Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

**FACULTAD DE FARMACIA**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

# TRABAJO FIN DE GRADO

# TÍTULO: Biosensores enzimáticos electroquímicos en la industria alimentaria

Autor: Marta Boix Cayuela

Tutor: Dra Marta Sánchez-Paniagua López

Convocatoria:Febrero

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

# Indice

Página

1. Resumen…… 1

2. Introducción y Antecendentes……2-3

3. Objetivos……4

4. Metodología……4-5

5. Discusión y resultados…… 6-16

   a) Detección de pesticidas en alimentos…… 8-9

   b) Detección de aditivos en alimentos…… 9-10

   c) Detección de contenido fenólico en alimentos…… 10-12

   d) Detección de colesterol en alimentos…… 12-13

   e) Detección de metales pesados en alimentos…… 14-15

   f) Detección de aminas biogénicas en alimentos…… 15-16

6. Conclusión…… 16-17

7. Bibliografía…… 18-19

# 1.Resumen

Los biosensores enzimáticos electroquímicos son dispositivos analiticos con gran potencial en la industria alimentaria, gracias a su especificidad, alta sensibilidad y posibilidad de automatización y miniaturización. Es una herramienta útil para el análisis de la calidad de los alimentos, la seguridad de éstos y del control de procesos alimentarios, pudiendo trazabilizar cualquier problema existente en cada uno de ellos. Por ese motivo existe un elevado número de publicaciones sobre este tema aunque no se dispone de muchos biosensores comerciales a causa de problemas de estabilidad , tiempo de vida corto e interferencias.

En este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de biosensores enzimáticos amperométricos para el análisis de alimentos desarrollados en los 10 últimos años, pudiéndose utilizar en un futuro dentro de la industria alimentaria

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

# 2. Introducción y Antecedentes

La industria alimentaria ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años llegando, por ejemplo, a ser el primer sector industrial de España. El objetivo de este sector es proporcionar alimentos sanos, seguros y de calidad. En los últimos años el mayor esfuerzo ha sido orientado a su desarrollo e innovación, haciendo hincapié en los controles de calidad y seguridad alimentaria.

Las técnicas convencionales, para la detección de los diferentes compuestos con el fin de determinar la calidad y seguridad alimentaria, utilizadas en esta industria son la espectrofotometría, cromatografía, o electroforesis que son costosas y lentas lo que impide que se haga un seguimiento continuo del producto. La metodología ideal sería una que fuese rápida, sensible, específica, segura y barata. Los métodos electroquímicos constituyen una alternativa interesante y dentro de estos métodos los biosensores amperométricos han adquirido un papel relevante, estudiándose ampliamente[1].

Un biosensor es un dispositivo analítico que consta de dos componentes básicos, un elemento biológico de reconocimiento y un transductor. El sistema de reconocimiento molecular es capaz de reconocer selectivamente un determinado compuesto mediante una reacción que produce un cambio de concentración, pH, masa, calor, propiedades ópticas…etc. El transductor detecta este cambio y transforma dicha señal en una señal física más fácilmente medible. La señal eléctrica producida aporte información analítica acerca de la muestra estudiada.

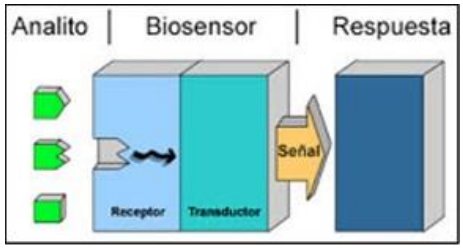


Figura 1- Biosensor

Los biosensores se pueden clasificar en función del elemento de reconocimiento, el sistema de transducción o el tipo de interacción.

**<u>En función del elemento de reconocimiento:</u>**

<u>Biosensores Catalíticos:</u> Son aquellos biosensores en los que se utiliza un biocatalizador que al interaccionar con el sustrato desencadena una reacción química, sin consumo del material biológico que se regenera y puede ser utilizado de nuevo. Los receptores utilizados pueden ser enzimas, células, orgánulos o tejidos. Una de sus desventajas es que necesitan ser extraídos y purificados.

Biosensores de Afinidad: Son aquellos biosensores en los que el elemento de reconocimiento interacciona con el sustrato deseado formando un complejo con éste. Debido a que no hay un cambio catalítico, normalmente se necesitan marcadores para medir la interacción y así ser detectado por el transductor. Este sería uno de los inconvenientes de estos sensores junto con su capacidad de saturación, impidiendo que reaccione todo el analito. Dentro de los receptores utilizados se encuentran los anticuerpos, los ácidos nucleicos, anticuerpos, receptores, biomiméticos…etc.[2]

**En función del sistema de transducción:**

Un transductor es un dispositivo analítico que detecta los cambios físico-químicos producidos por el sensor y lo procesa en una señal medible y amplificada proporcional al cambio detectado. Dependiendo de la señal que detecta, se dividen en ópticos, termométricos, piezoeléctricos, nanomecánicos y electroquímicos.

El transductor electroquímico está en contacto directo con el sensor transformando el cambio detectado en una señal eléctrica. Este tipo de transductores son los más utilizados para los elementos de reconocimientos biocatalíticos. Dentro de los electroquímicos existen los conductimétricos (mide cambios en la conductividad), potenciométricos (midiendo potencias eléctricas), amperométricos (reacciones oxidación-reducción) e impedimétricos (aumento de conductancia).[3]

Los biosensores enzimáticos electroquímicos tienen muchas ventajas como un límite de detección bajo, alta selectividad y sensibilidad, una respuesta rápida, baja reproducibilidad, son regenerables, diseño y preparación simple, bajo coste y con posibilidad de miniaturización y automatización. Presentan algunos inconvenientes como que se requieren técnicas de inmovilización del material biológico para aumentar su estabilidad, y la sensibilidad del dispositivo puede verse afectada frente a diferentes condiciones ambientales tipo temperatura, fuerza iónica o pH. Algunas enzimas necesitan la presencia de cofactores para llevar a cabo su catálisis o pueden ser inhibidas por otras sustancias.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

# 3. Objetivos

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica de los biosensores enzimáticos electroquímicos enfocados a la industria alimentaria, con el fin de conocer el estado actual de este tipo de dispositivos analíticos en el análisis alimentario. Estos dispositivos han experimentado un notable avance en los últimos años para el control de calidad y seguridad en la industria alimentaria.

# 4. Metodología:

Este trabajo se centra en los biosensores cuyo elemento de reconocimiento es una enzima que está en contacto con un transductor electroquímico. El primer biosensor enzimático electroquímico desarrollado y comercializado fue para la medición de la glucosa en sangre mediante la enzima glucosa oxidasa en 1962.

Las enzimas son un tipo de proteínas que catalizan reacciones químicas de forma potente y eficaz en los sistemas biológicos. Suelen ser muy estables en pH neutro y a temperatura suave. En algunos casos se necesita un cofactor para llevar a cabo las reacciones enzimáticas. Las enzimas presentan centro activo, que es la porción de la molécula que facilita la unión y el reconocimiento del sustrato formando un complejo activo. Esto hace que se genere la suficiente energía para desencadenar la reacción química. Por tanto, el centro activo de las enzimas les confiere una alta especificidad y selectividad, unas características muy deseables para los sensores.

Un factor limitante para el tiempo de vida de los biosensores enzimáticos es la estabilidad de las enzimas. Para incrementar, a lo largo del tiempo, la estabilidad estructural y funcional del biomaterial, se han empleado distintos métodos de inmovilización que proporcionan un ambiente en el que el material biológico se encuentra protegido del medio que le rodea. Para que una técnica de inmovilización sea óptima debe mantener la estabilidad de la enzima, que se pueda reutilizar y que siga teniendo la misma selectividad. Por tanto hay que tener especial cuidado con alterar la conformación de ésta. Se pueden dividir en métodos

físicos y químicos. Dentro de los químicos el más estable es mediante uniones covalentes con el electrodo, generalmente mediante grupos hidrófilos de la enzima no necesarios en su actividad catalítica. El proceso de cross-linking es otro método químico en el que los reactivos establecen enlaces intermoleculares con la enzima. Y el proceso sol-gel son reacciones de hidrólisis y polimerización sobre un precursor dando una suspensión coloidal. Entre los métodos de inmovilización físicos se encuentran la adsorción (establece uniones débiles tipo Van der Waals), la encapsulación (uso de una membrana semipermeable rodeando las enzimas y permitiendo el libre movimiento de los sustratos e iones) y el atrapamiento (retención del biosensor en las cavidades de una matriz, normalmente un gel).

Finalmente para transformar la señal detectada por los sensores a una señal cuantificable, se necesita un transductor. Este trabajo se centra en el uso de transductores electroquímicos, y dentro de estos, amperométricos. [2]

Las medidas amperométricas se realizan mediante sistemas de 3 electrodos: electrodo de referencia, electrodo auxiliar y un electrodo de trabajo. El electrodo de referencia mantiene constante el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo. En el electrodo de trabajo se mide el paso de corriente una vez que se ha fijado una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar, actuando este último como un contraelectrodo para cerrar el circuito eléctrico.

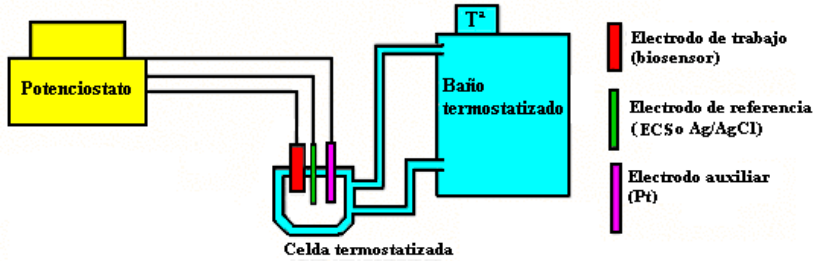



Figura 2- Diseño del potenciostato

Los sensores amperométricos se basan en la medida de la intensidad de corriente resultante de la oxidación o reducción de la superficie electroactiva en un electrodo al que se le ha sometido a un potencial constante. Viene dado la relación entre la carga y los electrones por la ecuación de Faraday, Q= nFN. Donde Q es la carga eléctrica total, n es el número de valencia de la sustancia, F la constante de Faraday (la carga en culombios de un mol de electrones) y N el número de Avogadro.[3]

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

# 5. Resultados y Discusión

El número de publicaciones científicas, revisiones y patentes relacionadas con biosensores enzimáticos electroquímicos en la industria alimentaria es elevado, lo que refleja el gran interés que despierta este tema en el área científica.

A pesar de ello, comercialmente no se han desarrollado tanto habiendo un gran interés comercial de llevarlo a la práctica.

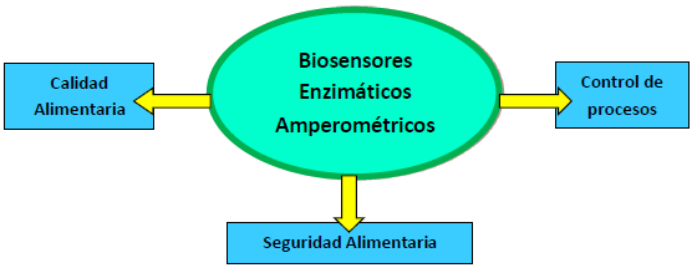



Figura 3- Esquema de aplicación de biosensores

Dentro de la industria alimentaria los biosensores pueden utilizarse para la calidad alimentaria, el control de procesos y la seguridad alimentaria.

La calidad alimentaria es , según el BOE núm. 182 28/2015, "un conjunto de propiedades y características de un producto alimenticio o alimento relativas a las materias primas o ingredientes utilizados en su elaboración, a su naturaleza, composición, pureza, identificación, origen y trazabilidad, así como a los procesos de elaboración, almacenamiento, envasado y comercialización utilizados y a la presentación del producto final, incluyendo su contenido efectivo y la información al consumidor final especialmente el etiquetado".

Con los biosensores se puede analizar el estado de los alimentos desde la frescura a microrganismos o toxinas. Por ejemplo se puede analizar el índice de madurez de las frutas, mediante la cuantificación de azúcares[4] o el índice de enranciamiento del aceite de oliva midiendo los polifenoles que presenta[5].

El control de procesos en la industria alimentaria permite analizar los alimentos en las distintas fases de la cadena productiva, pudiendo detectar cualquier problema que haya podido ocurrir durante todo el proceso y solucionarlo, antes de que el alimento llegue al mercado (trazabilidad del error). Normalmente se realiza este control mediante medidas de pH, temperatura o presión. Aunque en estos últimos años se han desarrollado biosensores

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

con este fin, por ejemplo la detección de ácido láctico que determina la acidez de los quesos o de etanol en bebidas alcohólicas[6].

La seguridad alimentaria se basa en garantizar que los alimentos producidos no son dañinos para la salud ni adulterados de forma nociva, siendo sanos e inocuos para el consumidor y aptos para el consumo. Por ejemplo, detectando sustancias presentes en los alimentos que no son sintetizadas por seres vivos. Dentro de esto hay una gran variedad de compuestos como microorganismos, toxinas, alérgenos, aditivos o fármacos.

La detección de microorganismos en alimentos es necesaria para evitar infecciones alimenticias, la mayoría de biosensores desarrollados para ello no son enzimáticos sino inmunológicos, donde se utiliza la reacción de complejación de los anticuerpos en presencia de los antígenos específicos. También las toxinas son importantes determinarlas para evitar toxiinfecciones, analizándose de la misma manera.

Los aditivos, aparte de que pueden encubrir la falta de calidad de los alimentos, pueden presentar problemas de intolerancia o alergias en el ser humano. Por eso la legislación los regula de forma muy exhaustiva. Se han desarrollado biosensores amperométricos, por ejemplo, para la detección de ácido benzóico o los sulfitos que tienen efectos conservantes en los alimentos pero en altas concentraciones son nocivas para el ser humano[7].

Los pesticidas también pueden causar graves problemas de salud. Su uso es muy común en cultivos de alimentos y en animales puede acumularse en el tejido graso, por tanto es fundamental que su presencia en ellos sea mínima. Se han desarrollado biosensores que detectan estos compuestos mediante la inhibición de algunas enzimas como, por ejemplo, la tirosinasa[7] o la acetilcolinesterasa[8].

También se detectan fármacos como hormonas para el crecimiento de los animales o antibióticos en leche, al igual que metales pesados, alérgenos o antinutrientes, que impiden la absorción de ciertos compuestos[9].

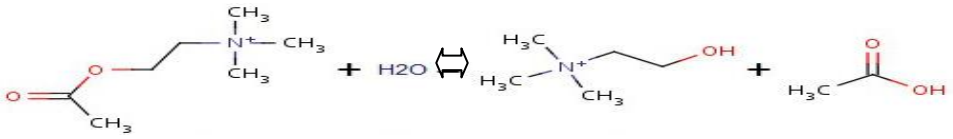
A continuación se explicará con más detalle diferentes grupos de compuestos detectados en alimentos mediante biosensores enzimáticos electroquímicos, publicados en los últimos 10 años.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

## a) Detección de pesticidas en alimentos

Los pesticidas son aquellas sustancias utilizadas para proteger los vegetales de organismos nocivos que puedan afectar a su ciclo de vida. Aunque la Unión Europea (EU) solo autoriza aquellos que no pueden ser activos en humanos durante su cultivo y consumo, suelen quedar residuos de metabolitos y de su degradación. Por eso se han establecido un límite máximo de residuos en los alimentos que es un límite toxicológicamente aceptable, es decir, aunque se superase este límite no tiene por qué causar perjuicios a la salud.

Una de las enzimas más estudiada para su uso como biosensor es la acetilcolinesterasa, que reacciona con la acetilcolina mediante la siguiente reacción enzimática




Acetilcolina + Agua ⇔ Colina + Acetato

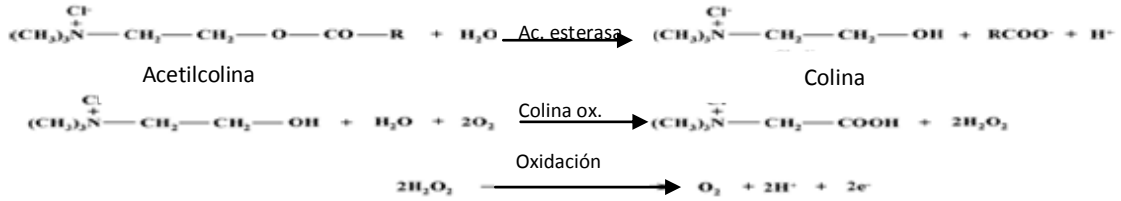
El interés hacia esta enzima radica en que es inhibida irreversiblemente por los pesticidas organofosforados, que son neurotóxicos y teratogénicos para el ser humano, ya que impiden la hidrólisis de la acetilcolina afectando al sistema colinérgico. Su mecanismo de acción es que reacciona con una serina del centro activo de la enzima, mediante un ataque nucleofílico del fosfoester impidiendo la hidrólisis de la acetilcolina.

Los métodos utilizados generalmente para su detección son cromatográficos siendo los biosensores enzimáticos una buena alternativa para conseguir una prueba “in situ”.

Zhang y col.[10] (2005) desarrollaron un biosensor como dispositivo analítico para la detección de organofosfatos y carbamatos en leche. Para ello, se medía la actividad enzimática en ausencia de inhibidor, posteriormente se dejaba incubar la enzima con el inhibidor y finalmente se medía la actividad enzimática en presencia de inhibidor. Así, se obtenía una relación entre la concentración del inhibidor y la disminución de la actividad. Para conseguir el máximo efecto de la interacción enzima-inhibidor se estudiaron las condiciones óptimas que fueron un tiempo de incubación entre 5 y 8 minutos, un pH 7.4 y a 30ºC.

Esta enzima fue inmovilizada mediante cross-linking con glutaraldehido pero por si sola resultó no ser lo suficiente sensible ya que la colina no es activa electroquímicamente, por eso se desarrolló combinada con otras enzimas como la colina oxidasa, debido a que la oxidación del agua peroxidada sí lo es. La reacción es la siguiente:

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.




El transductor utilizado fue el amperométrico y el electrodo de trabajo es de carbono modificado con hidroxietil celulosa y tetracianoquinodimetano. Las enzimas fueron obtenidas de forma mutagénica e inmovilizadas las dos juntas, consiguiendo así un aumento de la sensibilidad. El inconveniente es que necesita aplicarse un alto potencial (100mV), haciéndole susceptible a interferencias.

## b) Detección de aditivos en alimentos

Los aditivos son sustancias que se añaden a los alimentos para aportar buena textura, mejorar su aspecto o para aumentar su caducidad. Existen distintas clases desde colorantes a antioxidantes, todos ellos deben de estar aprobados por la UE. Para ello, su uso debe tener un motivo justificado, demostrar que es inocuo para la salud, indicando cuál es la ingesta diaria admisible teniendo en cuenta que se puede consumir en diferentes alimentos.

Un ejemplo de aditivo alimentario es el ácido benzóico. Pertenece al grupo de conservantes por sus propiedades antimicrobianas y se suele usar en frutas, zumos o bebidas, debido a que tiene un pH ácido. La concentración máxima permitida es 300-5000 mg/kg dependiendo del alimento. Se han desarrollado diferentes biosensores para su detección. Para ello, se utiliza la enzima polifenol oxidasa que cataliza la hidroxilación de los fenoles (como el catecol), que el ácido benzóico inhibe de forma competitiva por su parecido a los catecoles.

En 2010 se desarrolló un biosensor para estudiar su capacidad de trabajo en un medio hidrofílico e hidrófobo con diferentes matrices (Brucita y Monetita) enzima tirosinasa (M.Sanchez-Paniagua y col.[7], 2011). La brucita está dispuesta en láminas paralelas mientras que la monetita no está hidratada y presenta un fosfato inorgánico.

Se utiliza un electrodo de trabajo de carbono vitrificado, con un potencial de -0,1V e inmovilizado por adsorción y cross-linking, en un tampón con una solución de catecol a pH 6. Como es una inhibición competitiva en concentraciones altas de catecol se produce una bajada de la inhibición del ácido benzóico, llegando a la saturación de la enzima.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Se observa que la matriz de brucita solo produce señal en un medio hidrófilo. Presentando una alta sensibilidad y una respuesta rápida. Pero con pérdidas de la enzima.

Por otro lado, la monetita es menos sensible pero queda más enzima retenida ya que su medio ideal es el hidrofóbico. Por tanto al retener más enzima produce una señal de inhibición máxima mayor que la de la brucita, teniendo un límite de detección menor.

En ambos casos se observaron interferencias con el ácido ascórbico aumentando un 5,3% la señal. El biosensor enzimático desarrollado se aplicó al análisis de bebidas energéticas o en mayonesa, obteniéndose resultados satisfactorios utilizando los dos diferentes medios.

Otro conservante que también se puede detectar con biosensores enzimáticos son los sulfitos que sirven para prevenir la oxidación y el crecimiento bacteriano de comida y bebida, sobre todo durante el almacenaje. Es importante su control ya que puede tener efectos citotóxicos, mutagénicos y como antinutrientes (interaccionado con las vitaminas). Además en estos últimos años se ha detectado reacciones adversas hacia los sulfitos que van desde tos a shock anafiláctico. Esto es debido a que el ion sulfito es nucleofílico pudiendo reaccionar con diferentes grupos funcionales como carbonilos.

La enzima utilizada para su detección es la sulfito oxidasa, que participa en la degradación de los aminoácidos con grupos sulfuros. $SO_3^{2-} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Sulfito ox.}} SO_4^{2-} + H_2O_2$

Generando peróxido de hidrógeno que puede ser detectado electroquímicamente.

Molinero-Abad y col.[11] (2014) proponen un biosensor con esta enzima para la detección de sulfitos en vino, donde se utiliza un transductor amperométrico y un electrodo de carbono con tetratiafulvaleno donde la enzima es inmovilizada con glutaraldehido, aumentando su sensibilidad. En este caso el agua peroxidada resultante reacciona con el TTF reducido oxidándolo, produciendo una señal. Las condiciones óptimas para el análisis fueron pH 6, a 60 º C y con un potencial de -0,1V, para evitar interferencias. Finalmente se analizó el contenido de sulfitos en dos tipos de vino diferentes obteniéndose buenos resultados, uno blanco y otro tinto con un pretratamiento analítico decolorándolo con carbón activo.

## c) Detección de contenido fenólicos en alimentos

Los polifenoles son metabolitos secundarios que están presentes en muchos alimentos vegetales como por ejemplo aceite de oliva, chocolate o vino. Pueden estar en forma de

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

fenoles simples o flavonoides. Tienen gran capacidad antioxidante, ya que son capaces de captar radicales libres e incorporarlos dentro de su estructura de forma estable deslocalizándolos. Esto le confiere propiedades anticancerígenas, antinflamatorias, antihipertensivas, para la prevención de enfermedades cardiacas.

Los vinos son una mezcla compleja de diferentes compuestos donde los polifenoles (presentes sobretodo en la piel y semillas de la uva) son una pieza clave en su calidad. Presentan una gran variedad de compuestos fenólicos como el reservatrol que es un fitoestrógeno agonista parcial del receptor estrogénico, taninos que le confieren la astringencia o la aspereza al sabor del vino y antocianos que dan el color al vino, entre otros muchos compuestos fenólicos. Esta gran cantidad de compuestos fenólicos hace muy difícil determinarlos por separado, midiéndose todos juntos mediante el índice fenólico. El método de referencia es Folin-Ciocalteu que se trata de un método colorimétrico.

En la publicación de Di Fusco y col.[12] (2010) se desarrolla un biosensor enzimático para obtener el índice fenólico del vino utilizando la enzima lacasa. Esta enzima oxida diferentes sustratos y reduce el oxígeno a agua.

$$4AH + O_2 \xleftrightarrow{Lacasa} SO_4^{2-} + H_2O_2$$

Posteriormente, se mide la reducción electroquímica del sustrato producido por la enzima.
Utiliza dos tipos de lacasas provenientes de diferentes levaduras, una comercial del *Trametes versicolor* y otra purificada de *Trametes hirsuta.* Además utiliza un prepolímero para la inmovilización de la enzima por adsorción y cross-linking. Los electrodos de trabajo utilizados son nanotubos de carbono múltiple y simple con un potencial de -100mV.
Primero realiza diferentes medidas de vinos con el electrodo de nanotubo múltiple, variando las dos diferentes lacasas. Los resultados con el biosensor utilizando la lacasa de *Trametes versicolor* son entre un 41-58% menores en vino blanco y 38-47% menos en vino tinto en comparación con el método de referencia (Folin-Ciocalteu). Mientras que con la lacasa de *Trametes hirsuta* el resultado es mejor, siendo solo un 8% menor que el método de referencia. Luego se probó con el electrodo de nanotubo de carbono simple con la lacasa del *Trametes hirsuta*, donde la sensibilidad disminuyó un 50% y aumentó el límite de detección. Los resultados obtenidos fueron entre un 4-11% menores que mediante Folin-Ciocalteu.
El método Folin-Ciocalteu presenta interferencias con el dióxido de sulfuro y los azúcares reducidos. Este es el motivo de que las medidas sean superiores a la de los biosensores

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

propuestos. La única interferencia que presentan estos biosensores es al ácido ascórbico con el electrodo de nanotubo de carbono múltiple variando la señal entre un 5 a un 10%.
Finalmente se estudió la diferencia de resultados entre las enzimas atribuyéndolo a las impurezas de la enzima comercial en comparación de la purificada, siendo los biosensores con la enzima purificada una buena alternativa a Foli-Ciocalteu por sus mínimas interferencias, corto tiempo de análisis (4 minutos), reproducibilidad y tiempo útil (10 días).

El mismo año, Montereali y col.[13] (2010) desarrollaron otro biosensor enzimático para el mismo fin, analizando el vino durante el proceso de fermentación. En este caso se utilizan conjuntamente dos enzimas la lacasa y la tirosinasa (relación de concentración 1:2) inmovilizadas en una matriz sol-gel por electrodos de grafito serigrafiados modificados con ferroceno. La coinmovilización de ambas enzimas produce un aumento de la reactividad con los diferentes compuestos fenólicos. El biosensor mostró adecuadas propiedades analíticas permitiendo realizar medidas a bajo potencial (0,05 V), reduciendo el efecto de sustancias interferentes. Se analizaron muestras de mosto de uva y vino.
La utilización de enzimas diferentes en el mismo biosensor disminuía notablemente el límite de detección. El sulfito al inhibir ambas enzimas interfería en los resultados y se desarrolló un tratamiento previo del vino, acidificándolo para evitar esta interferencia. Y finalmente al comparar los resultados con los de método de referencia se vio que obtenían diferentes valores, atribuyéndolo a la diferencia de metodología analítica empleada. Al representarse en una gráfica se obtuvo unas curvas parecidas, concluyéndose que este biosensor se podía aplicar satisfactoriamente en la determinación del índice fenólico del vino.

## d) Detección de colesterol en alimentos

El colesterol es un lípido sintetizado por el hígado y también presente en muchos alimentos. Forma parte de la estructura celular de nuestro organismo, sirve como precursor de diferentes hormonas y vitaminas y es también utilizada para obtener energía. Los altos niveles de colesterol, sobretodo LDL, se han asociado a diferentes enfermedades como las cardiovasculares o la diabetes. Por ello es tan importante el control del colesterol en los alimentos.
En la publicación de R.Yuan y col.[14] (2013) se estudia un biosensor utilizando solo la enzima colesterol oxidasa, midiendo la oxidación del peróxido de hidrógeno. Esto hace que mida

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

solo el colesterol libre. La colesterol oxidasa oxida el alcohol del colesterol produciendo con ayuda del cofactor FAD agua peroxidada. ***Colesterol + $O_2$ $\xrightarrow{Coles.\ Ox}$ Colest -4-en-3-ona + $H_2O_2$***

El biosensor enzimático tiene un electrodo de trabajo carbono vitrificado, trabajando a un potencial de -0,35 V. Este electrodo está compuesto, para facilitar la inmovilización por atrapamiento de la enzima, por una nanoestructura de Ti y grafeno, que le aporta la parte estructural, por Pt y Pd, que le confiere la actividad catalítica, conductiva y eléctrica, y Au, que facilita la transferencia de electrones. Se estudió su estabilidad después de 4 semanas y sus resultados fueron del 89,4% en comparación con el primer día. En cuanto a las interferencias posibles, se comprobó que el ácido ascórbico, úrico y la glucosa no interferían de forma significativa la señal. Finalmente se analizaron huevos, carne y aceite de pescado cuyos resultados concordaban con los que se indicaban en la etiqueta realizados por HPLC.

A.Chen y col.[15] en 2011 desarrollan un biosensor enzimático para la detección de colesterol total. El biosensor está formado por un voltímetro cíclico, un electrodo de trabajo de Ti con nanoporos de Au y chitosán para inmovilizar las enzimas por atrapamiento. Los nanoporos de Au tienen fácil síntesis, son biocompatibles, tienen buenas propiedades eléctricas (favoreciendo la transferencia de electrones) y aumentan la sensibilidad del biosensor. El chitosán es un polisacárido biocompatible, biodegradable, soluble en agua acidificada y que le confiere estabilidad estructural al electrodo. Las enzimas inmovilizadas en este biosensor son la colesterol oxidasa, la colesterol esterasa y la peroxidasa de suero de caballo.

La colesterol esterasa hidroliza el colesterol esterificado liberando los ácidos grasos, por lo que el biosensor desarrollado es útil para la detección de colesterol total.

***Ester de colesterol + $H_2O$ $\xrightarrow{Coles.Es}$ Colesterol + Ácidos grasos***

La peroxidasa del suero de caballo (HRP) mediante un grupo hemo con $Fe^{3+}$ desencadena un ciclo oxidativo degradando el agua peroxidada a agua y que así sea detectado por el sensor.

Gracias a la incorporación de la peroxidasa se pudo trabajar a un potencial menor que en el anterior trabajo (-0,203 V) disminuyendo la posibilidad de interferencia. Además se vio que no presenta casi interferencias significativas con el ácido láctico, úrico, ascórbico o azúcares y que tiene una larga estabilidad, durando hasta 60 días. Se estudió la aplicabilidad del biosensor desarrollado mediante el análisis de margarina y mantequilla, obteniéndose resultados satisfactorios.

$H_2O_2 + HRP(Fe^{3+}) \longrightarrow$ Compuesto I($Fe^{4+}$) + $H_2O$

Compuesto I(($Fe^{4+}$)=O) $\longrightarrow$ Compuesto II(($Fe^{4+}$)=O)

Compuesto II(($Fe^{4+}$)=O) $\longrightarrow$ HRP($Fe^{3+}$) + $H_2O$

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

## e) Detección de metales pesados

Los metales pesados dentro de nuestra alimentación es una de las crecientes preocupaciones de la sociedad, debido a que estos metales tienen efectos nocivos para el ser humano provocando desde leucemias a enfermedades neurológicas. Sobre todo está presente en el agua y suelo contaminado, llegando finalmente a estar en los alimentos.

En la publicación de M.R. Guascito y col.[16] (2008) propone un biosensor enzimático para el análisis de agua con la enzima glucosa oxidasa. El estudio se basa en la inhibición irreversible de los metales pesados sobre esta enzima. El biosensor consta de un electrodo de trabajo de platino con polifenilendiamina, donde la enzima es inmovilizada por atrapamiento, a un potencial 0,70V. Se obtuvieron resultados diferentes en función del ión a determinar. Los $Hg^{2+}$, $Ag^{+}$, $Cu^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Co^{2+}$, $Ni^{2+}$ y el anión $CrO_4^{2-}$ presentaron respuesta inhibitoria con la enzima glucosa oxidasa. Mientras que $Pb^{2+}$, $Cr^{3+}$, $Zn^{2+}$y $Mn^{2+}$ no presentaron señal inhibitoria. El tiempo de respuesta el biosensor se estimó en 100 segundos. Y su reversibilidad mediante el lavado con EDTA fue en la mayoría de más de un 90%, excepto con $Cu^{2+}$ (81%) y el $Co^{2+}$ (21%). El resultado del $Co^{2+}$ se debe a que con el potencial que se aplica puede haberse oxidado a $Co^{3+}$. Se vio, que después de un día la sensibilidad disminuía un 60% pero luego permanecía estable hasta 4 semanas. Esto es debido a que no toda la enzima está unida fuertemente al electrodo perdiéndose en un día la que está adsorbida con enlaces débiles.

Además estudiaron las interferencias posibles, sobre todo con el $H_2O_2$ ya que en presencia de metales de transición se descompone fácilmente. Al añadirle agua peroxidada, no se vio un cambio significativo en las señales inhibitorias debido a la gran afinidad de estos metales por la glucosa oxidasa.

Finalmente se concluyó que el $Ag^{+}$ al ser el metal con más poder inhibitorio, tiene el menor límite de detección de todos y que solo puede presentar como interferencia la presencia de $Hg^{2+}$. Como desventaja de este biosensor es que no es selectivo a cada ion por lo que se determina el total de la concentración de metales pesados en la muestra analizada.

I.Tan y col.[17] (2011) proponen un biosensor para detectar $Ni^{2+}$ y $Hg^{2+}$, utilizando la enzima lactato deshidrogenasa. Esa enzima es obtenida mediante la bacteria Clostridium thermocellum, la forma más estable de obtener la enzima.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

La disolución utilizada tiene lactato y NAD+ para que reaccione formando piruvato. El electrón del NAD+ es captado por la matriz polimérica del electrodo de trabajo. El biosensor está formado por un electrodo de trabajo de Au y la enzima esta inmovilizada por cross-linking en poliglutaraldehido-pirrol. Mostrando la máxima actividad a pH 7.5, a 60 ºC con un potencial de 0,2V. La estabilidad del biosensor fue de una semana.

$$Lactato + NAD^+ \xleftrightarrow{Lactato\ DH} Piruvato + NADH + H^+$$

Los metales con mayor efecto inhibitorio fueron el $Hg^{2+}$, $Cd^{2+}$ y $Pb^{2+}$. Para obtener un biosensor sensible a $Hg^{2+}$ y $Ni^{2+}$, se aumentó la concentración de lactato, solo con respuesta al $Hg^{2+}$ y no al $Ni^{2+}$, siendo un biosensor selectivo únicamente a este metal pesado.

## f) Detección de aminas biógenas en alimentos

Las aminas biogénicas son marcadores de calidad de los alimentos. Son producidas por los animales, plantas y microbios aumentando su concentración durante el almacenaje. Por tanto, su presencia es un buen indicador de la frescura del alimento, como, por ejemplo, en fruta o pescado. Dentro de las aminas biógenas están la histamina, putrescina, cadaverina o tiramina. Una alta concentración de éstas puede ser tóxica para el ser humano.

D.Centoze y col.[18] (2010) se estudia un biosensor enzimático para la determinación de estas aminas. Consiste en el uso de la enzima diamino oxidasa con un potencial 0,7V inmovilizada por cross-linking.

$$R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 + H_2O + O_2 \xrightarrow{Diamino\ oxidasa} R\text{-}CHO + NH_3 + H_2O_2$$

Como electrodos de trabajo se estudiaron el electrodo de Pt y el electrodo de Au, obteniéndose una mayor señal a la histamina para el primero, que será el que se utilice en el estudio. También estudia el uso de una monocapa o una bicapa en el electrodo de trabajo, siendo modificada con polipirroles y poli-orto-fenillendiamina para que la enzima sea inmovilizada por cross-linking. El electrodo monocapa (Pt y el polipirrol) no presenta una buena selectividad ya que interfieren los aminoácidos. Mientras que la bicapa, disminuye notablemente las interferencias (solo al acido gálico) y aumenta la sensibilidad.

También se comprobó que la respuesta con esta enzima es más lenta en comparación con otras oxidasas pero tiene mayor respuesta a la putrescina y cadaverina.

Finalmente, se realizó el análisis de las aminas, de forma conjunta ya que el biosensor no es selectivo a una de ellas, en queso y anchoas (en diferentes condiciones) y los resultados obtenidos fueron bastante parecidos a los que se obtuvieron mediante HPLC.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Alonso-Lomillo y col.[19] (2010) estudian un biosensor enzimático para la detección de estas aminas. Consiste en la utilización de la monoamino oxidasa y la diamino oxidasa ambas junto a la peroxidasa de suero de caballo. El biosensor tiene un electrodo de trabajo que es de carbono modificado. En este electrodo se inmovilizan las enzimas con la matriz de la sal diaril-diazonia, que establece enlaces covalentes con los grupos carboxílicos de las enzimas. Se estudió las diferentes condiciones como el pH, el ratio de concentración de las enzimas y el voltaje para hallar las óptimas. Las óptimas son pH 9,3, voltaje de 250 mV y el ratio DAO/HRP 1:3,35 y MAO:HRP 1:4. La diferencia entre las dos enzimas es la concentración necesaria de las dos, mientras que la DAO son 120 mg/ml la MAO es de 5mg/ml. Esto se debe a la baja actividad de la DAO aunque tiene mayor especificidad, sobre todo a la putrescina, cadaverina e histamina. También se estudian las enzimas por separado y se vio que son más sensibles juntas. Finalmente se analiza el total de histamina equivalente en anchoas, dando un resultado parecido al obtenido con el método estándar.

## 6. Conclusión

Los biosensores enzimáticos electroquímicos son una buena alternativa como dispositivos analíticos dentro de la industria alimentaria. Aunque la legislación todavía no es muy exigente en la frecuencia del control de calidad de esta industria, la preocupación de la sociedad hacia la salud (incluida la alimentaria) hace que se demande cada vez más controles exhaustivos de calidad, seguridad y control de procesos. Los biosensores electroquímicos enzimáticos son sensibles, específicos, rápidos, regenerables y simples, además con posibilidad de miniaturización y automatización. Aunque exista un gran número de publicaciones sobre este campo, su comercialización hasta el momento está siendo limitada. La razón de ello es que tienen un tiempo de vida corto, algunos son caros, presentan interacciones y no detectan diferentes analitos, haciendo que otros métodos analíticos sean en la actualidad los métodos de elección. En este trabajo de revisión bibliográfica se puede observar que se han conseguido grandes avances en este campo. Se están consiguiendo biosensores con un tiempo de vida más largo donde las interferencias son mínimas. También se están desarrollando sistemas multienzimáticos para la detección de diferentes sustratos. Por estos motivos cabe suponer que en un futuro cercano habrá una mayor comercialización de estos biosensores, disminuyendo su coste actual, para su uso en

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

la industria alimentaria, pudiendo llegar a ser el método analítico de elección en esta industria.

Tabla 1. Tabla resumen de los biosensores descritos como revisión bibliográfica

| Enzima | Sistema de inmovilización | Sustrato a determinar | Muestras reales | Electrodo de trabajo | LD | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Acetilcolinesterasa | Crosslinking | Organofosfatos | Leche | Carbono modificado | $1,20x10^{-4}$ mg/ $dL^{-1}$ | 10 |
| Tirosinasa | Adsorción y Crosslinking | Ácido Benzóico | Mayonesa | Carbono vitrificado | 0,5 µM | 7 |
| Sulfito oxidasa | Crosslinking | Sulfitos | Vino | Carbono modificado | 1080 µM | 11 |
| Lacasa | Adsorción y Crosslinking | Polifenoles | Vino | Carbono modificado | 0,01 mg/$dL^{-1}$ | 12 |
| Lacasa y Tirosinasa | Sol-gel | Polifenoles | Vino y Mosto | Carbono modificado | 2 µM | 13 |
| Colesterol oxidasa, colesterol esterasa y Peroxidasa | Atrapamiento | Colesterol | Mantequilla y Margarina | Titanio | 0,5 mg/$dL^{-1}$ | 15 |
| Colesterol oxidasa | Atrapamiento | Colesterol | Huevos, carne y aceite de pescado | Carbono vitrificado | 0,017 µM | 14 |
| Glucosa oxidasa | Atrapamiento | Metales pesados | Agua | Platino | 0,05 µM | 16 |
| Lactato deshidrogenasa | Crosslinking | Mercurio y Niquel | Agua | Oro | $0.5\times10^{-3}$ µM | 17 |
| Diamino oxidasa | Crosslinking | Aminas biógenas | Queso y pescado | Platino | 6 µM | 18 |
| Monoamino oxidasa, Diamino oxidasa y Peroxidasa | Enlaces Covalentes | Aminas biógenas | Pescado | Carbono modificado | 0,18 µM | 19 |

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

# 7. Bibliografía:


1. Víctor González Rumayor, Esther García Iglesias, Olga Ruiz Galán, Lara Gago Cabezas. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Informe de vigilancia tecnológica. 2005.
2. Brian R.Eggins, Chemical Sensors Biosensors (Analytical Techniques in the Sciences). UK: John Wiley & Sons; 2002.
3. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de análisis instrumental 6ª ED. Philadelphia: Saunders College Pub; 2009.
4. Campanella L, Nuccilli A, Tomassetti M, Vecchio S. Biosensor analysis for the kinetic study of polyphenols deterioration during the forced thermal oxidation of extra-virgin olive oil. Talanta. 15 de febrero de 2008;74(5):1287-98
5. Ang LF, Por LY, Yam MF. Development of an Amperometric-Based Glucose Biosensor to Measure the Glucose Content of Fruit. Börnke F, editor. PLOS ONE. 19 of March.2015;10(3):e0111859.
6. Wen G, Zhang Y, Shuang S, Dong C, Choi MMF. Application of a biosensor for monitoring of ethanol. Biosensors and Bioelectronics. agosto de 2007;23(1):121-9.
7. López, M. S.-P. and López-Ruiz, B., Inhibition Biosensor Based on Calcium Phosphate Materials for Detection of Benzoic Acid in Aqueous and Organic Media. Electroanalysis, 2011; 23: 264–271.
8. Andreescu S, Marty J-L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. Biomolecular Engineering. marzo de 2006;23(1):1-15
9. Amine A, Mohammadi H, Bourais I, Palleschi G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. Biosensors and Bioelectronics. Febrero de 2006;21(8):1405-23.
10. Zhang Y, Muench SB, Schulze H, Perz R, Yang B, Schmid RD, et al. Disposable Biosensor Test for Organophosphate and Carbamate Insecticides in Milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry. junio de 2005;53(13):5110-5.
11. Molinero-Abad B, Alonso-Lomillo MA, Domínguez-Renedo O, Arcos-Martínez MJ. Sulfite oxidase biosensors based on tetrathiafulvalene modified screen-printed


Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

carbon electrodes for sulfite determination in wine. Analytica Chimica Acta. febrero de 2014;812:41-4.

12. Di Fusco M, Tortolini C, Deriu D, Mazzei F. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. Talanta. 15 de abril de 2010;81(1-2):235-40.
13. Montereali MR, Seta LD, Vastarella W, Pilloton R. A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. julio de 2010;64(3-4):189-94.
14. Cao S, Zhang L, Chai Y, Yuan R. An integrated sensing system for detection of cholesterol based on TiO2–graphene–Pt–Pd hybridnanocomposites. Biosensors and Bioelectronics. abril de 2013;42:532-8.
15. Ahmadalinezhad A, Chen A. High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol. Biosensors and Bioelectronics. julio de 2011;26(11):4508-13.
16. Guascito MR, Malitesta C, Mazzotta E, Turco A. Inhibitive determination of metal ions by an amperometric glucose oxidase biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical. mayo de 2008;131(2):394-402.
17. Tan I, Erhan E, KaragöZ P, öZkan M. Determination of mercury and nickel by amperometric biosensor prepared with thermostable lactate dehydrogenase. Transactions of Nonferrous Metals Society of China. octubre de 2011;21(10):2332-8.
18. Carelli D, Centonze D, Palermo C, Quinto M, Rotunno T. An interference free amperometric biosensor for the detection of biogenic amines in food products. Biosensors and Bioelectronics. diciembre de 2007;23(5):640-7.
19. Alonso-Lomillo MA, Domínguez-Renedo O, Matos P, Arcos-Martínez MJ. Disposable biosensors for determination of biogenic amines. Analytica Chimical Acta. Abril de 2010;665(1):26-31.
20. Figura biosensor, nts_432.jpg (Imagen JPEG, 460 × 526 píxeles) [Internet].[citado 23 de enero de 2016]. Recuperado a partir de: http://www.inti.gob.ar/noticiero/2015/imagenes/nts_432.jpg

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.