

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE PRODUCCION ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA DETECTAR
LACTATO EN PRODUCTOS LÁCTEOS**

TESIS PRESENTADA POR:

ZULMA ESTHER MEJÍA DÍAZ

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México, Diciembre 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE PRODUCCION ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA DETECTAR
LACTATO EN PRODUCTOS LÁCTEOS**

TESIS PRESENTADA POR:

ZULMA ESTHER MEJÍA DÍAZ

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México, Diciembre 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA DETECTAR
LACTATO EN PRODUCTOS LÁCTEOS**

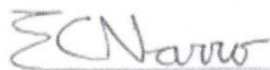
TESIS PRESENTADA POR:

ZULMA ESTHER MEJÍA DÍAZ

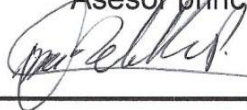
**QUE SE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA POR:



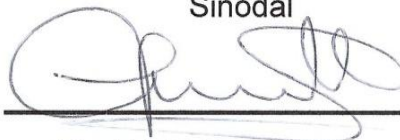
Dr. Efraín Castro Narro
Asesor principal



Mc. Oscar Noé Reboloso Padilla
Sinodal



Dr. Antonio Aguilera Carbó
Sinodal



Mc. Xóchitl Ruelas Chacón
Sinodal



Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Saltillo Coahuila, México, Diciembre 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a **DIOS** por haberme regalado la vida, salud, fe, esperanza, perseverancia, sabiduría y el don de la perseverancia. Mi confidente, el mejor amigo fiel que siempre estuvo conmigo en las buenas y en las malas, los momentos más difíciles de mi vida a lo largo de mi carrera, ayudándome a formarme profesionalmente, gracias Dios por permitirme lograr una más de mis metas.

A la “**UAAAN**” mi **ALMA TERRA MATER** por permitir realizarme como profesionista y como persona dentro de sus instalaciones, y brindarme muchas experiencias en las disciplinas que estuve durante mi carrera. Me siento feliz y orgullosa de ser **100% BUITRE-ORGULLO NARRO**.

A mis **padres: Dagoberto Mejía Pérez y Esther Díaz Zacarías**, por haberme traído a este mundo para conocer y vivir estas experiencias maravillosas que hoy he logrado.

Mis **hermanos**: Yolanda J., Vidal, Marcos, Lorenzo, José M., Martha R., Gualberto E., Alex F.

A mis **cuñadas**: Leticia E., L. Yaneli. Mis **cuñados**: Casimiro E., Neri de Jesús, por el simple hecho de formar parte de la familia, por brindarme su amistad y echarme porras en todo momento.

A mi novio **Misael Aparicio López** por formar parte de mi vida, porque has estado conmigo en todo momento, por tu apoyo incondicional que

me has brindado, tu cariño, confianza y amor, por maravillosos momentos que hemos compartido juntos y porque contigo aprendí el valor y la importancia de muchas cosas y que para llegar al éxito y ganar hay que arriesgarse una y otra vez hasta cumplir el objetivo. Gracias amor por estar ahí siempre en las buenas y en las malas brindándome tu más sincero apoyo, gracias por llegar a mi vida, te AMO.

Al internado femenino de máxima seguridad “el principal matamoros” por abrirme las puertas cuando más necesitaba, lugar donde viví muchas experiencias y conocí a muchas personas con las cuales compartí momentos inolvidables, gracias a todas las chicas por compartir esas locuras durante mi estancia en el internado.

A mis **amigas**: Ángeles, Llesmin, Cheli, Ade, Anita, por todos los momentos que conviví con cada una de ustedes gracias por su amistad. A Ale mi mejor amiga de toda la carrera, gracias por brindarme tu amistad y tu apoyo incondicional y por compartir malos y bellos momentos conmigo, porque estuviste en las buenas y en las malas por nuestras locuras y por todo lo demás te quiero amiga. A Lili L., gracias por tu amistad incondicional y por tu apoyo que me has brindado y por bellos momentos que hemos compartido te quiero amiga. A Lili Mar, Merita, Diana, Sahara, gracias mis niñas por su amistad incondicional y por compartir muchos momentos de locuras y alegrías en el internado desde que las conocí, las quiero mucho niñas.

Mis sinceros agradecimientos a:

Dr. Efraín Castro Narro por haberme brindado su amistad y su apoyo en todos los aspectos durante mi formación profesional y en la elaboración de mi tesis, por su tiempo y paciencia para realización del mismo echándome porras y por confiar en mi capacidad para lograr muchas cosas, gracias por sus conocimientos brindados.

Mc. Oscar Noé Reboloso Padilla por todo el apoyo brindado durante la carrera, por sus enseñanzas, por su tiempo y por guiarme durante todo este tiempo.

Mc. Xóchitl Ruelas Chacón por apoyarme en mi formación profesional, y por haberme brindado su apoyo, por todos sus conocimientos brindados y por su amistad brindada por que más que una maestra también fue una amiga, muchas gracias

Dr. Antonio Aguilera Carbó también por brindarme su apoyo incondicional que me dio en mi estancia en la universidad, por sus conocimientos que me brindo durante la carrera para mi formación como profesionista.

A las personas de laboratorio: Paty, Mari, Cheli, que apoyaron de alguna manera con el proyecto de tesis.

A mis **compañeros de I.C.T.A generación CXXII**: Ale, Ángeles, Cheli, Llesmin, Elena, Itzel, Tere, Alfredo, Jorge, David, Pablo Laguna, Pablo Llamas, Pablo Encinos, Talía, Mayra, Luz, Izamar, Julio, Aleida, Idamar, Evelyn, gracias por el simple hecho de haber sido mis compañeros y por compartir casi 5 años en la carrera cumpliendo todos juntos una más de nuestras metas.

DEDICATORIAS

A **DIOS** porque gracias a él logré llegar a cumplir uno más de mis sueños y una más de mis tantas metas.

A mi madre, **Esther Díaz Zacarías** por creer en mí siempre, porque siempre tener su esperanza y confianza puesta, por sus sabios consejos, su apoyo moral y por hacerme una mujer de bien que cada día estuvo ahí echándome porras durante mi formación tanto personal como profesional. Gracias mamita hermosa por apoyarme en todo desde pequeña ayudándome a crecer, por ser padre y madre a la vez, que sin tu apoyo no hubiese sido posible este sueño logrado, y por eso quiero que mi triunfo lo sientas como el tuyo propio. Te Amo MAMÁ.

A mis **hermanos**: Yolanda Julieta Mejía Díaz, Vidal Mejía Díaz, Marcos Mejía Díaz, Lorenzo Mejía Díaz, José Martin Mejía Díaz, Martha Rosa Mejía Díaz, Gualberto Epifanio Mejía Díaz, Alex Francisco Mejía Díaz. Por el simple hecho de ser mi familia y ser parte de mi vida, por apoyarme de alguna manera y por sustituir esos momentos en el que tenía que alejarme de casa para luchar por mis sueños. Mis hermanas hermosas gracias por ser también a la vez mis amigas, gracias por su apoyo incondicional y por compartir conmigo bellos momentos. A ti Yoli por ser para mí como una segunda madre que siempre estuviste pendiente de mí desde pequeña. A todos gracias porque me apoyaron durante mi formación académica de pequeña, los Amo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIAS	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	VII
RESUMEN.....	VIII
CAPITULO I	1
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
CAPITULO II	4
2 MARCO TEORICO	4
2.1 SENSORES ELECTROQUIMICOS	5
2.2 BIOSENSORES.....	7
2.2.1 TIPOS DE BIOSENSORES.....	8
2.2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES	9
2.2.3 SISTEMA DE TRANSDUCCION.....	9
2.2.4 BIOSENSORES ENZIMATICOS.....	13
2.3 HISTORIA DE LOS BIOSENSORES	13
2.4 APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	18

2.5 ELECTROQUIMICA	20
2.5.1 REACCIONES DE OXIDO REDUCCION.....	20
2.5.2 CELDAS ELECTROQUIMICAS	20
2.5.3 TIPOS DE CELDAS ELECTROQUIMICAS	21
2.5.4 ANODOS Y CATODOS.....	21
2.5.5 ELECTRODOS	23
2.5.6 ECUACION DE NERNST.....	28
2.5.7 TECNICAS VOLTAMPEROMETRICAS.....	30
2.5.8 ÁCIDO LÁCTICO	33
<u>CAPITULO III</u>	<u>35</u>
<u>3 MATERIALES Y METODOS.....</u>	<u>35</u>
3.1 MATERIALES.....	35
3.2 REACTIVOS	36
<u>CAPITULO IV</u>	<u>37</u>
<u>4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....</u>	<u>37</u>
4.1 VOLTAMPEROMETRIA CICLICA.....	37
4.1.1 PREPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS DE TRABAJO.....	37
4.1.2 MONTAJE DE LA CELDA ELECTROQUÍMICA	38
<u>CAPITULO V.....</u>	<u>38</u>
<u>5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u>	<u>38</u>
<u>6 CONCLUSIONES.....</u>	<u>42</u>
<u>CAPITULO VI.....</u>	<u>43</u>

7 LITERATURA CITADA	43
CAPITULO VII.....	49
8 ANEXOS	49

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURA 1. FIGURA 1: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEL FUNCIONAMIENTO DE UN SENSOR QUÍMICO (MONTAÑEZ J. ET AL; 2011)	6
FIGURA 2. FIGURA PRINCIPIO DE UN BIOSENSOR (PIVIDO, 2008).....	8
FIGURA 3. ESTRUCTURA DEL BIOSENSOR DE GLUCOSA OXIDASA DESARROLLADA POR CLARK Y LYONS EN 1962 (CHAUBEY Y MALHOTRA, 2002).	15
FIGURA 4. MOLÉCULA DEL ÁCIDO LÁCTICO (SERNA Y RODRÍGUEZ, 2005).....	33
FIGURA 5. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA DE ELECTRODOS DE ORO MODIFICADOS CON LA ENZIMA EN UNA SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATOS 0.1 M A PH = 7 Y 0.5 mM DE ALCOHOL FERROCENILMETÍLICO (A) SIN ÁCIDO LÁCTICO Y (B) 0.034 M EN ÁCIDO LÁCTICO.....	39
FIGURA 6. RESPUESTA DEL BIOSENSOR (CORRIENTE DE PICO ANÓDICO DE VOLTAMPEROGRAMAS CÍCLICOS) A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO LÁCTICO.....	41
TABLA 1. CORRIENTE DE PICO ANÓDICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO LÁCTICO.....	40

RESUMEN

Un biosensor enzimático electroquímico para lactato se ha construido y se está optimizando. La estrategia para construirlo fue unir la enzima lactato oxidasa a alambres de oro. Adsorción no específica de la enzima en el electrodo desde una solución buffer a pH =7 mostró buenos resultados preliminares sin ser satisfactorio en cuanto a durabilidad. La enzima se trató de fijar al electrodo mediante interacciones hidrofóbicas desde una solución buffer a un valor de pH relativamente cercano a su punto isoeléctrico y al electrodo recubierto con una mono capa auto ensamblada con un grupo carboxilo terminal observándose que la enzima no mostró actividad catalítica. Se procederá a unir la enzima covalentemente mediante mono capas auto ensambladas de diferente estructura a los electrodos de oro y se optimizará el funcionamiento del biosensor posteriormente.

Palabras clave: Biosensor, enzimático, electroquímico, ácido láctico, lactato oxidasa.

CAPITULO I

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente en la industria alimentaria han ocurrido muchos avances en cuanto a diferentes cuestiones, bien sabemos que en los alimentos siempre hay diversas sustancias de las cuales algunas son benéficas y otras no, además hoy en día las industrias agroalimentarias han venido evolucionando con los alimentos, pero en cuanto al avance tecnológico aún no se han satisfecho las necesidades de equipos de análisis para dichos productos alimenticios, por lo cual se presenta la falta de equipos sofisticados que determinen algunas sustancias. Los equipos y materiales que se han venido utilizando a lo largo del tiempo, incluyen algunos que no son tan eficientes, además de que son tardados y los costos son más elevados. Por esta razón y por otras más, se ha presentado la necesidad de desarrollar nuevos instrumentos o equipos para ayudar a la industria de los alimentos a mejorar los laboratorios de análisis con equipos más sofisticados, exactos, eficientes, menos tardados, más económicos, accesibles y mucho más prácticos.

Un biosensor es un dispositivo de análisis conformado por un elemento biológico de reconocimiento (célula, tejido, receptor, ácido nucleico, enzima, ribosoma o anticuerpo, entre otros), ó nano materiales (nano partículas, nano compuestos), materiales inteligentes ó compuestos biomiméticos (aptámeros, polímeros de micro porosidad intrínseca, sondas de ácidos nucleicos), asociado a un mecanismo que garantiza la detección e interpretación de la variación de propiedades ópticas, fisicoquímicas, eléctricas, entre otras, obtenida de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico. Cabe destacar que las características fisicoquímicas del analito de interés son las determinantes para la elección del material biológico/biomimético, mientras que el tipo de elemento de reconocimiento es el que determina el sistema transductor (*Turner y Newman 1998; Jiménez y León 2008*).

¿Qué es el ácido láctico?

A partir de varias definiciones mencionadas por varios autores podemos decir que el Ácido Láctico, ácido 2-hidroxipropanoico, es un compuesto muy versátil que se utiliza en las industrias química, farmacéutica, de alimentos, médica, de los cosméticos y del plástico comúnmente. Fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria, fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur en 1847 y tan solo en 1881, Littleton inicia la fermentación a escala industrial (*Suriderp .1995 y Pares, et al.1997; Serna y Rodríguez, 2005*).

Además de que principalmente lo encontramos en la leche, es muy común que durante la fabricación del queso asadero, es necesario la cuantificación continua de ácido láctico, lo cual suele realizarse por el método de titulación, y como se mencionó anteriormente, este método presenta las desventajas de ser lento y relativamente complejo, por lo que es deseable diseñar un método fácil, exacto, preciso, rápido, sensible, selectivo, durable y económico para cuantificar ácido láctico. El ácido láctico tradicionalmente se cuantifica por métodos colorimétricos y cromatográficos. De acuerdo a la consulta de información hemos observado que han sido pocos trabajos los que se han realizado sobre biosensores enzimáticos electroquímicos basados en la inmovilización de la enzima lactato oxidasa.

En este proyecto se ha tomado la iniciativa para desarrollar un nuevo equipo de análisis que determine ácido láctico, viendo las necesidades que existen en todos los laboratorios de alimentos para cuantificar ácido láctico, ya que por lo que sabemos en todos los laboratorios se utilizan los métodos alcalimétricos de titulación con hidróxido de sodio para determinar esta sustancia lo cual es un método muy tardado, y no tan practico, además de que es más costoso en cuanto a cantidad de reactivo que se utiliza.

El equipo a desarrollar es un nuevo biosensor electroquímico más sofisticado, preciso, práctico, accesible, rápido y de bajo costo, lo cual consistirá en la utilización de una enzima del grupo de las oxido reductasas, por su capacidad redox, es ideal para utilizarlo como bioreceptores en un biosensor amperométrico. Las enzimas son los elementos más comúnmente utilizados para la fabricación de biosensores debido a su alta selectividad, bajo costo, disponibilidad en el mercado y su fácil manipulación, la enzima que se empleará será, la lactato-oxidasa, que se fijará sobre un electrodo de trabajo que generalmente son de grafito, oro, platino en este caso será de oro.

La obtención del biosensor consiste en la inmovilización de moléculas de lactato oxidasa sobre superficie de oro, y su aplicación en la detección y caracterización de moléculas de ácido láctico de interés alimentario. Está basado en la posibilidad de inmovilizar moléculas con un extremo tiolado sobre superficie de oro de forma que se originen mono capas para que la enzima se adhiera a ella. Las enzimas son los elementos más usados para la fabricación de biosensores debido a su bajo costo, disponibilidad en el mercado y fácil manipulación.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un biosensor con capacidad para detectar ácido láctico en productos lácteos para mejorar el equipamiento de los laboratorios de alimentos.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar un biosensor que sea sencillo, accesible, de bajo costo, rápido, preciso, específico, más práctico y eficiente.
- Facilitar el análisis principalmente de productos lácteos con el biosensor.
- Dar a conocer una nueva herramienta para los laboratorios de alimentos.
- Ahorrar material en cuanto a reactivos de valoración.
- Utilización para detectar ácido láctico directamente sin tener que realizar una titulación.
- Mejorar los laboratorios de alimentos, en cuanto a introducción y uso de un nuevo equipo más sofisticado.
- Cambiar los métodos alcalímetros por este equipo para reducir tiempo.

CAPITULO II

2 MARCO TEORICO

La necesidad de contar con resultados analíticos precisos y confiables para la monitorización y el control de procesos químicos, ha originado el desarrollo de nuevos y sofisticados métodos de análisis que requieren de una instrumentación, instalación y mantenimiento, lo que ha dado lugar a la aparición de una sub-disciplina de la química analítica y la electroquímica que es, la química analítica de procesos, cuyo objetivo principal consiste en suministrar información cualitativa y cuantitativa de un determinado proceso químico en función del tiempo; información que además de permitir la monitorización y el control de los parámetros de calidad, también es útil para optimizar de manera eficiente y desde el punto de vista industrial, el consumo de energía y de materias primas, así como la duración del proceso y el aspecto final del producto terminado (*Riebe, 1990; Ferreira et al., 2003*).

2.1 SENSORES ELECTROQUIMICOS

Anteriormente se utilizaban sensores electroquímicos, simples dispositivos analíticos que responden selectiva y cuantitativamente a un tipo de analito en particular, a través de una reacción química en la que se generan señales primarias de reconocimiento, las cuales posteriormente son convertidas en señales eléctricas a través de un transductor (*Alegret et al, 1997; Cortes et al, 2006*). De tal manera se fueron mejorando diferentes aspectos en los análisis que se realizaban con la aparición de los biosensores. Fue así como se mejoró la sensibilidad y la precisión, en cuanto a los biosensores no es necesario estar manipulando las muestras, ni usar una gran variedad ni cantidad de reactivos, es posible hacer cientos o miles de medidas con un solo biosensor, se economiza el costo de los ensayos y se aumenta la rapidez del proceso, además son pequeños y son más sencillos de utilizarse.

Entre las ventajas de los biosensores para el aseguramiento de la calidad fisicoquímica, microbiológica, composicional y la vida útil de los alimentos, se destacan: alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, debido a que las mediciones de nutrientes, micronutrientes, contaminación por residuos, toxinas y productos metabólicos se encuentran en concentraciones a nivel de trazas; ampliación de la vida media del dispositivo utilizando materiales estables y resistentes (*Pérez Calvo A., 2014*). Además estos equipos por los trabajos que se han realizado podemos decir que son de fácil manejo, bajo costo y corto tiempo de análisis, lo que los hace versátiles en el control de procesos y eficientes, ya que disminuyen los tratamientos de las muestra además también de ser fáciles de operar y transportar y quizá una de las ventajas más trascendentales para la industria de alimentos que permiten obtener resultados en tiempo real.

Los sensores químicos están constituidos por dos partes principales: un elemento de reconocimiento molecular o receptor que sólo reconoce al analito por cuantificar, y un elemento transductor de la señal de reconocimiento, en cuya superficie se encuentra inmovilizado el receptor (*Thevenot et al., 2001*).

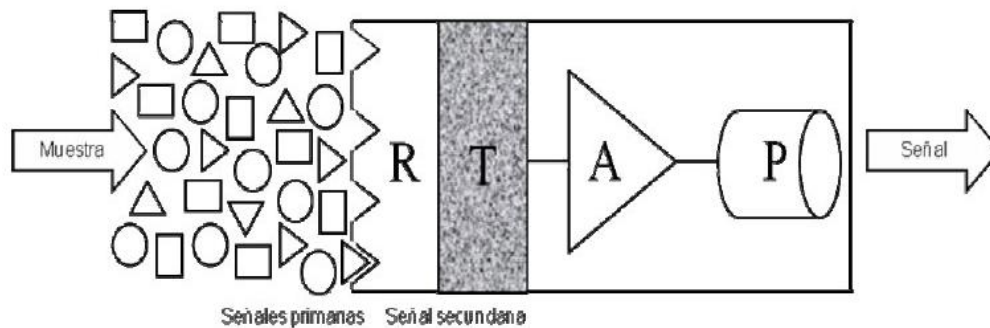


FIGURA 1. Figura 1: Diagrama esquemático del funcionamiento de un sensor químico (*Montañez J. et al; 2011*)

El sistema de reconocimiento o receptor (R) sólo reconoce el analito por cuantificar (A) presente en la muestra. La señal generada en el proceso de reconocimiento es convertida en una señal eléctrica mediante el transductor (T), la cual posteriormente es amplificada (A) y finalmente procesada y presentada en forma digital (P). El receptor puede interactuar con el analito a través de mecanismos físicos, químicos o biológicos (*Montañez J. et al; 2011*).

La escasa versatilidad en la disponibilidad de receptores sintéticos es determinante para que los sensores químicos presenten un grado de reconocimiento limitado, lo que originó el uso de materiales biológicos como elementos de reconocimiento molecular, mucho más selectivos y versátiles que los de tipo sintético. A estos sensores químicos que incorporan materiales biológicos como elementos de reconocimiento molecular, se les dio el nombre de biosensores (*Wang, 2008; Sharma et al., 2003*).

Debido a su alta selectividad y sensibilidad, las enzimas destacan como los elementos de reconocimiento molecular más utilizados en la construcción de biosensores (*Dornelles y Tatsuo, 2002, Leonard et al., 2003*).

Durante el comienzo de la fabricación de biosensores, el biosensor de glucosa fue el primero en construirse, y apartir de este se comenzaron a desarrollar muchos con aplicaciones para distintas cosas, tales como la determinación de contaminantes, diabetes, glutamato, metales, etc. Además de esos también ha surgido la necesidad de realizar un biosensor para ácido láctico.

2.2 BIOSENSORES

Un biosensor podemos definirlo como una herramienta o un sistema analítico conformado por un material biológico que está inmovilizado, del tipo enzimas, anticuerpos u orgánulo. Este material biológico está en contacto con un sistema de transducción adecuado que transforma la señal bioquímica en una señal eléctrica que se puede cuantificar. Se emplea un transductor porque es un dispositivo capaz de transformar el tipo de energía de entrada, en otra diferente a la de salida. La elección del componente biológico, va a depender de la sustancia, la cual denominamos normalmente analito, que se quiera cuantificar; el transductor que se utilizara dependerá del biocomponente (*Garcia, 2003; Ruiz, 2006*).

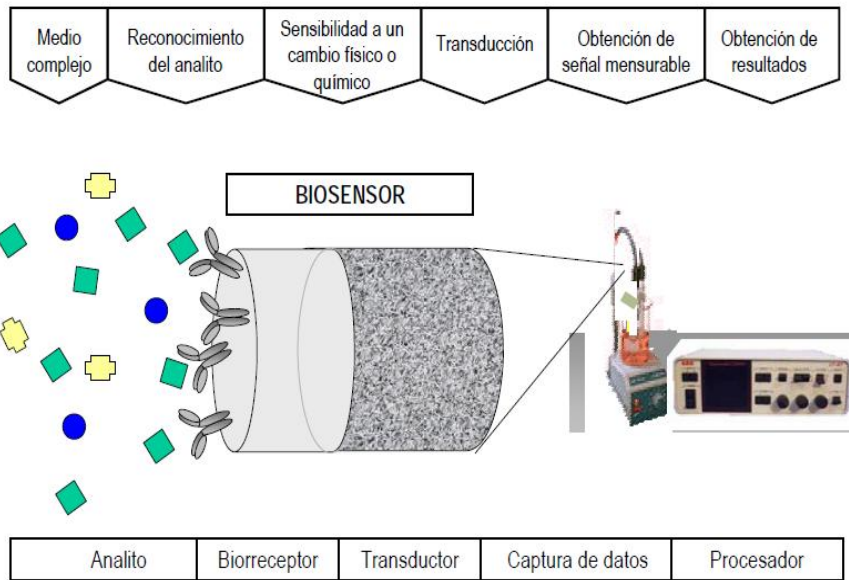


FIGURA 2. Figura Principio de un biosensor (Pivido, 2008).

2.2.1 TIPOS DE BIOSENSORES

- Tipo de interacción: biocatalíticos o de bioafinidad.
- Método de detección: directo o indirecto.
- Elemento de reconocimiento: célula, organelo, tejido, enzima, receptor, anticuerpo, ácido nucleico, polímero de impresión molecular (PIM), ácido nucleico peptídico (PNA) o aptámero.
- Sistema de transducción: nano mecánico, piezoeléctrico, electroquímico, termoeléctrico u óptico.

2.2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES

2.2.2.1 Los biosensores se clasifican en dos tipos:

a) En función del biocomponente inmovilizado.

- Catalíticos o enzimáticos
- De afinidad
- Inmunobiosensores
- De proteínas de membrana
- De microorganismos

b) En función del transductor.

- Transductores electroquímicos
- Transductores ópticos
- Transductores calorimétricos/térmicos
- Transductores acústicos/térmicos

2.2.3 SISTEMA DE TRANSDUCCION

La naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito constituye el factor determinante para la selección del sistema de transducción, sin el cual no es posible obtener, amplificar, registrar, sistematizar, almacenar e interpretar las señales producto de la interacción entre estos.

Entre los sistemas de transducción más referenciados están los siguientes:

- ✓ T. ópticos
- ✓ T. electroquímicos
- ✓ T. amperométricos
- ✓ T. nanomecánicos
- ✓ T. potenciométricos de luz direccionada-LAPS
- ✓ T. piezoeléctricos

2.2.3.1 TRANSDUCTORES ELECTROQUIMICOS

Transductores electroquímicos caracterizados por su capacidad de convertir la señal obtenida en una señal eléctrica, son utilizados en sistemas de reconocimiento biocatalíticos. Los biosensores más comúnmente utilizados son los de tipo impedimétrico, conductimétrico, potenciométrico y amperométrico. Entre las aplicaciones más recientes destacan la utilización de los biosensores amperométricos para el monitoreo de la fermentación maloláctica, determinante de las características de acidez en vinos y monitoreo de concentraciones de glucosa y etanol en procesos de fermentación; monitoreo mediante biosensores impedimétricos de concentraciones de α -solanina y α -chaconina, presentes en papa y tomate; detección de carbofuran y carbaril en aguas utilizando biosensores conductimétricos e inmovilización enzimática en sílica gel, y biosensores potenciométricos para la determinación de butiricolinesterasa, como sensor para glicósidos, organofosforados, carbamatos y metales pesados en papa. (*Jiménez et al, 2009*).

Dentro de los electrodos enzimáticos el mayor número de biosensores desarrollados corresponde sin lugar a dudas a los que se basan en la inmovilización de glucosa oxidasa, dada la alta estabilidad de esta enzima y la gran utilidad de estos sensores en el mercado de los análisis de glucosa en sangre. De hecho, la glucosa oxidasa se suele emplear como enzima modelo para el desarrollo de un gran número de biosensores enzimáticos cuya metodología se emplea posteriormente para diseñar otros biosensores con diferentes enzimas.

Por ello, desde 1962, año en el que se reportó el primer biosensor de glucosa oxidasa, el seguimiento de las publicaciones de estos biosensores puede servir como indicador de la evolución de los biosensores amperométricos en general (*Alegret et al, 2004*).

La glucosa oxidasa no transfiere electrones directamente a electrodos convencionales, debido a que una gruesa capa proteica rodea su centro FAD, hecho bastante común entre las flavoproteínas. Dicha capa introduce una separación espacial en la pareja dador/aceptor de electrones y, por lo tanto, existe una barrera intrínseca a la transferencia de electrones. Por ello, la minimización de esa distancia es crucial para asegurar un funcionamiento óptimo de esta enzima cuando se trabaja con biosensores amperométricos. Así, desde los primeros diseños en los que la monitorización estaba enfocada al empleo de electrodos de Clark, se ha pasado a la utilización de diferentes mediadores, así como al acoplamiento con peroxidasa (*Beliz et al, 1992*).

2.2.3.2 TRANSDUCTORES AMPEROMETRICOS

Este tipo de biosensores se basan en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o grafito, respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica. También es posible realizar análisis basados en técnicas voltamperométricas variando el potencial de trabajo de forma controlada. Los transductores amperométricos se fundamentan en la proporcionalidad existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva determinada y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado. Los biosensores amperométricos son los que han mostrado un mayor avance debido a su extensa aplicación dentro del campo de análisis médico. (*Thevenot et al, 2001*).

Los biosensores basados en transductores electroquímicos son uno de los campos que más ha avanzado en cuanto a la investigación en los últimos años.

Existen diferentes tipos de bioreceptores que se pueden inmovilizar sobre transductores electroquímicos:

- Anticuerpos
- Acidos nucleicos
- Microorganismos
- Tejidos orgánicos
- Enzimas

2.2.4 BIOSENSORES ENZIMATICOS

Es un hecho bien conocido que la utilización analítica de las reacciones enzimáticas ha estado hasta hace poco tiempo restringida a los medios acuosos. Sin embargo, a partir de los trabajos realizados por Hall y Col ha quedado claro que es posible desarrollar biosensores enzimáticos en fase orgánica con ventajas que incluso pueden mejorar las conseguidas en medio acuoso, tales como la posibilidad de monitorización de analitos en muestras hasta ese momento inaccesibles, sin necesidad de un tratamiento de muestra (*Reviejo, 2000*).

La gran mayoría de las publicaciones referidas a biosensores utilizan enzimas como material biológico. Las principales ventajas de los biosensores enzimáticos respecto a los microbianos son las siguientes: I. Elevada especificidad. II. Tiempos de respuesta breves, en general menores al minuto. III. Retornan rápidamente a la línea base. IV. Se pueden usar inhibidores de crecimiento microbiano en las soluciones. V. Material biológico más homogéneo y predecible (*Peña, 2003*).

2.3 HISTORIA DE LOS BIOSENSORES

Los biosensores, al igual que cualquier otro tipo de instrumento, han evolucionado a lo largo de la historia. Anecdóticamente, podríamos decir que los primeros biosensores fueron los canarios; ya que estas aves se utilizaban antiguamente en las minas de carbón para detectar gases tóxicos. Los canarios se mueren antes que las personas en presencia de monóxido de carbono o metano y como suelen estar cantando la mayoría del tiempo el hecho de que no lo hicieran se convertía en una alarma sonora (*Ruiz, 2006*).

Pero, independientemente de este hecho de acuerdo a las consultas realizadas sobre los primeros trabajos de biosensores, se puede decir que el padre de estos dispositivos es Clark Jr., quien realizó muchos trabajos dedicando todo su tiempo en ello tales como los que se mencionan a continuación:

Los biosensores iniciaron su desarrollo y comercialización, fundamentalmente, alrededor de los años 60, orientados a aplicaciones clínicas y de impacto bioquímico. El primero desarrollado fue un sensor enzimático para determinar la concentración de glucosa en sangre a través de la reacción catalizada por la glucosa oxidasa; éste biosensor fue diseñado en 1962, acoplando la glucosa oxidasa a un electrodo selectivo de oxígeno (*Clark y Narang 1994; Jiménez y León 2008*).

El primer biosensor fue un analizador de glucosa desarrollado por Clark y Lyons en 1962 y comercializado a partir de 1975 por Yellow Springs Instrument Company. Este biosensor se denominó "enzyme electrode" y consistía en un dispositivo que contenía la enzima glucosa oxidasa acoplada a un electrodo para oxígeno (*Chaubey, 2002*).

Desde entonces, el desarrollo de los biosensores se ha centralizado en el campo del diagnóstico clínico debido a lo cual, el biosensor de glucosa ha sido el biosensor más desarrollado a nivel mundial (*Wang, 2001; Newman y Turner, 2005*).

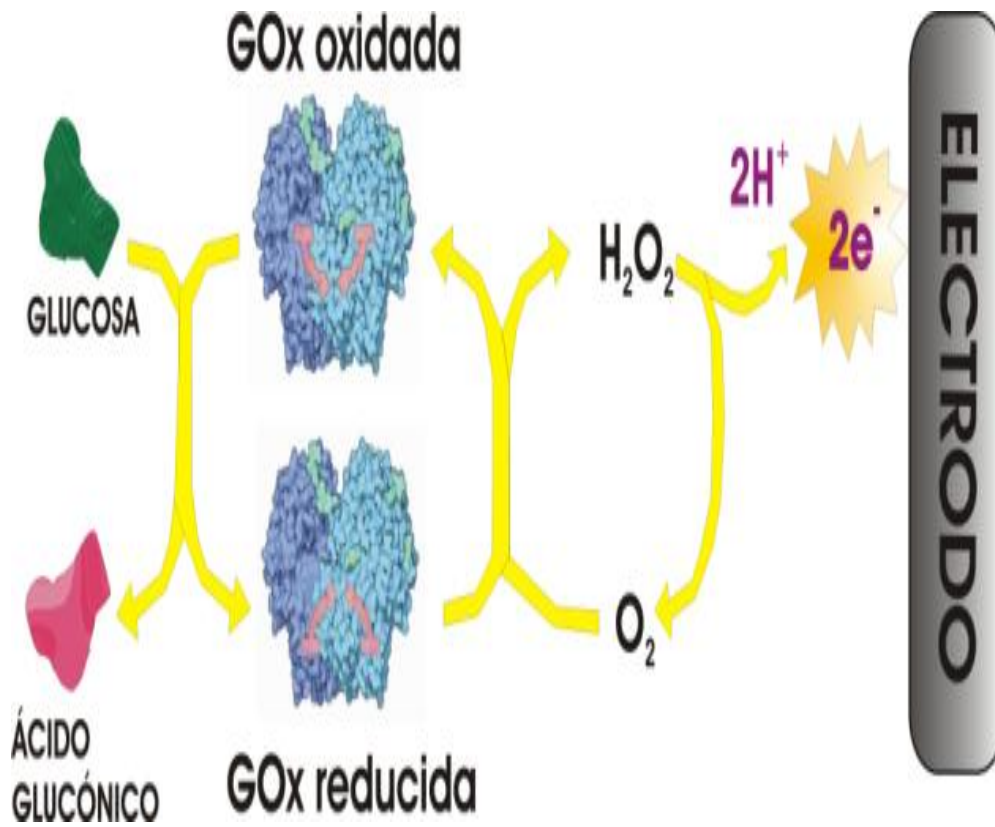


Figura 3. Estructura del biosensor de glucosa Oxidasa desarrollada por Clark y Lyons en 1962 (Chaubey y Malhotra, 2002).

En 1956 Clark finalizó sus trabajos con el electrodo de O₂, pero no se conformó y tuvo la idea de ampliar su uso al de medir más analitos en el cuerpo humano y en 1962 propuso hacer sensores “más inteligentes”. Lo que él quería decir con esto era que sería una buena idea combinar las enzimas y otros materiales biológicos con los sensores electroquímicos que había hasta esa época. Con esta idea, y con la ayuda de Lyon, construyó el primer biosensor. (*Chaubey y Malhotra, 2002*), el cual consistía en un electrodo de O₂ con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada.

Este biosensor permitía relacionar directamente la concentración de glucosa con la disminución de la concentración de oxígeno.

Posteriormente, Guilbault y Montalvo detallaron el primer electrodo enzimático potenciométrico basado en la inmovilización de la enzima ureasa sobre un electrodo selectivo de amonio.

En 1975, Divis se preguntó: ¿por qué no usamos las bacterias como elemento biológico en los biosensores para medir la cantidad de alcohol en una muestra? Esta pregunta causó un gran revuelo en muchas grandes empresas de medio ambiente de Japón y otros lugares que se pusieron en marcha en su investigación y no tardaron mucho tiempo en desarrollar los electrodos microbianos. Un año antes se comenzó a usar transductores térmicos (*thermal enzyme probes*) y los termistores enzimáticos (*enzyme thermistors*). Posteriormente se comenzaron a utilizar los biosensores basados en fibra óptica, que originaron la aparición de los denominados “optados”. Éstos se usaron en un primer momento para la determinación de CO₂ y O₂ (*Montañez et al, 2011*).

Más o menos 15 años después de la construcción del primer biosensor, Clemens incorporó un biosensor de glucosa en un páncreas artificial que se comercializó como el Biostator. Actualmente este biosensor ya no está en venta. En este mismo año una empresa Suiza construyó un biosensor que utilizaba la lactato deshidrogenasa; éste fue muy útil para mejorar los análisis en clínica y en deportes (*Wang, 2001*).

En 1982, basándose en la utilización de mediadores electroquímicos para favorecer la transferencia de electrones desde el centro redox de una enzima a la superficie del electrodo se construyeron la nueva generación de biosensores electroquímicos. Basándose en esto se describió la implantación de un biosensor subcutáneo para la determinación de glucosa (*Zhou et al., 2008*).

Desde sus orígenes y hasta la actualidad se han desarrollado diferentes configuraciones del biosensor de glucosa, en la mayoría de ellas se utiliza la enzima glucosa oxidasa (GOD) inmovilizada de diversas formas y empleando diferentes sistemas de transducción de la señal (*Wang, 2001; Patel, 2002; Nakamura y Karube, 2003; Zhou et al., 2008*).



Reacción básica catalizada por esta enzima glucosa oxidasa.

Estos prototipos presentan un reducido intervalo de concentración de respuesta lineal, así como un corto tiempo de vida media debido a la constante pérdida de material sensor (enzima y mediador electroquímico) desde el cuerpo del biosensor al seno de la solución (*Chaubey y Malhotra, 2002; Dornelles y Tatsuo, 2002; Shan et al., 2007*).

Volviendo a la década de los 70; en ella también se intentaron construir inmunosensores inmovilizando anticuerpos y utilizando transductores piezoeléctricos o potenciométricos, aunque fue en la década de los 80 cuando Liedberg los comercializó con éxito. En 1987 mediante la utilización de mediadores electroquímicos inmovilizados en electrodos enzimáticos serigrafiados se consiguió construir el “bolígrafo” para el seguimiento personal de glucosa en la sangre, comercializado por Medi Sense (*Shan et al., 2007*).

Actualmente las compañías Abbott Boehringer Mannheim y Bayer dominan las ventas de éste bolígrafo lo que da lugar a unas ventas del orden de varios cientos de millones de dólares; y está desbancando casi totalmente a los métodos convencionales de medir la glucosa (*Shan et al., 2007*).

2.4 APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Gracias al apoyo de los instrumentos de la biotecnología y a la investigación postgenómica, los biosensores actualmente suponen potentes herramientas de análisis que encuentran numerosas aplicaciones en la industria agroalimentaria medioambiental, química, farmacéutica y militar (*Rekha et al., 2000; Patel, 2002; Ferreira et al., 2003*). En la industria agroalimentaria, las tres grandes áreas de aplicación de los biosensores son: seguridad alimentaria, calidad alimentaria y control de procesos (*González et al., 2005*).

Las características más destacables que convierten a los biosensores en opciones altamente atractivas tanto en la industria alimentaria como en otras disciplinas, para competir en el mercado con otras tecnologías son: su especificidad, su alta sensibilidad, su corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, su facilidad de automatización, su capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad que permite el diseño de dispositivos a la carta, y su bajo costo, entre otras (*González et al., 2005*)

Actualmente existen multitud de biosensores en los cuales se combinan la amplia diversidad de componentes biológicos (enzimas, ácidos nucleicos, receptores celulares, anticuerpos y células intactas) con los diferentes tipos de transductores (electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométrica).

Éstos se pueden utilizar en numerosos problemas de la actualidad como el análisis clínico, de alimentos, bebidas, vigilancia del medio ambiente, defensa, seguridad y muchas más áreas.

Aunque los desarrollos iniciales de tecnología de biosensores fueron de aplicación en química clínica, su espectro ha aumentado y su versatilidad ha permitido incursionar en el análisis de compuestos orgánicos e inorgánicos y en matrices ambientales, alimentarias, cosméticas y farmacéuticas entre otras. (*Jiménez y León 2008*).

Caracterizados por su capacidad de convertir la señal obtenida en una señal eléctrica, son utilizados en sistemas de reconocimiento biocatalíticos. Los biosensores más comúnmente utilizados son los de tipo impedimétrico, conductimétrico, potenciométrico y amperométrico. Entre las aplicaciones más recientes se destacan la utilización de los biosensores amperométricos para el monitoreo de la fermentación maloláctica, determinante de las características de acidez en vinos (*Jiménez y León 2008*).

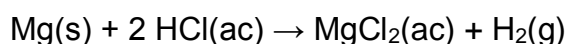
2.5 ELECTROQUIMICA

Se define como electroquímica al conjunto de técnicas analíticas que usan la medición del potencial, carga o corriente para determinar la reacción química de un analito. La electroquímica, es originada del estudio del movimiento de los electrones en una reacción de óxido-reducción (*Alegret y Arben, 2004*).

2.5.1 REACCIONES DE OXIDO REDUCCION

Las reacciones de óxido-reducción son procesos en los que uno o más electrones se transfieren de una especie a otra (átomos, moléculas o iones). Como resultado de esa transferencia de electrones, cambian las cargas de los átomos de los diversos reactivos (*Cerón y Burbet, 2004*).

Por ejemplo, cuando el magnesio metálico reacciona con un ácido acuoso, un átomo de magnesio cede un electrón a cada uno de dos iones H^+ , formándose así un ion Mg^{2+} y una molécula H_2 . La carga del magnesio pasa de 0 a 2+, mientras que la carga de cada hidrógeno se modifica de 1+ a 0.



2.5.2 CELDAS ELECTROQUIMICAS

Una celda electroquímica consiste en dos conductores denominados electrodos, cada uno sumergido en una solución electrolítica. Las soluciones en que se sumergen los dos electrodos son diferentes y deben de estar separadas para evitar la reacción directa entre los reactivos. La manera más común de evitar que se mezclen es insertando un puente salino en las soluciones. La conducción de electricidad desde una solución electrolítica hacia la otra ocurre por el desplazamiento de iones de la sustancia química por la cual esté conformado dicho puente (*Cerón y Burbet, 2004*).

2.5.3 TIPOS DE CELDAS ELECTROQUIMICAS

Las celdas electroquímicas pueden ser galvánicas o electrolíticas. También se pueden clasificar como reversibles e irreversibles.

Las celdas galvánicas o voltaicas almacenan energía eléctrica. Por lo general las baterías se hacen con varias celdas de este tipo conectadas en serie para producir un voltaje mayor que el que puede producir una celda sencilla.

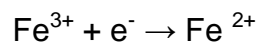
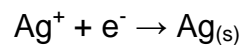
Las reacciones en los dos electrodos de estas celdas tienden a ocurrir espontáneamente y producen un flujo de electrones desde el ánodo hacia el cátodo a través de un conductor externo. Las pilas galvánicas funcionan espontáneamente y la reacción neta que sucede durante la descarga se denomina reacción espontánea de la celda (*Cerón y Burbet, 2004*).

Contrario a una celda galvánica, para que una celda electrolítica funcione, necesita una fuente externa de energía eléctrica. Típicamente está constituida por un recipiente contenedor del electrolito y dos electrodos que funcionan, uno como ánodo y el otro como cátodo, los cuales permiten el paso de corriente eléctrica. Se utiliza con mayor frecuencia para descomponer los compuestos químicos, en un proceso llamado electrólisis, un ejemplo importante de esta es la descomposición del agua en hidrógeno y oxígeno.

2.5.4 ANODOS Y CATODOS

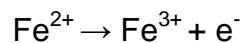
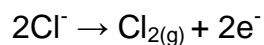
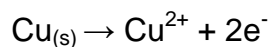
En una celda electroquímica, el cátodo es el electrodo en el que se lleva a cabo una reacción de reducción. El ánodo es el electrodo en el que tiene lugar una oxidación.

Estos son ejemplos de reacciones catódicas comunes.



Se puede hacer que estas reacciones se lleven a cabo aplicando el potencial adecuado a un electrodo inerte, como el platino.

Algunas reacciones anódicas comunes son:



La primera reacción requiere de un ánodo de cobre, pero las otras dos se pueden llevar a cabo en la superficie de un electrodo inerte de platino, que puede proporcionar o donar electrones.

2.5.5 ELECTRODOS

Un electrodo es un conductor eléctrico utilizado para hacer contacto con una parte no metálica de un circuito, por ejemplo un semiconductor, un electrolito, el vacío, un gas (en una lámpara de neón), entre otros. Existen dos tipos de electrodos

- ❖ Los electrodos de referencia.

- ❖ Los electrodos indicadores.

Un electrodo de referencia es una semicelda con un potencial de electrodo conocido que permanece constante y que es independiente de la composición del analito o de otros iones contenidos en la solución que se analiza (*Cerón y Burbet, 2004*).

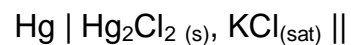
2.5.5.1 TIPOS DE ELECTRODO DE REFERENCIA

Un electrodo de referencia ideal es aquel que tiene un potencial que se conoce con exactitud, se mantiene constante y es completamente independiente a la composición de la solución del analito. Además, el electrodo debe ser resistente, fácil de usar y debe mantener un potencial constante al paso de la corriente (*Cerón y Burbet, 2004*).

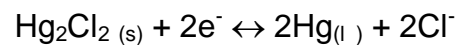
Dentro de los tipos de electrodos de referencia más usados comúnmente en métodos potenciométricos son:

- ❖ Los calomelanos.
- ❖ Los de plata cloruro de plata.

Los electrodos de referencia calomelanos se componen de mercurio en contacto con una solución saturada de cloruro de mercurio (I) que contiene también una solución conocida de potasio. Las semiceldas de los calomelanos se pueden representar como sigue:

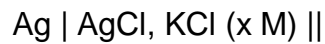


El potencial de electrodo para esta semi-celda está determinado por la reacción:

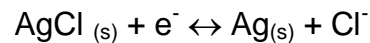


Y depende de la concentración de cloruro.

El electrodo de referencia más ampliamente comercializado consiste en un electrodo de plata sumergido en una disolución de cloruro de potasio saturada con cloruro de plata (Cerón y Burbet, 2004).



El potencial del electrodo está determinado por la semirreacción:



Normalmente, este electrodo se prepara ya sea con una disolución saturada de cloruro de potasio o con una a concentración 3.5 M. Algunos modelos comerciales de este electrodo son semejantes en apariencia externa y en forma a los electrodos calomelanos.

Los electrodos de plata-cloruro de plata tienen la ventaja de que pueden utilizarse a temperaturas superiores a los 60 °C, mientras que los electrodos calomelanos no. Por otra parte los iones de mercurio reaccionan con menos componentes de la muestra que los iones de plata (que pueden por ejemplo reaccionar con las proteínas); tales reacciones pueden conducir a la obturación de la unión entre el electrodo y la disolución del analito (Cerón y Burbet, 2004).

2.5.5.2 ELECTRODOS INDICADORES

Respecto a los electrodos indicadores, estos tienen un potencial que cambia en forma predecible con las variaciones en la concentración del analito. Idealmente un electrodo indicador responde de forma rápida y reproducible a los cambios de actividad del ion analito (o un grupo de iones). Aunque ningún electrodo indicador es totalmente específico en su respuesta, hay algunos que son marcadamente selectivos. Dos tipos de electrodos indicadores son ampliamente usados en métodos potenciométricos los metálicos y los de membrana (*Peña, 2003; Cerón y Burbet, 2004*).

Dentro del campo de los electrodos indicadores metálicos se pueden distinguir cuatro tipos de electrodo:

- ❖ Electrodos de primera clase.
- ❖ Electrodos de segunda clase.
- ❖ Electrodos de tercera clase.
- ❖ Electrodos indicadores redox.

Los electrodos metálicos de **primera clase** están en equilibrio directo con el catión que deriva del electrodo metálico. En este caso, interviene una única reacción. Los electrodos de primera clase no son muy utilizados en el análisis potenciométrico por varias razones. En primer lugar no son muy selectivos y responden no solo a los cationes de su tipo, sino también a otros cationes más fácilmente reducibles (*Skoong et al, 2001*).

Los electrodos de **segunda clase** que son también metales también responden a la concentración de aniones que forman precipitados poco solubles o complejos estables con esos cationes.

Están formados por un metal en contacto con una disolución saturada de una de sus sales poco solubles. Se basan en la propiedad de que algunos metales no sólo responden hacia sus propios cationes, sino que también son sensibles a la actividad de aniones que forman precipitados poco solubles o complejos estables con dichos cationes (Skoong *et al*, 2001).

El mercurio sirve como electrodo indicador de segunda clase del anión del EDTA. Y es un valioso electrodo de esta clase en valoraciones de EDTA.

Un electrodo de **tercera clase** implica dos equilibrios que afectan a la pareja redox M^{n+} / M . Por ejemplo, un electrodo de tercera clase que responda al ión Ca^{2+} se puede obtener utilizando AEDT como ligando común para el Ca^{2+} y Hg^{2+} . La reacción de intercambio electrónico implica a la pareja redox Hg^{2+} / Hg . Un electrodo metálico se convierte en un electrodo de tercera clase cuando se hace que responda a un catión diferente (Skoong *et al*, 2001).

Los **electrodos redox** son los electrodos que corresponden al potencial redox de una disolución formada por una o más parejas redox. Los más utilizados son aquellos constituidos por oro, platino, paladio u otros metales inertes. Estos electrodos actúan como una fuente o como un sumidero de los electrones transferidos desde un sistema redox presente en la disolución. Hay que resaltar que los procesos de transferencia de los electrones en los electrodos inertes no suelen ser reversibles y por lo tanto, los electrodos inertes no responden a muchas de las semirreacciones de las tablas de electrodos de una forma predecible (Skoong *et al*, 2001).

2.5.6 ECUACION DE NERNST

El principio de Chatelier nos dice que, al aumentar la concentración de los reactivos, la ecuación química se desplaza a la derecha, y al aumentar la concentración de los productos, dicha ecuación se desplaza a la izquierda.

La ecuación de Nernst se puede emplear para determinar la FEM (fuerza electromotriz) de una pila construida de electrodos no estándar o para calcular el potencial del electrodo de una media pila en la cual todas las especies se encuentran presentes a la actividad diferente a la unidad. También se usa en biología para estimar la diferencia de potencial a través de las membranas celulares biológicas, como las neuronas. Otra aplicación de la ecuación de Nernst es la medida de concentraciones (Cerón y Burbet, 2004).

A medida que los reactivos se consumen en una pila electroquímica funcionando, el potencial de la pila disminuye hasta que finalmente llega a cero. Una batería “muerta” es aquella en la cual la reacción de la pila ha llegado al equilibrio. En el equilibrio una pila no genera diferencia de potencial entre sus electrodos y la reacción ya no puede generar trabajo (Cerón y Burbet, 2004).

Para la semirreacción:



La ecuación de Nernst da el potencial de la semicelda E.

Ecuación de Nernst:

$$E = E^\circ + \frac{0.05916}{n} \log \frac{[Ox]}{[Red]}$$

Donde:

E° = Potencial estándar de reducción

Ox = concentración de las especies oxidadas

Red = concentración de las especies reducidas

n = Número de electrones intercambiados

El logaritmo de la ecuación de Nernst es el cociente de reacción, Q .

$$Q = \frac{A_B^b}{A_A^a}$$

Q tiene la misma forma que la constante de equilibrio, pero las concentraciones no son necesariamente las concentraciones de equilibrio. Ni los sólidos puros, ni los líquidos puros, ni los disolventes figuran en Q , porque sus actividades valen 1 (o son cercanas a 1). Las actividades de los solutos se expresan en molaridades, mientras que la de los gases se expresan en atmósferas. Cuando todas las actividades son la unidad, $Q = 1$ y $\ln Q = 0$. Por consiguiente, cuando todas las actividades son la unidad, $E = E^\circ$.

$$\text{Ecuación de Nernst a } 25^\circ\text{C} \quad E = E^\circ - \frac{0.05916 \text{ V}}{n} \log Q$$

El potencial varía, pues, en $59.16/n$ mV por cada diez veces de cambio en el valor de Q .

2.5.7 TECNICAS VOLTAMPEROMETRICAS

La voltamperometría abarca un grupo de métodos electroanalíticos en los que la información sobre el analito se obtiene de la medida de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, en condiciones que favorezcan la polarización de un electrodo indicador o de trabajo. Comúnmente con el objetivo de aumentar la polarización, los electrodos de trabajo en voltamperometría son microelectrodos que tienen áreas superficiales como máximo de unos pocos milímetros cuadrados y en algunas aplicaciones unos pocos micrómetros o incluso menos (*Luna, 2008*).

La voltamperometría se basa en la medida de la intensidad de corriente que se desarrolla en una celda electroquímica en condiciones de polarización total de concentración. Una de las ventajas que ofrece la voltamperometría es que tiene lugar un consumo mínimo del analito mientras que con otras técnicas como la coulombimetría prácticamente todo el analito pasa a otro estado (*Vilasó, 2014*).

2.5.7.1 VOLTAMPEROMETRIA CICLICA

La variación del potencial eléctrico con el tiempo se conoce como velocidad de barrido, pudiéndose expresar en unidades de (V / s). El potencial se mide entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo y la corriente se mide entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar. Estos datos se representan como corriente (I) actual vs el potencial (E). Como muestra la forma de onda, el puntero de exploración produce un pico de corriente para cualquier analito que se pueda reducir (u oxidar en función de la dirección de exploración inicial) a través de la ventana de potencial escaneada (*Vilasó, 2014*).

La corriente aumentará a medida que el potencial alcanza el potencial de reducción de la sustancia analizada, pero luego se cae como la concentración de la sustancia analizada se agota cerca de la superficie del electrodo. Si la pareja redox es reversible entonces cuando el potencial aplicado se invierte, llegará a la posibilidad de que vuelva a oxidar el producto formado en la reacción de reducción ocurrida, y producir una corriente de inversión de polaridad de la exploración hacia adelante. Este pico de oxidación por lo general tiene una forma similar al pico de reducción. Como resultado, la información que se obtiene es sobre el potencial redox y la reacción electroquímica de los compuestos en estudio (*Pividori, 2008*).

Caracterización

La utilidad de la voltamperometría cíclica es altamente dependiente del analito en estudio. El analito debe ser un reductor u oxidante activo dentro de la ventana de potencial de experimentación. También es muy conveniente si el analito muestra una onda reversible. Una onda reversible es cuando un analito se reduce, por ejemplo, en una exploración hacia adelante y se re-oxida si se cambia la dirección de exploración (*Pividori, 2008*).

2.5.7.2 POTENCIOMETRIA

En química analítica, la potenciometría se basa en los métodos analíticos para medir el potencial de una celda electroquímica. La medición del potencial se determina bajo condiciones reversibles, en forma termodinámica, y esto implica que se debe dejar pasar el tiempo suficiente para llegar al equilibrio, extrayendo la mínima cantidad de intensidad, para no influir sobre el equilibrio que se establece entre la membrana del electrodo y la disolución muestra (*Reviejo y Pingarron, 2000*).

Para obtener mediciones analíticas válidas en potenciometría, uno de los electrodos deberá ser de potencial constante y que no sufra cambios entre uno y otro experimento. El electrodo que cumple esta condición se conoce como electrodo de referencia. Debido a la estabilidad del electrodo de referencia, cualquier cambio en el potencial del sistema se deberá a la contribución del otro electrodo, llamado electrodo indicador o de trabajo (*Reviejo y Pingarron, 2000*).

2.5.7.3 AMPEROMETRIA

Los metodos amperométricos utilizados son del tipo potencioestáticos; en estos se fija un potencial entre el electrodo de referencia y el de trabajo, de tal manera de que se oxiden o reduzcan las especies de interés, midiéndose la corriente que circula entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo (*Luna, 2008*).

Como su nombre lo indica esta técnica implica la medición de la cantidad de corriente que circula por el circuito de medida. Para tener una utilidad analítica el parámetro que se determina tiene que tener una relación con la concentración del analito que se desea cuantificar. Esto se logra si se trabaja en condiciones donde el único mecanismo de transporte actuante con el analito sea la difusión (*Reviejo y Pingarron, 2000*).

En general los métodos amperométricos pueden ser realizados variando el potencial aplicado a un electrodo de trabajo, como es el caso de la polarografía, la voltamperometría, etc. Otra opción es trabajar a un valor de potencial constante. Este es el caso de las titulaciones amperométricas, donde se monitorea constantemente el valor de la corriente y se trabaja a un potencial adecuado de modo que en el punto equivalente ocurra un brusco cambio en el valor de la misma (*Peña, 2003*).

2.5.8 ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico, ácido 2-hidroxipropanoico, es un compuesto muy versátil, líquido siruposo, incoloro, soluble en éter e insoluble en cloroformo, éter de petróleo y disulfuro de carbono. Es utilizado en las industrias química, farmacéutica, de alimentos y del plástico. Fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria, fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur en 1847 y tan solo en 1881, Littleton inicia la fermentación a escala industrial (*Suriderp, 1995; Parés et al1997*).

También podemos decir que es una biomolécula presente en gran parte de los seres vivos y es un componente normal en la sangre y los músculos de los animales.

El ácido láctico tiene un carbono asimétrico lo cual da lugar a actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos, el D (-) láctico y L (+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-). A diferencia del isómero D (-), la configuración L(+) es metabolizada por el organismo humano. Tanto las dos formas ópticamente activas como la forma racémica se encuentran en estado líquido, siendo incoloros y solubles en agua (*Serna y Rodríguez, 2005*).

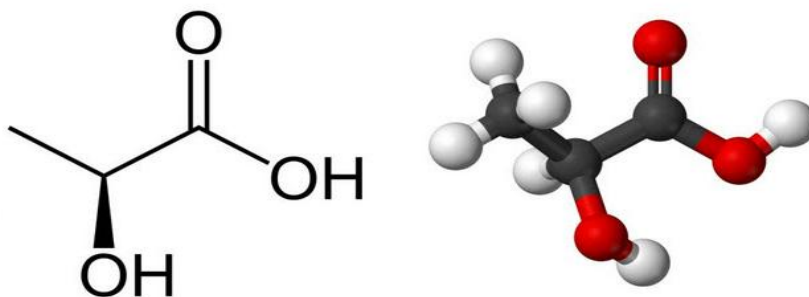


Figura 4. Molécula del ácido láctico (*Serna y Rodríguez, 2005*).

En estado puro son sólidos altamente higroscópicos de punto de fusión bajo, el cual es difícil de determinar debido a la extrema dificultad de producirlo anhidro; es por esta razón que se manejan rangos de 18- 33°C.

El punto de ebullición del producto anhidro esta entre 125-140°C (Suriderp, 1995; Parés et al., 1997). Ambas formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas y se pueden producir polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición (**Naitove 1998; Serna y Rodríguez, 2005**).

2.5.8.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

La mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo con las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y los hongos filamentosos del género *Rhizopus*. El uso de los hongos tiene ventaja por las características amilolíticas y bajos requerimientos en nutrientes. La morfología de los hongos, es una característica de interés en la producción del ácido porque puede influir positiva como negativamente; los hongos pueden crecer en forma de micelio individual, granular, en flóculos en pellets esféricos (*Serna y Rodriguez, 2005*).

Se encontró que cuando la morfología de *R. arrhizus* cambió de filamentosa a pellets, después de 152 h decreció la productividad del ácido láctico de 75,3% a 62,6%. En un cultivo de *R. oryzae* la producción de ácido láctico fue mejorada al ser inducido a la forma micelial (*Park et al. 1998; Serna y Rodríguez, 2005*).

CAPITULO III

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

- ❖ Potentiostat / Galvanostat Model 273, EG&G PRINCETON APPLIED RESEARCH.
- ❖ Parrilla eléctrica, (NOVA II STIRPLATE THERMOLYNE)
- ❖ Balanza analítica, (AND HR-200 MADE IN JAPAN)
- ❖ Peachímetro Russell RL060P user´s Guide, Thermo electron corporation
- ❖ Cartucho de gas butano / propano valvula con rosca,(TRUPER).
- ❖ Electrodo de trabajo: alambre de Oro puro, 1 mm de diámetro, 99.99%
- ❖ Electrodo de referencia: Plata /cloruro de plata
- ❖ Electrodo auxiliar: alambre de platino, 1 mm de diámetro, 99.99%
- ❖ Micro pipeta de 100-1000 μ L (GLASSCO)
- ❖ Matraz de aforación de 10 ml, 25 ml, 50 ml y 100 ml.
- ❖ Vaso de precipitado
- ❖ Pinzas
- ❖ Agitador de vidrio
- ❖ Agua destilada
- ❖ Agua desionizada
- ❖ Estufa FELSA, modelo 242, temp.220 °C
- ❖ Limpiador de metales Ultrasonido (STEREN USC-100)
- ❖ MicroPolish 0.05 μ m (BUEHLER)
- ❖ Para Film "M" (BEMIS, NEE NAH, WI)
- ❖ Vial Tubo Eppendorf 10 ml

3.2 REACTIVOS

- ❖ Lactatoxidasas, from pediococcus S.P. 1.3 mg solid, 40 units/mg (SIGMA ALDRICH).
- ❖ Ferrocenylmethyl alcohol (H-MNR) 95%, pm: 216.06g/mol (SIGMA ALDRICH).
- ❖ Lactic acid ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) 85%, pm: 90.080g/mol (MACRON FINE CHEMICALS).
- ❖ Nitrato de plata RA (AgNO_3), pm: 169.87g/mol (FERMONT).
- ❖ D.I.C. N´N- Diisopropylcarbodiimide ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2$) 99% (SIGMA ALDRICH).
- ❖ 3-Mercaptopropionic acid \geq 99%, pm:106.14g/mol, (SIGMA ALDRICH)
- ❖ Buffer de referencia color rojo pH 4.01+/- 0.01
- ❖ Buffer de referencia color amarillo pH 7.00
- ❖ Buffer de referencia color azul pH 10.0
- ❖ Ácido nítrico (HNO_3) 64-66% RA, pm:63.01g/mol, (FERMONT).
- ❖ Acetona (CH_3)₂CO, pm: 58.08g/mol, (FERMONT).
- ❖ Alcohol etílico absoluto 99.5%, (JALMEK).
- ❖ Ácido acético glacial (CH_3COOH), pm: 60.05g/mol, (CTR SCIENTIFIC).
- ❖ Acetato de potasio (CH_3COOK), pureza: 98.14%, (CTR SCIENTIFIC).
- ❖ Hidróxido de sodio (NaOH), pm: 39.997g/mol, (JALMEK).

CAPITULO IV

4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 VOLTAMPEROMETRIA CICLICA

4.1.1 Preparación de los electrodos de trabajo

Se utilizaron como electrodos de trabajo, alambres de oro 99.99 % en base a metales en traza de 1.0 mm de diámetro. Dichos electrodos se hirvieron en ácido nítrico concentrado durante 5 min y se enjuagaron con agua destilada para los experimentos de adsorción no específica mientras que para los experimentos de inmovilización por interacciones físicas, se calentaron al rojo vivo en una flama de una mezcla de gases butano y propano en aire, enjuagándose posteriormente con agua destilada. Para los experimentos de adsorción no específica, los electrodos de oro, una vez tratados, se remojaron en 20 μ L de solución de la enzima y se dejaron secar al aire para usarse inmediatamente o después de 50 días a temperatura ambiente. Para los experimentos de inmovilización por interacciones físicas, los electrodos tratados se sumergieron en una solución 1 mM de ácido 3-mercaptopropiónico \geq 99% en acetona durante toda la noche para después sacarse, enjuagarse con acetona, dejarse secar y remojar en una mezcla de 20 μ L de solución de enzima y 20 μ L de una solución buffer de acetato de potasio/ácido acético 0.1 M con pH = 4.6 (preparada a partir de ácido acético glacial y acetato de potasio) con el fin de acercar el pH de la solución al punto isoeléctrico de la enzima. La solución de enzima se preparó disolviendo 1.3 mg de enzima lactato oxidasa de *pediococcus* sp. (Por sus siglas en inglés), la cual se mantuvo guardada a -20 °C desde que se recibió y hasta antes de su usarse, en 250 μ L de solución buffer de fosfatos 0.1 M a pH = 7, tomando de esta solución las alícuotas necesarias para los experimentos y guardando la solución de enzima a -20 °C inmediatamente para reusarse.

4.1.2 Montaje de la celda electroquímica

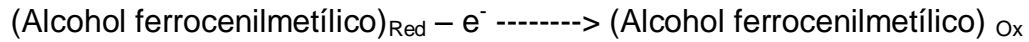
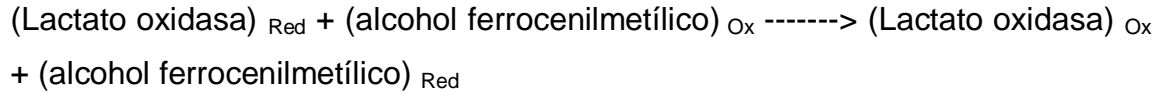
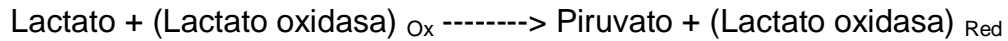
La celda electroquímica consistió en un vaso de precipitados de 100 ml en el que se introdujeron tres electrodos: como electrodo de trabajo se utilizó el electrodo de oro modificado, como electrodo de referencia, se utilizó un electrodo de plata/cloruro de plata y como contraelectrodo un alambre de platino. En la celda se utilizaron 50 ml de solución buffer de fosfatos 0.1 M a pH = 7 (preparada a partir de fosfato monobásico de sodio monohidratado ajustando el pH a 7 con hidróxido de sodio) y 0.5 mM de alcohol ferrocenilmetílico 95 % (H-NMR) utilizado como mediador de electrones. A dicha solución, después de estudiarla por voltamperometría cíclica por sí sola, se le fueron agregando diferentes cantidades (no mayores a 1 ml) de solución 0.1 M de ácido láctico (preparada a partir de una solución al 85 % de ácido láctico) para estudiar la respuesta del biosensor por voltamperometría cíclica a diferentes concentraciones de ácido láctico

CAPITULO V

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra la voltamperometría cíclica del electrodo modificado sin ácido láctico (a) y con un exceso de ácido láctico 0.34 M (b). Los voltamperogramas fueron corridos de -100 mV a 600 mV y de regreso a -100 mV a una velocidad de 50 mV/s. Se puede observar un comportamiento reversible para el alcohol ferrocenilmetílico en ausencia de ácido láctico, mientras que cuando el ácido láctico está presente se observa una respuesta catalítica al sustrato debida a la enzima lactato oxidasa presente en el electrodo de manera que la corriente del pico anódico aumenta considerablemente mientras que la corriente del pico catódico disminuye.

Esto es debido a las siguientes reacciones:



De manera que el lactato se oxida a piruvato cuando se corre el potencial en la dirección positiva, mientras que posteriormente al correrse en dirección negativa, la reducción del piruvato no es favorecida por la enzima y esto se puede apreciar en el comportamiento de los picos del alcohol ferrocenilmetílico en los voltamperogramas cíclicos.

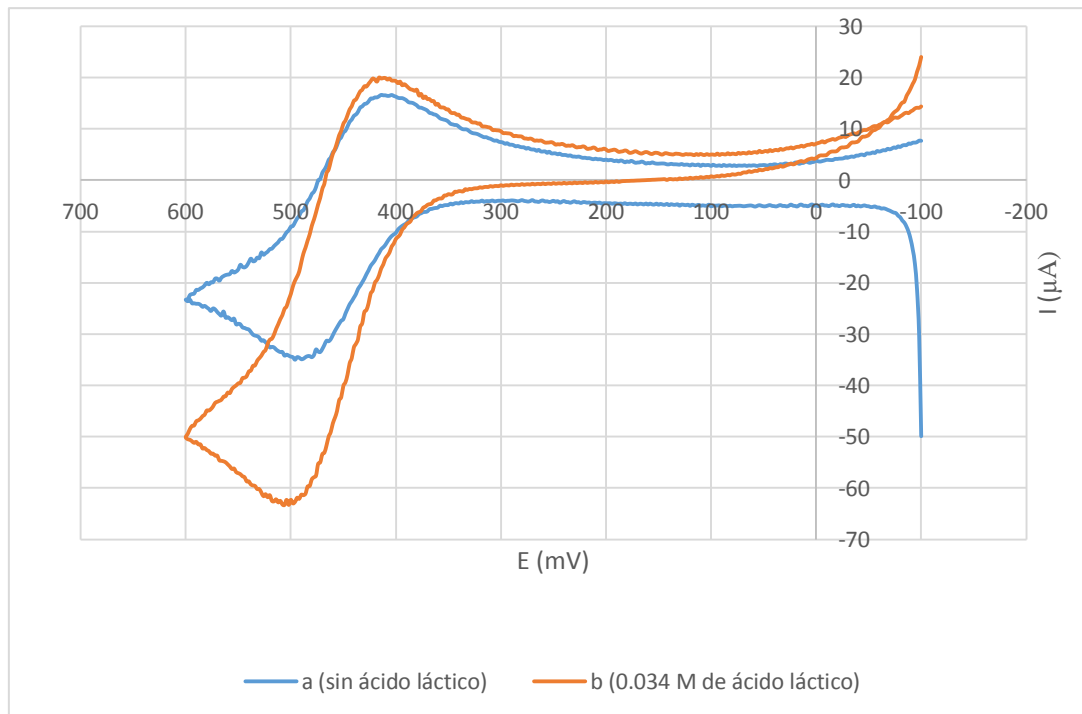


Figura 5. Voltamperometría cíclica de electrodos de oro modificados con la enzima en una solución buffer de fosfatos 0.1 M a pH = 7 y 0.5 mM de alcohol ferrocenilmetílico (a) sin ácido láctico y (b) 0.034 M en ácido láctico.

Tabla 1. Corriente de pico anódico a diferentes concentraciones de ácido láctico.

Conc. A.L. M	i_{pa} (μA)
0.0000	-18.04
0.0009	-21.17
0.0017	-22.25
0.0028	-23.89
0.0041	-25.45

La Figura 6 muestra la respuesta (corriente de pico anódico) a diferentes concentraciones de ácido láctico, observándose que el biosensor está respondiendo al aumentar la concentración de ácido láctico. De acuerdo a nuestros experimentos, la enzima se satura a una concentración de ácido láctico de entre 4 mM y 5 mM, en las que la corriente de pico anódico no aumenta más.

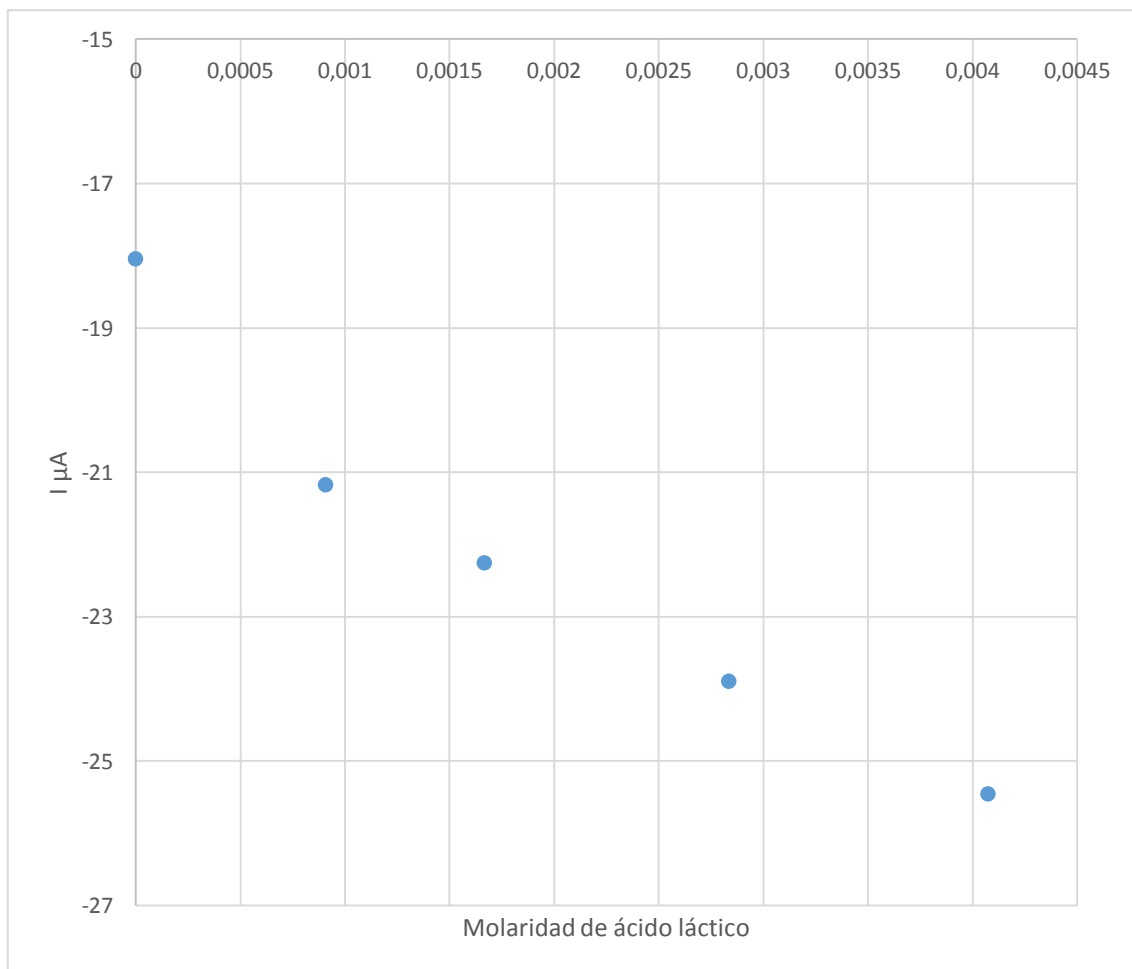


Figura 6. Respuesta del biosensor (corriente de pico anódico de voltamperogramas cíclicos) a diferentes concentraciones de ácido láctico.

El experimento que llevamos a cabo en el cual dejamos el electrodo modificado con la enzima dentro de un vial cubierto durante 5 semanas a temperatura ambiente, no observamos efecto catalítico, solo los picos del alcohol ferrocenilmetílico, lo que nos indica que la enzima se desnaturalizó durante este tiempo y a estas condiciones.

El experimento que llevamos a cabo en el que cubrimos el electrodo con la mono capa de ácido 3-mercaptopropiónico y posteriormente con la enzima utilizando una solución con un pH más cercano a su punto isoeléctrico, nosotros esperábamos que debido a que se presentan interacciones interproteicas fuertes, en su mayoría hidrofóbicas, y la capa inmovilizada de enzima es más estable que las moléculas de enzima en solución y debido a que el pK_a de la mono capa de ácido 3-mercaptopropiónico se encuentra ente los valores de 6.5 a 8.4[12], por lo que la mono capa no se encontrará muy ionizada y existirán interacciones hidrofóbicas entre la mono capa y la enzima y la superficie del electrodo modificada con la mono capa se cubriría casi completamente con un empaquetamiento compacto. Sin embargo, la enzima no mostró actividad catalítica posiblemente debido a que esos valores más bajos de pH cercanos a su punto isoeléctrico, la enzima se desnaturaliza.

6 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el biosensor electroquímico planteado, está funcionando utilizando la adsorción no específica de la enzima en el electrodo de oro pero, después de cinco semanas, la enzima está desactivada por lo que es deseable hacer estudios de durabilidad del biosensor uniendo la enzima covalentemente mediante mono capas autoensambladas de diferente estructura, trabajo que estamos a punto de iniciar.

También se puede concluir que aun cuando la superficie del electrodo modificado con una mono capa autoensamblada con un grupo carboxilo terminal se cubra completamente con la enzima lactato oxidasa a un valor de pH cercano a su punto isoeléctrico, esta se desnaturaliza a dicho valor de pH y no cataliza la reacción de oxidación de lactato a piruvato por lo que es recomendable trabajar a un valor de pH cercano a 7.

CAPITULO VI

7 LITERATURA CITADA

Alegret, S., Del Valle, M., & Merkoci, A. (2004). *Sensores Electroquimicos*. Bellaterra, Barcelona, España, Pag. 171: Cataluña. Ed. Junio 2004.

Calvo Peerez, A. (2014). Desarrollo Y Aplicacion De Sensores Y Biosensores Electroquimicos Para La Determinacion De Contaminantes Medio Ambientales Y Agroalimentarios. Tesis Doctoral. UB. Burgos. *Departamento De Quimica. Universidad De Burgos.* , Pag. 233.

Cano Luna, M. (2008). *Diseño Y Aplicacion De Sensores Electroquimicos Basados En Moleculas Organicos Conductoras*. Publicaciones De Universidad De Cordova. Tesis Doctoral. UC. Rabanales, Cordoba. Departamento De Quimica, Fisica Y Termodinamica Aplicada. Universidad Cordova Campus Rabanales. Pag. 200.

Ceron, M. L., & Soto Bubern, A. (2004). *Elementos De Electromecanica*. Pag. 43.

Corton, E. (2000). Desarrollo Y Aplicaciones De Biosensores Enzimaticos Y Microbianos. Tesis Doctoral. UBA. Buenos Aires. Argentina. *Facultad De Ciencias Exactas Y Naturales, Universidad De Buenos Aires.* , Pag. 150.

Gonzales Rumayor, V., Garcia Iglesias, E., Ruiz Galon, O., & Gago Cabezas, L. (2005). *Aplicaciones De Biosensores En La Industria Agroalimentaria. Informe De Vigilancia Tecnologica (Vt).* . Madrid. Pag. 113: Elece Industria Grafica. .

Gonzalo Ruiz, J. (2006). Desarrollo Biosensores Enzimaticos Miniaturizados Para Su Aplicacion En La Industria Alimentaria. Tesis Doctoral. UAB. Barcelona. *Facultad De Ciencias Depto. De Quimica Universidad Autonoma De Barcelona.* , Pag. 244.

Jimenez C., C., & Leon P., D. E. (Año 2009). Biosensores: Aplicaciones Y Perspectivas En El Control Y Calidad De Procesos Y Productos Alimenticios. *Revista De La Facultad De Quimica Farmaceutica. Vol. 16 #1, Universidad De Antioquia, Medellin, Colombia.* , Pag. 154.

Peña Garcia, N. (2003). Biosensores Amperometricos Compositos Basados En Peroxidasa. Aplicacion A La Determinacion De Analitos De Interes En Alimentos Mediante Electrodos Bienzimaticos Y Multienzimaticos. Tesis Doctoral. UCM. Madrid. *Facultad De Ciencias Quimicas Departamento Quimica Analitica. Universidad Comutense De Madrid.* , Pag. 398.

Peña Garza, N. (2003). Biosensores Amperometricos Compositos Basados En Peroxidasa , Aplicacion A La Determinacion De Analitos De Interes En Alimentos Mediante Electrodo Bienzimaticos Y Multienzimaticos: Tesis De Doctorado. *Universidad Comutense De Madrid (UCM). Madrid:* , Pag. 398. Facultad De C. C. Quimicas(UCM).

Pividori, M. I. (2008). Quimica Bioanalitica Curso.UNL. Santa Fe, Argentina. Ciudad Univercitaria. *Facultad De Bioquimica Y Ciencias Biologicas. Universidad Nacional Del Litoral* , Pag. 14.

Reviejo, A. J., & Pingarron, J. M. (2000). Biosensores Electroquimicos. Una Herramienta Util Para El Analisis Medio Ambiental Alimentario Y Clinico. Invest Quimicos. *Departamento De Quimicos Analitico. Facultad De Quimicas. Universidad Comutense De Madrid. 28040-Madrid, España* , Pag. 11.

Vilaso Cadre, J. E. (2014). Propuesta De Instrumentacion Voltamperometrica De Bajo Costo Para Uso De Docente En La Carrera De Quimica. *Natura* , Vol.1. No.1: Pag. 141.

Suriderp, C. (1995). Enciclopedia de Ullman de la química industrial: Ácido láctico. 5 edición. De Barbara Elvers. Pp97-104

- Pares**, R y Juárez, A. (1997). Bioquímica de los microorganismos. Reverté S. A., Barcelona, España.
- Belitz** y Grosch. (1992). "Química de los Alimentos". 2ª Edición. Editorial. *Arriba*.
- Bridge** K.A., Hinson S.P.J. (2001). Poliacrilonitrilo en Membranas compuestas de película fina para la optimización de un sensor de glucosa en sangre entera. *Electroanálisis* vol.13, No 3, pgs:191 - 198.
- Chaubey** A. y Malhotra B. (2002). Revisión de mediadas biosensores. *Los biosensores y bioelectrónica*: 17, 441 a 456.
- Dornelles**, M. L. y K.L. Tatsuo. (2003). Revisión del uso de biosensores como herramientas de análisis en las industrias de alimentos y bebidas. *Food Chemistry*, 77, 237 a 256.
- Ferreira**, S., M. B. De Souza, J.O. Trierweiler, R.O.M. Locura y B. Hitzmann. (2003). Aspectos relacionados con el uso de biosensores para el control del proceso: las investigaciones experimentales y de simulación. *Informática e Ingeniería Química*, 27, 1165-1173
- Gómez**, MR y SS Alegret. (1997). Los Sensores Químicos: una Aportación a la instrumentación analítica. *Educación Química*, 8 (4), 191-196.
- González**, R. V., es decir, García, G.O. Ruiz y C.L. Gago. (2005). Aplicaciones de los biosensores en la Industria Alimentaria. 24.5. ECECE Industria Gráfica. Madrid, España.
- Jiménez** Claudio y León Daniel E. (2009). Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y Productos Alimenticios. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA* ISSN 0121-4004 Volumen 16 número 1, año 2009. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 144-154

- Leonard P.**, S. caluroso, J. Brennan, L. Dunne, J. Quinn, T. Chakraborty y R. Kennedy. (2003). Avances en biosensores para la detección de patógenos en los alimentos y el agua. *Enzyme y Microbial Technology*, 32, pg.13.
- Nakamura H.** y I. Karube. (2003). La actividad de investigación actual en biosensores. *Analíticos & Bioanalytical Chemistry*, 377. Pg.446 a 468.
- Newman, J. D.**, y A.P.F. Turner. (2005). Biosensores de glucosa en sangre: una perspectiva comercial. *Los biosensores y bioelectrónica*. Pg: 2453.
- Patel P.D.** (2002). Biosensores para la medición de analitos implicados en la seguridad alimentaria: una revisión. *Tendencias en Química Analítica*, 21 (2). Pg.96-115.
- Rekha K.**, S. Thakur y N.G. Karanth. (2000). Biosensores para la detección de pesticidas organofosforados. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20 (3). Pg. 213-235.
- Riebe, M.T.** y JD Eustace. (2000). Química analítica de proceso: una perspectiva industrial. *Anal. Chem.*, 62 (2), 65-71 (1990).
- Shan D.**, M. Zhua, H. Xuea y Cosnier. (2000). La elaboración del biosensor amperométrico de glucosa basado en una novela atractiva matriz de inmovilización de enzimas: las nanopartículas de carbonato de calcio. *Los biosensores y bioelectrónica*, 22, 1.612-1.617.
- Sharma, SK, N. Sehgal** y A. Kumar. (2003). Biomoléculas para el desarrollo de biosensores y sus aplicaciones. *Física Aplicada actual*, 3. Pg: 316 .
- Thevenot, K Toht, R. A. Durst,** y G. S. Wilson. (2001). Biosensor electroquímico. Definiciones y clasificacion. *Biosensores y bioelectronica*.pg. 121-131.

- Zhou M.**, L. Shang, B. Li, L. Huang y S. Dong. (2000). Carbonos mesoporosos como material de electrodo para la construcción de deshidrogenasa-electroquímica y biosensores basados en la oxidasa. *Los biosensores y bioelectrónica* 24, 442 - 447.
- Cadre**, J. E. (2014). Propuesta de instrumentación voltamperométrica de bajo costo para uso docente en la carrera de química. *NATURA VOL.1, NO.1*, 14.
- Serna Cock L.**, Rodríguez de Stouvenel A. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico. Estado del arte. UV. Gali, Colombia. Departamento de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle. Pg. 13.
- Theavenot Daniel R.**, Klara Toth, Richard A., Dursty George S., Wilson. (1999). Biosensores Electroquímicos: Recomendados, definiciones y clasificación. *Repote técnico*. Vol. 71, No. 12. Gran Bretaña. Pgs: 2333.
- Cortes M. T.**, Otero T.F., Mendez M.A., Suarez M. F., Diaz M., Vera E. (2006). Desarrollo de Sensores Electroquímicos. *Revista Colombiana de Física*. Vol. 38, No.4. pg. 1358.
- Wang Joseph.** (2008). Biosensor Electroquímico de Glucosa. Sociedad Americana de Química. Universidad Estatal de Arizona.
- Wang J.**, (2004). Biosensore Electroquímico a base de Nanotubos de Carbono: una revisión. Vol. 17, No. 1. Pg.14.
- Ortega Ortiz F.**, (2006). Biosensores y biochips: herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. Discurso. Madrid, España. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Pg.148.
- Jose L. Montañez**, Ramos Emma G., Alegret Salvador, Delgado Raul J. (2011). Biosensor de Glucosa basado en un Biocomposito disperso de grafito,

epox-platino-glucosa oxidasa. Información Tecnológica. Vol.22, No.1,2011.Pg.29.

Skoong Douglas A., West Donald M., Holler James F., Crouch Stanley R. (2001). Química Analítica. Ed. Reverte.7^a edición. México D.F., Mc GRAW-HILL.Pg. 521.

Skoong Douglas A., West Donald M., Holler James F., (2001). Fundamentos de química analítica. Ed. Reverte. 4^a ed., Buenos Aires, Bogotá, Barcelona.Pg.4006-421.

CAPITULO VII

8 ANEXOS

Imágenes de los electodos de trabajo en la enzima



Imágenes de los electrodos de trabajo en ácido nítrico

