

BIOELECTRODO BASADO EN LA INMOVILIZACION DE PEROXIDASA DE RABANO EN PELICULAS ULTRADELGADAS DE POLICATION BIOCOMPATIBLE Y NANOPARTICULAS DE LAPONITA Y Au

Gulotta, Florencia A.^a; Tulli, Fiorella, G.^a; Martino, Débora^b; Borsarelli, Claudio, D.^a; Paz Zanini, Verónica I.^a

^aInstituto de Bionanotecnología (INBIONATEC), Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE); CONICET. RN 9, Km 1125, G4206XCP. Santiago del Estero, Argentina.

^bInstituto de Física del Litoral (IFIS Litoral), CONICET-UNL, Guemes 3450, 3000, Santa Fe, Argentina.

fgulotta@hotmail.com

Introducción y Objetivos

La inmovilización de enzimas en geles inorgánicos de laponita genera biomateriales que exhiben una actividad enzimática elevada, debido al significativo carácter hidrofílico de la matriz huésped [1,2]. Sin embargo, la lenta liberación de las moléculas de enzima incorporadas en estas matrices requiere en algunos casos, la utilización de un entrecruzador químico, tal como el glutaraldehído [3], aunque desafortunadamente este tratamiento muchas veces disminuye la actividad de la enzima atrapada. Otra forma de limitar la liberación enzimática consiste en generar electroquímicamente un polímero dentro de agujeros, microcanales y espacios conformados en películas ultradelgadas del hidrogel formado por la arcilla nanoestructurada laponita [4]. Se ha informado sobre la inmovilización de diversas enzimas, tales como glucosa oxidasa [4,5,6], polifenoloxidasas [7] y lactato oxidasa [8,9,10] en matrices inorgánicas de laponita mediante diversas metodologías. Un desafío muy interesante radica en la búsqueda de agentes estabilizantes de los hidrogeles que sean biocompatibles y solubles en medios acuosos. En este sentido, el presente trabajo propone la indagación del uso de polielectrolitos biocompatibles y amigables con el medio ambiente, tal como los policationes obtenidos por co-polimerización de vinil bencil timina (VBT) y vinil bencil amonio (VBA) [11].

El presente trabajo propone el diseño y desarrollo de electrodos amperométricos enzimáticos en los cuales la enzima peroxidasa de rábano (HRP) será incluida en películas ultradelgadas compuestas de nanodiscos de arcilla Laponita® (25x1 nm), nanopartículas de oro (AuNP, $\varnothing = 5$ nm) y polielectrolitos de fórmula general $\{[VBT-VBA_n]^{n+}\}_m$ con $n = 4, 8$ y 16 y $m = 20-40$ derivados de la co-polimerización de unidades de VBT y VBA. Se analizaron las condiciones experimentales de inmovilización y operabilidad del bioelectrodo (pH, fuerza iónica, relación en masa de arcilla/enzima), como así también los parámetros analíticos de los mismos.

Metodología

Los hidrogeles se prepararon mezclando 30 μ g de laponita con 15 μ g de polication y diferentes cantidades de HRP (7,5; 15 y 30 μ g) y AuNP (2,5; 5 y 7,5 μ l; solución coloidal). Las películas se obtuvieron depositando un volumen determinado sobre un electrodo de carbono vítreo y dejando evaporar el solvente a temperatura ambiente. Una vez optimizadas las variables experimentales se determinaron las características analíticas del transductor desarrollado: sensibilidad, rango de linealidad, límites de detección y cuantificación, reproducibilidad y estabilidad. La señal analítica se obtuvo mediante determinaciones electroquímicas, a partir de la respuesta amperométrica hacia

hidroquinona, y la caracterización de los transductores modificados se llevó a cabo mediante voltametría cíclica empleando un mediador redox como sonda de prueba.

Resultados

La estabilidad de la película del hidrogel, como así también la funcionalidad de la enzima en la misma está influenciada por un balance masa/carga que posibilita un equilibrio entre la voluminosidad y la densidad de carga de las estructuras involucradas. La composición óptima de la película correspondió a un gel formado por: 30 μg de laponita + 15 μg de polication $[\text{VBT-VBA}_4]^{4+}$ + 15 μg de HRP y 2,5 μl de solución de AuNP. Los parámetros analíticos correspondientes a esta biointerface se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Parámetros analíticos del biosensor desarrollado

Sensibilidad $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	Rango de linealidad (μM)	Límite de detección (μM)	Límite de cuantificación (μM)	Reproducibilidad
$0.118 \pm$ 0.003	0,010 – 72	0,003	0,009	98 %

Conclusiones

La inmovilización del elemento de bioconocimiento constituye una etapa clave en el diseño y desarrollo de un biosensor. En este sentido los hidrogeles con laponita han demostrado cualidades óptimas, aunque la retención de la enzima muchas veces está comprometida. Por su parte, los polielectrolitos derivados de timina posibilitan la estabilización de estas estructuras sin afectar significativamente la actividad biológica del elemento de reconocimiento. Así mismo, las AuNP mejoran la señal de corriente obtenida como respuesta como consecuencia del incremento de la conductividad del hidrogel y además proveen de nanoambientes adecuados en los cuales las biomoléculas pueden retener su actividad biocatalítica. Finalmente, el biosensor desarrollado exhibe características destacadas que superan a algunas previamente informadas en bibliografía, lo cual lo hace potencialmente aplicable al análisis de muestras reales.

Referencias

- [1]. Poyard, S.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Cosnier, S.; Labbé, P.; Besombes, J-L.; Sens. Actuators B; 1996, 33, 44.
- [2]. Senillou, A.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Cosnier, S. Anal. Chim. Acta; 1999, 401, 117.
- [3]. Poyard, S.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Cosnier, S.; Labbé, P.; Anal. Chim. Acta; 1998, 364, 165.
- [4]. Cosnier, S.; Lambert, F. Stoytcheva, M.; Electroanalysis; 2000, 5, 12.
- [5]. Cosnier, S.; Mousty, C.; Gondran, C.; Lepellec, A.; Materials Science and Engineering; 2006, C26, 442.
- [6]. Paz Zanini, V.I., Gavilán, M., López de Mishima, B.A., Martino, D.M., Borsarelli, C.D.; Talanta; 2016, 150, 646.
- [7]. Fan, Q.; Shan, D.; Xue, H.; He, Y.; Cosnier, S.; Biosens. Bioelectron.; 2007, 22, 816.
- [8]. Paz Zanini, V.; López de Mishima, B.; Labbé, P.; Solís, V.; Electroanal; 2010, 22, 946.
- [9]. Paz Zanini, V.; López de Mishima, B.; Solís, V.; Sens. And Actuators B; 2011, 155, 75.
- [10]. Paz Zanini, V.I., Tulli, F., Martino, D.M., López de Mishima, B., Borsarelli, C.D.; Sens. Actuators B; 2013, 181, 251.

XXXI Congreso Argentino de Química

25 al 28 de Octubre de 2016 Asociación Química Argentina

Sánchez de Bustamante 1749 – Ciudad de Buenos Aires – Argentina

The Journal of The Argentine Chemical Society Vol. 103 (1-2) January – December 2016 ISSN: 1852 -1207

Anales de la Asociación Química Argentina AAQAE 095 - 196

[11]. Grasshoff, M.; Taylor, L. D.; Warner, J.C.; Vinylbenzyl thymine monomers, U.S. Patent 5,455,349, October 3, 1995.