



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

TESIS

**“Estudio comparativo de dos fuentes de enzima lacasa
inmovilizada en nanotubos de carbono para su uso
como biosensor en la detección de fenoles”**

Para obtener el título de:

Maestra en Ciencias Biológicas

PRESENTA:

I.B.Q. Fátima Ortiz Lara

ASESOR:

D.I. Ma. Guadalupe Garnica Romo

Morelia, Michoacán Diciembre de 2015



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

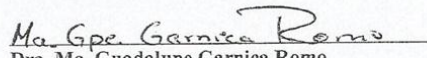
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: “ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS FUENTES DE ENZIMA LACASA INMOVILIZADA EN NANOTUBOS DE CARBONO PARA SU USO COMO BIOSENSOR EN LA DETECCIÓN DE FENOLES”, presentado por la IBQ. Fátima Ortiz Lara, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

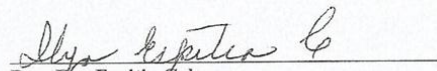
A T E N T A M E N T E

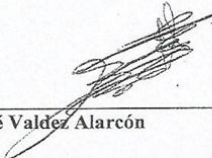
Morelia, Michoacán, a 14 de octubre de 2015

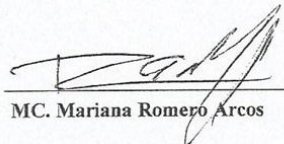
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo
Asesor


Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores


Dra. Ilya Espitia Cabrera


Dr. Juan José Valdez Alarcón


MC. Mariana Romero Arcos

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis padres Noé y Flora, mis hermanos Noemí, Noé y Mariela por su apoyo y amor en todo momento, los quiero mucho. Mis sobrinos Gael, Diego, Gabriel y Victoria que le dan alegría a mi vida. Rosa, gracias por tu ayuda y motivación. Esta tesis va dedicada a ellos.

A la Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por su apoyo, su tiempo, paciencia y orientación.

A los integrantes del comité y revisores de tesis Dr. Hector, Dra. Ilya, Dr. Juan José y M.C. Mariana, por su tiempo, sus revisiones, comentarios y aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos (LIDA) de la Facultad de Químico-Farmacobiología y al Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario en Estudios en Biotecnología (CEMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarme la facilidad en sus instalaciones y laboratorios para el desarrollo de este trabajo. Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico mediante la beca otorgada.

A mis amigos y compañeros de maestría Janet, Judith, Gaby, Eunice, Sarai y Pedro, por su amistad, porque estuvieron conmigo en esta etapa importante de mi vida y también en los momentos difíciles.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción.....	2
CAPÍTULO II.....	4
ANTECEDENTES.....	4
2.1 Inmovilización de enzimas	5
2.1.1 Métodos de inmovilización	5
2.1.1.1 Retención física	6
2.1.1.2 Unión química.....	7
2.2 Sensores químicos y biosensores	10
2.2.1 Clasificación de biosensores	12
2.2.1.1 Naturaleza del material biológico	12
2.2.1.2 Sistemas de transducción.....	15
2.3 Compuestos fenólicos	20
2.3.1 Métodos de determinación de compuestos fenólicos	23
2.4 Nanotubos de carbono	25
2.5 Enzimas	28
2.5.1 Clasificación de enzimas	29
2.5.1.1 Transferasas	30

2.5.1.2	Hidrolasas.....	30
2.5.1.3	Liasas.....	30
2.5.1.4	Isomerasas.....	31
2.5.1.5	Ligasas.....	31
2.5.1.6	Oxido-reductasas.....	31
2.6	Justificación.....	36
2.7	Hipótesis.....	37
2.8	Objetivos.....	37
2.8.1	Objetivo General.....	37
2.8.2	Objetivos Particulares.....	37
CAPÍTULO III.....		38
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....		38
3.1	Material y reactivos.....	39
3.2	Purificación y funcionalización de NTC.....	40
3.3	Inmovilización de la enzima lacasa en NTC y elaboración de electrodos modificados.....	41
3.4	Ensayo enzimático.....	42
3.5	Caracterización.....	43
3.6	Caracterización electroquímica.....	47
CAPÍTULO IV.....		48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		48
4.1	Caracterización de NTC.....	49
4.1.1	Microscopía electrónica de barrido.....	49
4.1.2	Difracción de rayos X (DRX).....	53
4.1.3	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	57

4.1.4	Espectroscopia Raman	59
4.2	Actividad enzimática	60
4.3	Caracterización del compósito por FTIR y Espectroscopia Raman	63
4.4	Caracterización electroquímica	67
4.4.1	Espectroscopia de Impedancia Electroquímica	67
4.4.2	Caracterización por voltimetría cíclica	71
5.5.3	Detección de catecol en solución	73
CAPÍTULO V		77
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		77
BIBLIOGRAFÍA.....		80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación de los métodos de inmovilización (Ruiz, 2006).	5
Figura 2. Inmovilización enzimática por atrapamiento.	6
Figura 3. Inmovilización enzimática mediante microencapsulación.	7
Figura 4. Inmovilización enzimática por adsorción en la superficie.....	8
Figura 5. Inmovilización enzimática mediante unión covalente, a) no orientada, b) orientada.....	9
Figura 6. Inmovilización enzimática mediante entrecruzamiento	9
Figura 7. Figura esquemática y principio de operación de un biosensor (Sassolas y col., 2012).....	11
Figura 8. Diversas estructuras de Carbono (a) Fullerenos (b) NTC de pared simple y (c) estructura de los NTC (Maubert y col., 2009).....	26
Figura 9. Diagrama esquemático de los NTC. A) pared simple. B) pared doble. C) multipared.....	27
Figura 10. Estructura 3D de la lacasa	34
Figura 11. Representación esquemática de la purificación y oxidación de los NTC	40
Figura 12. Purificación y funcionalización de NTC en HNO ₃ y H ₂ SO ₄ (1:3).	41
Figura 13. Microscopio Electrónico de Barrido	43
Figura 14. Difractómetro de polvos para DRX	44
Figura 15. Espectrofotómetro de IR	45
Figura 16. Espectrofotómetro Raman.....	46
Figura 17. Micrografía de los NTC (a) 5 000X (b) 20 000X	49
Figura 18. Micrografía de diámetro externo de los NTC 100 000X	50
Figura 19. Micrografía de los NTC oxidados (a) 5 000X (b) 20 000X	51
Figura 20. Micrografía de diámetro externo de los NTC oxidados 100 000X	51
Figura 21. Espectro EDS de los NTC antes de la oxidación	52
Figura 22. Espectro EDS de los NTC oxidados	52
Figura 23. Espectro de DRX de los NTC.	54

Figura 24. NTC sintetizados por deposición química de vapor (Mahanandia <i>et al.</i> , 2011).....	55
Figura 25. Espectro de DRX de los NTC oxidados	56
Figura 26. Patrones de DRX de NTC oxidados con H ₂ SO ₄ /HNO ₃ (Saleh, 2013). ..	56
Figura 27. FTIR de NTC antes (a) y después de la oxidación (b).	58
Figura 28. Espectro Raman de NTC antes (a) y después de la oxidación (b).	59
Figura 29. Actividad de la enzima lacasa libre e inmovilizada en NTC.	61
Figura 30. Actividad de la enzima lacasa (en el extracto) libre e inmovilizada en NTC.	62
Figura 31. FTIR GA (curva a), NTC (curva b) y NTC/LAC/GA (curva c).	64
Figura 32. FTIR GA (curva a), NTC (curva b) y NTC/EXT/GA (curva c).	65
Figura 33. Espectro Raman de NTC (curva a) y el compósito Lac/NTC/GA (curva b).....	66
Figura 34. Espectro Raman de NTC (curva a) y el compósito EXT/NTC/GA (curva b).....	67
Figura 35. Diagramas de Nyquist del EG (a), modificado con E-GA (b), NTC (c) y E-NTC-GA (d) en solución de KCl 1M que contiene K ₃ [Fe ₄ (CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0.1M.	68
Figura 36. Diagramas de Nyquist del EG (a), modificado con EXT-GA (b), NTC (c) y EXT-NTC-GA (d) en solución de KCl 1M que contiene K ₃ [Fe ₄ (CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0.1M.	69
Figura 37. Voltamperometría cíclica de E-GA (a), E-NTC-GA (b), EG (c) y NTC-GA (d) en solución de KCl 1M que contiene K ₃ [Fe ₄ (CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0.1M.....	71
Figura 38. Voltamperometría cíclica de EXT-GA (a), EXT-NTC-GA (b), EG (c) y NTC-GA (d) en solución de KCl 1M que contiene K ₃ [Fe ₄ (CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0.1M.	72
Figura 39. Voltametría cíclica del biosensor E-NTC-GA en SBP, curva (a) y en 5mM de catecol, curva (b)	74
Figura 40. Voltametría cíclica del biosensor EXT-NTC-GA en SBP, curva (a) y en 5mM de catecol, curva (b)	75

Figura 41. Voltametría cíclica del biosensor en SBP (negro), biosensor de lacasa (verde) y biosensor de extracto (azul) en 5mM de catecol.76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales polifenoles presentes en la dieta (Leighton, 1999)	21
Tabla 2. Clasificación de las enzimas según el tipo de reacción que catalizan (Mathews, 2002).....	29
Tabla 3. Valores de R_p de los electrodos modificados.	70

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A Ampers

ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfúrico)

CVD Deposición Química de Vapor

DRX Difracción de Rayos X

EDS Espectroscopia por Dispersión de Energía

EG Electrodo de Grafito

EIS Espectroscopia de Impedancia electroquímica

Ext Extracto enzimático crudo

FTIR Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier

GA Glutaraldehído

Lac Lacasa

m Mili

M Molar

MEB Microscopia Electrónica de Barrido

MWCNT Nanotubos de Carbón de Pared Múltiple

NAD⁺ Nicotin Adenin Dinucleótido (en su forma oxidada)

NTC Nanotubos de Carbono

SBF Solución Buffer de Fosfatos

SWCNT Nanotubos de Carbón de Pared Simple

V Volts

“Estudio comparativo de dos fuentes de enzima lacasa inmovilizada en nanotubos de carbono para su uso como biosensor en la detección de fenoles”

μ Micro

Ω Ohm

RESUMEN

En el presente estudio se utilizaron nanotubos de carbono (NTC) como soporte para la inmovilización de la enzima lacasa en el desarrollo de un biosensor amperométrico para la determinación de compuestos fenólicos en soluciones. La enzima utilizada proviene de dos fuentes: enzima lacasa comercial de *Trametes versicolor* (Sigma) y extracto enzimático crudo de *Trametes versicolor* (TA-CMU). Los NTC son estructuras artificiales novedosas que presentan buenas propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas. Estas propiedades han hecho a los NTC objeto de aplicación en la inmovilización de enzimas para la fabricación de biosensores. Los NTC utilizados en este estudio fueron purificados y oxidados mediante tratamiento ácido con una solución de HNO₃ y H₂SO₄ concentrados (1:3) para dejar la superficie cargada con el grupo carboxilo y llevar a cabo la inmovilización de la enzima. Posteriormente se caracterizaron estructural y morfológicamente mediante: DRX, espectroscopia de FTIR espectroscopia Raman y MEB. Se prepararon electrodos modificados con NTC, enzima y extracto, posteriormente se caracterizaron mediante Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) para identificar la interfase formada en la superficie del electrodo, mostrando la impedancia o resistencia al paso de iones que presenta la enzima por si sola y la presencia de los NTC unidos a la enzima mejoran el proceso de la transferencia de electrones. Finalmente se realizaron ensayos de Voltamperometría Cíclica en presencia de catecol para evaluar la detección, los valores de intensidad del pico de oxidación se determinó en 715.624 y 709.224 μ A para el biosensor elaborado con enzima comercial (E-NTC-GA) y el biosensor elaborado con el extracto crudo enzimático (EXT-NTC-GA), respectivamente, estos valores cercanos mostraron que el extracto es capaz de detectar el catecol de la misma forma que la enzima a la misma concentración del fenol.

Palabras clave: enzimas, nanotubos de carbón, inmovilización, compuestos fenólicos, biosensor.

ABSTRACT

In this work carbon nanotubes (CNT) are used as support for the immobilization of the laccase enzyme in developing of an amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds. The enzyme used comes from two sources, commercial laccase from *Trametes versicolor* (Sigma) and enzymatic crude extract of *Trametes versicolor* (TA-CMU). CNT are novel artificial structures, which have good mechanical, electrical and thermal properties. These properties have become the NTC application object in the immobilization of enzymes for manufacturing biosensors. The CNT used in this study were purified and oxidized by acid treatment with a solution of $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (1: 3) to leave the surface loaded with the carboxyl group and carry out immobilization it's. Then, they were characterized by, XRD, FTIR, Raman spectroscopy, and SEM. CNT modified enzyme electrodes were prepared extract and subsequently characterized by Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to identify the interface formed in the electrode surface, showing the impedance or resistance to passage of ions having the enzyme alone and NTC the presence of the enzyme attached to improving the process of electron transfer. Finally Cyclic Voltammetry tests were performed in the presence of catechol to evaluate the detection values of the peak intensity of oxidation was determined in 715.624 and 709.224 μA for the biosensor prepared with commercial enzyme (E-NTC-GA) and the biosensor made from Crude enzyme extract (EXT-NTC-GA), respectively, these values close showed that the extract is capable of detecting the catechol in the same way that the enzyme at the same concentration of phenol.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Los NTC son estructuras artificiales novedosas que presentan buenas propiedades físicas como su densidad, resistencia y conductividad térmica. Estas propiedades han hecho a los NTC objeto de una gran cantidad de estudios, los cuales han revelado un inmenso potencial de aplicación en diferentes áreas, como electrónica, física y biología. Los NTC poseen las características adecuadas para la inmovilización de enzimas surgiendo como un área de investigación importante aplicada a desarrollar técnicas de inmovilización para el desarrollo de biosensores como herramientas rápidas y confiables de análisis. El término inmovilización de enzimas se refiere a enzimas físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida en el espacio reteniendo sus propiedades y su actividad catalítica. Dependiendo del tipo de inmovilización las enzimas pueden ser inmovilizadas de forma permanente o temporal para ser utilizadas repetida y continuamente en diversas aplicaciones. La inmovilización combina la actividad elevada y específica de las enzimas con la estabilidad química y mecánica del soporte. El desempeño biocatalítico de las enzimas inmovilizadas depende principalmente de las propiedades de la enzima, el soporte, la técnica y las condiciones de inmovilización.

Entre los diferentes compuestos con propiedades antioxidantes, los compuestos fenólicos desempeñan un papel protector contra las enfermedades humanas asociadas con el estrés oxidativo. Estos se encuentran comúnmente presentes en las frutas, legumbres, verduras y varias bebidas [1]. Hoy en día, se dedica un gran esfuerzo para estudiar varios aspectos de los radicales libres, un tipo de compuestos inestables producidos durante los procesos metabólicos. Un exceso de radicales libres en el cuerpo humano, puede ser causado por la contaminación, la luz del sol o el humo de los cigarrillos promueve el daño oxidativo en las células, lo que acelera el proceso de envejecimiento. En consecuencia, durante los últimos años, se han reportado numerosos estudios dirigidos a evaluar la capacidad antioxidante de productos naturales, como los vinos, té e infusiones de hierbas. En particular, se ha prestado especial atención al desarrollo de nuevas

metodologías, como biosensores amperométricos basados en las enzimas tirosinasa, peroxidasa o lacasa, que se puede emplear como métodos alternativos para la determinación del contenido de compuestos fenólicos en los alimentos [2-6].

En este trabajo se describe el desarrollo y caracterización de dos tipos de biosensores basados para la determinación de polifenoles. La diferencia entre los biosensores es la fuente de enzima lacasa: lacasa comercial y extracto enzimático crudo de *Trametes versicolor* que contiene la enzima lacasa. Cada una se inmovilizó en NTC para formar el compósito Lac/NTC y Ext/NTC. Las técnicas de caracterización MEB, DRX, FTIR y espectroscopia Raman fueron utilizadas a lo largo del proceso de funcionalización y purificación de los NCT así como la inmovilización y desarrollo del biosensor, por último se utilizaron técnicas electroquímicas para evaluar su funcionamiento utilizando el catecol como sustrato fenólico.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente [7]. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte [8].

2.1.1 Métodos de inmovilización

El componente biológico de cualquier biosensor tiene que ser incorporado en el dispositivo de manera que se garantice su actividad si posee propiedades catalíticas o bien que, el sitio de unión en el que se produce la interacción con el analito se encuentre accesible al mismo. Por ello la adecuación del proceso de inmovilización de este componente esencial es determinante en el desarrollo de un biosensor [9].

Es el proceso más importante en la fabricación de un biosensor, ya que características tan importantes como el tiempo de vida o la sensibilidad dependen en gran medida de la metodología de inmovilización utilizada. En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos categorías (Figura 1): Retención física y Unión química [10].

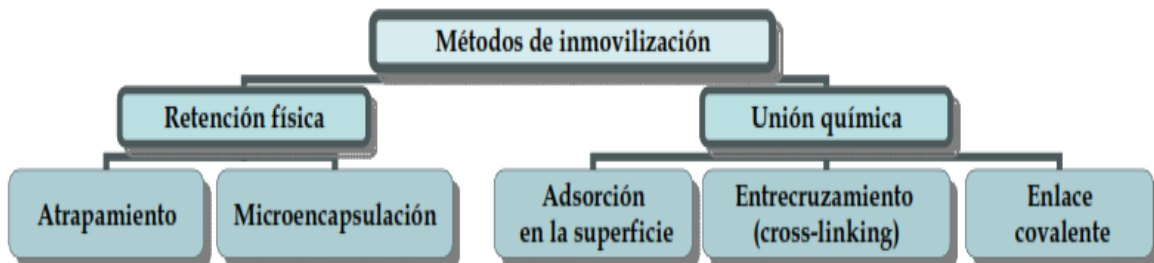


Figura 1 Clasificación de los métodos de inmovilización (Ruiz, 2006).

2.1.1.1 Retención física

ATRAPAMIENTO

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano (Figura 2). El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, aunque suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína [11].

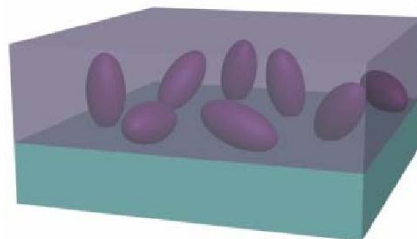


Figura 2. Inmovilización enzimática por atrapamiento.

Es una técnica de gran sencillez desde el punto de vista experimental y no requiere de gran cantidad de material biológico. Como ventaja adicional, la enzima

no sufre ninguna alteración en su estructura uno de los inconvenientes es la gran barrera creada que dificulta la difusión del analito hasta el centro activo de la enzima, aumentando el tiempo de respuesta del sensor [10].

MICROENCAPSULACIÓN

En esta técnica, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima (Figura 3) [10]. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 μm de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos [11].

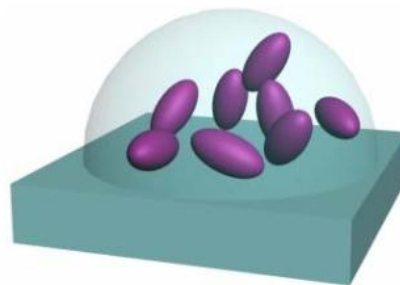


Figura 3. Inmovilización enzimática mediante microencapsulación.

2.1.1.2 Unión química

ADSORCIÓN EN LA SUPERFICIE

En la adsorción la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno (Figura

4). Se suelen utilizar diferentes sustancias con gran capacidad de absorber el material biológico, como por ejemplo alúmina, arcillas, grafito y sílica gel [10].

Una variante dentro de la técnica de la adsorción consiste en emplear resinas de intercambio iónico, las cuales contienen grupos funcionales y contraiones móviles. Estos contraiones se pueden intercambiar reversiblemente por otros iones de la misma carga, sin que se produzcan cambios en la matriz insoluble [11].

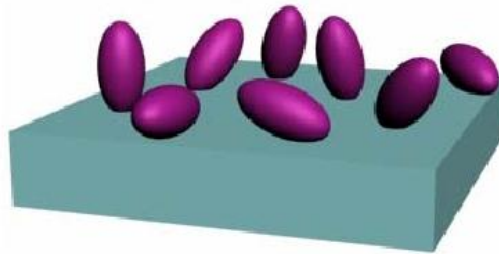


Figura 4. Inmovilización enzimática por adsorción en la superficie.

UNIÓN COVALENTE

La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con grupos nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente [11].

Este tipo de inmovilización precisa el control de parámetros como el pH o la fuerza iónica de la solución, así como disponer de una superficie del transductor perfectamente limpia. La gran ventaja de este método es que permite conseguir tiempos de vida muy largos, entre 4 y 14 meses. En la Figura 5 se muestran dos

tipos de inmovilización mediante unión covalente existentes, en función si la enzima está o no orientada [10].

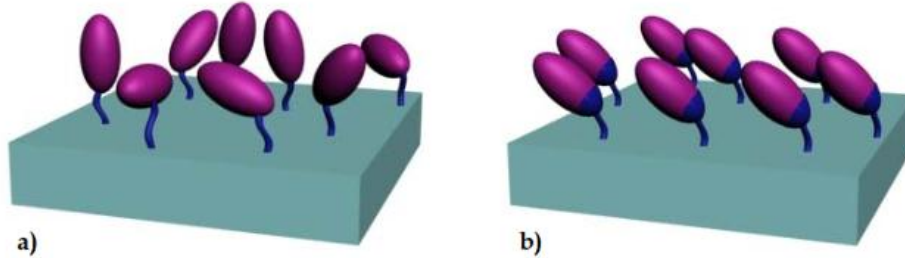


Figura 5. Inmovilización enzimática mediante unión covalente, a) no orientada, b) orientada.

ENTRECRUZAMIENTO (CROSS-LINKING)

Esta es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para la estabilización de enzimas [12]. El método consiste en la utilización de reactivos bifuncionales (dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio, e incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida) que originan uniones intermoleculares entre moléculas de enzima (Figura 6). Los entrecruzadores más utilizados son glutaraldehído, hexametildisocianato y 1,5-dinitro2,4-diflorobenceno [13].

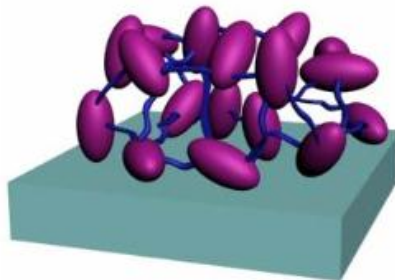


Figura 6. Inmovilización enzimática mediante entrecruzamiento

Actualmente el método más novedoso de cross-linking consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas. Esta tecnología se ha aplicado a enzimas muy diferentes, las cuales se han utilizado en la obtención de compuestos enantioméricamente puros y en la síntesis de péptidos [11].

La inmovilización de enzimas por reticulación con glutaraldehído u otros agentes bifuncionales, como glioxal o hexametildiamina es otro enfoque bien conocido para desarrollar biosensores. Este método es atractivo debido a su simplicidad y la fuerte unión química que se logra entre biomoléculas. El principal inconveniente es la posibilidad de pérdidas de actividad debido a la distorsión de la enzima de conformación activa y las alteraciones químicas del sitio activo durante el entrecruzamiento [14].

2.2 Sensores químicos y biosensores

Un sensor químico es un dispositivo que como resultado de una interacción química con el analito, transforma información química de tipo cualitativa o cuantitativa en una señal medible y útil analíticamente [15]. Los sensores químicos se caracterizan por sus dimensiones reducidas, robustez, facilidad de uso y capacidad de suministrar información analítica fiable de manera continua.

Los sensores químicos normalmente están formados por dos componentes básicos interconectados: un sistema de reconocimiento molecular (receptor) y un transductor físico-químico. El receptor es capaz de reconocer selectivamente un determinado analito. Como consecuencia de este reconocimiento se produce una

señal primaria de tipo térmica, eléctrica, óptica o másica. El transductor es el responsable de transformar dicha señal en otra de tipo eléctrica. La señal eléctrica producida aporta información analítica sobre la muestra, el proceso o el sistema que se investiga [16-18].

La definición de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) dice que: el término biosensor se reserva para definir un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico, o biomimético, íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico, que en presencia del analito produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo proporcional a la cantidad presente del mismo [19]

En la Figura 7 se muestra el principio de operación de un biosensor, el cual, comenzando desde el analito, puede proveer toda la información necesaria para su evaluación. Esta información puede ser procesada y almacenada.

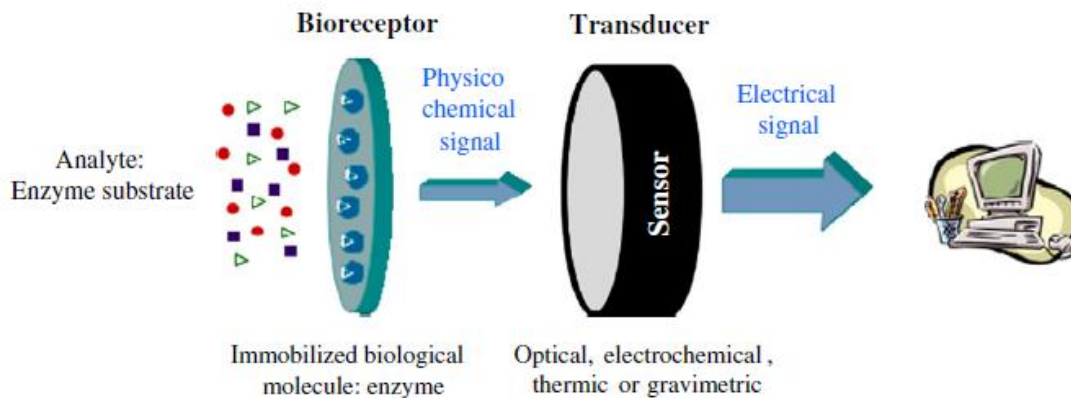


Figura 7. Figura esquemática y principio de operación de un biosensor (Sassolas y col., 2012).

El biosensor está en contacto directo con la muestra a través de un biorreceptor, que le confiere la selectividad a través de un sitio selectivo que identifica al analito y lo transforma de alguna manera. Generalmente el biorreceptor es una enzima inmovilizada que transforma el analito en un producto que es detectable por el transductor. Estos cambios que se producen al identificar un analito pueden ser: variaciones en la temperatura, masa, constante dieléctrica, potencial de media

celda, conductividad iónica, de turbidez de la muestra, entre otros. Por tanto, dependiendo de la modificación bioquímica que se produzca, se elegirá el transductor. El transductor debe dar una señal óptima, sensible, fácil de monitorear y con el mínimo de ruido. El transductor puede ser: electroquímico (potenciométrico, amperométricos, semiconductores), termométrico, fotométrico o piezoeléctrico y de acuerdo al tipo de biorreceptor con el que se combina pueden formarse múltiples tipos de biosensores [11, 20].

Las características más destacables de los biosensores, que los convierten en opciones altamente atractivas como herramientas analíticas son: su especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta que conduce a un corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad y bajo costo, entre otras.

2.2.1 Clasificación de biosensores

En el caso de los biosensores, son clasificados de acuerdo a la naturaleza (moléculas, conjunto de células, etc.) o de la función (afinidad o catálisis) del elemento de bioreconocimiento. El aislamiento y/o purificación son requeridos en el orden de obtener el mejor desempeño del sensor [21].

2.2.1.1 Naturaleza del material biológico

BIOSENSORES CATALÍTICOS

Cuyos receptores pueden ser enzimas, tejidos o células. Son los biosensores mejor conocidos y los más aplicados. Se basan en la utilización de biocatalizadores, que son elementos capaces de producir una reacción química

sin consumo del biocatalizador, que se regenera y puede ser utilizado de nuevo. Pueden utilizarse para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción, detectando la desaparición de algún co-sustrato o la aparición de algún producto. Para aumentar la estabilidad del material biológico se utilizan distintos sistemas de inmovilización que se describen posteriormente.

BIOSENSORES DE AFINIDAD

Donde los receptores son anticuerpos, ácidos nucleicos, etc. Se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin que exista transformación catalítica, sino que se produce una reacción en la que se forma un complejo analito-receptor. Para medir la interacción, ya que no existe consumo de sustratos ni generación de productos, se suele utilizar un marcador del receptor o de un elemento que compita con el analito por la unión al receptor, es habitual el uso de enzimas como marcadores ya que permiten detectar mediante el sistema de transducción alguno de los componentes de la reacción biocatalítica complementaria. El inconveniente que plantea este sistema es la necesidad de incluir pasos posteriores de lavado y separación del exceso de moléculas marcadas y la adición de sustratos para que ocurra la reacción que cataliza la enzima que se usa como marcador [22].

Varias moléculas o conjunto de células pueden ser usadas como elementos de bioreconocimiento y los más importantes son:

INMUNOSENSORES

Están basados en la interacción antígeno-anticuerpo y la transducción del evento de bioreconocimiento en una señal física. El diseño y la preparación de una interfaz óptima entre el elemento biológico y el material detector es la clave para este tipo de sensores.

BIOSENSORES BASADOS EN CONJUNTO DE CELULAR U ORGÁNELOS

Los biosensores de conjuntos de células bacterianas es una ingeniería bacteriana para reconocer un analito específico. La señal de transducción es realizado por la producción de un marcador de proteína fácilmente identificable. En la mayoría de los casos, un existente sistema regulatorio en las células bacterianas es explotado a la unidad de expresión de un gen reportero, como la proteína bacteriana verde fluorescente.

BIOSENSORES BASADO EN DNA

Los biosensores de DNA son comúnmente empleados para detectar secuencias específicas de DNA. Estos pueden alcanzar altos niveles de selectividad y afinidad basados en la hibridación entre el objetivo del ADN y su sonda complementaria, la cual está presente en un soporte o en solución o sólido. Se han desarrollado ensayos homogéneos que permiten la determinación de secuencias de DNA. Estos sistemas pueden basarse en detecciones ópticas o electroquímicas.

BIOSENSORES BASADOS EN PROTEÍNAS

Sensores basados en proteínas requieren que las proteínas se sometan a cambios conformacionales al unirse con el ligando. Después, la señal de transducción pueden ser cuantitativamente monitoreados. Detecciones fluorescentes y/o mediciones electroquímicas, han sido reportadas. Por lo tanto, se ha prestado una considerable atención para desarrollar un biosensor compacto, ligero y portátil para este tipo de reconocimiento de las moléculas.

BIOSENSORES BASADOS EN APTÁMEROS

En los aptámeros in vitro pueden ser seleccionados los oligonucleótidos funcionales que se unirán a una molécula específica. Debido a su inherente selectividad, afinidad y sus ventajas sobre los elementos de reconocimiento tradicionales, estos, representan una interesante alternativa para los biosensores. Los aptámeros son pequeños en tamaño en comparación con otras moléculas de bioreconocimiento como los anticuerpos, las proteínas y las enzimas. Esto permite una inmovilización eficiente en una alta densidad. Por lo tanto, la producción, miniaturización, integración y automatización de los biosensores puede ser logrado más fácilmente con aptámeros que con anticuerpos

BIOSENSORES ENZIMÁTICOS

Esa clase de biosensor utiliza enzimas como biocatalisis. Las enzimas reaccionan con el analito o el sustrato, produciendo una señal detectable a través de este proceso de bioreconocimiento [21].

2.2.1.2 Sistemas de transducción

Los transductores son dispositivos que convierten la información correspondiente a las variaciones de las propiedades fisicoquímicas, inducidas como consecuencia de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito, en magnitudes eléctricas cuantificables. Esta transformación permite que las señales puedan ser amplificadas, almacenadas y registradas.

Como se ha indicado anteriormente, existen varios tipos de transductores que pueden emplearse en la fabricación de biosensores. La utilización de un transductor u otro dependerá del propio elemento de reconocimiento empleado, de la naturaleza de la interacción entre éste y el analito y del mecanismo de señalización producido por el marcador utilizado si lo hubiere [9].

TRANSDUCTORES 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.

Se utilizan tanto métodos de detección directa como métodos de detección indirecta, en la que es necesario utilizar marcadores, adaptándose igualmente a sistemas biocatalíticos como de bioafinidad. Entre los transductores que utilizan propiedades ópticas se incluyen los sensores de fibra óptica (optrodos) y los sensores de onda evanescente [9, 22].

TRANSDUCTORES PIEZOELÉCTRICOS

Los sistemas de transducción piezoeléctricos, másicos, gravimétricos o acústicos miden cambios directos de masa inducidos por la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Los materiales que se utilizan para el diseño de este tipo de biosensores son materiales piezoeléctricos. Estos cristales se recubren con el elemento de reconocimiento que suele ser de bioafinidad y se ponen en contacto con la muestra que contiene el analito. La señal medida es la variación observada en la frecuencia de oscilación antes y después de que se produzca la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito [22].

Los sensores piezoeléctricos pueden adoptar dos modos distintos de funcionamiento, según el tipo de onda acústica implicada. Unos son los denominados tipo SAW (*Surface Acoustic Wave*) donde la resonancia ocurre sólo en la superficie del cristal, al tratarse de ondas transversales superficiales cuya

energía se encuentra confinada en una zona de la superficie equivalente a una longitud de onda. El otro modo corresponde a los tipo BAW (*Bulk Acoustic Wave*) que son ondas de volumen que atraviesan el cristal y por tanto la resonancia ocurre en toda la masa del mismo. El dispositivo que utilizan estas últimas se conoce comúnmente como la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) [9].

TRANSDUCTORES TERMOMÉTRICOS

Se basan en la detección del calor generado en las reacciones enzimáticas exotérmicas, que se puede relacionar con la concentración de 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.

Dado que la mayor parte de las reacciones bioquímicas son de naturaleza exotérmica en mayor o menor grado, la calorimetría ofrece un sistema de detección para numerosos analitos, especialmente en aquellos en que media una catálisis enzimática. Estas reacciones están asociadas con cambios relativamente elevados en la entalpía molar, en un intervalo entre 20 y 100 KJ mol⁻¹ (catalasa-peróxido de hidrógeno $-\Delta H = 100 \text{ mol}^{-1}$, glucosa oxidasa-glucosa $-\Delta H = 80 \text{ KJ mol}^{-1}$). Presentan la ventaja de que las medidas se pueden llevar a cabo sólo sobre la base de la catálisis enzimática y sin la necesidad del concurso de otras reacciones, como la adición de un segundo reactivo. En la actualidad existen calorímetros sencillos y de bajo coste que permiten su utilización rutinaria, especialmente en clínica [9, 22].

TRANSDUCTORES MAGNÉTICOS

El empleo de partículas magnéticas representa una poderosa y versátil herramienta en el diagnóstico en biología y medicina. Dos instrumentos se utilizan fundamentalmente para este fin. Los magnetómetros y los microscopios basados

en el dispositivo SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device* o dispositivo superconductor de interferencia cuántica). Un SQUID consiste, básicamente, en un toroide de material superconductor con una pequeña discontinuidad, que se conoce como “*unión Josephson*”. Mediante un proceso puramente cuántico puede usarse para medir variaciones casi infinitesimales en los campos magnéticos [9].

TRANSDUCTORES 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 [22].

TRANSDUCTORES 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, 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 [22].

- ***Biosensores potenciométricos***

Basados en medidas potenciométricas, suelen emplearse electrodos selectivos a iones (*Ion Selective Electrode ISE*), con los que se determina la variación en la concentración de un ión, inducida mediante una reacción catalizada por una enzima. Las variaciones en la medida de los potenciales vienen determinadas por la ecuación de Nerst y en el caso de los electrodos enzimáticos se encuentra afectada por el valor de K_m de la enzima utilizada. La respuesta sólo será lineal a concentraciones de sustrato inferiores a la equivalente a la décima parte del valor de dicha K_m . Las configuraciones más empleadas en este tipo de biosensores utilizan el electrodo de vidrio, el electrodo de amoníaco, el de yoduro y el sensor de anhídrido carbónico, en combinación con diferentes enzimas inmovilizadas en la proximidad del electrodo, mediante membranas del tipo poliacrilamida.

Los electrodos selectivos a iones deben su respuesta a la diferencia de potencial que se genera a ambos lados de una membrana, con propiedades de unión selectiva para un determinado ión, que separa la disolución objeto de análisis y un electrolito interno de concentración invariable.

- ***Biosensores conductimétricos e impedimétricos***

Las variaciones en la conductividad de un medio, debidas a la transformación catalítica de un sustrato en sus productos correspondientes, pueden también detectarse mediante un sistema integrado de electrodos planos interdigitados, a través de la medida de su impedancia.

El ejemplo quizás más característico lo constituye el biosensor de urea, fabricado mediante la inmovilización de ureasa sobre la superficie del sistema de electrodos. Esta enzima en presencia de urea cataliza su transformación en el ión bicarbonato y amoníaco, con el consiguiente aumento en la conductividad del medio [9].

- **Biosensores amperométricos.**

Se basan en la medida de las corrientes *faradaicas* resultantes de los intercambios de electrones que se producen entre las enzimas que constituyen el sistema de biorreconocimiento y un electrodo mantenido a un potencial apropiado. La posibilidad de poder incorporar en el electrodo otros componentes, como mediadores redox, cofactores u otras biomoléculas, confiere a este tipo de biosensores una gran versatilidad de uso.

La mayor parte de los biosensores amperométricos utilizan las enzimas del grupo oxido-reductasas, dado que los productos consumidos o producidos durante el proceso de óxido-reducción, suelen ser fácilmente transducibles amperométricamente.

2.3 Compuestos fenólicos

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes por su estructura química (donador de H^+ o electrones) necesarios para el funcionamiento de las células vegetales; que se encuentran en frutas y verduras, por ejemplo, manzanas y cebollas, y en bebidas como té y vino [23]. Se clasifican de acuerdo con el número de átomos de carbono del esqueleto base (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Principales polifenoles presentes en la dieta (Leighton, 1999)

Átomos de carbono	Esqueleto	Tipo	Ejemplos presentes en vino
6	C ₆	Fenoles simples benzoquinonas	Ácido gálico
7	C ₆ - C ₁	Ácidos fenólicos	Tirosol
8	C ₆ - C ₂	Derivados de tirosina y ácidos fenilacéticos	Ácido caféico
9	C ₆ - C ₃	Ácidos cinámicos fenilpropénicos cumarinas	
10	C ₆ - C ₄	Naftoquinones	
13	C ₆ - C ₁ - C ₆	Xantonas	
14	C ₆ - C ₂ - C ₆	Estibenos antraquinones	Resveratrol
15	C ₆ - C ₃ - C ₆	Flavonoides isoflavonoides	Quercitina ciandina catequina miricetina maldivina
18	(C ₆ - C ₃) ₂	Lignanos Neolignanos	
30	(C ₆ - C ₃ - C ₆) ₂	Bioflavonoides	
n9	(C ₆ - C ₃) _n	Ligninas	
n6	(C ₆) _n	Melaninas catecolinas	Procianidina
n15	(C ₆ - C ₃ - C ₆) _n	Taninos condensados	

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 [24]. 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 [6].

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 [25].

En la industria alimentaria los polifenoles se usan para incrementar el tiempo de conservación de los alimentos, 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 [24].

Por otro lado, las propiedades organolépticas de ciertas frutas, y consecuentemente, 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 autooxidación y de sus características organolépticas [25].

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 tinto, contiene un alto número de ácidos fenólicos (cumarínico, cinámico, cafeico, gentísico, ferúlico y vanílico), trihidroxi estilbenos (resveratrol y polidatina), y flavonoides (antocianinas, catequina, epicatequina, miricetina, kaempferol, 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 [26].

En el área ambiental los compuestos fenólicos son contaminantes que aparecen en los efluentes de numerosas industrias, como la fabricación de conservas vegetales, plásticos, resinas, pinturas, industrias papeleras, textiles, etc. Su presencia es perjudicial, tanto para el medio ambiente, como para la salud humana, al tratarse de sustancias tóxicas y corrosivas difíciles de degradar. Recientemente, 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 [24].

2.3.1 Métodos de determinación de compuestos fenólicos

En la actualidad, este grupo de compuestos presentan un gran interés debido a sus diversas aplicaciones y por lo mismo se han desarrollado distintos métodos para su análisis. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos, así como sus diferentes estructuras químicas, han traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación [27].

Dentro de las técnicas analíticas que se disponen actualmente para el análisis de compuestos fenólicos se encuentran las técnicas cromatográficas como son la cromatografía de capa fina (TCL), la cromatografía de gases (CG) y la de líquidos de alta resolución (HPLC), y también se encuentran las técnicas espectrofotométricas, dentro de estos métodos está el ensayo de Folin-Ciocalteu [6, 27-29].

De Las técnicas de identificación de compuestos fenólicos HPLC es la técnica más utilizada. Los sistemas de detección más empleados en HPLC son espectrofotometría UV-visible con fotodiodos en serie, espectrometría de masas y detección electroquímica. 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 [25, 30].

Los métodos colorimétricos son frecuentemente usados para la determinación de compuestos fenólicos [28] y 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 [22].

Los inconvenientes de estas técnicas es que son métodos en los que se necesita algún tratamiento o preparación de la muestra, largos tiempos y altos costos de análisis. Debido a esto se ha recurrido al desarrollo de varias técnicas de determinación de compuestos fenólicos para la monitorización de los alimentos en tiempo real ya sea en el proceso, en la manipulación o almacenado [6].

Por otro lado, los métodos electroquímicos constituyen una alternativa interesante para la detección de distintos compuestos de interés, especialmente los fenólicos, sustancias electroactivas fácilmente oxidables. Estos métodos analíticos son poco costosos, sencillos, utilizan cortos tiempos de análisis, su determinación es en tiempo real y se tiene una buena reproducibilidad. Por estas razones, los métodos electroquímicos constituyen una alternativa para la detección de compuestos fenólicos, y dentro de estos métodos se encuentran los que utilizan biosensores [25].

Las características más destacables de estos dispositivos que los convierten en opciones altamente atractivas para competir con otras tecnologías son: su especificidad, su alta sensibilidad, su corto tiempo de análisis, su capacidad de

inclusión en sistemas integrados, su facilidad de automatización, su capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad que permite el diseño de dispositivos a la carta, y su bajo coste, entre otras [31].

Debido a las diferentes ventajas que poseen los biosensores, la combinación de varias de ellas podría situar a muchos de estos dispositivos en una posición ventajosa frente a las técnicas de análisis convencionales (cromatografía, espectrometría, etc). Además, permiten que sean aplicables a la monitorización en tiempo real de procesos industriales [32, 33].

2.4 Nanotubos de carbono

En 1991 Iijima descubrió accidentalmente la aparición de nuevas formas de carbono, que en principio se pensó eran fullerenos (Figura 8a). Sin embargo, estas nuevas macromoléculas eran pequeños tubos de medidas nanométricas, que en sus polos tenían lo que parecía ser la mitad de una buckiesfera; así se realizó el descubrimiento de los primeros NTC, los cuales eran de pared múltiple (NTCPM o SWCNT por sus siglas en inglés) (Figura 8b), que consistían en varios tubos acomodados entre ellos en forma concéntrica [34]. En 1993 se descubrieron los primeros NTC de pared simple (NTCPS o SWCNT por sus siglas en inglés), la forma más sencilla de NTC, que consiste en un solo tubo, sin más capas que la del tubo mismo (Figura 8c) [35, 36].

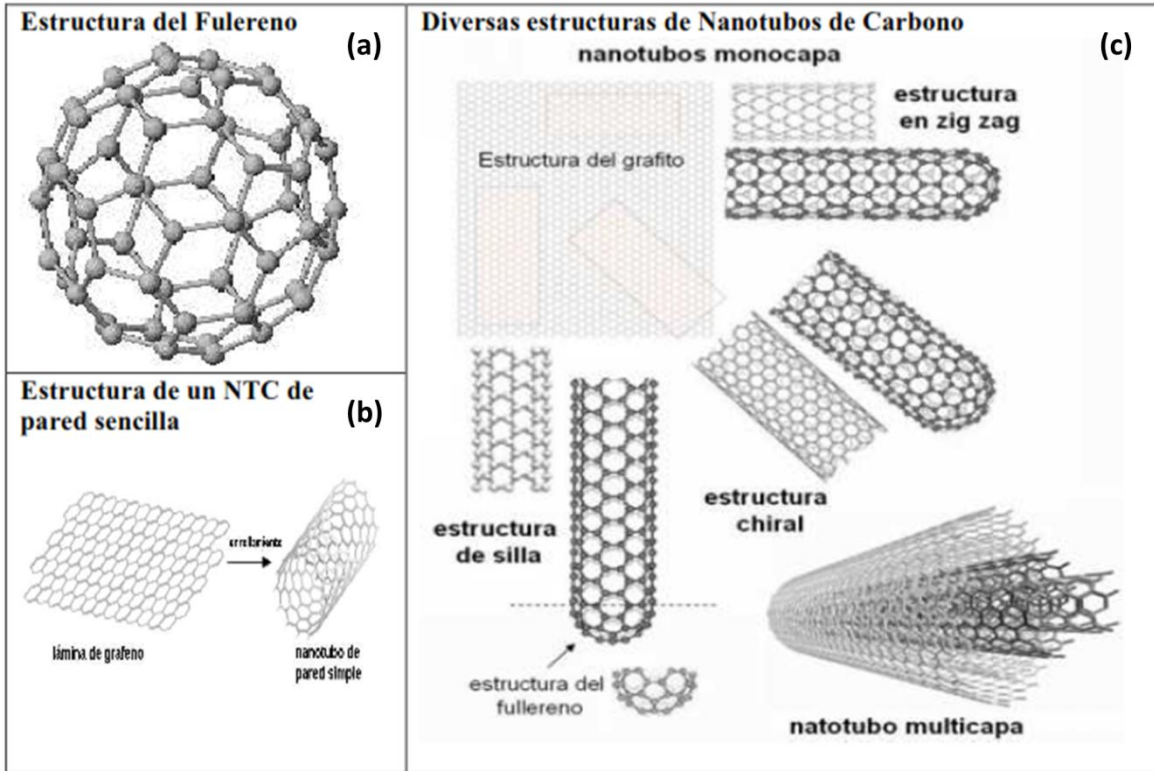


Figura 8. Diversas estructuras de Carbono (a) Fullereno (b) NTC de pared simple y (c) estructura de los NTC (Maubert y col., 2009)

Llamados anteriormente nanocables fullerénicos o fullerenos cilíndricos [37], los NTC consisten en una hoja de grafito enrollada en sí misma hasta formar un cilindro, con diámetros exteriores que varían de 0,4 a 5nm [38, 39]. La estructura de ambos tipos de NTC (de pared simple y multipared) consta de enlaces puros de carbono unidos entre sí por un enlace covalente híbrido sp^2 [34] y se caracterizan por tener propiedades eléctricas, mecánicas, ópticas, térmicas, y electrónicas inusuales, a partir de las cuales se predicen aplicaciones biológicas [40].

Los nanotubos pueden ser abiertos o cerrados, en cuyo caso la estructura que cierra el nanotubo es similar a la mitad de un fullereno. Los nanotubos también pueden ser de monocapa (de una sola capa, Figura 9 A), dos capas (doble capa, Figura 9 B) o multicapa (varias capas concéntricas, Figura 9 C).

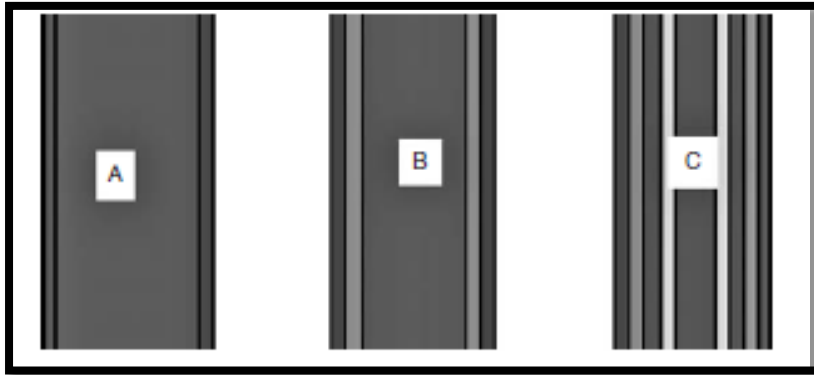


Figura 9. Diagrama esquemático de los NTC. A) pared simple. B) pared doble. C) multipared.

Desde entonces, ha habido una intensa actividad científica relacionada a la síntesis y propiedades de los NTC, así como también de sus aplicaciones en varias áreas de la ciencia. De hecho, los NTC representan uno de los mejores ejemplos de las nanoestructuras, derivadas del progreso de la síntesis química de nuevos materiales. Es importante destacar, que lo NTC poseen una composición química y configuración atómica sencilla, sin embargo, dentro de los nanomateriales conocidos hasta hoy día estos exhiben, posiblemente, la más vasta diversidad y riqueza en relación a sus estructuras y propiedades intrínsecas. Es decir, existe un gran número de posibilidades en los tipos de moléculas de NTC que pueden ser obtenidos, ya que cada NTC puede presentar propiedades físicas distintas a otros NTC preparados en condiciones diferentes. En este sentido, la síntesis controlada de NTC abre interesantes oportunidades en el campo de la nanotecnología, dado que es una forma de controlar también sus propiedades eléctricas y mecánicas. Por ejemplo, la funcionalización química de los NTC permite su empleo como catalizadores, sensores moleculares y aun sirviendo como interfase en sistemas biológicos [41].

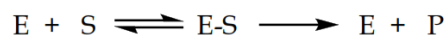
Uno de los métodos más empleados en la purificación de NTC recurre al tratamiento con ácidos concentrados, la funcionalización de nanotubos de carbono ha sido un área de crecimiento dentro del campo de la nanotecnología que tiene como objetivo incrementar la afinidad de los tubos y mejorar su reactividad

química con otras moléculas [42]. Se ha estudiado que el empleo de esta técnica genera defectos y en algunos casos puede llegar a dañar la superficie de los nanotubos, sin embargo estos defectos (rompimiento de enlaces) pueden dar lugar a la formación de grupos funcionales que contienen átomos de oxígeno, como ácidos carboxílicos, lactonas, cetonas, anhídridos carboxílicos y fenol entre otros [43-46].

Los NTC representan buenos soportes a nanoescala debido a su facilidad de oxidación a partir de los ácidos para producir grupos de ácido carboxílico e hidroxilo hidrófilos a lo largo de sus paredes laterales [47]. Por otra parte su área superficial pueden conducir a la inmovilización de enzimas, mientras que su alta estabilidad térmica y mecánica los hace susceptibles para su uso como soportes sólidos para la unión de proteínas [48].

2.5 Enzimas

Las enzimas son proteínas capaces de catalizar una reacción química. Reaccionan de manera selectiva con una analito o familia de analitos, acelerando la reacción química, y sin consumirse. El mecanismo básico de la catálisis enzimática es el siguiente:



Donde S es el sustrato, E la enzima, ES es el complejo enzima-sustrato y P es el producto.

La actividad enzimática está regulada por el pH del medio, la fuerza iónica, la temperatura y, requiere en algunos casos, la presencia de un cofactor. El cofactor es un producto químico no proteico necesario para que la reacción enzimática se lleve a cabo por ejemplo NAD^+ u oxígeno.

Las enzimas están formadas por una estructura tridimensional compuesta por péptidos con una zona activa que reacciona con el sustrato. Esta zona activa, que confiere especificidad a la enzima, suele estar situada en el interior de la enzima [10]

2.5.1 Clasificación de enzimas

Existen diferentes tipos de enzimas, clasificados según el tipo de reacción que llevan a cabo (Tabla 2) [49]. 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 y debido a sus propiedades de transferencia durante la catálisis [33].

Tabla 2. Clasificación de las enzimas según el tipo de reacción que catalizan (Mathews, 2002)

CLASIFICACIÓN	REACCIÓN CATALIZADA
1. Oxido-reductasas	Reacciones de óxido-reducción.
2. Transferasas	Transferencia de un grupo químico de un sustrato a otro.
3. Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
4. Liasas	Adiciones de grupos a dobles enlaces o formaciones de dobles enlaces por eliminación de grupos.
5. Isomerasas	Catalizan la interconversión de isómeros.
6. Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O Y C-N por reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP.

2.5.1.1 Transferasas

Son las enzimas que catalizan aquellas reacciones celulares donde un grupo de átomos se transfiere de un sustrato a otro. La subclase especifica los grupos que se transfieren (metilos, formilos, carboxilos, acilos, glicosilos, alquilos, arilos, grupos nitrogenados, fosforilos, que contienen azufre); la subsubclase detalla aspectos de esos grupos como el tamaño, la constitución más específica y los grupos que actúan como receptores. Las transferasas comunes son: las fosfotransferasas, las aminotransferasas, las metiltransferasas, las glicosiltransferasas, las transcetolasas y las transaldolasas [50, 51].

2.5.1.2 Hidrolasas

Son las enzimas que realizan la ruptura de un gran número de biomoléculas usando como cosustrato a la molécula de H₂O. La subclase especifica el tipo de enlace que se rompe (éster, éter, glicosídico, peptídico), y la subsubclase indica los átomos involucrados en esos enlaces. Las hidrolasas más comunes incluyen a las lipasas, las glicosidasas, las proteinasas y las fosfatasas [52].

2.5.1.3 Liasas

Son las enzimas que causan rupturas no oxidativas, no reductivas y no hidrolíticas en las moléculas. Tales rupturas ocasionan normalmente la salida de otra molécula como CO₂, H₂O, NH₃, SH₂, R-NH₂ y OHC-COOH. La subclase indica el tipo de enlace que se rompe (C-C, C-O, C-N, C-S), y la subsubclase especifica el grupo funcional implicado en el enlace (carboxi, aldehído, cetona, etc.). Las liasas más comunes son: descarboxilasas (carboxi-liasas), deshidratasas (hidro-liasas), desaminasas (amonio-liasas), y las carboxilasas que no requieren ATP [53].

2.5.1.4 Isomerasas

Comprende las enzimas encargadas de catalizar conversiones entre los diferentes tipos de isómeros: estructurales, geométricos y ópticos. La subclase indica el tipo de isomería implicada (óptica, cis-trans, de grupo funcional, de posición), y la subsubclase especifica el grupo funcional sobre el cual se actúa, o el que se convierte o se transpone. Entre las isomerasas más frecuentes están las racemasas, las epimerasas, las mutasas, las cis-trans isomerasas y las isomerasas de grupo funcional [54].

2.5.1.5 Ligasas

Se agrupan aquí las enzimas que catalizan la formación de nuevas sustancias, ya sea agregando a un sustrato grupos como CO_2 , NH_3 , HSCoA (coenzima A), o condensando varias sustancias para generar otra diferente. Tales síntesis y condensaciones requieren el consumo de energía, expresamente contenida en un nucleótido como ATP y GTP. La subclase indica el enlace nuevo que se forma (C-O, C-S, C-N, C-C), y la subsubclase especifica los grupos que contienen a esos enlaces: éster, tioéster, amino, amido, etc. Las ligasas más frecuentes son las carboxilasas y las sintetisas [55].

2.5.1.6 Oxido-reductasas

Entre las enzimas disponibles comercialmente, las más utilizadas son las correspondientes a la familia de las óxido-reductasas. Se trata de enzimas muy estables que catalizan reacciones de óxido-reducción y que pueden acoplarse a distintos sistemas de transducción, como dispositivos potenciométricos, amperométricos, optoelectrónicos, calorimétricos y piezoeléctricos, mediante diferentes técnicas de inmovilización química [9].

Las enzimas fueron los primeros bioreceptores utilizados y siguen siendo hoy en día los más empleados para la fabricación de biosensores. Una de las grandes ventajas de la utilización de enzimas, a parte de su alta selectividad, es su menor

tiempo de respuesta en relación con los otros tipos de bioreceptores. Como inconvenientes, se debe tener en cuenta que pierden actividad al ser inmovilizadas sobre la superficie del electrodo y tienen un tiempo de vida relativamente corto [10].

Lignina Peroxidasa

Las peroxidases han sido las enzimas ligninolíticas más estudiadas desde el aislamiento en 1983 de la lignina peroxidasa (LiP) producida por *P. chrysosporium* [56, 57]. La purificación de la lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14) abrió nuevos horizontes en el conocimiento del mecanismo de degradación de la lignina por parte de los hongos de podredumbre blanca. Esta hemoproteína se diferencia de otras peroxidases no ligninolíticas en su alto potencial de oxidorreducción y en su preferencia para oxidar compuestos aromáticos no fenólicos mediante la sustracción de un único electrón del anillo aromático, dando lugar a la formación de radicales catiónicos aromáticos [58]. Estos radicales, muy inestables, sufren posteriormente una serie de reacciones no enzimáticas que dan lugar a la ruptura de enlaces carbono-carbono, desmetoxilaciones, descarboxilaciones, formación de quinonas, etc. [59].

Manganeso Peroxidasa

La manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) fue descrita por primera vez también en *P. chrysosporium* [60]. Esta enzima requiere iones Mn^{2+} para cerrar su ciclo catalítico, elemento abundante en los materiales lignocelulósicos [61]. Además, esta enzima también puede oxidar compuestos no fenólicos a través de otros intermediarios, entre los que se encuentran radicales derivados de tioles o lípidos insaturados [62-64]. En este sentido, se ha comprobado que la despolimerización de lignina *in vitro* por manganeso peroxidasa es favorecida por la presencia de tioles (como el glutatión) y ácidos grasos insaturados o derivados

(como el Tween 80), que actúan como cooxidantes a través de un mecanismo de generación de radicales libres [65].

Este tipo de peroxidasas se han encontrado en la mayoría de hongos que degradan lignina [66, 67], detectándose además en procesos naturales de degradación de lignocelulosa [68].

Lacasa

La lacasa (bencenodiol: oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) es una enzima oxidasa, cataliza reacciones redox que involucran al oxígeno molecular, que contiene varios átomos de cobre en su estructura. La lacasa está presente en multitud de plantas [69, 70], hongos [71], bacterias [72] e incluso en algunos insectos [73]. Donde más extendida está su presencia es entre las plantas, en las cuales se encarga de sintetizar la lignina, que se constituye como el componente estructural de la pared celular de las plantas [74].

La lacasa fue descubierta en una planta japonesa llamada *Rhus Vernicifera* o árbol de laca [75], hace más de un siglo en 1883 por Yoshida. Sin embargo, la mayor parte de las lacasas se han obtenido por extracción de hongos y son biotecnológicamente más útiles (es decir, aquellas con altos potenciales redox) [76, 77].

La molécula de lacasa presenta tres subunidades diferentes (Figura 10). La enzima contiene cuatro átomos de cobre los cuales están unidos a las interfaces entre las subunidades (dominios) [78].

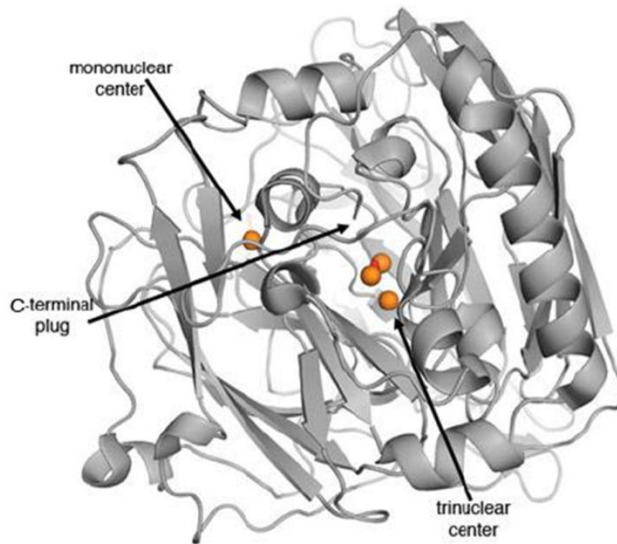
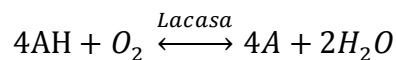


Figura 10. Estructura 3D de la lacasa

La lacasa es capaz de oxidar fenoles, polifenoles, anilinas e incluso algunos compuestos inorgánicos a través de un mecanismo de transferencia de un electrón [79-82], según la reacción:



Donde AH y A son los estados reducidos y oxidados del substrato respectivamente [83-85]

La molécula de lacasa, en su forma de holoenzima activa, es una glicoproteína dimérica o tetramérica, que contiene por monómero cuatro átomos de cobre unidos a tres sitios redox (tipo 1, tipo 2 y tipo 3) [86, 87]. Para que la lacasa presente actividad catalítica tiene que haber un mínimo de cuatro átomos de cobre por cada unidad proteica activa. El cobre de tipo 1 en su estado de reposo está oxidado y es el responsable del color azul de la proteína. Los átomos de cobre de tipo 3 consisten en un par de átomos de cobre que presentan una conformación binuclear. Las posiciones de los cobres de tipo 2 y de tipo 3 es próximas en el espacio y forman centro trinuclear que participa del mecanismo catalítico de la

enzima [88]. Los iones de cobre en el sitio activo de la lacasa, proporcionan un mecanismo de transferencia de electrones por cambiar sus estados de oxidación entre Cu (II) y Cu (I). La función del centro T1 es para proporcionar la transferencia a larga distancia intramolecular de electrones desde el sustrato a la T2/T3 centro de cobre redox. El centro de cobre T2/T3 juega un papel clave en la reducción de los oxígeno. Entre las dos cobres T3 hay un ligando oxígeno, ya sea OH^- u O^{2-} , que se coordina con los iones de cobre T2 y T3. El disolvente y el oxígeno tienen acceso al centro T2/T3 a través de dos canales. El centro totalmente reducido cobre trinuclear reacciona con dióxígeno para generar un nivel intermedio de peróxido y finalmente el oxígeno molecular (O_2) se reduce a agua [89-91].

En una reacción típica catalizada por la lacasa, 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. Difenoles simples como la hidroquinona y catecoles son un buen sustrato para la mayoría de las lacasas [86, 92, 93].

La lacasa es una enzima que atrae gran atención debido a su amplio rango de aplicaciones, como la deslignificación de compuestos lignocelulósicos, entrecruzamiento de polisacáridos, biorremediación, biotransformación de tintes textiles, en la industria alimentaria [89, 94-97], aplicaciones dentro del cuidado personal y sanitario, síntesis química y el desarrollo de biosensores y nuevas aplicaciones analíticas [98-100].

2.6 Justificación

Se ha estudiado la inmovilización de enzimas para distintas aplicaciones entre ellos el diseño de biosensores, los cuales presentan un gran potencial en la industria alimentaria debido a que proporcionan información que no ofrecen las técnicas analíticas convencionales ofreciendo especificidad en la respuesta, simplicidad y rapidez. Y también las detecciones electroquímicas tienen una serie de ventajas como una rápida respuesta, fácil de usar y un bajo costo en los detectores.

En la actualidad, debido a las propiedades antioxidantes y las distintas aplicaciones en área alimentaria de los compuestos fenólicos ha surgido un gran interés por desarrollar técnicas de detección rápida de estos compuestos. Debido a esto, se pretende lograr el desarrollo de biosensores enzimáticos amperométricos de lacasa y también a partir de un extracto enzimático crudo (que contiene enzima lacasa) como una alternativa del bioelemento de reconocimiento, esperando una respuesta favorable a la detección de estos compuestos.

2.7 Hipótesis

La inmovilización de la enzima lacasa comercial y el extracto enzimático crudo en NTC podrán ser usados como biosensores para la determinación compuestos fenólicos.

2.8 Objetivos

2.8.1 *Objetivo General*

Inmovilizar la enzima lacasa y el extracto enzimático crudo de *Trametes versicolor* en NTC para su uso en biosensores y demostrar que son capaces de detectar compuestos fenólicos en solución.

2.8.2 *Objetivos Particulares*

- Funcionalizar y caracterizar los NTC.
- Desarrollar el compuesto Lacasa/NTC y Extracto crudo/NTC
- Evaluar la actividad enzimática de la enzima lacasa y del extracto enzimático antes y después de su inmovilización en los NTC
- Mediante técnicas de espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) caracterizar el biosensor desarrollado con lacasa y el del extracto enzimático.
- Realizar pruebas de detección de catecol mediante Voltamperometría Cíclica en ambos biosensores

CAPÍTULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Material y reactivos

- Nanotubos de carbón. 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.
- Extracto enzimático crudo de la cepa CMU-TA (CMU- Cepario Michoacano Universitario, TA- *Trametes versicolor*) aisladas de diferentes ecosistemas del estado de Michoacán y depositadas en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario en Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El extracto enzimático extracelular contiene enzimas ligninolíticas: lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasas fúngicas. Responsable: Dr. Gerardo Vázquez Marrufo.
- Enzima lacasa de *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (0.5 U/mg) Sigma-Aldrich 38429.
- Electrodo de grafito
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado JT Baker.
- Ácido nítrico (HNO₃) al 70% JT Baker.
- 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfónico) (ABTS) Sigma.
- Solución amortiguadora de fosfatos (SBF) (0.1 M pH 5.5).
- Glutaraldehído 0.5% Sigma
- Cloruro de Potasio 1M (KCl)
- Ferrocianuro de Potasio 0.1M (K₄[Fe(CN)₆])
- Ferrocianato de Potasio 0.1M (K₃[Fe₄(CN)₆])
- 1,2-Dihydroxybenceno (Catecol) *ReagentPlus*®, ≥99% Sigma

Todos los reactivos son de grado analítico.

3.2 Purificación y funcionalización de NTC

Este proceso fue realizado por tratamiento ácido, los NTC (polvo) se someten en un baño de ultrasonido durante 3 horas en una mezcla de H_2SO_4 (98%) y HNO_3 (70%) concentrados (3:1 v/v), como se muestra en la Figura 11. Después del tratamiento, la dispersión de NTC se filtró con una membrana de $0.2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro y fueron lavados con suficiente agua hasta remover los ácidos. Posteriormente se colocaron en un horno de secado a 80°C durante 48 horas [101, 102].

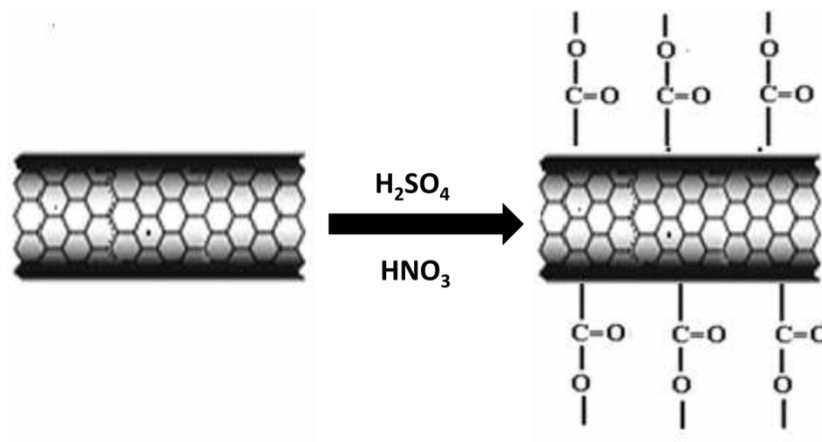


Figura 11. Representación esquemática de la purificación y oxidación de los NTC

La purificación de los NTC es un paso esencial en la preparación de nanotubos funcionalizados. Por lo tanto los NTC se purificaron antes de la inmovilización enzimática con el objetivo de eliminar las impurezas del material y del catalizador empleado en la producción de los mismos, al mismo tiempo se producen grupos carboxilo ($-\text{COOH}$) e hidroxilo ($-\text{OH}$) libres. La adición de grupos que contienen oxígeno en la superficie de los nanotubos o la activación de los NTC se puede lograr mediante tratamiento de oxidación. Se puede llevar a cabo usando agentes oxidantes como ácido nítrico, ácido sulfúrico o una mezcla de ambos [103]. Los grupos que contienen oxígeno se pueden insertar en la superficie de los nanotubos mediante este procedimiento. Durante dicho proceso se logró una

dispersión uniforme del material en la solución de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ como se muestra en la Figura 12. Posteriormente la etapa de filtrado y de lavado de los NTC se realizó repetidas veces hasta que el pH del agua con la que se enjuagan tuvo un valor neutro, esto para eliminar residuos de ácidos.



Figura 12. Purificación y funcionalización de NTC en HNO_3 y H_2SO_4 (1:3).

3.3 Inmovilización de la enzima lacasa en NTC y elaboración de electrodos modificados.

Los NTC funcionalizados fueron suspendidos en 1ml de SBF (0.1 M, pH 6.8). Los electrodos de grafito (EG) fueron pulidos hasta espejo y se limpiaron con polvo de Al_2O_3 , se colocan en una solución de HNO_3 y H_2SO_4 y se someten a ultrasonido durante 10 minutos, se lavan con agua destilada y se colocan en solución de etanol a ultrasonido por 10 minutos, por último se lavan con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Los NTC se mezclaron con lacasa (Lac) (que está suspendida en SPf) y con Extracto enzimático (Ext), por separado durante 2 horas. De la suspensión de NTC se mezcló con glutaraldehído (GA) al 50% y de la mezcla se depositaron 25 μl de NTC/GA sobre la superficie del EG y se dejó secar a temperatura ambiente para fabricar el electrodo modificado con NTC/GA, después la mezcla Lac-NTC se

depositó en el electrodo se dejó secar. Para comparar NTCGA-E y NTCGA, este se preparó con el mismo procedimiento, de igual manera se preparó un EG con enzima y GA depositando 25 μl de la mezcla E-GA (1:1 v/v). Las mismas mezcla se prepararon y se elaboraron los electrodo modificados pero con extracto enzimático.

3.4 Ensayo enzimático

La actividad enzimática de la lacasa se calculó espectrofotométricamente usando como sustrato ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico)). La mezcla de ensayo contenía ABTS 5mM, solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.8 y la cantidad adecuada de enzima lacasa. La oxidación del ABTS se monitorizó mediante la determinación del aumento de la A_{420} ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [104-106]. Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que forma un μmol de producto por minuto. Las mediciones de actividad se realizaron en un lector multidetección de microplacas Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Scientific™. A partir de la absorbancia obtenida se calculó la actividad enzimática de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$U = \frac{A_{420}/\text{min} \times \text{volumen total de reacción}}{\text{coeficiente de extinción molar del ABTS} \times \text{volumen de enzima}}$$

Dónde:

U= unidades de actividad

A_{420} = absorbancia a 420 nm

La actividad relativa fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad relativa (\%)} = (\text{Actividad} / \text{Actividad máxima}) \times 100$$

3.5 Caracterización

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

El equipo que se utilizó para esta caracterización es un Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL JSM -7600F (Figura 13), con el objetivo de caracterizar morfológicamente la superficie de los NTC.



Figura 13. Microscopio Electrónico de Barrido

El Microscopio Electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y el análisis de toda clase de superficies. Las imágenes se obtienen por un sistema óptico-electrónico. Se basa en el fenómeno que todo punto de la superficie de una muestra alcanzada por un haz de electrones de alta energía (20-30keV) da origen a un conjunto de señales, como electrones secundarios, rayos X, electrones retrodifundidos, cátodo luminiscencia y electrones Auger, que pueden ser detectadas independientemente, convertidas en pulsos electrónicos y luego ampliadas convenientemente. Si con alguna de estas señales ampliadas se modula la intensidad del haz del tubo de rayos catódicos, se tendrá en la pantalla un registro visual de las variaciones de la señal elegida para los puntos de la muestra que son barridos por el haz electrónico. Las zonas claras y oscuras sobre la pantalla constituyen así la imagen que proporciona el SEM. Cada una de las

imágenes correspondientes a las diferentes señales genera algún tipo de información sobre la superficie y la estructura de la muestra analizada [107, 108].

Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de DRX se tomaron con un difractómetro de polvos Bruker D8 ADVANCE ECO™ (Figura 14). Equipado con un ánodo de cobre ($\text{CuK}_{\alpha 1}=1.5418 \text{ \AA}$) operado a 40 kV y 30 mA. La adquisición de datos se realizó para ángulos 2θ entre $10\text{-}90^\circ$, con paso de 0.02 y tiempo de adquisición 1 seg/paso. El equipo presenta como características principales su alto rendimiento y fiabilidad en la investigación básica y aplicada para el estudio de materiales.



Figura 14. Difractómetro de polvos para DRX

La DRX es la técnica analítica de referencia para el estudio de la composición mineralógica de una amplia gama de materiales, inorgánicos u orgánicos, tanto de origen natural como sintético. El patrón de DRX de una sustancia se considera la “huella dactilar” de la sustancia. El material puede ser metal, mineral, cerámico, vidrio, plástico, recubrimiento en capa fina, papel, fármacos o prácticamente de cualquier tipo. Las muestras pueden estar en forma de polvo, sólidos, pastillas y películas delgas. La forma y tamaño pueden ser muy variables [109, 110]

Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier

La caracterización FTIR (por sus siglas en inglés) se realizó en un espectrofotómetro marca Bruker IR Tensor 27 (Figura 15). 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. Los espectros de IR fueron realizados en pastillas con KBr (para los polvos). Las muestras fueron preparadas mezclando la muestra en polvo con KBr y comprimidas con una prensa manualmente [111].



Figura 15. Espectrofotómetro de IR

La espectroscopia infrarroja (IR) es una técnica analítica instrumental que proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales y permite conocer estos grupos de la estructura molecular de un compuesto, por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales. Esta información se obtiene a partir del espectro de absorción de dicho compuesto al haberlo sometido a la acción de la radiación infrarroja en el espectrofotómetro [112].

Espectroscopia Raman

La caracterización por espectroscopia Raman se realizó Sistema de Alta Resolución Marca Horiba, Modelo Lab Ram HR Evolution (Figura 16), usando una

línea de excitación 632.8nm (laser de He Ne 5 mW), Objetivo de 50X donde el Spot es de 2 μ ..



Figura 16. Espectrofotómetro Raman

El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desea determinar, y examinar la luz dispersada por dicha muestra. La mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente pero una fracción muy pequeña presenta un cambio de frecuencia, resultado de la luz con la materia. La luz que tiene la misma frecuencia ν_0 que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh y no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. La luz dispersada que presenta frecuencias distintas a la radiación incidente, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como dispersión Raman. Las nuevas frecuencias, $+\nu$, y $-\nu$ son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente. Cada material tendrá unos valores de frecuencia de vibración característico de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman. El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda al que se produce [113-115].

3.6 Caracterización electroquímica

Espectroscopia de Impedancia electroquímica

Las mediciones de impedancia electroquímica se llevaron a cabo en un Potenciostato (Gamry Instruments) en una solución de KCl 1M que contiene $K_3[Fe_4(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 0.1M. Los espectros de impedancia electroquímica se registraron en una frecuencia desde 0.1 hasta 10,000 Hz con una frecuencia de muestreo de 10 puntos por década. La amplitud del potencia sinusoidal aplicada en cada caso fue de 5mV [116].

Voltimetría cíclica

El mismo equipo se utilizó para los ensayos de voltimetría cíclica con la solución de KCl 1M que contiene $K_3[Fe_4(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 0.1M con una velocidad de barrido de 100 mV/s. Todos los ensayos electroquímicos se llevaron a cabo en solución de buffer de fosfatos (0.1M, pH=6.8) y en solución redox a temperatura ambiente en una celda convencional con tres electrodos; uno es el electrodo de grafito, usado como el electrodo de trabajo, un electrodo de calomel como electrodo de referencia y un alambre de platino como contra-electrodo o electrodo auxiliar.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de NTC

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

4.1.1 Microscopía electrónica de barrido

Se realizó el análisis de las características morfológicas de los NTC antes y después de su purificación. La Figura 17 (a) es una imagen tomada con el microscopio electrónico de barrido en la cual se observa una superficie no lisa y con relieves. La Figura 17 (b) muestra formación de filamentos carbonosos en una especie de alfombra de aglomerados y entrelazados. La micrografía de la Figura 18 es una magnificación de la anterior donde se puede observar el que el diámetro de los NTC es pequeño, del orden nanométrico y tienen variaciones que van desde los 11.6 nm hasta los 31.1nm aproximadamente.

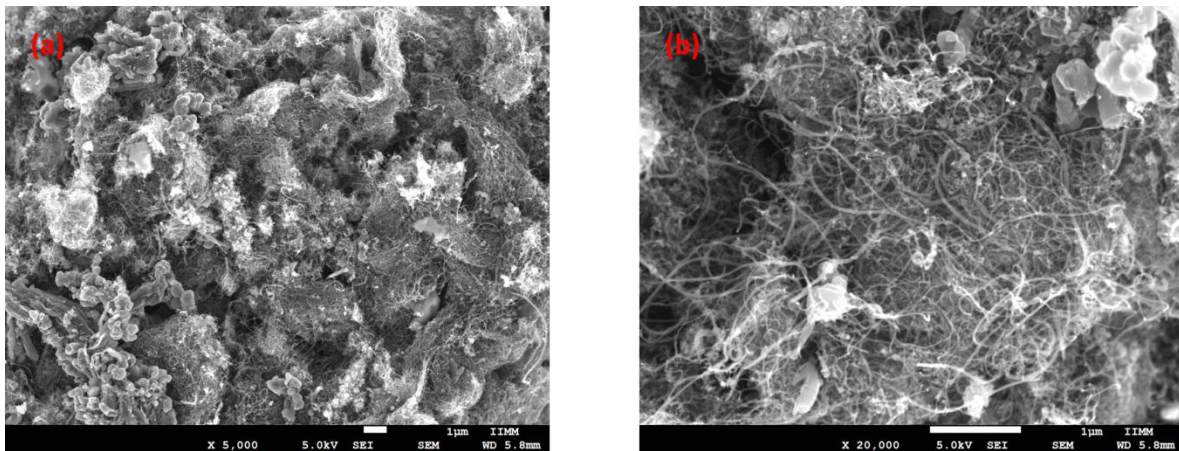


Figura 17. Micrografía de los NTC (a) 5 000X (b) 20 000X

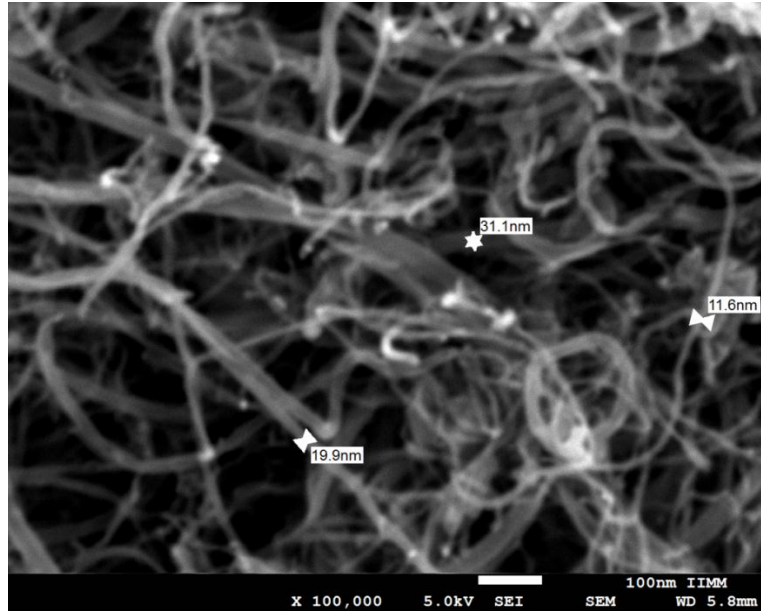


Figura 18. Micrografía de diámetro externo de los NTC 100 000X

Las micrografías siguientes fueron tomadas después del tratamiento ácido al que se sometieron los NTC. De igual manera las micrografías obtenidas fueron tomadas a 5,000, 20,000 y 100,000X, respectivamente. En la Figura 19(a) se observa nuevamente la superficie no lisa y con relieves, al igual que en la Figura 19(b) se muestran estructuras tubulares aglomeradas entrelazadas y por último para resaltar las características morfológicas de los NTC la siguiente magnificación en la micrografía de la Figura 20 es posible observar los diámetros de los NTC que van desde los 17.2 nm hasta los 67.6 nm.

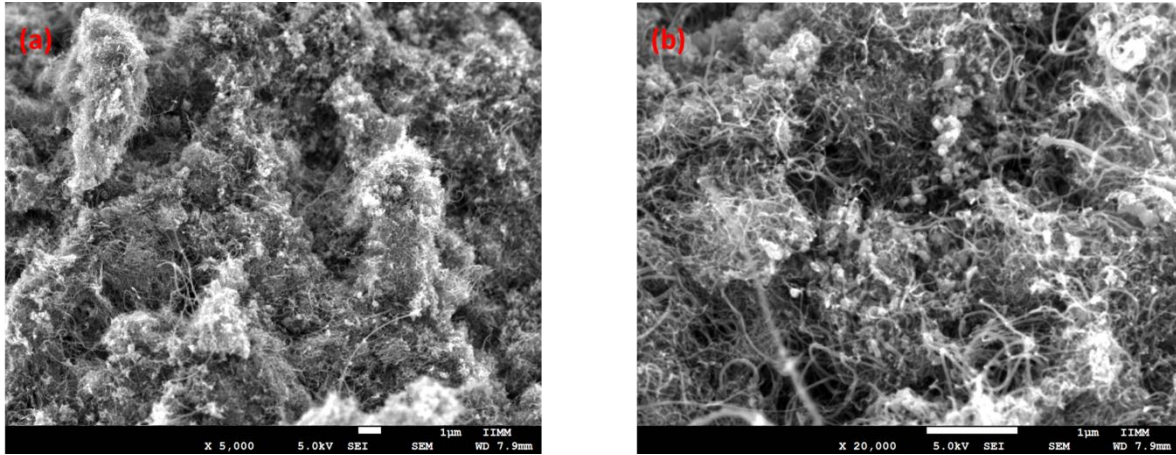


Figura 19. Micrografía de los NTC oxidados (a) 5 000X (b) 20 000X

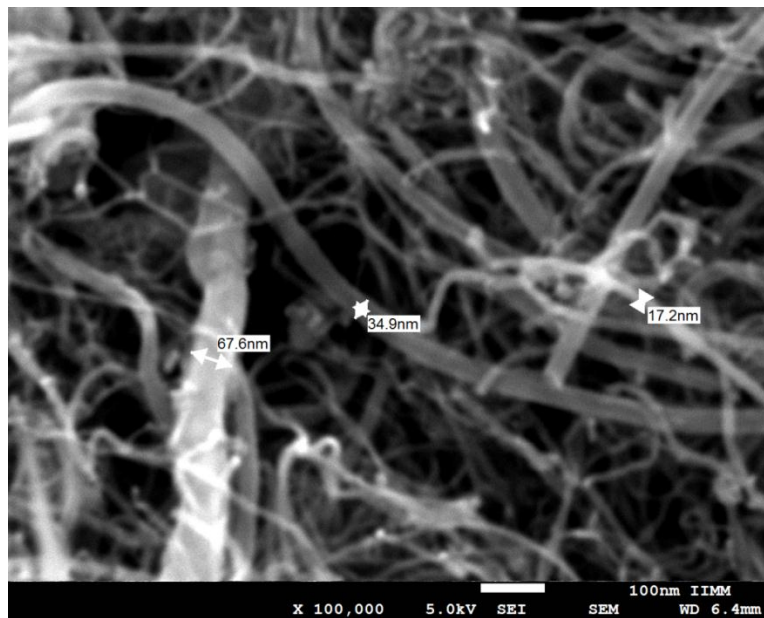


Figura 20. Micrografía de diámetro externo de los NTC oxidados 100 000X

También se obtuvo el espectro de microanálisis por EDS (Energy Dispersive Spectrometer o espectroscopia por dispersión de energía) de los NTC antes y después del tratamiento ácido en el cual se identificaron los elementos presentes en las muestras, es decir, se obtuvo información cualitativa y cuantitativa de los NTC.

“Estudio comparativo de dos fuentes de enzima lacasa inmovilizada en nanotubos de carbono para su uso como biosensor en la detección de fenoles”

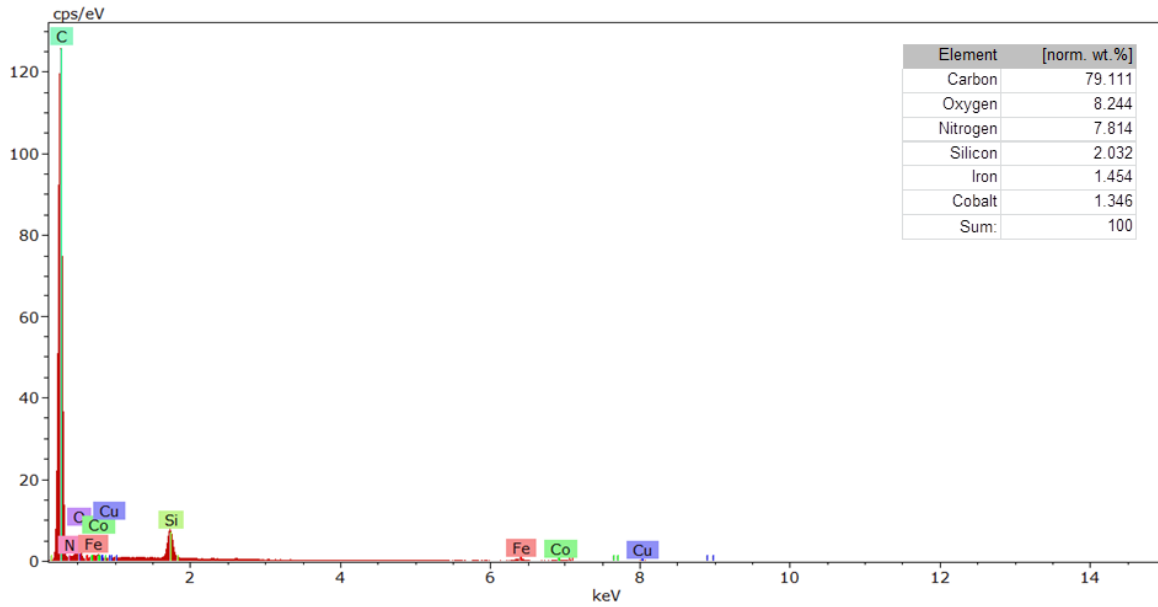


Figura 21. Espectro EDS de los NTC antes de la oxidación

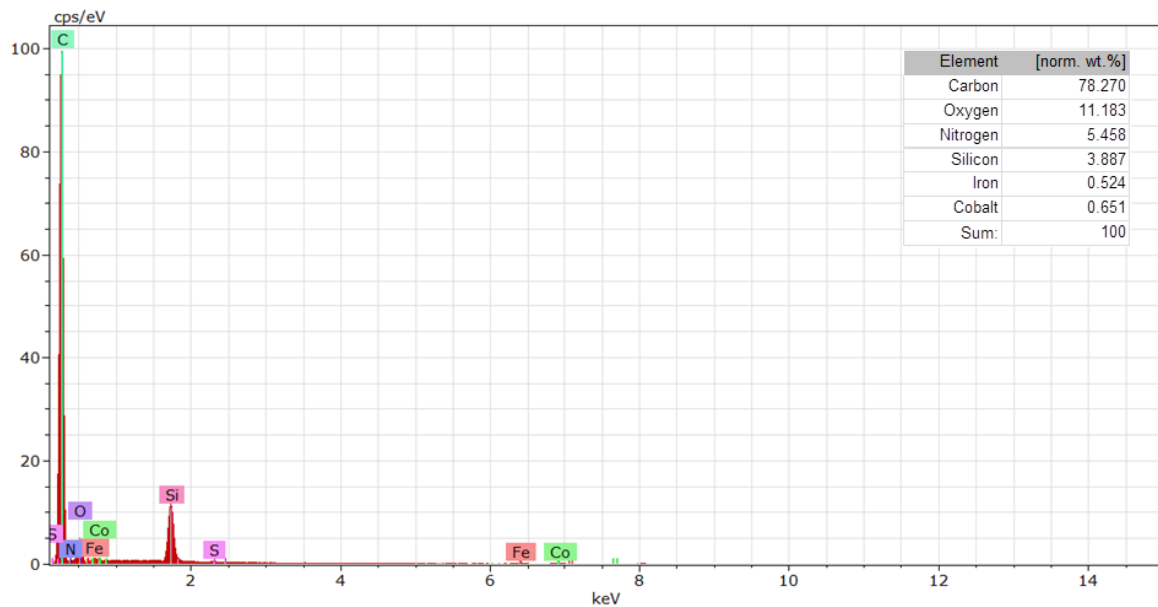


Figura 22. Espectro EDS de los NTC oxidados

En la Figura 21 se muestra el espectro de los NTC previos al tratamiento ácido donde se observa que el pico más alto es el del elemento carbono, que fue el más abundante en la muestra analizada. Le siguen otros elementos presentes en cantidades inferiores como oxígeno, nitrógeno, silicio, fierro y cobalto. La

presencia de estos elementos se debe al catalizador utilizado y al método de fabricación de los NTC. El análisis elemental de los NTC después de la purificación y funcionalización se observa en la Figura 22 donde nuevamente el elemento más abundante en la muestra es el carbono, de igual forma le siguen los demás elementos mencionados.

Al comparar el estudio de la Figura 21 con el de la Figura 22 se concluye que debido al tratamiento ácido al que fueron sometidos los NTC se redujo la cantidad de impurezas presentadas al inicio, como la reducción (en porcentaje) de fierro y cobalto en los cuales antes de la purificación se presentaron en proporciones de 1.454% y 1.346%, respectivamente y después 0.524% de fierro y 0.651% de cobalto.

4.1.2 Difracción de rayos X (DRX)

Las mediciones de rayos X se muestran en la Figura 23 observándose el pico de difracción a 25-26° (2θ) del material, correspondiente a la familia de los planos (002) [117], confirmando la naturaleza gráfica de los NTC y la presencia de Fe (011) como catalizador teniendo el pico de difracción 45-46° (2θ).

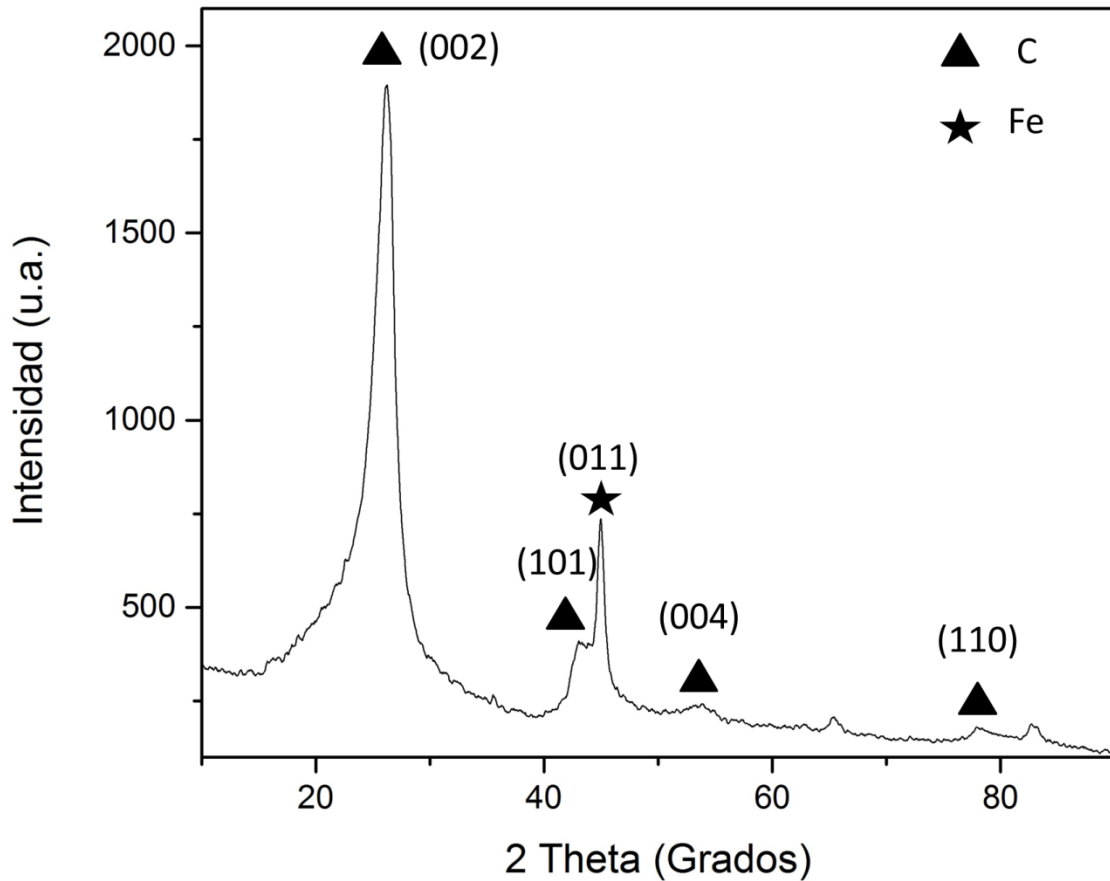


Figura 23. Espectro de DRX de los NTC.

El difractograma de la Figura 24 muestra los patrones de difracción de los NTC's sintetizados por el método de deposición química de vapor a partir de benceno como precursor y ferroceno como catalizador [118], los cuales muestran patrones similares a los obtenidos anteriormente antes de someter a los NTC al tratamiento ácido. De igual manera otros autores Oh y Chen (2008) [119], Yan et al. (2009) [120], Kim y Tannenbaum (2011) [121] y Luo et al. (2011) [122] presentan dichos patrones de difracción para NTC mostrando principalmente el pico de difracción en el ángulo (2θ) de 25-26° la reflexión del grafito a partir de los NTC (002).

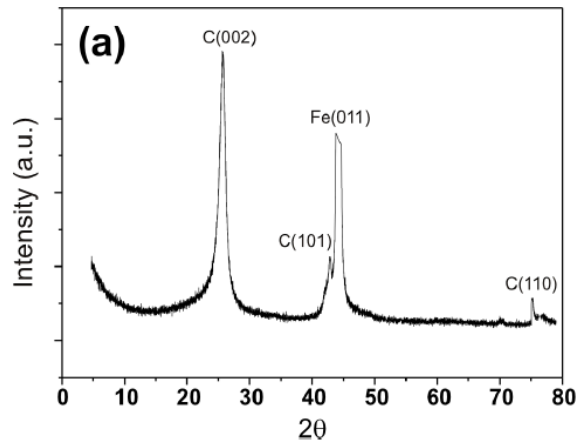


Figura 24. NTC sintetizados por deposición química de vapor (Mahanandia *et al.*, 2011)

La Figura 25 representa el patrón de difracción de rayos X de los NTC oxidados. El pico de difracción más fuerte en el ángulo (2θ) ubicado entre $25-26^\circ$ puede ser clasificado como el plano (002) correspondiente a la estructura de grafito en su fase hexagonal [123, 124]. La definición del pico en el ángulo (2θ) de $25-26^\circ$ indica que la estructura de grafito de los NTC fue oxidada con ácidos sin daño significativo ya que cualquier disminución en el orden de cristalinidad en los NTC haría que los picos de DRX fueran más amplios y desplazaría el pico hacia ángulos inferiores. Los otros picos de difracción característicos de grafito a 2θ de aproximadamente 43° , 53° y 77° están asociados a los planos característicos del grafito que (100), (004) y (110) [103]. Las reflexiones de grafito a partir de los NTC no mostraron gran diferencia a pesar de la introducción de grupos funcionales en las paredes laterales.

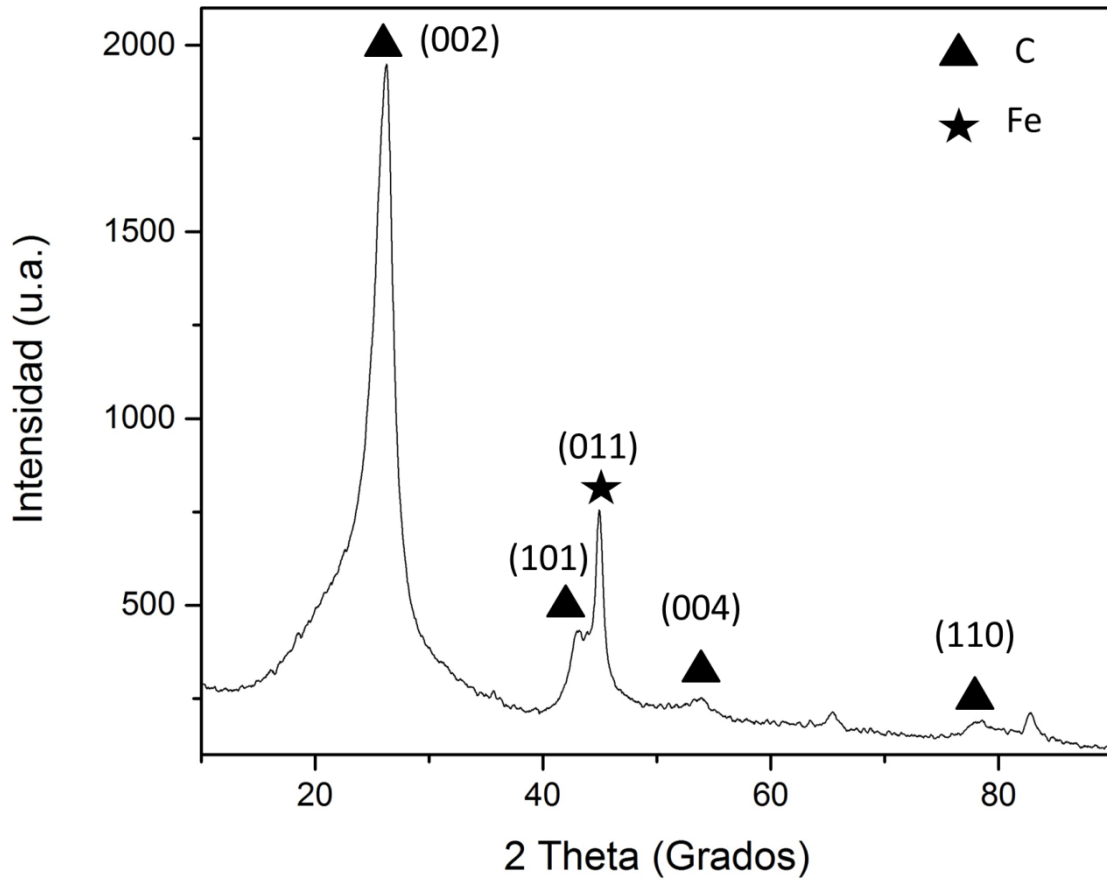


Figura 25. Espectro de DRX de los NTC oxidados

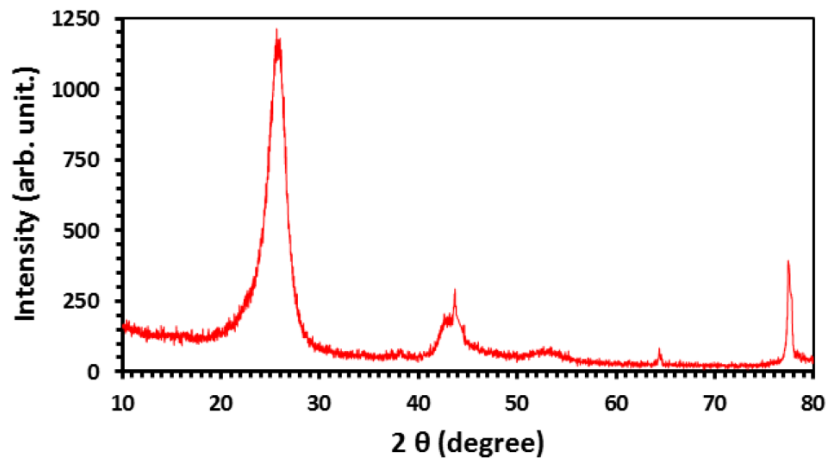


Figura 26. Patrones de DRX de NTC oxidados con H_2SO_4/HNO_3 (Saleh, 2013).

El espectro de difracción de la Figura 26 muestra el patrón de DRX típico de los NTC oxidados según Saleh (2013), en el cual se aprecia un comportamiento muy similar al difractograma obtenido en la muestra de NTC después del tratamiento ácido. Destacándose el pico de la estructura cristalina del carbono (002) y los otros picos de difracción característicos de grafito a 2θ de aproximadamente 43° , 53° y 77° están asociados con (100), (004) y (110) difracciones de grafito, respectivamente [103].

4.1.3 Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 27(a) se muestra el espectro de FTIR de los NTC en el cual aparecen las dos señales características de los NTC mostrando el pico característico en 1580 cm^{-1} asignado al enlace C=C en los NTC de multipared y la banda que se presenta en 1102 cm^{-1} aproximadamente es atribuida a los enlaces C-C también como parte estructural de los NTC [123]. La Figura 27(b) representa el espectro IR de los NTC oxidados donde nuevamente aparecen los picos para los enlaces C=C y C-C en 1550 y 1130 cm^{-1} , respectivamente. También el espectro muestra el pico característico del grupo carbonil en 1639 cm^{-1} y el del grupo carboxilo en 1710 cm^{-1} [45]. La observación de los espectros de IR de los NTC oxidados indica la presencia de estos grupos funcionales en la superficie de los nanotubos.

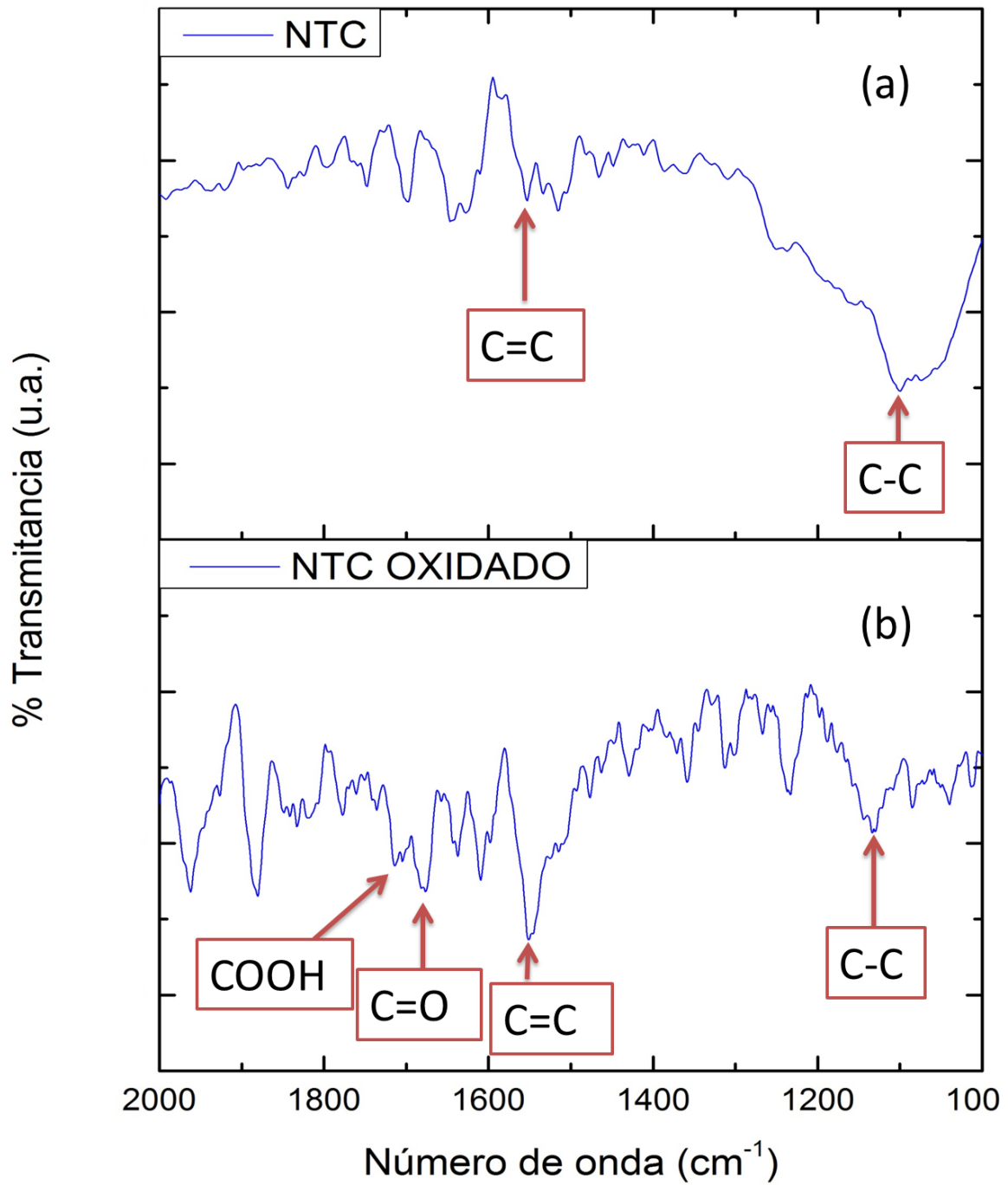


Figura 27. FTIR de NTC antes (a) y después de la oxidación (b).

4.1.4 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una herramienta utilizada para proporcionar información estructural de los NTC antes y después de la oxidación. Como se muestra en los espectros de la Figura 28 (a) las bandas D y G de los NTC en 1323 y 1570 cm^{-1} aproximadamente [125] y puede apreciarse más nítidamente la banda 2D en 2647 cm^{-1} que aparece junto a las bandas D y G. En la Figura 28 (b) se observó que la intensidad de las bandas D y G para los NTC oxidados, fue menor que la de los NTC antes del tratamiento. La disminución de la intensidad de pico se puede atribuir a la rotura de algunos enlaces y la inserción de grupos químicos en los NTC durante la oxidación [126].

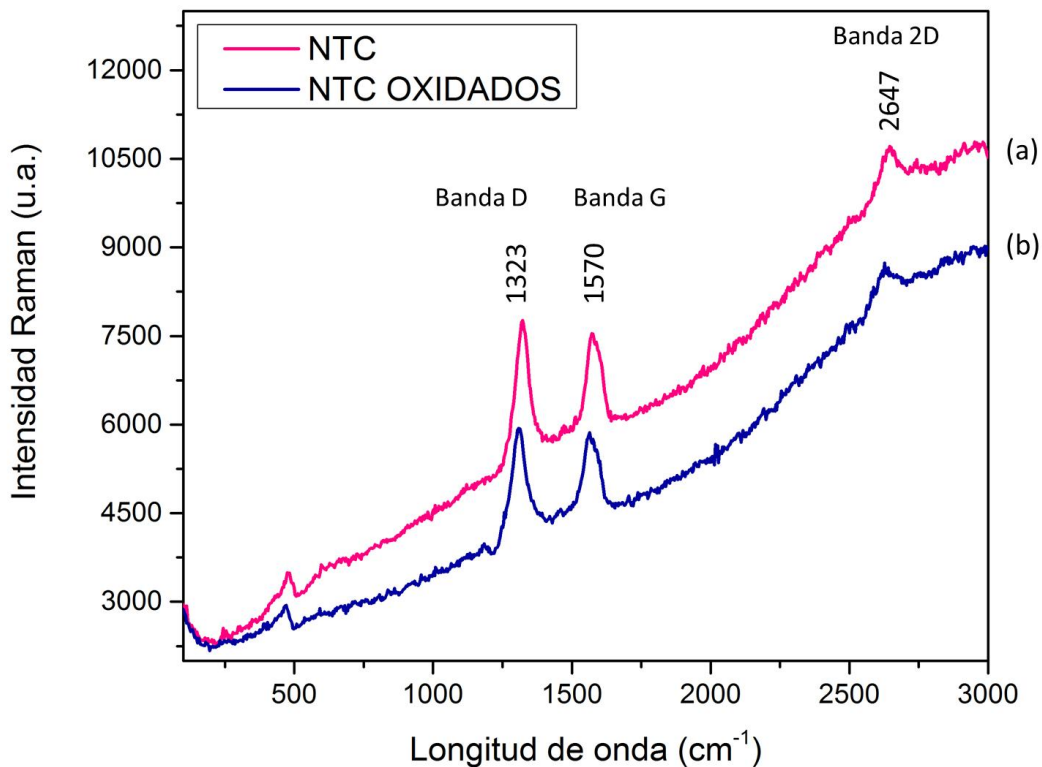


Figura 28. Espectro Raman de NTC antes (a) y después de la oxidación (b).

Es importante señalar que en este estudio también se observó la ausencia de la banda RBM (Radial Breathing Modes) en $100\text{-}300\text{ cm}^{-1}$, esta banda es característica de los NTC de pared simple, lo cual confirma que los NTC son de pared múltiple [114, 127, 128].

La banda denominada G corresponde a la vibración fundamental (primer orden) de elongación tangencial y se presenta sobre 1600 cm^{-1} , la banda G' ubicada en 2650 cm^{-1} corresponde a un sobretono (segundo orden) además la banda en la zona de 1300 cm^{-1} denominada D ("Disorder induced"), esta banda D es indicadora de la presencia de defectos en las paredes como con las especies no cristalinas del carbono como por ejemplo carbón amorfo, de manera que de la relación de intensidades entre las bandas D y G puede extraerse información sobre el número de defectos, mientras que la banda G es un indicador de estructuras de carbono con enlace sp_2 [114, 129, 130]

4.2 Actividad enzimática

Se analizó la actividad enzimática antes y después de la inmovilización en NTC, en este estudio, se ha empleado la enzima lacasa para depositarla en los nanotubos y evaluar la actividad de la enzima libre e inmovilizada.

Los estudios con lacasa absorbida sobre la superficie de los NTC indicaron que su actividad no se anula durante su inmovilización en los nanotubos. La capacidad y la actividad de la enzima podrían verse afectados por la estructura, la densidad y la longitud de los NTC [131].

Utilizando ABTS el cual al ser oxidado por la enzima a un radical catión estable, ABTS+, presenta una aparición de un color verde oscuro en la mezcla de reacción, de esta manera la intensidad del color incrementó conforme transcurría el tiempo midiéndose esta absorbancia cada 30 segundos durante 10 minutos

La enzima lacasa presentó una actividad de 2696.44 U/L y la enzima inmovilizada 2070.58 U/L reduciéndose un 23.1% de la actividad en comparación con la

enzima libre. La Figura 29 muestra la actividad relativa de la lacasa en función del tiempo (curva de color negro), después de la inmovilización en los nanotubos la actividad de la enzima disminuyó (curva azul), debido a que está anclada a los NTC, sin embargo es un porcentaje de menos de un cuarto de la actividad encontrada en la enzima libre.

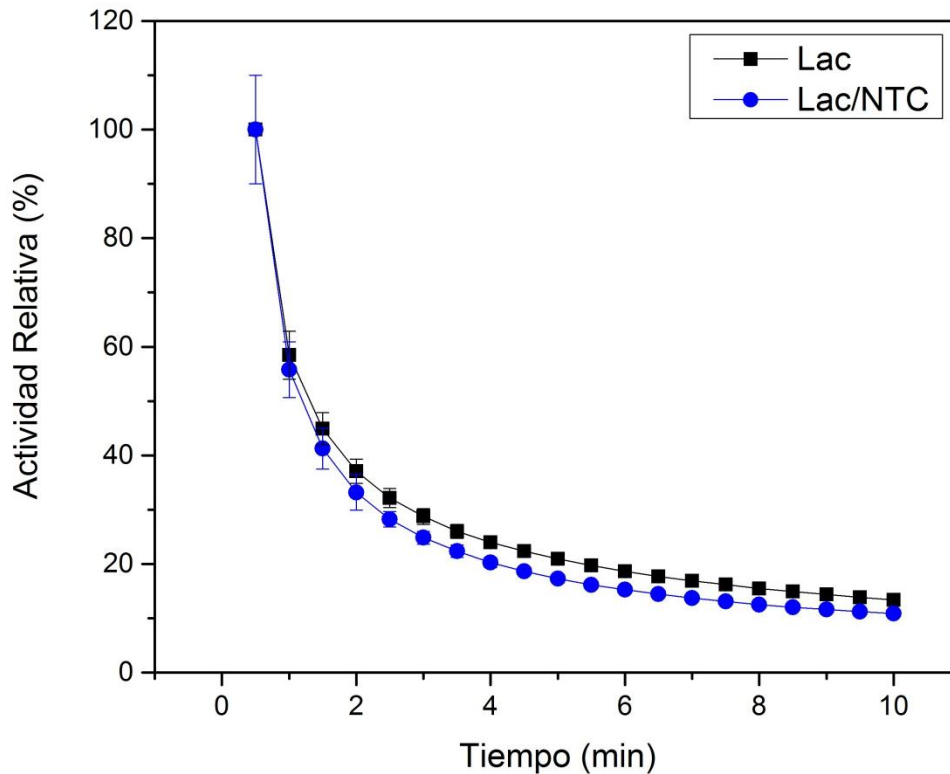


Figura 29. Actividad de la enzima lacasa libre e inmovilizada en NTC.

Se obtuvo una actividad de la lacasa en el extracto de 152.12 U/L y un valor de 108.37 U/L para Ext-NTC. De igual manera, la actividad de la lacasa en el extracto enzimático disminuyó después de la inmovilización en los NTC, en la Figura 30 se muestra la actividad de la lacasa en el extracto en función del tiempo, después de la inmovilización en los nanotubos la actividad fue de 71.2%, es decir, disminuyó 28.8% respecto a la actividad presentada en el extracto puro.

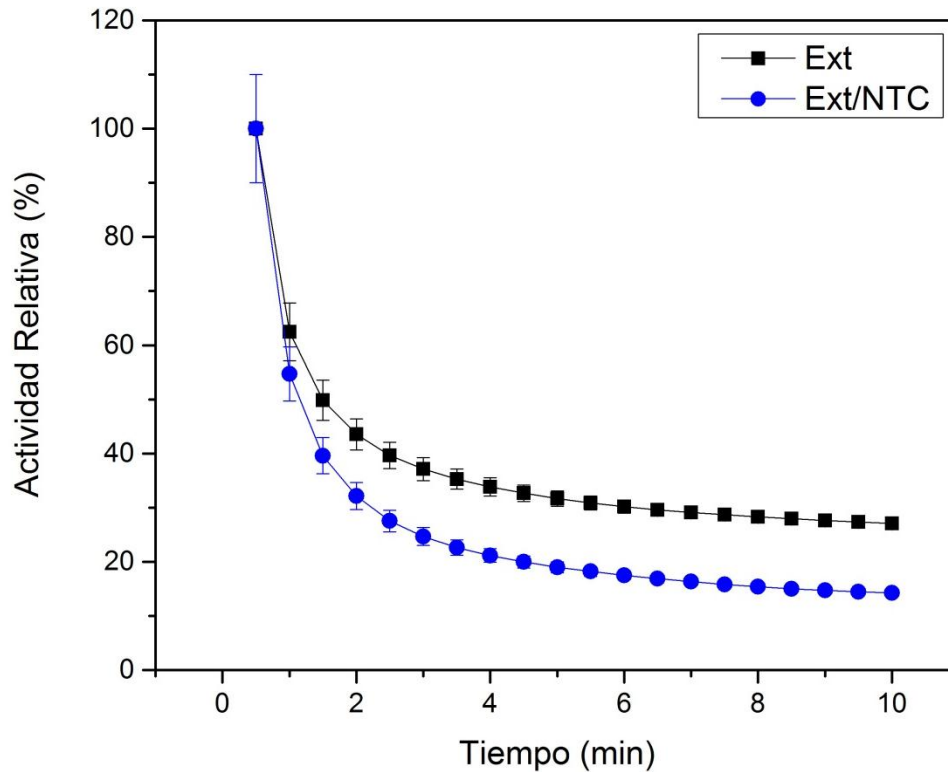


Figura 30. Actividad de la enzima lacasa (en el extracto) libre e inmovilizada en NTC.

La disminución de la actividad de la enzima para ambos casos se debe a que la unión de la enzima a los nanotubos pudo haber generado cambios conformacionales en la enzima, lo que resulta en una menor posibilidad de formación del complejo enzima sustrato y puede haber menos accesibilidad del sustrato al sitio activo de la enzima inmovilizada. También, esta disminución en la actividad enzimática puede atribuirse a la adsorción de la enzima en las capas de los nanotubos impidiendo el acceso del sustrato a la carga enzima que se encuentre inmovilizada en las capas interiores [132].

La baja actividad de lacasa en el extracto enzimático en comparación con la enzima comercial se debe a que posiblemente la concentración de enzima comercial es mucho más elevada que la del extracto y teniendo en cuenta también que el extracto utilizado es un extracto crudo y contiene las otras enzimas lignolíticas y para este estudio sólo se evaluó la actividad de lacasa.

4.3 Caracterización del compuesto por FTIR y Espectroscopia Raman

La superficie del electrodo fue caracterizada por FTIR y espectroscopia Raman. Los espectros de FTIR para la inmovilización de la lacasa se muestran en la Figura 31. El espectro(a) representa el espectro FTIR del GA el cual como parte de la inmovilización participa como entrecruzador, en este tipo de compuestos el estiramiento simétrico y asimétrico del C-H del grupo CH₂ aparece en 2948 cm⁻¹, los picos que aparecen en 1647 y 1716 cm⁻¹ se atribuye a la presencia del grupo carbonil (CO) y el carboxilo (COOH) respectivamente que también forman parte de la estructura de este compuesto. La curva (b) representa el espectro de los NTC oxidados que se usaron para el proceso de la inmovilización enzimática y que anteriormente en el apartado 5.3.3 se hizo una descripción más a detalle donde destacan los picos en 1550 y 1130 cm⁻¹ para los enlaces C=C y C-C respectivamente y para los grupos carbonil y carboxilo en 1639 y 1710 cm⁻¹. En el espectro obtenido del compuesto NTC/LAC/GA (curva c) un pico más estrecho en aproximadamente 1600 cm⁻¹ y que abarca el 1550 cm⁻¹ es característico de los enlaces amida primarios y secundarios entre los grupos -NH₂ de la enzima y los grupos funcionales de los NTC[6, 133, 134].

De igual manera, las gráficas de FTIR de la Figura 32 muestran la curva (a) y (b) para el GA y los NTC oxidados donde se muestran los picos representativos de los grupos que conforman las estructuras, tanto del GA como de los nanotubos. La curva (c) representan el espectro del compuesto NTC/EXT/GA nuevamente se presenta el pico en 1600 cm⁻¹, que como anteriormente se sugirió que es característico de los enlaces amida primarios y secundarios entre los grupos amino de las enzimas y los grupos funcionales libres de los nanotubos oxidados.

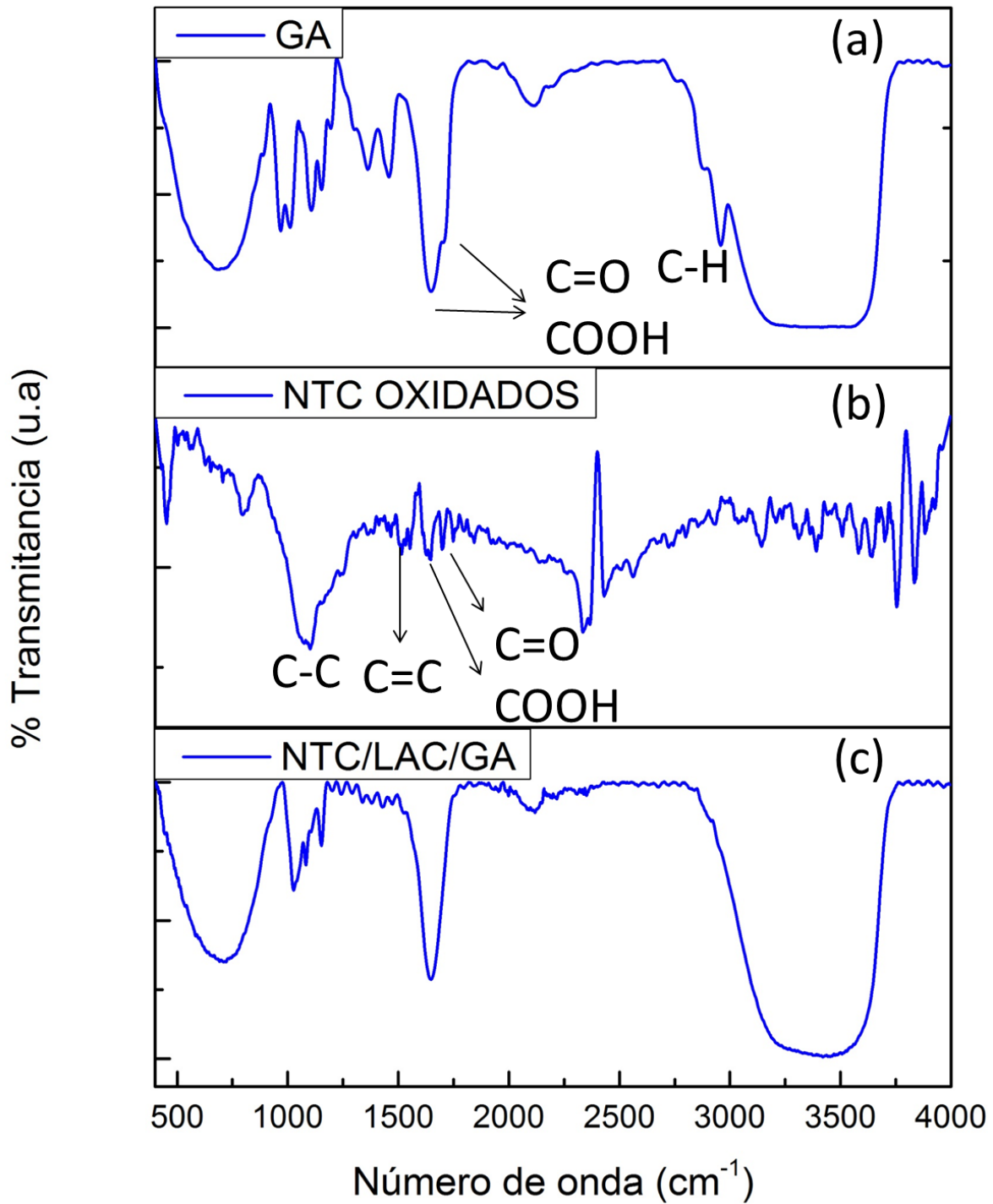


Figura 31. FTIR GA (curva a), NTC (curva b) y NTC/LAC/GA (curva c).

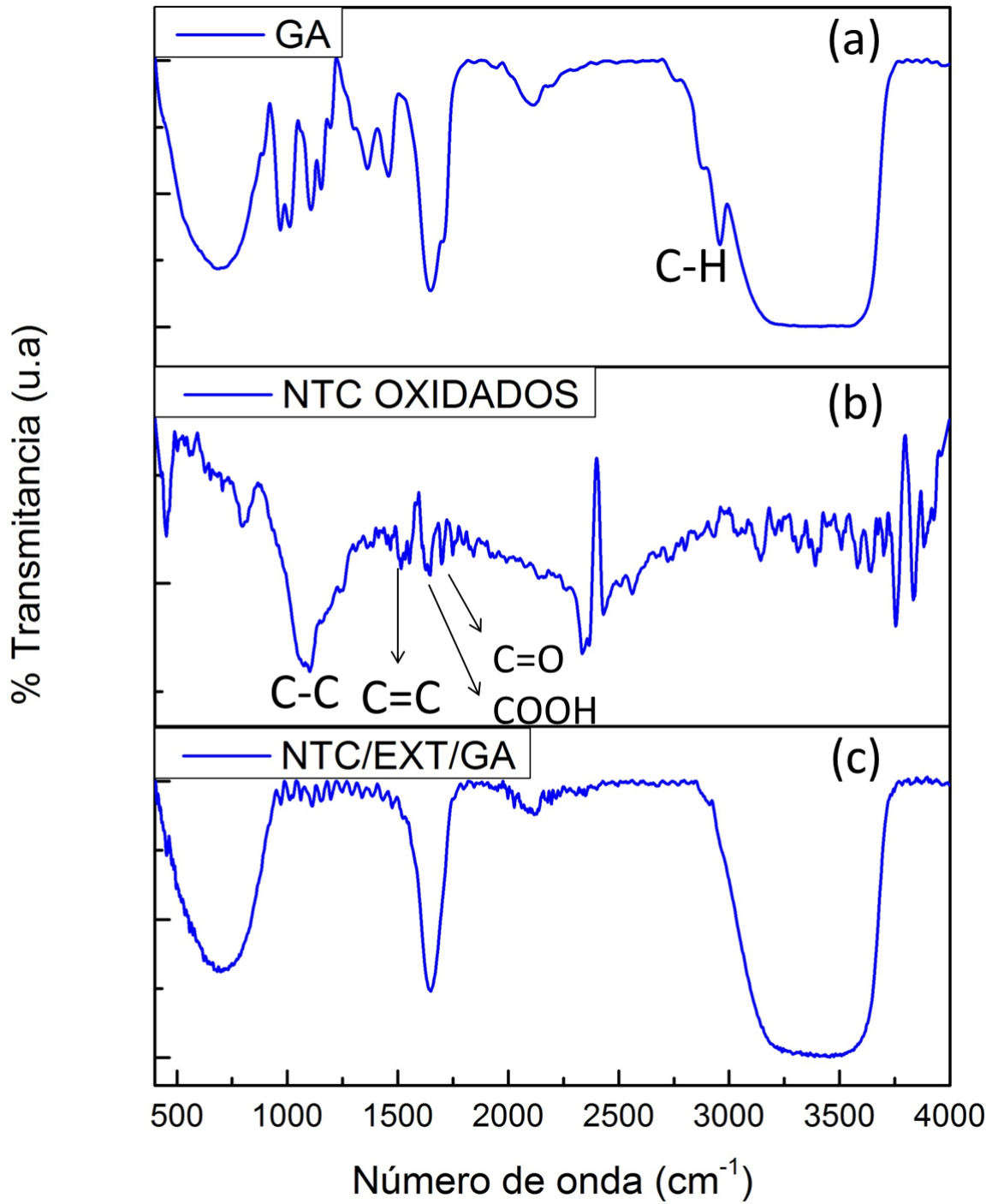


Figura 32. FTIR GA (curva a), NTC (curva b) y NTC/EXT/GA (curva c).

El espectro Raman de los NTC y del compuesto Lac/NTC/GA se muestra en la Figura 33, donde ambos espectros exhiben los picos correspondientes a las bandas D y G característicos de las estructuras de los NTC. Como ya se explicó anteriormente, la banda G (1600 cm^{-1}) se atribuye a una red de grafito sp^2 , mientras que la banda D (1300 cm^{-1}) refleja el desorden y defectos en la red cristalina de carbono [135].

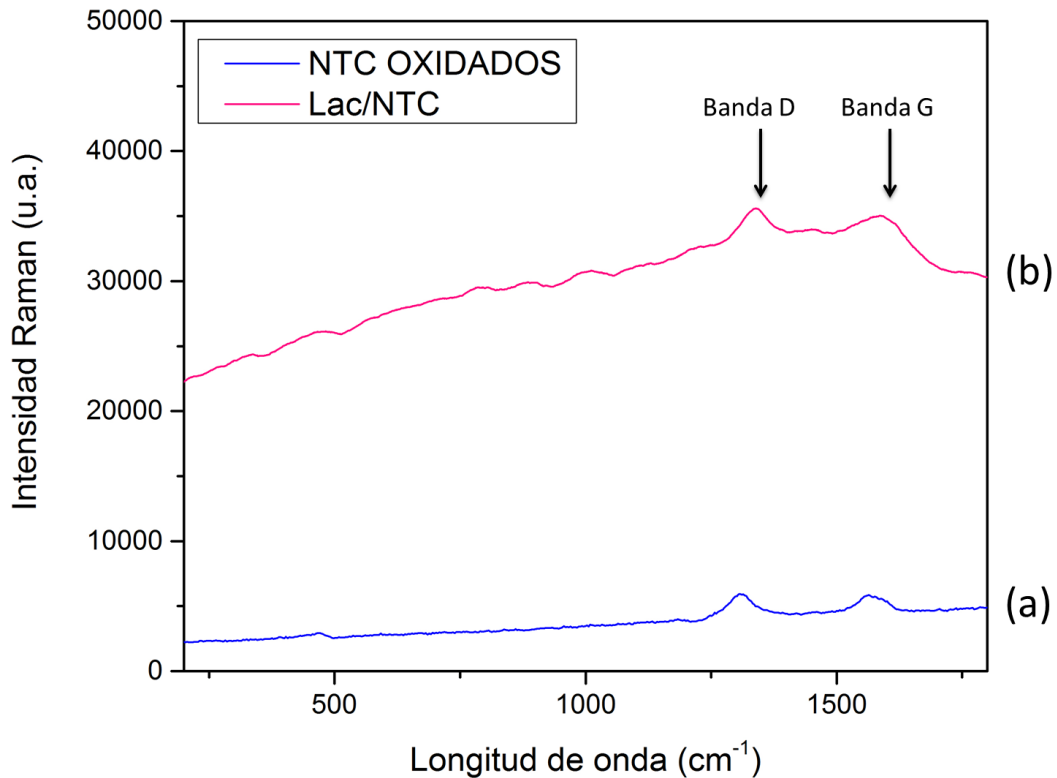


Figura 33. Espectro Raman de NTC (curva a) y el compuesto Lac/NTC/GA (curva b).

De la misma manera se muestran los espectros Raman de los NTC y Ext/NTC/GA en la Figura 34 donde se presentan las bandas características de los NTC, en la curva (b) que representa el compuesto aparecen las bandas D y G de los NTC demostrando la presencia de estos en el compuesto.

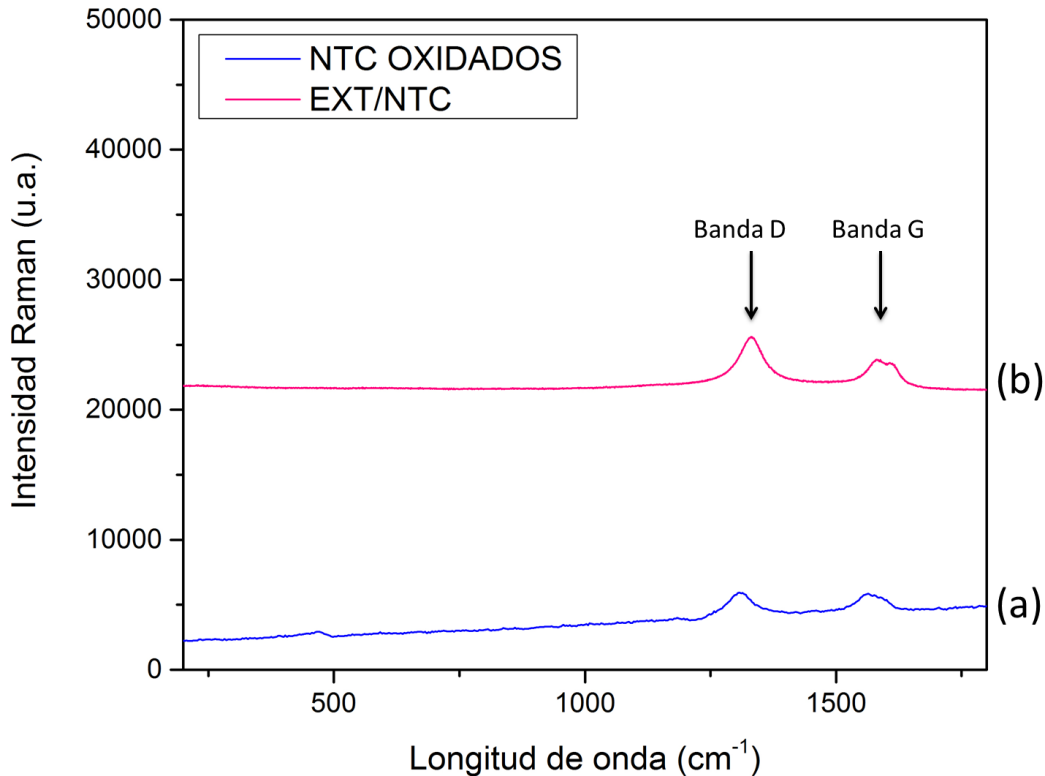


Figura 34. Espectro Raman de NTC (curva a) y el compuesto EXT/NTC/GA (curva b).

4.4 Caracterización electroquímica

4.4.1 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

La funcionalización de los NTC se realizó de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. De igual manera, se prepararon los EG modificados y posteriormente se realizaron los ensayos de impedancia electroquímica.

Utilizando la solución redox ($\text{KCl } 1\text{M}$ y $\text{K}_3[\text{Fe}_4(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] 0.1\text{M}$), se obtuvieron los diagramas de Nyquist de los diferentes electrodos en el rango de frecuencia de 10^{-1} a 10^5 Hz (Figura 35). En el experimento con el EG (a) se registró casi una línea recta, indicando el paso libre de iones debido a que la superficie del electrodo se encuentra limpia y sin ningún recubrimiento en la superficie. El electrodo modificado con NTC (curva c) muestra una pequeña resistencia a la transferencia de electrones (4.467Ω), la cual es mucho menor en

comparación con el electrodo con E-NTC-GA (curva d) con un valor de resistencia a la transferencia de carga (R_p) de 15.27Ω , lo que nos indica que los NTC actúan como un buen medio para la transferencia de electrones. Un electrodo de grafito fue recubierto con enzima y GA (curva b), la impedancia (o resistencia al paso de iones) se registró mucho más grande que los 2 electrodos anteriores con un valor de R_p de 72.86Ω , lo que sugiere que la enzima bloquea el intercambio de iones en el experimento debido a que la enzima no tiene propiedades conductoras y cuando la enzima se une a los NTC (electrodo modificado con E-NTC-GA) el diámetro del semicírculo de la gráfica de Nyquist fue pequeño en comparación con el electrodo modificado con E-GA indicando que la presencia de los NTC unidos a la enzima mejoran el proceso de la transferencia de electrones.

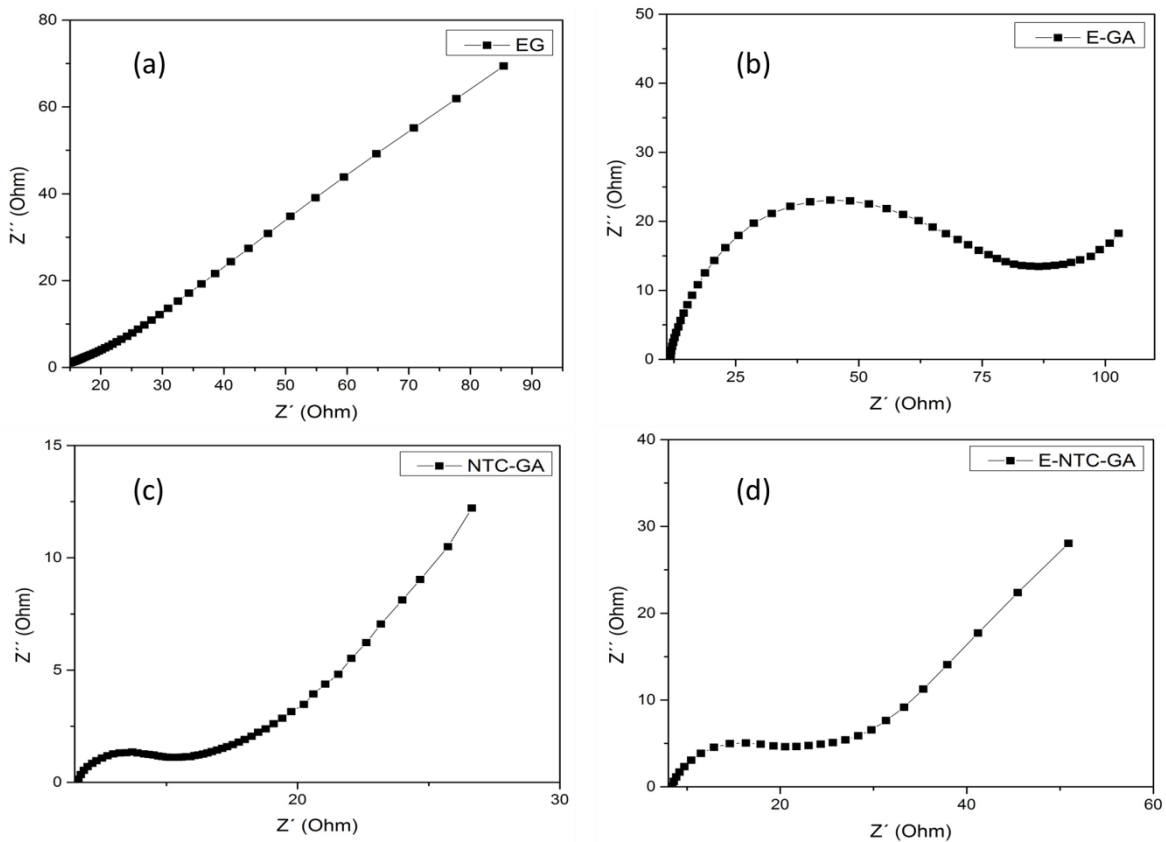


Figura 35. Diagramas de Nyquist del EG (a), modificado con E-GA (b), NTC (c) y E-NTC-GA (d) en solución de KCl 1M que contiene $K_3[Fe_4(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 0.1M.

De igual manera, en la Figura 36 el EG, debido a que no tiene ningún tipo de recubrimiento en la superficie mostró la tendencia casi recta (a), lo mismo sucedió con el EG con NTC (c) al observarse una pequeña resistencia comparada con el electrodo con EXT-GA (b) en el cual la impedancia aumentó considerablemente (85.98 Ω), esto se atribuye a que el material biológico inmovilizado (en este caso la enzima) carece de propiedades conductoras, convirtiéndose en un obstáculo para la transferencia de electrones [134]. El resultado en el electrodo EXT-NTC-GA (d) confirma nuevamente la disminución en la resistencia debido a la formación del compuesto NTC-EXT con un valor de R_p de 29.35 Ω , lo que sugiere que los NTC intervienen de manera favorable en la transferencia de electrones entre la solución redox y el electrodo.

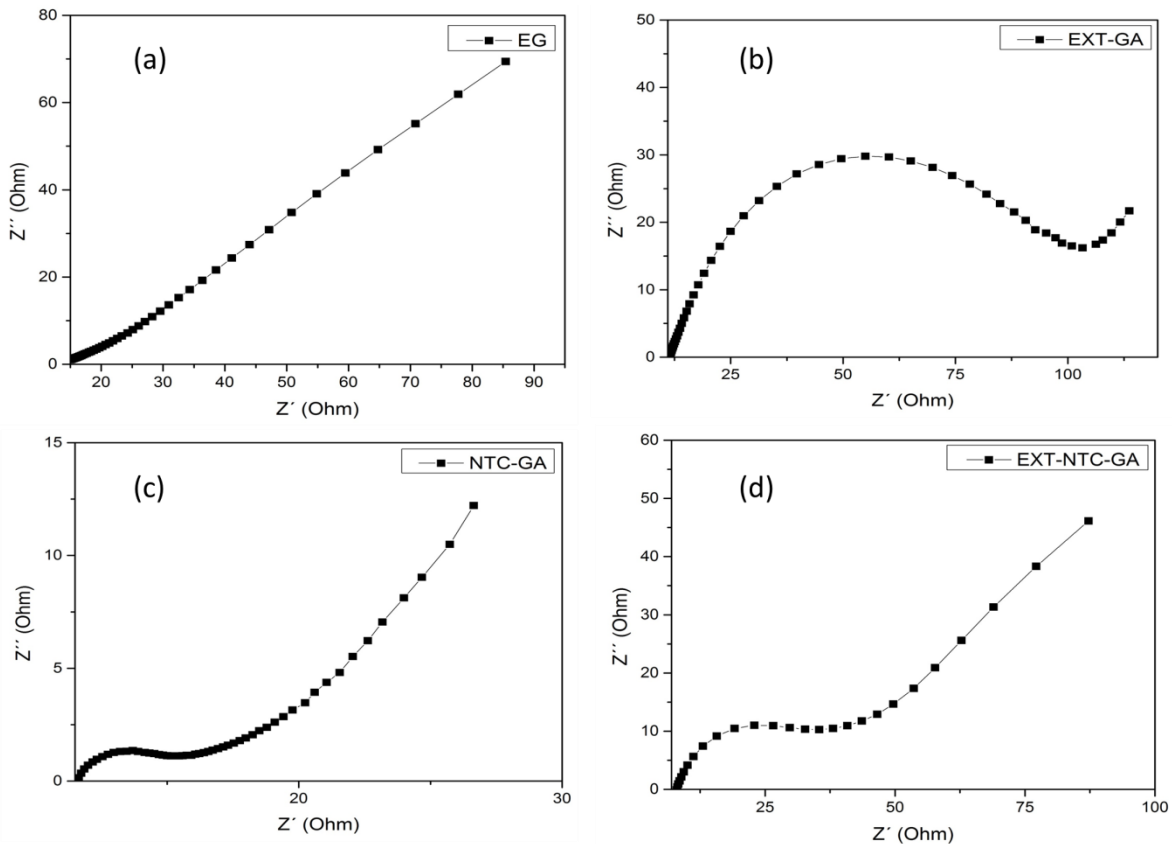


Figura 36. Diagramas de Nyquist del EG (a), modificado con EXT-GA (b), NTC (c) y EXT-NTC-GA (d) en solución de KCl 1M que contiene $K_3[Fe_4(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 0.1M.

Tabla 3. Valores de Rp de los electrodos modificados.

Lacasa	Rp (Ω)	Extracto	Rp(Ω)
NTC-GA	4.467	NTC-GA	4.467
E-NTC-GA	15.27	Ext- NTC -GA	29.35
E-GA	72.86	Ext-GA	85.98

El cambio en el valor de la resistencia que refleja el aumento o disminución en el diámetro del semicírculo a altas frecuencias en los espectros de impedancia está asociado con el comportamiento del bloqueo de la superficie del electrodo superficie para la transferencia de carga.

Para ambos casos (E y EXT), el cambio en la impedancia obtenido después del proceso de modificación muestra que la enzima lacasa se ha absorbido en los NTC, disminuyendo la resistencia que presenta por si sola la enzima y aumentándose en comparación con la que se mostró con los NTC (ver Tabla 3). Lo que indica que los NTC tienen buena conductividad y que este nanomaterial puede hacer la transferencia de electrones con mayor facilidad.

La Espectroscopia de Impedancia Electroquímica proporciona información útil sobre los cambios en la impedancia en la superficie del electrodo durante el proceso de fabricación. La porción semicircular a frecuencias altas corresponde al proceso limitado de transferencia de electrones, y su diámetro es igual a la resistencia de electrones, el cual controla la cinética de transferencia de electrones en la interface del electrodo. Mientras tanto la parte lineal a bajas frecuencias corresponde al proceso de difusión.

Un comportamiento similar se muestra en el trabajo de Deng y col. (2009) [116], en el cual se reporta el comportamiento en los ensayos de impedancia electroquímica con los electrodos modificados con NTC y enzima, en este caso se inmovilizó glucosa oxidasa pero al igual que en este estudio el diagrama de Nyquist del electrodo modificado con enzima muestra una impedancia mucho mayor en comparación con los NTC demostrando que estos facilitan la

transferencia de electrones. De igual manera en las investigaciones de Rawal y *col.* (2011) [133] y Chawla y *col.* (2012) [134] se reporta que las biomoléculas unidas a NTC y otras nanopartículas para formar nanocompuestos que actúan como elementos favorables para la transferencia de electrones.

4.4.2 Caracterización por voltimetría cíclica

Los electrodos modificados se caracterizaron también por voltamperometría cíclica para evaluar su comportamiento electroquímico.

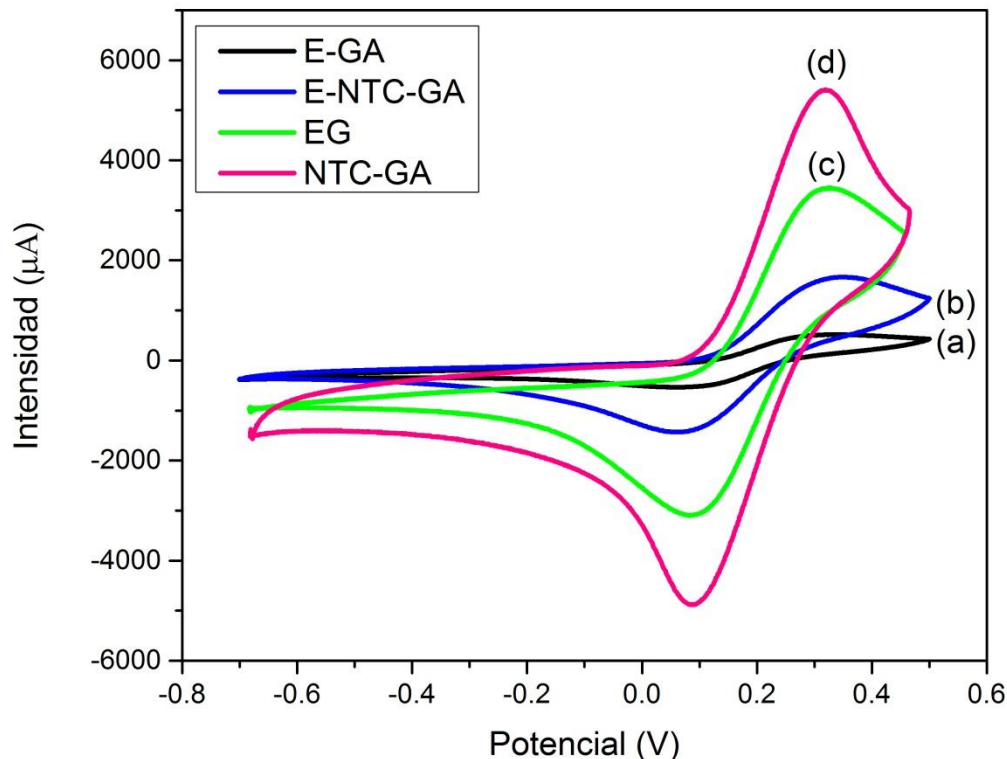


Figura 37. Voltamperometría cíclica de E-GA (a), E-NTC-GA (b), EG (c) y NTC-GA (d) en solución de KCl 1M que contiene $\text{K}_3[\text{Fe}_4(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.1M.

En la Figura 37 se muestran los voltamperogramas de los diferentes electrodos, la curva (c) representa un voltamperograma del electrodo de grafito, en donde se

observa un comportamiento cíclico reversible debido a que el grafito es un material conductor, la curva (a) que representa el electrodo modificado de una mezcla de enzima con GA muestra una corriente de pico muy baja debido a las propiedades no conductoras pertenecientes a la enzima. El electrodo de NTC y glutaraldehído curva (d) muestra un aumento drástico en la corriente de pico, aunque el GA es un polímero no conductor, se muestran tanto el pico anódico como el catódico esto por las propiedades conductoras de los NTC. En el compuesto E-NTC-GA representado en la curva (b) se vislumbra un aumento en la intensidad de pico en comparación con la enzima (curva a) esto se debe a la inmovilización de la enzima en los nanotubos y las propiedades conductoras que estos presentan [136].

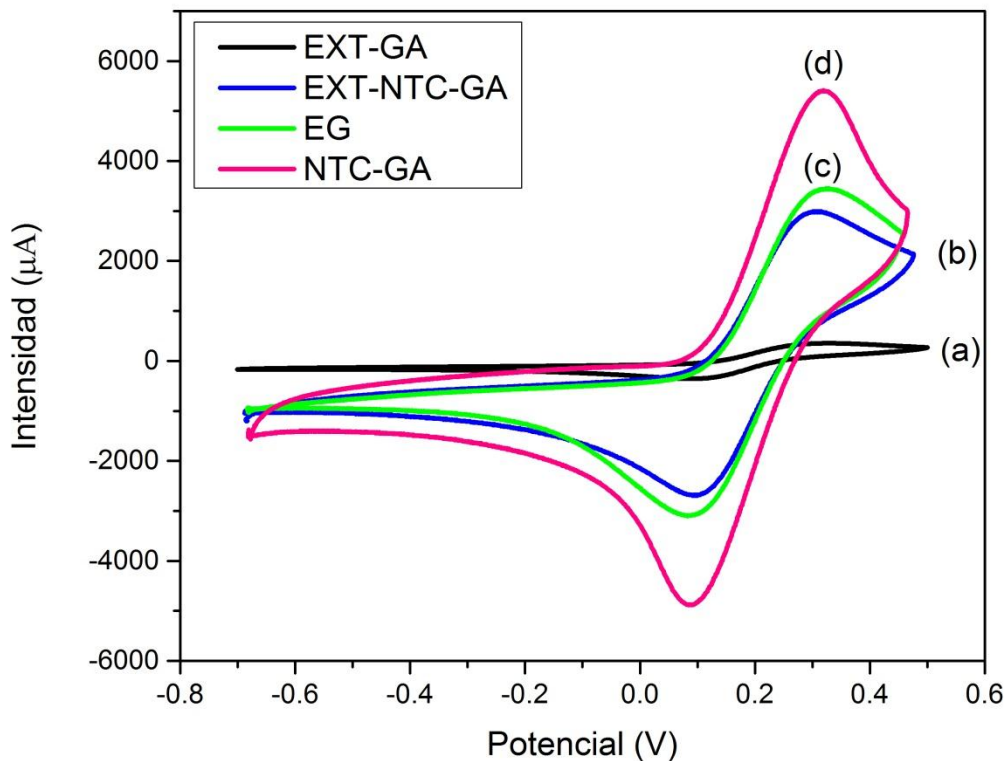


Figura 38. Voltamperometria cíclica de EXT-GA (a), EXT-NTC-GA (b), EG (c) y NTC-GA (d) en solución de KCl 1M que contiene $K_3[Fe_4(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 0.1M.

De igual forma, en la Figura 38, en los voltamperogramas de los electrodos en el cual se muestran los picos tanto anódico como catódico para el electrodo de grafito (sin recubrimiento) por las propiedades conductoras del grafito (curva c). Se muestra en la curva (a) la baja corriente de pico debido al extracto enzimático y porque las enzimas no tienen propiedades conductoras obstruyendo la transferencia de electrones, que en comparación con la curva (d) aumenta considerablemente la corriente de pico debido a los NTC y finalmente el compuesto del extracto enzimático y los nanotubos muestran un aumento en la corriente de pico en comparación con la curva (a) por la razón de que los NTC contribuyen a dicho aumento [137].

5.5.3 Detección de catecol en solución

El objetivo de este experimento fue observar el comportamiento de los electrodos modificados contruidos frente a la presencia de catecol. A continuación se percibe el comportamiento ante la ausencia y presencia de catecol, obteniéndose las siguientes representaciones gráficas de los dos tipos de biosensores preparados tomando en cuenta que se realizaron 5 ciclos en el experimento de voltametría y en los voltamperogramas que se muestran enseguida se han tomado los valores de la cuarta curva por ser los valores más estables del sistema.

El voltamperograma cíclico del electrodo (E-NTC-GA) en SBF (0.1 M, pH 6.8) es representado en la curva (a) y en presencia de catecol (5mM) en la curva (b) de la Figura 39, en el cual se observaron tanto el pico de oxidación como el de reducción (anódico y catódico) debido a la reacción enzimática que lleva a cabo dentro del sistema.

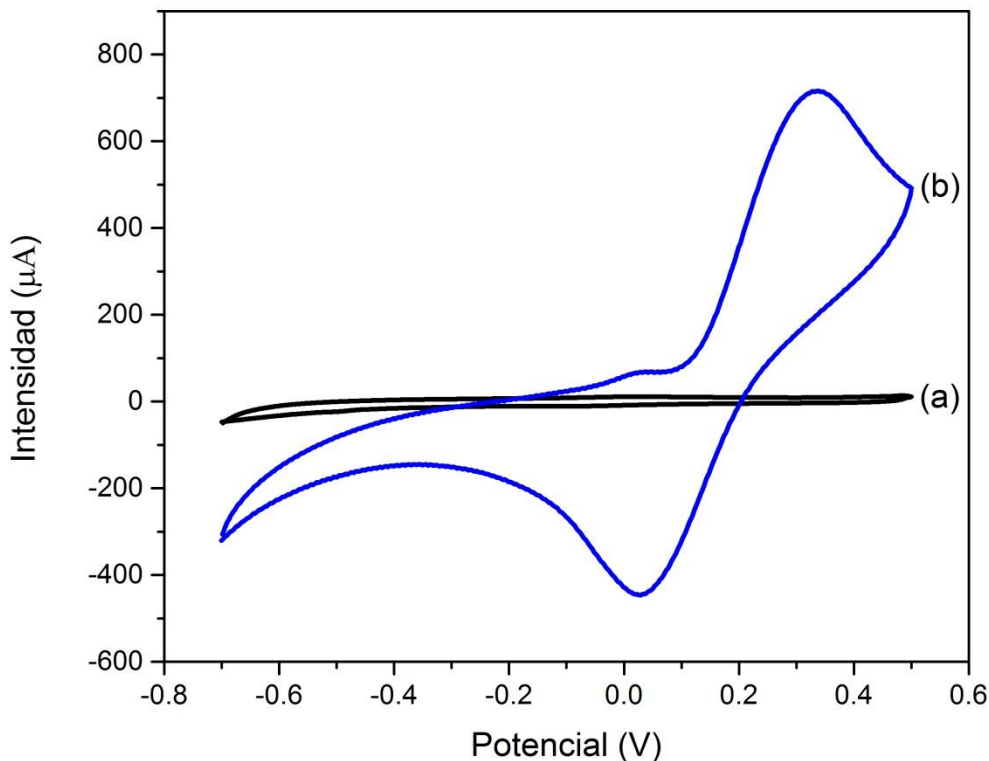


Figura 39. Voltametría cíclica del biosensor E-NTC-GA en SBP, curva (a) y en 5mM de catecol, curva (b)

El voltamperograma del electrodo E-NTC-GA muestra la ausencia y la presencia de catecol, ya que en ausencia de este no se observa ningún pico de oxidación o reducción debido que en la SBP no está presente ningún sustrato para la enzima inmovilizada, cuando se añade catecol el voltamperograma revela una intensidad de pico definido de oxidación en 715.624 μA y un pico de reducción en -446.476 μA (100 mV/s) en la región comprendida entre -0.7 y 0.5 V esto debido a la reacción de óxido-reducción que ocurre en los sitios activos de la lacasa al oxidar el catecol

El electrodo EXT-NTC-GA también mostró los picos de oxidación y reducción en presencia de catecol (Figura 40), observándose un gran aumento en la intensidad

de los picos de la curva (b) en comparación a la ausencia de catecol en la curva (a).

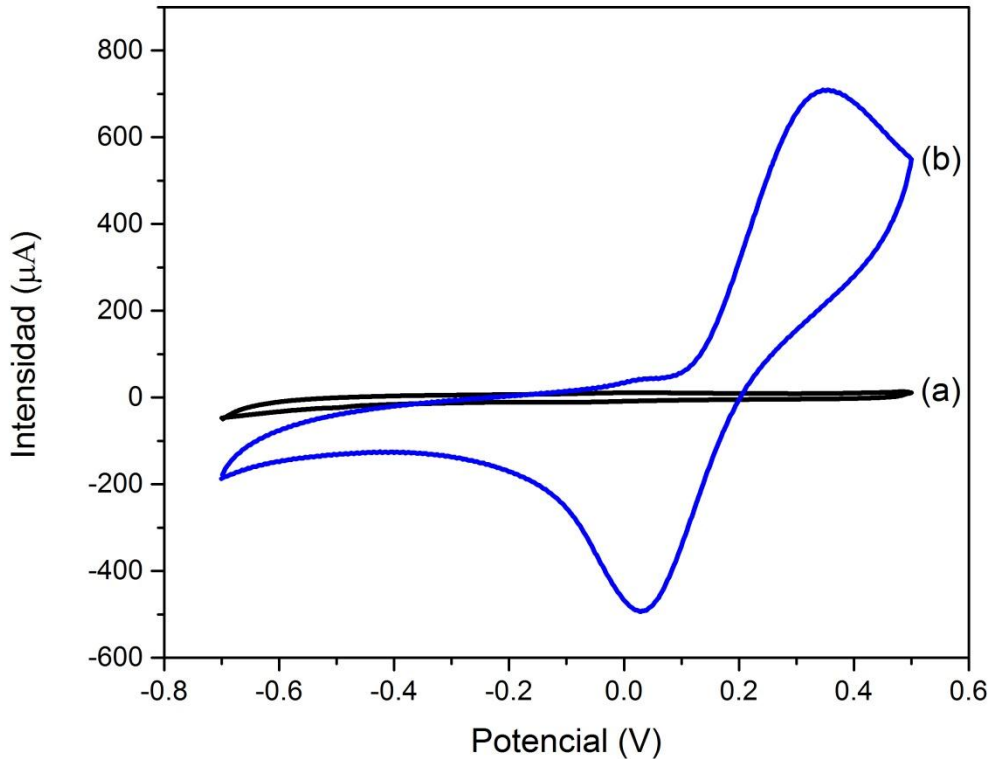


Figura 40. Voltametría cíclica del biosensor EXT-NTC-GA en SBP, curva (a) y en 5mM de catecol, curva (b)

Se ha probado el electrodo EXT-NTC-GA empleando como electrolito soporte la SBP donde no se presentaron picos de oxidación o reducción debido a la ausencia del catecol en la solución; el voltamperograma en presencia de catecol presentó la intensidad de pico en 709.224 μA y -493.676 μA (anódico y catódico respectivamente) en la región comprendida entre -0.7 y 0.5 V (100 mV/s), esto también debido a la reacción de óxido-reducción que ocurre al oxidarse el catecol por el extracto enzimático utilizado.

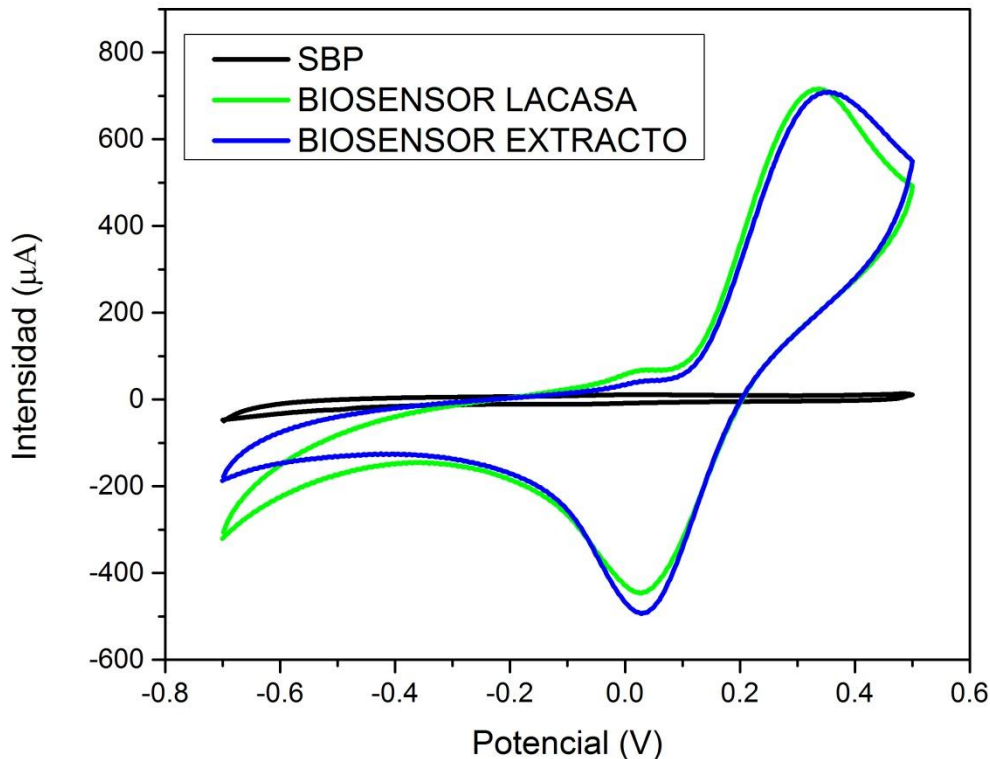


Figura 41. Voltametría cíclica del biosensor en SBP (negro), biosensor de lacasa (verde) y biosensor de extracto (azul) en 5mM de catecol.

Los valores del pico de oxidación de ambos biosensores se encuentran cercanos en $715.624 \mu\text{A}$ y $709.224 \mu\text{A}$ para el biosensor de lacasa y extracto respectivamente. En la Figura 34 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra una comparativa de los dos biosensores desarrollados en donde se puede apreciar la cercanía del valor de la corriente de pico de ambos.

La posible razón por la que los valores del pico de oxidación son muy cercanos puede deberse a que aunque la enzima lacasa tuvo mayor actividad que la actividad de la lacasa en el extracto enzimático, en el extracto enzimático están presentes otras enzimas y otros componentes ya que es un extracto crudo, por esto es posible que se estén llevando otro tipo de reacciones con potencial redox y el sistema lo está detectando.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El tratamiento ácido con la mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico (1:3) al que se sometieron los NTC condujo a la funcionalización de nanotubos como se observa en los espectros de FTIR. Este proceso de funcionalización conduce a una cantidad de grupos funcionales como carbonilo, carboxilo e hidroxilo los cuales se introdujeron en esta etapa del tratamiento. En las micrografías electrónicas se pudieron observar las estructuras tubulares de los NTC y el análisis EDS mostró una reducción en porcentaje de Fe y Co, por lo que el tratamiento ácido ayudo a la reducción de estos compuestos. El patrón de rayos X reveló la naturaleza gráfica de los NTC. Los estudios de Microscopia Raman mostraron las bandas D, G y 2G características de los NTC y una disminución en la intensidad, la disminución de la intensidad de pico debido probablemente a la oxidación de los nanotubos.

Los estudios de FTIR mostraron la inmovilización de la lacasa en los NTC y el extracto en NTC donde, en ambos casos se pudo observar el pico característico de los enlaces amida, atribuido al enlace entre los grupos NH_2 de la enzima y los grupos carboxilo de los NTC funcionalizados. De igual manera en los espectros Raman del compósito E-NTC-GA y EXT-NTC-GA mostraron las bandas características de los NTC aunque en mayor intensidad, esto se puede atribuir a la unión de las enzimas a los nanotubos.

Los ensayos de actividad enzimática mostraron la disminución de la actividad de la enzima inmovilizada en comparación con la enzima libre, para ambos casos (lacasa y extracto enzimático). Sin embargo, aunque la lacasa esta inmovilizada en NTC se observó que la enzima es capaz de oxidar el ABTS y de la misma manera para el extracto enzimático crudo en NTC reaccionaba con el ABTS para oxidarlo por lo que se determinó que es factible el proceso de inmovilización que se utilizó dándole un ambiente estable y reteniendo su actividad catalítica

La técnica de impedancia electroquímica proporcionó información útil sobre las propiedades del biosensor teniendo una reducción en la impedancia del biosensor (E-NTC-GA y Ext-NTC-GA) ya que las propiedades conductoras de los NTC facilitan la transferencia de iones debido a que la enzima no tiene propiedades conductoras.

El biosensor, tanto de enzima lacasa como de extracto enzimático, fue capaz de detectar catecol en solución presentando los picos de oxidación y reducción (anódica y catódica) mostrando la ausencia de estos picos en ausencia de catecol y la presencia de ellos cuando se añade catecol. Los picos de oxidación de ambos biosensores se reportaron en un valor cercano, por lo que se puede decir que ambos pueden detectar la misma intensidad de pico.

Como perspectiva de este proyecto, se recomendaría hacer un estudio del extracto enzimático utilizado, ya que debido a que contiene otras enzimas que podrían estar interviniendo en la detección. O podría usarse un extracto purificado de una enzima. Finalmente, se recomienda realizar un estudio de concentraciones con catecol para evaluar la sensibilidad de los biosensores y determinar los límites de detección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Casero, E., et al., Laccase biosensors based on different enzyme immobilization strategies for phenolic compounds determination. *Talanta*, 2013. **115**: p. 401-408.
2. Vianello, F., et al., A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006. **21**(11): p. 2155-2160.
3. Mena, M.L., P. Yáñez-Sedeño, and J.M. Pingarrón, A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes. *Analytical Biochemistry*, 2005. **336**(1): p. 20-27.
4. Tang, H., et al., A new amperometric method for rapid detection of *Escherichia coli* density using a self-assembled monolayer-based bienzyme biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **562**(2): p. 190-196.
5. Tan, Y., et al., Polymeric Bionanocomposite Cast Thin Films with In Situ Laccase-Catalyzed Polymerization of Dopamine for Biosensing and Biofuel Cell Applications. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010. **114**(15): p. 5016-5024.
6. Chawla, S., R. Rawal, and C.S. Pundir, Fabrication of polyphenol biosensor based on laccase immobilized on copper nanoparticles/chitosan/multiwalled carbon nanotubes/polyaniline-modified gold electrode. *Journal of Biotechnology*, 2011. **156**(1): p. 39-45.
7. Wingard, L., Jr., Enzyme engineering, in *Advances in Biochemical Engineering*, Volume 2. 1972, Springer Berlin Heidelberg. p. 1-48.
8. Bickerstaff, G.F., Protein Immobilization. *Fundamentals and Applications: (Bioprocess Technology Series/14)* Edited by Richard F. Taylor. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1992. **44**(1): p. 71-71.

9. Ortega Ortiz de Apodaca, F., Biosensores y biochips: herramientas para el diagnóstico y la terapéutica 2006: Madrid : Instituto de España : Real Academia Nacional de Farmacia. 140.
10. Gonzalo Ruiz, J., M. Alonso Lomillo, and F.J. Muñoz Pascual, Desarrollo de biosensores enzimáticos miniturizados para su aplicación en la industria alimentaria. 2007: Universitat Autònoma de Barcelona.
11. Arroyo, M., Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars Pharmaceutica, 1998. **39**(2): p. 23-39.
12. Wong, S.S. and L.-J.C. Wong, Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. Enzyme and Microbial Technology, 1992. **14**(11): p. 866-874.
13. Eggins, B.R., Biosensors: an introduction. 2013: Springer-Verlag.
14. Sassolas, A., L.J. Blum, and B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. Biotechnology Advances, 2012. **30**(3): p. 489-511.
15. Stetter, J.R., W.R. Penrose, and S. Yao, Sensors, chemical sensors, electrochemical sensors, and ECS. Journal of The Electrochemical Society, 2003. **150**(2): p. S11-S16.
16. Thévenot, D.R., et al., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. Biosensors and Bioelectronics, 2001. **16**(1): p. 121-131.
17. de la Guardia, M., Biochemical sensors: The state of the art. Microchimica Acta, 1995. **120**(1-4): p. 243-255.
18. Powner, E. and F. Yalcinkaya, Intelligent biosensors. Sensor review, 1997. **17**(2): p. 107-116.
19. Turner, A., I. Karube, and G.S. Wilson, Biosensors: fundamentals and applications. 1987.

20. López, G. and F. Ortiz de Apodaca, Inmunosensores: herramientas analíticas con un gran potencial de futuro. *Schironia*, 2002. **1**: p. 51-59.
21. Hernández, F.J., Design of biosensors exploiting conformational changes in biomolecules. 2009, Universitat Rovira i Virgili.
22. Sánchez-Paniagua López, M., Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos. 2009.
23. Leighton, F. and I. Urquiaga. Los componentes del vino y sus efectos beneficiosos para la salud humana. in VII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Mendoza, Argentina. P. 1999.
24. Carralero Sanz, V., Preparación de biosensores enzimáticos e inmunosensores basados en electrodos modificados con nanopartículas de oro. 2009.
25. Maltos, D.A.F., et al., Uso de técnicas electroquímicas para evaluar el poder antioxidante en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 2010. **18**(49): p. 20-25.
26. Gómez, S., et al., Caracterización de la enzima lacasa en biocompuestos para la determinación del índice de polifenoles en vino. 2008, Universidad de Barcelona. p. 419-425.
27. Martínez Valverde, I., M.J. Periago, and G. Ros, Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch. Latinoam. Nutr*, 2000. **50**(1): p. 5-18.
28. Escarpa, A. and M. Gonzalez, An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2001. **31**(2): p. 57-139.
29. Singleton, V. and J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 1965. **16**(3): p. 144-158.

30. Carrasco-Pancorbo, A., et al., Coelectroosmotic capillary electrophoresis of phenolic acids and derivatized amino acids using N, N-dimethylacrylamide-ethylpyrrolidine methacrylate physically coated capillaries. *Talanta*, 2007. **71**(1): p. 397-405.
31. Rumayor, V.G., et al., Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. 2005: CEIM; Direccion General de Universidades e Investigación.
32. Patel, P., (Bio) sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002. **21**(2): p. 96-115.
33. Mello, L.D. and L.T. Kubota, Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 2002. **77**(2): p. 237-256.
34. Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 1991. **354**(6348): p. 56-58.
35. Iijima, S. and T. Ichihashi, Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, 1993. **363**(6430): p. 603-605.
36. Bethune, D., et al., Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. 1993.
37. Kroto, H.W., A.W. Allaf, and S.P. Balm, C60: Buckminsterfullerene. *Chemical Reviews*, 1991. **91**(6): p. 1213-1235.
38. Nikolaev, P., et al., Fullerene nanowires. *Pure and applied chemistry*, 1997. **69**(1): p. 31-34.
39. Peigney, A., et al., Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon*, 2001. **39**(4): p. 507-514.
40. Yang, W., et al., Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology*, 2007. **18**(41): p. 412001.
41. Maubert, M., et al., Nanotubos de carbono: La era de la nanotecnología. *Razón y palabra*, 2009(68): p. 17.

42. Cruz-Delgado, V.J., et al., Funcionalización de nanotubos de carbobo para la preparación de nanocompuestos poliméricos. *Ide@s CONCYTEG*, 2011. **6**(72): p. 675-692.
43. Chen, J., et al., Solution Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science*, 1998. **282**(5386): p. 95-98.
44. Andrews, R., et al., Multiwall Carbon Nanotubes: Synthesis and Application. *Accounts of Chemical Research*, 2002. **35**(12): p. 1008-1017.
45. Ros, T.G., et al., Surface Oxidation of Carbon Nanofibres. *Chemistry – A European Journal*, 2002. **8**(5): p. 1151-1162.
46. Rasheed, A., et al., The efficiency of the oxidation of carbon nanofibers with various oxidizing agents. *Carbon*, 2007. **45**(5): p. 1072-1080.
47. Jiang, K., et al., Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. *Journal of Materials Chemistry*, 2004. **14**(1): p. 37-39.
48. Asuri, P., et al., Water-soluble carbon nanotube-enzyme conjugates as functional biocatalytic formulations. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006. **95**(5): p. 804-811.
49. Mathews, C., K. Van Holde, and K. Ahern, *Bioquímica*. 3ra. Edición. Madrid: Adison Wesley Pearson Education, 2002.
50. Hayes, J.D., J.U. Flanagan, and I.R. Jowsey, Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005. **45**: p. 51-88.
51. Horton, H.R., et al., *Principios de bioquímica*. 2008: Pearson Educación.
52. Henrissat, B. and G. Davies, Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current opinion in structural biology*, 1997. **7**(5): p. 637-644.
53. Purich, D.L. and R.D. Allison, *Handbook of biochemical kinetics: a guide to dynamic processes in the molecular life sciences*. 1999: Academic Press.

54. Lehninger, A.L., Lehninger Principios En Bioquímica. 2002: Editorial Omega.
55. Sun, H., et al., Analysis of five rice 4-coumarate: coenzyme A ligase enzyme activity and stress response for potential roles in lignin and flavonoid biosynthesis in rice. Biochemical and biophysical research communications, 2013. **430**(3): p. 1151-1156.
56. Tien, M. and T.K. Kirk, Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science(Washington), 1983. **221**(4611): p. 661-662.
57. Glenn, J.K., et al., An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemical and biophysical research communications, 1983. **114**(3): p. 1077-1083.
58. Martínez, A.T., Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **30**(4): p. 425-444.
59. Tien, M., Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. CRC Critical reviews in microbiology, 1987. **15**(2): p. 141-168.
60. Kuwahara, M., et al., Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS letters, 1984. **169**(2): p. 247-250.
61. Blanchette, R.A., Manganese accumulation in wood decayed by white rot fungi. Phytopathology, 1984. **74**(6): p. 725-730.
62. Hammel, K.E., et al., Biomimetic oxidation of nonphenolic lignin models by Mn (III): new observations on the oxidizability of guaiacyl and syringyl substructures. Archives of biochemistry and biophysics, 1989. **270**(1): p. 404-409.

63. Wariishi, H., et al., Thiol-mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*, 1989. **264**(24): p. 14185-14191.
64. Bao, W., et al., Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS letters*, 1994. **354**(3): p. 297-300.
65. Hofrichter, M., Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial technology*, 2002. **30**(4): p. 454-466.
66. Hatakka, A., Lignin-modifying enzymes fungi: production and role. *FEMS microbiology reviews*, 1994. **13**: p. 125-135.
67. Pelaez, F., M.J. Martinez, and A. Martinez, Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological research*, 1995. **99**(1): p. 37-42.
68. Camarero, S., et al., Manganese-Mediated Lignin Degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. **62**(3): p. 1070-1072.
69. Kunamneni, A., et al., Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, 2008. **7**(1): p. 32.
70. Desai, S. and C. Nityanand, Microbial laccases and their applications: a review. *Asian J Biotechnol*, 2011. **3**(2): p. 98-124.
71. Messerschmidt, A. and R. Huber, The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin modelling and structural relationships. *European Journal of Biochemistry*, 1990. **187**(2): p. 341-352.
72. Claus, H., Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 2003. **179**(3): p. 145-150.
73. Kramer, K.J., et al., Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 2001. **57**(2): p. 385-392.

74. Gellerstedt, G. and R. Northey, Analysis of birch wood lignin by oxidative degradation. *Wood Science and Technology*, 1989. **23**(1): p. 75-83.
75. Yoshida, H., LXIII.—chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society of Tokio. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 1883. **43**: p. 472-486.
76. Baldrian, P., Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews*, 2006. **30**(2): p. 215-242.
77. Elsayed, M.A., et al., Optimization of cultural and nutritional parameters for the production of laccase by *Pleurotus ostreatus* ARC280. *British Biotechnology Journal*, 2012. **2**(3): p. 115-132.
78. Hakulinen, N., et al., Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2002. **9**(8): p. 601-605.
79. Piontek, K., M. Antorini, and T. Choinowski, Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(40): p. 37663-37669.
80. Xu, F., Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, 1996. **35**(23): p. 7608-7614.
81. Xu, F., et al., A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1996. **1292**(2): p. 303-311.
82. Sakurai, T., Anaerobic reactions of *Rhus vernicifera* laccase and its type-2 copper-depleted derivatives with hexacyanoferrate (II). *Biochem. J*, 1992. **284**: p. 681-685.

83. Abadulla, E., et al., Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000. **66**(8): p. 3357-3362.
84. Di Fusco, M., et al., Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta*, 2010. **81**(1–2): p. 235-240.
85. Gomes, S. and M. Rebelo, A New Laccase Biosensor For Polyphenols Determination. *Sensors*, 2003. **3**(6): p. 166.
86. Manole, A., et al., Laccase immobilized on hydrotalcites as a 3rd generation biosensor type. *Biomaterials in Biophysics Medical Physics and Ecology*, 2008: p. 11.
87. Freire, R.S., et al., Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2003. **14**(2): p. 230-243.
88. Thurston, C.F., The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994. **140**(1): p. 19-26.
89. Gochev, V. and A. Krastanov, Fungal laccases. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2007. **13**: p. 75-83.
90. Ivnitski, D. and P. Atanassov, Electrochemical studies of intramolecular electron transfer in laccase from *Trametes versicolor*. *Electroanalysis*, 2007. **19**(22): p. 2307-2313.
91. Enguita, F.J., et al., Crystal structure of a bacterial endospore coat component a laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(21): p. 19416-19425.
92. Durán, N., et al., Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002. **31**(7): p. 907-931.

93. Singh, G., et al., 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*, 2010. **3**(1): p. 48-53.
94. De Quan, K.Y., K.B. Yoon, and W. Shin, Assembly of laccase over platinum oxide surface and application as an amperometric biosensor. *Bull Korean Chem Soc*, 2002. **23**: p. 385-90.
95. Couto, S.R. and J.L.T. Herrera, Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances*, 2006. **24**(5): p. 500-513.
96. Madhavi, V. and S. Lele, Laccase: properties and applications. *BioResources*, 2009. **4**(4): p. 1694-1717.
97. Minussi, R.C., G.M. Pastore, and N. Durán, Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 2002. **13**(6): p. 205-216.
98. Mohidem, N.A. and H. Mat, The catalytic activity of laccase immobilized in sol-gel silica. *Journal of Applied Sciences*, 2009. **9**(17): p. 3141-3145.
99. Li, A., et al., Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes* sp. *African Journal of Biochemistry Research*, 2008. **2**(8): p. 181-183.
100. Dwivedi, U.N., et al., Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011. **68**(2): p. 117-128.
101. Kim, Y.-S., et al., Immobilization of avidin on the functionalized carbon nanotubes. *Synthetic Metals*, 2006. **156**(14–15): p. 938-943.
102. Liu, J., et al., Fullerene Pipes. *Science*, 1998. **280**(5367): p. 1253-1256.

103. Saleh, T.A., The Role of Carbon Nanotubes in Enhancement of Photocatalysis. Syntheses and Applications of Carbon Nanotubes and Their Composites. 2013.
104. Bourbonnais, R., et al., Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995. **61**(5): p. 1876-1880.
105. Wolfenden, B.S. and R.L. Willson, Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2[prime or minute]-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1982(7): p. 805-812.
106. Tavares, A.P.M., et al., Immobilization of laccase on modified silica: Stabilization, thermal inactivation and kinetic behaviour in 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid. *Bioresource Technology*, 2013. **131**: p. 405-412.
107. Ipohorski, M., microscopio electrónico de barrido. 1975.
108. Bermúdez, F.L. and L.T. Sáinz, PROCESOS DE EROSION EN TUNEL (PIPING) EN CUENCAS SEDIMENTARIAS DE MURCIA (ESPAÑA). ESTUDIO PRELIMINAR MEDIANTE DIFRACCION DE RAYOS XY MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO. *Papeles de Geografía*, 1986(11).
109. Bermúdez-Polonio, J., Métodos de difracción de rayos X: principios y aplicaciones. 1981: Ediciones Pirámide.
110. Warren, B.E., X-ray Diffraction. 1969: Courier Corporation.
111. Stobinski, L., et al., Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods. *Journal of Alloys and Compounds*, 2010. **501**(1): p. 77-84.

112. Madejová, J., FTIR techniques in clay mineral studies. *Vibrational spectroscopy*, 2003. **31**(1): p. 1-10.
113. McCreery, R.L., *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, ed. J.D. Winefordner. 2000, USA: Wiley-Interscience.
114. Santoro, G. and C. Domingo, Espectroscopía Raman de nanotubos de carbono. *Óptica pura y aplicada*, 2007. **40**(2): p. 175-186.
115. Costa, S., et al., Characterization of carbon nanotubes by Raman spectroscopy. *Mater Sci-Poland*, 2008. **26**(2): p. 433-441.
116. Deng, S., et al., A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nitrogen-doped carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **25**(2): p. 373-377.
117. Díez Tascón, J.M., *Materiales de carbono: estructuras y formas*. *Óptica pura y aplicada*, 2007. **40**(2): p. 149-159.
118. Mahanandia, P., et al., Studies towards synthesis, evolution and alignment characteristics of dense, millimeter long multiwalled carbon nanotube arrays. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2011. **2**: p. 293-301.
119. Oh, W. and M. Chen, Synthesis and Characterization of CNT/TiO₂ Composites Thermally Derived from MWCNT and Titanium (IV) n-Butoxide. *Bulletin-Korean Chemical Society*, 2008. **29**(1): p. 159.
120. Yan, D., et al., Production of a high dispersion of silver nanoparticles on surface-functionalized multi-walled carbon nanotubes using an electrostatic technique. *Materials Letters*, 2009. **63**(2): p. 171-173.
121. Kim, I.T. and R. Tannenbaum, *Magnetic Carbon Nanotubes: Synthesis, Characterization, and Anisotropic Electrical Properties*. 2011: INTECH Open Access Publisher.

122. Luo, X., et al., Carbon nanotube nanoreservoir for controlled release of anti-inflammatory dexamethasone. *Biomaterials*, 2011. **32**(26): p. 6316-6323.
123. Saleh, T.A., The influence of treatment temperature on the acidity of MWCNT oxidized by HNO₃ or a mixture of HNO₃/H₂SO₄. *Applied Surface Science*, 2011. **257**(17): p. 7746-7751.
124. Lu, C., F. Su, and S. Hu, Surface modification of carbon nanotubes for enhancing BTEX adsorption from aqueous solutions. *Applied Surface Science*, 2008. **254**(21): p. 7035-7041.
125. Hirsch, A., Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002. **41**(11): p. 1853-1859.
126. Malarvizhia, A. and P. A., Bonding of cholesterol oxides to functionalised multiwalled carbon nanotubes for in-vitro biosensor application. *Biomed Res- India*, 2012. **23**(4): p. 505-512.
127. Kumar, A., et al., Effect of intense laser and energetic ion irradiation on Raman modes of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Thin Solid Films*, 2009. **517**(15): p. 4322-4324.
128. Arepalli, S., et al., Protocol for the characterization of single-wall carbon nanotube material quality. *Carbon*, 2004. **42**(8): p. 1783-1791.
129. Dresselhaus, M.S., et al., Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Physics reports*, 2005. **409**(2): p. 47-99.
130. Kalbac, M., et al., Defects in individual semiconducting single wall carbon nanotubes: Raman spectroscopic and in situ Raman spectroelectrochemical study. *Nano letters*, 2010. **10**(11): p. 4619-4626.
131. Kim, B.J., et al., Immobilization of horseradish peroxidase on multi-walled carbon nanotubes and its enzymatic stability. *Current Applied Physics*, 2009. **9**(4, Supplement): p. e263-e265.

132. Rastian, Z., et al., Facile surface functionalization of multiwalled carbon nanotubes by soft dielectric barrier discharge plasma: Generate compatible interface for lipase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, 2014. **90**: p. 16-26.
133. Rawal, R., S. Chawla, and C.S. Pundir, Polyphenol biosensor based on laccase immobilized onto silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline gold electrode. *Analytical Biochemistry*, 2011. **419**(2): p. 196-204.
134. Chawla, S., et al., An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto nickel nanoparticles/carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline modified gold electrode for determination of phenolic content in fruit juices. *Biochemical Engineering Journal*, 2012. **68**: p. 76-84.
135. Iyer, P.V. and L. Ananthanarayan, Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 2008. **43**(10): p. 1019-1032.
136. Yin, Y., et al., Direct Electrochemistry of Redox Proteins and Enzymes Promoted by Carbon Nanotubes. *Sensors*, 2005. **5**(4): p. 220.
137. Qiguan, W. and M. Hiroshi, Carbon Nanotube-Based Thin Films: Synthesis and Properties. *Carbon Nanotubes - Synthesis, Characterization, Applications*. 2011.