



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**“DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE
TRIGLICÉRIDOS BASADO EN UN TRANSDUCTOR
POTENCIOMÉTRICO DE ACERO INOXIDABLE”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN QUÍMICA

P R E S E N T A:

ZITA GUADALUPE CRUZ ABURTO

DIRECTOR:

Dr. CARLOS ANDRÉS GALÁN VIDAL

MINERAL DE LA REFORMA, HGO.

DICIEMBRE 2018



Mineral de la Reforma, Hgo., a 3 de diciembre de 2018

Número de control: ICBI-D/1155/2018
Asunto: Autorización de impresión.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de Licenciatura en Química **Zita Guadalupe Cruz Aburto**, quien presenta el trabajo de titulación **“Desarrollo de un biosensor de triglicéridos basado en un transductor potenciométrico de acero inoxidable”** después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

- PRESIDENTE: Dra. María Elena Páez Hernández
- PRIMER VOCAL: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
- SEGUNDO VOCAL: Dr. Gian Arturo Álvarez Romero
- TERCER VOCAL: Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
- SECRETARIO: Dr. Luis Humberto Mendoza Huizar
- PRIMER SUPLENTE: Dra. Irma Pérez Silva
- SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Maria Luísa Soares da Silva

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”

Dr. Oscar Rodolfo Suárez Castillo
 Director del ICBI



ORSC/SEPC



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
 Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
 México, C.P. 42184
 Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2231
 Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



El presente trabajo de tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Carlos Andrés Galán Vidal, en el Laboratorio 1 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Agradecemos el financiamiento de la UAEH y del CONACyT a través del proyecto Desarrollo de una lengua electrónica para la cuantificación simultánea de glucosa, colesterol y triglicéridos CB-2014-242677

Agradecimientos

Agradezco a mi asesor el [Dr. Carlos Andrés Galán Vidal](#) por darme la oportunidad de trabajar en su línea de investigación y por brindarme la confianza para realizar este proyecto, agradezco todas las enseñanzas, aportes realizados, su constante apoyo y paciente seguimiento; así como las críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

Agradezco al [Dr. José Antônio Rodríguez Ávila](#) por su apoyo, guía y ayuda en la elaboración de este trabajo, por las explicaciones y los conocimientos compartidos, así como las sugerencias, aportaciones y consejos.

Agradezco a cada uno de mis sinodales: [Dra. Ma. Elena Páez Hernández](#), [Dr. Gian Arturo Álvarez Romero](#), [Dr. Luis Humberto Mendoza Huizar](#), [Dra. Irma Pérez Silva](#) y [Dra. María Luisa Soares da Silva](#) por todo el apoyo recibido de su parte, por los comentarios, observaciones y sugerencias en la escritura de la tesis.

Índice general

Índice general	i
Lista de abreviaturas	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	ix
Resumen	1
1. Antecedentes	2
1.1. Triglicéridos	3
1.2. Importancia biomédica de los triglicéridos	5
1.2.1. Fuente de triglicéridos en el organismo	5
1.2.2. Función que desempeñan los triglicéridos	6
1.2.3. Valores normales y enfermedades asociadas a los niveles de triglicéridos	7
1.3. Triglicéridos en alimentos y su extracción	8
1.3.1. Métodos de extracción de triglicéridos	8
1.3.2. Extracción de triglicéridos con solventes	9
1.3.3. Extracción de triglicéridos con fluidos supercríticos	9
1.3.4. Método Soxhlet para extraer triglicéridos	9
1.3.5. Extracción de triglicéridos mediante emulsificantes	10
1.4. Determinación de los triglicéridos	10

1.4.1. Métodos basados en la cuantificación espectroscópica de glicerol o formaldehído	11
1.4.2. Métodos basados en la cuantificación espectroscópica con el uso de enzimas	13
1.5. Biosensores electroquímicos de triglicéridos	17
1.5.1. Biosensor amperométrico de triglicéridos	18
1.5.2. Biosensor potenciométrico de triglicéridos	21
1.5.3. Electrodo de pH basados en una película de óxido sobre acero inoxidable (POSAI)	23
1.5.4. Funcionamiento de los transductores POSAI	24
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo general	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. Metodología experimental	28
3.1. Reactivos	29
3.2. Soluciones	29
3.3. Material	30
3.4. Equipo	30
3.5. Metodología	30
3.5.1. Electropulido de barras de acero inoxidable	31
3.5.2. Oxidación de barras de acero inoxidable	32
3.5.3. Evaluación de la respuesta del transductor	33
3.5.4. Evaluación de la dinámica de respuesta del transductor POSAI	33
3.5.5. Construcción y evaluación del biosensor	34
3.5.6. Optimización del biosensor	35
3.5.7. Parámetros analíticos del biosensor	35

3.5.8. Evaluación del efecto de la membrana de Nafion sin enzima sobre la respuesta del biosensor	36
3.5.9. Análisis de triglicéridos en muestras comerciales	36
3.5.9.1. Extracción de triglicéridos	36
3.5.9.2. Análisis de triglicéridos con el biosensor	36
3.5.9.3. Análisis de triglicéridos mediante espectrofotometría UV/Vis	37
4. Resultados y discusiones	38
4.1. Evaluación de la respuesta del transductor POSAI	39
4.2. Evaluación de la sensibilidad del transductor de acero	41
4.3. Optimización y evaluación del biosensor de triglicéridos	44
4.4. Validación del método	51
5. Conclusiones	55
6. Referencias	58

Lista de abreviaturas

4-AF	4-Aminofenazona
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ATP	Adenocin trifosfato
CHIT	Quitosano
E	Potencial
E^0	Potencial estándar
EISCAP's	Condensador de semiconductor aislante de electrolito
G3P	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
GCE	Electrodo de carbón vítreo
GDH	Glicerol deshidrogenasa
GDH	Glicerol deshidrogenasa
GK	Glicerol quinasa
GKNPs	Nanopartículas de Glicerol Quinasa
GPO	Glicerol-3-fostado oxidasa
GPONPs	Nanopartículas de Glicerol-3-fosfato oxidasa
IRL	Intervalo de respuesta lineal
IrNPS	Nanopartículas de iridio
ISFET's	Transistor de efecto de campo sensible a iones
LD	Límite de detección
LIP	Lipasa
LIPNPs	Nanopartículas de lipasa
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPL	Lipoproteína lipasa
NAD^+	Dinucleótido de nicotinamida (en su forma oxidada)

NADH	Dinucleótido de nicotinamida (en su forma reducida)
NiONPs	Nanopartícula de óxido de níquel;
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos pH=7.0 preparada con $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en KCl $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.
POSAI	Acero inoxidable con película de óxido sensible al pH
QM	Quilomicrones
r. p. m.	Revoluciones por minuto
r^2	Coefficiente de correlación
SA	Sensibilidad analítica
TB	Tributirina
TCNQ	Tetracianoquinodimetano
TG	Triglicéridos
TTF	Tetratiafulvaleno
UI	Unidades internacionales
ZnHFC	Hexacianoferrato de zinc

Índice de figuras

Figura

1	Estructura molecular de un triglicérido	3
2	Origen de triglicéridos en el organismo	6
3	Reacciones incluidas en el método colorimétrico para la determinación de triglicéridos con ácido cromotrópico	12
4	Reacciones incluidas en el método de Kessler y Lederer para la determinación de triglicéridos	13
5	Reacción para determinar glicerol mediante el método de Wieland	13
6	Reacciones asociadas a la cuantificación de triglicéridos por el método de Eggstein y Kreutz	14
7	Reacciones asociadas a la cuantificación de triglicéridos por el método de Klotzsch	15
8	Determinación de triglicéridos mediante el kit enzimático espectrofotométrico de Spinreact	16
9	Principio básico de operación de un biosensor electroquímico	17
10	Reacciones involucradas en el método de operación de un biosensor amperométrico convencional para determinar TG mediante las enzimas LIP, GK y GPO	18
11	Reacción de un biosensor amperométrico para determinar TG mediante la enzima LIP y GDH	20
12	Reacción generada en un biosensor potenciométrico para determinar triglicéridos	22
13	Esquema del proceso de electropulido	31

14	Proceso de electropulido, oxidación y cubierta de resina del electrodo de acero inoxidable con película de óxido sensible al pH (POSAI)	32
15	Esquema del equipo utilizado para determinar la respuesta del electrodo	33
16	Electrodo con la membrana enzimática	34
17	Registro del potencial vs pH de la barra de acero inoxidable contra un electrodo combinado de vidrio	39
18	Registro cronopotenciométrico de un transductor de acero, PBS pH=7.0 con adiciones sucesivas cada 3 minutos de HCl 0.1 mol·L ⁻¹ en el intervalo de pH de trabajo	41
19	Línea de calibrado potencial contra pH de un transductor POSAI obtenida a partir del registro cronopotenciométrico de la figura 18	42
20	Registro cronopotenciométrico de un transductor de acero, PBS pH=7.0 con 6 UI de lipasa con adiciones sucesivas cada 3 minutos de 40 μL de TB 0.1 mol·L ⁻¹ en el intervalo de pH de trabajo	43
21	(a). Dependencia del potencial respecto al pTB; (b). Dependencia del potencial respecto a la concentración de tributirina	44
22	Registro cronopotenciométrico de un biosensor potenciométrico de triglicéridos y un electrodo POSAI. 25 mL de PBS pH=7.0 con adiciones sucesivas de 80 μL de TB 0.1 mol·L ⁻¹ . Membrana enzimática formulada con 10.5 UI lipasa + 1.1% v/v Nafion en 140 μL PBS pH=7.0.	45
23	Registro cronopotenciométrico de un biosensor potenciométrico de triglicéridos y un electrodo POSAI. 25 mL de PBS pH=7.0 con adiciones sucesivas de 80 μL de TB 0.1 mol·L ⁻¹ . Membrana enzimática formulada con 10.5 UI lipasa + 1.1% v/v Nafion en 140 μL PBS pH=7.0.	46

24	Superficie de respuesta de la relación entre la cantidad de lipasa, Nafion y sensibilidad	48
25	(a) Registro cronopotenciométrico del biosensor optimizado, haciendo adiciones sucesivas de 80 μL de la emulsión de TB 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cada 6 minutos sobre 25 mL de PBS pH=7.0. (b) Acercamiento del registro en las primeras adiciones	49
26	(a) Curva de calibración del registro cronopotenciométrico haciendo adiciones sucesivas de 80 μL de la emulsión de TB 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cada 6 minutos. (b) Acercamiento de la curva de calibración en las primeras adiciones	49

Índice de tablas

Tabla

1	Estructura de los mono-, di- y triglicéridos	4
2	Biosensores amperométricos para determinar triglicéridos	21
3	Biosensores potenciométricos para determinar triglicéridos	23
4	Preparación de sistemas para la determinación espectrofotométrica de triglicéridos.	37
5	Parámetros analíticos del electrodo de trabajo referentes a un electrodo de pH	40
6	Matriz del diseño central composite utilizado para la optimización del biosensor potenciométrico de TG (2 factores: UI de lipasa y % v/v de Nafion)	47
7	Parámetros analíticos de un biosensor potenciométrico para determinar triglicéridos	50
8	Contenido de TG en los extractos por emulsión con goma Arábica de muestras comerciales determinado por potenciometría con el biosensor	51
9	Contenido de TG en los extractos por emulsión con goma Arábica de muestras comerciales determinado por espectrofotometría UV/Vis	52
10	Datos y resultados del contraste t para datos emparejados	53

Resumen

Los altos niveles de triglicéridos en el organismo se han relacionado con diversos problemas metabólicos y de salud; en muchos de los casos, son asociados a dietas con alto contenido de estos lípidos. En este sentido, es fundamental contar con metodologías de cuantificación, a fin de conocer y ayudar a controlar sus niveles en sangre y alimentos.

Debido a su importancia, existen numerosos métodos analíticos para determinar triglicéridos; sin embargo, la mayoría son complicados, requieren prolongados tiempos de análisis, extenso pretratamiento de la muestra, instrumentación de alto costo y personal capacitado para operar. Como una alternativa analítica viable para superar algunos de los inconvenientes de las metodologías convencionales de análisis, los biosensores electroquímicos han demostrado ser dispositivos analíticos sencillos, económicos y confiables para cuantificar triglicéridos.

En el presente trabajo se desarrolló un biosensor potenciométrico para determinar triglicéridos, empleando una membrana enzimática basada en la enzima lipasa y Nafion, colocada sobre un transductor de película de óxido sobre acero inoxidable. El dispositivo analítico se utilizó para cuantificar triglicéridos en muestras alimenticias (frituras), demostrando ser una alternativa prometedora, simple y más económica que otros biosensores reportados.

“DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE TRIGLICÉRIDOS BASADO EN
UN TRANSDUCTOR POTENCIOMÉTRICO DE ACERO INOXIDABLE”

ANTECEDENTES

1. Antecedentes

1.1. Triglicéridos

Los triglicéridos, también llamados triacilglicéridos o trigliceroles, forman parte de los lípidos más simples y son una fuente importante de almacenamiento de energía para plantas y animales (Litchfield, 1972); (Fornaguera y Gómez , 2004) (Figura 1).

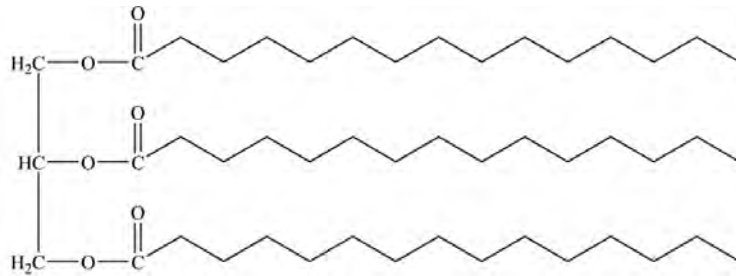


Figura 1. Estructura molecular de un triglicérido.

Los triglicéridos se pueden obtener a través de la reacción de esterificación entre los grupos hidroxilo (-OH) del glicerol y un ácido graso. La molécula de glicerol contiene tres grupos hidroxilo; si solo uno de ellos se combina a una molécula de ácido graso se obtiene un monoglicérido, si está unido a dos ácidos grasos se tiene un diglicérido, y cuando se combina con tres moléculas de ácidos grasos (iguales, diferentes, saturados o insaturados) genera un éster (triglicérido) como producto (Rosli, et al. 2016); (Peña, et al. 2004) (Tabla 1).

Los ácidos grasos comúnmente se encuentran en la naturaleza formando ésteres con el glicerol, siendo los más abundantes los de 16 y 18 átomos de carbono como el palmítico y esteárico que dan lugar a grasas sólidas a temperatura ambiente.

Tabla 1. Estructura de los mono-, di- y triglicéridos.

	Estructura	Masa molecular (g·mol ⁻¹)
Glicerol	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{HC} - \text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{OH} \end{array} $	92.09
Ácido palmítico	$ \text{HO} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3 $	256.42
Monoglicérido con ácido palmítico	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{HC} - \text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{OH} \end{array} $	330.50
Diglicérido con ácido palmítico	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{HC} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{OH} \end{array} $	568.91
Triglicérido con ácido palmítico	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{HC} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3 \end{array} $	807.32

En contraparte, los aceites se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente; en este caso los triglicéridos contienen ácidos grasos con dobles enlaces y son llamados insaturados. Un ejemplo de ácido graso insaturado de 18 átomos de carbono es el oleico (con una insaturación) y el linoleico (con dos insaturaciones) (Lajusticia, 2007).

1.2. Importancia biomédica de los triglicéridos

1.2.1. Fuente de triglicéridos en el organismo

Se puede distinguir entre triglicéridos exógenos y endógenos. Los primeros se incorporan a través del intestino a partir de los alimentos ingeridos, para posteriormente ser resintetizados para su utilización. Los triglicéridos endógenos se forman principalmente en el hígado a partir del acetil-CoA. (Díaz, et al. 1997) (Figura 2).

En el transporte exógeno, los lípidos provenientes del intestino se acoplan a los quilomicrones (QM) a través de las apolipoproteínas. Una vez en circulación, los triglicéridos se hidrolizan por acción de la lipoproteína lipasa (LPL), liberando los ácidos grasos para ser utilizados por los músculos o ser almacenados en el tejido adiposo. A medida que circulan los QM pierden TG y se hacen más pequeños y densos para finalmente ser retirados de la circulación por el hígado.

La vía endógena, es un sistema mediado por otra apolipoproteína. Esta vía se inicia en el hígado donde primero se ensamblan y luego se secretan las lipoproteínas de muy baja densidad, las cuales pasan a la circulación y se hidrolizan por la LPL transportando los TG hacia los tejidos periféricos (músculo y tejido adiposo) (Longo, et al. 2012).

1. Reserva de calor: La mayoría de la energía derivada de la combustión de los triacilgliceroles se destina a la producción calórica necesaria para el organismo, incluso para los largos periodos de hibernación de algunos animales.
2. Reserva de agua: Las reservas de grasa poseen un grado de reducción mayor que los carbohidratos, la combustión aeróbica de los lípidos produce una gran cantidad de agua. Así, la combustión de un mol de ácido palmítico puede llegar a producir hasta 146 moles de agua.
3. Reserva de energía: El tejido adiposo constituye el depósito de grasa del organismo (triglicéridos); constituyendo la principal forma de almacenamiento y fuente de energía por dos razones:
 - i. Al ser hidrofóbicos, se encuentran en forma deshidratada y se pueden almacenar más moléculas por unidad de peso.
 - ii. Son moléculas altamente hidrogenadas que al oxidarse proporcionan más del doble de energía por gramo respecto a las proteínas o carbohidratos.
4. Transporte: Al formar parte estructural de los quilomicrones, permiten que los ácidos grasos ingeridos sean llevados por los sistemas circulatorios linfático y sanguíneo para ser distribuidos dentro del cuerpo (Fornaguera y Gómez , 2004); (Battaner, 2012).

1.2.3. Valores normales y enfermedades asociadas a los niveles de triglicéridos

La cuantificación de triglicéridos en plasma sanguíneo es fundamental, ya que es un importante valor que contribuye en el diagnóstico para las enfermedades coronarias (Zhang, et al. 2014). Los niveles ideales de triglicéridos se ubican en un nivel menor de $150 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$; valores entre 150 y $199 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ son considerados como hipertrigliceridemia, es decir, un exceso de triglicéridos por encima de los límites saludables. Un valor de 200 - $499 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ se considera como alto y superior a $500 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ se puede asociar a una gran variedad de enfermedades como: Alzheimer, pancreatitis, diabetes, enfermedades

hepáticas, cardiovasculares y del riñón, consecuencia del metabolismo anormal de las lipoproteínas (Pundir y Narwal, 2018).

Los altos niveles de triglicéridos en el organismo, además de relacionarse con problemas de metabolismo, comúnmente se asocian a dietas con alto contenido de grasas; en este sentido es importante cuantificar triglicéridos en alimentos y no sólo en fluidos biológicos.

1.3. Triglicéridos en alimentos y su extracción

Un alimento es cualquier sustancia que en su composición contiene proteínas, vitaminas, carbohidratos, grasas y minerales que un ser vivo ingiere para nutrirse. Respecto a la alimentación, cada vez se reconoce más el papel que tiene la dieta sobre el organismo tanto en salud como en la enfermedad; por ejemplo, para mantener los niveles de triglicéridos en sangre en cifras adecuadas es recomendable seguir una alimentación funcional en la cual el alimento ingerido ejerza un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas (Rodríguez-Murgía, et al. 2007).

Entre los alimentos con mayor contenido de triglicéridos destacan los sesos, huevo de gallina, hígado, mayonesa, paté, mantequilla y calamares. Es importante considerar que en la actualidad la mayoría de los alimentos indulgentes como frituras y pan dulce, también contienen altas concentraciones de TG. El alto consumo de estos alimentos debido a su fácil disposición, aunado a una vida sedentaria, normalmente favorece la aparición de problemas de salud.

1.3.1. Métodos de extracción de triglicéridos

Con la finalidad de poder cuantificar los triglicéridos en muestras tan complejas como los alimentos, es necesario extraer los lípidos de las muestras a evaluar ya que se encuentran asociados a otras moléculas mediante interacciones químicas; esto genera

que la separación se lleve a cabo mediante tratamientos químicos o físicos, con la finalidad de disminuir impurezas, concentrar la muestra y eliminar algunos componentes no necesarios para su posterior análisis (Akoh y Min, 1955). Entre los métodos más empleados se encuentran:

1.3.2. Extracción de triglicéridos con solventes

Los triglicéridos tienen la característica de ser hidrofóbicos, esta cualidad permite que el contenido de grasa en los alimentos (constituyente lipídico libre) se pueda extraer empleando solventes menos polares como éter de petróleo o éter dietílico; los constituyentes lipídicos unidos requieren solventes polares como los alcoholes, los lípidos neutros se pueden extraer con solventes no polares, los lípidos que se unen covalentemente no son extraídos completamente mediante disolventes orgánicos, por lo que es necesario llevar a cabo una hidrólisis para que sean completamente extraíbles. (Akoh y Min, 1955)

1.3.3. Extracción de triglicéridos con fluidos supercríticos

El uso de SC-CO₂ como fluido supercrítico empleado en la extracción de lípidos genera una gran cantidad de lípido no polares. Trabajar con esta metodología reduce el uso de solventes orgánicos y reduce el tiempo de extracción (Akoh y Min, 1955).

1.3.4. Método Soxhlet para extraer triglicéridos

Este método consiste en separar los triglicéridos de las muestras con solventes orgánicos (generalmente éter etílico) y la aplicación de temperatura; la ventaja de esta técnica es que se puede recuperar el solvente empleado y se puede cuantificar la cantidad de triglicéridos por diferencia de pesos del cartucho empleado para la extracción, la

desventaja que presenta el método es el tiempo de análisis ya que son necesarias varias horas de extracción (Akoh y Min, 1955).

1.3.5. Extracción de triglicéridos mediante emulsificantes

Los emulsificantes contiene partes polares y no polares separadas entre sí de manera equilibrada, pueden ser aplicados en la industria alimenticia para mantener una consistencia homogénea del alimento y brindarle estabilidad, otra aplicación es la formación de micelas de lípidos contenidos en muestras alimenticias permitiendo su extracción. Un ejemplo de emulsificante es el uso de goma arábica, la cual tiene una alta solubilidad en agua y una viscosidad en solución relativamente baja en comparación con otras gomas, lo que facilita su aplicación como emulsionante (Lauridsen, 1976).

1.4. Determinación de los triglicéridos

Conocer los niveles de triglicéridos (ya sea en sangre o en alimentos) es extremadamente importante, ya que es un parámetro que nos ayuda a monitorizar y prevenir la aparición de diversas enfermedades (principalmente las cardiovasculares) y saber acerca del valor nutricional de un alimento.

Se han desarrollado una gran variedad de métodos para cuantificar triglicéridos, entre los más empleados destacan los métodos químicos y particularmente los espectrofotométricos enzimáticos. Aunque existen reportes de otras alternativas como cromatografía; está no es utilizada con fines de cuantificación total de triglicéridos sino de caracterización y determinación de abundancia relativa de TG en muestras particulares (de la Fuente y Juárez, 1999); (Asmis, et al. 1997); (Okazaki, et al. 1998); (Björkhem, et al. 1976); (Dhull, et al. 2017).

Los primeros métodos desarrollados para cuantificar triglicéridos consistieron en la valoración por retroceso del exceso de hidróxido utilizado durante la saponificación de los extractos orgánicos obtenidos de las muestras (Klotzsch y McNamara, 1990). Más

tarde se desarrollaron métodos basados en la cuantificación del glicerol o formaldehído obtenidos después de un proceso de saponificación u oxidación del glicerol.

1.4.1. Métodos basados en la cuantificación espectroscópica de glicerol o formaldehído

En este método se extraen los lípidos con cloroformo, se eliminan los fosfolípidos por adsorción en ácido silícico y luego se saponifican los ésteres de los glicéridos para obtener glicerol. El glicerol se determina mediante su oxidación con peryodato, de tal manera que el formaldehído producido se hace reaccionar con el ácido cromotrópico en medio ácido para formar un cromóforo cuya absorbancia es proporcional a la concentración de triglicéridos (Klotzsch y McNamara, 1990) (Figura 3).

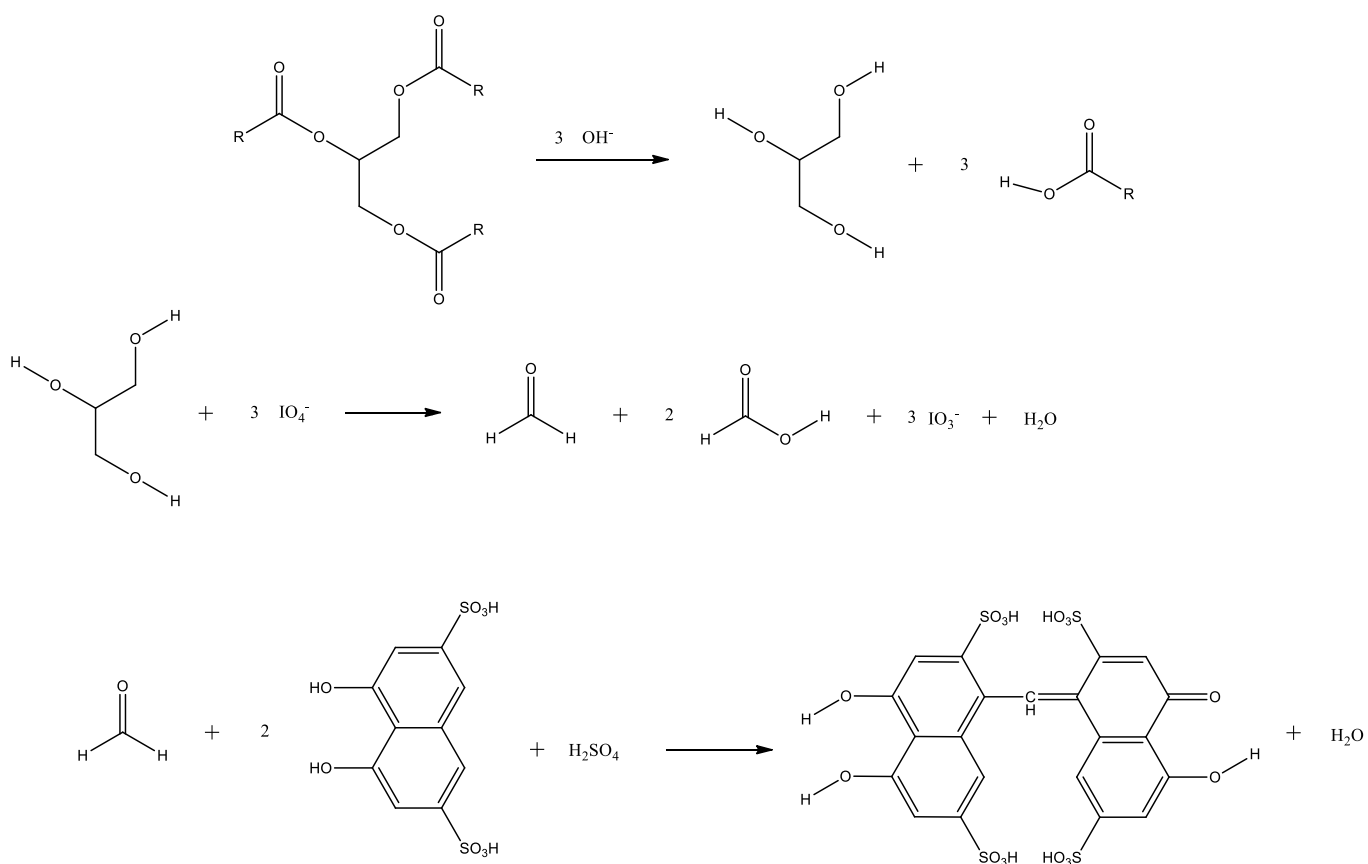


Figura 3. Reacciones incluidas en el método colorimétrico para la determinación de triglicéridos con ácido cromotrópico (Klotzsch y McNamara, 1990).

En otra estrategia basada en la cuantificación de glicerol, Kessler y Lederer desarrollaron un método en el cual el formaldehído producido en la etapa de oxidación con peryodato, se mide fluorométricamente después de una condensación de tipo Hantzsch con diacetilacetona y amoniaco (Klotzsch y McNamara, 1990) (Figura 4).

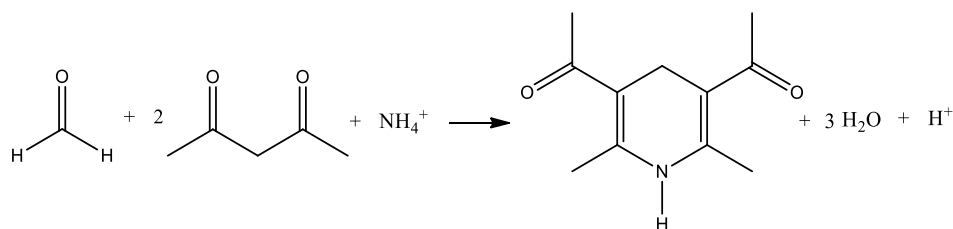


Figura 4. Reacciones incluidas en el método de Kessler y Lederer para la determinación de triglicéridos (Klotzsch y McNamara, 1990).

1.4.2. Métodos basados en la cuantificación espectroscópica con el uso de enzimas

El método de Wieland se basa en la medición del glicerol mediante un procedimiento espectrofotométrico-enzimático (Figura 5). En esta estrategia el glicerol es transformado en glicerol 3 fosfato (G3P) en presencia de ATP por acción de la glicerol quinasa. Posteriormente el G3P es convertido en dihidroxiacetona fosfato gracias a la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, en presencia de su coenzima NAD⁺; produciendo NADH, el cual se mide espectrofotométricamente, relacionándolo así con la concentración de triglicéridos.

Figura 6. Reacciones asociadas a la cuantificación de triglicéridos por el método de Eggstein y Kreutz (Klotzsch y McNamara, 1990).

Otra de las alternativas analíticas basadas en el principio de Wieland, es el método de Klotzsch, el cual incorpora una reacción asistida con la diaforasa para generar un compuesto colorido que se mide espectrofotométricamente (Klotzsch y McNamara, 1990) (Figura 7).

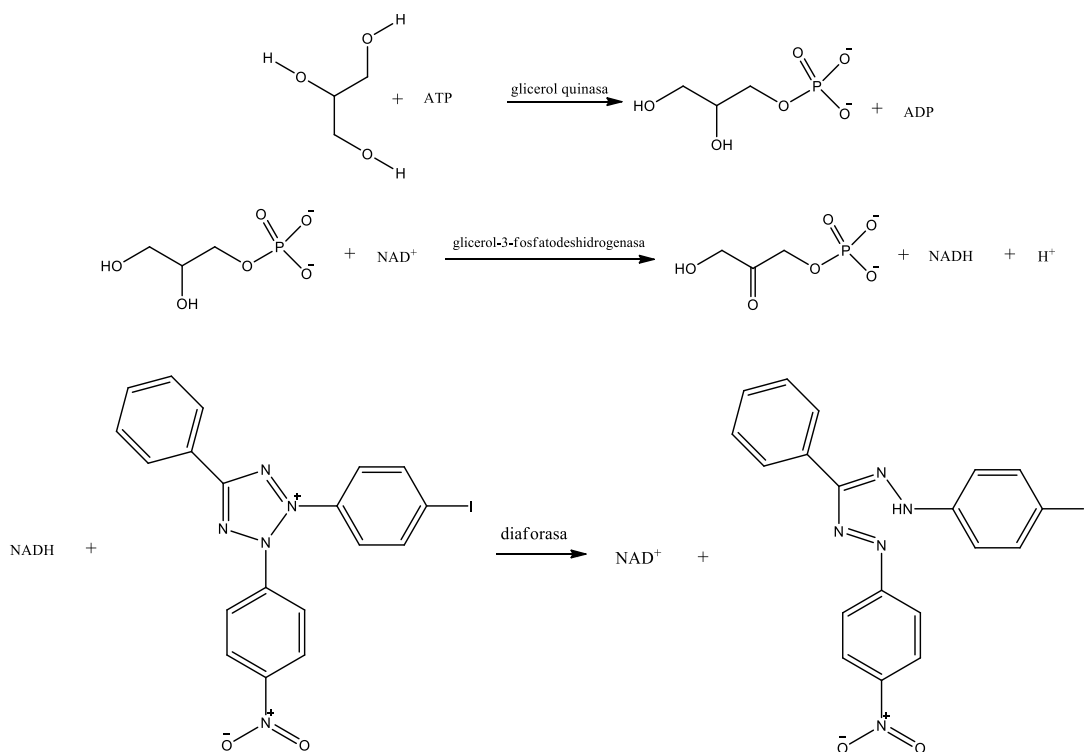


Figura 7. Reacciones asociadas a la cuantificación de triglicéridos por el método de Klotzsch (Klotzsch y McNamara, 1990).

Posteriormente continuaron las modificaciones del método de Wieland, mismas que desembocaron finalmente en el desarrollo del método que incorpora la glicerol fosfato oxidasa para producir peróxido de hidrógeno y acoplar su cuantificación con el método de Trinder, el cual lo hace reaccionar con 4-aminoantipirina, fenol y peroxidasa para producir una quinona cuya absorbancia es proporcional a la concentración de triglicéridos. Actualmente, esta metodología es referente para la cuantificación de TG en suero sanguíneo (Spinreact, S.A. , 2018) (Figura 8)

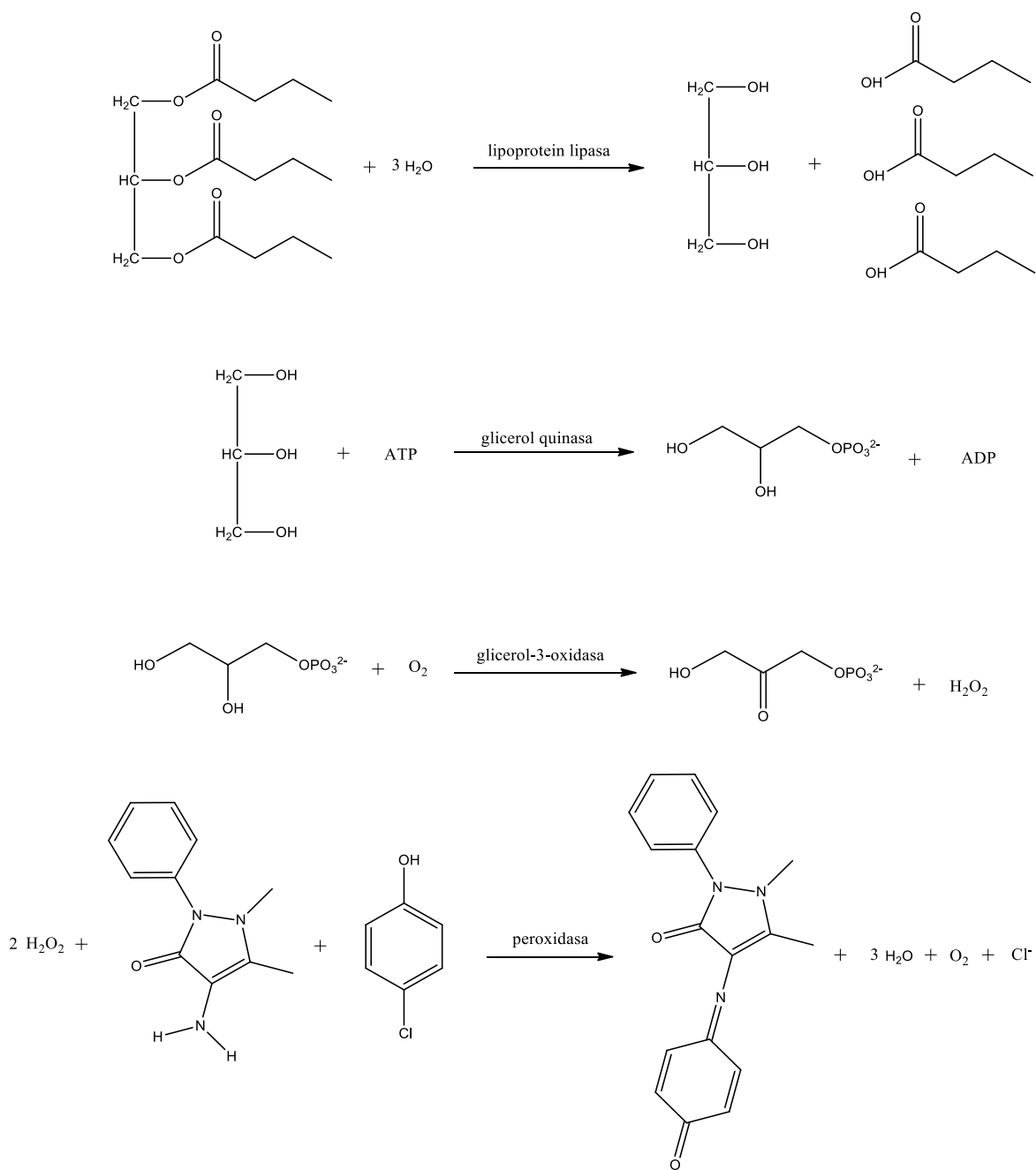


Figura 8. Determinación de triglicéridos mediante el kit enzimático espectrofotométrico de Spinreact (Spinreact, S.A. , 2018).

1.5. Biosensores electroquímicos de triglicéridos

Los métodos convencionales para cuantificar triglicéridos, presentan importantes desventajas como el costo de la instrumentación, prolongado tiempo de análisis, necesidad de extenso pretratamiento de muestras y personal capacitado para su implementación, entre otras. En este sentido, se requiere desarrollar alternativas analíticas que contribuya a superar algunas de estas limitaciones. Los biosensores electroquímicos que incorporan enzimas inmovilizadas como elemento de reconocimiento han demostrado ser comparativamente simples, rápidos, sensibles y no requerir de una preparación de muestra que consuma demasiado tiempo o de una instrumentación relativamente costosa, proporcionando un futuro prometedor para la detección fácil y temprana de triglicéridos en los ámbitos clínico y alimentario.

En términos generales, un biosensor electroquímico consiste en tres componentes, un elemento de reconocimiento de naturaleza biológica (enzima, célula, anticuerpos, receptores celulares y muchos más), un transductor y un procesador de señal (Pundir y Narang, 2013). Los biosensores electroquímicos se pueden clasificar de acuerdo con su principio de detección; entre ellos destacan los amperométricos, potenciométricos y conductimétricos (Figura 9).

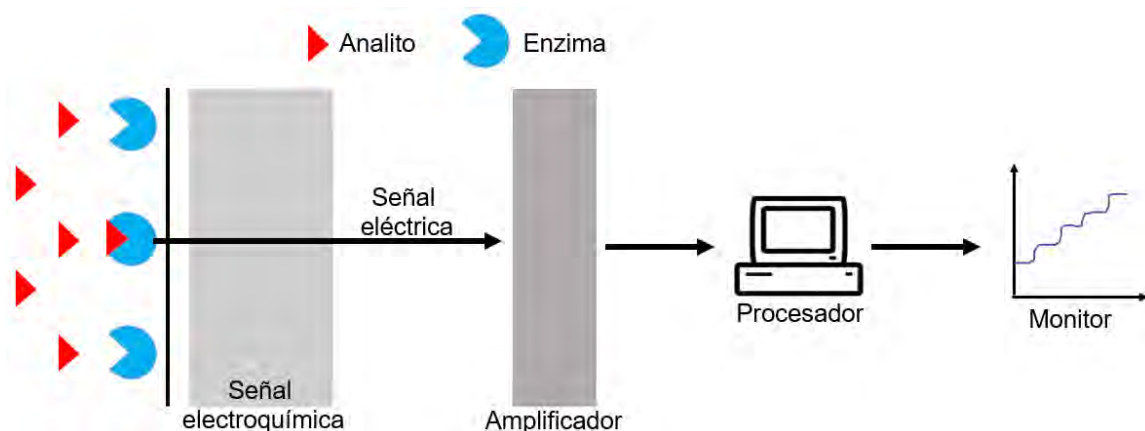


Figura 9. Principio básico de operación de un biosensor electroquímico.

1.5.1. Biosensor amperométrico de triglicéridos

El esquema de detección más común en los biosensores amperométricos de triglicéridos, se basa en la interacción de tres enzimas, lipasa, glicerol quinasa (GK) y glicerol-3-fosfato oxidasa (GPO). La cantidad de triglicéridos se puede determinar mediante la medición del consumo de oxígeno o la cantidad de H_2O_2 producido por las reacciones enzimáticas; el biosensor mide los cambios de corriente provocados por la oxidación del H_2O_2 al imponer un potencial (E) sobre un transductor electroquímico (electrodo de trabajo) (Figura 10).

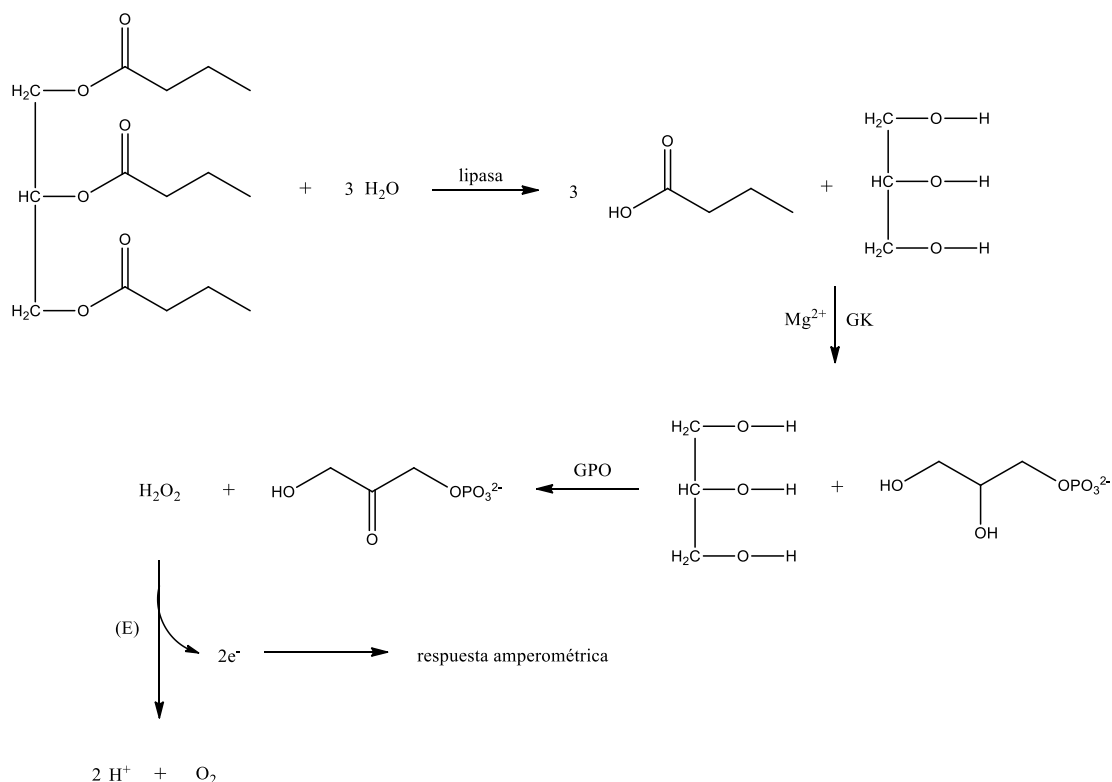


Figura 10. Reacciones involucradas en el modo de operación de un biosensor amperométrico convencional para determinar TG mediante las enzimas LIP, GK y GPO (Pundir y Narang, 2013).

Existen diversas variantes del esquema de detección presentado en la figura 10. Las más importantes implican la incorporación de mediadores químicos. En este caso la corriente de oxidación que se relaciona con la concentración de triglicéridos, es la provocada por la oxidación del mediador reducido y obtenido al regenerar el sitio activo de la GPO. Entre los mediadores más utilizados destacan: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, tetracianoquinodimetano (TCNQ) y el tetratiafulvaleno (TTF). Otros biosensores mejoran su selectividad y sensibilidad incorporando transductores de metales preciosos o modificados con nanomateriales.

Otra estrategia menos utilizada en el desarrollo de biosensores de triglicéridos utiliza la oxidación del glicerol por la enzima glicerol deshidrogenasa GDH con la participación de NAD^+ (nicotidamida dinucleótido) como aceptor de electrones, produciendo dihidroxiacetona y NADH al regenerarse el sitio activo de la GDH. El NADH producido enzimáticamente es oxidado sobre la superficie del transductor y la corriente es relacionada directamente con la concentración de TG (Figura 11) (Pundir y Narang, 2013).

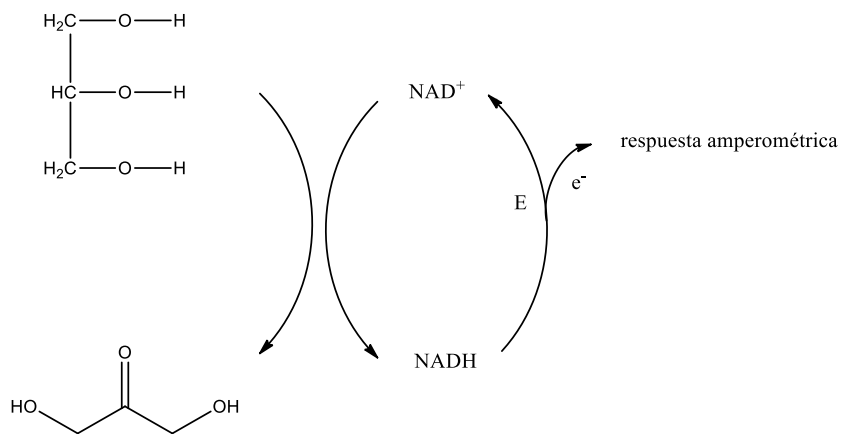
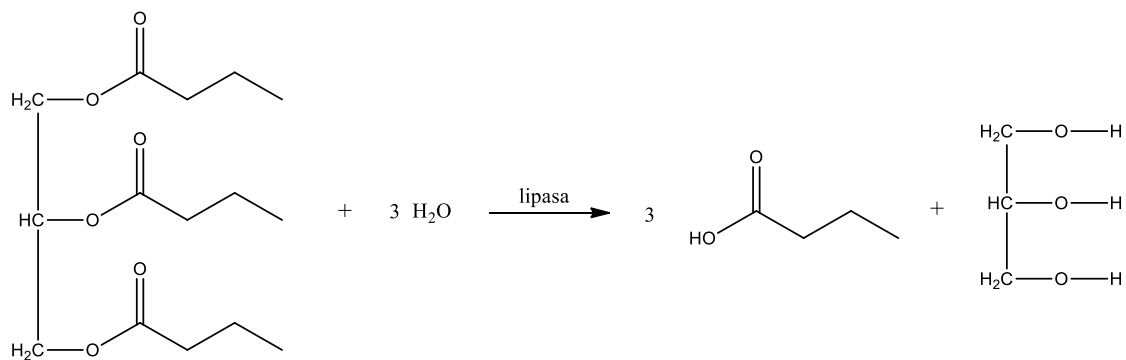


Figura 11. Reacción de un biosensor amperométrico para determinar TG mediante la enzima LIP y GDH (Pundir y Narang, 2013).

Algunos ejemplos de biosensores amperométricos de triglicéridos, se reportan en la tabla 2.

Tabla 2. Biosensores amperométricos para determinar triglicéridos

Transductor/membrana/ enzimas	LD (mM)	Sensibilidad (nA mM ⁻¹)	IRL (mM)	Referencias
Au/Cistamina/LIP-GK-GPO	0.17	NR	0.17-2.26	(Jeong, et al. 2014)
Au/Cáscara de huevo/LIP-GK-GPO	0.28	NR	0.56-2.25	(Narang, et al. 2010)
GCE/ Grenetina/ LIP-GK-GPO	0.14	NR	0.14-1.13	(Yücel, et al. 2014)
Au/NiONPs-CHIT-ZnO-ZnHFC/LIP-GK-GPO	0.11	4,427.2	0.56-7.91	(Narang, et al. 2013)
Pt/Acetato de celulosa/GK-GPO	0.20	NR	0.20-3.05	(Minakshi y Pundir, 2008)
Pt/PVA/LIP-GK-GPO-HRP	0.21	NR	0.56-2.25	(Pundir, et al. 2010)
CE/IrNPs/LIP-GK-GDH	0.10	7.5	0-10.0	(Wei, et al. 2008)
Au/Glutaraldehyde /LIPNPs-GKNPs-GPONPs	0.001	NR	0.11-5.56	(Pundir y Aggarwal 2016)

LD: Límite de detección. IRL: Intervalo de respuesta lineal. LIP - Lipasa; GK - Glicerol Quinasa; GPO - Glicerol-3-fosfato oxidasa; HRP – Peroxidasa de rábano picante; GCE - Electrodo de carbono vítreo; NiONPs - Nanopartícula de óxido de níquel; CHIT - Quitosano; ZnHFC - Hexacianoferrato de zinc; PVA - Polivinil alcohol; CE – Electrodo de carbón; GDH - Glicerol deshidrogenasa; IrNPs - Nanopartícula de iridio; LIPNPs - Nanopartículas de lipasa; GKNPs - Nanopartículas de Glicerol Quinasa; GPONPs - Nanopartículas de Glicerol-3-fosfato oxidasa.

1.5.2. Biosensor potenciométrico de triglicéridos

Los biosensores potenciométricos de TG se basan en la hidrólisis del triglicérido catalizada por la enzima lipasa a glicerol y ácidos grasos libres. La producción de ácidos grasos induce cambios en el pH de la solución del analito que se miden con un electrodo de vidrio o equivalente (Figura 12), (Pundir y Narwal 2018).

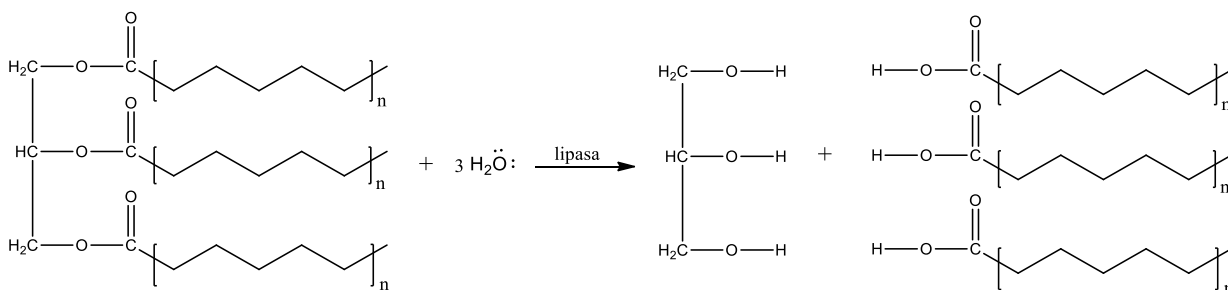


Figura 12. Reacción generada en un biosensor potenciométrico para determinar triglicéridos (Dhull, et al. 2017).

Los biosensores potenciométricos más comunes utilizan electrodos selectivos de iones para transducir la reacción biológica en una señal eléctrica. El biosensor consiste en una membrana de enzima inmovilizada que rodea la sonda de un electrodo de pH, donde la reacción catalizada genera iones de hidrógeno (Pundir y Narang2013).

Otros esquemas de detección de los cambios de pH asociados a la reacción de hidrólisis de los triglicéridos mediada por la lipasa, involucran dispositivos microelectrónicos de efecto de campo como los transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET's) y los capacitores electrolito-aislante-semiconductor (EISCAP's). En ellos al igual que en los electrodos selectivos de iones y el electrodo de vidrio, la propiedad que cambia respecto a la concentración del analito, es el potencial, aunque la instrumentación y modo de operación difieran del potenciométrico clásico (Pundir y Narwal, 2018); (Schöning y Poghossian, 2006).

Algunos ejemplos de biosensores potenciométricos de triglicéridos, se reportan en la tabla 3.

Tabla 3. Biosensores potenciométricos para determinar triglicéridos

Transductor	Membrana	LD (mM)	Sensibilidad (mV/mM)	IRL (mM)	Referencias
EISCAP	Silicon sustrato	5	1,774.8*	5.0-10.0	(Basu, et al. 2005)
EISCAP- miniaturizado	Glutaraldehído- LIP	0.56	2,085.4*	0.56-1.68	(Veeramani, et al. 2014)
Silicio poroso	Silicon sustrato	5.90	1774.8*	5.90-21.0	(Reddy, et al. 2001)
ISFET	Queratina-LIP- atrapamiento de gel de alginato- adsorción NC	NR	28.3*	<4	(Pijanowska, et al. 2001)
Grafito-epoxi	LIP-Nafion	0.02	41.76	NR	(Escamilla-Mejia, et al.2015)

LD: Límite de detección. IRL: Intervalo de respuesta lineal. NC: Nitrocelulosa: LIP: Lipasa

* asumiendo una respuesta Nernstiana del electrodo de pH utilizado como transductor

1.5.3. Electrodo de pH basados en película de óxido sobre acero inoxidable (POSAI)

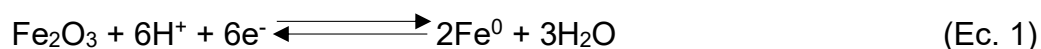
En cualquier laboratorio de análisis químico, es indispensable llevar a cabo la medición de pH, sin embargo, el electrodo de vidrio presenta algunas desventajas como: son frágiles, de vida media corta y son altamente sensibles a soluciones proteicas y alcalinas. Una posible alternativa para la realización de electrodos sensibles al pH, son las películas de óxidos (férrico y ferroso) que se forman por la oxidación de aceros inoxidables obtenidas mediante tratamiento químico (Rosales y Pérez, 1998). Este tipo de dispositivos podrían ser un transductor conveniente para desarrollar biosensores potenciométricos de triglicéridos al inmovilizar lipasa sobre su superficie.

El acero 316P, es una aleación de C (0.08%), Si (1%), Mn (2%), P (0.045%) S (0.030 %), Cr (17%), Ni (12%) y Mo (2%). Este tipo de acero se caracteriza por su excelente resistencia a la corrosión, excelente soldabilidad, no se endurece por tratamiento térmico y se puede utilizar tanto a temperaturas bajas y elevadas. Diversos trabajos de investigación han demostrado que los electrodos POSA-316P, funcionan como electrodos selectivos de iones H⁺ en un intervalo de pH de 2 a 13 en medio acuoso (García-Gómez et al. 1997).

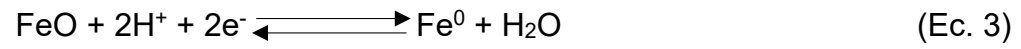
1.5.4. Funcionamiento de los transductores POSAI

La reacción de hidrólisis entre la enzima lipasa y un triglicérido genera ácidos grasos, los cuales provocan un cambio de pH en la solución que se encuentran. Para determinar este cambio de pH, se puede utilizar un electrodo de vidrio convencional; sin embargo, el uso de estos electrodos tiene varias desventajas como las descritas anteriormente. Es por esto que una alternativa para desarrollar un biosensor potenciométrico de triglicéridos, es emplear un sensor de pH basado en un transductor de película de óxido sobre acero inoxidable POSAI, el cual es también sensible a los cambios de pH y presenta ventajas competitivas como su resistencia al impacto, bajo costo y posibilidad de miniaturizarse (Mayorga-Martinez et al. 2009).

Los electrodos de acero inoxidable con película de óxido responden a los cambios de pH conforme al mecanismo descrito en las ecuaciones 1-5 (del Rosal-Vargas, 2000).



$$E = E^0 + \frac{59.16}{6} \log \frac{\chi_{\text{Fe}_2\text{O}_3} [\text{H}^+]^6}{\chi_{\text{Fe}}^2} \quad (\text{Ec. 2})$$



$$E = E^0 + \frac{59.16}{2} \log \frac{\chi_{\text{FeO}\downarrow} [\text{H}^+]^2}{\chi_{\text{Fe}\downarrow}} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$E = E^0 - 59.16\text{pH} \quad (\text{Ec. 5})$$

“DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE TRIGLICÉRIDOS BASADO EN
UN TRANSDUCTOR POTENCIOMÉTRICO DE ACERO INOXIDABLE”

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Diseñar, construir, optimizar y evaluar un biosensor potenciométrico para la determinación de triglicéridos en muestras alimenticias.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar, mediante parámetros analíticos, la respuesta del transductor potenciométrico basado en película de óxido sobre acero inoxidable empleado en el desarrollo de un biosensor para la determinación de triglicéridos.
- Construir un biosensor potenciométrico para la determinación de triglicéridos, a través de la inmovilización de la enzima lipasa en una membrana de Nafion sobre el transductor potenciométrico evaluado.
- Caracterizar y validar el funcionamiento del biosensor potenciométrico de triglicéridos en muestras de alimentos; y contrastar estadísticamente los resultados obtenidos con un método espectrofotométrico.

“DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE TRIGLICÉRIDOS BASADO EN
UN TRANSDUCTOR POTENCIOMÉTRICO DE ACERO INOXIDABLE”

METODOLOGÍA

3. Metodología experimental

En el presente capítulo se describe la metodología experimental seguida durante el desarrollo del biosensor potenciométrico para determinar triglicéridos.

3.1. Reactivos

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos comerciales de grado analítico y las disoluciones acuosas se prepararon con agua desionizada Mili Q (Millipore) con resistividad $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

Los reactivos fueron utilizados sin ningún tratamiento previo, tal y como se recibieron del proveedor. $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , CH_3COOH , KCl , H_3BO_3 , H_3PO_4 , tributirina, NaOH , CrO_3 , Nafion 5% (v/v), H_2SO_4 , lipasa de *Candida rugosa* (E.C. 3. 1. 1. 3) 5.3 U/mg proteína, (Sigma-Aldrich); CH_3COCH_3 (J. T. Baker); goma arábica (grado alimenticio).

3.2. Soluciones

Para la construcción y evaluación del biosensor potenciométrico para determinar triglicéridos, se utilizaron: la solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH=7.0 preparada con $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($0.001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) en KCl $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Solución Britton Robinson pH=2.5 con H_3PO_4 , H_3BO_3 y CH_3COOH $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ c/u ajustada con NaOH .

El coctel enzimático se prepara con 1.9 mg de lipasa de *Candida rugosa* (10.1 UI), 30 μL de Nafion al 5% y 110 μL de PBS. La solución obtenida se agita hasta que se disuelva completamente y se coloca en el transductor para su posterior uso.

La emulsión de tributirina $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, se prepara dispersando el reactivo en una solución de goma arábica al 4 % (p/v) como emulsionante. La mezcla generada se dispersa en un baño ultrasónico por 30 minutos. La mezcla se almacena a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

3.3. Material

- Barra redonda de acero inoxidable 316P (4 mm de diámetro por 10 cm de altura)
- Resina serigráfica Policat R2 6019 (Sánchez)
- Catalizador Policat SP R20100 (Sánchez)
- Solvente P1 0300 (Sánchez)

3.4. Equipo

- Baño ultrasónico (Cole-Parmer, 8890R-MT)
- Fuente de poder GPC 3030D G W
- Potenciómetro pH 510 Oakton
- Potenciómetro pH 120 Conductronic
- Electrodo de referencia Ag/AgCl de doble camisa con solución interna de KNO_3 al 10 % Orion 900200
- Electrodo auxiliar Pt (BASi)
- Electrodo combinado de pH de vidrio Orion 910600
- Balanza analítica BP 2215 Sartorius
- AUTOLAB PGSTAT 30 (Ecochemie) con software GPES versión 4.5
- Espectrómetro Pekin-Elmer Lambda 40 UV/Vis

3.5. Metodología

La metodología seguida para la construcción de los biosensores y su evaluación se describe a continuación.

3.5.1. Electropulido de barras de acero inoxidable

El electropulido, es una técnica empleada para limpiar las superficies metálicas reduciendo su microrrugosidad, dejando una superficie libre de imperfecciones. En este trabajo, una capa del metal superficial es eliminada de la barra de acero mediante la aplicación de una corriente eléctrica a la barra de acero sumergida en un electrolito oxidante.

Con el fin de obtener una superficie limpia en las barras de acero inoxidable 316P, se pulen con una lija 1200 y se limpia la superficie con acetona, posteriormente la parte inferior de la barra se introduce en una solución de cromo (CrO_3 $2.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a 70°C . Se forma un circuito eléctrico cerrado con la probeta que se va a electropulir y un contraelectrodo (otra barra de acero inoxidable), conectándose las dos barras a una fuente de poder con la ayuda de caimanes: al polo positivo (ánodo) la barra a electropulir y al negativo (cátodo) el contraelectrodo, haciendo pasar una corriente de 2.5 amperes durante 10 minutos con agitación continua como se muestra en la figura 13 (del Rosal-Vargas, 2000).

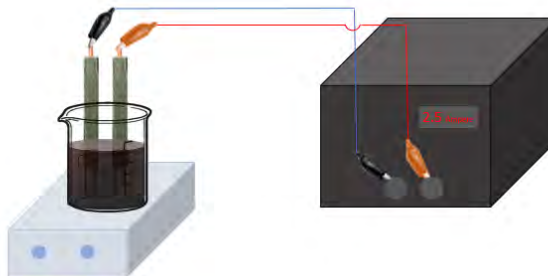


Figura13. Esquema del proceso de electropulido.

3.5.2. Oxidación de barras de acero inoxidable

Cuando las barras de acero se encuentran libres de impurezas y sin imperfecciones (electropulidas) es necesario crear una película de óxido mediante un tratamiento químico, el cual consiste en sumergir aproximadamente 1 cm de la zona electropulida en una solución de cromo (CrO_3 $2.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a 70°C con agitación continua durante una hora (del Rosal-Vargas, 2000).

Para obtener un tamaño de superficie controlado y no exponer al medio la zona no oxidada, se coloca una resina epóxica dejando expuesto 0.5 cm de la sección inferior del electrodo. La resina se prepara en una proporción 5:1 de resina serigráfica Policat R2 6019 y catalizador Policat SP R20100 respectivamente, con $100 \mu\text{L}$ del solvente P1 0300 por cada 6 g de la mezcla resina:catalizador. La barra cubierta se deja secar a temperatura ambiente por 24 horas y la superficie oxidada de trabajo se activa con una solución de NaOH $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ por 24 horas para su posterior uso (Figura 14).

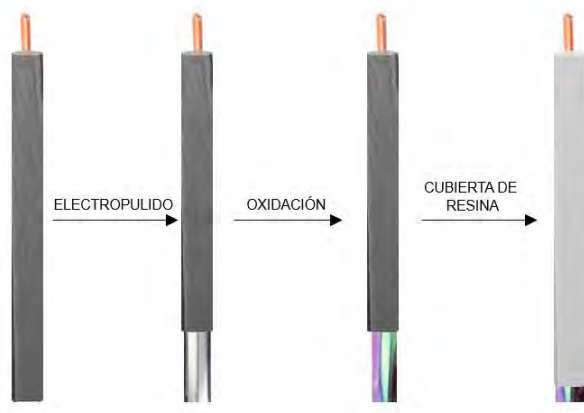


Figura 14. Proceso de electropulido, oxidación y cubierta de resina del electrodo de acero inoxidable con película de óxido sensible al pH (POSAI).

3.5.3. Evaluación de la respuesta del transductor

Con la finalidad de evaluar la respuesta al cambio de potencial del electrodo de trabajo respecto a un electrodo comercial de pH, se realizaron curvas de valoración. El procedimiento se realiza registrando simultáneamente el cambio de potencial (mV) con el electrodo POSAI y el de pH con un electrodo combinado de vidrio. El sistema consistió en 50 mL de una solución de buffer Britton Robinson pH=2.5 que se valoró con adiciones sucesivas de 100 μL NaOH 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante una bureta (Figura 15).

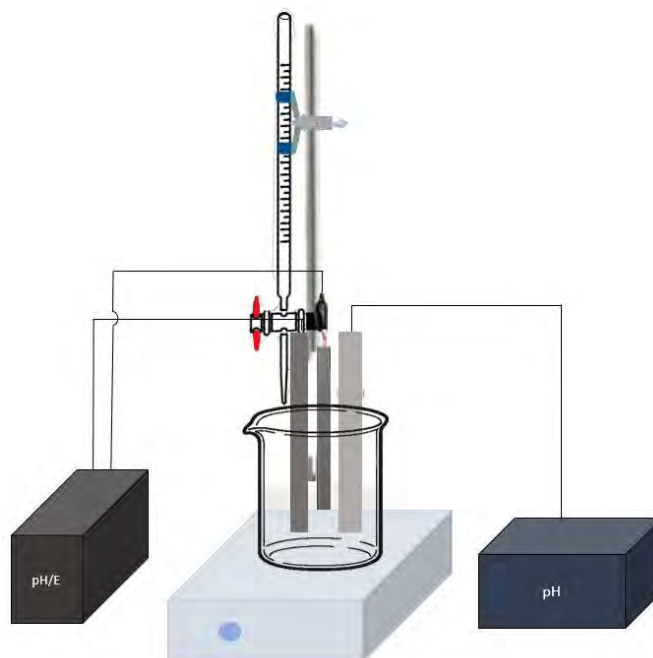


Figura 15. Esquema del equipo utilizado para determinar la respuesta del electrodo

3.5.4. Evaluación de la dinámica de respuesta del transductor POSAI

Con la finalidad de evaluar la dinámica de respuesta del transductor POSAI en un intervalo de pH cercano al de trabajo de la lipasa, se llevaron a cabo adiciones sucesivas de 20 μL de HCl 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cada 3 minutos a 25 mL de una solución PBS. El procedimiento se realiza registrando simultáneamente el potencial (mV) y el pH en dos sistemas independientes e idénticos; siguiendo el cambio de potencial en uno de ellos

con un potenciostato y el cambio de pH con un potenciómetro en el otro. En el potenciostato, la celda electroquímica se constituyó por un electrodo de referencia Ag/AgCl, un contraelectrodo de platino y como electrodo de trabajo la barra de acero inoxidable 316P. Las lecturas de pH se realizaron con un electrodo combinado de pH de vidrio, previamente calibrado.

De manera análoga, se evaluó la respuesta al cambio en la concentración de los triglicéridos en dos sistemas independientes e idénticos de 25 mL de PBS que contenían 6 unidades enzimáticas de lipasa con adiciones sucesivas de 80 μL de una solución de tributirina TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cada 3 minutos. La dinámica de respuesta fue seguida con el electrodo POSAI y de manera simultánea se registraron los cambios de pH con un electrodo de vidrio.

3.5.5. Construcción y evaluación del biosensor

Para construir el biosensor, el transductor POSAI se introduce por un minuto en 120 μL de PBS con Nafion al 0.71% y 10.6 UI de lipasa (coctel enzimático). Posteriormente se deja secar a temperatura ambiente y se repite el procedimiento cinco veces más. Concluida la última evaporación, se sumerge el biosensor en PBS y se almacena a temperatura de 4-8 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (Figura 16).



Figura 16. Electrodo con la membrana enzimática

Con el objetivo de comprobar el correcto funcionamiento del biosensor se realizaron registros cronopotenciométricos en 25 mL de PBS con 5 adiciones sucesivas de 80 μL de TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. La respuesta fue contrastada contra la obtenida por un electrodo POSAI sin la membrana enzimática.

3.5.6. Optimización del biosensor

Un diseño factorial, es un experimento diseñado que consiente en estudiar los efectos que varios factores pueden generar en una respuesta. Esto permite estudiar las interacciones entre los factores al variar los niveles de todos los factores al mismo tiempo en lugar de uno a la vez y al realizar un experimento (MINITAB 18, 2017).

Para la optimización de la composición de la membrana, se realizó un diseño experimental, evaluando el valor de la sensibilidad analítica del biosensor respecto a la concentración de lipasa y Nafion en el coctel enzimático. El diseño de experimentos (DOE), se realizó mediante un diseño factorial de dos niveles con dos factores, evaluándose un total de 13 experimentos

Se prepararon cocteles enzimáticos con las cantidades propuestas por el diseño experimental de Lipasa (3.76-12.24 UI) y Nafion (0.40-1.10 %v/v) en el volumen necesario para completar 140 μL de PBS. Para preparar los biosensores se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.5.5 y la sensibilidad analítica se determinó a partir de los respectivos registros cronopotenciométricos, obtenidos conforme a lo reportado en el apartado 3.5.4 para el electrodo POSAI en solución con lipasa.

3.5.7. Parámetros analíticos del biosensor

Con la finalidad de obtener los principales parámetros analíticos del biosensor optimizado, se obtuvieron curvas de calibración $E(\text{mV})$ contra $[\text{TB}](\text{mM})$ a partir de registros cronopotenciométricos de 25 mL de soluciones de PBS con adiciones sucesivas de 80 μL de la emulsión de TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cada 6 minutos. Así, se determinaron la

sensibilidad analítica SA, los límites de detección y cuantificación LOD y LOQ, el intervalo de respuesta lineal IRL y el coeficiente de determinación r^2 .

3.5.8. Evaluación del efecto de la membrana de Nafion sin enzima sobre la respuesta del biosensor

Con el objetivo de comprobar que la respuesta del biosensor se debe a la lipasa y no a la membrana de Nafion, se realizó un estudio donde la respuesta de un biosensor optimizado se contrastó con la obtenida con un electrodo al que sólo se colocó una membrana equivalente de Nafion sin enzima. Los registros cronopotenciométricos se obtuvieron en 25 mL de PBS y se hicieron 5 adiciones sucesivas de 80 μL de TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.5.9. Análisis de triglicéridos en muestras comerciales

3.5.9.1. Extracción de triglicéridos

Se coloca en un tubo de polipropileno 100 mg de la muestra problema (frituras), se agregan 10 mL de una solución de goma arábiga al 4% en agua desionizada a 65°C , se agita la mezcla 2 minutos en un agitador vortex y luego se coloca en baño maría a 65°C durante 5 minutos (Escamilla-Mejia, et al. 2015). Nuevamente se agita la mezcla 2 minutos en un agitador vortex y se centrifuga durante 5 minutos a 2,500 r.p.m.. Se decanta la solución y se trabaja con la fase líquida.

3.5.9.2. Análisis de triglicéridos con el biosensor

El análisis de triglicéridos se realizó en muestras de papas fritas de tres marcas diferentes, las cuales fueron adquiridas en un comercio local.

Para el análisis de triglicéridos contenidos en las muestras de frituras, se utilizó el método de adición patrón a partir de registros cronopotenciométricos. En este procedimiento se sumerge la celda electroquímica en 25 mL de una solución de PBS, posteriormente se hacen 3 adiciones sucesivas, la primera de 1,000 μL de la muestra problema y dos de 80 μL de la emulsión de TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cada 6 minutos.

3.5.9.3. Análisis de triglicéridos mediante espectrofotometría UV/Vis

Se emplea un espectrofotómetro UV/Vis para la determinación cuantitativa de triglicéridos utilizando el kit enzimático Triglicéridos-LQ (Spinreact, S.A. , 2018) cuyo fundamento ha sido presentado en el apartado 1.4.2. Los sistemas se preparan conforme a lo reportado en la tabla 5; una vez mezclados, se incuban durante 5 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y se lee la absorbancia a 505 nm.

Tabla 4. Preparación de sistemas para la determinación espectrofotométrica de triglicéridos.

Solución	Sistema		
	Blanco	Estándar	Problema
Reactivos (mL)	1.0	1.0	1.0
Solución estándar (μL)	-	10.0	-
Solución problema (muestra) (μL)	-	-	10.0

Reactivos= p-clorofenol; LPL; GK; GPO; POD; 4-AF; ATP. (Spinreact, S.A. , 2018)

“DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE TRIGLICÉRIDOS BASADO EN
UN TRANSDUCTOR POTENCIOMÉTRICO DE ACERO INOXIDABLE”

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4. Resultados y discusiones

4.1. Evaluación de la respuesta del transductor POSAI.

En este trabajo se reporta un método para la determinación potenciométrica de triglicéridos con base en la determinación del cambio de pH provocado por la reacción entre los TG y la lipasa; cambio registrado por un transductor de película de óxido sobre acero inoxidable.

Como primera etapa en el desarrollo del biosensor, se evaluó la respuesta del transductor POSAI en el intervalo de pH de 2.5 a 10.5 en solución Britton-Robinson. En la figura 17, se muestra el registro del potencial vs pH de la barra de acero inoxidable contra un electrodo combinado de pH de vidrio, donde puede observarse que ambos tienen una respuesta similar.

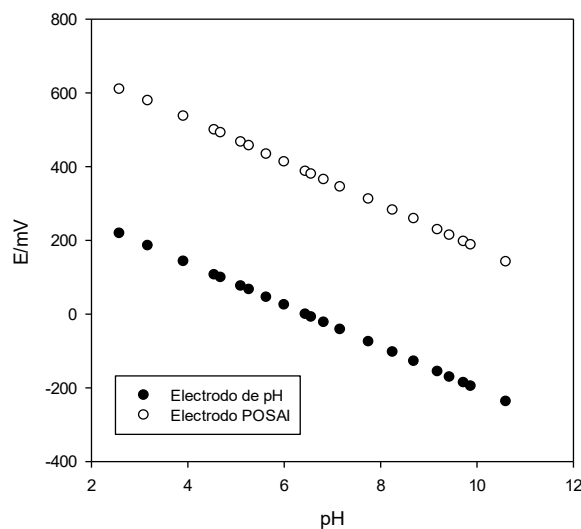


Figura 17. Registro del potencial vs pH de la barra de acero inoxidable contra un electrodo combinado de vidrio.

En la tabla 5, se muestran las sensibilidades de 13 electrodos POSAI y 13 calibrados de un electrodo combinado de vidrio. Los valores demuestran que el electrodo de acero inoxidable funciona adecuadamente. Para hacer la comparación de las medias de las pendientes para ambos casos con un 95% de confianza (ensayo t), es necesario establecer en principio si ambas muestras (electrodos de acero y vidrio) proceden de poblaciones con desviaciones estándar iguales; los resultados demuestran que las muestras provienen de diferentes poblaciones ($t_{crit}=2.18$; $t_{cal}=2.30$). Al comparar las pendientes, asumiendo que los datos provienen de poblaciones con diferente varianza, se encuentra que no difieren significativamente, ya que $t_{crit} > t_{cal}$ ($t_{crit}=2.13$ y $t_{cal}=1.74$).

Tabla 5. Parámetros analíticos del electrodo de trabajo referentes a un electrodo de pH.

Electrodo/No. De calibrado	Sensibilidad (mV/pH)	
	Electrodo de acero	Electrodo de vidrio
1	-63.8	-59.9
2	-63.9	-56.8
3	-58.0	-56.9
4	-58.4	-56.8
5	-59.1	-57.0
6	-58.8	-56.9
7	-53.3	-55.7
8	-55.3	-55.4
9	-58.4	-55.4
10	-57.6	-56.3
11	-60.0	-55.7
12	-57.5	-55.9
13	-52.7	-55.8
Media	-58.2	-56.5
DS	3.3	1.2
%DSR	5.7	2.1

4.2. Evaluación de la sensibilidad del transductor de acero

Una vez determinada la respuesta a los cambios de la concentración de H^+ del transductor, se evalúa la dinámica de respuesta con un registro cronopotenciométrico, a partir del cual se obtiene la sensibilidad analítica en el intervalo de pH de trabajo de la lipasa (5.0-7.0). La figura 18 muestra dicho registro referente a los cambios de pH. Al llevarse a cabo una disminución de pH, se observa con claridad un aumento en el potencial, encontrándose un tiempo de respuesta promedio ($t_{95\%}$) de 2.54 ± 0.11 min. A partir del registro cronopotenciométrico, es posible trazar una línea de calibrado E contra pH, misma que reporta una pendiente de -70.0 mV pH^{-1} ($r^2=0.9955$) (Figura 19), existiendo una clara diferencia con respecto a la reportada en la tabla 5 (-58.2), hecho que se atribuye a la influencia de la deriva que tiene el electrodo de acero (1.8 mV min^{-1}); las lecturas de potencial para cada pH fueron tomadas a los 3 minutos de la adición de HCl.

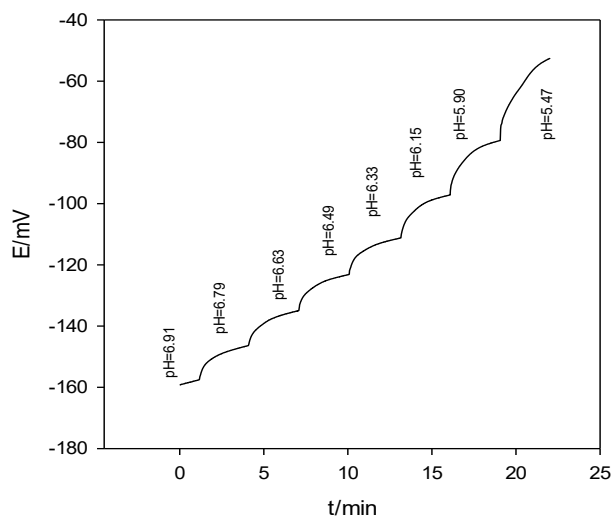


Figura 18. Registro cronopotenciométrico de un transductor de acero, PBS pH=7.0 con adiciones sucesivas cada 3 minutos de HCl $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en el intervalo de pH de trabajo.

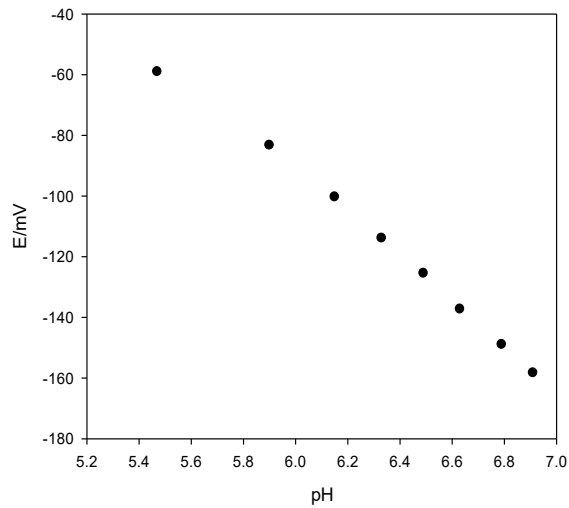


Figura 19. Línea de calibrado potencial contra pH de un transductor POSAI obtenida a partir del registro cronopotenciométrico de la figura 18.

Una vez evaluada la respuesta del transductor hacia los cambios de pH, es conveniente establecer si también es lo suficientemente sensible al agregar tributirina en presencia de lipasa en solución; de esta manera, no solo se evalúa la sensibilidad hacia los triglicéridos, sino el posible efecto de la adsorción de la proteína respecto a la deriva (Figura 20).

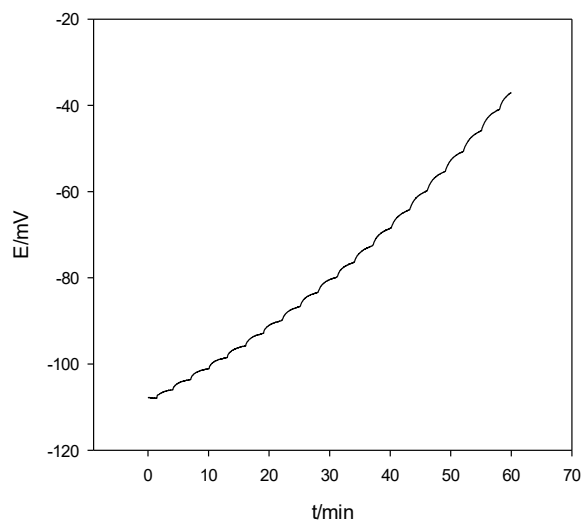


Figura 20. Registro cronopotenciométrico de un transductor de acero, 25 mL PBS pH=7.0 con 6 UI de lipasa con adiciones sucesivas cada 3 minutos de 40 μL de TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en el intervalo de pH de trabajo.

Conforme a los resultados, es posible establecer un tiempo de respuesta ($t_{95\%}$) de $1.27 \pm 0.21 \text{ min}$; aproximadamente la mitad del encontrado para adiciones de HCl, hecho que se puede atribuir a cierto grado de adsorción de la proteína sobre el electrodo.

En cuanto a la sensibilidad del electrodo, se encuentra que no es lineal con respecto al pTB, ubicándose entre -8.5 y -215 mV/pTB (Fig.21a). Este hecho se debe a que por cada molécula de TB la lipasa libera tres moléculas de ácidos grasos, los cuales no son ácidos fuertes y cuya disociación depende de su propia concentración. Al graficar el potencial contra la concentración milimolar de TB, se encuentra un comportamiento más cercano al lineal ($r^2=0.9814$) con una sensibilidad aproximada de 11.7 mV mM^{-1} (Figura 21b).

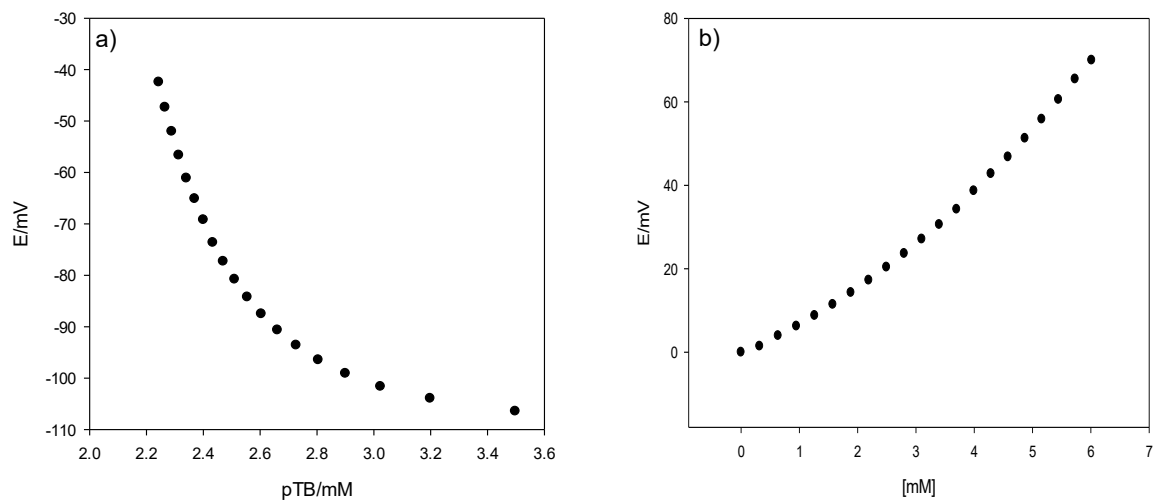


Figura 21. (a) Dependencia del potencial respecto al pTB; (b) dependencia del potencial respecto a la concentración de tributirina.

Los resultados obtenidos sugieren que, para la cuantificación de triglicéridos con el biosensor, es más conveniente trabajar con la relación $E(\text{mV})$ contra la concentración de TB (mM).

4.3. Optimización y evaluación del biosensor de triglicéridos

Previamente al proceso de optimización, es conveniente establecer si existe una respuesta diferencial entre un electrodo POSAI y el biosensor (POSAI + membrana enzimática) hacia la tributirina (Fig. 22). De acuerdo con los resultados, existe una respuesta significativamente mayor del biosensor, respecto al electrodo POSAI, lo cual confirma el mecanismo de detección de los triglicéridos en el dispositivo. Se realizó este experimento con el objetivo de determinar que el transductor de acero responde aun cuando se le coloca una membrana que contiene el coctel enzimático.

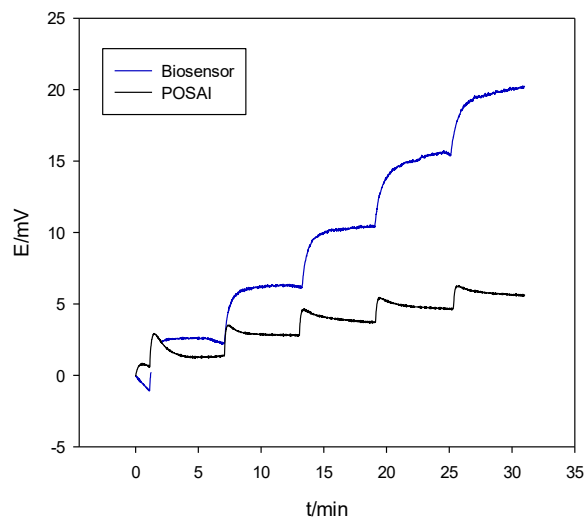


Figura 22. Registro cronopotenciométrico de un biosensor potenciométrico de triglicéridos y un electrodo POSAI. 25 mL de PBS pH=7.0 con adiciones sucesivas de 80 μL de TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Membrana enzimática formulada con 10.5 UI lipasa + 1.1% v/v Nafion en 140 μL PBS pH=7.0.

Finalmente, para comprobar que la respuesta del biosensor es debida a la hidrólisis enzimática de la tributirina y no al efecto de esta sobre el Nafion, se realizaron estudios cronopotenciométricos con el biosensor y un electrodo de acero con una membrana de Nafion equivalente, pero sin lipasa. En la figura 23 se puede observar que el electrodo que no contiene enzima es sensible a las adiciones de tributirina, pero no muestra una señal significativa con respecto al biosensor que contiene lipasa, resultado que confirma la utilidad del dispositivo desarrollado para cuantificar triglicéridos.

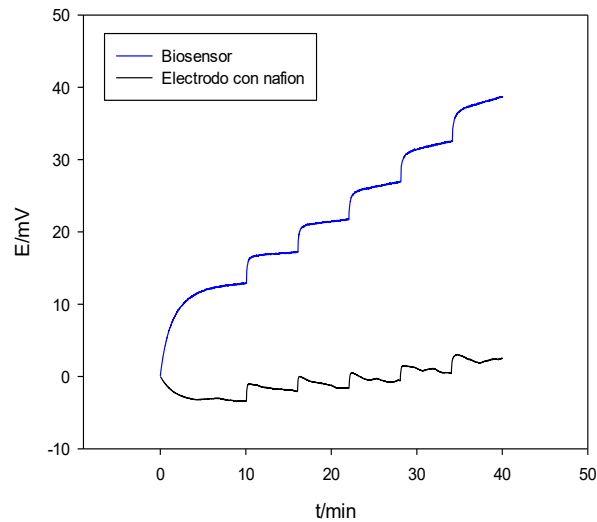


Figura 23. Registro cronopotenciométrico de un biosensor y un electrodo con Nafion en 25 mL de PBS pH=7.0 con adiciones sucesivas de 80 μL de TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Membrana del electrodo formulada con 1.1% v/v Nafion en 140 μL de PBS pH=7.0. Membrana enzimática (biosensor) formulada con 10.5 UI lipasa + 1.1% v/v Nafion en 140 μL PBS pH=7.0.

Para la optimización de la composición de la membrana del biosensor, se estudió el efecto de la cantidad de lipasa y Nafion sobre el valor de la sensibilidad analítica del biosensor, obtenida de curvas de calibración E (mV) contra concentración de TB (mM). La matriz de diseño utilizada y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6. La superficie de respuesta correspondiente se presenta en la figura 24.

Tabla 6. Matriz del diseño central composite utilizado para la optimización del biosensor potenciométrico de TG (2 factores: UI de lipasa y % v/v de Nafion).

Experimento	Factores y niveles		Sensibilidad analítica (mV·mM ⁻¹)
	Lipasa (UI)	Nafion (% v/v)	
1	8.00	0.75	30.56
2	11.00	1.00	25.38
3	5.00	1.00	23.28
4	12.24	0.75	19.24
5	5.00	0.50	2.92
6	8.00	0.75	10.65
7	11.00	0.50	6.22
8	3.76	0.75	3.70
9	8.00	0.75	18.23
10	8.00	0.34	17.82
11	8.00	1.12	26.09
12	8.00	0.75	26.09
13	8.00	0.75	12.76

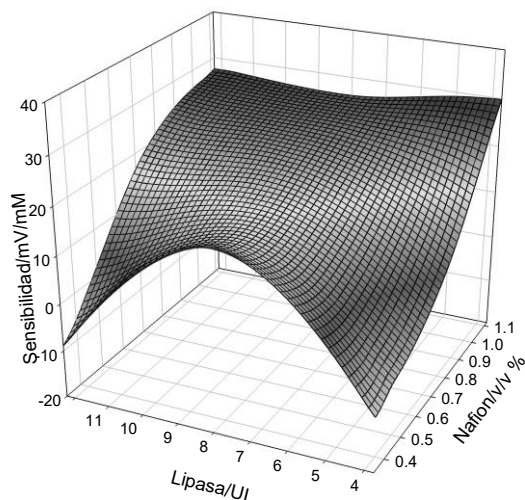


Figura 24. Superficie de respuesta de la relación entre la cantidad de lipasa, Nafion y sensibilidad.

Los resultados obtenidos, fueron procesados mediante el programa MINITAB 17. La ecuación 6 contiene el modelo matemático que predice el comportamiento de la sensibilidad (S) con respecto a las concentraciones de lipasa (L) y Nafion (N) en la membrana.

$$S = -1.60 + 7.24L - 75.0N - 0.370L^2 + 70.2N^2 + 0.50LN \quad (\text{Ec. 6})$$

Conforme a la ecuación 6, las condiciones en las que se maximiza la sensibilidad son 10.5 UI de lipasa y 1.1 % (v/v) Nafion.

Bajo las condiciones óptimas en la composición de la membrana enzimática, se construyó un nuevo biosensor para determinar los parámetros analíticos de respuesta con base en el registro cronopotenciométrico (Figura 24) y la línea de calibrado obtenido (Figura 25).

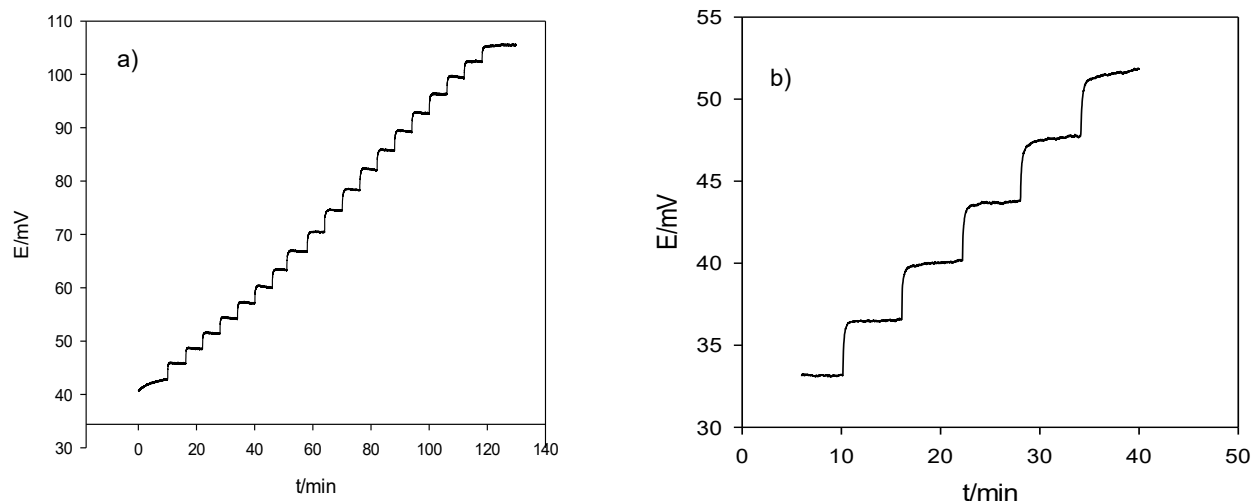
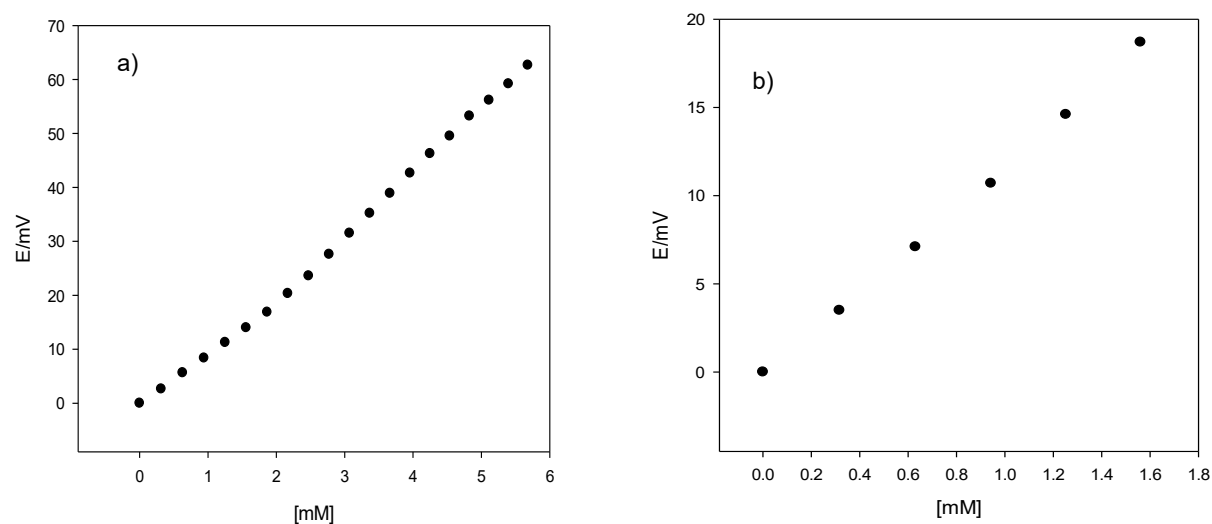


Figura 25. (a) Registro cronopotenciométrico del biosensor optimizado, haciendo adiciones sucesivas de 80 μL de la emulsión de TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cada 6 minutos sobre 25 mL de PBS $\text{pH}=7.0$. (b) Acercamiento del registro en las primeras adiciones.

Figura 26. (a) Curva de calibración del registro cronopotenciométrico haciendo adiciones



sucesivas de 80 μL de la emulsión de TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cada 6 minutos. (b) Acercamiento de la curva de calibración en las primeras adiciones.

Conforme a los resultados obtenidos en la dinámica de respuesta (Figura 24), se encuentra un tiempo de respuesta $t_{95\%}$ promedio de 0.79 ± 0.54 min; siendo menor al encontrado anteriormente en el electrodo POSAI en su respuesta hacia ácido clorhídrico y tributirina con lipasa en solución. Este hecho se atribuye a la adsorción de la proteína sobre el electrodo y el perfil difusional de TG y ácidos grasos sobre el transductor que inhibe la deriva en la respuesta de potencial reportada anteriormente.

Las características de respuesta del biosensor desarrollado son competitivas con respecto a lo reportado para otros dispositivos potenciométricos en cuanto al intervalo de respuesta lineal, aunque su sensibilidad es inferior (Tablas 3 y 7).

Tabla 7. Parámetros analíticos de un biosensor potenciométrico para determinar triglicéridos.

Curva de calibración	Pendiente $\text{mV} \cdot \text{mM}^{-1}$	Ordenada al origen mV	r^2	IRL mM	LD mM	LQ mM
Figura 26b	9.02	-0.09 (0.068)	0.9997	0.075-1.560	0.023	0.075
Figura 26a	11.35	-2.56 (0.538)	0.9964	0.474-5.680	0.142	0.474

IRL: Intervalo de respuesta lineal, LD: Límite de detección. LQ: Límite de cuantificación.

En la tabla 7 se presentan los parámetros analíticos obtenidos mediante la curva de calibración en el intervalo de bajas concentraciones (Figura 26b) y con el intervalo completo de concentraciones estudiadas (Figura 26a). En ambos casos se tiene una ordenada al origen negativa y la cual diferente de cero conforme al contraste de significación; en este sentido y para disminuir el error en el cálculo de los límites de detección y cuantificación se consideró como cero.

4.4. Validación del método

Con la finalidad de validar el biosensor desarrollado, se evaluó el contenido de triglicéridos por el método potenciométrico y el método de referencia por espectrofotometría UV/Vis (Tabs. 8 y 9). Se analizaron tres diferentes marcas de papas fritas por triplicado, realizado días diferentes cada uno de ellos.

Los resultados indican que ambos métodos presentan reproducibilidad similar, misma que se ubica entre 5.3 y 10.3 por ciento de desviación estándar relativa.

Tabla 8. Contenido de TG en los extractos por emulsión con goma Arábica de muestras comerciales determinado por potenciometría con el biosensor.

Método potenciométrico			
Concentración de TG en % (ρ_{TB}/p)			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
	20.849	17.969	16.212
	19.452	18.705	18.699
	17.224	19.937	18.248
Media	19.116	18.853	17.686
DE	1.828	0.994	1.325
%DER	9.564	5.273	7.490

DE=desviación estándar; %DER=porcentaje de desviación estándar relativa

Tabla 9. Contenido de TG en los extractos por emulsión con goma Arábica de muestras comerciales determinado por espectrofotometría UV/Vis.

Método UV/Vis			
Concentración de TG en % (ρ_{TB}/ρ)			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
	26.969	33.828	25.066
	28.608	30.675	23.691
	23.314	35.849	21.609
Media	26.201	33.382	23.412
DE	2.710	2.608	1.741
%DER	10.344	7.811	7.435

DE=desviación estándar; %DER=porcentaje de desviación estándar relativa

Para realizar el contraste de resultados entre ambos métodos, existen varias alternativas que podrían utilizarse. En primer lugar, se podría considerar el contraste de medias para cada una de las muestras basado en la t de Student; sin embargo, se tendría que realizar la prueba en tres ocasiones para cada una de las muestras, lo cual no es recomendable, ya que no son comparables los resultados entre las diferentes muestras por no provenir de la misma población.

Por otra parte, se podría optar por realizar un análisis de varianza. No obstante, al contar con tres muestras analizadas por dos métodos diferentes, al igual que en el ensayo de la t de Student, se requeriría hacer el análisis de manera independiente para cada muestra y los resultados no serían comparables.

Considerando los inconvenientes de llevar a cabo el contraste con las metodologías mencionadas anteriormente, la comparación de resultados entre el biosensor potenciométrico y el método espectrofotométrico, se realizó aplicando un contraste t para los 9 datos emparejados (Tab. 10).

Tabla 10. Datos y resultados del contraste t para datos emparejados

Método potenciométrico	Método UV/Vis	diferencia
20.849	26.969	-6.120
19.452	28.608	-9.156
17.224	23.314	-6.090
17.969	33.828	-15.859
18.705	30.675	-11.97
19.937	35.849	-15.912
16.212	25.066	-8.854
18.699	23.691	-4.992
18.248	21.609	-3.361
	media d=	-9.146
	DE=	4.584
	n=	9
	t=	-5.985
	gl=	8
	t₈=	2.26

d=diferencia; DE=desviación estándar; n=número de datos; gl=grados de libertad; t₈=t crítico para 8 grados de libertad

Conforme a los resultados, t calculada es mayor que t crítica y en consecuencia se puede afirmar que existen diferencias significativas entre ambos métodos, siendo evidentemente mayores los valores reportados por el método espectrofotométrico.

Dado que los triglicéridos de las muestras analizadas por ambas metodologías se obtuvieron en el mismo proceso de extracción, la diferencia entre los métodos se puede atribuir a que en el biosensor la lipasa no completa el proceso de hidrólisis de TG en las muestras, reflejándose esto en un cambio menor en el potencial del esperado por el dispositivo.

En las tres muestras de frituras, sistemáticamente el biosensor reportó un menor contenido de triglicéridos, respecto al método de referencia. En todos los casos el % (p_{TB}/p) promedio reportado por el biosensor es similar, lo cual es compatible como una saturación de la enzima y en consecuencia una hidrólisis de TG incompleta.

“DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE TRIGLICÉRIDOS BASADO EN
UN TRANSDUCTOR POTENCIOMÉTRICO DE ACERO INOXIDABLE”

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

En el presente trabajo se diseñó, construyó y evaluó un biosensor potenciométrico para la determinación de triglicéridos en muestras alimenticias. El dispositivo consiste en un transductor potenciométrico de película de óxido sobre acero inoxidable sobre el que se coloca una membrana enzimática de lipasa y Nafion sensible a los cambios de pH producidos por la reacción entre la enzima lipasa y los triglicéridos contenidos en la muestra a analizar.

El transductor demostró un comportamiento Nernstiano, estadísticamente equivalente al de un electrodo de vidrio y su respuesta a los cambios de pH no es inhibida por la lipasa ni la membrana de Nafion.

La formulación óptima de la membrana enzimática fue 10.6 UI de lipasa, 1.1% v/v Nafion en 140 μ L de solución amortiguadora PBS de pH 7.0.

El biosensor desarrollado presenta buenas características de respuesta que son competitivas con dispositivos análogos reportados y demostró ser adecuado para el análisis de triglicéridos en frituras.

El contraste de resultados del análisis en muestras reales entre el método espectrofotométrico de referencia y el biosensor, sugiere equivalencia en la reproducibilidad de ambas metodologías; sin embargo, los porcentajes de triglicéridos presentan diferencias significativas que hemos atribuido a la saturación de la enzima en el dispositivo.

Con la finalidad de mejorar el desempeño del biosensor desarrollado, es necesario incrementar el contenido de lipasa en la membrana; sin embargo, es importante considerar que la membrana de Nafion utilizada no es capaz de soportar mayor contenido de la enzima por lo que será necesario explorar otras matrices poliméricas para inmovilizar la enzima. Asimismo, es necesario incorporar un estudio de interferentes, considerando especialmente aquellos que pudieran generar respuesta potenciométrica en la membrana que se utilice.

“DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE TRIGLICÉRIDOS BASADO EN
UN TRANSDUCTOR POTENCIOMÉTRICO DE ACERO INOXIDABLE”

REFERENCIAS

6. Referencias

- Akoh, C. C., y Min, D. M. (1955). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. EUA: CRC Press.
- Asmis, R., Bühler, E., Jelk, J., y Gey, K. F. (1997). Concurrent quantification of cellular cholesterol, cholesteryl esters and triglycerides in small biological samples reevaluation of thin layer chromatography using laser densitometry. *Journal of Chromatography B*, 59-66.
- Basu, I., Subramanian, R. V., Mathew, A., Kayastha, A. M., Chadha, A., y Bhattacharya, E. (2005). Solid state potentiometric sensor for the estimation of tributyrin and urea. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 418-423.
- Battaner, E. (2012). *Biomoléculas. Una introducción estructural a la bioquímica* (1a ed.). España: Universidad de Salamanca.
- Björkhem, I., Blomstrand, R., y Svensson, L. (1976). Determination of serum triglycerides by mass fragmentography. *Clinical Chemistry Acta*, 191-198.
- de la Fuente, M. A., y Juárez, M. (1999). Aplicación de las técnicas cromatográficas al estudio de triglicéridos y esteroides de la grasa de leche. *Food science and technology international*, 103-119.
- del Rosal-Vargas, J. D. (2000). *Desarrollo de biosensores electroquímicos de glucosa*. México.
- Dhull, R., Dhull, V., Rathee, K., y Singh, S. (2017). A review on evolution in triglyceride determination. *Der Pharma Chemica*, 30-36.
- Díaz, J., Fernández, M. T., y Paredes, F. (1997). *Aspectos básicos de bioquímica clínica*. España: Díaz de Santos.

- Escamilla-Mejia, J. C., Rodríguez, J. A., Álvarez-Romero, G. A., y Galán-Vidal, C. A. (2015). Monoenzimatic lipase potentiometric biosensor for the food analysis based on a pH sensitive graphite-epoxy composite as transducer. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 19-23.
- Fornaguera, J., y Gómez, G. (2004). *Bioquímica: La ciencia de la vida*. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- García-Gómez, F., Pérez-Saavedra, J. J., y Marquez-Vargas, S. (1997). Películas de óxidos sobre acero inoxidable 316 (POSAI 316) como electrodo indicador de pH. *Sociedad Química de México*, 3-7.
- Jeong, C. Y., Han, Y. D., Yoon, J. H., y Yoon, H. C. (2014). Bioelectrocatalytic sensor for triglycerides in human skin sebum based on enzymatic cascade reaction of lipase, glycerol kinase and glycerolphosphate oxidase. *Journal of Biotechnology*, 7-14.
- Klotzsch, S. G., y McNamara, J. R. (1990). Triglyceride measurements: A review of methods and interferences. *Clinical Chemistry*, 1605-1613.
- Lajusticia, A. M. (2007). *Colesterol, triglicéridos y su control* (3a ed.). España: Edaf.
- Lauridsen, J. B. (1976). Food emulsifiers: surface activity, edibility, manufacture, composition and application. *Oil chemists society*, 400-407.
- Litchfield, C. (1972). Introduction. En C. Lichfield, *Analysis of triglycerides*. EUA: Academic Press.
- Longo, D. L., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Jamenson, J. L., y Loscalzo, J. (2012). *Harrison: Principios de medicina interna* (18a ed., Vol. 1). México: Mc Graw Hill.
- Mayorga-Martinez, C. C., Madrid, R. E., y Felice, C. J. (2009). A pH sensor based on a stainless steel electrode electrodeposited with iridium oxide. *IFEE Transactions on education*, 133-136.

- Minakshi, y Pundir, C. S. (2008). Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251-255.
- MINITAB 18. (2017). *Soporte de MINITAB 18*. Obtenido de <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/factorial-and-screening-designs/factorial-and-fractional-factorial-designs/>
- Narang, J., Chauhan, N., y Pundir, C. S. (2013). Construction of triglyceride biosensor based on nickel oxide-chitosan/zinc oxide/zinc hexacyanoferrate film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45-51.
- Narang, J., Minakshi, Bhambi, M., y Pundir, C. S. (2010). Determination of serum triglyceride by enzyme electrode using covalently immobilized enzyme on egg shell membrane. *International Journal of Biological Macromolecules*, 691-695.
- Okazaki, M., Komoriya, N., Tomoike, H., Inoue, N., Usui, S., Itoh, S., y Hosaki, S. (1998). Quantitative detection method of triglycerides in serum lipoproteins and serum-free glycerol by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 179-187.
- Peña, A., Begovich, A., Gómez, A., y Tapia, R. (2004). *Bioquímica*. México: Limusa.
- Pijanowska, D. G., Baraniecka, A., Wiater, R., Ginalska, G., Lobarzewski, J., y Torbiez, W. (2001). The pH detection of triglycerides. *Sensors and Actuators B*, 263-266.
- Pundir, C. S., y Aggarwal, V. (2016). Amperometric triglyceride bionanosensor based on nanoparticles of lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase. *Analytical Biochemistry*, 56-63.
- Pundir, C. S., y Narang, J. (2013). Determination of triglycerides with special emphasis on biosensors: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 379-389.

- Pundir, C. S., y Narwal, V. (2018). Biosensing methods for determination of triglycerides: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 214-227.
- Pundir, C. S., Singh, B. S., y Narang, J. (2010). Construction of an amperometric triglyceride biosensor using PVA membrane bound enzymes. *Clinical Biochemistry*, 467-472.
- Reddy, R. R., Chadha, A., y Bhattacharya, E. B. (2001). Porus silicon based potentiometric triglyceride biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 313-317.
- Rosales, G., y Pérez, J. J. (1998). Estudio potenciométrico del ácido fluorhídrico con electrodos POSAI-316. *Sociedad Química de México*, 182-185.
- Rosli, H. N., Zain, Z. M., y Ahmad, N. M. (2016). Lipase based biosensors for trygliceride determination. *MATEC Web of Conferences*, 1-4.
- Schöning, M. J., y Poghossian, A. (2006). Bio FEDs (Field-Effect Devices): State-of-the-art and new directions. *Electroanalysis*, 1893-1900.
- Spinreact, S.A. . (7 de 5 de 2018). *Spinreact*. Recuperado el Noviembre de 2018, de www.spinreact.com/files/Incerts/Bioquimica/BSIS31_TG_2018.pdf
- Veeramani, M. S., Shyam, K. P., Ratchagar, N. P., Chadha, A., y Bhattacharya, E. (2014). Miniaturised silicon biosensors for the retection of triglyceride in blood serum. *Analytical Methods*, 1728-1735.
- Wei, L., Chung , L., y Tse, C. (2008). Detection of triglyceride using an iridium nanoparticle catalyst based amperometric biosensor. *The Analyst*, 1757-1763.
- Yücel, A., Özcan, H. M., y Sağıroğlu, A. (2014). A new multi enzyme type biosensor for triglyceride determination. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 78-84.
- Zhang, W., Tang, Y., Liu, J., Ma., Y., Jiang, L., Huang, W., y Tian, D. (2014). An electrochemical sensor for detecting triglyceride based on biomimetic polydopamine and gold nanocomposite. *Journal of Materials Chemistry B*, 8490-8495.