



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS EN INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

## DESARROLLO DE UN BIOSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS EN ALIMENTOS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN QUÍMICA

PRESENTA:

Q. JUAN CARLOS ESCAMILLA MEJÍA

DIRECTORES:

DR. CARLOS ANDRÉS GALÁN VIDAL  
DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
DIRECCIÓN

**M. en C. Julio César Leines Medécigo**  
Director de Administración Escolar  
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
PRESENTE

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al Candidato a Maestro en Química, **Q. Juan Carlos Escamilla Mejía**, quien presenta el trabajo "**Desarrollo de un biosensor potenciométrico para la cuantificación de triglicéridos en alimentos**", después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, ha decidido **autorizar la impresión** del mismo, una vez realizadas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado.

PRESIDENTE: Dr. Joseantonio Godoy Reyes (AAQ)  
SECRETARIO: Dr. Gíaan Arturo Álvarez Romero (AAQ)  
VOCAL: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal (AAQ)  
SUPLENTE: Dr. José Antonio Rodríguez Ávila (AAQ)

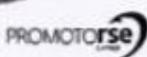
Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

"Amor, Orden y Progreso"

Mineral de la Reforma, Hgo., a 23 de junio de 2014

  
Dr. Orlando Avila Pozo  
Director del ICBI



Ciudad Universitaria Carretera Pachuca-Tulancingo  
Km. 4.5. s/n Col. Carboneras C.P. 42184  
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.  
Tel: (771)7172000 ext. 2230, 2231





El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Química Analítica y Electroquímica del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

El presente proyecto de investigación se realizó gracias al financiamiento del proyecto (Referencia: 62462) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y del CONACyT.

Juan Carlos Escamilla Mejía agradece la beca de proyecto de investigación otorgada por CONACyT (441228).

**Parte de este trabajo ha sido presentado en:**

- **III Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química UAM-2012** con el trabajo: *“Desarrollo de un biosensor monoenzimático de triglicéridos”*
- **XXVI Congreso Nacional de Química Analítica (CUCEI de la Universidad de Guadalajara en 2013)** con el trabajo: *“Biosensor potencimétrico lipasa-TCNQ para la cuantificación de triglicéridos”*

---

**Dedicado a mi familia y  
amigos, que son las  
personas de corazón más  
grande y de espíritu  
inquebrantable.**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis padres Ma. Del Carmen Mejía García y Carlos Escamilla Pérez con cariño y gratitud por haberme dado la vida, por el amor, por compartir experiencias de vida, por el apoyo moral y económico que me han brindado incondicionalmente durante todos estos años.*

*A mis hermanos Ma. Guadalupe Escamilla M. y César Escamilla M. con cariño por brindarme su cariño y apoyarme siempre.*

*A mis sobrinos Javier de Jesús E. y Jonathan Axel E. con cariño por brindarme su amor y darme momentos de alegría*

*A mis abuelos Elisa García Díaz y Facundo Mejía con cariño por su amor y por compartir tantas experiencias de vida.*

*A mis abuelos Juana Pérez Carrasco (q.e.p.d.) y Carlos Escamilla M. con cariño por su amor y cariño.*

*A mi cuñado Gilberto López Islas por brindarme su amistad.*

*A Carlos Andrés Galán Vidal por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender en el lapso de este proyecto. Mi respeto y admiración.*

*A José Antonio Rodríguez Ávila a quien aprecio, considero un amigo y admiro. Gracias por tu amistad, paciencia y apoyo para realizar este trabajo de tesis.*

*A Giaan Arturo Álvarez Romero por su amistad, aprecio y consejos. ¡Gracias amigo!*

*A Araceli Castañeda Ovando por su amistad, consejos y apoyo incondicional en las estancias inter-laboratorio.*

*A Luis Gil Borja a quien le tengo aprecio y estima. Le agradezco la oportunidad de compartir experiencias de vida que motivan a vivir. Mi respeto y admiración siempre.*

*A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo con sentimiento, que fue mi segunda casa, abierta a la enseñanza del conocimiento a través de sus libros y su gente.*

*A mis compañeros y amigos químicos con quien compartí buenos momentos, desafíos y tristezas. En ellos deposito la confianza que mis errores serán vistos con benevolencia y los aciertos sobrepasen a ellos. Agradeciendo la crítica constructiva que de mi trabajo se haga: Acela, Gaby I., Iraís, Julio, Erick A Zuñiga, Alberto A., Laura Adriana, Irma, Yu, Prisciliano, Israel, Íris, Lupita, Miriam, Enaim, Nancy, Etzael,*

*Fernando, Liliana, Juan G., José Juan, Pamela V., Evelin Cordero, Caro G., Naye, Mariana F., Claudia, Evelin G., compañeros de alimentos y ciencias ambientales.*

*A J. G. Portillo, Carlos Espinoza, Ale Farfan, Sirley, Ana García, Lizzy, Viri, Jenny, Vicky, Diana A., Diana L., Maricela Cruz, Amado, Marco G., Kevin, Mauro, Marco, Manolo, Chava, Tania L., Elizabeth H. y Carmen García por su amistad y apoyo incondicional.*

*A mis directores (Carlos Andrés Galán V. y José Antonio Rodríguez A.) e integrantes de mi comité (Giaan Arturo A. y Joseantonio Godoy) por haber contribuido en la mejora de éste trabajo de investigación.*

*A los doctores que impartieron cátedra y fueron guía en esta estancia: Dra. Myriam, Dr. José Antonio R., Dr. Carlos A. Galán, Dr. Giaan A. y Dr. J. Alfredo Guevara.*

*A los coordinadores de la Maestría en Química (Dra. Maricruz Sánchez Z. y Dr. Fco. Zuno) por su apoyo y entusiasmo para que mejore dicho programa.*

*A mis familiares, amigos y compañeros que son y han sido parte de mi vida como un testimonio de eterno agradecimiento por el apoyo moral que siempre me han brindado.*

# ÍNDICE

Índice.....	<i>i</i>
Índice de figuras.....	<i>iii</i>
Índice de tablas.....	<i>iv</i>
Resumen.....	<i>v</i>
<b>1.- ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
1.1 Triglicéridos en alimentos.....	2
1.2 Métodos de extracción de lípidos en alimentos.....	4
1.2.1 Método mecánico para la extracción de lípidos.....	4
1.2.2 Método para la extracción de lípidos con solventes orgánicos.....	5
1.2.3 Método para la extracción de lípidos sin solventes orgánicos.....	6
1.2.3.1 Extracción de lípidos por fluidos supercríticos.....	6
1.2.3.2 Extracción de lípidos en medio acuoso.....	7
1.3 Uso de emulsiones aceite/agua (o/w) en alimentos.....	7
1.4 Métodos para la cuantificación de triglicéridos.....	9
1.4.1 Métodos cromatográficos para la cuantificación de triglicéridos.....	9
1.4.1.1 Cromatografía de gases.....	10
1.4.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución.....	12
1.4.1.3 Cromatografía de capa fina.....	14
1.4.2 Métodos espectrofotométricos.....	15
1.4.3 Sensores químicos.....	17
1.4.3.1 Biosensores.....	18
1.4.3.2 Biosensores electroquímicos basados en enzimas.....	19
1.4.3.2.1 Amperométricos.....	19
1.4.3.2.2 Potenciométricos.....	20
1.4.3.3 Inmovilización de enzimas.....	25
1.4.3.3.1 Lipasas.....	27
1.4.3.3.2 Propiedades catalíticas de las lipasas.....	27

<b>2.- OBJETIVOS</b>	
2.1 Objetivo General.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
<b>3.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	
3.1 Reactivos y soluciones .....	33
3.2 Construcción y evaluación del biosensor potenciométrico para cuantificación de triglicéridos.....	33
3.2.1 Construcción del electrodo composite grafito-epoxy .....	33
3.2.2 Construcción del biosensor .....	34
3.2.3 Cuantificación potenciométrica de los biosensores .....	35
3.3 Análisis de interferentes.....	36
3.4. Análisis de triglicéridos en muestras de alimentos.....	36
3.4.1 Extracción de triglicéridos en muestras de alimentos.....	37
3.4.1.1 Método oficial .....	37
3.4.1.2 Extracción de triglicéridos en emulsión .....	38
3.4.2. Análisis de triglicéridos mediante potenciometría.....	38
3.4.4. Análisis de las muestras por espectrofotometría UV/Vis .....	38
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1 Evaluación de la sensibilidad del transductor grafito-epoxy al pH .....	40
4.2 Optimización del biosensor potenciométrico de triglicéridos.....	42
4.3 Validación del método propuesto para la cuantificación de triglicéridos .....	45
<b>5.- CONCLUSIONES</b> .....	52
<b>6.- REFERENCIAS</b> .....	54

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hidrólisis enzimática de triglicéridos.....	3
<b>Figura 2.</b> Reacciones involucradas en la cuantificación de triglicéridos por el método colorimétrico enzimático.....	17
<b>Figura 3.</b> Esquema del funcionamiento de un sensor químico .....	18
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de operación de electrodos de membrana con ionóforos selectivos a H <sup>+</sup> .....	22
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de la lipasa de <i>Rhizopus oryza</i> en un triglicérido de grupo acilo R''.....	28
<b>Figura 6.</b> Representación de la construcción de electrodos grafito-epoxy .....	34
<b>Figura 7.</b> a) Registro cronopotenciométrico para un electrodo de grafito-epoxy. b) Dependencia del potencial, respecto al cambio de pH. c) Dependencia del cambio de potencial, respecto a la concentración de protones en mM .....	40
<b>Figura 8.</b> a) Registro cronopotenciométrico para un electrodo de grafito-epoxy en solución enzimática, b) Dependencia del potencial (mV) respecto al cambio de concentración de tributirina ([TB] mM) .....	41
<b>Figura 9.</b> Estructura del Nafion.....	43
<b>Figura 10.</b> Interacciones lipasa-Nafion .....	44
<b>Figura 11.</b> Respuesta del biosensor de triglicéridos y curva de calibrado a diferentes concentraciones.....	45

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales emulsionantes de triglicéridos en alimentos .....	8
<b>Tabla 2.</b> Condiciones para la determinación de triglicéridos en diversas matrices ...	11
<b>Tabla 3.</b> Condiciones para la determinación de triglicéridos en matrices de alimentos por RP-HPLC .....	13
<b>Tabla 4.</b> Condiciones para la determinación de triglicéridos en matrices de alimentos por Ag-HPLC .....	14
<b>Tabla 5.</b> Determinación de triglicéridos en matrices de alimentos por UV/Vis .....	16
<b>Tabla 6.</b> Biosensores amperométricos para la cuantificación de triglicéridos .....	20
<b>Tabla 7.</b> Características de electrodos de óxidos metálicos de pH.....	22
<b>Tabla 8.</b> Características de electrodos ionóforos de pH .....	23
<b>Tabla 9.</b> Biosensores potenciométricos para la cuantificación de triglicéridos.....	24
<b>Tabla 10.</b> Clasificación de los principales métodos de inmovilización de enzimas en biosensores.....	26
<b>Tabla 11.</b> Principales componentes (%p/p) en muestras de alimentos.....	36
<b>Tabla 12.</b> Matriz de diseño factorial completo a tres niveles ( $3^2$ ).....	43
<b>Tabla 13.</b> Recuperación de tributirina .....	46
<b>Tabla 14.</b> Contenido de sólidos remanentes y grasas en alimentos comerciales....	47
<b>Tabla 15.</b> Contenido de grasas y triglicéridos en muestras de alimentos comerciales obtenidas por diferentes métodos de extracción .....	48
<b>Tabla 16.</b> Contenido de triglicéridos en muestras de alimentos comerciales obtenidas por potenciometría y espectrofotometría a partir del análisis de extractos por emulsión.....	49

# RESUMEN

El reciente cambio de hábitos alimenticios en la población ha generado un desequilibrio en los niveles de grasas consumidas diariamente, aumentando los niveles de triglicéridos (TG) en suero sanguíneo y convirtiéndose en un factor de riesgo para la salud humana; los altos niveles de TG están relacionados con diversos trastornos metabólicos como la obesidad, hipertensión e infartos.

Considerando la relevancia de los TG, para el análisis rutinario de TG se han desarrollado diversos métodos analíticos, entre los que destacan la espectrofotometría UV/Vis y la cromatografía de líquidos HPLC que debido a sus rigurosos procedimientos aumentan el tiempo de análisis y requieren de sofisticada instrumentación, lo que incrementa su costo. En contraparte, existen nuevas alternativas analíticas que se basan en el uso de biosensores de transducción electroquímica, mismas que han logrado simplificar el proceso analítico a bajo costo y con buena fiabilidad.

En el presente trabajo se describe el desarrollo de un biosensor potenciométrico basado en el uso de la enzima lipasa inmovilizada en una membrana de Nafion sobre un transductor grafito-epoxy. Dicho dispositivo ha sido utilizado para cuantificar TG en muestras de alimentos a partir de los extractos acuosos obtenidos por emulsión con goma arábica. La metodología propuesta no presenta diferencias significativas respecto a la determinación espectrofotométrica utilizada como contraste.

Este trabajo de investigación constituye la primera descripción de un biosensor potenciométrico basado en la detección de los cambios de pH mediante un transductor grafito-epoxy y constituye el primer dispositivo potenciométrico que no utiliza un ISFET como transductor por lo que puede ser fabricado sin la necesidad de contar con costosas instalaciones para su producción.

La metodología diseñada es una alternativa sencilla y de bajo costo que permite minimizar el uso de disolventes orgánicos, sin afectar la precisión y exactitud del análisis en muestras complejas de alimentos como mantequilla, papas fritas y pan dulce.

ANTECEDENTES

---

---

## 1.- ANTECEDENTES

### 1.1 Triglicéridos en alimentos

Los alimentos son en términos generales, mezclas complejas de sustancias. Sus componentes sirven para la nutrición del hombre; es decir, para la síntesis e intercambio de sustancias destinadas a la constitución y funcionamiento del organismo, así como para la obtención de energía. Se caracterizan por poseer propiedades como aspecto, olor, sabor y consistencia; mismas que determinan su valor culinario, lo que les confiere importancia para su aceptación. La composición de los alimentos incluye los siguientes nutrimentos: proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y sales minerales [1].

Alimentos como carne, huevo, productos lácteos y grasas, particularmente la mantequilla, margarina y aceites, son las fuentes primarias de las grasas comestibles o lípidos de la dieta. Estos están formados fundamentalmente por triglicéridos TG (>95%) y otros lípidos saponificables complejos (como fosfoglicéridos) y lípidos no saponificables (terpenos y esteroides) en menor proporción (<3%). Los TG destacan sobre otros nutrientes por el alto aporte energético fisiológico, el cual es de 9 Kcal/g, mientras que para proteínas y carbohidratos es de 4 Kcal/g. Por otra parte los TG almacenados en depósitos grasos en el organismo, proporcionan protección del esqueleto y órganos, además de funcionar como un aislante térmico eficiente. Adicionalmente, este tipo de lípidos son imprescindibles para la biosíntesis de sustancias de importancia metabólica como fosfolípidos, colesterol y vitaminas [2,3]

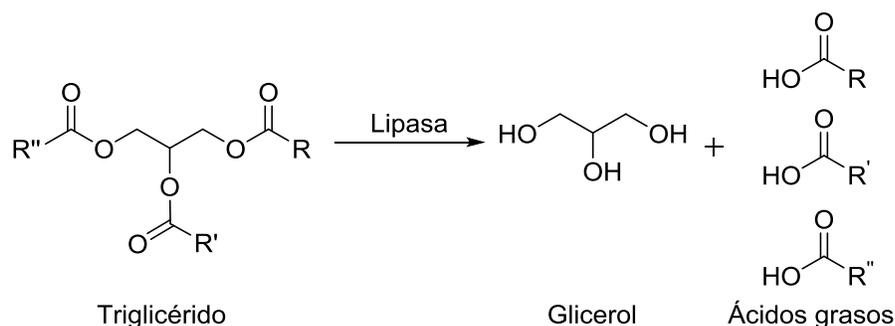
Para poder utilizar la energía almacenada en células adiposas, los TG deben ser transformados a una mezcla de ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos liberados son llevados a las células del hígado, corazón y otros músculos donde se lleva a cabo su oxidación total, llegando a la formación de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. En los seres humanos y otros animales, existen tres fuentes primarias de ácidos grasos para el metabolismo energético: a) TG de la dieta, b) TG sintetizados en el hígado, c) TG almacenados en los adipocitos como gotas de lípidos. Los procesos de digestión, absorción y transporte de grasas de la dieta en los animales superiores son complicados porque no son solubles en agua. Para que los TG estén listos para almacenarse o utilizarse como fuente de energía, primero deben experimentar varias etapas de preparación, que van desde la emulsificación en el intestino delgado hasta su almacén en los adipocitos o su catabolismo en los músculos [4].

La ingesta desmedida de alimentos con gran valor energético produce acumulaciones anormales de TG en el cuerpo, produciendo la ganancia de peso por

---

el incremento del tejido adiposo. El incremento de peso en el organismo se asocia con la enfermedad metabólica llamada obesidad, la cual depende de factores genéticos y ambientales. La distribución de grasa y el grado de obesidad tienen un efecto independiente y aditivo sobre la glucosa plasmática, los niveles de TG y la presión sanguínea [5,6]. Diversos estudios epidemiológicos han asociado directamente la obesidad y las enfermedades cardiovasculares, siendo las segundas la principal causa de defunción en todo el mundo según muestra la Organización Mundial de la Salud [7]. Como consecuencia se recomienda el monitoreo rutinario de los niveles de TG en suero sanguíneo para detectar posibles anomalías como la hipertrigliceridemia en el paciente, lo que permite aplicar un tratamiento oportuno que disminuye los niveles de estos lípidos que son considerados como “factor de riesgo” de las enfermedades cardiovasculares. Estos tratamientos involucran, además de medicamentos, el cambio en el estilo de vida, promoviendo el ejercicio y la disminución de la ingesta calórica de carbohidratos refinados y grasas saturadas. El resultado es la pérdida de peso y la reducción en los niveles de TG en sangre que se ven reflejados en la salud del paciente [5,8].

Los TG, llamados también triacilgliceroles son lípidos simples que tienen un origen natural o sintético; se encuentran en forma de grasas y/o aceites. Los TG están formados por glicerol (1,2,3-propanotriol) y tres ácidos grasos o tres grupos acilo; son simples si tienen grupos acilo iguales y mixtos si contienen dos o tres grupos acilo diferentes (Fig.1) [9].



**Figura 1.** Hidrólisis enzimática de triglicéridos

Las propiedades físicas y químicas de estos compuestos se deben principalmente a los ácidos grasos que constituyen su estructura, y son [10]:

1. Poco solubles en agua y solubles en disolventes apolares.

2. Su punto de fusión viene determinado por el número de carbonos y grado de saturación de los ácidos grasos. Esta propiedad distingue unos acilglicéridos de otros. Se denominan grasas los que son sólidos a temperatura ambiente y aceites a los que son líquidos.
3. La configuración estructural en estado líquido de un TG, depende de la cadena del ácido graso. Las tres cadenas de ácidos grasos forman entre si un ángulo de 120° aproximadamente.
4. La hidrólisis de TG es inversa a la esterificación y es una reacción reversible. Se realiza calentando en presencia de ácidos fuertes o por acción de enzimas específicas, como las lipasas pancreáticas, aunque de igual manera se puede llevar a cabo con álcalis, usando NaOH o KOH para formar “jabones” por un proceso de saponificación. Este tipo de reacciones permite la formación de fases intermedias parciales de diglicéridos y monoglicéridos. Otra alteración que ocurre frecuentemente en las grasas es el “enranciamiento”, es decir la hidrólisis parcial por calor y humedad; una oxidación de los ácidos grasos insaturados a aldehídos y cetonas. La oxidación por fermentación de estos lípidos conduce de igual manera a la formación de cetonas.

## **1.2 Métodos de extracción de lípidos en alimentos**

Los lípidos contenidos en alimentos provienen principalmente de tejidos animales y vegetales que conforman una matriz celular compleja donde las fuerzas intramoleculares e intermoleculares prevalecen todo el tiempo. Estas interacciones dificultan la separación de los lípidos y hace necesario el uso de diferentes tratamientos químicos y físicos para su extracción. Esta separación permite aumentar su pureza, elimina componentes no deseados e incrementa el valor añadido de los productos [11].

### **1.2.1 Método mecánico para la extracción de lípidos**

Desde el siglo XVI a.C. se tienen registros de sistemas mecánicos utilizados para la extracción de aceites de distintos frutos y semillas en la región del Mediterráneo. Estas técnicas primitivas utilizaban procesos de prensado, torsión en sacos y compresión de la pulpa mediante piedras, entre otras. Estos procesos eran cotidianos en la extracción de aceite de oliva. Para lograr extraer la mayor cantidad posible de aceite se vertía agua caliente [12]. Actualmente la obtención de aceites de distintas semillas sigue los mismos principios mecánicos usados en la antigüedad;

---

sin embargo, se ha logrado aumentar la eficiencia de la extracción gracias a la comprensión de la naturaleza de los lípidos, así como a los avances tecnológicos. No obstante, siempre se debe evaluar un tratamiento particular, si se requiere un aceite con mejores características de pureza.

### **1.2.2 Método para la extracción de lípidos con solventes orgánicos**

La extracción de lípidos rutinaria en la industria alimentaria utiliza gran variedad de disolventes y se realiza por métodos estándares establecidos por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), los cuales constituyen una serie de etapas que se describen a continuación [13]:

*Pretratamiento de la muestra.* Los procedimientos aplicados antes de la separación de lípidos facilitarán los procesos de extracción. Incluye un proceso de secado que rompe las emulsiones existentes en la muestra del alimento y un proceso de molienda que permite la reducción del tamaño las partículas para una mejor interacción con el disolvente.

*Homogenización y separación de lípidos con solventes orgánicos.* La hidrofobicidad de los lípidos permite su separación con solventes orgánicos en una sola fase, separándola de carbohidratos, proteínas, aminoácidos y otros componentes encontrados en la matriz. Los disolventes más utilizados para la extracción de lípidos son los alcoholes (metanol, etanol, isopropanol, n-butanol), acetona, acetonitrilo, éteres (éter dietílico, éter isopropílico, dioxano, tetrahidrofurano), hidrocarburos halogenados (cloroformo, diclorometano), hidrocarburos (hexano, benceno, ciclohexano, isooctano) o sus mezclas.

*Eliminación del disolvente y secado del extracto.* Para obtener el extracto lipídico se recurre a la evaporación de disolvente orgánico que tiene un punto de ebullición bajo y facilita su separación. Debido a que el disolvente no es extraído en su totalidad se sigue un procedimiento de secado.

Actualmente mediante métodos gravimétricos rutinarios se logran cuantificar las grasas totales de gran variedad de alimentos por medio de procedimientos de extracción que utilizan disolventes orgánicos. Las ventajas de utilizar estos métodos de extracción son: la obtención de la fracción lipídica con alto rendimiento y la conservación de su integridad durante el proceso, ya que se evita la degradación hidrolítica y oxidativa, lo que facilita la cuantificación y caracterización [14].

Los lípidos totales o grasas totales están compuestos por los lípidos libres y ligados a los tejidos de los alimentos. La determinación de grasas totales (grasas comestibles) se define como la suma de los ácidos grasos expresados como TG según dicta la ley de etiquetado y educación nutrimental [15].

Los procedimientos extractivos para obtener lípidos con disolventes orgánicos más utilizados en la industria alimenticia son: el método oficial de la AOAC para lípidos libres (mejor conocido como extracción Soxhlet), el método de Folch y el método Bligh y Dyer.

La extracción de lípidos directa por Soxhlet utiliza principalmente el éter de petróleo como disolvente no polar, el cual tiene estabilidad química, bajo punto de ebullición (40-60 °C) y tiene una mayor afinidad por los lípidos mayoritarios en los alimentos, aunque se pueden utilizar n-hexano o éter dietílico para realizar el mismo procedimiento [16]. El uso de mezclas de disolventes orgánicos favorece la extracción completa de lípidos, incluyendo aún a los más polares; además, reduce considerablemente uso de volúmenes de disolventes orgánicos respecto al método oficial de la AOAC. El método Folch utiliza una mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v) y puede utilizarse en alimentos húmedos que no fueron sometidos a secado [17]. El método Bligh y Dyer es la modificación del Folch, que aumenta las proporciones de los disolventes en una relación (1:3 v/v) [18,19].

### **1.2.3 Método para la extracción de lípidos sin solventes orgánicos**

La industria alimentaria busca métodos alternativos que faciliten la extracción de los lípidos y contribuyan con las regulaciones ambientales al disminuir y/o eliminar el uso de disolventes orgánicos [20].

#### **1.2.3.1 Extracción de lípidos por fluidos supercríticos**

La extracción por fluidos supercríticos (SCFE) es una separación donde componentes de una sustancia son disueltos en un fluido, el cual es capaz de modificar su capacidad de disolución por los cambios de presión y temperatura. Un fluido supercrítico (SCF) es un líquido o gas que se comprime por encima de su presión crítica y se calienta por encima de su temperatura crítica, proporcionándole propiedades fisicoquímicas intermedias entre un líquido y un gas, que le permiten tener una mayor difusión en gran diversidad de compuestos. Algunos ejemplos de disolventes utilizados como SCF son: agua, acetileno, etanol, metanol y el dióxido de carbono, siendo el último compuesto el más utilizado en la industria alimenticia.

---

El proceso de SCFE ha mostrado ventajas sobre el método convencional que utiliza disolventes al disminuir el número de operaciones en el proceso ya que lleva a cabo la extracción y separación de forma simultánea, reduce el uso de disolventes orgánicos, evita la descomposición por calor y oxidación ya que el fluido utilizado es inerte, de fácil recuperación y no deja residuos. Sin embargo, mantener las condiciones especiales de presión y temperatura del disolvente por medio de equipos especializados que aumentan el costo por procesado, limitándolo a una serie de alimentos [21].

El uso del CO<sub>2</sub> como SCF es ampliamente utilizado para la extracción de lípidos debido a su fácil accesibilidad, alta pureza y fácil manipulación. Las ventajas del método de extracción por fluidos supercríticos han sido recomendadas por la AOAC como una alternativa para la extracción de grasas y aceites. Algunos ejemplos de alimentos a los que se les extrajeron las grasas (como triglicéridos) utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico son: huevo, leche, carne de res, carne de cerdo, nuez moscada, hinojo, avellana, pimienta y cacao [20,22,23].

### **1.2.3.2 Extracción de lípidos en medio acuoso**

El método de Weibull y Schimidt se realiza en fase acuosa para separar los lípidos y es aplicado para gran variedad de alimentos simples o compuestos. El procedimiento implica una hidrólisis con ácido clorhídrico para liberar las grasas en forma de ácidos grasos principalmente, lo que permite cuantificar de forma indirecta la fracción correspondiente a grasas totales, sin embargo imposibilita la caracterización de los distintos lípidos por que han cambiado químicamente. El tratamiento con álcalis (método de Röse Gottlieb) tiene ventajas similares al llevado a cabo en medio ácido [15].

### **1.3 Uso de emulsiones aceite/agua (o/w) en alimentos**

Las emulsiones son ampliamente utilizadas en los estudios de estabilidad cinética de lipasas y otras enzimas en sistemas acuosos [24]. También se utilizan en la industria alimentaria para conservar y mantener homogénea la consistencia de los lípidos en los alimentos. Otra aplicación es su uso para formar micelas por medio de tensoactivos para facilitar la extracción de lípidos de muestras de alimentos y disminuir el uso de disolventes orgánicos [13].

Una emulsión es una mezcla de dos fases inmiscibles, una dispersa o discontinua, en forma de gotitas o cristales líquidos, y otra fase no dispersa o continua. Las

---

emulsiones del tipo aceite en agua (o/w) utilizan emulsionantes para reducir la tensión superficial y aumentar el área superficial de las gotas de aceite en la fase continua ya que se favorece termodinámicamente su formación y disminuye su ruptura conforme al tiempo por fenómenos fisicoquímicos como: la sedimentación (diferencia de densidad), la desproporcionalización (disminución del área superficial), la floculación y la coalescencia (aumento de las fuerzas de atracción de Van de Waals y disminución en la fuerza electrostática al disminuir la distancia de separación entre las gotas) [25,26].

Un emulsionante o surfactante es una molécula anfifílica, es decir, que tiene una zona molecular polar que interacciona con las moléculas del agua y otra hidrófoba que lo hace con la fase lipídica. Estas moléculas se pueden clasificar por su estructura como: aniónicos, cationicos, no-iónicos o anfotéricos. Los emulsionantes generalmente son adicionados después de un pretratamiento del alimento para estabilizar las emulsiones de aceite en agua, por ejemplo, para la extracción de los lípidos de la leche; primero se rompe la capa proteica del alimento con fosfato sódico seguido del emulsiónante monolaurato de sorbitan [27,28]. En la Tabla 1 se muestran diversos emulsionantes grado alimenticio utilizados en la industria alimenticia.

**Tabla 1.** Principales emulsionantes de triglicéridos en alimentos

<b>Naturaleza</b>	<b>Emulsionantes</b>	
<b>Polisacáridos</b>	Goma arábica (goma acacia)	Pectina de la remolacha
	Almidones modificados	Goma de fibra de maíz
	Metilcelulosa	Polisacárido de soya soluble
	Hidroxipropilcelulosa	Quillaja saponaria
	Metil-p-hidroxipropilcelulosa	
<b>Proteínas</b>	Globulina	Gelatina de pescado y animales
	Lactoalbúmina	
	Caseína	
<b>Sintéticos</b>	Monolaurato de sorbitán polietoxilado (Tween 20)	Monooleato de sorbitán polietoxilado (Tween 80)
	Monopalmitato de sorbitán polietoxilado (Tween 40)	Sucroésteres de ácidos grasos
	Monoesterato de sorbitán polietoxilado (Tween 60)	

La goma arábica es un polisacárido complejo de alta solubilidad en agua debido a grupos funcionales polares existentes en su estructura como  $-OH$ . Se extrae de árboles de acacia en África y es ampliamente utilizado como emulsionante de TG en bebidas, debido a su estabilidad ante los cambios físicos y químicos producidos por la ambientación. Las propiedades de las emulsiones formadas por este polisacárido han mostrado estabilidad en un amplio rango de pH (3.0-9.0), a la presencia de electrolitos provenientes de sales ( $NaCl$ ,  $CaCl_2$ ) y al tratamiento térmico (30-90 °C). Las soluciones de goma arábica tienen una baja viscosidad en comparación con otras gomas, característica que le permite incorporar una mayor cantidad de TG hasta alcanzar una viscosidad alta, cuando la concentración de goma se aproxima al 50% [27].

#### **1.4 Métodos para la cuantificación de triglicéridos**

Actualmente los métodos de análisis y caracterización de TG comprenden un gran número de técnicas clásicas e instrumentales entre las que destacan la gravimetría, cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (GC), espectroscopia UV/Vis y espectrometría de masas (MS). Por otra parte, en las últimas décadas el uso de biosensores electroquímicos se ha convertido en una alternativa fiable para el análisis de estos lípidos.

Es de gran relevancia destacar la vigencia y uso de las técnicas gravimétricas en los métodos oficiales AOAC para la cuantificación rutinaria de lípidos gracias a su exactitud e instrumentación común y sencilla. El ejemplo más conocido es el “método Soxhlet” para la cuantificación de dichos extractos después de evaporar el disolvente.

##### **1.4.1 Métodos cromatográficos para la cuantificación de triglicéridos**

Uno de los objetivos en la determinación cuantitativa y cualitativa de TG en aceites y grasas es la autenticación de las muestras, la cual es difícil debido al gran número de posibles combinaciones de los ácidos grasos en la cadena de glicerol. Los aceites vegetales contienen entre cinco y diez ácidos grasos, mientras que las grasas animales pueden ser mucho más complejas y contener entre diez y cuarenta ácidos grasos diferentes. Los ácidos grasos más abundantes son: palmítico (P;  $C_{16}H_{32}O_2$ ), esteárico (E;  $C_{18}H_{36}O_2$ ), oleico (O;  $C_{18}H_{34}O_2$ ), linoléico (L;  $C_{18}H_{32}O_2$ ) y linolénico (Ln;  $C_{18}H_{30}O_2$ ) [29].

---

La determinación de TG mediante métodos cromatográficos ha permitido establecer los perfiles de composición que funcionan como “huellas dactilares”, ya que se ha encontrado una distribución estereo-específica de los ácidos grasos unidos al glicerol, la cual es única para cada alimento [30]. Las técnicas cromatográficas son de gran relevancia en la autenticación de aceites encontrados en varios alimentos como: aceite de oliva, aceites vegetales, grasas animales, aceite de pescado, leche y sus derivados, cacao y café [31].

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen en dos fases: una fase móvil, que puede ser gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase móvil en conjunto con los analitos se hace pasar por una fase estacionaria fija en una columna o una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los analitos contenidos en la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que los componentes que se unen débilmente a ésta fase, se mueven con mayor velocidad. Como consecuencia de las distintas movilidades, los componentes de las muestras se separan en bandas o zonas discretas que pueden utilizarse para el análisis cualitativo o cuantitativo [32].

#### **1.4.1.1 Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases (GC) es una técnica separativa útil en la determinación de TG sin hidrólisis previa. La elución de los TG se produce por el flujo de gases inertes como  $H_2$ ,  $N_2$ , y He en la fase móvil dentro de la columna cromatográfica. Las columnas utilizadas se componen generalmente de polisiloxano funcionalizado con grupos metilo y fenilo. La composición de la fase estacionaria determina la baja o media polaridad de la columna [33].

La separación de los TG depende de las insaturaciones en su estructura, así como, del número total de carbonos (NC), los cuales son la sumatoria de los carbonos contenidos en las cadenas de ácidos grasos libres. La elución para el NC se da primero por los TG de menor NC seguida de los de mayor longitud, de manera general se separan los TG que contienen entre 24-56 NC. La detección se realiza a temperaturas entre 340 y 390 °C utilizando el detector de ionización de llama (FID). El análisis cuantitativo se realiza mediante la interpretación del cromatograma obtenido durante la separación de los lípidos, el cual muestra la relación señal/tiempo donde se lleva el fraccionamiento o separación de cada componente. La cuantificación total de los TG está dada por la suma de fracciones que contienen el mayor número de ácidos grasos abundantes [33]. Cada fracción depende del área

---

bajo la señal o pico correspondiente a los TG con igual NC. Los picos de los TG se determinan por NC mediante una fórmula para la identificación de ácidos grasos. La variación de tamaño y número de picos está relacionada con las cantidades y/o los diferentes grupos de TG en aceites y grasas [34]. Las condiciones para el análisis por GC para triglicéridos en diversas muestras se presentan la Tabla 2.

**Tabla 2.** Condiciones para la determinación de triglicéridos en diversas matrices

<b>Matriz</b>	<b>Columna GC</b>	<b>Fase móvil</b>	<b>Detección con base en NC</b>	<b>Ref.</b>
Aceite: palma, avellana, nuez, nuez de brasil	PhMeSi 50%., 25 m x 0.25 mm; 0.12 µm Separación isotérmica 370 °C	H <sub>2</sub>	C <sub>32</sub> - C <sub>56</sub>	35
Muestras de queso	PhMeSi (CB-TAP)., 25 m x 0.25 mm; 0.1µm Rampa de temperatura 280-350°C	He	C <sub>26</sub> - C <sub>54</sub>	36
Mezcla sintética de triglicéridos	PhMeSi 75% (SOP-75)., 15 m x 0.32 mm; 0.2 µm Rampa de temperatura 280-390°C	H <sub>2</sub>	C <sub>42</sub> - C <sub>56</sub>	37
Plasma sanguíneo	PhMeSi 50% (RSL-300)., 25m x 0.25 mm; 0.12 µm Rampa de temperatura 290-360°C	H <sub>2</sub>	C <sub>48</sub> - C <sub>54</sub>	38
Aceite: oliva, cacahuate, palma	PhMeSi 50% (OV-17-OH)., 25 m x 0.25 mm; 0.1 µm Rampa de temperatura 320-340°C	H <sub>2</sub>	C <sub>50</sub> - C <sub>56</sub>	39
Grasa de leche de cabra	PhMeSi 65% (RTx-65)., 2.5 m x 0.25 mm; 0.1 µm Separación isotérmica 355 °C	He	C <sub>24</sub> - C <sub>54</sub>	40

#### 1.4.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución, HPLC por sus siglas en inglés es la técnica más empleada para el análisis de las especies moleculares de TG debido a su mayor sensibilidad y selectividad. La HPLC, a diferencia de la GC, para su funcionamiento necesita de una fase móvil líquida. Al tener una amplia elección de fases móviles se favorece la selectividad y la separación de un mayor número de grupos de TG. No obstante desde el punto de vista operativo, ambos métodos tienen resultados adecuados [41,42].

Una clasificación ampliamente utilizada para esta cromatografía, es con base en la polaridad relativa de las fases involucradas [43]:

*Cromatografía de fase normal (NP).* La fase estacionaria es de naturaleza polar (p. ej. sílice y alúmina) y la fase móvil es apolar (p. ej. n-hexano o tetrahidrofurano). Las muestras quedan retenidas por procesos de adsorción reversibles sobre la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares. El método de NP-HPLC es ampliamente utilizado en el análisis de diacilgliceroles, monogliceroles, ésteres metílicos, esteroides, ácidos grasos libres y fosfolípidos; no siendo así para el análisis de TG, ya que no tiene buena selectividad en la separación de las diversas especies moleculares de dichos lípidos [36].

*Cromatografía de fase inversa o reversa (RP).* La fase estacionaria es apolar (p. ej. gel de octadecilsilano ODS o C-18), mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente mezclas agua con metanol, acetona y acetonitrilo. En este caso, cuando más apolar sea la muestra, mayor será su retención. La RP-HPLC es el método más utilizado para el análisis de TG debido a que permite realizar separaciones basadas en el NC y su grado insaturación logrando una mejor caracterización de los TG [30].

Para el análisis de los TG se utilizan detectores ultravioleta (UV), índice de refracción (RI) y de ionización de llama (FID). La caracterización cualitativa y cuantitativa de los TG en alimentos se realiza de igual manera mediante la sumatoria de área. En la Tabla 3 se muestran las condiciones descritas para la cuantificación de TG en distintos alimentos. Trabajos actuales sugieren el acoplamiento a un espectrómetro de masas (MS) como detector para obtener datos más precisos respecto a los anteriores sistemas de detección [41].

**Tabla 3.** Condiciones para la determinación de triglicéridos en matrices de alimentos por RP-HPLC

Matriz	Columna HPLC	Fase móvil	Detector	Detección con base en NC	Ref.
Aceite de oliva	ODS Zorbax., 60 x 6.2 mm; 5 $\mu$ m	ACN-DCM	FID	C <sub>24</sub> - C <sub>54</sub>	44
Mantequilla, aceite de: soya, girasol, palma, oliva, cacahuate	Hibar RP-18., 250 x 4 mm; 5 $\mu$ m	ACN	IR	C <sub>12</sub> – C <sub>66</sub>	45
Aceite de soya	Spherisorb-5-ODS2., 150 x 4.6 mm; 5 $\mu$ m	ACN-MTBE	UV <sub>215 nm</sub>	C <sub>24</sub> - C <sub>50</sub>	46
Leche humana	Supelcosil LC-18., 250 x 4.6 mm; 5 $\mu$ m	AC-ACN	IR	C <sub>36</sub> - C <sub>54</sub>	47
Aceite de onagra	Supelcosil LC-18., 250 x 4.6 mm 5 $\mu$ m	ACN-iProp	UV <sub>215 nm</sub>	C <sub>35</sub> - C <sub>52</sub>	48

AC = acetona; ACN = acetonitrilo; DCM = diclorometano; iProp = iso-propanol; MTBE =metiliterbutileter; IR= índice de refracción; FID=detector de ionización en llama; UV = ultravioleta

#### *HPLC de ión plata (Ag-HPLC)*

La cromatografía de iones plata (Ag) es aplicada con la misma finalidad que RP-HPLC. Se fundamenta en la formación de un complejo de interacción específica entre las insaturaciones del lípido y el ión plata; hecho que mejora la separación al igual que RP-HPLC, debido a las insaturaciones de los ácidos grasos. La elución de los TG se realiza utilizando disolventes en toda el intervalo de polaridad. En la Tabla 4 se muestran las condiciones para la cuantificación de TG para distintos alimentos mediante cromatografía de ión plata [29,49].

**Tabla 4.** Condiciones para la determinación de triglicéridos en matrices de alimentos por Ag-HPLC

Matriz	Columna HPLC	Fase móvil	Detector	Detección con base en NC	Ref.
Aceite de palma, cacahuete, girasol y pescado, mantequilla de cacao	ODS-3 $\mu\text{m}$ ., 2 x 150 x 4.6 mm	BZ (isocrática) DCE-DCM; AC; AC- ACN (gradiente)	FID	C <sub>30</sub> – C <sub>42</sub>	50
Muestra sintética	ChromSphere., 250 x 2 mm; 5 $\mu\text{m}$	Hex-ACN (isocrático)	UV	C <sub>24</sub> - C <sub>54</sub>	51

BZ = benceno; ACN = acetonitrilo; AC = acetona; DCM = diclorometano;  
DCE = dicloroetano; Hex = hexano

#### 1.4.1.3 Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (TLC) es utilizada para la separación rápida de TG en grasas y aceites puros. La cuantificación puede realizarse en una segunda etapa mediante el revelado de la placa y el análisis de la absorbancia producida o mediante la elución de los analitos de la fase estacionaria y análisis posterior de los extractos por otras técnicas cromatográficas (GC y HPLC) o espectroscópicas (UV/Vis) [30].

Existen tres formas de uso de la TLC: NP-TLC, RP-TLC y Ag-TLC. El mecanismo de separación de TG es similar al de HPLC. De manera general, las disoluciones problema contienen acetona como disolvente. Uno de los reveladores más empleados es el ácido fosfomolibdico, el cual se calienta a una temperatura de 110°C produciendo una coloración gris-azulada. El correspondiente número de bandas y su secuencia, así como su posición (valor  $r_f$ ), es característico de cada grasa. El uso del ácido fosfomolibdico, en el procedimiento no permite la recuperación de los lípidos, por lo que la cuantificación suele realizarse midiendo la densidad óptica. Existen descritos el uso de reveladores como la clorofluoresceína, yodo y rodamina 6G que permiten la recuperación de los componentes separados. Los cromatogramas obtenidos a diferentes concentraciones permite la cuantificación

mediante interpolación en la línea de calibrado obtenida mediante el procesamiento de imagen. Por otro lado la cuantificación fuera de línea se puede realizar por espectroscopia UV/Vis o cromatografía de gases después de extraer las muestras fraccionadas en la TLC cuando el procedimiento es no destructivo. Aunque se tienen buenas estimaciones en la determinación de TG por estas metodologías, el procedimiento para la cuantificación es laborioso por lo que se le considera más como un método separativo [52,53].

#### 1.4.2 Métodos espectrofotométricos

El análisis de TG se basa en las posiciones de absorción de energía electromagnética dentro del espectro UV/visible (longitud de onda de 800 a 100 nm) como consecuencia de las transiciones entre los niveles de energía electrónica de los grupos funcionales que los componen. A estos grupos funcionales también se les denomina cromóforos. Los grupos característicos de los TG son: el grupo éster y el enlace doble de alquenos. Aunque comúnmente se encuentran en su estructura enlaces dobles conjugados.

En la industria de los alimentos, la espectrofotometría UV/Vis es ampliamente utilizada para determinar la composición, identificar adulteraciones y degradación de lípidos. La caracterización se realiza mediante su espectro UV, el pico de absorción a una longitud de onda definida tiene un coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) característico para cada molécula que conforma la grasa, pudiendo relacionar el perfil espectral teórico con la composición de la muestra [52].

La longitud de onda donde absorbe el cromóforo del grupo funcional éster está entre 200-230 nm, el doble enlace sin conjugar absorbe a una longitud de onda menor a 210 nm, mientras los dienos y trienos conjugados absorben a longitudes mayores a 230 nm. La cercanía de la absorción entre estos dos tipos de cromóforos puede generar aditividad en la absorbancia del espectro UV/Vis. Para evitar esa contribución o interferencia del doble enlace en la absorción del grupo éster las mediciones se realizan a 220 nm. Las longitudes de ondas entre 230-300 nm se utilizan para determinar la proporción de los distintos ácidos grasos que componen al TG. Otro aspecto importante es el uso de un disolvente orgánico que no cause interferencia en el análisis de los TG. El isooctano es comúnmente utilizado para disolver las grasas y aceites debido a que no absorbe en la región UV/Vis donde se lleva el análisis a diferencia del cloroformo, acetona, acetato de etilo o tolueno que absorben fuertemente entre 200 y 220 nm [54]. En la Tabla 5 se muestran las condiciones de análisis de TG por espectrofotometría para muestras de aceite.

---

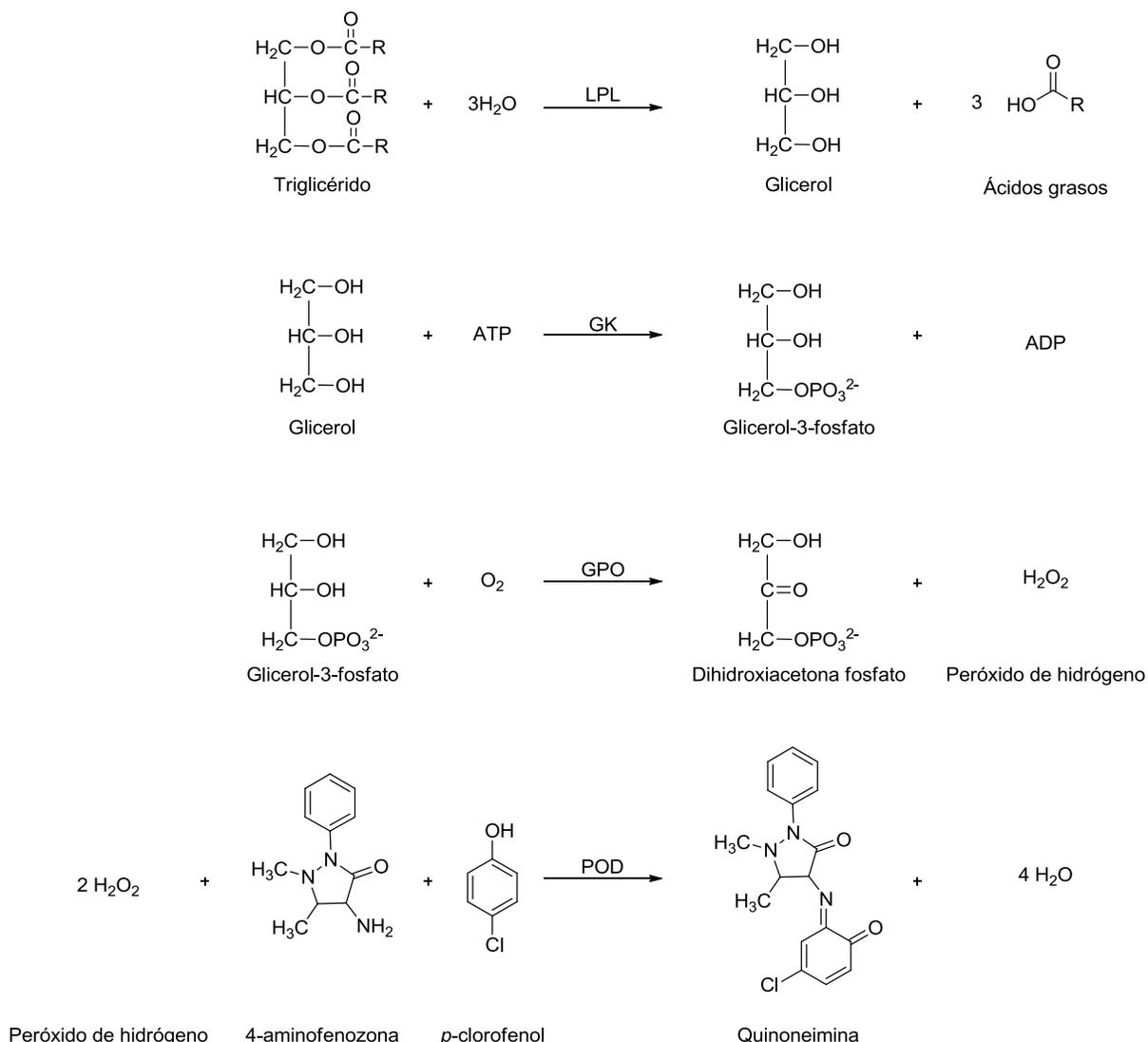
**Tabla 5.** Determinación de triglicéridos en matrices de alimentos por UV/Vis

<b>Matriz</b>	<b><math>\lambda</math> (nm) de análisis</b>	<b>Composición</b>	<b>Ref.</b>
Aceite de orujo de oliva, oliva refinado, oliva lampante y orujo de oliva refinado	232	LLL	55
Aceite de oliva	232 y 274	Diferentes composiciones de O, L, Ln en triglicéridos	54

O = ácido oléico; L = ácido linoleico; Ln = ácido linolénico

Alternativamente se han descrito métodos espectrofotométricos que involucran enzimas lipasas para la cuantificación de TG. El método enzimático espectrofotométrico es aplicado para la cuantificación directa de TG en matrices complejas. Se puede utilizar indistintamente en muestras de suero sanguíneo, grasas y aceites, aunque su popularidad es mayor en el análisis clínico de TG.

El principio del método se basa en la hidrólisis de los TG utilizando lipoproteinalipasa (LPL) para la formación de glicerol y ácidos grasos libres. Este método multienzimático involucra varias reacciones, las cuales se observan en la Figura 2. Las reacciones involucran la fosforilación del glicerol en presencia de glicerol quinasa (GK) y trifosfato de adenosina (ATP), para producir glicerol-3-fosfato. Éste reacciona con el oxígeno y glicerol-3-oxidasa (GPO), para formar dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con la 4-aminofenazona y p-clorofenol, en presencia de peroxidasa (POD) dando como producto una quinonaimina de coloración roja que se detecta a longitud de onda 505 nm [56]. El límite de detección del método en muestras de suero sanguíneo humano es de 11.3  $\mu$ M utilizando trioleina como estándar [57].

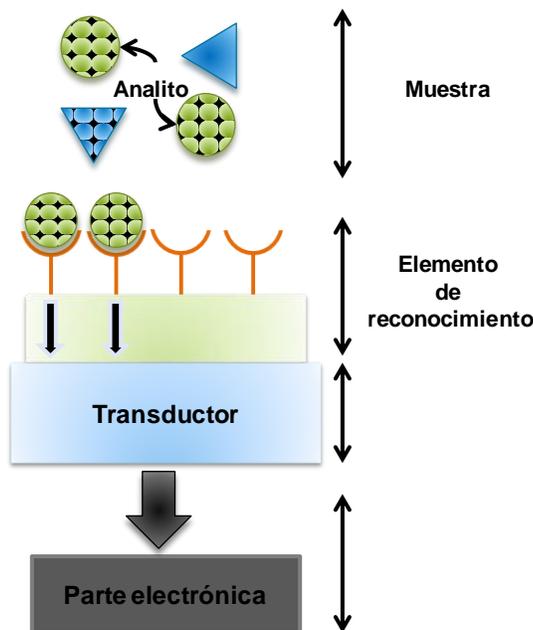


**Figura 2.** Reacciones involucradas en la cuantificación de triglicéridos por el método colorimétrico enzimático. Donde LPL = lipoproteínlipasa; GK = glicerol quinasa; GPO = glicerol-3-oxidasa; POD = peroxidasa; ATP = trifosfato de adenosina; ADP = difosfato de adenosina

### 1.4.3 Sensores químicos

Los sensores químicos son dispositivos analíticos que transforman las señales producidas químicamente en una señal analítica útil. Están formados por un elemento de reconocimiento (receptor) que puede ser de naturaleza molecular o iónica y que está unido a un elemento instrumental (transductor). El funcionamiento de estos dispositivos se basa en reacciones selectivas entre el receptor y un

determinado analito contenido en la muestra. La reacción genera una señal primaria que es reconocida por el transductor el cual la transforma en una señal secundaria fácilmente procesable, generalmente una señal de tipo eléctrico [58]. El esquema general del funcionamiento de un sensor químico se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Esquema del funcionamiento de un sensor químico

Dentro de los sensores químicos destacan por su especificidad los biosensores, al incorporar un elemento biológico para realizar la función de reconocimiento del analito.

#### 1.4.3.1 Biosensores

El uso de biosensores en distintas áreas de la química es amplio y sigue en aumento, de acuerdo a nuevas necesidades de análisis que las diversas industrias demandan. Un grupo importante de biosensores utilizados para el análisis de TG han sido clasificados de acuerdo al transductor utilizado, existiendo los biosensores másicos [59], térmicos [60] ópticos [61] y electroquímicos. De este grupo sobresalen los de transducción electroquímica por sus ventajas de análisis como mayor sensibilidad, rapidez y practicidad. La clasificación de biosensores anterior no es absoluta para los dispositivos de transducción electroquímica ya que se puede

obtener otra clasificación en base al elemento de reconocimiento como: enzimáticos, inmunosensores y celulares [62]. Una descripción más detallada de los biosensores electroquímicos enzimáticos se presenta en el siguiente apartado.

#### **1.4.3.2 Biosensores electroquímicos basados en enzimas**

Este tipo de biosensores basan su funcionamiento en el cambio de magnitud eléctrica producido por la reacción del analito con el elemento biológico de reconocimiento. Su principal característica para el análisis se basa en la especificidad de las enzimas y sensibilidad del sensor electroquímico o transductor.

El uso de enzimas es ideal para llevar las transformaciones bioquímicas necesarias en los biosensores. El uso de lipasas y otras enzimas como la glicerol quinasa y la glicerolfosfato deshidrogenasa son utilizadas comúnmente en biosensores destinados a la cuantificación de TG en distintas matrices [63].

De manera general las enzimas son biomoléculas ampliamente utilizadas en transformaciones químicas específicas de compuestos biológicos que necesitan obtener un valor agregado como la producción de un solo tipo de grasa. La primera aplicación que tuvieron estos elementos biológicos data desde la antigüedad en la producción de alimentos como queso y diversos fermentados. En la actualidad la aplicación de las enzimas está en crecimiento en diversas áreas, debido a la comprensión de su naturaleza y a los avances tecnológicos. La química analítica es un área donde las enzimas tienen una importante aplicación ya que permiten mejorar los análisis gracias a su especificidad. El empleo de enzimas es una buena estrategia en el análisis de productos o subproductos de compuestos que no pueden ser determinados directamente mediante las técnicas existentes, debido a su naturaleza y/o a la complejidad de la matriz donde se determina el compuesto [64]. Los biosensores electroquímicos con mayor número de artículos publicados para el análisis de TG son los amperométricos y potenciométricos.

##### **1.4.3.2.1 Amperométricos**

La amperometría consiste en la medición de una intensidad de corriente que fluye en una celda electroquímica, mientras el electrodo de trabajo mantiene un potencial fijo aplicado mediante una fuente externa. De esta manera los sistemas electroquímicos tratan el transporte de cargas provenientes de especies electroactivas objeto de estudio a través de una interfase de fases químicas, por ejemplo entre un conductor electrónico (un electrodo) y un conductor iónico (un electrolito). La carga se

---

transporta a través de la interfase metal/solución, provocando la oxidación o la reducción de la especie electroactiva, según ésta se encuentre en su forma reducida u oxidada en el par redox, respectivamente. Como estas reacciones están gobernadas por la ley de Faraday, la corriente resultante de dichos procesos se denomina de tipo faradaico y es la que interesa desde el punto de vista analítico [58]. Los biosensores del tipo amperométricos que se han utilizado para cuantificar TG se basa en la enzima peroxidasa que reconoce el compuesto peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que es el subproducto de la oxidación de algún metabolito secundario producido tras la reacción de hidrólisis de los TG. El principio de operación de estos dispositivos se basa en el transporte de cargas provenientes de especies electroattractivas como el  $H_2O_2$  a través de una interfase. La carga se transporta de la solución electrolítica al transductor a través de la matriz de inmovilización, la cual es proporcional al avance de la reacción [63]. En la Tabla 6 se describen algunos biosensores de este tipo con transductores de platino y diferentes membranas.

**Tabla 6.** Biosensores amperométricos para la cuantificación de triglicéridos

Enzimas	Formulación de membrana	pH de trabajo	Límite de detección (trioleina, mM)	Tiempo de respuesta (s)	Ref .
L, GK, GPO	CA	6.5	0.20	40	65
L, GK, GPO, POD	PVC	7.5	0.11	30	66
L, GK, GPO	PVA	7.0	0.21	2	67
L, GK, GPO, POD	Membrana de huevo	7.0	0.28	10	68

L = lipasa; GK = Glicerol quinasa; GPO = Glicerol-3-fosfato; POD = Peroxidasa; CA = Acetato de celulosa; PVC = Cloruro de polivinilo; PVA = Acetato de polivinilo

#### 1.4.3.2.2 Potenciométricos

La potenciometría consiste en medir la fuerza electromotriz generada en una celda galvánica donde una reacción química tiene lugar de forma espontánea, y donde una energía en forma química se transforma a una forma eléctrica [58]. La diferencia de potencial medida respecto al electrodo de referencia es linealmente dependiente del logaritmo de la actividad de un ión medido en solución y se representa mediante la ecuación Nernst (Ec. 1), donde E es el potencial,  $z_i$  es la carga del ión,  $a_i$  es la actividad del ión y K es una constante que depende de diversos factores y una pendiente Nernstiana ideal de  $2.303 RT/z_i F$  (59.1 mV por cada década de cambio a

298.15 K). Cuando la fuerza iónica es baja, la actividad se puede sustituir por la concentración molar [69].

Un sensor potenciométrico responde idealmente a una única especie, el ión principal, denominándose específico; sin embargo, comúnmente se presenta respuesta a iones adicionales llamados “iones interferentes”, que pueden interaccionar con la membrana selectiva, en este caso se denomina selectivo. Para tener en cuenta este hecho se amplía la ecuación de Nernst, en lo que se llama la ecuación de Nicolsky-Eisenman, la cual recoge la contribución de posibles iones interferentes presentes en la misma solución de trabajo [58].

$$E=K+2.303\frac{RT}{z_i F}\log a_i \quad \text{Ec. 1}$$

Entre los dispositivos que de manera ideal cumplen la ecuación de Nernst están los electrodos selectivos de iones (ISEs) y los transistores de efecto de campo sensible a iones (ISFET). De la amplia gama de electrodos desarrollados, destacan los empleados para medir la actividad de iones  $H^+$  en diversas muestras. Asumiendo que la actividad de  $H^+$  es igual a la concentración de  $H^+$  cuando la actividad es baja, la respuesta se registra en función de  $-\log [H^+]$  o pH. La importancia de este parámetro ha permitido el desarrollo de diferentes dispositivos para realizar esta cuantificación, algunos ejemplos de electrodos sensibles al pH se muestran a continuación [70]:

a) *Electrodos de membrana de vidrio*: Son los más utilizados para medir  $H^+$  debido a su gran selectividad. Se basan en el uso de materiales de óxido de silicio que forman un vidrio. El mecanismo de acción se basa en el intercambio de iones en la interfase externa e interna del sensor. Este fenómeno se lleva a cabo sobre la superficie de la membrana de silicato generando un cambio en el potencial de membrana. El rango de medición de estos dispositivos es de 0.0-14.0 unidades de pH y tienen un comportamiento Nernstiano [71].

b) *Electrodos de óxidos metálicos*: Éste tipo de dispositivos están formados por un metal recubierto de su óxido y en algunos se trata de una mezcla de óxidos metálicos-sales ternarias. Bajo este concepto se encuentran descritos los electrodos antimonio, bismuto, iridio y acero inoxidable. Las semireacciones involucradas permiten relacionar la concentración de  $H^+$  en el potencial de celda, como por ejemplo:

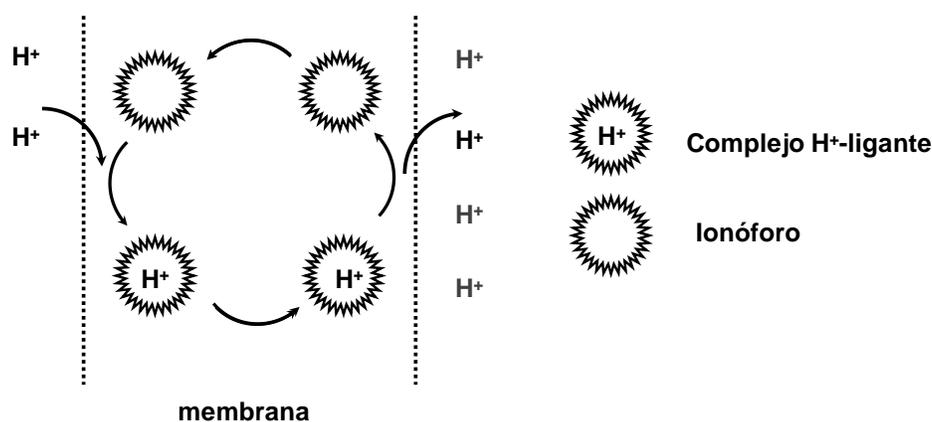


Las ventajas principales es que son de fácil fabricación, tienen una mayor resistencia mecánica y química a los iones  $F^-$ , comparados con los electrodos de vidrio. Sin embargo, presentan una alta sensibilidad al  $O_2$ , agentes reductores y cloruros [71]. Algunas características de estos electrodos se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Características de electrodos de óxidos metálicos de pH

Electrodo	pH de trabajo	Pendiente ( $mV\ pH^{-1}$ )	Ref.
Antimonio	1.0-10	-51 a -60	71
Acero inoxidable	1.0-13	-58	72

c) *Electrodos de membrana con ionóforos*: Utilizan agentes de reconocimiento, llamados ionóforos, los cuales son los componentes activos en membranas poliméricas. Estos compuestos son lipofílicos y se comportan como ácidos débiles orgánicos que facilitan la formación de complejos reversibles con iones, por ejemplo: el transporte de  $H^+$  en solución acuosa a través de una fase lipídica a otra solución acuosa (Fig. 4) [71,73]. Algunas características de estos electrodos se muestran en la Tabla 8.



**Figura 4.** Mecanismo de operación de electrodos de membrana con ionóforos selectivos a  $H^+$

**Tabla 8.** Características de electrodos ionóforos de pH

Ionóforo	pH de trabajo	Pendiente (mV pH <sup>-1</sup> )	Ref.
Tridodecilamina	0.0-8.0	-56.6 a -58.7	74
4-nonadecilpiridina	2.0-9.0	-56.7	75
Isocianato de octadecilo	0.0-8.0	-57.2	76

d) *Electrodos de carbono*: El carbono es utilizado como material conductor en la formación de electrodos, principalmente en la producción de biosensores. La alotropía de este compuesto permite obtener diversos materiales de carbono (carbón vítreo, grafito, fulereno, grafeno y nanotubos de carbono) que en combinación con materiales aglutinantes (resinas epóxicas, silicona, poliuretano y teflón, entre otras) forman materiales compuestos que proporcionen una mayor resistencia mecánica y química [77].

Las reacciones electroquímicas que se dan sobre superficies sólidas de este tipo de electrodos permiten la transferencia de iones entre las dos fases. Un ejemplo son los electrodos composite grafito-resina epóxica. Estos dispositivos proporcionan las cualidades fisicoquímicas y económicas para detectar iones como H<sup>+</sup>. Aunque el mecanismo de detección no está completamente establecido, se cree que es producto de la interacción de este ión con los distintos grupos funcionales como hidroxilo, éter, grupos carboxilo y grupos cetona. Dichos grupos son formados por la oxidación superficial del carbono por medio de agentes oxidantes como ácido nítrico o sulfúrico utilizados durante la producción del carbono [78-81].

Los electrodos composites grafito-resina epóxica pueden ser utilizados para medir el pH. La sensibilidad de estos dispositivos tiene una sensibilidad analítica de 36.1 mV/pH, lo que permite dar seguimiento a reacciones ácido-base [77,82]. Sin embargo, su uso en el desarrollo de biosensores potenciométricos para TG no ha sido descrito en la literatura.

e) *Transistores de efecto de campo sensible a iones (ISFET)*: Los ISFET son dispositivos a los que se les ha modificado la puerta de un transistor de efecto de campo (FET) por un semiconductor sólido de óxido metálico (MOS) para dar lugar a un transistor de efecto de campo metal-óxido-semiconductor (MOSFET). El MOS se deposita sobre membranas sensibles a iones H<sup>+</sup> (como Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, WO<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub> y SnO<sub>2</sub> entre otras), en las cuales se desarrolla el potencial de membrana [83,84]. Una buena aproximación del funcionamiento de estos dispositivos se explica

con la teoría de centros activos, en la cual existe una densidad de carga superficial generada por los grupos químicos del MOS que interaccionan con los iones  $H^+$  para producir una variación de carga en su superficie y en el potencial de membrana del MOSFET. Dicho potencial depende logarítmicamente de la actividad de los iones en disolución, por lo que su comportamiento es análogo al de los ISEs (Ec. 1) [85]. Un condensador de electrolito-aislante-semiconductor (EISCAP) es un transistor similar a un MOS, exceptuando que el metal de la puerta se sustituye por un electrolito [59].

El comportamiento Nernstiano en el análisis de estos sensores selectivos de  $H^+$  muestran sensibilidades aproximadas de 54.8 y 48.5 mV/pH en intervalos de pH de 1.0-12.0 para un ISFET  $Al_2O_3/SiO_2$  [86]. La miniaturización y sensibilidad de estos dispositivos es la mayor de sus ventajas; sin embargo, su estabilidad se ve afectada por errores relacionadas con las derivas, estabilidad térmica y química de los MOS [87].

En el caso de TG, se ha propuesto registrar la respuesta potenciométrica debida al cambio de pH como consecuencia de la formación de ácidos grasos libres durante la hidrólisis enzimática de los TG por lipasas. Estos dispositivos integran material enzimático y la detección potenciométrica mediante ISEs e ISFETs [58]. La Tabla 9 muestra algunos biosensores potenciométricos descritos en la literatura.

**Tabla 9.** Biosensores potenciométricos para la cuantificación de triglicéridos

Formulación de membrana	Transductor	Límite de detección	Tiempo de respuesta (min)	Ref.
pH-FET	ISFET	10 $\mu$ M Trioleina	2	88
Nitrocelulosa	ISFET	<4.0 mM Tributirina	NR	89
Silicón	EISCAP	500 $\mu$ M Tributirina	45	59
Nanopartículas magnéticas	ISFET	NR	< 5	90

*NR = no reportado*

### 1.4.3.3 Inmovilización de enzimas

La utilización de las enzimas y en particular de lipasas en diversas industrias, ha permitido el estudio y la optimización de su acción catalítica por medio de tecnologías enzimáticas que posibilitan su recuperación y reutilización, así como la mejora de su estabilidad termodinámica y cinética.

La acción catalítica se puede mejorar por medio de una selección adecuada de características tales como la especificidad y termoestabilidad, entre otras. La elección del medio de reacción puede desplazar el equilibrio de hidrólisis; una reacción enzimática puede disminuir la transformación del sustrato cuando se le adiciona un disolvente orgánico [91].

La modificación química es un tratamiento que se utiliza empíricamente para modificar determinada región de la proteína con el fin de obtener una mayor estabilidad que permita influir en la cinética de reacción mediante la modificación del sitio activo. Otras modificaciones se han realizado mediante la alteración de genes que está dirigida a la producción de enzimas híbridas que resaltan alguna característica específica de las enzimas. La inmovilización enzimática es, sin duda, la mejor tecnología enzimática ya que permite controlar la mayoría de los factores que alteran su acción catalítica [91].

La inmovilización es el confinamiento de la enzima en un espacio físico definido, por medio de un material orgánico, inorgánico o sintético que trata de mantener inalterada su esencia catalítica sobre un soporte en un sistema *in vitro* frente a cambios físicos y químicos.

Los métodos de inmovilización son de gran aplicación en el desarrollo de biosensores enzimáticos. Estos métodos utilizan materiales insolubles y biocompatibles (no tóxicos) para mantener confinada a las lipasas en condiciones diferentes a las naturales. El método de inmovilización se puede clasificar según la relación física del biocatalizador con el material de retención y se aplica indistintamente para todas las enzimas. En la Tabla 10 se presenta la clasificación de estos métodos, así como, sus principales ventajas y desventajas. A menudo la inmovilización puede incorporar varios procedimientos en un mismo método como: la absorción, seguida del uso de biomoléculas bifuncionales para producir la reticulación, entre otros. Los múltiples pasos logran una mejora en la inmovilización de las enzimas [92].

**Tabla 10.** Clasificación de los principales métodos de inmovilización de enzimas en biosensores

<b>Método</b>	<b>Carácter vinculante</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
<b>Adsorción</b>	Interacciones intermoleculares	Simple y fácil Permanencia de la actividad enzimática	Desorción Adsorción no es específica
<b>Unión covalente</b>	Unión química entre los grupos funcionales de la enzima y los del soporte	No generan barrera difusional Estable Tiempo de respuesta corto	Matriz no regenerable Acoplamiento con material tóxico Pérdida de la actividad enzimática
<b>Atrapamiento</b>	Permite la incorporación de la enzima dentro de un gel o polímero	No hay reacción química entre el monómero y la enzima Se mantiene la actividad catalítica Selectividad adicional generada por el polímero	Genera una barrera difusional Pérdida de enzima Altas concentraciones de monómero y de enzima para la electropolimerización
<b>Entrecruzamiento (cross-linking)</b>	Unión química entre la enzima y una molécula bifuncional de entrecruzamiento y una molécula inerte	Simple	Alta pérdida de la actividad enzimática
<b>Afinidad</b>	Afinidad de los grupos funcionales por un soporte específico (semejanza a la analogía llave-cerradura)	Inmovilización controlada y orientada	Requiere la presencia de grupos específicos de la enzima

Los materiales usados comúnmente en la inmovilización de la lipasa por los diversos métodos son: el vidrio poroso y sus derivados, tierra de diatomeas o diatomita, carbón activado, celulosa y sus derivados, sílice y sus derivados, arcilla, caolín, alúmina, óxido de titanio, acero inoxidable, nylon, polímeros y sus derivados (polietileno polipropileno, poliestireno, poliacrilamida, poliamida y poliuretano), agarosa y sus derivados, gelatina, colágeno, alginato, y polietilenglicol unido a magnetita principalmente [93].

#### 1.4.3.3.1 Lipasas

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) son catalizadores naturales encontrados en gran diversidad de fuentes biológicas como lo son, animales, plantas y microorganismos. Sus funciones biológicas básicas son: la hidrólisis de TG y esterificación de ácidos grasos (Fig. 1). Estos biocatalizadores superan la eficiencia catalítica de los catalizadores químicos debido a su mayor especificidad y estabilidad en reacciones *in situ* dentro de sistemas de reacción biológicos y/o no biológicos [94].

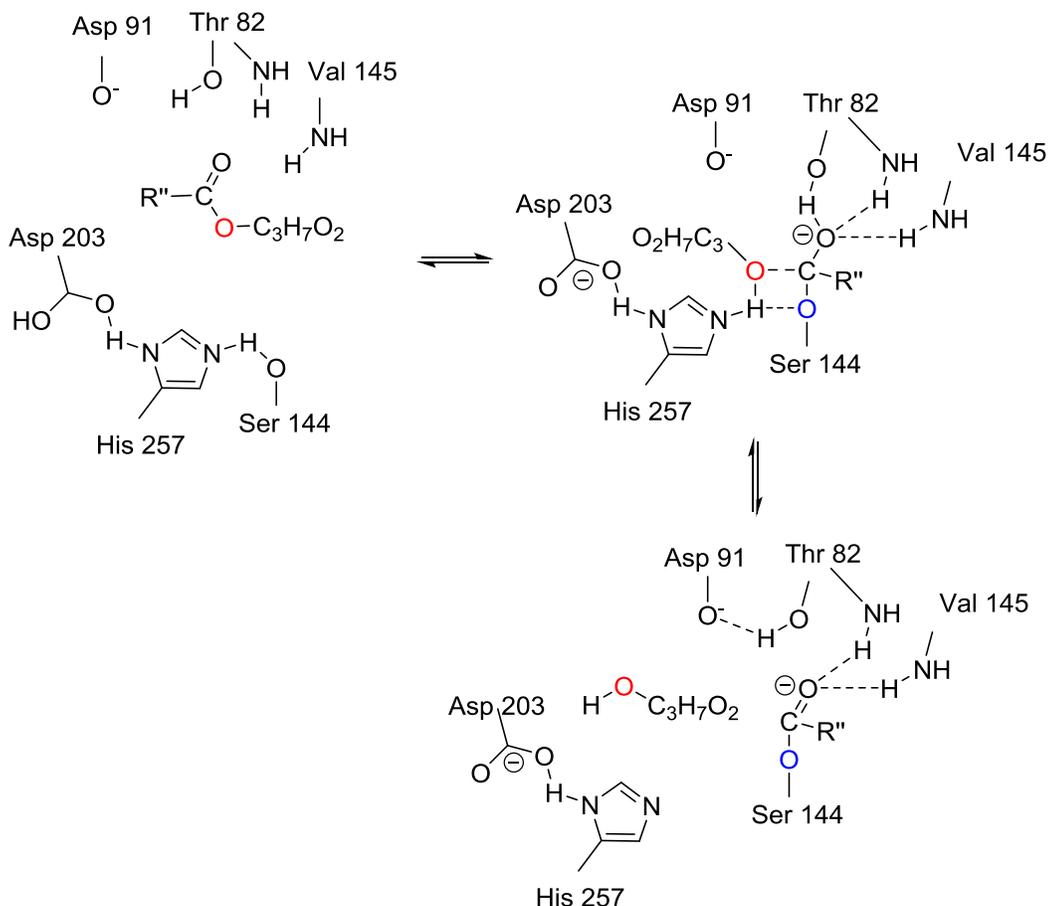
Las lipasas utilizadas en las diversas industrias tienen un origen microbiano y son modificadas genéticamente para obtener enzimas con mejores características, que tienen una mayor aplicación en las diferentes industrias, por ejemplo: en la industria textil, (modificador de tejidos), detergente (aditivo para remover la grasa), alimentos (resaltantes de sabor y modificantes de lípidos), papel (degradación de lípidos en la pulpa), oleoquímica (síntesis de grasas y aceites), producción de polímeros biodegradables (síntesis de polímeros), farmacéutica (síntesis de fármacos), herramientas en diagnóstico (biomarcador), cosméticos (eliminación de grasas), aplicaciones médicas (tratamiento de dislipidemia, alergias, etc.), biosensores (análisis de triglicéridos), tratamiento de cuero (extracción de grasas de pieles animales) producción de biodiesel (síntesis de ésteres), entre otras [94,95].

#### 1.4.3.3.2 Propiedades catalíticas de las lipasas

El sitio activo de las lipasas está cubierto por tapas protéicas que se activan en contacto con TG. La hidrólisis de los TG se puede llevar a cabo en una mezcla homogénea o heterogénea. La mezcla heterogénea genera una interface; por parte del sustrato lipoideo y la correspondiente al medio acuoso donde está disuelta enzima. Los sistemas homogéneos constituyen una sola fase formada por micelas y emulsiones. La hidrólisis de los TG se puede representar por el mecanismo de acción de la lipasa de *Rhizopus oryzae* como se muestra en la Figura 5 [96-99].

Las propiedades catalíticas de las lipasas y cualquier otra enzima están determinadas por su estabilidad termodinámica (o estructural) y cinética (persistencia de la actividad biológica). La pérdida de su conformación terciaria o termodinámica conduce a su desnaturalización y finalmente a una inactivación parcial o total. En general, las lipasas mantienen su actividad catalítica en condiciones biológicas naturales, pH = 7.0 y una temperatura de 37°C. La desnaturalización es causada por factores físicos (agitación, cambios de temperatura, fuerzas mecánicas y radiación), biológicos (proteasas) y químicos (ácidos, bases, sales, disolventes, surfactantes, oxidantes, metales pesados y agentes quelantes) [100].

---



**Figura 5.** Mecanismo de acción de la lipasa de *Rhizopus oryza* en un triglicérido de grupo acilo  $R''$ . Los aminoácidos encontrados en la figura corresponden al sitio activo de la lipasa [96].

Las lipasas muestran diferentes tipos de especificidad que son dependientes de factores biológicos y no biológicos. Estos tipos son: especificidad posicional, especificidad en condiciones de reacción, especificidad de la longitud de cadena y grado de insaturación de los ácidos grasos en los TG [101]. En el desarrollo de biosensores se utiliza como elemento de reconocimiento principal a las lipasas no específicas como la lipasa de *Candida rugosa*, debido a que catalizan a la reacción de los grupos éster de los TG en cualquier posición hasta llegar hasta ácidos grasos y glicerol. La falta de especificidad de estos biocatalizadores ha facilitado la medición de TG totales [100-102].

Los métodos convencionales como la espectrofotometría UV/Vis y HPLC utilizados para la determinación de TG en las diversas muestras que lo contienen, han mostrado un alto costo de operación, así como un tiempo considerable en la

preparación de muestras y reactivos. En las últimas décadas se ha observado un incremento en el desarrollo de biosensores electroquímicos, ya que son simples, sensibles, rápidos y con un costo de análisis bajo. Con base a los antecedentes presentados, se busca una nueva alternativa analítica para la cuantificación de TG mediante un biosensor electroquímico que simplifique el proceso analítico a bajo costos y con buena fiabilidad en los resultados, por lo cual se plantearon los siguientes objetivos para este trabajo.

## OBJETIVOS

---

---

## **2.- OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Desarrollar un biosensor potenciométrico utilizando un transductor composite grafito-epoxy para la cuantificación simple y económica de triglicéridos en alimentos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Construir un transductor electroquímico composite grafito-epoxy y evaluar su sensibilidad ante los cambios de pH.
- Construir un biosensor potenciométrico de triglicéridos mediante la inmovilización de la enzima lipasa con membrana de Nafion sobre el transductor grafito-epoxy.
- Optimizar el desempeño del biosensor potenciométrico de triglicéridos mediante el cambio en la composición de la membrana de Nafion.
- Evaluar y validar la extracción de grasas mediante goma arábica como una alternativa para disminuir el uso de disolventes orgánicos en el análisis de triglicéridos.
- Aplicar el biosensor desarrollado en muestras de alimentos.

# METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

---

---

### 3.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reactivos y soluciones

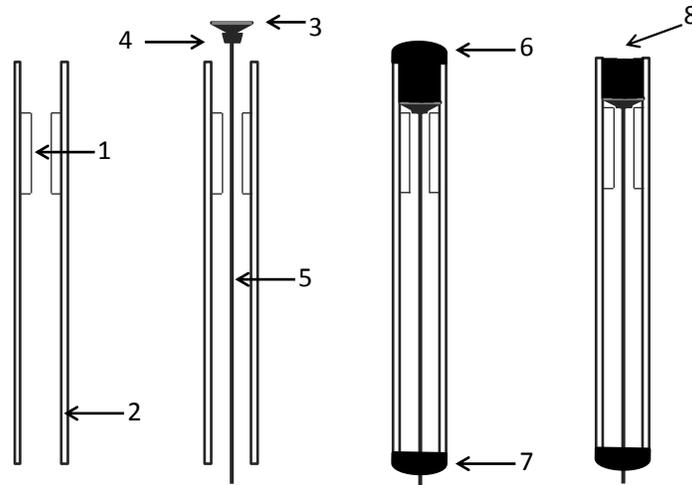
Todas las soluciones fueron preparadas en agua desionizada con una resistividad no menor a 18 MΩ cm (Milli Q, Millipore). Tributirina (TB), KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, polvo de grafito de grafito 1-2 μm, lipasa de *Candida. rugosa* (E.C.3.1.1.3; 5.3 U/mg sólida), Nafion al 5% (v/v) en mezcla de alcoholes alifáticos de grado analítico (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) y goma arábica grado alimenticio. Los interferentes evaluados fueron caseína láctica, albúmina de huevo, almidón soluble, sacarosa, glucosa anhidra, benzoato de sodio, ácido cítrico y cloruro de sodio de la marca Reasol (México).

La emulsión de TB 0.1 M se prepara utilizando goma arábica como emulsionante; la TB y goma arábica se adicionan en proporción (1:1 p/p), se disuelven en una solución de PBS (Phosphate Buffer Saline) que contienen fosfatos 1x10<sup>-3</sup>M y KCl 0.1 M (pH=7.0). La emulsión se genera por dispersión sónica durante 30 minutos en un baño de ultrasonido (Cole-Parmer, 8890R-MT). La mezcla se almacena a 4°C hasta su uso [24].

#### 3.2 Construcción y evaluación del biosensor potenciométrico para cuantificación de triglicéridos

##### 3.2.1 Construcción del electrodo composite grafito-epoxy

El transductor se construye con un tubo de metacrilato (longitud = 10 cm, diámetro interior = 8.5 mm), al cual se fija en su interior otro tubo del mismo material de menor tamaño (longitud = 2 cm, diámetro interior = 4 mm). Un cable blindado que está soldado a un disco de cobre (diámetro = 8 mm) se hace pasar a través del tubo más delgado, fijándose sobre el tubo más pequeño dejando un espacio de 5 mm. Una mezcla de grafito-epoxy se deposita sobre el espacio creado entre el tubo de acrílico externo y el disco de cobre. La proporción en peso de grafito-resina-catalizador es 5.0-4.2-0.8 de polvo de grafito- resina (Araldyt HY956 Ciba Geigy) - catalizador (REM 001 Ciba Geigy). El electrodo se deja curar 24 horas a una temperatura de 40 °C. Una vez endurecido el material, se lija y se pule hasta lograr una superficie plana (Fig. 6) [82].



**Figura 6.** Representación de la construcción de electrodos grafito-epoxy. (1) Tubo de metacrilato interno. (2) Tubo de metacrilato externo (3) Disco de cobre. (4) Soldadora de estaño. (5) Cable blindado. (6) Composite depositado. (7) Fijación del cable. (8) Superficie pulida del composite

Con la finalidad de evaluar la respuesta del electrodo construido, se obtiene la sensibilidad analítica respecto al cambio de pH en un intervalo de 6.0-7.0 unidades. El procedimiento se realiza en 25 ml de PBS (0.001M, pH=7.0) haciendo cambios de pH provocados por la adición sucesiva de 10  $\mu$ l de una solución de HCl 0.1 M cada 50 segundos. De la misma manera se evalúa la sensibilidad analítica realizando el análisis de TG en solución. Se colocan 25 ml de una solución de PBS (0.001M, pH=7.0) que contiene 6 unidades enzimáticas de lipasa. El cambio de pH se produce por la adición sucesiva de 40  $\mu$ l de una solución de TB 0.1 M cada 200 segundos.

Las medidas potenciométricas se realizan utilizando electrodos composite grafito-epoxy, de platino y de Ag/AgCl (KCl sat) como electrodos de trabajo, auxiliar y de referencia, respectivamente. De manera simultánea se registró el cambio en el pH de la solución utilizando un electrodo de vidrio. Los registros potenciométricos fueron obtenidos mediante en un equipo AUTOLAB (Ecochemie, PGSTAT 30) controlado a través del programa GPES versión 4.5.

### 3.2.2 Construcción del biosensor

Construido el transductor se prepara un coctel enzimático que contiene 10.6 U de lipasa de *Candida rugosa* y concentración final de Nafion 0.71 % en 140  $\mu$ l de PBS (0.01M, pH = 7.0). En un tubo eppendorf, la mezcla se agita durante un minuto

mediante un agitador vortex. Los biosensores de TG se prepararon añadiendo 20  $\mu\text{l}$  de la mezcla en la superficie del electrodo de grafito-epoxy, dejando evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Concluida la evaporación se sumerge el biosensor en PBS (0.1 M, pH =7.0) y se almacena a una temperatura de 4°C hasta su uso.

### 3.2.3 Cuantificación potenciométrica de los biosensores

Para evaluar el cambio del potencial, dependiente del pH en la superficie del biosensor producido por la hidrólisis de los TG, se realizaron estudios cronopotenciométricos a corriente nula. A partir de estos registros se construyeron las curvas de calibración E/mV contra [TB/mM] a temperatura ambiente en solución buffer de fosfatos 0.001 M / KCl 0.1 M (PBS) a un pH de 7.0 (PBS), realizando adiciones sucesivas de 20  $\mu\text{l}$  de una emulsión de TB 0.1 M cada 300 segundos. Los parámetros analíticos obtenidos son: sensibilidad analítica (SA), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), intervalo de respuesta lineal (IRL) y coeficiente de correlación ( $r^2$ ).

Se calculó la reproducibilidad y repetitividad para las concentraciones 0.1, 0.2 y 0.4 mM de TB. Así, se evaluaron para cada concentración tres biosensores de distintos lotes los días 3, 7 y 15 por el método de adición patrón. La concentración del tributirina se determinó mediante la siguiente expresión [103]:

$$C_{TG} = \frac{V_s C_s}{\left(V_T * 10^{\frac{\Delta E}{S}}\right) - V_x} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:  $C_{TG}$  = concentración de triglicéridos en la muestra (mM)

$C_s$  = concentración de triglicéridos en el estándar (mM)

$V_x$  = volumen de la muestra (ml)

$V_s$  = volumen de la solución estándar añadida ( $\mu\text{l}$ )

$V_T = V_x + V_s$  (ml)

$\Delta E = E_s - E_x$

$E_x$  = potencial medido de la muestra

$E_s$  = potencial medido de la muestra enriquecida

$S$  = sensibilidad analítica en mV/log [TB/mM]

### 3.3 Análisis de interferentes

La evaluación de interferentes se realizó adicionando cantidades conocidas de caseína láctica, albúmina de huevo, almidón soluble, sacarosa, glucosa anhidra, benzoato de sodio, ácido cítrico y cloruro de sodio. Los interferentes fueron seleccionados de acuerdo a la composición mayoritaria de los nutrientes registrados por el fabricante en los alimentos de marca comercial. El interferente se adiciona en un matraz aforado de 25 ml junto con una cantidad de emulsión de TB tal que al ser aforado se obtenía una concentración conocida de TB. El % de recuperación de TG se obtiene a partir del cociente de las concentraciones obtenidas y la concentración de TG adicionada.

### 3.4. Análisis de triglicéridos en muestras de alimentos

Las tablas nutrimentales permiten la obtención de información general sobre el contenido de componentes que contribuyen con el aporte energético. Los nutrientes contenidos en un mayor porcentaje en gran variedad de alimentos son el agua, proteínas, lípidos y carbohidratos. Con la finalidad de estudiar la aplicabilidad y alcance de la metodología propuesta para la cuantificación de TG totales, se eligieron muestras de alimentos con contenidos elevados de: lípidos (mayonesa y mantequilla), proteínas (chorizo y pate) y carbohidratos (papas fritas y pan dulce). Los contenidos reportados por los proveedores se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Principales componentes (%p/p) en muestras de alimentos

Componente (%p/p)	Mayonesa	Mantequilla	Chorizo	Pate	Papas fritas	Pan dulce
<b>Agua</b>	11.92	18.00	55.92	59.90	7.44	22.91
<b>Proteína</b>	1.00	1.00	14.20	12.00	4.00	6.08
<b>Grasa</b>	81.00	>80.00	20.90	22.00	32.00	23.04
<b>Carbohidratos</b>	2.00	1.00	6.90	6.00	52.00	47.68
<b>NaCl</b>	0.60	-	0.98	0.01	0.56	0.29
<b>Ácido cítrico</b>	0.30	-	-	-	-	-

La extracción de TG se realiza mediante el método oficial de extracción de grasas y el de emulsión propuesto en este trabajo.

### 3.4.1 Extracción de triglicéridos en muestras de alimentos

#### 3.4.1.1 Método oficial

Se pesaron diversas muestras comerciales de alimentos por triplicado: pan dulce, papas fritas, chorizo de pavo, paté, mayonesa y mantequilla. La extracción de TG comienza con la separación de la sustancia seca que contiene grasas, fibra, proteínas, carbohidratos y minerales (SS). El procedimiento utilizado consiste en añadir una muestra de aproximadamente 6 g (homogeneizada y triturada) en una cápsula de aluminio de 60 mm de diámetro (previamente pesada), posteriormente se coloca en una estufa desecadora con vacío a 70 °C por 6 hrs. Transcurrida la evaporación, se coloca la cápsula de aluminio con la muestra en un desecador hasta alcanzar un peso constante. La muestra anhidra se almacena hasta su posterior análisis. El contenido de sustancia seca (SS) expresada como %p/p se calcula mediante la siguiente expresión [52,103]:

$$\%SS = \frac{(W_{70^{\circ}C} - W_{\text{cápsula}})}{W_{\text{inicial}} - W_{\text{cápsula}}} \times 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde: SS = Sustancia seca

$W_{70^{\circ}C}$  = Peso de la cápsula más muestra después del secado a 70 °C (g)

$W_{\text{cápsula}}$  = Peso de la cápsula vacía (g)

$W_{\text{inicial}}$  = Peso de la cápsula con la muestra (g)

La sustancia seca obtenida del análisis de SS se coloca en un cartucho de extracción libre de grasa en un sistema Soxhlet durante 6 horas, utilizando 100 ml de éter de petróleo como disolvente y un matraz balón de fondo plano (previamente secado a 103 °C y pesado) para coleccionar la mezcla disolvente-grasa. Transcurrido el tiempo de extracción se evapora el éter de petróleo en un rotavapor a 45 °C. Terminada evaporación del disolvente, se coloca el matraz en una estufa a 103 °C durante 1 hora para eliminar los residuos del disolvente y posteriormente se deja en un desecador hasta alcanzar peso constante. La grasa extraída es almacenada hasta su posterior análisis. El porcentaje de grasas (%G) se calcula mediante la siguiente expresión [52,104]:

$$\%G = \frac{(W_G - W_{\text{matraz}})}{W_{\text{muestra}}} \times 100 \quad \text{Ec. 7}$$

Donde: %G = % Grasa

$W_G$  = Peso del matraz más extracto de grasa

$W_{\text{matraz}}$  = Peso inicial del matraz

$W_{\text{muestra}}$  = Peso de la muestra analizada

### **3.4.1.2 Extracción de triglicéridos en emulsión**

En un tubo de polipropileno se adicionan entre 20 y 80 mg de la muestra de alimento, posteriormente se añaden 8.0 ml de la solución de goma arábica al 4.0 % (p/v) a una temperatura de 65 °C, y se coloca en baño maría durante 5 minutos a 65 °C. La mezcla es agitada en un vórtex y se hace pasar por filtros de 0.45 µm de poro, la fase líquida se lleva a un volumen de 10 ml con agua desionizada. Se almacena la disolución a una temperatura de 4°C hasta su uso.

### **3.4.2. Análisis de triglicéridos mediante potenciometría**

Se toma 1.0 ml de la emulsión que contiene los lípidos extraídos y se añaden a la celda electroquímica que contiene 25.0 ml de PBS (0.001 M, pH=7.0). La cuantificación de TG en la muestra (expresado como  $g_{TB} g^{-1}$ ) se determinó mediante el método de adición patrón. Se utilizan 5 adiciones de TB 0.1 M de 20 µl cada 300 segundos.

Con la finalidad de comparar la técnica propuesta con el método convencional de extracción se analizaron los TG obtenidos de las muestras mediante un sistema Soxhlet, utilizando como disolvente éter de petróleo. Se pesaron cantidades entre 10 y 20 mg del extracto lipídico en un tubo de polipropileno, adicionando 8.0 ml de solución de goma arábica 4.0% (p/v). La mezcla se coloca en un baño de ultrasonido por 30 min. La emulsión formada se afora a 10.0 ml con solución de goma arábica. La muestra se analiza con la metodología propuesta según se describió en el párrafo anterior.

### **3.4.4. Análisis de las muestras por espectrofotometría UV/Vis**

Se determinaron los TG extraídos por ambas metodologías (Soxhlet y goma arábica), analizándose espectrofotométricamente a 505 nm, utilizando el kit Triglicéridos-LQ (SPIREACT, Girona, España) [56,57]. Se construyó una curva de calibrado usando la emulsión de TB como patrón de referencia en concentraciones de 0.1- 0.4 mM. Posteriormente se mezclan 40 µl de la muestra problema con 1.0 ml del reactivo (Triglicéridos-LQ) durante 15 minutos a 37 °C. La cuantificación de TG en la muestra se realiza mediante interpolación en la curva de calibración.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

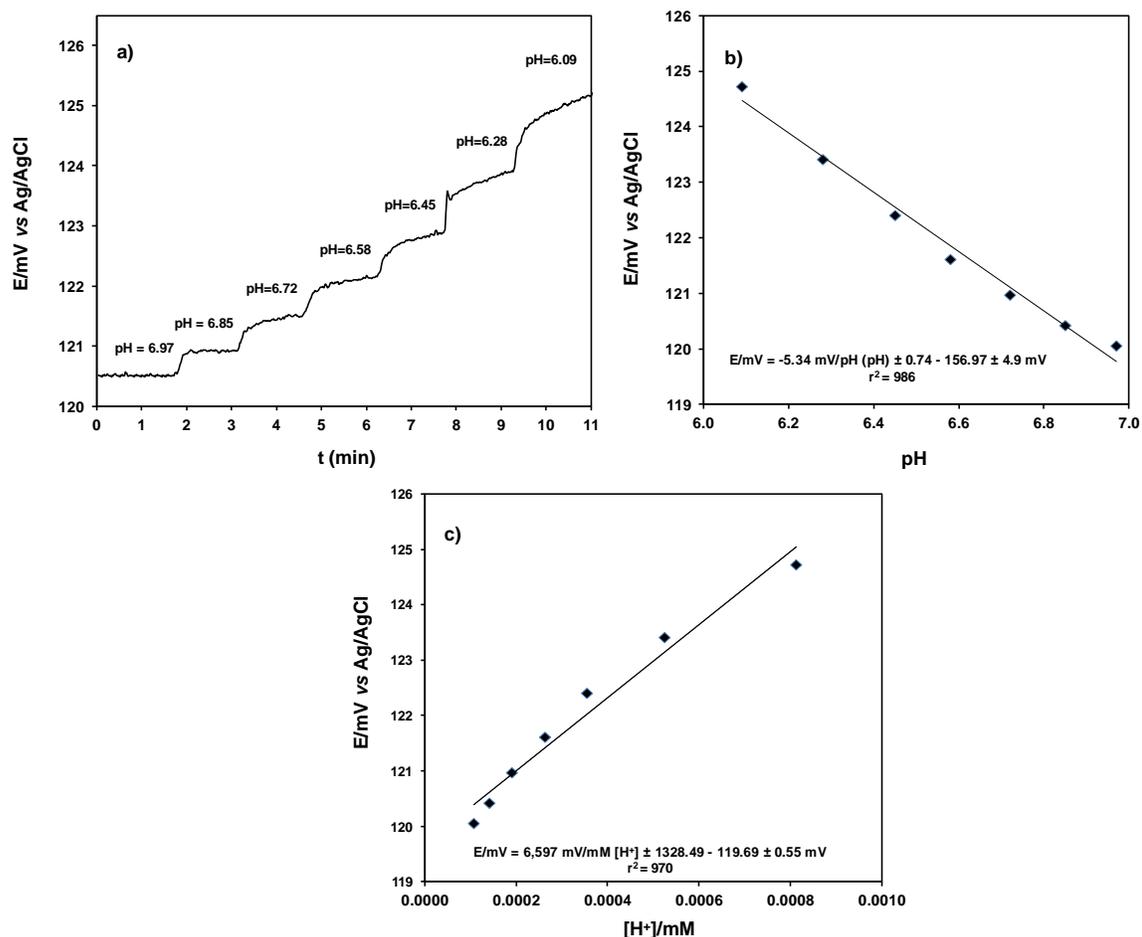
---

---

## 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Evaluación de la sensibilidad del transductor grafito-epoxy al pH

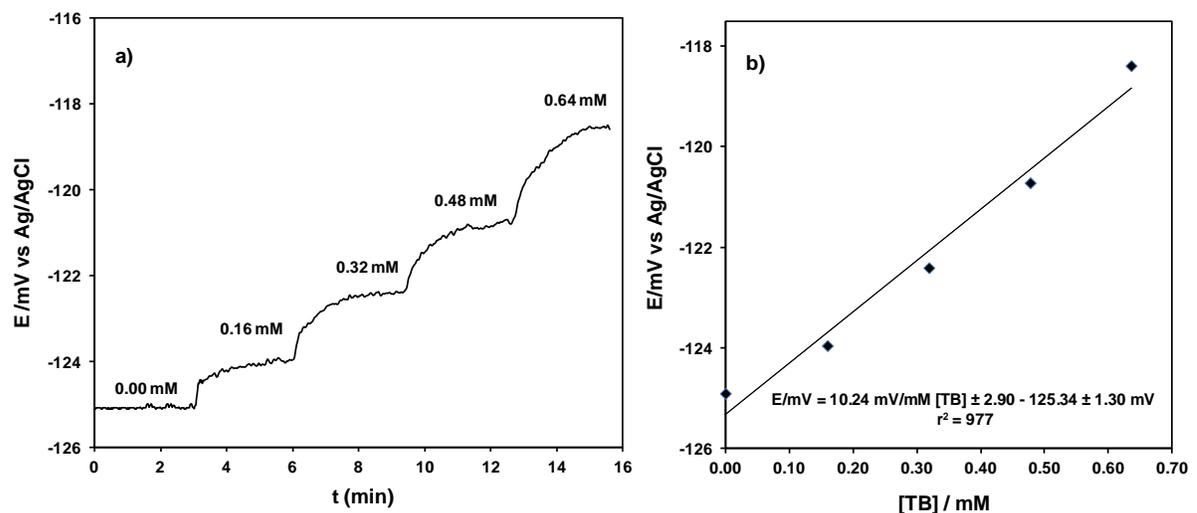
El principio de detección de los biosensores propuestos en este trabajo, se basa en la determinación de la concentración de  $[H^+]$  resultado de la reacción de hidrólisis de los TG por lipasas (Fig. 1). La Figura 7a muestra el registro potenciométrico respecto al cambio de pH de la solución utilizando el electrodo composite grafito-epoxy (transductor). Se observa un aumento en el valor del potencial respecto al valor de pH, lo que es congruente con la teoría potenciométrica. La sensibilidad alcanzada fue de  $-5.3 \text{ mV pH}^{-1}$  (Fig. 7b) y/o de  $6,597 \text{ mV mM}^{-1}$  (Fig. 7c) en el intervalo de pH de trabajo de 6.0-7.0, el cual es compatible con el intervalo de trabajo de la enzima lipasa de *Candida rugosa* [100].



**Figura 7.** a) Registro cronopotenciométrico para un electrodo de grafito-epoxy (PBS 0.001M, KCl 0.1 M, pH 7.0, más 6 adiciones de HCl 0.1 M de 10 ml c/100s ). b) Dependencia del potencial, respecto al cambio de pH. c) Dependencia del cambio de potencial, respecto a la concentración de protones en mM

No obstante que la respuesta de los electrodos grafito-epoxy respecto al pH es cercana a la Nernstiana en el intervalo de pH de 2 a 4 y 9 a 13 [82], el comportamiento del electrodo no es nernstiano en el rango de pH de 6 a 7. Es interesante observar en el trabajo de Rodríguez y colaboradores, que en la zona neutra de pH se advierte una clara disminución de la pendiente en congruencia con nuestros resultados [82].

De la misma manera, se determinó la sensibilidad del electrodo composite grafito-epoxy en una solución que contenía 6 U de lipasa de *Candida rugosa*. Las Figuras 8a y 8b muestran los registros potenciométricos y la línea de calibrado en un intervalo de 0.16-0.64 mM de TB. Como puede observarse, es posible dar seguimiento a la reacción enzimática utilizando el transductor de composite grafito-epoxy. Las respuestas encontradas se ajustan a un modelo lineal en ambos casos, con una sensibilidad de 10.24 mV/mM y un tiempo de respuesta menor a 4 minutos.



**Figura 8.** a) Registro cronopotenciométrico para un electrodo de grafito-epoxy en solución enzimática (80  $\mu$ l de coctel enzimático; 25 ml de PBS 0.001M, KCl 0.1 M, pH =7.0, más 4 adiciones de TB 0.1 M de 10  $\mu$ l c/200s ). b) Dependencia del potencial (mV) respecto al cambio de concentración de tributirina ([TB] mM)

Es bien conocido que debido a factores como la cinética enzimática, difusión del analito y la capacidad amortiguadora del medio de trabajo, en muchos casos los biosensores no siguen la ley de Nernst [58].

La principal desventaja de trabajar con la enzima en solución, es que su consumo se incrementa al no poder recuperarse transcurrido el análisis. Es por ello que la inmovilización de la lipasa, resulta importante en el desarrollo de metodologías competitivas.

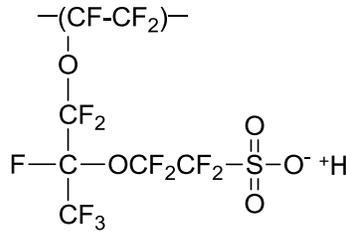
## 4.2 Optimización del biosensor potenciométrico de triglicéridos

El buen funcionamiento de un biosensor depende de la inmovilización del agente biológico de reconocimiento sobre la superficie del transductor, preservando su actividad biológica y la estabilidad del dispositivo ante condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica [105]. La inmovilización mediante entrecruzamiento es el método más utilizado en el diseño de biosensores, el método utiliza moléculas bifuncionales como glutaraldehído. Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones al alterar la actividad biológica y generar barreras difusionales. En contraparte, la inmovilización física de enzimas por atrapamiento en membranas poliméricas, como nafion, acetato de celulosa, cloruro de polivinilo o alcohol polivinílico controlan la difusión de iones, además de verse menos afectada la actividad biológica del agente de reconocimiento [58,63,66,106].

Estudios in vitro realizados para la lipasa de *Candida rugosa* muestran que de acuerdo al método de inmovilización la enzima puede trabajar en un intervalo de pH de 5.0 a 9.0; sin embargo, el pH óptimo in vivo de estos biocatalizadores es de 7.0 a 37 °C [67,107].

Estudios previos de la respuesta del transductor grafito-epoxy se realizaron en un intervalo de pH de 6.0-7.0 donde se espera la máxima actividad enzimática y por consiguiente la mejor detección de los biosensores que se desarrollan en este trabajo, los cuales se basan en el cambio en el valor de pH de la solución como resultado de la reacción de hidrólisis de los TG catalizada por la enzima lipasa inmovilizada.

La composición de la membrana (enzima-Nafion) en la construcción de biosensores resulta importante ya que permite controlar los fenómenos superficiales como la difusión y la reactividad. El Nafion (Fig. 9) es un polímero aniónico que controla la difusión de cationes; al colocarlo en la superficie del electrodo se puede dar seguimiento a la difusión de  $H^+$ , además de proteger la superficie del electrodo de interferentes contenidos en la muestra como compuestos aniónicos, proteínas o carbohidratos. La construcción de distintos biosensores basados en el uso de Nafion ha mostrado ventajas físicas, químicas y de biocompatibilidad con el agente de reconocimiento, aumentado la sensibilidad, selectividad y estabilidad a largo plazo de estos dispositivos [108,109].



**Figura 9.** Estructura del Nafion

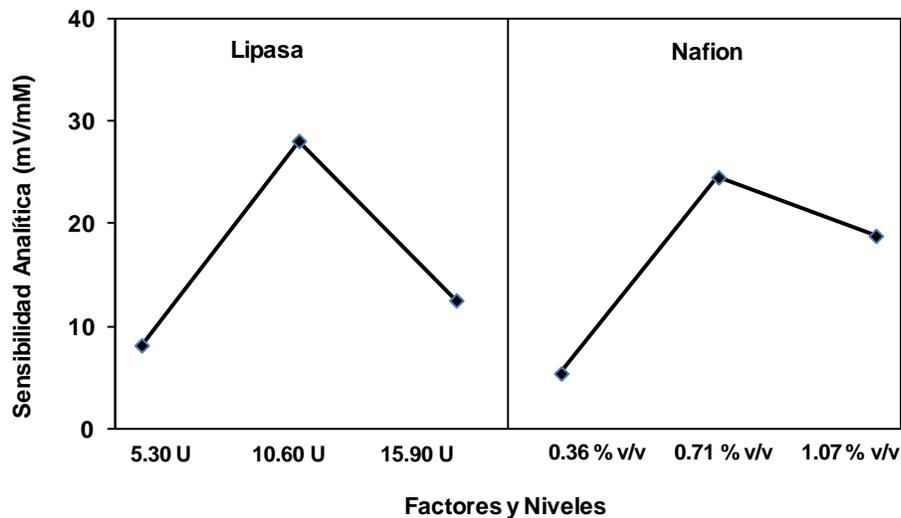
Para la optimización de la composición de la membrana, se estudió el efecto de la cantidad de lipasa y Nafion sobre el valor de la sensibilidad analítica del biosensor potenciométrico de TG. Las variables se evaluaron mediante un diseño factorial completo a tres niveles ( $3^2$ ), lo que supone un total de nueve experimentos. Se prepararon cocteles enzimáticos que contenían lipasa (5.30-15.90 U) y Nafion (0.36-1.07 % v/v) en 140  $\mu$ l de PBS (0.01M, pH=7.0). Los biosensores fueron construidos adicionando 20  $\mu$ l del coctel sobre el transductor grafito-epoxy. La sensibilidad analítica de los biosensores se determina a través del análisis de TB en el intervalo 0.08-0.56 mM. La matriz de diseño utilizada y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Matriz de diseño factorial completo a tres niveles ( $3^2$ ).

Experimento	Factores y niveles		Sensibilidad analítica (mV/mM)
	Lipasa (U)	Nafion (% v/v)	
1	5.30	0.36	2.21
2	5.30	0.71	12.42
3	5.30	1.07	9.90
4	10.60	0.36	8.84
5	10.60	0.71	41.76
6	10.60	1.07	33.77
7	15.90	0.36	5.24
8	15.90	0.71	19.55
9	15.90	1.07	12.90

Los resultados experimentales se analizaron mediante un análisis de varianza con la finalidad de estimar las contribuciones de cada variable utilizando el programa

MINITAB 13.1. El análisis obtenido demuestra que ambas variables son críticas, con un tanto por ciento de contribución a la varianza global de 49.81% y 43.79% para la concentraciones de enzima y Nafion, respectivamente. De igual forma la interacción binaria resulta crítica en el sistema. En la Figura 10 se muestra el gráfico de contribuciones medias para ambas variables. A partir de ésta figura se selecciona la concentración de lipasa óptima de 10.60 U y de Nafion 0.71 % (v/v).



**Figura 10.** Interacciones lipasa-Nafion

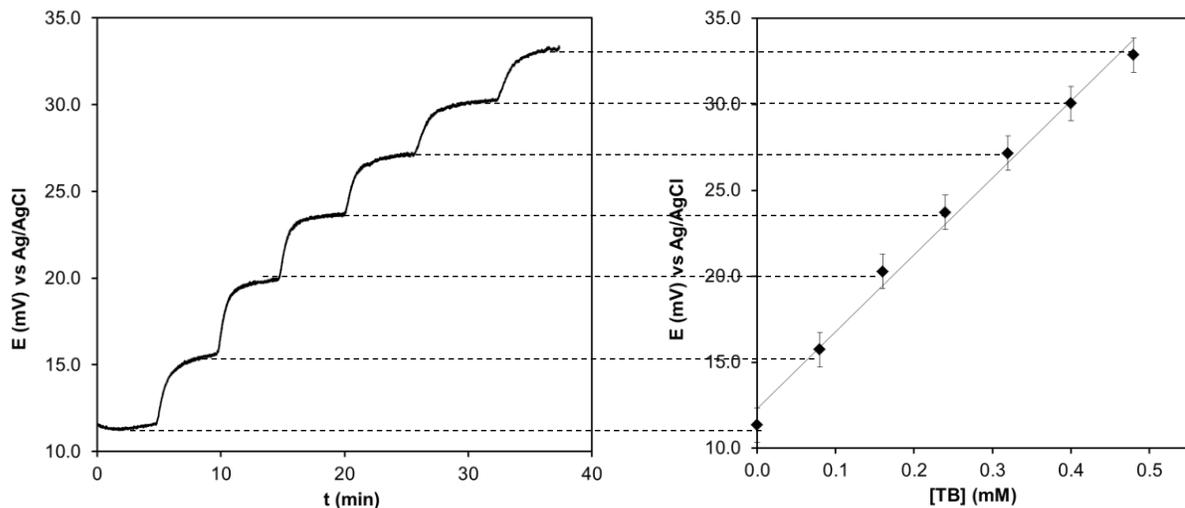
La respuesta del biosensor de TG propuesto depende de la relación óptima de lipasa-Nafion que permita mantener la máxima conversión del sustrato en un menor tiempo, adicionalmente que se facilite la difusión del ión hidronio a través de la membrana. Los biosensores potenciométricos descritos se basan principalmente en el uso de ISFETs, donde la enzima puede ser utilizada en solución (1200 U) o inmovilizada mediante entrecruzamiento (20 U). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que a bajos niveles en la cantidad de enzima no es suficiente, mientras que cuando se trabaja a niveles altos, hay un aumento en la viscosidad de la solución utilizada lo que se traduce en un mayor espesor de la membrana. El uso de 10.6 U son suficientes para realizar la determinación en el intervalo de interés [110,111].

La membrana de Nafion permite la difusión de moléculas pequeñas hacia la interface membrana-transductor, por lo que el espesor de la misma resulta importante en éste proceso. Las formulaciones descritas en la literatura para la elaboración de biosensores potenciométricos de ácido úrico y glucosa comprenden concentraciones óptimas de Nafion entre 0.25-1.00% v/v. Los resultados obtenidos corresponden a

los descritos, en donde utilizando concentraciones elevadas de Nafion se observa una disminución en la señal, atribuida al aumento en el espesor de la membrana y con ello se dificulta la difusión de los iones, lo que afecta el tiempo de respuesta [112-114].

#### 4.3 Validación del método propuesto para la cuantificación de triglicéridos

Utilizando las condiciones óptimas encontradas anteriormente, se realizaron tres diferentes biosensores y se construyeron curvas de calibrado utilizando concentraciones de TB entre 0.08 y 0.60 mM. La Figura 11 muestra el registro potenciométrico obtenido. Las respuestas encontradas (mV) se ajustan al modelo lineal en función a la concentración de TB en solución (mM) de acuerdo a la ecuación  $E/mV = 41.76 \pm 1.94 \text{ mV/mM [TB]} + 12.76 \pm 0.64 \text{ mV}$  con un valor de  $r^2$  de 0.998. El límite de detección expresado como  $3.29S_e/b_1$  fue de 0.02 mM, donde  $S_e$  es la raíz cuadrada de la varianza residual de la curva de calibración y  $b_1$  la sensibilidad analítica. El límite de cuantificación expresado como  $10S_e/b_1$  fue de 0.06 mM, mientras que el tiempo de respuesta fue de 4 minutos.



**Figura 11.** Respuesta del biosensor de triglicéridos y curva de calibrado a diferentes concentraciones

La determinación de los parámetros de precisión se realizó mediante un análisis de repetitividad y reproducibilidad utilizando concentraciones de TB de 0.1, 0.2 y 0.4 mM. La repetitividad expresada como %DER ( $n=3$  electrodos, en el mismo día) obtenidos fueron de 7.79, 3.73 y 1.84 respectivamente. La reproducibilidad expresada como %DER ( $n=9$ , 3 electrodos, 3 días) fue de 9.02, 8.44 y 5.27,

respectivamente. Dada la complejidad del sistema que analizamos, podemos considerar a los valores mostrados en este trabajo como adecuados para el análisis de TG ya que son menores al 10 %.

El biosensor propuesto alcanza un límite de detección comparable al de los biosensores potenciométricos descritos en la literatura (Tabla 9). No obstante, es importante destacar que el dispositivo propuesto tiene un tiempo de respuesta e intervalos de respuesta lineal apropiados para la cuantificación de TG en muestras de alimentos.

A fin de evaluar el efecto de posibles interferencias en el desempeño del biosensor desarrollado, se estudiaron los principales componentes encontrados en alimentos comerciales y que pueden afectar la cuantificación de TG, los cuales incluyen proteínas, carbohidratos y aditivos. La Tabla 13 muestra los contenidos especificados en la etiqueta de los productos analizados. Los resultados muestran recuperaciones encontradas superiores al 95% para todos los interferentes a las concentraciones encontradas en los alimentos analizados.

**Tabla 13.** Recuperación de tributirina

<b>Interferente</b>	<b>% p/v adicionado</b>	<b>[TB] (<math>\mu</math>M) añadida</b>	<b>[TB] (<math>\mu</math>M) encontrada</b>	<b>%DER (n=3)</b>	<b>%Recuperación</b>
<b>Albúmina</b>	14.20	224.89	220.50	0.70	98.06
<b>Caseína</b>	14.20	225.06	223.48	1.43	99.30
<b>Almidón</b>	14.20	231.84	222.19	6.14	95.84
<b>Sacarosa</b>	52.00	224.89	223.22	7.92	99.26
<b>Glucosa</b>	52.00	254.65	247.64	0.10	97.25
<b>Benzoato de sodio</b>	0.10	201.00	196.46	6.01	97.74
<b>Ácido cítrico</b>	0.10	297.65	290.22	7.93	97.51
<b>Cloruro de sodio</b>	1.00	291.03	281.00	4.09	96.55

Una vez optimizado el biosensor se evaluó la extracción de TG en emulsión utilizando una suspensión de goma arábica (4 % p/v) en muestras de alimentos comerciales de mayonesa, mantequilla, pate, chorizo, papas fritas y pan dulce. Los resultados de la extracción con goma arábica fueron comparados con la emulsión formada con la extracción utilizando el método estándar para extracción total de grasas AOAC 920.39 el cual consiste en un secado al vacío a 70 °C y la extracción Soxhlet de la grasa con éter de petróleo durante 6 horas (ver § 3.4.1).

Los resultados de TG extraídos de las 7 muestras de alimentos por la metodología Soxhlet descrita en el capítulo anterior se muestra en la Tabla 14, en donde se presentan los valores de las fracciones de los componentes principales de los alimentos. Las grasas totales extraídas son expresadas como % p/p.

**Tabla 14.** Contenido de sólidos remanentes y grasas en alimentos comerciales.

<b>Muestra</b>	<b>%Sr (%p/p)</b>	<b>Grasas (%p/p)</b>
<b>Mayonesa</b>	8.05	81.69
<b>Mantequilla</b>	11.56	86.24
<b>Chorizo</b>	28.35	23.90
<b>Pate</b>	14.06	24.64
<b>Papas fritas</b>	56.93	26.80
<b>Pan dulce</b>	55.98	26.38

%Sr\* = Porcentaje de sólidos remanentes = %SS - %G

Los extractos de grasas obtenidos por Soxhlet y emulsión de goma arábica, fueron analizados por triplicado utilizando el biosensor optimizado y cuantificando el %TB mediante el método de adición patrón. La validación de los resultados obtenidos por el biosensor se realizó mediante la metodología enzimática-UV/Vis [13]. La ecuación obtenida para espectrofotometría es  $Abs = 1240.74 Abs/mM \pm 263.48 + 0.01 \pm 0.05$  y  $r^2 = 0.995$ .

El contenido de lípidos extraídos para cada grupo de alimentos por el método Soxhlet y por emulsión utilizando goma arábica, se analizaron mediante el biosensor potenciométrico desarrollado. El contenido de TG por ambos métodos de extracción, se muestra en la Tabla 15. Mediante un análisis estadístico t, se puede concluir que hay diferencia significativa entre el contenido de TG obtenidos mediante el análisis

del extracto Soxhlet respecto al obtenido con la emulsión, para los alimentos ricos en proteínas (chorizo y paté) y en grasas (mayonesa); es decir que el valor de la  $t$  obtenida experimentalmente es mayor que la  $t_{\text{crítica}}$  ( $\alpha = 0.05$ ,  $n=4$ ). En contraparte, para las muestras de mantequilla, papas fritas y pan dulce, se encuentran resultados estadísticamente equivalentes en ambos casos.

El contenido de TG que presenta diferencias significativas entre ambos métodos de extracción, se puede atribuir a la difícil separación de lípidos en muestras que provienen de matrices celulares complejas y que tienen a los lípidos unidos covalentemente a hidratos de carbono y proteínas. Así, los resultados de la extracción con goma arábica comparada con la extracción por Soxhlet, difieren debido a la baja eficiencia de extracción del método por emulsión en aquellos casos que demandan no solo tratamientos físicos, sino químicos. La extracción completa puede requerir de tiempo de extracción más largo o una serie o combinación de disolventes de modo que los lípidos puedan solubilizarse eficientemente a partir de la matriz [13].

Se ha descrito que utilizar disolventes orgánicos ayuda a romper las fuerzas intermoleculares de Van del Waals e interacciones electrostáticas de los lípidos con proteínas, para lo cual se hace uso de mezclas de disolventes diferentes al éter de petróleo e incluso de tratamientos químicos como la hidrólisis [13].

**Tabla 15.** Contenido de grasas y triglicéridos en muestras de alimentos comerciales obtenidas por diferentes métodos de extracción

Muestra	Concentración de TG			Grasas totales
	Biosensor potenciométrico % (p <sub>TB</sub> /p)			
	Emulsión*	Soxhlet*	t <sub>exp</sub> *	Soxhlet % (p/p)
Mayonesa	80.90 (1.85)	64.56 (0.79)	14.60	81.69
Mantequilla	90.59 (10.16)	82.53 (0.55)	1.24	86.24
Chorizo	11.85 (8.83)	25.44 (6.82)	9.49	23.90
Pate	9.60 (0.40)	25.24 (8.61)	10.18	24.64
Papas fritas	19.73 (3.79)	22.15 (2.59)	2.60	26.80
Pan dulce	23.98 (11.21)	28.49(1.51)	2.29	26.38

\* Media y %DER, \*t<sub>crítica</sub> 2.78 (  $\alpha = 0.05$ ,  $n=4$ ).

Con la finalidad de validar el biosensor desarrollado, el contenido de TG obtenido para cada grupo de alimentos fue evaluado por el método potenciométrico propuesto y el método UV/Vis (Tabla 16) haciendo uso de la extracción por emulsión. El contenido promedio encontrado en ambos casos, fue comparado a través de un análisis de varianza de una vía. El valor de F calculado (0.00029) es menor que el valor de F tabulado ( $F_{1,10}=4.93$ ,  $p=0.05$ ), por lo que se puede afirmar que no hay diferencias significativas entre los métodos de análisis contrastados. Este resultado permite afirmar que podemos utilizar a la determinación potenciométrica utilizando el biosensor desarrollado, lo que implica menor tiempo de análisis y costo.

**Tabla 16.** Contenido de triglicéridos en muestras de alimentos comerciales obtenidas por potenciometría y espectrofotometría a partir del análisis de extractos por emulsión

Muestra	Concentración de TG en % (p <sub>TB</sub> /p)		Grasas totales
	UV-vis	Biosensor potenciométrico	% (p/p)
	Emulsión*	Emulsión*	Soxhlet
<b>Mayonesa</b>	76.86 (0.99)	80.90 (1.85)	81.69
<b>Mantequilla</b>	93.49 (0.65)	90.59 (10.16)	86.24
<b>Chorizo</b>	12.26 (3.84)	11.85 (8.83)	23.90
<b>Pate</b>	9.25 (1.07)	9.60 (0.40)	24.64
<b>Papas fritas</b>	20.19 (0.86)	19.73 (3.79)	26.80
<b>Pan dulce</b>	23.33 (0.84)	23.98 (11.21)	26.38

\* Media y %DER

Haciendo una comparación entre el contenido de grasas obtenido por Soxhlet con los TG encontrados por el análisis de la emulsión y considerando que aproximadamente el 90% de las grasas son TG; es posible distinguir diferencias que no son explicables por el supuesto anterior. Este hecho puede atribuirse a que las grasas sufren complicados cambios químicos y físicos al ser calentadas a altas temperaturas ya que provocan la deshidratación de los alimentos y los vapores generados promueven la hidrólisis de los TG. Por otra parte, la degradación de TG en alimentos se ha relacionado con productos con gran cantidad de carbohidratos y bicarbonatos que

promueven la descomposición por hidrólisis [105]. Adicionalmente es importante considerar que el oxígeno favorece y acelera la oxidación o enranciamiento de los TG, por lo que se recomienda mantener una atmósfera inerte en procedimientos prolongados de almacenamiento [13].

Un factor relevante a considerar en el análisis de grasas y aceites obtenidos por extracción con disolventes es el contenido de sustancias eventualmente interferentes como: fosfolípidos, ácidos grasos libres, sustancias sápidas y olorosas, ceras, pigmentos (clorofilas, carotenoides y sus productos de degradación), compuestos azufrados, compuestos fenólicos, trazas de metales contaminantes, pesticidas, hidrocarburos policíclicos y productos de auto-oxidación. Para eliminar todas estas sustancias el extracto lipídico suele someterse a un proceso de refinado [3]

CONCLUSIONES

---

---

## **5.- CONCLUSIONES**

- Se desarrolló un biosensor potenciométrico simple y eficiente para cuantificar triglicéridos en diversos alimentos.
- El dispositivo desarrollado se basa en el registro de los cambios de pH generados por el reconocimiento de la enzima lipasa al hidrolizar los triglicéridos y acidificar el medio. Este trabajo de investigación constituye el primer reporte de un biosensor potenciométrico basado en la detección de los cambios de pH mediante un transductor grafito-epoxy.
- Adicionalmente y con la finalidad de simplificar el proceso analítico en la cuantificación de triglicéridos, se evaluó y validó la extracción de grasas mediante goma arábica como una alternativa para disminuir el uso de disolventes orgánicos en el análisis de triglicéridos en algunas muestras.
- Los resultados obtenidos mediante la metodología desarrollada son estadísticamente equivalentes a los obtenidos para el análisis de grasas en alimentos mediante la técnica enzimático-espectrofotométrica.
- El biosensor reportado en este trabajo, es el primer dispositivo potenciométrico que no utiliza un ISFET como transductor y que en consecuencia puede ser fabricado sin la necesidad de contar con costosas instalaciones para su producción.
- El biosensor desarrollado en este trabajo, es el primer dispositivo reportado que es capaz de cuantificar triglicéridos en muestras complejas de diversos alimentos, lo cual demuestra su eficacia y utilidad práctica.
- La preparación de muestras para análisis de triglicéridos debe considerar el tipo de alimento y la naturaleza de sus lípidos. Un análisis eficaz, requiere del conocimiento de los componentes de la muestra y de su estructura química; por lo tanto, diseñar un método general de extracción de triglicéridos, útil para diferentes alimentos, es una asignatura pendiente.
- En el análisis de triglicéridos, el uso de altas temperaturas debe evitarse a fin de minimizar las reacciones de hidrólisis y se recomienda el uso de atmósferas inertes para prevenir la oxidación de los lípidos insaturados.

## REFERENCIAS

---

---

---

## 6.- REFERENCIAS

1. Souci-Fachmann-Kraut. (1991). *Tabla de composición de alimentos*. Acribia.
  2. Osborne, D. R., & Voogt, P. (1985). *Análisis de los nutrientes de los alimentos*. Acribia.
  3. Anchía, I. A., & Hernández, J. A. M. (Eds.). (2003). *Alimentos: composición y propiedades*. McGraw-Hill Interamericana.
  4. Rodney, B. (2000). *Conceptos de bioquímica*. México, International Thomson Editores.
  5. Boullart, A. C. I., de Graaf, J., & Stalenhoef, A. F. (2012). Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(5), 867-875.
  6. Ebbert, J. O., & Jensen, M. D. (2013). Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients*, 5(2), 498-508.
  7. Organización Mundial de la Salud. Available online: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/es/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/) (accessed on 11 October 2013).
  8. Pérez B, F., Carrasco Piña, E., Santos M, J. L., Calvillán C, M., & Albala Brevis, C. (1999). Prevalencia de obesidad, hipertensión arterial y dislipidemia en grupos aborígenes rurales de Chile. *Revista Médica de Chile*, 127(10), 1169-75.
  9. Carey, F. A., Arellano, J. A. V., & y Pozo, V. G. (2006). *Química orgánica*. McGraw-Hill.
  10. Garrido, A., Teijón, J. M., Blanco, D., Villaverde, C., Mendoza, C., & Ramírez, J. (2003). *Fundamentos de bioquímica estructural*. Alfaomega Grupo Editor.
  11. Grandison, A. S., Grandison, A. S., & Lewis, M. J. (Eds.). (1996). *Separation processes in the food and biotechnology industries: principles and applications*. Elsevier.
  12. Ávila Rosón, J. C., & Fernández Sánchez, J. F. (2009). Ayer y hoy del olivo y de la producción de aceite. *El aceite de oliva virgen: tesoro de Andalucía*, 7-35.
  13. Casmir, C.A. & David, B.M. (2002). Extraction and Analysis of Lipids. *Food Lipids*. (2<sup>a</sup> ed). New York.
  14. Jean, A., Acques Potus, J., Poiffait, A., & Dauvillier, P. (2000). Análisis nutricional de los alimentos. *Editorial Acribia SA Zaragoza. España*.
  15. Greenfield, H., & Southgate, D. A. T. (2006). *Datos de composición de alimentos: obtención, gestión y utilización*. B. A. Burlingame, & U. R. Charrondiere (Eds.). FAO. 118.
  16. Sahasrabudhe, M. R., & Smallbone, B. W. (1983). Comparative evaluation of solvent extraction methods for the determination of neutral and polar lipids in beef. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(4), 801-805.
-

17. Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
18. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
19. Iverson, S. J., Lang, S. L., & Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36(11), 1283-1287.
20. Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Karim, A. A., Abbas, K. A., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2009). Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction-A review. *Journal of Food Engineering*, 95(2), 240-253.
21. Ramaswamy, H. S., & Marcotte, M. (2005). *Food processing: principles and applications*. CRC Press.
22. Rebolleda, S., Rubio, N., Beltrán, S., Sanz, M. T., & González-Sanjosé, M. L. (2012). Supercritical fluid extraction of corn germ oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *The Journal of Supercritical Fluids*, 72, 270-277.
23. Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Information Tecnológica*, 18(1), 53-66.
24. Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Fernández-Serrano, M., & García-Román, M. (2008). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of triglycerides in O/W emulsions: study of the initial rates and the reaction time course. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 473-484.
25. McClements, D. J. (2005). Emulsion stability. *Food emulsions, principles, practices, and techniques*, 269-339.
26. Tan, Y., Xu, K., Niu, C., Liu, C., Li, Y., Wang, P., & Binks, B. P. (2014). Triglyceride-water emulsions stabilised by starch-based nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 36, 70-75.
27. Piorkowski, D. T., & McClements, D. J. (2013). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.009>
28. McClements, D. J. (2012). Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 174, 1-30.
29. Buchgraber, M., Ulberth, F., Emons, H., & Anklam, E. (2004). Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(9), 621-648.
30. Ulberth, F., & Buchgraber, M. (2000). Authenticity of fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102(11), 687-694.
31. Bosque-Sendra, J. M., Cuadros-Rodríguez, L., Ruiz-Samblás, C., & de la Mata, A. P. (2012). Combining chromatography and chemometrics for the

- characterization and authentication of fats and oils from triacylglycerol compositional data-A review. *Analytica Chimica Acta*, 724, 1-11.
32. Skoog, D. H., Nieman, F., & de Análisis Instrumental, T. P. (2001). Editorial McGraw-Hill. *España. Quinta edición. Pág*, 922, 12.
  33. Buchgraber, M., Ulberth, F., & Anklam, E. (2004). Interlaboratory evaluation of injection techniques for triglyceride analysis of cocoa butter by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1036(2), 197-203.
  34. Imbs, A. B., Nevshupova, N. V., & Pham, L. Q. (1998). Triacylglycerol composition of Pinus koraiensis seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(7), 865-870.
  35. Geeraert, E., & Sandra, P. (1987). Capillary GC of triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase. Part II. The analysis of chocolate fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64(1), 100-105.
  36. Alonso, L. (1993). Capillary gas chromatography of some triglycerides in cheese using programmed-temperature injection. *Chromatographia*, 35(9-12), 649-652.
  37. Mayer, B. X., Zöllner, P., Lorbeer, E., & Rauter, W. (2002). A new 75% diphenyl, 25% dimethyl-polysiloxane coated on fused silica capillary columns for high temperature gas chromatography. *Journal of Separation Science*, 25(1-2), 60-66.
  38. Kuksis, A., Myher, J. J., & Geher, K. (1993). Quantitation of plasma lipids by gas-liquid chromatography on high temperature polarizable capillary columns. *Journal of Lipid Research*, 34(6), 1029-1038.
  39. Antoniosi Filho, N. R., Mendes, O. L., & Lanças, F. M. (1995). Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. *Chromatographia*, 40(9-10), 557-562.
  40. Fontecha, J., Diaz, V., Fraga, M. J., & Juarez, M. (1998). Triglyceride analysis by gas chromatography in assessment of authenticity of goat milk fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(12), 1893-1896.
  41. Perona, J. S., Ruiz-Gutiérrez, V., & Barrón, L. J. (1999). High-performance liquid chromatography in the separation of triglycerides from complex animal fats. *Grasas y Aceites*, 50(4), 298-311.
  42. Pocklington, W., & Hautfenne, A. (1986). Determination of triglycerides in fats and oils. Results of a collaborative study and the standardised method. *Yukagaku*, 35(8), 659-666.
  43. Yost, R. W., Ettore, L. S., & Conlon, R. D. (1981). *Introducción a la cromatografía líquida práctica*. Perkin Elmer.
  44. Phillips, F. C., Erdahl, W. L., Nadenicek, J. D., Nutter, L. J., Schmit, J. A., & Privett, O. S. (1984). Analysis of triglyceride species by high-performance liquid chromatography via a flame ionization detector. *Lipids*, 19(2), 142-150

45. Frede, E. (1986). Improved HPLC of triglycerides by special tempering procedures. *Chromatographia*, 21(1), 29-36.
46. Barron, L. J. R., & Santa-Maria, G. (1989). HPLC Analysis of complex mixtures of triglycerides using gradient elutions and an ultraviolet detector. *Chromatographia*, 28(3-4), 183-188.
47. Dotson, K. D., Jerrell, J. P., Picciano, M. F., & Perkins, E. G. (1992). High-performance liquid chromatography of human milk triacylglycerols and gas chromatography of component fatty acids. *Lipids*, 27(11), 933-939.
48. Redden, P. R., Huang, Y. S., Lin, X., & Horrobin, D. F. (1995). Separation and quantification of the triacylglycerols in evening primrose and borage oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 694(2), 381-389.
49. Litchfield, C. (2012). *Analysis of triglycerides*. Elsevier.
50. Redden, P. R., Huang, Y. S., Lin, X., & Horrobin, D. F. (1995). Separation and quantification of the triacylglycerols in evening primrose and borage oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 694(2), 381-389.
51. Adlof, R. O., Menzel, A., & Dorovska-Taran, V. (2002). Analysis of conjugated linoleic acid-enriched triacylglycerol mixtures by isocratic silver-ion high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 953(1), 293-297.
52. Matissek, R., Steiner, G., & Schnepel, F. M. (1998). *Análisis de los alimentos: fundamentos, métodos, aplicaciones*. Acribia.
53. Sek, L., Porter, C. J., & Charman, W. N. (2001). Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(3), 651-661.
54. Grigoriadou, D., & Tsimidou, M. Z. (2006). Quality control and storage studies of virgin olive oil: Exploiting UV spectrophotometry potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(1), 61-69.
55. Cert, A., Moreda, W., León-Camacho, M., & Pérez-Camino, M. D. C. (1996). Determinación de absorción de luz UV a 232 nm, composición de ácidos grasos, trilinoleína y triglicéridos con número equivalente de carbonos igual a 42, en aceites de oliva y de orujo de oliva: Determinación de precisión de los métodos analíticos mediante el estudio estadístico de los resultados de un análisis colaborativo. *Grasas y aceites*, 47(6), 401-410.
56. Bucolo, G. David, H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical Chemistry*, 19, 476-482.
57. Quantitative determination of triglycerides IVD, application note BSIS49-E, SPIREACT, 2013.

58. Alegret, S., Valle, M. D., & Merkoçi, A. (2004). *Sensores electroquímicos*. Bellaterra, Barcelona: Servei de Publicacions
59. Fernandez, R. E., Hareesh, V., Bhattacharya, E., & Chadha, A. (2009). Comparison of a potentiometric and a micromechanical triglyceride biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5), 1276-1280.
60. Yakovleva, M., Bhand, S., & Danielsson, B. (2013). The enzyme thermistor-A realistic biosensor concept. A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 766, 1-12
61. Starodub, N. F. (2006). Biosensors for the evaluation of lipase activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40(3), 155-160.
62. Adam, H., Stanisław, G., & Folke, I. (1991). Chemical sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, 63, 1274-1250.
63. Pundir, C. S., & Narang, J. (2013). Determination of triglycerides with special emphasis on biosensors: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 379-389.
64. Gacesa, P., & Hubble, J. (1990). *Tecnología de las enzimas*. Acribia.
65. Pundir, C. S. (2008). Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 133(1), 251-255.
66. Narang, J., Minakshi, Bhambi, M., & Pundir, C. S. (2009). Fabrication of an amperometric triglyceride biosensor based on PVC membrane. *Analytical Letters*, 43(1), 1-11.
67. Pundir, C. S., Sandeep Singh, B., & Narang, J. (2010). Construction of an amperometric triglyceride biosensor using PVA membrane bound enzymes. *Clinical biochemistry*, 43(4), 467-472.
68. Narang, J., Bhambi, M., & Pundir, C. S. (2010). Determination of serum triglyceride by enzyme electrode using covalently immobilized enzyme on egg shell membrane. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(5), 691-695.
69. Wang, J. (2006). *Analytical electrochemistry*. John Wiley & Sons.
70. Yuqing, M., Jianrong, C., & Keming, F. (2005). New technology for the detection of pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 63(1), 1-9.
71. Galster, H. (1991). *pH measurement*. VCH, New York, NY(USA).
72. Nomura, K., & Ujihira, Y. (1988). Response of oxide films on stainless steel as a pH sensor. *Analytical Chemistry*, 60(23), 2564-2567.
73. Bühlmann, P., Pretsch, E., & Bakker, E. (1998). Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 2. Ionophores for potentiometric and optical sensors. *Chemical Reviews*, 98(4), 1593-1688.
74. Oesch, U., Brzozka, Z., Xu, A., Rusterholz, B., Suter, G., Viet, P. H., & Simon, W. (1986). Design of neutral hydrogen ion carriers for solvent polymeric membrane electrodes of selected pH range. *Analytical Chemistry*, 58(11), 2285-2289.

75. Chao, P., Ammann, D., Oesch, U., Simon, W., & Lang, F. (1988). Extra-and intracellular hydrogen ion-selective microelectrode based on neutral carriers with extended pH response range in acid media. *Pflügers Archiv*, 411(2), 216-219.
76. Oesch, U., Brzózka, Z., Xu, M. A., & Simon, W. (1987). Solvent polymeric membrane pH catheter electrode for intraluminal measurements in the upper gastrointestinal tract. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 25(4), 414-419.
77. Alhadeff & Ninoska Bojorge (2011). *Graphite-Composites Alternatives for Electrochemical Biosensor*. Int Metal, Ceramic and Polymeric Composites for Various Uses, Dr. John Cuppoletti (Ed.), ISBN: 978-953-307-353-8.
78. Martínez, G., & Salavagione, H. (2011). Nanocompuestos poliméricos de grafeno: preparación y propiedades. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12, 1.
79. Shi, D. (Ed.). (2010). *Nanoscience in biomedicine*. Springer.
80. Švancara, I., Vytřas, K., Kalcher, K., Walcarius, A., & Wang, J. (2009). Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. *Electroanalysis*, 21(1), 7-28.
81. Ma, X., Jia, L., Zhang, L., & Zhu, L. (2014). The Significant Role of Carboxylated Carbonaceous Fragments in the Electrochemistry of Carbon Nanotubes. *Chemistry-A European Journal*, 20(14), 4072-4076.
82. Rodríguez Huerta, L. A., Galán-Vidal, C. A., Álvarez Romero, G. A., & Páez-Hernández, M. E. (2006). Potentiometric behavior of graphite-epoxy electrochemical transducers towards anions, cations and pH in aqueous media. *Revista Mexicana de Física*, 52, 17-19.
83. Bergveld, P. (1970). Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, (1), 70-71.
84. Chou, J. C., & Wang, Y. F. (2002). Preparation and study on the drift and hysteresis properties of the tin oxide gate ISFET by the sol-gel method. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 86(1), 58-62.
85. Bergveld, P. (1972). Development, operation, and application of the ion-sensitive field-effect transistor as a tool for electrophysiology. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, (5), 342-351.
86. Rani, R. A., & Sidek, O. (2004, November). ISFET pH sensor characterization: towards biosensor microchip application. In *TENCON 2004. 2004 IEEE Region 10 Conference (Vol. 500, pp. 660-663)*. IEEE.
87. Martinoia, S., Massobrio, G., & Lorenzelli, L. (2005). Modeling ISFET microsensor and ISFET-based microsystems: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 105(1), 14-27.

88. Nakako, M., Hanazato, Y., Maeda, M., & Shiono, S. (1986). Neutral lipid enzyme electrode based on ion-sensitive field effect transistors. *Analytica Chimica Acta*, 185, 179-185.
89. Pijanowska, D. G., Baraniecka, A., Wiater, R., Ginalska, G., Łobarzewski, J., & Torbicz, W. (2001). The pH-detection of triglycerides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 78(1), 263-266.
90. Vijayalakshmi, A., Tarunashree, Y., Baruwati, B., Manorama, S. V., Narayana, B. L., Johnson, R. E. C., & Rao, N. M. (2008). Enzyme field effect transistor (ENFET) for estimation of triglycerides using magnetic nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(11), 1708-1714.
91. Trevan, M. D., & Boffey, S. (1998). *Bioteconología: Principios Biológicos*. Acribia. Zaragoza-España.
92. Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489-511.
93. Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill Jr, C. G., & Amundson, C. H. (1990). Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(12), 890-910.
94. Verma, N., Thakur, S., & Bhatt, A. K. (2012). Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(8), 88-92
95. Salihi, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., & Salleh, H. M. (2012). Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 5, 36-44.
96. Schmid, R. D., & Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(12), 1608-1633.
97. Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R., & Hari Krishna, S. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*, 20(10), 433-437.
98. Reetz, M. T. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(2), 145-150.
99. Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 27(6), 782-798.
100. Iyer, P. V., & Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10), 1019-1032.
101. Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569.

102. Speranza, P., & Macedo, G. A. (2012). Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties. *Process Biochemistry*, 47(12), 1699-1706.
103. Aguilar Lira, G. Y., Álvarez Romero, G. A., de J Licona Sánchez, T., Páez Hernández, M. E., Galán Vidal, C. A., & Romo, R. (2013). Potentiometric Quantification of the Benzoate Ion in Nonalcoholic Beverages Using a Solid Electrode Modified with a Polypyrrole-Based Selective Membrane. *Electroanalysis*, 25(6), 1519-1527.
104. AOAC. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Published by AOAC. Inc Helrich K (editor), 15th Edition, Arlington, Vol I y II, 17-18, 40-63, 69-83, 1012.
105. Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology advances*, 30(3), 489-511.
106. Tkac, J., Vostiar, I., Gorton, L., Gemeiner, P., & Sturdik, E. (2003). Improved selectivity of microbial biosensor using membrane coating. Application to the analysis of ethanol during fermentation. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(9), 1125-1134.
107. Wu, C., Zhou, G., Jiang, X., Ma, J., Zhang, H., & Song, H. (2012). Active biocatalysts based on *Candida rugosa* lipase immobilized in vesicular silica. *Process Biochemistry*, 47(6), 953-959.
108. Lu, J., Drzal, L. T., Worden, R. M., & Lee, I. (2007). Simple fabrication of a highly sensitive glucose biosensor using enzymes immobilized in exfoliated graphite nanoplatelets nafion membrane. *Chemistry of Materials*, 19(25), 6240-6246.
109. Vamvakaki, V., & Chaniotakis, N. A. (2007). Carbon nanostructures as transducers in biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 126(1), 193-197.
110. Reddy, R., Basu, I., Bhattacharya, E., & Chadha, A. (2003). Estimation of triglycerides by a porous silicon based potentiometric biosensor. *Current Applied Physics*, 3(2), 155-161.
111. Fernandez, R. E., Bhattacharya, E., & Chadha, A. (2008). Covalent immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase on semiconducting materials. *Applied Surface Science*, 254(15), 4512-4519.
112. Syed, M.; Usman, A.; Nura, O.; Willander, M.; Danielsson, A fast and sensitive potentiometric glucose microsensor based on glucose oxidase coated ZnO nanowires grown on a thin silver wire *Sensors and Actuators B* 145 (2010) 869–874.
113. Usman Ali, S. M., Nur, O., Willander, M., & Danielsson, B. (2010). A fast and sensitive potentiometric glucose microsensor based on glucose oxidase coated

- ZnO nanowires grown on a thin silver wire. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145(2), 869-874.
114. Lukachova, L. V., Karyakin, A. A., Karyakina, E. E., & Gorton, L. (1997). The improvement of polyaniline glucose biosensor stability using enzyme immobilization from water-organic mixtures with a high content of organic solvent. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 44(1), 356-360.
115. Wong, D. W. (1995). *Química de los alimentos: mecanismos y teoría*. Acribia.