



## INMOVILIZACIÓN DE ENZIMA LACASA EN NANOTUBOS DE CARBONO

Ma. Guadalupe Garnica Romo<sup>1</sup>, Fátima Ortiz Lara<sup>2</sup>, Héctor Eduardo Martínez Flores<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Facultad de Ingeniería Civil, U.M.S.N.H., [gomar05@yahoo.com.mx](mailto:gomar05@yahoo.com.mx),

<sup>2</sup> Estudiante del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, U.M.S.N.H. [faty10\\_ol@hotmail.com](mailto:faty10_ol@hotmail.com)

<sup>3</sup> Facultad de Químico Farmacobiología, U.M.S.N.H., [hedu65@hotmail.com](mailto:hedu65@hotmail.com)

### RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la inmovilización de la enzima lacasa en nanotubos de carbono (NTC). Los NTC son estructuras artificiales novedosas que presentan buenas propiedades mecánicas eléctricas y térmicas. Estas propiedades han hecho a los NTC objeto de aplicaciones en la inmovilización de enzimas como biosensores. Los NTC fueron caracterizados mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y difracción de rayos X, posteriormente se funcionalizaron con un tratamiento ácido con una solución de HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrados en proporciones 1:3 para dejar la superficie cargada con el grupo carboxilo y llevar a cabo la inmovilización de la enzima. Se prepararon los electrodos de grafito (EG) modificados con NTC y enzima, los EG se caracterizaron mediante técnicas de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) identificando la interfase formada en la superficie del electrodo, mostrando la resistencia al paso de iones que presenta la enzima por si sola y que la presencia de los NTC unidos a la enzima mejoran el proceso de la transferencia de electrones.

### 1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o más grupos hidróxidos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos (Martínez y col. 2000).

Existe en el ser humano un gran interés en el poder antioxidante de estas moléculas naturales tras su ingesta, parte de la actividad biológica de los polifenoles se debe a su capacidad de formar parte del sistema antioxidante celular, proporcionando importantes beneficios para la salud. Entre sus propiedades más relevantes cabe destacar 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, reduciendo la actividad de la enzima hialuronidasa, y sus propiedades anticancerígenas (Flores y col. 2010).

Debido a las distintas aplicaciones de los compuestos fenólicos es importante disponer de métodos analíticos que permitan su identificación y cuantificación. En la actualidad se dispone de varios métodos para el análisis de compuestos polifenólicos, que se basan en técnicas de separación como la cromatografía líquida (HPLC), la electroforesis capilar (CE) o los métodos colorimétricos (métodos de Folin-Ciocalteu). Las desventajas de estos métodos es su alto coste y de varios pasos en las etapas de operación. Existe por tanto una necesidad de disponer de técnicas de



estimación de polifenoles para fines determinados, tales como la monitorización de los mismos en tiempo real en alimentos almacenados, en la manipulación o en su proceso (Chawla y col. 2011). Respecto a la calidad alimentaria, hoy en día los métodos electroquímicos constituyen una alternativa interesante para la detección de distintos compuestos de interés, especialmente los fenólicos, sustancias electroactivas fácilmente oxidables. Estos métodos analíticos son poco costosos, sencillos, utilizan cortos tiempos de análisis, su determinación es en tiempo real y se tiene una buena reproducibilidad. Por estas razones, los métodos electroquímicos constituyen una alternativa para la detección de compuestos fenólicos, y dentro de estos métodos se encuentran los que utilizan biosensores (Flores y col. 2008).

La inmovilización de proteínas se define como la localización de la misma en una determinada región definida del espacio con retención de su actividad catalítica y que puede ser utilizada continua y repetidamente (Chibata, 1978). Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte (Taylor, 1991).

El componente biológico de cualquier biosensor tiene que ser incorporado en el dispositivo de manera que se garantice su actividad si posee propiedades catalíticas o bien que, el sitio de unión en el que se produce la interacción con el analito se encuentre accesible al mismo. Por ello la adecuación del proceso de inmovilización de este componente esencial es determinante en el desarrollo de un biosensor (Ortega, 2006). Es el proceso más importante en la fabricación de un biosensor, ya que características tan importantes como el tiempo de vida o la sensibilidad dependen en gran medida de la metodología de inmovilización utilizada (Ruiz, 2006).

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

Los NTC se caracterizaron mediante SEM y difracción de rayos X con el objetivo de obtener un análisis cualitativo y cuantitativo del material principal para la inmovilización de la enzima. Las técnicas mencionadas anteriormente se utilizaron con los NTC antes y después de la purificación. Para la purificación y funcionalización de los NTC, 10 mg de NTC fueron mezclados con una solución de  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrados en proporción 1:3 y fueron sonicados durante 3 hrs. La mezcla fue filtrada usando una membrana de  $0.2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro y lavados con agua destilada. Después se dejaron secar en un horno a  $80^\circ\text{C}$  durante 48 horas (Kim y col. 2006).

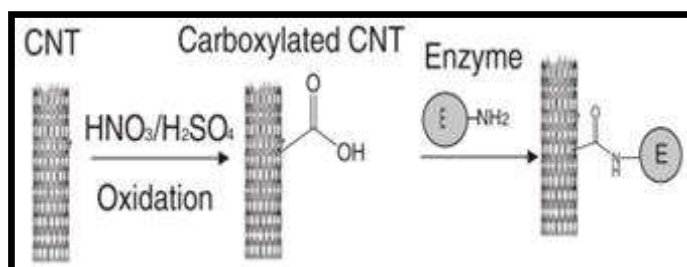


Figura 1. Representación esquemática de la conjugación de enzimas a nanotubos de carbono funcionalizados.

Los NTC funcionalizados fueron suspendidos en 1ml de glutaraldehído (GA) al 50% y se dejaron sonicar durante 1 hora. Los electrodos de grafito (EG) fueron pulidos hasta espejo y se limpiaron con polvo de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , se colocan en una solución de  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y se sonicaron durante 10 minutos, se lavan con agua destilada y se colocan en solución de etanol a sonicar por 10 minutos, por último se sonicaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Se depositaron  $20 \mu\text{l}$  de NTCGA sobre la superficie del EG y se dejó secar a temperatura ambiente para fabricar el electrodo modificado con NTCGA, después el electrodo modificado con NTCGA se sumergió en  $50 \mu\text{l}$  de enzima Lacasa a  $40 \text{ mg mL}^{-1}$  en solución buffer de fosfatos ( $0.1\text{M}$  pH 6.8)



durante 12 hrs en la refrigerador a 4°C. El electrodo modificado con NTCGA-E después se lavó con agua desionizada para eliminar el exceso de enzima que no fue absorbida y se dejó secar. Para comparar NTCGA-E y NTCGA, este se preparó con el mismo procedimiento, de igual manera se preparó un EG con enzima y GA depositando 20 µl de la mezcla E-GA (1:1 v/v).

Las mediciones de impedancia electroquímica se llevaron a cabo en un Potenciostato (Gambray Instruments) en una solución de KCl 1M que contiene  $K_3[Fe_4(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  0.1M. Los espectros de impedancia electroquímica se registraron en una frecuencia desde 0.1 hasta 10,000 Hz. La amplitud en cada caso fue de 5mV (Deng y col. 2009). El mismo equipo se utilizó para los ensayos de voltimetría cíclica con la solución de KCl 1M que contiene  $K_3[Fe_4(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  0.1M con una velocidad de barrido de 100 mVs<sup>-1</sup>. Todos los ensayos electroquímicos se llevaron a cabo en solución de buffer de fosfatos (0.1M, pH=6.8) y en solución redox a temperatura ambiente en una celda convencional con tres electrodos; uno es el electrodo de grafito, usado como el electrodo de trabajo, un electrodo de calomel como electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo o electrodo auxiliar.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

Con el fin de obtener información de las propiedades físicas y químicas de los NTC en el presente trabajo se emplearon las técnicas de caracterización, cada una con un objetivo en particular.

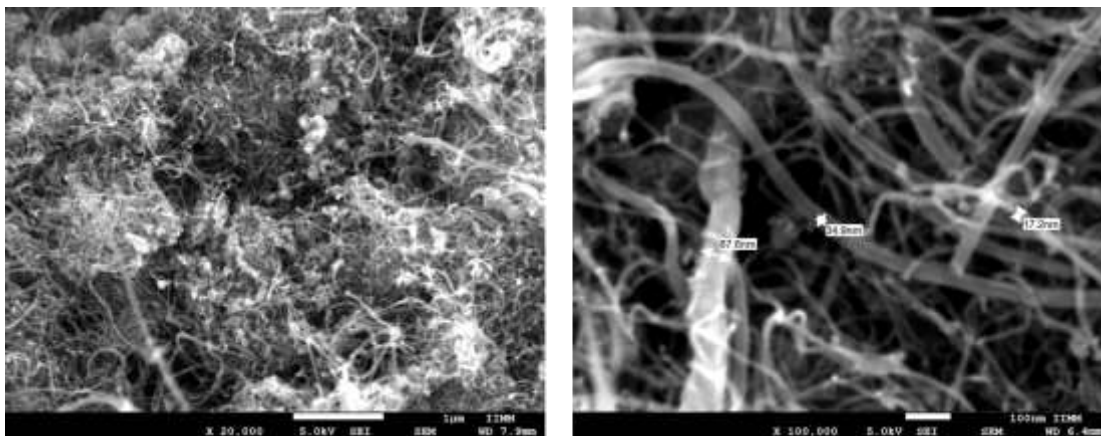


Figura 2. Micrografías de SEM de los NTC a 20 000 y 100 000 aumentos respectivamente.

Las micrografías SEM se muestran en la Figura 2 la muestra formación de filamentos carbonosos y se observan grandes cantidades de NTC en una especie de alfombra de nanotubos enredados entre sí, en donde además de apreciar las estructuras entrelazadas se pueden observar estructuras helicoidales o en forma de espiral. Para resaltar las características morfologías de los NTC se realizaron diferentes magnificaciones entre ellas destaca la de 100,000X en donde se puede observar fácilmente el espesor de los NTC los cuales varían desde los 10 hasta los 60 nm.

El espectro de microanálisis por EDS (Energy Dispersive Spectrometer o espectroscopia por dispersión de energía) de los NTC en el cual se identificaron los elementos presentes en la muestra, es decir, se obtuvo información cualitativa y cuantitativa de los NTC. En la Figura 3 se muestra el espectro donde se observa que el pico más alto es el de carbono, el elemento más abundante en la muestra analizada. Le siguen otros elementos presentes con picos y en cantidades inferiores. La presencia de estos elementos se debe al catalizador utilizado en el método de fabricación de los NTC.

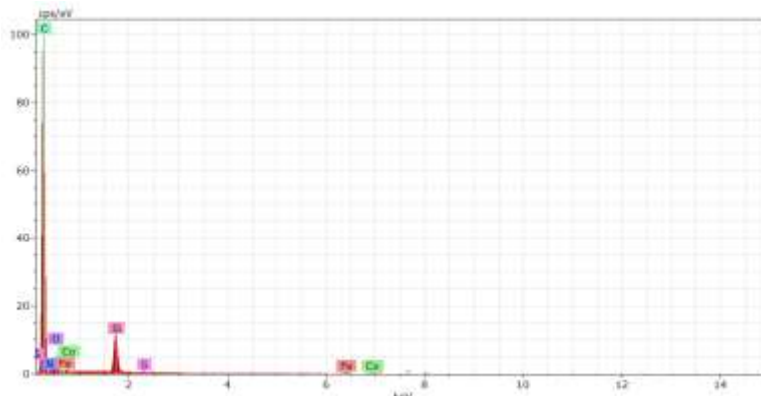


Figura 3. Espectro EDS de los NTC

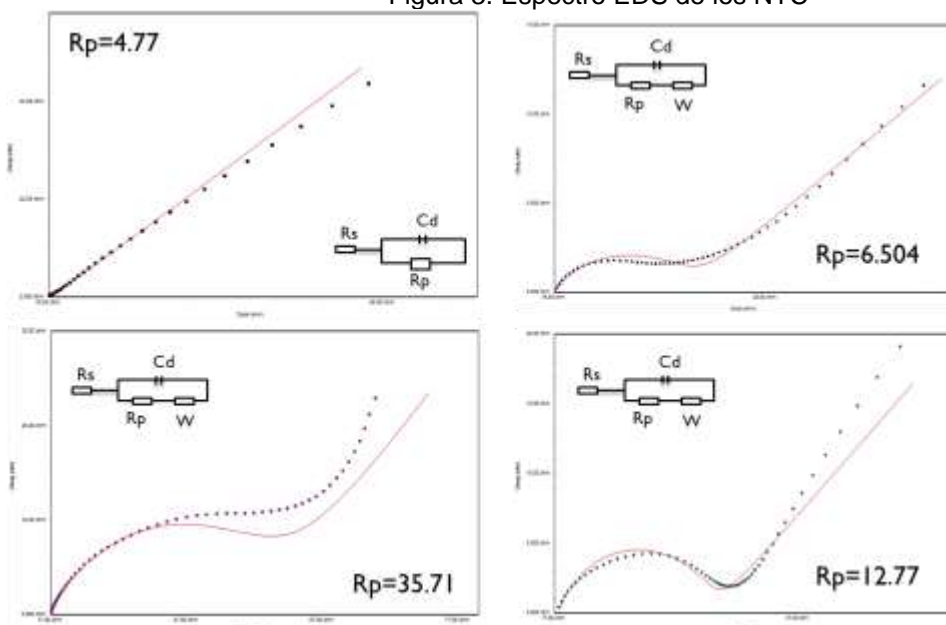


Figura 4. Diagramas de Nyquist del EG o blanco (■), modificado con NTCGA (▲), GA-E (●) y NTCGA-E (▼) en solución de KCl 1M que contiene  $K_3[Fe_4(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  0.1M.

La funcionalización de los NTC se realizó de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. De igual manera. Se prepararon los EG modificados y posteriormente se realizaron los ensayos de impedancia electroquímica. La EIS proporciona información útil sobre los cambios en la impedancia en la superficie del electrodo durante el proceso de fabricación. La porción semicircular a frecuencias altas corresponde al proceso limitado de transferencia de electrones, y su diámetro es igual a la resistencia de electrones, el cual controla la cinética de transferencia de electrones en la interfase del electrodo. Mientras tanto la parte lineal a bajas frecuencias corresponde al proceso de difusión.

Utilizando la solución redox ( $KCl$  1M y  $K_3[Fe_4(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  0.1M), se obtuvieron los diagramas de Nyquist de los diferentes electrodos en el rango de frecuencia de  $10^{-1}$  a  $10^5$  Hz (Figura 4 ). En el experimento con el EG se registró casi una línea recta, indicando el paso libre de iones debido a que la superficie del electrodo se encuentra limpia y sin ningún recubrimiento en la superficie. El





electrodo modificado con NTCGA muestra una resistencia a la transferencia de electrones de aproximadamente de  $6.504\Omega$  mucho menor en comparación con el electrodo con NTCGA-E ( $12.77\Omega$ ), lo que nos indica que NTCGA actúa como un buen medio para la transferencia de electrones. Un electrodo de grafito fue recubierto con enzima y GA, la impedancia (o resistencia al paso de iones) aumentó demasiado a aproximadamente  $35.71\Omega$  lo que sugiere que la enzima bloquea el intercambio de iones en el experimento y cuando la enzima se une a los NTC (electrodo modificado con NTCGA-E) el diámetro del semicírculo de la gráfica de Nyquist fue pequeño en comparación con el electrodo modificado con GA-E indicando que la presencia de los NTC unidos a la enzima mejoran el proceso de la transferencia de electrones. El cambio en el valor de la resistencia que refleja el aumento o disminución en el diámetro del semicírculo a altas frecuencias en los espectros de impedancia está asociado con el comportamiento del bloqueo de la superficie del electrodo superficie para la transferencia de carga.

#### 4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir que los NTC es un material capaz de inmovilizar la enzima lacasa.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez, V.I., Jesús, P.M., Ros, G. (2000). "Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta." Archivos latinoamericanos de Nutrición. 50(1): 5-18.
2. Flores M., Sandoval C.J., Valdivia U. B, Aguilar G.CN. (2010). *Uso de técnicas electroquímicas para evaluar el poder antioxidante en alimentos.* Investigación y Ciencia. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 18: 20-25.
3. Chawla, S., et al. (2011). "Fabrication of polyphenol biosensor based on laccase immobilized on copper nanoparticles/chitosan/multiwalled carbon nanotubes/polyaniline-modified gold electrode." Journal of Biotechnology 156(1): 39-45.
4. Chibata, I. (1978) *In Immobilized Enzymes*, Ed. John Wileyand Sons, New York, p. 1-73.
5. Taylor, R. F. (1991). "Commercially available supports for protein immobilization." In: Protein immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY, pp. 139–160.
6. Ortega O. F. (2006). "Biosensores y biochips: herramientas para el diagnóstico y la terapéutica." Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. P. 44-49, 55-57.
7. Ruiz J. G. (2006). "Desarrollo de biosensores enzimáticos para su aplicación en la industria alimentaria." Universidad autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias, Departamento de Química
8. Kim, J., et al. (2006). "Integration of enzyme immobilized single-walled carbon nanotubes mass into the microfluidic platform and its application for the glucose-detection." Sensors and Actuators A: Physical 128(1): 7-13.
9. Deng, S., G. Jian, et al. (2009). "A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nitrogen-doped carbon nanotubes." Biosensors and Bioelectronics 25(2): 373-377.