



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR MONOENZIMÁTICO PARA DETERMINAR
TRIGLICÉRIDOS BASADO EN UN TRANSDUCTOR VOLTAMPEROMÉTRICO DE pH**

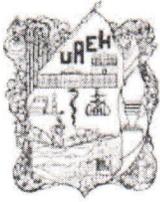
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN QUÍMICA

P R E S E N T A:

Q. ZITA GUADALUPE CRUZ ABURTO

BAJO LA DIRECCIÓN DEL DOCTOR CARLOS ANDRÉS GALÁN VIDAL

PACHUCA HIDALGO, JULIO 2021
MÉXICO



Mineral de la Reforma, Hgo., a 01 de julio de 2021

Número de control: ICBI-D/565/2021
Asunto: Autorización de impresión de tesis.

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

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado a la Q. Zita Guadalupe Cruz Aburto, alumna de la Maestría en Química con número de cuenta 281917, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado "Desarrollo de un biosensor monoenzimático para determinar triglicéridos basado en un transductor voltamperométrico de pH", en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación, se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE	Dra. María Elena Páez Rodríguez
SECRETARIO	Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
VOCAL	Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
SUPLENTE	Dra. Irma Pérez Silva



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

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
 Director del ICBI



OAAS/LMHM

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



www.uaeh.edu.mx



Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 1 del Área Académica de Química, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. Carlos Andrés Galán Vidal.

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

6° Congreso de Ciencia Educación y Tecnología y 2° Encuentro de buenas prácticas Docentes (2020), con el trabajo: "Evaluación de un transductor amperométrico de pH para el desarrollo de biosensores monoenzimáticos de triglicéridos". Cuautitlán Izcalli, México.

XXXII Congreso Nacional y XXII Simposio Estudiantil de Química Analítica (2019), con el trabajo: "Desarrollo de un biosensor de triglicéridos basado en un transductor potenciométrico de acero inoxidable". San Luis Potosí, México.



La investigación se realizó gracias al financiamiento de CONACyT como parte del proyecto: "Desarrollo de una lengua electrónica para la cuantificación simultánea de glucosa, colesterol y triglicéridos". CLAVE: CB-2014-242677.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar estudios de posgrado (No. de beca: 734642).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por haberme abierto sus puertas y dejarme descubrir aquí el increíble mundo de la ciencia.

Agradezco a cada uno de las y los catedráticos que tuve en la Licenciatura y en la Maestría por compartir su conocimiento conmigo. Gracias a todos ustedes el día de hoy cuento con las herramientas necesarias para mi desarrollo profesional.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, Doctora María Elena Páez Hernández, Doctor José Antonio Rodríguez Ávila y Doctora Irma Pérez Silva, por contribuir con su conocimiento y experiencia para enriquecer aún más este proyecto. Además gracias por su amistad y su apoyo.

Agradezco a mi director de tesis: Doctor Carlos Andrés Galán Vidal. Por darme la confianza para realizar este proyecto de investigación, por todo el apoyo necesario en cada etapa del trabajo, gracias por compartir su conocimiento y por explicarme cuando no entendía algo; también gracias por su amistad.

Amigas y amigos. Gracias a todos ustedes por su apoyo y por estar siempre presentes, Agradezco su amistad, la convivencia, los ánimos y los buenos momentos.

A todos, gracias.

Hacer ciencia nos permite comprender
una parte del universo que nos rodea.
-ZGCA

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	I
LISTADO DE ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Generalidades de los lípidos.....	1
1.2. Triglicéridos.....	1
1.2.1. Funciones de TG en el organismo y en alimentos.....	2
1.2.2. Valores convencionales y padecimientos asociados con los TG.....	2
1.2.3. Origen de triglicéridos en el organismo.....	3
1.3. Métodos de extracción de triglicéridos.....	4
1.3.1. Pretratamiento de la muestra.....	5
1.3.2. Extracción mediante hidrólisis ácida o alcalina.....	5
1.3.3. Extracción de triglicéridos con solventes orgánicos.....	5
1.3.4. Digestión asistida por microondas.....	6
1.3.5. Extracción con fluidos supercríticos.....	6
1.3.6. Método Soxhlet.....	7
1.3.7. Extracción de triglicéridos mediante emulsificantes.....	7
1.4. Métodos de determinación de triglicéridos.....	9
1.4.1. Métodos cromatográficos.....	9
1.4.2. Espectrometría de masas.....	10
1.4.3. Métodos espectroscópicos.....	10
1.5. Biosensores electroquímicos.....	12

1.5.1. Biosensores amperométricos para determinar triglicéridos.....	14
1.5.2. Biosensores potenciométricos para determinar triglicéridos.....	17
1.6. Enzima lipasa empleada como elemento de reconocimiento biológico en los biosensores para determinar triglicéridos.....	19
1.7. Métodos de inmovilización del elemento de reconocimiento biológico.....	21
1.8. Electrodo potenciométrico para determinar pH.....	23
1.9. Electrodo de polímeros conductores para determinar pH.....	25

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo general.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	28
3.1 Reactivos.....	28
3.2. Soluciones.....	28
3.3. Instrumentación.....	28
3.4. Tratamiento del electrodo de trabajo.....	29
3.5. Metodología.....	30
3.5.1. Evaluación del comportamiento electroquímico de hidroquinona (HQ).....	31
3.5.2. Evaluación del esquema de detección.....	31
3.5.3. Evaluación del comportamiento electroquímico de verde malaquita en solución.....	32
3.5.4. Estudio del comportamiento electroquímico de la electropolimerización de verde malaquita sobre carbón vítreo.....	32

3.5.5. Evaluación del intervalo de potencial de trabajo para la electropolimerización de verde malaquita.....	32
3.5.6. Electropolimerización de verde malaquita en medio ácido sobre una membrana de Nafion.....	33
3.5.7. Evaluación de la respuesta electroquímica del electrodo electropolimerizado.....	33
3.5.8. Optimización del transductor.....	34
3.5.9. Parámetros analíticos del transductor.....	35
3.5.10. Evaluación de la respuesta del biosensor.....	35
3.5.11. Optimización del biosensor.....	36
3.5.12. Parámetros analíticos del biosensor.....	37
3.5.13. Análisis de triglicéridos en muestras reales con el biosensor.....	37

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	38
4.1. Evaluación del comportamiento electroquímico de hidroquinona.....	38
4.2. Evaluación del esquema de detección.....	45
4.3. Evaluación del comportamiento electroquímico de verde malaquita en solución.....	48
4.4. Estudio del comportamiento electroquímico de la electropolimerización de verde malaquita sobre carbón vítreo.....	52
4.5. Evaluación del intervalo de potencial de trabajo para la electropolimerización de verde malaquita.....	55
4.6. Electropolimerización de verde malaquita en medio ácido sobre una membrana de Nafion.....	58
4.7. Evaluación de la respuesta electroquímica del electrodo electropolimerizado.....	61

4.8. Optimización del transductor.....	63
4.9. Parámetros analíticos del transductor.....	66
4.10. Evaluación de la respuesta del biosensor.....	68
4.11. Optimización del biosensor.....	70
4.12. Parámetros analíticos del biosensor.....	73
4.13. Evaluación de triglicéridos en una muestra real.....	74

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	76
-------------------------------------	----

CAPÍTULO VI

6. REFERENCIAS.....	78
---------------------	----

LISTADO DE ABREVIATURAS

GK	Glicerol quinasa
GPO	Glicerol-3-fosfato oxidasa
HQ	Hidroquinona
IRL	Intervalo de respuesta lineal
LIP	Lipasa
p(VM)	poli (verde malaquita)
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
TB	Tributirina
TG	Triglicéridos
U	Unidades enzimáticas
VM	Verde malaquita

RESUMEN

Los triglicéridos son ésteres derivados de glicerol y de ácidos grasos que se encuentran en las grasas o aceites. En el organismo, se absorben en el intestino a partir de los alimentos ingeridos, aunque también se pueden sintetizar en el hígado a partir de la acetil-CoA. En el cuerpo humano, los triglicéridos se utilizan principalmente como reserva de agua, energía y calor.

No obstante sus importantes funciones, tener niveles elevados de triglicéridos incrementa el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, las cuales constituyen las principales causas de muerte en México. Por lo tanto, es necesario cuantificarlos en fluidos biológicos y en alimentos como un parámetro que contribuya a monitorizar el estado de salud y proporcione información nutricional del alimento.

Actualmente, los métodos más comunes para cuantificar triglicéridos tienen la desventaja de ser complejos ya que requieren un pretratamiento de muestra complicado, lo cual incrementa el costo y exige personal capacitado para su utilización.

Tomando en cuenta lo anterior, es necesario el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que contribuyan a resolver estas desventajas. Una alternativa viable son los biosensores electroquímicos, ya que son dispositivos analíticos simples, de bajo costo, rápidos y de operación sencilla. Dentro de los esquemas comunes de detección de triglicéridos empleando biosensores destacan los amperométricos y los potenciométricos. Los primeros siguen un esquema multienzimático, lo cual incrementa su costo, aunque son altamente selectivos; mientras que los segundos siguen un esquema de detección más simple ya que involucran solo una enzima, lo que los hace menos sensibles y selectivos que los anteriores.

En el presente trabajo se reporta el desarrollo y evaluación de un biosensor para determinar triglicéridos, basado en un transductor amperométrico de pH y en, un esquema de detección monoenzimático.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Generalidades de los lípidos

Los lípidos son sustancias hidrocarbonadas de cadena larga, son solubles en solventes orgánicos no polares e insolubles en solventes polares (Hammond, J. L., et al., 2016). Pueden clasificarse con base en su composición en simples y complejos. Los simples solo contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, mientras que los complejos contienen además de los elementos ya mencionados fósforo, nitrógeno y azufre. Otra clasificación se basa en sus propiedades físicas agrupándolos como grasas o aceites dependiendo de si se encuentran en estado sólido o líquido a temperatura ambiente, respectivamente (Argüeso Armesto, R., et al., 2011).

De igual manera se diferencian los lípidos que son esenciales, es decir, aquellos que se obtienen de la alimentación y no esenciales para el organismo. Basados en su polaridad se clasifican en polares y neutros (Akoh, C. C. y Min, D. B., 2002; Peña Díaz, A., et al., 2004).

1.2. Triglicéridos

Los triglicéridos (TG), forman parte de los lípidos simples y son ésteres de ácidos grasos del glicerol. Su estructura se compone de una cadena lineal anfipática con un grupo carboxilo (extremo polar) y una cadena hidrofóbica que termina con grupos metilo. Químicamente pueden obtenerse por la reacción de esterificación entre los grupos hidroxilo de la molécula de glicerol con tres moléculas de ácidos grasos, dando como producto al éster correspondiente como se muestra en la Figura I.1., (Huwaida Rosli, N., et al., 2016; Argüeso Armesto, R., et al., 2011).

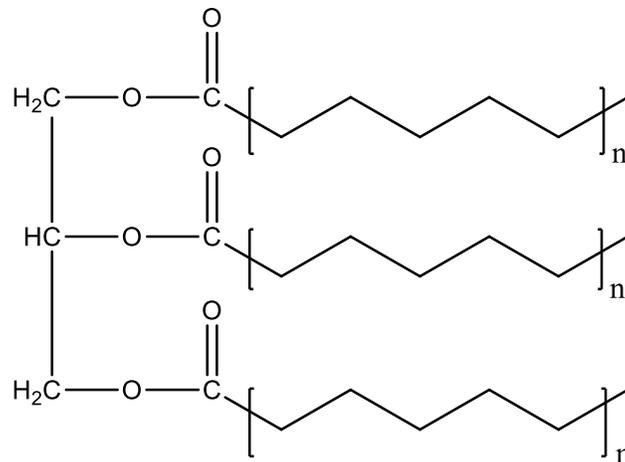


Figura I.1. Estructura molecular general de un triglicérido.

1.2.1 Funciones de TG en el organismo y en alimentos

En el organismo, los triglicéridos forman parte de la estructura de las membranas celulares, y almacenan energía en forma de depósitos; es decir, constituyen la grasa que se utiliza como fuente de energía al oxidarse mediante la respiración. Así mismo, actúan como precursores de hormonas y vitaminas liposolubles, intervienen en el transporte de la energía metabólica y aíslan los órganos internos de choques térmicos, eléctricos y físicos. Además, actúan como reserva de agua, ya que la combustión aeróbica de los lípidos produce una gran cantidad del vital líquido (Díaz Portillo, J., et al., 1997; Fornaguera, J. y Gómez, G., 2004).

En los alimentos, aportan color, sabor, textura y aroma. Asimismo, se agregan a los alimentos por su capacidad de formar agregados cristalinos y de interactuar con otros componentes como proteínas o hidratos de carbono.

1.2.2 Valores convencionales y padecimientos asociados a TG

Un exceso de TG en el organismo (hipertrigliceridemia) se puede acumular en las paredes de las arterias y derivar en diversos padecimientos como aterosclerosis, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades coronarias. Los niveles altos de

TG en el organismo se asocian a desórdenes como: Alzheimer, pancreatitis, diabetes, enfermedades hepáticas, cardiovasculares y del riñón; consecuencia del metabolismo anormal de las lipoproteínas. En la Tabla I.1. se muestran los valores de triglicéridos en sangre (Lang, F., 2009).

Tabla I.1. Valores de triglicéridos en sangre.

Triglicéridos	Niveles de triglicéridos (mg-dL ⁻¹)
Normales	<150
Altos en el límite	150-199
Altos	200-499
Muy altos	>500

Los niveles altos de triglicéridos también se asocian a dietas con elevado contenido de grasas. De ahí que es importante conocer y monitorizar el contenido de triglicéridos en alimentos.

El aporte de lípidos esenciales en la dieta debe ser equilibrado: 3 a 5 gramos por día o alrededor del 2% del total calórico. El exceso en su consumo, aunado a una vida sedentaria, conduce a un incremento progresivo de peso que determina la aparición de obesidad (Araya, L. H. y Lutz R. M., 2003; Gómez Candela, C. et al., 2005).

1.2.3 Origen de triglicéridos en el organismo

Los seres humanos poseemos TG en nuestro organismo, los cuales obtenemos por dos vías: la vía endógena y la vía exógena. En la primera, los triglicéridos se sintetizan principalmente en el hígado a partir de acetil-CoA. En la segunda, los lípidos se absorben desde el intestino delgado a partir de los alimentos ingeridos para después ser resintetizados en el hígado para su posterior utilización (Peña Díaz, A., et al., 2004).

Un alimento es aquella sustancia que contiene nutrientes fisiológicamente activos que benefician la salud y sustentan el organismo. Por lo tanto, la energía que se usa para vivir y realizar diversas actividades proviene del consumo de alimentos. Entre los principales nutrientes que debe de tener un alimento destacan los carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales y lípidos. Los triglicéridos son los principales componentes de los lípidos que aporta la dieta.

En la dieta, la mayor contribución de TG proviene de los lácteos como mantequilla y quesos, los cuales tienen un alto contenido en grasas saturadas. Las carnes, huevos, pescados y aceites vegetales aportan además grasas saturadas, monoinsaturadas y poliinsaturadas. No obstante, en alimentos industriales tales como bollería y frituras, normalmente no se reporta con precisión el contenido ni la naturaleza de los lípidos presentes (Araya, L. H. y Lutz R. M., 2003; Gómez Candela, C. et al., 2005).

Es particularmente importante cuantificar triglicéridos en fluidos biológicos y alimentos, debido a que su concentración es relevante información nutricional y biomédica que contribuye a evaluar el estado de salud para prevenir enfermedades y mejorar la dieta. Comúnmente los TG se encuentran en matrices complejas y es necesario extraerlos para su posterior análisis.

1.3. Métodos de extracción de triglicéridos

Para llevar a cabo una extracción exitosa de triglicéridos para su posterior análisis, es necesario tener una buena eficiencia de extracción y la eliminación completa del contenido no lipídico de la muestra. Al realizar un tratamiento previo de la muestra se optimiza la separación de TG aumentando la reproducibilidad de los análisis.

1.3.1. Pretratamiento de la muestra

La preparación depende de la naturaleza de la muestra; la eficacia de la extracción requiere un conocimiento de la estructura, las principales clases de lípidos y sus componentes. Si la extracción se realiza a muestras que se degradan o sufren un cambio estas se almacenan en contenedores sellados bajo condiciones de temperatura o atmósfera inerte que mejor las conserve, las bajas temperaturas reducen la degradación de los lípidos (Hewavitharana, G. G., et al., 2020).

La extracción de los lípidos se facilita reduciendo el contenido de humedad en las muestras (secado). Debido a que los lípidos se unen a proteínas y carbohidratos, se emplea secado al horno o vacío a bajas temperaturas (liofilización). Además, el menor tamaño de la partícula aumenta el área de superficie, permitiendo un mayor contacto entre el disolvente y la muestra para obtener una mayor eficiencia de separación (Hewavitharana, G. G., et al., 2020).

1.3.2. Extracción mediante hidrólisis ácida o alcalina

Se utilizan medios ácidos o alcalinos para liberar lípidos que se encuentran unidos covalentemente o iónicamente a proteínas o carbohidratos y para romper grasas emulsionadas con el fin de mejorar la eficacia de extracción. En este proceso también se puede emplear el uso de enzimas para hidrolizar a los triglicéridos (Hewavitharana, G. G., et al., 2020).

1.3.3. Extracción de triglicéridos con solventes orgánicos

Los triglicéridos son hidrofóbicos, esta propiedad permite utilizar solventes orgánicos para extraerlos de las matrices complejas. Se emplean solventes de diferentes polaridades para separar diferentes constituyentes lipídicos; por ejemplo, las grasas se pueden extraer con solventes menos polares como éter de petróleo; los constituyentes lipídicos “unidos” necesitan solventes polares.

Los lípidos neutros, están unidos hidrofóbicamente y se pueden extraer mediante solventes no polares. Los lípidos polares, que están unidos generalmente por fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno, necesitan solventes polares capaces de romper estos enlaces (Cequier Sanchez, E., et al., 2008; Schmid, M., et al., 2016).

1.3.4. Digestión asistida por microondas

La energía de microondas aumenta la fuerza de rotación sobre los enlaces que conectan restos dipolares a las moléculas adyacentes y reduce la energía requerida para alterar las uniones hidrofóbicas, lo que ayuda a disolver todo tipo de lípidos. Además, este método tiene la ventaja de ser rápido y consume una menor cantidad de solvente para extraer lípidos (de Moura, R. R., 2018; Rahimi, M. A., et al., 2017).

1.3.5. Extracción con fluidos supercríticos

Las muestras para analizar se calientan en una cámara presurizada y se mezclan con el fluido supercrítico, generalmente se utiliza CO₂ para la recuperación de los lípidos no polares, como los ácidos grasos esterificados, acilgliceroles y la materia insaponificable. Posteriormente bajo presión y a bajas temperaturas del solvente provocan que el CO₂ se convierta nuevamente en gas, dejando la fracción lipídica sin el solvente orgánico.

Los lípidos polares complejos son insolubles en CO₂, para extraerlos se puede modificar la polaridad del fluido utilizando un agente de arrastre como metanol, etanol o incluso agua. Este método reduce significativamente el uso de solventes orgánicos, evita problemas de eliminación de desechos, elimina el uso de solventes potencialmente tóxicos e inflamables, y reduce el tiempo de extracción. Sin embargo, mantener las condiciones del fluido supercrítico es muy costoso (Cheng, C. H., et al., 2011; Hewavitharana, G. G., et al., 2020).

1.3.6. Método Soxhlet

Este método consiste en separar los triglicéridos de las muestras con solventes orgánicos, generalmente éter etílico y temperatura. Es importante secar la muestra y reducir el tamaño de partícula de esta, la materia se coloca en un dedal poroso contenido en una cámara de extracción que recoge el solvente evaporado realizando la separación. 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, mientras que la desventaja es el tiempo de análisis, ya que se necesitan varias horas de extracción (Ahangari, B., et al., 2013; Zarnowski, R., et al., 2004).

1.3.7. Extracción de triglicéridos mediante emulsificantes

Las emulsiones están formadas por dos líquidos inmiscibles dispersado uno sobre del otro en forma de gotas pequeñas, esto es llamado fase discontinua, mientras que el líquido restante se conoce como fase continua. Los emulsificantes contienen partes polares y no polares separadas entre sí de manera equilibrada, de esta manera generan la extracción formando micelas de lípidos contenidos en las muestras alimenticias (Shahidi, F. y Wanasundara, P. K. J. P. D., 2002; Lauridsen, J. B., 1976; Miller, R., 2015).

La Tabla I.2., muestra una recopilación de los métodos descritos para extraer triglicéridos de diferentes muestras.

Tabla I.2. Métodos de extracción de triglicéridos.

Método de extracción	Muestra	Tratamiento de muestra	Referencia
Solventes orgánicos			
CHCl ₃ :MeOH (2:1 V/V) y CH ₂ Cl ₂ :MeOH (2:1 V/V)	Hueva congelada de bacalao	Liofilización Secado Reducción de partícula	Cequier Sánchez, E., et al., 2008
CHCl ₃ :MeOH EtOH Hexano EtOH:hexano	Algas comestibles	Liofilización Reducción de partícula	Schmid, M., et al., 2016
Digestión asistida por microondas			
CHCl ₃ :MeOH (2:1 V/V) e irradiación en microondas	Pasta de algas	Reducción de partícula	de Moura, R. R., et al., 2018
Hexano:isopropanol (3:2 V/V)	Sardina	Reducción de partícula Secado	Rahimi, M. A., et al., 2017
Fluidos supercríticos			
CO ₂ ; caudal 20 g/min	Suero de leche en polvo	Secado Reducción de partícula	Spence, A. J., et al., 2009
CO ₂ ; P=306 bar y T=60 °C	Microalgas	Liofilización	Cheng, C.H., et al., 2011
Método Soxhlet			
Extracción por 6 horas usando acetona, cloroformo, ciclohexano, éter dietílico, acetato de etilo y n-hexano	Granos de trigo	-	Zarnowski, R. y Suzuki, Y., 2004
Extracción por 6 horas usando benceno de petróleo y n-hexano	Granos de café	Secado Reducción de tamaño	Ahangari, B. y Sargolzaei, J., 2013
Emulsificantes			
Se utiliza goma arábica, baño de agua a 65 °C y filtrado	Mantequilla	-	Escamilla Mejía, J. C., et al., 2014
Se utiliza goma arábica al 4%, baño de agua a 65 °C, agitación y filtrado	Papas (frituras)	Reducción de tamaño	Cruz Aburto, Z. G., 2018

1.4. Métodos de determinación de triglicéridos

Los métodos para cuantificar triglicéridos se utilizan por lo general posteriormente a la extracción de la muestra. Los más utilizados son los métodos indirectos de determinación total de TG, su principio se basa en utilizar una referencia y es necesario contrastarse con una metodología para ser validados.

1.4.1. Métodos cromatográficos

La completa caracterización del contenido lipídico de una muestra se realiza con la determinación de las especies moleculares de las clases de triglicéridos que la componen. De este modo se conoce la forma en que se distribuyen los ácidos grasos dentro de cada molécula lipídica (Shahidi, F. y Wanasundara, P. K. J. P. D., 2002).

La cromatografía de capa fina se utiliza para el fraccionamiento de mezclas de lípidos complejos, ensayo de pureza, identificación e información sobre la estructura. El principio implica una fase estacionaria que contienen un adsorbente como alúmina, sílice o celulosa sobre una placa inerte. Este método es de bajo costo, sin embargo, el análisis demanda mayor tiempo (Narang, J., et al., 2013).

La cromatografía de gases involucra la partición de los componentes de la muestra (mezcla lipídica) en el estado de vapor entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida estacionaria no volátil dispersa en un soporte inerte. Generalmente se utiliza una fase móvil de nitrógeno o helio cuando se utilizan columnas empaquetadas y en las columnas capilares helio o hidrógeno, además el detector más empleado es el de ionización de llama (FID). Este análisis requiere de la derivatización de ácidos grasos para incrementar su volatilidad (Shahidi, F. y Wanasundara, P. K. J. P. D., 2002).

El principio de la cromatografía líquida de alto rendimiento se basa en un soporte finamente dividido empaquetado sobre una columna de acero inoxidable (fase estacionaria) sobre la cual se hace pasar un solvente o una mezcla de disolventes (fase móvil). La composición de la fase estacionaria empleada (fase normal o fase inversa) dependerá de la polaridad del analito de interés. La metodología se emplea para la separación y cuantificación de diglicéridos, monoglicéridos y triglicérido, sin embargo, la muestra necesita una derivatización para facilitar la separación y mejorar el límite de detección del análisis (Shahidi, F. y Wanasundara, P. K. J. P. D., 2002).

1.4.2. Espectrometría de masas

Es una técnica empleada para la caracterización estructural de lípidos que se basa en la separación de iones con base en la carga eléctrica y la masa atómica mediante campos eléctricos y magnéticos. La muestra en estado gaseoso pasa a una cámara de ionización, donde se utiliza un campo eléctrico fuerte para generar pequeñas gotas cargadas que se envían al analizador, donde son separadas por su relación masa/carga (m / z). El espectro de masas obtenido es un patrón de picos característicos que representan fragmentos moleculares de la muestra con diferentes relaciones masa/carga (m / z). Es muy útil para identificar la estructura, longitud o ramificación de la cadena de los ácidos grasos o la presencia de anillos en las especies saturadas (Ivanova, S. B., et al., 2007).

1.4.3. Métodos espectroscópicos

Los métodos espectroscópicos se basan en estudiar como interacciona la materia con la cantidad de radiación absorbida o emitida por la especie de interés; son métodos no destructivos y tienen aplicaciones específicas en el análisis de lípidos, generalmente se utilizan para la identificación y cuantificación.

La espectroscopía de absorción infrarroja es un método fácil, rápido y no destructivo empleado para identificar lípidos donde la radiación electromagnética en forma de reflexión, dispersión, absorción o transmisión procedente de la muestra interacciona en función al número de onda. Las bandas resultantes que se observan en un espectro IR proporciona información acerca de la estructura y los grupos funcionales, generalmente de muestras de aceites comestibles (Rohman, A., 2017).

La espectroscopía de infrarrojo cercano tiene la ventaja de contar con un registro espectral rápido y ser una técnica no destructiva. Los grupos funcionales contenidos en los analitos absorben energía IR a longitudes de ondas específicas que dependen del contenido de triglicéridos de la muestra, debido a las diferentes interacciones de luz y materia. La cuantificación de TG se realiza utilizando una curva estándar de la absorción IR y del contenido de triglicéridos determinados por métodos analíticos estándar (Castillo Martínez, M., 2017).

El método de resonancia magnética nuclear es un método robusto empleado para determinar el contenido de lípidos en alimentos; con él se obtiene información cuantitativa y estructural sobre los TG. El principio se basa en determinar la frecuencia de resonancia de los núcleos atómicos de protón o carbono presentes en la muestra. La intensidad de la señal se puede relacionar con el contenido de triglicéridos de la muestra utilizando curvas de calibración (García Rodríguez, E., 2019).

La espectroscopía UV-Visible se basa en la luz que absorben las moléculas produciendo excitaciones o transiciones electrónicas en grupos funcionales con alta densidad de electrones como los grupos carbonilo o grupos con dobles enlaces, triples enlaces o enlaces conjugados que absorben fuertemente en el rango ultravioleta o visible a longitudes de onda características. Un ejemplo del uso de esta técnica es para evitar la adulteración en la industria de los aceites comerciales (Salinas Buenaño, J. P., 2018).

Los métodos enzimáticos involucran el uso de enzimas y se basa en las reacciones acopladas sobre los triglicéridos. El ensayo más descrito es el que

emplea lipasa para generar glicerol y ácidos grasos libres, estos últimos reacciona con glicerol quinasa para producir glicerolfosfato; finalmente la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa reduce el difosfato de nicotinamida y adenina (NAD⁺) a NADH, el producto final es un cromóforo que se puede medir mediante espectrofotometría.

Existen enzimas que al reaccionar con los triglicéridos generan productos estereoespecíficos, de esta manera se pueden determinar las diferencias estructurales de los TG que contiene la muestra; por ejemplo, el uso de lipasa pancreática elimina los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3 generados por la hidrólisis del triglicérido. Por otra parte, la enzima fosfolipasa A₂ libera los ácidos grasos de la posición 2 del TG (Shahidi, F. y Wanasundara, P. K. J. P. D., 2002).

1.5. Biosensores electroquímicos

Los métodos convencionales para analizar 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. La mayoría no se utiliza con fines de cuantificación sino de caracterización y determinación de abundancia relativa de triglicéridos en muestras particulares.

En este sentido, es necesario el desarrollo de nuevas alternativas analíticas que contribuyan 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 costosa, proporcionado un futuro prometedor para la detección fácil y oportuna de triglicéridos en los ámbitos clínico y alimentario.

Un biosensor electroquímico, como el que se muestra en la Figura I.2., es un dispositivo analítico compuesto por un elemento de reconocimiento biológico (receptor) que se encuentra inmovilizado sobre un transductor. El transductor convierte un cambio observado en una señal medible, que se registra en un procesador de señal. Los receptores aportan selectividad y evita interferencias, los más utilizados son enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos y antígenos.

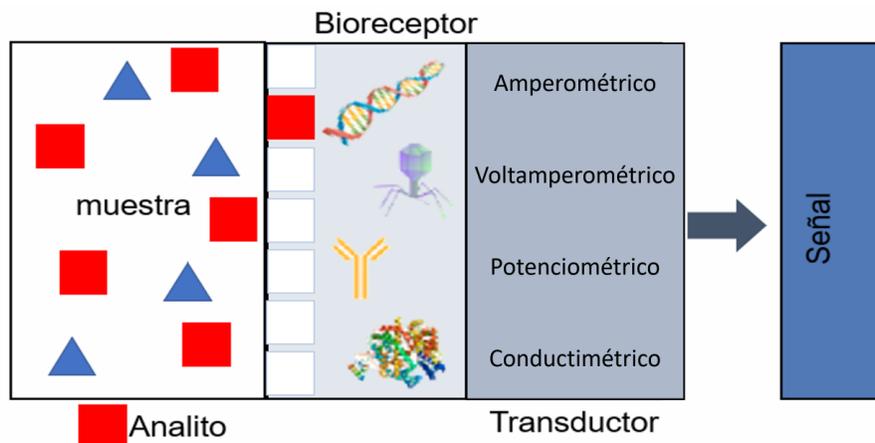


Figura I. 2. Esquema de los componentes de un biosensor. Modificado de Eggins, G. B. (2002).

Los biosensores electroquímicos se clasifican con base en el tipo de transductor en: amperométricos, voltamperométricos, potenciométricos y conductimétricos (Eggins, G. B., 2002). Entre los biosensores más utilizados para determinar triglicéridos, destacan dos tipos principales: los amperométricos y los potenciométricos.

1.5.1. Biosensores amperométricos para determinar triglicéridos

Los biosensores amperométricos se basan en la medida de la intensidad de corriente producida por la oxidación o reducción de especies electroactivas. La intensidad de corriente resultante es proporcional a la concentración del analito (Nguyen, H.H., et al.,2019).

Los biosensores amperométricos de triglicéridos siguen un esquema de detección como el que se muestra en la Figura I.3. Se basan en la interacción de tres enzimas, lipasa (LIP), 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 o la reducción de O_2 al imponer un potencial (E) sobre un transductor electroquímico (electrodo de trabajo) (Narang, J., et al., 2013; Minakshi y Pundir, C. S., 2008). En la Tabla I.3., se muestra una recopilación de ejemplos de biosensores amperométricos para determinar triglicéridos.

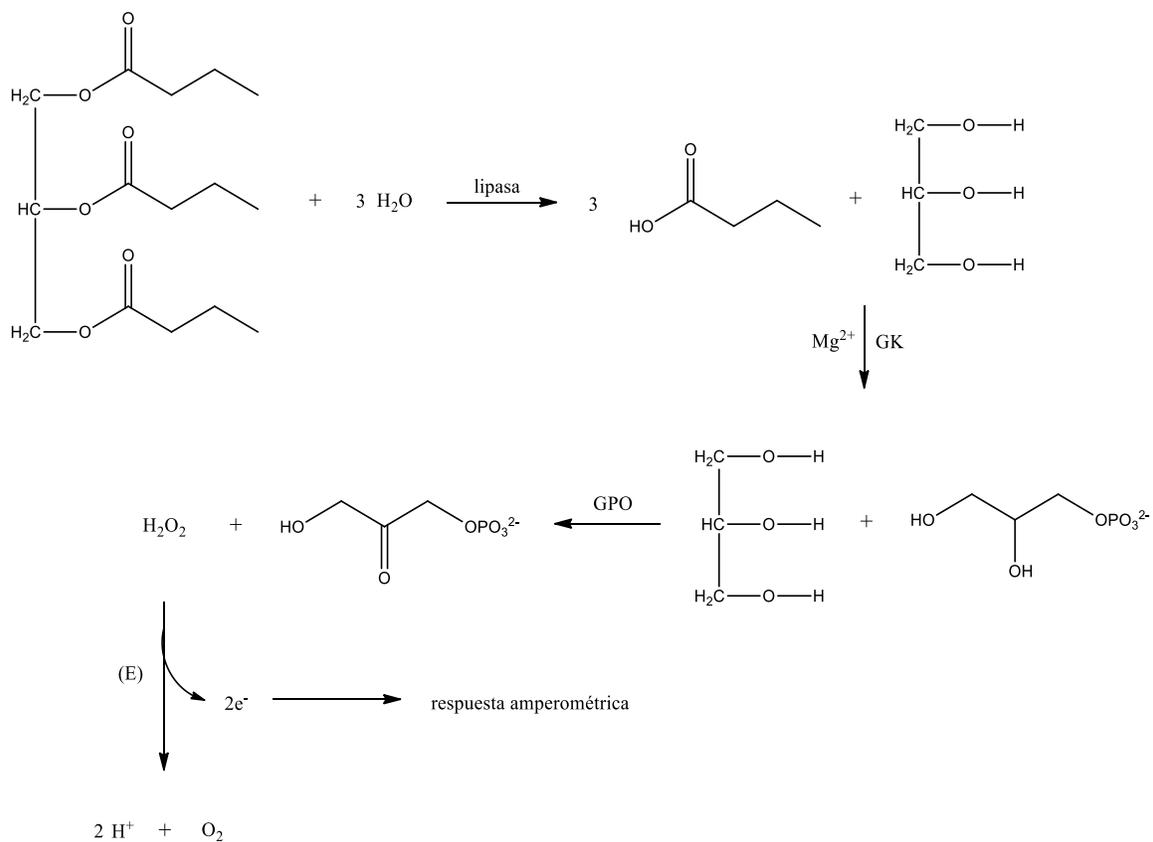


Figura I.3. Esquema de detección de un biosensor amperométrico convencional para determinar TG mediante las enzimas LIP, GK y GPO. Modificado de Dhull, R., et al. (2017).

Tabla I.3. Biosensores amperométricos para determinar triglicéridos.

Enzimas	Método de inmovilización	Muestra	Solución estándar	IRL	Método de comparación	pH	T/°C	Actividad	Referencias
LIP Candida rugosa /GPO Aerococcus viridans /GK Cellulomonas sp.	Cross-linking gelatina/BSA/ glutaraldehído	Leche de coco	Trioleína 0.5 mM	0.3 – 1.3 mM	UHPLC	7.0	25	Decremento de 57% después de 30 días almacenado a 4°C	Manoj, D., et al., 2020
LIPNPs Candida rugosa /GKNPs Cellulomonas species/GPON Ps Aerococcus viridans	Cross-linking glutaraldehído/ cisteamina	Suero sanguíneo	Trioleína 0.1 mM	0.5 – 1.0 mM	Espectrometría UV-Kit enzimático colorimétrico	7.0	35	Decremento de 20% después de 240 días almacenado a 4°C	Narwal, V. y Pundir, C. S., 2017
LIP/GK/GPO/HRP	Cross-linking Polivinil alcohol/ glutaraldehído	Suero sanguíneo	Trioleína	0.56 – 2.25 mM	Espectrometría UV-Kit enzimático colorimétrico	7.0	25	Decremento de 50 % después de 50 días a 4°C	Pundir, C. S., et al., 2010
LIP <i>Aspergillus oryzae</i> / glicerol deshidrogenasa Cellulomonas sp	Covalente sobre una película de Chit-nano-ZrO ₂	Tributirina	Tributirina	0.25 – 4 mg·mL ⁻¹		-	-	Decremento de 15 % después de 11 semanas.	Solanki, S., et al., 2016
LIP pancreas de porcino /GK Cellulomonas sp/GPO Aerococcus viridans	Adsorción BSA /glutaraldehído	Suero sanguíneo	Trioleína		Espectrometría UV-Kit enzimático colorimétrico	6.5	25	Decremento de 50 % después de 25 días a 4 °C	Minakshi y Pundir, C. S., 2008

LIP: Lipasa; GK: Glicerol quinasa; GPO: glicerol-3-fosfato oxidasa; HRP: peroxidasa de rábano picante; LIPNPs: Nanopartículas de lipasa; GKNPs: Nanopartículas de glicerol quinasa; GPONPs: Nanopartículas de glicerol-3-fosfato oxidasa.

1.5.2. Biosensores potenciométricos para determinar triglicéridos

El biosensor potenciométrico mide la diferencia de potencial entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia. Esta diferencia es proporcional al logaritmo de la actividad iónica o la concentración del analito (Thakur, M. S., y Ragavan, K. V., 2013).

Los biosensores potenciométricos de TG se basan en la hidrólisis de triglicéridos catalizada por la enzima lipasa a glicerol y ácidos grasos libres (Figura I. 4.). 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 (Huwaida Rosli, N., et al., 2016).

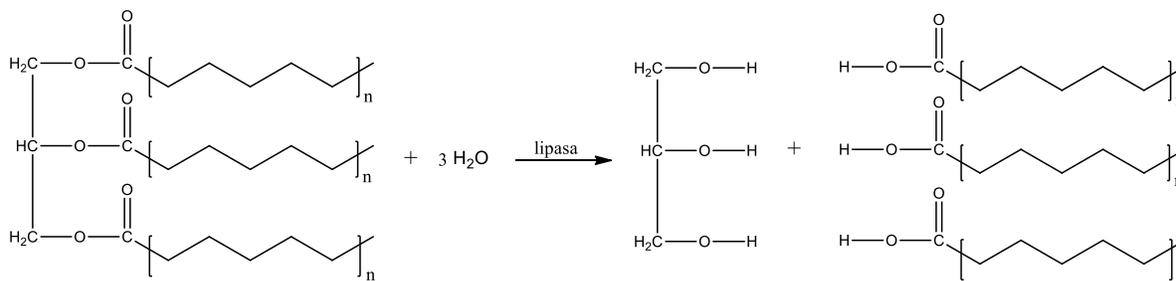


Figura I. 4. Reacción generada en un biosensor potenciométrico para determinar triglicéridos. Modificado de Huwaida Rosli, N., et al. (2016).

La Tabla I.4., muestra ejemplos de biosensores potenciométricos para determinar TG.

Tabla I.4. Biosensores potenciométricos para determinar triglicéridos.

Enzimas	Método de inmovilización	Muestra	Solución estándar	Método de comparación	IRL	LD	pH óptimo	Referencias
LIP Candida rugosa	Adsorción Nafion	Mayonesa, mantequilla, chorizo, pate, papas, pastelería	Tributirina	Espectrometría UV-Kit enzimático colorimétrico	-	0.02 mM	7.0	Escamilla Mejía, J. C., et al., 2014
LIP Pseudomonas cepacia	Cross-linking glutaraldehído	Suero sanguíneo	Tributirina 1 mM	-	0.7–2.86 mM	-	7.4	Veeramani, M. S., et al., 2014
LIP Pseudomonas cepacia	Cross-linking glutaraldehído	Tributirina	Tributirina 1 mM	Sensores de microcantilever	1-7 mM	-	-	Fernandez, R. E., et al., 2009
LIP páncreas de porcino	Adsorción	Aceite de girasol y suero sanguíneo	Tributirina	-	-	-	7.0	Kumar Reddy, R. R., et al., 2003
LIP Candida rugosa	Cross-linking glutaraldehído	Aceite de oliva	Tributirina 2 mM	GC	-	-	7.0	Huwaida Rosli, N., et al., 2016

LIP: Lipasa; GC: Cromatografía de gases; LD: Límite de detección.

1.6. Enzima lipasa empleada como elemento de reconocimiento biológico en los biosensores para determinar triglicéridos

Las enzimas son proteínas globulares de estructura flexible, su función es catalizar las reacciones químicas y disminuir la energía de activación, de igual manera poseen una alta especificidad ya que contienen un sitio activo específico para un sustrato, son estereoselectivas y regioselectivas. La desventaja del uso de enzimas es que funcionan en ciertos intervalos de trabajo como lo son el pH y la temperatura, ya que si no se utilizan estas condiciones pueden desnaturalizarse fácilmente y por lo tanto, perder su actividad (Arroyo, M., et al., 2014).

La enzima lipasa (E.C. 3.1.1.3), pertenece a la clase de las hidrolasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster del triglicérido produciendo glicerol y ácidos grasos libres. Las lipasas contienen una superficie hidrofílica donde el sitio activo hidrofóbico está cubierto por una tapa lipofílica. El mecanismo de hidrólisis ocurre cuando la enzima entra en contacto con una superficie lipofílica, la tapa se abre revelando el sitio activo hacia el solvente hidrofóbico (grasa o aceite), de esta manera el lípido entra en contacto con el sitio activo; así, los productos hidrofílicos de la hidrólisis se difunden rápidamente en la capa acuosa, como se muestra en la Figura I.5. (Hou, C. T. y Shimada, Y., 2004).

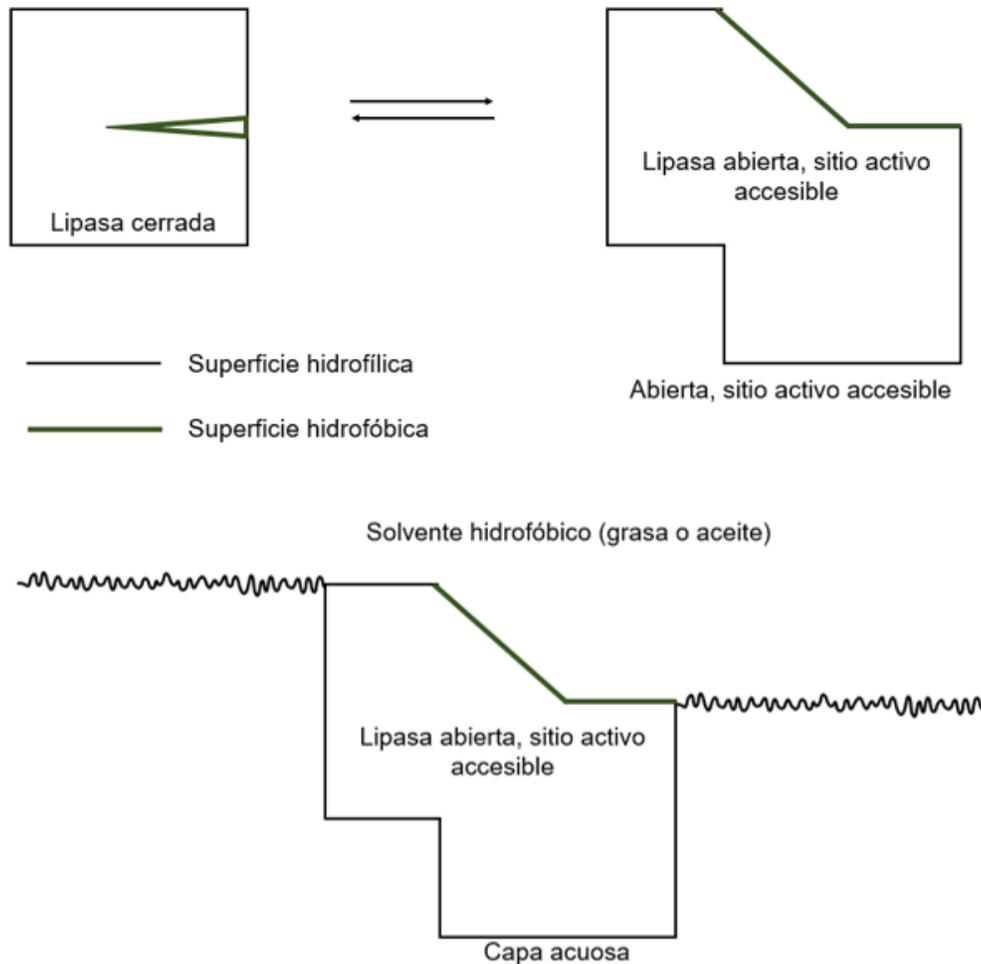


Figura I.5. Mecanismo de la hidrólisis enzimática de lípidos. Modificado de Paravidino, M., et al. (2012).

La especificidad de la enzima depende también de la familia procedente, las lipasas inespecíficas como las lipasas provenientes de *Candida Rugosa*, producen ácidos grasos libres, glicerol así como mono y diglicéridos como intermedios. Las lipasas 1,3-específicas liberan ácidos grasos de las posiciones 1 y 3, de esta manera la hidrólisis de TG a diglicéridos es mayor que la de monoglicéridos. También algunas lipasas que actúan específicamente sobre la hidrólisis de los ésteres que tienen ácidos grasos de cadena larga con dobles enlaces en posiciones cis sobre el carbono 9 (Utama, Q. D., et al., 2019).

Existen diversos ejemplos de enzimas, su tipo y condiciones óptimas de trabajo dependen del organismo de procedencia estas pueden ser producidas por mamíferos, bacterias y hongos. Por ejemplo la lipasa de la especie *Candida Rugosa* trabaja en el intervalo de pH de 5-8 a una temperatura de 35-50 °C y es una enzima inespecífica (Vakhlou, J. y Kour, A., 2006).

1.7. Métodos de inmovilización del elemento de reconocimiento biológico

Las enzimas empleadas en el uso de biosensores implican la medición electroquímica de su oxidación o reducción, aportan ventajas al biosensor como sensibilidad y rapidez (Eggins, G. B., 2002). Con la finalidad de obtener un biosensor viable, el elemento biológico debe estar perfectamente conectado al transductor, este proceso es conocido como inmovilización. Los principales métodos que se utilizan para inmovilizar bioreceptores son los que se describen a continuación (de la Guardia, M. y González Illueca, A., 2013).

La adsorción es la transferencia selectiva de ciertos componentes de una fase fluida llamados solutos, a la superficie de un sólido insoluble. Los solutos adsorbidos se denominan adsorbatos y el material sólido, adsorbente. Cuando un adsorbente se expone a una fase fluida, las moléculas en la fase fluida se difunden a su superficie, donde se unen químicamente con la superficie sólida o se mantienen allí físicamente por fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas.

Existen dos tipos de adsorción. La fisisorción se produce cuando las fuerzas de atracción intermoleculares entre las moléculas de adsorbente y de fluido son mayores que las de las propias moléculas de soluto; por otra parte, la quimisorción se produce cuando se forman enlaces covalentes entre el adsorbato y adsorbente.

Las ventajas de este método es que es fácil, es de bajo costo, no es necesario el uso de aditivos químicos y regeneración para su uso repetido (Eggins, G. B., 2002; de la Guardia, M. y González Illueca, A., 2013).

En la microencapsulación el biomaterial está rodeado de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de la enzima. Los materiales más utilizados incluyen acetato de celulosa, colágeno, policarbonato, teflón, Nafion y poliuretanos. Este procedimiento le proporciona un contacto directo con el transductor. Las ventajas son la estabilidad a los cambios de temperatura, pH o fuerza iónica del medio (Eggins, G. B., 2002; de la Guardia, M. y González, Illueca, A., 2013).

El atrapamiento es un método fácil de realizar, de bajo costo y estable; al no modificar a la enzima se conserva su actividad. Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa. Las enzimas, agentes dopantes y mediadores artificiales como ferroceno facilitan el transporte de los electrones desde el centro de la enzima hasta la superficie del electrodo. Uno de los inconvenientes es la gran barrera creada que dificulta la difusión del analito hasta el centro activo de la enzima, aumentando el tiempo de respuesta del sensor (Eggins, G. B., 2002; de la Guardia, M. y González, Illueca, A., 2013).

El método de electropolimerización, es un tipo de atrapamiento que se basa en aplicar un potencial o corriente al transductor que se encuentra sumergido en una solución que contiene a la enzima, un monómero y un agente dopante (Eggins, G. B., 2002; de la Guardia, M. y González, Illueca, A., 2013).

La reticulación utiliza agentes bifuncionales como el glutaraldehído, glioxal o hexametildiamina para unir el biomaterial al material de soporte. De igual manera se pueden unir empleando con una proteína como la albúmina de suero bovino. Las ventajas de este método es que es simple y se logra una fuerte unión química entre las moléculas. Sin embargo, la actividad enzimática puede disminuir debido a la distorsión de la conformación de la enzima (Eggins, G. B., 2002; de la Guardia, M. y González, Illueca, A., 2013).

Las enzimas contienen algunos grupos funcionales que no son esenciales para la actividad catalítica, estos se pueden unir covalentemente a la matriz de soporte. Primero se debe de activar la superficie con un reactivo multifuncional como

carbodiimida o glutaraldehído, seguido del acoplamiento del biocatalizador al sustrato activado (Eggins, G. B., 2002; de la Guardia, M. y González, Illueca, A., 2013).

1.8. Electrodo potenciométricos para determinar pH

Los electrodos convencionales para determinar pH responden principalmente al ion H^+ y a los iones del grupo IA (Na^+ y K^+), están constituidos por una membrana de vidrio compuesta por Na_2O , 22%; CaO , 6% y SiO_2 , 72% (Pingarrón Carrazón, J. M., y Sánchez Batanero, P., 2003). Además de estos materiales se han utilizado los electrodos de carbono para este fin, ya que poseen una buena conductividad eléctrica, es un material con baja densidad, elasticidad, expansión térmica y tienen la propiedad de poder modificarse para mejorar las propiedades redox, electrocatalíticas o de detección de iones (Kahlert, H., 2008).

Las modificaciones de las superficies de los electrodos de distintos tipos de grafito como: carbón vítreo, nanotubos de carbono, fibras de carbono y nanotubos de carbono de paredes múltiples, consiste en inmovilizar sustancias sensibles al cambio de pH. Un ejemplo de esto es la modificación química con grupos funcionales que contienen oxígeno. El oxígeno proveniente de grupos funcionales como cetonas, ácidos carboxílicos y alcoholes se quimisorbe en la superficie del electrodo de trabajo para formar complejos carbono-oxígeno. La cantidad y el tipo de grupos funcionales dependen del material de carbono y pueden modificarse con un pretratamiento del electrodo, por ejemplo, oxidación química, en fase gaseosa, radiofrecuencia, oxidación electroquímica o pulido mecánico de la superficie del electrodo (Kahlert, H., 2008).

Otra modificación es el enlace covalente de compuestos sensibles al pH. El proceso de activación electroquímica se basa en la generación de radicales en solución, y en cómo se unen estos radicales a las superficies de los electrodos de trabajo; es decir, forman un enlace covalente entre la superficie de carbono y el

compuesto modificador sensible al pH. Un ejemplo de este tipo es la unión covalente de estructuras que contengan una quinona a la superficie de carbón vítreo (Kahlert, H., 2008).

Los compuestos con estructura de quinhidrona se adsorben a la superficie del electrodo mediante polarización electroquímica en medio ácido o simplemente con la inmersión del electrodo en la solución. Por ejemplo, el uso del sistema quinona/hidroquinona forma un sistema redox estable sobre la superficie de carbón vítreo, esto se atribuye a la reacción redox del par quinona/hidroquinona. A este método se le llama adsorción física de materiales sensibles al pH (Kahlert, H., 2008).

En el método de electrodeposición de películas de polímeros, se forma una película sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo, un ejemplo es el uso de difenilamina fisisorbida que sufre una reacción oxidativa de electropolimerización para formar polidifenilamina. La película del polímero es fácil de fabricar y su comportamiento muestra una respuesta rápida. Sin embargo, estos electrodos muestran una cierta vida útil después de la cual la superficie debe renovarse. Esto incluye un pulido intensivo de la superficie del electrodo de carbono para eliminar las películas viejas y un nuevo procedimiento de deposición de películas (Kahlert, H., 2008).

Otro método común es la fabricación de electrodos compuestos. El método se basa en inmovilizar micropartículas sobre la superficie del electrodo de carbono y un aglutinante, es un método fácil y, dependiendo del aglutinante, se pueden usar incluso a temperaturas o condiciones químicas severas. No obstante sus ventajas, la capa que se inmovilizó puede ser inestable cuando las soluciones fluyen a través de la superficie del electrodo en condiciones adversas.

Desde el punto de vista potenciométrico, existen los electrodos de quinhidrona (especies ácido base) propuestos por primera vez en 1920 por Biilmann, donde el cambio de pH provoca un cambio en el potencial y esto se registra con una sonda de pH. Las quinhidronas también siguen una reacción redox, de tal manera que la

intensidad de corriente que se obtienen por la oxidación de la hidroquinona será proporcional al pH (Galster, H., 1991).

1.9. Electrodos de polímeros conductores para determinar pH

Los electrodos se eligen de tal manera que sean selectivos y específicos a un determinado analito, o bien que sean capaces de modificar la velocidad de reacción. A través de la incorporación de un modificador superficial apropiado, se intenta ejercer un mayor control sobre sus características electroquímicas e influir no solo en el potencial aplicado sino también en la reactividad superficial, pudiendo preseleccionar o anticipar la respuesta del electrodo modificado hacia especies externas (Pingarrón Carrazón, J. M., y Sánchez Batanero, P., 2003).

Los electrodos modificados por especies que involucran reacciones ácido-base acopladas a reacciones redox (como algunos polímeros conductores), miden la concentración de iones de hidrógeno del medio en función de la interacción y el intercambio de iones entre el polímero y el ion de hidrógeno. El polímero conductor que se encuentra en varios estados de oxidación depende del pH y el cambio de potencial afecta la conductividad, por lo tanto, el cambio en la estructura electrónica medido por diferentes tipos de técnicas electroquímicas se puede utilizar para la medición del pH (Gupta, B., et al., 2010).

Los polímeros conductores típicos incluyen polianilina, polipirrol y politiofenos; estos se pueden inmovilizar mediante electropolimerización sobre la superficie del electrodo de trabajo, también se puede aprovechar este método de deposición para atrapar moléculas biológicas presentes en la solución. Alternativamente, una película polimérica puede depositarse electroquímicamente y luego la especie biológica puede adsorberse o injertarse químicamente en la película; facilitando la transferencia rápida de electrones entre las especies activas y la superficie del electrodo. De esta manera, el polímero conductor actúa como elemento transductor dentro del biosensor (Davis, F., y Higson, S. P. J., 2007).

La Tabla I.5., muestra algunos ejemplos de biosensores que emplean polímeros conductores.

Tabla. I. 5. Dispositivos analíticos que utilizan polímeros conductores.

Transductor	PC	Analito	Bioreceptor	Sensibilidad	$t_{\text{respuesta}}$	LD	IRL	Referencias
Amperométrico	Polipirrol	Triglicérido	Lipasa	-	15 s	25 mg·dL ⁻¹	50-500 mg·dL ⁻¹	Chauhan, R., et al., 2013
Potenciométrico	PANi	Glucosa	Glucosa oxidasa	-	5-10 s	0.5 mM	0.01- 1.0 mM	Zhao, M., et al., 2009
Amperométrico	PANi-Nafion	L-arginina	Ureasa y arginasa	110 nA/(mM·mm ²)	10 s	0.0038 mM	0.07- 0.06 mM	Stasyuk, N., et al., 2012
Sensor potenciométrico	PPPD	Urea	-	34 mV·década ⁻¹	-	1x10 ⁻¹¹ M	2-11 M	Gupta, B., et al., 2010

PPPD= Polietilentriamina; PANi= Polianilina

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Desarrollar, evaluar y optimizar un biosensor amperométrico monoenzimático para la determinación de triglicéridos en muestras alimenticias.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Desarrollar, evaluar y optimizar un transductor amperométrico de pH como base para el desarrollo de un biosensor para determinar triglicéridos.

2.2.2. Desarrollar, evaluar y optimizar un biosensor amperométrico monoenzimático para la determinación de triglicéridos.

2.2.3. Evaluar el desempeño del biosensor desarrollado en una muestra alimenticia real.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

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 , $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_2 \cdot \text{C}_2\text{HO}_4 \cdot 0.5\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ (sal de oxalato verde de malaquita), CH_3COOH , tributirina, Nafion 5% (v/v), lipasa de *Candida rugosa* (E.C. 3. 1. 1. 3) 5.3 U/mg proteína, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-1,4-(OH)}_2$ (hidroquinona) HCl, H_3BO_3 , H_3PO_4 , HNO_3 , CH_3COCH_3 , (Sigma-Aldrich), KCl (J. T. Baker), NaOH (MEYER), H_2SO_4 (Fisher Scientific), Al_2O_3 (Alfa Aesar), goma arábica (grado alimenticio).

3.2. Soluciones

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando las siguientes soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH=7.0 preparada con KH_2PO_4 + $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) en KCl $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH=7.0 preparada con KH_2PO_4 + $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) en KCl $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ con goma arábica al 4%.

Solución amortiguadora Britton Robinson de pH=2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 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 lipasa, nafion y PBS pH=7.0.

3.3. Instrumentación

- Micropipeta, Eppendorf de volumen variable 10-100 μL .
- Micropipeta, Eppendorf de volumen variable 100-1000 μL .
- Agitador magnético

- Baño ultrasónico, Cole-Parmer 8890R-MT.
- Electrodo combinado de pH de vidrio Orion 910600.
- Potenciómetro pH 510 Oakton.
- Celda electroquímica: La celda de trabajo está formada por un electrodo de trabajo de carbón vítreo, BASi MF-2012; electrodo de referencia Ag/AgCl, BASi MF-2052 y un electrodo auxiliar Pt, BASi MF-2013.
- Los estudios de voltametría lineal y diferencial de pulsos se obtuvieron con un Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT302N, FRA32M con software Nova 2.0.
- Los estudios de cronoamperometría se realizaron en un detector Amperométrico LC-4C, Bioanalytical Systems.

3.4. Tratamiento del electrodo de trabajo

Con la finalidad de conseguir una superficie del electrodo de trabajo libre de impurezas y limpia (acabado espejo), es necesario realizar un proceso de pretratamiento para obtener una respuesta electroquímica reproducible. El electrodo de carbón vítreo se pule sobre un paño con una solución de alúmina al 1% y se enjuaga con agua desionizada.

Posteriormente, se coloca el electrodo durante un minuto en el baño ultrasónico en cada una de las siguientes soluciones de manera sucesiva: NaOH 2.0 mol·L⁻¹, HNO₃ 1:1 agua desionizada y acetona 1:1 agua desionizada. Entre cada una se enjuaga el electrodo con agua desionizada y se retira el exceso de agua con papel (Wang, X., et al., 2007; Fnag, C., et al., 1999).

La activación electroquímica es el mejor método para tratar el electrodo de carbón vítreo, ya que esto proporciona una superficie reproducible y una mejor transferencia de electrones. Esto se realiza haciendo cinco barridos consecutivos de voltametría cíclica en sentido anódico, en una solución de H₂SO₄ 0.1 mol·L⁻¹, en el intervalo de potencial de 1.2 V a -1.2 V; velocidad de barrido 100 mV·s⁻¹.

Finalmente se enjuaga el electrodo con agua desionizada y se deja secar a temperatura ambiente para su posterior uso (Shi, K. y Shiu, K. K., 2002).

3.5. Metodología

El dispositivo propuesto en este trabajo consta de un electrodo de trabajo de carbón vítreo sobre el cual se inmoviliza la enzima lipasa y una especie redox sensible a los cambios de pH, como se muestra en la Figura III.6.

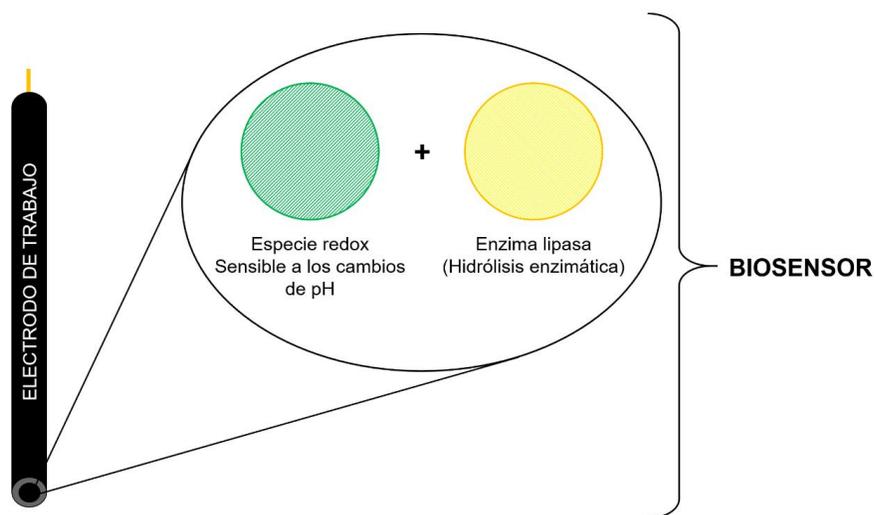


Figura III.6. Esquema de los componentes del biosensor amperométrico monoenzimático para determinar triglicéridos.

La metodología propuesta para la construcción y evaluación del biosensor se desarrolla en tres etapas. La primera etapa corresponde a la construcción del transductor amperométrico, la evaluación de su respuesta con respecto al pH y su optimización mediante un diseño Taguchi L_9 . La segunda etapa se basó en la construcción del biosensor, la evaluación de su comportamiento y su optimización empleando un diseño de Taguchi L_9 . La tercera etapa se basó en evaluar el biosensor en una muestra real.

Etapa 1

3.5.1. Evaluación del comportamiento electroquímico de hidroquinona (HQ)

Se evaluó el comportamiento electroquímico de la hidroquinona en un potenciostato mediante estudios voltamperométricos. En una solución amortiguadora de fosfatos $\text{pH}=7.0$, $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ que contiene HQ $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, sobre la cual se hacen adiciones sucesivas de HCl $4.4 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para provocar cambios del pH. A partir de estos voltamperogramas se generan curvas de calibración realizando cortes a diferentes potenciales y se obtienen los parámetros analíticos.

Los potenciales en los que se observó una mayor sensibilidad se evalúan cronoamperométricamente, en un sistema igual al descrito en el párrafo anterior, con la finalidad de encontrar el potencial de trabajo adecuado.

3.5.2. Evaluación del esquema de detección

Para evaluar el esquema de detección propuesto, se realizan estudios electroquímicos de la hidroquinona, lipasa y tributirina en solución. Se realizan mediciones por voltamperometría empleando 25 mL de una solución amortiguadora de fosfatos $\text{pH}=7.0$, $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ que contiene HQ $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y 15.9 U enzimáticas de lipasa, sobre esta solución se realizan adiciones sucesivas de TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

De los registros voltamperométricos se obtienen las curvas de calibración haciendo cortes diferentes a diferentes potenciales, para encontrar el potencial óptimo de trabajo y los parámetros analíticos, de igual manera a partir de los registros cronoamperométricos se obtienen curvas de calibración a diferentes potenciales impuestos.

3.5.3. Evaluación del comportamiento electroquímico de verde malaquita en solución

Para estudiar el comportamiento electroquímico del verde malaquita se utiliza la técnica de voltamperometría diferencial de pulsos, empleando soluciones amortiguadoras Britton Robinson $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de diferentes valores de pH con VM $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

A partir de estos registros, se realiza la curva de calibración haciendo cortes a distintos valores de potencial, y se obtienen los parámetros analíticos.

3.5.4. Estudio del comportamiento electroquímico de la electropolimerización de verde malaquita sobre carbón vítreo

Para estudiar la reacción de electropolimerización de VM, la celda electroquímica se sumerge en una solución de VM $1 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y se realizan diez barridos en voltametría cíclica en sentido anódico en el intervalo de potencial de 0.0 V a 1.2 V , con una velocidad de barrido de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.5.5. Evaluación del intervalo de potencial de trabajo para la electropolimerización de verde malaquita

Con la finalidad de encontrar el mejor intervalo de potencial para electropolimerizar la especie redox sobre el electrodo de trabajo, se realizan dos barridos por voltametría cíclica en sentido anódico en una solución de verde malaquita $1 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en los intervalos de potencial 0.0 V a 1.0 V , 0.0 V a 1.1 V , 0.0 V a 1.2 V y 0.0 V a 1.3 V .

3.5.6. Electropolimerización de verde malaquita en medio ácido sobre una membrana de Nafion

Para inmovilizar el verde malaquita sobre el electrodo de trabajo, se realiza la electropolimerización colocando una gota de 5 μL de una solución de Nafion alcohólica al 5% y se deja secar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Luego de que el electrodo se encuentra listo para realizar la electropolimerización, la celda electroquímica se sumerge en 10 mL de una solución de verde malaquita $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, y se realizan 20 barridos consecutivos mediante voltametría cíclica en un intervalo de potencial de 0.0 a 1.2 V; con una velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (Chen S. M., et al., 2007).

Terminados los ciclos, se lava la celda electroquímica con agua desionizada y el electrodo de trabajo se sumerge durante diez minutos en PBS $\text{pH} = 7.0$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para su posterior uso.

Después de la formación del polímero, se evalúa su respuesta en soluciones amortiguadoras Britton Robinson $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de diferentes valores de pH mediante voltametría cíclica, en el intervalo de potencial de 0.0 V a 1.2 V utilizando una velocidad de barrido de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.5.7. Evaluación de la respuesta electroquímica del electrodo electropolimerizado

Con la finalidad de medir como responde el electrodo que contiene el poli (verde malaquita) con respecto a la disminución del pH, se realizan barridos por voltametría cíclica en sentido anódico en PBS $1 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre la cual se realizan adiciones sucesivas de HCl $4.42 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para monitorear los cambios de intensidad de corriente en diferentes valores de potencial.

3.5.8. Optimización del transductor

Para optimizar del transductor, se realiza un diseño de experimentos de Taguchi, evaluando como variable de salida la sensibilidad analítica del transductor, respecto a las variables de entrada: concentración de verde malaquita (2.0×10^{-4} - 2.0×10^{-3} mol·L⁻¹), velocidad de barrido (20 - 100 mV·s⁻¹), número de ciclos (5 - 25) y el volumen de Nafion (5 - 15 μL).

El diseño de experimentos se realizó mediante un diseño Taguchi L₉ de tres niveles con cuatro factores. El transductor se prepara siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5.6. con los niveles propuestos por el diseño experimental que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla III.6. Diseño de Taguchi del transductor

Diseño Taguchi L₉ (3⁴)			
Factores y niveles			
[VM, M]	Velocidad de barrido (mV·s⁻¹)	Número de ciclos	Volumen de Nafion (μL)
2.0x10 ⁻⁴	20	5	5
2.0x10 ⁻⁴	60	15	10
2.0x10 ⁻⁴	100	25	15
1.1x10 ⁻³	20	15	15
1.1x10 ⁻³	60	25	5
1.1x10 ⁻³	100	5	10
2.0x10 ⁻³	20	25	10
2.0x10 ⁻³	60	5	15
2.0x10 ⁻³	100	15	5

La sensibilidad analítica se determina a partir de los respectivos registros de voltamperometría diferencial de pulsos de la evaluación del transductor en una

solución amortiguadora de fosfatos (PBS) $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.0$ sobre la cual, se realizan adiciones sucesivas de HCl $4.42 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.5.9. Parámetros analíticos del transductor

Con base en las condiciones óptimas donde se encuentra la mayor sensibilidad, se evalúa la reproducibilidad del transductor realizando el experimento por triplicado.

Terminados los ciclos de electropolimerización, se lava la celda electroquímica con agua desionizada y el transductor se sumerge durante diez minutos en PBS $\text{pH}=7.0$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para su uso. Posterior a este paso se evalúa su respuesta mediante voltametría diferencial de pulsos en una solución amortiguadora de fosfatos $\text{pH}=7.0$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre la cual se realizan adiciones sucesivas de HCl $4.42 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Etapa 2

3.5.10. Evaluación de la respuesta del biosensor

Después de electropolimerizar el electrodo de trabajo, se prepara un coctel enzimático con 8.48 U de lipasa, Nafion al 0.71% y 120 uL de PBS $\text{pH}=7.5$; $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Se coloca 1 gota de 5 uL del cóctel enzimático sobre el electrodo de trabajo previamente electropolimerizado y se deja secar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Posteriormente se sumerge el biosensor durante 20 minutos en una solución de PBS $\text{pH}=7.5$; $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Transcurrido el tiempo, se enjuaga el biosensor con agua desionizada y la celda electroquímica se evalúa mediante voltametría cíclica y voltametría diferencial de pulsos en una solución de PBS $\text{pH}=7.5$; $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A esta solución se realizan adiciones sucesivas de 5 uL de aceite de oliva.

3.5.11. Optimización del biosensor

Después de obtener las condiciones óptimas del transductor, se optimiza la composición del coctel enzimático, evaluando las variables de entrada: % Nafion v/v (0.35-1.1 %), unidades enzimáticas de lipasa (4.55-14.15 UI) y la cantidad del coctel enzimático que se coloca sobre el transductor (5-20 μL).

El biosensor se prepara siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5.10. Con las cantidades propuestas por el diseño experimental que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla III.7. Diseño de Taguchi del biosensor

Diseño Taguchi L₉ (3³)		
Factores y niveles		
%Nafion (v/v)	Lipasa (UI)	Cantidad de cóctel enzimático (μL)
0.35	4.55	5.0
0.35	9.35	12.5
0.35	14.15	20.0
0.73	4.55	12.5
0.73	9.35	20.0
0.73	14.15	5.0
1.10	4.55	20.0
1.10	9.35	5.0
1.10	14.15	12.5

La sensibilidad analítica se determina a partir de los respectivos registros obtenidos mediante voltametría diferencial de pulsos de la evaluación del biosensor en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ que contiene goma arábica al 4%, sobre la cual se realizan adiciones sucesivas de 10 μL de TB $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

3.5.12. Parámetros analíticos del biosensor

Con la finalidad de obtener los principales parámetros analíticos del biosensor optimizado, se obtuvieron curvas de calibración de $I/\mu\text{A}$ vs $[\text{TB}]/\text{mM}$ a partir de los voltamperogramas de diferencial de pulsos de 5 mL de PBS $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH=7.0 que contiene goma arábica al 4% con adiciones sucesivas de 10 μL de tributirina $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Para realizar la voltametría diferencial de pulsos se utilizó una ventana de potencial de 0.0 a 1.2 V; paso: 0.005 V; amplitud de modulación: 0.025 V; tiempo de modulación: 0.05 s; tiempo de intervalo: 0.49648 s; número estimado de puntos: 310 y un rango de escaneo de 0.010071 V/s.

Etapa 3

3.5.13. Análisis de triglicéridos en muestras reales con el biosensor

El análisis de triglicéridos se realizó con una muestra comercial de aceite de aguacate, el criterio para elegir esta muestra fue por su alto contenido de lípidos.

Se preparó una solución con 295.9 μL de la muestra aforados a 10 mL con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH=7.0 que contiene goma arábica al 4%.

Para llevar a cabo el análisis de la muestra real con el biosensor se utilizó el método de adición patrón mediante mediciones de voltamperometría diferencial de pulsos. La celda electroquímica se sumerge en 5 mL de PBS $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH=7.0 que contiene goma arábica al 4%, se hace una primera adición de 10 μL de la solución de la muestra y otras dos adiciones de 10 μL de la solución de tributirina $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Evaluación del comportamiento electroquímico de hidroquinona

Las quinhidronas tienen asociada una reacción redox que involucra 2 electrones y 2 protones como se muestra en la Figura IV.7. Dicha reacción redox implica una dependencia del potencial del sistema respecto al pH conforme la ley de Nernst correspondiente a la Ecuación 1.

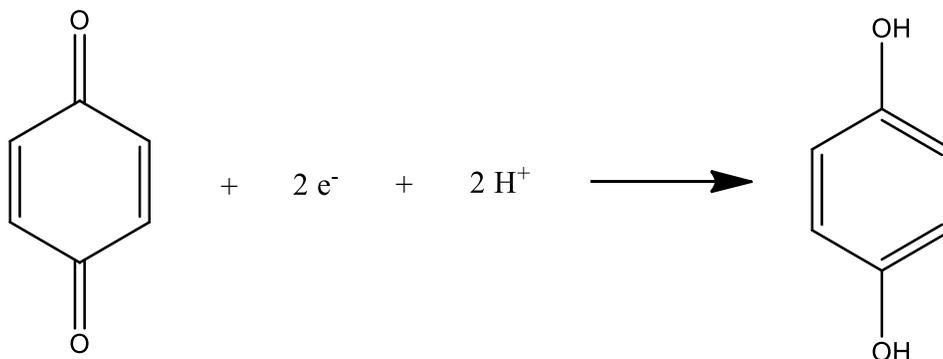


Figura IV.7. Reacción de reducción y oxidación de la quinona/hidroquinona. Modificado de Bailey, S. I. y Ritchie, I. M. (1985).

$$E = E_{Q/H_2Q}^{\circ} + \frac{0.059}{2} \log \left(\frac{[Q]}{[H_2Q]} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

Conforme a la reacción de óxido-reducción del sistema quinona-hidroquinona y el Diagrama de Pourbaix de la Figura IV.8., existen cambios de potencial del sistema dependientes del pH que se verán reflejados voltamperométricamente en cambios de los potenciales de los picos de oxidación y reducción; así como de la intensidad de corriente.

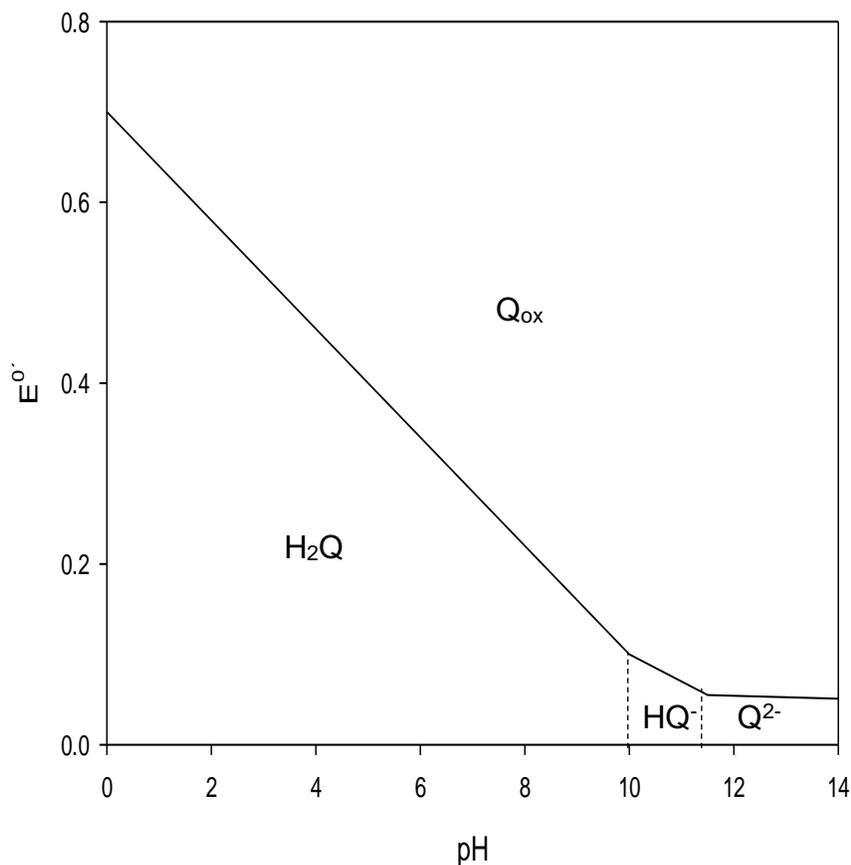
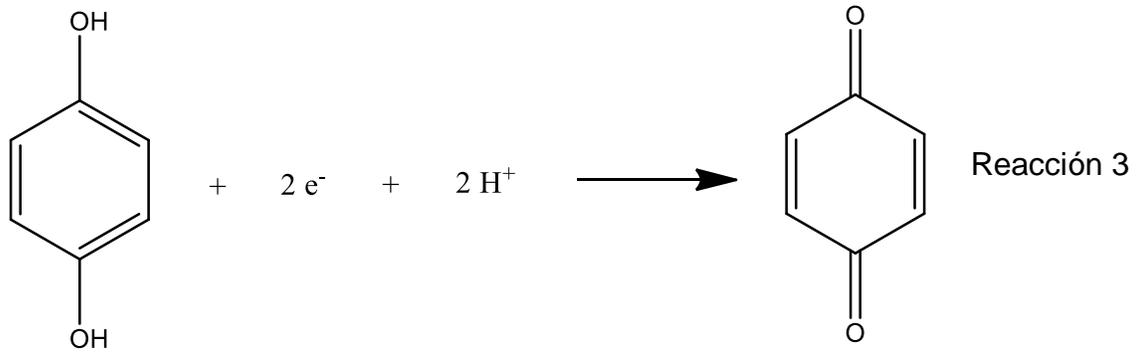
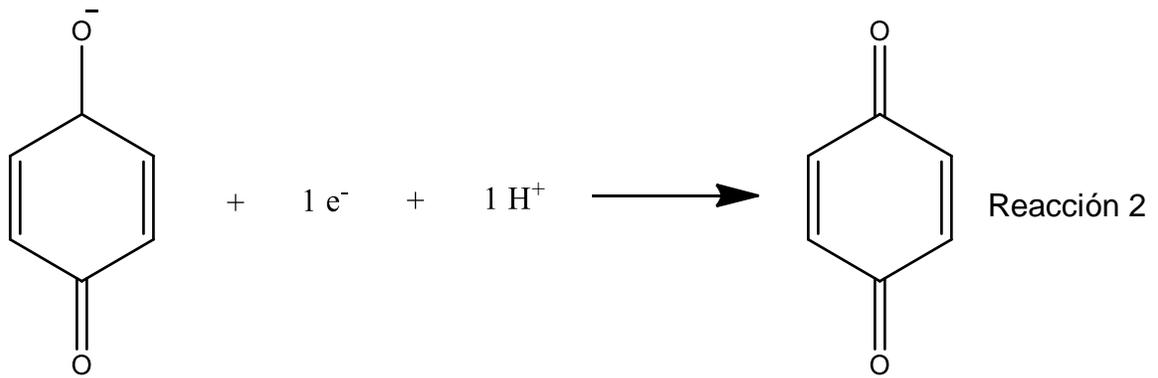
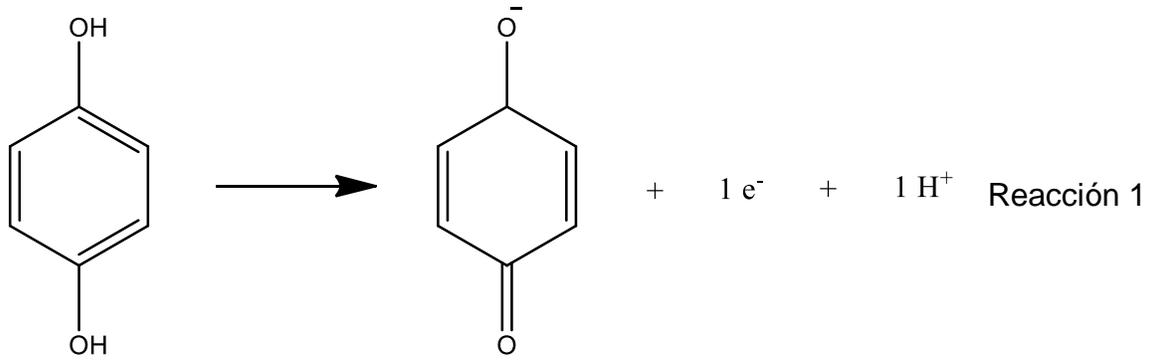


Figura IV.8. Diagrama de Pourbaix del sistema Q/H₂Q.

Conforme a lo anterior la Figura IV.9., muestra el comportamiento electroquímico de la hidroquinona respecto al cambio de pH. En la imagen se observan dos picos de oxidación, el primero corresponde a la reacción de oxidación de hidroquinona (H₂Q) al radical fenoxi (HQ[•]) (Reacción 1), a medida que el pH disminuye el radical fenoxi se desestabiliza y se pierde la señal, por lo cual la intensidad de corriente del pico I disminuye (Reacción 1 y 2).

El pico II corresponde a la formación directa de la para-benzoquinona (Q) (Reacción 3), al ser un sistema de dos electrones su intensidad de corriente incrementa y el potencial se desplaza a valores mayores al disminuir el pH como se observa en el diagrama de Pourbaix de la Figura IV.8.



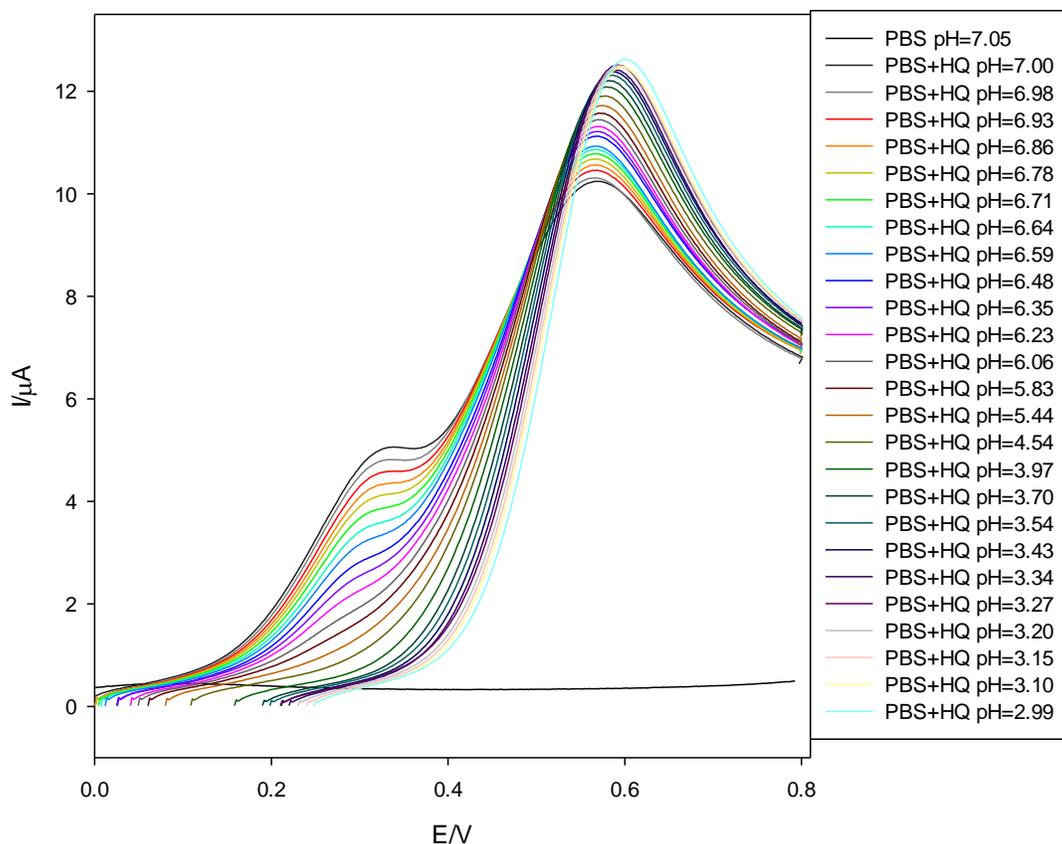


Figura IV.9. Voltamperogramas lineales (velocidad de barrido: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0.0 a 0.8 V). en función del pH. En 25 mL de PBS $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH=7.0 con H_2Q $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, con adiciones sucesivas de HCl $4.4 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Para hacer el análisis de los potenciales de trabajo, se prefieren los potenciales comprendidos entre 0.2 V y 0.4 V, donde se observan los cambios más significativos de la intensidad de corriente; además, al trabajar en potenciales menores disminuye la probabilidad de oxidar interferentes que pueda contener la muestra.

Los parámetros obtenidos de las curvas de calibración de la Tabla IV.8., muestran que el potencial adecuado de trabajo es 0.3 V, ya que a este potencial se obtiene la mayor sensibilidad voltamperométricamente.

Tabla IV.8. Parámetros analíticos obtenidos a partir de voltamperometría lineal

E (V)	r²	m (μA/pH)	IRL (pH)
0.20	0.99	1.05	6.23 - 7.0
0.30	0.99	3.08	6.23 - 7.0
0.40	0.99	1.42	5.83 - 7.0

Realizando el cronoamperograma al potencial de trabajo óptimo de 0.3 V (Figura IV.10 a), se observa que al disminuir el pH de la solución evaluada la intensidad de corriente disminuye. Esto quiere decir que el sensor es sensible a los cambios voltamétricos y cronoamperométricos.

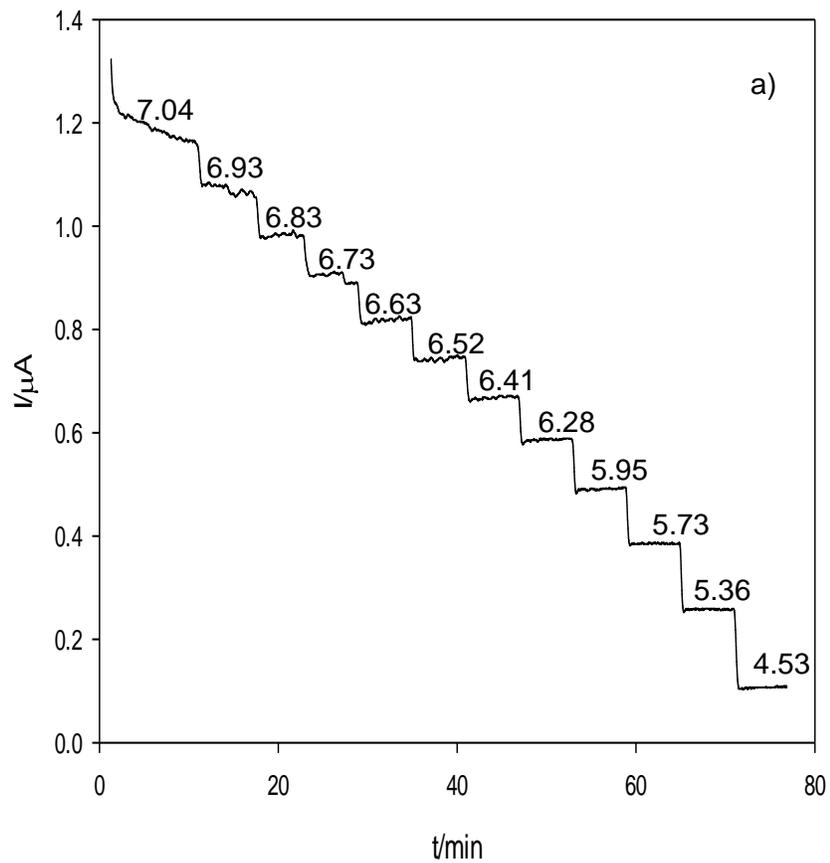


Figura IV.10. a) Cronoamperograma en PBS $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH=7.0 con HQ $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; con adiciones sucesivas de HCl $4.4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cada 6 minutos. Rango 5.0 μA , Filtro 0.02 Hz, potencial 0.3 V

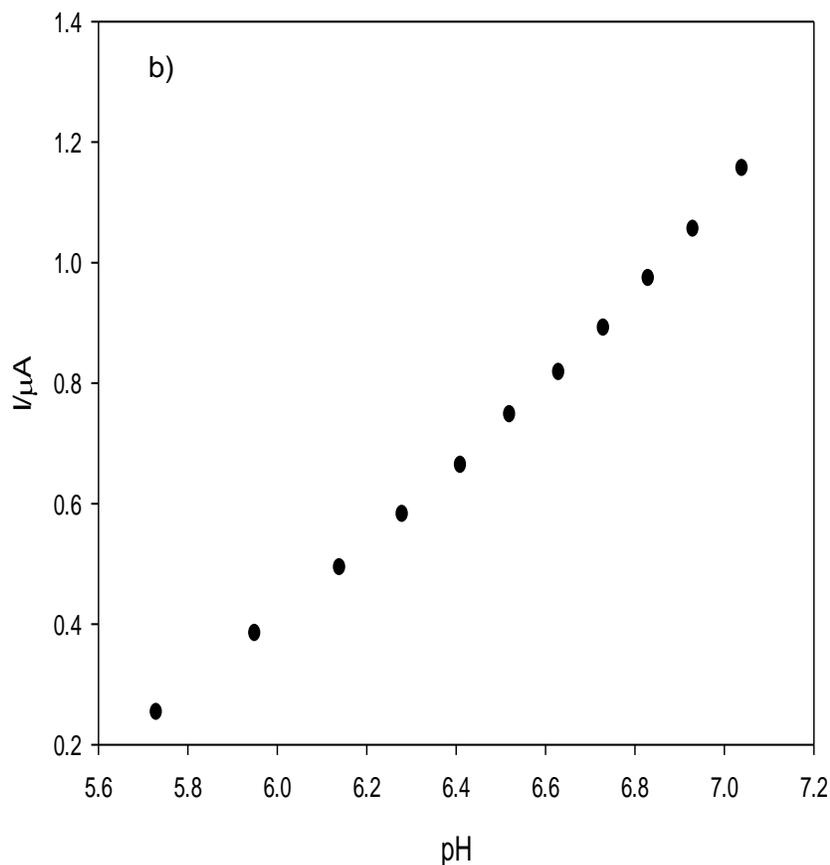


Figura IV.10. a) Cronoamperograma en PBS $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH=7.0 con HQ $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; con adiciones sucesivas de HCl $4.4 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cada 6 minutos. Rango 5.0 μA , Filtro 0.02 Hz, potencial 0.3 V y b) curva de calibración a 0.3 V.

A partir de estos resultados, se realizó la curva de calibración (Figura IV. 10 a), obteniéndose los parámetros mostrados en la Tabla IV.9., una sensibilidad de $0.705 \mu\text{A}/\text{pH}$ y un IRL $7.04 - 5.95$, adecuado para realizar los experimentos en el intervalo óptimo de trabajo de la enzima lipasa (Ribeiro, B. D., 2011), en este sentido la hidroquinona se puede utilizar en el desarrollo de un transductor amperométrico como base para la construcción de un biosensor monoenzimático de triglicéridos.

Tabla IV.9. Parámetros analíticos de la curva de calibración obtenida del registro cronoamperométrico de la figura 4.

r^2	m ($\mu\text{A}/\text{pH}$)	IRL (pH)
0.995	0.705	7.04-5.95

Estos resultados permitieron establecer que se puede emplear un sensor amperométrico de pH con especies redox y, que se puede medir mediante voltamperometría y cronoamperometría.

4.2. Evaluación del esquema de detección

Una vez que se evaluó el comportamiento de la especie redox para poder registrar los cambios de pH amperométricamente, se estudió cómo se comporta el sistema cuando hay lipasa y tributirina presente en la solución.

En la Figura IV.11., se observan los desplazamientos en el potencial y los cambios en la intensidad de corriente al aumentar la cantidad de triglicéridos agregados en la solución. Esto indica que el sistema monoenzimático se puede medir voltamperométricamente y que no afecta la presencia de lipasa y triglicéridos en el medio; es decir, el esquema de detección funciona adecuadamente.

En estos resultados no se observan los dos picos de oxidación que se mostraban en la Figura IV.9. Considerando que en esta solución están presentes la lipasa y los triglicéridos, la presencia de un solo pico de oxidación y su desplazamiento a potenciales más anódicos cuando el pH disminuye se atribuye a una posible adsorción de la enzima o del triglicérido sobre el electrodo de trabajo.

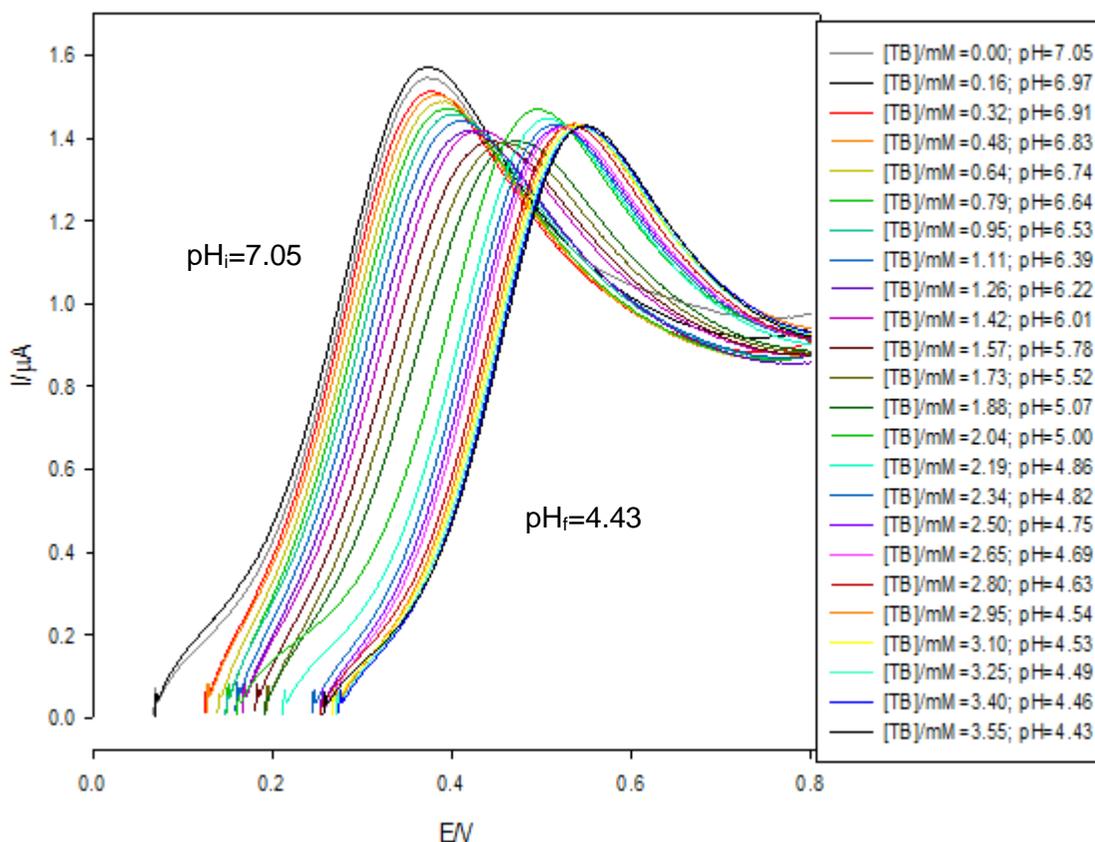


Figura IV.11. Voltamperogramas lineales; velocidad de barrido: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0.0 a 0.8 V. En 25 mL de PBS $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH=7.0 + HQ $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 15.9 U enzimáticas con adiciones sucesivas de $40 \mu\text{L}$, TB $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

De acuerdo con los datos obtenidos de las curvas de calibración de los voltamperogramas, la Tabla IV.10. muestra una mayor sensibilidad al potencial de trabajo de 0.3 V para este sistema y muestra un IRL de 0.16 – 2.04 mM de tributirina.

Tabla IV.10. Parámetros analíticos obtenidos a partir de las curvas de calibración de voltamperometría lineal.

E (V)	r²	m ($\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$)	IRL (mM)
0.2	0.99	-0.20	0.16 - 1.73
0.3	0.99	-0.43	0.16 - 2.04
0.4	0.98	-0.08	0.48 - 1.11
0.5	0.97	0.07	0.32 - 1.11
0.6	0.99	0.01	0.16 - 0.64
0.7	0.89	0.02	0.48 - 0.95
0.8	0.94	-0.20	0.16 - 0.48

Con los resultados obtenidos se demuestra que las quinonas son especies sensibles a los cambios de pH en la solución que se encuentran, generando un cambio en la intensidad de corriente al potencial de trabajo, por lo tanto se pueden utilizar en el desarrollo del transductor.

En el sistema estudiado que contiene hidroquinona, lipasa y triglicéridos se encuentra una respuesta proporcional a la concentración de TG; sin embargo, para realizar el biosensor es necesario inmovilizar la especie redox sensible a los cambios de pH sobre la superficie del electrodo de trabajo, lo cual en este caso no es posible, ya que la hidroquinona es una especie muy soluble en medio acuoso. En este sentido se propone el uso de otra especie con un comportamiento electroquímico similar que sea susceptible de inmovilizarse.

4.3. Evaluación del comportamiento electroquímico de verde malaquita en solución

El verde malaquita es una especie que tiene asociada una reacción redox que intercambia 2 electrones, como se muestra en la Figura IV.12.

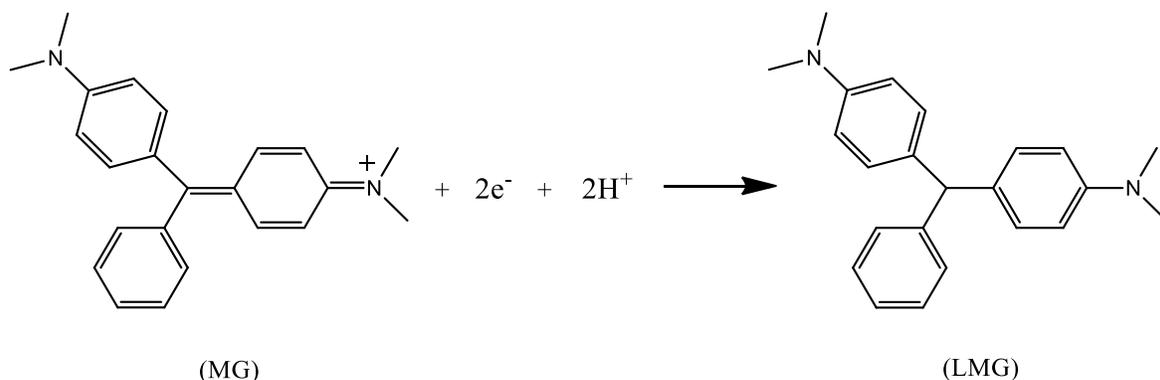


Figura IV.12. Reacción redox de verde malaquita. Modificado de Mitrowska, K., et al. (2005).

En la Figura IV.15., se observan cambios de la respuesta de intensidad de corriente y el potencial de los picos de oxidación y reducción del verde malaquita en solución, es decir, los resultados muestran una clara dependencia de la respuesta voltamperométrica con respecto al pH debido a los cambios en la abundancia relativa de las diferentes especies ácido base (verde malaquita, verde malaquita-carbinol; Figura IV.13.). Particularmente en pH 2.09 es importante resaltar dos procesos de reducción que están asociados a la electropolimerización de VM.

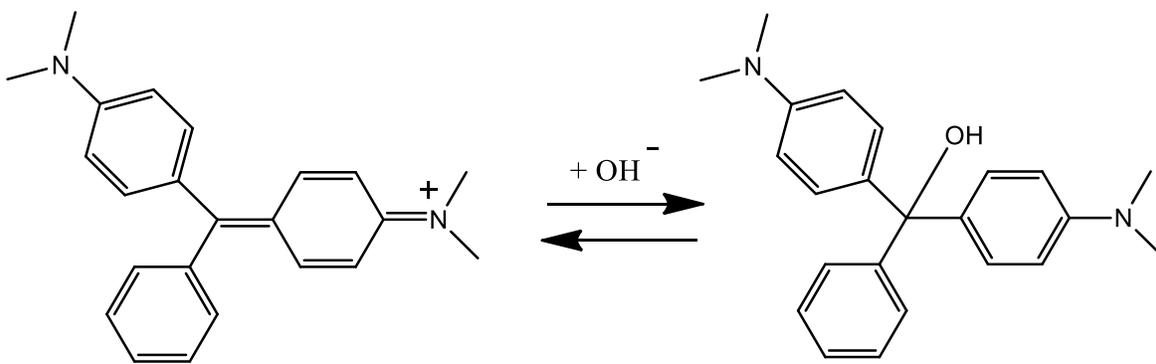


Figura IV.13. Especies ácido base de verde malaquita. Modificado de Ghodbane, I., et al. (2018).

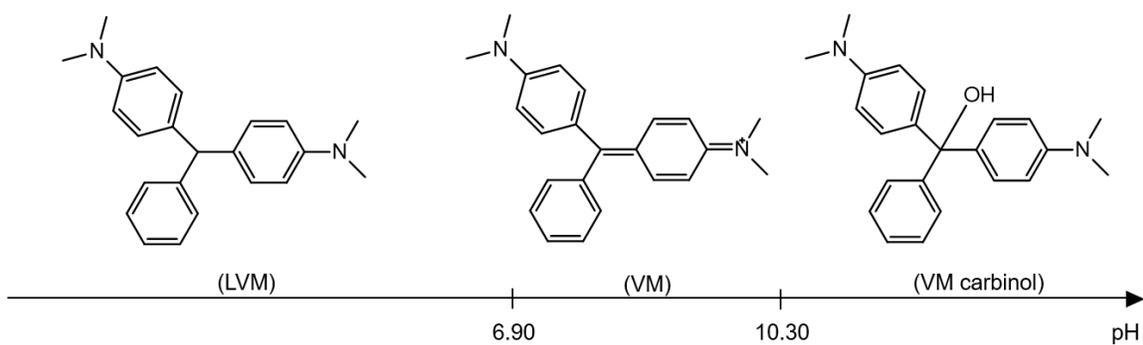


Figura IV.14. Diagrama lineal de zonas de predominio de verde malaquita con base en sus valores de pKa. Modificado de Ghodbane, I., et al. (2018) y Mitrowska, K., et al. (2005).

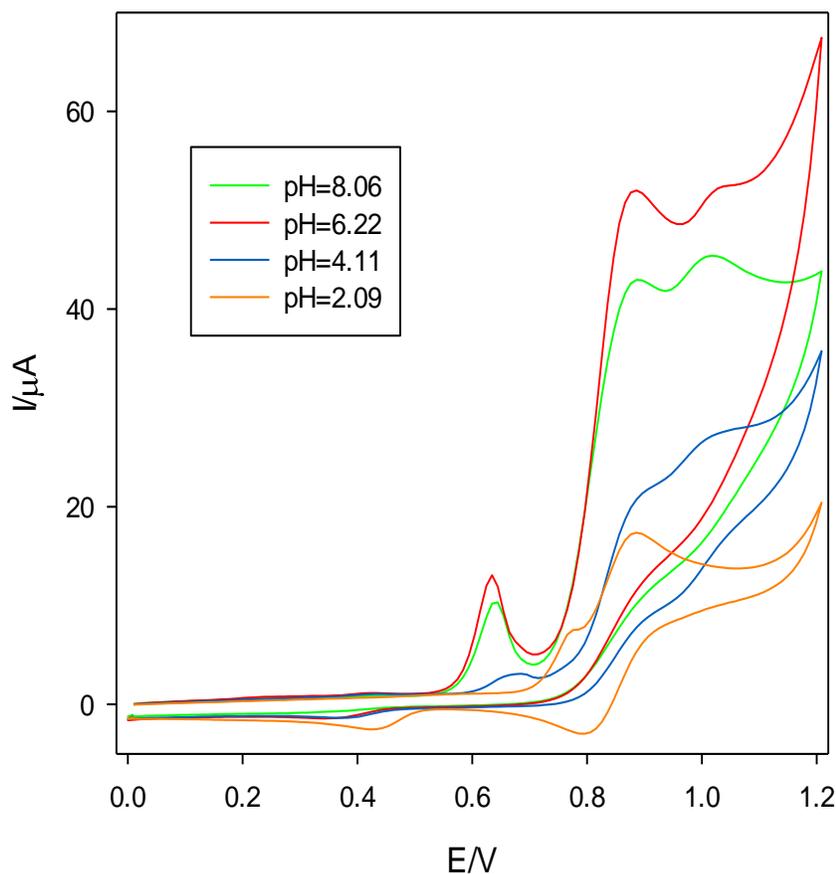


Figura IV.15. Voltamperogramas cíclicos en sentido anódico; de verde malaquita $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en soluciones amortiguadoras Britton Robinson $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de diferentes valores de pH. Velocidad de barrido: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0.0 a 1.2 V. *Tratamiento del electrodo entre cada medición.

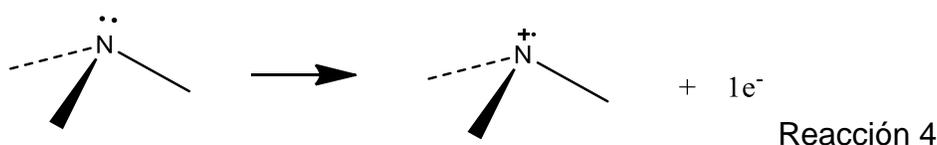
La oxidación electroquímica de VM a $\text{pH}=2.09$ (línea naranja) conduce a la formación de leuco verde malaquita (forma oxidada), caracterizada por un comportamiento cuasi-reversible $2e^-$, $2H^+$. Los picos de oxidación y reducción que aparecen aproximadamente en 0.8 V y 0.9 V son el par redox del VM en solución. Los picos que aparecen entre 0.4 V y 0.8 V corresponden al par redox del poli (verde malaquita).

La línea azul muestra el comportamiento obtenido a pH=4.11, aún se observa la oxidación del pH anterior (aproximadamente a 0.9 V) y el pico de reducción tiene una menor intensidad de corriente. De igual manera se observan otros picos de oxidación entre 0.6 V y 1.0 V asociados a las formas del verde malaquita.

La evaluación de VM a pH=6.22 se muestra en el voltamperograma cíclico de color rojo, se observan dos picos de oxidación de verde malaquita en solución aproximadamente en 0.8 V y, a 1.0 V el pico del pH anterior. El pico aproximadamente en 0.6 V corresponde la oxidación de la forma carbinol del verde malaquita sobre el electrodo de trabajo (adsorción) y en 0.4 V el pico de reducción del par redox de verde malaquita.

En valores de pH superiores al pka del VM (pH=8.06 línea verde), se produce una reducción de VM a carbinol, este producto se puede oxidar para generar VM y el ion hidroxilo

El pico de oxidación cercano a 1.0 V es el resultado de la oxidación del par libre de electrones del nitrógeno amínico para formar una especie de radical (Reacción 4), Zhu, D., et al., (2016).



A partir de los registros de voltametría cíclica de la Figura IV.16., se obtuvieron curvas de calibración realizando cortes a diferentes potenciales para obtener los parámetros analíticos que se muestran en la Tabla IV.11.

Tabla IV.11. Parámetros analíticos obtenidos de las curvas de calibración a diferentes potenciales

E (V)	m ($\mu\text{A}\cdot\text{pH}^{-1}$)	r^2	IRL (pH)
0.2	0.08	1.00	2.09 – 6.22
0.4	0.10	0.93	2.09 – 6.22
0.6	1.45	0.79	2.09 – 6.22
0.8	3.83	0.71	2.09 – 6.22
1.0	0.90	0.97	2.09 – 6.22
1.2	11.41	0.97	2.09 – 6.22

Hay que tener en cuenta que la mayor sensibilidad se encuentra en el potencial de 1.2 V; sin embargo, sería preferible trabajar en 0.6 V, ya que existe una menor posibilidad de oxidar especies interferentes que pueda contener una muestra.

4.4. Estudio del comportamiento electroquímico de la electropolimerización de verde malaquita sobre carbón vítreo

La Figura IV.16., muestra en la línea de color negro el primer barrido de voltametría cíclica en sentido anódico del verde malaquita en medio ácido. El pico I corresponde a su oxidación en solución, el pico II pertenece a la reducción del verde malaquita en solución y el pico III se asocia a la reducción del poli (verde malaquita).

En el segundo barrido (línea roja) se observa la aparición de un pico IV atribuido a la oxidación del poli (verde malaquita). La intensidad de corriente del pico I disminuye al consumirse el VM de la solución, mientras que los picos III y IV se incrementan al aumentar el número de ciclos (línea azul), lo que confirma la formación del polímero de verde malaquita sobre el electrodo de trabajo.

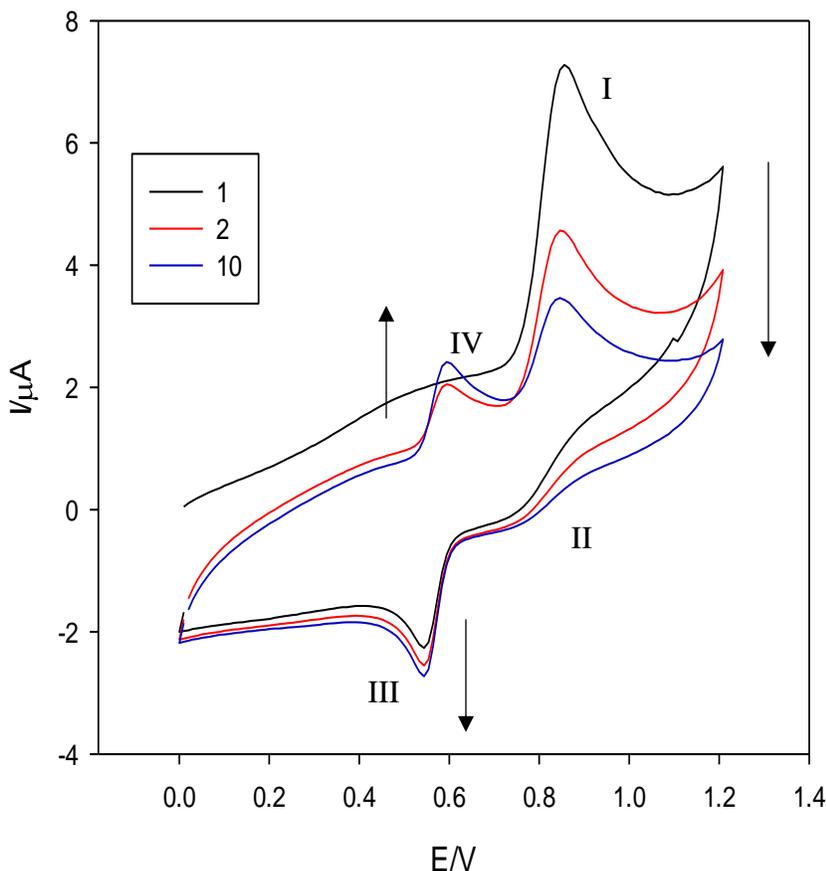


Figura IV.16. Voltamperogramas cíclicos en sentido anódico de verde malaquita $1 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Velocidad de barrido: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0.0 a 1.2 V.

Los procesos químico-electroquímicos asociados al proceso de electropolimerización del VM se presentan en la Figura IV.17. Primero se oxida el verde malaquita (estructura 1) electroquímicamente a un radical catiónico (reacción 1, estructura 2). Este radical de la estructura 2, también puede formar la estructura de resonancia 3. La estructura 3, puede conducir a la dimerización de cola a cola electrofílica de dos de estas especies de radicales para dar el dímero de la estructura 4. Esto se puede convertir en la especie de poli verde malaquita de la

estructura 5, mediante una oxidación electroquímica de $2e^-$, $2H^+$ (Zhu, D., et al., 2016).

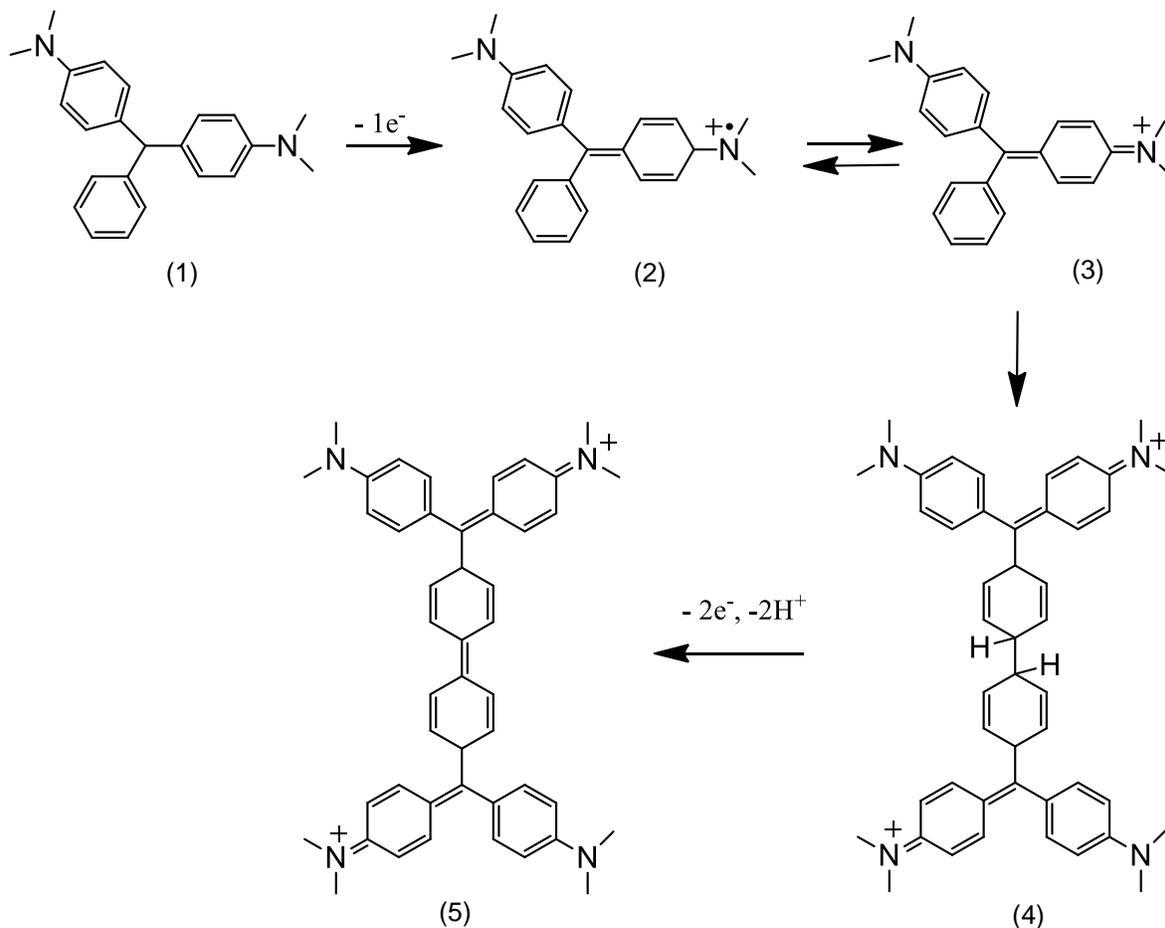


Figura IV.17. Proceso de electropolimerización de verde malaquita. Modificado de Zhu, D., et al., (2016).

Debido a que se utiliza una membrana de Nafion (carga negativa) sobre el electrodo de trabajo para electropolimerizar VM (carga positiva), este interactúa con el polímero formando interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, lo que permite una mayor estabilidad de la película formada. La Figura IV.18., muestra la representación de estas interacciones.

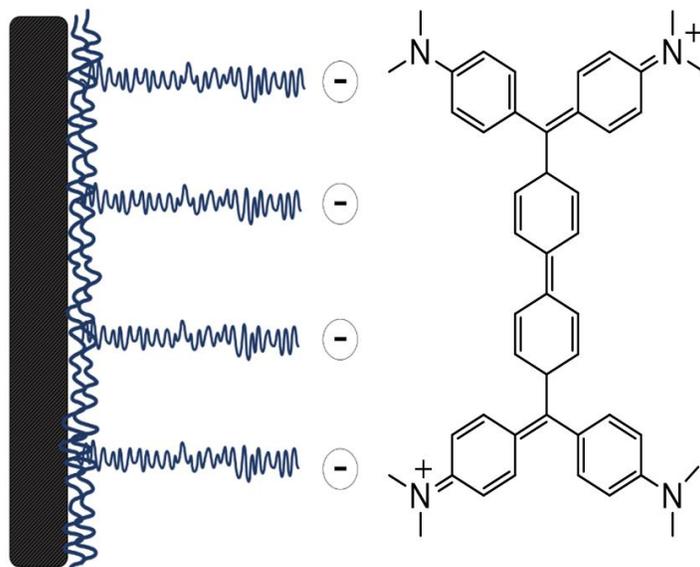


Figura IV.18. Interacciones de VM con Nafion sobre el electrodo de trabajo. Modificado de Xu, M., et al. (2012).

4.5. Evaluación del intervalo de potencial de trabajo para la electropolimerización de verde malaquita

Considerando el mecanismo de electropolimerización, al aumentar el potencial de oxidación se favorece la formación del p(VM). Con la finalidad de encontrar el mejor intervalo de potencial para electropolimerizar la especie redox sobre el electrodo de trabajo, se amplió el potencial máximo hasta 1.3 V. En la Figura IV.19., se observa el primer barrido de la voltametría cíclica en sentido anódico de verde malaquita en medio ácido, similar a la Figura IV.16., se observan los picos de oxidación y reducción del verde malaquita en solución y la reducción del poli (verde malaquita).

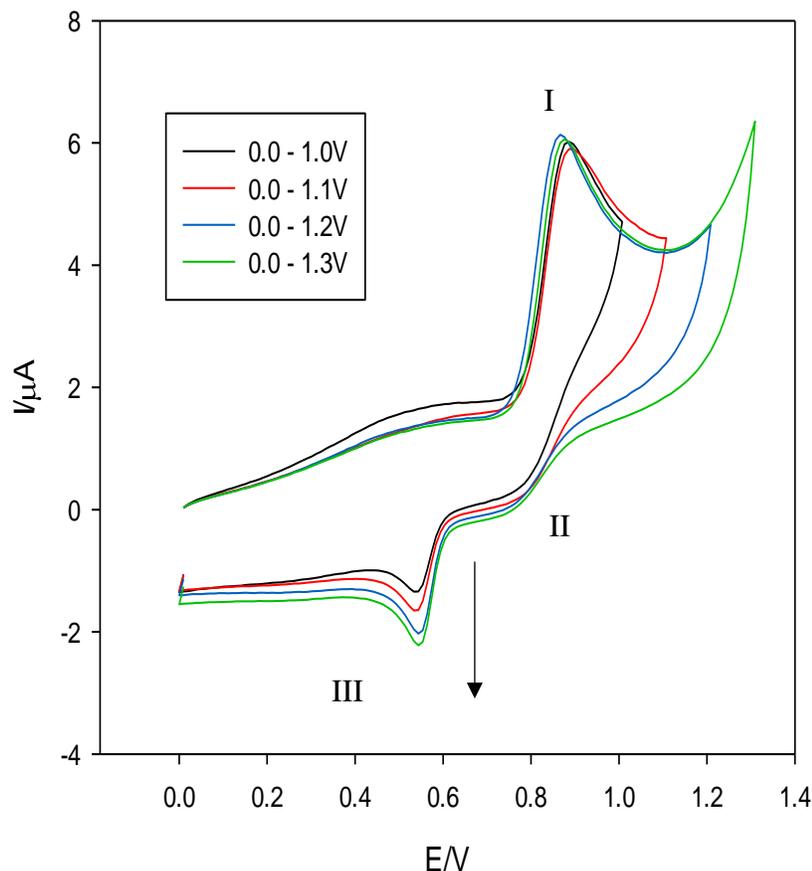


Figura IV.19. Primer barrido de voltametría cíclica en sentido anódico de verde malaquita $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en los intervalos de potencial 0.0 a 1.0 V, 0.0 a 1.1 V, 0.0 a 1.2 V y 0.0 a 1.3 V; velocidad de barrido $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

La Figura IV.20., muestra el segundo barrido de VM. Se observa que en un mayor intervalo de potencial (por ejemplo, 0.0 a 1.3 V, línea verde) se incrementa la polimerización del verde malaquita sobre el electrodo de trabajo. Esto se puede observar en el aumento de la intensidad de corriente de los picos III y IV de reducción y oxidación del poli (verde malaquita).

Debido a que el electrodo de trabajo que se utiliza en el desarrollo del biosensor es de carbón vítreo, para evitar fracturas de su superficie, el intervalo de

potencial de trabajo utilizado en la electropolimerización de verde malaquita fue de 0.0 a 1.2 V.

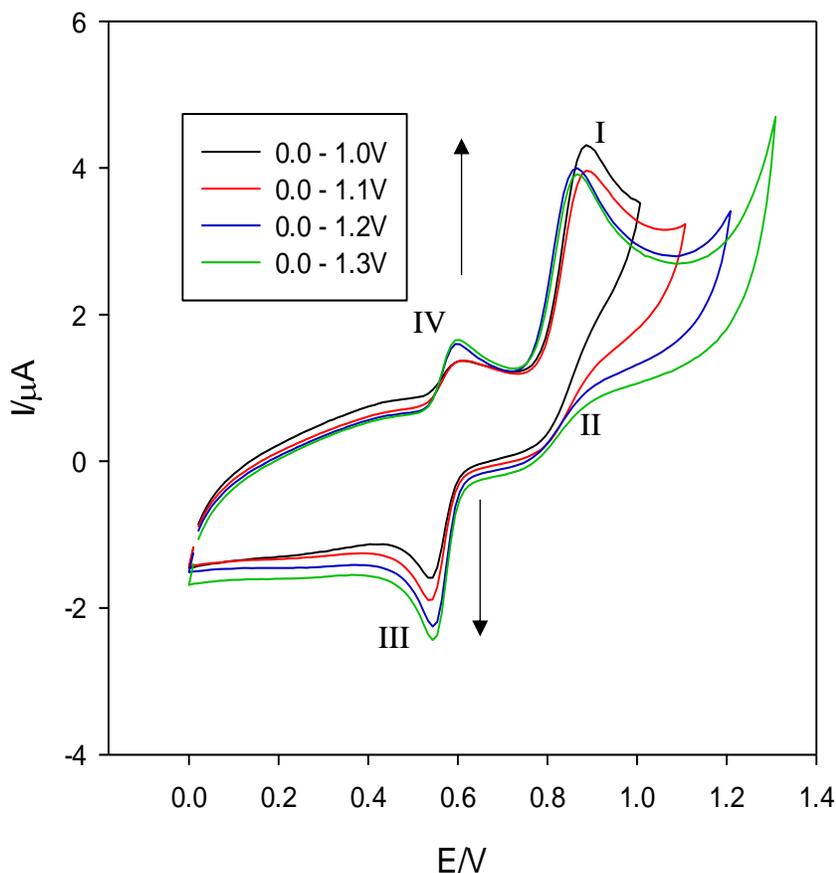


Figura IV.20. Segundo barrido de voltametría cíclica en sentido anódico de verde malaquita $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en los intervalos de potencial 0.0 a 1.0 V, 0.0 a 1.1 V, 0.0 a 1.2 V y 0.0 a 1.3 V; velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

A pesar de que se logró electropolimerizar la especie redox sobre el electrodo de trabajo, la película obtenida es frágil y se desprende con facilidad. Por esta razón, se propuso emplear una membrana de Nafion sobre el electrodo de trabajo para electropolimerizar el VM, basándose en los reportes de Chen, S. M., et al, 2007; Fnag, C., et al., 1999 y Wang, X., et al., 2007.

4.6. Electropolimerización de verde malaquita en medio ácido sobre una membrana de Nafion

La Figura IV.21., muestra en la línea sólida de color negro el barrido de un electrodo con Nafion en ácido sulfúrico $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (blanco). Posterior a esto se muestra la electropolimerización de verde malaquita en el mismo medio ácido realizando 25 ciclos consecutivos mediante voltametría cíclica en el intervalo de potencial de 0.0 V a 1.2 V.

El primer barrido (línea punteada de color negro) muestra el pico I correspondiente a la oxidación del verde malaquita en solución y los picos II y III atribuidos a la reducción del VM y del poli (verde malaquita).

A partir del segundo barrido se observa el incremento del pico de oxidación que corresponde a la combinación de los picos I+IV de oxidación de VM en solución y p(VM).

De igual manera, al incrementar el número de ciclos la intensidad de corriente del pico III se incrementa, lo que confirma la formación de la película del polímero sobre el electrodo de trabajo.

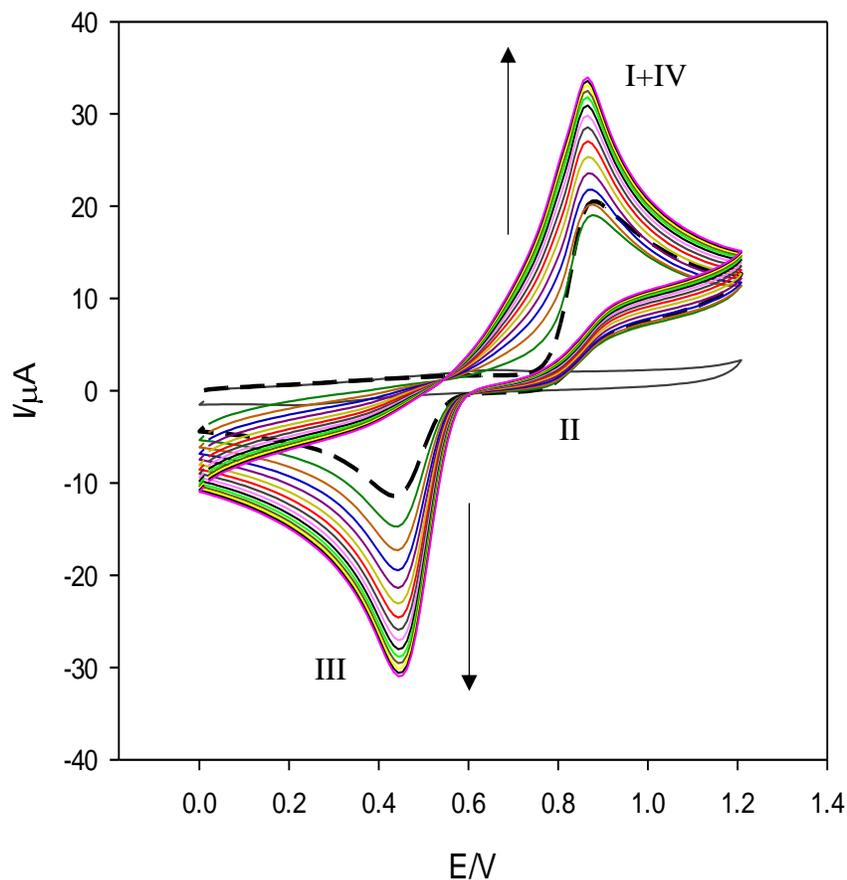


Figura IV.21. Electropolimerización de verde malaquita $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 25 ciclos a $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; intervalo de potencial: 0.0 V a 1.2 V, sobre una película de $5 \mu\text{L}$ de Nafion.

Cabe destacar que en este caso, al enjuagar el electrodo de trabajo la película obtenida se mantiene estable sobre la superficie del electrodo, esto es debido a las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre el Nafion y el VM. Este resultado se muestra en la Imagen IV.1.

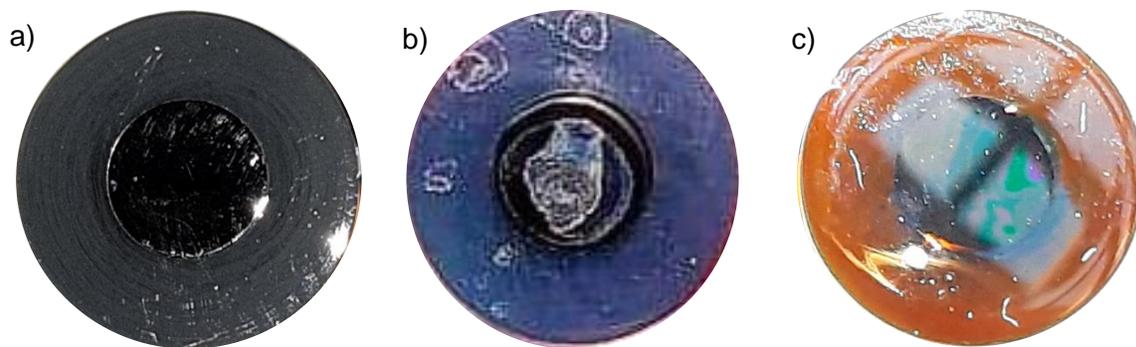


Imagen IV.1. a) Superficie del electrodo de carbón vítreo con Nafion; b) Superficie del electrodo de trabajo electropolimerizado sin la membrana de Nafion, membrana inestable; c) Superficie del electrodo de trabajo electropolimerizado con la membrana de Nafion.

Posterior a la formación del polímero, se evaluó su respuesta en soluciones amortiguadoras de diferentes valores de pH. En la Figura IV.22., se muestra que la intensidad de corriente y la posición de los picos de oxidación y reducción cambia respecto al pH de manera análoga a la observada para el VM en solución (Figura IV.15.).

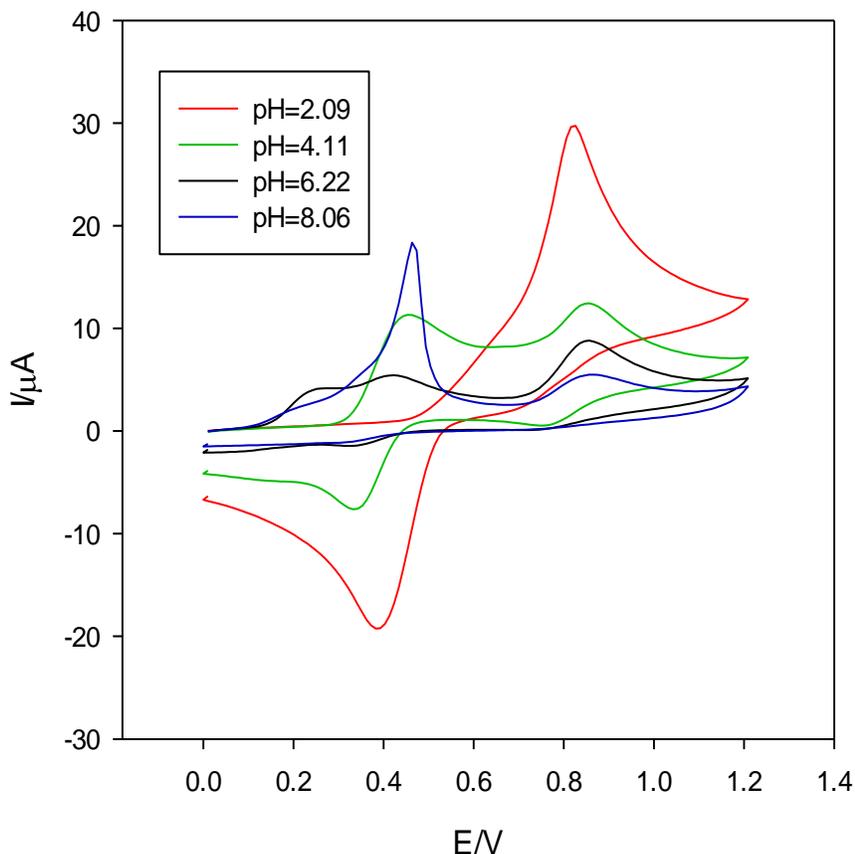


Figura IV.22. Voltamperograma cíclico en sentido anódico en soluciones amortiguadora de fosfatos $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, haciendo adiciones de HCl $4.42 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; velocidad de barrido: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0.0 a 1.2 V.

4.7. Evaluación de la respuesta electroquímica del electrodo electropolimerizado

A partir de los voltamperogramas realizados a diferentes valores de pH, se obtuvieron curvas de calibración haciendo cortes a diferentes potenciales y se calcularon los parámetros analíticos que se muestran en la Tabla IV.12. Bajo estas condiciones, se observa una mayor sensibilidad en el potencial de 0.6 V y el intervalo de pH de 6.24-6.82.

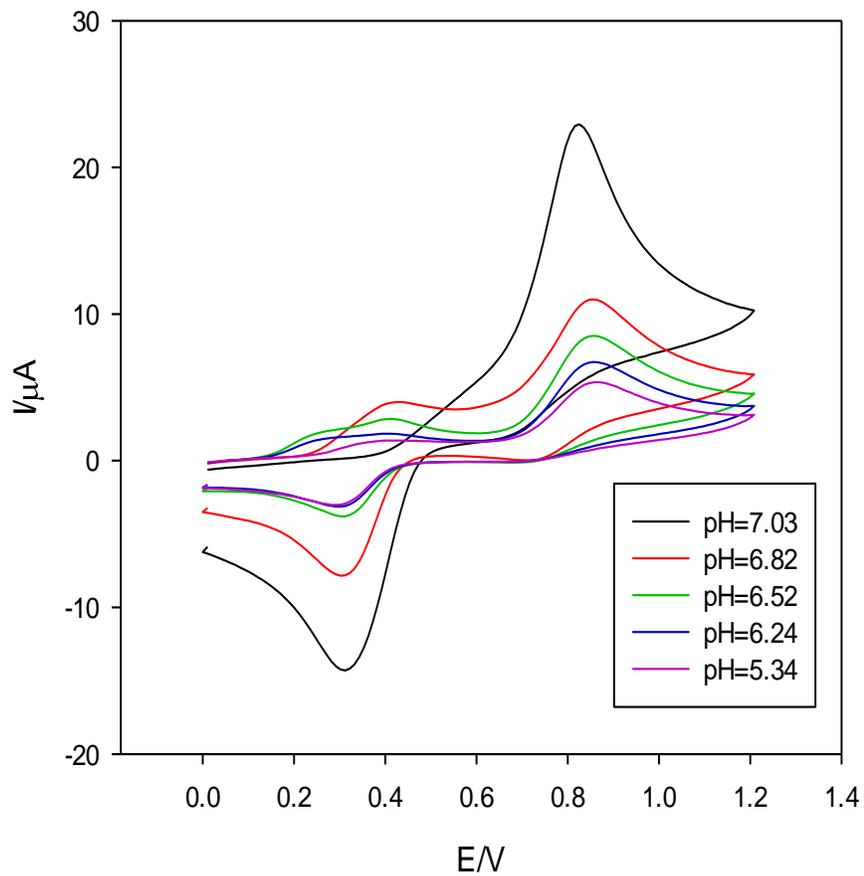


Figura IV.23. Voltamperograma cíclico en sentido anódico en una solución amortiguadora de fosfatos $\text{pH}=7.03$; $1 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, realizando adiciones de HCl $4.42 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; velocidad de barrido: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0.0 a 1.2 V.

Tabla IV.12. Parámetros analíticos obtenidos de la curva de calibración anterior.

E (V)	m ($\mu\text{A}\cdot\text{pH}^{-1}$)	r^2	IRL (pH)
0.1	0.02	0.70	5.34 - 6.52
0.2	0.76	0.98	5.34 - 6.52
0.3	1.05	0.10	5.34 - 6.52
0.4	3.53	1.00	6.24 - 6.82
0.5	3.66	0.97	6.24 - 6.82
0.6	4.00	0.92	6.24 - 6.82
0.7	5.36	0.92	6.24 - 6.82
0.8	3.23	0.83	5.34 - 6.82
0.9	3.12	0.83	5.34 - 6.82
1.0	2.35	0.82	5.34 - 6.82
1.1	1.93	0.81	5.34 - 6.82
1.2	1.68	0.80	5.34 - 6.82

4.8. Optimización del transductor

Con la finalidad de obtener las variables de entrada que proporcionen una mayor sensibilidad en las mediciones electroquímicas, se realizó la optimización del transductor con un experimento de Taguchi L_9 (3^4) evaluando cuatro factores con tres niveles.

La Tabla IV.13., muestra los resultados de la sensibilidad obtenida en el proceso de optimización mismos que se utilizaron para analizarlos mediante el programa MINITAB 17. Los resultados se obtuvieron al realizar curvas de calibración haciendo cortes a diferentes valores de potencial, se eligió el potencial de 0.2 V ya que bajo este valor de potencial observamos una mayor sensibilidad.

Tabla IV.13. Sensibilidades analíticas de la optimización del transductor a E=0.2V

Diseño Taguchi L₉ (3⁴)				
Factores y niveles				Sensibilidad
[VM, M]	Velocidad de barrido (mV·s⁻¹)	Número de ciclos	Volumen de Nafion (μL)	analítica, (μA·mM⁻¹ [HCl])
2.0x10 ⁻⁴	20	5	5	-0.1923
2.0x10 ⁻⁴	60	15	10	-0.0258
2.0x10 ⁻⁴	100	25	15	-0.0182
1.1x10 ⁻³	20	15	15	-0.4417
1.1x10 ⁻³	60	25	5	-0.1671
1.1x10 ⁻³	100	5	10	-0.0012
2.0x10 ⁻³	20	25	10	-0.5378
2.0x10 ⁻³	60	5	15	-0.1040
2.0x10 ⁻³	100	15	5	-0.1363

La Figura IV.24., muestra las condiciones óptimas donde se obtiene la mayor sensibilidad del transductor. Al utilizar una concentración de verde malaquita 2x10⁻³ mol·L⁻¹ sugiere que una mayor cantidad de moles de verde malaquita ayudan a la formación de la cadena polimérica, por lo tanto favorece la formación de la película sobre la superficie del electrodo de trabajo.

El verde de malaquita es un compuesto que tiene una estructura abierta pero ionizada y, por lo tanto, el polímero resultante es prometedor al exhibir características interesantes como una velocidad rápida de transferencia de carga y transporte de iones. Al utilizar una velocidad de barrido de 20 mV·s⁻¹, el VM tiene más tiempo para oxidarse y por lo tanto formar el radical catiónico responsable de la formación del polímero. Realizar 25 ciclos asegura que toda o la mayor cantidad de verde malaquita se convierta en p(VM).

El Nafion es un polímero aniónico, su estructura tiene canales hidrofílicos contenidos dentro de una matriz hidrofóbica, es una especie químicamente inerte.

El diseño de experimentos arrojó un volumen óptimo de Nafion de 10 μL para formar la membrana sobre la cual se deposita el polímero. Este hecho implica que una membrana de mayor espesor (15 μL) conlleva una mayor resistividad y menor corriente, mientras que una membrana más delgada retiene menos VM en su estructura.

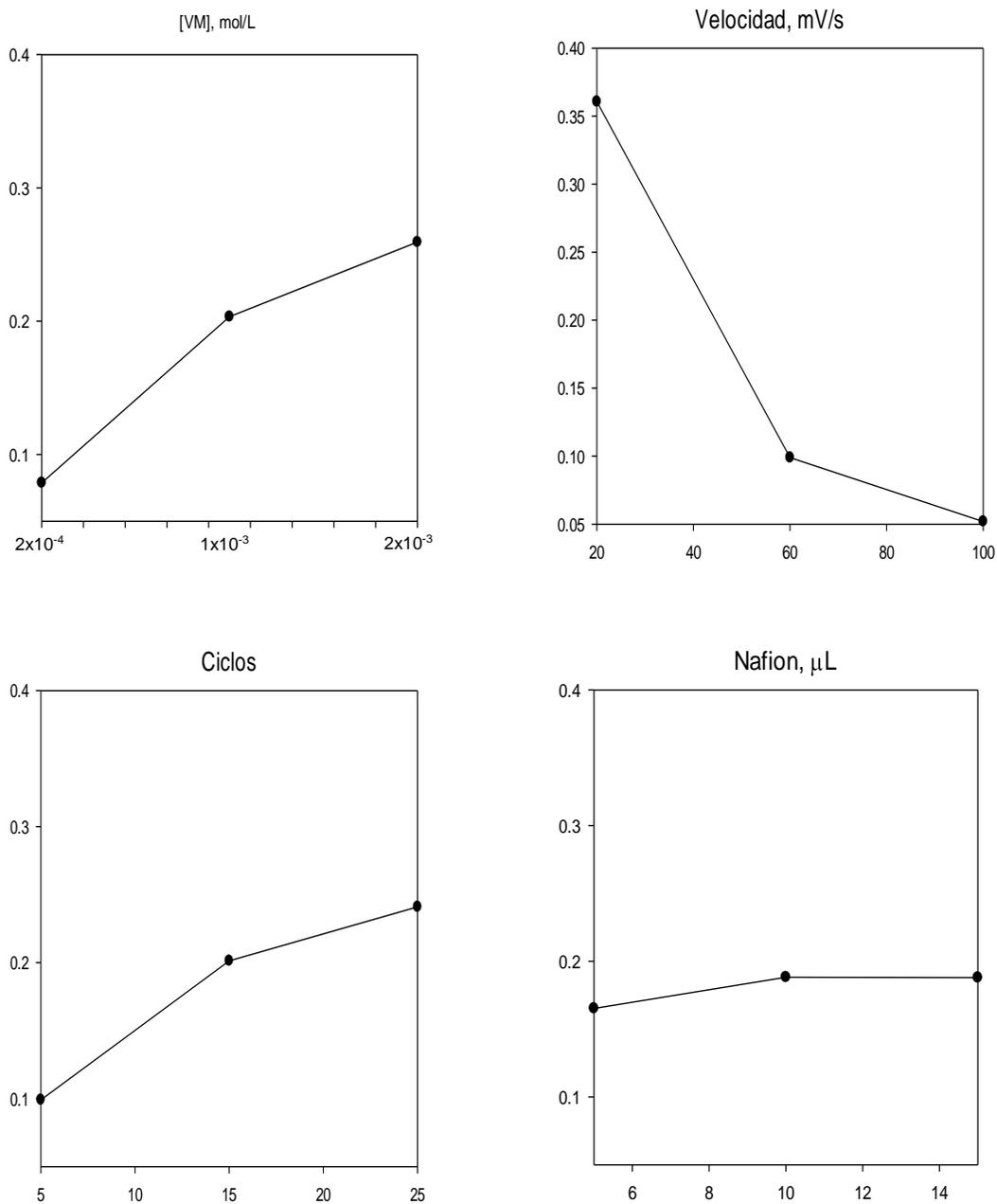


Figura IV.24. Condiciones óptimas del transductor.

4.9. Parámetros analíticos del transductor

Se construyó el transductor bajo las condiciones óptimas del diseño de Taguchi. Se utilizó una concentración de VM $2 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, velocidad de barrido $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, 25 ciclos y $10 \mu\text{L}$ de Nafion.

Se inmovilizó verde malaquita $2 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en medio ácido, sobre una membrana de Nafion de $10 \mu\text{L}$ cubriendo la superficie del electrodo de carbón vítreo. Para la electropolimerización se realizaron 25 barridos en voltametría cíclica de 0.0 V a 1.2 V con una velocidad de barrido de $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

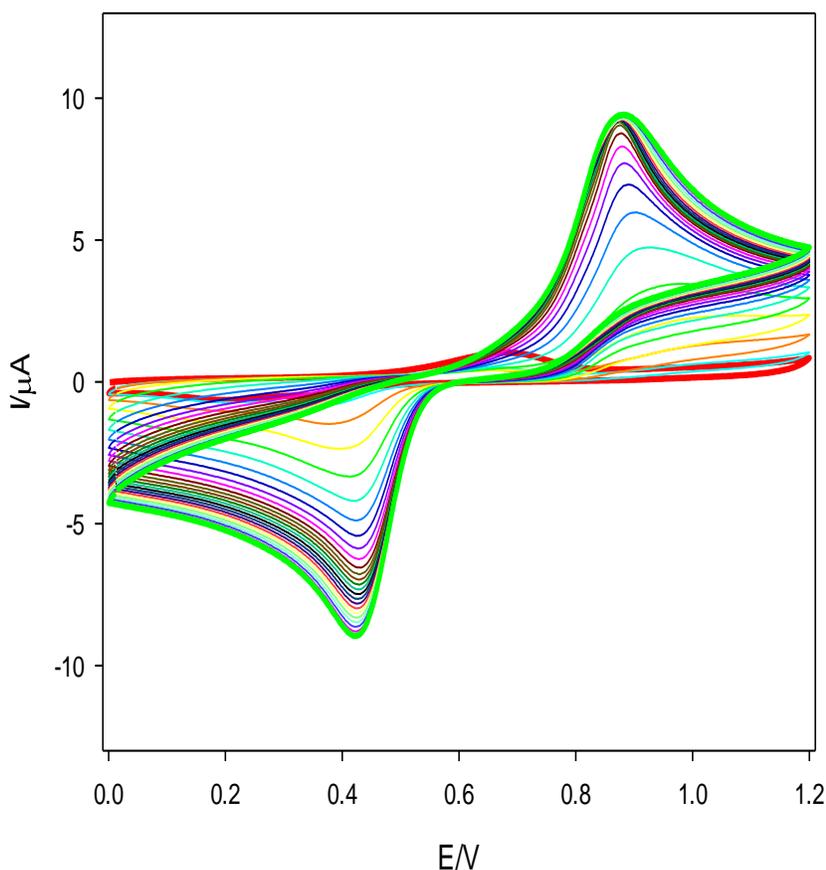


Figura IV. 25. Electropolimerización de verde malaquita $2 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ con 25 ciclos a $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, intervalo de potencial de 0.0 V a 1.2 V, sobre una película de $10 \mu\text{L}$ de Nafion.

La Figura IV. 25., muestra la electropolimerización de VM bajo las condiciones óptimas, se observa en el primer barrido (línea roja) el decremento en la intensidad de corriente de los picos I y II referentes a la oxidación y reducción del VM en solución. Los picos III y IV corresponden a la reducción y oxidación del poli (verde malaquita) respectivamente, su intensidad de corriente incrementa al aumentar el número de ciclos, esto indica la formación del polímero sobre el electrodo de trabajo.

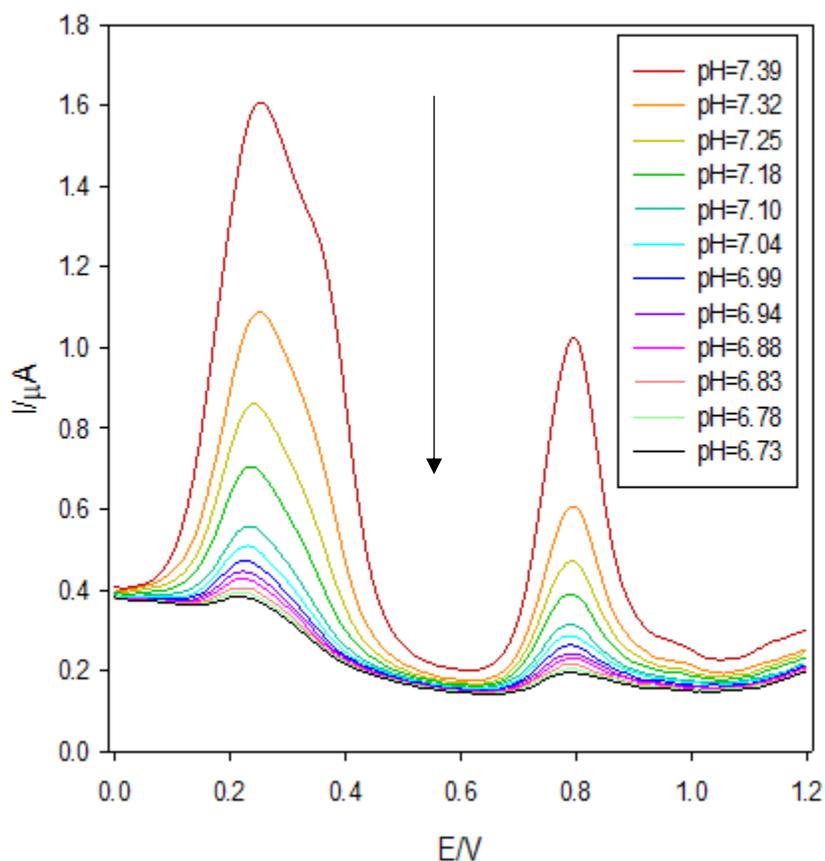


Figura IV.26. Voltametría diferencial de pulsos en 5 mL de PBS $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH=7.0 con adiciones sucesivas de HCl $4.42 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Intervalo de potencial de 0.0 V a 1.2 V; paso: 0.005 V; amplitud de modulación: 0.025 V; tiempo de modulación: 0.05 s.

La Figura IV.26., muestra la respuesta al cambio de pH del transductor optimizado, se observa que al disminuir el pH la intensidad de corriente disminuye. A partir de estos registros de voltametría diferencial de pulsos, se obtuvieron las curvas de calibración de $I/\mu\text{A}$ vs $[\text{HCl}, \text{mM}]$ realizando cortes a diferentes potenciales. En la Tabla IV.14., se observan los parámetros analíticos del transductor optimizado.

Tabla IV.14. Parámetros analíticos obtenidos de la curva de calibración $I/\mu\text{A}$ vs $[\text{HCl}, \text{mM}]$.

E V)	m ($\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$)	b (μA)	r^2	IRL (mM)
0.0	-0.011	0.386	0.934	0.524 – 0.782
0.1	-0.212	0.462	0.987	0.088 – 0.351
0.2	-1.425	1.014	0.997	0.088 – 0.351
0.3	-1.889	1.100	0.974	0.088 – 0.351
0.4	-0.742	0.504	0.939	0.088 – 0.351
0.5	-0.115	0.224	0.978	0.088 – 0.351
0.6	-0.058	0.181	0.993	0.088 – 0.438
0.7	-0.253	0.279	0.989	0.088 – 0.351
0.8	-1.103	0.685	0.979	0.088 – 0.351
0.9	-0.255	0.290	0.992	0.088 – 0.351
1.0	-0.126	0.266	0.985	0.088 – 0.351
1.1	-0.144	0.225	0.987	0.176 – 0.524
1.2	-0.074	0.206	0.992	0.088 – 0.351

Con base en los resultados obtenidos, la mayor sensibilidad se obtiene en un potencial de 0.3 V, con un IRL de 0.088 a 0.351 mM.

4.10. Evaluación de la respuesta del biosensor

La Figura IV.27., muestra los resultados obtenidos por voltametría cíclica y la Figura IV.28., los resultados de voltametría diferencial de pulsos; ambos con el biosensor

desarrollado al inmovilizar lipasa en Nafion sobre la película de p(VM). La enzima lipasa contenida en el biosensor reacciona con los triglicéridos que se agregan en la solución amortiguadora de fosfatos $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.5$, generando los productos glicerol y ácidos grasos, siendo estos últimos los responsables de cambiar el pH de la solución en la que se encuentran, mismo que se ve reflejado en ambos gráficos. Se observa un cambio en la intensidad de corriente a medida que se realizan adiciones sucesivas de los triglicéridos a la solución, confirmando el esquema de detección propuesto.

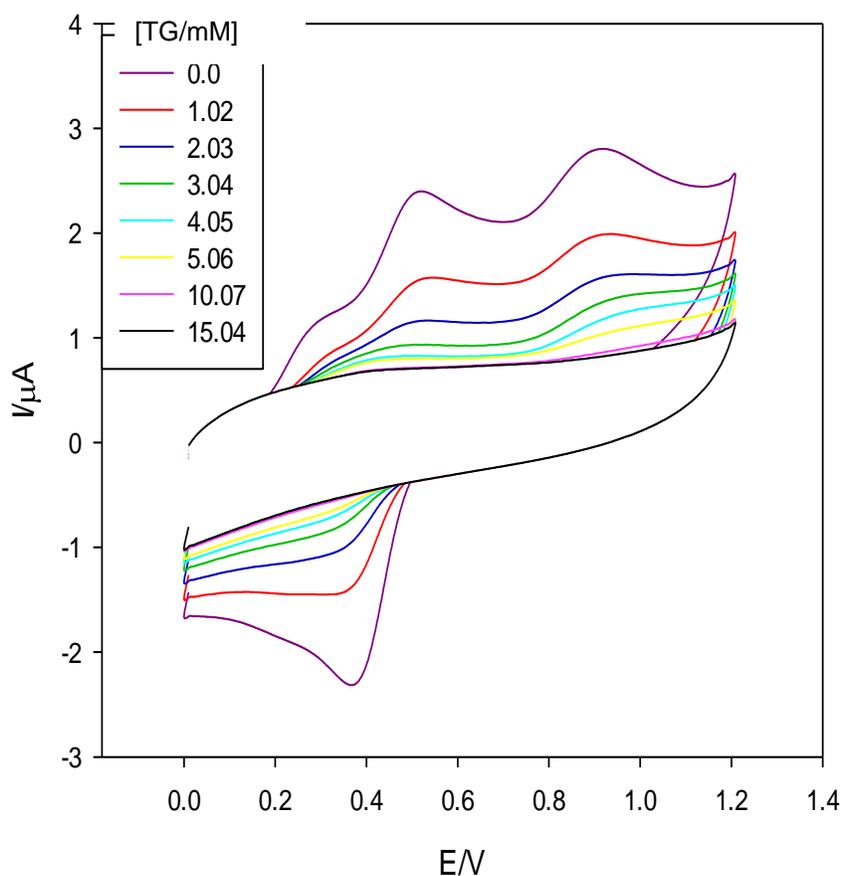


Figura IV.27. Evaluación de la respuesta del biosensor en: voltametría cíclica en 5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) $\text{pH}=7.5$; $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, realizando adiciones sucesivas de TG, con un cambio de pH de 7.42 a 7.30. velocidad de barrido: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0.0 a 1.2 V.

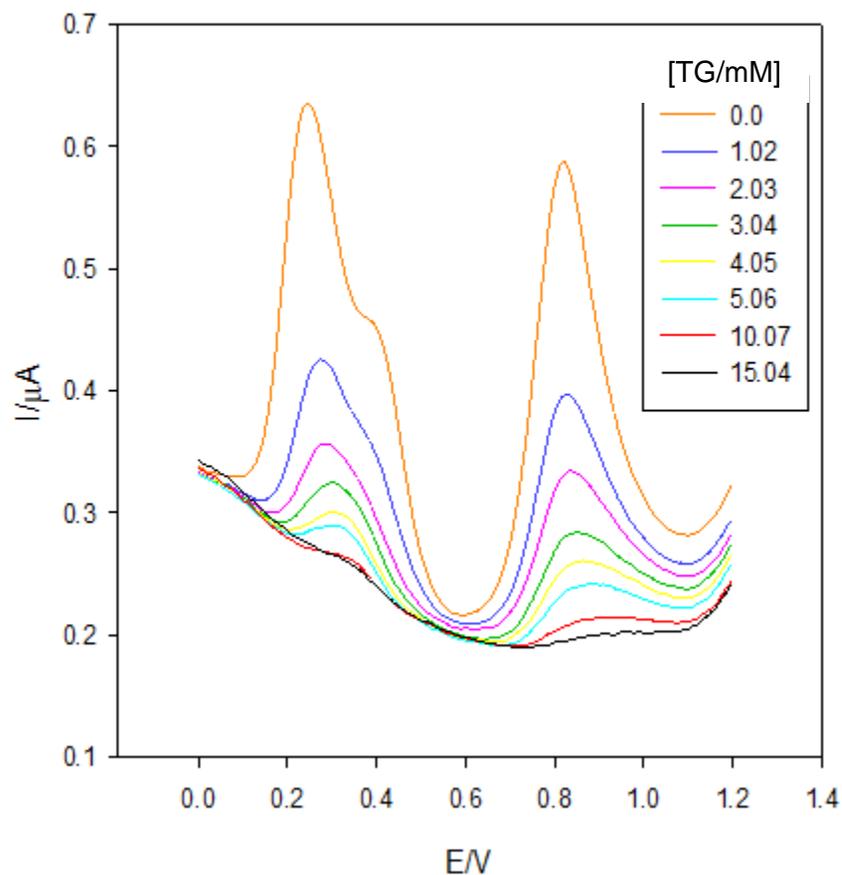


Figura IV.28. Evaluación de la respuesta del biosensor mediante voltametría diferencial de pulsos en 5 mL de PBS pH=7.5; $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, haciendo adiciones sucesivas de TG, con un cambio de pH de 7.42 a 7.30. Intervalo de potencial de 0.0 V a 1.2 V; paso: 0.005 V; amplitud de modulación: 0.025 V; tiempo de modulación: 0.05 s.

4.11. Optimización del biosensor

Después de evaluar que el principio de detección del biosensor funciona, se realizó una optimización para incrementar la sensibilidad del dispositivo con un diseño de Taguchi L9 (3^3), la Tabla IV.15., muestra los resultados obtenidos de cada experimento.

Tabla IV.15. Sensibilidad analítica de la optimización del biosensor a E=0.20V

Diseño Taguchi L9 (3³)			
Factores y niveles			Sensibilidad analítica ($\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ [TB])
%Nafion (v/v)	Lipasa (UI)	Cantidad de cóctel enzimático (μL)	
0.35	4.55	5.0	0.2188
0.35	9.35	12.5	0.3156
0.35	14.15	20.0	0.3102
0.73	4.55	12.5	0.0617
0.73	9.35	20.0	0.2356
0.73	14.15	5.0	0.2365
1.10	4.55	20.0	0.0201
1.10	9.35	5.0	0.0575
1.10	14.15	12.5	0.0849

Los resultados obtenidos se procesaron en el programa MINITAB 17, con base en este tratamiento las condiciones óptimas del cóctel enzimático para la construcción del biosensor son: Nafion al 0.35% y 14.15 unidades enzimáticas de lipasa contenidos en PBS $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=7.0, de este cóctel se coloca una gota de 20 μL sobre el transductor. El uso de Nafion en el desarrollo del biosensor muestra una biocompatibilidad con el material biológico, por lo tanto, ayuda a inmovilizar a la enzima lipasa sobre el transductor formando una capa delgada, de este proceso depende el control de los fenómenos superficiales como la reactividad y la difusión. El Nafion es una especie con carga negativa que permite la difusión de protones hacia el transductor, utilizando la menor cantidad (0.35 %) provee una mayor sensibilidad a diferencia de las cantidades superiores al 1.0 % que promueven una disminución en la señal atribuido al incremento del grosor de la

membrana. Los resultados obtenidos muestran que al utilizar la menor cantidad de lipasa el dispositivo muestra una menor respuesta, en este estudio la mayor sensibilidad se obtuvo con la mayor cantidad de enzima. La Figura IV.29., muestra las condiciones óptimas obtenidas a partir del diseño de experimentos del biosensor.

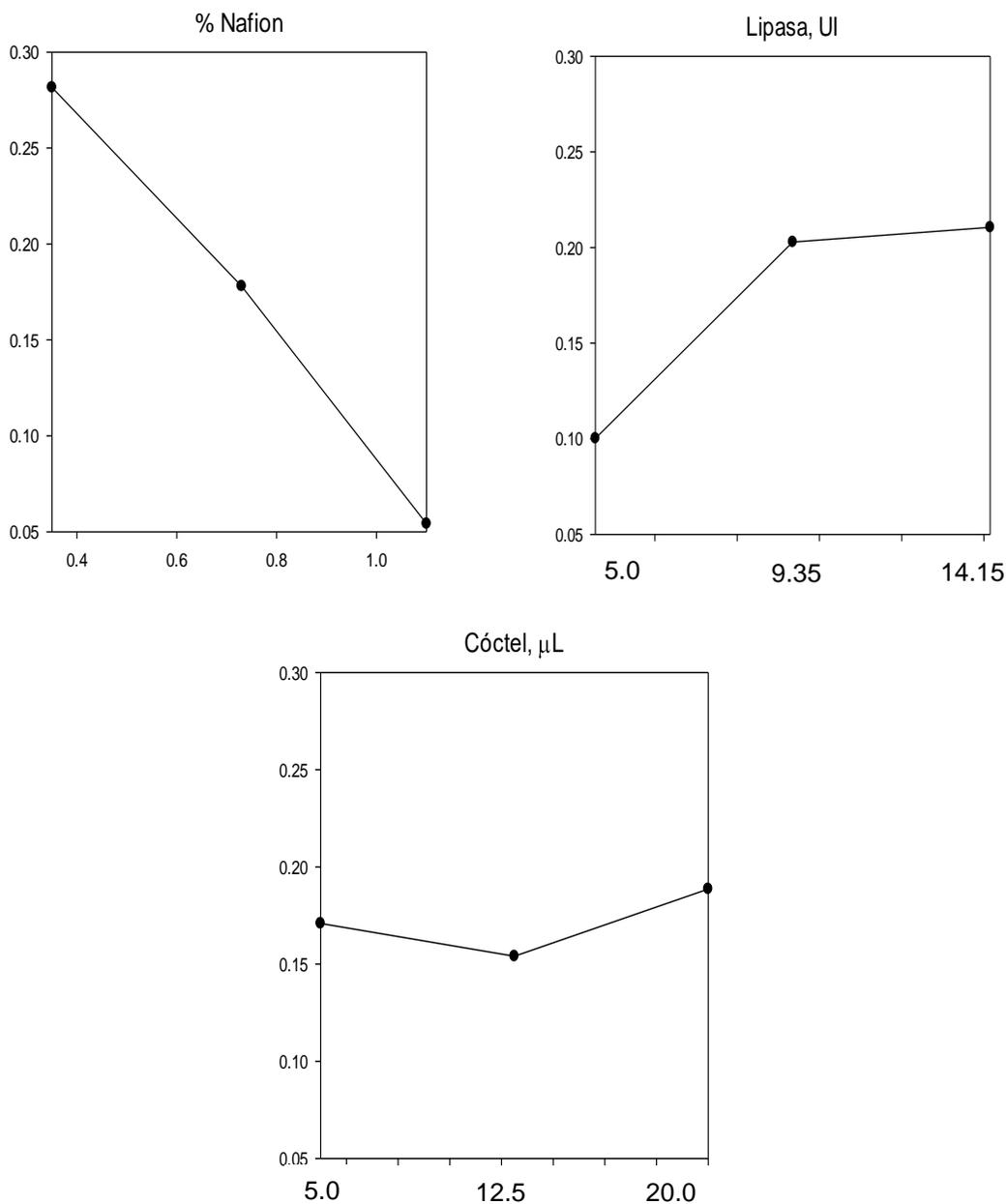


Figura IV.29. Condiciones óptimas del biosensor.

4.12. Parámetros analíticos del biosensor

Se construyó el biosensor bajo las condiciones óptimas para determinar los parámetros analíticos de respuesta, con base en el registro de voltametría diferencial de pulsos en un intervalo de concentración de tributirina de 0.200 mM a 1.186 mM.

Las curvas de calibración se obtuvieron haciendo cortes a diferentes potenciales de los registros de voltamperometría diferencial de pulsos. La sensibilidad, intercepto, coeficiente de variación y el IRL en diferentes potenciales, se muestran en la Tabla IV.14.

La sensibilidad tiene un signo negativo debido a que al incrementar la cantidad de TG el pH disminuye; este decremento se ve reflejado en la disminución de la intensidad de corriente. Se obtiene una mayor linealidad en el potencial de 1.1 V, con una concentración de 0.200 a 0.596 mM de TB.

Tabla IV.16. Parámetros analíticos obtenidos de la curva de calibración $I/\mu\text{A}$ vs [TB, mM].

E (V)	m ($\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$)	b (μA)	r^2	IRL (mM)
0.0	-0.018	0.175	0.998	0.398 – 0.990
0.1	-0.013	0.182	0.986	0.596 – 0.990
0.2	-0.072	0.237	0.976	0.200 – 0.596
0.3	-0.051	0.214	0.997	0.200 – 0.596
0.4	-0.012	0.134	0.999	0.200 – 0.596
0.5	-0.004	0.112	0.975	0.200 – 0.794
0.6	-0.001	0.110	0.898	0.596 – 0.990
0.7	-0.009	0.140	0.975	0.794 – 1.186
0.8	-0.029	0.178	0.975	0.200 – 0.990
0.9	-0.019	0.161	0.974	0.200 – 0.596
1.0	-0.011	0.157	0.993	0.398 – 0.794
1.1	-0.023	0.187	1.000	0.200 – 0.596
1.2	-0.022	0.263	0.980	0.200 – 0.596

4.13. Evaluación de triglicéridos en una muestra real

Con la finalidad de evaluar el desempeño del biosensor desarrollado en una muestra real, se realizó una curva de adiciones patrón a partir de una muestra problema preparada por dilución de un aceite de aguacate y una solución estándar de tributirina, ambas de aproximadamente la misma concentración. Los resultados de los voltamperogramas diferenciales de pulsos se presentan en la Fig. IV.30.

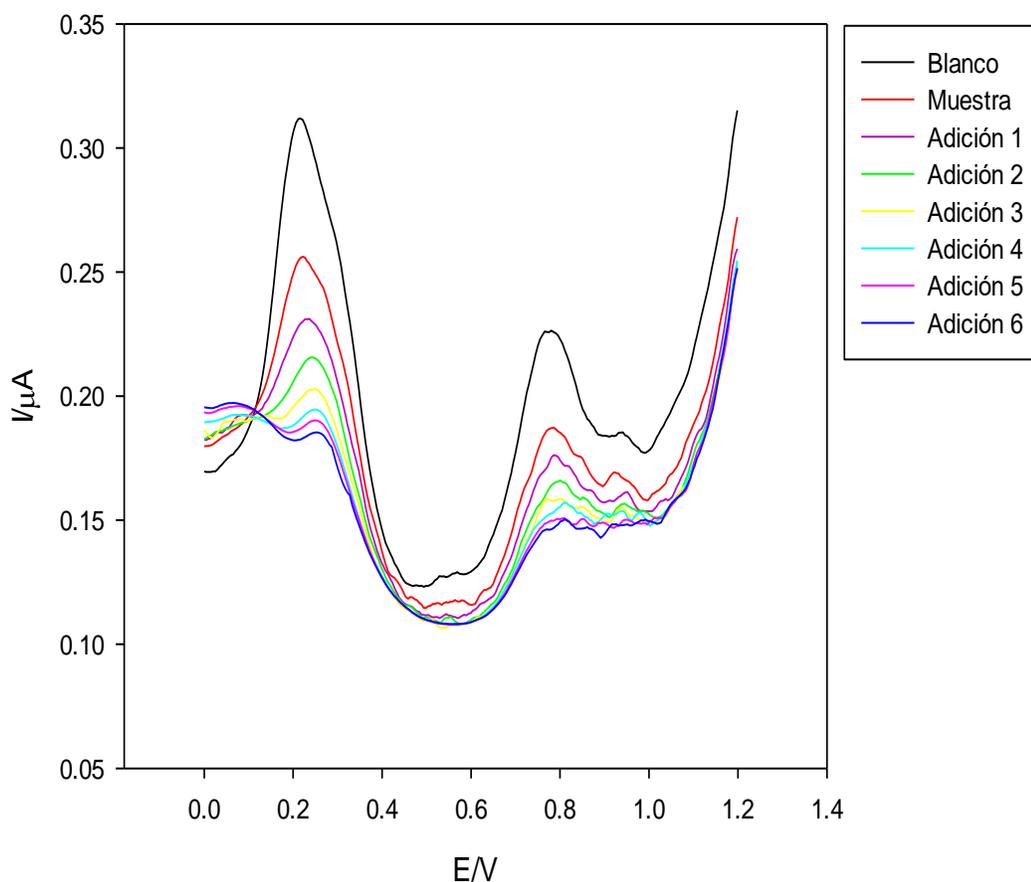


Figura IV.30. Evaluación de la respuesta del biosensor en: voltametría diferencial de pulsos en 5 mL de PBS pH=7.5; $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ mediante el método de adición patrón; haciendo adiciones sucesivas de la muestra y la solución patrón TB $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Intervalo de potencial de 0.0 V a 1.2 V; paso: 0.005 V; amplitud de modulación: 0.025 V; tiempo de modulación: 0.05 s.

A pesar de haberse utilizado iguales volúmenes de solución problema y de las adiciones de estándar, el cambio en la magnitud de la intensidad de corriente que reporta el problema es significativamente mayor al de las adiciones estándar, diferencia que se reduce más allá de la pequeña dilución del sistema (Figura IV.31.). Este comportamiento se atribuye a una posible adsorción de la trioleína (triglicérido mayoritario del aceite de aguacate) sobre la superficie del biosensor, lo que provoca que el comportamiento no sea lineal y en consecuencia que sea imposible cuantificar los triglicéridos de la muestra.

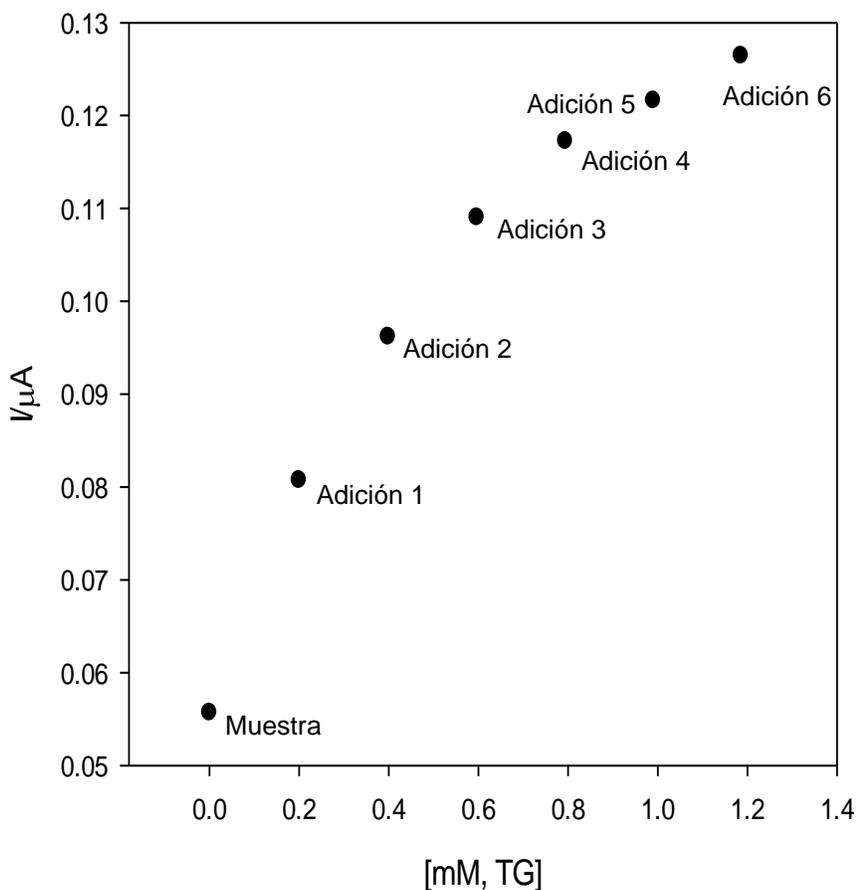


Figura IV.31. Curva de adición patrón de la determinación de TG con el biosensor, primer punto: adición de la muestra, puntos subsecuentes, adiciones sucesivas de la solución estándar.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Al evaluar el comportamiento voltamperométrico de la especie verde malaquita en soluciones amortiguadoras, este muestra una respuesta en el cambio del potencial y de la intensidad de corriente respecto al cambio del pH, demostrando ser una especie que puede ser utilizada en el desarrollo del biosensor.

Se logró inmovilizar con éxito la especie redox verde malaquita en medio ácido sobre el electrodo de trabajo con ayuda de una membrana de Nafion, sirviendo como base para el desarrollo del biosensor voltamperométrico monoenzimático para determinar triglicéridos.

Al evaluar el comportamiento del electrodo electropolimerizado en soluciones amortiguadoras de pH, este responde de la manera esperada; es decir, su intensidad de corriente cambia con respecto a los cambios de pH.

Se logró desarrollar el biosensor colocando un coctel enzimático (lipasa, Nafion y PBS) sobre el electrodo electropolimerizado. Este dispositivo es sensible a los cambios de pH.

El trabajo desarrollado demuestra que es posible desarrollar biosensores voltamperométricos basado en enzimas que provoquen un cambio en el pH interfacial del dispositivo como consecuencia del evento de reconocimiento.

El biosensor desarrollado muestra un comportamiento no lineal respecto a los cambios de concentración de triglicéridos al analizar una muestra de aguacate. En

este sentido es necesario evaluar la adición de tensoactivos o solventes no acuosos para disminuir la posible adsorción del analito sobre el dispositivo.

Es necesario evaluar otras especies electroactivas sensibles a los cambios de pH y que puedan ser inmovilizadas sobre un electrodo para generar diversos transductores voltamperométricos de pH que operen a potenciales reducidos y con alta sensibilidad a fin de contar con plataformas para desarrollar biosensores con un esquema útil y novedoso de operación.

Con la finalidad de ampliar los alcances del trabajo, es necesario contrastar los resultados del biosensor desarrollado con un método de referencia.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS

- Ahangari, B., y Sargolzaei, J. (2013). Extraction of lipids from spent coffee grounds using organic solvents and supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5), 1014–1021. Doi:10.1111/j.1745-4549.2012.00757.x
- Akoh, C. C., y Min, D. B., (2002). *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc.
- Araya L, H., y Lutz R, M. (2003). Alimentos Funcionales Y Saludables. *Revista Chilena de Nutrición*, 30(1). Doi:10.4067/s0717-75182003000100001
- Argüeso Armesto, R., Díaz Díaz, J., Díaz Peromingo, J., Rodríguez González, A., Castro Mao, M., y Diz-Lois Martínez, F. (2011). Lípidos, colesterol y lipoproteínas. *Galicia Clínica*, 72(1), 7–17.
- Arroyo, M., Acebal, C., y De la Mata, I. (2014). Biocatálisis y biotecnología; Biocatalysis and biotechnology. *ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura*, 190-768, 2-11. Doi: 10.3989/arbor.2014.768n4010
- Bailey, S. I., y Ritchie, I. M. (1985). A cyclic voltammetric study of the aqueous electrochemistry of some quinones. *Electrochimica Acta*, 30(1), 3–12. Doi: 10.1016/0013-4686(85)80051-7
- Castillo Martínez, M., (2017). Aplicación de la espectroscopía NIR al control de la industria química. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona].
- Ceguir Sánchez, E., Covadonga Rodríguez, G. Ravelo, A. y Zárata R. (2008). Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4297-4303. Doi: 10.1021/jf073471e
- Chauhan, R., Nagar, B., Solanki, P. R., y Basu, T. (2013). Development of Triglyceride Biosensor Based on a Platinum Nano Particle and Polypyrrole Nano Composite Electrode. *Materials Focus*, 2(4), 316–323. Doi: 10.1166/mat.2013.1096

- Chen, S. M., Chen, J. Y., y Thangamuthu, R. (2007). Electrochemical preparation of poly(malachite green) film modified Nafion-coated glassy carbon electrode and its electrocatalytic behavior towards NADH, dopamine and ascorbic acid. *Electroanalysis*, 19(14), 1531–1538. Doi: 10.1002/elan.200703861
- Cheng, C. H., Du, T. B., Pi, H. C., Jang, S. M., Lin, Y. H., y Lee, H. T. (2011). Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. *Bioresource Technology*, 102(21), 10151–10153. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.08.064
- Cruz Aburto, Z. G., (2018). Desarrollo de un biosensor de triglicéridos basado en un transductor potenciométrico de acero inoxidable. [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo].
- Davis, F., y Higson, S. P. J. (2007). *Polymers in biosensors*. Biomedical Polymers. Woodhead Publishing Limited. Doi: 10.1533/9781845693640.174
- de la Guardia, M., y González Illueca, A. (2013). Food protected designation of origin. En C. Apetrei, y M. Ghasemi Varnamkhasti, *Biosensors in food OPD authentication*. (279-294). United Kingdom: Elsevier.
- de Moura, R. R., Etges, B. J., dos Santos, E. O., Martins, T. G., Roselet, F., Abreu, P. C., D'Oca, M. G. M. (2018). Microwave-Assisted Extraction of Lipids from Wet Microalgae Paste: A Quick and Efficient Method. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(7), 1–7. Doi: 10.1002/ejlt.201700419
- Díaz Portillo, J., Fernández del Barrio, M. T., y Paredes Salido, F. (1997). *Aspectos básicos de bioquímica clínica*. España: Díaz de Santos S.A.
- Dhull, R., Dhull, V., Rathee, K., y Singh, S. (2017). CODEN (USA): PCHHAX A Review on Evolution in Triglyceride Determination, *Der pharma chemica*. 9(2), 30–36.
- Eggins, G. B. (2002). *Chemical sensors and biosensors*. England: John Wiley & Sons Ltd.

- Escamilla Mejía, J. C., Rodríguez, J. A., Álvarez-Romero, G. A., y Galán-Vidal, C. A. (2015). Monoenzymatic lipase potentiometric biosensor for the food analysis based on a pH sensitive graphite-epoxy composite as transducer. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 59(1), 19–23. Doi: 10.29356/jmcs.v59i1.9
- Fang, C., Tang, X., y Zhou, X. (1999). Preparation of poly(malachite green) modified electrode and the determination of dopamine and ascorbic acid. *Analytical Sciences*, 15(1), 41–46. Doi: 10.2116/analsci.15.41
- Fernandez, R. E., Hareesh, V., Bhattacharya, E., y Chadha, A. (2009). Comparison of a potentiometric and a micromechanical triglyceride biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5), 1276–1280. Doi: 10.1016/j.bios.2008.07.054
- Fornaguera, J. y Gómez, G. (2004) *Bioquímica: la ciencia de la vida*. México: EUNED.
- Galster, H. (1991). *pH Measurement, Fundamentals, Methods, Applications, Instrumentation*. United States: VCH.
- García Rodríguez, E. (2019). Caracterización del perfil lipídico mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de una población adulta de mujeres obesas metabólicamente sanas. [Tesis doctoral, Universidad de Málaga].
- Gupta, B., Singh, S., Mohan, S., y Prakash, R. (2010). Urea Biosensor Based on Conducting Polymer Transducers. *Biosensors*, (February). Doi: 10.5772/7205
- Ghodbane, I., Kherrrat, R., Zougar, S., Lamari, R., Haddadji, R., y Medjram, M. S. (2018). Kinetic study and characterization of a platinum electrode/sensitive membrane for malachite green detection. *Sensor Review*, 38(3), 335–344. Doi: 10.1108/SR-06-2017-0099
- Gómez Candela, C., de Cos Blanco, A. I., y Blanco Samper, B. (2005). Hidratos de carbono. En Vázquez, C., de Cos, A. I. y López Nomdedeu, C. *Alimentación y nutrición*. España: Díaz de santos.

- Hammond, J. L., Formisano, N., Estrela, P., Carrara, S., y Tkac, J. (2016). Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 69–80. Doi: 10.1042/EBC20150008
- Hewavitharana, G. G., Perera, D. N., Navaratne, S. B., y Wickramasinghe, I. (2020). Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(8), 6865–6875. Doi: 10.1016/j.arabjc.2020.06.039
- Hou, C. T., y Shimada, Y. (2009). Lipases. *Encyclopedia of Microbiology*, 385–392. Doi:10.1016/B978-012373944-5.00153-X
- Huwaida Rosli, N., Mohd Zain, Z., y Monica Ahmad, N. (2016). Lipase based biosensors for triglyceride determination. *MATEC web of conferences*, 59 (1-4), Doi: 10.1052/matecconf/20165901012.
- Ivanova, S. B., Milne, M. O., Byrne, Y. Xiang, y A. Brown. (2007). Glycerophospholipid identification and quantitation by electrospray ionization mass spectrometry. *Methods in enzymology*. 432, 21-57. Doi: 10.1016/s0076-6879(07)32002-8
- Kahlert, H. (2008). Functionalized carbon electrodes for pH determination. *Journal of Solid State. Electrochemistry*, 12(10), 1255–1266. Doi: 10.1007/s10008-008-0566-7
- Kumar Reddy, R. R., Basu, I., Bhattacharya, E., y Chadha, A. (2003). Estimation of triglycerides by a porous silicon based potentiometric biosensor. *Current Applied Physics*, 3(2–3), 155–161. Doi: 10.1016/S1567-1739(02)00194-3
- Lang, F. (2009). *Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease*. *Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease (Vol. 1)*. Doi: 10.1007/978-3-540-29676-8
- Lauridsen, J. B. (1976). Food emulsifiers: Surface activity, edibility, manufacture, composition, and application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 53(6), 400-407. Doi: 10.1007/BF02605731

- Manoj, D., Auddy, I., Nimbkar, S., Chittibabu, S., y Shanmugasundaram, S. (2020). Development of co-immobilised enzymes amperometric biosensor for the determination of triglycerides in coconut milk. *International Food Research Journal*, 27(5), 875–882.
- Miller, R. (2015). *Emulsifiers: Types and Uses*. Encyclopedia of Food and Health (1st ed.). Elsevier Ltd. Doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00249-X
- Minakshi, y Pundir, C. S. (2008). Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 133(1), 251–255. Doi: 10.1016/j.snb.2008.02.036
- Mitrowska, K., Posyniak, A., y Zmudzki, J. (2005). Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1089(1–2), 187–192. Doi: 10.1016/j.chroma.2005.07.004
- 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*, 60, 45–51. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.007
- Narwal, V., y Pundir, C. S. (2017). An improved amperometric triglyceride biosensor based on co-immobilization of nanoparticles of lipase, glycerol kinase and glycerol 3-phosphate oxidase onto pencil graphite electrode. *Enzyme and Microbial Technology*, 100, 11–16. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.01.009
- Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., y Kim, M. (2019). Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*, 12(1), 1–34. Doi: 10.3390/ma12010121
- Paravidino, M., Böhm, P., Gröger, H., Hanefeld, U. (2012). *Hydrolysis and Formation of Carboxylic Acid Esters*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Peña Díaz, A., Arroyo Begovich, A., Gómez Puyou, A., Tapia Ibarguengoytia, R. (2004). *Bioquímica*. Limusa.

- Pingarrón Carrazón, J. M., Sánchez Batanero, P. (2003). *Química Electroanalítica fundamentos y aplicaciones*. Síntesis.
- Pundir, C. S., Sandeep Singh, B., y Narang, J. (2010). Construction of an amperometric triglyceride biosensor using PVA membrane bound enzymes. *Clinical Biochemistry*, 43(4–5), 467–472. Doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.12.003
- Rahimi, M. A., Omar, R., Ethaib, S., Siti Mazlina, M. K., Awang Biak, D. R., y Nor Aisyah, R. (2017). Microwave-assisted extraction of lipid from fish waste. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 206(1). Doi: 10.1088/1757-899X/206/1/012096
- Ribeiro, B. D., De Castro, A. M., Coelho, M. A. Z., y Freire, D. M. G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: A review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, 2011(1). Doi: 10.4061/2011/615803
- Rohman, A. (2017). Infrared spectroscopy for quantitative analysis and oil parameters of olive oil and virgin coconut oil: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(7), 1447–1456. Doi: 10.1080/10942912.2016.1213742
- Salinas Buenaño, J. P., (2018). *Extracción y caracterización de aceites de semillas de cítricos*. [Tesis de licenciatura, Universidad Técnica de Ambato].
- Schmid, M., Guihéneuf, F., y Stengel, D. B. (2016). Evaluation of food grade solvents for lipid extraction and impact of storage temperature on fatty acid composition of edible seaweeds *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) and *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Food Chemistry*, 208, 161–168. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.03.123
- Shahidi, F. y Wanasundara, P. K. J. P. D. (2002). Extraction and analysis of lipids. En Akoh, C. C. y Min, D. B. *Food lipids, chemistry, nutrition, and biotechnology* (151-186). New York: Marcel Dekke, Inc.
- Shi, K., y Shiu, K. K. (2002). Scanning tunneling microscopic and voltammetric studies of the surface structures of an electrochemically activated glassy

- carbon electrode. *Analytical Chemistry*, 74(4), 879–885. Doi:10.1021/ac010734+
- Solanki, S., Pandey, C. M., Soni, A., Sumana, G., y Biradar, A. M. (2016). An amperometric bienzymatic biosensor for the triglyceride tributyrin using an indium tin oxide electrode coated with electrophoretically deposited chitosan-wrapped nanozirconia. *Microchimica Acta*, 183(1), 167–176. Doi: 10.1007/s00604-015-1618-1
- Spence, A. J., Jimenez-Flores, R., Qian, M., y Goddik, L. (2009). The influence of temperature and pressure factors in supercritical fluid extraction for optimizing nonpolar lipid extraction from buttermilk powder. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 458–468. Doi: 10.3168/jds.2008-1278
- Spinreact, S. A. (2018). Triglicéridos GPO-POD. Enzimático colorimétrico [en línea]. [Consulta: 02/01/2021]. Recuperado de: https://www.spinreact.com/files/Inserts/Bioquimica/BSIS31_TG_2018.pdf
- Stasyuk, N., Smutok, O., Gayda, G., Vus, B., Koval'chuk, Y., y Gonchar, M. (2012). Bi-enzyme L-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 37(1), 46–52. Doi: 10.1016/j.bios.2012.04.031
- Thakur, M. S., y Ragavan, K. V. (2013). Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 625–641. Doi:10.1007/s13197-012-0783-z
- Utama, Q. D., Sitanggang, A. B., Adawiyah, D. R., y Hariyadi, P. (2019). Lipase-catalyzed interesterification for the synthesis of medium-long-medium (MLM) structured lipids - A review. *Food Technology and Biotechnology*, 57(3), 305–318. Doi:10.17113/ftb.57.03.19.6025
- Vakhlu, J., y Kour, A. (2006). Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 69–85. Doi: 10.2225/vol9-issue1-fulltext-9

- Veeramani, M. S., Shyam, K. P., Ratchagar, N. P., Chadha, A., y Bhattacharya, E. (2014). Miniaturised silicon biosensors for the detection of triglyceride in blood serum. *Analytical Methods*, 6(6), 1728–1735. Doi: 10.1039/c3ay42274g
- Wang, X., Yang, N., Wan, Q., y Wang, X. (2007). Catalytic capability of poly(malachite green) films based electrochemical sensor for oxidation of dopamine. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 128(1), 83–90. Doi: 10.1016/j.snb.2007.05.036
- Xu, M., Zhu, J., Su, H., Dong, J., Ai, S., y Li, R. (2012). Electrochemical determination of methyl parathion using poly(malachite green)/graphene nanosheets-nafion composite film-modified glassy carbon electrode. *Journal of Applied Electrochemistry*, 42(7), 509–516. Doi: 10.1007/s10800-012-0425-1
- Zarnowski, R., y Suzuki, Y. (2004). Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(5), 649–663. Doi: 10.1016/j.jfca.2003.09.007
- Zhao, M., Wu, X., y Cai, C. (2009). Polyaniline nanofibers: Synthesis, characterization, and application to direct electron transfer of glucose oxidase. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(12), 4987–4996. Doi:10.1021/jp807621y
- Zhu, D., Li, Q., Honeychurch, K. C., Piano, M., y Chen, G. (2016). Determination of Malachite Green in Aquaculture Water by Adsorptive Stripping Voltammetry. *Analytical Letters*, 49(9), 1436–1451. Doi: 10.1080/00032719.2015.1104321