



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

OPCIÓN: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**Preparación y caracterización de biosensores
amperométricos enzimáticos para determinación de
compuestos fenólicos**

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta la

M.C. Mariana Romero Arcos

Directora de Tesis

Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo

RESUMEN

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS ENZIMÁTICOS PARA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Por

Mariana Romero Arcos

Agosto 2016

Doctor en Ciencias Biológicas

Dirigida por: Dr. Ma. Guadalupe Garnica Romo

La presencia de compuestos fenólicos (CF) en alimentos es importante debido a su actividad antioxidante tras ser ingeridos y por incrementar el tiempo de conservación de los alimentos. 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. Por lo cual, se detectó la necesidad de desarrollar métodos que impliquen análisis rápidos, precisos, exactos, que sean validables y que precisen un tratamiento de muestra mínimo y lo más sencillo posible. Estos requisitos los pueden cumplir los biosensores amperométricos enzimáticos, los cuales combinan la selectividad que aportan las enzimas con la sensibilidad de la detección amperométrica.

Este trabajo tiene como objetivo principal desarrollar biosensores amperométricos enzimáticos para la detección de CF en bebidas (té y café). Para llevar a cabo el desarrollo de los biosensores se utilizaron dos nano-estructuras; dióxido de titanio (TiO_2) y nanotubos de carbono (NTC), como soporte para la inmovilización de la enzima lacasa. Para el desarrollo del biosensor amperométrico basado en nano-estructura de titanio, se llevó a cabo la síntesis mediante la técnica de sol-gel, posteriormente se realizó la caracterización mediante Difracción de Rayos-X (DRX) para determinar la fase anatasa de la nano-estructura, posteriormente se hizo el análisis de tamaño partícula para conocer el diámetro de la misma. De manera similar para los nanotubos de carbono se hizo caracterización por Espectroscopia de Raman para conocer el tipo de nanotubos, y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) para determinar el diámetro de los nanotubos. Posteriormente se prepararon electrodos modificados con TiO_2 -Lacasa y NTC-Lacasa; ambos biosensores se caracterizaron mediante Espectroscopia de Impedancia (EIS) para identificar la interface en la superficie de los electrodos y Voltimetría Cíclica (VC) para detectar la señal que produce la reducción directa de la reacción enzimática, el cual, fue determinado a 100 mV contra Ag/AgCl (3 M KCl) sin ningún mediador. Los resultados obtenidos en términos de sensibilidad, rango lineal, y límite de detección fueron: 2.8 $\mu\text{A L}/\mu\text{mol}$, 0.75-175 μM y 0.75 μM respectivamente para el biosensor de TiO_2 -Lacasa. Para el biosensor de NTC-Lacasa se obtuvieron los siguientes resultados: sensibilidad 2.81 $\mu\text{A L}/\mu\text{mol}$, con un rango lineal de 0.5-150 μM y su límite de detección 0.5 μM . Ambos biosensores fueron probados en muestras comerciales de té y café, los resultados obtenidos fueron comparados con el método del Reactivo Folin-Ciocalteu, donde se observó que ambos biosensores (TiO_2 /NAF/LAC y NTC/GA/LAC) muestran una mayor selectividad hacia los compuestos fenólicos comparándolos con el reactivo Folin-Ciocalteu.

Palabras claves: Titania, Lacasa, Catecol, nanotubos de carbono, Biosensor.

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOSENSORS AMPEROMETRIC ENZYME FOR DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS

The presence of phenolic compounds (CF) in foods is important because of its antioxidant activity after being ingested and increase the shelf life of food. The strong interest in determining CF qualitatively and quantitatively in food is due to its ability to form part of the cellular antioxidant system, which provides important health benefits, among which are its ability to inhibit oxidative processes low-density lipoprotein (LDL) reducing the risks of cardiovascular disease, protecting tissues from oxidative damage and cell aging, as well as its anti-inflammatory action, and its anti-cancer properties. Therefore, the need to develop methods involving rapid, precise, accurate analysis, which are validatable and requiring a minimum sample treatment and as simple as possible was detected. They can meet these requirements amperometric biosensors enzyme, which combine the selectivity of enzymes contributing to the sensitivity of amperometric detection.

This work has as main objective to develop enzymatic amperometric biosensors for the detection of CF in beverages (tea and coffee). To carry out development of biosensors two nanostructures were used; titanium dioxide (TiO_2) and carbon nanotubes (NTC), as a support for immobilizing the laccase enzyme. For the development of amperometric biosensor based on nano-structure titanium was carried out the synthesis using the technique of sol-gel, then the characterization was performed Diffraction X-ray (XRD) to determine the anatase

phase of the nano -structure, then the particle size analysis was done to determine the diameter thereof. Similar to the way carbon nanotubes characterization was made by Raman Spectroscopy for the type of nanotubes, and Scanning Electron Microscopy (SEM) to determine the diameter of the nanotubes. Subsequently they modified TiO_2 -laccase NTC-Laccase and electrodes were prepared; both biosensors were characterized by Impedance Spectroscopy (EIS) to identify the interface on the surface of the electrodes and voltammetry Cyclic (VC) for detecting the signal produced by the direct reduction of the enzyme reaction, which was determined at 100 mV against Ag/AgCl (3M KCl) with no mediator. The results in terms of sensitivity, linear range, and detection limit were: 2.8 $\mu\text{A}/\text{mol}$, 0.75 to 175 μM and 0.75 μM respectively for TiO_2 -Laccase biosensor. Biosensor for NTC-Laccase the following results were obtained: μA sensitivity 2.81 L/mol, with a linear range from 0.5 to 150 μM and 0.5 μM detection limit. Both biosensors were tested in commercial samples of tea and coffee, the results were compared with the method of Folin-Ciocalteu, where it was observed that both biosensors (TiO_2 /NAF/LAC and NTC/GA /LAC) show greater selectivity phenolic compounds compared with Folin-Ciocalteu reagent.

DEDICATORIA

Gracias a Dios y a todas las personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron ahí para brindarme su ayuda y apoyo, por su motivación para poder lograr este gran objetivo. Con todo mi cariño está tesis la dedico a ustedes:

A mi madre, hija, a mis hermanos y amigos.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por la beca 267345 asignada para la realización de este proyecto.

A la Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo, asesora de este proyecto de tesis, gracias por sus aportaciones y apoyo para su conclusión, porque sin su valiosa colaboración esto no pudo haber sido posible.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a través del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, con opción en Biotecnología de Alimentos, por el apoyo brindado durante la duración del programa.

CONVOCATORIA INFR-2015-01 Apoyo a la infraestructura proyecto No 253736 titulado Equipamiento para el fortalecimiento del grupo de Investigación en Caracterización de propiedades de los alimentos con impacto en los programas Institucionales de Maestría y Doctorado en C Biológicas de la UMSNH. CONACYT.

Redes Temáticas de Colaboración Convocatoria 2013, Segundo año Red Materiales Nanoestructurados, Nombre de Proyecto "Investigación y Desarrollo de Conductores Transparentes"; PRODEP.

Redes Temáticas de Colaboración Académica, Tercer año de la red aprobado en la convocatoria 2011 (Marzo 2015). Red Materiales Nanoestructurados, Nombre de Proyecto "Investigación y Desarrollo de Conductores Transparentes", PRODEP.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

INDICE

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE TABLAS

NOMENCLATURA

Capítulo I. Introducción.....	1
1.1 Justificación.....	3
1.2 Hipótesis.....	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 General.....	4
1.3.2 Particulares	4
Capitulo II. ANTECEDENTES	5
2.1 Biosensores	5
2.2 Clasificación de los biosensores	7
2.2.1 Biosensores de interacción.....	7

2.2.2 Sistemas de transducción	8
2.3 Enzimas	11
2.3.1 Lacasa	12
2.3.2 Cinética enzimática	16
2.3.2.1 Representación de Linewaver-Burk	19
2.4 Proceso sol-gel	19
2.5 Óxido de titanio	21
2.6 Nanotubos de Carbono (NTC)	23
2.6.1 Tipos de nanotubos de carbono	24
2.6.2 Propiedades de los nanotubos de carbono	25
2.7 Sistemas de inmovilización	27
2.8 Características que deben presentar los biosensores	29
2.9 Compuestos Polifenolicos	29
2.10 Métodos de determinación	31
2.11 Técnicas Electroquímicas	33
2.11.1 Espectroscopia de Impedancia EIS	33
2.11.2 Diagrama de Nyquist	37
2.11.3 Diagramas de Bode	38
2.11.4 Circuitos equivalentes	40

2.11.4.1 Circuito capacitivo.....	41
2.11.4.2 Circuito de Randles simplificado.....	43
2.11.5 Voltimetría Cíclica	45
2.12 Técnicas de Caracterización	49
2.12.1 Difracción de rayos X	49
2.12.2 Microscopia electrónica de barrido	52
2.12.3 Espectroscopia de Infrarrojo	53
2.12.4 Espectroscopia RAMAN	56
Capítulo III. Metodología	58
3.1 Materiales y Reactivo	58
3.2 Síntesis de óxido de titanio por sol-gel	59
3.3. Oxidación de los nanotubos de carbono (NTC)	59
3.4 Preparación de los biosensores	59
3.4.1 Pretratamiento del electrodo de grafito.....	59
3.4.2 Electrodo Composito con nanopartículas de Titania	60
3.4.3 Electrodo Composito con nanotubos de carbono	60
3.5 Métodos de Caracterización	61
3.5.1 Difracción de Rayos-X (DRX).....	61
3.5.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	61

3.5.3 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)	62
3.5.4 Espectroscopia RAMAN.....	62
3.6 Técnicas Electroquímicas.....	62
3.6.1 Pruebas de Impedancia (EIS)	62
3.6.2 Medidas de Voltametría Cíclica (VC)	63
3.6.2.1 Solución de Ferrocianuro de potasio.....	63
3.6.2.2 Estudio de concentraciones	63
3.7 Determinación de compuestos fenólicos mediante Reactivo Folin- Ciocalteu.....	63
3.7.1 Preparación de la curva de calibración.....	64
Capítulo IV. Resultados	66
4.1 Difracción de Rayos X (DRX).....	66
4.1.1 Grafito.....	66
4.1.2 Polvo de óxido de titanio	67
4.2 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).....	68
4.3 Tamaño de Partícula	69
4.4 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)	70
4.4.1 Dióxido de titanio	70
4.4.2 Nafion	71

4.4.3 Lacasa.....	72
4.4.4 Biosensor TiO ₂ /NAF/LAC.....	73
4.5 Espectroscopia de RAMAN	74
4.6 Medidas de impedancia electroquímica (EIS)	75
4.6.1 Biosensores recubiertos con TiO ₂	75
4.7 Medidas de Voltimetría Cíclica (VC).....	78
4.8 Respuesta electroquímica de catecol en los biosensores	79
4.9 Estudio de concentraciones	80
4.10 Biosensores desarrollados con Nanotubos de carbón.....	85
4.11 MEB para nanotubos de Carbono (NTC)	86
4.12 Espectroscopia de Raman.....	87
4.13 Medidas de Impedancia Electroquímica.....	88
4.14 Medidas de Voltimetría Cíclica.....	89
4.15 Estudio de concentraciones de NTC	91
Capítulo V. Conclusiones	94
Capítulo VI. Bibliografía	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de un biosensor.	6
Figura 2: Representación de los centros Cu, especificando las distancias entre cada átomo.	14
Figura 3: Reacción típica de catalización de las lacasas sobre compuestos del tipo fenólicosrston	15
Figura 4: Curva de velocidad de reacción.	17
Figura 5: Curva cinética de la reacción enzimática.	18
Figura 6: Estructuras cristalinas del TiO_2 (a) rutilo y (b) anatasa.	22
Figura 7: Formas alotrópicas del carbono.	24
Figura 8: tipos de nanotubos dependiendo en número de capas. (a) nanotubo de carbono de pared simple; (b) nanotubo de carbono de pared múltiple.	25

Figura 9: Representación esquemática de los diferentes métodos de inmovilización de enzimas.....	28
Figura 10: Respuesta de una corriente sinusoidal en un sistema lineal.....	35
Figura 11: Diagrama de Nyquist, gráfica de las magnitudes de impedancia imaginaria (Z') e impedancia real (Z), a diferentes frecuencias.	37
Figura 12: Diagrama de Bode (magnitud del módulo z vs log frecuencia).....	38
Figura 13: Diagrama de Bode (ángulo de fase Θ vs log frecuencia).	39
Figura 14: Circuito puramente capacitivo.	41
Figura 15: Típico gráfico de Nyquist para un recubrimiento.	42
Figura 16: Típico gráfico de Bode para un recubrimiento.	42
Figura 17: Típico gráfico de Bode para un recubrimiento.	43
Figura 18: Diagrama de Nyquist para un típico circuito de Randles simplificado. ..	44
Figura 19: Diagrama de bode para un típico circuito de Randles simplificado.....	45
Figura 20: La forma de onda de potencial aplicado al electrodo de trabajo en el experimento de voltametría cíclica.	46
Figura 21: Voltamperograma Cíclico reversible.....	48
Figura 22: Difracción de los Rayos X por los planos de un cristal.....	50

Figura 23: Principales componentes de un Difractómetro de Rayos X.	51
Figura 24: Microscopio Electrónico de Barrido.	53
Figura 25: Modos vibracionales por absorción Infrarroja.	55
Figura 26: Interferómetro de Michelson.	55
Figura 27: Espectrómetro Raman.	57
Figura 28: Curva de calibración para concentración de catecol ($\mu\text{g/ml}$).....	65
Figura 29: Espectro de Difracción de Rayos X del grafito.	66
Figura 30: Espectro de difracción de rayos X, del polvo de TiO_2 , en el cual se muestran los picos de la fase anatasa, obtenida por el método sol-gel.	67
Figura 31: Micrografías de: TiO_2 , a) 10000x, b) 40000x, y c) Biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$ 10,000x.....	68
Figura 32: Distribución del tamaño de partícula del TiO_2	70
Figura 33: Espectro de Infrarrojo del sol-gel de TiO_2	71
Figura 34: Espectro Infrarrojo Nafion.....	72
Figura 35: Espectro de Infrarrojo de Lacasa.	73
Figura 36: Espectro de Infrarrojo biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$	73
Figura 37: Espectros Raman de: (a) TiO_2 , (b) lacasa y (c) Biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$	74

Figura 38: Diagrama de Nyquist para las medidas de Impedancia.....	76
Figura 39: Circuitos equivalentes para ajustar los espectros de impedancia electroquímica, (a) barra de grafito; (b) NAF/LAC; TiO ₂ /LAC; y TiO ₂ /NAF/LAC	77
Figura 40: Voltimetría cíclica en 0.1M[Fe (CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ , en una solución de 0.2M KCl a un barrido de potencial 100 V/s.....	79
Figura 41: Respuesta Amperométrica de los diferentes biosensores, en 25 µM de catecol.	80
Figura 42: Respuesta Voltamétrica de los biosensores en SBP 0.1M, con distintas adiciones de disolución de catecol.	81
Figura 43: Espectro de Rayos X de NTC.....	85
Figura 44: Imágenes MEB de Nanotubos de Carbono: (a) NTC 100,000x; (b) diámetro de NTC 100,000x; (c) biosensor NTC/LAC/GA) 100,000x.....	86
Figura 45: Espectro Raman de Nanotubos: (a) sin funcionalizar y (b) oxidados. ..	87
Figura 46: Diagrama de Nyquist para las medidas de impedancia de los diferentes electrodos de NTC.	89
Figura 47: Voltametría Cíclica en 0.1M [Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ y 0.2 M KCl a 100 v/s, para biosensores con NTC.	90

Figura 48: Respuesta voltamétrica de los biosensores en SBP 0.1M, con distintas adiciones de disolución de catecol.	91
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de enzimas.....	11
Tabla 2: Elementos eléctricos comunes de Circuitos Eléctricos Equivalentes.....	41
Tabla 3: Relación de volumen añadido.....	64
Tabla 4: Características analíticas de los diferentes biosensores.....	82
Tabla 5: Estabilidad del biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$	83
Tabla 6: Contenido equivalente de fenoles en infusiones de té y café, determinados por el método amperométrico propuesto (biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$), y el método espectrofotométrico (Folin-Ciocalteu). CEF: contenido equivalente de fenoles.....	84
Tabla 7: Características analíticas de los diferentes biosensores.....	92
Tabla 8: Estabilidad del biosensor $\text{NTC}/\text{LAC}/\text{GA}$	93
Tabla 9: Contenido equivalente de fenoles en infusiones de té y café, determinados por el método amperométrico propuesto (biosensor $\text{NTC}/\text{LAC}/\text{GA}$), y el método espectrofotométrico (Folin-Ciocalteu). CEF: contenido equivalente de fenoles.....	93

NOMENCLATURA

CF	Compuestos Fenólicos
REM	Radiación electromagnética
EPR	Resonancia paramagnética de electrones
[S]	Concentración de sustrato
V_m	Velocidad máxima
V	Velocidad de reacción
TiO ₂	Dióxido de titanio
Kbar	Kilobarias
NTC	Nanotubos de carbono
(NTC-S)	Nanotubos de carbono de pared simple
(NTC-M)	Nanotubos de carbono de pared múltiple
HPLC	Cromatografía de líquidos
CE	Electroforesis capilar
CA	Corrientes Alterna
RX	Difracción de Rayos X
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
MEB	Microscopia electrónica de Barrido
EIS	Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

VC	Voltimetría Cíclica
BET	Brunauer, Emmett y Teller
NAF	Nafion
LAC	Lacasa
GA	Glutaraldehído

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

La determinación de CF es de gran interés en las áreas de alimentos, suelo, medicina, medio ambiente, y superficie del agua, debido a su actividad antioxidante, toxicidad inherente y persistencia (Wang y col. 2010). Algunos de ellos provienen de la producción de compuestos orgánicos como fármacos, colorantes, plásticos, plaguicidas, pasta de papel, entre otros. La mayoría de los CF muestran toxicidad diferente y su determinación es importante cuando se evalúa la toxicidad de una muestra tomada del medio ambiente (Chawla y col. 2011). Cabe mencionar que los CF son componentes naturales de las hojas de las plantas, frutas y algunas verduras (Chawla y col. 2010 Lee y col. 2007), y esenciales en las propiedades organolépticas de astringencia, olor y sabor del aceite de oliva, vino, té y algunas frutas (Gomes y col. 2004).

Su papel como antioxidantes es significativo en términos de prevención de las enfermedades cardiovasculares y algunos pueden prevenir el cáncer, debido a que neutralizan las especies reactivas de oxígeno, son inhibidores de la oxidación de la lipoproteína y de iones metálicos quelantes (Chawla y col. 2011; Elkaoutit y col. 2007).

Existen varios métodos para la determinación cualitativa o cuantitativa de CF algunas de estas técnicas son: por cromatografía (HPLC, GCLC), espectrofotometría, electroforesis capilar con diversos sistemas de detección o en técnicas que no implican la separación como la colorimetría: Folin-Ciocalteu, vainillina-HCl y n-butanol-HCl, entre otros [Chawla y col. 2011; Ren y col. 2011; Pérez y Merkoçi 2008). Si bien estos métodos nos dan resultados exactos a muy bajas concentraciones, son dispositivos pesados, caros, nos consumen tiempo, son complicados en el pretratamiento de la muestra, son limitados en su aplicación

en línea e inadecuados para la supervisión *in situ*. (Wang y col. 2010; Lee y col. 2007).

Para resolver este problema un gran número de esfuerzos se han realizado para determinar este tipo de CF de una manera simple, rápida y eficaz, entre los cuales destacan las técnicas electroquímicas, en especial los biosensores de tipo amperométrico, los cuales han sido considerados para ser un método prometedor para la monitorización de proteínas, bacterias, recientemente CF en la industria alimentaria, debido a sus capacidades de rendimiento excepcionales, que incluyen una alta especificidad y sensibilidad, bajo costo, tamaño compacto, fácil manejo, son rápidos y efectivos en comparación con los métodos analíticos tradicionales (Chawla y col. 2010; Amine y col. 2005). El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de nuevos biosensores de tipo amperométrico basado en superficies nano-estructuradas que inmovilizan la enzima lacasa para la determinación de compuestos fenólicos en alimentos.

1.1 Justificación

El reciente interés que existe por los fenoles naturales se debe a su alto poder antioxidante, ya que estos han sido relacionados con efectos positivos en relación a las enfermedades crónico-degenerativas, vasculares y en ocasiones con el cáncer. Por otra parte, los fenoles son utilizados en la industria alimentaria para incrementar el tiempo de conservación de los alimentos, que es limitado por la oxidación de las grasas. Por lo cual, se han generado expectativas por determinar este tipo de sustancias en los alimentos, por lo que es necesario desarrollar distintos métodos para su determinación, que sean sencillos, económicos, selectivos y sensibles.

1.2 Hipótesis

Los biosensores tipo amperométrico desarrollados con enzima lacasa inmovilizada en nano-estructuras (TiO_2 y Nanotubos de carbono), serán capaces de detectar concentraciones en muestras de bebidas comerciales de forma más eficiente y rápida con respecto al método tradicional (Folin-Ciocalteu) utilizado en la industria alimentaria.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

El objetivo de este trabajo fue desarrollar, caracterizar y optimizar biosensores amperométricos de lacasa empleando superficies nano-estructuradas para la detección de compuesto fenólicos en café y té.

1.3.2 Particulares

- Sintetizar la nano-estructurada de óxido de titanio.
- Conocer el comportamiento de las superficies nano-estructuradas (TiO_2 y NTC).
- Depositar las nano-estructuras (nanotubos de carbono y titania), en la superficie del transductor amperométrico (electrodo de grafito).
- Indagar el comportamiento de los materiales compositos mediante impedancia electroquímica.
- Caracterizar la morfología de los materiales compositos (grafito-titania, grafito-nanotubos).
- Realizar la inmovilización de la enzima lacasa en el seno de las dos electrodos compositos (grafito-titania y grafito- nanotubos de carbono).
- Estudiar los parámetros analíticos de los biosensores en medios acuosos (sensibilidad, estabilidad, reproducibilidad).
- Aplicar los biosensores al análisis de polifenoles a muestras de té y café.

Capítulo II. ANTECEDENTES

2.1 Biosensores

Los sensores naturales son tan antiguos como los organismos vivos. Estos *bioreceptores* son transductores naturales que convierten todo tipo de señales físicas y químicas del ambiente en señales eléctricas, resultando en potenciales de acción que pueden ser procesados por una “computadora natural”, nuestro sistema nervioso. La presencia de *bioreceptores* no se limita a los órganos de nuestros sentidos sino que aparecen en todos los procesos involucrados en los organismos vivos y células. La aparición de los sensores artificiales y su progresiva expansión permitió poner en contacto a los aparatos electrónicos con el mundo exterior, dotando de "sentidos" a la tecnología (López y Ortega, 2002).

Por lo tanto, se puede definir un biosensor como un dispositivo que consta de un elemento de reconocimiento biológico llamado bioreceptor (célula, tejido, receptor, ácido nucleico, enzima, anticuerpo, entre otros) en contacto íntimo con un transductor adecuado, que es capaz de convertir la reacción de reconocimiento biológico o biocatalítica del proceso en una señal medible (Grieshaber y col. 2008; Navaratne y col. 2007; Balasubramanian y Burghard 2006).

El biosensor está en contacto directo con la muestra a través del *bioreceptor*, que le confiere la selectividad a través de un sitio selectivo que identifica al analito y lo transforma. En general, el *bioreceptor* es el elemento en el que se inmoviliza el ente biológico, y es el lugar en el que se transforma el analito en un producto que es detectable por el transductor. Estos cambios que se producen al identificar al analito pueden ser: variaciones de temperatura, de masa, constante dieléctrica, potencial de media celda, de conductividad iónica, turbidez de la muestra, entre otros. Por lo tanto, dependiendo de esta modificación química

que se produzca se escoge el *transductor*. El *transductor* debe dar una señal óptima, sensible, fácil de monitorear y con el mínimo de ruido (Sassolas y col. 2012; Prodromidis y Karayannis 2001).

El transductor puede ser electroquímico, termométrico, fotométrico o piezoeléctrico y de acuerdo al tipo de *bioreceptor* con el que se combina pueden formarse múltiples tipos de biosensores.

El principio de detección de un biosensor (Figura 1) se basa en la interacción específica entre el material (compuesto o microorganismo de interés) y el elemento de reconocimiento. Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, de calor, cambio de potencial, de masa, variación de las propiedades ópticas, etc.) que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal electrónica indicativa de la presencia del analito sometido a estudio o proporcional a su concentración en la muestra (Castro y col. 2007):

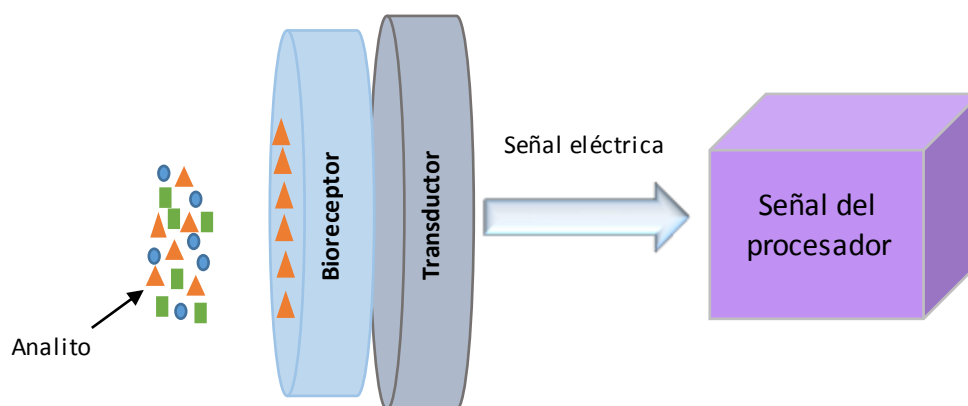


Figura 1: Esquema de un Biosensor (Romero-Arcos y col.2016).

2.2 Clasificación de los biosensores

Los biosensores se pueden clasificar atendiendo a las siguientes variables (Jiménez y col. 2009):

- Tipo de interacción: biocatalíticos o de bioafinidad.
- Método de detección: directo o indirecto.
- Elemento de reconocimiento: célula, organelo, tejido, enzima, receptor, anticuerpo, ácido nucleico, polímero de impresión molecular (PIM), ácido nucleico peptídico (PNA) o aptámero.
- Sistema de transducción: piezoeléctrico, electroquímico, termoelectrónico u óptico.

2.2.1 Biosensores de interacción

- **Biocatalíticos.-** Son sistemas *in-situ*, constituidos por organelos, células, tejidos, sistemas enzimáticos o multienzimáticos de origen animal o vegetal, utilizados para la detección de sustratos mediante el comportamiento estequiométrico de productos o reactivos, o mecanismos de inhibición enzimática que intervienen en el proceso, caracterizados por su capacidad regenerativa que no condiciona la dependencia del proceso de la cantidad del mismo. Entre los elementos de reconocimiento típicos de este tipo de interacciones, se destacan las enzimas, que son moléculas inmovilizadas de naturaleza proteica o ribozimica, altamente específicas, eficientes y

- regulables, acoplables a transductores de tipo calorimétrico, potenciométrico, amperométrico, piezoeléctrico u optoelectrico (Halamek y col. 2005).
- **Bioafinidad.-** se caracterizan por su capacidad para formar complejos entre el analito de interés y el receptor, sin llevar a cabo transformaciones químicas, pero generando excelentes mecanismos de respuesta, aunque con grandes exigencias analíticas para determinar su magnitud. Dichas interacciones generan respuestas que demandan sistemas de alta sensibilidad y precisión, cuantificándose a través del seguimiento cinético del proceso en presencia de inhibidores competitivos, marcaje isotópico, comportamiento óptico del proceso o variaciones gravimétricas (Jiménez y col. 2009).

2.2.2. Sistemas de transducción

La naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito constituye el factor determinante para la selección del sistema de transducción, sin el cual no es posible obtener, amplificar, registrar, sistematizar, almacenar e interpretar las señales producto de la interacción entre estos (Eggins 2002).

- **Ópticos.-** Los transductores ópticos se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de la radiación electromagnética (REM) como consecuencia de la interacción física o química entre el analito y el elemento biológico. Las bases físicas de este tipo de sensores son los cambios que ocurren en la absorción de REM, luminiscencia, dispersión de REM o índice de

refracción, cuando la radiación incide sobre las superficies de reconocimiento. El sistema básico de medida consiste en una fuente de REM, el elemento biológico (donde se encontrarían las moléculas receptoras) y el detector (Jiménez y col. 2009).

- **Piezoeléctricos.-** Conocidos también con el nombre de sistemas de transducción másicos, gravimétricos o acústicos, constituyen un material piezoeléctrico (cristales), caracterizados por entrar en resonancia ante la exposición a un campo electromagnético y soportar el elemento de reconocimiento (proteínas), son versátiles y su uso en el sector alimenticio ha permitido hacer seguimiento de propiedades reológicas como la textura mediante la detección de vibraciones por fractura de las muestras de interés (Taniwaki y col. 2006). El principio de los sensores piezoeléctricos se basa en que la frecuencia de vibración de un cristal oscilante es disminuida por la adsorción de un material extraño en su superficie. El cristal está sensibilizado mediante una cubierta de material de unión o reaccionando con el analito. Los sensores piezoeléctricos se han utilizado para la medición de amoníaco, óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono, los hidrocarburos, el hidrógeno, metano, dióxido de azufre y ciertos compuestos organofosforados.
- **Termométricos.-** Se basan en la detección del calor generado en las reacciones enzimáticas exotérmicas, que se puede relacionar con la concentración del analito. Estos cambios de temperatura normalmente se determinan por medio de termistores a la entrada y a la salida del dispositivo en el que se encuentran inmovilizadas las enzimas.
- **Nanomecánicos.-** En este caso, el elemento de reconocimiento biológico se inmoviliza sobre la superficie de una micropalanca de silicio, que se sumerge en una muestra líquida. Generalmente se utilizan anticuerpos como elementos de reconocimiento. La interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito

produce un cambio diferencial en la tensión superficial del líquido y la micropalanca sufre una respuesta de tipo nanomecánico que consiste en un cambio de la deflexión y/o de la frecuencia de resonancia, la magnitud de este cambio está relacionada con la concentración de analito.

- **Electroquímicos.-** Los transductores electroquímicos transforman la señal que se produce por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito en una señal eléctrica. El elemento de reconocimiento biológico y el elemento de transducción deben estar en contacto. Se diferencian cuatro tipos de biosensores electroquímicos que son conductimétricos, potenciométricos, amperométricos e impedimétricos que detectan cambios en la conductividad, en el potencial, en la corriente generada o en la impedancia, respectivamente.

Los biosensores que realizan medidas amperométricas son los más utilizados. En estos casos se trabaja a un potencial fijo respecto al electrodo de referencia. Se mide el flujo de corriente que se genera en la superficie del electrodo de trabajo cuando tiene lugar la oxidación o reducción de alguna de las especies implicadas en la reacción enzimática, y la señal dada se puede correlacionar con la concentración de sustrato. En estos electrodos, ya sea el sustrato o el producto deben ser especies electroactivas y la velocidad de la reacción enzimática se controla por el registro directo de la corriente (transferencia de electrones) producida.

De entre los biosensores amperométricos, los más utilizados son los electrodos enzimáticos, que al inmovilizar en las cercanías del material electródico las enzimas, combinan las ventajas de la selectividad enzimática con la transducción directa de la velocidad de reacción en una corriente eléctrica.

2.3 Enzimas

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones de sustratos específicos extremadamente rápido. En un proceso analítico, las enzimas se utilizan para la estimación específica de sustratos correspondientes y proporcionan un sistema de amplificación significativa para la detección sensible de un sustrato (Patel 2002). De acuerdo a su función se clasifican (Tabla 1) en seis clases: Oxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, y ligasas (Voet y col. 2007). Las enzimas oxido-reductasa son las más utilizadas en el desarrollo de biosensores debido a que son más estables, en algunas situaciones no requieren coenzimas o cofactores debido a sus propiedades de transferencia durante la catálisis (Mello y Kubota 2002). Estas pueden ser divididas en cuatro grupos: oxidasas, deshidrogenasas, peroxidas y oxigenasas.

Tabla 1: Clasificación de enzimas.

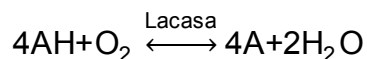
Clasificación	Tipo de reacción catalizada
Oxidoreductasas	Reacciones de óxido-reducción
Transferasas	Transferencia de grupos funcionales
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
Liasas	Eliminación de grupos para formar dobles enlaces
Isomerasas	Isomerización
Ligasas	Formación de enlaces, acoplado con hidrólisis de ATP

2.3.1 Lacasa

Yoshida descubrió por primera vez en 1883 lacasas en los exudados del árbol de laca japonesa *Rhus vernicifera*. Unos años más tarde también fue encontrada en los hongos (Baldrian P. 2006), y posteriormente en muchas otras plantas (Kunamneni y col. 2008; Desai y Nityanand, 2011), insectos (Kramer y col. 2001), y bacterias (Claus 2003).

Las lacasas son cada vez más utilizadas en una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas como deslignificación, teñir o manchar el blanqueado, la modificación de fibras vegetales, la producción de etanol, las células biocombustibles, desintoxicación de efluentes industriales, en su mayoría de papel y pulpa, textiles e industrias petroquímicas, son usadas como una herramienta para diagnósticos médicos y como agente para la bioremediación de herbicidas, pesticidas y ciertos explosivos en el suelo (Quan y col. 2002; Gochev y Krastanov 2007). También ha sido utilizado como catalizador para la manufactura de drogas anti-cáncer e incluso como ingredientes en cosméticos (He y col. 2006; Mohidem y Mat 2009; Li y col. 2008).

Las lacasas (EC1.10.3.2, p-bencenodiol: oxígeno oxidorreductasa) es una oxidorreductasa que contiene cobre que cataliza la oxidación de algunos compuestos inorgánicos y orgánicos (especialmente fenoles) y la reducción simultánea de oxígeno a agua [Avni Oktem y col. 2012; Manole y col. 2008; Singh y col. 2010; Kunamneni y col. 2008]. Estas son capaces de oxidar diferentes sustratos: fenoles, mono-, di-, y polifenoles, aminas aromáticas, anilinas según la reacción:



Donde AH y A son los estados reducidos y oxidados del sustrato respectivamente [Abadulla y col. 2000; Di Fusco y col. 2010; Gomes y Rebelo 2003].

Para los más de 60 tipos de lacasas aisladas de diferentes fuentes, las diferencias en las propiedades termodinámicas y cinéticas que se observaron, dependen de la fuente, aunque el centro de cobre es similar para todas las lacasas. La enzima lacasa contiene cuatro iones cobre (Cu): un Cu tipo 1 (CuT1), el cobre “azul” paramagnético presenta fuerte absorción en torno a 600nm, lo cual confiere a estas enzimas su característico color azul en estado oxidado; un tipo 2 (CuT2) y dos iones Cu^{2+} tipo 3 (CuT3) acoplados binuclearmente. En sus estados oxidados los CuT2 y CuT3 exhiben señales específicas en los espectros de resonancia paramagnética de electrones (EPR). Por el contrario hay dos CuT3 que no son paramagnéticos. El CuT1, en su estado oxidado, absorbe fuertemente la luz a 610nm, mientras que los CuT3 lo hacen a 340nm. El CuT1 está unido a un átomo de azufre perteneciente a un residuo de cisteína, a dos anillos de imidazol de los residuos de histidina y a un azufre del residuo de metionina (Figura 2). El CuT2 está ligado al menos a dos grupos imidazol de los residuos de la histidina (Lu y col., 1992). Los CuT3 están enlazados a tres nitrógenos, de los cuales al menos uno es de un grupo imidazol del residuo de la histidina y a un cuarto ligando que puede ser H_2O u OH^- [Garavaglia y col., 2004; Gochev y Krastanov 2007; Ivnitski y Atanassov 2007].

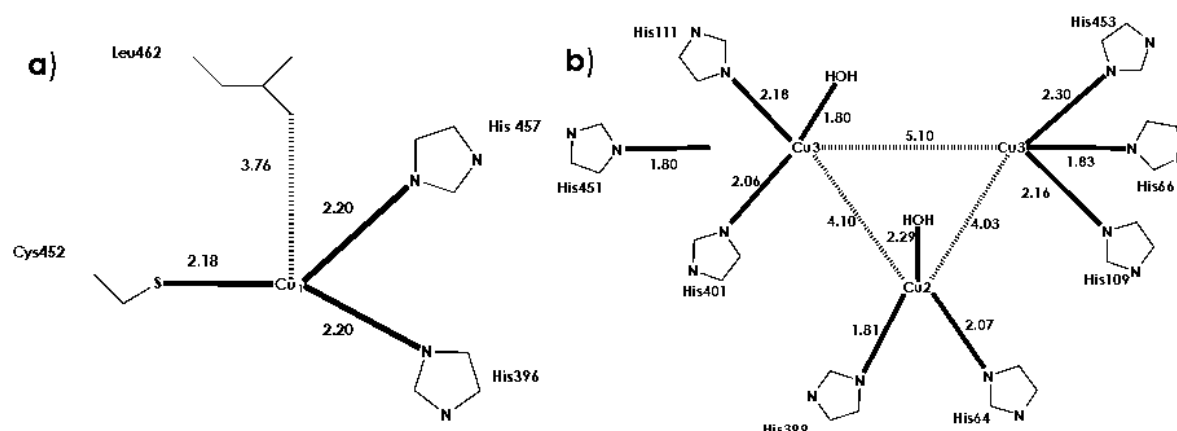


Figura 2: Representación de los centros Cu, especificando las distancias entre cada átomo. (a) CuT1 y (b) esquema trinuclear de CuT2/T3 (Lu y col., 1992).

En una reacción típica catalizada por la lacasa (Figura 3), un sustrato fenólico se somete a una oxidación de un electrón dando lugar a un radical fenoxi, que se oxida a una quinona en la segunda etapa. La quinona, así como el producto de radicales libres se somete a reacciones no enzimáticas de acoplamiento que conducen a polimerización de difenoles simples tales como la hidroquinona y catecoles son un buen sustrato para la mayoría de las lacasas [Durán y col. 2003; Manole y col. 2008; Singh y col. 2010].

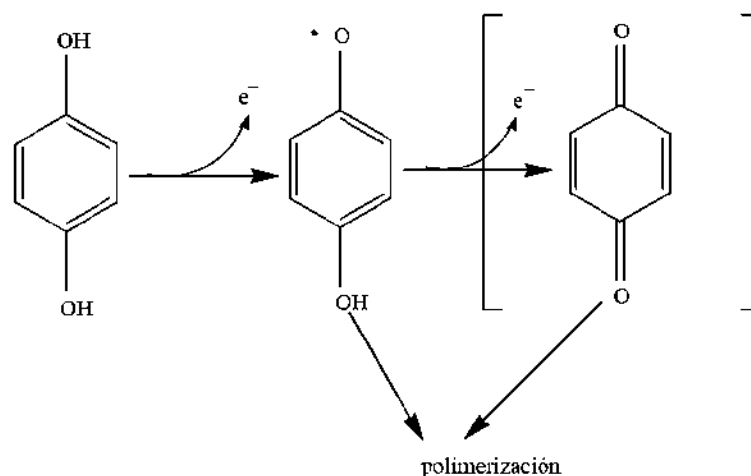


Figura 3: Reacción típica de catalización de las lacasas sobre compuestos del tipo fenólicos (Thurston 1994).

Diversas investigaciones han mostrado que la lacasa en su forma inmovilizada es más estable que en solución (Fei y *col.* 2007). A través de la literatura se han mostrado diversos estudios donde la lacasa es inmovilizada principalmente para la aplicación de biosensores amperométricos sobre diferentes soportes, tales como fibras de carbono, hidrogel redox, carbón vítreo, grafito, pasta de carbono, polietersulfona membranas y platino (Gomes y *col.* 2004). Yaropolov y *col.* [2005], propusieron un electrodo amperométrico basado en enzima lacasa para la determinación de compuestos fenólicos. La enzima fue inmovilizada en tres diferentes polímeros sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo, carga positiva cetílico etilo poli (etilenimina) y cargados negativamente comercial Nafion y polímeros Eastman AQ 29D. Mohidem y Mat [2009], inmovilizaron la enzima lacasa en una matriz de sílice utilizando el proceso sol-gel, para la determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales.

2.3.2 Cinética enzimática

Los estudios cinéticos permiten detectar el número y secuencia de los intermediarios del mecanismo, la existencia de complejos y de cambios conformacionales, y la participación de grupos ácidos y básicos. Por otra parte, estos estudios conducen a la determinación de las constantes de velocidad del mecanismo, parámetros que describen cuantitativamente las propiedades de afinidad y de reactividad característica del sistema enzimático considerado.

Si una reacción enzimática se repite varias veces, con una cantidad constante de enzima y con cantidades crecientes de sustrato, y se mide la velocidad inicial, obtenemos una curva como se muestra en la Figura 4, en la cual, se observa que en su primer tramo corresponde a una cinética de primer orden y el en el tramo horizontal a una cinética de orden cero. Esto indica que con concentraciones bajas de sustrato la enzima no está saturada y a concentraciones altas la velocidad de reacción ya no depende de la concentración de sustrato $[S]$ y se alcanza la velocidad máxima V_m . Si la concentración de la enzima aumenta en presencia de un exceso de sustrato, la velocidad de reacción V , aumenta linealmente.

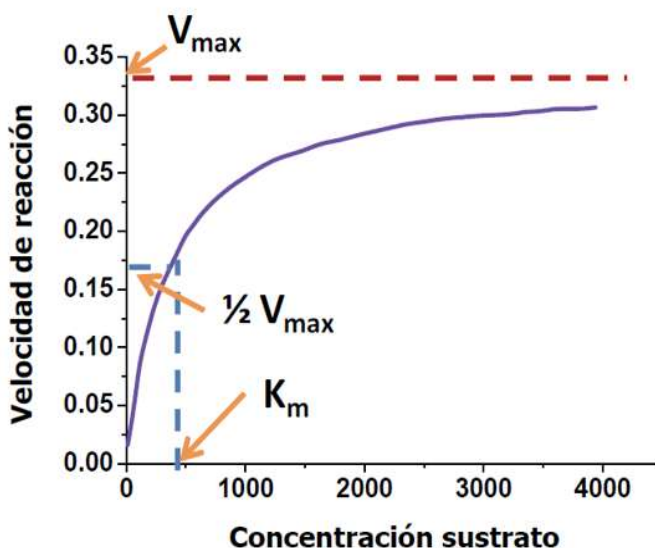
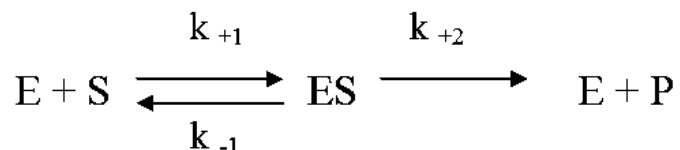


Figura 4: Curva de velocidad de reacción (Pérez 2012).

En 1913, Michaelis y Menten propusieron un mecanismo partiendo de la hipótesis del mecanismo simplificado:



Cuando la concentración de sustrato es mayor que la concentración de enzima, y en condiciones de estado estacionario (la concentración del complejo enzima-sustrato es constante), la velocidad de reacción se puede describir con la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} * C}{K_M + C} \quad (1)$$

Dónde: v_{max} es la velocidad máxima que se puede alcanzar a saturación de sustrato; C es la concentración de sustrato en el medio de reacción; y K_M , definida como el cociente, $(k_{-1} + k_2)/k_1$, es la concentración de sustrato con la que la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima.

Por lo tanto, v_{max} nos da una idea de la capacidad de la enzima para convertir el sustrato en producto (etapa limitante), mientras que K_M nos indica la afinidad de la enzima por el sustrato: una mayor K_M indica una menor afinidad por

el sustrato y viceversa. Conviene tener en cuenta que v_{max} de la reacción depende de la concentración de enzima, mientras que K_M es independiente. Por ese motivo, en lugar del valor de v_{max} suele ser más interesante el valor de la constante catalítica (k_{cat}), también conocida como número de recambio, cuyo valor, calculado a partir de la v_{max} , es independiente de la concentración de enzima.

Puesto que no siempre es posible medir experimentalmente la V_{max} de una reacción, se suelen medir las velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (Figura 5). Para calcular de forma sencilla los parámetros K_M y V_{max} , existen diferentes tratamientos de los datos que, partiendo de la ecuación de Michaelis-Menten, ofrecen una representación lineal de la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de reacción (Copeland 2000).

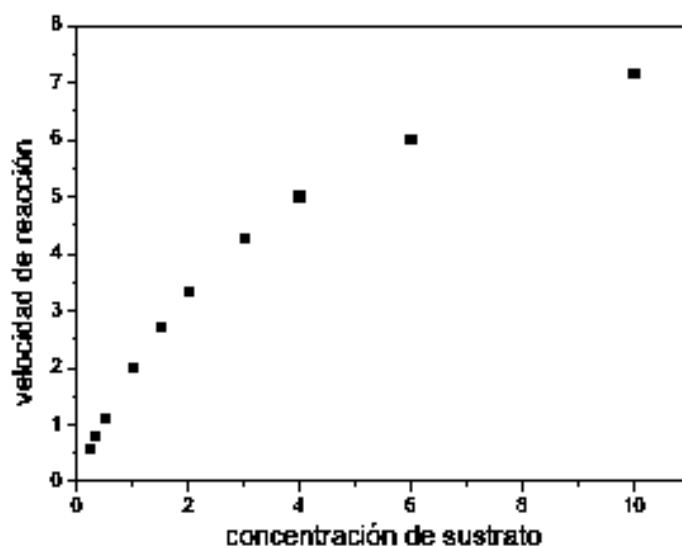


Figura 5: Curva cinética de la reacción enzimática (Peña y col 2004).

2.3.2.1 Representación de Linewaver-Burk

Esta representación es la más usada para calcular los parámetros cinéticos. Se basa en una simple conversión matemática de la ecuación de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \quad (2)$$

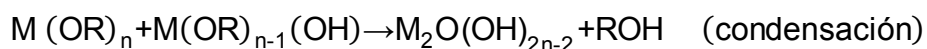
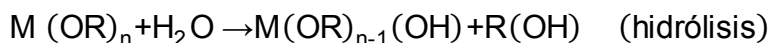
Representando la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de sustrato se obtiene una línea recta a partir de la cual se pueden calcular la K_M (pendiente) y la $v_{\max}$ (ordenada en el origen).

Sin embargo, este tratamiento de los datos puede dar como resultado un gran error en la medida, puesto que son los puntos de baja concentración de sustrato los que presentan mayor importancia en la regresión lineal, siendo también dichos puntos los que llevan asociado un error de medida mayor (es más difícil medir velocidades bajas). Por lo tanto, una pequeña desviación en la velocidad a concentraciones de sustrato bajas dará como resultado un gran cambio en los parámetros calculados.

2.4 Proceso sol-gel

El proceso sol-gel ha sido ampliamente usado como una alternativa tecnológica para la preparación de una gran variedad de formas que incluyen monolitos, polvos, revestimientos y fibras [Sung-Seen 2003], además, este proceso se puede llevar a cabo a bajas temperaturas, obteniendo materiales

homogéneos, químicamente inertes, porosos, transparentes y mecánicamente estables [Mackenzie y col. 2007; Laurent y col. 2010]. El proceso sol-gel implica la hidrólisis de los precursores moleculares constituyentes y la policondensación posterior a una forma similar al vidrio [Galceran y col. 2007]. En un típico proceso sol-gel, una suspensión coloidal, o un sol, se forma a partir de las reacciones de hidrólisis y de polimerización de los precursores, que son por lo general sales inorgánicas de metales o compuestos de metales orgánicos tales como alcóxidos de metales. La polimerización completa y pérdida de disolvente conduce a la transición del sol líquido en una fase de gel sólido [Chen y Mao 2007; Gupta y col. 2008]. Estas reacciones de hidrólisis y condensación pueden ser expresadas esquemáticamente como [Jolivet J. 2000; Pierre 2002]:



El método Sol-Gel, consiste básicamente en la formación de redes compuestas por elementos inorgánicos, que se obtienen a partir de la hidrólisis del alcóxido, alcohol y agua (solución homogénea) llamada sol (A), que es una solución coloidal. El “sol” tiene un diámetro aproximado de 100 Å (Angstroms). En el sol se forman micelas suspendidas en el líquido, las cuales van aumentando de tamaño en función del tiempo y en un sistema de agitación constante, hasta la formación del gel (B), este es un sistema polimérico que tiene una apariencia gelatinosa y cuando se seca a una temperatura de aproximadamente 70°C, se forma un polvo (C) que aún conserva las propiedades de un coloide. Brinker y col., describen el siguiente procedimiento para desarrollar el método Sol-Gel: es necesario preparar una solución coloidal en fase líquida, la cual debe de contener iones metálicos disueltos. Surgen reacciones de hidrólisis que forman una solución organometálica o sol, la cual está compuesta por cadena polimérica, con iones metálicos y oxígeno. De la solución se forman partículas de óxido amorfo, las cuales producen una capa superficial de gel rígido. El proceso de gelación inicia con la formación de agregados fraccionados hasta formar por su unión una red

tridimensional. Si las dimensiones más pequeñas del gel son más grandes que unos pocos milímetros, el objeto es generalmente llamado monolito. Alternativamente, la gelación puede ser producida por la evaporación rápida del solvente, como ocurre durante la preparación de películas o fibras. El gel es sometido a un proceso de secado y después es calcinado. Las temperaturas de sinterizado son por lo general bajas debido a que algunos polvos pueden ser altamente reactivos a la temperatura. Temperaturas de calcinado más elevadas permiten la producción de vidrios y vidrios cerámicos.

Cuando se dan tratamientos térmicos entre 800 y 1000 °C el xerogel, que es el gel secado a condiciones atmosféricas una vez eliminado el sol residual, cambia sus propiedades texturales (área, porosidad, tamaño de partícula, etc.) y se obtiene una cerámica (D). La formación de partículas uniformes (E), requiere de tiempos prolongados de envejecimiento y de un sistema estable para obtener un monolito.

Recientemente, la química sol-gel ofrece nuevas e interesantes posibilidades en el campo de biosensores, para la inmovilización de una gran variedad de biomoléculas, en especial para la inmovilización de enzimas, debido a sus características especiales como inercia química, rigidez física, alta estabilidad térmica, biodegradación, transparencia óptica, pueden ser preparados en condiciones ambientales y mantienen la actividad catalítica de la enzima [Kim y Lee 2003; Wang y col. 2007; Yu y col. 2003; Galceran y col. 2007].

2.5 Óxido de titanio

El titanio es el noveno elemento más abundante en la corteza terrestre y tiene lugar en la naturaleza sólo en combinación con otros elementos como oxígeno para formar TiO_2 (US Geological Survey, 2002). Naturalmente encontramos formas de dióxido de titanio que son usualmente combinadas con

hierro (FeTiO_3 o FeO-TiO_2) y conteniendo otras impurezas. Por lo tanto el TiO_2 (titania) usado como fotocatalizador es fabricado por medios sintéticos.

Generalmente, existen tres fases cristalinas para las nanopartículas de TiO_2 (Figura 6): rutilo, anatasa y broquita [Watson y *col.* 2004; Macwan y *col.* 2011, Yodyingyon y *col.* 2011]. Las fases anatasa y rutilo presentan estructura tetragonal, mientras que la estructura broquita es ortorrómbica. La fase rutilo es estable a la mayoría de las temperaturas y presiones de hasta 60 Kbar, las estructuras broquita y anatasa se transforman a la fase rutilo después de alcanzar un cierto tamaño de partícula, la fase rutilo llega a ser más estable que la fase anatasa cuando se tienen tamaños de partícula mayores de 14nm, cuando la fase rutilo es formada se presenta en mayor cantidad que la fase anatasa, la actividad de la fase rutilo es generalmente muy pobre [Gupta 2011, Macwan y *col.* 2011]. Muscat y *col.* (2002) encontró que la fase anatasa es más estable que la fase rutilo. La fase anatasa dentro de las fases cristalinas del TiO_2 es conocida como una de las mejores catalíticamente hablando, debido a que posee una actividad fotocatalítica más alta que una fase rutilo (Linsebigler y *col.* 1995). La broquita es una fase de incidencia natural y es relativamente difícil sintetizarla (Neppoliana 2005).

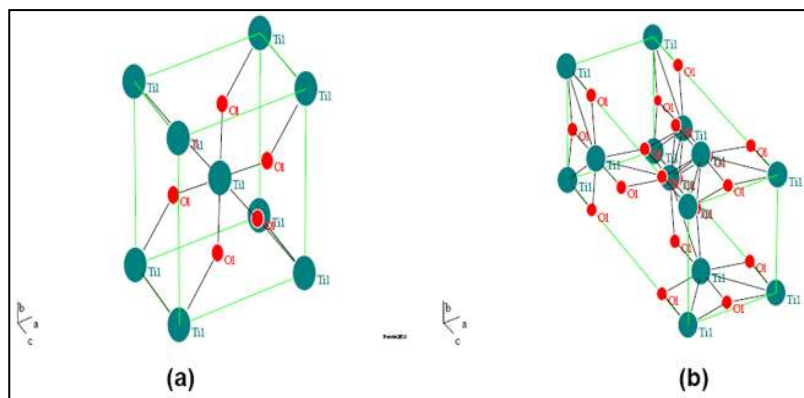


Figura 6: Estructuras cristalinas del TiO_2 (a) Rutilo y (b) Anatasa (Londeree 2002).

En la actualidad, las nano-partículas de óxido de titanio se han propuesto como una interfaz potencial para la inmovilización de biomoléculas, las cuales son aplicadas en la fotoquímica y electroquímica, debido a que forman una película porosa, y aumentan con ello el área superficial, por su conductividad de iones oxígeno, retienen la actividad biológica [Zhong y col. 2011; Chavhan y col. 2012]. Por otra parte, los biosensores basados en las películas compuestas de óxido de titanio exhiben buena estabilidad a largo plazo debido a la excelente biocompatibilidad de la película de óxido de titanio [Lee y col. 2007].

2.6 Nanotubos de Carbono (NTC)

Los nanotubos de carbono (NTC), descubiertos por lijima y Ichihashi 1991, han atraído un gran interés en la mayoría de las áreas de la ciencia y la ingeniería, debido a su comportamiento único, incluyendo sus propiedades estructurales, físicas, químicas y eléctricas, lo que los hace un material muy atractivo para una amplia gama de aplicaciones. Los NTC pueden mostrar un carácter metálico, semiconductor y de transporte de electrones, además, de poseer un núcleo hueco y tener el mayor módulo elástico que cualquier material conocido [Wang 2005].

Los NTC son una de las formas alotrópicas del carbono, junto con el grafito, el carbón amorfo, el diamante, y los fullerenos (Figura 7). Los NTC se construyen a partir de unidades de carbono sp^2 y presentan una estructura transparente con celosías de panal hexagonal, siendo varios nanómetros de diámetro y muchas micras de longitud. Su estructura puede considerarse procedente de una lámina de grafito enrollada sobre sí misma hasta formar un cilindro, con diámetros exteriores que varían de 0,4 a 5nm [Rivas y col., 2007].

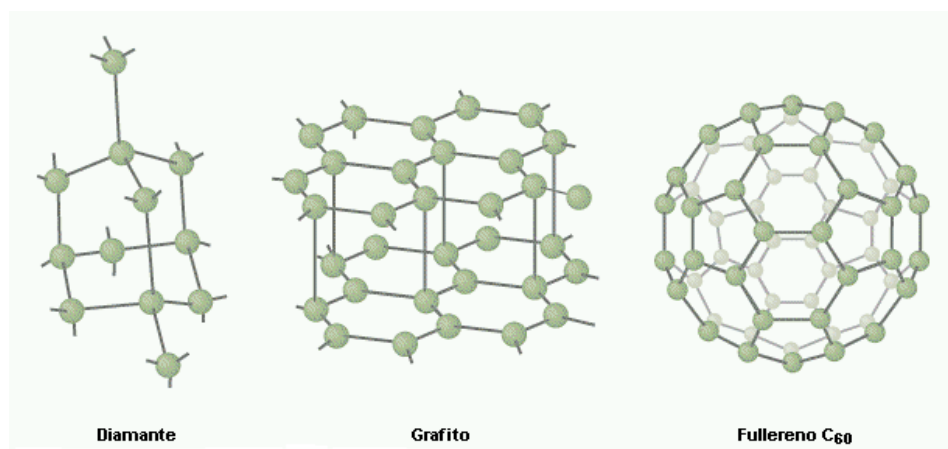


Figura 7: Forma alotrópicas del carbono (Díaz del Castillo 2012).

2.6.1 Tipos de nanotubos de carbono

Dependiendo de la naturaleza y el tamaño del catalizador así como la temperatura, la fuente de carbono, y de las condiciones de síntesis, los nanotubos pueden clasificarse en dos tipos diferentes según sea el número de capas, en NTC de pared simple y NTC de pared múltiple.

- Nanotubos de carbono de pared simple (NTC-S): Consiste en una sola hoja de grafito enrollada formando un cilindro hueco (Figura 8a) por lo cual, presentan excepcionales propiedades derivadas de la perfección cristalina en su estructura y unidimensionalidad, este tipo de nanotubos se encuentran covalentemente enlazados a tres átomos de carbono vecinos mediante hibridación tipo sp^2 , el cuarto enlace del carbono queda deslocalizado entre los demás átomos. Poseen diámetros de 1-2nm [Cruz-Delgado y col., 2007; Wang y col., 2005].

- Nanotubos de carbono de pared múltiple (NTC-M): Consisten de varias hojas de grafito enrolladas concéntricamente con un espacio entre ellos de 0.36nm (Figura 8b). De igual manera presenta una hibridación tipo sp^2 , en este tipo de nanotubos el cuarto enlace del carbono forma enlaces débiles del tipo Van der Waals con las demás hojas de grafito lo que le confiere también un carácter semiconductor a la estructura formada. El diámetro varía entre 10-20 nm [Cruz-Delgado y col., 2007; Wang y col., 2005].

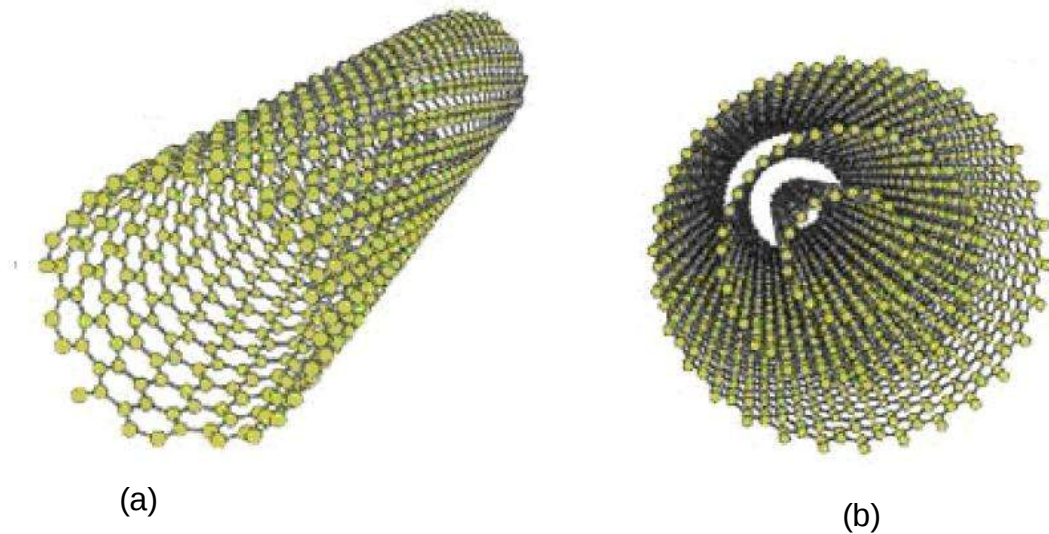


Figura 8: Tipos de nanotubos dependiendo en número de capas. (a) nanotubo de carbono de pared simple; (b) nanotubo de carbono de pared múltiple (Farías 2010).

2.6.2 Propiedades de los nanotubos de carbono

- **Eléctricas:** los NTC presentan un amplio margen de conductividades, en función de su diámetro, quiralidad y el número de capas de su composición. Pueden ser semiconductores o conductores en función de su quiralidad, como los NTC-S, mientras que los NTC-M, son siempre conductores, ya que en todos los casos alguna de sus capas será de tipo conductor.

Además son materiales piezoeléctricos, que pueden expandirse o contraerse con la aplicación de un voltaje eléctrico [Benavides-Castillo 2013].

- **Tenacidad:** Los nanotubos son los elementos con mayor resistencia física encontrados sobre la tierra, en términos de elasticidad, consecuencia del tipo de enlaces covalentes entre los carbonos del nanotubo. Los NTC son las fibras más fuertes que se conocen. Un solo nanotubo perfecto es de 10 a 100 veces más fuerte que el acero. Por encima de una tensión muy elevada, los nanotubos sufren una deformación plástica, lo que quiere decir que es una deformación permanente [Díaz del Castillo 2012].
- **Térmicas:** Todos los nanotubos son buenos conductores térmicos, poseyendo una propiedad especial llamada "conducción balística". Se predice que los nanotubos podrán transmitir alrededor de 20 veces más calor que metales como el cobre [Días del Castillo 2012].
- **Mecánicas:** Las propiedades mecánicas de los NTC son excelentes; poseen alta dureza, tenacidad, resistencia mecánica, flexibilidad y elasticidad (aunque hay que aplicar grandes fuerzas para deformarlos). Además, son muy ligeros. Poseen un módulo de Young de hasta 1 TPa (5 veces superior al del acero convencional), una elongación del 10%, una resistencia a la tracción de 50 GPa (10 veces superior a la del acero convencional) y una densidad de 1,35 g/cm³ (6 veces inferior a la del acero convencional). Estas propiedades son muy superiores a las de cualquier material conocido.
- **Químicas:** Al estar los nanotubos formados por carbono puro, estos poseen la riqueza química del carbono. Permiten el acoplamiento de estructuras químicas en las paredes y en los extremos de los nanotubos, lo que genera modificaciones de sus propiedades. Este hecho abre un gran campo de posibilidades tales como favorecer el transporte de electrones si se acoplan estructuras químicas en ambos extremos de un nanotubo metálico o conseguir que un nanotubo sea soluble en un determinado tipo de solvente, lo que facilita su dispersión en una matriz para formar compuestos. Además, los NTC son

hidrófobos, es decir, repelen el agua. Esta propiedad podrá permitir el desarrollo de compuestos hidrófobos.

Recientemente, NTC han atraído gran interés debido a su comportamiento único, como notables propiedades mecánicas, eléctricas y sus propiedades químicas específicas, con lo cual pueden facilitar la transferencia de electrones, por lo que, proporcionan una vía para la fabricación de biosensores. Varios electrodos modificados basados en NTC han sido utilizados para la detección de biomoléculas, compuestos inorgánicos y orgánicos. Debido a que estos, tienen una gran capacidad de absorción, excelente conductividad, gran área específica, alta estabilidad, y especialmente la biocompatibilidad y la capacidad para facilitar la transferencia de electrones del sitio activo de las enzimas y mejorar la actividad relativa de las mismas, con lo cual, son adecuados para su inmovilización.

2.7 Sistemas de inmovilización

La elección del método de inmovilización depende de muchos factores, tales como la naturaleza del elemento biológico, el tipo de transductor utilizado, las propiedades fisicoquímicas del analito y las condiciones de operación en el que el biosensor puede funcionar, y todas estas consideraciones son necesarias para que el elemento biológico exhiba su máxima actividad en su microambiente inmovilizada (Singh y *col.* 2008; Kausaite-Minkstiene y *col.* 2011; Akyilmaz y *col.* 2003). Los métodos de inmovilización comprenden métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento, y métodos químicos, ya sea mediante unión covalente o por entrecruzamiento o cross-linking. Dentro de cada uno de estos métodos existen numerosas variantes y además, también es posible utilizar combinaciones de diferentes métodos de inmovilización (Karim y Fakhruddin 2012).

En la Figura 9 se presentan los esquemas correspondientes a los principales métodos de inmovilización.

- ❖ *Adsorción*: Es la forma más sencilla y rápida de preparar enzimas inmovilizadas. En general la adsorción puede dividirse en dos clases: física y química. Muchas sustancias absorben enzimas en sus superficies, por ejemplo: la alúmina, carbón, arcilla, celulosa, caolín, gel de sílice, vidrio y colágeno.
- ❖ *Enlace covalente*: En este método, el enlace se produce entre un grupo funcional en el material con la matriz de soporte.
- ❖ *Atrapamiento*: Se refiere a la mezcla del biomaterial con una solución de monómero y luego polimerizado a un gel, atrapando el biomaterial.
- ❖ *Cross-linking*: Para este método, por lo general, el biomaterial está enlazado químicamente a soportes sólidos o de otro material de apoyo como agente de reticulación para aumentar significativamente la unión (Zhao y Jiang 2010; Karim y Fakhruddin 2012).

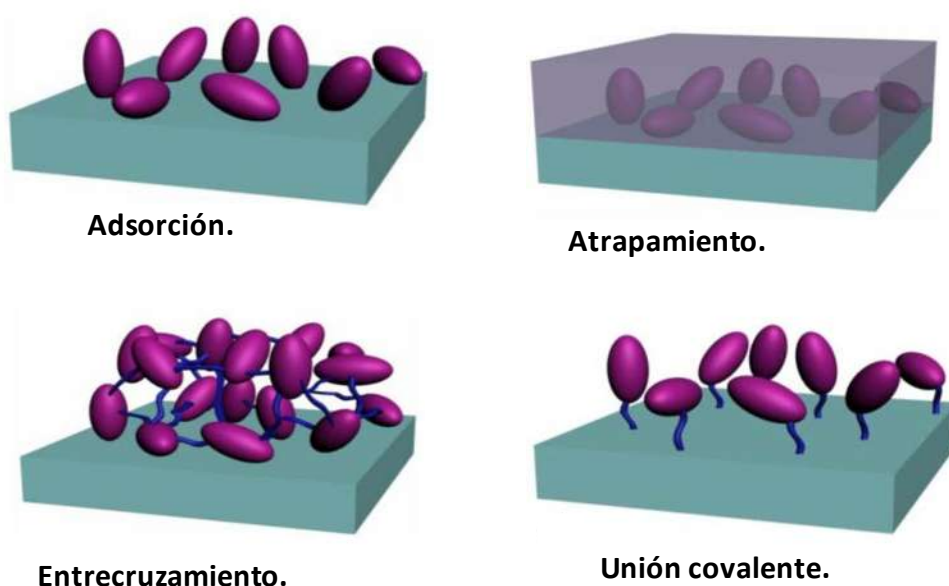


Figura 9: Representación esquemática de los diferentes métodos de inmovilización de enzimas. (Gonzalo 2006).

2.8 Características que deben presentar los biosensores

- Sensibilidad.- Alta para ciertos analitos como los xenobióticos con efectos sobre la salud, incluso a concentraciones de partes por billon ($\mu\text{g/L}$).
- Selectividad.- Alta, para que el dispositivo interaccione exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros. Mediante elementos de reconocimiento específicos.
- Confiabilidad.- Alta, los sistemas de transducción se diseñan de manera que no puedan ser alterados (o lo sean mínimamente) por la muestra.
- Tiempo de vida.- Largo, que no obligue al empleo del dispositivo por cortos períodos desde su fabricación ni a sustituciones frecuentes del mismo. Lo que depende de su estabilidad química, física y mecánica.
- Bajo costo de producción, operación y mantenimiento.
- No pretratamiento de la muestra
- Tiempo de análisis.- Capaces de medir en tiempo real o muy corto, posibilitando una actuación rápida, controlando parámetros importantes de manera inmediata y automática.

2.9 Compuestos Polifenolicos

Los polifenoles son moléculas que tienen una función importante en las plantas y en la industria alimenticia. En este último caso, los polifenoles se utilizan principalmente como colorantes y antioxidantes (Gómez y col. 2008).

Estructuralmente, los polifenoles son un conjunto de moléculas heterogéneas que se caracterizan por su aromaticidad y por contener uno o varios grupos hidroxilos unidos directamente al anillo aromático. Además de las formas solubles, encontradas principalmente en las vacuolas celulares, hay también formas polimerizadas de solubilidad variable, como los taninos, o completamente insolubles como las ligninas (Carralero y col. 2008).

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).

Los polifenoles tienen características estructurales que les confieren su potencial antioxidante: la presencia de sustituyentes donadores de hidrógeno y la posibilidad de deslocalización electrónica. Debido a la deslocalización de los electrones, los radicales resultantes son lo suficientemente estables como para no desencadenar reacciones con radicales en cadena, neutralizan las especies reactivas del oxígeno y los iones metálicos quelantes (Chawla *y col.* 2011).

En la industria alimentaria los polifenoles se usan para incrementar su tiempo de conservación, que puede limitarse debido a la oxidación de las grasas, la cual no sólo es indeseable a nivel organoléptico del alimento, por la aparición del sabor/olor a rancio, sino también debido a que puede tener implicaciones en la salud humana, ya que la exposición a radicales libres aumenta el riesgo de padecer las enfermedades crónicas antes mencionadas (Carralero *y col.* 2008).

Por otro lado, las propiedades organolépticas de ciertas frutas, y la calidad de algunos alimentos y bebidas, dependen de la concentración y tipo de compuesto polifenólico presente. Un ejemplo, lo encontramos en el aceite de oliva. Los polifenoles al tratarse de antioxidantes naturales, ralentizan o previenen los procesos de descomposición de aceites y grasas. De ahí que la determinación de estos compuestos sea importante en la evaluación de la calidad del aceite, ya que son parcialmente responsables de su estabilidad a la auto-oxidación y de sus características organolépticas (Flores *y col.* 2010).

Respecto al vino, su composición es extremadamente compleja ya que en su matriz se han identificado un gran número de compuestos polifenólicos. El vino, en especial el vino tinto, contiene un alto número de ácidos fenólicos (cumarínico, cinámico, cafeico, ferúlico y vanílico), trihidroxi estilbenos (resveratrol y polidatina), y flavonoides (antocianinas, catequina, epicatequina, miricetina, y quercetina). De entre todos los compuestos, los polifenoles de la uva se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas, y en las pepas, siendo su concentración más baja en la pulpa (Gómez, 2008).

Por lo cual, se están realizando numerosas investigaciones a nivel mundial con el fin de conocer la cantidad y el tipo de polifenoles presentes en los alimentos, ya que muchos de los efectos saludables de los mismos, se deben en realidad a su alto contenido en polifenoles (Carralero y col. 2008).

2.10 Métodos de determinación

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) (Chawla y col. 2011).

Los métodos colorimétricos son capaces de permitir la realización de una gran variedad de reacciones que se pueden utilizar para su detección espectrofotométrica. Las reacciones más comunes son las de copulación o condensación que generan especies intensamente coloreadas que son fácilmente analizables por espectrofotometría. Los fenoles con sustituyentes en la posición para-, no se pueden determinar por estos métodos, por tener desactivada la posición más activa tanto para las reacciones de condensación como de copulación. Por otra parte, se trata de una técnica con baja especificidad, ya que

la reacción de color tiene lugar con cualquier grupo hidroxilo oxidable y además se determina la cantidad total de fenoles sin distinguir entre ellos.

En lo que se refiere a las técnicas más utilizadas para la caracterización de compuestos fenólicos, los sistemas de detección más empleados son espectrofotometría UV-Vis con fotodiodos en serie, espectrometría de masas, detección electroquímica y Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La electroforesis capilar ha sido incorporada como alternativa o complemento de las separaciones cromatográficas para el análisis de compuestos fenólicos en distintas matrices, ya que es una técnica de alta resolución, sin paso de derivatización previo y corto tiempo de análisis (Flores y col. 2010).

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 electro activas 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. 2010).

2.11 Técnicas Electroquímicas

2.11.1 Espectroscopia de Impedancia EIS

La Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) fue descrita por Lorenz and Schulze en 1975. Esta técnica consiste en la medida de la impedancia que presenta un sistema electroquímico a diferentes frecuencias, mide la oposición de un circuito o de un componente eléctrico al paso de una corriente eléctrica sinusoidal alterna (Ronkainen y col., 2010; Bartlett 2008; Lorenz and K. D. Schulze 1975). Ha sido utilizada para explicar los mecanismos de corrosión, la caracterización de transporte de carga a través de membranas e interfaces de membrana/solución, y la optimización de las baterías, entre otras (Lisdat F., y Schäfer D., 2008). En el campo de los biosensores, es utilizada para la detección de acontecimientos de unión sobre la superficie del transductor. También de la detección de procesos de bioreconocimiento, se trata de una herramienta valiosa para caracterizar las modificaciones de la superficie, tales como lo que ocurre durante la inmovilización de biomoléculas en el transductor, además los métodos de impedancia son poderosos porque son capaces de muestrear la transferencia de electrones a alta frecuencia y transferencia de masa a baja frecuencia (Lisdat y Schäfer, 2008; Ronkainen y col., 2010).

La impedancia eléctrica como principio de transducción ha sido aplicada en una gran variedad de problemas biológicos, fisiológicos y médicos.

La resistencia eléctrica (R) es la capacidad de un elemento de circuito para resistir el flujo de corriente eléctrica. La ley de Ohm (Ecuación 1) define la resistencia en términos de la relación entre la tensión, E , y la corriente, I .

$$R = \frac{E}{I} \quad (1)$$

Si bien, esto es una relación bien conocida, su uso está limitado a un solo elemento de circuito - la resistencia ideal. Un resistor ideal tiene varias propiedades de simplificación:

- Sigue la ley de Ohm en todos los niveles de corriente y tensión.
- Su valor de la resistencia es independiente al de frecuencia.
- Las señales de tensión y corriente a través de un resistor están en fase.

El mundo real contiene elementos que presentan un comportamiento mucho más complejo. Estos elementos obligan a desechar el simple concepto de resistencia. En su lugar se utiliza el de impedancia, que es un parámetro del circuito mucho más general. Al igual que la resistencia, la impedancia es una medida de la habilidad de un circuito para resistir el flujo de la corriente eléctrica. A diferencia de la resistencia, la impedancia no está limitada por ninguna de las condicionantes expuestas anteriormente.

La impedancia electroquímica se mide generalmente mediante la aplicación de un potencial de corriente alterna (CA) a una celda electroquímica y a continuación, la medición de la corriente a través de la celda. Supongamos que aplicamos un potencial de excitación sinusoidal. La respuesta a este potencial es una señal de CA. Esta señal de corriente puede ser analizada como una suma de funciones sinusoidales (una serie de Fourier).

Impedancia electroquímica se mide normalmente utilizando una señal de excitación pequeña. Esto se hace para que la respuesta de la celda es pseudo-lineal. En un sistema lineal (o pseudo-lineal), la respuesta de la corriente a un potencial sinusoidal será una senoide a la misma frecuencia pero desplazada en fase (Figura 10).

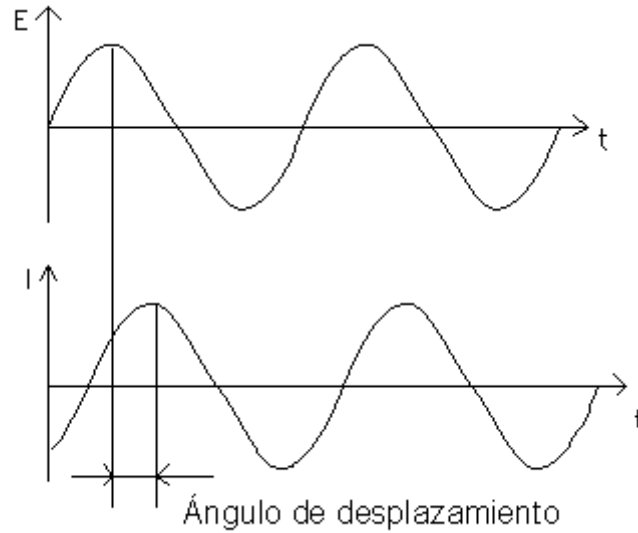


Figura 10: Respuesta de una corriente sinusoidal en un sistema lineal.

La señal de excitación, expresado como una función del tiempo, tiene la forma:

$$E = E_0 \text{sen}(\omega t) \quad (2)$$

Donde E es el potencial en el tiempo t , E_0 es la amplitud de la señal, y ω es la frecuencia radial. La relación entre la frecuencia ω radial (expresado en $\frac{\text{radianes}}{\text{segundo}}$) y f la frecuencia (expresada en herzt) es:

$$\omega = 2\pi f \quad (3)$$

Variando la frecuencia ω , de esta señal de potencial, E , desde $0 \rightarrow \infty$ se obtiene la respuesta del sistema esta vez en corriente I . la respuesta en régimen permanente de un sistema lineal a una señal de excitación de tipo sinusoidal es otra señal sinusoidal, de la misma frecuencia que la primera, pero que difiere de ella en los valores de amplitud y ángulo de fase:

$$I = I_0 \sin(\omega t + \phi) \quad (4)$$

Una expresión análoga a la ley de Ohm nos permite calcular la impedancia del sistema en:

$$Z = \frac{E}{I} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \phi)} \quad (5)$$

Por consiguiente, la impedancia se expresa en términos de una magnitud, Z_0 , y un desplazamiento de fase, Φ .

Con la relación de Euler,

$$\exp(j\phi) = \cos\phi + j\sin\phi \quad (6)$$

es posible expresar la impedancia como una función compleja. El potencial se describe como,

$$E = E_0 \exp(j\omega t) \quad (7)$$

y la respuesta de corriente como,

$$I = I_0 \exp(j\omega t - \phi) \quad (8)$$

La impedancia se representa entonces como un número complejo,

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} = Z_0 \exp(j\phi) = Z_0(\cos\phi + j\sin\phi) \quad (9)$$

Entre las diferentes representaciones gráficas de los datos impedimétricos, la más común es la representación del diagrama de Nyquist, en la que la parte

imaginaria de la impedancia $-Z''$, se representa frente a la parte real Z' . En esta gráfica cada punto corresponde a una frecuencia diferente. Los resultados también pueden ser interpretados mediante diagramas de Bode, en los cuales el logaritmo de la magnitud de la impedancia ($\log |Z|$) y el desfase (ϕ) se grafican respecto al logaritmo de la frecuencia ($\log \omega$).

2.11.2 Diagrama de Nyquist

Esta es la forma más usual de representar gráficamente un diagrama de impedancia. Las gráficas de Nyquist (Figura 11) consisten en representar la parte de la impedancia imaginaria en negativo, $-Z''$ (convención utilizada en electroquímica) frente a la parte real de la impedancia, Z' . De esta forma, podemos obtener información útil sin necesidad de realizar ningún ajuste de los datos experimentales ya que basta con colocar algunas líneas rectas sobre el diagrama y podemos obtener la resistencia del electrolito, la resistencia de transferencia de carga o resistencia de Faraday, y otros parámetros electroquímicos.

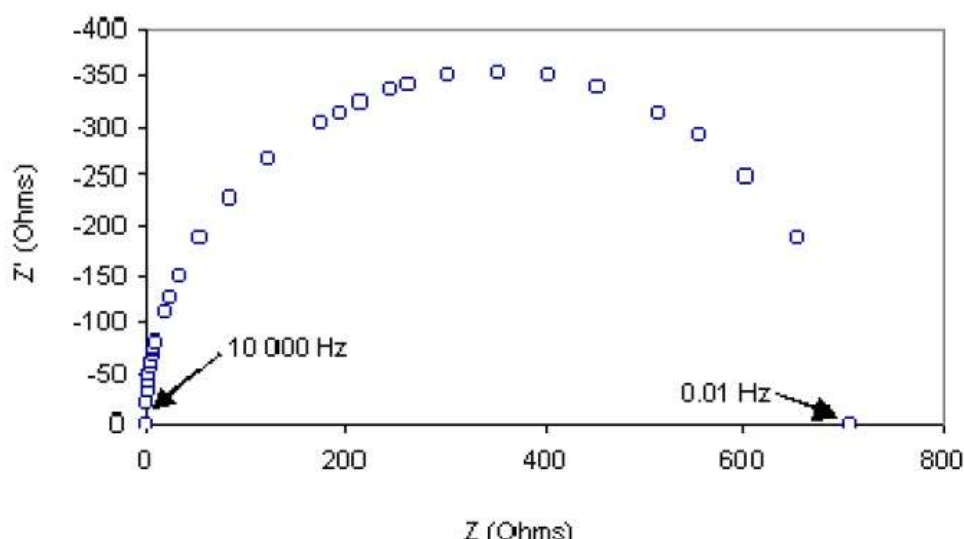


Figura 11: Diagrama de Nyquist, gráfica de las magnitudes de impedancia imaginaria (Z') e impedancia real (Z), a diferentes frecuencias.

2.11.3 Diagramas de Bode

Corresponde al diagrama donde se representa el ángulo de desfase entre la parte real y la parte imaginaria de la impedancia frente al logaritmo de la frecuencia de excitación (Figura 12 y 13 respectivamente). Con esta representación, los posibles picos que pudieran aparecer tienen especial interés por su relación con el número de posibles reacciones que se están realizando, y si estas tienen un carácter “difusivo”, ya que en este caso a baja frecuencia la gráfica tendería a 45° .

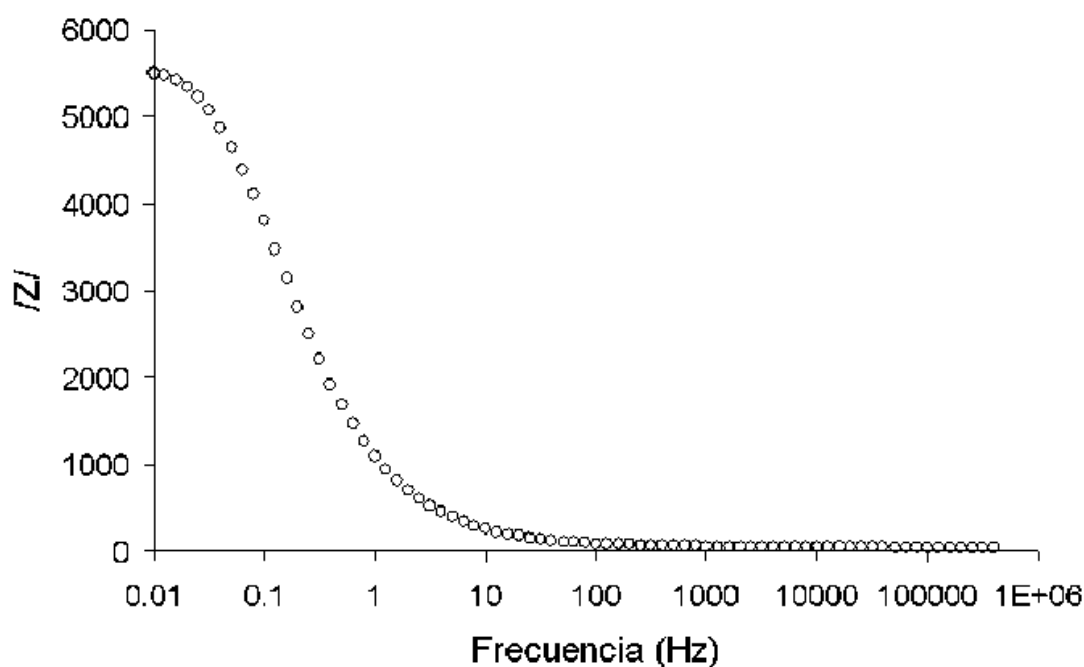


Figura 12: Diagrama de Bode (magnitud del módulo Z vs log frecuencia).

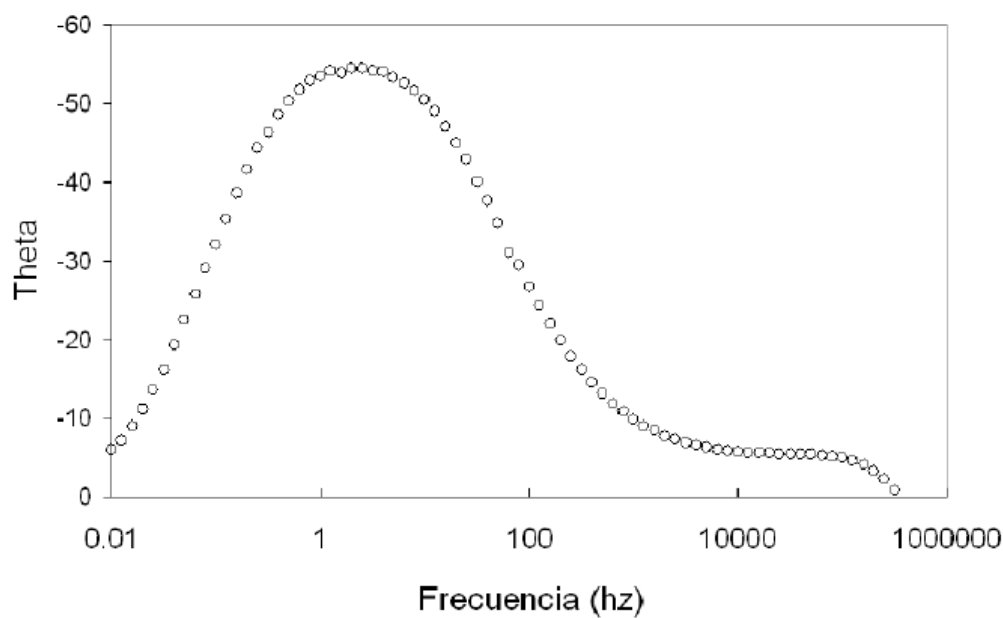


Figura 13: Diagrama de Bode (ángulo de fase Θ vs log frecuencia).

Dependiendo del comportamiento del ángulo de fase y el módulo, se tendrá un comportamiento resistivo o capacitivo. En el proceso resistivo, la señal del potencial (E_0) y la respuesta de corriente (I_0) están en fase, es decir el ángulo es igual a cero y valor de Z' es igual a la magnitud del resistor; en el proceso capacitivo, se tiene un desfaseamiento del ángulo de 90° a diferentes valores de frecuencia.

Un proceso resistivo, está asociado a procesos de conducción y ejemplo de ello es la conductividad en el electrolito y/o a una transferencia de electrones a través de la interfase metal-electrolito. En el proceso capacitivo, se da principalmente un desfaseamiento del potencial y la corriente y está relacionado con un fenómeno de generación de un campo eléctrico que está asociado a procesos electroquímicos que produzcan polarización o separación de carga en algún lado del sistema.

2.11.4 Circuitos equivalentes

Debido a que la impedancia se determina generalmente a diferentes frecuencias en lugar de solo una, un espectro de impedancia permite la caracterización de las superficies, capas o membranas, así como el intercambio y procesos de difusión. Los datos de EIS son comúnmente analizados mediante el ajuste a un modelo de circuito eléctrico equivalente. La mayoría de los elementos del circuito en el modelo son elementos eléctricos comunes, tales como resistencias, condensadores e inductores. Para que sean útiles, los elementos en el modelo deberían tener una base en la electroquímica física del sistema.

En tales circuitos, una resistencia idealmente describe una trayectoria conductora tal como la generada por la conductividad mayor del sistema o el paso de transferencia de carga debido a una reacción del electrodo, mientras que la capacitancia generalmente describe la región de polarización de carga espacial en el sistema, así como la modificación de una superficie de electrodo debido a procesos de adsorción o la deposición de una capa de polímero (Fernández-Sánchez y col., 2005).

Los elementos utilizados en los circuitos equivalentes son presentados en la Tabla 2.

Tabla 1: Elementos eléctricos comunes de circuitos eléctricos equivalentes.

Elemento Equivalente	Impedancia
Resistor	R
Capacitor (C)	$1/j\omega C$
W (Warburg absoluto)	$1/Y_0\sqrt{j\omega}$
O (Warburg limitado)	$\text{Tanh}(B\sqrt{j\omega})/Y_0\sqrt{j\omega}$
Q (CPE)	$1/Y_0(j\omega)^\alpha$
Elemento de fase constante	

2.11.4.1. Circuito Capacitivo

Un metal cubierto con un revestimiento intacto generalmente tiene una muy alta impedancia. El circuito equivalente para tal situación es en la Figura 14.

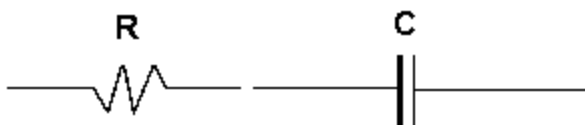


Figura 14: Circuito puramente capacitivo.

El modelo incluye una resistencia (debido principalmente al electrolito) y la capacitancia de revestimiento en serie. Un diagrama de Nyquist para este modelo se muestra en la Figura 15.

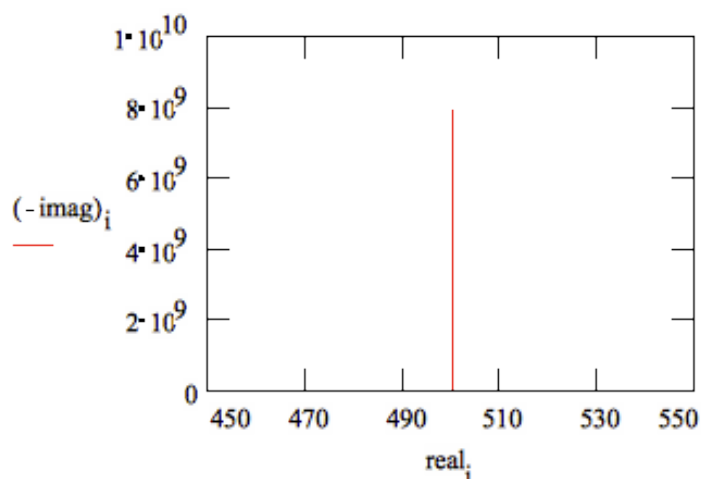


Figura 15: Típico gráfico de Nyquist para un recubrimiento.

El valor de la capacidad no puede determinarse a partir del diagrama de Nyquist. Se puede determinar por un ajuste de la curva o de un examen de los puntos de datos. Nótese que la intersección de la curva con el eje real proporciona una estimación de la resistencia de la solución.

El mismo modelo se muestra en el diagrama de Bode en la Figura 16. Observe que la capacitancia puede estimarse a partir de la gráfica, pero el valor de resistencia de la solución no aparece en el gráfico.

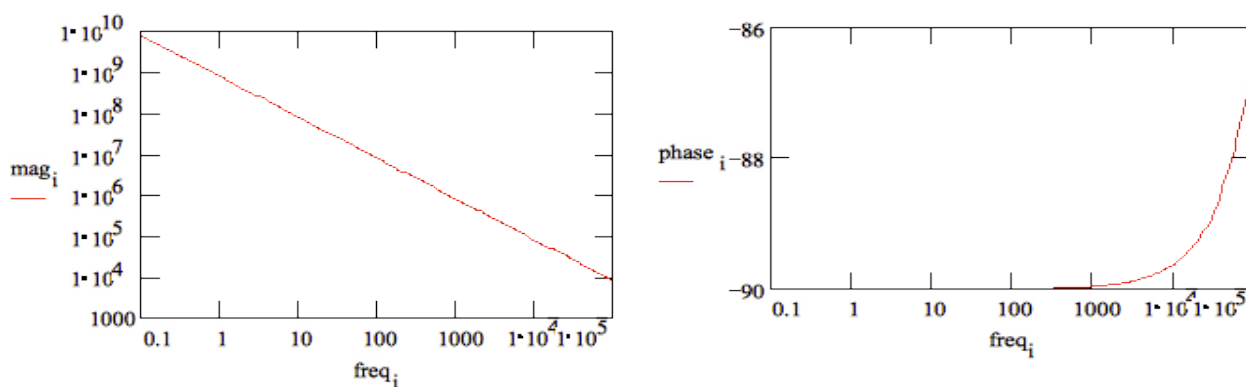


Figura 16: Típico gráfico de Bode para un recubrimiento.

2.11.4.2 Circuito de Randles simplificado

El circuito Randles es el circuito equivalente más simple que describe una celda electroquímica. De esta forma, un sistema electroquímico simple se puede representar por una resistencia, R_{ct} , en serie con un elemento Z_w y en paralelo con un condensador, C_{dl} , que simula la interfase electrodo/disolución y está a su vez en serie con una segunda resistencia, R_s , tal como se muestra en la Figura 17, (Fernández-Sánchez y col., 2005). Este circuito propuesto por Randles, explica satisfactoriamente un gran número de sistemas electroquímicos, R_s representa la resistencia óhmica entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia y engloba la resistencia del electrolito, la resistencia de los hilos utilizados para conectar la célula al sistema de medida, etc. La doble capa eléctrica electrodo-disolución es como un condensador, y se representa en el circuito equivalente como C_{dl} , R_{ct} es la resistencia a la transferencia de carga ion/electrón y, por tanto, de su valor depende la velocidad de transferencia electrónica entre el electrodo y la disolución, y la llamada impedancia de Warburg Z_w , que refleja la influencia del transporte de masa de las especies electroactivas en la impedancia total del sistema.

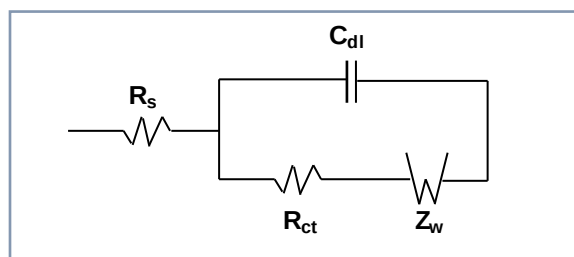


Figura 17: Típico gráfico de Bode para un recubrimiento.

La Figura 18 es el diagrama de Nyquist para un típico circuito de Randles simplificado.

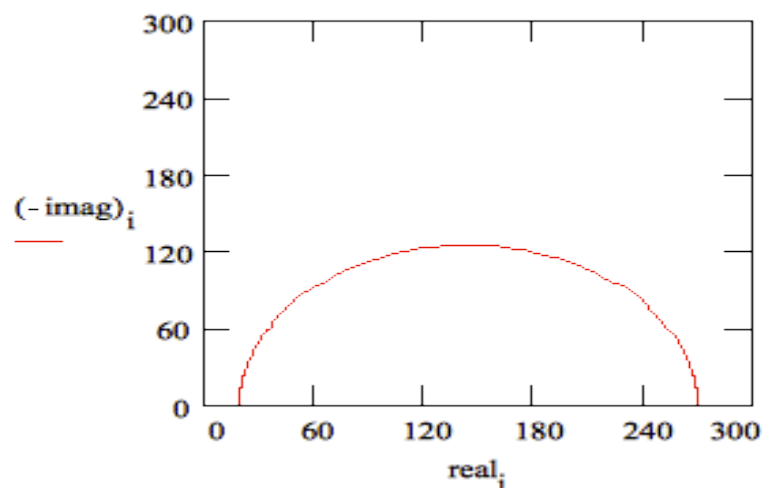


Figura 18: Diagrama de Nyquist para un típico circuito de Randles simplificado.

El diagrama de Nyquist para un circuito de Randles simplificado es siempre un semicírculo. La resistencia de la solución se puede encontrar mediante la lectura del valor de eje real en la intersección de alta frecuencia. Esta es la intersección cerca del origen de la gráfica. El valor real del eje en el otro (baja frecuencia) de intercepción es la suma de la resistencia a la polarización y la resistencia de la solución. Por consiguiente, el diámetro del semicírculo es igual a la resistencia a la polarización.

En la Figura 19 es la representación gráfica para un circuito de Randles simplificado.

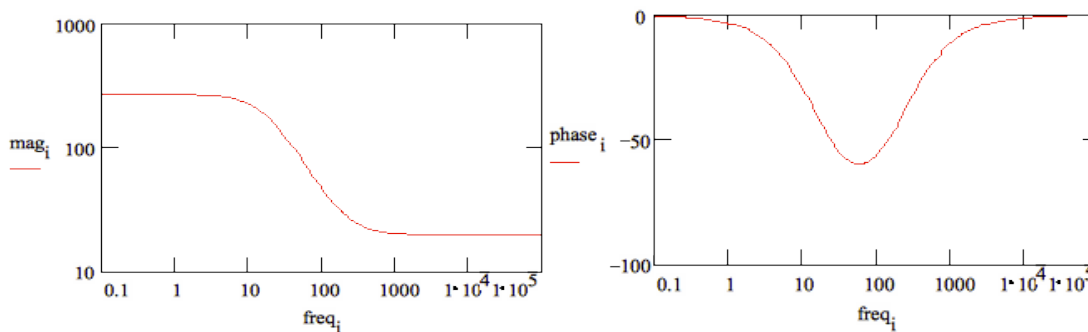


Figura 19: Diagrama de Bode para un típico circuito de Randles simplificado.

5.11.5 Voltimetría Cíclica

Voltimetría cíclica es un método para investigar el comportamiento electroquímico de un sistema. Fue reportada por primera vez en 1938 y descrito teóricamente por Randles. Es una de las técnicas que más se emplea para estudiar mecanismos de reacción, ya que aporta información rápida acerca del comportamiento redox de las especies, de las reacciones químicas en que participan (mecanismos de reacción, reacciones químicas acopladas) y en la determinación de parámetros termodinámicos. En un típico experimento de voltametría cíclica, se aplica un voltaje al electrodo de trabajo en una forma de onda triangular desde un valor inicial a un límite predeterminado donde la dirección de exploración se invierte y la medición de la corriente resultante. El experimento de voltametría cíclica implica la aplicación de un potencial al electrodo de trabajo que cambia con los tiempos como se muestra en la Figura 25.

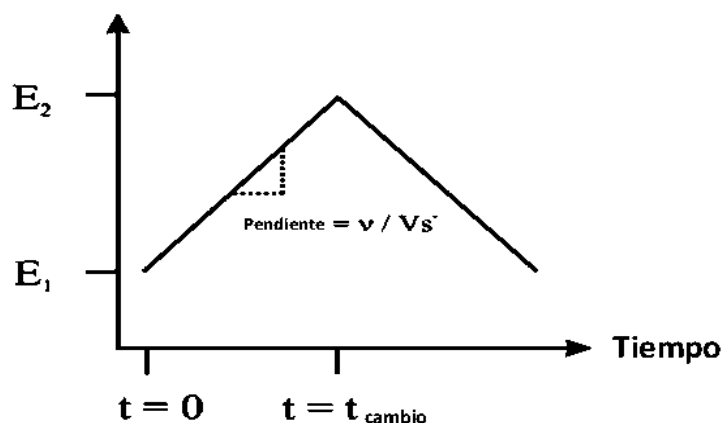


Figura 20: La forma de onda de potencial aplicado al electrodo de trabajo en el experimento de voltametría cíclica (Compton y Banks, 2007).

Tal y como se aprecia en la Figura 20 se inicia desde un potencial de partida y se realiza un barrido creciente de potencial, con una velocidad de barrido constante, hasta un potencial V_2 , que se conoce como potencial de corte anódico. Una vez llegado a ese potencial se invierte el barrido de tal forma que se hace un barrido decreciente de potencial desde el potencial V_2 hasta el potencial V_1 , denominado potencial de corte catódico. Finalmente se vuelve a hacer un barrido creciente hasta alcanzar el potencial de partida.

Las velocidades de barrido simétricas triangulares pueden variar desde unos cuantos milivolts por segundo hasta cientos de volts por segundo.

La corriente en el electrodo de trabajo se llama corriente farádica, es decir, la cantidad de electricidad que pasa (carga) es proporcional al número de moles de reactante convertido. Las superficies de los electrodos donde se llevan a cabo los procesos están clasificados como electrodos de transferencia de carga, ya que el grado de reacción depende de la carga medida que pasa a través de la superficie del electrodo. La reacción redox que tiene lugar en la solución se puede

expresar como: $O + ne^- \leftrightarrow R$, donde O y R son las formas oxidadas y reducidas de las especies redox, respectivamente. Cuando, la reversibilidad del proceso se debe a que la transferencia de electrones es más rápida que el resto de procesos que tienen lugar, como por ejemplo la difusión, la separación de los potenciales de pico deben de cumplir con la siguiente relación:

$$|E_{pa} - E_{pc}| = 2.218 \frac{RT}{nF} \quad (12)$$

Dónde: E_{pa} es el potencial de pico anódico, E_{pc} , potencial de pico catódico, R es la constante universal de los gases, T es temperatura absoluta en Kelvin, F es la constante de Faraday y n es el número de moles de electrones transferidos en la reacción

Para un proceso de transferencia de carga en las mismas condiciones reversibles, como en la ecuación (25) la densidad de corriente pico I_p se describe mediante la ecuación de Randles-Sevcik:

$$I_p = (2.69 \cdot 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad (13)$$

Donde n es el número de moles de electrones transferidos en la reacción, A es el área del electrodo, C es la concentración de analito (en moles/cm³), D es el coeficiente de difusión, y v es la velocidad de barrido del potencial aplicado.

Por otra parte, la voltamperometría puede proporcionar información del mecanismo y cinética, que incluye el reconocimiento de los intermedios en las reacciones redox orgánicos. El voltamograma cíclico típico de un proceso reversible se muestra en la Figura 21.

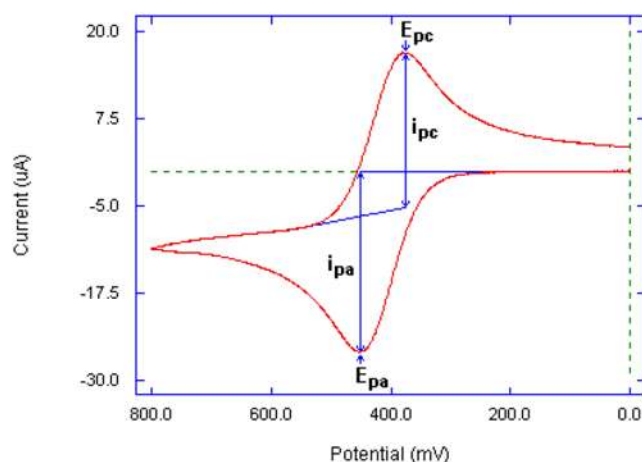


Figura 21: Voltamperograma cíclico reversible.

Como aprecia en la figura anterior durante el barrido positivo, el pico de potencial catódico y la corriente pico anódico se obtienen. Esta es la dirección de la exploración donde las especies electro-activos se reducen en la superficie electrodo. Como se invierte la exploración, se obtiene una corriente de pico anódico negativo y pico de potencial anódico. En esta dirección, especies reducidas se reoxidan en la superficie del electrodo.

La intensidad de la corriente de los picos es proporcional a la cantidad de especie electroactiva presente en la disolución de la celda electroquímica. Por lo tanto, la voltametría es una técnica que puede ser usada para realizar análisis cuantitativos y cualitativos. Ya que en función de la situación de los picos podremos distinguir entre distintas especies electroactivas y en función de la magnitud de dichos picos podremos determinar si hay una mayor o menor cantidad de dicha especie (Lojou y Bianco 2006, Gileadi y col. 1975, Faulkner 1980).

2.12 Técnicas de Caracterización

2.12.1 Difracción de rayos X

La aplicación de la difracción de rayos X a la investigación de la estructura de la materia, tuvo su origen en 1912, cuando los primeros materiales cristalinos fueron expuestos a este tipo de radiación, dando lugar a un diagrama de difracción característico de la muestra (llamado patrón de difracción). En la actualidad, a casi 100 años de ese descubrimiento, la difracción de rayos X es un método de análisis estructural que ha revolucionado el entendimiento de la química, la física, la mineralogía y la biología. La difracción de rayos X (Figura 27), está basada en la dispersión (scattering), que consiste en que el fotón incidente es desviado de su dirección original de propagación con igual (dispersión elástica) o menor (dispersión inelástica) energía, por y colisión con electrones. Cuando sobre un átomo incide un haz de rayos X, puede considerarse, desde un punto de vista geométrico, que éste se comporta como un radiador puntual que dispersa elásticamente (sin modificar su longitud de onda) la radiación en todas las direcciones del espacio [Albella y col., 2000]. Si ahora el haz de rayos X se incide sobre un cristal, es decir, sobre una agrupación de átomos periódicamente ordenados en el espacio, entre las ondas dispersadas por cada uno de ellos se producen fenómenos de interferencia que, normalmente, en la mayor parte de las direcciones, serán del tipo destructivo, cancelándose la resultante en mayor o menor proporción. Sin embargo, en determinadas direcciones, y debido precisamente a la ordenación periódica de los átomos, puede ocurrir que las ondas dispersadas estén en fase y se refuercen mutuamente. Este fenómeno de refuerzo recibe el nombre de difracción. Para comprender mejor esto supóngase que el haz de radiación que incide sobre un cristal determinado, está compuesto por un número muy grande de ondas denominado frente de ondas. Antes de impactar el cristal, todas las ondas están en fase entre sí, es decir, los máximos y mínimos de amplitud coinciden en la misma ubicación de la trayectoria del flujo.

Una vez que los rayos inciden sobre el cristal se puede producir interferencia constructiva o destructiva. Las condiciones necesarias para que se produzca difracción vienen determinadas por la ley de Bragg. Como en las sustancias cristalinas se pueden considerar distintas familias de planos paralelos y equidistantes entre sí. Consideremos una de estas familias con índices de Miller (hkl) y espaciado d_{hkl} (Figura 22).

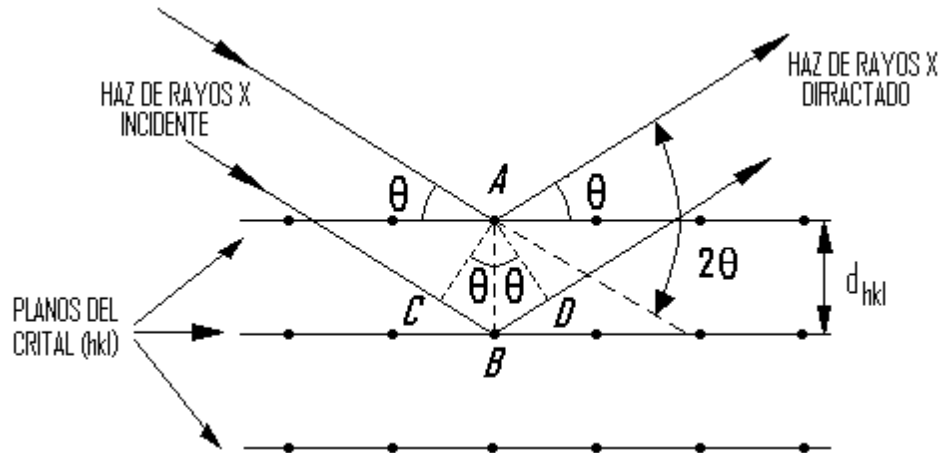


Figura 22: Difracción de los Rayos X por los planos de un cristal.

Si sobre estos planos incide un haz de rayos X monocromático, con longitud de onda λ (de algunos Angstroms), en una dirección que forma un ángulo θ con la superficie de los planos, solo se producirá refuerzo cuando el ángulo de incidencia, la longitud de onda de la radiación, el espaciado de la familia de planos cumplan la siguiente relación, llamada ley de Bragg:

$$n\lambda = d_{hkl} \sin\theta$$

Dónde:

n .- es un número entero (lo que indica que solo para números enteros de longitudes de onda ocurre la difracción).

λ .- la longitud de onda de los rayos X.

d_{hkl} .- la distancia entre los planos de la red cristalina.

θ .- el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.

Dicho de manera sencilla, la interferencia entre las dos ondas que se muestran en la Figura 22, es constructiva cuando la diferencia de trayectoria entre las dos ondas (que llamaremos Δt , la cual es la suma de las distancias CB y BD), es igual a un número entero (n) de longitudes de onda. Entonces si se analizan los triángulos formados ACB Y ABD obtenemos que $\Delta t = CB + BD = 2d \sin \theta$, lo que deduce la ley de Bragg.

La dirección en la que sale el haz difractado forma también un ángulo con la superficie de la familia de planos que difractan, es decir, un ángulo con la dirección de incidencia del haz de rayos X. Además, la dirección del haz incidente y la dirección del haz difractado están contenidas en un plano que es perpendicular a la familia de planos, que difractan. Como en un cristal hay distintas familias de planos, con distintos espaciados, existirán también distintas direcciones de difracción. Al ser el conjunto de espaciados de un cristal característico para cada especie cristalina, entonces si no hay dos sustancias cristalinas que tengan todos sus espaciados iguales, podemos decir, que no existen dos sustancias cristalinas que tengan un diagrama de difracción idéntico. Se dice que el diagrama de difracción es la huella dactilar de las sustancias cristalinas.



Figura 23: Principales componentes de un Difractómetro de Rayos X.

2.12.2 Microscopia electrónica de barrido

La microscopia electrónica de barrido (MEB) es una técnica de análisis que se emplea para obtener información superficial de las muestras, mediante el empleo de electrones (Allen y col., 1993). El microscopio electrónico de barrido es hoy en día una herramienta esencial para la investigación ya que se utiliza para varios propósitos como por ejemplo: para el estudio de la morfología y topografía de elementos, un análisis químico de la muestra a analizar, etc. Este instrumento utiliza voltajes cercanos a los 20,000 voltios, las lentes magnéticas utilizan un haz muy fino de electrones para penetrar repetidamente la muestra y se produce una imagen ampliada de la superficie observada en la pantalla del monitor.

Este tipo de microscopio se caracteriza por producir imágenes tridimensionales, y se puede tener una ampliación de 100,000 veces o más. Otra característica es en que la imagen no es obtenida una sola vez, sino que un estrecho haz de electrones va barriendo la muestra en sentido longitudinal. En el microscopio electrónico de barrido, dos partes son fundamentales, la columna y la cámara para colocar las muestras, el emisor de electrones es un filamento que se calienta de acuerdo a las necesidades de la muestra, el cual emite un haz de electrones que viajan a través de la columna en un ambiente de alto vacío, hasta incidir con la superficie de la muestra, ocasionando una interacción entre dichos electrones y los átomos de la muestra, generando varios tipos de señales tales como: electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos x característicos, electrones Auger, luz visible, etc. Todas estas señales eléctricas se producen simultáneamente pero cada una de ellas es captada por diferentes detectores (Figura 24).



Figura 24: Microscopio Electrónico de Barrido.

2.12.3 Espectroscopia de Infrarrojo

Una de las técnicas de caracterización estructural más empleadas en el estudio de materiales, es la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), debido a que proporciona información del tipo de enlaces químicos involucrados en la estructura del material, esta información la proporciona por medio de bandas de absorción debido a los diferentes modos vibracionales de los grupos funcionales, facilitando así la identificación de estos mismos. La región infrarroja del espectro incluye radiación comprendida entre los números de onda 12800 y 10 cm^{-1} aproximadamente, lo que corresponde a longitudes de onda de 0.78 a $1000\text{ }\mu\text{m}$. Desde el punto de vista de las aplicaciones, así como de los instrumentos, la región infrarroja se divide en: infrarrojo cercano, medio y lejano, de las cuales la más usada en la caracterización de materiales es la región del infrarrojo medio comprendida entre los 4000 y 670 cm^{-1} . La espectroscopia de IR mide los cambios vibracionales que experimentan las moléculas al absorber la energía electromagnética, estos cambios o movimientos pueden clasificarse en modos de estiramiento, donde la longitud del enlace cambia de una manera

periódica durante la vibración; o modos de doblamiento, donde el ángulo entre los enlaces cambia de forma periódica durante las vibraciones.

Como se observa en la Figura 25, los modos de estiramiento se dividen a su vez en simétricos y asimétricos, por otra parte los modos de doblamiento se dividen en:

- Mecimiento: que ocurre cuando la unidad estructural se balancea en el plano de simetría de la molécula.
- Tijereteo: que es cuando los dos átomos unidos a un átomo central se alejan y se acercan uno respecto de otro, deformando el ángulo de valencia.
- Alabeo: se presenta cuando la unidad estructural se balancea en el plano perpendicular al de simetría de la molécula.
- Torsión: manifestándose cuando la unidad estructural gira en vaivén alrededor del enlace que la une con el resto de la molécula.
- Acoplamiento vibracional: Además de las vibraciones mencionadas, se puede dar el caso de una interacción entre ellas, si los enlaces vibrantes están unidos a un átomo central.

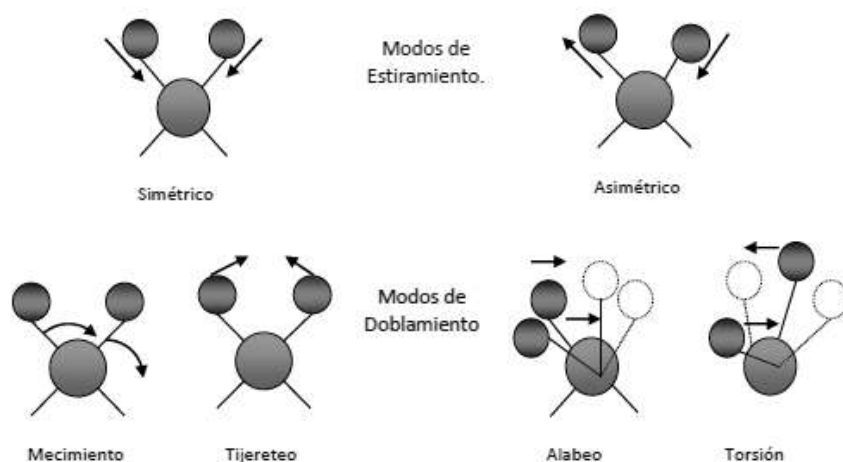


Figura 25: Modos vibracionales por absorción infrarroja.

Los espectros vibracionales se deben a la elasticidad del enlace covalente entre dos átomos, cuya rigidez está determinada a través de la constante característica (k) para cada enlace. Para la obtención de los espectros infrarrojos, se utilizan espectrómetros con interferómetros y transformada de Fourier (IR-FT). La radiación de infrarrojo es analizada por medio de un interferómetro de Michelson (Figura 26), que consiste en un montaje óptico en el que se produce el fenómeno de interferencia de ondas electromagnéticas.

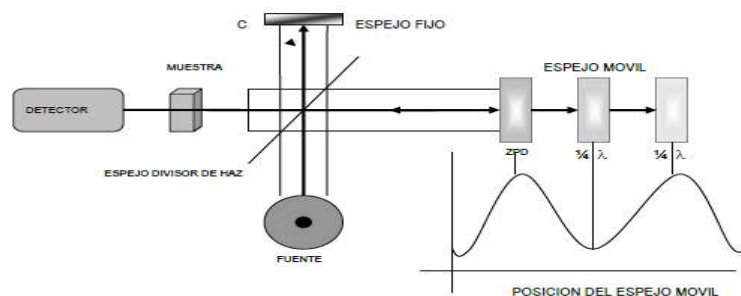


Figura 26: Interferómetro de Michelson.

En la operación del espectrómetro IR-FT, la radiación policromática de la fuente de infrarrojo (la cual consta de un filamento de Nernst) es y colimada por un espejo y el haz resultante se divide en el espejo divisor; la mitad del haz pasa al espejo fijo y la otra mitad se refleja en el espejo móvil. Después de reflejarse los dos haces se recombinan nuevamente en el divisor del haz. Cuando el espejo móvil está posicionado de tal manera que los dos caminos ópticos son iguales, simultáneamente todas las longitudes de onda de la luz proporcionan una interferencia constructiva. Si el espejo móvil se encuentra en alguna otra posición, una longitud de onda dada puede interferir constructiva o destructivamente, dependiendo si los haces de los dos caminos ópticos están o no en fase.

2.12.4 Espectroscopia RAMAN

La aplicación de la espectroscopia RAMAN para el análisis químico en el “mundo real” fue impedido por varios problemas fundamentales y técnicos como los picos de intensidad, la interferencia de la fluorescencia y la ineficiencia de la y colección y detección de luz. Los prospectos para los análisis químicos de rutina tomaron mayor importancia para el año de 1986 con la introducción del método de transformación de Fourier-RAMAN, servicios de carga, computadoras pequeñas y los láseres de infrarrojo cercano. Con la introducción de todo esto, vinieron a quitar los impedimentos anteriores y a hacer que la espectroscopia RAMAN renaciera en el contexto del análisis químico.

Un espectro RAMAN consiste en la dispersión de la intensidad detectada contra la energía (Figura 27). Cada pico consiste en un cambio dado RAMAN por la energía de la luz incidente ν_0 . Si sucede que la molécula se encuentre en un estado vibracional excitado cuando un fotón incidente es dispersado, el fotón gana energía cuando es dispersado, que conduce a la dispersión RAMAN antimovimientos. Los picos RAMAN de movimiento y los antimovimiento son posicionados simétricamente a los picos Raleigh, pero sus intensidades son muy diferentes, excepto por las vibraciones de energía bajas. En 1986 la evolución de la instrumentación RAMAN fue evolucionando. Al ir obteniendo mayores

resultados, fue la necesidad de integrar a los espectrómetros RAMAN láseres, espectrómetros, accesorios para las muestras y software que complementara el sistema. Estos nuevos instrumentos no fueron más capaces que los sistemas previos, pero eran más fáciles de utilizar.

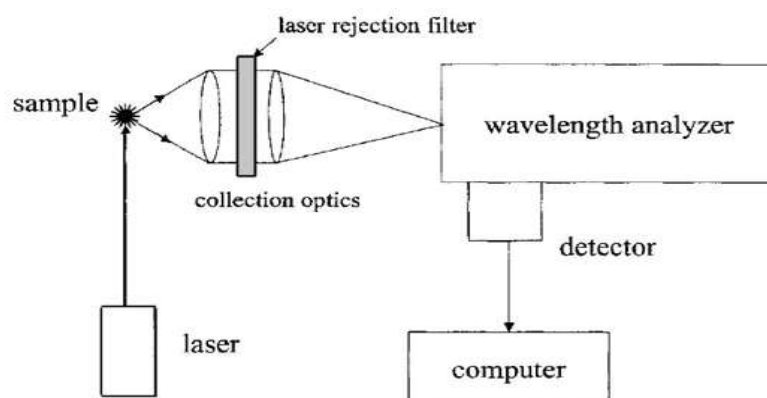


Figura 27: Espectrómetro Raman.

En adición a la reducción de la fluorescencia, el análisis RAMAN también provee precisión en la frecuencia y muchos otros beneficios. Antes de 1986 los espectrómetros RAMAN utilizaban láseres de Argón o Kriptón, que requería una energía eléctrica de 208 a 480 V y un sistema de enfriamiento. Como los costos de mantenimiento eran muy altos y como los láseres utilizados eran muy imprácticos para análisis de rutina, se implementó el uso de láseres de diodo de Nd: YAG (Itrio-Aluminio-G), ya que son más pequeños, tienen sistema de aire enfriador, necesitan un consumo eléctrico de 110 V y su costo de mantenimiento es mucho más bajo. Ejemplos comunes son: Nd: YAG (1064 nm), Doble Nd:YAG (532 nm) y laser de diodo Al:GaAs (750 a 900 nm). No solo estos láseres son utilizados para los análisis de rutina en instrumentos analíticos, también operan en infrarrojo cercano donde la fluorescencia es menos prominente (Richard 2000).

Capítulo III. METODOLOGÍA

3.1 *Materiales y Reactivo*

- ✓ Nanotubos de carbón. Fueron sintetizados en un reactor automatizado por deposición química de vapor (CVD por sus siglas en inglés) con flujo de gases controlado. Proporcionados por el Laboratorio de Materiales Nanoestructurados CINVESTAV-IPN, Querétaro. Responsables: Dr. Juan Francisco Pérez Robles, M.C. Luz Ma. Reyna Avilés Arellano.
- ✓ Isopropoxido de titanio Sigma-Aldrich
- ✓ Electrodo de grafito
- ✓ Enzima lacasa de *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (5 U/mg) Sigma-Aldrich.
- ✓ Nafion 117 Sigma-Aldrich.
- ✓ Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado JT Baker.
- ✓ Ácido nítrico (HNO_3) al 70% JT Baker.
- ✓ Solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M pH 6.8).
- ✓ Glutaraldehído 0.5% Sigma.
- ✓ Cloruro de Potasio 1M (KCl).
- ✓ Ferrocianuro de Potasio 0.1M ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$).
- ✓ Ferrocianato de Potasio 0.1M ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$).
- ✓ 1,2-Dihidroxibenceno (Catecol) ReagentPlus®, $\geq 99\%$ Sigma.

Todos los reactivos fueron de grado reactivo.

3.2 Síntesis de óxido de titanio por sol-gel

La síntesis de la fase anatasa del óxido de titanio se llevó a cabo mediante el método propuesto por Kochana y col. 2008, con algunas modificaciones. A 200 μL de isopropóxido de titanio se le adicionaron 2 mL de 2-isopropanol acidificado con 80 μL de HCl y 160 μL de ácido acético bajo agitación constante. A la solución del precursor se le adicionaron lentamente 2.4 mL de agua desionizada fría, agitando vigorosamente durante 1h. Posteriormente la solución se dejó envejecer durante 15 días antes de ser usado.

3.3. Oxidación de los nanotubos de carbono (NTC)

Los NTC fueron oxidados con una mezcla de ácidos (H_2SO_4 y HNO_3) en proporción 3:1 (v/v), los cuales fueron sonicados en baño durante 3 h, posteriormente se filtraron lavándolos con agua desionizada para la remoción de impurezas y los residuos de ácidos. Una vez limpios se secaron en horno a 80°C durante 48 h.

3.4 Preparación de los biosensores

3.4.1 Pretratamiento del electrodo de grafito

Antes de llevar a cabo la modificación de la superficie electródica, se aplicó un pretratamiento de limpieza para eliminar impurezas y obtener una superficie limpia y reproducible. Para lo cual, se pulió el electrodo con papel de lija no. 1500, posteriormente con alúmina hasta acabado espejo, seguidamente se lava con agua destilada, se introduce en baño ultrasónica durante 10 min en una solución de ácido clorhídrico, etanol y agua alternativamente. Por último se deja secar la superficie al ambiente.

3.4.2 Electrodo Composito con nanopartículas de Titania

- Electrodo NAF/LAC: Se mezclaron las cantidades apropiadas de Nafion-Lacasa, de la cual se tomó una alícuota depositándola en la superficie del electrodo de grafito, dejando secar al aire durante 24 hr.
- Electrodo TiO_2 /LAC: se tomó una alícuota de la suspensión del sol de titania, mezclándola con lacasa, para depositarla sobre la superficie cubierta con titania, dejando secar al aire.
- Electrodo TiO_2 /NAF/LAC. De la suspensión del sol de titania se tomó una alícuota mezclándola con Nafion, una vez realizada la mezcla se tomó una alícuota de una suspensión de lacasa, se mezcló con la suspensión de TiO_2 /NAF anterior, se agito durante 1 min en ultrasónico, finalmente se tomó una alícuota de la suspensión final y se depositó sobre la superficie del transductor.

3.4.3 Electrodo Composito con nanotubos de carbono

- Electrodo NTC/GA: Los NTC se dispersaron en la solución de glutaraldehído (al 25% v/v), posteriormente la mezcla fue sonicada durante 60 min. Del composito obtenido se tomó una alícuota la cual fue depositada en la superficie del transductor de grafito, dejó secar aire durante 48 hr.
- Electrodo GA/LAC: Se realizó un composito de GA (al 25% v/v), el cual se mezcló con la cantidad adecuada de lacasa (20 mg/ml), del cual se tomó una alícuota la cual fue depositada en la superficie del electrodo, de igual manera dejó secar al aire durante 48 hr.

- Electrodo de NTC/LAC/GA: Del composito realizado de NTC/GA, se mezcló la cantidad adecuada con enzima lacasa (20 mg/ml), para formar el composito NTC/LAC/GA, el cual fue sonificado durante 5 min, posteriormente una cantidad adecuada fue depositada en la superficie del transductor, dejando secar durante 48 horas.

3.5 Métodos de Caracterización

3.5.1 Difracción de Rayos-X (DRX)

Se realizó difracción DRX para determinar la presencia de las fases cristalinas del TiO_2 , y los NTC, para lo cual, se utilizó un difractómetro de rayos X marca RIGAKU modelo DMAX/1200, el cual trabaja con línea de cobre Cu-K_α con longitud de onda $\lambda=1.5406$ ángstroms, para realizar los análisis.

3.5.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La morfología del sol-gel de TiO_2 sintetizado y los NTC fueron examinados utilizando microscopia electrónica de barrido (MEB). El equipo que se utilizó para realizar estas caracterizaciones fue un Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL JSM -7600F. Para lo anterior, se tomaron muestras de los diferentes minerales y se colocaron en un porta muestras para posteriormente ser bañadas con cobre y de esta manera poder hacer las observaciones sin dificultad. A las mismas muestras se les realizó un microanálisis elemental mediante una sonda acoplada al microscopio.

3.5.3 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)

Esta técnica fue utilizada para la caracterización de las micropartículas de líquidos del TiO₂, Nafion y Lacasa. Para realizar los espectros FTIR de las micropartículas de líquidos se utilizó un espectrofotómetro marca Bruker IR Tensor 27 en el cual las muestras se corrieron en un rango de número de onda de 400 a 4000 cm⁻¹, con 23 ciclos de barrido y 4 cm⁻¹ de resolución.

3.5.4 Espectroscopia RAMAN

Para el análisis de las muestras mediante espectroscopia Raman se realizaron mediante un sistema de Alta Resolución Marca Horiba, Modelo Lab Ram HR Evolution, usando una Línea de Excitación 632.8nm (laser de He Ne 5mW), Objetivo de 50X donde el Spot es de 2 micras.

3.6 Técnicas electroquímicas

3.6.1 Pruebas de Impedancia (EIS)

Para la obtención de los espectros de impedancia se sumergieron los electrodos de trabajo, el de referencia y el auxiliar en una célula que contiene una mezcla de K₄Fe (CN)₆/K₃Fe (CN)₆ 0.1 M, de cada uno de ellos en medio cloruro potásico 1 M, para simular una prueba redox. El Rango de escaneado de frecuencia fue de 0,01 Hz a 100 kHz y la amplitud fue 5 mV.

3.6.2 Medidas de Voltametría Cíclica (VC)

3.6.2.1. Solución de ferrocianuro de potasio

Los experimentos se llevaron a cabo en una celda electroquímica que contenía 40mL de 0.1M $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ y 1 M KCl. Se realizaron 3 ciclos, con un barrido de potencial de -0,5 V a +0,7 V, con una velocidad de barrido de potencial de 100 mV/s.

3.6.2.2. Estudio de concentraciones

Para la medida de las concentraciones se preparó, una disolución de compuesto fenólico (Catecol y ácido gálico) 10^{-3} M empleando como disolvente disolución buffer de fosfato (SBP) 0,1M pH=6.68. Esta disolución será la disolución madre de la cual se adicionan a la celda electroquímica cantidades crecientes.

Para llevar a cabo las pruebas se realizó una primer voltametría cíclica con 40 ml de SBP en la celda que constituyeron el ensayo en blanco. Se realizaron 3 ciclos y se hace un barrido desde -0,5 V hasta +0,7 V, con una velocidad de barrido de potencial de 100 mV/s. posteriormente se añadieron 30 μ L de la disolución a la celda electroquímica, bajo las mismas condiciones que se llevó a cabo el ensayo en blanco.

3.7 Determinación de compuestos fenólicos mediante Reactivo Folin-Ciocalteu

Se basa en la interacción de los polifenoles con el reactivo Folin activado con el carbonato de sodio. La reacción entre el reactivo Folin y los polifenoles se realiza en medio básico. Como resultado da un rango de colores; da una coloración azul, cuyo máximo de absorción es a una longitud de onda de 765 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de polifenoles.

3.7.1 Preparación de la curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se preparó una solución stock de 0.1 mg/mL de catecol, de la cual se realizaron diluciones de 0 a 200 μL , en intervalos de 20 μL completando el volumen de cada uno a 2000 μL , posteriormente a cada disolución se le adiciono Na_2CO_3 al 20% y reactivo de Folin 1N. En la Tabla 2 se muestran los valores de las diluciones preparadas.

Tabla 2: Relación de volumen añadido.

Concentración Catecol ($\mu\text{g/mL}$)	Solución stock (μL)	Reactivo Folin (μL)	Na_2CO_3 al 20 % (μL)	Agua destilada (μL)
0	0	125	1250	625
0.025	5	125	1250	605
0.05	10	125	1250	585
0.075	15	125	1250	565
0.1	20	125	1250	545
0.125	25	125	1250	525
0.15	30	125	1250	505
0.2	40	125	1250	485
0.3	60	125	1250	465
0.4	80	125	1250	445
0.5	100	125	1250	425

Para la medición de las muestras (té y café comercial), se hizo una dilución de la muestra original 1:10 en agua destilada. De la cual se tomó una alícuota de 122 μL de extracto, se diluyo con 500 μL de agua, se le adicionaron 125 μL del reactivo de folin-ciocalteu, se mezclaron manualmente por 5 min y se le adicionaron 1250 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3 al 20 %). se incubaron por 2 h a temperatura ambiente protegiéndose de la luz y se leyó a 760nm en espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como mg equivalente de ácido gálico/gramo de muestra (mgEAG/g).

Con base en los datos de concentración contra absorbancia se generó la curva de calibración la cual se muestra en la Figura 28. En esta figura, se observa

que la interpolación de los correspondientes puntos genera una línea recta, lo que indica que el seguimiento de la reacción se puede realizar correctamente utilizando esta correlación de concentración con la variable absorbancia.

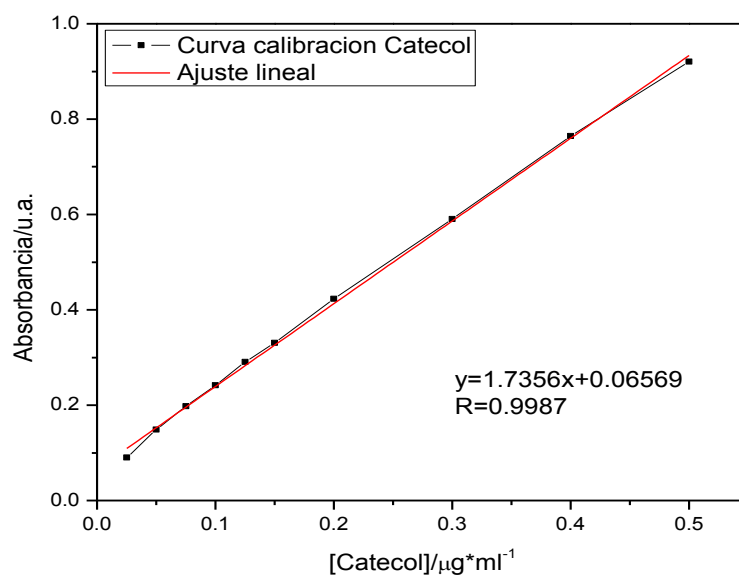


Figura 28: Curva de calibración para concentración de catecol ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

Capítulo IV. RESULTADOS

4.1 Difracción de Rayos X

4.1.1. Grafito

El difractograma del grafito se muestra en la Figura 29, en el cual se observan los picos característicos en el ángulo 2θ a 26.5° , 42.3° , 44.5° , 50.70° , 54.66° , 59.89° , 77.49° , 83.61° y 100.128° , los cuales coinciden con el patrón de difracción 00-056-0159 correspondiente al grafito.

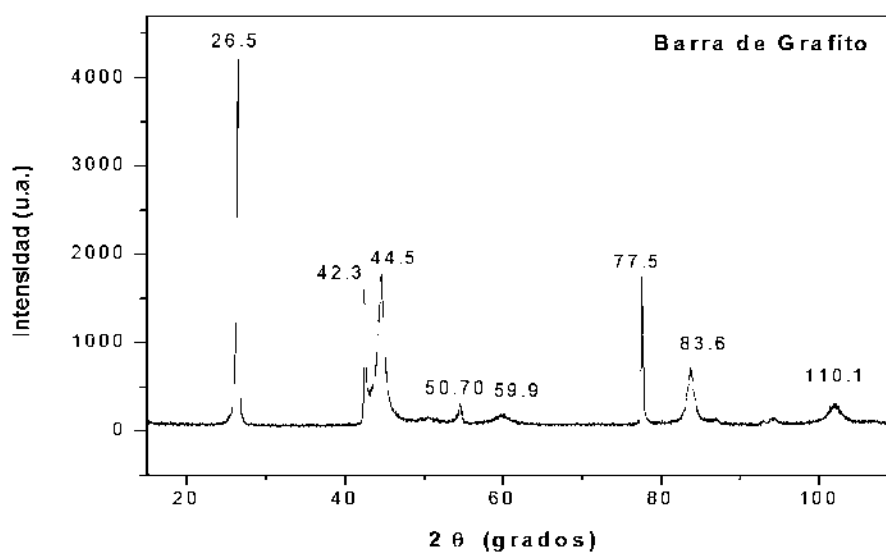


Figura 29: Espectro de difracción de Rayos X del grafito.

4.1.2 Polvo de óxido de titanio

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 30), los picos fueron observados a 2θ : 25.4, 37.8, 46.8, 53.6°, los cuales son los picos característicos de la fase anatasa del 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 2θ identificados como: 27, 32, 54, 57° (Kontos y col. 2005; Moradi y col. 2012; Llano y col. 2007; Uekawa y col. 2012).

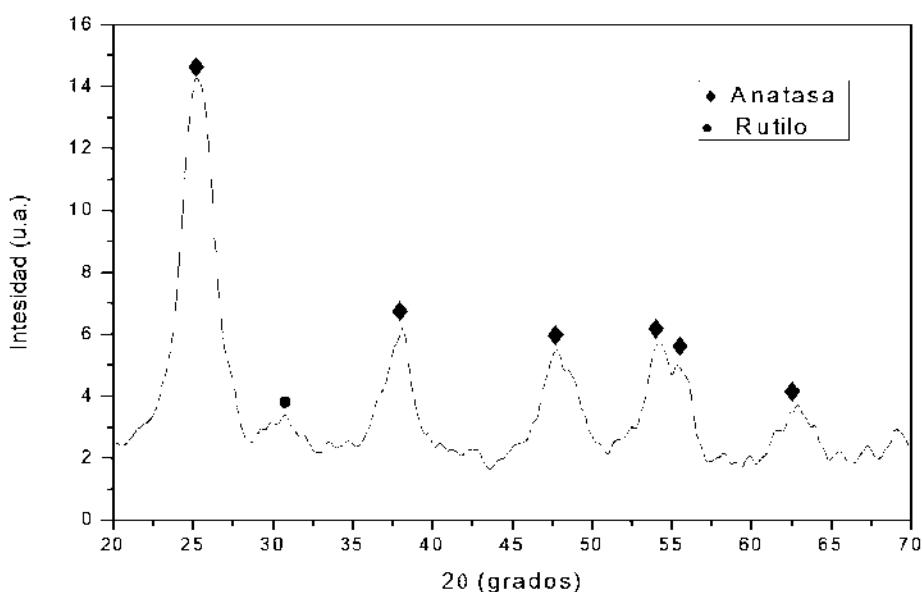


Figura 30: Espectro de difracción de Rayos X, del polvo de TiO_2 , en el cual se muestran los picos de anatasa, obtenida por el método sol-gel.

4.2 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

En la Figura 31a y 31b, se muestran las micrografías del óxido de titanio sintetizado por el método sol-gel, en la cual se aprecian partículas de diferentes tamaños las cuales van desde las 1 micras hasta 100 nanómetros, formando aglomeraciones de tamaños irregulares. Por otra parte, en la Figura 31c, se observa la enzima inmovilizada en las partículas de titania, esta se aprecia debido a la luminiscencia de la enzima lacasa.

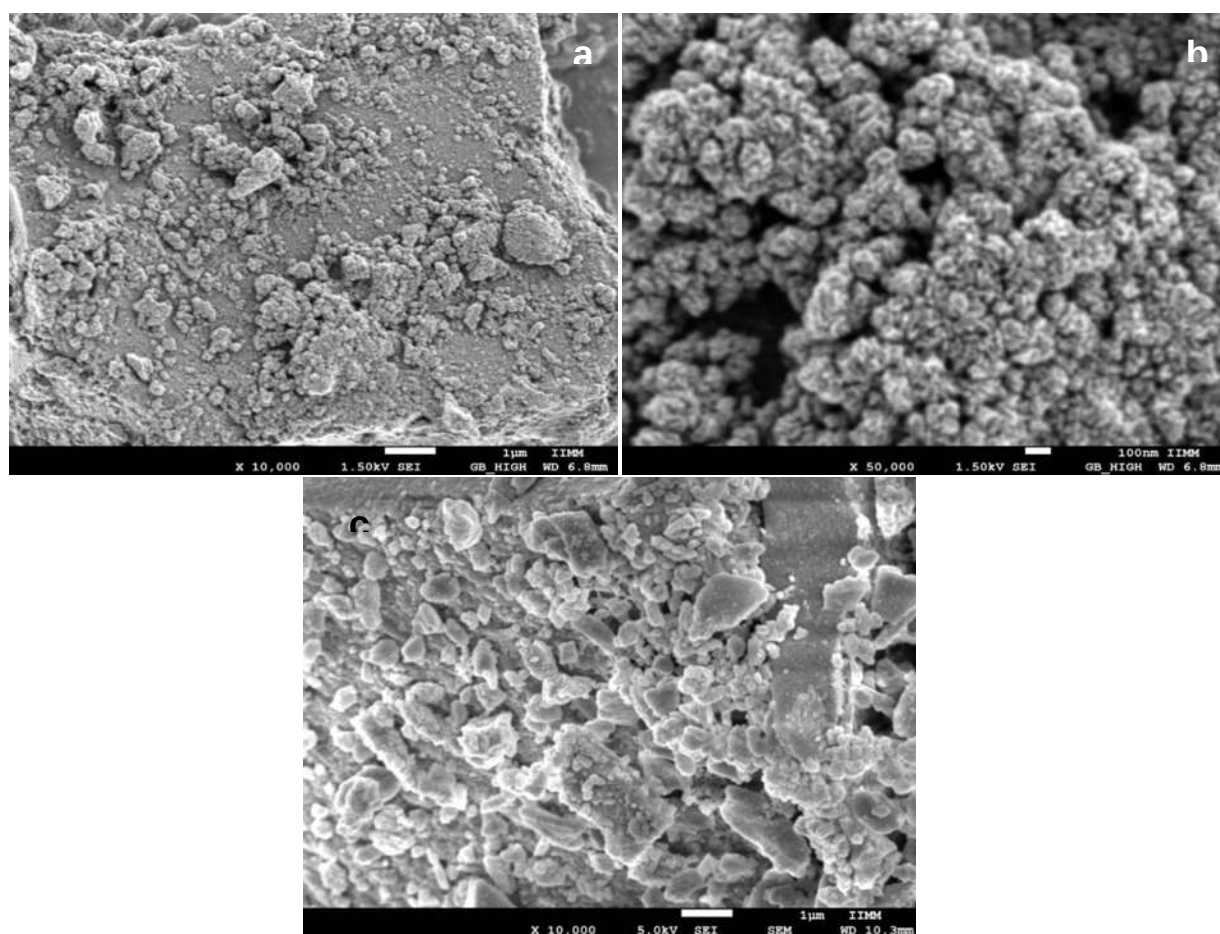


Figura 31: Micrografías de: TiO_2 , a) 10000x, b) 40000x, y c) biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$ 10,000x.

4.3 Tamaño de Partícula

La Figura 32 muestra la distribución del tamaño de partícula del óxido de titanio, en la cual se puede observar una distribución muy uniforme, presentando un estrecho rango el cual está concentrado en el rango de 0.012 a 0.096 μm (aproximadamente 12 a 96 nm), y el tamaño promedio se ubica en 0.066 μm (66nm). Por otra parte, el valor de área superficial obtenido por el método BET fue de 441.07m²/g, el cual es significativamente más alto comparado con lo reportado por Watson y col 2004, Kontos y col 2005; y Choi y col 2006. El resultado obtenido implica que las partículas tienen un buen potencial para su aplicación en la fabricación de películas compuestas de TiO₂, con baja resistencia y una gran retención orgánica.

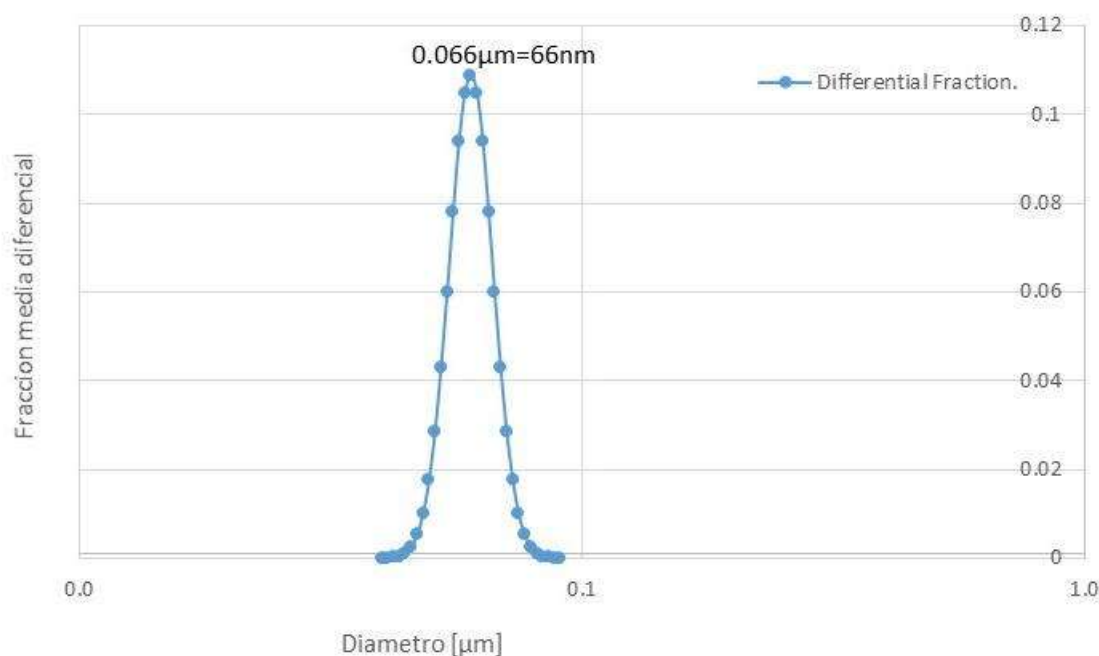


Figura 32: Distribución del tamaño de partícula del TiO_2 .

4.4 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

4.4.1 Dióxido de titanio

En la Figura 33 se muestra el espectro de infrarrojo para el óxido de titanio sintetizado, observándose las bandas alrededor de 650 y 783 cm^{-1} , las cuales son características del modo de vibración del grupo funcional Ti-O-Ti (Chen y col., 2007; Ochoa y col., 2009), en la banda alrededor de 933 cm^{-1} es característico de la formación de la red O-Ti-O [Porkodi and Arokiamary 2007]. El pico en la banda de alrededor de 1273 cm^{-1} es característico de la formación de la red de Ti-O-Ti (Watson y col., 2004). La banda de 1463 cm^{-1} puede ser asociada a tensiones C-H lo cual indica la presencia de grupos orgánicos residuales asociados con el ácido acético utilizado durante la síntesis (Hernández y col., 2011). El pico a 1643 cm^{-1} se debe a la flexión de las moléculas de agua absorbida (Hernández y col., 2008;

Zubieta y col., 2012), por último, la banda alrededor 3433 cm^{-1} es atribuida a la tensión vibracional de los grupos $-\text{OH}$ del agua (Chen y col., 2007; Attar y col., 2008; Hernández y col., 2008; Zubieta y col., 2012).

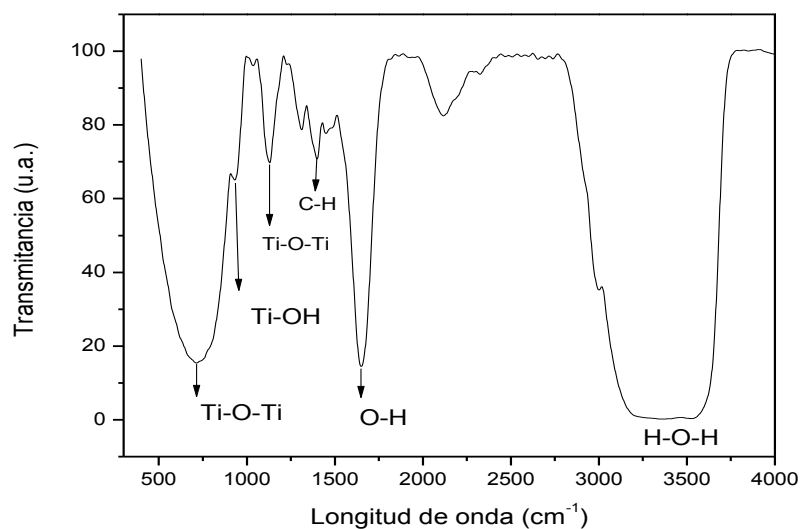


Figura 33: Espectro de infrarrojo del sol-gel de TiO_2 .

4.4.2 Nafion

En la Figura 34 se presenta el espectro de Nafion, los enlaces de la cadena principal del politetrafluoroetileno de naturaleza hidrofóbica producen dos bandas de absorción fuertes en 1214 cm^{-1} y 1155 cm^{-1} ; estas bandas son asignadas a estiramientos asimétricos y simétricos del enlace C-F, el resto de los picos del enlace C-F pertenecen a las cadenas laterales unidas por enlaces éter aparecen en forma de un pico muy débil a 707 cm^{-1} . (DonJie et al. 2009). Los picos dobletes en 829 y 983 cm^{-1} , y el pico a 1053 cm^{-1} son característicos de la cadena lateral en el Nafion, y se asignan a las vibraciones simétricas de enlaces C-O-C y S-O y a la vibración de estiramiento de los grupos $-\text{SO}_3^-$, respectivamente. Por otra parte se observan dos bandas características de la presencia de moléculas de agua localizadas en 3396 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} (Beltrán et al 2012; Luo et al 2008).

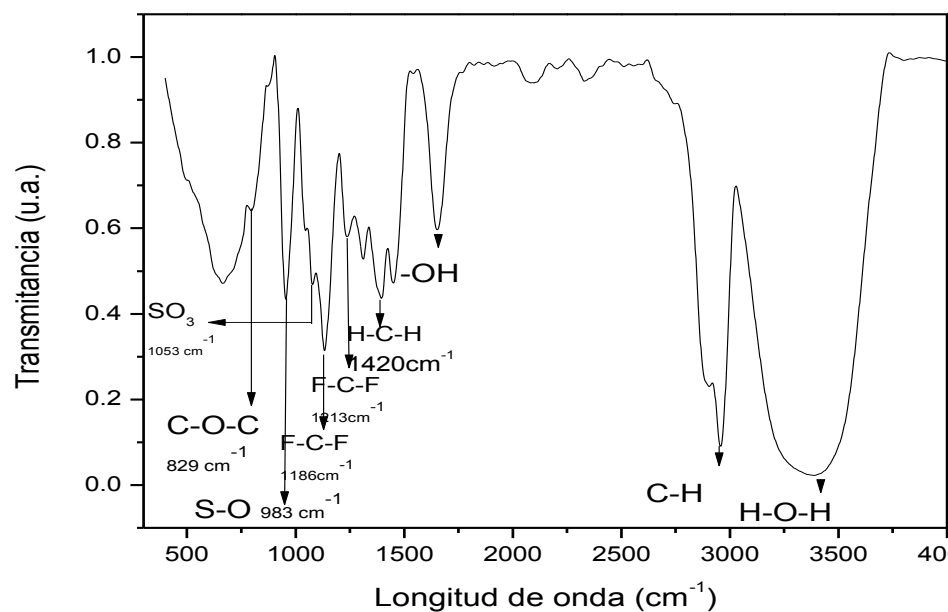


Figura 34: Espectro Infrarrojo Nafion

4.4.3 Lacasa

El espectro FTIR de lacasa (Figura 35) muestra las cinco bandas principales: la banda centrada a 3300 cm^{-1} asociada a las vibraciones OH del agua, la banda alrededor de 2800 cm^{-1} se atribuye a los enlaces C-H, la banda correspondiente al enlace peptídico N-H a 1630 cm^{-1} , la banda de las vibraciones de estiramiento de aminas C-N se localiza en 1350 cm^{-1} , y una fuerte banda a 1100 cm^{-1} debido a C-O-C (Tavares y col., 2015; Wang y col., 2012).

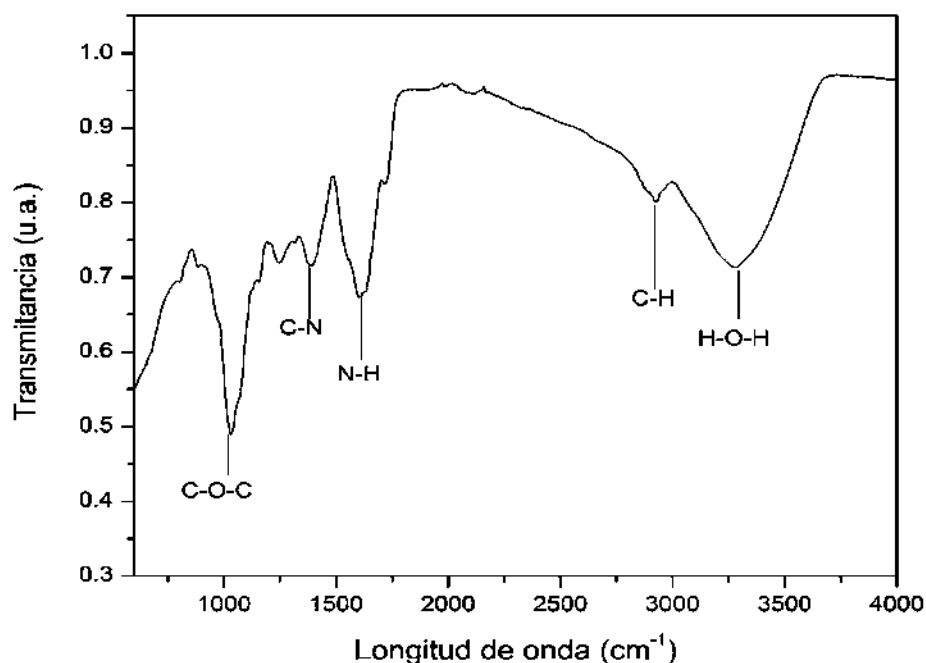


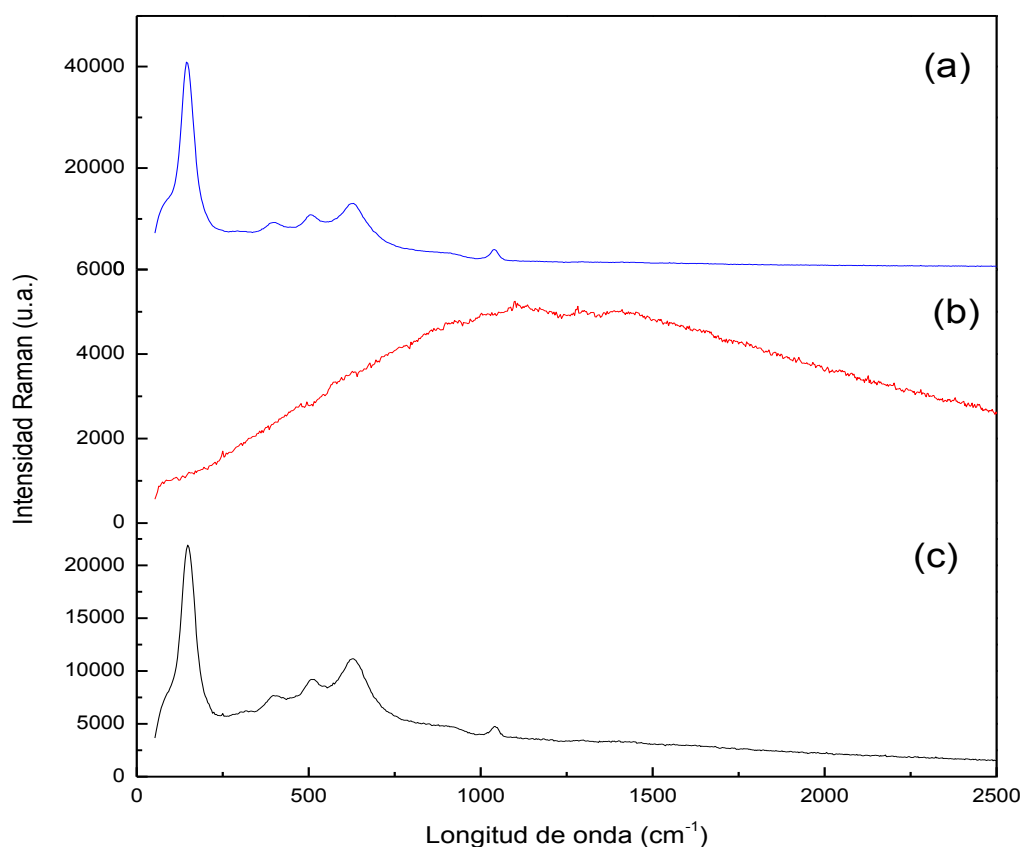
Figura 35: Espectro de Infrarrojo de lacasa.

4.4.4 Biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$

El análisis FTIR del biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$, se presenta en la Figura 36 en el cual están presentes los enlaces de las bandas principales de Ti-O-Ti, Ti-OH, CF, SO, como se ha mencionado en los apartados anteriores, con los resultados obtenidos comprobamos que el material compuesto, no afecta a los grupos químicos de la enzima, lo que demuestra que la buena biocompatibilidad de TiO_2 , con está.

4.5 Espectroscopia de RAMAN

Los espectros Raman de las nanopartículas de TiO_2 se muestran en las Figura 37, en donde las bandas colocadas a 145, 398, 517 y 639 cm^{-1} , son características de la fase anatasa del TiO_2 (Figura 37a), en la Figura 37b, se muestra el espectro Raman de la enzima lacasa en donde no hay bandas presentes, debido a la luminiscencia propia la enzima, la Figura 37c, pertenece al biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$, en el cual solo se aprecian las bandas asociadas a la



Titania, sin la formación de nuevos enlaces.

Figura 37: Espectros Raman de: (a) TiO_2 , (b) Lacasa y (c) biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$.

4.6 Medidas de impedancia electroquímica (EIS)

La microscopia de impedancia electroquímica es una poderosa herramienta para el estudio de las propiedades de interfaz de la superficie de los electrodos modificados. Las mediciones de impedancia de los diferentes biosensores, así como del transductor de grafito (EG, NAF/LAC, TiO_2/LAC , y $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$), se llevaron a cabo en un potencial de circuito abierto, con una solución buffer de fosfatos (pH 6,68) que contenía 5mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en un rango de frecuencia de 1×10^{-2} a 1×10^6 Hz.

La respuesta de impedancia se representa como diagramas de Nyquist, que consisten en dos partes: una parte es la sección de semicírculo, que se encuentra a frecuencias altas correspondiente al proceso limitado por transferencia de electrones (R_{ct}) y a la capacidad de la doble capa (C_{dl}) del electrodo modificado. La otra parte del diagrama de Nyquist pertenece a la sección lineal, la cual reúne la información relacionada al proceso de transferencia electrónica limitado por la difusión (R_s y W_s) dada en la solución situado a bajas frecuencias. Esta segunda sección se utiliza para analizar la respuesta detallada electroquímica de los electrodos modificados mediante el uso de componentes de Nyquist individuales o mezclados (Mayorga-Martínez y col., 2013).

4.6.1 Biosensores recubiertos con TiO_2

En la Figura 43 se representan las respuestas obtenidas por EIS en gráficos de Nyquist para el electrodo de grafito sin modificar, así como para los biosensores $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$, NAF/LAC y TiO_2/LAC .

El electrodo de grafito exhibe casi una línea recta en los espectros de Nyquist (Figura 38 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 NAF/LAC (Figura 38 curva b), lo cual nos indica

una resistencia de transferencia de carga (143.40 Ohm), este incremento es atribuido a las propiedades no conductoras de la enzima lacasa, (Kumar y col., 2008; Alarcón y col., 2010; Mayorga-Martínez y col., 2012). La disminución del diámetro del semicírculo disminuye con el compuesto TiO_2/LAC obteniendo una baja resistencia a la transferencia de electrones (16.03 Ohm) en la interface del electrodo (Figura 38 Curva c). Este incremento en la transferencia de electrones sobre la superficie del electrodo es originado por la monocapa de 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 38 curva d) está relacionado con la disminución del semicírculo, aumentado la transferencia de electrones (9.44 Ohm), debido a la rápida difusión/migración de la película TiO_2/NAF , en comparación con la película de NAF/LAC . Por otra parte, podemos observar que la adsorción de la Lacasa sobre el compuesto TiO_2/NAF , se relaciona con la disminución en el semicírculo, que es indicativo que la Lacasa ha sido inmovilizada sobre la matriz de titania.

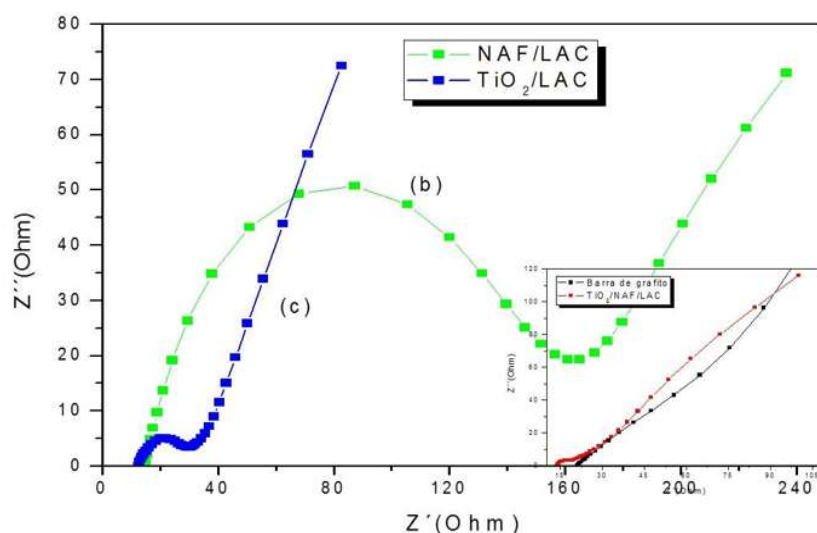


Figura 38: Diagrama de Nyquist para las medidas de Impedancia.

En los procedimientos experimentales, a partir de las gráficas de Nyquist se puede calcular la resistencia a la transferencia de carga y la capacidad de la doble capa con la ayuda de los circuitos equivalentes. Con respecto al EG y EG-TiO₂/PVA como son procesos de una sola constante de tiempo pueden ser modelados mediante un circuito eléctrico equivalente que consiste en la resistencia de la celda (R_s) en serie con un paralelo R_{ct} CPE (Figura 39a), donde: R_{ct} representa la resistencia a la transferencia de carga, y el CPE supone que es una capacitancia no ideal. Utilizando esta aproximación los valores obtenidos para $R_{ct} = 41 \text{ K}\Omega$ y para $CPE=20.08 \text{ mF}$, estos valores son semejantes a los obtenidos por diferentes tipos de electrodos de carbono (De Luca y col 2005; Filipe y col 2004). En la Figura 44b, se representa el circuito equivalente para los electrodos EG-PVA y EG-TiO₂, y EG-LAC a diferencia del circuito anterior se hizo la adición de un capacitor y un Warburg, debido a que presenta dos constante de tiempo (el semicírculo y la línea recta, los cuales representan la resistencia a la transferencia de y difusión), los valores para $R_{ct} = 13.40 \text{ M}\Omega$ y para $CPE=17.49 \text{ mF}$, los cuales son mayores a los obtenidos por electrodos anteriores, lo cual coincide con lo obtenido en el diagrama de Nyquist.

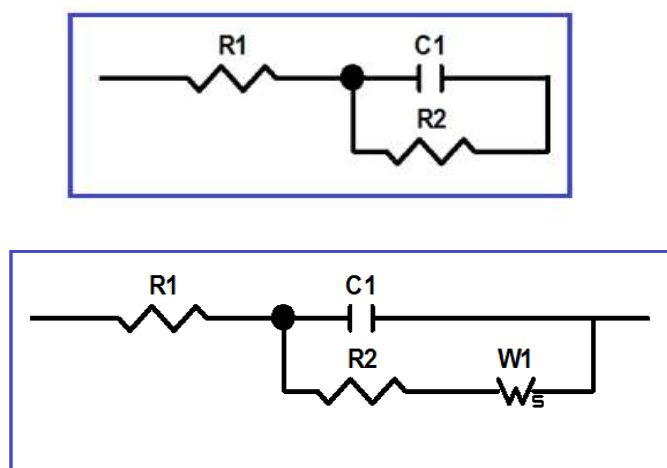


Figura 39: Circuitos equivalentes para ajustar los espectros de impedancia electroquímica, (a) barra de grafito; (b) NAF/LAC; TiO₂/LAC; y TiO₂/NAF/LAC. Dónde: R1, resistencia del electrolito; Ws, Warburg; R2, resistencia a la transferencia.

4.7 Medidas de Voltimetría Cíclica (VC)

Para evaluar las propiedades electroquímicas en la superficie de la barra de grafito y los diferentes electrodos modificados y sin modificar se empleó la técnica de voltimetría cíclica, se llevó a cabo en una solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 0.1 M disuelta en 0,2 M KCl a una velocidad de barrido 100 V/s en un rango de -0.5 a 0.70 V, para el electrodo de grafito sin modificar, así como para los biosensores dopados con TiO_2 como para los de NTC.

En la Figura 40 se puede observar los bien definidos picos para los biosensores $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$ y TiO_2/LAC , y para la barra de grafito, estos se deben a la conducción del grafito y a las propiedades de semiconductor del TiO_2 , en cambio para el biosensor NAF/LAC presenta una muy pequeña corriente de pico en el voltamperograma, lo cual es atribuido a que el Nafion está rodeado parcialmente por regiones hidrófobas de ionómero sulfonato perfluorado, lo que dificulta la transferencia de iones y las propiedades no conductoras de la enzima (Kochana 2012; Zhong et al. 2011). También se aprecia que los biosensores $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$ y TiO_2/LAC presentan una menor reversibilidad así como una mejor respuesta en la corriente de pico, que el electrodo NAF/LAC , esta conducta puede ser atribuida a que la enzima lacasa quedo adsorbida en la matriz de titania, por lo cual no obstruye el paso de electrones de la sonda electroquímica, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la técnica de impedancia electroquímica (Yang et al. 2005).

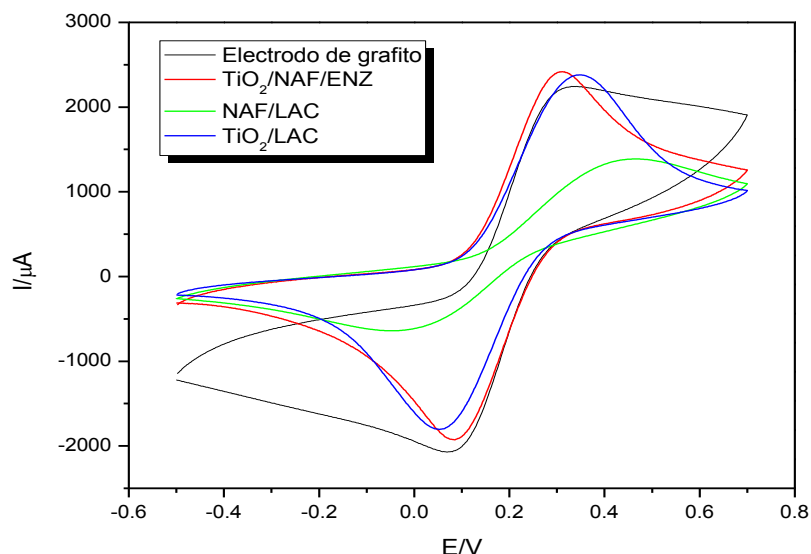


Figura 40: Voltimetría Cíclica en $0.1\text{M } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, en una solución de 0.2M KCl a un barrido de potencial 100 v/s .

4.8 Respuesta electroquímica de catecol en los biosensores

Para evaluar las características de detección electroquímica se utilizó el catecol como compuesto fenólico. La Figura 41 muestra los voltamperogramas cíclicos de catecol en una solución buffer pH 6.68 del biosensor NAF/LACA (a); TiO_2/LAC (b) y $\text{TiO}_2/\text{NAF/LAC}$ (c) en ausencia y presencia de catecol a una concentración de $25\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Como era de esperar no se observan picos de reducción-oxidación para la barra de grafito en ausencia de lacasa. En las Figuras 41 curvas (a), (b) y (c), con la adición de $25\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, se obtuvo un pico de oxidación y reducción bien definidos para los tres biosensores, con lo cual se comprobó las propiedades catalíticas de los electrodos modificados para la oxidación del biosensor, por lo tanto, pueden ser utilizados para realizar un estudio de concentración y ser aplicado para la determinación de ácido gálico.

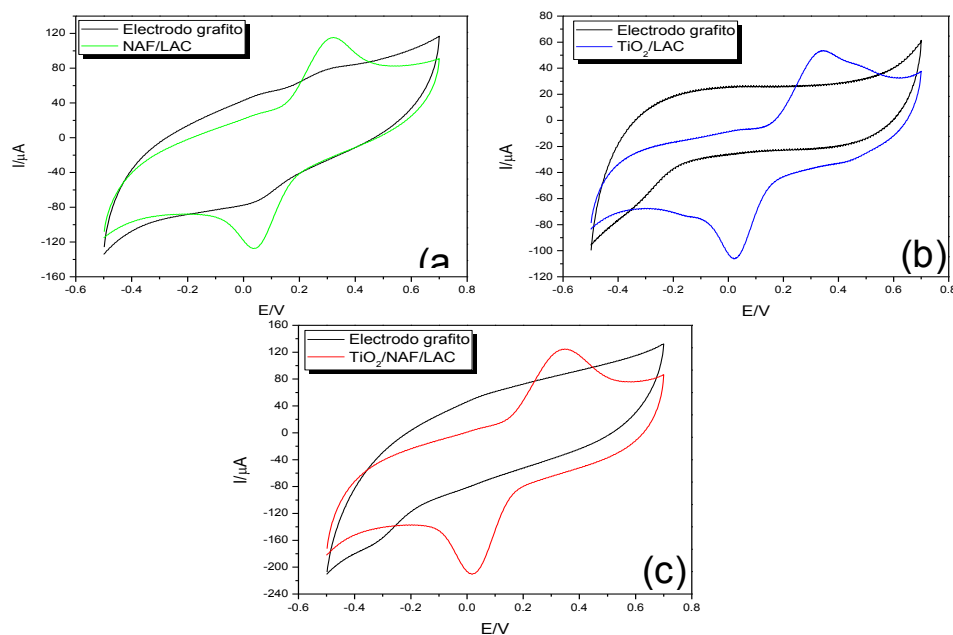


Figura 41: Respuesta de los diferentes biosensores, en 25 μM de catecol.

4.9 Estudio de concentraciones

Se realizaron adiciones sucesivas de concentraciones crecientes a la celda electroquímica de distintos antioxidantes (catecol), partiendo de una disolución madre de antioxidantes a una concentración 10^{-3} M , en una celda electroquímica, que contenía 40 mL de solución buffer de fosfato (SBP; 0,1 M pH=6.68). Los voltamperogramas cíclicos de catecol obtenidos (Figura 42), presentan un evidente aumento tanto en el pico de reducción como en el pico de oxidación, lo cual es producido debido a la reacción enzimática. También se puede notar que a medida que aumenta la concentración de antioxidante los picos sufren desplazamientos notables en cuanto a su Intensidad de corriente para los tres biosensores.

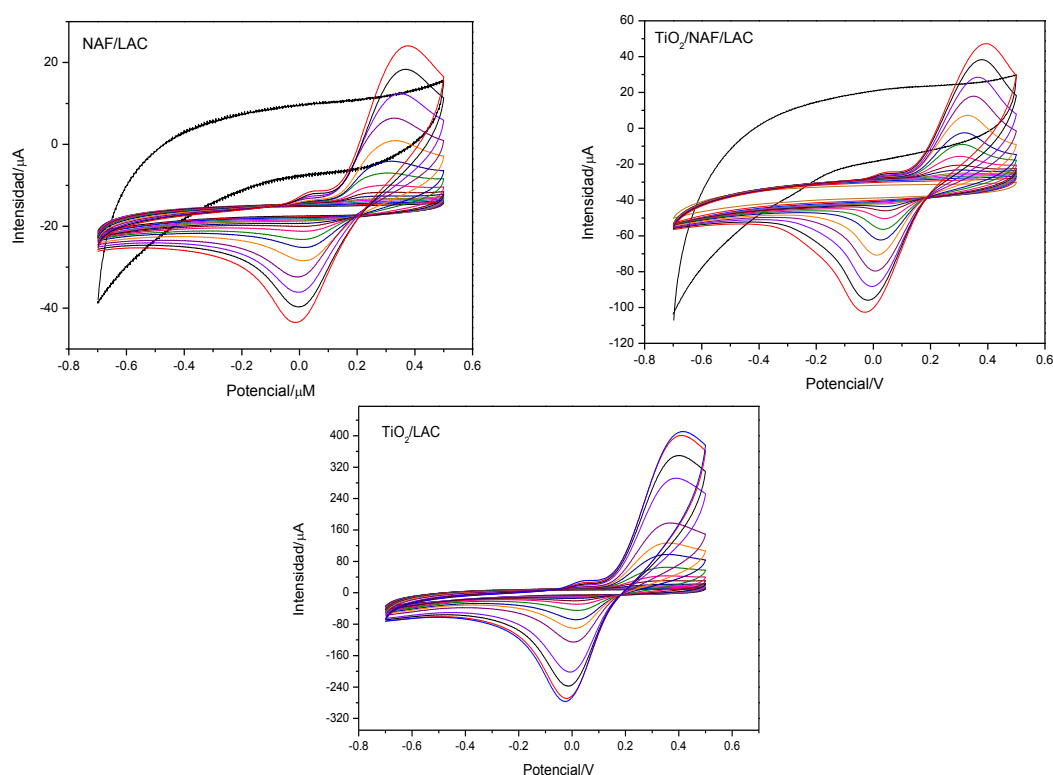


Figura 42: Respuesta voltamétrica de los biosensores en SBP 0.1M, con distintas adiciones de disolución de catecol.

En la Tabla 4 se presentan las características analíticas de los tres biosensores, en términos de sensibilidad, límite de detección y rango lineal. Los biosensores basados en NAF/LAC, y TiO_2/LAC presentan el mismo límite de detección de $1.25 \mu\text{M}$, con un factor de correlación de 0.9984 y 0.9952 respectivamente, mientras que el biosensor basado en $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$, tiene el menor límite de detección de $0.75 \mu\text{M}$ con un factor de correlación de 0.9968. Por otra parte, la respuesta lineal obtenida para los biosensores NAF/LAC y TiO_2/LAC está en el rango $1.25\text{-}175 \mu\text{M}$, mientras para el biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$, presentan una menor respuesta lineal en el rango de $0.75\text{-}175 \mu\text{M}$. La sensibilidad de los biosensores fue determinada obteniendo 2.8, 2.6 y $2.43 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ para $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$, NAF/LAC; TiO_2/LAC , respectivamente. La alta sensibilidad la presenta el biosensor de $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$, lo cual es atribuido a la buena

biocompatibilidad alrededor de la enzima y a la naturaleza porosa de la película compuesto por el sol-gel del óxido/Nafion.

Tabla 3: Características analíticas de los diferentes biosensores.

	Sensibilidad	Rango Lineal	Límite de detección	Factor correlación
Biosensor	$\mu\text{A L}/\mu\text{mol}$	μM	μM	
(TiO ₂ /NAF/LAC)	2.8	0.75-175	0.75	0.99682
(NAF/LAC)	2.6	1.25-125	1.25	0.99844
(TiO ₂ /LAC)	2.43	1.25-150	1.25	0.9952

La estabilidad del biosensor es considerada como una de las características principales, por lo que, su estabilidad a largo plazo fue estudiada. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos durante 60 días, en términos de sensibilidad, para el biosensor TiO₂/NAF/LAC. De los resultados obtenidos podemos resaltar que el biosensor va perdiendo gradualmente su actividad a lo largo de los 60 días, manteniendo solamente el 34%, este resultado demuestra que la película del sol de titania es muy eficiente para retener la actividad de la enzima lacasa. La estabilidad a largo plazo que presenta el biosensor de TiO₂, se debe a que el proceso de inmovilización en el sol-gel de titania no involucra ningún compuesto aditivo que pueda hacer una modificación química en las moléculas de la enzima, por lo que la enzima puede mantener su actividad biológica en gran medida (Yu y col., 2003; Lee y col., 2007).

Tabla 4: Estabilidad del biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$.

Biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$		
Días	Sensibilidad $\mu\text{A L}/\mu\text{mol}$	% de Actividad
1	2.8	100%
8	2.3	82%
15	1.98	71%
22	1.67	60%
30	1.39	50%
38	1.32	47%
45	1.18	42%
53	1.05	36%
60	0.95	34%

Para efectos prácticos, el biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$ se utilizó para determinar el contenido total fenólico en infusiones de té y café. Los resultados obtenidos fueron comparados con el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. La cuantificación se llevó a cabo sobre el estándar de catecol y los resultados se expresaron como mg de catecol por 100 g de muestra. En la Tabla 6, se resumen los resultados obtenidos, en donde se observa que el biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$ obtiene un menor valor que con el método Folin-Ciocalteu, esta diferencia, puede ser atribuida al diferente agente oxidante que se usa, es decir, una enzima (Biosensor) o un compuesto químico (Método Folin-Ciocalteu), que es utilizado en cada caso. Por una parte, la enzima oxida específicamente a los compuestos difenólicos en particular a los compuestos en posiciones orto, meta y para, mientras que el método Folin-Ciocalteu puede oxidar no solamente a compuestos fenólicos, sino a cualquier otra especie reducida en la muestra, es decir, aminas aromáticas, ácido ascórbico, Cu (I) y Fe (II) (Ibarra-Escutia y col.,

2010]. Por otra parte, el biosensor basado en lacasa proporciona una muy buena alternativa a los métodos convencionales para la detección de fenoles, además, de que las muestras analizadas no requieren ningún tratamiento previo. Lo anterior concuerda con lo reportado por Carralero Sanz y col 2005, en la detección de fenoles en muestras de vino, de igual manera Chang y col., 2002, para la estimación de fenoles totales en muestras de agua.

Tabla 5: Contenido equivalente de Fenoles en infusiones de té y café, determinados por el método amperométrico propuesto (Biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$), y el método espectrofotométrico (Folin-Ciocalteu). CEF: Contenido equivalente de fenoles.

Muestras	CEF $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$	CEF Folin-Ciocalteu
Té 1	4.47	131.06
Té Verde McCormick	5.18	26.74
Té Limón Vitte	4.81	31.09
Té Manzanilla McCormick	5.13	43.97
Té Hiervabuena Vitte	5.32	22.08
Té Limón hoja	14.14	25.19
Té Muicle	5.48	113.21
Café soluble	6.08	51.74
Café insoluble		

4.10 Biosensores desarrollados con Nanotubos de carbón

Debido a su naturaleza intrínseca, las principales características de patrón de difracción rayos X de nanotubos de carbono son similares a los de grafito. En la Figura 43 se muestra el difractograma de nanotubos de carbono, en el cual se aprecian claramente los picos de difracción característicos del Carbono con estructura hexagonal a 2θ : 26.0, 44.0, 51 y 80° que podemos comprobar con los datos extraídos del programa PCPDFWIN.

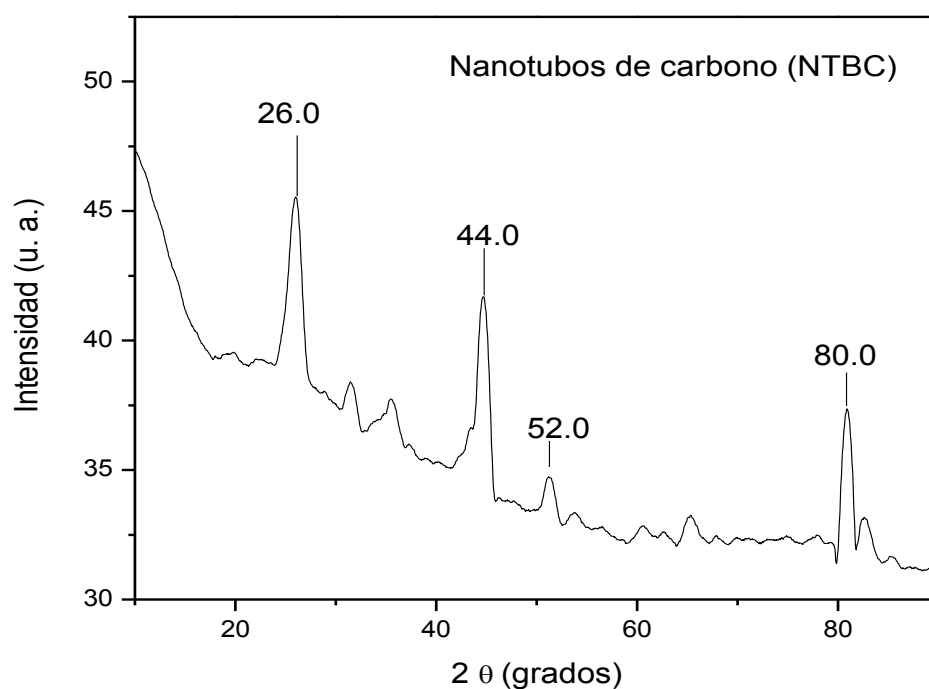


Figura 43: Espectro de Rayos X de NTC.

4.11 MEB para nanotubos de Carbono (NTC)

Los resultados por microscopia electrónica de barrido nos muestran aglomerados de NTC con estructura tubular, además se observa que el diámetro de los nanotubos varía de 17.2 a 67.6 nm (Figura 44 a y b). En la Figura 44 c, se muestra la morfología del compuesto NTC/LAC/GA, en donde se observan pequeñas estructuras de forma globular, indicando con ello la inmovilización exitosa de la enzima lacasa en la superficie de la capa de NTC/GA, esto concuerda con lo reportado por Chawla y col. 2012.

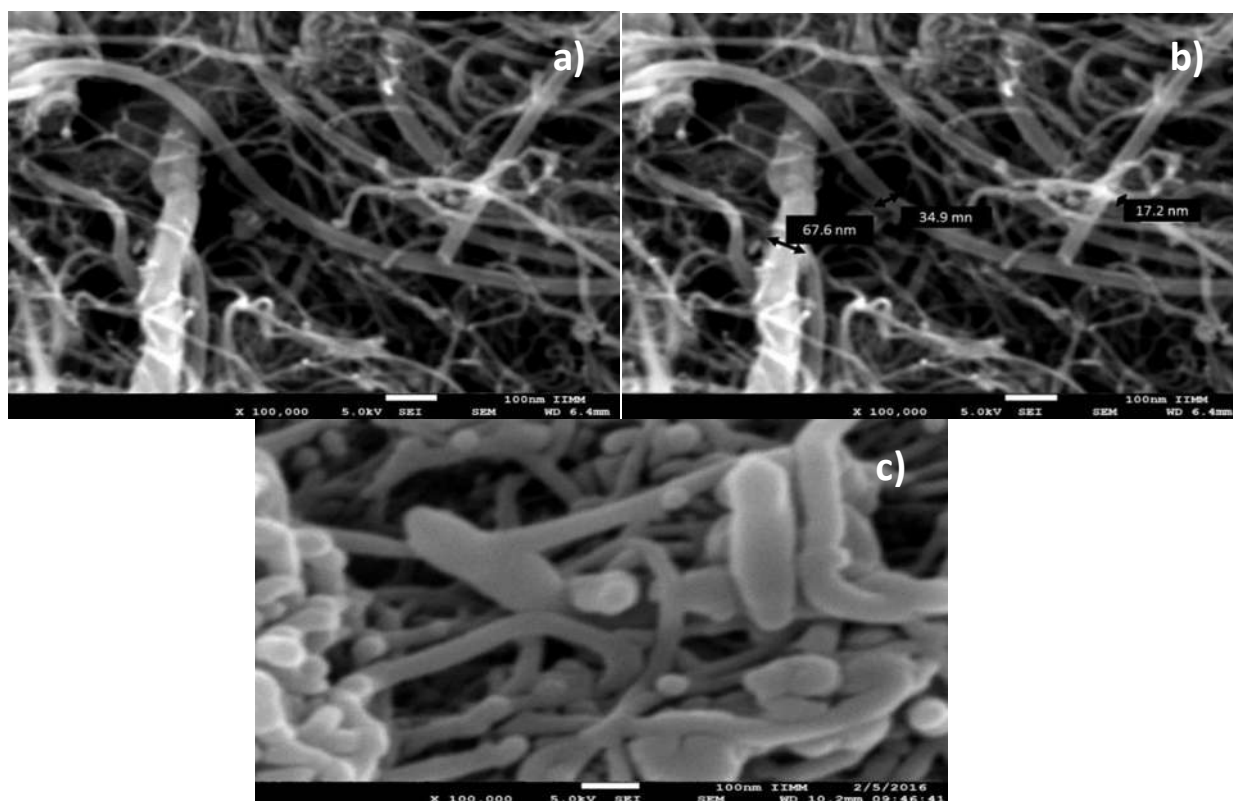


Figura 44: Imágenes MEB de Nanotubos de carbono: (a) NTC 100,000x; (b) diámetro de NTC 100,000x; (c) biosensor NTC/LAC/GA 100,000x.

4.12 Espectroscopia de Raman

La espectroscopia Raman es una herramienta que se utiliza para proporcionar información estructural sobre los NTC antes y después de su oxidación. El análisis espectroscópico se muestra en la Figura 45, en el cual se muestra la banda-D (1308 cm^{-1}) y la banda-G (1564 cm^{-1}), para los nanotubos antes y después de la oxidación (Curvas a y b, respectivamente), estas son las típicas bandas de los nanotubos de carbono de pared múltiple. El aumento en la intensidad (Curva b), se debe al tratamiento ácido recibido durante la oxidación, debido a la eliminación de átomos de carbono amorfo [Guadarrama-Fernandez y col., 2014]. Por otra parte, la disminución de la intensidad, para los nanotubos sin oxidar (Curva a) puede ser atribuida a la ruptura de algunos enlaces y la inserción de grupos químicos en los NTC durante la oxidación [Malarvizhi y col., 2012].

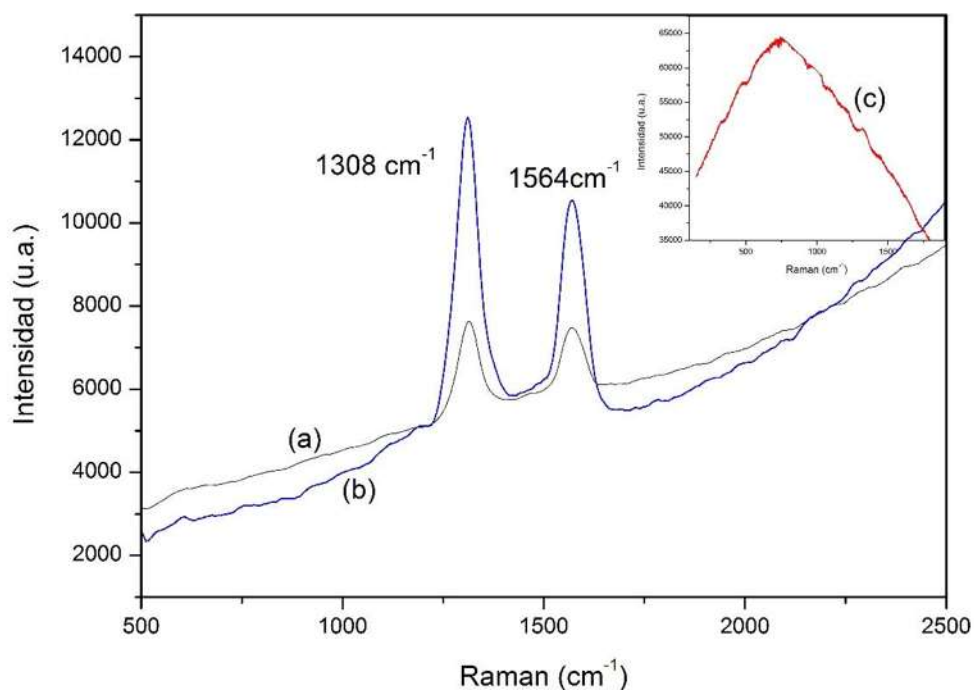


Figura 45: Espectro Raman de nanotubos: (a) sin funcionalizar y (b) oxidados (c) Biosensor NTC/GALAC.

4.13 Medidas de Impedancia Electroquímica

Mediante de la solución redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ como sonda electroquímica, se obtuvieron los diagramas de Nyquist de los diferentes electrodos modificados con nanotubos de carbono (NTC) en el rango de frecuencia de 10^{-2} a 10^5 Hz fueron obtenidos (Figura 46). El electrodo de grafito presenta casi una línea recta propia de los sistemas de una sola etapa sin presentar ninguna resistencia a la transferencia de carga, al modificar la superficie del transductor de grafito con GLUT/LAC se presentó un semicírculo a altas frecuencia aumentando drásticamente la resistencia a la transferencia de carga alrededor de 79.20 Ohm, debido como se mencionó anteriormente a las propiedades no conductoras tanto del glutaraldehído (GLUT) como de la enzima, los cuales bloquean el intercambio de electrones entre la sonda redox y la superficie del electrodo. Después el transductor se revistió con una mezcla de NTC/GLUT, con lo cual, el diámetro del semicírculo disminuyó considerablemente, trayendo con ello una menor resistencia a la transferencia de electrones (13.56 Ohm), esto es atribuido a que los NTC interactúan como una interface en la transferencia de electrones entre la sonda redox y el electrolito, finalmente la enzima lacasa fue inmovilizada en el composito NTC/GLUT, el diámetro del semi-circulo en los diagramas de Nyquist, fue menor que el obtenido en el composito cuando se inmovilizo solo en glutaraldehído, mejorando con ello la transferencia de electrones, y disminuyendo la resistencia a la transferencia de carga (33.14 Ohm), esto debido a que los nanotubos de carbono aceleran la transferencia de electrones entre los sitios electro-activos de la enzima (Deng y col., 2009; Jiang y col., 2009).

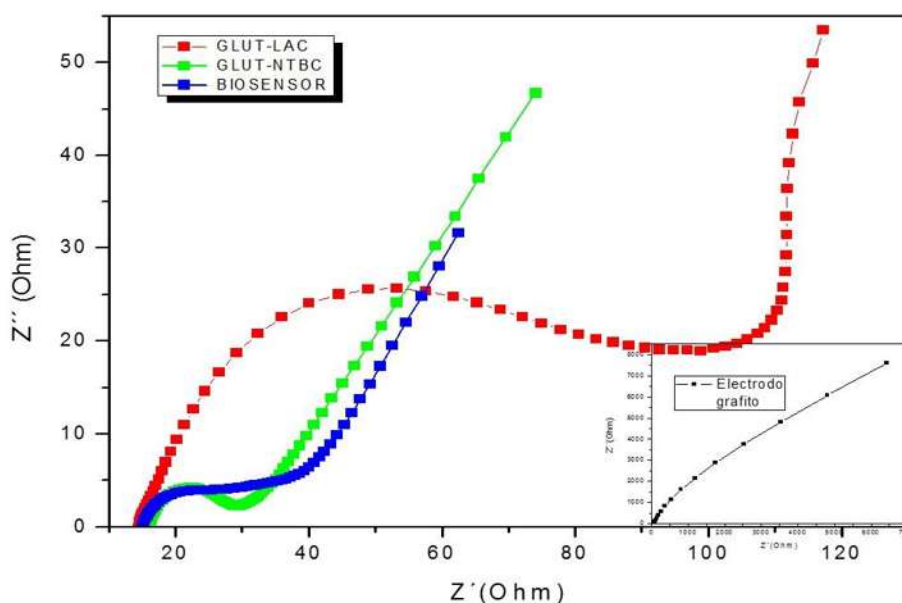


Figura 46: Diagrama de Nyquist para las medidas de Impedancia de los diferentes electrodos de NTC.

4.14 Medidas de Voltimetría Cíclica

En la Figura 47 son presentados los voltamperogramas cíclicos (CV) para estudiar el comportamiento electroquímico de la barra de grafito y los electrodos modificados a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} . El voltamperograma para la barra de grafito muestra un comportamiento cíclico reversible (Figura 52 curva a), propio para este sistema [Liu y col., 2006; Li y col., 2011], la corriente de pico disminuye drásticamente al modificar la superficie del electrodo de grafito con una mezcla de glutaraldehído y lacasa, donde tampoco hay aparición del pico anódico, debido a las propiedades no conductoras de la lacasa, las cuales obstruyen la transferencia de electrones (Zhong y col., 2011), cuando se recubre con la mezcla de NTC-GLUT (Figura 47 curva c), la corriente de pico aumenta y solo se obtiene la aparición del pico catódico, lo cual corresponde a una reacción irreversible e indica que le

Glutaraldehído actúa como una capa inerte que bloquea la transferencia de electrones. Cuando la enzima lacasa es inmovilizada en el compuesto NTC/GLUT, se obtiene comportamiento quasi-reversible, con una menor corriente de pico, esto se debe a las propiedades de conducción que presentan los NTC.

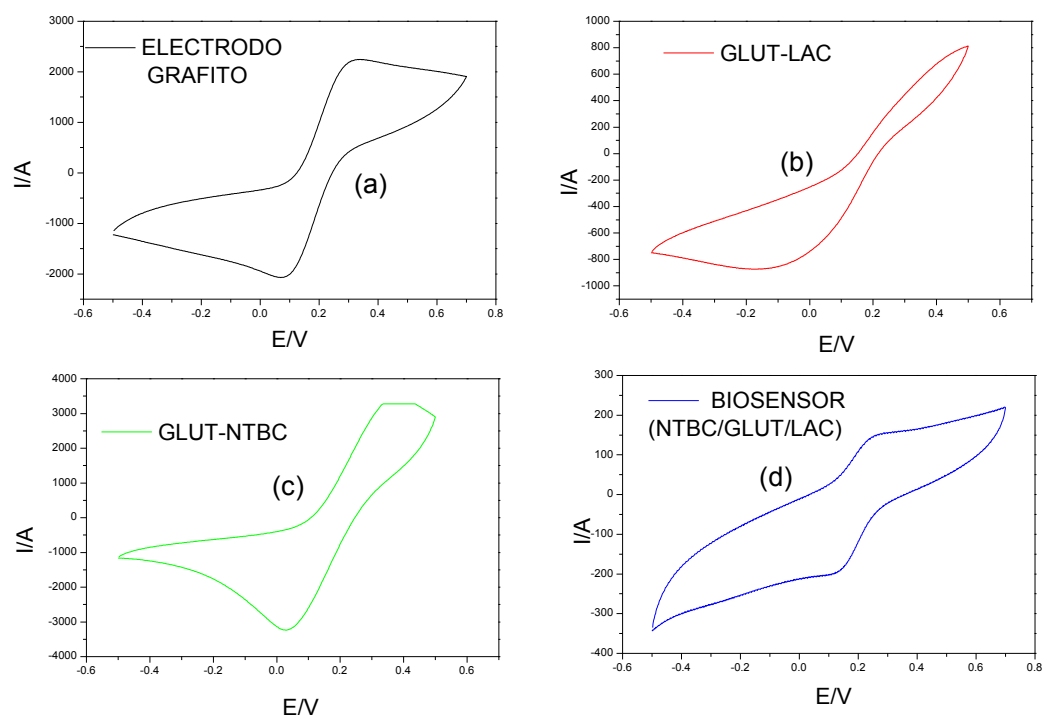


Figura 47: Voltametría cíclica en $0.1\text{M } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ y 0.2M KCl a 100 V/s , para biosensores con NTC.

4.15 Estudio de concentraciones de NTC

De igual manera para los biosensores desarrollados con nanotubos de carbono, se realizaron adiciones sucesivas de concentraciones crecientes a la celda electroquímica de catecol, partiendo de una disolución madre de antioxidante a una concentración 10^{-3} M, en una celda electroquímica, que contenía 40 mL de solución buffer de fosfato (SBP; 0,1 M pH=6.68). Los voltamperogramas cíclicos de catecol obtenidos (Figura 48), presentan un evidente aumento tanto en el pico de reducción como en el pico de oxidación, lo cual es producido debido a la reacción enzimática. También se puede notar que a medida que aumenta la concentración de antioxidante los picos sufren desplazamientos notables en cuanto a su Intensidad de corriente para los dos diferentes biosensores, teniendo una mejor respuesta el biosensor desarrollado con nanotubos, debido a las propiedades conductoras de estos.

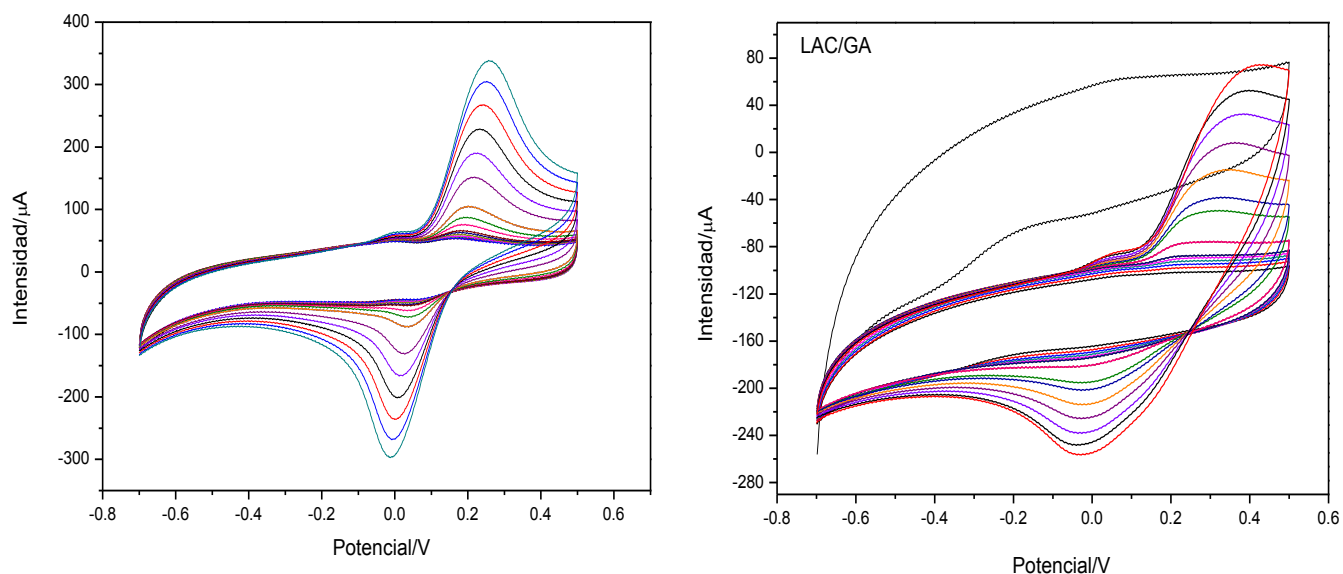


Figura 48: Respuesta voltamétrica de los biosensores en disolución SBP 0.1M, con distintas adiciones de disolución de catecol.

Las características analíticas de los dos diferentes biosensores son mostradas en la Tabla 7, en términos de sensibilidad, límite de detección y rango lineal. Como se observa las mejores características las presenta el biosensor NTC/LAC/GA, con una sensibilidad de 2.81 y un factor de correlación de 0.9948, mientras que el biosensor LAC/GA mostro 2.11 y un factor de correlación de 0.9949, en cuanto a límite de detección los biosensores obtuvieron 0.5 y 2.5 μM para NTC/LAC/GA y LAC/GA respectivamente, en cuanto al rango lineal el biosensor NTC/LAC/GA, exhibe el más amplio rango lineal. Esto se debe, a las distintivas propiedades de los nanotubos de carbono, en especial a la buena biocompatibilidad, la gran área superficial, elevada conductividad eléctrica, con lo cual, mejoran la capacidad de transferencia de electrones entre la especie electroactiva, mejorando con ello las propiedades de los electrodos (Diaconu y col., 2010; Pérez y Merkoçi 2008).

Tabla 6: Características analíticas de los diferentes biosensores.

	Sensibilidad	Rango lineal	Límite de detección	Factor de Correlación
Biosensor	$\mu\text{A L}/\mu\text{mol}$	μM	μM	
NTC/LAC/GA	2.81	0.5-150	0.5	0.9948
LAC/GA	2.11	2.5-175	2.5	0.9949

De igual manera, se estudió la sensibilidad a largo plazo del biosensor NTC/LAC/GA durante 45 días, en la Tabla 8 se muestran los resultados, en donde se observa que después de los 45 días el biosensor conserva solamente el 33% de su actividad. Con los resultados obtenidos se demuestra que el método para inmovilizar la enzima en los NTC es capaz de retardar la desnaturalización de lacasa, y, principalmente se debe al microambiente del biosensor, que tiene buena biocompatibilidad de lacasa existente (Ya y col., 2011).

Tabla 7: Estabilidad del biosensor NTC/LAC/GA.

Días	Sensibilidad $\mu\text{A L}/\mu\text{mol}$	% Actividad
1	2.81	100%
8	2.72	97%
15	2.62	93%
22	2.53	90%
30	2.43	86%
38	1.41	50%
45	0.95	33%

Se utilizó el biosensor NTC/LAC/GA, para evaluar el contenido total de fenoles en muestras de té y café. Los resultados obtenidos se expresaron en equivalentes de catecol por cada 100g de muestra, estos, fueron comparados por el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, utilizando catecol como estándar. Los datos son reportados en la Tabla 9, en donde se observa que los resultado obtenidos con el biosensor (NTC/LAC/GA), son menores, lo cual concuerda con lo reportado con el biosensor de $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$, esto de igual manera se debe a, que la enzima lacasa oxida en particular a los compuestos fenólicos.

Tabla 8: Contenido equivalente de fenoles en infusiones de té y café, determinados por el método amperométrico propuesto (biosensor NTC/LAC/GA), y el método espectrofotométrico (Folin-Ciocalteu). CEF: contenido equivalente de fenoles.

Muestras	CEF NTC/LAC/GA	CEF Folin-Ciocalteu
Té Verde McCormick	37.41	131.07
Té Limón Vitte	7.29	26.75
Té Manzanilla McCormick	7.24	31.10
Té Hiervabuena Vitte	7.53	43.98
Té Limón hoja	7.63	22.09
Té Muicle	16.05	25.20
Café soluble	17.52	113.22
Café insoluble	13.10	51.74

Capítulo V. CONCLUSIONES

- De los resultados obtenidos, el método sol-gel propuesto para sintetizar nano-partículas de TiO_2 , proporciona un proceso de inmovilización suave para enzima lacasa, y un microambiente biocompatible alrededor de esta, por lo cual, retiene su actividad biológica.
- Los resultados presentados en este trabajo demuestran que los tres biosensores compositos enzimáticos (TiO_2/LAC ; NAF/LAC y $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$), tienen buena sensibilidad hacia el catecol en el orden de $\mu\text{A}/\mu\text{M}$, comparado con lo reportado por otros autores los cuales lo han obtenido en orden de $\mu\text{A}/\text{mol}$, presentando las mejores propiedades analíticas el biosensor de $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$. Esto se debe a las propiedades semiconductoras del TiO_2 y a la película compuesta por TiO_2/NAF , la cual, es muy eficiente para evitar la salida de lacasa de la película, por lo cual se tiene buena estabilidad a largo plazo.
- El biosensor $\text{TiO}_2/\text{NAF}/\text{LAC}$, desarrollado presenta buena estabilidad y exhibió un buen desempeño en términos de tiempo de respuesta, sensibilidad, estabilidad a largo plazo, proceso de fabricación fue simple y puede ser utilizado para la determinación precisa del contenido fenólico sin ningún tratamiento previo de la muestra.
- La aplicación del biosensor en infusiones de té y café, muestra que el biosensor es confiable para una rápida y fiable detección del contenido fenólico de las muestras, sin hacer un proceso de extracción, comparando con el método de Reactivo Folin-Ciocalteu.

- El biosensor desarrollado con NTC, demostró que el composito NTC/GA, presento una gran sensibilidad para la detección de catecol, además de mostrar buenas características tales como un mayor tiempo de respuesta, mayor sensibilidad, menor límite de detección.
- De igual manera que el biosensor desarrollado con nano-partículas de titania, el biosensor NTC/GA/LAC, al ser probado en muestras de té y café, presento buena afinidad hacia los compuestos fenólicos, comparándolo con el método Folin-Ciocalteu.
- Como conclusión final se puede comprobar que al usar una nano-estructura ya sea TiO_2 o NTB, ambas tienen buena sensibilidad y estabilidad en el desarrollo de biosensores amperométricos para la detección de catecol.
- Por otra parte, ambos biosensores al ser utilizados para la detección de polifenoles en infusiones de té y café, muestran gran afinidad hacia estos compuestos.

Capítulo VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Wang L. Ran Q., Tian Y., Ye S., Xu J., Xian Y., Peng R., Jin L. (2010) Covalent grafting tyrosinase and its application in phenolic compounds detection. *Microchim Acta*, 171:217–223.
2. Chawla S., Narang J. y Pundir S. (2010). An amperometric polyphenol biosensor based on polyvinyl chloride membrane. *Anal. Methods*, 2, p-p: 1106–1111.
3. Chawla S., Rawal R., Shabnam. Kuhadb R.C., Pundir C.S. (2011). An amperometric polyphenol biosensor based on laccase immobilized on epoxy resin membrane. *Analytical Methods* 709-714.
4. Lee Y., Lyu Y., Choi H., Lee W. (2007). Amperometric Tyrosinase Biosensor Based on Carbon Nanotube – Titania – Nafion Composite Film. *Electroanalysis* 19, 1048–1054.
5. Gomes S., Nogueira J. y Rebelo M. (2004). An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosensors and Bioelectronics* 20, p-p: 1211–1216.
6. 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.
7. Ren J., Kang T., Xue R., Ge C., Chen S. (2011) Biosensor based on a glassy carbon electrode modified with tyrosinase immobilized on multiwalled carbon nanotubes. *Microchim Acta* 174, 303–309.
8. Pérez B. y Merkoc A. (2008) Improvement of the electrochemical detection of catechol by the use of a carbon nanotube based biosensor. *Analyst*, 134, p-p: 60–64.

9. Amine A., Mohammadi H., Bourais I., y Palleschi G. (2005) Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics* 21, p-p: 1405–1423.
10. López Gil M.A., Ortega Ortiz F. (2002). Inmunosensores: herramientas analíticas con un gran potencial de futuro. *Schironia* 1, p-p: 59-90.
11. Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J., Reimhult E. (2008) *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. *Sensors*, 8, 1400-1458.
12. Navaratne A., Gunawardena D., Kadawathaarachi L. y lleperuma C. (2007) Biosensor approach for monitoring polyphenol oxidase (PPO) activity of selected local fruits with blanching time (steam blanching). *Proceedings of the Peradeniya University Research Sessions, Sri Lanka, Vol.12, Part I*.
13. Balasubramanian K. y Burghard M. (2006). Biosensors based on carbon nanotubes. *Anal Bioanal Chem* 385, p-p: 452-486.
14. Sassolas A., Blum L.J, Leca-Bouvier B.D (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* 30:489–511.
15. Prodromidis M y Karayannis M (2002). Enzyme Based Amperometric Biosensors for Food Analysis. *Electroanalysis*, 14, No. 4 p-p: 241-261.
16. Castro O.L., Luna P.V., Villalobos P.R. (2007). Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 19, p-p: 35-45.
17. Romero-Arcos, M.; Garnica-Romo, M.G.; Martínez-Flores, H.E.; Vázquez - Marrufo, G.; Ramírez-Bon, R.; González-Hernández, J.; Barbosa-Cánovas, G.V. (2016). Enzyme Immobilization by Amperometric Biosensors with TiO₂ Nanoparticles Used to detect Phenol Compounds. *Food. Eng. Rev.* 8, 235-250.
18. Jiménez C. y León D. (2009) Biosensores: Aplicaciones y Perspectivas en el control y calidad de procesos y Productos Alimenticios. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica ISSN 0121-4004 Volumen 16 número 1*, p-p: 144-154.

19. Taniwaki M, Hanada T, Sakurai N. (2006) Device for acoustic measurement of food texture using a piezoelectric sensor. *Food Res Int.* 39:1099-1105.
20. Patel, P.D. (2002). (Bio) sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends in Analytical Chemistry* 21: 96-115.
21. Voet D., Voet J., (2007) *Bioquímica*. Editorial: Panamericana 2^{da} Edición.
22. Mello L.D. y Kubota L. T. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 77; 237-256.
23. Baldrian P. (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30, 215–242.
24. Kunamneni A., Camarero S., García-Burgos C., Plou F. J., Ballesteros A. y Alcalde A. (2008). Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, 7-32.
25. Desai, S.S., Nityan, C. (2011). Microbial laccases and their applications: A review. *Asian Journal of Biotechnology*, 3, 98-124.
26. Kramer, K.J., Kanost, M.R., Hopkins, T.L., Jiang, H., Zhu, Y.C., Xu, R., Kerwin, J.L., Turecek, F. (2001). Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 57(2), 385–392.
27. Claus, H. (2003). *Laccases and their occurrence in prokaryotes*. *Arch. Microbiol.*, 179, 145–150.
28. De Quan, Y. Kim and W. Shin (2004) Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 561 181–189.
29. Gochev V. K. y Krastanov A. I. (2007). Fungal Laccases (Review). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13; 75-83
30. He J., Xu Y., Ma H., Zhang Q., Evans D. G., Duran X. (2006). Effect of surface hydrophobicity/hydrophilicity of mesoporous supports on the activity of immobilized lipase. *J. Colloid Sci. Interface Sci.* 298: 780-786.
31. Mohidem N., Mat H. (2009). The catalytic activity of lacasse immobilized in sol-gel silica. *Journal of Applied Sciences* 9(17), 3141-3145.

32. Avni Oktem H., Senyurt O., Eyidogan F. I., Bayrac C., y Yilmaz R. (2012). Development of a laccase based paper biosensor for the detection of phenolic compounds. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.10 (2): 1030-1034.
33. Manole A., Herea D., Chiriac H., Melnig V. (2008). Laccase immobilised on hydrotalcites as a 3rd generation biosensor type. *Biomaterials in Biophysics, Medical Physics and Ecology*; 11-16.
34. Singh G., Bhalla A., Capalash N., Sharma P. (2010). Characterization of immobilized laccase from γ -proteobacterium JB: Approach towards the development of biosensor for the detection of phenolic compounds. *Indian Journal of Science and Technology*. 3, 1, 48-53.
35. Thurston Ch., (1994). The structure and function of fungal laccase, review article. *Microbiology*, 140, pp.19-26.
36. Singh M, Verma N, Garg AK, Redhu N (2008) Urea biosensors. *Sens Actuat B-Chem* 134:345–35
37. Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz G. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol*; 66: 3357–62.
38. Di Fusco M., Tortolini C., Deriu D, Mazzei F. (2010). Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta* 81 235–240.
39. Gomes, S.A.S.S; Rebelo, M.J.F. (2003). A new laccase biosensor for polyphenols determination. *Sensors*, 3, 166-175
40. Lu J., Bender C. J., Mc Cracken J., Peisach J., Severns J. C. y Mc Millin D. R. (1992). Pulsed EPR studies of the type 2 copper binding site in the mercury derivate of laccase. *Biochemistry*. 31 (27): 6265-6272.
41. Garavaglia S., Cambria M. T., Miglio M., Ragusa S., Lacobazzi V., Palmieri F., D' Ambrosio C., Scaloni A. y Rizzi M. (2004) The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T_3 copper pair. *Journal of Molecular Biology*. 342: 1519-1531.

42. Ivnitski, D. y P. Atanassov. (2007). Electrochemical studies of intramolecular electron transfer in laccase from *trametes versicolor*. *Electroanalysis* 19 : 2307-2313.
43. Durán , Rosa M. A, D'Annibale A., y Gianfreda L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 31, 907–931.
44. Fei, J., H.K. Song, G.T.R. Palmore. (2007). A biopolymer composite that catalyzes the reduction of oxygen to water. *Chem. Mater* 19:1565-1570.
45. Gomes S., Nogueira J. y Rebelo M. (2004). An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosensors and Bioelectronics* 20, p-p: 1211–1216.
46. Yaropolov A. I., Shleev S. V., Morozova O. V., Zaitseva E. A., Marko-Varga G., Emneus J., Gorton L. An Amperometric Biosensor Based on Laccase Immobilized in Polymer Matrices for Determining Phenolic Compounds. *Journal of Analytical Chemistry*, 60, 2005, 553–557.
47. Sung Ho Kima, S.-Y. K.-H. (2003). Design of TiO₂ nanoparticle self-assembled aromatic polyamide thin-film-composite (TFC) membrane as an approach to solve biofouling problem. *Journal of Membrane Science* 211, 157–165.
48. Mackenzie J.D., Bescher, E.P. (2007).Chemical routes in the synthesis of nanomaterials using the sol-gel process. *Acc. Chem. Res.* 40, 810–818.
49. Laurent, S., Bridot, J.L., Elst, L.V. Magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Future Med. Chem.* 2, 427–449 (2010).
50. Galceran M., Pujol M. C., Aguiló M. Díaz F. (2007).Sol-gel modified Pechini method for obtaining nanocrystalline KRE(WO₄)₂ (RE = Gd and Yb). *J Sol-Gel Sci Techn.* 42, 79–88.
51. Chen X., Mao S. S Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications (2007). *Chem. Rev.*, 107, 2891-2959.

52. Gupta K. K., Jassal M., Agrawal A. K. (2008). Sol-gel derived titanium dioxide finishing of cotton fabric for self -cleaning. *Indian Journal of Fibre y Textile Research*, 33 443-450.
53. Jolivet J. (2000). *Metal oxide Chemistry and Síntesis. From solution to solid state*, John Wiley R Sons, Ltd.
54. Pierre A. C. (2002). *Introduction to sol-gel processing*. Kluwer Academic Publishers.
55. Kim M., Lee W. (2003). Amperometric phenol biosensor based on sol–gel silicate/Nafion composite film. *Analytica Chimica* , 479, 143–150.
56. Wang J, Gu M, Di J, Gao Y, Wu Y, Tu Y (2007) A carbon nanotube/silica sol–gel architecture for immobilizationof horseradish peroxidase for electrochemical biosensor. *Bioprocess Biosyst Eng* 30:289–296.
57. Yu J., Liu S., and Ju H. (2003) Mediator-free phenol sensor based on titania sol/gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method. *Biosensors and Bioelectronics* 19 509:514.
58. US Geological Survey. (2002). Titanium statistical compendium. Obtenido de <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/titanium/stat/>
59. Yodyingyong S, Sae-Kung C, Panijpan B, Triampo W, Triampo D (2011) Physicochemical properties of nanoparticles titania from alcohol burner calcination. *Bull Chem Soc Ethiop* 25:263-272.
60. Macwan D. P., Dave P. N., Chaturvedi S. (2011). A review on nano-TiO₂ sol–gel type syntheses and its applications. *J Mater Sci* 46, 3669–3686.
61. Gupta S., Tripathi M. (2011). A review of TiO₂ nanoparticles. *Chinese Sci Bull*, 16: 1639–1657.
62. Muscat J, Swamy V, Harrison N M. (2002). First-principles calculations of the phase stability of TiO₂. *Phy Rev B*, 65: 1–15.
63. Linsebigler M., Lu, G., & Yates, J. (1995). Photocatalysis on TiO₂ Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results. *Chem. Rev.* 95, 735-758.

64. Neppoliana B. Y. (2005). Preparation of unique TiO₂ nano-particle photocatalysts by a multi-gelation method for control of the physicochemical parameters and reactivity. *Catalysis Letters* 105, 111-117.
65. Zhong H., Yuan R., Chai Y., Li W., Zhang Y., and Wang C (2011) Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on horseradish peroxidase onto gold nanowires and TiO₂ nanoparticles. *Bioprocess Biosyst Eng* 34:923–930.
66. Chavhan P., Reddy V., Kim C. (2012). Nanostructured Titanium Oxide Platform for Application to Ascorbic Acid Detection. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7 5420-5428.
67. Wang J. (2005) Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis* 17:7-14.
68. Rivas G.A. Rubianes M.D., Rodríguez M.C., Ferreyra N.F., Luque G.L., Pedano L.M., Miscoria S.A. y Parrado C. (2007) Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. *Talanta* 74: 291–307.
69. Cruz-Delgado V.J., Ávila-Orta C.A.- Pérez-Camacho O., García-Zamora M., Comparán-Padilla V.E., Medellín-Rodríguez F.J. Funcionalización de nanotubos de carbono para la preparación de nanocompuestos poliméricos. *Ide@s CONCYTEG*, G (72), 675-692.
70. Benavides C.L., (2013) Nanotubos de Carbono aplicados al electrodo negativo de una batería de Ni/MH. Instituto Balseiro. Argentina.
71. Kausaite-Minkstimiene A., Mazeiko V., Ramanaviciene A., Ramanavicius A. (2011). Evaluation of amperometric glucose biosensors based on glucose oxidase encapsulated within enzymatically synthesized polyaniline and polypyrrole. *Sensors and Actuators B* 158, 278– 285.
72. Akyilmaz E, Sezginturk MK, Dinckaya E. (2003). A biosensor based on rate oxidase-peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine. *Talanta*, 61: 73–79.
73. Karim F. y Fakhruddin A. (2012). Recent advances in the development of biosensor for phenol. *Rev Environ Sci Biotechnol*.

74. Galindo, F. (2006). Propiedades Fisicoquímicas y Catalíticas de Óxidos Mixtos de TiO_2 - CeO_2 Sol-gel. México: Tesis Maestría, Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa.
75. Gómez S., Del Valle M., Alegret S., Pivadori M. I. (2008). Caracterización de la enzima lacasa en biocompuestos para la determinación del índice de polifenoles en vino. Universidad de Barcelona. 419-425.
76. Carralero, S.V., Mena M.L. González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarron, J.M. 2008. Development of a tyrosinase biosensor base on gold nanoparticle-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines. *Analytical Chimica Acta* 528, p-p: 1-8.
77. 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.
78. Ronkainen N.J., Halsall H.B.y Heineman W.R (2010) Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* 39:1747–1763.
79. Bartlett, John Wiley, Sons, West. (2008). Sussex,Bioelectrochemistry Fundamentals, Experimental Techniques and Applications, ed. P. N. England.
80. Lojou E. y P. Bianco. 2006. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *J Electroceram* 16: 79-91.
81. Lorenz W., Schulze K.D. (1975) Zur anwendung der transformations impedanzspektrometrie. *J. Electroanal. Chem.* 65, 141–153.
82. Lisdat F. y Schäfer D. (2008) The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal Bioanal Chem* 391:1555–1567.
83. Faulkner, L., Bard, A. (1980) *Electrochemical methods*, New York 1980.
84. Gileadi, E. (1993) *Electrode kinetics for chemists, engineers and material scientists*, Weinheim.

85. Allen J., Bard y Michel U. Mrikin. (1993). Scanning Electrochemical Microscopy. Marcel Dekker, Inc. 200.
86. Richard L. McCreery (2000). Raman Spectroscopy for Chemical Analysis. Editorial Wiley-Interscience. USA.
87. Fernández-Sánchez C., McNeil C.J., Rawson K. (2005) Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development. Trends in Analytical Chemistry, 24, 1, 37-48.
88. 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.
89. Kontos A.I., Arabatzis I.M., Tsoukleris D.S., Kontos A.G., Bernard M.C., Petrakis D.E., y Falaras P. (2005). Efficient photocatalysts by hydrothermal treatment of TiO₂. Catalysis Today, 101; 275–281.
90. Moradi S, Aberoomand AP, Raeis FS, Abedini KS, Hadi GM (2012) Effect of Additives on Characterization and Photocatalytic Activity of TiO₂/ZnO Nanocomposite Prepared via Sol-Gel Process. International Journal of Chemical Engineering 1-5.
91. Llano B., Marín J. M., Restrepo G. y Ríos L. A. (2007). Desarrollo de sistemas fotoactivos TiO₂/fibra óptica. Scientia Et Technica, XIII, 036; 325-329.
92. Uekawa N., Naoya E. N., Ishii K., Kojima T, y Kakegawa K. (2012) Characterization of Titanium Oxide Nanoparticles Obtained by Hydrolysis Reaction of Ethylene Glycol Solution of Alkoxide. Journal of Nanotechnology.
93. Watson S., Beydoun D., Scott J., Amal R (2004) Preparation of nanosized crystalline TiO₂ particles at low temperature for photocatalysis Journal of Nanoparticle Research 6 193–207.
94. Hernández J. M., García A.R., García S. L., Cueto H.Y. (2011) Síntesis, caracterización y actividad fotocatalítica de óxido de titanio modificado con nitrógeno. Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr. 50, 5, 245-252.

95. Hernández-Enríquez J. M. García-Serrano L. A., Zeifert-Soares B. H. (2008) Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de N-TiO₂ – Anatasa. *Superficies y Vacío* 21, 4, 1-5.
96. Ochoa Y., Ortegón Y., Rodríguez P.J. (2010) Síntesis de TiO₂, fase anatasa, por el método sol-gel: estudio del efecto de la presencia de AcacH en el Sistema. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 52, 29-40.
97. Choi H, Kim YJ, Varma RS, Dionysiou DD (2006) Thermally Stable Nanocrystalline TiO₂ Photocatalysts Synthesized via Sol-Gel Methods Modified with Ionic Liquid and Surfactant Molecules. *Chem. Mater* 18:5377-5384.
98. Porkodi K, Arokiamary SD (2007) Synthesis and spectroscopic characterization of nanostructured anatase titania: A photocatalyst. *Materials Characterization* 58:495–503.
99. DonJie G.; HaiTao D.; HaiJu W.; QuingSong H.; Min Y.; ZhenDong D. *Springer*, 52, 3061-3070, 2009.
100. Beltrán G.C.K, Alarcón J.G. y Martínez M. S. (2012) Desarrollo de membranas híbridas dieléctricas de tipo Nafion con óxidos de zirconio, hafnio y lantano. *Afinidad* LXIX, 558.
101. Luo Q., Zhang H., Chen J., Qian P., Zhai Y. (2008) Modification of Nafion membrane using interfacial polymerization for vanadium redox flow battery applications. *Journal of Membrane Science* 311:98–103.
102. Tavares, A.P.M., Silva, C.G.; Dražić, G.; Silva, A.M.T.; Loureiro, J.M.; Faria, J.L. (2015) Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454, 52–60.
103. Wang, K.; Tang, J.; Zhang, Z.; Gao, Y.; Chen, G. (2012) Laccase on Black Pearl 2000 modified glassy carbon electrode: Characterization of direct electron transfer and biological sensing properties for pyrocatechol. *Electrochimica Acta*, 70, 112–117.

104. Mayorga-Martinez CC, Cadevall M, Guix M, Ros J, Merkoc A (2013) Bismuth nanoparticles for phenolic compounds biosensing application. *Biosens Bioelectron* 40:57–62.
105. Kumar AS, Lo HP, Chen MS (2008) Electrochemical synthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles and their use as a platform for flavin adenine dinucleotide immobilization and efficient electrocatalysis. *Nanotechnology* 19:1-7.
106. Alarcón G., Ambrosi G., Ramirez M.T., Palomar M.E., y Merkoc A. (2012). Stable and sensitive flow-through monitoring of phenol using a carbon nanotube based screen printed biosensor. *Nanotechnology* 21; 245-502.
107. De Luca., Florescu M., Ghica M.E., Lupu A. Palleshi G., Brett C., Compagnone D. (2005). Carbon film electrodes for oxidase-based. *Talanta* 68; 171–178.
108. Filipe M. S., Christopher C M. A. Brett (2003) Characterization of Carbon Film Electrodes for Electroanalysis by Electrochemical Impedance Olga. *Electroanalysis*, 16, 12, 994-1001.
109. Kochana J (2012) Influence of Nafion in Titania Sol-gel Matrix on Analytical Characteristic of Amperometric Phenol Biosensor Based on Tyrosinase. *Acta Chim. Slov.* 59:760–765.
110. Chawla S., Rawal R., Kumar D., and Pundir C.S. (2012) Amperometric determination of total phenolic content in wine by laccase immobilized onto silver nanoparticles/zinc oxide nanoparticles modified gold electrode. *Analytical Biochemistry* 430:16–23.
111. Ibarra-Escutia P., Juarez G.J, Calas-Blanchard C., Marty J.L., Ramírez-Silva M.T. (2010) Amperometric biosensor based on a high resolution photopolymer deposited onto a screen-printed electrode for phenolic compounds monitoring in tea infusions. *Talanta* 81, 1636–1642.
112. Chang S.C., Rawson K., McNeil C.J., (2002) Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols. *Biosens. Bioelectron.* 17, 1015–1023.

113. Carralero S.V., Mena M.A., González-Cortés A., Yáñez-Sedeño P. Pingarrón J.M. (2005) Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticlesmodified glassy carbon electrodes: application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines. *Anal. Chim. Acta* 528, 1–8.
114. Guadarrama-Fernández L., Chanona-Pérez J., Manzo-Robledo A., Calderón-Domínguez G., Martínez-Rivas A., Ortiz-López J., y Vargas-García J.R. (2014) Characterization of Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes for Use in an Enzymatic Sensor. *Microsc. Microanal.* 20:1479–1485.
115. Malarvizhi A. y Pandurangan A. (2012) Bonding of cholesterol oxides to functionalised multiwalled carbon nanotubes for in-vitro biosensor application. *Biomed Res- India* 23:505-512.
116. Deng S., Jian G., Lei J., Hu Z., y Ju H. (2009) A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nitrogen-doped carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics* 25:373–377.
117. Jiang Y., Tang W., Gao J., y Zhou L., y He Y (2009) Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its applications in phenolic compounds and dye removal. *Enzyme and Microbial Technology* 55:1– 6.
118. Liu Y, Qu X, Guo H, Chen H, Liu F, Dong S (2006) Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite. *Biosens Bioelectron* 21:2195–220.
119. Li JH, Kuang DZ, Feng YL, Zhang FX, Liu MQ (2011) Voltammetric determination of bisphenol A in food package by a glassy carbon electrode modified with carboxylated multiwalled carbon nanotubes. *Microchim Acta* 172:379–386

120. Diaconu M., Litescu S.C., Radu G.L. (2010). Laccase–MWCNT–chitosan biosensor—A new tool for total polyphenolic content evaluation from in vitro cultivated plants. *Sensors and Actuators B* 145, 800–806.
121. Ya P., Guang-ming Z., Lin T., Yi Z., Zhen L., y Li-juan C. (2011) Laccase biosensor using magnetic multiwalled carbon nanotubes and chitosan/silica hybrid membrane modified magnetic carbon paste electrode. *J. Cent. South Univ. Technol.* 18:1849–1856.