



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO
BIENZIMÁTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE
GLUCOSA Y COLESTEROL EN ALIMENTOS**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN QUÍMICA

PRESENTA:

Q. JESSICA TORRES GÁMEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS ANDRÉS GALÁN VIDAL

MINERAL DE LA REFORMA, HGO.

ENERO, 2019



Mineral de la Reforma, Hgo., a 16 de enero de 2019

Número de control: ICBI-D/071/2019
Asunto: Autorización de impresión de tesis.

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

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado a la Q. Jessica Torres Gámez, alumna de la Maestría en Química con número de cuenta 372104, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado "Desarrollo de un biosensor amperométrico bienzimático para la cuantificación simultánea de glucosa y colesterol en alimentos", en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes. A continuación, se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE
 SECRETARIO
 VOCAL
 SUPLENTE

Dra. María Gabriela Vargas Martínez
 Dr. Luis Humberto Mendoza Huizar
 Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
 Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega



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

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"

Dr. Óscar Rodolfo Suárez Castillo
 Director del ICBI



ORSC/BMM



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia Carboneras,
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
 Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



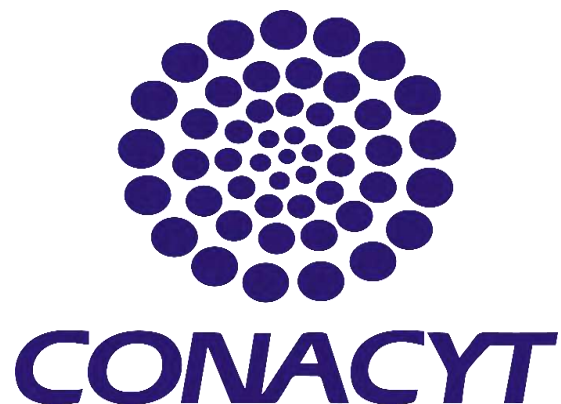
Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 1 del Área Académica de Química, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

- 17th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2018), con el trabajo: *“Simultaneously electrochemical detection of glucose and ascorbic acid employing a voltammetric biosensor”*. Rodas, Grecia.
- XXXI Congreso Nacional de Química Analítica (2018), con el trabajo: *“Desarrollo de un biosensor para la determinación de glucosa y ácido ascórbico mediante voltamperometría lineal”*. Pachuca de Soto, Hidalgo, México.
- XXXI Congreso Nacional de Química Analítica (2018), con el trabajo: *“Determinación simultánea de glucosa y colesterol por espectrofotometría de ultravioleta visible empleando calibración multivariante”*. Pachuca de Soto, Hidalgo, México.

Parte de este trabajo ha sido publicado en:

- Jessica Torres-Gamez, José A. Rodríguez, María Elena Páez-Hernández, Carlos Andrés Galán-Vidal. *“Application of multivariate statistical analysis to simultaneous spectrophotometric enzymatic determination of glucose and cholesterol in serum samples”*, *International Journal of Analytical Chemistry*. Article ID: 753268, 5 pages.



La investigación se realizó gracias al financiamiento del CONACyT como parte del proyecto: ***DESARROLLO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE GLUCOSA, COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS*** (CLAVE CB-2014-242677).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para realizar estudios de posgrado nivel Maestría (No. 828195).

AGRADECIMIENTOS

En este trabajo estuvieron involucradas distintas personas, sin la cuales la culminación de este trabajo no hubiera sido posible. Es por eso que en esta apartado quiero agradecer a cada uno de ellos.

A Dios por permitirme llegar hasta aquí, por darme la fuerza y valentía para asumir este reto y salir de mi zona de confort. Por ser mi compañero cuando la soledad pesaba al estar lejos de casa y ayudarme a enfrentar cada una de las adversidades que se fueron presentando en el trayecto.

A mis padres Froilan y Susy por todo el apoyo que me han brindado, por animarme siempre para cumplir cada uno de mis sueños aunque eso significara separarnos por un tiempo. Por enseñarme que los sueños pueden cumplirse con perseverancia y trabajo y que el amor es uno de los principales motores que impulsa a las personas para lograr sus objetivos. Gracias por todo su amor, sin ustedes no hubiera podido alcanzar este objetivo.

A mis hermanos Froylan y Tania por ser mis compañeros de vida, por siempre alentarme y protegerme como su hermana menor. Gracias por todas las risas y llantos que hemos compartido y por celebrar cada victoria conmigo como si fuera de ustedes.

A mi director de tesis, el Dr. Carlos Andrés Galán Vidal por haberme permitido trabajar en este proyecto y brindarme la confianza para formar parte de su equipo de trabajo. Gracias por compartir sus conocimientos conmigo, por orientarme para que lográramos alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo, por sus palabras para no rendirme cuando los resultados no eran los esperados y por cada uno de sus consejos para mejorar profesionalmente y personalmente. Sin duda, siempre estaré agradecida por todo el apoyo que me brindo durante mis estudios de Maestría.

A los miembros mi comité tutorial, a la Dra. María Gabriela Vargas Martínez, al Dr. Luis Humberto Mendoza Huizar y al Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega, por todas sus contribuciones hechas para la mejora de este trabajo. Por realizar siempre

observaciones constructivas para que mejorara en cada exposición y por el tiempo invertido en cada una de las revisiones y exposiciones relacionadas a este trabajo. Gracias por compartir sus conocimientos y enriquecer este trabajo con su experiencia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Ale, Nan, Ray, Ana, Isa, Richard, Lili, Zita, Evelyn y Acela por todo el apoyo brindado a lo largo de este tiempo, por todos los buenos momentos que compartimos en estos dos años y por siempre alentarnos unos a otros para alcanzar nuestros objetivos. Gracias por todo.

A los doctores José Antonio Rodríguez Ávila, Alfredo Guevara Lara y María Elena Páez Hernández, por todo el apoyo brindado a lo largo de este tiempo. Por compartir sus conocimientos conmigo y ayudarme siempre a mejorar. Gracias por su confianza y siempre estaré agradecida por el cariño que me brindaron.

A mis amigos Caro, Dianela, Edwin, Toni, Miguel, Diana y Mary porque a pesar de la distancia siempre recibía su apoyo y aliento para continuar, por compartir cada momento de este camino conmigo. Gracias por siempre alentarme a cumplir mis objetivos, por los momentos que hemos compartidos juntos y porque hemos aprendido que la distancia fortalece amistades. Gracias chicos.

Por último pero no menos importante a mis compañeros en esta aventura lejos de casa Ricardo y Aldair, que aunque nos separaba la enorme CDMX cada vez que nos reuníamos me hacían sentir muy cerca de casa. Aldair gracias por siempre apoyarme, por aguantar mi histeria en mis días grises, por siempre levantarme el ánimo cuando las días se tornaban difíciles y por celebrar conmigo cada una de mis victorias, siempre estaré agradecida por todo lo que hemos vivido. Ricardo gracias por escucharme siempre, por reír conmigo hasta llorar y por alentarme para seguir adelante. Sin duda, sin ustedes, el camino hubiera sido difícil.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
RESUMEN	iii
ANTECEDENTES	1
1.1 Glucosa y colesterol: Propiedades y análisis.	2
1.2 Biosensores	7
<i>1.2.1 Clasificación de biosensores.</i>	8
<i>1.2.2 Primera, segunda y tercera generación en los biosensores amperométricos.</i>	13
<i>1.2.3 Inmovilización del elemento de reconocimiento biológico</i>	14
<i>1.2.4 Aplicación de biosensores</i>	15
<i>1.2.5 Biosensores de glucosa y colesterol.</i>	16
1.3 Redes neuronales artificiales	18
<i>1.3.1 Neuronas biológicas y artificiales</i>	19
<i>1.3.2 Arquitecturas de las redes neuronales artificiales</i>	20
<i>1.3.3 Redes neuronales multicapa</i>	23
<i>1.3.4 Aplicación de las redes neuronales en química analítica</i>	24
OBJETIVOS.....	26
METODOLOGÍA	28
3.1 Reactivos.	29
3.2 Equipos y materiales.	29
3.3 Desarrollo experimental.	30
<i>3.3.1 Evaluación del procesamiento mediante redes neuronales artificiales empleando una simulación teórica de respuesta.</i>	30
<i>3.3.2 Biosensor de glucosa</i>	31
<i>3.3.3 Biosensor de colesterol</i>	33

3.3.4 Dispositivo biparamétrico para la detección simultánea de glucosa y colesterol	36
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	38
4.1 Evaluación del procesamiento mediante redes neuronales artificiales empleando una simulación teórica de respuesta.	39
4.2 Biosensor de glucosa.....	46
4.3 Biosensor de colesterol	49
4.4 Determinación simultánea de glucosa y colesterol.....	52
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	59
REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1	Equilibrio de la D-glucosa.	3
Figura I.2	Estructura del colesterol.	5
Figura I.3	Esquema de un biosensor	8
Figura I.4	Clasificación de los biosensores.	9
Figura I.5	Representación de 1) primera, 2) segunda y 3) tercera generación de biosensores.	13
Figura I.6	Diagrama de una neurona (a) biológica y (b) artificial.	20
Figura I.7	Esquema de una red neuronal a) unidireccional y b) retropropagación.	22
Figura I.8	Esquema de una red neuronal multicapa.	23
Figura III.1	Diagrama de la construcción del biosensor de glucosa.	31
Figura III.2	Diagrama de la construcción del biosensor de colesterol.	34
Figura IV.1	Voltamperogramas obtenidos a partir de una simulación teórica.	40
Figura IV.2	Cronoamperogramas obtenidos a partir de una simulación teórica.	44
Figura IV.3	Intervalo estudiado para el biosensor de glucosa.	46
Figura IV.4	Curva de calibración construida para el biosensor de glucosa.	47
Figura IV.5	Intervalo de concentración estudiado en el biosensor de colesterol.	49
Figura IV.6	Curva de calibración obtenida empleando el biosensor de colesterol.	50
Figura IV.7	Esquema de reacciones. a) método electroquímico y b) método espectrofotométrico.	52
Figura IV.8a	Concentración nominal frente concentración estimada en el set de entrenamiento 1) glucosa, 2) colesterol.	56
Figura IV.8b	Concentración nominal frente a concentración estimada en el set de validación 1) glucosa, 2) colesterol.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1	Métodos de referencias empleados para el análisis de glucosa.	4
Tabla I.2	Métodos reportados para el análisis de colesterol.	6
Tabla I.3	Métodos para la inmovilización del elemento biológico de reconocimiento.	15
Tabla I.4	Biosensores para la detección de glucosa y colesterol.	17
Tabla I.5	Aplicación de redes neuronales empleando técnicas electroquímicas como método de detección.	25
Tabla III.1	Composición de los sistemas utilizados en el análisis de glucosa empleando el biosensor de glucosa.	32
Tabla III.2	Sistemas empleados en el análisis de glucosa empleando el método de referencia.	33
Tabla III.3	Composición de los sistemas empleados en el análisis de colesterol en yema de huevo utilizando el biosensor de colesterol.	35
Tabla III.4	Composición de las mezclas utilizadas en el análisis de colesterol empleando el método de referencia.	36
Tabla IV.1	Matriz de concentraciones empleada en la simulación teórica.	39
Tabla IV.2	Tamaño de las matrices empleadas en redes neuronales artificiales para el conjunto de datos voltamperométricos.	42
Tabla IV.3	Porcentajes de error relativo (%REP) obtenidos en el procesamiento de datos voltamperométricos mediante redes neuronales	43
Tabla IV.4	Tamaño de las matrices empleadas en redes neuronales utilizando el conjunto de datos cronoamperométricos.	44
Tabla IV.5	Porcentajes de error relativo (%REP) obtenidos en el procesamiento de datos cronoamperométricos mediante redes neuronales.	45
Tabla IV.6	Comparación de los parámetros analíticos en biosensores de glucosa.	48
Tabla IV.7	Concentración de glucosa encontrada en muestras de jugo de uva.	48
Tabla IV.8	Biosensores de colesterol reportados para el análisis en muestras sanguíneas y alimentarias.	51
Tabla IV.9	Composición de las mezclas del conjunto de calibración empleado en redes neuronales artificiales.	53
Tabla IV. 10	Composición de las mezclas del conjunto de validación utilizado en el modelo de redes neuronales artificiales.	53
Tabla IV.11	Parámetros optimizados y errores obtenidos en la red neuronal artificial empleando el conjunto de entrenamiento.	55
Tabla IV. 12	Errores obtenidos entre el valor nominal y el estimado en el conjunto de validación	55

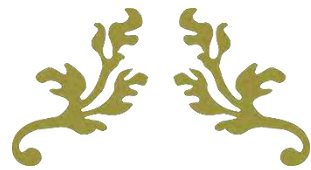
RESUMEN

La glucosa es uno de los monosacáridos más importantes, ya que está involucrada en diversas reacciones dentro del organismo. La determinación de glucosa es uno de los problemas analíticos más importantes, principalmente en la industria alimenticia y el análisis clínico. Al igual que la glucosa, la detección de colesterol es crucial ya que alteraciones en sus niveles sanguíneos pueden provocar diversas enfermedades cardíacas y cardiovasculares.

Para la determinación de estos analitos se han empleado la espectrofotometría de ultravioleta-visible, espectroscopia de masas y cromatografía de líquidos; sin embargo, estas técnicas se requieren instrumentos costosos y entrenamiento especial en el manejo de la instrumentación. Es por esto que en los últimos años el empleo de técnicas electroquímicas para la determinación de glucosa y colesterol ha ido en aumento, ya que es una técnica relativamente económica y permite ser empleada para mediciones *in situ*.

A pesar que se han desarrollado diversas metodologías electroquímicas, aún son escasos los estudios que permiten la determinación simultánea de estos analitos. Es por esto que en este trabajo nos hemos planteado desarrollar una metodología que permita la detección de glucosa y colesterol simultáneamente, empleando un electrodo y redes neuronales como herramienta quimiométrica de procesamiento de información.

En los siguientes capítulos se describirán los métodos desarrollados para la detección individual de los analitos, los biosensores que han sido aplicados para la determinación de glucosa y colesterol de manera individual, así como los parámetros empleados en redes neuronales. De igual forma se describe la metodología propuesta para la detección de los analitos y su aplicación en muestras de leche saborizada, dando como resultado una novedosa propuesta para la detección simultánea de glucosa y colesterol libre en muestras alimentarias mediante voltamperometría lineal y empleando redes neuronales artificiales como herramienta de procesamiento.



CAPÍTULO I

ANTECEDENTES



1.1 Glucosa y colesterol: Propiedades y análisis.

La glucosa y el colesterol tienen un papel importante en los procesos fisiológicos del cuerpo humano. El aumento de glucosa en la sangre es la característica más común que presenta el organismo al desarrollar diabetes; esta enfermedad es una de las principales causas de muerte de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. Al igual que la glucosa, la alteración del nivel de colesterol en la sangre puede provocar diversas enfermedades cardíacas y cardiovasculares como la hipertensión, arteriosclerosis, enfermedades coronarias, trastorno en el metabolismo de lípidos y trombosis cerebral, entre otras. Debido a los problemas que causan el incremento de colesterol en la sangre al menos 2.6 millones de personas en el mundo han muerto y 29.7 millones presentan alteraciones en la salud [1-3].

El incremento de enfermedades en la población a causa de los factores antes mencionados, ha sido un objetivo en las investigaciones para desarrollar metodologías en las cuales se pueda analizar glucosa y colesterol. En este apartado se presentan algunos de los métodos desarrollados para la determinación de estos analitos.

1.1.1 Glucosa

La D-glucosa, también llamada dextrosa, forma parte del grupo de carbohidratos conocidos como monosacáridos (azúcares simples). La glucosa con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, contiene seis átomos de carbono y un grupo aldehído; es por esto que nos referimos a ella como una aldohexosa. La glucosa puede encontrarse en forma cíclica y acíclica, siendo esta última el resultado de una reacción intramolecular entre el átomo de carbono del grupo aldehído y el grupo hidroxilo presente en el C-5. Como el anillo contiene cinco átomos de carbono y un átomo de oxígeno y la estructura es semejante a la del pirano, esta forma cíclica es conocida como glucopiranososa [4]. La formación de la glucopiranososa se presenta en la Figura I.1

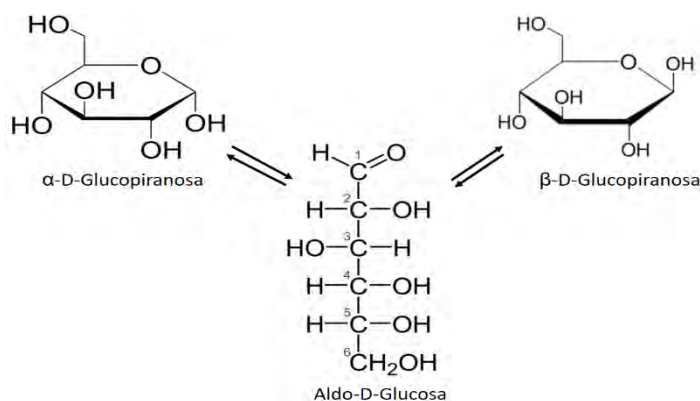


Figura I.1 Equilibrio de la D-glucosa [4].

La forma acíclica es termodinámicamente inestable y espontáneamente ocurre la isomerización de la forma cíclica. Cuando la glucosa es disuelta en solución acuosa, una serie de reacciones ocurren involucrando un arreglo molecular alrededor del C-1. Este arreglo está asociado con la rotación óptica y provoca la formación de una mezcla de productos en el equilibrio, dicho proceso es conocido como mutorrotación y en el cual se obtienen los anómeros α y β -glucopiranososa, esta última en mayor proporción (65%) [4].

Una de las propiedades físicas más importantes de la glucosa es su solubilidad, la cual es asociada a los grupos hidroxilo que presenta en su estructura, estos incrementan su solubilidad en agua debido a que pueden formar puentes de hidrógeno. La glucosa es soluble en agua y ácido acético; medianamente soluble en metanol y etanol e insoluble en etil éter [4].

Este monosacárido es la principal fuente de energía para los vertebrados. Los niveles de glucosa en los seres humanos se encuentran en un intervalo de entre 3.5-5.5 mmol/L. Niveles elevados a 7.8 mmol/L pueden provocar el desarrollo de diabetes en los seres humanos. De igual forma la glucosa está presente en frutas y vegetales, ya que contribuye a la textura y sabor de estos. [5].

Debido a que la glucosa es una fuente de energía para los seres humanos y su incremento en el organismo puede provocar la alteración de los procesos biológicos, es importante la cuantificación de este compuesto en alimentos y/o plasma sanguíneo. Para realizar el análisis de glucosa existen diversos métodos entre los

cuales se encuentran los métodos enzimáticos, los métodos cromatográficos y la electroforesis capilar de zona [5].

Los métodos de referencia empleados para el análisis de glucosa son descritos en la Tabla I.1 y se presentan los límites de detección reportados para cada uno de los métodos, en donde se puede observar que los métodos cromatograficos presentan límites de detección menores en comparación con los métodos enzimáticos. Esto puede deberse a que la instrumentación empleada es más sensible y permite detectar concentraciones en el orden de partes por billón (ppb).

Tabla I.1 Métodos de referencias empleados para el análisis de glucosa.

Método	Descripción	Límite de detección	Ref.
Enzimático (espectrofotometría de ultravioleta-visible)	Se basa en una reacción enzimática en donde la glucosa reacciona con la glucosa oxidasa dando como producto ácido glucónico y peróxido de hidrogeno. Este último reacciona con peroxidasa, fenol y 4-aminoantipirina para generar un compuesto cromóforo. La intensidad de color del compuesto es proporcional a la concentración de glucosa.	0.36-23.4 g/L	[6]
HPLC- ELSD	Este sistema de detección es destructivo y requiere la nebulización y evaporación de la fase móvil y así obtener los analitos que no se evaporan.	0.37 µg/L	[7]
RP-HPLC	Esta técnica emplea fases estacionarias con grupos funcionales hidrófobos (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilos) y fases móviles polares. Los analitos interaccionan hidrófobamente con la fase estacionaria y son eluidos de acuerdo a su polaridad. Los azúcares son previamente derivatizados con grupos aromáticos que proporcionen la hidrofobicidad	0.023 µg/L	[8]
CG-MS	Se emplea un gas acarreador (helio, nitrógeno, hidrogeno), el cual hace pasar los analitos volátiles a través de una columna capilar empacadas por una fase estacionaria que presenta diversas características. En este método se requiere llevar a cabo una derivatización de los azúcares para su análisis.	-	[9]
CZE-UV	Se basa en las diferentes movilidades iónicas dependiendo de las cargas de los analitos de una mezcla. Para el análisis de glucosa se emplea un electrolito soporte a base de hidróxido de sodio para la ionización de los grupos hidroxilos presentes en la molécula.	3.6 mg/L	[10]

HPLC-ELSD: cromatografía de líquidos de alta eficiencia- detector de dispersión de luz evaporativa, RP-HPLC: cromatografía de fase reversa, CG-MS: cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa, CZE-UV: electroforesis capilar de zona con detector de ultravioleta-visible.

1.1.2 Colesterol

Los esteroides naturales, incluyendo el colesterol, tienen un esqueleto de 1,2-ciclopentano-fenantreno con 27-30 carbonos en su estructura, un grupo hidroxilo en el C-3 y una cadena lateral de mínimo 7 carbonos en el C-17 del anillo (Figura I.2). La variación en la estructura del esqueleto del anillo y en la cadena lateral diferencia a los esteroides presente en los mamíferos y en las plantas. El colesterol es el esteroide más abundante en los animales y es un componente estructural vital en las membranas plasmáticas [11].

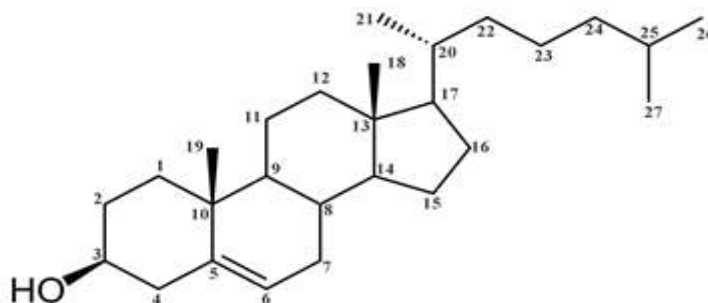


Figura I.2 Estructura del colesterol [11].

El colesterol se puede encontrar libre o esterificado con ácidos grasos de cadena larga en tejidos animales. Para la funcionalidad celular puede tomarse exógenamente a través de lipoproteínas de baja densidad (LDL) del torrente sanguíneo o sintetizarse endógenamente a partir de acil-coenzima A (CoA). Se transporta en el torrente sanguíneo mediante lipoproteínas, principalmente en forma de ésteres de colesterol. Debido a su hidrofobicidad, los ésteres de colesterol son más adecuados para el almacenamiento celular, mientras que el colesterol libre adquirido por las células a través de la hidrólisis de los ésteres de colesterol se acumula en las membranas celulares como un componente estructural [11].

El 20-25% del colesterol que se encuentra en el cuerpo humano proviene de alimentos de origen animal, como el huevo, carne, productos lácteos, entre otros; ya que estos alimentos son ingeridos diariamente, es importante conocer el contenido de colesterol en cada alimento [12]. Es por eso que en los últimos años

se han desarrollado diversos métodos para la cuantificación de colesterol en muestras alimentarias y biológicas.

En la Tabla I.2 se describe los métodos desarrollados para el análisis de colesterol. Cada uno de los métodos descritos presentan diversas ventajas. Los métodos químicos clásicos son relativamente simples y de bajo costo, sin embargo el proceso está compuesto por una serie de pasos que provoca que el tiempo de análisis sea prolongado. Los ensayos enzimáticos emplean enzimas, las cuales elevan el costo del análisis y los límites de detección son bajos. Los métodos instrumentales presentan una buena exactitud y sensibilidad, sin embargo se requiere de equipos costosos y de pretratamientos de la muestra exhaustivos [12].

Tabla I.2 Métodos reportados para el análisis de colesterol.

Método	Descripción	Ref.
Método modificado <i>Abell-Kendall</i>	Es un método de referencia para la determinación total de colesterol. Este método químico multi-pasos, involucra la saponificación de los ésteres de colesterol con hidróxido de potasio, posteriormente se realiza una extracción con hexano y se posteriormente se adiciona ácido acético para obtener un compuesto con coloración. Este compuesto es medido por espectrofotometría de UV-vis.	[13]
Ensayos enzimáticos	Este ensayo se basa en reacciones enzimáticas acopladas para la determinación de colesterol total. Los ésteres de colesterol empleando colesterol esterasa se convierten colesterol libre. El colesterol libre se convierte en 4-colestenona y peróxido de hidrogeno empleando colesterol oxidasa. El peróxido de hidrogeno reacciona con 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa para así obtener un compuesto con coloración, cuya intensidad es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.	[14]
GC-MS	Son empujados para separar al colesterol de otras especies.	[15]
LC-MS	Pueden utilizarse para la determinación de colesterol libre, ésteres de colesterol y colesterol total. Presentan mayor exactitud que los métodos químicos clásicos y los métodos enzimáticos. Para llevar a cabo el análisis la muestra requiere de previa derivatización.	[16]
GC-ID-MS	Empleado para la medición de colesterol total. El colesterol marcado isotópicamente se añade a la muestra en una concentración aproximadamente igual a la del analito presente en la muestra. Adicionalmente, se prepara una mezcla de calibración que contiene al isótopo de colesterol y al colesterol. La cuantificación se basa en el cálculo de la relación del área de pico que corresponde al colesterol isotópico y al no isotópico y se compara con la relación calculada de la mezcla de calibración.	[17]

GC-MS: cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa, LC-MS: cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masa, GC-ID-MS: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con dilución isotópica.

Además de la selección apropiada del método, la preparación de la muestra es un paso crucial para el análisis de colesterol. Los esteres de colesterol constituyen cerca del 60% del colesterol en la sangre y pueden ser hidrolizados por medio de una hidrólisis química (saponificación) o enzimáticamente utilizando colesterol esterasa para obtener colesterol libre y realizar la cuantificación de colesterol. Todos los métodos emplean comúnmente el mismo procedimiento para la preparación de la muestra, el cual incluye la saponificación de los lípidos totales y extracciones sucesivas para la purificación y concentración de la muestra [12].

Debido a las diferentes características químicas (polaridad, solubilidad, volatilidad) que presentan la glucosa y el colesterol la implementación de los métodos descritos para la detección simultánea de estos analitos, no siempre son una opción viable.

Por esta razón en los últimos años se han desarrollado investigaciones para la detección de estos dos compuestos, basándose en biosensores, ya que presentan diversas ventajas frente a las técnicas convencionales, como cortos tiempo de análisis, no se requiere de un exhaustivo pretratamiento de la muestra, pueden realizarse mediciones *in-situ* y la instrumentación empleada no es tan robusta como la utilizada en las técnicas descritas anteriormente. A continuación se describe de manera detallada el funcionamiento de los biosensores.

1.2 Biosensores

Los biosensores y herramientas relacionadas con bioanalítica surgieron para complementar las técnicas analíticas convencionales. Estas alternativas analíticas, han sido empleadas en un gran número de aplicaciones como lo son el monitoreo ambiental, diagnóstico clínico y análisis alimentario. Algunas ventajas que marcan la diferencia con las metodologías convencionales son: los tiempos de medición cortos, posibilidad de miniaturización, capacidad para monitoreo continuo y en algunos casos, llevar a cabo el análisis de matrices complejas con una preparación de muestra mínima [18].

De acuerdo a la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) un biosensor, “es un dispositivo, el cual es capaz de proveer información analítica

cuantitativa o semi-cuantitativa empleando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico) el cual está en contacto con el elemento de transducción electroquímico” [19].

Un biosensor está compuesto por tres elementos, un bioreceptor o elemento de reconocimiento biológico, un transductor y un sistema de procesamiento de señales (Figura I.3). El elemento de reconocimiento biológico es la estructura capaz de detectar específicamente a un analito. Este biocomponente puede estar compuesto por anticuerpos, ácidos nucleicos, enzimas y células, entre otros [19].

El transductor es el encargado de transformar la reacción entre el analito y el bioreceptor en una señal útil. Dicha reacción produce cambios químicos como la producción de un nuevo producto, cambio en el flujo de electrones y cambios de pH o masa. Así, la señal bioquímica es convertida a una señal eléctrica por el transductor. Posteriormente, la señal eléctrica es amplificada y enviada a un procesador de datos para finalmente ser visualizada [19].

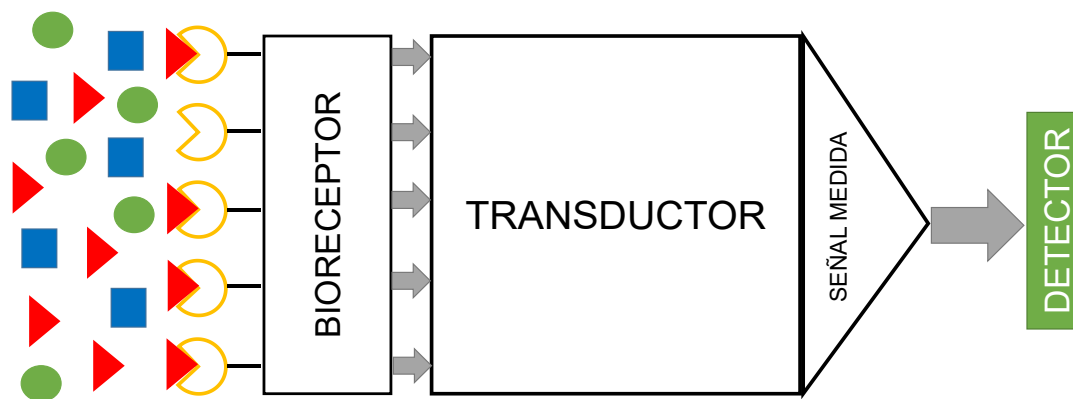


Figura I.3 Esquema de un biosensor [19].

1.2.1 Clasificación de biosensores.

Los biosensores pueden clasificarse de acuerdo al tipo de elemento de reconocimiento biológico o al tipo de señal primaria que procese el transductor. En la Figura I.5 se representan las diferentes categorías de los biosensores [20].

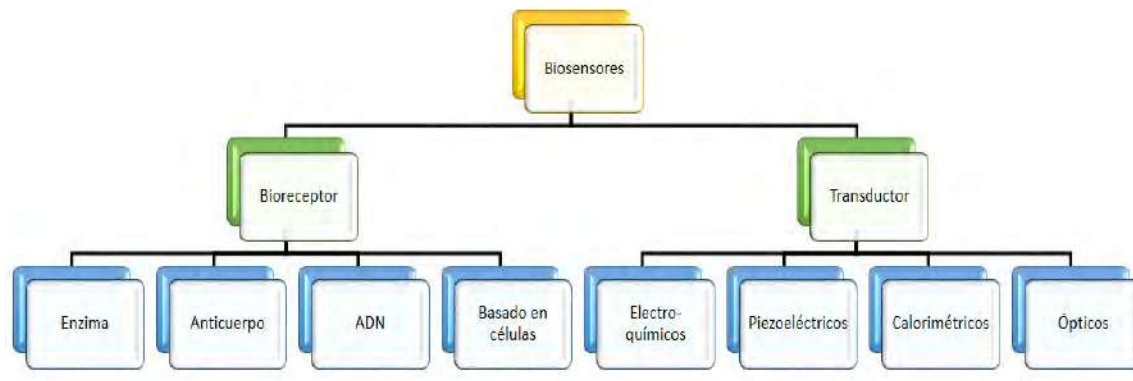


Figura I.4 Clasificación de los biosensores [20].

1.2.2.1 Clasificación de acuerdo al elemento de reconocimiento biológico

El bioreceptor es el elemento más significativo que distingue a los biosensores. Dicho elemento es crucial para aumentar la sensibilidad y la selectividad del dispositivo para determinar un analito en particular y prevenir las interferencias al analizar una muestra. Los biosensores se clasifican de acuerdo al mecanismo biológico que se emplee. La señal biológica de los biosensores puede dividirse en cuatro mecanismos, los cuales son mencionados a continuación [20]:

1. **Biosensores enzimáticos.** Este tipo de biosensores están asociados a la biocatálisis, debido a la característica que presentan las enzimas de reconocer específicamente a un sustrato y posteriormente transformarlos empleando procesos catalíticos. Debido a esta propiedad, en este tipo de biosensores se puede detectar a un analito en particular en una matriz compleja [21]. La enzima puede ser inmovilizada en el dispositivo por interacciones de Van der Waals, enlaces iónicos y enlaces covalentes. Las enzimas más empleadas son la oxidorreductasa, transferasa, ligasa, entre otras [22].
2. **Inmunosensores.** El funcionamiento de este tipo de biosensores se basa en la afinidad que tiene el anticuerpo por el antígeno. El anticuerpo se enlaza con el patógeno o toxina o interactúa con el componente que se encuentra en el sistema inmune [22]. El desarrollo de este tipo de biosensores ha sido una gran contribución al área de salud debido a su alta sensibilidad,

especificidad y su rápida respuesta; los inmunosensores desarrollados han comenzado a ser un método de detección de cáncer y tumores debido a las ventajas presentadas ante los métodos tradicionales [23].

3. **Sensores de ADN/ácido nucleico.** Su funcionamiento consiste en que un fragmento de una hélice del ácido nucleico es reconocido y enlazado con la hélice complementaria presente en una muestra. La formación de la doble hélice está regida por puentes de hidrógeno. Los biosensores basados en ADN son empleados en el área clínica para el diagnóstico de virus y enfermedades [22].
4. **Sensores basados en células.** Para estos sensores se emplean células vivas como elemento de reconocimiento biológico y se basan en la habilidad de las células para detectar al analito de interés en condiciones intracelulares o extracelulares. Estos biosensores son utilizados en el diagnóstico clínico, análisis ambiental, control de calidad en alimentos, industria farmacéutica y detección de drogas [23].

1.2.2.2 Clasificación de acuerdo al tipo de transductor

Los biosensores son normalmente clasificados de acuerdo al método de transducción que se emplee. El transductor es un componente del biosensor el cual tienen un papel importante en el proceso de detección de la señal. El transductor es un dispositivo que convierte un intervalo físico, químico o biológico en una señal eléctrica con alta sensibilidad y mínimo de interferencias en la medición. En los últimos años se han desarrollado un gran número de métodos para la detección de la señal, a continuación se mencionan los más empleados [20]:

1. **Biosensores electroquímicos.** La señal transformada es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo. Los biosensores electroquímicos están clasificados en cuatro grupos [20]:

- 1.1. *Amperométricos.* Basados en la medición de la corriente en función del tiempo, la que resulta de la oxidación o reducción de un especie electroactiva producida o consumida en una reacción bioquímica, la cual depende

principalmente de la concentración de un analito y de un potencial fijo de trabajo. En un sensor amperométrico se emplean tres tipos de electrodos, un electrodo de trabajo que generalmente es de oro, carbón o platino (el biosensor); un electrodo de referencia el cual sirve para referir y controlar el potencial del electrodo de trabajo y el tercer electrodo, el cual se le conoce como contraelectrodo o electrodo auxiliar y se incluye para que el flujo de carga eléctrica no pase a través del electrodo de referencia y se pueda mantener controlado el potencial de trabajo [24].

- 1.2. *Potenciométricos*. En estos electrodos el elemento de reconocimiento biológico convierte el proceso de reconocimiento en un cambio de potencial, el cual proporciona la señal analítica. Para esta técnica se emplean dos electrodos: un electrodo indicador que desarrolla un potencial variable para el proceso de reconocimiento y un electrodo de referencia (usualmente Ag/AgCl) el cual requiere de un potencial constante de celda [25].
- 1.3. *Conductimétricos*. En este método, la información analítica se obtiene midiendo la conductividad del electrolito, la cual varía con el cambio de la concentración de la especie iónica. El transductor conductimétrico provee información acerca de la capacidad que posee la solución electrolítica para conducir corriente eléctrica entre los electrodos. El dispositivo conductimétrico está compuesto por dos electrodos, los cuales están separados a cierta distancia [20].
- 1.4. *Espectroscopia de impedancia*. Este método es similar a las técnicas de detección electroquímica mencionadas con anterioridad, en donde la conductividad se detecta en un intervalo de frecuencia eléctrica de entre 10 kHz y 10 MHz. En la medición por espectroscopia de impedancia, la muestra es puesta en un dispositivo y se aplica un voltaje alterno controlado al electrodo y la corriente que fluye a través de la muestra es monitoreada. La impedancia resultante de la medición de las muestras es la relación entre voltaje sobre la corriente. Para este método se emplean tres electrodos (electrodo de trabajo, referencia y auxiliar), un potencióstato y un analizador de frecuencias [26].

2. **Biosensores ópticos.** Este método de transducción emplea diversas clases de biosensores acoplados a diferentes tipos de espectroscopia como absorción, fluorescencia, fosforescencia, Raman, refracción y espectroscopia de dispersión. Los biosensores ópticos son capaces de medir diferentes propiedad de los analitos [27].

2.1. *Resonancia del plasmón de la superficie (RPS).* Los biosensores RPS están expuestos a un cambio cuando el analito de interés interacciona con el elemento de bioreconocimiento, dicho cambio provoca una diferencia en el índice de refracción el cual es utilizado para medir u observar la reacción. Cuando el analito interactúa con la biomolécula inmovilizada en la superficie del sensor, esto provoca un cambio en el índice de refracción de la superficie del electrodo. Este cambio produce una variación en la constante de propagación de la onda de la superficie del plasmón, dicha variación es medida y posteriormente analizada [28].

2.2. *Quimioluminiscencia.* En un biosensor de este tipo, la reacción entre el analito y la biomolécula inmovilizada (la cual es un marcador con una especie quimioluminiscente) genera una luz como resultado de una reacción bioquímica [29].

2.3. *Fluorescencia.* Los biosensores basados en esta técnica incorpora una molécula fluorocromófora la cual es empleada para producir una luz durante el bioreconocimiento. El proceso de bioreconocimiento se transforma a una señal óptica acoplado a un reactivo fluorescente que sea sensible a los elementos [30].

2.4. *Fibra óptica.* Los biosensores de fibra óptica esta compuestos por una fuente de luz, el elemento de bioreconocimiento (el cual es inmovilizado), una fibra óptica (empleada para transmitir luz y actuar como sustrato) y un detector (el cual mide la señal de la luz de salida). En estos sensores el analito interacciona con el elemento de reconocimiento biológico en la superficie de la fibra, la reacción produce un cambio en la propiedades ópticas. Dicho cambio está relacionado con la concentración del analito. Posteriormente, la

luz es transmitida a través de la fibra óptica y dicha fibra es empleada para direccionar la luz al detector [31].

3. **Biosensores piezoeléctricos.** En estos biosensores, el transductor es de un material piezoeléctrico (por ejemplo, cuarzo) y el material biosensible reviste el material piezoeléctrico, el cual tiene una frecuencia y vibración natural. La frecuencia es controlada por una señal eléctrica externa, la cual produce un valor de corriente y cuando el analito es expuesto al material, este reacciona y cambia la frecuencia produciendo una diferencia de corriente, la cual puede ser relacionada con la masa del analito de interés [20].
4. **Biosensores calorimétricos.** El principio de este tipo de transductores se basa en la medición del cambio de temperatura en la reacción entre el elemento de reconocimiento biológico y el analito. El cambio de temperatura está relacionado a la cantidad de reactivos consumidos o a los productos formados. En los dispositivos calorimétricos, el cambio de calor es medido empleando óxidos metálicos o cerámicos semiconductores [32].

1.2.2 Primera, segunda y tercera generación en los biosensores amperométricos.

Se han desarrollado diferentes métodos para la transferencia de electrones entre la enzima y el transductor, lo que permite diferenciar tres generaciones de biosensores (Figura I.4) [19].

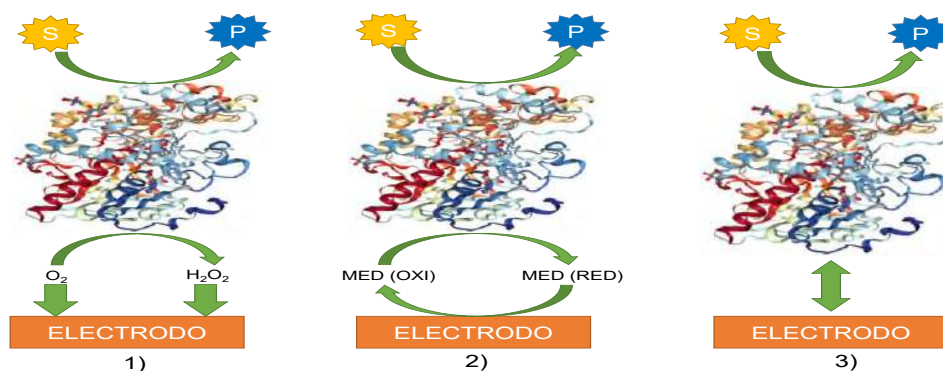


Figura I.5 Representación de 1) primera, 2) segunda y 3) tercera generación de biosensores [19].

Los biosensores de primera generación están basados en la medida de uno de los productos o del cofactor de la reacción enzimática; por lo que la sustancia analizada debe poseer propiedades electroquímicas. La segunda generación de biosensores incorpora un mediador, el cual es el encargado de la transferencia electrónica entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo; el mediador debe reaccionar de manera rápida con el centro activo, minimizando así la competición con el cofactor natural de la enzima. En los biosensores de tercera generación la transferencia electrónica entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo se realiza de forma directa; este tipo de biosensores muestra una mayor selectividad pues trabaja a potenciales muy próximos a los intrínsecos de la enzima [20].

1.2.3 Inmovilización del elemento de reconocimiento biológico

Uno de los aspectos más importantes en la construcción de los biosensores es la inmovilización del elemento biológico en la superficie del transductor. La inmovilización del elemento biológico es crucial para llevar a cabo una correcta determinación de los analitos. El método de inmovilización a emplear depende de las características del material del transductor (metal, vidrio, superficie de carbón, etc.) y de las propiedades del elemento de reconocimiento biológico [18]. En la Tabla I.3, se mencionan los diferentes métodos reportados para la inmovilización del elemento biológico.

Tabla I.3 Métodos para la inmovilización del elemento biológico de reconocimiento [18].

Método de inmovilización	Interacción principal	Ventajas	Desventajas
Adsorción física	Interacción hidrófoba Adsorción electrostática	Facilidad Versatilidad No requiere modificar el elemento biológico	Entrecruzamiento reversible. Reproducibilidad baja. Permeabilidad. La eficiencia del enlace depende del pH/ afinidad iónica.
Microencapsulación	Se emplea una membrana inerte para inmovilizar al elemento biológico.	Adaptabilidad Facilidad	Permeabilidad.
Atrapamiento	Se prepara un gel polimérico que contiene el elemento biológico. El elemento queda atrapado en el gel.	Adaptabilidad Facilidad No se requiere modificar la biomolécula.	Velocidad de reacción lenta. Pérdida de actividad del elemento biológico.
Entrecruzamiento	Se lleva a cabo empleando un agente bifuncional.	Mejor reproducibilidad. Enlace estable	Se requiere una activación previa de la biomolécula.
Enlace covalente	Se emplea como agente carbodimida, EDAC/NHS, silanización.	No se requiere modificar el elemento biológico	Enlace al azar.
Interacción oro-tiol	La interacción se la superficie de oro del electrodo.	Enlace orientado	Es necesario modificar la biomolécula.
Electropolimerización		Enlace orientado	Se requiere de una superficie y biomolécula modificada

1.2.4 Aplicación de biosensores

Los biosensores han sido aplicados en la industria alimentaria, área clínica y sector marino, entre otros; ya que proporcionan una mejor estabilidad y sensibilidad comparado con los métodos tradicionales (espectroscopia de UV-Vis, cromatografía de líquidos, etc.) [33].

En el área médica, la aplicación de los biosensores ha ido en aumento. Los biosensores de glucosa han sido aplicados para el seguimiento de pacientes diagnosticados con diabetes mellitus, ya que se requiere un control continuo de los niveles de glucosa. Estos biosensores son los más vendidos en el mercado. Otra

aplicación de los biosensores en esta área es el arreglo de inmunosensores para la inmunofenotipificación clínica de las leucemias agudas y biochips para la detección rápida y precisa de múltiples marcadores de cáncer y neuroquímica [33].

La industria alimentaria ha aplicado el uso de biosensores como método de control de calidad de alimentos durante el proceso de producción. Algunas determinaciones que se han realizado son la detección de patógenos en carne y drogas en cerdos, determinación de inmunoglobulina G en leche de bovino, detección de antibióticos en alimentos, cuantificación de herbicidas, pesticidas y metales pesados en suelo y agua subterránea; esto para conocer la calidad en un campo agrícola [33].

1.2.5 Biosensores de glucosa y colesterol.

El monitoreo de glucosa en sangre es un herramienta importante en la terapia moderna para los pacientes diabéticos. Generalmente se emplea un dispositivo electroquímico portable para monitorizar los niveles de glucosa en la sangre. Estos dispositivos comerciales emplean un volumen pequeño de muestra (sangre), un mediador y la enzima correspondiente inmovilizada de tal forma que esta permanezca estable. Debido a la necesidad que se presenta en el ámbito clínico por elevar la eficiencia de estos dispositivos y de generar nuevos equipos para la detección de diversos analitos de origen biológico (colesterol, triglicéridos, ácido úrico, etc.), se han realizado diversas investigaciones en las cuales se desarrollan nuevos electrodos que presentan mayor sensibilidad que los electrodos que se comercializan actualmente [18].

En la Tabla I.4, se enlistan algunos los biosensores desarrollados recientemente para la detección de glucosa y colesterol, siendo estos analitos los de interés para este trabajo de investigación. Estos presentan algunas características en común, una de ellas es el método de inmovilización utilizado; en gran parte de ellos se emplea el entrecruzamiento y el glutaraldehído como agente entrecruzante. Esto debido a que el método de inmovilización contribuye a la estabilidad y la reproducibilidad del biosensor; mientras que el agente permite la formación de enlaces estables con la enzima. Algunos otros biosensores presentados en la Tabla I.4, utilizan nuevos

materiales como nanotubos multipared y nanopartículas de oro. Dichos materiales han sido cada vez más empleados en la construcción de biosensores ya que presentan propiedades conductivas que pueden ayudar a la transferencia de electrones y de igual forma su estructura puede favorecer enlaces estables con la enzima, lo cual provoca que mejore la superficie del electrodo.

Tabla I.4 Biosensores para la detección de glucosa y colesterol.

Analito	Muestra	Composición del electrodo	Transductor	Método de inmovilización	Ref.
Glucosa	Vino	Electrodo de carbón/ GOx/ BSA/ Glutaraldehído/ Nafión (5%)	Amperométrico	Entrecruzamiento	[34]
Glucosa	Suero sanguíneo	Electrodo de carbón vítreo/ GOx/ Glutaraldehído/ MWNT	Amperométrico	Entrecruzamiento	[35]
Glucosa	Suero sanguíneo	Electrodo de carbón vítreo/ GOx/ Nitrofenil /TBATFB NPDTFB	Amperométrico	Entrecruzamiento	[36]
Glucosa	Suero sanguíneo/ sangre	Electrodo serigrafiado de oro/ GOx/ HRP/ Membrana de hidrogel/ TMB	Amperométrico	Atrapamiento	[37]
Colesterol	Huevo/carne/ hígado	Electrodo de oxígeno CHOx/ CHE Glutaraldehído	Potenciométrico	Entrecruzamiento	[38]
Colesterol	Suero sanguíneo	Placa de vidrio de óxido de indio y estaño/ CHOx/ Nanopartículas de óxido de zinc/ Quitosan	Espectroscopia de impedancia	Adsorción física	[39]
Colesterol	Suero sanguíneo	Placa de vidrio de óxido de indio y estaño/ CHOx/ Quitosan/ MWNT/ BMIM-BF ₄ / Glutaraldehído	Amperométrico	Entrecruzamiento	[40]
Colesterol	Mantequilla/ margarina/ aceite de pescado	Placa de titanio/ Nanopartículas de oro/ CHOx/ CHE HRP/ Quitosan	Voltamperométrico	Adsorción física	[41]

BMIM-BF₄: 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato, BSA: albúmina de suero bovino, CHE: colesterol esterasa, CHOx: colesterol oxidasa, GOx: Glucosa Oxidasa, HRP: peroxidasa de rábano, MWNT: nanotubos multicapa, NPDTFB: nitrofenildiazonio tetrafluoroborato, TBATFB: tetrabutilamonio tetrafluoroborato, TMB: tetrametilbenzidina,

Los biosensores además de ser utilizados para la detección de un analito, también han sido implementados en arreglos de sensores. Los arreglos de sensores son sistemas en los que se producen señales que no específicamente de un analito en particular, pero son generadas debido a que presentan diversas características presentes en la muestra y las cuales se pueden determinar por medio de un entrenamiento computacional, el cual reconoce a los analitos que presentan las diversas particularidades de la muestra [42].

Para realizar el reconocimiento de cada uno de los analitos en el arreglo de sensores, se requiere emplear métodos multivariante. Estos métodos quimiométricos se encargan de la extracción de la información a partir de un procesamiento adecuado. Dependiendo del tipo de aplicación, se puede seleccionar el método para el procesamiento de datos. Para una determinación cualitativa el análisis por componentes principales (PCA) sería el método más adecuado, ya que con este método se puede realizar una clasificación de las muestras. Si el análisis es cuantitativo existen diversos métodos para realizar la determinación, entre los más empleados se encuentran el análisis por componentes principales (PCR), regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) y redes neuronales artificiales (ANN) [42]. Este último método se detalla a continuación, ya que es el empleado en este trabajo.

1.3 Redes neuronales artificiales

Las redes neuronales artificiales (ANN, por sus siglas en inglés) se desarrollaron empleando modelos matemáticos basados en el sistema nervioso biológico. La idea de las redes neuronales artificiales no es replicar la operación del sistema biológico, sino emplear el funcionamiento de las redes biológicas para resolver problemas complejos. Es por esta razón que se dice que las redes neuronales son un modelo abstracto de las redes biológicas [43].

El tener esta propiedad vuelve al modelo más atractivo ya que presenta características poco comunes presentes en otros modelos, las propiedades presentes en este modelo son la no linealidad, la cual permite un mejor ajuste en

los datos, la falta de sensibilidad al ruido que proporciona una mejor precisión en la predicción, un mayor paralelismo trae como consecuencia un procesamiento más rápido y una mejor tolerancia a errores, la capacidad de aprendizaje y adaptabilidad permiten al sistema modificar su estructura interna para así responder de manera adecuada al ambiente externo y la capacidad de generalización facilita la aplicación del modelo a un conjunto de datos desconocido [44].

Debido a sus características las redes neuronales puede ser aplicadas en funciones de aproximación, en la cual se realiza un mapeo de un conjunto de entrada para obtener una respuesta de salida; modelos de asociación y reconocimiento el cual se emplea como una técnica de clasificación y memoria asociativa [45].

1.3.1 Neuronas biológicas y artificiales

El sistema nervioso está compuesto por un billón de neuronas de diversos tipos y longitudes, las cuales se localizan en todo nuestro organismo. El cuerpo de éstas contiene el núcleo, en el cual se localiza información hereditaria y en el plasma se genera material molecular que las neuronas necesitan para su operación. Las dendritas reciben señales de otras neuronas y transmiten la señal al cuerpo celular o soma de estas. El axón recibe las señales del cuerpo y transmite dicha información a otras neuronas [44].

El elemento de procesamiento básico en una red neuronal es la neurona. En el modelo matemático de la neurona, el efecto de la sinapsis (lugar de encuentro de dos neuronas) es representado por la conexión de los pesos que es modulada por el efecto asociado de las señales de entrada y las características no lineales presentadas en la neurona, las cuales son representadas por una función de transferencia. Este proceso sería el análogo al realizado por los axones y las dendritas [43]. En la Figura I.6 se muestra un esquema de la neurona biológica y la artificial, con sus principales similitudes.

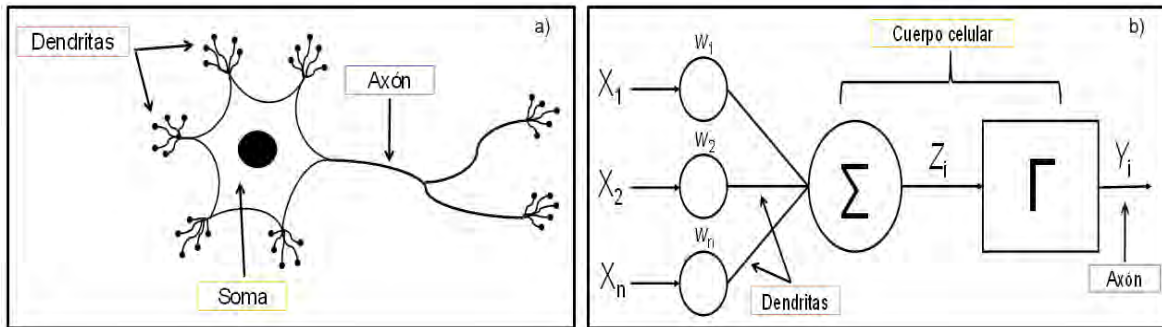


Figura I.6 Diagrama de una neurona (a) biológica y (b) artificial [43].

La red neuronal puede generar diversos datos de salida a través de la sumatoria de los diferentes pesos y los datos de entrada. Esta operación activa a cada una de las neuronas para así obtener como resultado al conjunto de salida, cuando se llevan a cabo las diversas operaciones en la capa oculta se dice que la red está pasando por un proceso de activación, cuyo término es asociado a las funciones de transferencia o activación [46].

Las funciones de transferencia son funciones no lineales, las cuales permiten la obtención del conjunto de salida de manera satisfactoria. Dichas funciones son conocidas como *squashing function*, ya que el conjunto de salida producido debe cumplir con ciertos límites para poder pasar a la capa de salida [47].

Existen diversas funciones de transferencia, las cuales son elegidas dependiendo de las propiedades de estas y del caso de estudio en el que será empleada la red neuronal. La función de transferencia más empleada es la función sigmoidea, debido a que presenta propiedades matemáticas menos complejas y que facilitan el procesamiento, algunas de las propiedades que posee esta función son la monotonía, continuidad y diferenciación, lo cual es muy importante en el entrenamiento de la red neuronal [47].

1.3.2 Arquitecturas de las redes neuronales artificiales

La arquitectura básica consiste en tres tipos de capas neuronales: capa de entrada, oculta y de salida. En la primera capa se introduce el conjunto de datos de entrada (inputs) en la red, los parámetros empleados en esta capa como la normalización de los datos, la selección de las variables, entre otros son seleccionados antes de

análisis; el número de neuronas en la capa de entrada es igual al número de datos de entrada y cada una de las neuronas de entrada es transmitida a la siguiente capa. La capa oculta es básica para el funcionamiento de la red, en esta capa los datos de la capa de entrada son recibidos y procesados para posteriormente ser transmitidos a la capa de salida. La última capa es la capa de salida, en donde se reciben los datos procesados y el número de neuronas es igual al número de datos de salida [48].

Existen diferentes clasificaciones de redes neuronales, una de ellas es la dirección que tienen los vectores para transmitir la información en la red; en esta clasificación se pueden obtener dos tipos de redes, las redes unidireccionales y las redes con retropropagación (Figura 1.7). En las redes unidireccionales (feed-forward networks), el flujo de la señal es de la capa de entrada a la capa de salida, estrictamente en una sola dirección. El procesamiento de los datos puede extenderse a múltiples capas, sin embargo no pueden presentarse conexiones en el sentido inverso [43]. El tipo de redes que se encuentran en esta clasificación son las redes neuronales unicapa, las redes neuronales multicapas y las redes basadas en las funciones radiales [49].

A diferencia de las redes unidireccionales, en las redes con retropropagación (recurrent networks) el flujo puede llevarse a cabo tanto en sentido unidireccional como en sentido inverso. La dinámica entre las conexiones es la propiedad más importante en este tipo de redes [43]. Dentro de esta clasificación se encuentran las redes competitivas, los mapas auto organizados de Kohonen (modelo SOM), redes de Hopfield, los modelos ART (por sus siglas en Ingles, Teoría de Resonancia Adaptativa) y las redes neuronales con regularización Bayesiana [49].

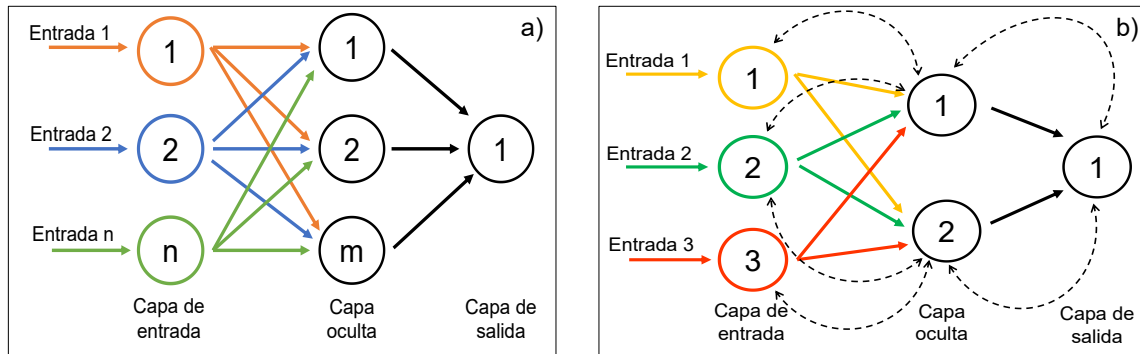


Figura I.7 Esquema de red neuronal a) unidireccional y b) retropropagación [43].

Una red neuronal debe configurarse de tal forma que la aplicación de un conjunto de entrada produzca el conjunto de salida deseado. Para esto existen varios métodos para establecer fortalezas en las conexiones. El primer método es emplear una matriz de pesos explícita, teniendo un conocimiento a priori. Otro método es entrenar a la red neuronal alimentándola con patrones de enseñanza y permitiendo que la matriz de pesos sea modificada empleando una regla de aprendizaje [43].

El aprendizaje de una red neuronal puede clasificarse en tres tipos: aprendizaje supervisado, aprendizaje no supervisado y aprendizaje de reforzamiento. En el aprendizaje supervisado un vector de entrada junto con las respuestas deseadas entran en contacto con cada una de las neuronas, para así obtener el conjunto de salida. Dicha información pasa por cada una de las capas y los errores se encuentran de la diferencia entre la respuesta deseada y la respuesta obtenida en la capa de salida, estos luego son empleados para determinar la matriz de pesos y así obtener un error menor. El término supervisado se origina del hecho de que las respuestas deseadas en las neuronas de salida son proporcionadas por un agente externo [43].

En el aprendizaje no supervisado, el conjunto de salida está entrenado para responder a un grupo de patrones pertenecientes a un conjunto de entrada. En este tipo de aprendizaje, el sistema debe descubrir características estadísticamente importantes del conjunto de entrada. El aprendizaje de reforzamiento es un aprendizaje para maximizar una señal numérica, en el cual el aprendiz no expresa que acción tomará y de esta forma el sistema puede aprender de diversas formas

para así descubrir diversas posibilidades con las cuales se pueda maximizar la señal. En este tipo de aprendizaje no se obtiene únicamente una acción que permita el mejoramiento de la señal, si no se obtienen diferentes acciones que pueden mejorar el resultado del conjunto de salida [43].

1.3.3 Redes neuronales multicapa

Las redes neuronales multicapa (MLP, multi layer preceptor por sus siglas en inglés) consisten en un sistema simple en donde se interconectan las neuronas con los vectores pertenecientes al conjunto de entrada y los vectores del conjunto de salida. Las neuronas se conectan con los pesos y las señales de salida, las cuales son obtenidas por la sumatoria del conjunto de entrada y que van siendo modificados por en cada neurona empleando una función de transferencia. El sistema es una superposición de diversas funciones de transferencia no lineales que permiten que cada una de las diversas neuronas cumpla con una función no lineal de aproximación [50].

La arquitectura de las redes multicapa puede variar pero consiste en diversas capas ocultas. En las redes neuronales multicapa todo el sistema está conectado, cada una de las neuronas lo está con la capa oculta subsecuente [50]. El esquema de una red neuronal multicapa se presenta en la Figura I.8

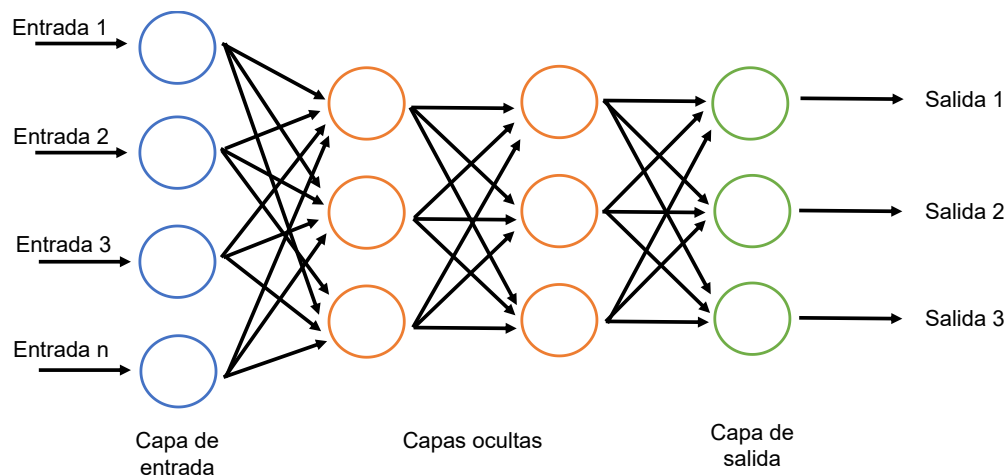


Figura I.8 Esquema de una red neuronal multicapa [50].

1.3.4 Aplicación de las redes neuronales en química analítica

En general, los problemas químicos están compuestos por sistemas complejos. Diversos procesos químicos se pueden modelar con diferentes funciones matemáticas (lineales, cuadráticas, exponenciales, hiperbólicas y funciones logarítmicas, entre otras). Usualmente, los métodos quimiométricos son empleados para el tratamiento de datos y resolver problemas complejos [51].

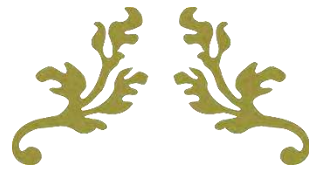
Uno de los métodos más empleados es el análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS, por sus siglas en inglés), sin embargo esta metodología únicamente puede ser empleada en datos que presenten una tendencia lineal. Debido a que en algunos casos se presentan problemas en la calibración como ruido o solapamiento de las señales, el análisis por PLS no es posible ya que estos son no lineales. Es por esta razón que en los últimos años diversos autores han empleado las redes neuronales artificiales para la resolución de problemas complejos y de co-linealidad. Dichas ventajas han hecho que sean empleadas en diversas áreas de la química como los son la medicinal, farmacéutica, teórica, bioquímica, alimentaria y analítica [51].

Una de las áreas en donde el empleo del modelo de redes neuronales ha ido en aumento es en el área de química analítica, las cuales son empleadas para el análisis y calibración multivariante o como un diseño de experimentos [51].

Dentro de las técnicas empleadas en la química analítica, las electroquímicas han implementado el uso de redes neuronales artificiales como un modelo para calibración multivariante. Esto debido que en esta técnica se emplean arreglos de sensores que requieren de métodos quimiométricos para el análisis de datos. En la Tabla I.5 se enlistan algunos de los estudios reportados en donde se han empleado las redes neuronales como método de análisis de datos.

Tabla I.5 Aplicación de redes neuronales empleando técnicas electroquímicas como método de detección.

Técnica electroquímica	Aplicación	Arreglo de sensores	Ref.
Voltamperometría de onda cuadrada	Determinación de eugenol, carvacol y timol en miel.	Electrodo de carbón vítreo	[52]
Voltamperometría de barrido lineal	Determinación de glucosa y ácido ascórbico en jugos de frutas.	Arreglo de tres biosensores de GOx y catalizadores metálicos.	[53]
Amperometría	Cuantificación de insecticidas: mezcla de paraoxón y carbofurano en muestras de agua.	Arreglo de cuatro biosensores basados en la inhibición de AChE.	[54]
Cronoamperometría	Determinación de seis pesticidas organofosforados en muestras de agua.	Arreglo de seis biosensores basados en la inhibición de AChE.	[55]
Voltamperometría de barrido lineal	Cuantificación de compuestos fenólicos: fenol, catecol y <i>m</i> -cresol.	Biosensor basado en tirosina	[56]
Voltamperometría cíclica	Cuantificación del contenido de fenoles totales en vinos y champaña.	Arreglo de cuatro biosensores, basados en tirosina, lactato y nanopartículas de cobre.	[57]
Voltamperometría cíclica	Determinación de glucosa, ácido ascórbico y ácido úrico.	Biosensor de GOx/ nanopartículas de oro.	[58]
Potenciometría	Clasificación de residuos de pesticidas basados en tres grupos (carbamatos, piretroides y organofosfatos).	Arreglo de tres sensores basados en BERA, tres líneas de cultivo celular como respuesta electrofisiológica.	[59]
Voltamperometría cíclica	Cuantificación de compuestos fenólicos: ácido ferúlico, ácido gálico y ácido sinápico en cerveza.	Arreglo de cuatro biosensores, basados en tirosina, lactato y nanopartículas de cobre.	[60]
Amperometría	Determinación de mezclas de etanol y glucosa.	Arreglo de dos biosensores en la inmovilización de células de <i>Gluconobacter oxydans</i> y <i>Pichia methanolica</i> .	[61]
Potenciometría	Cuantificación de lisina en alimento para caballos.	Arreglo de ocho electrodos ISEs con lisina oxidasa.	[62]



CAPÍTULO II

OBJETIVOS

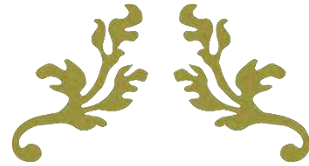


2.1 Objetivo General

Desarrollar un biosensor bienzimático y biparamétrico para la detección simultánea de glucosa y colesterol en muestras alimentarias.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar una simulación de la respuesta del biosensor bienzimático y biparamétrico.
2. Evaluar el procesamiento de los datos generados en la simulación, mediante redes neuronales.
3. Construir un biosensor bienzimático y biparamétrico para la detección simultánea de glucosa y colesterol.
4. Optimizar y evaluar la arquitectura y las variables de redes neuronales y parámetros analíticos para la cuantificación simultánea de glucosa y colesterol.
5. Validar el biosensor frente a métodos establecidos (kits enzimáticos)



CAPÍTULO III

METODOLOGÍA



3.1 Reactivos.

- Agua desionizada (18 M Ω , Milli-Q)
- Colesterol, Research Organics
- Colesterol oxidasa de *Streptomyces sp*, Sigma Aldrich, 100 UN, \geq 20 U/mg proteína
- Cloruro de potasio, J.T Baker, 99%
- Etanol, J.T Baker, 99%
- Ferricianuro de potasio, Sigma Aldrich, 99%
- Fosfato de potasio dibásico, Sigma Aldrich, 98%
- Fosfato de potasio monobásico, J.T Baker, 99%
- D-(+)-Glucosa, Sigma Aldrich, 99.5%
- Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich, 50 KU, Tipo X-S
- Hidróxido de potasio, J.T. Baker, 98%
- Kit enzimático de colesterol, Spinreact
- Kit enzimático de glucosa, Spinreact
- Metanol, J.T Baker, 99%
- Tritón X-100, Sigma Aldrich

3.2 Equipos y materiales.

Los equipos y materiales utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- Agitador vórtice Maxi-Max, modelo M16715
- Centrífuga Rolco, modelo 3070
- Electrodo serigrafado de carbono DropSens 110[®]
- Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer, modelo Lambda 40 utilizando una celda de cuarzo de 10 mm de paso óptico
- Incubadora Boekel, modelo 132000
- Micropipetas, Eppendorf de volumen variable 10-100 μ l
- Micropipetas, Eppendorf de volumen variable 100-1000 μ l
- Potenciómetro Oakton modelo 510
- Purificador y desionizador de agua Milli-Q

- Potenciostato galvanostato Autolab, modelo PGSTAT30.
- Software de simulación voltamperométrica DigiElch® versión 8.0
- Software matemático MATLAB® versión R2017a con la herramienta de redes neuronales
- Software estadístico Minitab® versión 2017

3.3 Desarrollo experimental.

La metodología propuesta se desarrolló en cuatro etapas, la primera corresponde a la simulación teórica de respuesta para glucosa y colesterol, la segunda y tercera etapa se basó en la construcción de los biosensores de glucosa y colesterol y la última consistió en la construcción y evaluación del dispositivo biparamétrico para la determinación simultánea de glucosa y colesterol.

3.3.1 Evaluación del procesamiento mediante redes neuronales artificiales empleando una simulación teórica de respuesta.

Para obtener los voltamperogramas y cronoamperogramas se modeló un biosensor amperométrico construido a partir de un electrodo serigrafiado de carbón (0.126 cm^2) sobre el que se depositó ferricianuro de potasio, actuando este como mediador y una membrana enzimática formulada con glucosa oxidasa y colesterol oxidasa. Para la simulación se consideró una constante de transferencia electrónica de $1.3 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, $E^\circ = 0.127 \text{ V}$ (SCE) y coeficientes de difusión de 5.6×10^{-10} , $1.8 \times 10^{-10} \text{ cm s}^{-1}$ para glucosa y colesterol, respectivamente [63-64]. Para realizar la simulación se utilizó el software DigiElch considerando en el caso de la voltamperometría lineal una velocidad de barrido de 0.02 V s^{-1} con una ventana de potencial de 0 V hasta 0.6 V ; para las simulaciones cronoamperométricas se consideró un potencial impuesto de 0.3 V .

Para el procesamiento de la información mediante redes neuronales se utilizó el software Matlab® con la herramienta de redes neuronales y se evaluó la arquitectura, número de neuronas, número de capas, estado de aprendizaje y funciones de transferencia.

3.3.2 Biosensor de glucosa.

1. Soluciones

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.04 M con KCl 0.1 M, pH 7.
- Solución enzimática de glucosa oxidasa de 6 U/ μ L. Esta solución se preparó con solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y se almacenó en tubos eppendorf de 1.5 mL a 4°C.
- Solución patrón de 50 mM de glucosa. La solución se preparó un día antes de realizar el análisis y se refrigeró hasta su uso. A partir de esta solución se tomaron diversas alícuotas para la preparación de la diferentes soluciones estándar. Todas las soluciones fueron preparadas con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.
- Solución de ferricianuro de potasio 10 mM en solución amortiguadora pH 7. La solución se preparó antes de realizar el análisis de las muestras.

2. Construcción del biosensor

En un disco de 10 mm de diámetro (papel filtro, Whatman 41) se colocaron 10 μ L de solución enzimática. Los discos se secaron a 25 °C en una incubadora por 45 min. Posteriormente, el disco de papel fue colocado en un electrodo serigrafado de carbón (Drop Sens 110)[®] para así cubrir los tres electrodos. Una vez colocado el disco en el electrodo, se adicionaron 10 μ L de la solución de ferricianuro; el cual actúa como mediador del sistema y finalmente, se agregaron 20 μ L de la solución de glucosa y se llevó a cabo el análisis. El diagrama de la construcción del biosensor se representa en la Figura III. 1.

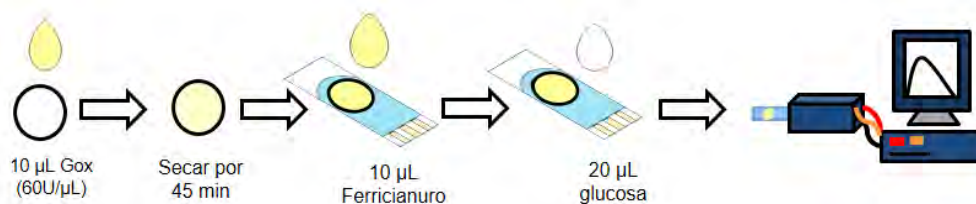


Figura III.1 Diagrama de la construcción del biosensor de glucosa.

3. Curva de calibración univariante.

Se elaboró una curva de calibrado para obtener el intervalo lineal de respuesta del biosensor. Para realizar dicho análisis se prepararon once estándares de glucosa, en un intervalo de 0.25 mM a 9 mM. Posterior al análisis para obtener el intervalo lineal, se realizó una segunda curva de calibrado empleando diez estándares de glucosa en un intervalo de 0.25 a 4 mM; este análisis se realizó por triplicado y por tres días consecutivos.

4. Análisis de muestras reales.

Para este análisis se emplearon tres muestras de jugo de uva, debido a su alto contenido de glucosa. Se tomaron 3 mL de la muestra y se aforó a 10 mL con solución amortiguadora de fosfatos pH 7. El análisis por la metodología propuesta se llevó a cabo por el método de adición estándar, para ello se prepararon cuatro sistemas con diversas alícuotas de la solución estándar. La composición de las disoluciones empleadas se reportan en la Tabla III.1.

Tabla III.1 Composición de los sistemas utilizados en el análisis de glucosa empleando el biosensor de glucosa.

	Sistemas				
	Blanco	1	2	3	4
Dilución de la muestra (mL)	-	1	1	1	1
Solución patrón de glucosa (mL)	-	-	1	2	3
Solución amortiguadora de fosfatos (mL)	10	9	8	7	6

Para contrastar la metodología propuesta con el método de referencia (espectrofotometría de UV-Vis) se empleó un kit enzimático de glucosa. La determinación se realizó empleando el método de adición estándar. Para ello se preparó una solución madre de la muestra, en la cual se tomaron 2 mL de la muestra y se aforó a 10 mL con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7. Posteriormente

se tomaron diversas alícuotas para la preparación de los sistemas. La composición de las mezclas empleadas en el análisis se reportan en la Tabla III.2.

Tabla III. 2 Sistemas empleados en el análisis de glucosa empleando el método de referencia.

	Sistemas				
	Blanco	1	2	3	4
Muestra (μL)	-	11	11	11	11
Solución de glucosa- kit enzimático (μL)	-	-	11	22	32
Reactivo enzimático (mL)	2	1.98	1.97	1.96	1.95

3.3.3 Biosensor de colesterol

1. Soluciones

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.04 M con KCl 0.1 M, pH 7.
- Solución enzimática de colesterol oxidasa 20 U/mL. Esta solución se preparó con solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y se almacenó en tubos eppendorf de 1.5 mL a 4°C.
- Solución patrón 50 mM de colesterol. La solución preparó con una mezcla de Tritón X-100 al 1% v/v en etanol. Esta solución se debe preparar previamente al análisis.
- Solución de ferricianuro de potasio 10 mM en solución amortiguadora de fosfato pH 7. La solución se prepara antes de realizar el análisis de las muestras.
- Solución de hidróxido de potasio 0.4 M en etanol.

2. Construcción del biosensor

En un disco de 10 mm de diámetro (papel filtro, Whatman 41) se colocaron 50 μL de solución enzimática. Los discos se secaron a 25 °C en una incubadora por 45 min. Posteriormente, el disco de papel fue colocado en un electrodo serigrafado de carbón (Drop Sens 110)[®] para así cubrir los tres electrodos. Una vez colocado el disco en el electrodo, se adicionaron 10 μL de la solución de ferricianuro; el cual

actúa como mediador del sistema. Finalmente, se agregan 20 μL de la solución de colesterol y se lleva a cabo el análisis. En la Figura III. 2 se presenta un diagrama de la construcción del biosensor.

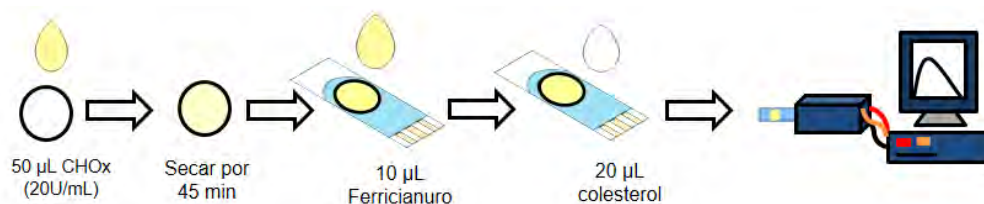


Figura III.2 Esquema de la construcción del biosensor de colesterol.

3. Curva de calibración

Se elaboró una curva de calibrado para obtener el intervalo lineal de respuesta del biosensor. Para realizar dicho análisis se prepararon nueve estándares de colesterol, en un intervalo de 0.05 mM a 0.8 mM. Posterior al análisis para obtener el intervalo lineal, se realizó una segunda curva de calibrado empleando diez estándares de colesterol en un intervalo de 0.05 a 0.5 mM. Todas las soluciones empleadas en los análisis fueron preparadas a partir de la solución patrón de colesterol y se llevaron al aforo (10 mL) con solución amortiguadora de fosfatos (pH 7). El análisis se realizó por triplicado durante tres días consecutivos.

4. Análisis de una muestra real

Para llevar a cabo el análisis en una muestra real, se requirió un pretratamiento de la muestra. Para ello se realizó una saponificación, ya que esto permite hidrolizar los ésteres de colesterol y obtener el colesterol libre, el cual puede ser detectado por la enzima empleada.

La muestra seleccionada para el análisis fue yema de huevo de gallina, debido a su alto contenido de colesterol (1000 mg de colesterol/100 g de alimento) y el consumo frecuente de estos productos en la población mexicana [11].

La metodología empleada para la hidrólisis de los ésteres de colesterol del huevo fue la siguiente: se separó la yema de la clara y la yema se homogenizó pesando 2 g de esta en un tubo tipo Falcon de 50 mL, se agregaron 10 mL de KOH 0.4 M en

etanol y se homogenizó la mezcla. La mezcla se calentó a 50°C por 30 min en baño María. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 10 mL de agua desionizada y se homogenizó. La mezcla se trasvasó a un embudo de separación y se agregaron 10 mL de n-hexano, dicho procedimiento se realizó por triplicado. La fase orgánica fue recolectada y evaporada a sequedad. La muestra se reconstituyó con 1 mL de Tritón X-100 al 1% v/v en etanol y posteriormente fue analizada [63].

El análisis de la muestra se llevó a cabo por adición estándar, para esto los sistemas se prepararon tomando una alícuota de la muestra y añadiendo diversos volúmenes de la solución patrón de colesterol. La composición de cada una de las mezclas se presenta en la Tabla III.3.

Tabla III.3 Composición de los sistemas empleados en el análisis de colesterol en yema de huevo utilizando el biosensor de colesterol.

	Sistemas			
	Blanco	1	2	3
Dilución de la muestra (μL)	-	20	20	20
Solución patrón de colesterol (μL)	-	-	20	40
Solución amortiguadora de fosfatos (mL)	10	9.98	9.96	9.94

De igual forma se empleó la espectrofotometría de UV-Vis como método de referencia, para contrastar los resultados obtenidos en el método propuesto. El análisis se llevó a cabo por el método de adición estándar y se empleó un kit enzimático de colesterol. La composición de las soluciones empleadas en el análisis se enlista en la Tabla III.4

Tabla III.4 Composición de las mezclas utilizadas en el análisis de colesterol empleando el método de referencia.

	Sistemas			
	Blanco	1	2	3
Dilución de la muestra (μL)	-	15	15	15
Solución de colesterol- kit enzimático (μL)	-	-	11	36
Reactivo enzimático (mL)	2	1.98	1.97	1.94

3.3.4 Dispositivo biparamétrico para la detección simultánea de glucosa y colesterol

1. Soluciones

- Solución amortiguadora 0.04 M con KCl 0.1 M, pH 7.
- Solución enzimática de colesterol oxidasa 20 U/mL. Esta solución se preparó con solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y se almacenó en tubos eppendorf de 1.5 mL a 4°C.
- Solución enzimática de glucosa oxidasa de 6 U/ μL . Esta solución se preparó con solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y se almacenó en tubos eppendorf de 1.5 mL a 4°C.
- Solución patrón 50 mM de colesterol. La solución se preparó con una mezcla de Tritón X-100 al 1% v/v en etanol. Esta solución se debe realizar antes del análisis.
- Solución patrón 50 mM de glucosa. La solución se prepara un día antes de realizar el análisis y se refrigera hasta su uso.

2. Construcción del dispositivo biparamétrico

En un disco de 10 mm de diámetro (papel filtro, Whatman 41) se colocaron 10 μL de solución enzimática de glucosa y 50 μL de una solución enzimática de colesterol. Los discos se secaron a 25 °C en una incubadora por 45 min. Posteriormente, el disco de papel fue colocado en un electrodo serigrafiado de carbón (DropSens 110) para así cubrir los tres electrodos. Una vez colocado el disco en el electrodo, se

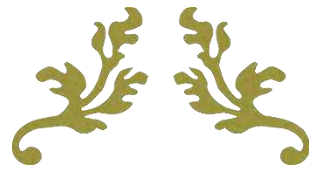
adicionaron 10 μL de la solución de ferricianuro; el cual actúa como mediador del sistema. Finalmente, se agregan 20 μL de una mezcla de glucosa y colesterol y se lleva a cabo el análisis. La metodología empleada para este dispositivo es análoga a la empleada en la construcción y evaluación de los biosensores de glucosa y colesterol.

3. Análisis de muestras reales

Para comprobar la eficiencia de la metodología propuesta con el dispositivo biparamétrico, se analizaron seis muestras mediante redes neuronales. Las muestras seleccionadas fueron leches saborizadas, cuya formulación contiene los dos analitos de interés.

La muestra de leche recibió un pretratamiento para precipitar las proteínas presentes en ella. La metodología empleada fue la siguiente: se tomaron 2 mL de leche y se colocaron en un tubo cónico de polipropileno (15 mL), posteriormente se adicionaron 6 mL de metanol. La mezcla se agitó por 1 min en agitador vórtice, esto para homogenizar la solución, y posteriormente se centrifugó por 10 min a 2,500 rpm. Una vez obtenido el suero, se tomó 1 mL de este y se aforó a 10 mL con buffer de fosfato; para posteriormente llevar a cabo su análisis [64-65].

Como metodología de contraste se empleó la espectrofotometría de UV-Vis utilizando kits enzimáticos de glucosa y colesterol, respectivamente. La metodología empleada para este método fue la recomendada por el fabricante. En dicha metodología se emplean 2 mL del kit enzimático de glucosa o colesterol, según sea el caso y 20 μL de la muestra. Los resultados obtenidos fueron comparados con los que se obtuvieron por el método electroquímico empleando redes neuronales artificiales como herramienta de procesamiento.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES



4.1 Evaluación del procesamiento mediante redes neuronales artificiales empleando una simulación teórica de respuesta.

Para obtener los datos voltamperométricos y cronoamperométricos se construyó una matriz de concentraciones para así obtener las diferentes mezclas de glucosa y colesterol. La matriz de concentraciones se obtuvo a partir de un diseño de experimentos central compuesto (Tabla IV.1) y el intervalo seleccionado para glucosa fue de 0.5-7 mM y de 2-11 mM para colesterol. Las concentraciones empleadas en el diseño de experimentos fueron seleccionadas de acuerdo a los niveles de referencia de glucosa y colesterol presenten en suero sanguíneo; ya hasta el momento no se tienen valores de referencia de estos analitos en alimentos [68].

Una vez obtenida la matriz, se procedió a realizar la simulación con el programa DigiElch[®] empleando las constantes de transferencias y condiciones mencionadas en el capítulo 3. Es importante mencionar que los datos se generan de manera independiente para cada uno de los analitos y que el voltamperograma o cronoamperograma correspondiente a cada una de las mezclas, es obtenido mediante la suma de los datos de cada analito a la concentración y potencial o tiempo respectivos.

Tabla IV.1 Matriz de concentraciones empleada en la simulación teórica.

Mezcla	Glucosa (mM)	Colesterol (mM)
1	1.45	3.32
2	6.05	3.32
3	1.45	9.68
4	6.05	9.68
5	0.50	6.50
6	7.00	6.50
7	3.75	2.00
8	3.75	11.00
9	3.75	6.50

Los datos voltamperométricos obtenidos (Figura IV.1) posteriormente fueron procesados mediante redes neuronales artificiales empleando el procesador Matlab[®]. Para el procesamiento se utilizaron cuatro pretratamientos de datos para evaluar la diferencia que estos tenían al ser procesados mediante redes neuronales.

Los cuatro pretratamientos seleccionados para el conjunto de datos de entrada fueron los siguientes: datos sin tratamiento, datos normalizados, matriz reducida y matriz reducida y normalizada.

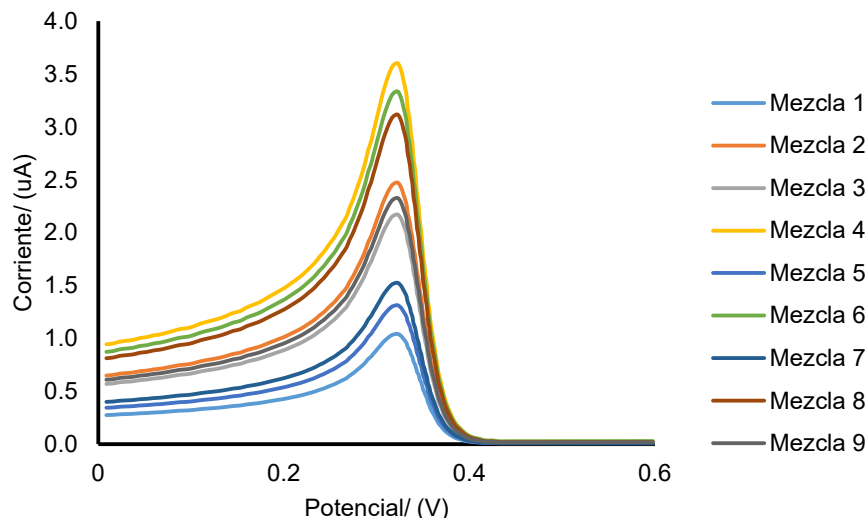


Figura IV.1 Voltamperogramas obtenidos a partir de una simulación teórica.

Los datos fueron normalizados empleando una ecuación que permitía obtener valores de entre -1 y 1, el cual es el intervalo adecuado para la función de transferencia tangente sigmoidea; puesto que esta es la función utilizada en este estudio. Para la normalización de los datos de entrada y de salida se empleó la ecuación 1; en donde p es el valor a normalizar, p^{min} es el elemento con el menor valor del conjunto de datos, p^{max} es el elemento con valor máximo del conjunto y p^n es el valor normalizado [69].

$$p^n = \frac{2(p-p^{min})}{p^{max}-p^{min}} - 1 \quad (4.1)$$

Para obtener la matriz reducida de datos se utilizó el método de stepwise; este método selecciona un modelo en el que añade o remueve predictores, paso a paso, basándose en un estadística significativa (las cuales pueden ser pruebas t student o pruebas de Fisher), este procedimiento se realizó empleando el programa Minitab®. El resultado de este procedimiento es un modelo simple. En este modelo se pueden controlar los niveles de significancia y los procesos de añadir o remover

términos [70]. En este estudio en particular se empleó un α de 0.15 para añadir y remover términos y Minitab® para el procesamiento stepwise.

Una vez obtenidos los diferentes conjuntos de datos, la información fue procesada por redes neuronales artificiales. Para emplear esta herramienta quimiométrica se utilizó un aprendizaje supervisado, por lo que se contó con un conjunto de entrada, un conjunto objetivo y un conjunto de salida; el tamaño de la matriz varió de acuerdo al pretratamiento dado para el conjunto original de datos. En el conjunto de datos sin tratamiento se emplearon los datos obtenidos mediante la simulación voltamperométrica, para los datos normalizados se emplearon los datos originales y estos fueron posteriormente codificados utilizando la ecuación 4.1. Para obtener la matriz reducida se emplearon los datos originales y estos fueron procesados por el método de stepwise para así obtener los datos significativos, posteriormente esta matriz reducida fue normalizada y de esta forma se obtuvo el cuarto pretratamiento.

El tamaño de las matrices presentadas en la Tabla IV.2 se obtuvieron de la siguiente manera: para el conjunto de entrada en el primer pretratamiento se seleccionaron los 129 potenciales obtenidos a través de la simulación voltamperométrica, lo cual corresponde al número de filas de la matriz y las nueve columnas corresponden a número de mezclas empleadas en el análisis obteniendo así una matriz de 129x9. Para el segundo pretratamiento el tamaño de la matriz es el mismo, la diferencia es la normalización de los datos. En el tercer pretratamiento se seleccionaron dos potenciales, obtenidos a través del método stepwise, los cuales corresponden al número de filas y las nueve columnas corresponden al número de mezclas empleadas. El tamaño de la matriz del pretratamiento cuatro se obtuvo de la misma manera que el mencionado anteriormente.

Para el conjunto objetivo y el conjunto de salida, el tamaño de la matriz es igual. Las dos filas corresponden a cada uno de los analitos, en este caso glucosa y colesterol, y las nueve columnas corresponden a las concentraciones de cada uno de estos analitos presenten en las mezcla, obteniendo así una matriz de 2x9.

Tabla IV.2 Tamaño de las matrices empleadas en redes neuronales artificiales para el conjunto de datos voltamperométricos.

Pretratamiento de datos	Conjunto de entrada	Conjunto objetivo	Conjunto de salida
Sin tratamiento	129x9	2x9	2x9
Normalizado	129x9	2x9	2x9
Reducida	2x9	2x9	2x9
Reducida y normalizada	2x9	2x9	2x9

En todos los estudios mediante redes neuronales se utilizó como función de transferencia en las capas ocultas tangente sigmoidea y en la capa de salida la función de transferencia lineal; ya que son las más recomendadas para la redes neuronales multicapas con retropropagación. El algoritmo utilizado fue Levenberg-Marquardt, ya que este reduce el número de iteraciones y es rápido y eficaz para resolver matrices de tamaño moderado. La regla de aprendizaje empleada fue la de gradiente descendente de momentos, este fue seleccionado ya es capaz de compensar errores en la red neuronal y puede corregir la orientación de los vectores que no actúan de acuerdo a la tendencia de los datos [69].

Los parámetros de la arquitectura a evaluar fueron el número de capas ocultas y el número de neuronas en cada capa oculta. Dado que el número de neuronas en la capa oculta es uno de los factores que pueden disminuir el funcionamiento adecuado de la red [43], se decidió evaluar este parámetro en un intervalo de 5 a 30, para así observar el efecto que se tenía empleando un bajo, medio y elevado número de neuronas en la capa oculta. En tanto que para el número de capas se empleó un intervalo de 2 a 6 capas ocultas.

Las estructuras de las redes presentadas en la Tabla IV.3 se obtuvieron mediante la evaluación del número de capas ocultas y el número de neuronas en cada capa empleando el método univariante. El número de neuronas en la capa de entrada corresponde a los potenciales seleccionados para cada uno de los pretratamientos, el número de neuronas en la capa de salida corresponde al número de analitos a cuantificar y el número de neuronas y capas ocultas se seleccionaron de acuerdo al porcentaje de error relativo (%REP) obtenido en cada una de las redes neuronales.

Para obtener el %REP se realizó una comparación entre las concentraciones de cada uno de los analitos obtenidas mediante redes neuronales y las concentraciones conocidas presentadas en la Tabla IV.1. Tomando como mejor estructura de la red, aquella que presentó un menor %REP.

Tabla IV.3 Porcentajes de error relativo (%REP) obtenidos en el procesamiento de datos voltamperométricos mediante redes neuronales.

Matriz	Estructura de la red ¹	%REP	
		Glucosa	Colesterol
Sin tratamiento	129-(15-15-2)-2	11.93	12.98
Normalizado	129-(30-30-30-30-30-2)-2	7.13	10.46
Reducida	2-(15-15-15-15-2)-2	2.95	6.86
Reducida y normalizada	2-(10-10-2)-2	18.29	12.48

¹Estructura de la red: datos de entrada-(capas ocultas-capa de salida)- datos de salida

Los mejores resultados utilizando los datos voltamperométricos se obtuvieron empleando una matriz reducida y una estructura de la red con cinco capas ocultas y 15 neuronas en cada una de las capas. Al emplear una matriz reducida se extrae la información significativa del conjunto de datos original, lo que ocasiona que la red neuronal procese de manera más rápida la información y el resultado obtenido sea similar al esperado. El número de neuronas en las capas ocultas es el adecuado, ya que un número menor de neuronas (5 neuronas) puede provocar que no se realice de manera correcta las conexiones en la red y esto provoque un mayor porcentaje de error [43].

En cuanto a los datos cronoamperométricos (Figura IV.2), se realizó el mismo procedimiento que para los datos voltamperométricos. Al conjunto de datos obtenidos igualmente se le realizaron cuatro pretratamientos (sin normalizar, normalizado, matriz reducida y matriz reducida y normalizada), la matriz reducida se obtuvo de igual forma empleando el método de stepwise con un α de 0.15 mediante Minitab® y la normalización de los datos se realizó utilizando la ecuación 4.1.

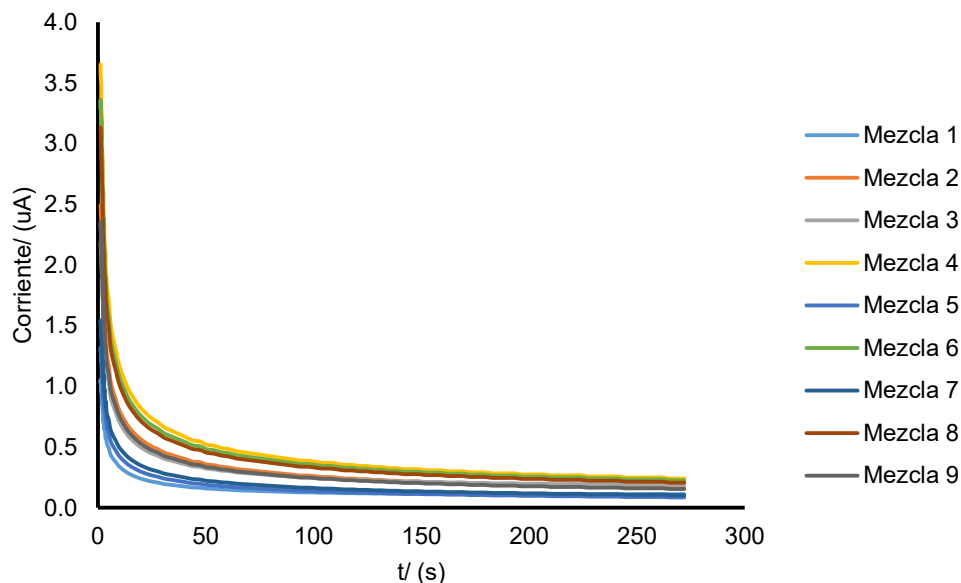


Figura IV.2. Cronoamperogramas obtenidos a partir de una simulación teórica.

Las matrices presentadas en la Tabla IV.4 se emplearon para la construcción de las redes neuronales. Para los datos sin tratamiento y normalizados, los 109 datos de la matriz del conjunto de entrada corresponden a las intensidades de corriente obtenidas para cada de las mezclas mediante la simulación y las nueve columnas corresponden al número de mezclas empleadas en la simulación obteniendo de esta manera una matriz de 109x9. En el caso de matrices reducidas y normalizadas, las dos filas corresponden a las intensidades de corriente únicamente seleccionando dos tiempos (esto empleando el método de stepwise) y las nueve columnas corresponden al número de mezclas. En las matrices del conjunto objetivo y el conjunto de salida, las dos filas corresponden a las concentraciones de los analitos y las nueve columnas al número de mezclas empleadas.

Tabla IV.4 Tamaño de las matrices empleadas en redes neuronales utilizando el conjunto de datos cronoamperométricos.

Pretratamiento de datos	Conjunto de entrada	Conjunto objetivo	Conjunto de salida
Sin tratamiento	109x9	2x9	2x9
Normalizado	109x9	2x9	2x9
Reducida	2x9	2x9	2x9
Reducida y normalizada	2x9	2x9	2x9

Al igual que en los datos obtenidos de la simulación voltamperométrica, los parámetros a evaluar fueron el número de neuronas en cada capa y el número de capas ocultas. Se emplearon los intervalos mencionados con anterioridad para cada uno de los parámetros y el procedimiento para obtener el %REP fue el mismo, comparar la concentración conocida con la concentración obtenida mediante el análisis por redes neuronales para cada uno de los analitos. En la Tabla IV.5 se presentan los resultados obtenidos empleando redes neuronales, en los cuales para la estructura de la red se emplean 109 neuronas de entrada correspondientes a las intensidad de corrientes, esto para la matriz sin tratamiento y normalizada y dos neuronas en el caso de las matrices reducidas y normalizadas. El número de capas ocultas se seleccionó de acuerdo a la estructura que presentó el menor porcentaje de error relativo.

Tabla IV.5 Porcentajes de error relativo (%REP) obtenidos en el procesamiento de datos cronoamperométricos mediante redes neuronales.

Matriz	Estructura de la red	%REP	
		Glucosa	Colesterol
Sin tratamiento	109-(10-10)-2-2	11.65	12.32
Normalizado	109-(25-25-25-25)-2-1	28.68	35.14
Reducida	2-(30-30-30)-2-2	10.80	9.51
Reducida y normalizada	2-(30-30-30)-2-2	2.34	13.3

Los menores porcentajes de error se obtuvieron con una matriz reducida y una estructura de la red de cuatro capas ocultas y 30 neuronas en cada capa; sin embargo los porcentajes de error no son menores a los obtenidos con los datos voltamperométricos. Además el número de neuronas es un poco elevado lo que puede ocasionar que al ingresar nuevos datos de entrada a la red neuronal está no actué de manera óptima. Debido a los resultados obtenidos en ambos análisis y las tendencias observadas, se decidió trabajar con la voltamperometría lineal en la fase experimental y realizar una reducción de la matriz de datos, esto con el fin de mejorar el procesamiento mediante redes neuronales artificiales.

4.2 Biosensor de glucosa

El biosensor de glucosa construido se evaluó en un intervalo de concentración de 0.25-7 mM (Figura IV.3). En donde se observó que el intervalo de trabajo óptimo de este biosensor es de 0.25-4 mM de glucosa, los puntos posteriores a este intervalo no presentan un aumento en la intensidad de corriente registrada por lo que se atribuye que la enzima ha sido saturada y no puede transformar completamente al sustrato añadido.

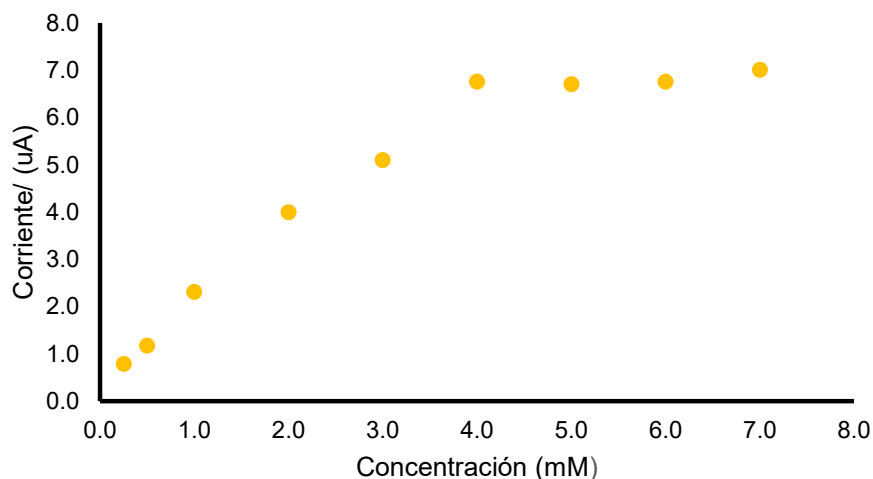


Figura IV.3 Intervalo estudiado para el biosensor de glucosa.

Una vez obtenido el intervalo de trabajo, se construyó una curva de calibración (Figura IV.4) en el intervalo de respuesta lineal para obtener los siguientes parámetros analíticos: una sensibilidad de $1.34 \pm 0.09 \mu\text{A}/\text{mM}$, una ordenada a la origen de $0.50 \pm 0.20 \mu\text{A}$, un coeficiente de determinación de 0.9935 con un límite de detección de 0.34 mM.

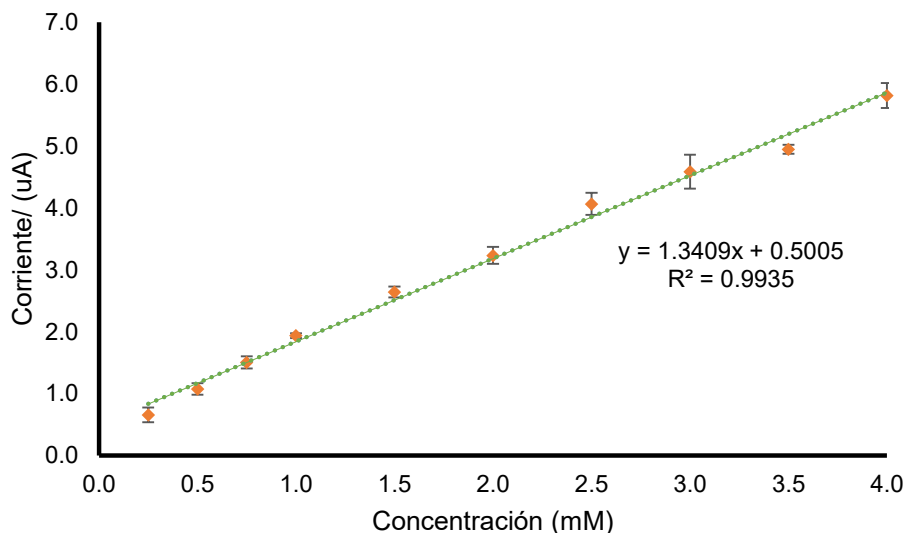


Figura IV.4 Curva de calibración construida para el biosensor de glucosa.

La evaluación de la precisión se llevó a cabo mediante el proceso de repetibilidad, en el cual se estudió la variabilidad del biosensor construido efectuando una serie de análisis, tanto intradía como interdía. Para este análisis se emplearon las concentraciones de 1, 2.5 y 4 mM y para su evaluación se compararon con lo reportado por la ecuación de Howirtz, que de acuerdo con el intervalo de trabajo seleccionado, se considera aceptable una precisión $\leq 5.3\%$ [71]. Los resultados obtenidos para la precisión intradía ($n=9$) fue un porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) de entre 0.93 y 3.10%; en tanto para la precisión interdía ($n=9$) se obtuvo un %DER de entre 1.99 y 4.11%. En ambos casos se cumplen con los criterios dados por la ecuación de Howirtz, por lo que se considera que las mediciones obtenidas con el biosensor son aceptables.

En la Tabla IV.6, se realiza una comparación entre los electrodos que se encuentran reportados y el electrodo construido en este trabajo. La sensibilidad analítica presentada por el electrodo construido es mayor que la reportada para algunos electrodos [34,37]. El intervalo de trabajo seleccionado para el electrodo presentado en este trabajo coincide con los reportados en la literatura [34,37,73]. En algunos de ellos se emplean materiales conductores para mejorar los parámetros analíticos; sin embargo, esto impacta en el costo del biosensor. Una de las ventajas que ofrece

el biosensor presentado en este trabajo, es que su construcción es más sencilla e igual de eficaz que los biosensores reportados.

Tabla IV.6 Comparación de los parámetros analíticos en biosensores de glucosa.

Composición del biosensor	Matriz	Límite de detección	Intervalo lineal	Sensibilidad	Ref.
Nafion, GOx, electrodo de carbón pirolítico.	Vino	0.08 mM	0.02-4 mM	0.01 μ A/mM	34
Hidrogel de calcio, GOx, HRP, TMB	Sangre	0.01 mM	0-4 mM	0.36 μ A/mM	37
GOx, HRP, electrodo serigrafiado de carbón.	Jugo de naranja	0.11 mM	0.05-0.7 mM	1.98 μ A/mM	72
GOx, disco de papel, electrodo serigrafiado de carbón con azul de Prusia.	Suplemento energético	0.01 mM	0.25-2 mM	2.14 μ A/mM	73
Nanotubos de carbono, GOx	Suero sanguíneo	0.07 mM	0.04-1 mM	2.40 μ A/mM	74
Gox, disco de papel, electrodo serigrafiado de carbón.	Jugo de uva	0.34 mM	0.34-4 mM	1.34 μ A/mM	Este trabajo

GOx: glucosa oxidasa, HRP: peroxidasa de rabano, TMB: 3,3', 5,5'- tetrametilbencidina

Para comprobar la aplicación del biosensor en muestras reales, se emplearon tres muestras comerciales de jugo de uva en los cuales se determinó el contenido de glucosa. Los resultados obtenidos se compararon con el método de referencia (espectrofotometría de UV-Vis/ kit enzimático). En la Tabla IV.7 se presentan las concentraciones obtenidas para cada muestra empleando el biosensor de glucosa y el kit enzimático, en ella podemos observar que los resultados no difieren significativamente uno del otro. Para comprobar si los métodos diferían significativamente, se realizó una prueba de *t* de muestras emparejadas, a un nivel de confianza del 95%. En el cual se obtuvo un t_{cal} de 0.24 y una t_{crit} de 4.30, lo cual nos indica que no existen diferencias significativas entre ambas metodologías; por lo que el biosensor construido es adecuado para determinar glucosa en muestras alimentarias.

Tabla IV.7 Concentración de glucosa encontrada en muestras de jugo de uva.

Muestra	Biosensor	Kit enzimático
1	165.84 \pm 0.93	168.61 \pm 0.58
2	180.54 \pm 1.32	182.72 \pm 1.09
3	143.34 \pm 0.83	139.81 \pm 1.63

4.3 Biosensor de colesterol

Para el biosensor de colesterol se realizó un estudio en el intervalo de concentraciones de 0.05 a 6 mM (Figura IV.5), en el cual se obtuvo como resultado el intervalo lineal de trabajo comprendido de 0.05 a 0.5 mM. Las concentraciones mayores a 0.5 mM no presentan un incremento en la intensidad ni la estabilidad en la señal que se esperaba, lo cual podría indicar que se ha llegado al punto de saturación de la enzima.

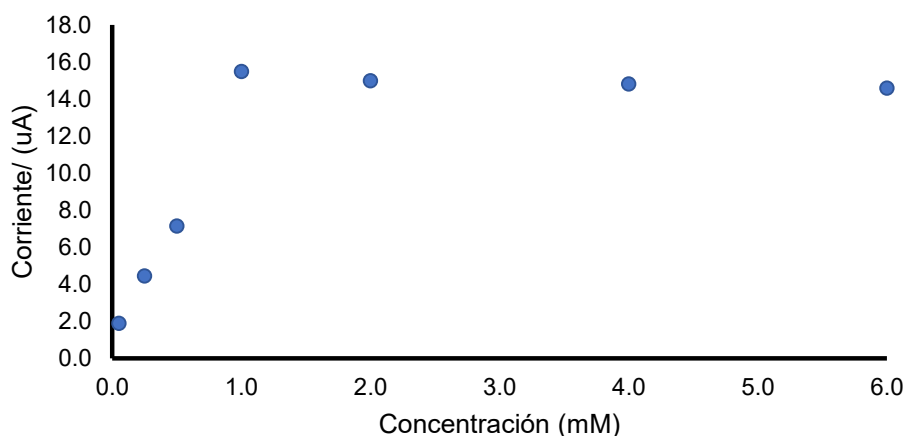


Figura IV.5 Intervalo de concentración estudiado en el biosensor de colesterol.

Con el intervalo lineal de trabajo seleccionado se realizó una curva de calibración (Figura IV.6), lo cual dio como resultado los siguientes parámetros analíticos: sensibilidad de $36.22 \pm 2.55 \mu\text{A}/\text{mM}$, una ordenada al origen de $0.86 \pm 0.79 \mu\text{A}$, un coeficiente de determinación de 0.9926 y un límite de detección de 0.04 mM.

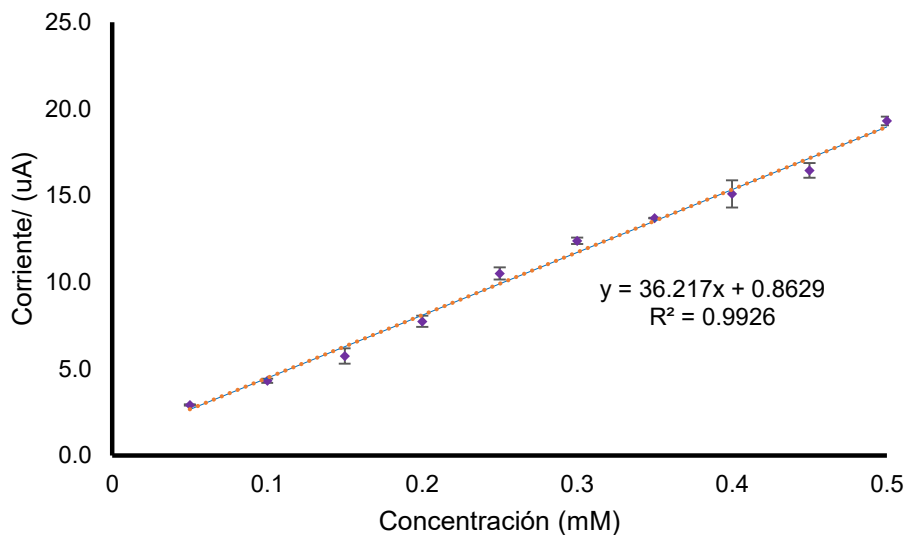


Figura IV.6 Curva de calibración obtenida empleando el biosensor de colesterol.

Los parámetros analíticos obtenidos se compararon con los reportados para otros biosensores de colesterol. En la Tabla IV.8 se puede observar que la sensibilidad presentada por el dispositivo construido en este trabajo supera la sensibilidad de otros biosensores que incorporan materiales costosos (nanopartículas de oro, nanotubos de carbono u óxidos metálicos) que en muchas ocasiones son utilizados para mejorar este parámetro analítico [73-78]. De igual forma el intervalo de trabajo lineal obtenido para el biosensor de colesterol, se encuentra dentro de los intervalos reportados para otros biosensores [75]. Una de las ventajas que tiene el biosensor construido sobre los ya reportados es su fácil construcción y que los materiales empleados son de menor costo.

Tabla IV.8 Biosensores de colesterol reportados para el análisis en muestras sanguíneas y alimentarias.

Composición del biosensor	Matriz	Límite de detección	Intervalo lineal	Sensibilidad	Ref.
AuE/ ditiol/ AuNPs/ MUA/ChOx	Suero sanguíneo	0.04 mM	0.04-0.22 mM	45.96 μ A/mM	75
ChOx/HRP/AuNPs/PDDA/ MWCNTs/GCE	Suero sanguíneo	0.02 mM	0.01-1.05 mM	18.6 μ A/mM	76
CSNF-AuNPs/ ChOx	Suero sanguíneo	0.05 μ M	0.001 -0.045 mM	1.02 μ A/mM	77
NiFe ₂ O ₄ /CuO/FeO-Ch/ ChOx	Suero sanguíneo	0.03 mM	0.13-12.95 mM	16.54 μ A/mM	78
G/PVP/PANI composite	Suero sanguíneo	1.00 μ M	0.05-10 mM	34.77 μ A/mM	79
ChOx, disco de papel, electrodo serigrafiado de carbón.	Yema de huevo	0.04 mM	0.05-0.5 mM	36.22 μ A/mM	Este trabajo

AuE: electrodo de oro, AuNPs: nano partículas de oro, MUA: ácido 11-mercaptoundecanoico, ChOx: colesterol oxidasa, HRP: peroxidasa de rábano, PANI: polianilina, PDDA: poli-(dimetil dialil amonio), PVP: poli (vinilpirrolidina), MWCNTs: nanotubos de carbono multipared, G: grafeno, GCE: electrodo de carbón vítreo, CSNF: nanofibra de quitosan, Ch: quitosan.

La evaluación de la precisión, al igual que en el biosensor de glucosa, se llevó a cabo mediante el proceso de repetibilidad, en el cual se estudió la variabilidad del biosensor construido efectuando una serie de análisis, tanto intradía e interdía. Los análisis intradía e interdía se llevaron a cabo empleando las concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 mM el %DER para la prueba intradía (n=9) fue de 0.92-2.85%, en tanto que para la prueba interdía (n=9) el %DER fue de 4.67-5.51%. Para el intervalo de concentración seleccionado la ecuación de Howirtz considera aceptable una precisión $\leq 7.3\%$ [71].

La aplicación del biosensor se llevó a cabo empleando una muestra de yema de huevo. El análisis se realizó por triplicado y el contraste del método se realizó frente a un kit enzimático de espectrofotometría de UV-vis. La concentración obtenida mediante el biosensor de colesterol fue de 604.20 ± 2.33 mg de colesterol/ 100 g de alimento; en tanto para el método espectrofotométrico arrojó una concentración de 690.93 ± 0.53 mg de colesterol/ 100 g de alimento. Para contrastar los resultados obtenidos, se empleó una prueba *t* de muestras emparejadas en donde se

encontraron diferencias significativas entre ambas metodologías ($t_{cal}: 27.42 > t_{crit}: 12.71$).

La diferencia entre ambas metodologías se atribuye al mecanismo empleado en cada uno de los métodos. En el biosensor de colesterol se encuentra presente la colesterol oxidasa que detecta al colesterol libre presente en la muestra y posteriormente este se transforma en 4-colestenona, mientras que en el método espectrofotométrico, la colesterol esterasa reacciona con el colesterol total de la muestra dando como resultado el colesterol libre y posteriormente este reacciona con la colesterol oxidasa para dar como producto la 4-colestenona [11]. El aumento en la concentración en el método espectrofotométrico, puede deberse a que el colesterol que no fue hidrolizado reaccionó con la colesterol esterasa, dando como resultado una mayor concentración de colesterol. El esquema de reacción se representa en la Figura IV.7.

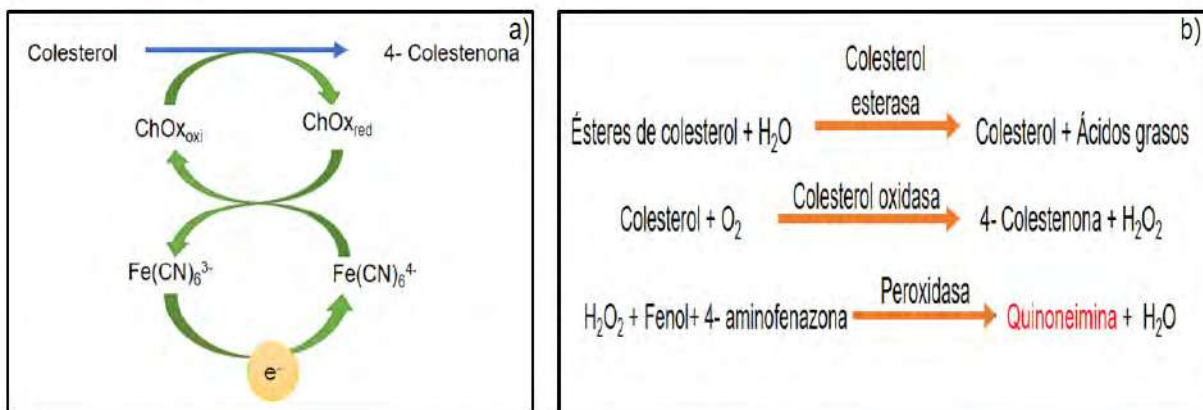


Figura IV.7 Esquema de reacciones. a) Método electroquímico y b) método espectrofotométrico [11].

4.4 Determinación simultánea de glucosa y colesterol.

Para el análisis simultáneo de las analitos se construyeron dos conjuntos de mezclas binarias, cada uno estuvo compuesto por nueve mezclas de glucosa y colesterol, las concentraciones utilizadas en cada uno de los conjuntos corresponden a los intervalos de trabajo encontrados en los biosensores de glucosa y colesterol, respectivamente. Para definir la composición de las mezclas se empleó un diseño de experimento central compuesto. En las Tablas IV.9 y IV.10, se enlistan

la composición de las mezclas obtenidas. El conjunto de mezclas presentado en la Tabla IV.9, se empleó para la calibración en el método de redes neuronales artificiales y el conjunto de mezclas enlistado en la Tabla IV.10 se utilizó para la validación del modelo.

Tabla IV.9 Composición de las mezclas del conjunto de calibración empleado en redes neuronales artificiales.

No. Mezcla	Glucosa (mM)	Colesterol (mM)
1	1.00	0.20
2	0.59	0.30
3	3.00	0.40
4	2.00	0.44
5	1.00	0.40
6	2.00	0.16
7	3.00	0.20
8	3.41	0.30
9	2.00	0.30

Tabla IV.10 Composición de las mezclas del conjunto de validación utilizado en el modelo de redes neuronales artificiales.

No. Mezcla	Glucosa (mM)	Colesterol (mM)
1	2.00	0.23
2	1.24	0.23
3	2.71	0.23
4	2.50	0.15
5	2.50	0.30
6	1.50	0.30
7	1.50	0.15
8	2.01	0.12
9	2.00	0.33

En la aplicación de redes neuronales artificiales para el análisis simultáneo de glucosa y colesterol, se seleccionó la mejor red neuronal; para ello se compararon diferentes arquitecturas construidas y validadas empleando un modelo de predicción, en este caso el conjunto de validación (Tabla IV.10). La arquitectura de la red consistió en una capa de entrada, capas ocultas y una capa de salida. El número de neuronas en la capa de entrada fue igual al número de variables independientes, en este caso en particular se eligieron 32 potenciales los cuales fueron seleccionados por el método de stepwise [36]. Para llevar a cabo la selección de los potenciales, los datos obtenidos mediante las mediciones

voltamperométricas fueron centrados y posteriormente evaluados mediante la metodología de Stepwise. El número de neuronas en la capa de salida corresponde al número de variables de salida, en este estudio es la concentración de glucosa y colesterol.

El número de neuronas en la capa oculta fue obtenido a partir de la mejor arquitectura que presentaba la red neuronal artificial, para la selección del número de neuronas se creó una red neuronal con un número determinado de neuronas (se evaluaron de 5 a 30 neuronas) y se seleccionó la función de transferencia. La red fue entrenada con el conjunto de calibración (Tabla IV.9), considerando 70% de los datos para el aprendizaje, 15% para el monitoreo y 15% como prueba de la red. Posteriormente se obtuvieron los errores de las diferentes arquitecturas y se seleccionó la red que presentó el menor error. Los parámetros a evaluar fueron el error cuadrático medio (MSE), el porcentaje de error relativo (%REP) y la raíz del error cuadrático medio para los analitos (RMSE) [50].

La mejor arquitectura para este estudio se obtuvo empleando la función de transferencia tangente sigmoidea en las capas ocultas y la función lineal para la capa de salida. El algoritmo de entrenamiento fue el Levenberg- Marquardt, ya que de acuerdo a lo reportado a la literatura es el más apropiado para las redes neuronales multicapa [52].

De acuerdo a porcentajes de error relativo obtenidos empleando el conjunto de calibración, la mejor estructura de la red está compuesta por dos capas ocultas y 25 neuronas en cada una de las capas ocultas. Teniendo como estructura 32 neuronas en la capa de entrada, correspondientes a los potenciales seleccionados, 25 neuronas en las capas ocultas y dos neuronas en las capa de salida, las cuales corresponden a cada uno de los analitos. Dando como resultado una arquitectura de 32-25-25-2-2.

Para la arquitectura antes mencionada se realizaron 32 iteraciones y la función de transferencia para cada una de las capas ocultas fue tangente sigmoidea. Se obtuvo un RMSE de entrenamiento de 0.421 mM, un RMSE de monitoreo de 0.894 mM y

un RMSE de prueba de 0.071 mM. Los porcentajes de error relativo obtenidos para cada uno de los analitos empleando el conjunto de entrenamiento se enlistan en la Tabla IV.11, en donde se observan que los porcentajes son menores al 5% por lo que la red es adecuada para ser empleada en el conjunto de validación

Tabla IV.11 Parámetros optimizados y errores obtenidos en la red neuronal artificial empleando el conjunto de entrenamiento.

	Glucosa	Colesterol
RMSE, P* (mM)	0.170	0.011
REP* (%)	3.44	4.87

*Errores obtenidos entre el valor nominal y el estimado en set de calibración

Después de optimizar la red neurona con el conjunto de calibración, el set de validación fue empleado para corroborar la precisión y exactitud de la red. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla IV.12. Los porcentajes de error obtenidos son menores al 10%, por lo que se considera que el modelo es aceptable [40].

Tabla IV.12 Errores obtenidos entre el valor nominal y el estimado en el conjunto de validación

	Glucosa	Colesterol
RMSEP (mM)	0.251	0.049
%REP	8.29	9.34

El entrenamiento y validación de la red se realizaron durante tres días consecutivos (n=3). En la Figura IV.8a y IV.8b, se presentan los valores estimados frente a los valores nominales del set de validación y entrenamiento.

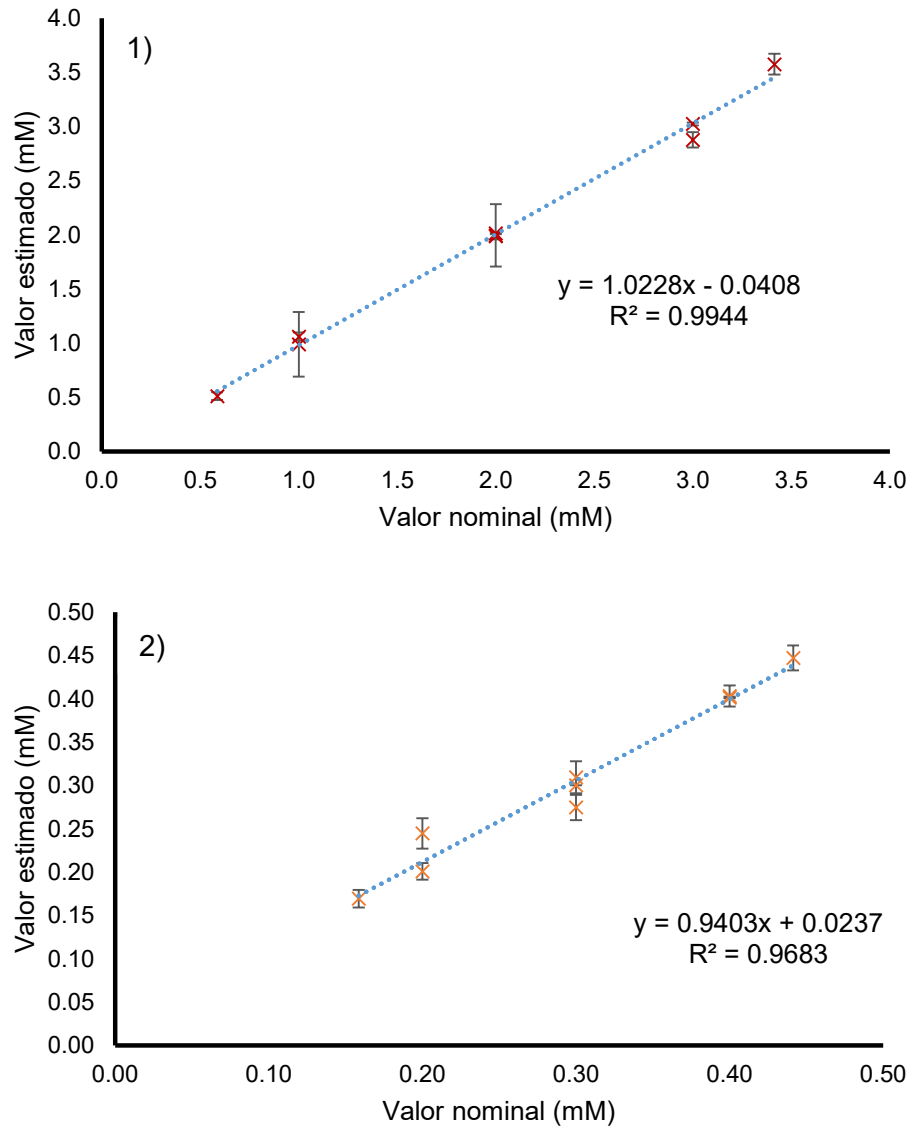


Figura IV.8a Concentración nominal frente concentración estimada en el set de entrenamiento (n=3) 1) glucosa, 2) colesterol.

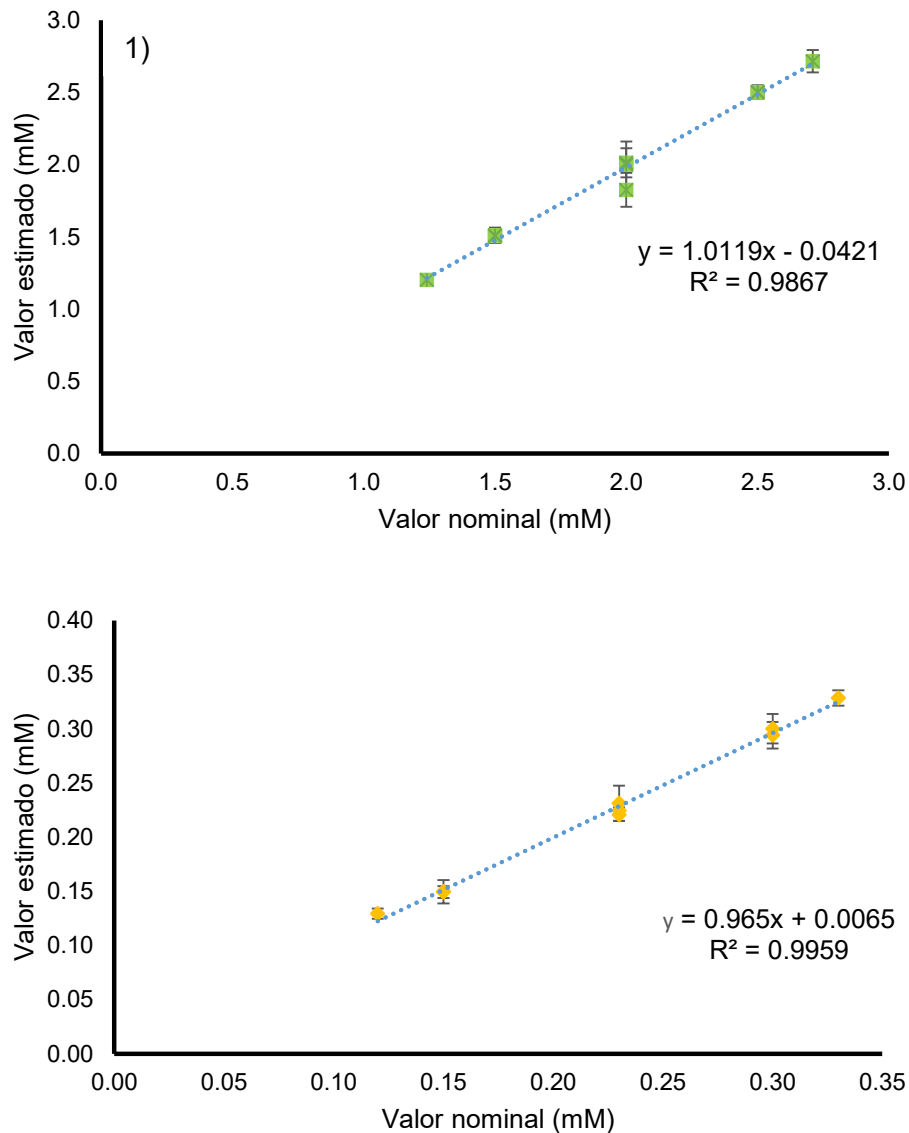
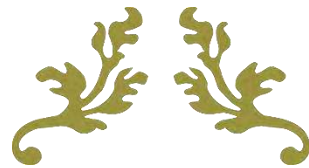


Figura IV.8b. Concentración nominal frente a concentración estimada en el set de validación (n=3) 1) glucosa, 2) colesterol

El método propuesto se aplicó para determinar glucosa y colesterol en muestras de leche saborizada. Los resultados obtenidos se contrastaron con el método de referencia (espectrofotometría de UV-vis). Para contrastar la metodología propuesta empleando redes neuronales artificiales con el método de referencia se empleó una prueba t de muestras emparejadas. El valor t_{cal} para glucosa fue de 0.99 en tanto para colesterol fue de 3.41, la t_{crit} en ambos casos fue de 2.57; por la que metodología podría implementarse para el análisis de glucosa en muestras

alimentaria. Aunque la metodología muestra diferencias significativas con el método de referencia, esta podría emplearse para la detección de colesterol total.

.

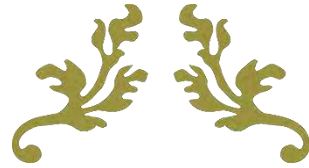


CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS



- El biosensor de glucosa construido presenta una sensibilidad de 1.34 ± 0.09 $\mu\text{A}/\text{mM}$, y un límite de detección de 0.34 mM. El dispositivo se probó frente a una muestra de jugo de uva comercial y la metodología propuesta no presentó diferencias significativas con el método de referencia. Por lo que el biosensor diseñado en este estudio, puede ser empleado para la determinación de glucosa en muestras alimentarias.
- El biosensor de colesterol diseñado tiene una sensibilidad de 36.22 ± 2.55 $\mu\text{A}/\text{mM}$ y un límite de detección de 0.04 mM. Dicho dispositivo se probó en una muestra de yema de huevo y aunque el método muestra diferencias significativas con la metodología de referencia. El biosensor compite con otros biosensores de colesterol reportados con anterioridad y podría emplearse en la detección de colesterol libre.
- Se construyó un dispositivo biparamétrico para la detección simultánea de glucosa y colesterol con el cual se obtuvieron porcentajes de error menores al 10% empleando redes neuronales como modelo de análisis de datos.
- El modelo se probó en muestras de leche saborizadas y los resultados se contrastaron con el método de referencia (kit enzimático). Aunque se encontraron diferencias significativas en las mediciones de colesterol. El dispositivo podría ser empleado para la detección simultánea de glucosa y colesterol libre empleando redes neuronales como herramienta de procesamiento.
- La metodología desarrollada en este trabajo servirá como sistema para la incorporación de la enzima lipasa para así detectar de manera simultánea glucosa, colesterol y triglicéridos.



CAPÍTULO VI

REFERENCIAS



-
- [1]. Ahmad, R., Tripathy, N., Park, J.-H., & Hahn, Y.-B. (2015). A comprehensive biosensor integrated with a ZnO nanorod FET array for selective detection of glucose, cholesterol and urea. *Chemical Communications*, 51(60), 11968-11971.
 - [2]. Saxena, U., & Das, A. B. (2016). Nanomaterials towards fabrication of cholesterol biosensors: Key roles and design approaches. *Biosensors and Bioelectronics*, 75, 196-205.
 - [3]. Huang, Q., An, Y., Tang, L., et. al. (2011). A dual enzymatic-biosensor for simultaneous determination of glucose and cholesterol in serum and peritoneal macrophages of diabetic mice: Evaluation of the diabetes-accelerated atherosclerosis risk. *Analytica Chimica Acta*, 707(1), 135-141.
 - [4]. Shendurse, A. M., & Khedkar, C. D. (2016). Glucose: Properties and Analysis. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. B. T.-E. of F. and H. Toldrá (Eds.) (pp. 239-247). Oxford: Academic Press.
 - [5]. Galant, A. L., Kaufman, R. C., & Wilson, J. D. (2015). Glucose: Detection and analysis. *Food Chemistry*, 188, 149-160.
 - [6]. Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of clinical Biochemistry*, 6(1), 24-27.
 - [7]. Ma, J., Hou, X., Zhang, B., Wang, Y., & He, L. (2014). The analysis of carbohydrates in milk powder by a new “heart-cutting” two-dimensional liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 91, 24-31.
 - [8]. Dai, J., Wu, Y., Chen, S., Zhu, S., Yin, H., Wang, M., & Tang, J. (2010). Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 629-635.
 - [9]. Uri, C., Juhász, Z., Polgár, Z., & Bánfalvi, Z. (2014). A GC–MS-based metabolomics study on the tubers of commercial potato cultivars upon storage. *Food Chemistry*, 159, 287-292.
 - [10]. Rovio, S., Yli-Kauhaluoma, J., & Sirén, H. (2007). Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection. *Electrophoresis*, 28(17), 3129-3135.
 - [11]. Dinh, T., & Thompson, L. (2016). Cholesterol: Properties, Processing Effects, and Determination. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. B. T.-E. of F. and H. Toldrá (Eds.) (pp. 60-69). Oxford: Academic Press.
 - [12]. Li, L.-H., Dutkiewicz, E. P., Huang, Y.-C., Zhou, H.-B., & Hsu, C.-C. (2018). Analytical methods for cholesterol quantification. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2018, 1-12.
-

-
- [13]. Kendall, F. E. (1952). A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *Journal of biological chemistry*, 195, 357-366.
- [14]. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., et.al. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry*, 20(4), 470-475.
- [15]. Kanai, M. (1964). Gas Chromatographic Separation of Sterols and Its Clinical Application. *The Journal of Biochemistry*, 56(3), 266-272.
- [16]. Duncan, I. W., Culbreth, P. H., & Burtis, C. A. (1979). Determination of free, total, and esterified cholesterol by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 162(3), 281-292.
- [17]. Cohen, A., Hertz, H. S., Mandel, J., et.al. (1980). Total serum cholesterol by isotope dilution/mass spectrometry: a candidate definitive method. *Clinical chemistry*, 26(7), 854-860.
- [18]. Bettazzi, F., Marraza, G., & Minunii, M. (2017). Biosensors and related bioanalytical tools. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 77, 1-33.
- [19]. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. *Analytical Letters*, 34(5), 635-659.
- [20]. Perumal, V., & Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(1), 1-15.
- [21]. Morrison, D. W., Dokmeci, M. R., Demirci, U. T. K. A. N., et.al. (2008). Clinical applications of micro-and nanoscale biosensors. *Biomedical nanostructures*, 1, 433-458.
- [22]. Wang, J. (2008). Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 814-825.
- [23]. Fowler, J. M., Wong, D. K., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2008). Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors.
- [24]. Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., & Li, G. (2008). Electrochemical sensors for clinic analysis. *Sensors*, 8(4), 2043-2081.
- [25]. Saxena, V., & Malhotra, B. D. (2003). Electrochemical biosensors. *Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensor*. JAI Press, Stamford, 63-100.
- [26]. McGuinness, R. (2007). Impedance-based cellular assay technologies: recent advances, future promise. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(5), 535-540.
-

-
- [27]. Abdulhalim, I., Zourob, M., & Lakhtakia, A. (2007). Overview of Optical Biosensing Techniques. *Handbook of Biosensors and Biochips*.
- [28]. de Mol, N. J., & Fischer, M. J. E. (2010). Surface Plasmon Resonance: A General Introduction BT - Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols. In N. J. Mol & M. J. E. Fischer (Eds.) (pp. 1-14).
- [29]. Francis, P. S. (2015). Chemiluminescence detection. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, 429-436.
- [30]. Dodeigne, C., Thunus, L., & Lejeune, R. (2000). Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta*, 51(3), 415-439.
- [31]. Lee, B., Roh, S., & Park, J. (2009). Current status of micro- and nano-structured optical fiber sensors. *Optical Fiber Technology*, 15(3), 209-221.
- [32]. Xie, B., Ramanathan, K., & Danielsson, B. (1999). Principles of Enzyme Thermistor Systems: Applications to Biomedical and Other Measurements BT - Thermal Biosensors, Bioactivity, Bioaffinity. In P. K. Bhatia, B. Danielsson, P. Gemeiner, et.al. (Eds.) (pp. 1-33). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [33]. Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153-159.
- [34]. Ghica, M. E., & Brett, C. M. A. (2005). Development of a Carbon Film Electrode Ferrocene- Mediated Glucose Biosensor. *Analytical Letters*, 38(6), 907-920.
- [35]. Periasamy, A. P., Chang, Y.-J., & Chen, S.-M. (2011). Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 80(2), 114-120.
- [36]. Nasri, Z., & Shams, E. (2013). A glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized onto glassy carbon electrode modified with nitrophenyl diazonium salt. *Electrochimica Acta*, 112, 640-647.
- [37]. Márquez, A., Jiménez-Jorquera, C., Domínguez, C., & Muñoz-Berbel, X. (2017). Electrodepositable alginate membranes for enzymatic sensors: An amperometric glucose biosensor for whole blood analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 97, 136-142.
- [38]. Basu, A. K., Chattopadhyay, P., Roychoudhuri, U., & Chakraborty, R. (2007). Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. *Bioelectrochemistry*, 70(2), 375-379.
-

-
- [39]. Khan, R., Kaushik, A., Solanki, P. R., Ansari, A. A., Pandey, M. K., & Malhotra, B. D. (2008). Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 616(2), 207-213.
- [40]. Gopalan, A. I., Lee, K.-P., & Ragupathy, D. (2009). Development of a stable cholesterol biosensor based on multi-walled carbon nanotubes-gold nanoparticles composite covered with a layer of chitosan-room-temperature ionic liquid network. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(7), 2211-2217.
- [41]. Ahmadalinezhad, A., & Chen, A. (2011). High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(11), 4508-4513.
- [42]. Krantz-Rülcker, C., Stenberg, M., Winqvist, F., & Lundström, I. (2001). Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review. *Analytica Chimica Acta*, 426(2), 217-226.
- [43]. Ajith, A. (2005). Artificial Neural Networks. Handbook of Measuring System Design, edited by Peter H. Sydenham and Richard Thorn.
- [44]. Basheer, I. A., & Hajmeer, M. (2000). Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *Journal of Microbiological Methods*, 43(1), 3-31.
- [45]. Kalogirou, S. A. (2001). Artificial neural networks in renewable energy systems applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 5(4), 373-401.
- [46]. Graupe, D. (2013). *Principles of artificial neural networks* (Vol. 7). World Scientific.
- [47]. Priddy, K. L., & Keller, P. E. (2005). *Artificial neural networks: an introduction* (Vol. 68). SPIE press.
- [48]. Staub, S., Karaman, E., Kaya, S., Karapınar, H., & Güven, E. (2015). Artificial neural network and agility. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 195, 1477-1485.
- [49]. Jain, A. K., Mao, J., & Mohiuddin, K. M. (1996). Artificial neural networks: a tutorial. *Computer*, 29(3), 31-44.
- [50]. Gardner, M. W., & Dorling, S. R. (1998). Artificial neural networks (the multilayer perceptron)—a review of applications in the atmospheric sciences. *Atmospheric Environment*, 32(14), 2627-2636.
- [51]. Himmelblau, D. M. (2000). Applications of artificial neural networks in chemical engineering. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 17(4), 373-392.
-

-
- [52]. Tonello, N., Moressi, M. B., Robledo, S. N., D'Eramo, F., & Marioli, J. M. (2016). Square wave voltammetry with multivariate calibration tools for determination of eugenol, carvacrol and thymol in honey. *Talanta*, *158*, 306-314.
- [53]. Gutés, A., Ibáñez, A. B., del Valle, M., & Céspedes, F. (2006). Automated SIA e-Tongue Employing a Voltammetric Biosensor Array for the Simultaneous Determination of Glucose and Ascorbic Acid. *Electroanalysis*, *18*(1), 82-88.
- [54]. Bachmann, T. T., Leca, B., Vilatte, F., Marty, J.-L., Fournier, D., & Schmid, R. D. (2000). Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks. *Biosensors and Bioelectronics*, *15*(3), 193-201.
- [55]. Crew, A., Lonsdale, D., Byrd, N., Pittson, R., & Hart, J. P. (2011). A screen-printed, amperometric biosensor array incorporated into a novel automated system for the simultaneous determination of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(6), 2847-2851.
- [56]. Gutés, A., Céspedes, F., Alegret, S., & del Valle, M. (2005). Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, *20*(8), 1668-1673.
- [57]. Cetó, X., Capdevila, J., Mínguez, S., & del Valle, M. (2014). Voltammetric BioElectronic Tongue for the analysis of phenolic compounds in rosé cava wines. *Food Research International*, *55*, 455-461.
- [58]. Torrecilla, J. S., Mena, M. L., Yáñez-Sedeño, P., & García, J. (2008). A neural network approach based on gold-nanoparticle enzyme biosensor. *Journal of Chemometrics*, *22*(1), 46-53.
- [59]. Ferentinos, K. P., Yialouris, C. P., Blouchos, P., et.al (2013). Pesticide residue screening using a novel artificial neural network combined with a bioelectric cellular biosensor. *BioMed research international*, 2013.
- [60]. Cetó, X., Céspedes, F., & del Valle, M. (2013). Assessment of Individual Polyphenol Content in Beer by Means of a Voltammetric BioElectronic Tongue. *Electroanalysis*, *25*(1), 68-76.
- [61]. Lobanov, A. V, Borisov, I. A., Gordon, S. H., Greene, R. V, Leathers, T. D., & Reshetilov, A. N. (2001). Analysis of ethanol–glucose mixtures by two microbial sensors: application of chemometrics and artificial neural networks for data processing. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(9), 1001-1007.
- [62]. García-Villar, N., Saurina, J., & Hernández-Cassou, S. (2001). Potentiometric sensor array for the determination of lysine in feed samples using multivariate
-

- calibration methods. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 371(7), 1001-1008.
- [63]. González López, E. (2016). Evaluación de biosensores amperométricos para el desarrollo de dispositivos multiparamétricos de interés biomédico (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
- [64]. Saby, C., Ortiz, B., Champagne, G. Y., & Bélanger, D. (1997). Electrochemical Modification of Glassy Carbon Electrode Using Aromatic Diazonium Salts. 1. Blocking Effect of 4-Nitrophenyl and 4-Carboxyphenyl Groups. *Langmuir*, 13(25), 6805-6813.
- [65]. Albuquerque, T. G., Oliveira, M. B. P. P., Sanches-Silva, A., & Costa, H. S. (2016). Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 193, 18-25.
- [66]. Vargas Mamani, M. C., Reyes Reyes, F. G., & Rath, S. (2009). Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 117(3), 545-552
- [67]. Dmitrienko, S. G., Kochuk, E. V, Tolmacheva, V. V, Apyari, V. V, & Zolotov, Y. A. (2015). Determination of the total content of some sulfonamides in milk using solid-phase extraction coupled with off-line derivatization and spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, 188, 51-56.
- [68]. Karunakaran, C., Madasamy, T., & Sethy, N. K. (2015). Chapter 3 - Enzymatic Biosensors. In C. Karunakaran, K. Bhargava, & R. B. T.-B. and B. Benjamin (Eds.) (pp. 133-04).
- [69]. Hagan, M. T., Demuth, H. B., Beale, M. H., & De Jesús, O. (1996). Neural network design (Vol. 20). Boston: Pws Pub..
- [70]. Sharma, M. J., & Yu, S. J. (2015). Stepwise regression data envelopment analysis for variable reduction. *Applied Mathematics and Computation*, 253, 126-134
- [71]. Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E., (2004) Trend in quality in the Analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 535- 552.
- [72]. Amor-Gutiérrez, O., Rama, E. C., Fernández-Abedul, M. T., & Costa-García, A. (2017). Bioelectroanalysis in a Drop: Construction of a Glucose Biosensor. *Journal of Chemical Education*, 94(6), 806-812.
- [73]. Chandra Sekar, N., Mousavi Shaegh, S. A., Ng, S. H., Ge, L., & Tan, S. N. (2014). A paper-based amperometric glucose biosensor developed with

-
- Prussian Blue-modified screen-printed electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204, 414-420.
- [74]. Gupta, S., Prabha, C. R., & Murthy, C. N. (2016). Functionalized multi-walled carbon nanotubes/polyvinyl alcohol membrane coated glassy carbon electrode for efficient enzyme immobilization and glucose sensing. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(4, Part A), 3734-3740.
- [75]. Saxena, U., & Das, A. B. (2016). Nanomaterials towards fabrication of cholesterol biosensors: Key roles and design approaches. *Biosensors and Bioelectronics*.
- [76]. Eguílaz, M., Villalonga, R., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2011). Gold nanoparticles: Poly(diallyldimethylammonium chloride)-carbon nanotubes composites as platforms for the preparation of electrochemical enzyme biosensors: Application to the determination of cholesterol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 661(1), 171-178.
- [77]. Gomathi, P., Ragupathy, D., Choi, J. H., Yeum, J. H., Lee, S. C., Kim, J. C., ... Ghim, H. Do. (2011). Fabrication of novel chitosan nanofiber/gold nanoparticles composite towards improved performance for a cholesterol sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 153(1), 44-49.
- [78]. Singh, J., Srivastava, M., Kalita, P., & Malhotra, B. D. (2012). A novel ternary NiFe₂O₄/CuO/FeO-chitosan nanocomposite as a cholesterol biosensor. *Process Biochemistry*, 47(12), 2189-2198.
- [79]. Ruecha, N., Rangkupan, R., Rodthongkum, N., & Chailapakul, O. (2014). Novel paper-based cholesterol biosensor using graphene/ polyvinylpyrrolidone/ polyaniline nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 13-19.