



UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EN VINO POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS



Autor: Eva Adrián Serrano

Tutoras académicas: M^a. Julia Arcos Martínez

Isabel Escudero Barbero

Abril 2017

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	2
3.- OBJETIVOS.....	4
4.- PARTE EXPERIMENTAL.....	4
4.1.- Reactivos.....	4
4.2.- Aparatos y software	5
4.3.- Producción de electrodos serigrafiados utilizados	5
4.4.- Modificación de los electrodos.....	5
4.5.- Procedimiento experimental	6
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
5.1.- Experiencias en electrodo desnudo	6
5.2.- Experiencias en electrodo modificado con Pt	8
5.3.- Experiencias en electrodo modificado con CS y Pt.....	10
5.4.- Experiencias en electrodo modificado con Cu-MOF, CS y Pt	12
5.5.- Análisis de interferentes	15
5.6.- Análisis de muestras de vino	17
6.- CONCLUSIONS.....	18
7.- BIBLIOGRAFÍA	19

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

1.- INTRODUCCIÓN

La determinación del ácido láctico (AL) es importante en muchas áreas de actividad de la sociedad actual tales como en la industria alimentaria, la industria farmacéutica, la cosmética o en la medicina clínica o deportiva.

En el campo de la cosmética el AL se utiliza como una alternativa al uso de la glicerina como suavizante. Además, se usa como compuesto principal de numerosas cremas, debido a que tiene propiedades que inciden favorablemente en la mejora de la textura alisando las durezas, y suavizando la piel. También reduce el daño producido por la luz solar y ha demostrado una notable eficacia en la eliminación de verrugas.

El AL es un metabolito habitualmente presente en líquidos biológicos como la saliva, el sudor o la sangre. Un alto nivel de AL en sangre está relacionado frecuentemente con un intenso ejercicio físico y puede provocar alteraciones tales como fatiga crónica y fibromialgia. Por esta razón, en la medicina clínica se controlan los altos niveles de lactato porque pueden llegar a producir insuficiencia respiratoria, shocks y desordenes metabólicos. Así, en este campo, es útil el control del lactato en sangre lo que permite detectar el estado físico de los atletas, sus tejidos dañados o trombosis [1].

En la industria alimentaria la determinación de AL es importante ya que está presente en muchos productos lácteos como el yogur o la mantequilla, y también se encuentra en bebidas y otros alimentos que han sufrido fermentación. En el yogur las bacterias *Lactobacillus* y *Streptococcus* producen la fermentación de la lactosa, siendo la lactosa el principal azúcar que se encuentra de manera natural en la leche. El AL producido hace que se coagule la leche dando lugar al producto final, reduce el pH por lo que favorece a su conservación y además actúa como saborizante. También el AL juega un papel importante en la industria de las verduras encurtidas. Bacterias beneficiosas como el *Lactobacillus* realizan la fermentación de los carbohidratos dando lugar al AL sin la presencia de oxígeno, esto da lugar a una elevada acidez lo que inhibe el crecimiento de otras bacterias que provocan que el producto se estropee.

El vino es una bebida, elaborada a partir de la fermentación de la uva, que siempre ha formado parte de la dieta mediterránea [2]. Numerosos estudios afirman que un consumo moderado de vino favorece la digestión y la circulación, previene contra el cáncer y contra enfermedades cardíacas, evita el envejecimiento de las células y contribuye al control del colesterol [3]. Particularmente dentro del sector alimentario, en la industria del vino, el AL desempeña una función clave en el proceso de vinificación que tiene lugar en las bodegas.

Es conocido que el ácido málico se descompone durante la fermentación maloláctica dando lugar a CO₂ y al AL, que consecuentemente va aumentando en concentración en el vino. El control de esta transformación es importante ya que el AL, influye decisivamente en las cualidades organolépticas del vino contribuyendo a disminuir su acidez, y a dar sensación y suavidad en boca, es decir, mejora el cuerpo y persistencia del sabor [4]. Además esta transformación contribuye a la estabilidad microbiológica del producto final [5].

Este trabajo de fin de carrera se centra en la determinación de la concentración del AL en vino utilizando técnicas electroquímicas. Concretamente se describe la puesta a punto y las características de un biosensor enzimático amperométrico desechable, basado en la inmovilización de la enzima lactato oxidasa (LOx) en la superficie de un electrodo serigrafado, que permite la cuantificación de AL de forma sensible y selectiva en varios tipos de vinos.

2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En la bibliografía se hallan referenciados diversos métodos analíticos que se han utilizado para el análisis de AL. Entre ellos se pueden encontrar métodos colorimétricos, colorimétrico-enzimáticos, enzimáticos-espectrofotométricos, de microensayo, fluorimétricos-enzimáticos, electroquímicos y cromatográficos [6].

Entre los métodos más empleados cabe señalar aquellos basados en la utilización de técnicas cromatográficas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de exclusión iónica. Monosík y colaboradores, llevaron a cabo la determinación de diversos ácidos orgánicos entre ellos el AL mediante HPLC, realizando una filtración previa de las muestras e identificaron los ácidos orgánicos comparando los tiempos de retención con medidas de muestras patrón [7].

Por otro lado, Barket et al, describieron un método colorimétrico donde el AL es convertido a acetaldehído mediante un tratamiento con ácido sulfúrico. Después el acetaldehído fue determinado mediante una reacción colorimétrica con p-hidroxifenil en presencia de iones cúpricos. Finalmente, calcularon la concentración de AL midiendo la absorbancia del compuesto obtenido de color azul a una longitud de onda de 560 nm [6].

Marbach y Weil pusieron a punto un método espectrofotométrico enzimático, donde el lactato es oxidado a ácido pirúvico mediante la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NAD^+ que se reduce hasta NADH. El NADH se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm, siendo el valor de la absorbancia obtenida directamente proporcional a la concentración de lactato [6].

Monosík y su grupo de investigación, desarrollaron otro ensayo espectrofotométrico enzimático, que se basa en la oxidación de L-lactato a piruvato, originando también peróxido de hidrógeno, y para el que utilizan la enzima LOx. El peróxido de hidrógeno se hace reaccionar con un sustrato, la o-dianisidina, en presencia de una peroxidasa formando un producto coloreado. La o-dianisidina oxidada reacciona con ácido sulfúrico, formando a su vez un producto de color rosa estable que se mide con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm [7].

Los métodos descritos anteriormente son en general caros, laboriosos, no específicos, y requieren a un equipo experimentado y educado en la materia [6].

Las técnicas electroquímicas son una alternativa de bajo coste a muchas de estas técnicas, capaces de detectar pequeñas concentraciones de analitos de forma rápida y específica, sin necesidad de hacer un pretratamiento de la muestra. Uno de los problemas habituales que tienen lugar cuando se emplean técnicas electroquímicas es la mala reproducibilidad de las mismas cuando se utilizan electrodos convencionales. Por esta razón la sustitución de éstos por sistemas electródicos serigrafados (SPE) ha incrementado la calidad de las determinaciones por medio de técnicas electroquímicas y han sido ampliamente utilizados en la última década para la construcción de sensores electroquímicos.

Un sensor es un dispositivo que permite la transformación de la información química o física en una señal que pueda ser procesada y que facilite obtener la información de interés de forma simple y rápida [8]. La utilización de un sistema electródico serigrafado como transductor en un sensor electroquímico, presenta muchas ventajas. Además de posibilitar trabajar *in situ*, tienen pequeño tamaño son desechables y requieren un pequeño volumen de muestra para el análisis [4], [9], [10].

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

Entre las técnicas electroquímicas, la amperometría es una de las más frecuentemente empleadas en el análisis cuantitativo de analitos. Esta técnica consiste en la medida de la intensidad de corriente generada en el proceso redox de sustancias electroactivas que se desarrolla en el seno de una celda electroquímica donde se introduce un sistema electródico cuando se establece una diferencia de potencial apropiado entre ellos [9].

En una experiencia amperométrica se utiliza habitualmente un sistema de tres electrodos serigrafiados (SPEs), compuesto por un electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE), un electrodo de trabajo (WE) y un electrodo de referencia (RE).

Sobre el electrodo de trabajo es donde se llevará a cabo la reacción de interés, es decir, la reacción que va a ser objeto de estudio. Este electrodo puede ser de numerosos materiales como carbono, platino, plata, oro, etc. dependiendo de las necesidades del sistema. Por su parte, el electrodo de referencia debe tener un potencial constante, lo que permite conocer el potencial al que va a ocurrir la reacción de oxidación-reducción estudiada. La corriente fluye entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, mientras que se bloquea el flujo de corriente entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, controlando de esta manera el potencial del electrodo de trabajo. El contraelectrodo puede ser cualquiera que sea conveniente y que sus características electroquímicas no afecten al comportamiento del electrodo de trabajo; es decir, se debe evitar que se generen subproductos debidos a reacciones acopladas por electrolisis, que puedan llegar a alcanzar la superficie del electrodo de trabajo y produzcan interferencias. En definitiva el contraelectrodo es el encargado de cerrar el circuito y el electrodo de referencia por su parte, es el encargado de mantener la estabilidad de potencial, de manera que el potencial aplicado permanezca constante [9], [11].

El electrodo de trabajo se puede modificar con diversos biocomponentes como enzimas, anticuerpos, proteínas, etc, y cuando esto sucede el sensor pasa a denominarse biosensor. Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) se define biosensor como un sensor químico y específico, el cual lleva asociado un elemento de reconocimiento biológico asociado a un sistema de transducción físico-químico, el cual permite procesar la señal producida por la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento. El elemento biológico debe ser capaz de reconocer de forma específica el analito presente en la disolución [12].

Los electrodos serigrafiados ofrecen ciertas ventajas respecto a los electrodos convencionales en cuanto a la modificación de los mismos, puesto que, el biocomponente puede añadirse directamente a la pasta de impresión durante la fabricación del electrodo de trabajo o puede ser fijado posteriormente a la superficie del mismo mediante algún proceso de inmovilización como adsorción, entrecruzamiento, enlace covalente, etc [13].

La determinación de AL por medio de un biosensor electroquímico utilizando electrodos serigrafiados ha sido abordada ya por varios autores. Pérez et al, desarrolló un biosensor amperométrico incorporando dos enzimas: LOx y Horseradishperoxidasa (HRP), en una membrana de nanotubos/polisulfona de carbono. Con el fin de mejorar la sensibilidad de sus electrodos, depositaron ferroceno como mediador de la reacción redox. Monosik desarrolló otro biosensor para la determinación de AL en muestras reales de comida y bebida basado en un electrodo de oro modificado con una película de nanotubos de carbono sobre la que se inmovilizan LOx y peroxidasa con CS [4] [6] [7] [13] [15].

3.- OBJETIVOS

El principal objetivo de este Trabajo de Fin de Carrera es poner a punto un método electroquímico que permita el análisis de AL en muestras de vino de forma económica, selectiva y sensible. La consecución de este objetivo principal implicará alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un biosensor enzimático, utilizando un sistema serigrafiado de tres electrodos.
2. Caracterizar el biosensor determinando su reproducibilidad, repetividad, intervalo de calibrado y límite de detección.
3. Identificar los interferentes en la determinación de AL.
4. Determinar el contenido de AL de diferentes muestras de vinos tintos, rosados y blancos.
5. Validar el biosensor utilizando otra técnica de análisis de referencia como la cromatografía de líquidos (HPLC).

4.- PARTE EXPERIMENTAL

4.1.- Reactivos

La enzima LO_x procedente de *pediococcus sp.* (E.C.1.1.3.2.), en polvo liofilizado (28 unidades/mg), Quitosano (CS), Glutaraldehído (GA), Seroalbúmina Bovina (BSA), ácido tereftálico (1,4-H₂BDC), trietilediamina (TED)(C₆H₁₂N₂), ácido L-málico (C₄H₆O₅), ácido gálico (C₇H₆O₅), resveratrol y N,N-dimetilformamida (DMF)(C₃H₇NO), fueron comprados a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

El hexacloroplatinato (IV) de potasio (K₂PtCl₆), ácido ascórbico (C₆H₈O₆), fosfato de sodio dibásico dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O), fosfato de sodio monobásico dihidratado (NaH₂PO₄·2H₂O), etanol y nitrato de cobre trihidratado (Cu(NO₃)₂·3H₂O) se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

A Panreac-Appllichem (Darmstadt, Alemania) se compraron los ácidos láctico (85%) (C₃H₆O₃), succínico (C₄H₆O₄), cítrico anhidro (C₆H₈O₇) así como el cloruro de sodio (NaCl).

La (D)(+)-Glucosa monohidratada (C₆H₁₂O₆·H₂O) se adquirió en Fluka (Bucarest, Rumania). Quercetina (C₂₁H₁₈O₁₃) de Extrasynthese (Genay, Francia). El ácido acético (CH₃COOH) usado fue de VWR (Francia).

La red metálica de cobre (Cu-MOF) fue sintetizada según el método descrito en bibliografía [16] [17].

Todos los reactivos y disoluciones fueron preparados con agua desionizada Milli Q (Millipore, Bedford, USA).

4.2.- Aparatos y software

Las medidas amperométricas fueron realizadas usando un μ Stat 200 bipotenciostato de DropSens (Oviedo, España). La adquisición de datos se realizó utilizando el programa DropView para registrar y analizar resultados.

4.3.- Producción de electrodos serigrafiados utilizados

El sistema SPE utilizado se compone de tres electrodos: un electrodo auxiliar y un electrodo de trabajo ambos de carbono y una pseudoreferencia de Ag/AgCl. Dichos electrodos han sido impresos por el grupo de investigación de la Universidad de Burgos, usando una impresora DEK 248 (DEK, Weymouth, Reino Unido), con pantallas de poliéster con los patrones de las distintas partes del sensor. Sobre soportes de PVC se imprimen, con la ayuda de las pantallas correspondientes, los distintos electrodos utilizando diferentes tintas:

- Electrodag 418 de plata para las vías.
- Electrodag PF-407 de carbono para los electrodos de trabajo y auxiliar.
- Electrodag 6037 SS para el electrodo de referencia.
- Electrodag 452 SS de tinta dieléctrica como aislante.

Después de cada impresión el sistema electródico se somete a un periodo de curado, en estufa a una temperatura y tiempo determinado en cada caso para fijar las distintas tintas.

4.4.- Modificación de los electrodos

Una vez obtenidos el sistema electródico se procede a la modificación del electrodo de trabajo de carbono utilizando varios componentes que se van depositando en sucesivas etapas.

1. Depósito electroquímico de platino (Pt) sobre SPCE (Pt/SPCE)

Para realizar el recubrimiento homogéneo de Pt sobre el electrodo de trabajo de carbono, se depositó una gota de 200 μ L de solución de platino (K_2PtCl_6 0.001 M en KCl 0.1 M) sobre la superficie electródica y se realizaron 10 ciclos voltamperométricos entre 0.50 V y -0.70 V a una velocidad de barrido de 0.002 V/s. [18].

2. Depósito electroquímico de CS sobre SPCE (CS/Pt/SPCE)

Sobre el electrodo modificado con Pt se depositaron 2 μ L de disolución de CS (0.6% (p/v) en ácido acético al 0.5%).

3. Inmovilización de la enzima (LOx-Cu-MOF/CS/Pt/SPCE)

Una vez que se secó el electrodo a temperatura ambiente se inmovilizó la enzima, usando una solución que contiene 3 μ L de LOx, 3 μ L de Cu-MOF, 0.56 μ L de BSA y 0.56 μ L de GA. En cada electrodo de trabajo se depositaron 1.19 μ L de la disolución descrita anteriormente y se dejó secar a una temperatura de 4°C durante una hora.

4.5.- Procedimiento experimental

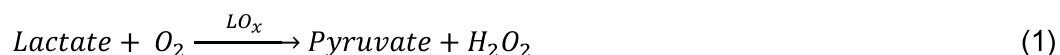
Las medidas amperométricas se llevaron a cabo a temperatura ambiente, utilizando una celda electroquímica conteniendo 4.5 mL de tampón fosfato (PO_4^{3-}) 0.1 M de pH= 7. Se aplicó un potencial, inicialmente de 0.60 V vs Ag/AgCl SPE, y se dejó estabilizar la corriente. Una vez alcanzada una intensidad constante, se fueron añadiendo sucesivas concentraciones conocidas de AL, registrándose el aumento de corriente y construyendo a continuación los calibrados, representando los sucesivos valores de los incrementos de intensidad encontrados frente a las concentraciones obtenidas en las sucesivas adiciones.

El procedimiento experimental fue posteriormente optimizado y mejorado, bajando el potencial aplicado a 0.15 V vs Ag/AgCl SPE para detectar el AL evitando las interferencias.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que el AL contiene en su estructura grupos funcionales susceptibles de sufrir reacciones Redox, en este trabajo, se ha puesto a punto un método para su determinación, basado en la oxidación electroquímica de la molécula utilizando una amperometría a potencial constante.

Aunque el AL es una molécula potencialmente electroactiva, no es posible visualizar ninguna reacción electroquímica directamente en electrodos de carbono serigrafiados (SPCE), ya que necesita un elevado potencial de trabajo para que se lleven a cabo. Por esta razón, y con el fin de poder observar un proceso electroquímico se ha modificado el electrodo de trabajo con la enzima LOx. Esta enzima ejerce una acción catalítica sobre la oxidación del láctico a piruvato de acuerdo con la reacción (1):



El agua oxigenada generada en esta reacción se oxida en el electrodo hasta oxígeno, según la reacción (2), dando lugar a una intensidad de corriente que es proporcional a la concentración de AL presente y que por tanto puede utilizarse para su determinación.



5.1.- Experiencias en electrodo desnudo (LOx/SPCE)

Las primeras experiencias realizadas se llevaron a cabo en SPCE, sobre los que se inmovilizó la enzima. En la figura 1 se muestra un amperograma obtenido con un

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

biosensor fabricado utilizando un electrodo de carbono desnudo sobre el que se inmovilizó, la enzima LOx, previamente al análisis de AL.

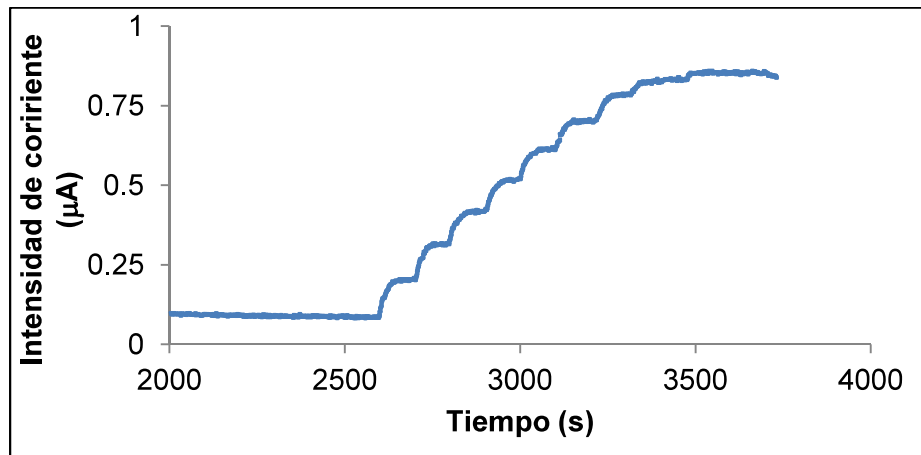


Figura 1. Amperograma obtenido utilizando LOx/SPCE en una disolución de tampón PO_4^{3-} pH=7, mediante sucesivas adiciones de AL. $E=0.60$ V vs Ag/AgCl SPCE.

Una vez puesto a punto el biosensor, se procedió a la caracterización del mismo determinando su precisión y su rango de calibración.

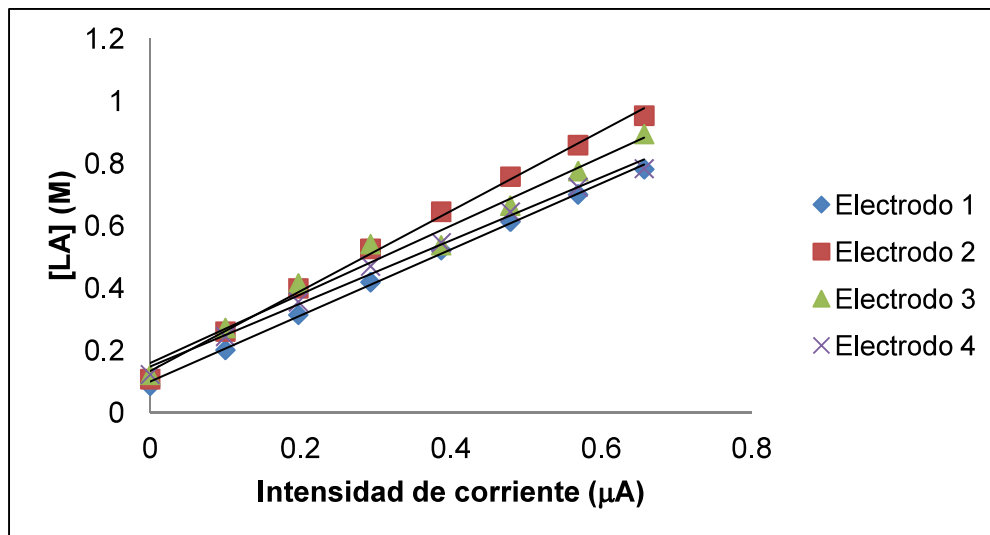


Figura 2. Rectas de calibrado de AL, obtenidas utilizando diferentes electrodos LOx/SPCE.

La precisión del dispositivo desarrollado se determinó analizando la reproducibilidad del mismo. Para ello se realizaron calibrados añadiendo en la celda electroquímica concentraciones conocidas de AL desde 1µM a 1mM y midiendo la intensidad de corriente (µA) a un potencial de 0.60 V vs Ag/AgCl SPCE. La reproducibilidad se calculó en términos de desviación estándar relativa (RSD) de las pendientes de las rectas de calibrado. En la Figura 2 se muestran las rectas de calibrado, en las que se

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

representa la intensidad de corriente (μA) frente a la concentración de AL (M), obtenidas utilizando cuatro LOx/SPCE diferentes.

Tabla 1. *Parámetros de calibración de las medidas amperométricas de AL utilizando LOx/SPCE.*

Biosensor				LOx/SPCE
Potencial aplicado (vs Ag/AgCl SPCE)				+ 0.60 V
Ecuación calibrado	Rectas de	R^2	Sensibilidad ($\mu\text{A}/\text{mM}$) (media de las pendientes)	RSD (%) (n=4)
1.0617x + 0.0995		0.9983	1.1142 (± 0.1353)	10.70
1.2831x + 0.1342		0.9968		
1.1002x + 0.1597		0.9792		
1.0119x + 0.1478		0.9936		

Los resultados que se muestran en la tabla 1 nos informan que la RSD no es muy buena, ya que es superior a 10%. Además el biosensor desarrollado requiere el uso de un potencial muy alto, 0.6 V vs Ag/AgCl SPCE, lo cual redundaría negativamente en el método para el análisis de muestras de vino, ya que posibilita que numerosas especies presentes en la muestra actúen como interferentes en el análisis de AL.

5.2.- Experiencias en electrodo modificado con Pt (LOx/Pt/SPCE)

Con el fin de mejorar la reproducibilidad y las prestaciones del biosensor desarrollado en el apartado anterior, se procedió a la modificación del electrodo de trabajo.

Dado que es conocido que el Pt es una superficie muy catalítica para la descarga electroquímica del agua oxigenada, la segunda experiencia llevada a cabo se realizó modificando los SPCE con Pt, en una etapa previa a la inmovilización de la enzima LOx. El Pt facilita la oxidación de peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente y permite observar el proceso de oxidación del agua oxigenada trabajando a potenciales más bajos. Concretamente el proceso puede ser observado disminuyendo el potencial desde 0.6 V vs Ag/AgCl a 0.15 V vs Ag/AgCl, de forma que la respuesta de la señal electroquímica incrementa su efectividad y sensibilidad ya que evita que otras especies presentes en la disolución puedan actuar como interferentes en el análisis de AL.

La modificación del SPCE con Pt (*Pt/SPCE*) se llevó a cabo de dos formas diferentes: depositando nanopartículas de Pt en la superficie del electrodo o bien cubriendo ésta con una película de Pt. La figura 3 muestra los amperogramas obtenidos por medio de las dos diferentes modificaciones del SPCE con Pt. Se puede observar que la intensidad de corriente es mayor en la medida amperométrica realizada con un electrodo de carbono en el que se ha depositado una película de Pt previa a la

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

deposición de la enzima LOx, frente a la medida amperométrica del electrodo en el que se han depositado únicamente nanopartículas de Pt.

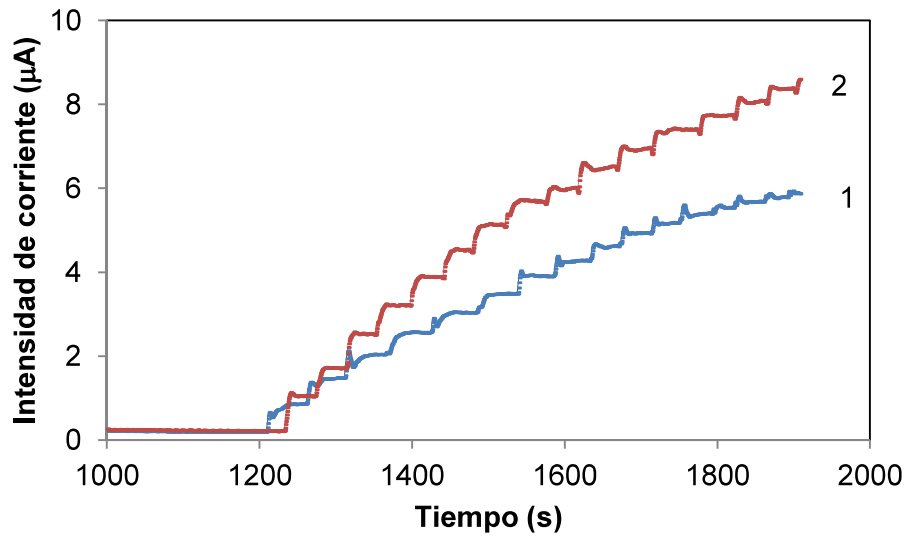


Figura 3. Amperogramas obtenidos en LOx/Pt/SPCE en una disolución tampón PO_4^{3-} pH=7 mediante sucesivas adiciones de AL. $E=0.15$ V vs Ag/AgCl SPCE. Electrodo de carbono modificado con nanopartículas de Pt (1) y con película de Pt (2).

Puesto que los electrodos modificados con película de Pt proporcionan una mayor intensidad de corriente al añadir el AL, se procedió a realizar calibrados de las medidas amperométricas con los electrodos modificados de esta manera. Las rectas de calibrado obtenidas se muestran en la figura 4.

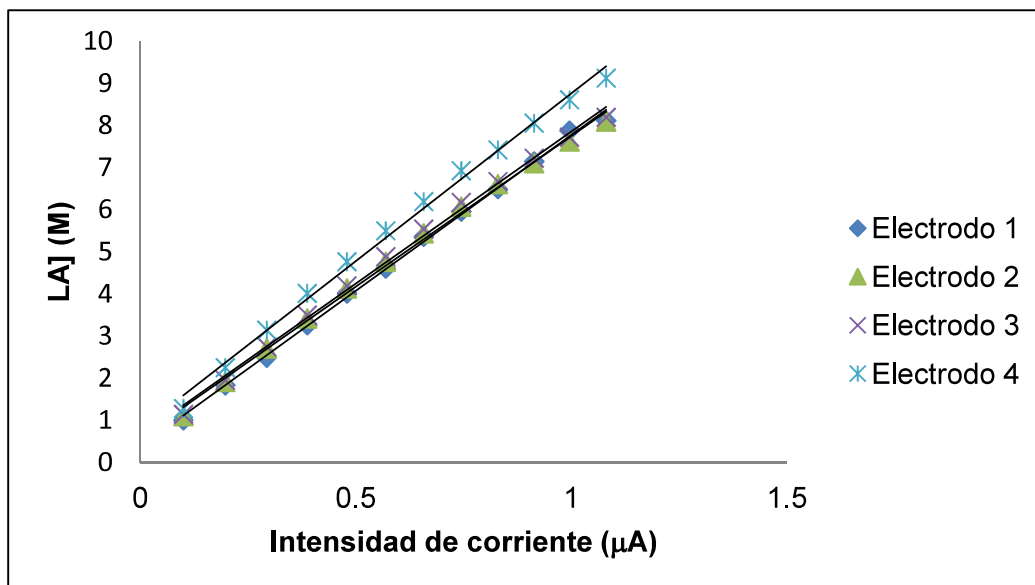


Figura 4. Rectas de calibrado de AL, obtenidas utilizando diferentes electrodos LOx/Pt/SPCE.

Los parámetros de los calibrados efectuados utilizando cuatro electrodos diferentes (LOx/Pt/SPCE) se muestran en la tabla 2. Se observa que la RSD ha disminuido de un 10.70 % a un 4.64 %, por lo que se puede concluir que la reproducibilidad ha mejorado muy notablemente únicamente con la deposición en capa de Pt en el electrodo de

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

trabajo. Además la intensidad de corriente al añadir AL aumenta en mayor medida que en el electrodo desnudo.

Tabla 2. *Parámetros de calibración de las medidas amperométricas de AL utilizando LOx/Pt/SPCE.*

Biosensor			LOx/Pt/SPCE	
Potencial aplicado (vs Ag/AgCl SPCE)			+ 0.15 V	
Ecuación calibrado	Rectas de	R ²	Sensibilidad (μA/mM) (media de laspendientes)	RSD (%) (n=4)
7.4053x + 0.3817		0.9979	7.4281 (±0.3445)	4.64
7.1577x + 0.6005		0.9967		
7.2291x + 0.6371		0.9964		
7.9737x + 0.7997		0.9953		

5.3.- Experiencias en electrodo modificado con CS y Pt (LOx/CS/Pt/SPCE)

Uno de los problemas habituales cuando se trabaja con enzimas es su tendencia a la desnaturalización si no están en el medio adecuado, por eso la correcta inmovilización de LOx y su adecuado almacenamiento utilizando una temperatura y humedad óptimas juegan un papel importante.

El CS es un polisacárido biocompatible que tiene una gran capacidad de formación de películas. Además tiene una alta resistencia mecánica y presenta una gran permeabilidad. Por todas estas características el CS ha sido frecuentemente usado para la inmovilización de enzimas y la construcción de biosensores electroquímicos enzimáticos [17].

La capa de CS proporciona a la enzima una mayor estabilidad en el tiempo, lo que es importante a la hora de la utilización de estos métodos electroquímicos en muestras reales, su producción en masa, así como su comercialización. Los grupos hidroxilo y amino presentes en el CS proporcionan un entorno hidrófilo compatible con la enzima (LOx), aumentando a la vez la sensibilidad [7]. Por esta razón, una vez vista la mejora de sensibilidad en la respuesta electroquímica con la modificación del electrodo con Pt, se depositó CS con el fin de mejorar la estabilidad y el tiempo de vida del biosensor.

En la figura 5 se muestra el amperograma obtenido con un biosensor en el que el electrodo de trabajo se ha modificado con CS (LOx/CS/Pt/SPCE). Además de que el CS proporciona una mayor estabilidad en el tiempo a la enzima depositada sobre el electrodo, los saltos de intensidad de corriente detectados al medir el AL son mayores.

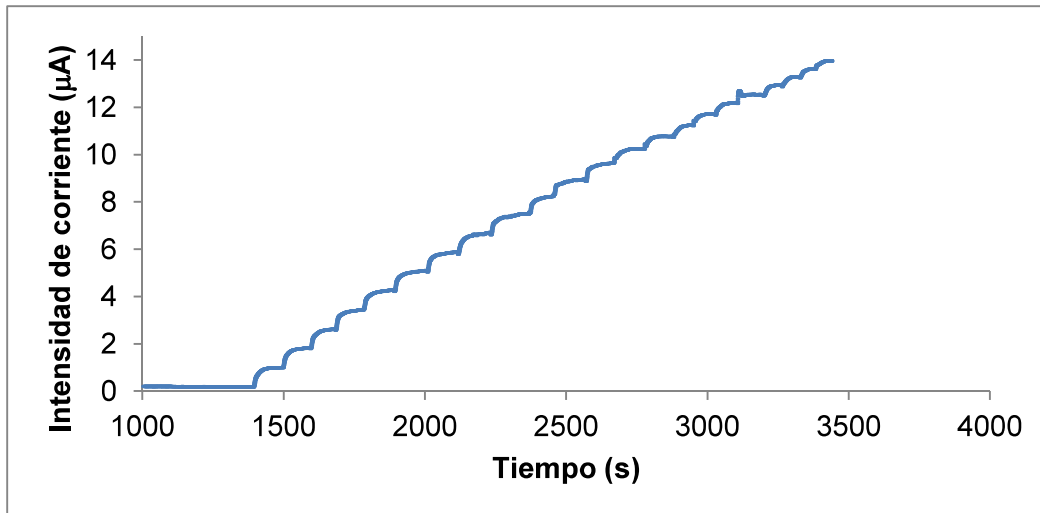


Figura 5. Amperograma obtenido en LOx/CS/Pt/SPCE en una disolución tampón PO_4^{3-} pH=7 mediante sucesivas adiciones de AL. $E=0.15$ V vs Ag/AgCl SPCE.

A continuación se muestran, en la figura 6, las rectas de calibrados de cinco electrodos de carbono modificados con capa Pt y CS (LOx/CS/Pt/SPCE). Como se puede observar en la tabla 3, el coeficiente de regresión lineal es bueno en las cinco rectas obtenidas.

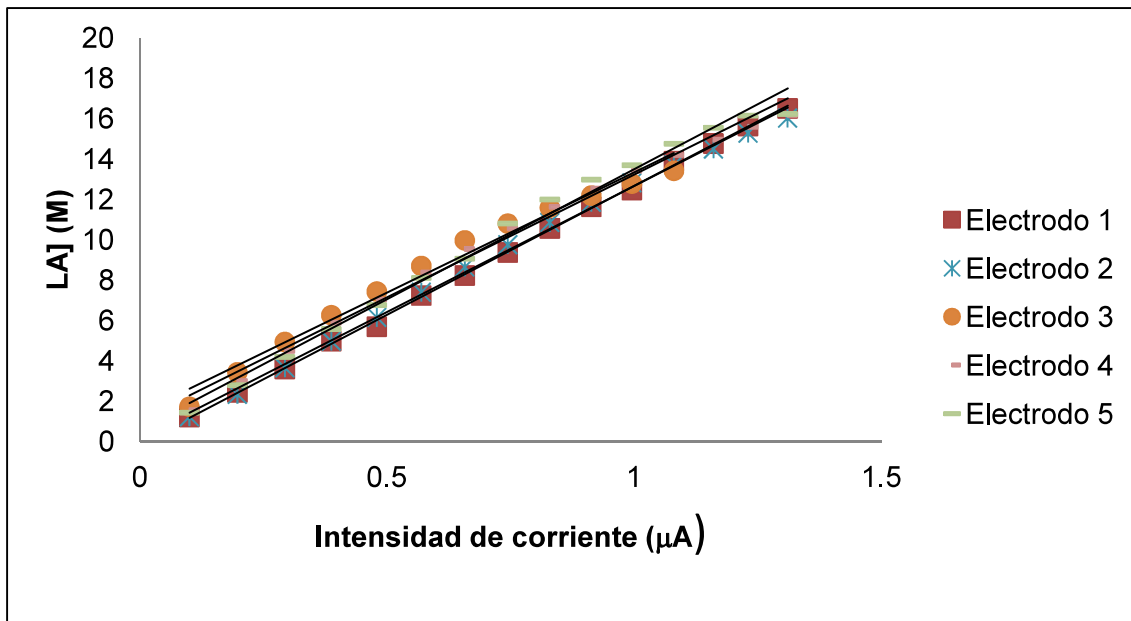


Figura 6. Rectas de calibrado de AL, obtenidas utilizando diferentes electrodos LOx/CS/Pt/SPCE.

Con los valores de las pendientes de las cinco rectas se calculó la reproducibilidad en términos de RSD, que se muestra en la tabla 3. Con estos valores obtenidos se caracterizó y validó el biosensor, de forma que las mejoras al añadir el CS quedaron patentadas. El valor de RSD obtenida con las rectas de calibrado de los electrodos LOx/Pt/SPCE, 4.64%, es mayor comparado con el obtenido con las rectas de calibrado de las medidas amperométricas de los electrodos LOx/CS/Pt/SPCE, 2.98%. Con lo que se puede concluir que cada una de las modificaciones realizadas sobre el electrodo de carbono han aumentado la sensibilidad y la reproducibilidad del método de análisis, mejorándolo considerablemente.

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

Tabla 3. Caracterización del biosensor para la medida de AL. basado en LOx/CS/Pt/SPCE

Biosensor		LOx/CS/Pt/SPCE	
Potencial aplicado (vs Ag/AgCl SPCE)		+ 0.15 V	
Ecuación Rectas de calibrado	R^2	Sensibilidad ($\mu\text{A}/\text{mM}$) (media de las pendiente)	RSD (%) (n=5)
12.786x – 0.1028	0.9993	12.3806(\pm 0.3692)	2.98
12.49x + 0.1818	0.9972		
11.917x + 1.4221	0.9805		
12.161x + 1.0739	0.9914		
12.889x + 0.6132	0.9902		

5.4.- Experiencias en electrodo modificado con Cu-MOF, CS y Pt (LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCE)

Los materiales conocidos como MOF (marco metal-orgánico) han sido estudiados en profundidad en los últimos años debido a sus características, ya que se unen a diversos metales y tienen un área superficial grande. Por estas características se han utilizado en diversas técnicas experimentales y en la construcción de biosensores enzimáticos electroquímicos. Al aprovechar las propiedades extraordinarias del MOF junto con la actividad biocatalítica de las enzimas, se pueden producir biosensores con un alto rendimiento.

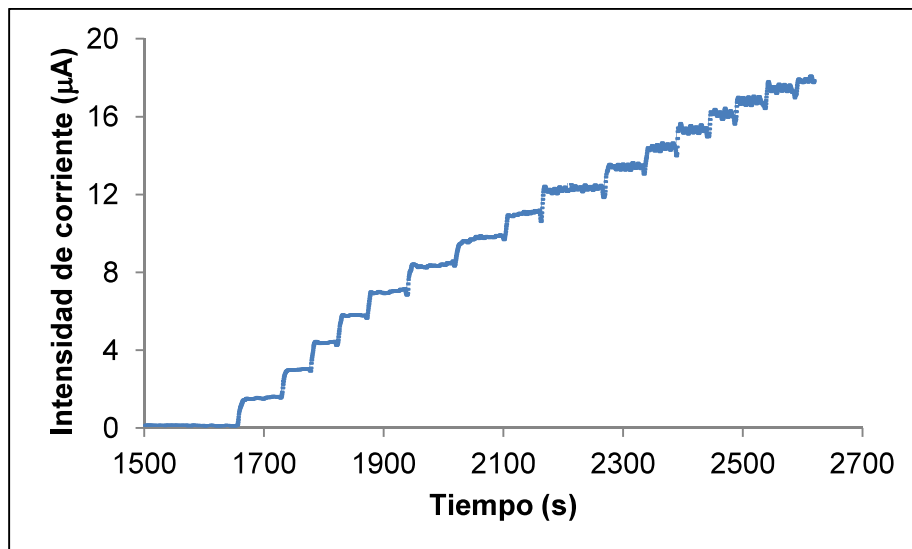


Figura 7. Amperograma con LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCE en una disolución de tampón PO_4^{3-} pH=7 mediante la adición de concentraciones conocidas de AL sucesivamente. $E=0.15$ V vs Ag/AgCl SPCE.

En este caso, la deposición de Cu-MOF sobre el electrodo favorece el proceso de inmovilización de la enzima en el electrodo, ya que ayuda a su estabilización a la vez

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

que aumenta notablemente la sensibilidad en la determinación de AL y mejora la velocidad de respuesta, consiguiendo una respuesta rápida y un bajo límite de detección [17].

En la figura 7 se muestra el amperograma obtenido utilizando un biosensor, en el que el electrodo de trabajo se ha modificado también con Cu-MOF (LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCE). Los saltos de intensidad de corriente observados son mucho más altos, llegando a unos valores mayores añadiendo las mismas concentraciones conocidas de AL respecto a los amperogramas mostrados anteriormente.

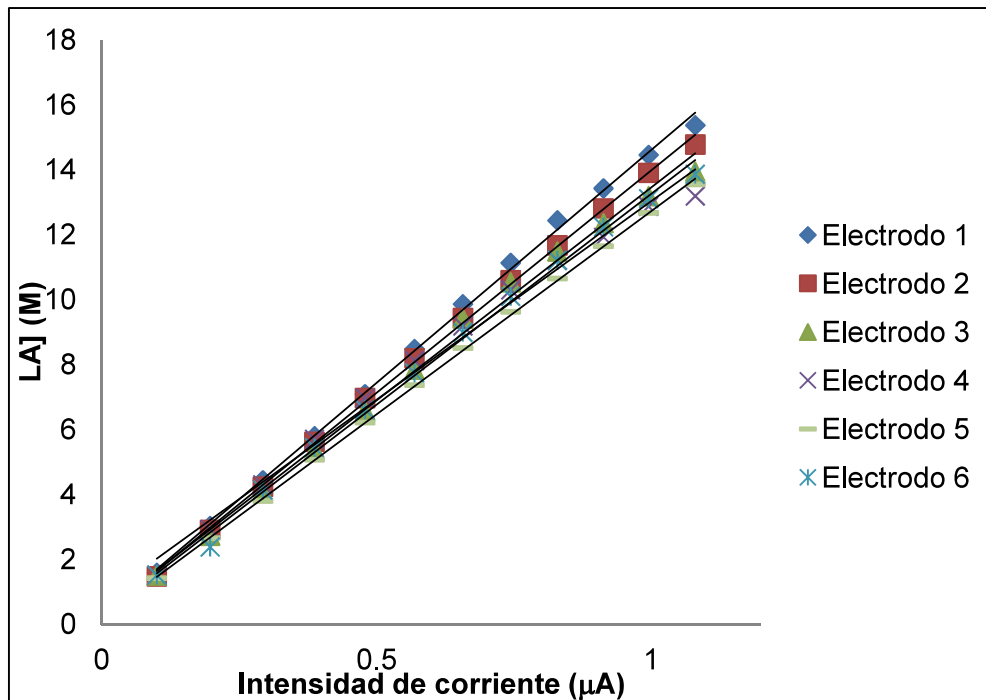


Figura 8. Calibrados de AL, utilizando seis biosensores basados en la utilización LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCE.

Con las pendientes obtenidas de las rectas de calibrado que se muestran en la figura 8, se calculó la RSD para verificar que el método de análisis sigue siendo reproducible, mostrándose los parámetros de caracterización del biosensor en la tabla 4. También se calculó su límite de detección (LOD), definido como la concentración correspondiente a cuatro veces la desviación estándar ($s_{x/y}$) del blanco dividida por la media de la pendiente (b) de la recta de calibrado correspondiente [19] [20] ($LOD=4s_{x/y}/b$).

A pesar de que la RSD obtenida con el biosensor modificado con Cu-MoF (5.91%) es mayor al obtenido con el electrodo LOx/CS/Pt/SPCE (2.98%); la reproducibilidad del método sigue siendo válida, ya que es menor al 10% y se ha conseguido aumentar la sensibilidad del biosensor notablemente. Además esta última modificación ofrece otra ventaja ya que mediante la incorporación de Cu-MOF, se consigue una ganancia en la estabilidad de los electrodos modificados lo que conlleva una mayor vida longevidad y conservación de estos biosensores en el tiempo

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

Tabla 4. Parámetros de caracterización del biosensor basado en la utilización de LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCE, para la determinación de AL.

Biosensor			LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCE	
Potencial aplicado (vs Ag/AgCl SPCE)			+ 0.15 V	
Ecuación Rectas de calibrado	R^2	Sensibilidad ($\mu\text{A}/\text{mM}$) (media de las pendientes)	RSD (%) (n=6)	Límite de detección (LOD) (mM)
14.349x + 0.2632	0.9986	13.1145(\pm 0.299)	5.91	0.12
13.699x + 0.2818	0.9990			
13.117x + 0.3397	0.9953			
12.235x + 0.7981	0.9904			
12.518x + 0.2089	0.9996			
12.993x + 0.2702	0.9971			

En la figura 9 se muestran en conjunto los amperogramas obtenidos utilizando los diferentes electrodos, donde queda patente la mayor sensibilidad alcanzada al modificar el biosensor construido inicialmente (LOx/SPCE), introduciendo Pt, CS y Cu-MOF en el mismo.

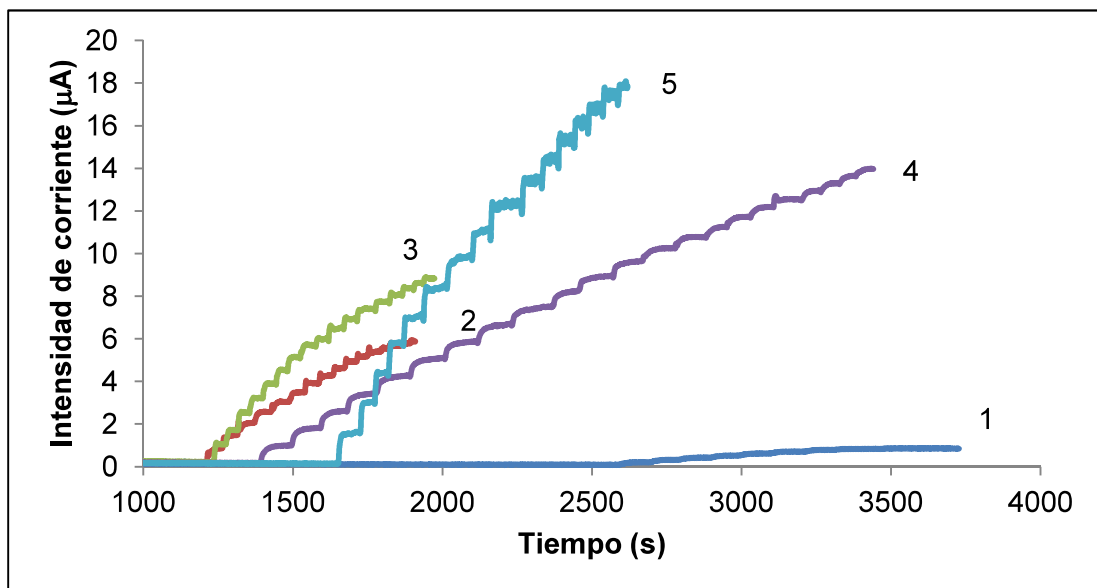


Figura 9. Amperogramas en una disolución tampón PO_4^{3-} pH=7, mediante sucesivas adiciones de AL (1) Electrodo LOx/SPCE; (2) Electrodo LOx/nano-Pt/SPCE; (3) Electrodo LOx/Pt/SPCE; (4) Electrodo LOx/CS/Pt/SPCE; (5) Electrodo LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCE.

En la tabla 5 se muestran las RSD y las pendientes de los calibrados obtenidos con las medidas amperométricas según se ha ido modificando el biosensor. Como se

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

puede observar la sensibilidad del biosensor mejoran con las sucesivas modificaciones efectuadas en el electrodo de trabajo.

Tabla 5. Valores de las RSD y sensibilidad de los biosensores desarrollados.

Biosensor	RSD (%)	Sensibilidad ($\mu\text{A}/\text{mM}$) (media pendiente)
LOx/SPCE	10.70	1.1142 (± 0.1353)
LOx/Pt/SPCE	4.64	7.4281 (± 0.3445)
LOx/CS/Pt/SPCE	2.98	12.3806 (± 0.3692)
LOx-CuMOF/CS/Pt/SPC	5.91	13.1145 (± 0.2995)

5.5.- Análisis de interferentes

Con el fin de determinar la selectividad del biosensor desarrollado, se estudió el comportamiento electroquímico en dicho biosensor, de diversos interferentes presentes en el vino con el fin de garantizar la aplicación del dispositivo electroquímico puesto a punto en muestras reales.

Dichos compuestos fueron elegidos por ser los estudiados en distintos artículos de bibliografía [4] [21]:

- D-Glucosa monohidratada: principal azúcar fermentable de la uva.
- Ácido L-ascórbico: antioxidante añadido frecuentemente en el vino para evitar cambios de color.
- Etanol: principal producto de la fermentación alcohólica.
- Ácido L-málico, ácido succínico, ácido acético, ácido gálico: ácidos que se encuentran de forma natural en el vino. El ácido L-málico responsable de la fermentación maloláctica.
- Citrato: compuesto presente en el vino.
- Quercetina y resveratrol: antioxidantes con propiedades cardiovasculares.

La influencia de estas especies se realizó analizando el incremento en la señal amperométrica de una muestra de AL en presencia de los distintos interferentes. Para ello se parte de una disolución 0.5 mM AL, y se deja que se establezca la corriente. A continuación se van adicionando 2 mg/L de cada uno de los interferentes. Finalmente se vuelve a adicionar AL para comprobar que el biosensor mantiene su sensibilidad. Los amperogramas obtenidos con las sucesivas adiciones se muestran en las figuras 10 y 11.

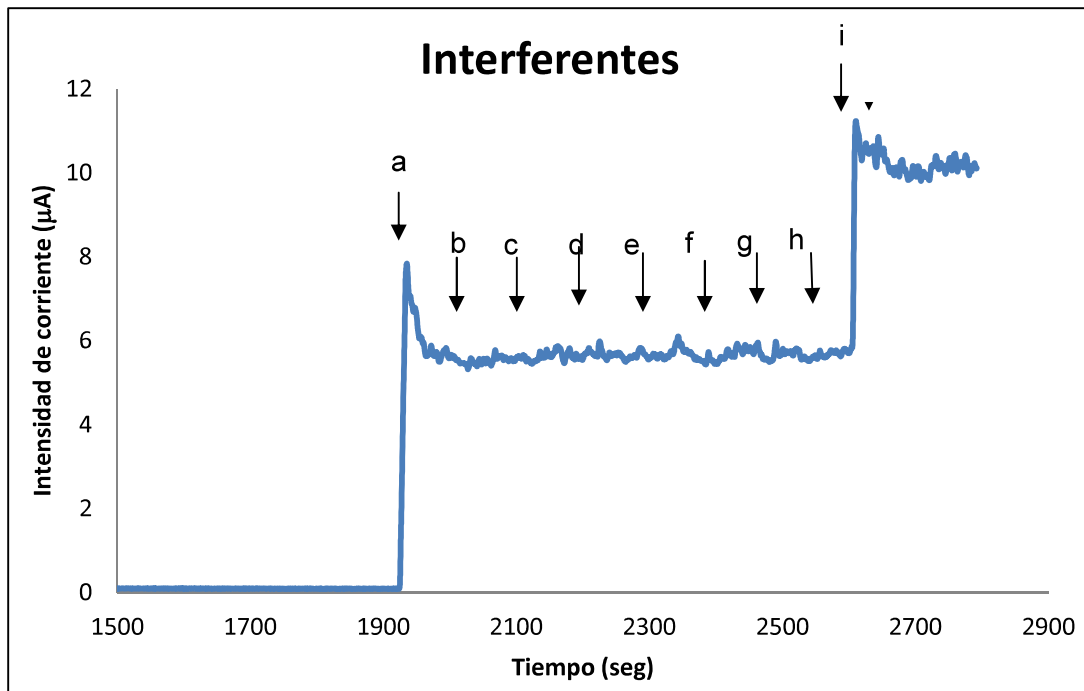


Figura 10. Amperograma obtenido en LO_x -CuMOF/CS/Pt/SPCE para el análisis de distintos interferentes, en una disolución tampón PO_4^{3-} pH=7. $E= 0.15$ V vs Ag/AgCl SPCE. (a) 0.5mM ácido láctico , (b) 3.32 µM ácido acético, (c) 4.34 µM etanol, (d) 2.84 mM L-ascórbico, (e) 4.23 mM succínico, (f) 2.52 mM D-glucosa monohidratada, (g) 1.94 mM citrato, (h) 3.73 mM L-málico, (i) 0.913 mM ácido láctico.

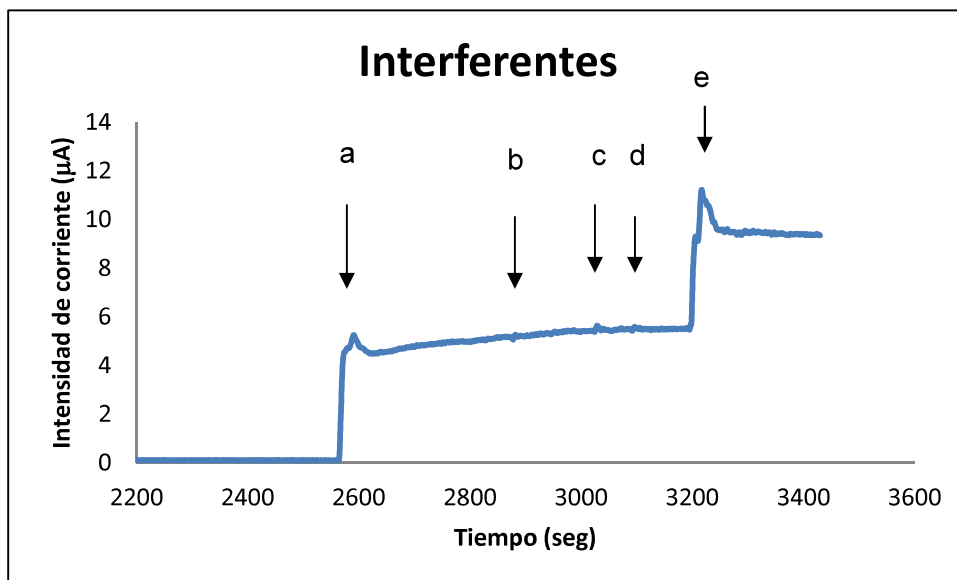


Figura 11. Amperograma obtenido en LO_x -CuMOF/CS/Pt/SPCE para el análisis de distintos interferentes, en una disolución tampón PO_4^{3-} pH=7. $E= 0.15$ V vs Ag/AgCl SPCE. (a) 0.5 mM ácido láctico , (b) 1.045 mM quercetina, (c) 2.99 mM ácido gálico, (d) 2.19 mM resveratrol, (e) 0.913 mM ácido láctico.

Se puede observar que el biosensor no responde a los distintos interferentes potenciales analizados, ya que la intensidad de corriente registrada no se ve afectada, cuando se les adiciona en la celda electroquímica.

5.6.- Análisis de muestras de vino

Se analizaron electroquímicamente tres muestras de vino: un vino tinto joven, un vino tinto crianza y un vino blanco. Para llevar a cabo el análisis de las muestras de vino se siguió un procedimiento experimental similar al utilizado para la determinar el contenido de AL en muestras sintéticas, utilizando el método de adición estándar.

Para ello, se depositaron en celda 4.950 mL de tampón fosfato pH=7, y una vez estabilizada la corriente se adicionó un volumen determinado de vino (50 μ l en el caso del vino blanco por tener una menor concentración de AL y 10 μ l para los vinos tintos).

Cabe mencionar que finalmente para calcular las concentraciones de AL para estos vinos se deberá aplicar un factor de dilución correspondiente al volumen añadido en celda. A continuación, se añadieron sucesivas cantidades de 50 μ L de una disolución de AL 0.10 M.

En la figura 12 se muestran los amperogramas de los tres vinos, en la que se puede observar el distinto aumento de intensidad de corriente cuando se añaden las diferentes muestras.

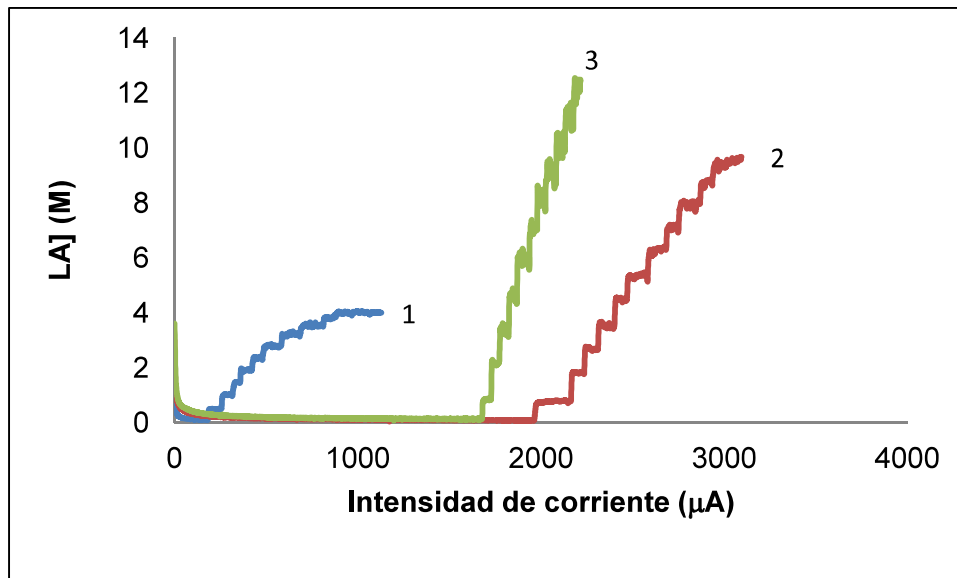


Figura 12. Amperograma obtenido en LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCE para el análisis de muestras de vino en una disolución de tampón PO_4^{3-} pH=7. $E=0.15$ V vs Ag/AgCl SPCE. (1) Vino tinto joven, (2) Vino tinto crianza, (3) Vino blanco.

Con los resultados obtenidos se hace un calibrado y se calcula tanto la concentración de AL en celda como en el vino, junto con el error.

Para validar el método de análisis se hicieron ensayos de recuperación para los tres vinos, contaminando los vinos con AL 50 mM en el caso de los vinos tintos y 20 mM para el vino blanco debido a que tiene una menor concentración de AL.

Los resultados hallados utilizando el biosensor amperométrico se compararon con los datos obtenidos por cromatografía líquida (HPLC). Ambos datos se muestran en la tabla 6. Se comprueba que el método de análisis con biosensores basado en LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCE es fiable y válido ya que los valores encontrados tanto por este método como por HPLC son comparables y las desviaciones entre ellos entran dentro del error.

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

Tabla 6. Resultados de las concentraciones de AL en muestras de vino, obtenidas con biosensores utilizando LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCEs y por HPLC. (Vino 1) tinto joven, (Vino 2) tinto crianza, (Vino 3) blanco.

		Biosensor	HPLC
Vino 1	Vino	61.18 ± 3.59 mM	42.65 ± 5.9 mM
	Recuperación (50 mM)	111.61 ± 5.15 mM	118.10 ± 0.95 mM
Vino 2	Vino	38.82 ± 2.2 mM	38.34 ± 2.93 mM
	Recuperación (50 mM)	87.77 ± 1.56 mM	95.84 ± 4.51 mM
Vino 3	Vino	7.90 ± 0.39 mM	8.15 ± 1.00 mM
	Recuperación (20 mM)	28.31 ± 2.26 mM	32.50 ± 2.36 mM

6.- CONCLUSIONS

The results of the experiments are summarized in the following conclusions:

- Lactic acid can be electrochemically determined by an enzymatic biosensor, using a screen-printed electrode system based on LOx immobilization onto surface of working electrode.
- Modification of the carbon electrode surface with a Pt film catalyses the electrochemical oxidation of hydrogen peroxide. Further, this modification allows to work at lower potential for amperometric measurements, avoiding interferences.
- CS modification increases the enzymatic stability, lifetime and sensitivity of the biosensor.
- The modification of the biosensor with Cu-MOF favors the immobilization of the enzyme, increasing the sensitivity, and allowing faster responses.
- The developed (LOx-CuMOF/CS/Pt/SPCEs) based biosensor offers an optimal RSD (5.91) and a low LOD ($0.12 \mu\text{M}$).in lactic acid determination.
- The interferent analysis shows that the biosensor is highly selective to lactic acid.
- The developed biosensor proves to be efficient for wine analysis, allowing an accurate quantification of lactic acid, supported by the results obtained in HPLC analysis.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. A. Alonso-Lomillo, J. Gonzalo Ruiz, J. Muñoz Pascual, O. Domínguez-Renedo, and M. J. Arcos-Martínez, "Enzyme Modified Screen Printed Electrodes", in *Biosensor Properties, Materials and Applications*. R. Comeaux, P. Novotny. New York: Nove Science Publisher, Inc, 2009, p.27.
- [2] M. V. Moreno-Arribas, *El Vino*. CSIC: "Los Libros de la Catara," Madrid, 2011.
- [3] Etchandy.M., "Vino Pasión," 2014. [Online]. Available: <http://vino-pasion.blogspot.com.es/>.
- [4] S. Pérez and E. Fàbregas, "Amperometric bienzymatic biosensor for l-lactate analysis in wine and beer samples," *Analyst*, vol. 137, no. 16, p. 3854, 2012.
- [5] J. Blouin and É. Peynaud, *Enología Práctica. "Conocimiento y elaboración del vino"*, 4th ed. Madrid: Mundi-Prensa, 2004.
- [6] C. S. Pundir, V. Narwal, and B. Batra, "Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 86, pp. 777–790, 2016.
- [7] R. Monošík, M. Stredánský, G. Greif, and E. Šturdík, "A rapid method for determination of l-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite," *Food Control*, vol. 23, no. 1, pp. 238–244, 2012.
- [8] J. Janata, Peer Reviewed : "Centenal retrospective on chemical sensors.," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 5, pp. 150–153, 2001.
- [9] J. B. Cano, B. Katia, and G. Pezzotti, "Transduction methods used on biosensors: amperometry and fluorescence / Métodos de transducción usados en biosensores: amperometría y fluorescencia," *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, vol. 2198558, no. 72, p. 104, 2014.
- [10] M. A. Alonso-Lomillo, J. Gonzalo Ruiz, and J. Muñoz Pascual, "Enzyme Modified Screen-Printed Electrodes and Sensors," in *Biosensors: Properties, Materials and Applications*, New York: Nova Science Publishers, Inc., 2005, pp. 1-52.
- [11] Bard and Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and applications*, 2nd edition. New York, John Wiley & Sons, Inc, 2001.
- [12] F.-G. Bănică, *Chemical Sensors and Biosensors*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- [13] M. Barquero Quirós, "Determinación electroquímica de aluminio en matrices acuosas con electrodos serigrafados modificados con nanopartículas y enzimas," Tesis Doctoral, Universidad de Burgos, 2016.
- [14] S. Piedade, M. Odloř, M. G. Almeida, A. N. Ara, C. M. C. M. Couto, and M. Conceic, "Application of lactate amperometric sol – gel biosensor to sequential injection determination of l-lactate," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, no. 4, pp. 1376–1381, 2007.

Determinación de ácido láctico en vino por métodos electroquímicos

- [15] Z. Bori, G. Csiffáry, D. Virág, M. Tóth-Markus, A. Kiss, and N. Adányi, "Determination of L-Lactic Acid Content in Foods by Enzyme-Based Amperometric Bioreactor," *Electroanalysis*, vol. 24, no. 1, pp. 158–164, 2012.
- [16] J. Y. Lee, D. H. Olson, L. Pan, T. J. Emge, and J. Li, "Microporous Metal–Organic Frameworks with High Gas Sorption and Separation Capacity," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 17, no. 8, pp. 1255–1262, 2007.
- [17] X. Wang, X. Lu, L. Wu, and J. Chen, "3D metal-organic framework as highly efficient biosensing platform for ultrasensitive and rapid detection of bisphenol A," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 65, pp. 295–301, 2015.
- [18] X. Dai and R. G. Compton, "Detection of As(III) via oxidation to As (V) using platinum nanoparticle modified glassy carbon electrodes: arsenic detection without interference from copper" . *Analyst*, vol. 131, no. 4, p. 516, 2006.
- [19] "International Union of Pure and Applied Chemistry, Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysisi-II," *Anal. Chem. Div. Spectrochim*, vol. Acta 33B, pp. 241–245, 1978.
- [20] J. Mocak, A. M. Bond, S. Mitchell, and G. Scollary, "A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques," *Pure Appl. Chem.*, no. 2, pp. 297–328, 2009.
- [21] S. P. Gomes, M. Odložilíková, M. Gabriela Almeida, A. N. Araújo, C. M. C. M. Couto, and M. C. B. S. M. Montenegro, "Application of lactate amperometric sol-gel biosensor to sequential injection determination of l-lactate," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, no. 4, pp. 1376–1381, 2007.