

USO DE BIOSENSORES ENZIMATICOS PARA LA DETERMINACION DE CADMIO EN AGUAS NATURALES EMPLEADAS EN LA INDÚSTRIA LECHERA

Diana Catalina Rodríguez¹, Stephanie Carvajal², Gustavo Peñuela³

¹ Ingeniera sanitaria. Msc. PhD (c), Universidad de Antioquia, Cll 62 #52-59, catalinarodriguez@udea.edu.co

² Estudiante de Biología, Universidad de Antioquia, Cll 62 #52-59, matis21@hotmail.com

³ PhD en Química Ambiental, Docente, Universidad de Antioquia, Cll 62 #52-59, gpenuela@udea.edu.co

RESUMEN

El agua residual generada en los hatos lecheros contiene compuestos de estructuras complejas como los son los antibióticos, plaguicidas y metales que la mayoría de veces son vertidos a los recursos hídricos sin ningún tratamiento y regulación. Cuando es usada agua contaminada para dar de beber al ganado y lavar el tanque de almacenamiento de la leche, es posible que la leche cruda quede contaminada con los mismos compuestos, de esta manera, el lavado con agua potable de excelente calidad es fundamental para reducir la contaminación de la leche. El cadmio es un metal tóxico que presenta graves riesgos para la salud humana. En la actualidad, las nuevas técnicas han permitido la determinación enzimática de diferentes analitos, tanto en el agua como en la industria alimentaria. En este trabajo, se realizó la validación del método a partir de un biosensor amperométrico y otro óptico para la determinación del cadmio presente en el agua cruda de hatos lecheros ubicados en Antioquia, basados en la inhibición de la enzima ureasa.

Palabras clave: Aguas crudas, Cadmio, Hatos lecheros, Enzimas

Recibido: 22 de Noviembre de 2011. Aceptado: 20 de Diciembre de 2011

Received: November 22nd, 2011. Accepted: December 20th, 2011

THE USE ENZYME BIOSENSORS FOR DETERMINATION OF CADMIUM IN NATURAL WATER USED IN THE DAIRY INDUSTRY

ABSTRACT

The wastewater generated in dairy herds containing compounds are complex structures such as antibiotics, pesticides and metals that are most often dumped into the water without any treatment and regulation. When contaminated water is used for watering livestock and wash the storage tank milk, raw milk may remain contaminated with these compounds, thus washing with high-quality drinking water is essential to reduce contamination of the milk. Cadmium is a toxic metal that poses serious risks to human health. Currently, new techniques have allowed the enzymatic determination of different analytes in both water and food industry. In this study, we performed the validation of the method from an amperometric biosensor and optical determination of cadmium in the raw water of dairy herds located in Antioquia, based on the inhibition of the enzyme urease.

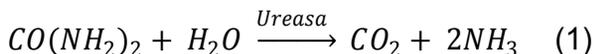
Keywords: Natural waters, Cadmium, Dairy herds, Enzymes

1. INTRODUCCIÓN

Los iones de metales pesados son muy abundantes en la naturaleza, situación que puede en algunos casos, representar un grave problema ambiental. La presencia de metales pesados en exceso afecta aire, agua y suelo [1]. Las plantas cultivadas en áreas contaminadas, pueden acumular metales pesados como el cadmio, zinc, plomo y cobre. Estos metales tienen ciertos niveles umbral para funciones esenciales de los organismos vivos y el hombre, convirtiéndose en sustancias tóxicas si el nivel de tolerancia correspondiente a cada organismo se excede [2]. Debido a lo anterior, hay una necesidad de determinarlos rápidamente *in situ*.

Aunque la detección típica de estos iones se basa en métodos como la espectrometría de absorción atómica y el plasma acoplado inductivamente a espectrometría de masas, estos métodos requieren ejecución en laboratorio y no pueden ser utilizados para el monitoreo en campo, además, requieren procesos previos de preparación de las muestras. Por lo tanto, hay una necesidad de emplear métodos simples para una detección rápida en campo [3].

El cadmio es un metal tóxico que presenta graves riesgos para la salud humana, con efectos tóxicos sobre los organismos vivos [4]. Este elemento ocurre en relativamente bajas concentraciones en la naturaleza, pero actividades antropogénicas han contribuido a incrementar su concentración en el ambiente. El cadmio, así como algunos metales suelen ser inhibidores de ciertas enzimas. La Ureasa es la enzima más empleada para medir el efecto inhibitor del Cadmio en diferentes matrices, es una enzima importante en los sistemas biológicos ya que cataliza la conversión de la Urea en dióxido de carbono y amoníaco [5]:



La presencia de Cadmio inhibe la enzima lo que conduce a una disminución en la actividad enzimática y como consecuencia, una menor cantidad de amoníaco es liberado. El efecto inhibitor del cadmio en la actividad de la ureasa se debe a su unión a los grupos sulfhidrilo que habitualmente se forman en el centro activo de la enzima.

En la región de pH donde la enzima es activa (alrededor de pH 7.0), los productos de la reacción enzimática disociada son:



De esta manera, la degradación de la Urea por la ureasa puede generar iones hidroxilo (OH⁻), incrementando el pH de la solución, lo que hace posible su determinación empleando biosensores ópticos mediante medidas de fluorescencia o amperométricas a partir de cambios en la corriente [6].

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en 20 fincas lecheras ubicadas en el norte y oriente del departamento de Antioquia, Colombia. La región norte está ubicada en promedio a 2700 metros sobre el nivel del mar y la temperatura oscila entre 13°C y 19°C. El 38% de las tierras de la región se dedican a la agricultura, el 50% a los pastos con tendencia a la ganadería y el 29.3% son bosques húmedos montañosos con un índice de degradación del 0.6%. La región oriental comprende un área de aproximadamente 2000 km² formada por un altiplano con alturas entre 2000 y 2200 m.s.n. La temperatura media (15°C) no sufre ninguna variación a lo largo del año. La precipitación anual varía entre 1700 y 2000 mm. El 60% de la población de esta región se dedica a actividades relacionadas con la agricultura y la ganadería. Ambas regiones poseen una gran riqueza hídrica que abastecen de agua para consumo y energía.

2.2 Reactivos

2.2.1 Biosensor óptico

Se empleó como Solución buffer el Fosfato de sodio Na₂HPO₄ (2 mM, pH 7.0), como sustrato para los ensayos, la urea (20 mM) y la enzima con la que se llevaron a cabo las reacciones fue la Ureasa (198.85 U/ml). El indicador de fluorescencia fue el 5(6)-Carboxynaphthofluorescein ≥ 90% preparado con una absorbancia máxima en el espectrofotómetro de 0.1 Abs.

2.2.2 Biosensor amperométrico

Se empleó como solución buffer el Fosfato de sodio (PBS) Na_2HPO_4 (0.1 mM, pH 7.0), como sustrato para los ensayos, la urea (80 mM) y la enzima fue la Ureasa (729.13 U/ml). La Ureasa fue inmovilizada por el método de entrecruzamiento (Cross-Linking), que consiste en generar uniones irreversibles entre la enzima y el transductor empleando reactivos bifuncionales como el glutaraldehído, la ventaja de esta técnica es que la enzima se vuelve estable a condiciones extremas tanto de pH como de temperatura. Para la inmovilización se empleó Albumina de Suero Bovino (1,66 % w/v) y Glutaraldehído (2,5%). Se preparó la siguiente solución:

- 10 μl de Albumina de Suero Bovino (1.66 % w/v)
- 3.32 μl de Ureasa (729.13 U/ml)
- 10 μl de Glutaraldehído al 2.5 %

Se colocó 5 μl de la solución anterior en el electrodo de trabajo. Posteriormente, se dejó secar el electrodo durante 1h a 4°C.

La inmovilización de la enzima mediante este procedimiento, permite que los electrodos puedan usarse inmediatamente y su estabilidad es de 6 días almacenados en seco a 4°C, posterior a este tiempo, el electrodo pierde sensibilidad y la enzima pierde actividad.

Antes de cada ensayo, los electrodos (Screen-Printed Electrodes, de plata con un electrodo de trabajo de carbón de 4 mm de diámetro) se acondicionaron con PBS (0.1M a pH 7.0) durante 10 min.

2.2.3 Equipos

Se emplearon dos biosensores uno óptico y otro amperométrico (marca biosensor, Italia-Roma). El método óptico fue validado con las siguientes especificaciones:

- Intensidad LED: 64
- Longitud de onda excitación: 510 nm
- Longitud de onda emisión: 550 nm
- Volumen de la celda: 200 μl

Mientras que el biosensor amperométrico fue operado de la siguiente manera:

- Flujo: 200 $\mu\text{l}/\text{min}$
- Voltaje: +700 mV
- Corriente: 5 μA

3. RESULTADOS

3.1 Análisis de curvas de calibración

La figura 1 y 2 muestran la curva de calibración realizada a partir del biosensor óptico y amperométrico respectivamente:

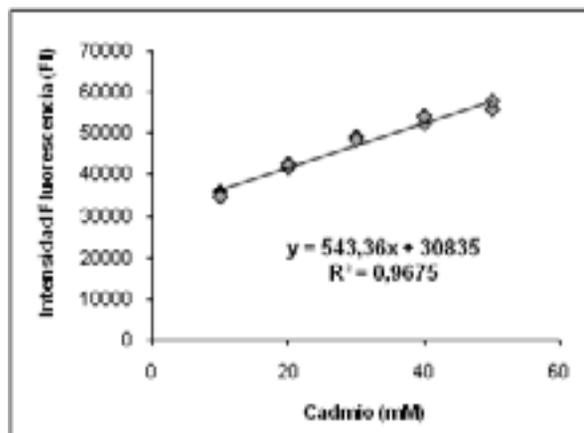


Fig. 1. Curva de calibración biosensor óptico

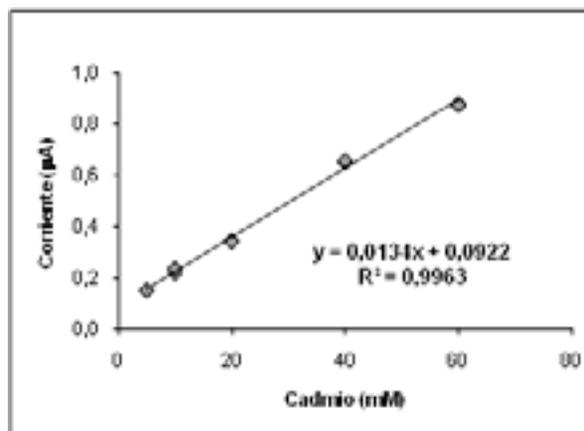


Fig. 2. Curva de calibración biosensor amperométrico

Con los resultados encontrados en las figuras 1 y 2, se realizó un análisis estadístico con el fin de determinar si la curva hallada era estadísticamente aceptable, para ello se evaluó en primera instancia la regresión que consistió en realizar un análisis de varianza ANOVA (De acuerdo con la plantilla de validación establecida en los parámetros de acreditación del grupo GDCON), donde se obtuvo para el caso del biosensor óptico un valor del estadístico de contraste (F. calculado) de 2,61 y un F. tabulado de 2,51, de esta manera la prueba de

hipótesis estableció unos criterios de aceptación para la regresión donde:

- Ho: Cantidad de mM y FI no se relacionan linealmente
- H1: Cantidad de mM y FI se relacionan linealmente

Por lo tanto Si $F. \text{ calculado} > F. \text{ tabulado}$ se rechazaba Ho. Los resultados concluyeron que existía una relación lineal entre las variables analizadas.

Para el biosensor amperométrico, se obtuvo un F. calculado de 41,76 y un F. tabulado de 2,51. La prueba de hipótesis estableció unos criterios de aceptación para la regresión donde:

- Ho: Cantidad de mM y μA no se relacionan linealmente
- H1: Cantidad de mM y μA se relacionan linealmente

Finalmente si $F. \text{ calculado} > F. \text{ tabulado}$ se rechazaba Ho. Por lo tanto se concluyó que existía una relación lineal entre las variables.

En cuanto a los intervalos de confianza para la pendiente, el análisis arrojó los siguientes resultados para el biosensor óptico (Tabla 1):

Tabla 1. Intervalo de confianza para la pendiente, método óptico

Ho:b=0

H1:b diferente de cero

t. calculado 39,33

t. tabulado 2,16

Alfa 0,05

Intervalo de confianza para la pendiente	573,20	Superior
	513,51	Inferior

Por lo tanto si $t. \text{ calculado} > t. \text{ tabulado}$ se rechazaba Ho. Por lo tanto se concluyó que la pendiente no tomaba valores de cero y el método respondía a cambios de concentración.

Para el biosensor amperométrico, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 2):

Tabla 2. Intervalo de confianza para la pendiente, método amperométrico

Ho:b=0

H1:b diferente de cero

t. calculado 86,70

t. tabulado 2,16

alfa 0,05

Intervalo de confianza para la pendiente	0,013740	Superior
	0,013072	Inferior

Donde si $t. \text{ calculado} > t. \text{ tabulado}$ se rechazaba Ho. Por lo tanto se concluyó al igual que el biosensor óptico que la pendiente no tomaba valores de cero y el método respondía a cambios de concentración.

Por último se evaluaron los intervalos de confianza para el intercepto, en el caso tanto del biosensor óptico como del amperométrico, los resultados mostraron que el intercepto incluía el cero y el método era proporcional en el intervalo ensayado (Tabla 3 y 4):

Tabla 3. Intervalo de confianza para el intercepto, método óptico

Ho:El intercepto no incluye el cero

H1:El intercepto incluye el cero

alfa 0,05

t. calculado 57,63

t. tabulado 2,16

Intervalo de confianza para el intercepto	31991,19	Superior
	29679,41	Inferior

Tabla 4. Intervalo de confianza para el intercepto, método amperométrico

Ho:El intercepto no incluye el cero

H1:El intercepto incluye el cero

alfa 0,05

t. calculado 17,11

t. tabulado 2,16

Intervalo de confianza para el intercepto	0,104	Superior
	0,081	Inferior

Se concluye por lo tanto, que la curva de calibración hallada con el biosensor óptico para la determinación de cadmio, estuvo entre un rango de 10 mM a 50 mM, mientras que empleando un biosensor amperométrico, se logró obtener un rango de medición más amplio; de 5 mM a 60 mM. De esta manera los límites de cuantificación para cada método fueron 10 mM y 5 mM respectivamente, esto comprueba que el biosensor amperométrico proporciona una mayor estabilidad a la enzima y por lo tanto permite lograr mayores rangos de medición.

3.2 Repetibilidad del método

Para evaluar la repetibilidad, se prepararon tres niveles (nivel bajo, medio y alto) de la curva de calibración 10 veces. Se midió la intensidad de la fluorescencia para el caso del método óptico y la corriente para el amperométrico y se calcularon los mM de cadmio, se halló el promedio (\bar{x}), la desviación de los datos (σ) y el coeficiente de variación (CV), los resultados se muestran en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Análisis de repetibilidad del método óptico

N°	mM		
	Nivel bajo (10 mM)	Nivel medio (20 mM)	Nivel alto (50 mM)
1	7,31	24,16	46,35
2	9,61	21,75	44,52
3	6,05	22,02	44,48
4	7,87	20,22	47,70
5	7,59	21,00	47,82
6	10,01	22,35	48,29
7	6,31	24,59	43,36
8	7,61	21,75	45,58
9	10,11	23,97	46,33
10	4,74	23,88	43,45
\bar{x}	7,72	22,57	45,79
σ	1,78	1,49	1,81
cv (%)	23,01	6,61	3,95

La EPA dentro de sus procedimientos para análisis biológicos [7], establece como criterios de aceptación un CV máximo del 25%, lo que quiere decir un criterio de aceptación de 50-150% [8]. Los resultados de repetibilidad tanto del método óptico como el amperométrico estuvieron dentro de ese porcentaje de aceptación, aunque para el método óptico, el nivel bajo se encontró en el límite establecido.

Tabla 6. Análisis de repetibilidad del método amperométrico

N°	mM		
	Nivel bajo (10 mM)	Nivel medio (30 mM)	Nivel alto (60 mM)
1	9,58	31,25	58,57
2	10,93	28,97	59,37
3	11,68	29,40	58,84
4	11,00	28,55	59,54
5	9,12	30,90	58,98
6	10,04	31,18	58,39
7	10,84	30,74	58,90
8	11,15	30,07	59,64
9	10,09	29,84	58,15
10	10,98	29,01	59,10
\bar{x}	10,54	29,99	58,95
σ	0,80	0,99	0,49
cv (%)	7,55	3,30	0,83

El biosensor óptico obtuvo un coeficiente de varianza (CV) para el nivel bajo (10 mM) de 23,01 %, a diferencia del amperométrico que para el mismo nivel bajo se obtuvo un CV de 7,55 %, lo que indica que el intervalo de aceptación para el óptico en este nivel es de 50-150% y para el amperométrico de 85-115%, lo que demuestra una mayor precisión en los datos del nivel bajo empleando un biosensor amperométrico. En los niveles medio y alto, ambos métodos obtuvieron CV bajos y muy similares entre si.

3.3 Efecto matriz en agua cruda

Se evaluó el efecto del método sobre un agua cruda, de esta manera, se midieron los mM de cadmio en una muestra 5 veces en diferentes días, posteriormente a la muestra de agua cruda, se le dopó con un nivel bajo de 10 mM de cadmio, se midió la intensidad de fluorescencia para el biosensor óptico y la corriente para el amperométrico y se determinó el porcentaje de recuperación (Tabla 7 y 8).

Tabla 7. Porcentaje de recuperación para un nivel bajo de Cadmio, método óptico

Intensidad Fluorescencia	mM	Recuperacion (%)
36045	10,26	85,881
35912	10,02	83,486
35987	10,15	84,837
34643	7,73	60,639
37892	13,58	119,135
\bar{x}		86,796
s		20,89
CV (%)		24,07

Tabla 8. Porcentaje de recuperación para un nivel bajo de cadmio, método amperométrico

Corriente (uA)	mM	Recuperación (%)
0,2535	12,0373	95,507
0,2561	12,2313	97,448
0,2381	10,8881	84,015
0,2676	13,0896	106,030
0,2519	11,9179	94,313
x		95,463
s		7,874
CV (%)		8,248

Posteriormente, a la misma muestra de agua cruda, se le dopó con un nivel alto de 40 mM de Cadmio y se midió la intensidad de fluorescencia para el óptico y con un nivel alto de 50 mM de cadmio y se le midió la corriente para el amperométrico y se determinó el % de recuperación (Tabla 9 y 10).

Los porcentajes de recuperación estuvieron relacionados no solo con el tipo de matriz empleada, sino también con el método de análisis y las interferencias que pudieron generar sobre la medición, también estaban correlacionadas con las concentraciones usadas de cada analito. En el efecto matriz se observó que los mM de cadmio en el agua cruda inicial fueron diferentes, esto debido a que las muestras analizadas fueron recolectadas en diferentes días. Con el método óptico el % de recuperación para el nivel bajo fue del 86,796 %, mientras que con el biosensor amperométrico fue de 95,463 %, de igual forma el CV en este mismo nivel con el biosensor óptico fue más alto que el obtenido con el amperométrico (24,07 y 8,248 respectivamente), lo que confirma que el biosensor amperométrico empleado para la determinación de cadmio, es más preciso y reproducible en los datos arrojados. En el nivel alto ocurrió lo mismo, el % de recuperación fue de 80, 70% en el óptico y 96, 99 % en el amperométrico. Según AEFI, 2001, aunque siempre se quiera obtener porcentajes de recuperación del 100 %, dependiendo de qué tan compleja sea la matriz, solo es posible alcanzar valores de 50, 80 o 90%. Para todos estos casos es importante anotar que aunque la recuperación no sea de un 100%, la precisión del método debe ser alta.

Tabla 9. Porcentaje de recuperación para un nivel Alto de Cadmio, método óptico

Intensidad Fluorescencia	mM	Recuperación (%)
47979	32,28	76,537
48848	33,85	80,448
47370	31,19	73,796
49390	34,82	82,888
50933	37,60	89,833
x		80,700
s		6,19
CV (%)		7,67

Tabla 10. Porcentaje de recuperación para un nivel alto de cadmio, método amperométrico

Corriente (uA)	mM	Recuperación (%)
0,7550	49,4627	93,952
0,7642	50,1493	95,325
0,7719	50,7239	96,475
0,8001	52,8284	100,684
0,7825	51,5149	98,057
x		96,899
s		2,598
CV (%)		2,681

4. CONCLUSION

Los biosensores amperométricos son herramientas útiles para la determinación rápida de compuestos tóxicos en muestras ambientales. El grado de precisión, reproducibilidad, recuperación y sensibilidad son variables que se encuentran en función de la enzima empleada y de su estabilidad, la cual va a depender del tipo de inmovilización empleada y de la afinidad que tenga el sensor (SPEs) por el compuesto a analizar. De otro lado, los biosensores ópticos aunque también son herramientas rápidas, suelen tener interferencias cuando se trata de muestras altamente contaminadas.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a la empresa Colanta y al grupo GDCON de la Universidad de Antioquia; por la financiación del proyecto, mediante el convenio 200802368-3619. A la empresa BIOSENSOR de Italia por la capacitación en el manejo de biosensores amperométricos y ópticos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Renedo, O., Lomillo, A., Goncalves, F., Martinez, A (2009). Development of urease based amperometric biosensors for the inhibitive determination of Hg (II). *Talanta*. 79: 1306–1310.

[2] Strobl, R., Robillard, P (2008). Network design for water quality monitoring of surface freshwaters: A review. *Journal of Environmental Management*. 87. 639–648.

[3] Lee, S.M., Lee, W.Y (2002). Determination of Heavy Metal Ions Using Conductometric Biosensor Based on Sol-Gel-Immobilized Urease. *Korean Chem. Soc.* 23 (8): 1169-174.

[4] Lakard, B., Herlem, G., Lakard, S., Antoniou, A., Fahys, B (2004). Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 1641–1647.

[5] Trivedi, U.B., Lakshminarayanaa, D., Kothari, I.L., Patel, N.G, Kapsed, H.N., Makhija, K.K., Patel, P.B., Panchale, C.J (2009). Potentiometric biosensor for urea determination in milk. *Sensors and Actuators B* 140: 260–266.

[6] Tsai, H.S., Doong, R.A (2005). Simultaneous determination of pH, urea, acetylcholine and heavy metals using array-based enzymatic optical Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 20: 1796–1804.

[7] Williams, L.R (1983). Validation of Testing/measurement Methods. EPA Internal report. EPA 600/X-83-060.

[8] AEFI. Asociación Española de Farmacéuticos de la industria. Validación de Métodos Analíticos. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad. 2001.