

Trabajo Fin de Grado

Test rápido enzimático para la determinación de alcohol.

Rapid enzymatic test for the determination of alcohol

Autor/es

Ester Lezcano Nieto

Director/es

Isabel Sanz Vicente

Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica.

Grupo de Nanosensores y Sistemas Bioanalíticos

Curso 2020/2021

RESUMEN.

Se pretende desarrollar un método analítico para la determinación de etanol de forma rápida en soportes de celulosa.

En primer lugar, se estudia mediante fluorescencia la oxidación de etanol a acetaldehído mediante la enzima ADH, utilizando NAD^+ como cofactor. El seguimiento de esta reacción se realiza a las longitudes de onda de absorción y fluorescencia del NADH, 340 y 450nm respectivamente. Con este método se ha conseguido un rango lineal muy bajo.

Para aumentar el rango lineal, se implanta una segunda reacción enzimática. Se trata de una reacción indicadora en la cual, debido a la enzima diaforasa se oxida el NADH generado en la reacción anterior. A su vez, se produce la reducción de un colorante produciéndose así un compuesto coloreado. Esta reacción se estudia a la longitud de onda de absorción del colorante (490nm).

Una vez optimizado el método analítico para la determinación de etanol en disolución y comprobado que es posible utilizar esta metodología para el desarrollo de un biosensor enzimático, se han dado los primeros pasos en la construcción de un soporte sólido para la determinación de etanol de forma rápida. Para ello, se han inmovilizado el colorante, el cofactor NAD y las enzimas ADH y diaforasa en soportes sólidos de celulosa.

Se ha comprobado que pueden observarse diferentes señales variando parámetros como pH, concentración de ADH y que dependen de la concentración de etanol.

ABSTRACT.

The object of this work is to develop an analytical method for the rapid determination of ethanol on cellulose supports.

First, the oxidation of ethanol to acetaldehyde by the enzyme ADH is studied by fluorescence, using NAD^+ as a cofactor. The monitoring of this reaction is carried out at the absorption and fluorescence wavelengths of NADH, 340 and 450nm respectively. Using this method, a very low linear range has been achieved.

To increase the linear range, a second enzymatic reaction is coupled. It is an indicator reaction in which, due to the diaphorase enzyme, the NADH generated in the previous reaction is oxidized. In turn, the reduction of a colorant occurs, thus producing a colored compound. This reaction is studied at the absorption wavelength of the dye (490nm).

Once the analytical method for the determination of ethanol in solution has been optimized, the next steps have been taken in the construction of a solid support for the fast determination of ethanol. For this, the dye, the cofactor NAD and the enzymes ADH and diaphorase have been immobilized on solid cellulose supports.

It has been found that different signals can be observed by varying parameters such as pH, ADH concentration and that depend on the ethanol concentration.

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.Etanol.....	1
1.2 Importancia de la determinación de etanol.....	2
1.3 Métodos para la determinación de etanol.....	3
1.4Métodos enzimáticos:.....	4
1.5 Biosensores:.....	5
2. OBJETIVOS.....	5
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	6
3.1 Reactivos y disoluciones.....	6
3.2. Instrumentación y material.....	7
3.3. Procedimiento experimental.....	7
3.3.1 Medidas de fluorescencia.....	7
3.3.2 Medidas por absorción molecular.....	8
3.3.3. Aplicación en muestra real.....	9
3.3.4.Método en soportes sólidos.....	9
4. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	10
4.1. Método de Fluorescencia.....	10
4.1.1. ADH equina.....	10
4.1.2. ADH Levadura de cerveza.....	12
4.2. Absorción molecular.....	14
4.2.1.Optimización de parámetros.....	15
4.2.2. Calibración.....	17
4.2.3.Reproducibilidad y límite de detección:.....	18
4.2.4 Aplicación a una muestra real.....	18
4.3 Soportes de celulosa.....	19
4.3.1 Ensayos previos.....	19
5. CONCLUSIONES.....	23
6. BIBLIOGRAFÍA.....	24

1. INTRODUCCIÓN.

1.1.Etanol.

Los alcoholes son compuestos con fórmula R-OH, siendo R una cadena orgánica cuya estructura influirá en sus propiedades físicas. Por otro lado, el grupo hidroxilo será el que dé la polaridad a la molécula ya que se trata de un grupo muy polar y es capaz de establecer puentes de hidrógeno. Esto permite que los alcoholes sean solubles en agua y en otros alcoholes. Dependiendo del número de grupos hidroxilo que tenga el alcohol, pueden clasificarse en monoalcoholes (Ej: etanol) o polialcoholes como es el caso de dietilenglicol (C₄H₁₀O₃).

Los monoalcoholes, a su vez, pueden clasificarse en alcoholes primarios, secundarios o terciarios según el número de sustituyentes que tenga el carbono enlazado al grupo OH.



Figura 1: Monoalcoholes: primario, secundario y terciario.

El alcohol etílico o etanol es un alcohol primario. Sus usos principales son en la fabricación de bebidas, industria (química, cosmética, farmacéutica, ...) y combustible y, por tanto, el proceso de producción y las materias primas varían ligeramente según los usos.

En las bebidas alcohólicas con un contenido hasta un 20 % v/v de etanol, éste se obtiene de manera natural mediante fermentación de hidratos de carbono por la acción de levaduras. Para bebidas con un contenido más elevado hace falta una etapa de destilación.

Se trata de una molécula soluble en agua y también es capaz de atravesar membranas y acceder a los distintos órganos y tejidos del cuerpo humano. Al ingerir elevados volúmenes de etanol se genera un desequilibrio metabólico, ya que el organismo humano produce cantidades mínimas debido a la flora intestinal, y al aumentar la concentración de etanol se deben destinar los recursos disponibles a su metabolismo y posterior eliminación.

El principal metabolito del etanol es el acetaldehído, que presenta elevada toxicidad debido a su gran reactividad química.

En los seres humanos existen tres vías en el proceso de metabolización del etanol¹:

1) Vía de la alcohol deshidrogenasa (ADH).

Es la vía principal en personas no alcohólicas; se metaboliza hasta un 90-95% del alcohol ingerido. Tiene lugar en el hígado, ya que la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) se encuentra mayoritariamente en los hepatocitos, convirtiendo el etanol en acetaldehído. El siguiente paso, está catalizado por la aldehído deshidrogenasa, convirtiendo el acetaldehído en ácido acético o acetato como se puede ver en la **Figura2**.

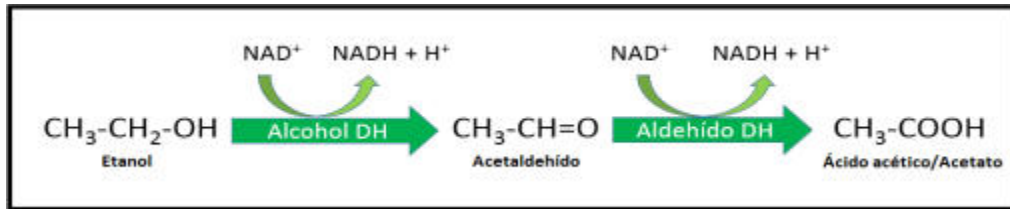


Figura 2: Vía de la alcohol deshidrogenasa

2) Sistema oxidativo microsomal.

Este proceso también tiene lugar en el hígado. En bebedores ocasionales supone un 5% del metabolismo, sin embargo, en adictos, puede suponer hasta el 25%. El responsable de la oxidación es el citocromo P450.

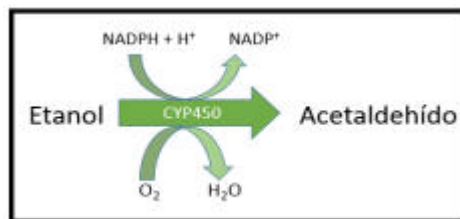


Figura 3: Sistema oxidativo microsomal

3) Peroxidación:

Se trata del principal mecanismo de degradación de etanol en el cerebro. En él interviene la enzima catalasa degradando peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

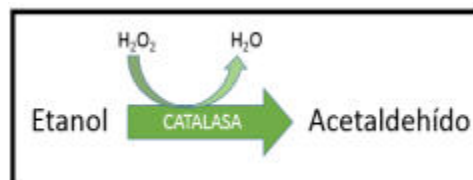


Figura 4. Peroxidación de alcoholes

1.2 Importancia de la determinación de etanol.

El interés en su determinación es amplio. Por un lado, es importante determinarlo durante la fabricación de las bebidas para controlar el proceso y establecer su grado alcohólico.

Se entiende por bebida alcohólica aquella en cuya composición está presente el etanol en forma natural o adquirida en una concentración igual o superior al 1% de su volumen².

Las bebidas no alcohólicas, se clasifican en zumos de frutas, otros vegetales y sus derivados, bebidas refrescantes y horchatas³.

Existen dos tipos de bebidas alcohólicas, bebidas fermentadas y destiladas. Las bebidas fermentadas son procedentes de frutas o cereales que por acción de levaduras convierten su azúcar en alcohol. Las más comunes son vino, sidra o cerveza.

Las bebidas destiladas se consiguen eliminando mediante calor, a través de la destilación, una parte del agua contenida en las bebidas fermentadas.

El elevado consumo de este alcohol es uno de los principales factores de riesgo de enfermedades, ya que contribuye al desarrollo de más de 200 problemas de salud (aumenta el riesgo de cáncer, enfermedades psiquiátricas) y otras lesiones contribuyendo también a la muerte prematura⁴.

El consumo de alcohol es el principal factor de riesgo en la población de 15 a 49 años a nivel mundial; en 2016 se le pueden atribuir al consumo de alcohol el 4% de las muertes en mujeres y un 12% a hombres⁴.

Según el Ministerio de Justicia, en 2020 el 48,7 % de los conductores fallecidos en accidentes había consumido alcohol, drogas o psicofármacos, siendo el alcohol la sustancia mayoritaria⁵.

La tasa máxima permitida de alcohol en sangre es de 0,3 g/l para conductores profesionales y noveles y de 0,5 g/l para todos los demás, algo que en aire se corresponde con 0,15 mg/l para los primeros y 0,25 mg/l para los segundos⁶.

Además, no debe caer en el olvido que el alcohol es una sustancia adictiva que puede ocasionar dependencia.

1.3 Métodos para la determinación de etanol.

Debido a la importancia de esta molécula se han desarrollado una gran variedad de métodos para su determinación que dependen de la muestra y del objetivo del resultado.

Los métodos oficiales para determinar el grado alcohólico en bebidas se basan en medir la densidad después de haber destilado la bebida⁷. Es un procedimiento lento y tedioso, que requiere una gran cantidad de muestra y no adecuado para las bebidas no alcohólicas, debido a su bajo contenido en etanol. Se ha desarrollado procedimientos instrumentales más rápidos y precisos, fundamentalmente cromatográficos, como HPLC ó CG⁸, que además permiten identificar otros componentes responsables de propiedades organolépticas.

La determinación de etanol en muestras biológicas humanas puede tener fines tanto médicos como legales.

Para fines médicos, el objetivo es identificar la presencia de alcohol para tratar los síntomas de una manera adecuada. Suelen determinarse la concentración de etanol en muestras de sangre o de orina.

Para fines legales, el objetivo es identificar la presencia de alcohol y evaluar dicha presencia en el contexto de la legislación vigente. Las muestras que se determinan para fines legales pueden ser de sangre, orina, aire y/o saliva. La determinación en aire es la que se utiliza con más frecuencia en los conductores. Se usa un alcoholímetro; al pasarse la

muestra de aire por él, el etanol se oxida en el ánodo, generando una corriente eléctrica que será proporcional a la concentración de alcohol. También los hay de infrarrojos.

Para confirmar o refutar estos resultados debe hacerse una comprobación mediante la determinación en la sangre o en orina.

Las determinaciones en sangre, orina o saliva se realizan en los laboratorios utilizando de nuevo técnicas como cromatografía de gases ⁹, HPLC ¹⁰ (requiere derivatización post columna para poder detectarlo en la mayoría de los casos) o electroforesis ¹¹. Las técnicas instrumentales comentadas requieren equipos costosos y personal cualificado.

Una alternativa a ellas son las técnicas espectrofotométricas en la zona IR ¹² o en el UV-Vis, siendo estas últimas las más utilizadas. El etanol es oxidado por dicromato o por Cerio IV siguiendo la reacción a 600 nm ^{13,14} o 485 nm respectivamente ¹⁵. Su inconveniente fundamental son las interferencias, ya que cualquier especie que se pueda oxidar en esas condiciones dará señal.

1.4 Métodos enzimáticos:

Los métodos enzimáticos son muy interesantes debido a la selectividad que aportan las enzimas ^{16,17}. Están basados en la acción de la enzima alcohol oxidasa (AOX) o de la alcohol deshidrogenasa (ADH). La ADH cataliza la oxidación de alcoholes a aldehídos o cetonas con la reducción simultánea del cofactor NAD⁺ a su forma reducida NADH. La formación de NADH será la señal que se observa tanto por absorción (340 nm) como por fluorescencia (450 nm) puesto que es el único componente de la reacción con propiedades espectroscópicas

A esta reacción principal se le puede acoplar una segunda reacción enzimática. La enzima involucrada en esta reacción es la enzima diaforasa, que tiene capacidad de transferir electrones entre NADH o NAD y distintos aceptores como pueden ser distintos colorantes.

Si el colorante es iodonitrotetrazoliumchloride (INT) la reacción que tiene lugar es la siguiente:

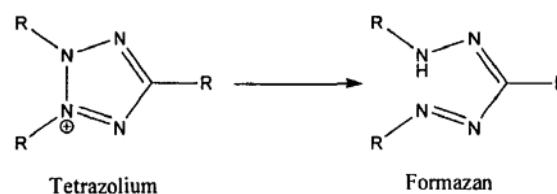


Figura 5: Reducción del colorante.

El formazán, producto de la reacción, presenta absorbancia a 490nm, debido a la reducción de la sal de tetrazolio, lo que permite medir absorción en la zona del visible. Esta reacción se observa fácilmente a simple vista, ya que, si hay reacción, la solución pasa a presentar una coloración rojiza.

1.5 Biosensores:

Un sensor químico es un dispositivo con la capacidad de transformar en información analítica útil una señal química obtenida por la reacción de un analito y de esta forma poder conocer características de la muestra a estudiar. Se habla de sensor óptico si la transformación se lleva a cabo a partir de las propiedades ópticas del sistema sensor. Se habla de biosensor en el caso de que la información química esté basada en un mecanismo bioquímico y de biosensor óptico si la señal analítica se basa en propiedades ópticas.

El proceso de transformación de la señal en información útil consta de tres etapas:

- En la primera tiene lugar el reconocimiento químico; en ella un reactivo interacciona selectivamente con el analito.
- En la segunda etapa ocurre la transducción de la señal, en ella un transductor transforma la información química en una señal física, en este caso óptica de absorción y/o fluorescencia.
- En la tercera y última etapa se lleva a cabo la amplificación y procesamiento de la señal para obtener una señal analítica.

En este trabajo, se estudiará la posibilidad de inmovilizar en soportes de celulosa los reactivos necesarios para la determinación enzimática de etanol (ADH, NAD, Diaforasa, INT) de forma que se puedan realizar test rápidos in situ de este analito. Las medidas de color se llevarán a cabo con un Smartphone convencional, de forma que sea un método fácil de utilizar por cualquier usuario.

2. OBJETIVOS.

El objetivo principal es el diseño de un soporte reactivo que permita realizar un test rápido para la determinación de etanol. El método está basado en el acoplamiento de dos reacciones enzimáticas. En la **Figura 6**, se encuentra el proceso de reacción de forma esquemática.

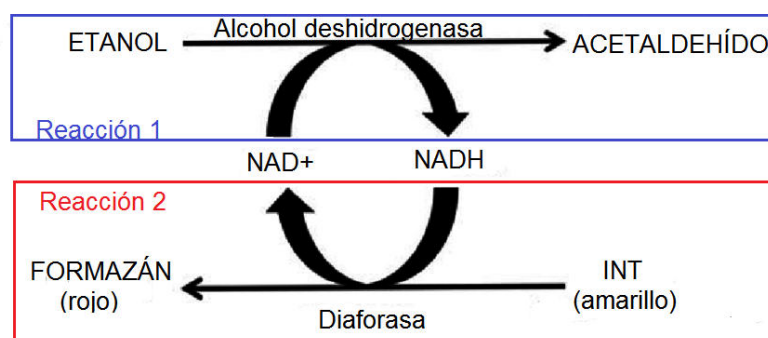


Figura 6: Mecanismo de la reacción global.

En la primera de las reacciones tiene lugar la oxidación de etanol a acetaldehído mediante el enzima alcohól deshidrogenasa (ADH), utilizando NAD^+ como cofactor.

La segunda es una reacción indicadora. En ella, debido a la actuación de una enzima diaforasa, se produce la oxidación de NADH generado en la reacción anterior a NAD^+ . A su vez, se produce, la reducción de un colorante (INT), que en su forma reducida dará un compuesto coloreado rojo.

Los objetivos concretos son:

1. Estudio en disolución de la reacción enzimática de etanol con ADH utilizando NAD^+ como cofactor mediante la técnica de fluorescencia, a partir de las propiedades espectroscópicas de NADH.
2. Estudio en disolución del acoplamiento de la reacción enzimática de ADH y diaforasa, seguimiento de la reacción mediante la técnica de absorción.
3. A partir de los parámetros que presenten mejores prestaciones analíticas en disolución, desarrollar un soporte sensor mediante la inmovilización de los reactivos que sirva como herramienta para la determinación rápida de etanol.
- 4.- Estudio de las características analíticas de los métodos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos y disoluciones.

- Disolución amortiguadora $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ 0,1M pH=9 , pH=10, y pH=11. Se prepara disolviendo 0,53 g de Na_2CO_3 (105,99g/mol) en 50mL de H_2O milliQ y ajustando el pH con una disolución HCl 1M.
- Disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M pH=6, pH=7 y pH=8. Se prepara disolviendo 2,13g de NaH_2PO_4 (120g/mol) en 50mL de H_2O milliQ y se ajusta el pH con una disolución de NaOH 2M.
- ADH equine A9589 de Sigma-Aldrich (Alcohol Dehydrogenase from equine liver $\geq 0,5$ units/mg protein.1,8U/mg). Se prepara disolviendo 1mg de enzima en 1mL de disolvente (H_2O milliQ o disolución amortiguadora dependiendo de las optimizaciones).
- ADH levadura A3263 de Sigma-Aldrich (Alcohol Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*, 300U/mg). Se prepara disolviendo 1mg de enzima en 2mL de H_2O milliQ o disolución amortiguadora.
- Diaforasa de D5540 de Sigma-Aldrich (Diaphorase from *Clostridium kluyveri* 5,6U/mg). Se prepara disolviendo 2mg en 1mL de disolución amortiguadora. Se guarda en baño de hielo.
- β -Nicotinamidaadeninucleotidohidrato(NAD), 96,5%. Se prepara disolviendo 1mg NAD en 1mL de disolución amortiguadora.
- Colorante cloruro de Iodonitrotetrazolio (INT). Se prepara disolviendo 1mg en 1mL de disolución amortiguadora.
- Etanol. Se prepara la disolución disolviendo etanol 98% en disolución amortiguadora. Se realizan varias diluciones hasta llegar a la concentración necesaria.

3.2. Instrumentación y material.

- Agitador magnético A-01, SBS.
- pH-metro CRISON, Basic 20, para la realización de las medidas del pH
- Balanza analítica modelo GR-202-EC de precisión $\pm 0,01$ mg.
- Micropipetas de volumen variable: Socorex (5-50 μ L, 10-100 μ L y 100-1000 μ L), PipetmanGilson(2-20 μ L, 50-200 μ L y 200-1000 μ L), EppendorfResearch plus (10-100 μ L, 30-300 μ L y 100-1000 μ L).
- Material de vidrio: vidrio de reloj, matraces (10 y 25mL), vasos de precipitados (50, 100 mL)
- Material desechable: cubetas de fluorescencia, viales, tubos falcon, puntas de micropipeta, tubos eppendorf (0,5mL, 1mL,2mL) , pipetas pasteur
- CentrifugalFiltersAmicon Ultra – 4 ml (UltraCell - 10K Membrane), Millipore (UFC801024)
- CentrifugalFiltersAmicon Ultra– 0,5 ml (UltraCell -10K Membrane), Millipore (UFC501024)
- Mezclas de celulosa al 3 y 10 % (W/V)Celulosemicrocristaline, polvo, 20 μ m.
- Tapas de placas de pocillos nuncTM
- Centrifuga eppendorf 5427 R (con control de temperatura)
- Baño Ultrasonidos P Selecta, Precistern
- Incubadora Edmun Bühler GmbH, Johanna Otto
- Espectrofotómetro Fluorescencia CaryFluorescenceSpectrophotometer de Agilenttechnologies, modelo Eclipse, que permite medir entre 190-900nm.
- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis Agilent 8453A, con lámparas de deuterio, red de fotodiodos y rango de medida comprendido entre 190 y 1100nm.
- Teléfono móvil: Realme 5 Pro, con cámara de 48 megapíxeles 9 con aplicación Color Grab®, del equipo Loomatix, capaz de recoger, capturar y reconocer colores en código RGB.

3.3. Procedimiento experimental

El procedimiento experimental consta de medidas de fluorescencia, medidas de absorción y medidas en soporte sólido.

3.3.1 Medidas de fluorescencia.

Todas las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia que permite medidas cinéticas. Para preparar las disoluciones de medida se utilizaron cubetas de fluorescencia con 1cm de paso óptico. El volumen total dependía del tipo de ADH a estudiar. En el caso de estudiar ADH equina, el volumen total fue 800 μ L y para ADH levadura 1800 μ L.

En primer lugar, se buscan los máximos del espectro de excitación y de absorción de NADH, siendo el máximo de excitación 340 nm y el de emisión 450 nm, como se puede observar en la **figura 7**.

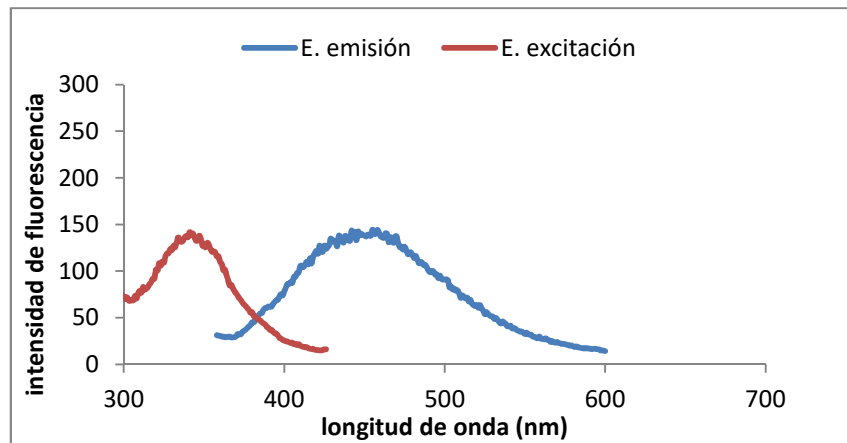


Figura 7: Espectros de emisión y excitación. En rojo, espectro de emisión con máximo de excitación en 340nm. En azul, espectro de excitación con máximo de emisión 450nm.

Para llevar a cabo las medidas, se adicionan sobre la disolución amortiguadora, NAD y ADH y se agitan de forma manual. Una vez que la línea base se estabiliza, se inyectan 20 μ L del analito (etanol). Como consecuencia de esta reacción, se da un aumento de la fluorescencia. Se da por finalizada la medida cuando la señal es estable.

3.3.2 Medidas por absorción molecular.

Todas las medidas se realizaron en cubetas de absorción de 1 cm de paso óptico. Igual que para fluorescencia, se realizan medidas cinéticas.

En el primer caso, donde sólo sucede una reacción, el volumen utilizado es de 1800 μ L. Las longitudes de onda absorción son 340. Antes de realizar las medidas se hace una medida de referencia.

Se añade, además de disolución amortiguadora, ADH y NAD, cuyas concentraciones óptimas se estudian. Se da comienzo a la medida registrando la variación de absorbancia con el tiempo. Una vez que línea base se ha estabilizado, se añaden 20 μ L de analito. Como consecuencia de esta reacción, se da un aumento de la señal de absorción. Cuando la señal se estabiliza, se da por finalizada la medida.

Para llevar a cabo las medidas de absorción en la segunda reacción el proceso es similar. En este caso, el volumen utilizado es 2000 μ L y la longitud de onda de medida es la de 490 nm ya que es la longitud de onda de absorción del colorante. Como el espectrofotómetro lo permite, se mide simultáneamente a 340nm. Esta vez en la cubeta de absorción, además de disolución amortiguadora, ADH y NAD, se añaden enzima diaforasa y colorante, cuyas concentraciones se van a optimizar.

Esta reacción, al ser una reacción indicadora, también es perceptible al ojo humano, ya que la disolución, inicialmente incolora, al añadir etanol, se torna de color rojo al producirse la reducción de INT. En la **figura 8** se muestran cuatro cubetas con concentraciones crecientes de etanol.

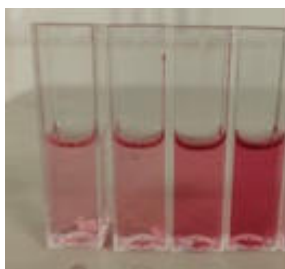


Figura 8. Concentración creciente de etanol de izquierda a derecha

3.3.3. Aplicación en muestra real.

Una vez que el método se ha optimizado, se realizan medidas en muestra real. El método se aplica a una bebida no alcohólica, Kombucha, con un contenido alcohólico inferior al 1%. El tratamiento de la muestra es el siguiente:

Se sumerge una alícuota de 2mL de la muestra en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos para eliminar el gas, puesto que esta bebida tiene una ligera efervescencia.

Después del baño, se realiza una filtración durante 10 minutos a 13400 rpm. Se recogen 950 μ L de esta disolución filtrada y se somete de nuevo a una filtración durante otros 10 minutos a la misma velocidad.

Para poder realizar la medida, se realizan una serie de diluciones para que la concentración de etanol esté dentro del rango lineal estudiado.

3.3.4. Método en soportes sólidos.

3.3.3.1 Construcción de los soportes de celulosa.

Se prepara una dispersión de celulosa de 20 μ m al 3%. Se depositan, a continuación, 75 μ L de esta dispersión en los orificios de una tapa de placa de pocillos que actúa como molde. Se deja secar en la incubadora durante 2-3 horas a 35°C.

Una vez seca esta dispersión se ha convertido en un soporte sólido de celulosa en el que se pueden inmovilizar los reactivos.

En este caso, los reactivos se añaden en volúmenes de 5 ó 10 μ L de uno en uno, esperando que se seque el primero para añadir el siguiente. Para el secado de los reactivos en las placas, éstas se deben introducir en la incubadora o en la caja de ventilación durante 15min.

3.3.3.2. Medida del analito.

El instrumento de medida es el teléfono móvil. Como el objetivo principal es la determinación rápida de etanol, poder hacer las medidas con un *smartphone* supone una gran ventaja. El montaje para la realización de la medida es muy sencillo. Se sujeta el teléfono a una pinza colocada en un soporte de laboratorio. De esta manera, se intenta que la medida sea lo más reproducible posible ya que el teléfono se encuentra en la misma posición en toda las medidas. En la **figura 9**, se observa dicho montaje.

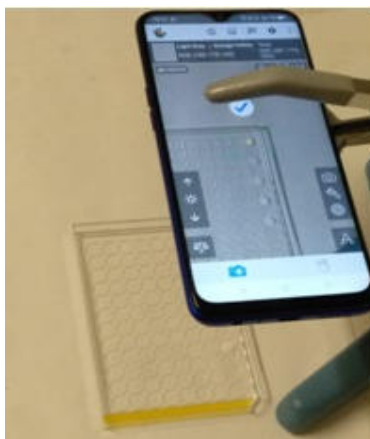


Figura 9: Dispositivo para medir en soporte sólido usando un *Smartphone*.

Una vez realizado el montaje, se pone una placa seca, sobre una superficie blanca debajo del teléfono para así poder realizar las medidas. Para ello, es necesario descargar la aplicación Color Grab®. Esta herramienta recoge y captura los colores mediante la cámara, por lo que colocando el círculo que indica donde se realiza la medida en el pocillo de interés (enfocando) se obtiene el valor en coordenadas RGB del color de dicho pocillo. Para realizar la medida de los diferentes pocillos se debe desplazar la placa y no el teléfono móvil puesto que podría afectar a la reproducibilidad de la señal.

En el momento de realizar la medida, es importante hacer una medida de referencia. Para ello, una vez puestos todos los componentes de la reacción, se adicionan 10 μL de disolución amortiguadora del pH al que se va a trabajar. Para el resto de las medidas, se añaden en lugar de 10 μL de disolución amortiguadora, 10 μL del analito a determinar.

La concentración de analito, se debe de poder seguir a través del cambio de las coordenadas RGB que da la aplicación. Se toma como señal, la diferencia de señal entre las coordenadas de la medida de referencia, y las obtenidas una vez se ha añadido el analito.

4. RESULTADOS y DISCUSIÓN.

Se comienza trabajando en disolución. La reacción se puede seguir por absorción molecular ultravioleta visible y por fluorescencia. Se comienza por fluorescencia ya que es más sensible.

4.1. Método de Fluorescencia.

4.1.1. ADH equina

En primer lugar, se comprueba que la reacción tiene lugar. Después de realizar esta comprobación, se procede a la optimización de parámetros.

1. Optimización del pH.

La mayoría de las enzimas son muy sensibles a las variaciones de pH. Es por ello, que en primer lugar, se realiza la reacción en distintas disoluciones amortiguadoras de pH; los datos obtenidos se encuentran en la **Tabla 1**.

pH	7,0	8,0	8,5	9,0	9,5
Δ señal	75	106	193	226	96

Tabla 1: Optimización de pH en ADH equina. $[ADH]= 0,8U/mL^{-1}$ $[NAD]= 1,88 \cdot 10^{-4}M$; $[etanol]=1,1 \cdot 10^{-3}M$

Se elige pH=9 por ser el medio en el que se encuentra una mayor diferencia de señal; este valor era el esperado ya que es el pH óptimo del enzima.

2. Optimización de concentración de NAD.

Se estudia la concentración de NAD para la cual la señal es mayor.

Se observa en la **figura 10** que la señal aumenta conforme se aumenta la concentración de NAD. En las dos concentraciones más bajas ($9,42 \cdot 10^{-5}M$ y $1,88 \cdot 10^{-4}M$) el aumento es considerable, pero en las dos concentraciones más altas ($3,77 \cdot 10^{-4}M$ y $2,83 \cdot 10^{-4}M$), el aumento de la señal no es tan acentuado. Se elige $[NAD]=1,88 \cdot 10^{-4}M$.

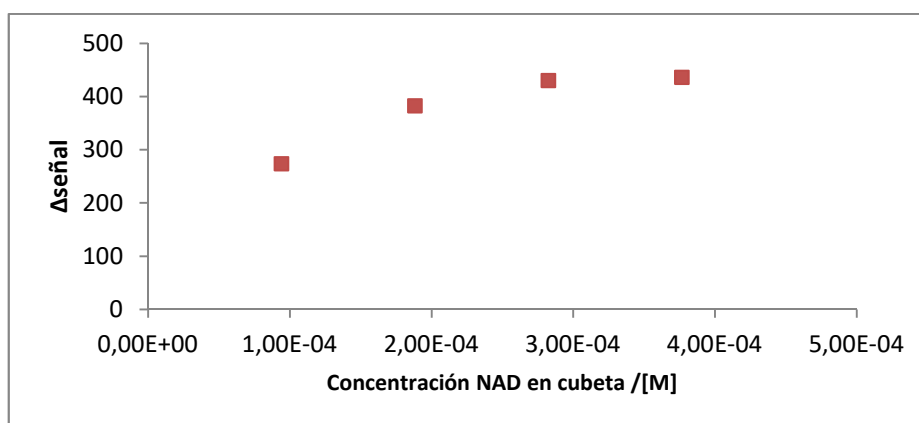


Figura 10: Optimización de la $[NAD]$. $[ADH]= 0,8U/mL^{-1}$; pH=9; $[etanol]=1,1 \cdot 10^{-3}M$.

3. Optimización de concentración de ADH.

El siguiente parámetro a estudiar, es la concentración del enzima. En la **tabla 2** se muestra la velocidad inicial de la reacción para distintas concentraciones de enzima.

$[ADH](U/mL)$	0,6	0,8	1,4	1,6
Velocidad inicial $[\Delta$ señal]/tiempo	2,103	2,327	2,438	2,584

Tabla 2. Optimización concentración ADH. $[NAD]= 1,88 \cdot 10^{-4}M$, pH=9, $[etanol]=1,1 \cdot 10^{-3}M$.

Se observa que la velocidad de la reacción aumenta conforme se aumenta la concentración de enzima. Se elige por ello, la concentración a la cual la reacción tiene una mayor velocidad ($1,6U/mL$) como concentración óptima. Aun así, como puede observarse en la **figura 11**, se trata de una reacción muy lenta.

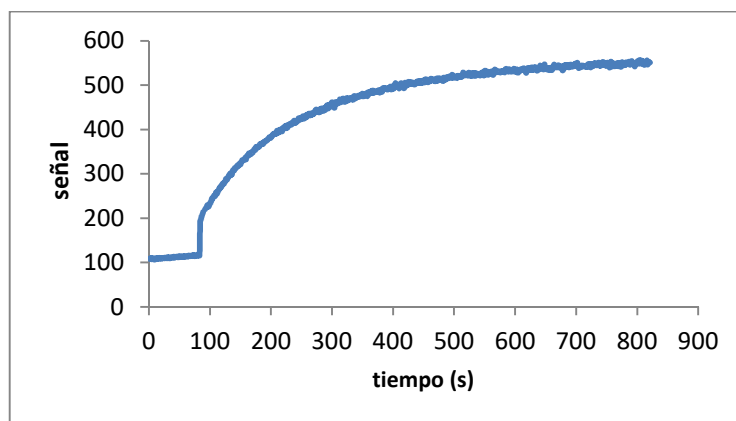


Figura 11. Ejemplo de medida cinética de la reacción. $[NAD]= 1,88 \cdot 10^{-4}M$; $[ADH]= 1,6U mL^{-1}$; $pH=9$; $[etanol]=1,1 \cdot 10^{-3}M$.

4.- Calibración y reproducibilidad.

Una vez que se han optimizado los parámetros, se realiza una calibración con las condiciones elegidas. La calibración viene representada en la **figura 12**

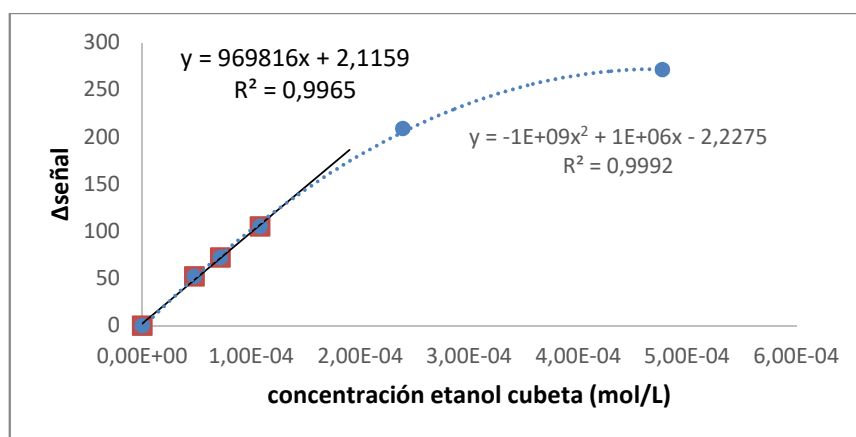


Figura 12: Calibración. $[NAD]= 1,88 \cdot 10^{-4}M$; $[ADH]= 1,6U mL^{-1}$; $pH=9$;

Se observa que la ecuación de calibración, es una ecuación de segundo grado, con un tramo lineal muy corto, solamente hasta $1 \cdot 10^{-4}M$ de etanol.

El rango lineal corto, y sobre todo, la baja velocidad, hacen que se decida hacer un cambio de enzima.

4.1.2. ADH Levadura de cerveza

Se estudia la misma reacción con una enzima de otro microorganismo para ver si la reacción es más rápida en este caso.

1. Optimización de ADH.

La nueva ADH tiene una mayor actividad lo que permite trabajar en un rango de concentración mayor y así determinar concentraciones de etanol más pequeñas en un

tiempo más corto. Por ello, en primer lugar, se procede a la optimización de la concentración de enzima.

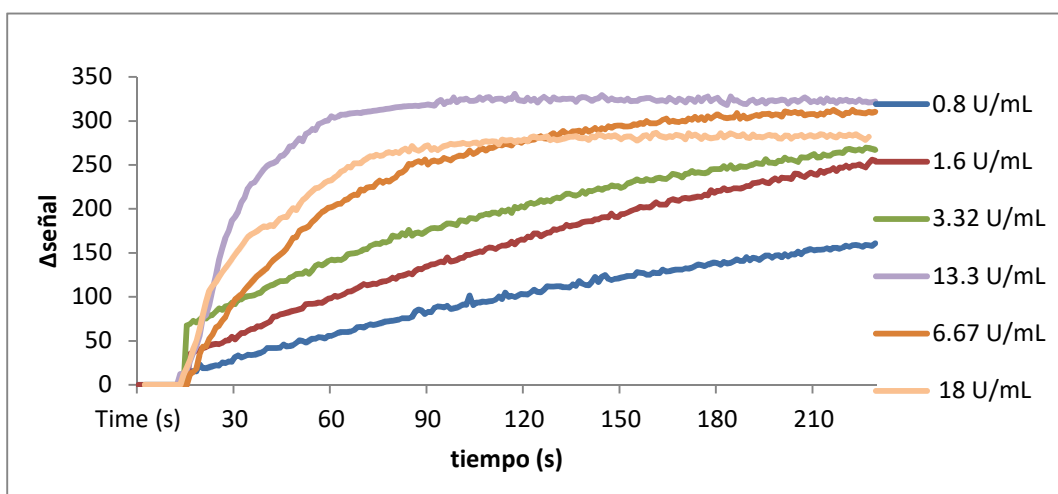


Figura 13. Optimización de [ADH]. [NAD]= $1,88 \cdot 10^{-4} M$; [etanol]= $4 \cdot 10^{-4} M$; pH=9

En la **figura 13**, está representada la cinética de la reacción para distintas concentraciones de ADH. Se puede observar que la concentración que da una señal más elevada en el mismo tiempo es 13,3 U/mL.

[ADH] (U/mL)	0,8	1,6	3,32	6,67	13,3	18
Velocidad inicial	1,12	1,71	2,25	5,32	13,3	7,82

Tabla 3. Tabla de velocidad inicial según concentración de ADH.

En la **tabla 3** se encuentran los datos de velocidad inicial para el enzima. Se observa que la velocidad inicial es mayor para dicha concentración (13,3 U/mL). Se trata de una concentración viable de enzima ya que la actividad de este ADH es mayor que en el ADH equina.

Por tanto, se cumple el objetivo principal para hacer un cambio de enzima que es mejorar la velocidad de la reacción.

2. Optimización de pH :

Se realiza la reacción en distintas disoluciones amortiguadoras de pH. Vuelve a elegirse como pH óptimo, pH=9 debido a que tiene un mayor incremento de señal. Los datos obtenidos se encuentran en la **Tabla 4**.

pH	9,5	9,0	8,5	8,0
Δseñal	274,0	325,0	207,5	111,8

Tabla 4: Optimización de pH. [ADH]= $13,3 U mL^{-1}$ [NAD]= $1,88 \cdot 10^{-4} M$; [etanol]= $4 \cdot 10^{-4} M$

3. Optimización NAD:

Una vez escogida la concentración del enzima y el pH de trabajo, se optimiza la concentración de NAD. Los resultados vienen recogidos en la **tabla 5**.

Concentración (M)	$2,00 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$
Δ señal	291	340	445	484	445.5

Tabla 5. Optimización de [NAD]. [ADH]= $13,3 \text{U mL}^{-1}$ [etanol]= $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$; pH=9

La concentración escogida para seguir con la determinación es $1,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ de NAD puesto que es para aquella concentración para la que se encuentra un mayor incremento de señal.

4. Calibración de etanol.

Una vez que se tienen las condiciones óptimas de la reacción, se realiza una calibración con las condiciones escogidas.

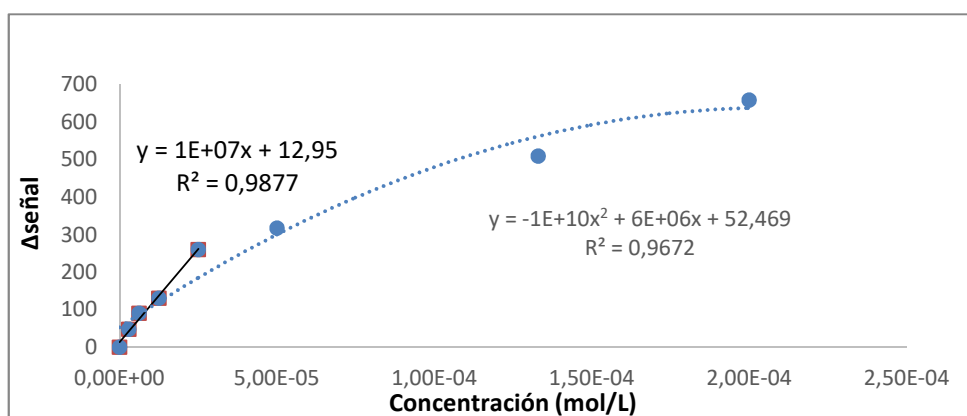


Figura 14: Calibración. [ADH]= $13,7 \text{U/mL}$; [NAD]= $1,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$; pH=9.

Como se observa en la **figura 14**, la ecuación de la calibración es como en el caso anterior una ecuación de segundo grado.

El primer tramo es lineal, pero el rango lineal es muy corto, sólo llega hasta $2,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Por tanto, se pasa a estudiar la reacción por absorción molecular para ver si así se evita este efecto.

4.2. Absorción molecular.

Se realiza una calibración mediante absorción molecular con las condiciones establecidas como óptimas en la reacción por fluorescencia. Como se observa en la **Figura 15**, esta calibración también tiene un rango lineal corto, ya que la ecuación de la recta es una ecuación de segundo grado. Se cree que puede ser porque la formación de NADH en la reacción se bloquea.

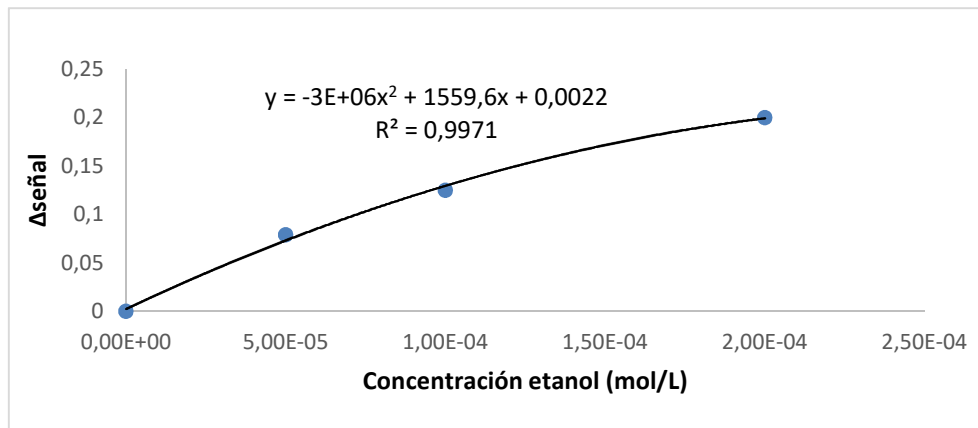


Figura 15. Calibración por absorción. [ADH]= 13.7 U/mL; [NAD]= $1,2 \cdot 10^{-3}$ M; pH=9.

Para conocer si se trata de un bloqueo en la reacción por el exceso de concentración de NADH, se estudia implementar una nueva reacción en la que se produzca un consumo de este producto.

En esta segunda reacción participa la enzima diaforasa y un colorante, en este caso iodonitrotetrazolium (INT). Se comprueba la viabilidad de que ocurran estas reacciones simultáneamente.

4.2.1. Optimización de parámetros.

Como se observa que hay reacción, se realiza una optimización de los parámetros.

1. Optimización de NAD.

El cofactor, es muy importante en esta reacción puesto que es el puente entre las dos reacciones. En la **tabla 6** se encuentran los valores de la señal para distintas concentraciones de NAD. Se observa que, por encima de un mínimo, la concentración de NAD no afecta a la reacción. Se elige como concentración de NAD $4 \cdot 10^{-3}$ M.

[NAD]/mol/L	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$7,6 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$
ΔSeñal (490nm)	0,09	0,62	0,62	0,66	0,63	0,67

Tabla 6: Optimización[NAD]. [ADH]=13,6U/mL; [diaforasa]=1U/mL; [INT]= $5 \cdot 10^{-5}$ M; [etanol]= $1 \cdot 10^{-4}$ M

2. Optimización pH.

El pH es un parámetro muy importante en las reacciones con enzimas, ya que la actividad de las enzimas depende del pH de trabajo. El pH óptimo de la enzima ADH es 9, mientras que el pH óptimo de la diaforasa es 7. El resultado del estudio de pH puede verse en la **figura 16**. Las medidas se dan para valores de 600 segundos, de los cuales, en los 60 primeros segundos se ha estabilizado la línea base. Se elige pH=10 como óptimo debido a que tiene una velocidad mayor que el resto. En la **figura 16**, puede verse un incremento de la señal mayor que el resto en el mismo intervalo de tiempo.

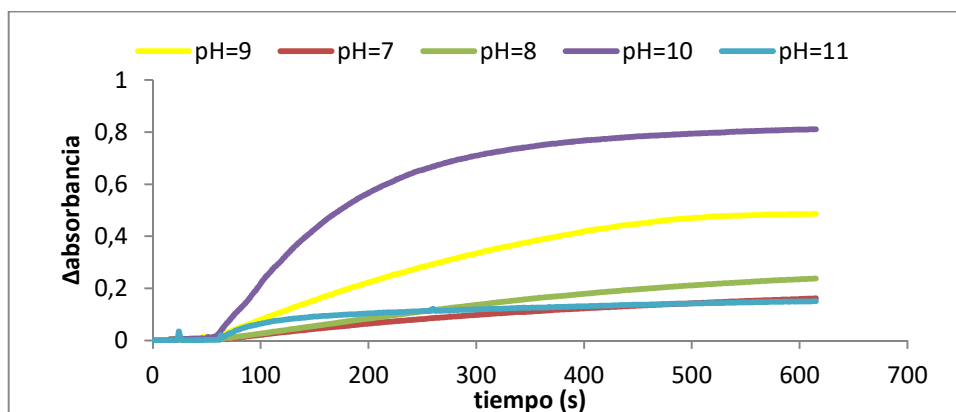


Figura 16: Optimización pH. [NAD]= $4 \cdot 10^{-3}$ M; [ADH]=13,6U/mL; [diaforasa]=1U/mL; [INT]= $5 \cdot 10^{-5}$ M; [etanol]= $1 \cdot 10^{-4}$ M

4. Optimización de diaforasa

Otro parámetro a optimizar es la concentración de enzima diaforasa. Para ello se realizan disoluciones al pH óptimo de varias concentraciones de enzima.

Como se observa en la **figura 17**, a medida que aumenta la concentración de enzima aumenta la velocidad. Se consideró adecuado la concentración de enzima a partir de 0,55 U/mL.

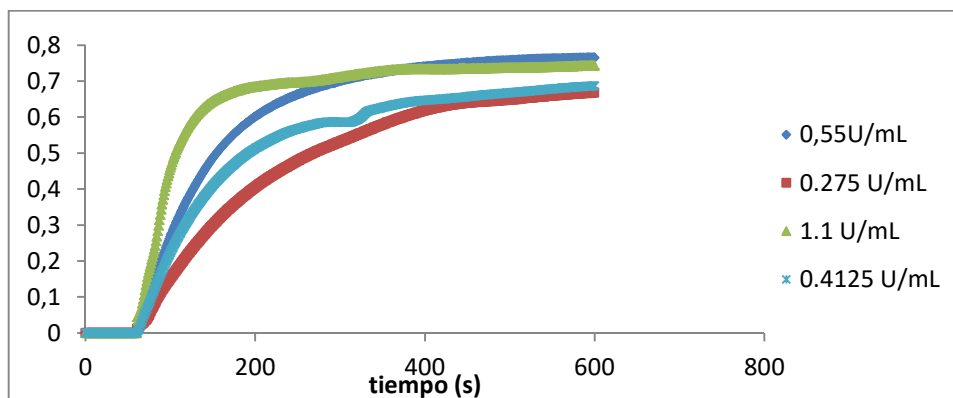


Figura 17: Optimización de diaforasa. [NAD]= $4 \cdot 10^{-3}$ M; [ADH]=13,6U/mL; [INT]= $5 \cdot 10^{-5}$ M; [etanol]= $1 \cdot 10^{-4}$ M; pH=10.

5. Optimización colorante.

Se comprueba que al aumentar la concentración de colorante aumenta la señal de manera lineal, **Figura 18**. El problema de las concentraciones más elevadas de colorante es que también aumenta la señal del blanco dando ya una coloración inicial a la disolución, lo que supondría un problema futuro, sobre todo, a la hora de inmovilizaren celulosa.

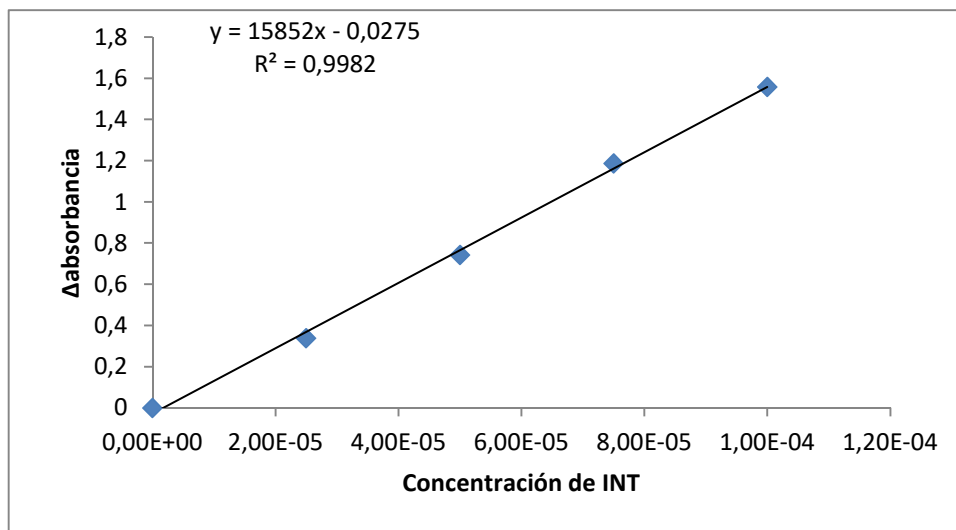


Figura 18: Optimización de colorante. [NAD]= $4 \cdot 10^{-3}$ M; [ADH]=13,6/mL; [diaforasa]=0,55; [etanol]= $1 \cdot 10^{-4}$ M. pH=10.

4.2.2. Calibración

Para hallar el rango lineal de la determinación de etanol, se realizó una calibración utilizando todos los parámetros anteriormente optimizados. Se prepararon disoluciones con concentraciones de etanol desde $1,25 \cdot 10^{-5}$ M hasta $1,00 \cdot 10^{-4}$ M.

Los resultados obtenidos tanto a 490 nm como a 340 nm se encuentran en la **figura 19**.

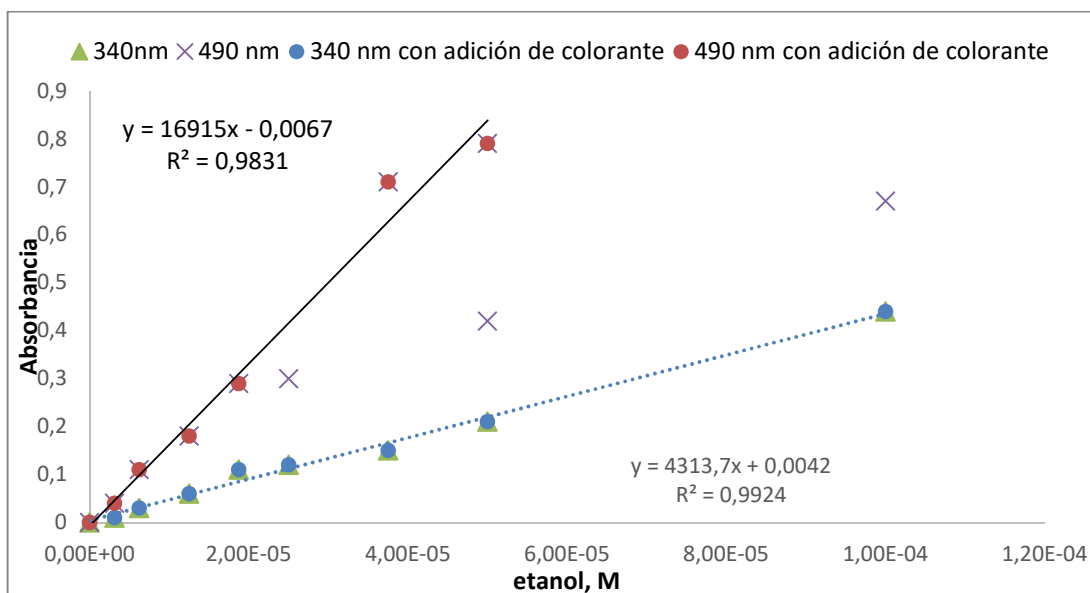


Figura 19: Calibración. [NAD]= $4 \cdot 10^{-3}$ M; [ADH]=13,6/mL; [diaforasa]=0,55; pH=10.

En la realización de esta calibración, se observa que, para 490 nm, al aumentar la concentración de etanol por encima de $1,88 \cdot 10^{-5}$ M se tumba la recta y se pierde la linealidad. Las señales de absorción a la longitud de onda del colorante son menores de lo esperado.

Es por esta razón, por la que se estudia el aumento de la concentración de colorante a partir de esas concentraciones. Se observa que si la concentración de colorante es cuatro veces mayor que la del analito aumenta el rango lineal.

Por otro lado, también en la **figura 19** se puede observar que a la longitud de onda del NADH, (340nm) ha aumentado el rango lineal con respecto a cuando sólo se tenía una reacción. Por lo tanto, se ha conseguido el objetivo, que era aumentar el rango lineal.

4.2.3.Reproducibilidad y límite de detección:

Una vez que se han optimizado todos los parámetros se estudia su reproducibilidad en condiciones óptimas. En este caso, se estudió con 4 réplicas que contenían una concentración de etanol de $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (**Tabla 7**).

Réplica nº	1	2	3	4	%DSR
Δabs_{490}	0,300	0,300	0,301	0,297	0,578

Tabla 7: [ADH] = 13,3U/mL; [colorante] = $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$; [diaforasa] = 0,55U/mL; [NAD] = $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$; pH=10

Se observa que la DSR que es el parámetro que indica si una muestra es reproducible es muy bajo. Por tanto, sí que estamos ante un método reproducible.

El límite de detección del método es de $3.1 \cdot 10^{-7} \text{M}$.

4.2.4 Aplicación a una muestra real.

Una vez optimizados los parámetros, se aplica a una muestra real. La muestra real elegida es una bebida llamada Kombucha.

La Kombucha es una bebida probiótica hecha a partir de té y azúcar. Se comercializa como una bebida que tiene beneficios para la salud, como la mejora del sistema inmune y el funcionamiento intestinal. Se trata de una bebida no alcohólica pero debido al proceso de producción, se cree que existe la posibilidad de que continúe fermentando y por tanto, produciendo etanol. Esto supondría que el contenido en alcohol inicial estuviese por debajo del umbral de certificación de bebida no alcohólica en el momento de la fabricación, pero esto no fuese así en el momento del consumo.

Se comparan dos muestras de dos marcas distintas: K1 y K2.

Se prepara la muestra como se ha explicado anteriormente y se analiza en las condiciones óptimas, que son las siguientes:

[ADH] = 13,3U/mL; [colorante] = $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$; [diaforasa] = 0,55U/mL; [NAD] = $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$; pH=10

Una vez que se obtiene la señal, se interpola en la recta de calibrado.

Los resultados son los siguientes:

Muestra K1: $0,36 \pm 0,01\%$

Muestra K2: $0,91 \pm 0,01\%$

Se concluye que las dos muestras de esta bebida pueden considerarse no alcohólicas por tener menos del 1% de alcohol.

En el caso de K1, en su etiqueta ponía que el contenido en alcohol era menor del 0,5% y en el caso de K2, menor del 1%. En ambos casos, el resultado está de acuerdo con la información del fabricante.

4.3 Soportes de celulosa

Una vez que se ha estudiado el método en disolución, se pasa al estudio en soporte sólido.

En primer lugar se debe construir el soporte. Para ello, es necesario inmovilizar los reactivos en soportes de celulosa. Se trata de una determinación mediante coordenadas RGB utilizando una aplicación de Smartphone.

4.3.1 Ensayos previos.

a.- Compatibilidad de reactivos y celulosa.

En primer lugar, se estudia si hay reacción y si es compatible con la celulosa ya que tiene grupos OH que podrían interferir en la reacción reaccionando con ADH.

Se preparan las siguientes disoluciones en agua

$[NAD]=4 \cdot 10^{-4}M$; $[ADH]=26,6U/mL$; $[diaforasa]=1U/mL$; $[INT]1 \cdot 10^{-5}M$; $[etanol]=2 \cdot 10^{-3}M$

Se añaden los reactivos de uno en uno, en volúmenes de 5 en $5\mu L$ y dejando secar 5 minutos entre una y otra.

Finalmente, se añaden $10\mu L$ de agua destilada en dos soportes y $10\mu L$ de etanol en otros dos. En ninguno de los casos, ni en el blanco, ni en los que tenían analito se vieron cambios a corto plazo. Podemos concluir entonces, que sí se trata de una reacción compatible con la celulosa, puesto que el blanco no da señal, aunque se deban optimizar los parámetros.

En un segundo estudio, se aumenta la concentración de reactivos y se prepara la dispersión de la celulosa en la disolución amortiguadora de $pH=10$ que se ha utilizado durante el estudio. Después del tiempo de secado, se añaden los reactivos. En este caso, ya se ve algo de color, lo que ocurre es que se distingue color tanto en el blanco como en las que contienen etanol. Además, hace un efecto de “mancha de café” debida a que el colorante no se expande correctamente.



Figura 20: los dos soportes de la izquierda son el blanco y las dos de la derecha tienen analito.

b.- Optimización inmovilización colorante.

Se busca eliminar el efecto mancha de café y que el color sea más uniforme. Para ello, se disuelve el colorante en la dispersión inicial de celulosa.

Se preparan dos dispersiones de celulosa de 20 micras al 3%, una con la disolución de colorante en agua y la otra con la disolución de colorante en la disolución amortiguadora. Como se observa en la **figura 21**, los pocillos que se han hecho con agua son de color blanco y los hechos con tampon son de color rosa. Por tanto, se puede afirmar que el pH o la especie del tampon afecta a la reacción. Por otro lado se observa que el color es homogéneo.



Figura 21

Se añade el resto de reactivos de igual forma que en los estudios previos. Finalmente se añade 10 μL de tampon y 10 μL de etanol de concentraciones $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$, $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ y $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$.

Los resultados se ven reflejados en la **Figura 22**. Puede apreciarse un aumento de coloración tanto en los soportes realizados con agua como en los realizados con tampon. Se cree, por tanto, que puede haber habido reacción aunque no parece depender de la concentración de etanol. La zona de celulosa disuelta en agua adquiere una coloración más baja que en la disuelta en tampon.

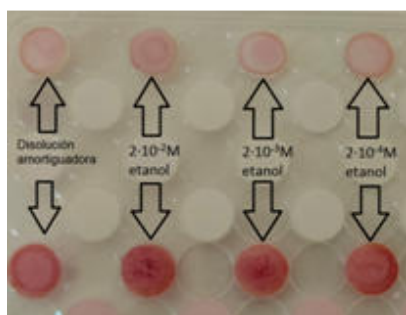


Figura 22

c.- Optimización de pH.

El objetivo de este ensayo es estudiar si es el pH o la especie lo que da color a los soportes sólidos antes de añadir ningún reactivo.

Se preparan disoluciones a $\text{pH}=10$ con distintos reactivos, carbonatos y tampon universal por si es la especie la que hace que se obtenga una señal inicial tan elevada. No se encuentran diferencias significativas de color entre las distintas especies amortiguadoras de $\text{pH}=10$. A este pH hay color independientemente de la especie.

Se estudian ahora otros pH; para ello, se prepara con tampon universal diferentes dispersiones de celulosa a pH= 9,8 y 7. Se observó que a pH=9 , los soportes experimentan algo de color, pero son blancos para pH=7 y 8.

d.- Comprobación de la reacción indicadora.

El objetivo de este experimento, es ver si la reacción indicadora tiene lugar, o, la coloración de la reacción, viene dada por la reacción del colorante con otra especie. Para ello se realiza la reacción con NADPH como analito.

Se prepara la dispersión de celulosa en agua y se deja secar en la incubadora durante 2-3 horas. Una vez seco, se añade diaforasa a pH=7, 8, 9 y 10 de la misma concentración que en los experimentos anteriores.

Cuando se seca la diaforasa, se añade blanco y diferentes concentraciones del que ahora es el analito (NADPH).

Se obtuvo señal a pH=7 que es el óptimo de la enzima diaforasa y no a pH=8,9 y 10. Esto explicaría por qué no hay señal en el etanol ya que se ha hecho a pH distintos de 7. Se observa además que la señal depende de la concentración de NADPH.

Se midieron las coordenadas de color mediante el código RGB con una aplicación de smartphone.

Al representar las coordenadas de color frente a la concentración de analito (NADPH), se observa que hay diferencia de señal. Donde más se aprecia esta variación de señal es en la coordenada G y B. Por tanto, la disolución indicadora sí que funciona.

En la **figura 23**, están representados la diferencia de señal entre las coordenadas de medida de referencia (medida del blanco) y la obtenida una vez se ha añadido el analito.

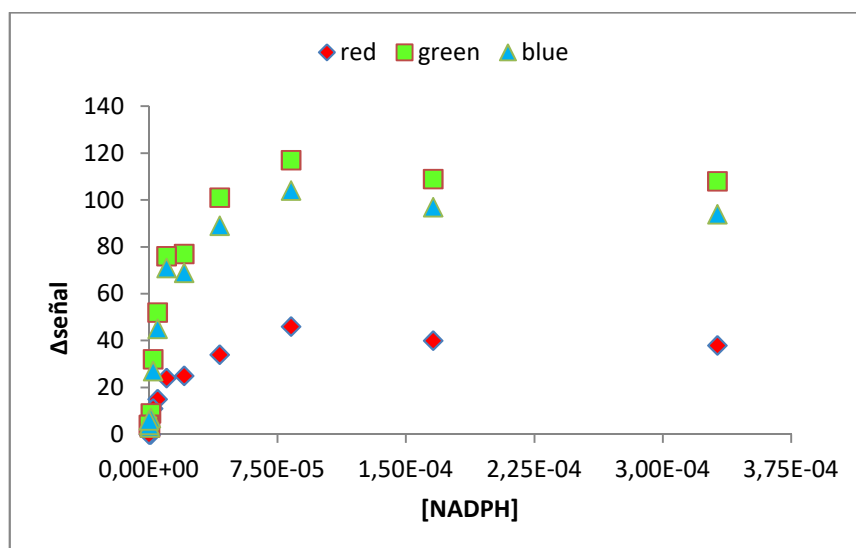


Figura 23. Diferencias en señal RGB con NADPH como analito

4.3.2 Dependencia de la concentración de ADH.

Una vez visto que la reacción indicadora funciona adecuadamente a pH=7, se estudia la reacción de etanol a ese pH. Para ello, se prepara una dispersión de celulosa con colorante a pH=7.

Se adicionan los reactivos de la misma forma que en los experimentos anteriores variando la cantidad de ADH.

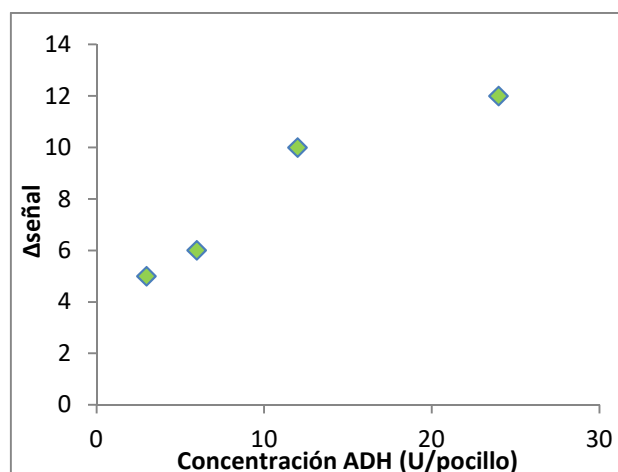


Figura 24. $[NAD]=4 \cdot 10^{-7}$ moles/pocillo; [diaforasa]=0.22U/pocillo

Dentro del código RGB, se utiliza la coordenada G. Como se observa, en la figura 24, se obtiene señal debido al etanol y esta señal depende de la concentración de enzima ADH; a medida que se aumenta la concentración de enzima se produce un aumento de la señal.

4.3.3 Dependencia de la concentración de etanol.

Se mide el color de las placas para distintas concentraciones de etanol en las mismas condiciones que en el apartado anterior. Un ejemplo de los resultados se encuentra en la figura 25. Las concentraciones de etanol estudiadas son: $2 \cdot 10^{-2}M$; $2 \cdot 10^{-3}M$ y $2 \cdot 10^{-4}M$.

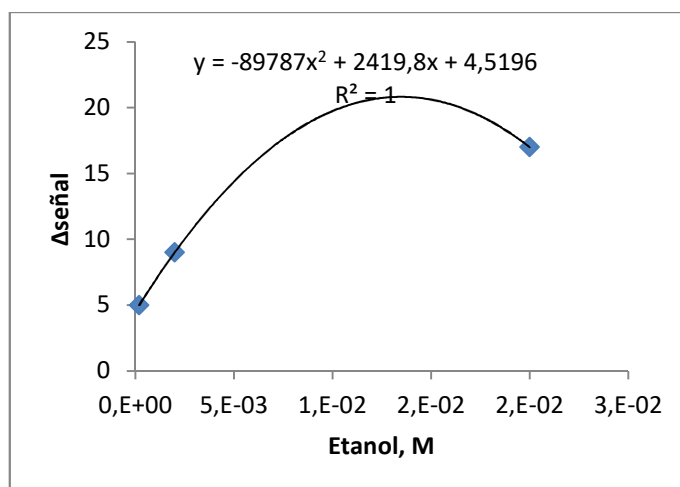


Figura 25. $[NAD]=4 \cdot 10^{-7}$ moles/pocillo; [diaforasa]=0.22U/pocillo; [ADH]=6U/pocillo

Se observa que hay una variación de la señal y que ésta aumenta con la concentración de etanol según una ecuación de segundo grado, si bien habría que estudiarla con más puntos.

Este resultado es muy prometedor, ya que se obtiene señales en un soporte sólido con concentraciones muy bajas de etanol.

Estos son los primeros estudios para la detección de etanol en soportes de celulosa. En ensayos posteriores, se deben optimizar parámetros de los que depende la reacción como la concentración de cofactor, de enzima diaforasa y el tipo y concentración de colorante. Así como la posibilidad de determinar el contenido de etanol en muestras reales de forma directa, por ejemplo en aire espirado.

Este estudio es un punto de partida para la detección de etanol utilizando las coordenadas RGB.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se aborda la determinación enzimática de etanol en disolución y en soportes de celulosa. Se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. La determinación de etanol con el enzima ADH a partir de las propiedades espectroscópicas de NADH (utilizado como cofactor) se puede llevar a cabo tanto por fluorescencia como por absorción molecular. La calibración es una ecuación de segundo grado que implica un rango lineal muy corto (hasta $2,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de etanol)
- 2.- De las dos enzimas ADH estudiadas, se recomienda utilizar la que proviene del organismo *Saccharomyces cerevisiae* ya que es mucho más activa.
3. Se ha comprobado la posible determinación de etanol mediante el acoplamiento de la reacción enzimática del enzima diaforasa con el NADH formado en la reacción anterior utilizando las propiedades espectroscópicas del colorante INT. Alarga el rango de respuesta lineal siempre que haya exceso de colorante respecto al analito en una proporción de al menos 4:1.
4. Las condiciones óptimas de determinación de etanol en disolución son ([ADH] = 13,3U/mL; [colorante] = $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$; [diaforasa] = 0,55U/mL; [NAD] = $4 \cdot 10^{-3} \text{M}$; pH=10) lo que ha permitido determinar etanol en muestras reales.
- 5.- Los reactivos ADH, Colorante, NAD y diaforasa se pueden inmovilizar en celulosa y siguen siendo activos ya que han permitido obtener señal al reaccionar con etanol.
6. En soporte sólido el pH es un factor muy importante ya que afecta al colorante. A pH=10 los soportes son coloreados. Así mismo la reacción indicadora resultó ser delimitante y el pH adecuado resultó ser 7.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- [1]. García Oliva, Cecilia María (2015) *Abordaje terapéutico del alcoholismo*.
- [2]. Monfort Palacios, A.: La alcoholemia y su legislación aplicable, en *Contribuciones a las Ciencias Sociales*, septiembre 2009. www.eumed.net/rev/cccss/05/amp2.htm
- [3]. https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/legislacion/recopilaciones-legislativas-monograficas/bebidas_no_alcoholicas.aspx Consultado 21/11/2021
- [4]. https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/Prevencion/alcohol/docs/Limites_Consumo_Bajo_Riesgo_Alcohol_Actualizacion.pdf Consultado 21/11/21
- [5]. <https://www.mjusticia.gob.es/es/ministerio/gabinete-comunicacion/noticias-ministerio/210713-informe-victimas-accidentes-de-trafico> Consultada el 23/11/21
- [6]. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-23514#civ>
- [7]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32000R2870v>
- [8]. Paulina Wiśniewska, Magdalena Śliwińska, Tomasz Dymerski, Waldemar Wardencki & Jacek Namieśnik (2015) Application of Gas Chromatography to Analysis of Spirit-Based Alcoholic Beverages, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45:3, 201-225, DOI: [10.1080/10408347.2014.904732](https://doi.org/10.1080/10408347.2014.904732)
- [9]. Libargachew Demlie Mihretu, Asfaw Gebretsadik Gebru, Kebede Nigussie Mekonnen, Abraha Gebrekidan Asgedom & Ykalo Hadush Desta | (2020) Determination of ethanol in blood using headspace gas chromatography with flame ionization detector (HS-GC-FID): Validation of a method, *Cogent Chemistry*, 6:1, 1760187 <https://doi.org/10.1080/23312009.2020.1760187>
- [10]. Pellegrino S, Bruno FS, Petrarulo M. Liquid chromatographic determination of ethyl alcohol in body fluids. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999 Jun 11;729(1-2):103-10. doi: 10.1016/s0378-4347(99)00131-0. PMID: 10410932.
- [11]. Thiago Gomes Cordeiro, Mauro Sergio Ferreira Santos, Ivano Gebhardt Rolf Gutz, Carlos D. Garcia, Photochemical oxidation of alcohols: Simple derivatization strategy for their analysis by capillary electrophoresis, *Food Chemistry*, Volume 292, 2019, Pages 114-120, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.043>
- [12]. Engelhard S, Löhmansröben HG, Schael F. Quantifying ethanol content of beer using interpretive near-infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc*. 2004 Oct;58(10):1205-9. doi: 10.1366/0003702042336000. PMID: 15527521.
- [13]. Gordon J Pilone, Determination of Ethanol in Wine by Titrimetric and Spectrophotometric Dichromate Methods: Collaborative Study, *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Volume 68, Issue 2, 1 March 1985, Pages 188-190, <https://doi.org/10.1093/jaoac/68.2.188>
- [14]. Determination of ethanol in distilled liquors using sequential injection analysis with spectrophotometric detection, *Analytica Chimica Acta*, Volume 499, Issues 1-2, 2003, Pages 123-128, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.07.005>.

- [15]. LAU, OI-WAH; LUK, SHIU-FAI. Spectrophotometric method for the determination of ethanol in beverages and beer samples using cerium (IV) as reagent. *International journal of food science & technology*, 1994, vol. 29, no 4, p. 469-472.
- [16]. Kristoffersen L, Skuterud B, Larssen BR, Skurtveit S, Smith-Kielland A. Fast quantification of ethanol in whole blood specimens by the enzymatic alcohol dehydrogenase method. Optimization by experimental design. *J Anal Toxicol*. 2005 Jan-Feb;29(1):66-70. doi: 10.1093/jat/29.1.66. PMID: 15808017.
- [17]. Páscoa RN, Vidigal SS, Tóth IV, Rangel AO. Sequential injection system for the enzymatic determination of ethanol in wine. *J Agric Food Chem*. 2006 Jan 11;54(1):19-23. doi: 10.1021/jf051787l. PMID: 16390171.