabajando siempre a temperatura ambiente y bajo las condiciones óptimas de experimentación encontradas para nuestro biosensor.

El estudio y análisis de la estabilidad operacional como una función del número de inyecciones se realizó mediante la inyección sucesiva de alícuotas de una solución de glucosa, incrementándose en cada inyección la concentración final en 0.1 mM. Se trabajó en todo momento en la región lineal de concentraciones determinada para la glucosa en el capítulo previo. La estabilidad operacional respecto del número de usos fue estimada sin regeneración de la superficie del electrodo.

Por el contrario la estabilidad operacional como una función del tiempo fue determinada mediante la inyección de analito en tiempos espaciados con potencial aplicado en forma constante al electrodo de trabajo. Una de las mayores ventajas prácticas de los biosensores de pasta de carbono es la posibilidad de regeneración de la superficie mediante un proceso tan simple como es el pulido. Es por ello, que en la determinación cuando la respuesta entregada por el biosensor presentó una desviación estándar muy cercana o superior al 10% respecto de la señal inicial, se efectuó un pequeño pulido de la superficie, continuando inmediatamente la medición. La finalidad

principal de este estudio fue poder evaluar el comportamiento del sensor luego de haber sido efectuada una pequeña renovación de su superficie activa.

En la Fig. que se muestra a continuación se puede apreciar con gran claridad como es la superficie sensora del electrodo de trabajo, la cual permite la realización de pulido superficial cuando las señales entregadas por el mismo disminuyen.

Figura 7.2 Fotografía de la superficie sensora del electrodo de trabajo



Como se puede observar, la pasta de carbono está introducida sobre un pequeño cilindro en el electrodo de teflón, presionada a través de un contacto eléctrico de acero, tal como se explicó en el capítulo 2. Esto permite que el pulido se realice muy fácilmente girando levemente el tornillo que desliza el cilindro de acero, empujando hacia fuera la pasta de carbono. El pulido de la superficie del sensor se realizó en todos los casos en los que fue necesario sobre papel de filtro.

Respecto a la estabilidad durante el almacenamiento del biosensor, fue estudiada en diversas condiciones de almacenaje del sensor.

- Estabilidad del electrodo almacenado en condiciones de temperatura ambiente y bajo refrigeración (3 °C). El electrodo fue almacenado bajo condiciones de refrigeración tanto en seco como en solución buffer de fosfatos pH 7.

- Análisis de la estabilidad de la pasta de carbono sin uso almacenada en condiciones de refrigeración (3 °C).

Para el análisis correcto de la estabilidad del sensor se utilizó un criterio de aceptación, por encima del cual se considera que la estabilidad no se mantiene. Este criterio está representado por la desviación estándar de cada medición respecto del valor inicial de señal obtenido con el biosensor, valor que no puede ser mayor al 10%. Este criterio es ampliamente utilizado para la comparación de resultados obtenidos experimentalmente, no sólo en el ámbito de los biosensores.

Todos los estudios presentados a continuación fueron realizados como mínimo por duplicado.

7.4 Resultados y discusión

7.4.1 Tiempo de respuesta

Como ya mencionamos con anterioridad, el tiempo de respuesta para biosensores representa el tiempo necesario en alcanzarse el 90% de la respuesta de estado estacionario desde la inyección del analito, tal como se esquematiza en la Fig. 7.1.

Mediante el análisis de 13 determinaciones, se obtuvo que el tiempo de respuesta para el biosensor amperométrico diseñado y construido para la determinación de glucosa en jugos de fruta fue de 10.7 ± 2.9 s.

Se reportan en bibliografía tiempos de respuesta para diversos biosensores amperométricos de glucosa. Los tiempos de respuesta encontrados para biosensores con características similares al aquí desarrollado se encuentran entre los 30 – 120 s. Por ejemplo, para un biosensor amperométrico que contiene polivinilferroceno/GOx operado a 0.6 V vs SCE se obtuvieron tiempos de respuesta en el rango que va desde 30 – 40 s. Además, en este mismo trabajo se analizó el tiempo de respuesta correspondiente a un sensor en el cual se agrega oro como material de electrodo. En este caso el tiempo de respuesta fue aún mayor que para el caso presentado previamente, siendo el rango entre 40 – 60 s (Sulak, 2006). Otro caso fue un biosensor bienzimático de GOx y peroxidada que tuvo un tiempo de respuesta aproximado de 60 s (Rondeau, 1999), o el caso de un biosensor con GOx inmovilizada en un electrodo modificado de grafito que tuvo un tiempo de respuesta de 120 s (Dimcheva, 2002) o un biosensor bienzimático para detectar glucosa basado en polipirrol y carbono cerámico como material de electrodo tuvo un tiempo de respuesta algo menor a 25 segundos (Tian, 2002).

La sencillez del biosensor de pasta de carbono desarrollado en la presente tesis podría ser una de las razones por la cual el biosensor presenta un tiempo de respuesta realmente muy bajo. En el presente sensor no se incorporan membranas externas a la superficie sensora o materiales que puedan estar involucrados en la inmovilización de la enzima y pueden dificultar la difusión del analito hacia la superficie del mismo con el consecuente retardo en la señal respuesta. Un ejemplo de este último caso son

electrodos en los cuales se realiza la deposición o el crecimiento de algún polímero para mejorar algunas de sus propiedades como puede ser la estabilidad de almacenamiento.

7.4.2 Repetibilidad y precisión intermedia

Para la evaluación de la repetibilidad se tomó como criterio de aceptación $0.5CV\%$ Horwitz, tal y como fue indicado el criterio de aceptación.

En la tabla que se muestra a continuación se presentan los valores de los coeficientes de variación experimentales de dos réplicas para cada concentración de glucosa y de los valores de $0.5CV\%$ de Horwitz que corresponden a los análisis de repetibilidad.

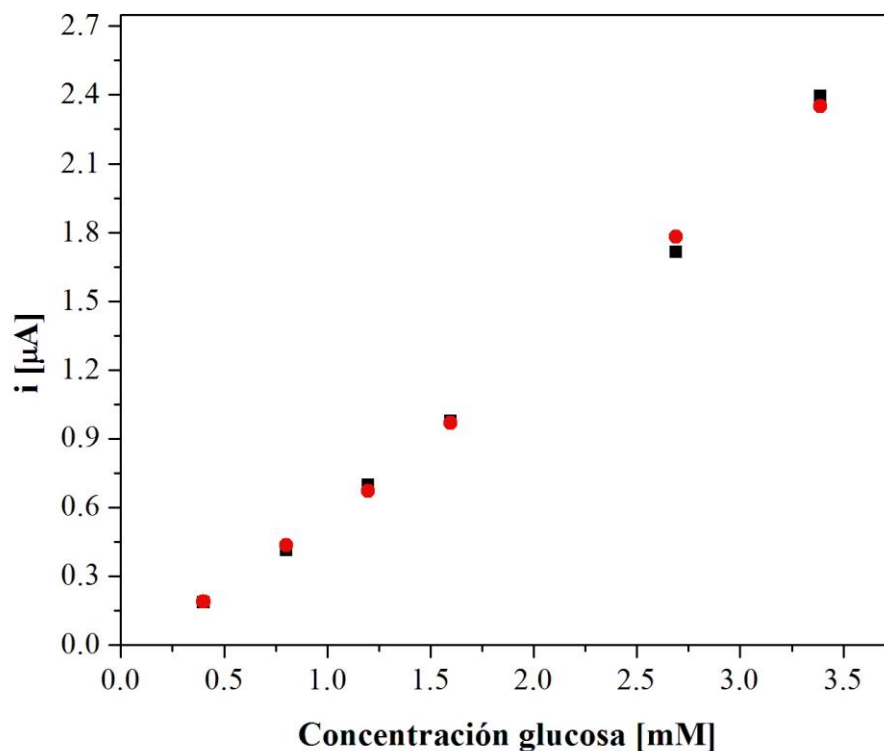
Tabla 7.1 Coeficiente de variación experimental y coeficientes de Horwitz para análisis de repetibilidad

Conc.Glucosa [mM]	CV% Experimental	0.5CV% Horwitz
0.4	0.34	4.20
0.8	3.08	3.79
1.2	2.70	3.56
1.6	0.67	3.41
2.69	2.70	3.15
3.38	1.28	3.05

Como se puede observar en la tabla 7.1, para todas las concentraciones de glucosa estudiadas, los valores de CV% experimentales obtenidos son menores que los valores correspondientes al $0.5CV\%$ de Horwitz. Esto indica que la precisión intralaboratorio del biosensor respecto a la repetibilidad de la señal obtenida con el biosensor es claramente aceptable.

El gráfico correspondiente se muestra a continuación.

Figura 7.3 Estudio de la Repetibilidad del electrodo de pasta de carbono



Con respecto al análisis de precisión intermedia realizado sobre las respuestas del biosensor, se estudió también esta característica para un conjunto de concentraciones pertenecientes a la región de linealidad de la respuesta del biosensor, pero en este caso no fue necesario barrer todo el rango lineal de concentraciones de la curva de calibración.

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para el estudio de la precisión intermedia con los correspondientes coeficientes de Horwitz experimentales y de criterio de aceptación para esta determinación en particular.

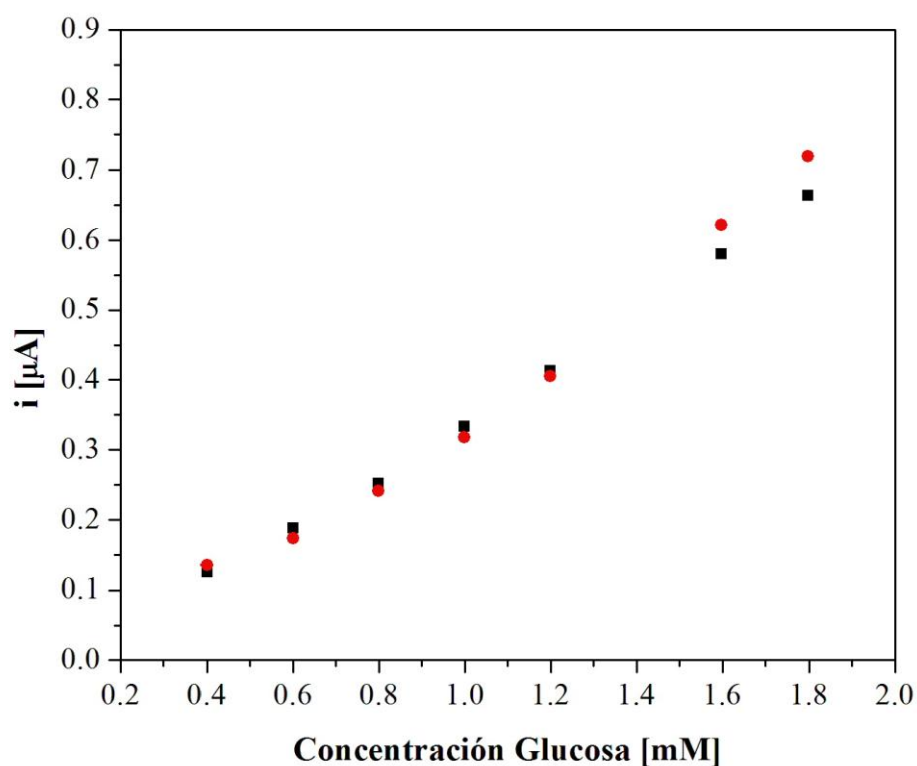
Tabla 7.2 Coeficiente de variación experimental y coeficientes de Horwitz para análisis de Precisión

Intermedia

Conc.Glucosa [mM]	CV% Experimental	CV% Horwitz
0.4	5.62	8.40
0.6	5.60	7.91
0.8	2.98	7.58
1	3.30	7.32
1.2	1.38	7.13
1.6	4.90	6.82
1.8	5.80	6.70

Como se observa en la tabla 7.2, nuevamente, los CV% de Horwitz en todos los casos estudiados son mayores que los CV% experimentales obtenidos lo que indica que el biosensor presenta una excelente precisión intermedia. El gráfico correspondiente al análisis previo se muestra a continuación.

Figura 7.4 Análisis de Precisión Intermedia del biosensor amperométrico para determinar glucosa en jugos de manzana



Es preciso aclarar en este punto que este estudio de la repetibilidad de la señal del biosensor de pasta de carbono se realizó sobre un rango más amplio de concentraciones de glucosa que en el caso de la precisión intermedia, ya que para la determinación de este parámetro del sensor se debe trabajar en concentraciones correspondientes a los extremos de la región lineal de concentraciones y también en puntos intermedios de concentración de glucosa dentro de dicho intervalo.

7.4.3 Estabilidad

7.4.3.1 Estabilidad operacional

En primer lugar se presentan los resultados que fueron obtenidos para la estabilidad operacional del sensor en función del número de determinaciones. Se

registraron las señales obtenidas al inyectar sucesivas alícuotas de glucosa en el medio de reacción para determinar como se ve afectada o no la estabilidad del biosensor con las diferentes inyecciones de analito agregadas. En la Fig. 7.5 se muestran los resultados obtenidos para este caso sin efectuar regeneración superficial.

Figura 7.5 Estabilidad operacional del sensor sin regeneración superficial

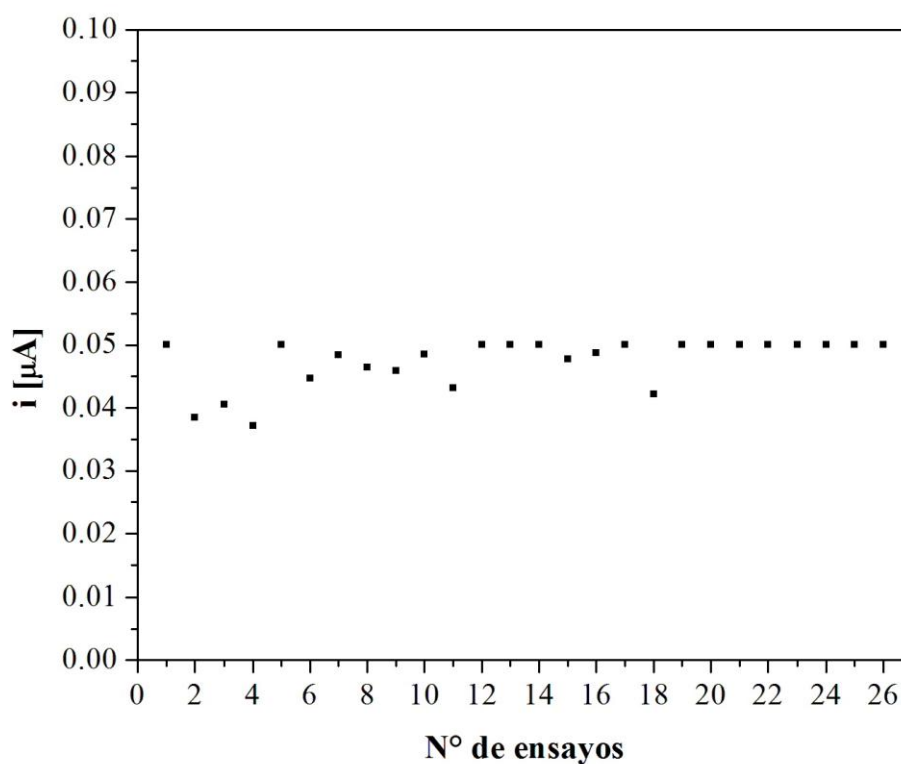
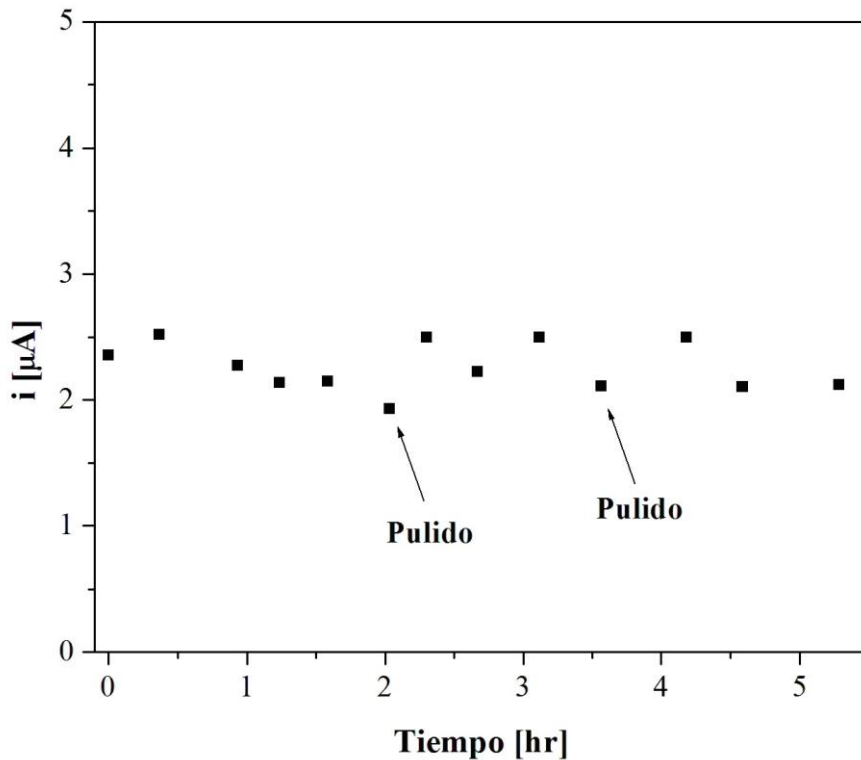


Figura 7.6 Estabilidad del electrodo sensor en función del uso con pulido superficial



La Fig. 7.6 muestra las respuestas obtenidas con el biosensor de glucosa en las condiciones óptimas de uso como una función del tiempo de uso en una jornada. Sobre la Fig. se indican las mediciones luego de las cuales se llevó a cabo el pulido de la superficie del sensor.

Puede observarse claramente que al realizar el pulido, lo que produce una renovación de la superficie sensora, la señal de respuesta obtenida para la glucosa aumenta hacia un valor muy próximo al valor correspondiente a la señal inicial registrada con el biosensor. Esto nos indica la efectividad del proceso de renovación de la superficie, posible gracias a la utilización de electrodos de pasta de carbono.

El tiempo de trabajo del sensor con dos regeneraciones de la superficie satisfactorias fue de 4 horas 15 minutos aproximadamente, tiempo después del cual, aún

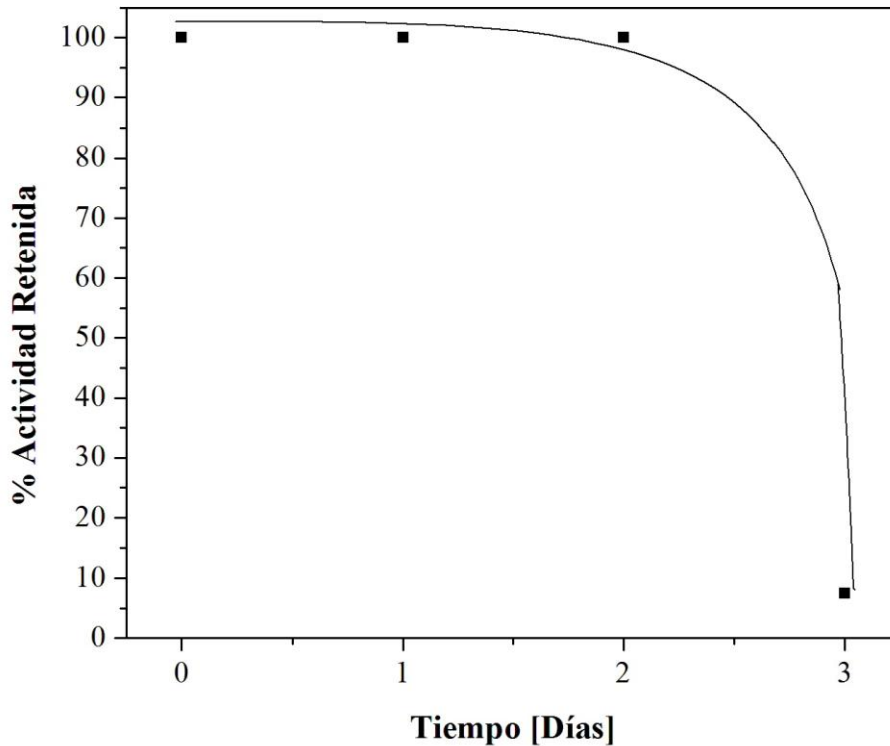
con regeneración de la superficie, el electrodo pierde actividad obteniéndose señales que presentan una desviación estándar cercana o superior al 10%, sin recuperación de la señal inicial detectada. Esto nos indica que el electrodo puede ser utilizado durante poco más de 4 horas sin pérdida aparente de la actividad del mismo, prácticamente en continuo, con dos pulidos superficiales durante ese tiempo.

No debe confundirse entre la estabilidad operacional en función del tiempo de utilización con la estabilidad en el tiempo, éstos representan dos ensayos completamente diferentes. El primero de ellos nos informa sobre la estabilidad del sensor en uso durante un determinado período de tiempo, mientras que el segundo ensayo determina la estabilidad del sensor en el tiempo cuando el mismo es almacenado bajo determinadas condiciones luego de realizarse la determinación.

7.4.3.2 Estabilidad durante el almacenamiento

Respecto de la estabilidad del sensor durante el almacenamiento, uno de los estudios realizados fue el análisis de estabilidad del electrodo sensor almacenado bajo condiciones de refrigeración sumergido en la solución buffer de fosfatos a pH 7.

Figura 7.7 Estabilidad en el tiempo del electrodo sensor almacenado bajo condiciones de refrigeración (3 °C) sumergido en solución buffer de fosfatos pH 7



En la Fig. 7.7 puede apreciarse que el electrodo sensor retiene el 100% de su actividad inicial durante un período de 48 horas, cayendo bruscamente en un período de 72 horas a valores que representan aproximadamente el 10% de su actividad inicial, con un valor de desviación estándar superior al 10%.

Una posible causa de la disminución abrupta en la actividad del sensor podría ser la variación de temperatura de 4 °C a 20 °C y viceversa.

A modo de ejemplo y con fines comparativos se puede mencionar que un electrodo de pasta de carbono con polipirrol electrodepositado sobre su superficie presenta una estabilidad de almacenamiento de 90% luego de estar sumergido durante una semana en solución buffer de fosfatos y a una temperatura de 4 °C, realizándose las

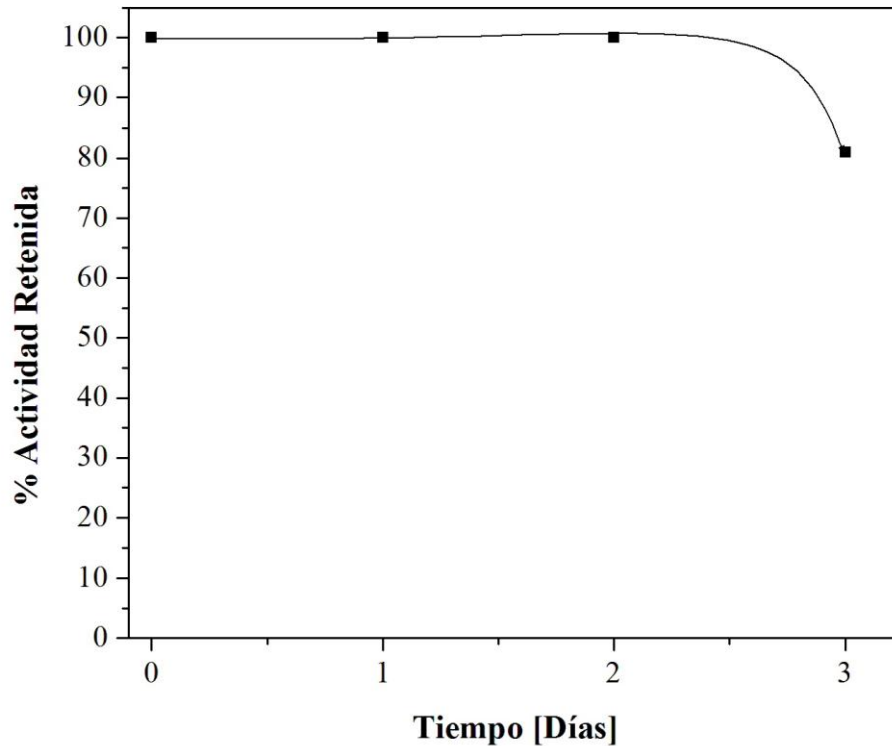
determinaciones cada 3 días, con lo cual el cambio abrupto en la temperatura sólo se produjo dos veces en la semana que duró la determinación (Tian, 2002).

En nuestro caso, se retuvo el 100% la actividad inicial durante 48 horas pero realizándose a diario las mediciones correspondientes, con lo cual también el cambio abrupto en la temperatura ocurrió dos veces, y además, es muy probable que la causa de la disminución marcada de la señal se deba principalmente a las grandes variaciones de temperatura sufridas por el biosensor a diario. Por otro lado, si bien las estabilidades de los dos sensores son diferentes, el biosensor con polipirrol es claramente un sensor más sofisticado en cuanto a los materiales empleados y en cuanto a su construcción, y sufrió a lo largo de la determinación de estabilidad los mismos cambios de temperatura que el biosensor de pasta de carbono. Es por ello que nuevamente mostramos conformidad con este sensor sencillo y más económico.

Otro estudio reporta la estabilidad de un electrodo que contiene glucosa oxidasa y hexoquinasa inmovilizadas en una membrana de sílice híbrido, película que ha demostrado ser una excelente matriz para la inmovilización de enzimas y efectiva para mantener su bioactividad. Los resultados indican que el electrodo almacenado a 4 °C en una solución buffer a un pH de 7.4 sólo por un período de 24 horas mantiene la actividad inicial, decreciendo luego en forma gradual (Liu, 2007).

Con respecto al análisis de la estabilidad del electrodo sensor almacenado en seco en condiciones de refrigeración, el resultado obtenido se muestra en la Fig. 7.8.

Figura 7.8 Estabilidad en el tiempo del electrodo almacenado bajo condiciones de refrigeración (3 °C)
en seco



Nuevamente y tal como ocurrió para el electrodo almacenado bajo condiciones de refrigeración pero sumergido en la solución buffer de fosfatos, el electrodo hasta las 48 horas (2 días) mantuvo el 100% de su actividad inicial, pero a las 72 horas (3 días) el electrodo presentó una actividad que representó el 81% de la actividad inicial, es decir, a diferencia del caso anterior, la disminución a las 72 horas no fue brusca. Luego de este período la señal al inyectar la solución de glucosa fue completamente inestable con fluctuaciones que no se corresponden a la respuesta de un biosensor amperométrico y no alcanzándose señales de estado estacionario.

En resumen, esto nos indica que el biosensor en cuestión mantiene el 100% de la actividad inicial cuando es almacenado en condiciones de temperatura de refrigeración, sumergido en la solución buffer o en seco, durante un período de 48 horas, luego del

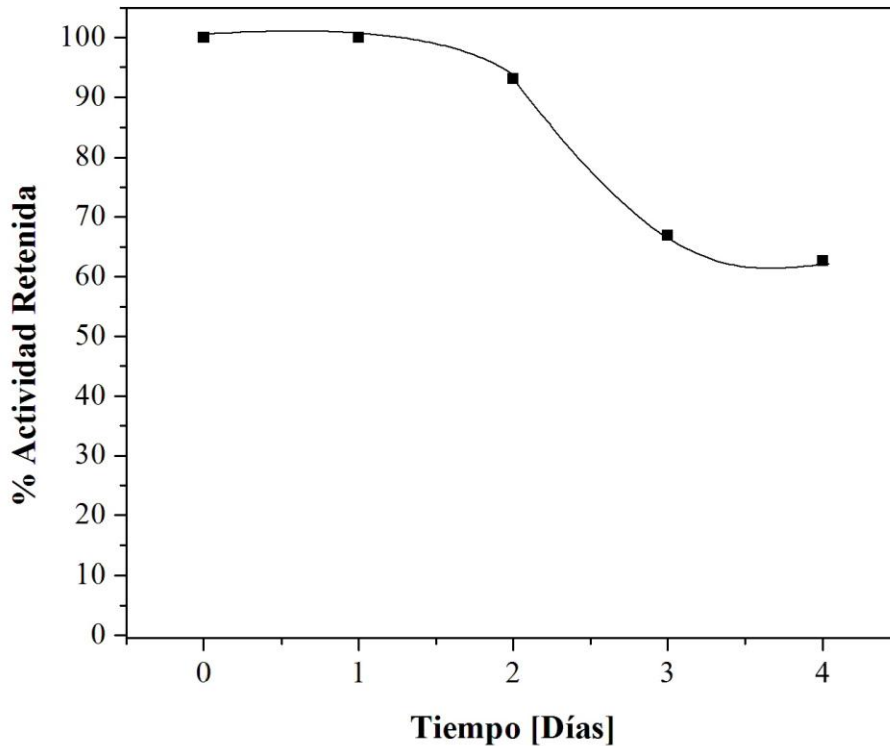
cual el electrodo disminuye abruptamente su actividad y no presenta estabilidad en las señales resultantes al inyectar el analito.

Datos encontrados en bibliografía correspondientes a un biosensor con glucosa oxidasa inmovilizada en un electrodo de grafito modificado con pequeñas cantidades de platino y paladio procedimiento que permite prolongar el período de estabilidad de un sensor. En este caso el sensor mantiene luego de 7 días el 50% de su actividad inicial cuando es almacenado en seco a una temperatura de 4 °C (Dimcheva, 2002), mientras que en el caso aquí estudiado el sensor mantiene una actividad superior al 80% de la actividad inicial durante un período de 3 días completos, lo que nos demuestra que el electrodo de glucosa se comporta en cuanto a la estabilidad dentro de los valores encontrados para este tipo de sensor.

Resultados de estabilidad de un biosensor bienzimático para determinación de glucosa que utiliza carbono cerámico como material de electrodo y contiene una membrana de polipirrol, el cual fue almacenado a una temperatura de 4 °C en seco muestran que el electrodo no mantiene el 100% de la actividad inicial sino que a las 24 horas de almacenamiento la señal presenta un decrecimiento respecto del valor de señal inicial registrado (Tian, 2002).

En la Fig. 7.9 se muestran los resultados que fueron obtenidos en el estudio de la estabilidad del electrodo sensor en condiciones de temperatura ambiente, en seco.

Figura 7.9 Estabilidad del electrodo sensor almacenado en condiciones de temperatura ambiente (20 ± 2 °C), en seco



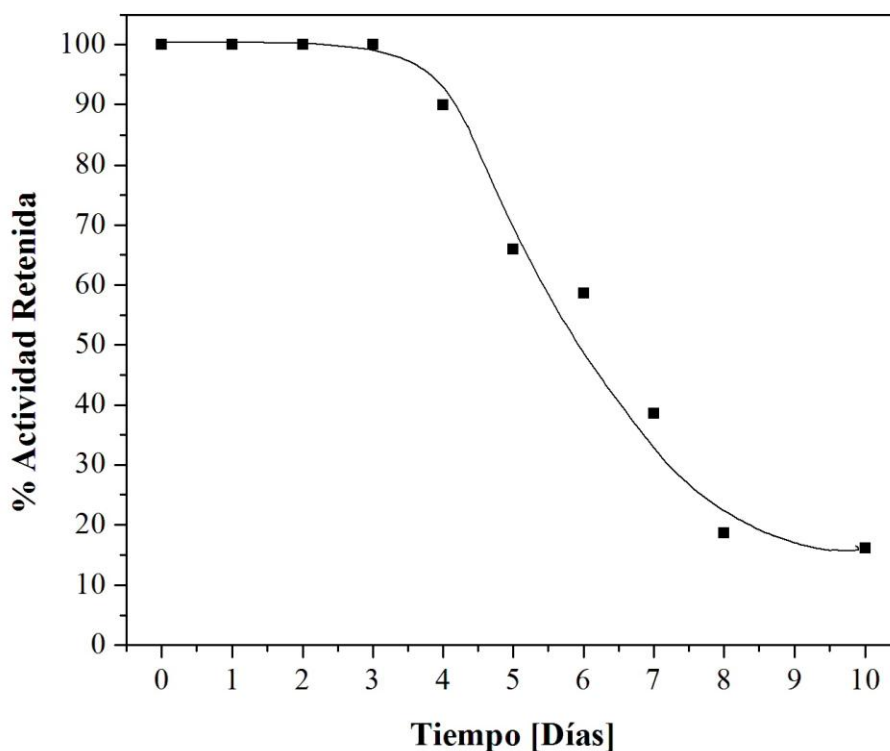
Puede verse que el electrodo mantiene el 100% de su actividad inicial en las primeras 24 horas, disminuyendo al 95% a las 48 horas posteriores a su preparación, llegando al 65% de su actividad inicial en el día 4, cayendo luego a valores de actividad muy bajos. Se observa que la actividad inicial se mantiene por un período inferior que en el caso presentado previamente (condiciones de refrigeración), sin embargo, en este último caso la disminución en la señal se presenta de manera más gradual que para el caso previo.

Si bien la actividad enzimática inicial del sensor se mantiene durante un período de tiempo mayor en el caso del sensor en mantenido en refrigeración, lo que nos indica que la enzima retiene mas actividad a más bajas temperaturas, los cambios de temperaturas a los que se ha sometido el sensor sin duda afectan también a su actividad,

quedando esto demostrado en la forma abrupta que el sensor pierde actividad desde las 48 a las 72 horas de iniciado el análisis para el caso del electrodo sumergido en la solución buffer y de las 72 horas para el caso del sensor almacenado en seco tiempo después del cual el electrodo entrega señales completamente inestables.

Además, se llevó a cabo un estudio de la estabilidad de la pasta de carbono sin uso, almacenada bajo condiciones de refrigeración (3-5 °C).

Figura 7.10 Estabilidad de la pasta de carbono almacenada bajo condiciones de refrigeración (3-5 °C)



Como se puede observar en la Fig. 7.10, la pasta de carbono mantiene el 100% de su actividad durante 3 días en condiciones de refrigeración (entre 3–5 °C). Luego la actividad cae al 90% en el día 4 decreciendo gradualmente hasta llegar a un valor de 15% de la actividad inicial en un período de 10 días consecutivos.

En este último caso, si bien la pasta se encuentra almacenada a temperaturas bajas, no se produce el descenso brusco de la señal debido a que para realizar las determinaciones se tomó una pequeña cantidad de pasta y el resto fue inmediatamente colocado en la heladera. Si bien la actividad de la enzima claramente desciende al ser almacenada a una temperatura de 3 °C, la disminución es gradual y puede utilizarse la pasta sin pérdida de actividad por 3 días completos. No se han encontrado datos en bibliografía correspondientes a un estudio similar al previo.

En el estudio de la estabilidad de un sensor durante su almacenamiento, es fundamental tener en consideración un aspecto importante para mejorar la vida útil del sensor. Una vez usado el electrodo es sumamente necesario realizar una minuciosa limpieza de la superficie del mismo con agua destilada para evitar que moléculas de glucosa (o de cualquier otro analito) queden adheridas a la superficie del mismo afectando la actividad del sensor y en consecuencia esto afectar la estabilidad del sensor. En todos los casos estudiados el electrodo fue lavado cuidadosamente con agua destilada para evitar este inconveniente.

7.5 Conclusiones

Experimentos de amperometría mostraron que este electrodo conteniendo ferroceno y glucosa oxidasa tiene un muy rápido tiempo de respuesta dentro de un amplio rango de concentraciones de glucosa, alcanzando el 90% de la corriente de respuesta en el estado estacionario en un tiempo promedio de 10 segundos a un bajo potencial aplicado al electrodo de trabajo.

Además, el biosensor presentó una excelente repetibilidad en las señales y una excelente precisión intermedia en el rango de lineal de concentraciones de la curva de calibración y en concentraciones intermedias respectivamente.

En relación a la estabilidad operacional del biosensor de glucosa como función del número de inyecciones realizadas, los resultados obtenidos indican una muy buena performance del electrodo, que presenta señales respuestas sin diferencias significativas durante 26 determinaciones consecutivas y sin pulido superficial. Lo mismo se puede decir para el estudio de la estabilidad del sensor respecto al tiempo de uso. Durante aproximadamente 5 horas de funcionamiento el sensor mostró excelentes respuestas ya que las señales se mantuvieron prácticamente invariables, y en los casos en los cuales las señales presentaron una desviación estándar mayor al 10% se realizó un pequeño pulido superficial con la finalidad de producir la renovación superficial lo que produjo la recuperación de la señal de corriente a valores muy similares a los correspondientes a la señal inicial entregada por el biosensor. Luego de poco más de 4 horas, la señal inicial no se recuperó aún con la realización de pulido superficial.

Con respecto a la estabilidad del sensor almacenado bajo condiciones de refrigeración, se demostró que el electrodo mantiene su actividad inicial por un período de 48 horas cuando es almacenado a una temperatura de 3 °C tanto sumergido en solución buffer como en seco, aunque en el primer caso, el descenso de la actividad fue claramente mucho más brusco en un período de 72 horas.

Respecto a la estabilidad del sensor almacenado a temperatura ambiente, podemos concluir que éste mantuvo la actividad inicial durante un período de 24 horas, tiempo después del cual la actividad decreció gradualmente. Lo mismo ocurrió para la pasta de carbono almacenada en condiciones de refrigeración, que mantuvo su actividad inicial por un lapso de 72 horas completas, decreciendo en forma gradual en los días subsiguientes.

Se conoce que la estabilidad en el caso de biosensor es un tema ampliamente estudiado debido a que justamente este tipo de electrodos trabaja con material biológico,

el cual debe ser cuidadosamente manipulado y almacenado para optimizar su performance en los distintos procesos en los cuales sea utilizado.

Es por ello que si bien las estabilidades estudiadas no superan los 4 días, se considera que para el presente biosensor estos resultados son muy buenos dada la sencillez de su fabricación y de los materiales involucrados en la construcción del mismo, y su relativo bajo costo.

CAPÍTULO 8

ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS

8.1 Introducción

El jugo de manzana está constituido por diferentes compuestos, los cuales le otorgan su sabor, olor y color característicos y sus diferentes propiedades nutricionales. Estos compuestos y sus correspondientes concentraciones aproximadas se incluyen en el capítulo 1 de la presente tesis.

Un inconveniente que presentan la mayoría de los biosensores es la aparición de interferencias en la señal obtenida debidas a la presencia de algunas sustancias. En el caso de nuestro biosensor, si bien la enzima GOx y por lo tanto el electrodo sensor es altamente selectivo para la glucosa, estas sustancias originan interferencias ya que son electroquímicamente activas al potencial de trabajo. Es fundamental hacer un estudio minucioso de interferencias cuando se trabaja con biosensores ya que la contribución de corriente de estas sustancias oxidables puede comprometer la selectividad y por lo tanto la precisión global de la medición (Wang, 2008).

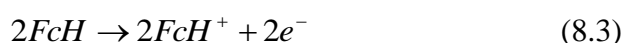
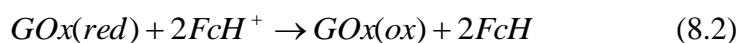
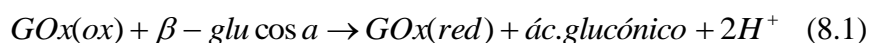
Hasta la actualidad han sido desarrollados una gran variedad de métodos que ayudan a eliminar o reducir interferencias electroquímicas, algunos de los cuales se mencionan a continuación.

- Recubrimiento con una capa pre-oxidante para eliminar las interferencias
- Recubrimiento de la capa enzimática con una membrana permeoselectiva
 - Exclusión por tamaño
 - Repulsión electrostática

- Medición de la corriente de reducción del H₂O₂ catalizada por una capa modificada
- Capa de Metal- hexacianoferrato
- Carbonos metalizados
- Peroxidada Horseradish (HRP)
- Disminución del potencial aplicado al electrodo mediante la incorporación de un mediador electroquímico.

Conociendo el comportamiento de los biosensores amperométricos y de acuerdo a la gran cantidad de trabajos que presentaron ciertos inconvenientes gracias a la aparición de interferencias, sobre todo con la del ácido ascórbico, previamente a la obtención de resultados se evaluaron distintas posibilidades para reducir o eliminar el problema de las interferencias, decidiéndose finalmente encarar el problema mediante la última de las técnicas mencionadas: la disminución del potencial aplicado mediante la incorporación de un mediador electroquímico, método para el cual existe una gran disponibilidad de trabajos e información.

Como fue indicado en el capítulo 2, las reacciones que se llevan a cabo en presencia de ferroceno como mediador electroquímico son:



Todas las cuestiones que tienen que ver con el empleo del ferroceno como mediador electroquímico y las diferentes características de este compuesto fueron presentadas en detalle en el capítulo 3.

En el presente capítulo se muestra el desarrollo de un estudio detallado de la evaluación realizada para todas las sustancias que conforman el jugo de manzana y que fueron consideradas como posibles sustancias interferentes para el biosensor en cuestión, realizándose diversas determinaciones amperométricas con cada una de ellas, analizándose cuidadosamente para cada uno de los casos las respuestas obtenidas con el biosensor de glucosa.

8.2 Materiales y métodos

8.2.1 Estudio de las interferencias

En primer lugar se realizó la evaluación de todas las sustancias del jugo de manzana que pueden contribuir a la aparición de interferencias bajo las condiciones de trabajo del sensor.

Como posibles sustancias interferentes presentes en el jugo de manzana se estudiaron la fructosa, sacarosa, ácido málico, almidón, ácido ascórbico (AA) compuesto también conocido como Vitamina C. Se analizó además el ácido cítrico, compuesto que no está presente en grandes cantidades en el jugo de manzana o que incluso puede estar ausente, pero resulta de gran interés conocer si resulta una sustancia interferente, en caso que se desee aplicar el biosensor en muestras de jugos de otras frutas distinta de la manzana, como por ejemplo en jugos de naranja.

Se realizó el estudio de interferencias para las diferentes sustancias citadas previamente para concentraciones correspondientes a las de una solución de jugo al 4% (v/v). La razón por la cual se efectuó de esta manera el estudio es debido a que para esta

dilución de jugo de manzana la concentración de glucosa se encuentra sobre el límite superior del intervalo de concentraciones de glucosa de la curva de calibración del biosensor.

Se prepararon las diferentes soluciones de los compuestos, y se efectuaron las determinaciones amperométricas utilizando el biosensor, inyectando un cierto volumen conocido de cada una de ellas de manera tal que la concentración final para la cual se realiza la medición sea igual a la concentración de cada uno de los compuestos en el jugo de manzana. Los resultados fueron comparados con la señal medida para la glucosa con el biosensor (4.48 mM), para una concentración de glucosa similar a la presente en el jugo de manzana. Estas comparaciones individuales nos permitieron evaluar el comportamiento de los distintos compuestos de interés a un potencial de 0.16 V vs. Ag/AgCl y determinar de esta manera si presentan interferencia comparando la relación de la señal de cada compuesto respecto a las señales de glucosa obtenidas para esas condiciones.

En la tabla 8.1 se muestran las concentraciones aproximadas de los distintos compuestos correspondientes a una hipotética solución de jugo de manzana al 4% (v/v).

Tabla 8.1 Concentración de los compuestos en estudio para una concentración igual a la de una solución al 4% de jugo de manzana.

Sustancia en estudio	Concentración Final de la sustancia
Acido ascórbico	0.000011 M
Fructosa	0.05 M
Sacarosa	0.009 M
Almidón	0.00019 M
	0.0014 M
Acido málico	0.0058 M
Acido Cítrico	0.12 M

8.2.2 Eliminación de interferencias

En diferentes ensayos realizados, los cuales serán presentados en la sección 8.3 dentro de este capítulo, el ácido ascórbico mostró claramente su característica de sustancia interferente para el biosensor amperométrico en estudio al potencial de trabajo seleccionado (0.16 V vs. Ag/AgCl). Este resultado fue el esperado ya que el ácido ascórbico es un compuesto conocido ampliamente por su gran poder interferente en biosensores y ha mostrado esta característica en una enorme cantidad de oportunidades (Jawaheer, 2003).

Es debido a esto es que resultó necesaria la investigación y el estudio de diferentes métodos que permitan la eliminación de este compuesto del jugo de manzana, previo a la determinación de la concentración de glucosa en el jugo. Dentro de las técnicas analizadas, se decidió realizar la eliminación del ácido ascórbico mediante dos ensayos completamente diferentes para luego realizar una comparación de ambos y evaluar ventajas o desventajas de cada uno de ellos.

La primera de las técnicas estudiada fue la eliminación enzimática del ácido ascórbico mediante la utilización de una enzima específica para este compuesto, la enzima ascorbato oxidasa, la cual transforma al ácido ascórbico en una sustancia completamente inerte al potencial de trabajo utilizado, el ácido dehidroascórbico; La segunda técnica empleada fue la eliminación natural del ácido ascórbico mediante la exposición controlada de este ácido al oxígeno del aire ambiente, lo que produce su oxidación. Esto se puede lograr en un período de tiempo relativamente corto, ya que el jugo de manzana tiene pequeñas cantidades de ácido ascórbico y por lo tanto no se requiere una exposición al aire prolongada.

A continuación se presenta un detalle de estas dos técnicas, su fundamento y su forma de implementación para la eliminación del ácido ascórbico y como resultado de

su aplicación la eliminación o reducción en la señal que este compuesto produce. En ambos casos, la eliminación de la sustancia interferente se corresponde con su transformación hacia una forma inerte, es decir, que no presente posibilidad de oxidación al potencial de trabajo seleccionado.

8.2.2.1 Eliminación enzimática del ácido ascórbico

Como se mencionó previamente, la primera técnica utilizada para la eliminación de la interferencia producida por el ácido ascórbico es la “Eliminación enzimática del ácido ascórbico”. Esta técnica consiste en la eliminación del ácido ascórbico mediante su transformación enzimática a ácido dehidroascórbico. Para optimizar la utilización y la vida útil de la enzima encargada de la transformación, se procedió a su inmovilización en un gel de alginato de sodio con el fin de poder reutilizarla varias veces.

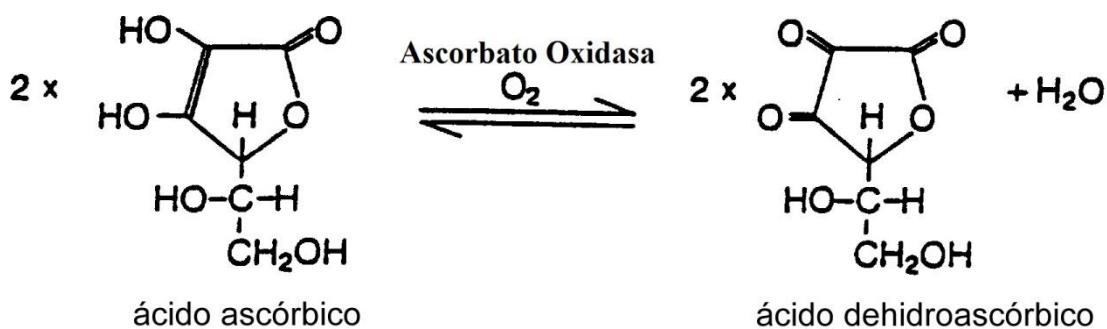
Los materiales que fueron necesarios para llevar a cabo este procedimiento enzimático fueron:

- Enzima Ascorbato oxidasa (*Cucurbita sp.*), SIGMA-ALDRICH polvo liofilizado.
- Alginato de sodio, MERCK.
- Cloruro de calcio, MERCK.
- Solución de glutaraldehído 1% (W/V)
- Buffer TRIS
- HCl
- Agujas hipodérmicas de 1mm de diámetro interno

Todos los reactivos utilizados en este ensayo fueron de calidad para análisis de laboratorio.

La enzima ascorbato oxidasa es la encargada de catalizar la siguiente reacción:

Figura 8.1 Oxidación enzimática del ácido ascórbico en presencia de la enzima Ascorbato oxidasa



Esta enzima es altamente específica para el L-ácido ascórbico y unos pocos análogos de éste. El rango de pH óptimo para la actividad enzimática se encuentra entre 5.5 - 7.

Como se observa en la Fig. 8.1 que representa la reacción enzimática de transformación de ácido ascórbico, por cada dos moléculas de AA que reaccionan, se produce una molécula de agua.

Preparación de las esferas de alginato de sodio con la enzima inmovilizada:

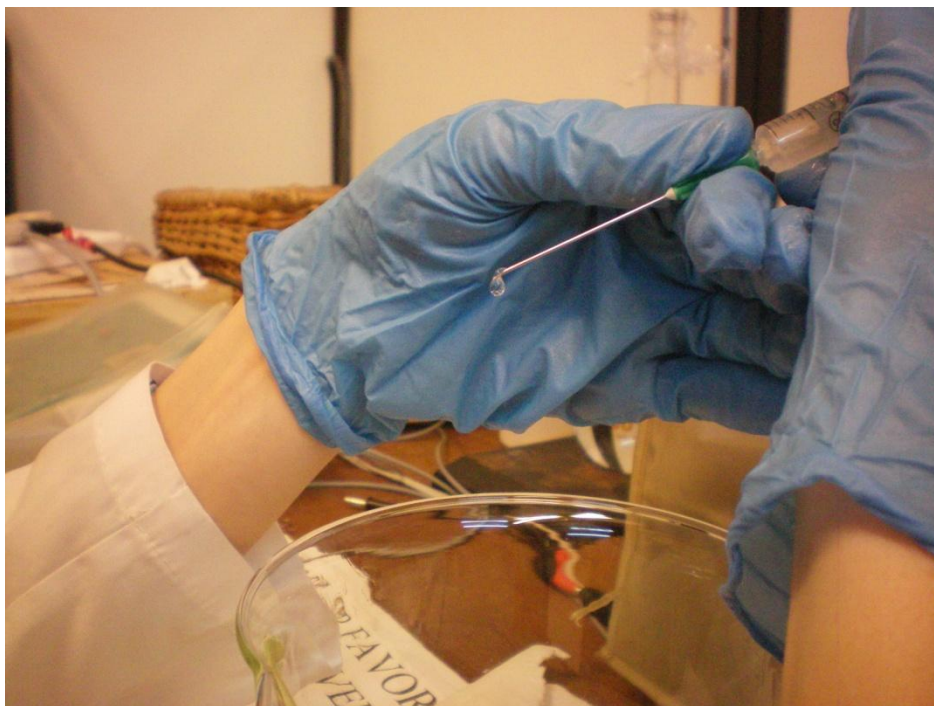
En primer lugar se preparó una solución de CaCl₂ 0.05 M y una solución Buffer TRIS-HCl 0.01 M a pH 7. Tal y como se explicó en capítulos previos, todas las soluciones buffer se preparan con agua destilada previamente hervida durante 10 minutos.

Preparación del gel de alginato de sodio: para evitar la formación de grumos en el gel es importante tener en cuenta que se debe agregar el polvo de alginato sobre agua

destilada en continua agitación. No debe realizarse de manera opuesta. Una vez que el alginato de sodio está completamente disuelto en el agua destilada se deja reposar sin ninguna perturbación durante un tiempo estipulado de 30 minutos con la finalidad de eliminar las burbujas de aire que puedan quedar atrapadas en el gel y que provocarían que las perlas preparadas con ese gel floten (Wang, 2009).

Inmovilización de la enzima en el gel de alginato de sodio: el vial de 0.5 mg de enzima Ascorbato oxidasa fue disuelto en 0.5 mL de buffer TRIS-HCl. La solución enzimática fue mezclada con 10 mL de solución de alginato de sodio 6% (w/v). El gel obtenido se colocó en el interior de una jeringa y se hizo pasar a través de la aguja hipodérmica. De esta manera se fueron formando las perlas que contiene la enzima, dejándolas caer en la solución de CaCl_2 . Este procedimiento se muestra en la Fig. 8.2, en la cual puede observarse la perla de alginato de sodio formada en la aguja hipodérmica.

Figura 8.2 Preparación de las esferas de alginato de sodio con la enzima inmovilizada



Las esferas formadas fueron curadas almacenándose durante 4 horas a una temperatura de 4 °C en la solución de CaCl₂ donde se dejaron caer. El diámetro aproximado de las perlas fue de 3 mm. Se busca que las esferas preparadas tengan un diámetro muy pequeño para aumentar de esta manera la superficie total de contacto para que tenga lugar la reacción enzimática.

Figura 8.3 Esferas de alginato de sodio con la enzima inmovilizada inmersas en la solución de CaCl₂



Transcurridas las 4 horas, las perlas fueron lavadas 5 veces con la solución de CaCl₂ y se almacenaron en la solución de glutaraldehído durante un período 20 horas a una temperatura de 4 °C para lograr el fortalecimiento de los enlaces formados. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo el último paso en la preparación de las esferas que contienen la enzima ascorbato oxidasa inmovilizada, que consistió en el lavado de las esferas de alginato con la solución de CaCl₂ nuevamente 5 veces finalizando así el procedimiento y quedando las esferas de alginato con la enzima inmovilizada listas para ser utilizadas (Esaka, 1985).

Con respecto al almacenamiento de las perlas preparadas, en los períodos en los cuales las esferas no fueron utilizadas, las mismas permanecieron almacenadas en buffer TRIS-HCl 0.01 M a pH 7, bajo condiciones de refrigeración (3 °C – 4 °C). Luego de la utilización de las perlas y previo a su almacenamiento, las mismas fueron en todos los ensayos enjuagadas con la solución de buffer TRIS para eliminar cualquier resto de jugo que pueda quedar en su superficie.

Para estudiar la eficacia de esta técnica se aplicó en primer lugar a soluciones de ácido ascórbico concentradas, cuya concentración fue igual a la concentración de AA en el jugo de manzana sin diluir (0.00028 M). Para ello, se preparó una solución de concentración 0.014 M de este compuesto y se colocó un volumen de 5 mL de esta solución en las esferas de alginato para que se inicie la reacción enzimática. Se permitió el contacto durante diferentes períodos de tiempo. Se tomaron alícuotas de 1 mL de esta solución en diferentes tiempos y se inyectaron en un volumen de 50 mL de la solución buffer de fosfatos que actúa como medio de reacción para el biosensor, registrándose y posteriormente analizándose la señal obtenida para los diferentes tiempos de contacto del ácido con las esferas.

La primera alícuota de solución inyectada correspondió a la solución de ácido ascórbico sin reaccionar con la enzima para tener el primer valor de señal correspondiente a la concentración de AA del jugo.

De esta manera se pudo hacer un gráfico en el cual se puede observar la variación de la señal producida por el ácido ascórbico como una función del tiempo de contacto de este ácido y las esferas de alginato de sodio que contenían la enzima inmovilizada, para concentraciones de AA aproximadamente iguales a la del jugo de manzana sin dilución.

A continuación se aplicó el mismo método a soluciones de ácido ascórbico más diluidas, correspondiente aproximadamente a la concentración de éste ácido para una solución al 4% (v/v) de jugo de manzana. De la misma manera que para el caso anterior, se preparó una solución inicial de AA de concentración 0.014 M. Se colocaron 5 mL de esta solución en contacto directo con las perlas para que tenga lugar la reacción enzimática. El procedimiento de medición fue el mismo que para el caso de AA de mayor concentración, se tomaron a diferentes tiempos volúmenes de 0.04 mL de la solución en contacto con la enzima (5 mL), inyectando estos volúmenes en la solución buffer de fosfatos (50 mL) para realizar la medición. Se realizaron distintas mediciones con el biosensor hasta alcanzar un error en la señal de glucosa determinada con el biosensor menor al 2%.

Para medir el error que introduce en las señales el AA a tiempo cero, se tomaron 0.04 mL de la solución de este ácido de concentración 0.014 M que fueron inyectados en 50 mL de buffer de fosfatos (medio de reacción original del biosensor), realizándose la determinación amperométrica sobre una solución de AA de concentración final 0.00001 M, equivalente a la concentración de una solución con un 4% de jugo de manzana.

Finalmente se llevó a cabo la eliminación de AA sobre muestras reales de dos jugos de manzana, realizándose estudios replicados de los distintos ensayos, cuyos resultados se presentarán en el capítulo correspondiente a “Aplicación del método en muestras reales”. Para ello se tomaron dos jugos de manzana, se hicieron diluciones correspondientes y posteriormente se permitió el contacto de un determinado volumen de la solución de los jugos con las perlas, evaluándose como fue la evolución luego de un tiempo prudencial de contacto.

Además de los estudios replicados, la técnica de inmovilización fue realizada por duplicado, preparando en dos oportunidades las esferas de alginato de sodio con diferentes lotes enzimáticos y soluciones involucradas en el análisis, lo que nos permitió tener un elevado grado de confianza en los resultados obtenidos.

8.2.2.2 Eliminación del ácido ascórbico por oxidación directa con O₂ en presencia de aire ambiente

Tal como fue mencionado previamente, el ácido ascórbico está presente en pequeñas cantidades en el jugo de manzana. La vitamina C se oxida muy fácilmente en presencia de oxígeno, incluso esta vitamina es la más sensible de todas. Las frutas y los jugos de frutas pierden la vitamina C por oxidación con oxígeno del aire, de aquí surge la importancia de consumir preferentemente el jugo de frutas recién preparado y la fruta recién pelada. La reacción que ocurre es la indicada en la Fig. 8.1, aunque en este caso tiene lugar en ausencia de la enzima.

A partir de esta reacción y sabiendo además que el jugo de manzana tiene una pequeña concentración de este compuesto, es que surgió la idea de realizar una eliminación de ácido ascórbico del jugo de manzana por medio de una exposición controlada del mismo a aire ambiente. Durante la exposición de las soluciones de AA y del jugo de manzana al aire ambiente, la agitación se mantuvo constante y muy lenta para permitir que todo el ácido ascórbico presente se oxide por contacto con el O₂, y además, como condición fundamental, las experiencias fueron realizadas bajo condiciones de temperatura ambiente (20 °C-22 °C) para evitar la evaporación de algunas moléculas de agua, lo que provocaría cambios de concentraciones no deseados en las soluciones bajo estudio.

Esta técnica se aplicó directamente sobre una solución de ácido ascórbico cuya concentración fue 0.00001 M, es decir una concentración equivalente a una solución de jugo de manzana al 4%, para evaluar la evolución de la señal interferente en el tiempo. Una vez estudiado el método y los tiempos necesarios para reducir el error producido por el AA hasta un error en las señales de glucosa menor al 2%, el método fue aplicado sobre muestras de jugos de manzana, de igual manera que el método de eliminación enzimática de AA.

8.3 Resultados y discusión

8.3.1 Estudio de interferencias

Para el estudio de las interferencias se evaluó la influencia de los compuestos considerados posibles sustancias interferentes sobre la señal de glucosa obtenida con el biosensor para dos casos de concentraciones diferentes.

Fueron estudiadas las señales obtenidas para concentraciones de cada compuesto iguales a las correspondientes a una solución de jugo de manzana al 4%, que se ajusta con la dilución correspondiente a la máxima concentración de glucosa del rango lineal de concentraciones de la curva de calibración (0.00448 M). Esta dilución es la mínima dilución que debe hacerse del jugo de manzana, ya que la concentración de glucosa es la máxima admisible para la curva de calibración.

Se evaluaron las respuestas de cada uno de los compuestos y los resultados que fueron obtenidos se muestran en la tabla 8.2.

Tabla 8.2 Estudio de las interferencias para valores de concentraciones correspondientes a las de un 4% de jugo de manzana (NI: No Interfiere) – Concentración glucosa: 0.00448M

Interferente	Concentración de Interferente	i [uA]	Er %
Acido ascórbico	0.000011 M	0.121	4.3
Fructosa	0.015-0.05 M	NI	-----
Sacarosa	0.003-0.009 M	NI	-----
Almidón	0.00019 M	NI	-----
	0.0014 M	NI	-----
Acido málico	0.002-0.0058 M	NI	-----

Como se puede apreciar en la tabla 8.2, para una concentración aproximada de cada compuesto equivalente a una solución de 4% de jugo de manzana, sólo el ácido ascórbico produce señales interferentes al utilizar el biosensor, observándose además como el error producido en la señal debido a la presencia de AA en la muestra tiene un valor próximo de 4%. Los restantes componentes estudiados no producen ningún tipo de modificación en la señal obtenida con el biosensor.

Los errores que este ácido produce representan errores significativos y comparables respecto a las señales de glucosa y por lo tanto podemos confirmar que el ácido ascórbico es una sustancia interferente para el biosensor amperométrico de glucosa, lo que finalmente define que esta sustancia debe ser eliminada del jugo de manzana previamente a la determinación de glucosa con el sensor. Este resultado se corresponde con datos encontrados en la bibliografía en los cuales se reporta que el ácido ascórbico es el mayor interferente en los biosensores amperométricos (Jawaheer, 2003). Los restantes componentes del jugo de manzana producen errores aproximadamente menores al 0.3% cada uno y la suma de todos sus errores representa un 1% de la señal respecto a la señal de la glucosa. Si bien estas sustancias modifican la señal global hay que tener en cuenta que en este ensayo se trabajó a concentraciones

muy superiores a las máximas permitidas para el biosensor y además se considera que esta perturbación en la señal se debe principalmente a la modificación del volumen de ensayo al inyectar las soluciones y a la perturbación que genera la inyección en si.

En el estudio de eliminación del AA por medio de las dos técnicas evaluadas, se tomará como error aceptable para la señal producida por el ácido ascórbico sobre la señal global un valor acotado entre el 1% y el 2%.

Para el ácido cítrico se trabajó con una concentración elevada, observándose que no se producen señales que interfieran en las respuestas entregadas por el biosensor, y es por ello que este compuesto no volvió a evaluarse en estudios posteriores.

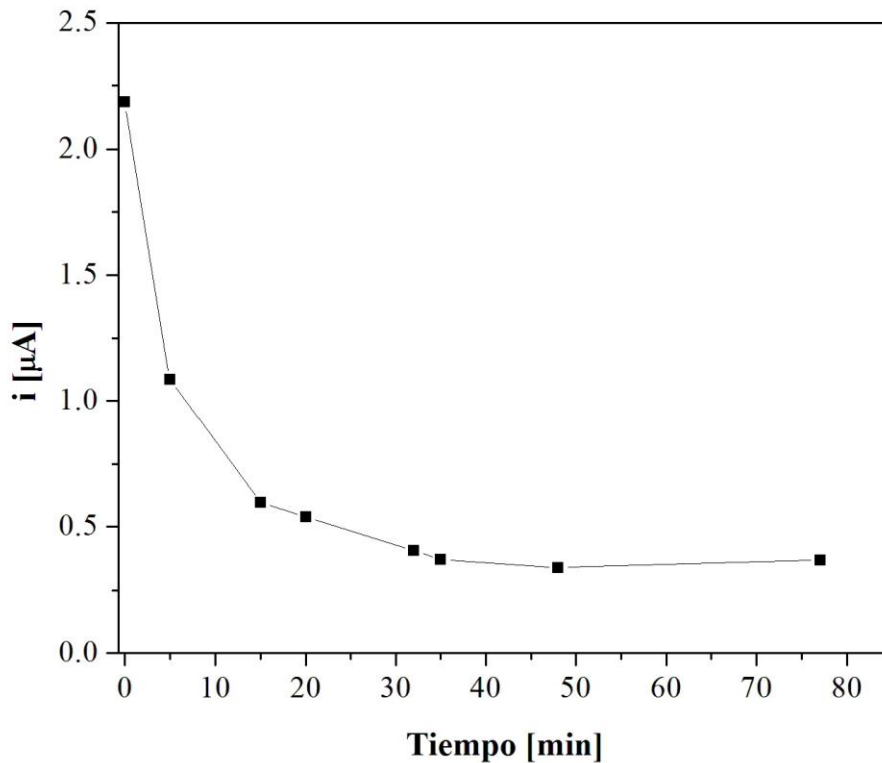
8.3.2 Eliminación enzimática del ácido ascórbico

En primer ensayo llevado a cabo para reducir las señales producidas por el AA fue la técnica de eliminación enzimática del ácido ascórbico. Para ello fue colocada la solución de ácido ascórbico a tratar en contacto directo con las esferas de alginato de sodio que contienen la enzima ascorbato oxidasa inmovilizada. Se tomaron pequeñas alícuotas de dicha solución en diferentes períodos de tiempo y se analizó la señal producida por la oxidación del ácido ascórbico.

Tal y como se explicó previamente, en primer lugar se evaluó la técnica usando concentraciones elevadas de AA, como si se trabajara con jugo de manzana puro, sólo para evaluar el éxito del proceso de inmovilización de la enzima ascorbato oxidasa y además la correcta disminución en las señales producidas por el ácido ascórbico cuando la solución de este ácido se encuentra en contacto con la enzima.

Los resultados correspondientes a este análisis se muestran en la Fig. 8.4.

Figura 8.4 Eliminación enzimática de ácido ascórbico en función del tiempo, partiendo de la concentración de ácido correspondiente al jugo de manzana puro



En la Fig. previa se observa una clara disminución de la señal de corriente producida por el AA, medida con el biosensor, a medida que aumenta el tiempo de permanencia de la solución de ácido con las esferas de alginato de sodio que contienen a la enzima ascorbato oxidasa.

Este ensayo se inició para una concentración aproximada de ácido igual a la presente en el jugo de manzana puro. La señal medida por el biosensor disminuye de manera considerable a lo largo de los 77 minutos que dura el estudio. Esto nos indica que el método de eliminación enzimática del ácido ascórbico es efectivo para este proceso.

Por lo tanto, el estudio previo nos demuestra que efectivamente la técnica enzimática elimina la interferencia producida por el AA de manera sumamente efectiva aún en muestras de jugo sin diluir.

Una aclaración importante es que en el gráfico 8.4, las líneas de unión entre los puntos experimentales representan solamente una posible tendencia de los datos.

A continuación se muestra el estudio del efecto interferente del ácido ascórbico para una dilución más baja de este ácido tal que la concentración de glucosa se encuentre en el rango de linealidad de la curva de calibración, siempre teniendo en cuenta la concentración aproximada de estos compuestos en el jugo de manzana a la hora de preparar las soluciones de cada uno de ellos.

Entonces, para una concentración de glucosa 0.00448 M (concentración que se ubica en el extremo superior del rango lineal de concentraciones para la curva de calibración de glucosa obtenida para el biosensor), la equivalencia en concentración de jugo es aproximadamente de una solución al 4% (v/v), tal como fue mencionado previamente. Se conoce del análisis de interferencias realizado en la sección 8.3.1 Estudio de interferencias, que sólo el ácido ascórbico actúa como sustancia interferente, por lo tanto se procede a su eliminación enzimática y se determinan los errores que el ácido incorpora en la señal de glucosa para diferentes tiempos de residencia del ácido con las esferas.

Se colocó un volumen inicial de 5 mL de ácido ascórbico de concentración 0.014 M en contacto con las perlas. De esta solución se fueron tomando volúmenes de 0.04 mL los cuales fueron inyectados en la solución buffer. Fueron necesarias 3 horas de contacto de la solución con las perlas de alginato, para que el error alcanzado en las señales globales debido a la presencia de ácido ascórbico sea menor al 2%. Para la concentración inicial de ácido ascórbico de 0.00001 M, este compuesto produce un error

del 4.27% respecto a la señal global obtenida con el biosensor de glucosa. Durante la primer hora de contacto de la solución de AA con las esferas que contienen la enzima inmovilizada, ese error disminuye hasta alcanzar un valor de 4.3%. Se deja reposar por un tiempo aún mayor el AA en las esferas llegando a un valor de error en la señal del 1.15% luego de un período de 3 horas en contacto con la enzima, alcanzándose en este tiempo un error menor al 2% estipulado para este análisis.

Una cuestión importante a la hora de evaluar el tiempo de residencia de la solución en las esferas de alginato fue el tiempo transcurrido desde la preparación de las esferas hasta el día de la determinación.

Los resultados presentados previamente que muestran que fue necesario un tiempo de 3 horas para alcanzar un error en la señal aceptable, corresponden a un ensayo para el cual el tiempo transcurrido desde la preparación de las esferas de alginato que contienen la enzima inmovilizada hasta el día de la determinación fue de aproximadamente 7 semanas. Es por ello que la reacción enzimática en este último caso fue mucho más lenta que para el caso de la muestra de concentración de AA correspondiente al jugo de manzana puro presentado anteriormente (Fig. 8.4), aunque igualmente para el segundo caso estudiado la concentración de ácido ascórbico disminuyó hasta alcanzar el valor deseado que presentó un error de aproximadamente 1% en la señal obtenida con el biosensor.

Es debido a esto que se seleccionó como tiempo de residencia de las muestra en las perlas de alginato, un tiempo de aproximadamente 3 horas, para asegurar de esta manera que el error en la señal debido a la presencia de ácido ascórbico se encuentre entre el 1% y el 2% previamente estipulado.

Además se estimó una vida útil de las esferas de hasta 8 semanas, ya que luego de ese tiempo las perlas comenzaron a desintegrarse y absorber agua del medio que

entra en contacto con ellas, ya sea del buffer de almacenamiento o las soluciones de jugo o AA, observándose un claro hinchamiento de las mismas, lo que produce una modificación de las concentraciones de las soluciones que se ponen en contacto con dichas perlas.

8.3.2 Eliminación del ácido ascórbico por oxidación directa con el O₂ del aire

Los análisis de eliminación de interferencias por oxidación directa del ácido ascórbico en presencia de O₂ del aire, se efectuaron directamente en soluciones de glucosa y AA cuya concentración se corresponde con la concentración equivalente a una solución con un 4% de jugo de manzana.

Resultados de estudios realizados sobre la oxidación de los jugos de fruta indican que este proceso en presencia de aire comienza aproximadamente luego de 30 minutos de exposición.

Los resultados indican que el error inicial en la señal obtenida con el biosensor debido a la concentración de AA presente es apenas un poco mayor al 4%, para las diluciones de AA y glucosa empleadas. En la primera hora de ensayo, el error en la señal disminuyó hasta un valor de 2.27%, y transcurridas las 3 horas de ensayo se alcanzó un error del 1.36%, valor que cumple con la especificación impuesta para los estudios de eliminación de ácido ascórbico.

De igual manera que para el caso de la eliminación enzimática del AA, el tiempo de reacción con el O₂ del aire ambiente necesario para alcanzar un error en las señales producido por la presencia de este ácido entre el 1% y el 2% fue de 3 horas aproximadamente.

Los resultados obtenidos al utilizar esta técnica fueron muy buenos, ya que se cumplió con el objetivo principal perseguido que fue lograr la disminución del error

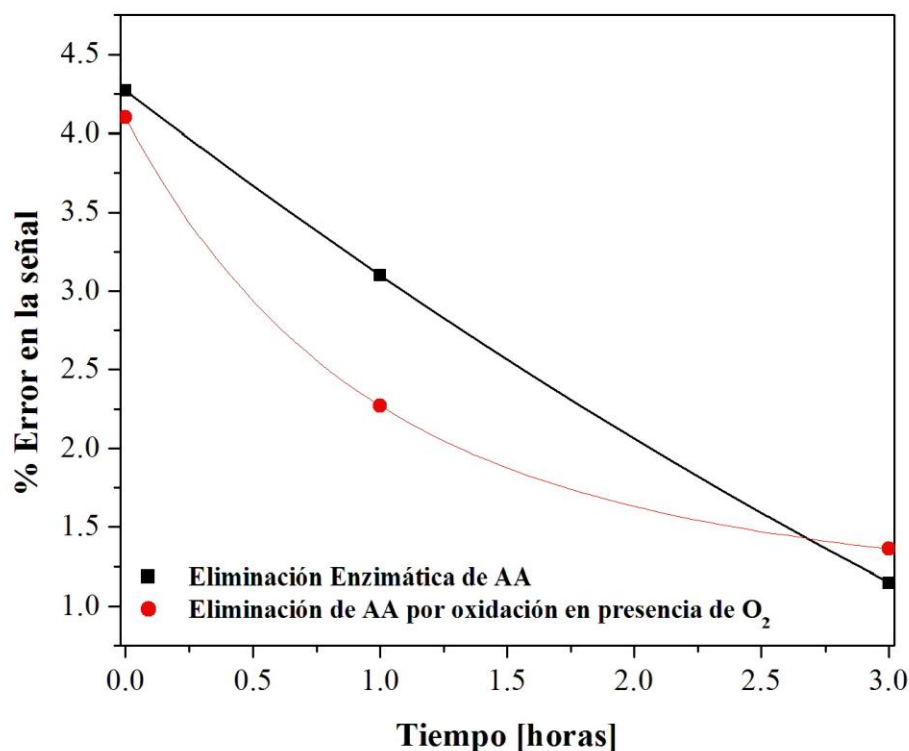
producido por la interferencia hasta un valor menor al 2%, mediante el uso de una técnica tan simple como es la oxidación de la sustancia por medio de la exposición al aire ambiente, transformándose la sustancia en un compuesto inerte o electroquímicamente inactivo.

Cabe mencionar que el oxígeno es sólo uno de los factores que influyen en la degradación del ácido ascórbico. Ciertos metales como el cobre y el hierro también conducen a la degradación de esta vitamina (Kurata, 1967), así como también algunos factores fisicoquímicos como son la concentración de sales y la temperatura (Huelin, 1971).

En la Fig. que se muestra a continuación se presentan en simultáneo los resultados de la eliminación del AA tanto enzimática como por oxidación con O₂. En el gráfico se presentan los errores iniciales debido a la presencia de AA aún sin reaccionar, y se ve claramente como estos errores en la señal van disminuyendo a medida avanza el tiempo de eliminación, cualquiera sea la técnica empleada.

Nuevamente en este punto cabe mencionar que en la Fig. 8.5 las líneas que unen los puntos experimentales obtenidos para cada una de las técnicas ensayadas, representan solamente una tendencia que pueden seguir los datos. Para asegurar una tendencia más real deberían tomarse datos en puntos intermedios, cuestión que no es de interés para la aplicación final que se le dará a las técnicas durante el desarrollo de esta tesis.

Figura 8.5 Eliminación de AA. Comparación de los resultados obtenidos con las dos técnicas empleadas, para concentraciones equivalentes a una solución de 4% de jugo de manzana.



De todas formas, obtener una tendencia aunque sea aproximada nos permite de alguna manera evaluar si el tiempo de reacción seleccionado para ambas técnicas (3 horas) es o no adecuado. En la Fig. 8.5 se puede observar que luego de transcurridas aproximadamente dos horas de transformación del AA por cualquiera de las dos técnicas empleadas, el error en la señal obtenida con el biosensor es menor al 2% estipulado como error aceptable en las señales del biosensor. Esto nos lleva a la conclusión de que la elección de un período de 3 horas como tiempo de reacción nos ofrece un margen suficiente de tiempo en el proceso de eliminación de AA para alcanzar los valores deseados de conversión de este ácido que nos lleven a errores aceptables.

Los resultados obtenidos en las muestras de jugo de manzana (muestras reales) respecto a la eliminación del ácido ascórbico son presentados en el capítulo de “Determinación de glucosa en muestras reales” junto con los resultados del análisis de la concentración de glucosa correspondiente.

Este ensayo también puede llevarse a cabo mediante la inyección controlada de O₂ puro en la muestra, mediante lo cual probablemente se produzca la oxidación del AA con una mayor rapidez que para el caso anterior ya que existe una mayor disponibilidad de O₂ en el medio.

8.4 Conclusiones

La interferencia electroquímica causada por el ácido ascórbico en muestras biológicas y muestras de alimentos es el principal problema que tienen los biosensores en especial cuando la aplicación final del sensor es el análisis de muestras de alimentos o jugos de frutas. Desde la década de los ´80, se ha destinado gran esfuerzo en el enfoque de la construcción de biosensores que puedan ser independientes de la concentración de oxígeno, reemplazándolo por alguna otra sustancia no fisiológica, como por ejemplo algún mediador electroquímico (Jia, 2010), como puede ser el ferroceno.

En nuestro caso particular, aún con el agregado de ferroceno como mediador en la transferencia de electrones, el ácido ascórbico igualmente actúa como interferente produciendo señales que generan errores considerables frente a la señal de glucosa. Es por ello que se estudiaron y aplicaron dos técnicas para transformar el ácido ascórbico en una sustancia inerte para el biosensor logrando obtener resultados altamente satisfactorios en ambos casos. Tanto la eliminación enzimática como la eliminación por oxidación directa debido a la exposición a O₂ del aire ambiente presentaron excelentes

resultados, consiguiéndose reducir con el método enzimático el error en las señales medidas desde aproximadamente un 4.3% a un 1.15% para una concentración inicial de ácido ascórbico de 0.00001 M que corresponde a una concentración de glucosa de 0.004 M, equivalente a una solución con 4% de jugo de manzana. Como puede observarse, los errores en las señales de glucosa determinadas con el biosensor en ambos casos fueron menores al 2% que se impuso como límite, por lo tanto se puede concluir que la eliminación enzimática del ácido ascórbico ha sido llevada a cabo con éxito por la reducción significativa en los errores de las señales obtenidas. Con respecto a la eliminación de este compuesto por oxidación directa mediante la exposición de la solución al aire ambiente, se logró la reducción del error debido a la interferencia desde un valor aproximado de 4% hasta valores menores al 1.5%. Al realizar una comparación entre las dos técnicas aplicadas, esta última tiene ciertas ventajas sobre la técnica enzimática ya que no requiere mucho tiempo de preparación del método ni de grandes equipamientos, sólo se necesita un agitador magnético que pueda mantener la solución en agitación constante y no incrementa la temperatura de la muestra para evitar evaporación del agua por calentamiento. Por el contrario, la técnica enzimática requiere mucho esfuerzo ya que es un proceso que demanda un mínimo de 4 jornadas de trabajo completas para la preparación de todas las soluciones necesarias y de las perlas de alginato de sodio que contienen la enzima inmovilizada. Es también obviamente una técnica más cara ya que se debe adquirir la enzima ascorbato oxidasa, y además, se presentó el inconveniente de que luego de dos semanas de uso a diario de las esferas, éstas comenzaron a desintegrarse y absorber agua de las soluciones con las que tenía contacto, generando grandes errores en las determinaciones, sumado esto a la disminución natural de la actividad de la enzima con el transcurso del tiempo.

De todas maneras, con ambas técnicas se obtuvieron excelentes resultados que satisfacen ampliamente el objetivo perseguido, que fue lograr eliminar las señales producidas por el ácido ascórbico hasta valores menores al 2% respecto de la señal de glucosa.

CAPÍTULO 9

APLICACIÓN DEL BIOSENSOR A MUESTRAS REALES

9.1 Introducción

En los capítulos previos se describieron los distintos resultados que hacen al estudio íntegro de un biosensor para determinar glucosa en jugos de manzana. En primer lugar fueron descriptos los materiales de construcción del electrodo, se estudiaron y definieron las óptimas condiciones de trabajo del biosensor como son el potencial de trabajo, la concentración de enzima en la pasta, el pH del buffer que se utilizaría como medio de reacción y se eligió el mediador electroquímico a utilizarse. Posteriormente se realizaron diferentes determinaciones para la caracterización del biosensor.

También durante las primeras instancias del trabajo de investigación se determinó la actividad enzimática de la enzima GOx en su estado libre para corroborar que dicha enzima se encuentre en condiciones de ser utilizada, análisis llevado a cabo para todas las partidas de enzima empleadas en el trabajo experimental de esta tesis. Además se estudió la cinética de la enzima inmovilizada en la pasta de carbono, así como también se obtuvo la curva de calibración para la glucosa y sus características analíticas tales como la sensibilidad, los límites de detección y determinación y su intervalo de linealidad.

En cuanto a las características del biosensor se estudiaron y analizaron en profundidad la repetibilidad y la precisión intermedia, el tiempo de respuesta del sensor frente a la inyección de glucosa, la estabilidad del sensor para distintas condiciones de

almacenamiento y la estabilidad operacional. Además se estudió la estabilidad de la pasta de carbono bajo condiciones de refrigeración (3 °C).

Tal como se describe en el capítulo 8 se realizó un análisis completo de sustancias interferentes, que son aquellas sustancias sensibles al potencial de trabajo y que sufren oxidación dando como resultado una señal que produce un error en la cuantificación de la concentración de glucosa en la muestra. A partir de este estudio se determinó y confirmó que el ácido ascórbico es una sustancia interferente. Se continuó entonces con el trabajo de investigación con la finalidad de encontrar métodos que permitan eliminar esta sustancia interferente del jugo de manzana como paso previo a la determinación de glucosa en la muestra. Un método que resultó efectivo para la eliminación del ácido ascórbico fue el tratamiento enzimático del jugo con la enzima Ascorbato Oxidasa la cual transforma el ácido ascórbico en una sustancia electroquímicamente inerte. También se estudió la eliminación del ácido ascórbico por medio de una agitación controlada con exposición al aire del jugo de manzana lo que provocaría la rápida oxidación de esta sustancia presente en pequeñas concentraciones. Ambas técnicas cumplieron satisfactoriamente con su propósito de reducción de las señales interferentes hasta producir errores en las señales medidas menores al 2%.

Completado el proceso de caracterización del biosensor y lograda la reducción de las interferencias producidas por el ácido ascórbico con los dos métodos disponibles, y para cumplimentar todos los objetivos establecidos para este trabajo de tesis, finalmente se realizó el análisis de la aplicación del biosensor en muestras reales de jugo de manzana y se evaluó su desempeño mediante la comparación de los resultados obtenidos con los resultados correspondientes a algún método de referencia, en este caso un glucómetro digital de los utilizados para medir glucosa en sangre.

A modo informativo citamos que entre todos los azúcares existentes, la glucosa es el analito más ampliamente estudiado en el ámbito de los electrodos enzimáticos en el área de los alimentos.

9.2 Materiales y métodos

Para la determinación de la concentración de glucosa presente en diversos jugos de manzana fue necesario preparar la solución buffer de fosfatos a pH 7 y la pasta de carbono tal como se describió en el capítulo 2.

Como muestras reales a los cuales se les aplicó el método fueron utilizados dos jugos de manzana diferentes. El primero de ellos fue un jugo de manzana comercial, adquirido en la góndola de un supermercado, y el segundo fue un jugo de manzana concentrado inicialmente a 71°Brix proveniente directamente de una juguera ubicada en la ciudad de Villa Regina, provincia de Río Negro.

En primera instancia se determinaron algunas características del jugo comercial que no estaban especificadas en la etiqueta del mismo, tales como la concentración de azúcares medida en °Brix y el pH.

Conocer la concentración del jugo comercial (°Brix) es de gran utilidad para luego poder realizar la dilución del jugo concentrado de manzana a la concentración real del jugo en la góndola listo para su consumo.

Nuevamente, dado el rango de linealidad para la curva de calibración, fue necesario realizar diluciones de ambos jugos utilizados para que las concentraciones a ser determinadas con el biosensor se ubiquen dentro de este rango.

Las diluciones realizadas fueron las mismas para ambos jugos y se decidió que fuera una dilución de 5 ml de jugo de manzana en 50 ml finales de solución (5/50 v/v). Las determinaciones de glucosa con el biosensor se realizaron en todos los casos de la

misma manera que fuera descrita en los capítulos previos para la glucosa. Se toma una alícuota 0.5 ml de la solución (solución 5/50) y se inyecta en el medio de reacción seleccionado para este sensor (buffer de fosfatos, 50 ml). Se registra la señal obtenida y con ese valor de corriente obtenido se ingresa en la curva de calibración que nos proporciona el valor de la concentración correspondiente a esa última dilución.

Todos los ensayos fueron realizados en diferentes días de trabajo, se emplearon distintas soluciones buffer cada día y se prepararon en fresco las diluciones de los jugos necesarias para los estudios correspondientes.

9.2.1 Método de referencia

Es fundamental para cualquier análisis experimental que se realice, comprobar la exactitud de los resultados obtenidos con ese método, mediante el empleo de alguna técnica o método de referencia. El caso aquí presentado no es la excepción y por lo tanto debe utilizarse algún método de referencia confiable por medio del cual se pueda certificar la validez de los resultados obtenidos con el biosensor, por comparación directa de los resultados de ambos métodos. Es decir, debemos verificar el desempeño del método para asegurar la calidad de los resultados que con él se obtienen.

En la práctica, existen numerosos métodos experimentales de química húmeda para determinar carbohidratos, métodos que resultan muy laboriosos, consumen mucho tiempo y esfuerzo por parte del analista, son costosos y en la mayoría de los casos estos ensayos determinan cantidad de azúcares reductores o no reductores y a partir de los resultados obtenidos se estima la concentración de glucosa, ensayos que implican grandes errores experimentales y de cálculo. Es por ello que desde un primer momento se pensó en la selección de otro tipo de técnicas de referencia, decidiéndose finalmente que lo más adecuado sería la utilización de un método basado en el mismo principio de

determinación de glucosa que el biosensor desarrollado, o fundamento similar, para que de esta manera los resultados en cada uno de los casos puedan ser comparables.

Es por ello que para realizar la verificación de los resultados obtenidos con el biosensor se seleccionó un glucómetro digital modelo CONTOUR TS de Bayer. Este glucómetro digital se utiliza con tiras que están diseñadas para el autocontrol de las concentraciones de glucosa en la sangre. Las tiras reactivas que fueron utilizadas contienen FAD glucosa deshidrogenasa (*Aspergillus* sp), ferricianuro de potasio (derivado del ferroceno) e ingredientes no reactivos, y la medición de glucosa en la sangre con el glucómetro se basa en la medición de la corriente eléctrica provocada por la reacción de la glucosa con los reactivos depositados sobre el electrodo de la tira reactiva. La muestra es absorbida y la glucosa reacciona con la FAD glucosa deshidrogenasa y el ferricianuro de potasio, generándose una corriente eléctrica que es proporcional a la glucosa presente en la muestra.

El medidor COUNTOUR TS de Bayer ofrece una medición cuantitativa de la glucosa en la sangre para un rango de concentraciones que va desde 10 mg/dL a 600 mg/dL o equivalentes 0.55 mM a 33 mM, respectivamente.

Para la determinación de la concentración de glucosa en los jugos de manzana con el glucómetro digital fueron necesarias pequeñas cantidades de jugo ya que este dispositivo sólo necesita una gota de muestra para realizar la determinación. El glucómetro remite el resultado de la concentración de este azúcar en unidades de mg/dL.

El procedimiento de determinación de glucosa utilizando el glucómetro es muy sencillo. Primero se coloca una gota de muestra en una superficie bien limpia y seca, como puede ser por ejemplo un vidrio. Se coloca la tira reactiva en el dispositivo de medición y se aproxima la tira a la gota de muestra hasta que la punta toque la gota de

muestra. Por un mecanismo de capilaridad el fluido avanza en la tira y nos entrega el resultado correspondiente a la concentración de glucosa en esa muestra. Solo hay que ser cuidadoso y no provocar la inmersión de la tira en la muestra, ya que esto generaría un error en la determinación y el dispositivo no podría realizar la medición correspondiente.

En la siguiente Fig. se muestra una fotografía del dispositivo utilizado como método de referencia y puede observarse la tira reactiva colocada sobre la base del mismo. La tira reactiva es un micro electrodo.

Figura 9.1 Imagen del glucómetro digital utilizado como método de referencia (Contour – Bayer)



Para los dos jugos considerados en el análisis, previamente a la medición de glucosa se procedió a la eliminación del ácido ascórbico tanto por el método enzimático como por el método de exposición controlada de la muestra al aire ambiente.

Como fuera explicado en detalle en el capítulo 8, para el caso de la eliminación enzimática del ácido ascórbico presente en las muestras, las mismas permanecieron por un período de 3 horas en las perlas de alginato que contienen la enzima ascorbato oxidasa inmovilizada con el fin de que se alcancen altos niveles de conversión de dicho ácido a ácido dehidroascórbico, y los errores relativos en las determinaciones debido a

las interferencias producidas sean menores al 2% considerado en estos análisis. De igual manera, en el caso de la eliminación del ácido ascórbico por oxidación directa con el aire ambiente, las muestras se mantuvieron en agitación constante durante aproximadamente 3 horas, período en el cual se considera que el ácido ascórbico de las muestras fue completamente oxidado por el oxígeno del medio.

9.3 Resultados y discusión

Las determinaciones de la concentración de azúcares (°Brix) y el pH del jugo de manzana comercial fueron llevadas a cabo como primera medida. Estos resultados fueron 13 °Brix y pH de 3.51 para el jugo comercial. Conociendo la concentración del jugo comercial se llevó a cabo la primera dilución del jugo concentrado para llevarlo de una concentración de 71 °Brix a 13 °Brix con agua destilada. El pH de este jugo ya diluido fue de 3.51. Luego, a partir de estos dos jugos fueron realizadas las diluciones 5/50 con las que se realizaron las determinaciones de glucosa correspondientes, previo a la eliminación del ácido ascórbico.

Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo en idénticas condiciones de trabajo, y la forma en que se fueron realizadas las determinaciones se detallan en la sección 9.2 Materiales y métodos.

En la Tabla 9.1 se presentan tanto los resultados obtenidos respecto a la concentración de glucosa con el biosensor como los obtenidos con la referencia para los dos jugos estudiados y se indica además el tipo de método aplicado para la eliminación de la sustancia interferente. Para la correcta interpretación de los resultados se incorpora también el error que se produce en la medición de la concentración de glucosa con el biosensor respecto del glucómetro empleado como método de referencia (error relativo).

Tabla 9.1 Concentración de glucosa en los diferentes jugos estudiados (dilución 5/50)

Jugo	Técnica de eliminación AA	Concentración Glucosa (mM) Biosensor	Concentración Glucosa (mM) Glucómetro	Error %
Comercial	Aireación	22.5	22.7	0.88
Comercial	Aireación	22.3	22.7	1.76
Comercial	Enzimática	22.8	22.0	3.63
Comercial	Enzimática	21.8	22.0	0.91
Villa Regina	Enzimática	17.1	17.3	1.16
Villa Regina	Aireación	17.6	17.3	1.74

Tal como puede observarse en la tabla mostrada previamente, los resultados obtenidos en cuanto a las concentraciones de glucosa de los jugos comercial y concentrado (Villa Regina), en todos los casos evaluados los errores en las concentraciones de glucosa respecto de la concentración medida con el método de referencia fueron menores al 3.7%. Esto nos muestra la excelente performance del biosensor de glucosa desarrollado en la determinación de este analito.

A continuación se realizaron los escalados correspondientes para calcular la concentración de glucosa en los jugos listos para el consumo, ya que como fue explicado se realizaron diferentes disoluciones de los mismos para que los valores de concentración se encuentren dentro de los límites del rango lineal de concentraciones de glucosa correspondientes a la curva de calibración del biosensor, que fuera expuesto en el capítulo 7. Finalmente, la concentración de glucosa en el jugo de manzana comercial fue de 39 g/L o equivalente 0.217 M, y la concentración de glucosa correspondiente al

jugo de manzana concentrado llevado previamente a una concentración de 13 °Brix fue de 31 g/L o equivalente 0.172 M, medidas ambas concentraciones con el biosensor.

9.4 Conclusiones

En el presente capítulo se tuvo como objetivo la determinación de glucosa en muestras reales de jugo de manzana, lo que representa el último paso en el desarrollo y construcción de cualquier biosensor.

Se evaluaron las concentraciones de glucosa en dos jugos de distinta procedencia y distintas características iniciales: uno de ellos fue un jugo comercial y el otro un jugo concentrado directamente obtenido de una juguera de Villa Regina.

Tal como se mostró en el apartado 9.3 Resultados y discusión, los errores en las determinaciones en todos los casos analizados fueron menores al 3.7% en relación con los valores de concentración obtenidos con el glucómetro, que fue el método de referencia elegido.

Siendo el biosensor y sobre todo el electrodo de trabajo un dispositivo sumamente sencillo y de tan fácil construcción, resulta altamente satisfactorio haber obtenido estos resultados que muestran una gran precisión del biosensor para la determinación de concentraciones de glucosa en muestras reales de jugo de manzana con eliminación previa de las interferencias producidas por la presencia del ácido ascórbico utilizando las dos técnicas estudiadas.

Es por todo ello que como conclusión de este capítulo se puede decir que los valores de concentración de glucosa obtenidos utilizando el biosensor representan excelentes resultados y se puede agregar además que el biosensor en general presenta una excelente performance y cumple con todos los objetivos que fueron planteados durante su diseño, construcción y puesta a punto.

CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJO A FUTURO

El objetivo específico de este proyecto fue el diseño y la construcción de un biosensor para la medición de la concentración de glucosa en jugos fruta, utilizando el de manzana como modelo, con ciertas características de interés tales como su facilidad de construcción con materiales sencillos, de rápida respuesta y principalmente económico, sin comprometer por ello la precisión y repetibilidad de los resultados.

Se construyó un biosensor de pasta de carbono (CPE), cuyo material de base es el polvo fino de grafito y se eligió como material aglomerante la parafina líquida, ambos de muy bajo costo. Se utilizó ferroceno como mediador electroquímico y glucosa oxidasa fue la enzima seleccionada. Las condiciones óptimas de trabajo encontradas para el biosensor fueron: potencial de trabajo: 0.16 V, carga de enzima en la pasta: 10%, medio de reacción: buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.

Se determinó la actividad enzimática de la GOx libre e inmovilizada en la pasta de carbono, resultando esta última ser un 60% de la actividad de la enzima libre. Además se realizó el estudio completo de la cinética de la enzima inmovilizada en la pasta de carbono, observándose que sigue el modelo de Michaelis-Menten, de cuya ecuación se obtuvieron los parámetros correspondientes. También se construyó la curva de calibración y se determinaron las características de la misma: sensibilidad, límite de detección e intervalo lineal de concentraciones de glucosa.

A continuación se estudiaron diferentes características del biosensor como la repetibilidad, la precisión intermedia, y el tiempo de respuesta, y se realizó un completo estudio de la estabilidad del biosensor y de la pasta de carbono bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Previo a la aplicación del biosensor en muestras reales de jugo de manzana, se llevó a cabo un estudio de interferencias, lográndose eliminar con éxito, mediante dos técnicas diferentes, la interferencia producida por el ácido ascórbico. A continuación se procedió a determinar la concentración de glucosa en jugos de manzana, obteniéndose resultados altamente satisfactorios, con errores en la determinación de la concentración de glucosa menores al 4%.

Observando los resultados obtenidos en cada uno de los estudios que fueron llevados a cabo durante las tareas experimentales, incluidos los resultados de prueba del biosensor en muestras reales, se puede concluir que el dispositivo cumple con todos los objetivos que fueron planteados a priori en el plan de estudio de la tesis. Se construyó un biosensor de bajo costo, de fácil construcción, de muy rápida respuesta, apto para determinaciones en línea de producción y que además presenta globalmente una excelente performance tal como se ve reflejado en los resultados finales obtenidos en la determinación de glucosa en muestras reales de jugo de manzana (capítulo 9). No puede dejar de mencionarse y hacer nuevamente hincapié en los materiales sumamente sencillos que componen el electrodo sensor, que no posee ningún tipo de membrana o tratamiento secundario sobre su superficie que lo encarezca o dificulte su construcción.

Uno de los principales inconvenientes que presentan los biosensores es la estabilidad de los mismos, área de gran investigación en la actualidad. Es por ello que una de las perspectivas futuras en cuanto al desarrollo de biosensores amperométricos de glucosa incluye el estudio de diferentes metodologías de estabilización de la enzima en el electrodo. Si bien el biosensor presenta resultados aceptables en cuanto a la estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento, es posible desarrollar técnicas que permitirían incrementar el tiempo de estabilidad, sin perder de vista las características principales de este sensor detalladas anteriormente. Por este motivo se

plantea como posible trabajo a futuro la búsqueda y desarrollo de alguna técnica económica y de relativa fácil aplicabilidad que permita lograr incrementar la estabilidad del biosensor en el tiempo o en otras palabras, que permita mantener la actividad de la enzima inmovilizada más de allá de los 4 días.

REFERENCIAS

Ablin A. (2011). El Mercado del jugo concentrado de manzana. Alimentos Argentinos – MinAgri. 1-13.

Ablin A. (2012). El Mercado del jugo concentrado de manzana (actualización 2012). Alimentos Argentinos – MinAgri. 1-4

ACS Commitee on Environmental improvement (1980).Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry. *Anal. Chem.* 52, 2242-2249.

Camerlingo C., Zenone F., Delfino I., Diano N., Mita D.G., Lepore M. (2007). Investigation on Clarified Fruit Juice Composition by Using Visible Light Micro-Raman Spectroscopy. *Sensors* 7, 2049-2061.

Cass A. E. G., Davis G., Francis G.D., Hill H. A. O., Aston W. J., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott L. D. L., Turner A. P. F. (1984). Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose. *Anal. Chem.* 56, 667-671.

Chaubey A., Malhotra B.D. (2001). Mediated biosensors – Review. *Biosensors and Bioelectronics* 17, 441-456.

Cui G., Yoo J.H., Woo B.W., Kim S.S., Cha G.S., Nam H. (2001). Disposable amperométrico glucose sensor electrode with enzyme-immobilized nitrocellulose strip. *Talanta* 54, 1105-1111.

Currie L. A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC). *Pure and Appl. Chem.*, Vol. 67, No. 10, 1699-1723.

Dimcheva N., Horozova E., Jordanova Z. (2002). A Glucose Oxidase Immobilized Electrode Based on Modified Graphite. *Z. Naturforsch.* 57c. 705-711.

Esaka M., Suzuki K., Kubota K. (1985). Determination Method for L-Ascorbic Acid in Foods with Immobilized Ascorbate Oxidase. *Agric. Biol. Chem.*, 39 (10), 2955-2960.

Fiorito P.A., Córdoba de Torresi S.I. (2001). Glucose Amperometric Biosensor Based on Co-immobilization of Glucose Oxidase (GOx) and Ferrocene in Poly(pyrrole) Generated from Ethanol / Water Mixtures. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 12, No. 6, 729-733.

Florescu M., Brett C. M. A. (2005). Development and evaluation of electrochemical glucose enzyme biosensors based on carbon film electrodes. *Talanta* 65, 306-312.

Fournier E. (2001). Colorimetric Quantification of Carbohydrates. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* E1.1.1-E1.1.8.

Gacesa P., Hubble J. (1990). *Tecnología de las enzimas*. Editorial ACRIBIA, Zaragoza (España).

Han K., Wu Z., Lee J., Ahn I., Park J. W., Min B. R., Lee K. (2005). Activity of glucose oxidase entrapped in mesoporous gels. *Biochemical Engineering Journal* 22, 161-166.

Horwitz W. (1982). Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of foods and drugs. *Analytical chemistry*, Vol.54, N° 1, 67 A-76 A.

Huelin, F. E. Coggiola I. M., Sidhu G. S., Kenneth B. H. (1971). The anaerobic decomposition of ascorbic acid in the pH range of foods and in more acid solutions. *Journal of the Science Food and Agriculture* 22, 540-542

IUPAC (1976). Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis – II. Data Interpretation. *Pure and Appl. Chem.*, Vol. 45, 99-103.

Jawaheer S., White S.F., Rughooputh S.D.D.V, Cullen D.C. (2003). Development of a common biosensor format for an enzyme based biosensor array to monitor fruit quality. *Biosensors and Bioelectronics* 18, 1429-1437.

Jia W., Wang K., Xia X. (2010). Elimination of electrochemical interferences in glucose biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol.29, No. 4, 306-318.

Kulys, J. (1999). The carbon paste electrode encrusted with a microreactor as glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 14 (5), 473-479.

Kurata T., Sakurai Y. (1967). Degradation of l-ascorbic acid and mechanism of non-enzymatic browning reaction. Part II, *Agricultural and Biological Chemistry* 31, 170-176.

Liu s., Sun Y. (2007). Co-immobilization of glucose oxidase and hexokinase on silicate hybrid sol-gel membrane for glucose ATP detection. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 905-911

Llamosa R.L.E., Meza Contreras L. G., Botero Arbelaez M. (2007). Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica. *Scientia Et Technica*, Vol. XIII, N° 035, 455-460.

Luiz de Mattos I., Carneiro da Cunha Areias M. (2005). Automated determination of glucose in soluble coffee using Prussian Blue-glucose oxidase.Nafion modified electrode. *Talanta* 66, 1281-1286.

Mello L.D., Kubota L.T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 77, 237-256.

Mocák J., Bond A. M., Mitchell S., Scollary G. (1997). A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection

and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (Technical Report). Pure and Appl. Chem., Vol. 69, No. 2, 297-328.

Mocák J., Janíka I., Rábarová E. (2009). Evaluation of IUPAC limit of detection and ISO minimum detectable value – Electrochemical determination of lead. Nova Biotechnologica 9 – 1, 91-100.

Murphy T. (2010). Cómo usar, medir y controlar la precisión intermedia. Magazines and Newsletter / ASTM Standardization News.

Pandey P.C., Upadhyay S., Shukla N.K., Sharma S. (2003). Studies on the electrochemical performance of glucose biosensor based on ferrocene encapsulated ORMOSIL and glucose oxidase modified graphite paste electrode. Biosensors and Bioelectronics 18, 1257-1268.

Patel H., Li X., Karan H.I. (2003). Amperometric glucose sensors based on ferrocene containing polymeric electron transfer systems – a preliminary report. Biosensors and bioelectronics 18, 1073-1076.

Rauf S., Ihsan K., Ghauri M.A., Rahman M., Anwar M.A., Khalid A.M. (2006). Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate-polymethylmethacrylate membrane. Journal of Biotechnology 121, 351-360.

Revista de Educación Bioquímica (2006). Respuesta al problema bioquímico. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 25, N° 003, 94-95.

Roberts J.C., Caserio M.C. (1977). Basic Principles of Organic Chemistry, Second edition, <http://resolver.caltech.edu/CaltechBOOK:1977.001>

Rondeau A., Larsson N., Boujtita M., Gorton L. and El Murr N. (1999). The synergetic effect of redox mediators and peroxidase in a bienzymatic biosensor for glucose assay in FIA. Analisis 27, 649-656.

Sigma Technical Service Department (1996). Enzymatic assay of GLUCOSE OXIDASE (EC 1.1.3.4).

Sorrivas V., Morales A. (1986). Introducción a la microscopía electrónica. CRIBABB, Argentina.

Southgate D.A.T. (1991). Determination of food carbohydrates. Elsevier applied Science, London, 50-57.

Stočes M, Kalcher K., Švancara I., Vytras K. (2011). A New Biosensor for Glucose Based on Carbon Paste and Enzyme Immobilized onto the Polyaniline Film. International Journal of Electrochemical Science 6, 1917 – 1926.

Sulak M.T., Gökdoğan, Ö., Gülce A., Gülce H. (2006). Amperometric glucose biosensor based on gold-deposited polyvinylferrocene film on Pt electrode. Biosensors and Bioelectronics 21, 1719-1726.

Taher., Al-Zuhair S., Al-Marzouqi A.H, Haik Y., Farid. M.M. (2011). A review of Enzymatic Transesterification of Microalgal Oil-Based Biodiesel Using Supercritical Technology (Review Article). Enzyme Research, Vol. 2011, Article ID 468292.

Thévenot D.R, Toth K., Durst R., Wilson G.S (1999), IUPAC. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. Pure Appl. Chem., Vol. 71, No. 12, 2333-2348.

Tian F., Zhu G. (2002). Bienzimatic amperométrico biosensor for glucosa base don polypyrrol/ceramic carbon as electrode material. Analytica Chimica Acta 451, 251-258.

Tongbu L., Xinyu P., Huiying Y., and Liangnian J. (1996). The producción of glucose oxidase using the waste myceliums of *Aspergillus niger* and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase. Enzyme and Microbial Technology 19, 339-342.

Trevor Palmer B.A. (1984), *Understanding enzymes*, 2nd ed. Ellis Horwood Limited, New York.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine (2011). *Study to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods used in Residue Depletion Studies*.

Wang J. (2001). Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis* 13, No.12, 983-988.

Wang J. (2008). Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem. Rev.* 108, 814-825.

Wang N. S. (2009). Experiment N. 7B. Enzyme immobilization protocol entrapment in alginate gel. Department of Chemical and Biomolecular Engineering. University of Maryland.

Yabuki S., Mizutani F. (1994). Modifications to a carbon paste glucose-sensing enzyme electrode and a reduction in the electrochemical interference from L-ascorbate. *Biosensors and Bioelectronics* 10, 353-358.

Yildiz H.B., Kiralp S., Toppare L., Yagci Y. (2005). Immobilization of glucose oxidase in conducting graft copolymers and determination of glucose amount in orange juice with enzyme electrodes. *International Journal of Biological Macromolecules* 37, 174-178.

Zoldák G., Zubrik A., Musatov A., Stupák M., Sedlák E. (2004). Irreversible thermal denaturation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* is the transition to the denatured state with residual structure. *J. Biol. Chem.* 279, 47601-47609.