

Título de la Tesis: “Determinación de carbohidratos en jugos de fruta con electrodos enzimáticos”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Ristoff, María Emilia

Director: Dr. Jorge Lozano

Resumen

El objetivo general de la presente tesis fue el diseño y la construcción de un biosensor amperométrico para determinar glucosa en jugos de fruta (utilizando el de manzana como modelo) que sea económico, de fácil construcción y que tenga respuesta rápida. Con tal fin se construyó un electrodo de pasta de carbono que consistió en un cilindro de teflón con un contacto eléctrico de acero inoxidable. Los materiales de la pasta de carbono fueron una mezcla de polvo fino de grafito y parafina, a los cuales se agregó la enzima glucosa oxidasa (GOx) y el ferroceno, como mediador. Se estudiaron diferentes condiciones de operación del biosensor tales como el pH del medio de reacción, el potencial aplicado y la carga de enzima en la pasta de carbono, siendo las condiciones óptimas seleccionadas: medio de reacción (buffer de fosfatos pH 7), potencial de trabajo (0.16 V) y carga enzimática (10%).

Se determinó la actividad enzimática de la enzima tanto libre como luego del proceso de inmovilización, y se estudió la cinética de la enzima en el electrodo, la cual se corresponde con la cinética típica de Michaelis-Menten, siendo los valores de los parámetros cinéticos $k_m = 0.0195 \text{ M}$ e $i_{max} = 35.5 \mu\text{A}$.

A continuación se construyó la curva de calibración cuyo intervalo lineal de concentraciones de glucosa fue de 0.1 mM a 4.48 mM, con una sensibilidad de $0.61 \mu\text{A}/\text{mM}$ y un valor del límite de detección de 0.05 mM, valores completamente aceptables para el biosensor en cuestión. También se evaluaron características del sensor como su tiempo de respuesta, que fue menor a 12 segundos en todos los casos y la repetibilidad y la precisión intermedia dando en ambos casos muy buenos resultados.

Posteriormente se evaluó la estabilidad del sensor bajo diferentes condiciones de almacenamiento con y sin inmersión en la solución buffer y tanto bajo refrigeración como a temperatura ambiente. Todos los resultados fueron altamente satisfactorios y concuerdan con los esperados para el biosensor y más aún teniendo en cuenta la simpleza respecto de los materiales empleados y a la construcción del mismo.

Otro estudio fue la evaluación de las interferencias debidas a sustancias electroquímicamente activas en el jugo de fruta, en este caso de manzana, que puedan afectar a la señal de la glucosa. Como posibles interferentes se estudiaron: ácido ascórbico, sacarosa, fructosa, almidón, ácido málico y ácido cítrico. Sólo el ácido ascórbico fue una sustancia interferente, debiendo eliminarse este compuesto del jugo como paso previo a la determinación de glucosa con el biosensor. Se estudiaron dos técnicas de eliminación: eliminación enzimática del ácido ascórbico y eliminación por oxidación directa con oxígeno del aire ambiente. Ambas técnicas dieron excelentes resultados en la eliminación de este compuesto.

Finalmente se procedió a la determinación de glucosa en muestras reales, para lo cual se emplearon dos jugos de manzana: uno comercial y uno concentrado obtenido directamente de fábrica. Para validar los resultados obtenidos con el biosensor se utilizó un glucómetro digital. En todos los casos los errores en las determinaciones respecto a los valores obtenidos con el glucómetro fueron menores al 4%, lo que indica el muy buen desempeño del biosensor.

Título de la Tesis: “Determinación de carbohidratos en jugos de fruta con electrodos enzimáticos”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Ristoff, María Emilia

Director: Dr. Jorge Lozano

Abstract

The main objective of the present Thesis was the design and construction of an amperometric biosensor to determine glucose in fruit juices (using apple juice as a model), considering this type of bio-electrodes are relatively cheap, simple to develop, set up and run and characterized by a fast response. The used carbon paste electrode consisted in a Teflon cylinder with stainless steel electric contact. Carbon paste was a mixture of graphite in fine powder and liquid paraffin, to which the enzyme glucose oxidase (GOx) and ferrocene as mediator was added. Several operation conditions were studied such as reaction medium pH, working potential and enzymatic load in the carbon paste, being the optimal conditions selected phosphate buffer (pH 7) as reaction medium, a working potential of 0.16 V, and 10% enzymatic load.

Enzymatic activity of both free enzyme and enzyme after the immobilization process was determined. Furthermore the kinetic of the enzyme in the electrode was studied, and the result shows that it follows a typical Michaelis-Menten kinetic, with $k_m = 0.0195$ M and $i_{max} = 35.5$ μ A.

The calibration curve shown that the linear range of glucose concentration was in the range 0.1 mM to 4.48 mM, with a sensitivity of 0.61 μ A/mM and a detection limit of 0.05 mM. These values are completely acceptable for this kind of biosensor. Sensor characteristics, including response time (<12 sec. in all cases), intermediate precision and repeatability were evaluated.

Stability of the sensor under different storage conditions was also evaluated. Results were highly satisfactory and consistent, considering used materials and simplicity of construction. Interferences from electrochemically-active substances in apple juice, which may affect glucose signal, were carefully considered. The possible studied interfering substances were: ascorbic acid, sucrose, fructose, starch, malic acid and citric acid. Only the ascorbic acid was observed to be an interfering substance, which must be removed from juice previously to the determination of glucose with the biosensor. Two removal techniques for ascorbic acid were assayed: enzymatic removal and elimination by direct oxidation with air. Both techniques showed to be appropriate for ascorbic acid elimination.

Finally, the determination of glucose in real samples was carried out, using two apple juices samples, a ready to drink commercial one, and a concentrated juice directly obtained from a factory. To validate the results obtained with the biosensor a digital glucometer was used. In all cases the errors in the determinations were lower than 4%, demonstrating the very good performance of the biosensor.