Revista Colombiana de Materiales N. 5 pp. 107-113

Edición Especial Artículos Cortos

FABRICACIÓN DE UN BIOSENSOR A PARTIR DE PVA PARA USO EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Mariluz Marín [1], Ana Zapata [1], Lindsey Quintero [1], Mario Mejía [2]*
1: Estudiante de Bioingeniería, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
2: Ingeniero de Materiales, Docente del Programa de Bioingeniería, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

*****Contacto: lindsey.alejandra@gmail.com

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un dispositivo que actúa como indicativo en el momento que la carne es atacada por bacterias. El biosensor fabricado contenía pequeñas partículas inertes en el núcleo que sirvieron como indicativo de que éste estaba siendo consumido por bacterias, dichas partículas estaban recubiertas por una capa de PVA y otra externa hecha de PLA o Almidón de Yuca, con el fin de que estos dos últimos cumplieran la función de alimento directo para las bacterias. Después de 1 mes de contacto entre los biosensores diseñados y la carne, se determinó como el más efectivo aquel que contenía PLA en la cubierta exterior ya que permitió observar la liberación de las partículas inertes en menor tiempo como indicativo visual de que efectivamente la carne contenía bacterias y que estas consumieron las capas externas del sensor. La caracterización del producto final se llevó a cabo por el proceso de Microscopía RAMAN en el cual se pudo observar la modificación que realizaron las bacterias sobre el PLA.

Palabras Clave: *Biosensor, Core-Shell, PVA, PLA, Almidón de Yuca*

ABSTRACT

In the present work biosensor was developed as an indicative of the time that the bacteria attacks the meat. The fabricated biosensor contained small inert particles in the nucleus, which served as indicative that bacteria were already consuming the biosensor, at the same time they were covered by a layer of PVA and another outer made of PLA or Cassava Starch. After 1 month of contact between the designed biosensors with meat, was determined as more effective that containing PLA in the outer cover since it allowed to observe the release of inert particles in less time as a visual indication that indeed the meat contained bacteria and that they consumed the outer layers of the sensor. The process of RAMAN Microscopy in which the modification carried out the bacteria on the PLA could be observed conducted the characterization of the final product.

Keywords: *Biosensor, Core-Shell, PVA, PLA, Cassava Starch*

1 INTRODUCCIÓN

En la industria alimenticia es obligatorio y necesario incluir en el empaque la fecha de caducidad de los productos; sin embargo ésta no es suficiente para alertar al consumidor, ya que tales etiquetas no son leídas o son afectadas por manipulación, sumado a las condiciones a las que está

sometido el producto (temperatura y humedad). Adicional a ello, se tiene que las fechas allí expuestas no son precisas, así como el producto puede durar más de lo previsto, también puede deteriorarse antes de lo indicado, lo que ocurre con frecuencia en los productos refrigerados en los que sobresalen las carnes, debido a que son un medio ideal de cultivo para microorganismos, como ciertos grupos de bacterias (*Staphilococus aureus, Escherichia coli, Enterobacter y Serratia, Pantoea agglomerans, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Yersinia enterocolitica*) [1]; por la gran cantidad de nutrientes y factores de crecimiento que contienen. [2]

Un sensor es un dispositivo que presenta características de naturaleza eléctrica (carga, voltaje, corriente), cuando es sometido a un fenómeno que no es eléctrico [3]. Los sensores miden cantidades físicas y las convierten en señales que pueden ser medidas; los biosensores siguen este mismo principio, sin embargo sus medidas son hechas sobre reacciones de tipo biológico, como las reacciones enzimáticas en el caso de un medidor de glucosa.

En la industria el uso de biosensores se ha incrementado en gran medida debido a que permiten conocer e identificar diferentes reacciones químicas no sólo a nivel de diagnóstico clínico, sino también en áreas de control de procesos industriales, veterinarios, agrícolas, etc. [4] ya que son más efectivos para otorgar un resultado y más amigables con el ecosistema, algo que hoy día es parte fundamental en los procesos de control.

En este proyecto se plantea una alternativa confiable para productos cárnicos, de forma que se pueda determinar el momento en el que estos son afectados por actividad bacteriana, esta solución consiste en la fabricación de un biosensor constituido de una matriz de PVA (Polivinil alcohol) un polímero completamente inerte, sobre la cual se inmovilizarán partículas de óxidos magnéticos recubiertos por un material atractivo para las bacterias como almidón y ácido poliláctico (PLA). Se analizaron diferentes metodologías para la fabricación de dicho sensor.

El principio de funcionamiento del biosensor se da cuando las bacterias atacan la carne y al sensor (ya que éste tienen un material llamativo para ellas), una vez sucede ésto, las partículas contenidas se liberaran y son observadas por el consumidor, dando una alerta de que la carne ya está en proceso de descomposición y no es apta para el consumo.

2 METODOLOGÍA

2.1 Fabricación de la magnetita

El proceso de fabricación de la magnetita se realizó con el método de precipitación de cloruro ferroso y cloruro férrico con el siguiente balance químico

$$2FeCl_3 + FeCl_2 + 8NH_3 + 4H_2O \longrightarrow Fe_3O_4 + 8NH_4Cl$$

Teniendo en cuenta ésta reacción se hallaron las cantidades necesarias de cada elemento para 15ml de agua, estas fueron (Tabla 1):

Tabla 1. Cantidades de elementos precipitación de magnetita

Amoniaco (NH_3)	Cloruro ferroso ($FeCl_2$)	Cloruro férrico ($FeCl_3$)
113,2ml	26,4g	67,6g

Se maceraron y se secaron los cloruros a 76°C por 2 horas, se adicionaron, al volumen de H_2O elegido, el peso calculado de los cloruros (20°C), se agitó esta mezcla durante 1 hora (20°C), posteriormente se adicionó la solución de NH_3 (volumen calculado), aumentando lentamente la temperatura hasta 90°C por 1 hora, por último se filtró el precipitado y se lavó hasta que la solución de enjuague llegó a pH neutro.

Se calculó el rendimiento a partir del valor esperado y el obtenido y se obtuvo que éste fue del 3.96%.

2.2 Fabricación de los encapsulados PVA-Partículas

En la fabricación de estos encapsulados se utilizaron dos metodologías diferentes, pero para ello se determinó previamente cual era la mejor cantidad de PVA en agua, por tanto se procedió a experimentar con diferentes cantidades de PVA y agua y se determinó que la forma deseada se lograba con 8g de PVA en 60ml de agua, y llevadas al horno a 55°C por 4 horas.

2.2.1 *Metodología A:*

Inicialmente se calentaron 60ml de H_2O, se adicionaron 0.5g de partículas, almidón a una relación (1:3) con la partículas y 8g de PVA; teniendo en cuenta que no se presenten diferenciales de temperatura. Por último se agitó por 20 min.

Problemas presentados:

Después de varios ensayos se descubrió que la relación entre el almidón y la partícula fue demasiado baja. Se tomaron las cantidades de partículas y almidón bajo diferentes proporciones así (Tabla 2):

Tabla 2. Relación partícula magnética/almidón

Protocolo	Partícula (g)	Almidón (g)
1	0.3	4.5
2	0.0522	4.5
3	0.025	6

El objetivo era lograr una solución lo menos grisácea posible, de forma que conservara el color del almidón, lo cual se logró con la relación 3 y fue ésta la que se usó para la metodología A.

2.2.2 *Metodología B:*

En esta metodología se prepararon dos soluciones a diferentes porcentajes de agua de forma que al unirlas se completaran los 60ml requeridos; se hicieron 2 mezclas a porcentajes diferentes (Tabla 3):

Tabla 3. Protocolos para metodología B

Protocolo	Solución 1 (H_2O)	Solución 2 (H_2O)
1	40ml	20ml
2	20	40

Solución 1: Almidón + partículas (pesos determinados en metodología A); se calentó el porcentaje de agua, se adicionó el almidón, se llevó al ultrasonido por 5 minutos, se calentó nuevamente y se adicionaron las partículas.

Solución 2: PVA+H2O; se preparó la solución 1, se adicionó el porcentaje restante de agua y se calentó, se adicionó el PVA y se agitó hasta logar solución homogénea

2.3 Fabricación del Biosensor

En la fabricación de los biosensores se siguieron distintas metodologías, teniendo en cuenta las láminas fabricadas con anterioridad y se usó el PLA (que se encontraba en forma de pellets) disuelto en cloruro de metileno. Los biosensores se pusieron en contacto con la carne a temperatura ambiente para acelerar el proceso de descomposición.

2.3.1 Biosensor A: Se tomó un pedazo de la lámina compuesta de PVA, almidón y partículas; y se puso entre capas de PLA (disuelto previamente) selladas con calor. Se hicieron dos muestras, la primera, etiquetada como A1, se hizo con la lámina que tenía más alta concentración de partículas, mientras que la segunda, etiquetada como A2, con menor concentración.

2.3.2 Biosensor B: Se tomó un pedazo de la lámina compuesta de PVA, almidón y partículas, además se adicionó almidón en polvo, se recubrió con PLA disuelto y se secó a temperatura ambiente. Se hicieron dos muestras, la primera, etiquetada como B1, con mayor concentración de partículas; y la segunda, etiquetada como B2, con mayor concentración de almidón en polvo.

2.3.3 Biosensor C: Para ésta metodología se disolvieron los pellets de PLA, se tomó una porción de éstos y una capa de PLA seco en forma de lámina, encima de dicha capa se agregó magnetita en polvo, luego se cubrió con otra capa de PLA seco en forma de lámina y por último se selló con más PLA disuelto.

2.4 Caracterización

La caracterización del biosensor se llevó a cabo mediante la técnica de Micro Espectroscopía Raman (micro Raman). Debido a que se tenían varios sensores fabricados por distintas metodologías, se decidió hacer la prueba de caracterización al sensor que cumplió con los objetivos del proyecto, que es el de nuestro interés (Biosensor C).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la experimentación con los biosensores se hizo un seguimiento de cada uno, tomando un trozo de carne de cerdo (según la experiencia su proceso de descomposición es más rápido [5]), y sobre éstos se pusieron los biosensores que fueron observados durante un mes, para los cuales se hizo el seguimiento descrito a continuación:

Para el día 2 no se observaron cambios significativos en ningún sensor.
En el biosensor C se presentó, a los 4 días de exposición, la presencia de partículas blancas a su alrededor y ya era posible observar que toda la capa de PLA en contacto con la carne estaba destruida y se encontraba expuesta la magnetita aunque no era visible si no se levantaba el biosensor de la carne. En los demás sensores se observó deterioro de la carne pero ninguna reacción de éstos.

Siete días después se observó en el biosensor C la magnetita acumulada en un solo sitio, esta no se esparció sobre la carne como se pretendía, sin embargo toda la capa de PLA en contacto con la carne ya se había desvanecido. La carne presentaba mejor aspecto que con los demás sensores.

Se realizó una siguiente revisión el día 23, se observó que la carne que se encuentra en contacto con el biosensor C ya presentaba coloración oscura superficial, posiblemente de la liberación de magnetita; en el biosensor B2 se observó que la capa en contacto con la carne se desprendió.

Se realizó una última observación el día 29 para la cual la carne en el biosensor C presentó alta coloración oscura; y los biosensores A1, A2 y B2 empezaron a reaccionar con las bacterias en la carne mostrando desprendimiento de las capas.

Por último se retiraron los biosensores de las carnes y se llevaron a un beaker con carbón activado para quitar los olores.

Después de observar estos resultados, se determinó que el biosensor C fue el que presentó el mejor comportamiento. En la figura 1 se muestra cómo fue el comportamiento del biosensor C a 23 y 29 días desde su exposición a la carne

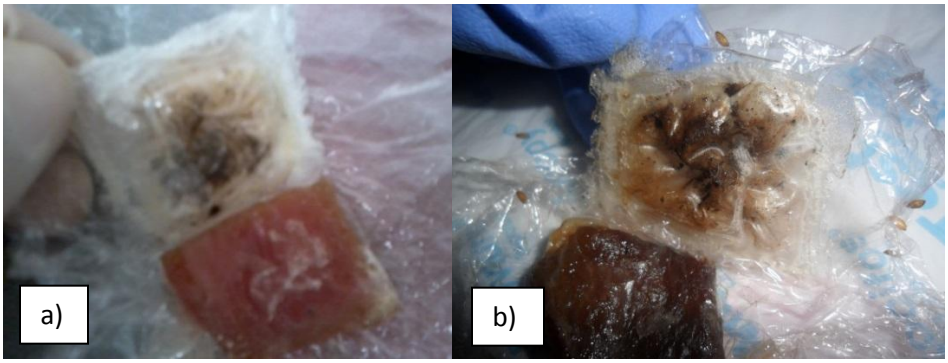

Figura 1. Biosensor C en contacto con carne. a) Día 23. b) Día 29

3.1 Caracterización

En la Figura 2, se muestra el espectro Raman para el biosensor C.

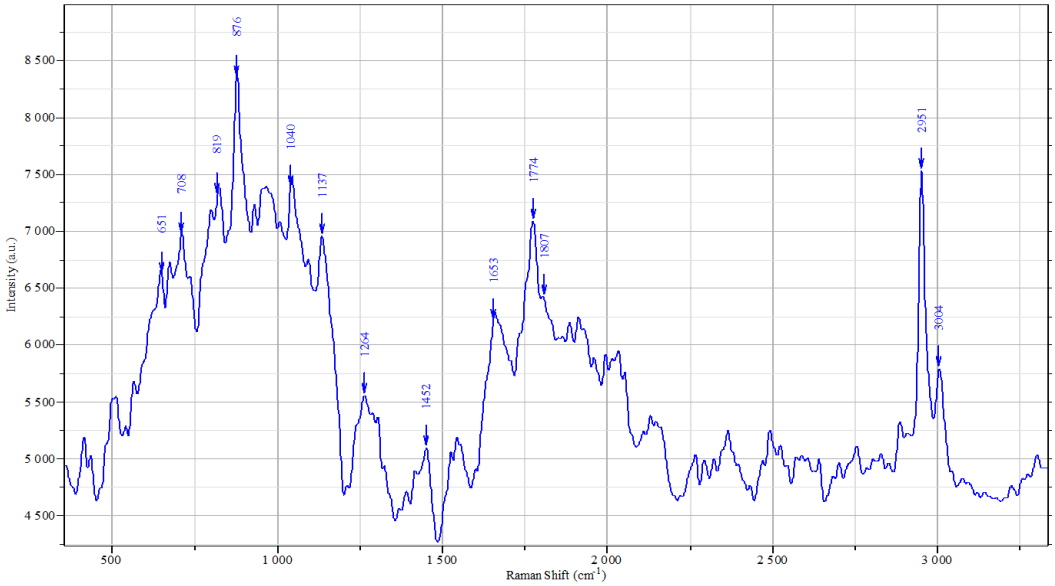

Figura 2. Espectro Raman para el Biosensor C

Se realizó micro espectrometría Raman para el biosensor C, en un rango de 500-3000 cm^{-1} debido a que el biosensor C fue fabricado a partir de PLA (Ácido poliláctico), este espectro se comparó con el espectro Raman del PLA, y se encontró similitud en los picos principales (en muestra de PLA puro se encuentran en un número de onda de 1050, 1100, 1150 y 1450), aunque se observa un desplazamiento en las bandas, así los mismos picos representativos se observan en 708, 876, 1040 y 2951, esto se debe a la interacción del PLA con el solvente (cloruro de metileno) y posibles sustancias liberadas por los microorganismos presentes en la carne.

Se observa que el espectro presenta algunos picos irregulares (en la banda comprendida entre 2000 y 2900 aproximadamente), esto se debe a la superficie de la muestra, ya que la espectrometría se realizó después de ensayar el sensor, por lo cual su superficie estaba algo deteriorada y resultó difícil realizar el ensayo.

4 CONCLUSIONES

En la elaboración de este trabajo se logró desarrollar un biosensor que actúa como indicador cualitativo del deterioro de productos cárnicos, tal biosensor está compuesto de un polímero biodegradable que debido a sus componentes enzimáticos se vuelve un atractivo para las bacterias, evitando que ataquen directamente la carne. Esta reacción se evidencia, en el biosensor C, después de estar en contacto con la carne por alrededor de un mes; se observa una coloración bastante oscura en la carne debido posiblemente a la liberación en su superficie de la magnetita que se encontraba en el interior del sensor. Además, según el seguimiento realizado se observó que dicho biosensor no solo indicaba el momento en que la carne era atacada por las bacterias sino que también servía como una especie de barrera para ésta, ya que los primeros días a pesar de que la carne usada con todos los biosensores provenía del mismo lugar y se encontraba bajo las mismas condiciones, en el biosensor C la carne se tardó más tiempo en deteriorarse, en comparación con los otros biosensores ya que las bacterias atacaron primero el sensor.

Lastimosamente ya que no se encuentran referencias de este tipo de trabajo, no es posible dar un resultado conciso comparado con literatura.

5 AGRADECIMIENTOS

Dedicamos este trabajo al gran apoyo brindado por nuestros docentes Mario Alejandro Mejía y Jazmín González sin los cuales esto no hubiese sido posible y a nuestros compañeros y amigos del Laboratorio de Biomateriales del programa de Bioingeniería de la Universidad de Antioquia, quienes nos apoyaron durante la fase experimental de éste proyecto.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. "Microbiología de la carne". [En línea] Consultado el 4 de noviembre de 2012 <http://www.fagro.edu.uy/~alimentos/cursos/carne/Unidad%206/MICROBIOLOGIA.pdf>

2. Arango, C.M.; Restrepo D.A. "Microbiología de la carne". [En línea] Consultado 4 de noviembre de 2012. http://es.scribd.com/doc/8717475/Cap-1-MicrobiologIa-de-La-Carne

3. Ahindra Nag, Baishakhi Dey. "Computer-Aided Drug Design and Delivery Systems". Cap 6, sub-temas 8 y 9: "Biosensores, Developmental History of Biosensors". [En línea] Consultado el 4 de noviembre de 2012 <http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2526/browse/computer-aided-drug-design-and-delivery-systems>

4. "Biosensores. Instrumentos analíticos que transforman procesos biológicos en señales eléctricas u ópticas y permiten su cuantificación". Formato Power Point. [En línea] Consultado el 4 de noviembre de 2012. <http://www.slidefinder.net/b/biosensores_instrumentos_anal%C3%ADticos_transforman_procesos/tema7biosensores-alumnos/8018383>

5. "Carnes Rojas" [En línea] Consultado el 4 de noviembre de 2012. <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/10%20carnes%20rojas.pdf>