



## RENDIMIENTO ANALÍTICO DEL BIOSENSOR DE NONOPARTICULAS DE $\text{TiO}_2$ INMOVILIZANDO ENZIMA LACASA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

Mariana Romero-Arcos<sup>a</sup>, Ma. Guadalupe Garnica-Romo<sup>b</sup>, Maricela Villicaña Méndez<sup>c</sup> y Leandro García González<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, UMSNH., [romeroarcosm@gmail.com](mailto:romeroarcosm@gmail.com)

<sup>b</sup> Facultad de Ingeniería Civil. U.M.S.N.H. [gromar05@yahoo.com.mx](mailto:gromar05@yahoo.com.mx).

<sup>c</sup> Facultad de Ingeniería Química. U.M.S.N.H. [vimadinmx@yahoo.com.mx](mailto:vimadinmx@yahoo.com.mx)

<sup>d</sup> Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana.  
[lgarciaglez@yahoo.com.mx](mailto:lgarciaglez@yahoo.com.mx)

### RESUMEN

Biosensor amperométrico basado en la inmovilización de la enzima lacasa en una película compuesta por nanopartículas de dióxido de titanio (titania) derivadas de la técnica sol-gel, fue desarrollado. Las nanopartículas de dióxido de titanio, han sido utilizadas debido a su alta estabilidad química, gran área superficial, es un material inerte, y presenta una buena biocompatibilidad con la enzima con la cual da lugar a una buena actividad catalítica electroquímica hacia la reducción de la benzoquinona producida por la reacción enzimática. El paso de inmovilización de la enzima lacasa se llevó a cabo mediante el dopaje de la superficie del electrodo de grafito con un compuesto del sol de titania con Nafión. Mediante difracción de rayos X se caracterizaron las nanopartículas de titanio. Por otra parte, se comparó el rendimiento analítico del biosensor desarrollado mediante Espectroscopia de Impedancia Electroquímica para estudiar los cambios en la interface, así como la cinética de inmovilización de la enzima.

### 1. INTRODUCCIÓN

La determinación de compuestos fenólicos (CF) es muy importante en alimentos, suelo, medicina, medio ambiente, y superficie del agua, debido a su actividad antioxidante, toxicidad inherente y persistencia [1]. Además, pueden ser considerados como antioxidante, anti-inflamatorios, anticancerígenos, y desempeñan un papel importante en muchos campos. El marcado interés por determinar los CF de manera cualitativa y cuantitativa en los alimentos se debe a su capacidad de formar parte del sistema antioxidante celular, el cual proporciona importantes beneficios para la salud, entre los cuales se destacan su capacidad para inhibir los procesos oxidativos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) reduciendo los riesgos de enfermedades cardiovasculares, protegiendo los tejidos del daño oxidativo y del envejecimiento celular, así como por su acción antiinflamatoria, y por sus propiedades anticancerígenas [1,2].

Un número de métodos han sido reportados para analizar el contenido de compuestos fenólicos. Los métodos analíticos tales como cromatografía, quimioluminiscencia, la electroforesis de zona capilar, y los métodos espectrofotométricos, están siendo empleados para determinar polifenoles. Pero estos métodos requieren pasos previos al tratamiento que requieren mucho tiempo, necesitan operadores expertos, son costos. Por lo cual, hay una demanda en desarrollar un método analítico fácil y sensible para la determinación de compuestos fenólicos. Debido a la buena reproducibilidad, la selectividad, alta sensibilidad, las técnicas electroquímicas, especialmente



biosensores amperométricos, se han considerado como el mejor candidato para la detección de polifenoles [3,4].

En los últimos años ha surgido un especial interés en desarrollar matrices de sol-gel para la inmovilización de la enzima para la construcción de biosensores debido a que estos presentan buena estabilidad a largo plazo debido a la excelente biocompatibilidad de la película de óxido de titanio, es una tecnología de baja temperatura para la producción de materiales inorgánicos por hidrólisis y policondensación de alcóxidos, son baratos y los vidrios inorgánicos se pueden adaptar a cualquier forma o tamaño, además, de presentar rigidez física, inercia química y despreciable hinchazón [5]. En el presente trabajo un biosensor amperométrico enzimático basado en la enzima lacasa, en el cual la lacasa fue inmovilizada en la matriz del sol-gel de óxido de titanio.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

*Síntesis de óxido de titanio por sol-gel.* El precursor isopropóxido de titanio fue adicionado a 2-propanol acidificado con una mezcla de ácidos  $\text{CH}_3\text{COOH}$  y  $\text{HNO}_3$  concentrados, sonicando la mezcla por 2 hrs. La solución del precursor fue adicionada lentamente en agua desionizada lentamente, dejándolo agitar durante 1 hr. El sol preparado se almacenó durante 15 días antes de ser utilizado para la preparación de los biosensores (Kochana y col. 2008).

*Preparación del biosensor.* El sol de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) preparado fue agitado con Nafion en proporción 1:2 (v/v), posteriormente se preparó una solución de lacasa (2 mg/mL) en solución buffer de fosfatos (pH=6.80, 0.1M) la cual fue mezclada y sonicada con el compuesto del sol de titanio con Nafion, y sin Nafion, los cuales fueron denominados como ( $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$  y  $\text{TiO}_2/\text{LAC}$ ), respectivamente. 23  $\mu\text{L}$  de las mezclas preparadas fueron depositadas sobre la superficie pretratada de la barra de grafito. Finalmente los biosensores enzimáticos fabricados se dejaron secar al aire durante toda la noche. Antes de ser utilizado se lavaron con agua desionizada. Cuando los electrodos enzimáticos no eran utilizados fueron almacenados a 4°C.

## 3. RESULTADOS

*Difracción de Rayos X.* A partir del análisis de difracción de rayos-X de la muestra realizada por el método Kochana y col. 2008, se indican las fases cristalinas del óxido de titanio (Figura 1), los picos fueron observados a  $2\theta = 25.4, 37.8, 46.8, 53.6^\circ$ , los cuales son los picos característicos de la fase anatasa del  $\text{TiO}_2$ , la cual es la fase predominante de la muestra, lo cual podemos confirmarlo debido a la ausencia de los picos característicos de la fase rutilo los cuales están en el ángulo de  $2\theta$  identificados como: 27, 32, 54, 57°.

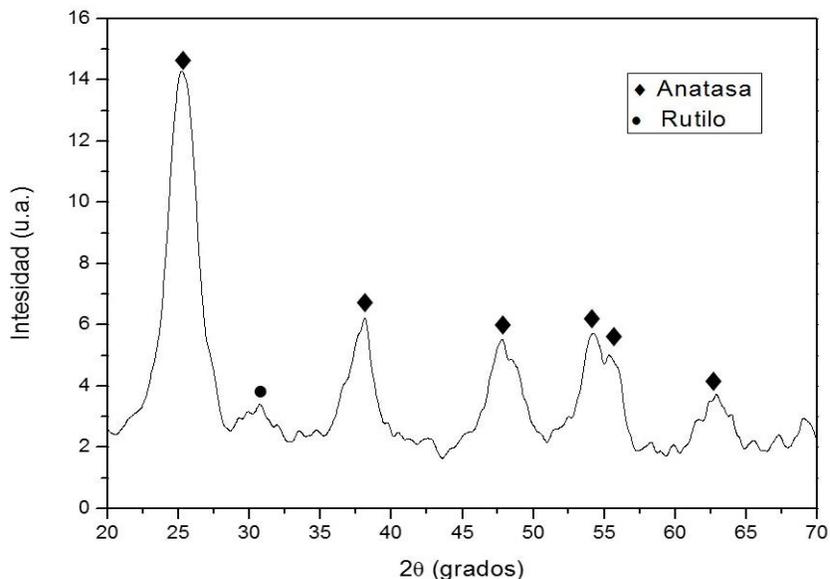


Figura 1.- Espectro de difracción de difracción de rayos X de  $\text{TiO}_2$  en polvo, el cual presenta los picos de fase anatasa, obtenido por el proceso sol-gel

#### *Medidas de impedancia electroquímica (EIS).*

En la Figura 2 se presentan los gráficos de Nyquist de las respuestas obtenidas mediante EIS del electrodo de grafito y los biosensores de  $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$  y  $\text{TiO}_2/\text{LAC}$ . En donde se observa que el electrodo de grafito presenta un comportamiento lineal en los espectros de Nyquist (Figura 2 curva a), que es característico para una etapa limitante del proceso electroquímico. El semicírculo a altas frecuencias aparece cuando se hace la deposición del compuesto  $\text{TiO}_2/\text{LAC}$  obteniendo una baja resistencia a la transferencia de electrones (16.03 Ohm) en la interface del electrodo (Figura 2 Curva b). Este incremento en la transferencia de electrones sobre la superficie es originado por la monocapa de  $\text{TiO}_2$ , debido las propiedades semiconductoras de este. Finalmente se puede observar que la adsorción de lacasa en la mezcla de  $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$  (Figura 2 curva c) está relacionado con la disminución del semicírculo, aumentado la transferencia de electrones (9.44 Ohm), debido a la rápida difusión/migración de la película  $\text{TiO}_2/\text{NAF}$ , en comparación con la película de  $\text{TiO}_2/\text{LAC}$ . Por otra parte, podemos observar que la adsorción de la Lacasa sobre el compuesto  $\text{TiO}_2/\text{NAF}$ , se relaciona la con la disminución en el semicírculo, que es indicativo que la Lacasa ha sido inmovilizada sobre la matriz de titania Kumar y col., 2008; Alarcón y col., 2010; Mayorga-Martínez y col., 2012).

#### **4. CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos, el método sol-ge propuesto proporciona un proceso de inmovilización suave para la lacasa, y un microambiente biocompatible alrededor de la enzima, por lo tanto esta retiene su actividad biológica. Por otra parte, el biosensor  $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$  presenta un amplio rango lineal, bajo límite de detección y gran sensibilidad.

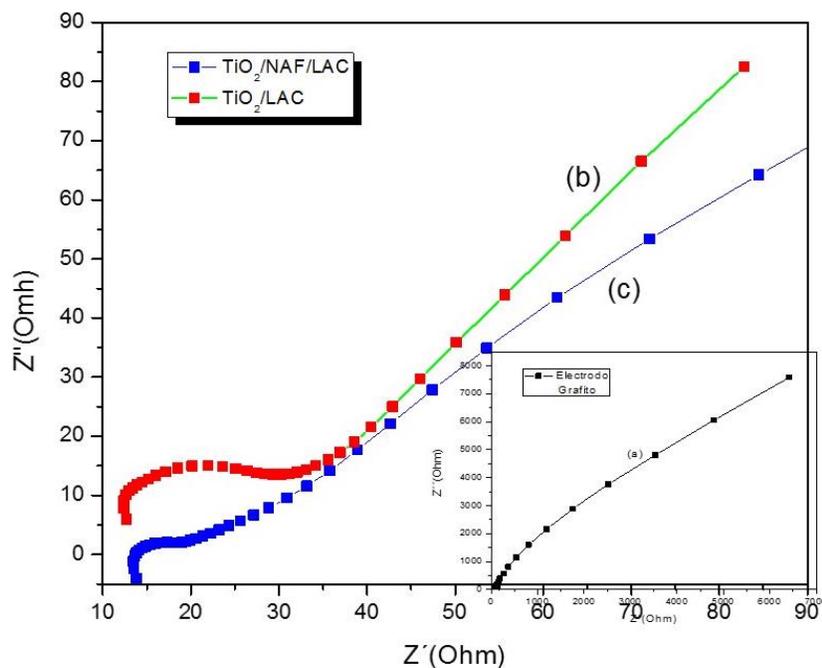


Figura 2. Diagrama de Nyquist para las medidas de Impedancia de los diferentes electrodos. Transductor de grafito (a);  $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$  (b) y  $\text{TiO}_2/\text{LAC}$  (c).

**AGRADECIMIENTOS.** Se agradece soporte económico a Coordinación de Investigación Científica 2015 de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Wang L., Ran O., Tian Y., Ye S., Xu J., Xian J., Hong Y., Peng Ru., Jin L. (2010) Covalent grafting tyrosinase and its application in phenolic compounds detection. *Microchim Acta* 171, p-p: 217–223.
2. Chawla S.; Rawal R.; Shabnam; Kuhad R.C. y Pundir C. S. (2011). An amperometric polyphenol biosensor based on laccase immobilized on epoxy resin membrane. *Anal. Methods*, 2011, 3, 709–714.
3. Elkaoutit M., Naranjo- Rodríguez I., Riffi-Temsamani K., Domínguez de la vega M. y Hidalgo-Hidalgo J. (2007). Dual Laccase–Tyrosinase Based Sonogel–Carbon Biosensor for Monitoring Polyphenols in Beers. *J. Agric. Food Chem.* 55, p-p: 8011–8018



4. Kochana J., Nowak P., Jarosz-Wilkolazka A., y Bieroń M. (2008). Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*, 89; 171–174.
5. Han R, Cui L, Ai S, Yin S, Liu X, Qiu Y (2012) Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized in hydrotalcite-like compounds film for the determination of polyphenols. *J Solid State Electrochem* 16:449-456.
6. Lee Y, Lyu Y, Choi H, Lee W (2007) Amperometric tyrosinase biosensor based on carbon nanotube – titania –nafion composite film. *Electroanal* 19:1048–1054.