



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDLAGO



FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

OPCIÓN: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

BIOSENSOR DE GLUCOSA OXIDASA BASADO EN UNA
NANOESTRUCTURA DE TiO_2 DOPADO CON Ni POR SOL
GEL

TESIS

Para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta el
IBQ. DAVID HERRERA GARCIA

Directora de tesis
D.I. Ma. Guadalupe Garnica Romo

Morelia, Michoacán, Agosto 2018

Dedicatoria

Gracias a mi familia, mis primos y amigos que siempre estuvieron conmigo brindándome su ayuda y apoyo, para lograr este gran objetivo. Con todo mi cariño y esfuerzo, esta tesis la dedico a ustedes:

A mi madre, padre, hermano, a mis primos y amigos.

Agradecimientos

A CONACyT por la beca 598587 asignada para la realización de este proyecto.

A la D.I. Ma. Guadalupe Garnica Romo, asesora de este proyecto de tesis, gracias por su apoyo y aportaciones para la exitosa conclusión, debido a que sin su ayuda esto no pudo haber sido posible.

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

A la coordinación de investigación científica de la Universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo del programa de investigación de 2018; por el soporte económico al proyecto titulado "Biosensor enzimático glucosa oxidasa basado en nanoestructura de TiO_2 dopado con níquel por sol-gel".

A la D.C. Mariana Romero Arcos por su apoyo para culminación del proyecto.

Índice

Dedicatoria

Agradecimientos

Índice

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen/abstract	1
1. Introducción	3
1.2 Justificación	3
1.3 Hipótesis	3
1.4 Objetivos	3
1.4.1 General	3
1.4.2 Específicos	3
2. Antecedentes	4
2.1. Biosensores	4
2.1.1 .Clasificación de los biosensores	4
2.1.1.1 Biosensores de interacción	4
2.1.1.2 Sistemas de transducción	5
2.1.1.3 Características que deben presentar los biosensores	6
2.1.2 Biosensor amperométrico	6
2.2 Enzimas	7
2.2.1 Glucosa oxidasa	7
2.3 Método Sol-Gel	9
2.4 Óxido metálico	10
2.4.1 Dióxido de titanio	10
2.4.1.1 Aplicaciones	11
2.4.2 Níquel	12
2.4.3 Titanato de níquel	12
2.5 Sistemas de inmovilización de enzimas	13
2.5.1 Adsorción	13
2.5.2 Entrecruzamiento	13
2.5.3 Unión covalente	13
2.6 Glucosa	13
2.6.1 Determinación de carbohidratos	14
2.6.2 Desventajas de los métodos tradicionales	14
3 Técnicas de caracterización	16
3.1 Espectroscopia de difracción de rayos X	16
3.2 Microscopia electrónica de barrido	18
3.3 Espectroscopia de infrarrojo	19
3.4 Espectroscopia RAMAN	21
3.5 Reflectancia difusa	22
3.6 Tamaño de partícula	24
3.7 Técnicas electroquímicas	26
3.7.1 Espectroscopia de impedancia (EIS)	26
3.7.2 Voltimetría cíclica	28
4 Metodología	31

4.1 Reactivos	31
4.2 Síntesis de nanoestructuras de TiO ₂ y TiO ₂ -Ni	31
4.3 Preparación del Biosensor	32
4.3.1 Pretratamiento del electrodo de grafito	32
4.3.2 Electrodo de nanopartículas de titania y titania-Ni	33
4.4 Métodos de caracterización	33
5 Resultados y Conclusión	35
5.1 Difracción de rayos X	35
5.2 Tamaño de partícula	38
5.3 Espectroscopia FTIR	40
5.4 Espectroscopia RAMAN	44
5.5 Reflectancia difusa	47
5.6 Microscopia electrónica de barrido (siglas en inglés SEM)	49
5.7 Enzima libre e inmovilizada	50
5.8 Espectroscopia de impedancia	52
5.9 Voltimetría cíclica	54
5.9.1 Respuesta electroquímica de glucosa en los biosensores	56
6 Conclusión	60
7 Referencias	61

Índice de figuras

Figura	Nombre	Página
Figura 1	Esquema de un biosensor	4
Figura 2	Estructura Glucosa Oxidasa	8
Figura 3	Reacción de oxidación de la D-glucosa	8
Figura 4	Flavín Adenín Dinucleótido (FAD)	9
Figura 5	Aplicaciones de la tecnología Sol-Gel	10
Figura 6	Fases cristalinas del TiO ₂ . De izquierda a derecha Rutilo, Anatasa y Brokita.	11
Figura 7	Estructura básica de Rutilo, Brokita y Anatasa	11
Figura 8	Estructura del NiTiO ₃	12
Figura 9	Estructura química de la D-Glucosa	14
Figura 10	Difracción de rayos X por los planos de un cristal	16
Figura 11	Ley de Bragg	17
Figura 12	Componentes principales de un difractómetro de rayos X	18
Figura 13	Microscopio de barrido electrónico	19
Figura 14	Modos vibracionales por absorción infrarroja	20
Figura 15	Interferómetro de Michelson	21
Figura 16	Espectrómetro de Raman	22
Figura 17	Esquema de funcionamiento de la reflectancia difusa	23
Figura 18	Esquema de funcionamiento de un equipo para determinar tamaño de partícula Horiba SZ100	24
Figura 19	Fluctuación de la intensidad de luz dispersada respecto al tiempo de una partícula: a) pequeña, b) mediana, c) grande	25
Figura 20	Respuesta de una corriente sinusoidal en un sistema lineal	27
Figura 21	Forma de onda triangular en voltimetría cíclica	29
Figura 22	Voltamperograma cíclico reversible	30
Figura 23	Diagrama de flujo de preparación sol-gel de TiO ₂	31
Figura 24	Diagrama de flujo de preparación sol-gel de TiO ₂ dopado con níquel	32
Figura 25	Espectro de difracción de rayos X muestras tratadas a 100°C	35
Figura 26	Espectro de difracción de rayos X muestras tratadas a 500°C	37
Figura 27	Tamaño de partícula de soles A) TiO ₂ , B) TiO ₂ -Ni2%, C) TiO ₂ -Ni5% y D) TiO ₂ -Ni10%	38
Figura 28	Tamaño de partícula muestras tratadas a 100°C A) TiO ₂ , B) TiO ₂ -Ni2%, C) TiO ₂ -Ni5% y D) TiO ₂ -Ni10%	39
Figura 29	Tamaño de partícula muestras tratadas a 500°C A) TiO ₂ , B) TiO ₂ -Ni2%, C) TiO ₂ -Ni5% y D) TiO ₂ -Ni10%	40
Figura 30	Espectro infrarrojo de soles de A)TiO ₂ , B)TiO ₂ -Ni2%, C)TiO ₂ -Ni5% y D) TiO ₂ -Ni10%	41
Figura 31	Espectro infrarrojo de polvos de TiO ₂	42
Figura 32	Espectro infrarrojo de polvos secados a 100 °C de: B) TiO ₂ -Ni2%, C) TiO ₂ -Ni5% y D) TiO ₂ -Ni10%	43
Figura 33	Espectro infrarrojo de polvos tratados a 500 °C de: B) TiO ₂ -Ni2%, C) TiO ₂ -Ni5% y D) TiO ₂ -Ni10%	44

Figura 34	Espectro de Raman polvos secados a 100°C de TiO ₂ y TiO ₂ dopado con Ni 2, 5 y 10%w	45
Figura 35	Detalle de Raman polvos secados a 100°C de TiO ₂ y TiO ₂ dopado con Ni 2, 5 y 10%w	45
Figura 36	Espectro de Raman polvos tratados a 500°C de TiO ₂ y TiO ₂ dopado con Ni 2, 5 y 10%w	46
Figura 37	Detalle de Raman polvos tratados a 500°C de TiO ₂ y TiO ₂ dopado con Ni 2, 5 y 10%w	47
Figura 38	Espectro de reflectancia difusa de polvos secados a 100°C de TiO ₂ y TiO ₂ dopado con Ni.	48
Figura 39	Espectro de reflectancia difusa de polvos tratados a 500°C de TiO ₂ y TiO ₂ dopado con Ni.	48
Figura 40	SEM Polvos secados a 100°C de: A) TiO ₂ , B) TiO ₂ -Ni2%, C) TiO ₂ -Ni5% y D) TiO ₂ -Ni10%	49
Figura 41	SEM Polvos tratados a 500°C de: a) TiO ₂ , b) TiO ₂ -Ni2%, c) TiO ₂ -Ni5% y d) TiO ₂ -Ni10%	50
Figura 42	Espectro infrarrojo de enzima glucosa oxidasa	51
Figura 43	Espectro IR de glucosa oxidasa/gluteraldehído	51
Figura 44	Espectro IR enzima inmovilizada en sol gel, A) TiO ₂ , B) TiO ₂ -Ni2%, C) TiO ₂ -Ni5% y D) TiO ₂ -Ni10%	52
Figura 45	Diagrama de Nyquist para películas de TiO ₂ y TiO ₂ dopado con Ni al 2, 5 y 10%w	53
Figura 46	Diagrama Nyquist películas de TiO ₂ y dopajes con Ni al 2, 5 y 10% con enzima y gluteraldehído	54
Figura 47	Electrodos con película de TiO ₂ y TiO ₂ -Ni 2, 5 y 10%w en solución de ferrocianato/ferrocianuro de potasio 0.1M	55
Figura 48	Voltimetría cíclica de la enzima inmovilizada con gluteraldehído y soles de TiO ₂ y TiO ₂ dopado con Ni	56
Figura 49	Respuesta de voltimetría cíclica de TiO ₂ -Glut-Enzima a glucosa	57
Figura 50	Respuesta de voltimetría cíclica de TiO ₂ -Ni2%-Glut-Enzima a glucosa	57
Figura 51	Respuesta de voltimetría cíclica de TiO ₂ -Ni5%-Glut-Enzima a glucosa	58
Figura 52	Respuesta de voltimetría cíclica de TiO ₂ -Ni10%-Glut-Enzima a glucosa	58

Índice de tablas

Tabla	Nombre	Página
Tabla 1	Clasificación de las enzimas	6
Tabla 2	Tamaño de cristal y porcentaje cristalino para muestras secadas a 100 °C	36
Tabla 3	Tamaño de cristal y porcentaje cristalino de las muestras tratadas a 500 °C	38

Resumen y abstract

En este trabajo se presenta el desarrollo de un biosensor de glucosa basado en glucosa oxidasa inmovilizada en una nanoestructura de TiO_2 dopado con Ni obtenida por sol-gel. La nanoestructura se caracterizó morfológicamente y estructuralmente mediante difracción de rayos X (DR-X), espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia RAMAN, reflectancia difusa (DRS), microscopia electrónica de barrido (SEM) y tamaño de cristal. Los resultados indican la presencia de fase anatasa en todas las muestras y de NiTiO_3 en las muestras dopadas. También se realizaron pruebas electroquímicas de espectroscopia de impedancia (EIS) y de voltimetría cíclica para conocer el comportamiento electroquímico de la nanoestructura y del biosensor, los resultados indican que la nanoestructura tiene baja resistencia al paso de carga eléctrica y que tanto la nanoestructura como el biosensor si presentan actividad electroquímica. Finalmente el biosensor fue capaz de detectar glucosa y mostró una sensibilidad de $0.625224599 \text{ mA/mMol}$.

In the current work, is presented the development of a glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in a nano-structure of TiO_2 doped with Ni obtained by sol-gel. The nanostructure was characterized morphologically and structurally by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), RAMAN spectroscopy, diffuse reflectance (DRS), scanning electron microscopy (SEM) and crystal size. The results indicate the presence of anatase phase in all samples and NiTiO_3 in the doped samples. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry tests were also performed to determine the electrochemical behavior of the nanostructure and the biosensor. The results indicate that the nanostructure has a low resistance to electric charge and that both the nanostructure and the biosensor if they present electrochemical activity. Finally, the biosensor was able to detect glucose and showed a sensitivity of $0.625224599 \text{ mA / mMol}$.

Palabras clave: Biosensor, glucosa, oxidasa, TiO_2 , NiTiO_3

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La determinación de azúcares es muy importante dentro de la industria de los alimentos, así mismo su regulación debido a los riesgos a la salud que pueden causar un consumo excesivo de estos, por ejemplo, obesidad y diabetes (Rodríguez- Burelo *et al.* 2014; Aguilar *et al.* 2009). Los azúcares o carbohidratos son parte importante para la vida de todos los seres vivos y cumplen diversas funciones, siendo la más importante la de fuente de energía.

Existen diversos métodos para medir la concentración de azúcar en un alimento, los cuales tienen ventajas y desventajas entre sí, de estos métodos, pocos son rápidos o económicos. Las mediciones más rápidas se realizan generalmente usando un refractómetro o usando equipos como espectrómetros que trabajen el rango visible, pero cada uno presenta alguna desventaja como costo, especificidad o sensibilidad.

Los biosensores son una opción viable para sustituir a los métodos y equipos que se usan actualmente, al ser precisos, confiables y de bajo costo. El primer biosensor de glucosa, fue desarrollado por Lyons y Clark en 1956, desde entonces han evolucionado, principalmente para detectar glucosa en sangre, área en la que actualmente existen electrodos económicos y desechables.

Actualmente existen dos tendencias en el desarrollo de biosensores de glucosa, mejorar la transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo, y el desarrollo de electrodos no enzimáticos basados en óxidos metálicos (Zhu *et al.* 2016). El presente trabajo combina ambas tendencias al consistir en el desarrollo de un biosensor enzimático de tipo amperométrico basado en una nanoestructura de óxido de titanio dopado con níquel.

1.2 Justificación

¿Por qué es importante medir la glucosa? Esto se debe a que cada vez adquiere mayor importancia el poder controlar las concentraciones de glucosa en los alimentos para prevenir enfermedades como sobrepeso, obesidad, y diabetes, que son problemas de salud muy importantes en México y en el mundo.

La mayoría de los métodos tradicionales para detectar y analizar carbohidratos son muy costosos o tardados, además de que no permiten un monitoreo y/o control oportuno del proceso en cuestión; el desarrollo de un biosensor basado en una nanoestructura de óxido metálico como el TiO_2 y dopándolo con metal como níquel permitiría que el instrumento sea económico, preciso, confiable y que permita monitorear las concentraciones de glucosa de diferentes procesos en tiempo real permitiría tener mejor control.

1.3 Hipótesis

El desarrollo de un biosensor basado en la inmovilización de glucosa oxidasa, empleando una nanoestructura de TiO_2 dopado con Ni, será capaz de detectar con precisión, niveles de glucosa, facilitando así el monitoreo y control de azúcar en alimentos como jugos y concentrados.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Construir un biosensor basado en glucosa oxidasa inmovilizada en una nanoestructura de óxido de titanio dopado con níquel capaz de detectar glucosa.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Obtener las nanoestructuras del TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Ni}$ y caracterizarlas estructural y morfológicamente por: difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja, espectroscopia RAMAN, reflectancia difusa y Microscopía electrónica de barrido (SEM).
2. Seleccionar un método de inmovilización para la enzima glucosa oxidasa.
3. Desarrollar y caracterizar el biosensor a través de pruebas de impedancia y voltimetría cíclica.
4. Probar el biosensor con muestras patrón.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1 Biosensores

Un biosensor es un instrumento que sirve para detectar y/o medir una sustancia o un parámetro, y que tiene como característica especial que incorpora un agente biológico para actuar como agente de reconocimiento del analito. Todos los sensores y biosensores están formados por dos partes: un detector que va a ser el componente que interactúa con el analito o la variable a medir y un transductor que transforma la señal del detector a una señal analítica útil y fácil de entender (Sciarra 2004) tal como se muestra en la fig. 1.

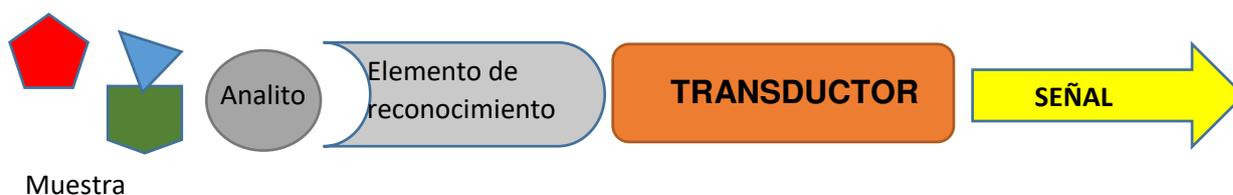


Figura 1. Esquema de un biosensor.

2.1.1 Clasificación de los biosensores:

Los biosensores se pueden clasificar en base a las siguientes variables:

Transductor: piezoeléctrico, electroquímico, termoeléctrico u óptico.

Método de detección: directo o indirecto.

Agente de reconocimiento: célula, enzima, organelo, anticuerpo, tejido, ácido nucleico, polímero de impresión molecular (PIM), ácido nucleico peptídico (PNA) o aptámero.

Tipo de interacción: biocatalíticos o de bioafinidad.

2.1.1.1 Biosensores de interacción

Biocatalíticos.- Son sistemas que operan *in-situ*, formados por tejidos, células, organelos, sistemas enzimáticos de origen vegetal o animal, capaces de detectar sustratos mediante el comportamiento estequiométrico de reactivos y productos, o mediante mecanismos de inhibición enzimática que intervengan en el proceso (Halamek *et al.* 2005).

Bioafinidad.- Se caracterizan por formar complejos entre el analito de interés y el receptor, sin llevar a transformaciones químicas, pero generando excelentes mecanismos de respuesta, aunque con grandes exigencias analíticas para determinar su magnitud. Dichas interacciones generan respuestas que demandan sistemas de alta sensibilidad y precisión, cuantificándose a través del seguimiento

cinético del proceso en presencia de inhibidores competitivos, marcaje isotópico, comportamiento óptico del proceso o variaciones gravimétricas (Jiménez *et al.* 2009).

2.1.1.2 Sistemas de transducción

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

Ópticos. – los transductores ópticos se basan en 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 consiste en una fuente de radiación electromagnética, el agente biológico que contiene las moléculas receptoras y el detector (Jiménez *et al.* 2009).

Piezoeléctricos.- También conocidos como sistemas de transducción másicos, gravimétricos o acústicos, constituyen un material piezoeléctrico (cristales), caracterizados por entrar en resonancia ante la explosión de un campo electromagnético y soportar el elemento de reconocimiento (proteínas), son versátiles y su uso en el sector alimenticio ha permitido hacer seguimiento de las propiedades reológicas por ejemplo, la textura mediante la detección de vibraciones por fractura de las muestras de interés (Taniwaki *et al.* 2006). Su funcionamiento se basa en que la frecuencia de vibración de un cristal es disminuida por la adsorción de un material extraño en su superficie. El cristal está sensibilizado mediante una cubierta de material de unión o reaccionando con el analito.

Termométricos.- Su funcionamiento se basa en la detección del calor producido por las reacciones enzimáticas exotérmicas, que se puede relacionar con la concentración del analito; dichos cambios de temperatura se determinan mediante termistores a la entrada y salida del dispositivo en el que se encuentran inmovilizadas las enzimas.

Nanomecánicos.- El elemento biológico de reconocimiento se localiza inmovilizado en la superficie de una micropalanca de silicio que se sumerge en una muestra líquida. Normalmente se utilizan anticuerpos como elemento de reconocimiento. La interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento produce un cambio en la tensión superficial del líquido, mientras que 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 del analito.

Electroquímico.- Los transductores de éste tipo, transforman la señal que se produce por la interacción del analito con el sistema de reconocimiento en una señal eléctrica. Se dividen en cuatro tipos: conductimétricos, potenciométricos,

amperométricos e impedimétricos que detectan cambios en la conductividad, potencial, intensidad de corriente o en la impedancia, respectivamente.

2.1.1.3 Características que deben presentar los biosensores

Sensibilidad.- Alta para los analitos de interés incluso en concentraciones de partes por billón ($\mu\text{g/L}$).

Selectividad.- Alta, para que sólo interactúe con el analito de interés y no con otros. Mediante elementos de reconocimiento específicos.

Confiabilidad.- Alta, los sistemas de transducción se diseñan para que no sean alterados (o lo sean mínimamente) por la muestra.

Tiempo de vida.- Largo que no obligue al empleo del dispositivo por cortos períodos desde su fabricación ni a sustituciones frecuentes del mismo. Lo que depende de su estabilidad física, química y mecánica.

Bajo costo de producción, operación y mantenimiento.

No pretratamiento a la muestra

Tiempo de análisis.- Capaces de medir en tiempo real o muy corto, permitiendo una actuación rápida, controlando los parámetros importantes de manera inmediata y automática

2.1.2 Biosensor amperométrico

Los biosensores de glucosa son los más antiguos, existen desde 1962 cuando Lyons y Clark crearon el primero, el cual, consistía en enzima glucosa oxidasa inmovilizada en el interior de una membrana semipermeable de diálisis montada en un electrodo de oxígeno (Wang 2001).

Estos sensores miden una corriente al aplicar un potencial entre dos electrodos, que es proporcional a las variaciones producidas en el biorreceptor. Normalmente podemos encontrar sensores con dos o tres electrodos, aunque los más usuales son los biosensores de tres electrodos ya que permiten controlar de forma muy precisa la tensión aplicada entre los electrodos de medida.

Ventajas

Proporcionan resultados precisos, reproducibles, rápidos, de bajo costo y sin necesidad de preparar la muestra o un blanco estándar.

En la actualidad existen miles de biosensores que monitorean diferentes sustancias y variables, pero todos siguen la tendencia de ser cada vez más pequeños, económicos, sensibles y más confiables. Como es el caso de los biosensores de glucosa, que ahora son desechables y tan pequeños como una laminilla de laboratorio, debido al desarrollo de nuevos materiales y a la nanotecnología que permite hacer electrodos con serigrafía de grafito o nanotubos de carbón (Harper y Anderson 2010).

2.2 Enzimas

Se denomina enzima a las proteínas que presentan actividad como catalizadores de alguna reacción. Las enzimas son muy importantes debido a que son mucho más específicas que los catalizadores no biológicos y muy eficientes, además de que se puede regular su actividad catalítica de varias maneras, lo que brinda mayor control en los procesos en que interviene. Para regular la actividad de las enzimas se manipulan factores como el pH, la temperatura y la presencia de ciertas sustancias (cofactores e inhibidores).

La Comisión de Enzimas (EC) de la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) ha dado a cada enzima código de cuatro partes, como EC 3.4.21.5. Los tres primeros números definen la clase principal, la subclase y la sub-subclase, respectivamente. El último es un número de serie dentro de la sub-subclase, que indica el orden en el que cada enzima se ha añadido a la lista, que crece continuamente. En la tabla 1 se muestra la clasificación de las enzimas.

Tabla 1. Clasificación de las enzimas

Clasificación	Cataliza
1.-Óxido-reductasas	Reacciones tipo óxido-reducción
2.-Transferasas	Transfiere grupos funcionales
3.-Hidrolasas	Rupturas hidrolíticas
4.-Liasas	Eliminaciones o adiciones de un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.
5.-Isomerasas	Reordenamientos intramoleculares.
6.-Ligasas	Reacciones de unión de dos moléculas.

2.2.1 Glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa (fig.2) está registrada bajo el código EC1.1.3.4 de acuerdo con la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), el número 1 (EC 1) indica que la enzima pertenece al grupo de las oxidoreductasa, el segundo número (EC1.1) que pertenece al subgrupo que actúa sobre los grupos CH-OH de los donantes. Mientras que el número 3 (EC.1.1.3) indica que es del sub-subgrupo en el cual el oxígeno es el aceptor. Finalmente el número 4 del código (EC 1.1.3.4) indica que fue la cuarta enzima en ser agregada a esta lista.

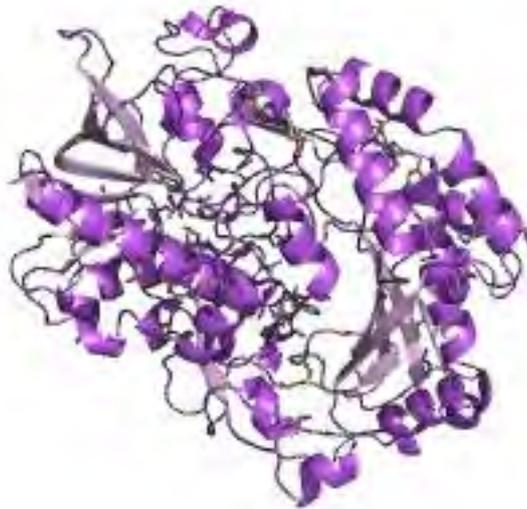


Figura 2. Estructura Glucosa Oxidasa (fuente: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/PDBsum/cf/1cf3//chainA.jpg>).

Esta enzima recibe muchos nombres glucosa oxidasa, GOD, GOx, hexosa oxidasa, notatin (penicilina A) o penicilina B, estos últimos debido a que se obtuvo a partir del hongo *Penicillium notatum*, y normalmente se obtiene de *Aspergillus niger*.

La glucosa oxidasa, presenta afinidad principalmente a la Beta-D-Glucosa (más del 98%), pero también puede catalizar la oxidación de compuestos con grupos OH como el 1,2 pentanediol, el 2-deoxi-D-Glucosa, etc., además de interactuar con otros azúcares como la galactosa. Pero siempre actuando con el oxígeno y FAD, para todas las reacciones.

Es una enzima muy estable, su actividad al estar inmovilizada disminuye solo un 10%, y dependiendo de la temperatura de almacenamiento puede mantener su actividad intacta entre seis meses a un año.

En la fig. 3 se presenta la reacción bajo la cual cataliza la glucosa oxidasa principalmente:

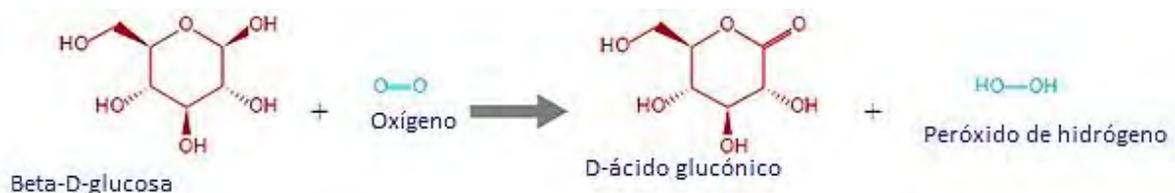


Figura 3. Reacción de oxidación de la D-glucosa.

Es una reacción redox (catalizada por la glucosa oxidasa), donde la β -D-Glucosa es oxidada en D-glucono-lactona, y el oxígeno que interviene en dicha reacción forma peróxido de hidrógeno o agua oxigenada por su nombre común.

Para actuar como catalizador, la glucosa oxidasa (GOx) requiere un cofactor, el flavín adenín dinucleótido (FAD), el FAD (fig. 4) actúa como el aceptor inicial de electrones y es reducido a FADH₂. Posteriormente el FADH₂ es oxidado por oxígeno molecular (O₂) que desempeña el papel de aceptor final de electrones. El oxígeno es capaz de ello debido a que tiene un potencial de reducción mayor. Como consecuencia el O₂ es reducido a peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

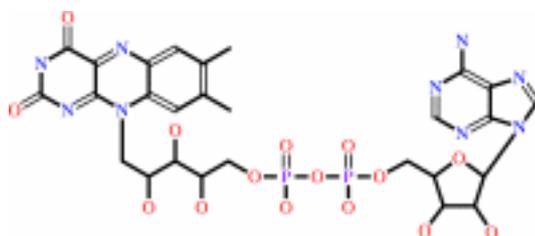


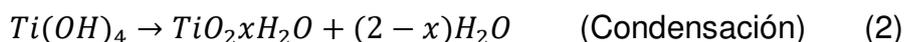
Figura 4. Flavín Adenín Dinucleótido (FAD).

En la actualidad la glucosa oxidasa es empleada con diferentes fines, entre los que se encuentran los biosensores confiables y económicos para diabéticos que miden la concentración de glucosa sanguínea, como aditivo en industrias manufactureras, la determinación de glucosa libre en suero o plasma sanguíneo con finalidades diagnósticas, y monitorear las concentraciones de glucosa en procesos de fermentación, biorreactores, y niveles de glucosa en materia prima vegetal y productos alimentarios.

2.3 Método Sol-Gel

Es un método empleado para obtener estructuras sólidas a partir de partículas muy pequeñas, por ejemplo, la obtención de nanoestructuras de óxidos metálicos como óxido de silicio o óxido de titanio. Este método implica la formación de una solución coloidal del material de interés a la cual se le añade un precursor que iniciará la formación de una red (gel) constituida por nuestro material de interés. El método consiste en la hidrólisis de un precursor, para obtener una suspensión coloidal (Sol), y posteriormente un gel por la condensación y agregación de las partículas (Schumuki y Virtanen 2009).

En el caso del óxido de titanio, este proceso de hidrólisis y condensación ha sido descrito de la siguiente manera (Guzmán *et al.* 2007):



Tiene como ventaja ser de bajo costo y que se puede realizar a temperatura ambiente a diferencia de otros métodos usados para obtener nanoestructuras, además de ofrecer estructuras homogéneas como lo reporta Feijóo *et al.* (2007).

Este método es muy usado para obtener nanoestructuras para sensores y la composición de las mismas puede mejorar la sensibilidad del sensor como reportó Jung-Chuan *et al.* (2016). Es muy útil ya que permite obtener diferentes estructuras con propiedades y aplicaciones diferentes (fig. 5).

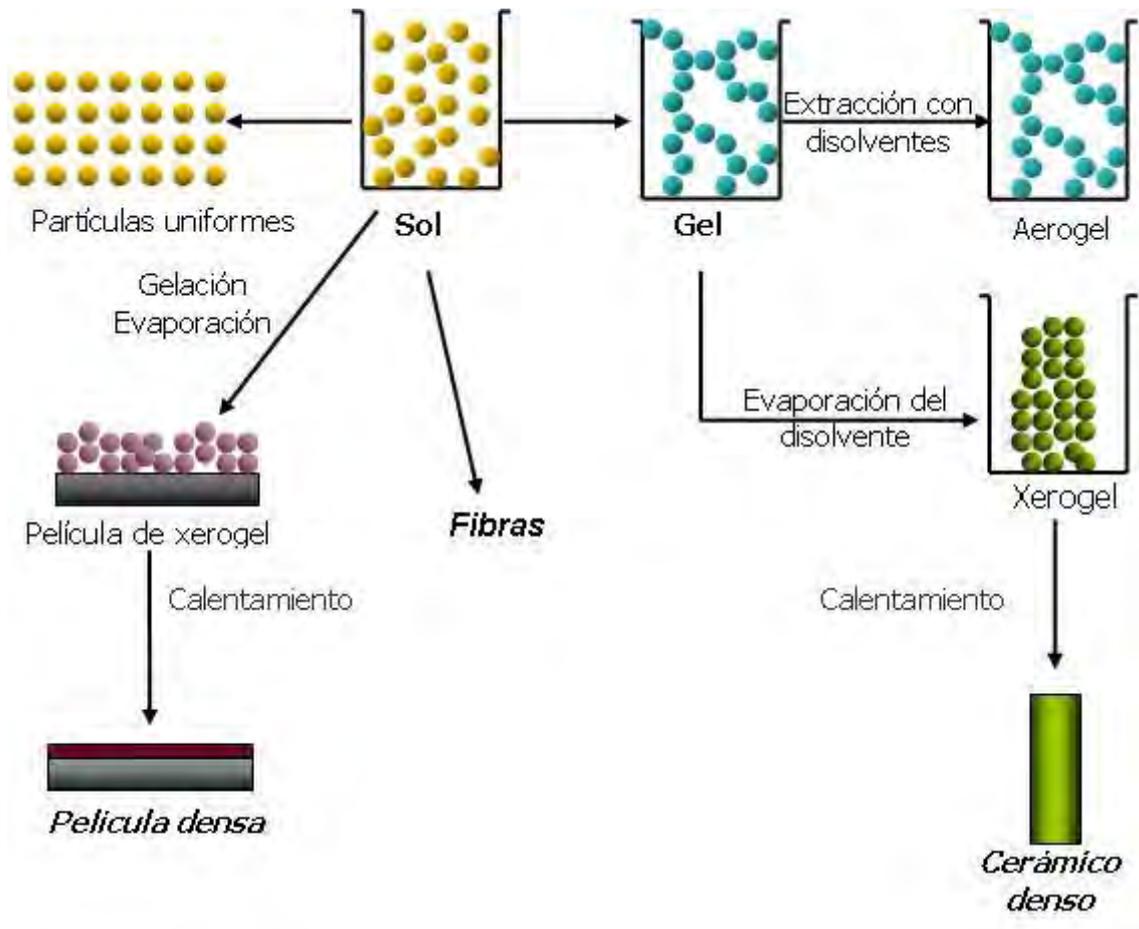


Figura 5. Aplicaciones de la tecnología Sol-Gel (fuente: <https://qro.cinvestav.mx/~ceramics/hibridos.htm>).

2.4 Óxido metálico

Un óxido metálico es la unión química de un metal con oxígeno cumpliendo la siguiente fórmula X_2O_n (donde X es el elemento metálico y O es oxígeno), por ejemplo: ZnO, MgO, Na₂O, FeO, Au₂O₃, etc. Debido a que presentan enlaces iónicos, son muy estables a temperaturas altas, presentan baja energía de ionización y presentan actividad de semiconductor (Feijóo *et al.*, 2007).

2.4.1 Dióxido de titanio

El dióxido de titanio (TiO₂) es material con gran valor comercial debido a sus aplicaciones como: semiconductor, protector UV, sensores de gas, celdas fotovoltaicas y fotocatalizador. En la naturaleza se encuentra en tres fases cristalinas: Brokita, Rutilo y Anatasa (fig. 6), siendo las dos últimas las comunes.

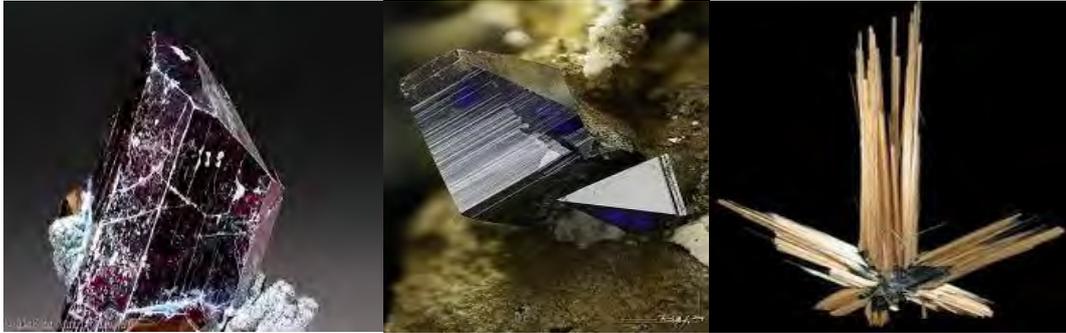


Figura 6. Fases cristalinas del TiO_2 . De izquierda a derecha Rutilo, Anatasa y Brokita.

El rutilo es termodinámicamente más estable, en cambio la anatasa presenta mayor actividad fotocatalítica.

La estructura cristalina de la fase anatasa y rutilo, es ortorrómbica y pueden ser descritas en términos de cadenas de octaedros de TiO_6 , fig. 7. Las dos estructuras cristalinas difieren por la configuración de ensamble de la cadena de octaedros, y por la distorsión de cada octaedro. Cada ion de Ti^{4+} es rodeado por un octaedro de seis iones de O^{2-} . El octaedro del rutilo no es regular, fig 7, mostrando una ligera distorsión ortorrómbica (Esch *et al.* 2014).

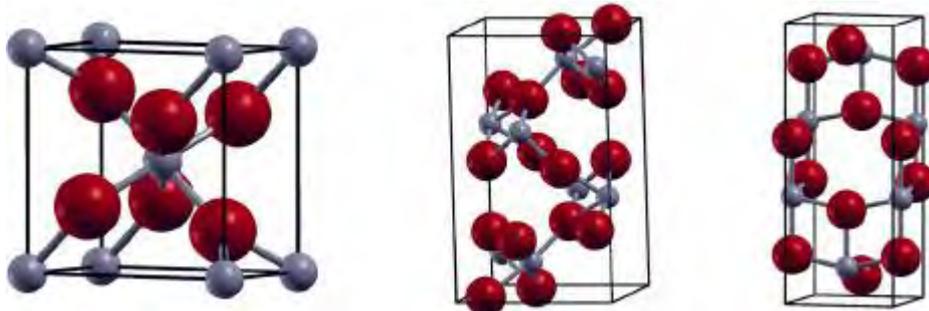


Figura 7. Estructura básica de Rutilo, Brokita y Anatasa (Esch *et al.* 2014).

La disposición estructural de la Anatasa, le favorece para tener mejor capacidad catalítica y conductividad eléctrica, lo que permite usar en óxido de titanio en muchas áreas.

2.4.1.1 Aplicaciones

El dióxido de titanio es usado en catálisis heterogénea, como un fotocatalizador, en celdas solares para la producción de hidrógeno y energía eléctrica, como sensor de gases, como pigmento blanco (en pinturas y productos cosméticos) como recubrimiento protector a la corrosión, como recubrimiento óptico, en cerámicos y en dispositivos eléctricos como varistores y además juega un papel importante en implantes de hueso debido a que es un material biocompatible.

2.4.2 Níquel

El níquel es el elemento número 28 de la tabla periódica y pertenece a los metales en transición. En la naturaleza se puede encontrar unido a hierro y su isótopo más abundante es el Ni^{58} , el cual no es radioactivo a diferencia de los otros (Hausinger, 1993). Es utilizado en la industria principalmente para la producción de acero inoxidable y para el acuñado de monedas. La importancia biológica reside en ser centro activo del 87% de las enzimas hidrogenasas.

2.4.3 Titanato de níquel

Es un óxido bimetálico que pertenece al grupo de las ilmenitas MTiO_3 ($M = \text{Ni}, \text{Fe}, \text{Mn}, \text{Co}$), que son materiales multifuncionales, con aplicaciones en electrónica, fotocatalisis, sensores de gas, etc., debido a su alta constante dieléctrica. En 1992 se sintetizó calcinando una mezcla estequiométrica de Ni o NiO con TiO_2 a una temperatura de $1000\text{ }^\circ\text{C}$ sin embargo se puede sintetizar mediante diversos métodos, por ejemplo: sol-gel, Pechini, coprecipitación, auto combustión, etc. (Zhang *et al.* 2015), la estructura del titanato de níquel (fig. 8) es parecida a la del TiO_2 .

Dopar con níquel estructuras de TiO_2 mejora las propiedades eléctricas y actividad fotocatalítica del óxido de titanio (Xiaoling Li *et al.* 2013), pero también mejora la durabilidad de las películas de TiO_2 (Wang *et al.* 2013). Debido a que el átomo de níquel tiene un tamaño mayor que el del titanio, genera una estructura con más espacios en el NiTiO_3 , que los presentes en las estructuras de TiO_2 , haciendo que tenga mayor área superficial y facilite la inmovilización de enzimas

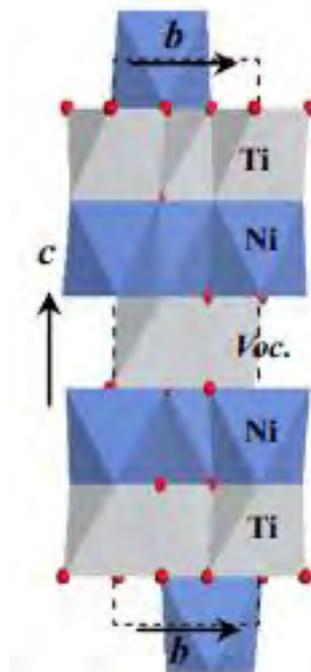


Figura 8. Estructura del NiTiO_3 (Zhang *et al.* 2015).

2.5 Sistemas de inmovilización de la enzima

La elección del método dependerá de factores tales como el tipo de transductor utilizado, naturaleza del elemento biológico, propiedades físicoquímicas del analito y las condiciones de operación del biosensor, para que el biosensor exhiba su máxima actividad, (Akyilmaz *et al.* 2003; Singh *et al.* 2008; Kausaite-Minkstimiene *et al.* 2011). Existen métodos físicos (atrapamiento y micro encapsulación) y métodos químicos (adsorción, unión covalente y entrecruzamiento).

2.5.1 Adsorción

Emplea fuerzas iónicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals para unir la enzima al soporte. El soporte debe tener una gran capacidad para adsorber material biológico.

2.5.2 Entrecruzamiento

Consiste en emplear reactivos bifuncionales (dialdehídos, diminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio, e incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida), que generan uniones intermoleculares entre las enzimas. Los entrecruzadores más usados son: glutaraldehído, hexametildiisocianato y 1,5-dinitro-2,4-diflorobenceno. Ésta técnica suele combinarse con la adsorción para tener mejores resultados

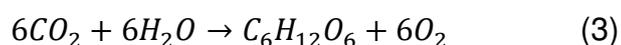
2.5.3 Unión covalente

Se basa en la activación de grupos químicos del soporte con nucleófilos de las proteínas. Los aminoácidos más empleados son la lisina, cisteína, tirosina e histidina. Éste método requiere de un buen control del pH o la fuerza iónica de la solución, así como de tener bien limpia la superficie del transductor.

2.6 Glucosa

Es un monosacárido, su fórmula química es $C_6H_{12}O_6$ perteneciente al grupo de las aldosas, además es un isómero de la hexosa galactosa. Se encuentra en frutas, vegetales y en la miel, normalmente está combinada con otros monosacáridos formando lactosa, maltosa y fructosa (Badui 2006).

La glucosa (fig.9) cumple varias funciones en el organismo, por ejemplo, estructurales, pero la principal función es la de fuente de energía. Es producida por organismos autótrofos que la sintetizan a partir de agua y dióxido de carbono siguiendo la siguiente reacción:



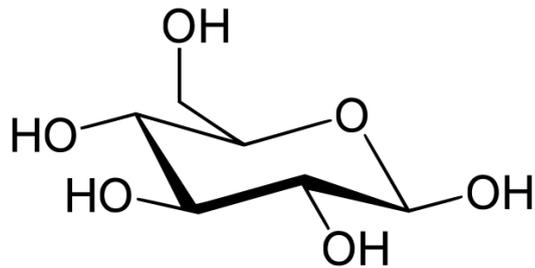


Figura 9. Estructura química de la D-Glucosa.

2.6.1 Determinación de carbohidratos

Existen diversas formas para analizar carbohidratos, que se pueden clasificar de la siguiente manera:

Métodos químicos (reducción de un metal)

Se basan en la capacidad reductora de los azúcares sobre un metal, siendo el principal el cobre (Cu), o en la formación de un compuesto colorido, al cual se le puede medir su absorbancia.

Métodos físicos (refractometría, polarimetría y densimetría)

Se basan en el principio de que un haz de luz cambia su trayectoria al pasar por un medio con una densidad diferente a la del aire.

Métodos enzimáticos

Como su nombre lo indica, emplean enzimas que permiten detectar un gran número de sustancias con mucha precisión.

Métodos Fluorométricos

Este método se fundamenta en la capacidad de algunas sustancias para absorber ondas de longitud corta y luego emitir una de mayor longitud.

Métodos cromatográficos

Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, con el objetivo de separar distintos componentes en una mezcla.

2.6.2 Desventajas de los métodos tradicionales

Para los métodos químicos, se requieren preparar muestras patrón, y procesar la muestra para después hacer cálculos y así obtener los resultados. Sin embargo, no siempre son precisos, son costosos, pueden tardar varios minutos y algunos de los reactivos son peligrosos.

Los refractómetros permiten realizar mediciones inmediatas y requieren de muestras muy pequeñas, pero su precisión depende de la temperatura, presencia

de gas en la muestra, diferentes sustancias líquidas y de sólidos diferentes al que se desea medir.

Los métodos enzimáticos, son precisos, rápidos y cada vez más económicos, pero no pueden hacer mediciones en el lugar.

En la actualidad existen dos tendencias en el desarrollo de biosensores, estas son: obtener estructuras con mejores propiedades electroquímicas que permitan mejorar la sensibilidad y estabilidad de la enzima del electrodo. La otra tendencia es desarrollar biosensores no enzimáticos que sean capaces de detectar y medir materiales biológicos como glucosa, proteínas, fenoles, etc., poder ser reutilizables y que no presenten las limitantes de los biosensores enzimáticos. Los óxidos metálicos están siendo la opción más estudiada para ambas tendencias, debido a que ofrecen nanoestructuras estables y con buenas propiedades electroquímica, ópticas, fotovoltaicas y fotocatalíticas que permiten tener electrodos más sensibles y capaces de ser reutilizables. Entre los óxidos metálicos estudiados, se encuentran el óxido de cobalto (CoO, Co₂O₃ y Co₃O₄), óxido de cobre (CuO y Cu₂O), óxido de níquel (NiO), óxido de zinc (ZnO), etc., debido a sus propiedades, las cuales se pueden modificar al dopar con algún metal (Zhu *et al.* 2016). A parte de los óxidos metálicos antes mencionados, también se estudian otros compuestos, por ejemplo, el grupo de las ilmenitas, que han mostrado tener gran potencial para el desarrollo de sensores y sistemas de fotocatalisis y producción de hidrógeno, entre otras.

CAPÍTULO III. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

3.1 Difracción de rayos X

El uso de la difracción de rayos X para la investigación de la estructura de la materia tuvo su origen en 1912, cuando los primeros materiales cristalinos fueron expuestos a este tipo de radiación, dando lugar a un diagrama de difracción característico de la muestra, también conocido como patrón de difracción. Actualmente, ésta técnica ha permitido revolucionar el entendimiento de la química, la física, la mineralogía y la biología debido a la información que permite obtener. La difracción de rayos X (DRX), está basado en la dispersión, que consiste en que el fotón incidente es desviado de su trayectoria original de propagación con igual (dispersión elástica) o menor energía (dispersión inelástica), por y colisión de electrones. Cuando sobre un átomo incide un haz de rayos x, puede considerarse, desde un punto de vista geométrico, que éste se comporta como un radiador puntual que dispersa elásticamente (sin modificar su longitud de onda) la radiación en todas las direcciones del espacio (Albella *et al.* 2000). Ahora, si el haz de rayos X incide en la superficie de un cristal, es decir, sobre una agrupación de átomos ordenados de manera periódica en el espacio, entre las ondas dispersadas por cada uno de ellos se producen fenómenos de interferencia que, normalmente, en la mayor parte de las direcciones, serán de tipo destructivo, cancelándose en mayor o menor proporción. Sin embargo, en determinadas, y debido precisamente a la ordenación periódica de los átomos puede ocurrir que las ondas dispersadas se encuentren en fase y se refuercen mutuamente, éste fenómeno es conocido como difracción. Para comprender mejor esto supóngase que el haz de radiación de incide sobre un cristal determinado, está compuesto por un número muy grande ondas denominado frente de ondas. Antes de impactar el cristal, todas las ondas están en fase entre sí, es decir los máximos y mínimos de amplitud coinciden en la misma ubicación de la trayectoria de flujo. Una vez que los rayos inciden sobre el cristal se puede producir interferencia constructiva o destructiva. Las condiciones necesarias para que se produzca difracción vienen determinadas por la ley de Bragg. Como en las sustancias cristalinas se pueden considerar distintas familias de planos paralelos y equidistantes entre sí. Consideremos una de estas familias con índices de Miller (hkl) y espaciado d_{hkl} (fig. 10).

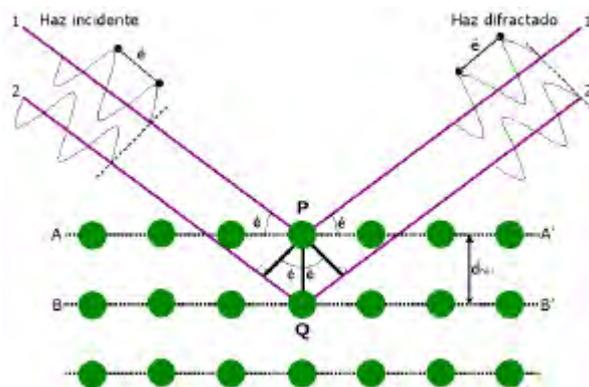


Figura 10. Difracción de rayos X por los planos de un cristal.

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

$$n\lambda = d_{hkl} \sin \theta \quad (4)$$

Dónde:

n .- es un número entero (sólo para números enteros de longitudes de onda ocurre la difracción).

λ .- longitud de onda de los rayos X.

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

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

Dicho de manera sencilla, la interferencia entre las dos ondas que se muestran en la fig. 11, es constructiva cuando la diferencia de trayectoria entre las ondas (que se llamarán Δt , la cual es la suma de las distancias CB y BD), es igual a un número entero (n) de longitudes de onda. Entonces si se analizan los triángulos ACB y ABD se obtiene que $\Delta t = CB + BD = 2d \sin \theta$, lo que deduce la ley de Bragg.

Ley de Bragg (1913)

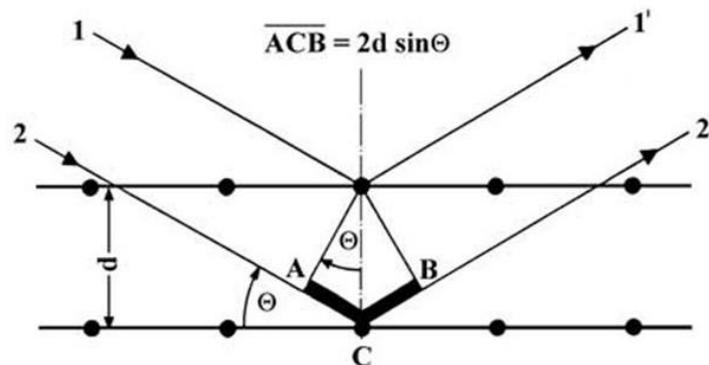


Figura 11. Ley de Bragg.

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

cristalina es como su huella dactilar. En la fig. 12 se puede observar un equipo de difracción de rayos X y sus componentes.

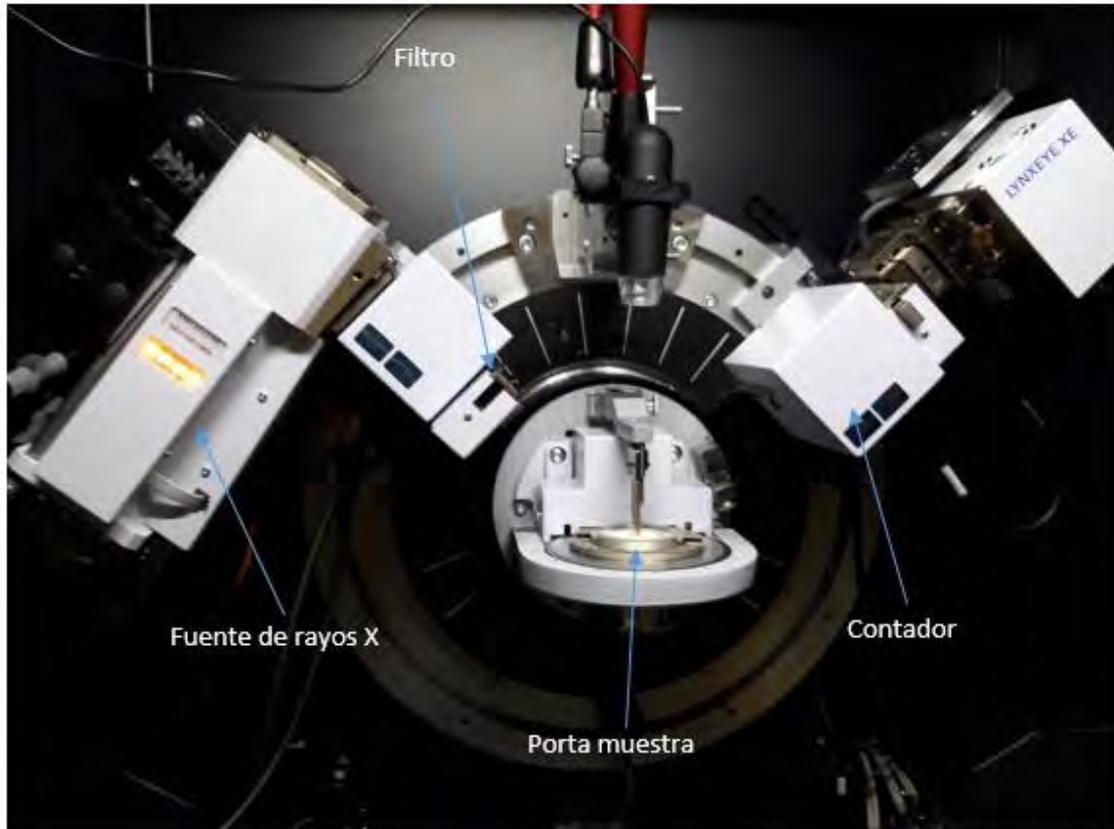


Figura 12. Componentes principales de un difractómetro de rayos X.

A partir de los difractogramas de rayos X, se puede calcular el tamaño de cristal empleando la ecuación de Scherrer.

$$t = \frac{k*\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (5)$$

Donde

t = tamaño de partícula

k = Constante de Scherrer

λ = Longitud de onda

β = línea que se ensancha a la mitad de la intensidad máxima

θ = ángulo

3.2 Microscopia electrónica de barrido

Es una técnica de análisis que se emplea para obtener información superficial de las muestras, mediante el empleo de electrones Allen *et al.* (1993). El microscopio electrónico de barrido es actualmente una herramienta esencial para la investigación ya que se utiliza para varios propósitos como, por ejemplo: para el estudio de la morfología y topografía de elementos, un análisis químico de la

muestra a analizar, etc. Este instrumento utiliza voltajes cercanos a los 20000 voltios, las lentes magnéticas utilizan un haz muy fino de electrones para penetrar repetidamente la muestra y se produce una imagen ampliada de la superficie observada en el monitor.

Este tipo de microscopios se caracteriza por producir imágenes tridimensionales, y se puede tener una ampliación de 100 000 veces o más. Otra característica es que la imagen no es obtenida una sola vez, sino que un estrecho haz de electrones va barriendo la muestra en sentido longitudinal. En el microscopio de barrido, dos son las partes fundamentales, la columna y la cámara para colocar las muestras. El emisor de electrones es un filamento que se calienta de acuerdo a las necesidades de la muestra, el cual emite un haz de electrones que viajan a través de la columna en un ambiente de alto vacío, hasta incidir con la superficie de la muestra a analizar, ocasionando una interacción entre dichos electrones y los átomos de la muestra, generando varios tipos de señales, tales como: electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X característicos, electrones Auger, luz visible, etc., todas las señales se producen simultáneamente, pero cada una es captada por un detector diferente (fig. 13).



Figura 13. Microscopio de barrido electrónico.

3.3 Espectroscopia de Infrarrojo

Dentro del estudio de materiales, la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) es una de las técnicas más utilizadas, debido a que proporciona información del tipo de enlaces químicos involucrados en la estructura del material analizado. Esta información es proporcionada por las bandas de absorción debido a los diferentes modos vibracionales de los grupos funcionales, facilitando así la identificación de estos mismos. La región infrarroja del espectro electromagnético incluye radiaciones comprendidas entre los números de onda 12800 y 10 cm^{-1} aproximadamente, lo que corresponde a longitudes de onda de 0.78 y $1000\text{ }\mu\text{m}$.

Desde una perspectiva de las aplicaciones, así como de los instrumentos, la región infrarroja se divide en: infrarrojo lejano, medio y cercano, de las cuales, la más

usada para la caracterización de materiales es la región del infrarrojo medio, comprendida entre los 4000 y 670 cm^{-1} . La espectroscopia de IR mide los cambios vibracionales que experimentan las moléculas al absorber energía electromagnética, estos cambios o movimientos pueden clasificarse como modos de estiramiento, donde la longitud del enlace cambia de una manera periódica durante el momento de vibración; o modos de doblamiento, donde el ángulo entre los enlaces cambia de forma periódica durante las vibraciones.

En la fig. 14, se observa que los modos de estiramiento se subdividen en simétricos y asimétricos; por su parte los modos de doblamiento se dividen en:

Tijereteo: Es cuando los dos átomos unidos a un átomo central se alejan y acercan uno respecto de otro, causando una deformación del ángulo de valencia.

Aleteo: se presenta cuando la unidad estructural se balancea en el plano perpendicular al de simetría de la molécula.

Torsión: Se manifiesta cuando la unidad estructural gira en vaivén alrededor del enlace que la une con el resto de la molécula.

Balaneo: Ocurre cuando la unidad estructural se balancea en el plano de simetría de la molécula.

Acoplamiento vibracional:

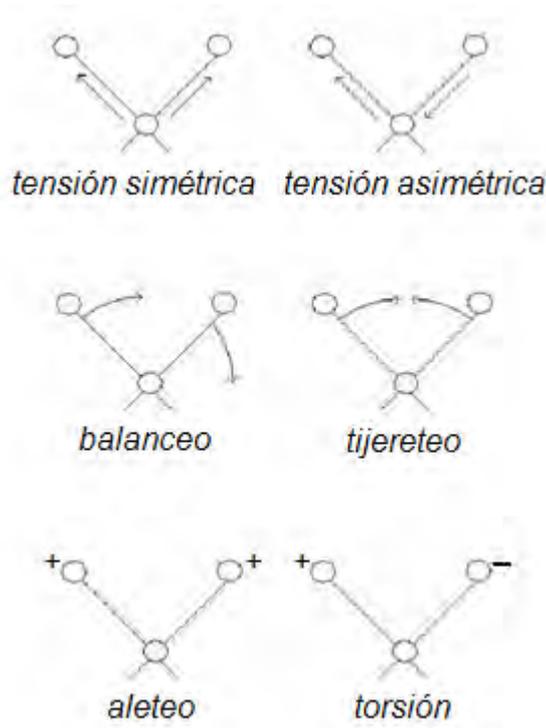


Figura 14. Modos vibracionales por absorción infrarroja.

Los espectros vibracionales se deben a la elasticidad del enlace covalente entre dos átomos, cuya rigidez está determinada a través de la constante característica (k) para cada enlace. Para la obtención de los espectros infrarrojos, se utilizan espectrómetros con interferómetros y transformada de Fourier (IR-FT). La radiación

de infrarrojo es analizada por medio de un interferómetro de Michelson (fig. 15), que consiste en un montaje óptico en el que se produce el fenómeno de interferencia de ondas electromagnéticas.



Figura 15. Interferómetro de Michelson

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

3.4 Espectroscopia RAMAN

El uso de la espectroscopia RAMAN para el análisis químico no era tan viable ni común como lo es hoy en día debido a varios problemas fundamentales y técnicos como los picos de intensidad, la interferencia de la fluorescencia y la ineficiencia en la colección y detección de luz. Con la introducción del método de transformación de Fourier-RAMAN, Servicios de carga, miniaturización de equipos de cómputo y láseres de infrarrojo cercano, permitieron quitar los impedimentos que atrasaban el uso de la espectroscopia RAMAN.

Un espectro RAMAN consiste en la dispersión de la intensidad detectada contra la energía (fig. 16). Cada pico consiste en un cambio dado RAMAN por la energía incidente E_0 . Si sucede que la molécula se encuentre en un estado vibracional excitado cuando el fotón incidente es dispersado, el fotón gana energía cuando es dispersado, que conduce a la dispersión RAMAN antimovimientos. Los picos RAMAN de movimiento y los antimovimiento, son posicionados simétricamente a los picos Raleigh, pero sus intensidades son diferentes, excepto por las vibraciones de energías bajas. En 1986 la instrumentación RAMAN empezó a evolucionar, al ir obteniendo mayores resultados, fue aumentando la necesidad de incorporar láseres, espectrómetros, accesorios para las muestras y softwares que complementarían el sistema del espectrómetro RAMAN. Estos nuevos instrumentos no fueron más capaces que sus predecesores, pero eran más fáciles de utilizar.

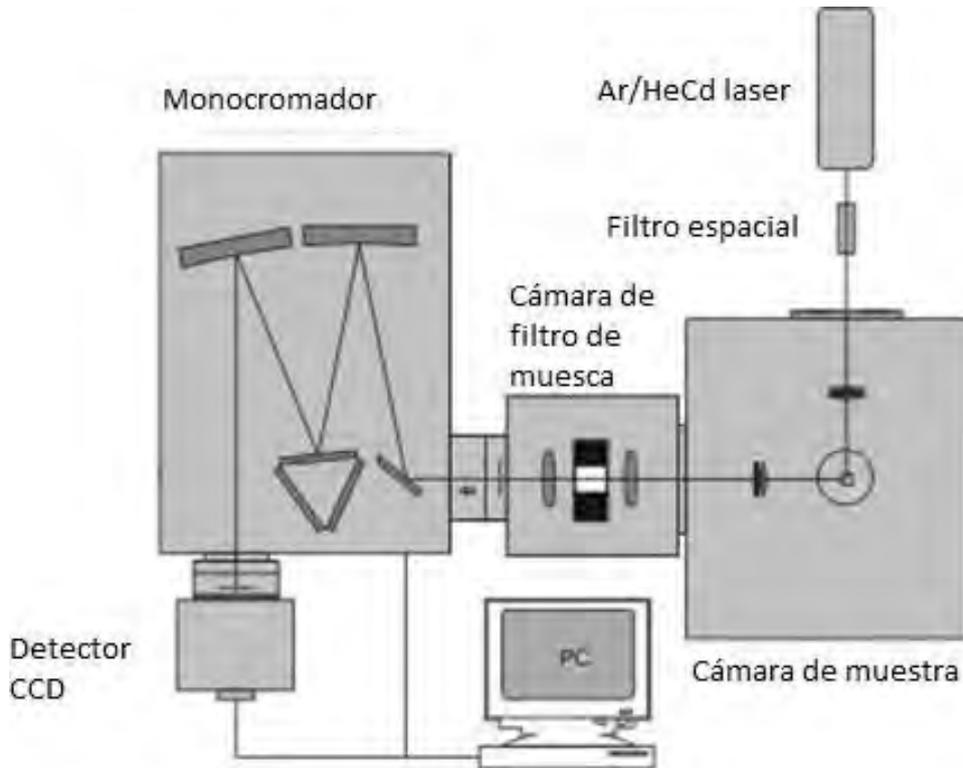


Figura 16. Espectrómetro RAMAN

En adición a la reducción de la fluorescencia, el análisis RAMAN también provee precisión en la frecuencia y muchos otros beneficios. El uso de láseres de diodo de Nd: YAG (Itrio-Aluminio-G), sustituyó a los láseres de Argón o Kriptón que requerían de sistemas de enfriamiento y energía eléctrica de 208 a 480V que los hacía imprácticos para análisis de rutina por los altos costos de uso y mantenimiento. Los nuevos láseres de Nd: YAG (1064 nm), Doble Nd: YAG (532 nm) y de diodo Al:GaAs (750 a 900 nm), no solo son más económicos al tener un consumo eléctrico de 110V sino que incorporan un sistema enfriador por aire y el costo de mantenimiento es menor. También operan en infrarrojo cercano donde la fluorescencia es menos prominente (Richard 2000).

3.5 Reflectancia Difusa

La técnica de espectroscopia ultravioleta-visible por reflectancia difusa (UV-Vis DRS) proporciona información sobre el entorno de las especies metálicas y orgánicas presentes en el material, siempre que éstas presenten transiciones entre niveles moleculares separados por energías del orden de la región UV y/o visible de la radiación electromagnética. Permite estudiar las contribuciones de los componentes orgánicos e inorgánicos de las muestras, así como el entorno de los átomos, algunos átomos metálicos.

Se basa en la medida del retardo y ensanchamiento temporal experimentado por un corto pulso de luz que viaja a través de un material.

Cuando la luz incide sobre una muestra (L_i), una cierta cantidad de los fotones puede transmitirse a través de la muestra (L_t) y el resto es reflejado (L_r), o absorbido (L_a) por algunos enlaces covalentes que actúan como resortes oscilantes que se acoplan con la frecuencia (cm^{-1}) o longitud de onda (nm) exacta de la radiación lumínica.

La absorción es selectiva y depende de los grupos moleculares involucrados. Así, la absorción de luz se estima por diferencia entre la luz incidente y la reflejada o transmitida. Cuando se trabaja en el modo de reflexión, se utiliza una muestra lo suficientemente opaca para que la transmisión (L_t) sea igual a cero, calculándose la absorción de luz por diferencia: $L_a = L_i - L_r$ (6)

En el modo de transmisión, se define absorbancia (A), como $\log(\frac{1}{T})$, en tanto que, en el modo de reflexión, A corresponde al $\log(\frac{1}{R})$. Se asume que ambos casos obedecen a la ley de Lambert-Beer, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda, es proporcional al número o concentración de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación (Murray, 1993).

Es decir, la energía total reflejada por una muestra, es la suma de la reflexión especular (superficial o en forma de espejo) más la reflexión difusa, que es aquella temporalmente absorbida y luego re-emitida por la muestra, como se aprecia en la fig. 17.

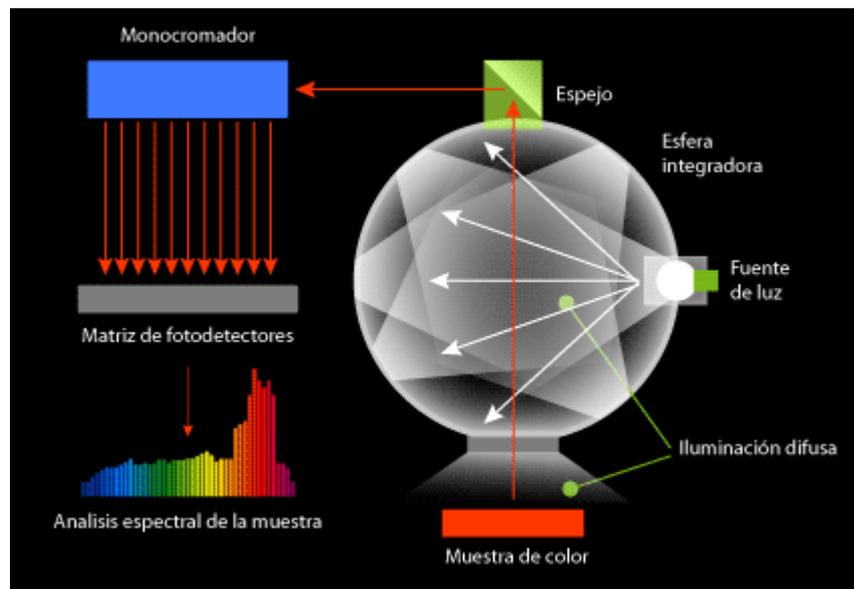


Figura 17. Esquema de funcionamiento de la reflectancia difusa

3.6 Tamaño de partícula

La dispersión dinámica de luz (DDL) o DLS, por sus siglas en inglés, también se conoce como espectroscopia de correlación de fotón, y es utilizada para la determinación de tamaño de partículas, debido a que permite medir desde partículas menores a 5 nm hasta varias micras de tamaño. Ésta técnica se basa en el principio de movimiento aleatorio de las partículas en gases o líquidos, también conocido como movimiento Browniano (Cuadros-Moreno *et al.* 2014). El movimiento (dispersión) de las partículas, es descrito por la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = k_B T / 6\pi\eta R \quad (7)$$

Donde la difusión (D) es igual al producto de la constante de Boltzman (k_B) dividido por el radio hidrodinámico de la partícula (R) y la viscosidad del solvente (η). Las partículas grandes tienen menor velocidad y presentan mayor dispersión.

En la mayoría de equipos de longitud de onda conocida pasa a través de una muestra diluida en solución y la intensidad de la luz dispersada se recoge mediante un detector y se deconvoluciona mediante algoritmos para determinar la distribución del tamaño de partícula de la muestra. En la fig. 18 se aprecia esquema de funcionamiento de un equipo de dispersión dinámica de luz.

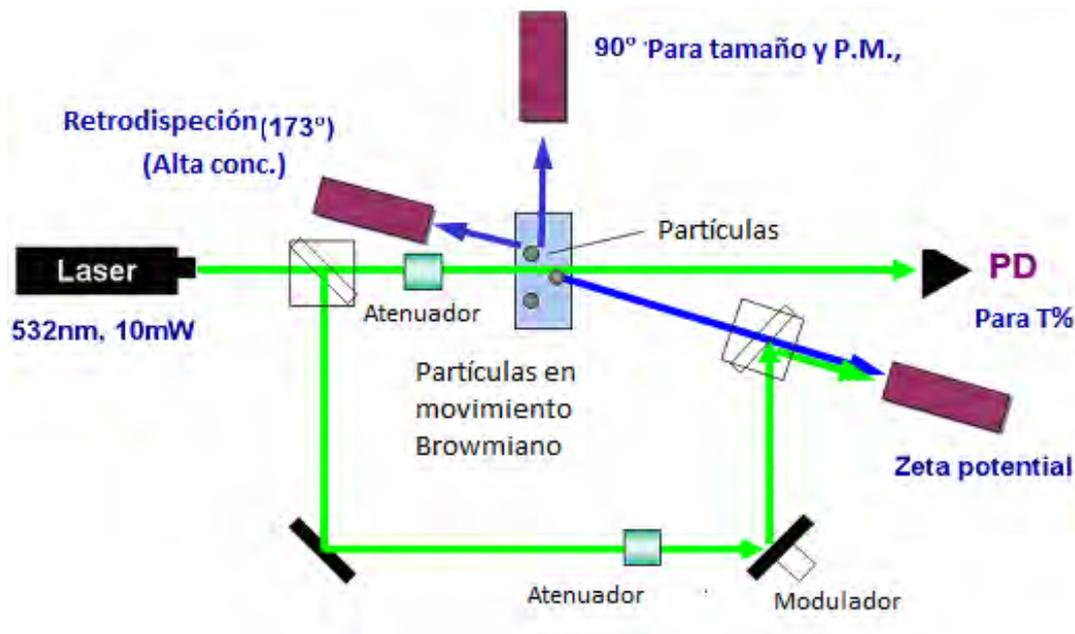


Figura 18. Esquema de funcionamiento de un equipo para determinar tamaño de partícula Horiba SZ100.

La cantidad de luz dispersa recogida depende del peso molecular, el tamaño y la forma de una partícula, así como los índices de refracción de la partícula y el disolvente. Antes de llegar al detector, la luz dispersa de partículas individuales

experimenta interferencia de aquellas dispersadas por otras partículas, todas las cuales se mueven aleatoriamente debido al movimiento browniano. Esto resulta en fluctuaciones aleatorias en el tiempo (fig. 19).

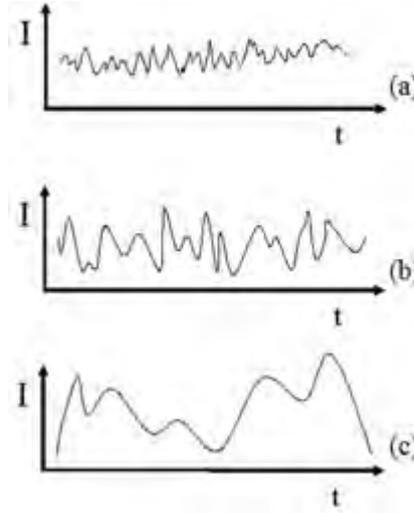


Figura19. Fluctuación de la intensidad de luz dispersada respecto al tiempo de una partícula: a) pequeña, b) mediana, c) grande.

Para determinar el tamaño numérico de las partículas, es necesario correlacionar la intensidad con el coeficiente de difusión de las partículas. Esto se hace usando una función de autocorrelación o *ACF* (ecuación 8). Esta función examina los cambios en la intensidad dispersa durante períodos de tiempo para un volumen de partículas. En el caso de una distribución de tamaño de partícula monodispersa simple (PSD), la *ACF* es una única función exponencial en descomposición (ecuación 9). Después de una serie de cálculos, se encuentra una constante de decaimiento (τ) que es inversamente proporcional a la difusividad de una partícula, como se muestra en las ecuaciones 10 (a-b) donde K es una constante llamada "vector de onda de dispersión". Esta constante relaciona la escala de tiempo del proceso de difusión con la escala de distancia establecida por la longitud de onda del láser. K se muestra en la ecuación 11 y depende de la longitud de onda del láser (λ), θ es el ángulo de detección y el índice de refracción del disolvente (η). Una vez que se conoce el coeficiente de difusión, el radio hidrodinámico se puede determinar usando la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 12).

$$C(t') = \langle I(t) * I(t - t') \rangle \quad (8)$$

$$C(t') = A \exp\left(-t'/\tau\right) + B \quad (9)$$

$$i/\tau = 2DK^2 \quad (10a)$$

$$D = (1/2K^2)(i/\tau) \quad (10b)$$

$$K = \left(\frac{4\pi\eta}{\lambda}\right) \sin \frac{\theta}{2} \quad (11)$$

$$D = kT/6\pi\eta R \quad (12)$$

El resultado de DLS más simple es una muestra monodispersa o uniforme con una distribución de tamaño estrecha.

3.7 Técnicas electroquímicas

3.7.1 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

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

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

La resistencia eléctrica (R) es la capacidad de un elemento de un circuito eléctrico para resistir el flujo de corriente eléctrica. La ley de Ohm (ecuación 13) define la resistencia en términos de la relación entre la tensión, E , y la corriente I .

$$R = \frac{E}{I} \quad (13)$$

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

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

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

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

La impedancia electroquímica se mide generalmente utilizando una señal de excitación pequeña. Esto se hace para que la respuesta de la celda sea pseudo-lineal. En un sistema lineal (pseudo-lineal), la respuesta de la corriente a un potencial sinusoidal será una senoide a la misma frecuencia pero desplazada en fase (fig. 20).

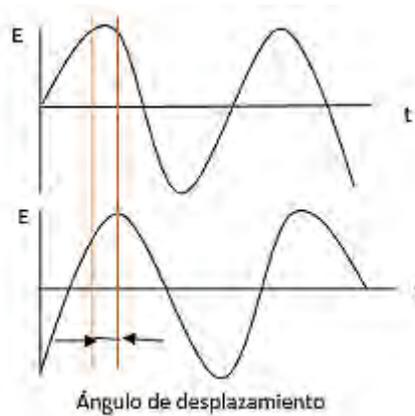


Figura 20. Respuesta de una corriente sinusoidal en un sistema lineal.

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

$$E = E_0 \sin(\omega t) \quad (13)$$

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

$$\omega = 2\pi f \quad (14)$$

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

$$I = I_0 \sin(\omega t + \phi) \quad (15)$$

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

$$Z = \frac{E}{I} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \phi)} \quad (16)$$

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

Con la relación de Euler,

$$\exp(j\phi) = \cos \phi + j \sin \phi \quad (17)$$

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

$$E = E_0 \exp(j\omega t) \quad (18)$$

y la respuesta de corriente como una función compleja. El potencial se describe como:

$$I = I_0 \exp(j\omega t - \phi) \quad (19)$$

La impedancia se representa entonces como un número complejo:

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} = Z_0 \exp(j\phi) = Z_0(\cos \phi + j \sin \phi) \quad (20)$$

Entre las diferentes representaciones gráficas de los datos impedimétricos, la más común es la representación del diagrama de Nyquist, en el que la parte imaginaria de la impedancia $-Z'$, se representa frente a la parte real Z'' . En esta gráfica cada punto corresponde a una frecuencia diferente. Los resultados también pueden ser interpretados mediante diagramas de Bode, en los cuales el logaritmo de la magnitud de la impedancia ($\log |Z|$) y el desfase (ϕ) se grafica respecto al logaritmo de la frecuencia ($\log \omega$).

3.7.2 Voltimetría cíclica

Es un método para investigar el comportamiento electroquímico de un sistema. Fue reportada por primera vez en 1938 y descrito teóricamente por Randles. Es una de las técnicas que más se emplea para estudiar mecanismos de reacción, ya que aporta información rápida acerca del comportamiento redox de las especies, de las reacciones químicas en que participan (mecanismos de reacción, reacciones químicas acopladas) y en la determinación de parámetros termodinámicos. En un típico experimento de voltimetría cíclica, se aplica un voltaje al electrodo de trabajo en una forma de onda triangular desde el valor inicial a un límite predeterminado, donde la dirección de exploración se invierte y la medición de la corriente resultante. El experimento de voltimetría cíclica implica la aplicación de un potencial al electrodo de trabajo que cambia con los tiempos como se muestra en la fig. 21.

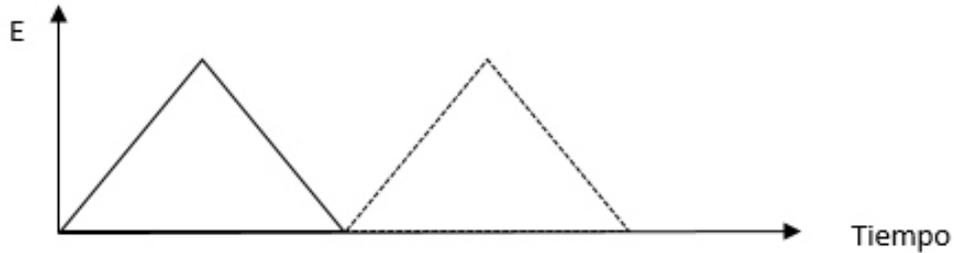


Figura 21. Forma de onda triangular en voltimetría cíclica.

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

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

La corriente en el electrodo de trabajo se llama corriente farádica, es decir, la cantidad de electricidad que pasa (carga) es proporcional al número de moles de reactante convertido. Las superficies de los electrodos donde se llevan a cabo los procesos están clasificados como electrodos de transferencia de carga, ya que el grado de reacción depende de la carga medida que pasa a través de la superficie del electrodo. La reacción redox que tiene lugar en la solución se puede expresar como: $O + ne^- \leftrightarrow R$, donde O y R son las formas oxidadas y reducidas de las especies redox, respectivamente. Cuando la reversibilidad del proceso se debe a que la transferencia de electrones es más rápida que el resto de procesos que tiene lugar, como por ejemplo la difusión, la separación de los potenciales de pico, deben de cumplir con la siguiente relación:

$$|E_{pa} - E_{pc}| = 2.218 \frac{RT}{nF} \quad (21)$$

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

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

$$I_p = (2.69 * 10^5) * n^{3/2} * A * C * D^{1/2} v^{1/2} \quad (22)$$

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

Por otra parte, la voltamperometría puede proporcionar información del mecanismo y cinética, que incluye el reconocimiento de los intermedios en las reacciones redox orgánicos. El voltamperograma cíclico típico de un proceso reversible se muestra en la fig. 22.

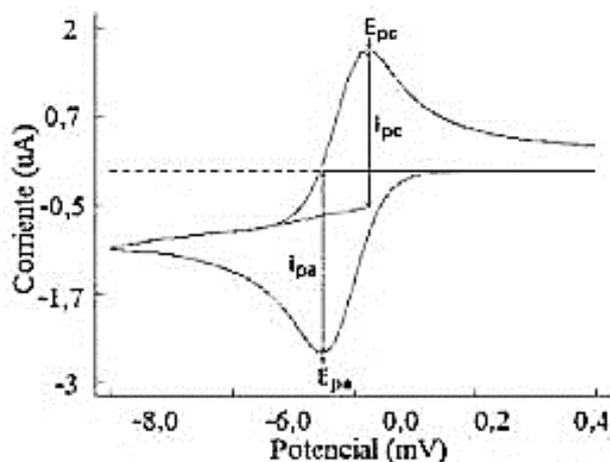


Figura 22. Voltamperograma cíclico reversible.

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

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

CAPÍTULO IV METODOLOGÍA

En esta sección se presenta la secuencia de preparación de las nanoestructuras por el método sol gel de las muestras de TiO_2 y dopados con Ni (2, 5, 10% w), así como la preparación del biosensor de glucosa oxidasa y se describen los equipos usados para la caracterización del biosensor.

4.1 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron:

Isopropóxido de titanio(IV) (97%) marca ALDRICH, alcohol isopropílico (99.9%) marca Fermont, ácido acético glacial (99.7%) marca J.T. Baker, ácido nítrico marca Sigma-Aldrich, agua desionizada marca Tecnología y control ambiental, nitrato de níquel hexahidratado (98%) marca Meyer, electrodos de grafito, gluteraldehído, D-glucosa anhidro, enzima glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) obtenida de *Aspergillus niger* Sigma-Aldrich, buffer de fosfatos (0.1M, pH7), ferrocianuro de potasio 0.1M ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ferrocianato de potasio 0.1M ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), hidróxido de sodio 0.1M.

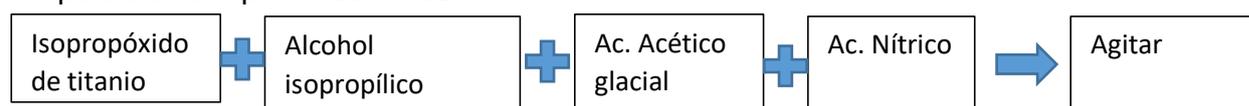
4.2 Síntesis de las nanoestructuras de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Ni}$

Sol Gel

Es uno de los métodos empleados actualmente para obtener partículas nanométricas (principalmente para obtener semiconductores), debido a que permite obtener materiales muy puros en condiciones de baja temperatura.

En el proceso Sol- Gel pueden se puede regular la velocidad y tamaño de partícula regulando el pH en la solución (F. Sayilkan *et al.* 2005). En este caso se realizó la síntesis en condiciones ácidas (pH=3) debido a que en estas condiciones se obtienen partículas de menor tamaño que las obtenidas bajo condiciones básicas como lo describe S. Mahshid *et al.* (2007). La metodología que se utilizó para la síntesis es similar a la de Habibi *et al.* (2006), con la modificación del ácido utilizado para la síntesis (fig. 23).

Preparación del precursor TiO_2 :



Preparación del sol gel

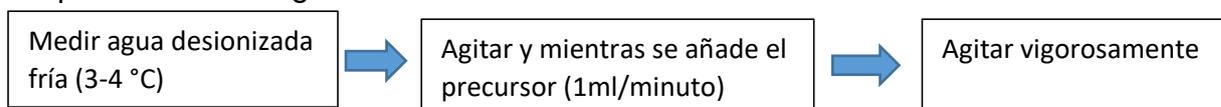


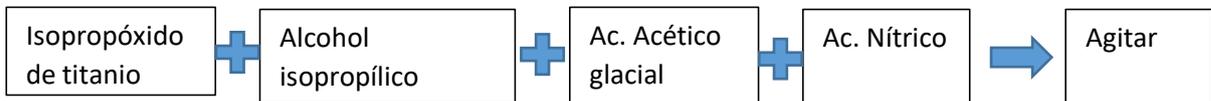
Figura 23. Diagrama de flujo de la preparación sol-gel de TiO_2 .

Dopaje del óxido de titanio con níquel

Para la síntesis del óxido de titanio con níquel (fig. 24), la metodología que se utilizó fue modificada de la propuesta por Al-Shabander y Al-Ajaj (2016), y de lo realizado por Kharoubi *et al.* (2015). Los dopajes fueron de 2, 5 y 10% en peso respecto al titanio, como lo realizado por Wan *et al.* (2012).

Ni-TiO₂

Preparación del precursor de titanio:



Preparación del precursor de níquel:



Preparación del sol gel

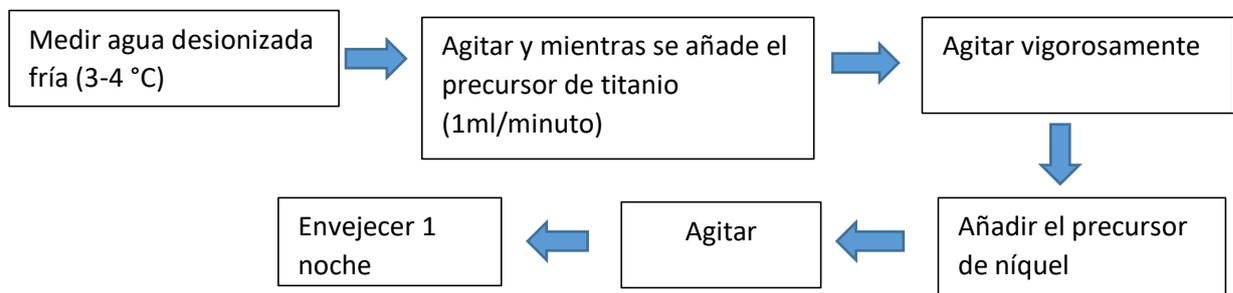


Figura 24. Diagrama de flujo de la preparación sol-gel de TiO₂ dopado con níquel.

Las muestras se secaron a 100 °C por 2 h, posteriormente fueron calcinadas a 500 °C por 1h. Estas muestras se caracterizaron estructural y morfológicamente, para asegurar que las fases de TiO₂ en anatasa y NiTiO₃ estuvieran presentes.

4.3 Preparación del biosensor

4.3.1 Pretratamiento del electrodo de grafito

Previo a la modificación de la superficie electródica, se realizó un pretratamiento de limpieza para eliminar impurezas y obtener una superficie limpia y reproducible. Para lo cual la superficie del electrodo se pulió con papel lija No. 1200 y 1500, posteriormente con alúmina hasta acabado espejo, seguidamente se lavo con agua destilada, se introdujo en baño ultrasónico durante 10 min en una solución de ácido clorhídrico, etanol y agua alternativamente como lo indica Kochana (2006), por último, se dejó secar al ambiente.

4.3.2 Electrodo de nanopartículas de titania y titania-Ni

Electrodo Glut/Enz: Se mezclaron las cantidades apropiadas de glutaraldehído y enzima glucosa oxidasa, de la cual se tomó una alícuota depositándola en la superficie del electrodo de grafito, dejando secar al aire durante 24 h.

Electrodo TiO₂/Glut/Enz: Se tomó una alícuota del sol de Titania, se mezcló con la suspensión de enzima glucosa oxidasa en una relación 1:1. Posteriormente, se le agregó una alícuota de solución de glutaraldehído al 25% a la mezcla de titania-enzima y se agitó 1 min. Finalmente, se colocó una alícuota de la mezcla final sobre la superficie del electrodo y se dejó secar por 24h.

Electrodo TiO₂-Ni2%/Glut/Enz: Se tomó una alícuota del sol de Titania-Ni2%w, se mezcló con la suspensión de enzima glucosa oxidasa en una relación 1:1. Posteriormente, se le agregó una alícuota de solución de glutaraldehído al 25% a la mezcla de titania-Ni-enzima y se agitó 1 min. Finalmente, se colocó una alícuota de la mezcla final sobre la superficie del electrodo y se dejó secar por 24h.

Electrodo TiO₂-Ni5%/Glut/Enz: Se tomó una alícuota del sol de Titania-Ni5%w, se mezcló con la suspensión de enzima glucosa oxidasa en una relación 1:1. Posteriormente, se le agregó una alícuota de solución de glutaraldehído al 25% a la mezcla de titania-Ni-enzima y se agitó 1 min. Finalmente, se colocó una alícuota de la mezcla final sobre la superficie del electrodo y se dejó secar por 24h.

Electrodo TiO₂-Ni10%/Glut/Enz: Se tomó una alícuota del sol de Titania-Ni10%w, se mezcló con la suspensión de enzima glucosa oxidasa en una relación 1:1. Posteriormente, se le agregó una alícuota de solución de glutaraldehído al 25% a la mezcla de titania-Ni-enzima y se agitó 1 min. Finalmente, se colocó una alícuota de la mezcla final sobre la superficie del electrodo y se dejó secar por 24h.

4.4 Métodos de Caracterización

La espectroscopia de FTIR se utilizó para determinar los modos vibracionales presentes en la nanoestructuras. El equipo utilizado fue el Bruker IR-FT Vertex 70 empleando el aditamento ATR para medir el TiO₂. Los parámetros empleados para las mediciones del Sol de TiO₂ fueron: Resolución de 4cm⁻¹, tiempo de escaneo de 32 s, tiempo de escaneo del blanco 32 s y rango del análisis de 4700cm⁻¹ a 340cm⁻¹ como lo han realizado Pecharrómán *et al.*, (2007) y Nolan *et al.* (2009).

Por difracción de rayos X se pudieron determinar las fases presentes en las nanoestructuras, las mediciones se realizaron en un equipo Bruker D8 Advance Davinci, que usa como fuente de radiación K- α con longitud de onda de 1.54 nm. La medición se realizó bajo los siguientes parámetros descritos por Mahshid, 2007, intervalo de 2 θ Barrido de 15° a 90°, paso de 0.02 s⁻¹. Los difractogramas obtenidos se analizaron usando el software Difracc.Eva de la compañía Bruker.

Para el análisis de las muestras mediante RAMAN se realizaron mediante un sistema de alta resolución Marca Horiba, modelo LabRAM HR Evolution, usando una línea de excitación 632.8 (laser de He Ne 5mW), objetivo de 50X donde el spot es de 2 μ .

La medición de reflectancia difusa fue realizada en un equipo DT-Mini-2 marca Ocean Optics con fuente de luz de deuterio tungsteno halógeno, que trabaja en un rango espectral de 200 a 2000 nm y cuenta con una salida de 0.5 mm. Las mediciones fueron realizadas usando el equipamiento de esfera integradora.

El tamaño de partícula se realizó en un equipo Horiba Scientific nano practica modelo SZ-100. La medición fue a 90° en agua desionizada y en celdas desechables. También se calculó el tamaño empleando la ecuación de Scherrer.

$$t = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (23)$$

Donde

t = tamaño de partícula

k = Constante de Scherrer

λ = Longitud de onda

β = línea que se ensancha a la mitad de la intensidad máxima

θ = ángulo

Las muestras se secaron a 100 °C por 2 h, posteriormente fueron calcinadas a 500 °C como lo realizó Ochoa *et al.* (2009) y Al- Shabander *et al.* (2016).

Medición de tamaño de partícula se realizó en un equipo Horiba Scientific nano practica modelo SZ-100. Las mediciones fueron a 90° usando en celdas desechables en agua desionizada y alcohol isopropílico.

Para determinar la morfología de las muestras se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, marca JEOL, modelo JSM-7600F. Cuenta con detector EDS, LBE y de electrones secundarios SEI y LEI. Éste equipo permite realizar estudios morfológicos a niveles nanométricos así como obtener a composición química de los materiales fabricados. La resolución que se utilizó fue de 10000X.

La voltimetría cíclica se realizó en un potencióstato marca Gamry Instruments empleando una solución de ferrocianato/ferrocianuro de potasio 0.1M y KCl 1M con una velocidad de barrido de 100 mV/s, un rango de -0.5 a 0.5 V y tres ciclos como lo realizó Romero Arcos en 2016. Para la medición de glucosa se emplearon las mismas condiciones, pero en una solución buffer de fosfatos a pH=7 se agregaron alícuotas de glucosa: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000 y 6000 μ l de solución de glucosa 1M.

CAPÍTULO V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las muestras de TiO_2 y TiO_2 dopadas con Ni (2, 5, 10 %w), describiendo la caracterización estructural y morfológica de las muestras en las cuales se determina las fases presentes en las muestras así como su morfología. Posteriormente se presentan las pruebas de impedancia y voltimetría cíclica, así como su respuesta a detección de glucosa.

5.1 Difracción de rayos X.

En la fig. 25 se muestran los resultados de difracción de rayos-X de todas las muestras secadas a 100°C , donde se observa la presencia de TiO_2 en proceso de cristalización a su fase anatasa en ángulo de 2θ igual a 25.5° , 37.5° , 48.1° , 53.8° , 55° , 62.7° , 70.3° , 75° , y 82.7° los cuales son referidos con la etiqueta 1 en la fig. 25. Esta fase fue identificada con la ficha PDF 00-004-0477 TiO_2 Anatase, syn. Mientras que las muestras dopadas con níquel se mantiene la fase anatasa y en la muestra dopada al 10% se puede apreciar el inicio de la cristalización a la fase que corresponde al NiTiO_3 que es identificada con la ficha PDF 04-010-7290 Titanium Nickel Oxide con valores en 2θ igual a 24° , 33° , 35.6° , 36.8° , 38.7° , 40.8° , 49.3° , 54.3° , 62.5° , 64° y 82.9° .

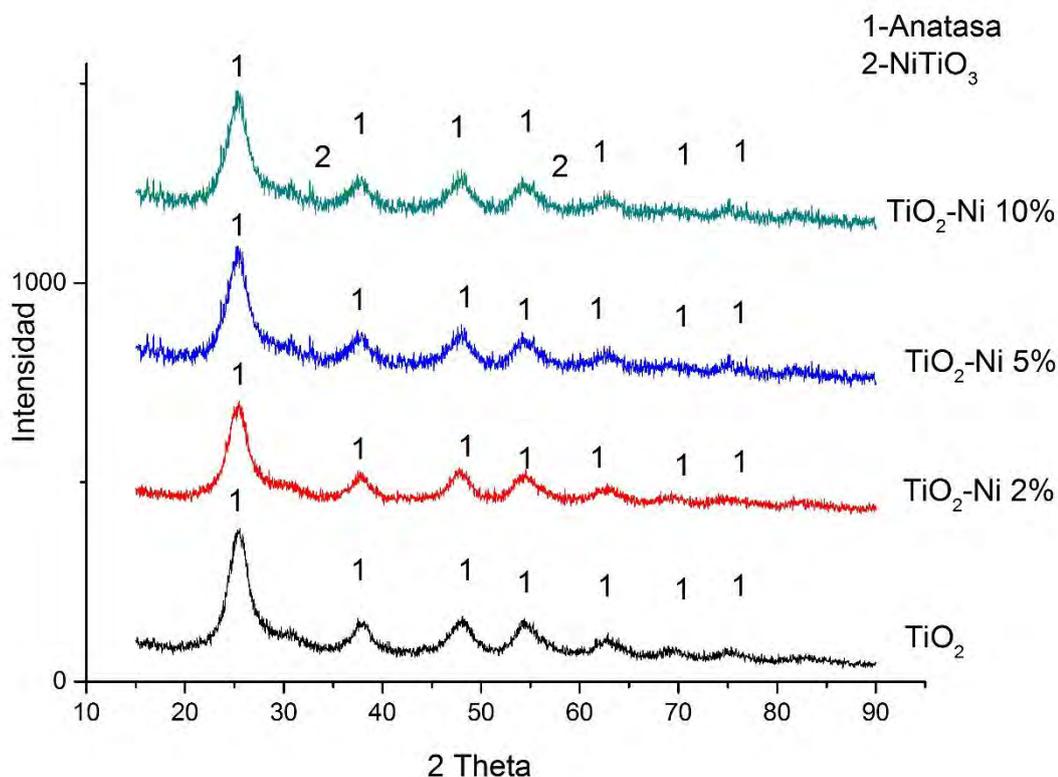


Figura 25. Espectro de difracción de rayos X muestras secadas a 100°C .

Se puede observar que el proceso de cristalización hacia la fase titanato de níquel en lugar de óxidos de níquel presenta las mejores propiedades electroquímicas en comparación con el óxido de níquel como lo señaló Pal *et al.* (2015).

Empleando el software DifracEva se calculó el porcentaje cristalino de las muestras secadas a 100 °C y mediante la ecuación de Scherrer se calculó el tamaño de cristal como puede apreciar en la tabla 2.

Tabla 2. Tamaño de cristal y porcentaje cristalino para muestras secadas a 100 °C.

Muestra	Porcentaje de cristalización	Tamaño de cristal (nm)		
		Anatasa	Brokita	NiTiO ₃
TiO ₂	52.6	1.53	2.71	-----
TiO ₂ -Ni2%	50.8	1.26	2.47	5.91
TiO ₂ -Ni5%	49.9	1.85	1.74	3.88
TiO ₂ -Ni10%	54	1.85	1.71	3.26

Conforme aumento el porcentaje de níquel se vio un ligero incremento en los picos de difracción asociados al NiTiO₃, por otro lado la fase anatasa está presente en las muestras dopadas con Ni. Y no se observa el inicio de la cristalización un óxido de níquel.

Por otro lado, cuando las muestras de TiO₂ y TiO₂ dopadas con Ni (2, 5 y 10%w Ni) son tratadas térmicamente a 500 °C (fig. 26) se observaron los picos de difracción asociados con la fase rutilo (ficha PDF 00-004-0551 TiO₂) en ángulos de 2θ igual a 27.5°, 36°, 39°, 41°, 44°, 54°, 56°, 64°, 69° y 82.3° con mayor intensidad para la muestra de TiO₂ y dicha fase desapareció conforme aumentó la cantidad de Ni, mientras que los picos de difracción asociados a titanato de níquel aumentaron conforme aumento el porcentaje de Ni, esto fue debido a que los iones de Ni retardan la formación de la fase rutilo y solo se presenta la fase anatasa para dopajes menores al 5%, ya que usar entre 2 y 5% de níquel es suficiente para retardar la transición de la fase anatasa a rutilo, lo cual concuerda con Douglas Skoog (2009), pero cuando el dopaje es mayor al 10% se observa que las reflexiones corresponden a la fase anatasa y titanato de níquel, esto es debido a que durante la cristalización de fase de titanato de níquel, los iones de níquel se segregan en la red del TiO₂ y cristalizan a la fase de titanato de níquel tal como fue descrito por Kakegawa *et al.* (1982) en que la fase tetragonal de anatasa puede coexistir con la fase romboédrica del NiTiO₃.

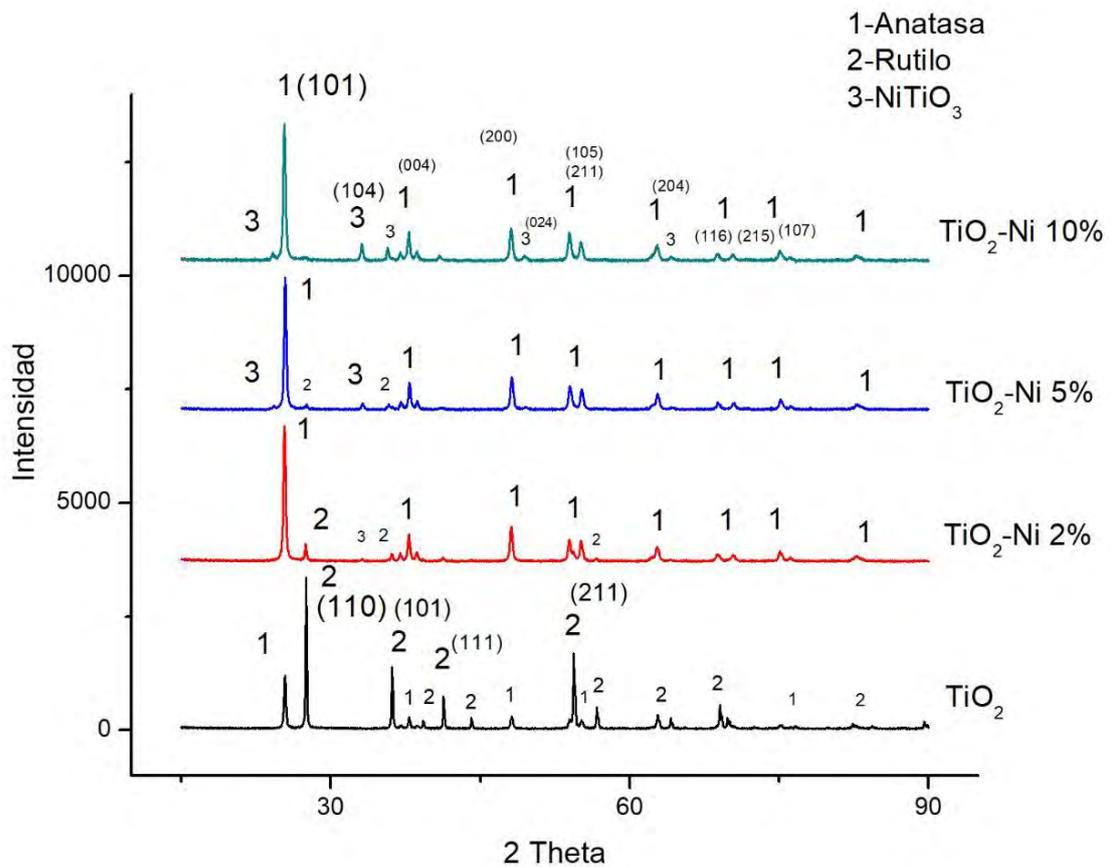


Figura 26. Espectro de difracción de rayos X muestras tratadas a 500 °C.

En la tabla 3 se puede observar que conforme aumento el %w de Ni disminuyo el tamaño de cristal del NiTiO₃, y el tamaño de cristal de la fase anatasa aumento, esto sugiere que el tamaño de las partículas de TiO₂ dopadas con Ni dio un ligero aumento del tamaño de cristal debido a que la incorporación de Ni indujo una distorsión de la expansión de la red de titania y en consecuencia resulta de un aumento del tamaño de partícula promedio debido a que el radio atómico del Ni²⁺ (72 pm) es más grande que el del Ti⁴⁺ (68pm), lo cual hizo que el Ni²⁺ posiblemente aumentaría el número de vacantes de oxígeno en la estructura cristalina del TiO₂, estas vacantes de oxígeno son responsables de la transformación de anatasa a rutilo. Por lo tanto, el TiO₂ dopado con el Ni debería tener una relación aumentada del rutilo a anatasa, sin embargo esto no sucede, posiblemente debido a que la temperatura de calcinación fue de 500 °C lo cual coincide con lo reportado por Prasetyo Hermawan *et al.* (2011) en contraste con lo reportado por Crisan *et al.* (2000) que reporto que la transformación de anatasa a rutilo sucede alrededor de 675 °C.

Tabla 3. Tamaño de cristal y porcentaje cristalino de las muestras tratadas a 500 °C

Muestra	Porcentaje de cristalización	Tamaño de cristal (nm)		
		Anatasa	Rutilo	NiTiO ₃
TiO ₂	83.6	6.12	9.51	-----
TiO ₂ -Ni2%	81	5.32	11.8	6.63
TiO ₂ -Ni5%	79.8	5.49	7.04	5.67
TiO ₂ -Ni10%	82.5	5.15	8.63	5.46

5.2 Tamaño de partícula

Se realizó la determinación de tamaño de partícula para los soles (fig. 27), donde se obtuvieron tamaños de partícula de 50.53, 57.09 y 64.5 nm para el TiO₂, siendo de 57.09 nm el más abundante. Para el TiO₂ dopado al 2%, las partículas presentes fueron de tamaños de 57.09, 64.5 y 72.87 nm, siendo el de 64.5 nm el más frecuente. Las muestras dopadas al 5 y 10% presentaron partículas de 72.87 hasta 105.1 nm donde los valores más frecuentes fueron de 72.87 con frecuencia de 49.72% y 93.02 nm con frecuencia de 61.26% para los soles dopados al 5 y 10% respectivamente.

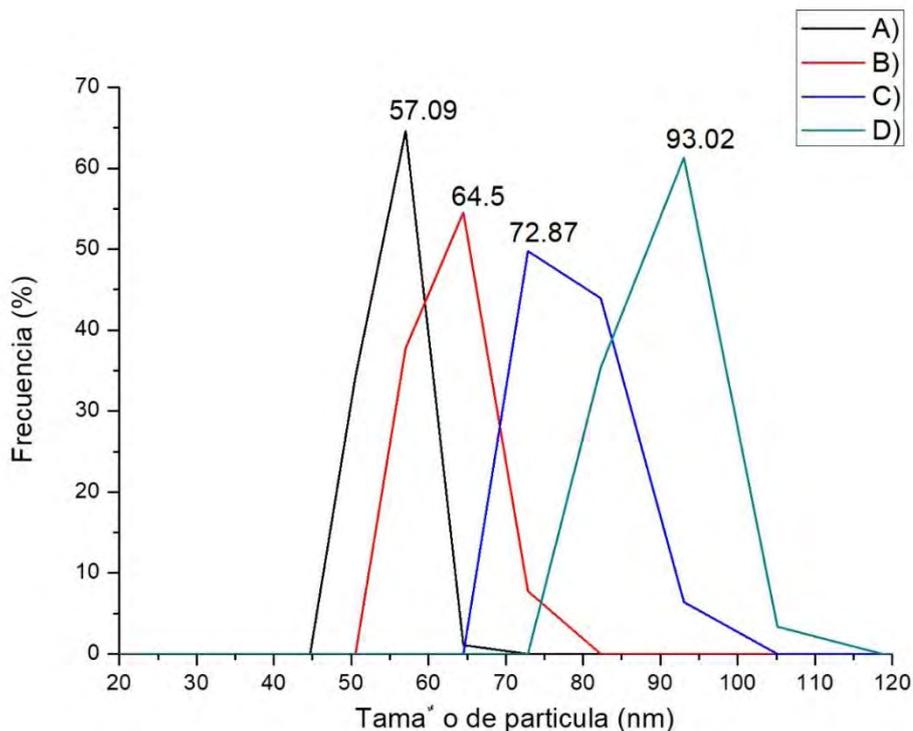


Figura 27. Tamaño de partícula de soles A) TiO₂, B) TiO₂-Ni2%, C) TiO₂-Ni5% y D) TiO₂-Ni10%.

El análisis de tamaño de partícula realizado en una solución de alcohol (fig. 28) para las muestras secadas a 100 °C mostró que las partículas de TiO₂ presentan un tamaño mayor de 150 nm en cambio la muestra dopada con níquel 2, 5 y 10% en peso tuvieron partículas de 0.49, 16.84 y 105.1 nm respectivamente.

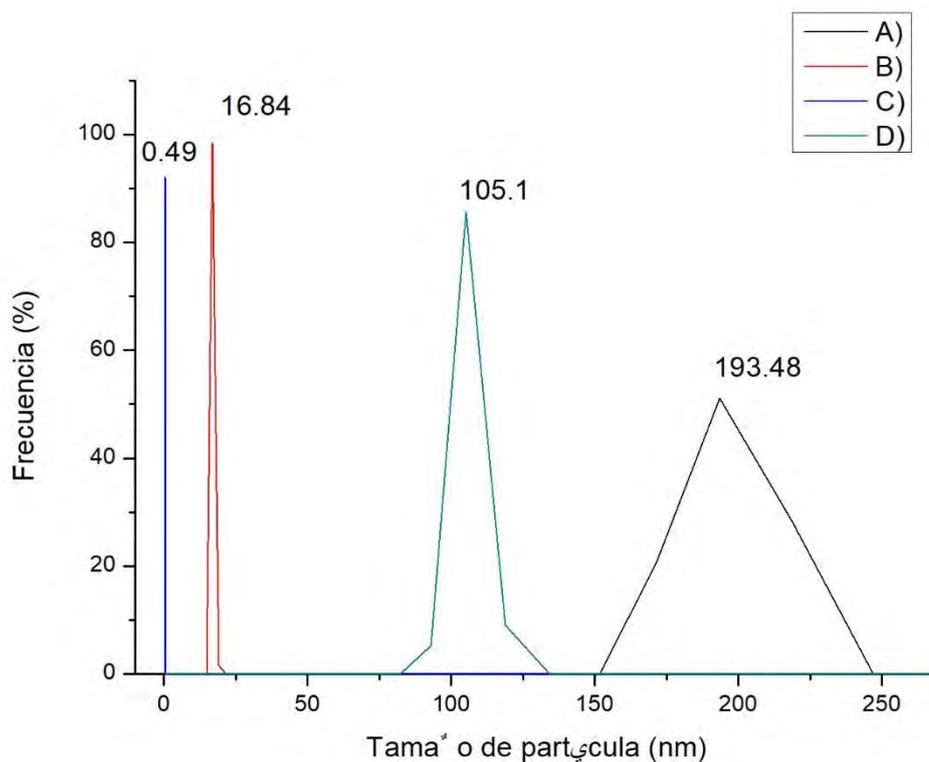


Figura 28. Tamaño de partícula muestras tratadas a 100°C A) TiO₂, B) TiO₂-Ni2%, C) TiO₂-Ni5% y D) TiO₂-Ni10%.

En las muestras tratadas a 500 °C el tamaño de las partículas usando alcohol como solvente se obtuvieron los siguientes valores: 218.6, 1.02, 0.38 y 93.02 nm para TiO₂, TiO₂-Ni2%, TiO₂-Ni5% y TiO₂-Ni10% respectivamente (fig. 29).

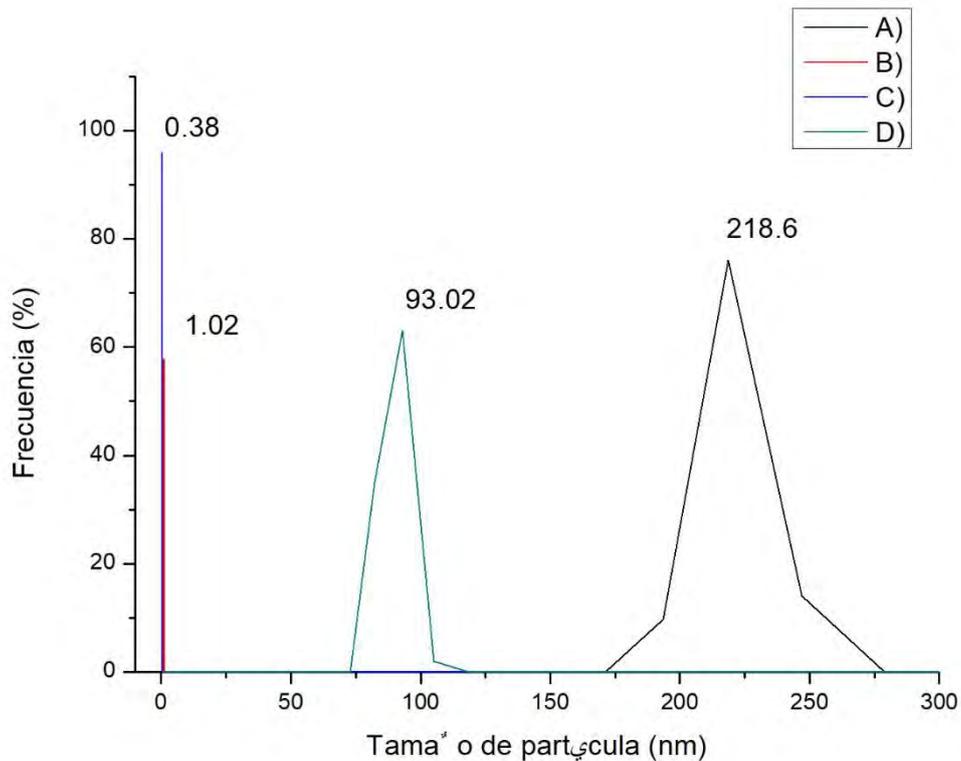


Figura 29. Tamaño de partícula muestras tratadas a 500°C A) TiO₂, B) TiO₂-Ni2%, C) TiO₂-Ni5% y D) TiO₂-Ni10%.

5.3 Espectroscopia FTIR

A continuación se presentan los espectros de FTIR de las muestras en forma de sol.

Los modos de vibración correspondientes a los enlaces de Ti-O-Ti se localizan alrededor de 500 cm⁻¹, la banda que se manifiesta en 1010 cm⁻¹ se asocia a los enlaces Ti-O-C como lo describe Guzmán *et al.* (2007). Las bandas en 1556 y 1762 cm⁻¹ indican enlaces C-N y las bandas en 1977 y 2025 cm⁻¹ se relacionan a enlaces CH₂ y C-C respectivamente en base lo descrito por Skoog (2007). Respecto a los enlaces de Ni-O, Ni-TiO₂ los autores G. Zhou *et al.* (2006) y H. Qiao *et al.* (2009) los reportaron, y los relacionaron con las bandas entre 500 y 700 cm⁻¹. Finalmente, Shabander *et al.* (2016) relaciona la banda de 1624 cm⁻¹ con el enlace de Ni-O-Ti el cual se puede apreciar en la fig. 30.

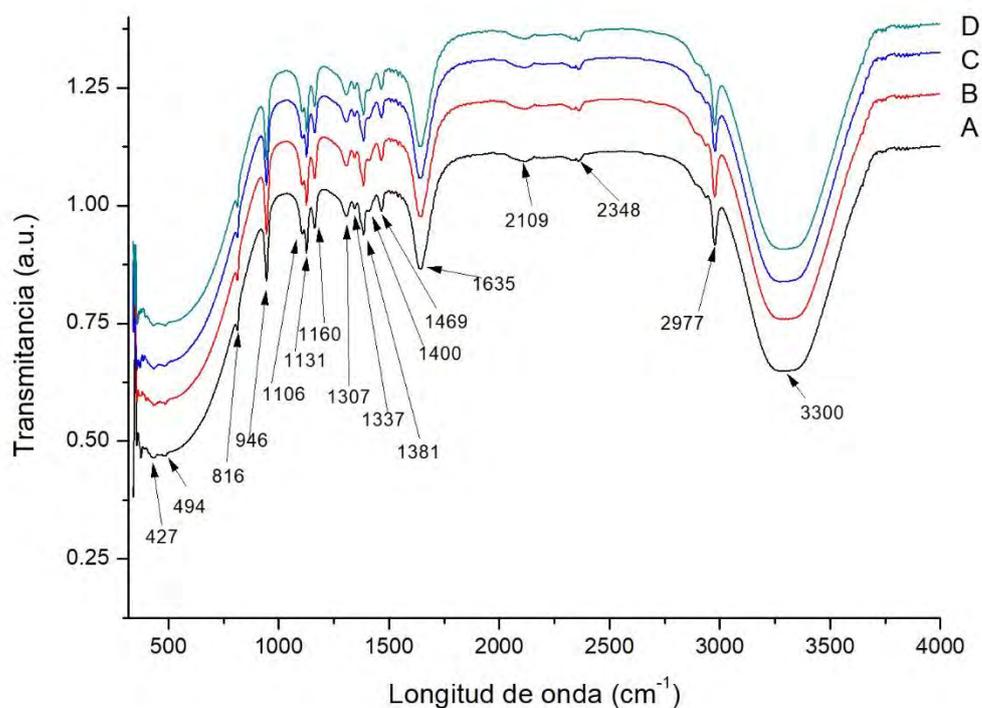


Figura 30. Espectro infrarrojo de soles de A)TiO₂, B)TiO₂-Ni2%, C)TiO₂-Ni5% y D) TiO₂-Ni10%.

Polvos

Las muestras en forma de polvos de los espectros FTIR de la muestra de TiO₂ secada a 100 °C por 1 h y tratada térmicamente a 500 °C por 1 h se muestran en la fig. 31.

En los espectros de infrarrojo obtenidos de los polvos secados a 100 °C y tratados a 500 °C, las bandas que se localizan entre 450 a 800 y en 1627cm⁻¹ se asocian a los enlaces Ti-O, Ti-O-Ti y TiO₂ descrito por Zhou et al. (2006) y Shabander et al. (2016) como se puede apreciar en la fig. 31. La banda que se aprecia en 2340 cm⁻¹ fue de descrito como característico para TiO₂ por Benavides *et al.* (2011). Las bandas entre 1036 y 1069 cm⁻¹ son asociados al enlace Ti-C, mientras que los enlaces C-H₂ se localizan cerca del 1400 cm⁻¹ (Guzmán et al. 2007). Las bandas en 1556 y 1762 cm⁻¹ indican enlaces C-C y las bandas en 1977 y 2025 cm⁻¹ se relacionan a enlaces CH₂ y C-C respectivamente en base lo descrito por Skoog (2007).

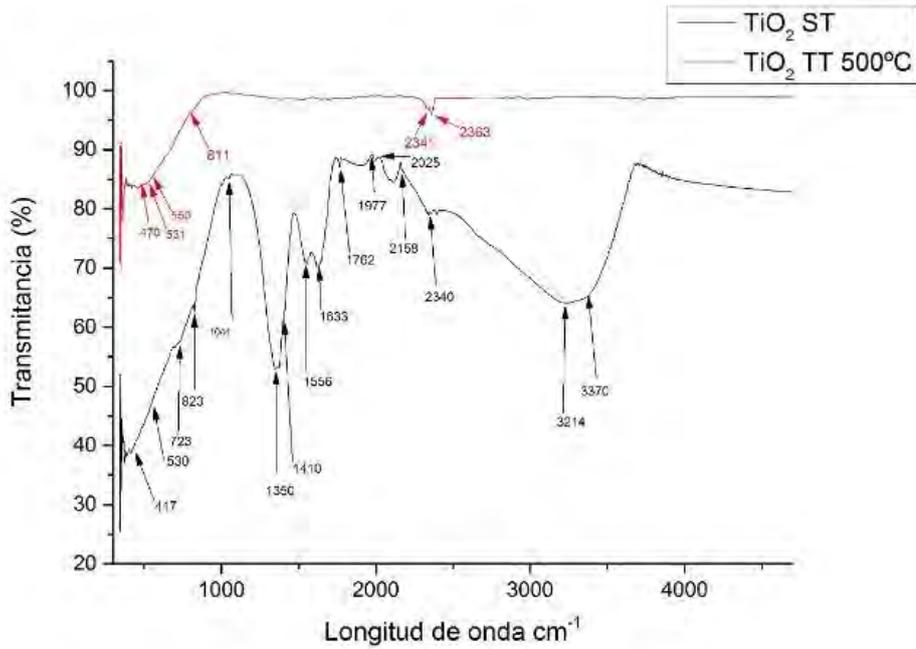


Figura 31. Espectro infrarrojo de polvos de TiO_2 .

En la fig. 32 se presentan los espectros de FTIR de las muestras de TiO_2 dopadas con Ni (2, 5 y 10 %w) etiquetadas en la figura con las letras B), C) y D) respectivamente. Se pueden observar los modos de vibraciones en números de onda en 425, 663, 1040, 1316, 1397, 1534, 1630, 2106, 2358, 2989 y 3334 cm^{-1} , las primeras 3 bandas se asocian a los enlaces Ti-O, Ti-O-Ti y Ti-O-C. Las bandas de 1316, 1397 y 1534 cm^{-1} corresponden enlaces C-C, CH_2 y CH_3 en estiramiento, tijereteo y flexión respectivamente (Zhou *et al.* 2006). Benavides *et al.* (2011) relaciona las bandas de 2106 y 2358 con enlaces C-C y TiO_2 . Respecto a los enlaces de Ni-O, Ni- TiO_2 los autores Zhou *et al.* (2006) y Qiao *et al.* (2009) los reportaron, los relaciona con las bandas entre 500-700 cm^{-1} . Finalmente, Shabander *et al.* (2016) asocian la banda de 1630 cm^{-1} con el enlace de Ni-O-Ti. Finalmente las bandas de 2989 y 3334 cm^{-1} se asocian a grupos hidroxilo.

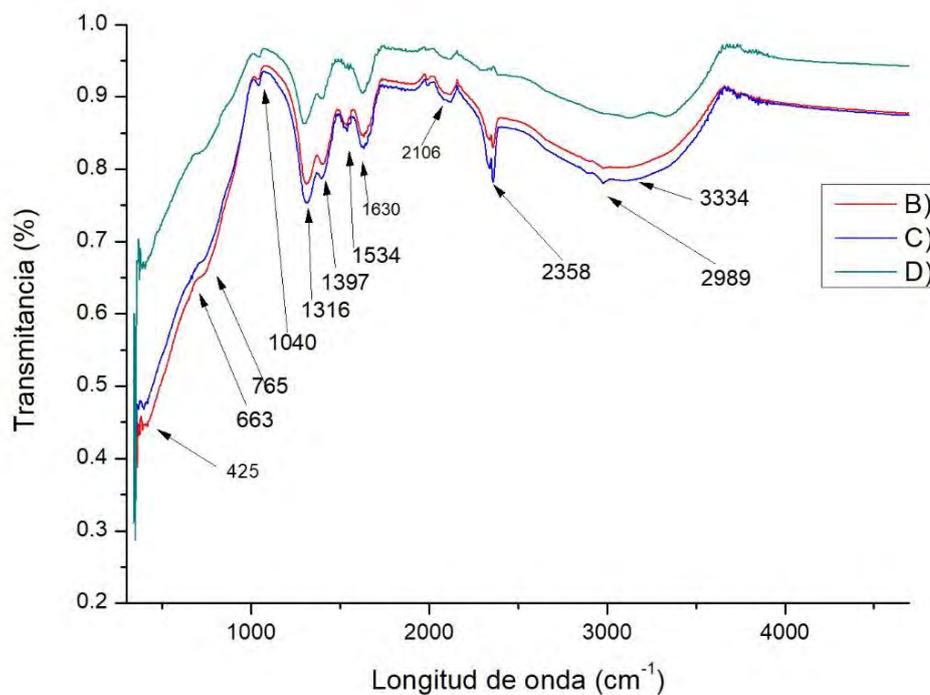


Figura 32. Espectro infrarrojo de polvos secados a 100 °C de: B) $TiO_2-Ni2\%$, C) $TiO_2-Ni5\%$ y D) $TiO_2-Ni10\%$.

El espectro de FTIR de muestras en forma de polvos tratadas a 500 °C dopadas con Ni (2, 5, 10 %w) en la fig. 33 identificadas con las letras B, C y D se pueden observar bandas en número de onda de: 427, 514, 811, 1630, 2341, 2363 y 2986 cm^{-1} . El TiO_2 se asocia a las bandas localizadas en 427, 514, 2341 y 2363 cm^{-1} , mientras que las bandas en 811 y 1630 cm^{-1} corresponden a enlaces Ni-O y Ni-O-Ti.

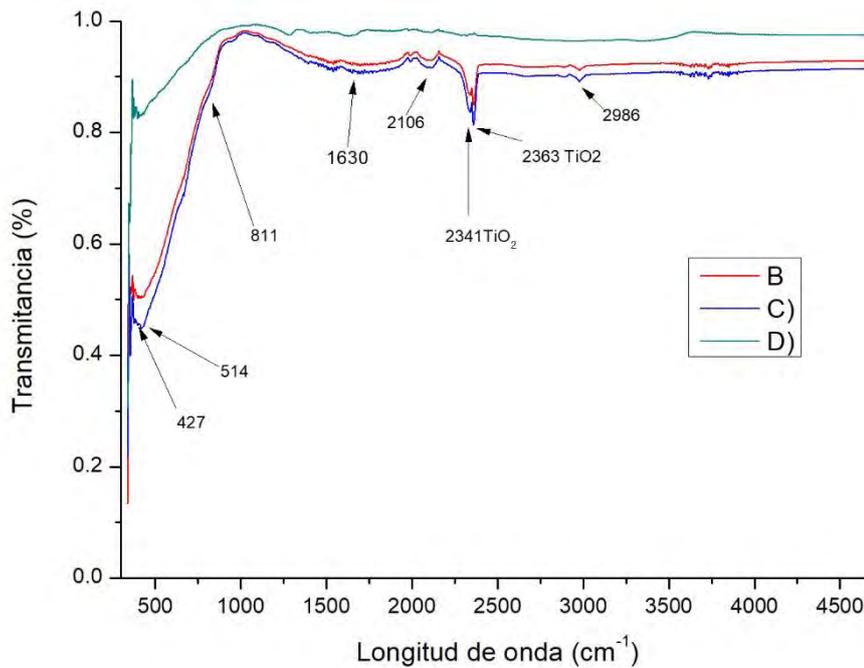


Figura 33. Espectro infrarrojo de polvos tratados a 500 °C de: B) TiO₂-Ni2%, C) TiO₂-Ni5% y D) TiO₂-Ni10%.

Se puede observar la presencia de los enlaces asociados con Ni-O y Ni-O-Ti en 811 y 1630 cm⁻¹ y las bandas de 427, 524, 2341 y 2363 cm⁻¹ se asocian al TiO₂ cual es corroborado con los espectros de difracción de muestras secadas y tratadas térmicamente de la presencia de Titanato de Níquel además de la fase anatasa.

5.4 Espectroscopia RAMAN

El espectro de RAMAN para las muestras secadas a 100°C se aprecia en la fig. 34 donde se encuentran bandas en: 152, 510 y 630 cm⁻¹ y en el detalle de la fig. 35, se observan frecuencias débiles en 243 y 410 cm⁻¹ que corresponden a la fase de anatasa. Si bien estos no coinciden con los picos reportados para el titanato de níquel, esto es debido a que no se encuentra aún la fase totalmente cristalizada y sólo hay una tendencia a la fase de titanato, lo cual concuerda con los espectros de difracción de rayos X de las muestras secadas a 100 °C.

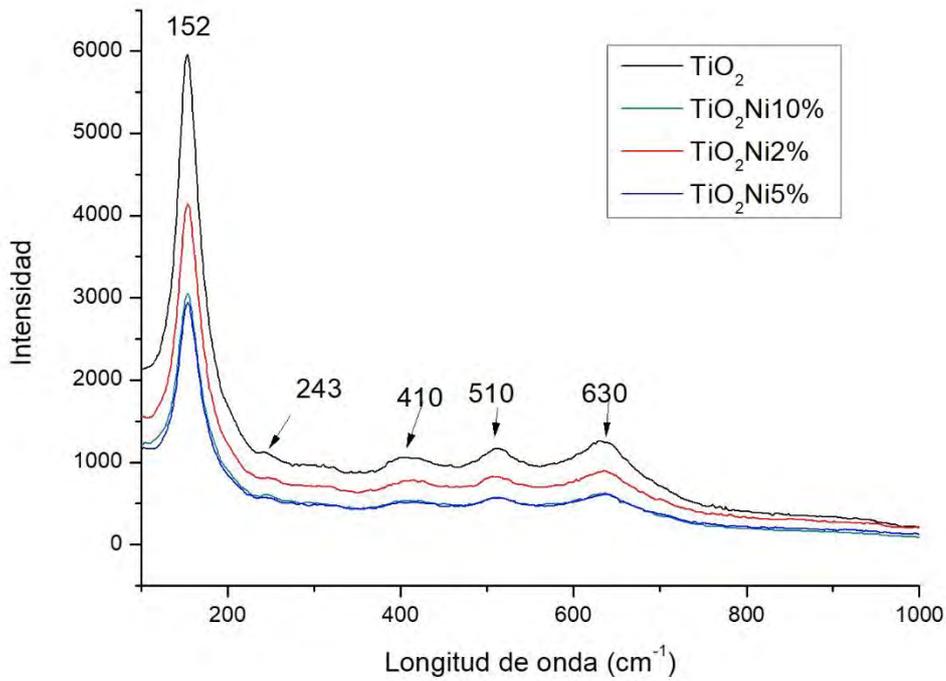


Figura 34. Espectro de RAMAN polvos secados a 100°C de TiO₂ y TiO₂ dopado con Ni 2, 5 y 10%w.

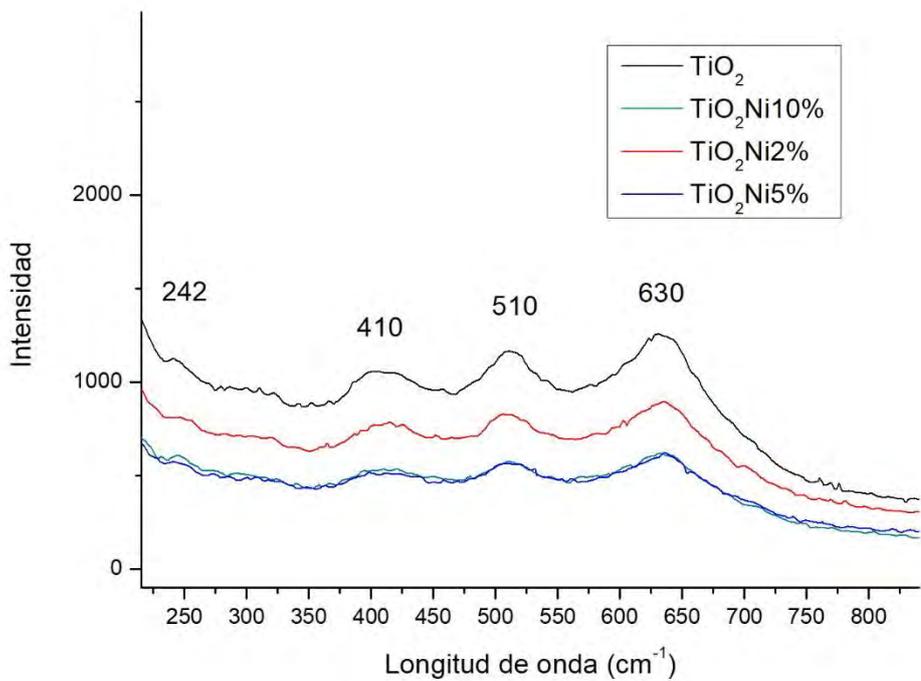


Figura 35. Detalle de RAMAN polvos secados a 100°C de TiO₂ y TiO₂ dopado con Ni 2, 5 y 10%w.

En las muestras tratadas a 500°C se aprecian en la fig. 36 las frecuencias en 141, 193, 445, 609 y 637 cm^{-1} asociadas al TiO_2 en fase de anatasa y rutilo; en 141, 193, 393, 513 y 637 cm^{-1} correspondientes al NiTiO_3 . Al observar el detalle de la fig. 37, es posible ver las frecuencias débiles en: 193, 243, 343 y 710 cm^{-1} de las muestras de titanato de níquel mientras que para la titania en 393 y 637 cm^{-1} . Las bandas de la titania coinciden con las reportadas para anatasa por varios autores (Grujić-Brojčin *et al.* 2005, Nolan *et al.* 2009 y Romero Arcos *et al.* 2016); las bandas asociadas al NiTiO_3 coinciden con los mencionados por Chuang *et al.* (2011), así como por Challasamy y Thangadurai (2017).

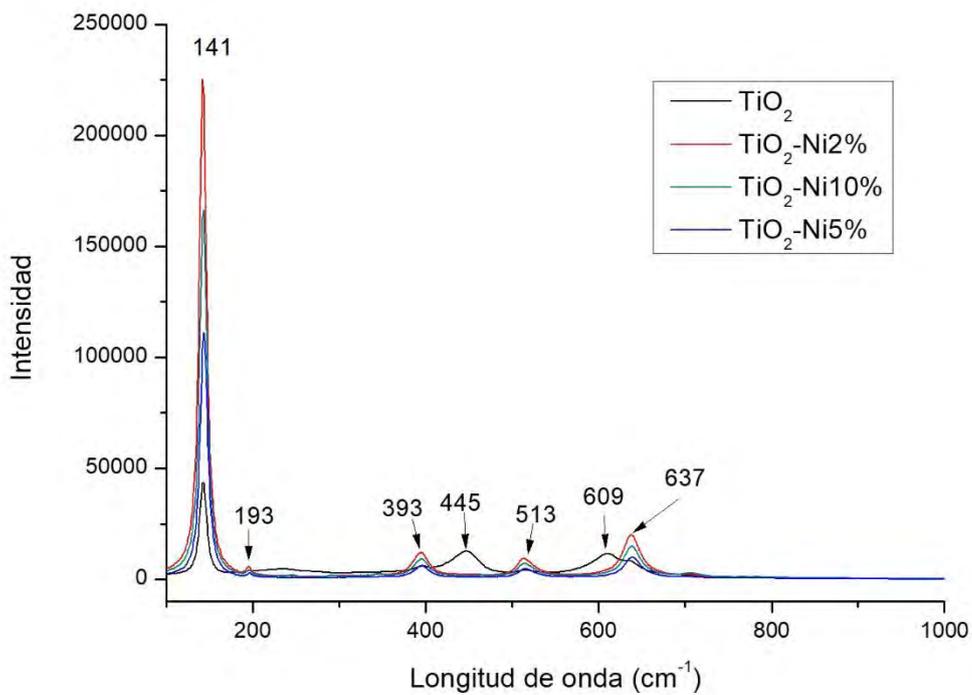


Figura 36. Espectro de RAMAN polvos tratados a 500°C de TiO_2 y TiO_2 dopado con Ni 2, 5 y 10%w.

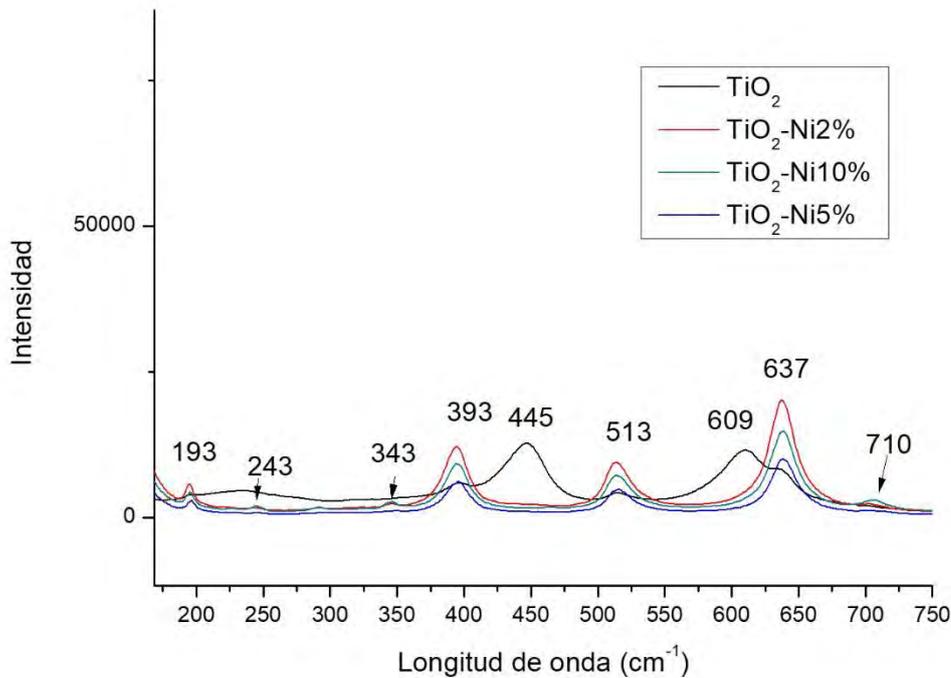


Figura 37. Detalle de RAMAN polvos tratados a 500°C de TiO₂ y TiO₂ dopado con Ni 2, 5 y 10%w.

5.5 Reflectancia difusa

En la fig. 38 se muestra el espectro de reflectancia difusa para las muestras secadas a 100°C de TiO₂ y TiO₂ dopado con Ni al 2, 5 y 10%w en peso, donde la banda de absorción se manifiesta en 324 nm la cual se adjudica a las transiciones electrónicas de $O\ 2p \rightarrow Ti\ 3d$, mientras que las bandas de 450 y 510 nm que corresponden a transiciones de $Ni\ 3d \rightarrow Ti\ 3d$ y $Ni\ 3d \rightarrow O\ 2p$ respectivamente que son características del titanato de níquel (Moghiminia *et al.* 2014 y Pal *et al.* 2015) no se pueden apreciar en las muestras secadas, sin embargo, sí se manifiestan en las muestras tratadas a 500 °C (fig. 39). Esta discrepancia entre los espectros de NiTiO₃ de las muestras secadas y tratadas se puede deber a que en las muestras secadas a 100 °C no hay una fase cristalina, sino amorfa y con tendencia a cristalizar en fase de titanato, como se mostró en las fig. 25 y 26 de difracción de RX de dicha muestra, mientras que las muestras tratadas, si tienen una fase cristalina del titanato.

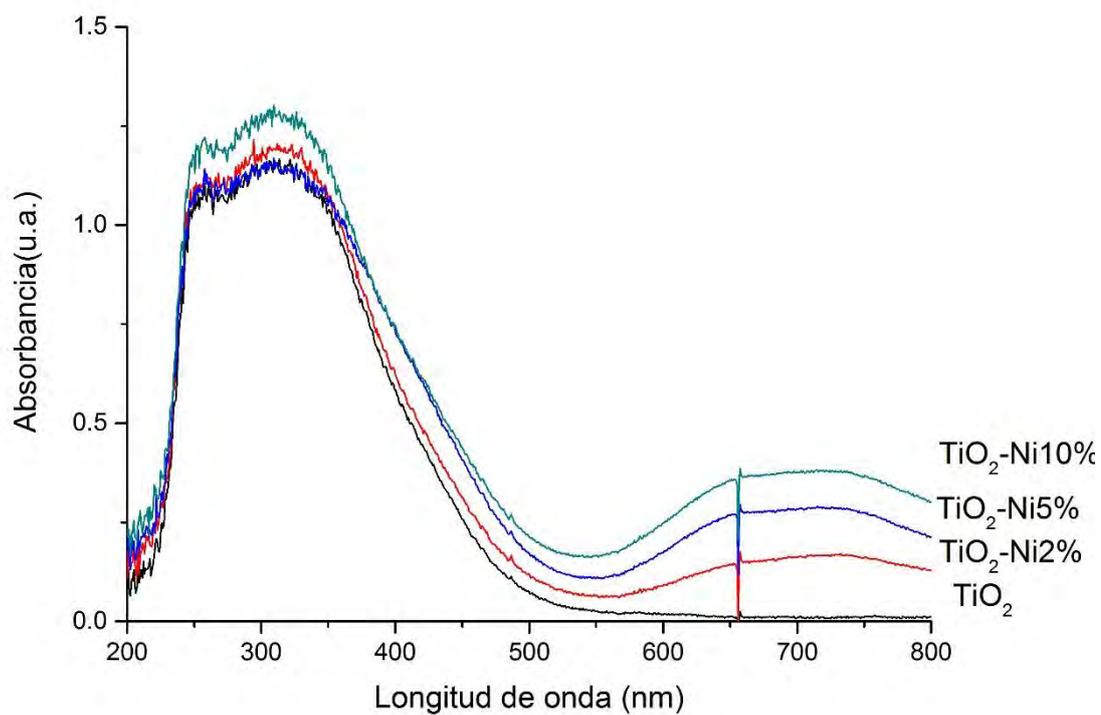


Figura 38. Espectro de reflectancia difusa de polvos secados a 100°C de TiO_2 y TiO_2 dopado con Ni.

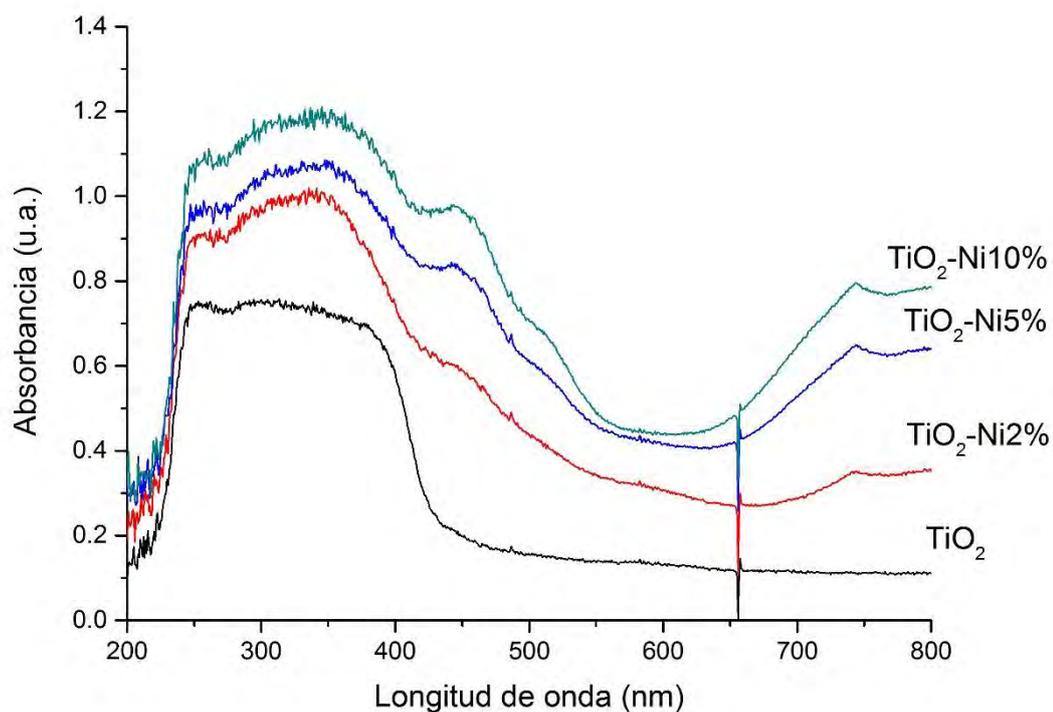


Figura 39. Espectro de reflectancia difusa de polvos tratados a 500°C de TiO_2 y TiO_2 dopado con Ni.

5.6 Microscopia electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés)

En la fig. 40, se muestran las micrografías con un aumento de 10000X de los polvos secados de TiO_2 y TiO_2 dopado con Ni 2, 5 y 10%w. Esta imagen corrobora la información obtenida de tamaño de partícula, donde se indicaba una disminución conforme se aumentaba el dopaje con Ni.

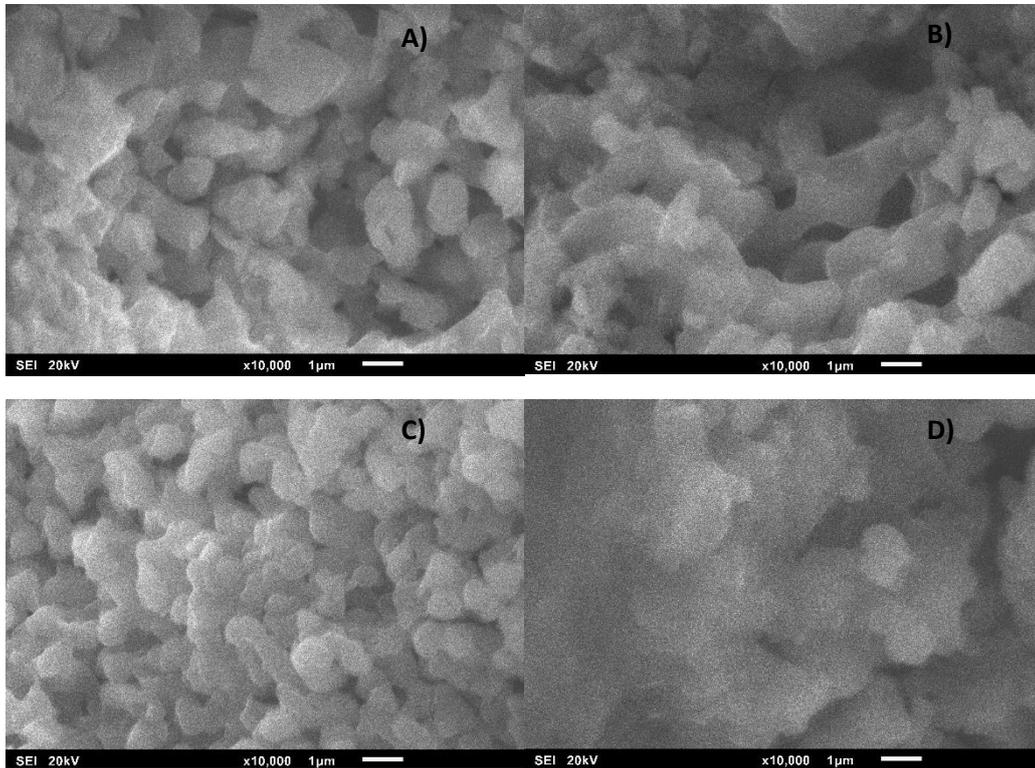


Figura 40. SEM Polvos secados a 100 °C de: A) TiO_2 , B) TiO_2 -Ni2%, C) TiO_2 -Ni5% y D) TiO_2 -Ni10%.

La fig. 41, corresponde a las micrografías de los polvos de TiO_2 y TiO_2 -Ni al 2, 5 y 10%w tratados a 500°C. Usando un aumento de 10000X se puede apreciar que el material se encuentra en el orden nanométrico y que disminuye al aumentar el dopaje con Ni, también si se comparan las imágenes de las muestras tratadas con las secadas 100°C, se confirma que el tratamiento térmico ayudo a disminuir el tamaño de las partículas.

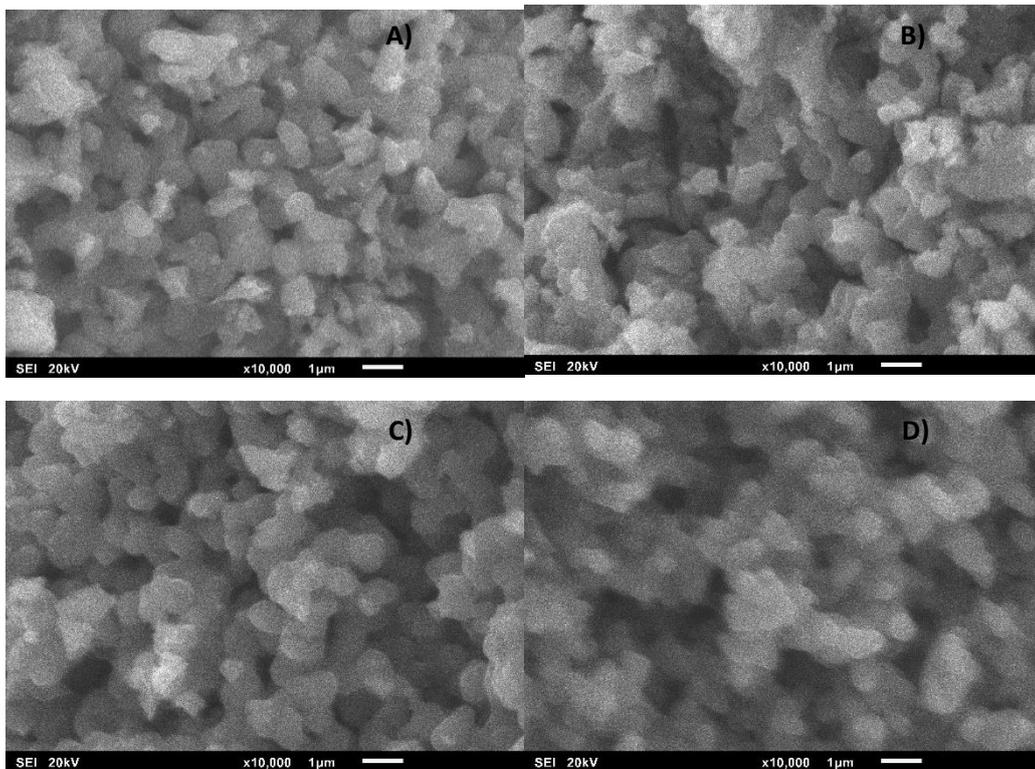


Figura 41. SEM Polvos tratados a 500°C de: a) TiO_2 , b) $\text{TiO}_2\text{-Ni}2\%$, c) $\text{TiO}_2\text{-Ni}5\%$ y d) $\text{TiO}_2\text{-Ni}10\%$.

5.7 Enzima libre e inmovilizada

Se analizó la enzima glucosa oxidasa mediante espectroscopia FTIR antes y después de inmovilizarla (fig.42 a 43). En la fig. 42 se muestran bandas de vibración para 516 cm^{-1} asociada a imida IV o V, 836 y la evidenciada en 944 cm^{-1} podrían ser impurezas; 1087 cm^{-1} corresponde a modo de estiramiento de enlaces C-O, 1241 cm^{-1} se relaciona a la imida III, 1280 y 1396 cm^{-1} se asocian a enlaces C-H; el modo vibracional de doblamiento de los enlaces C-H se asocia a 1454 cm^{-1} , el modo de doblamiento de enlaces N-H de la amida II se localiza en 1538 cm^{-1} , 1632 cm^{-1} se relaciona con vibraciones de estiramiento de enlaces C=O de la amida I, 2346 cm^{-1} , las bandas 2864 y 2927 cm^{-1} se relaciona al modo vibracional de estiramiento asimétrico del enlace C-H para los grupos C-H_3 y C-H_2 respectivamente, 3288 cm^{-1} corresponde a la amida A. Esto coincide con lo reportado por Portaccio *et al.* (2014).

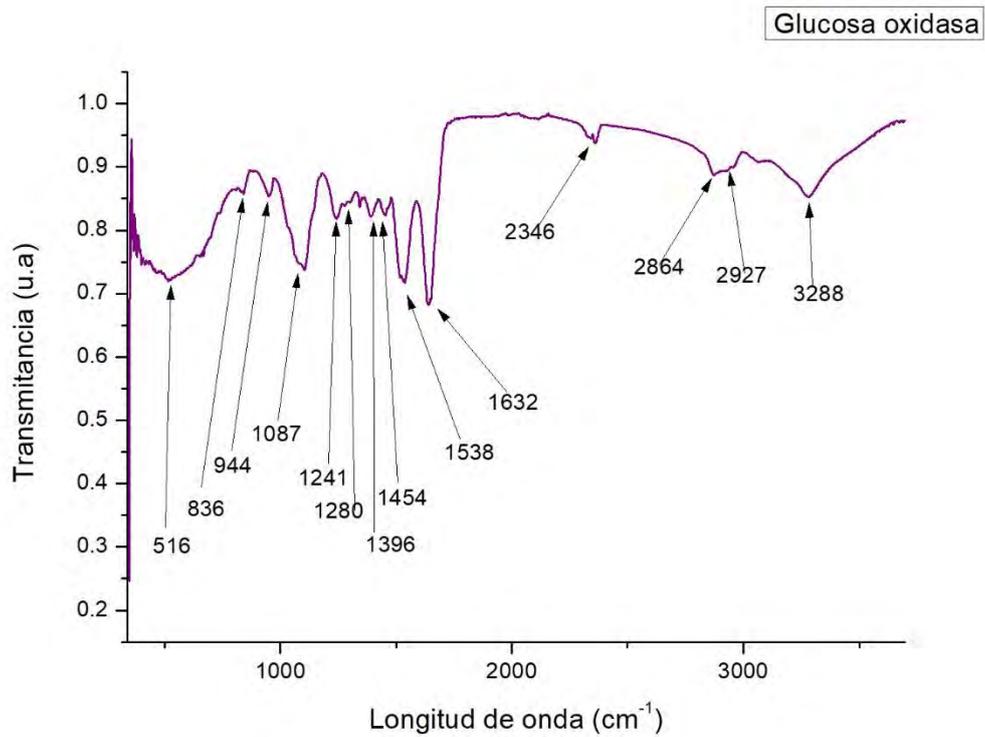


Figura 42. Espectro infrarrojo de enzima glucosa oxidasa.

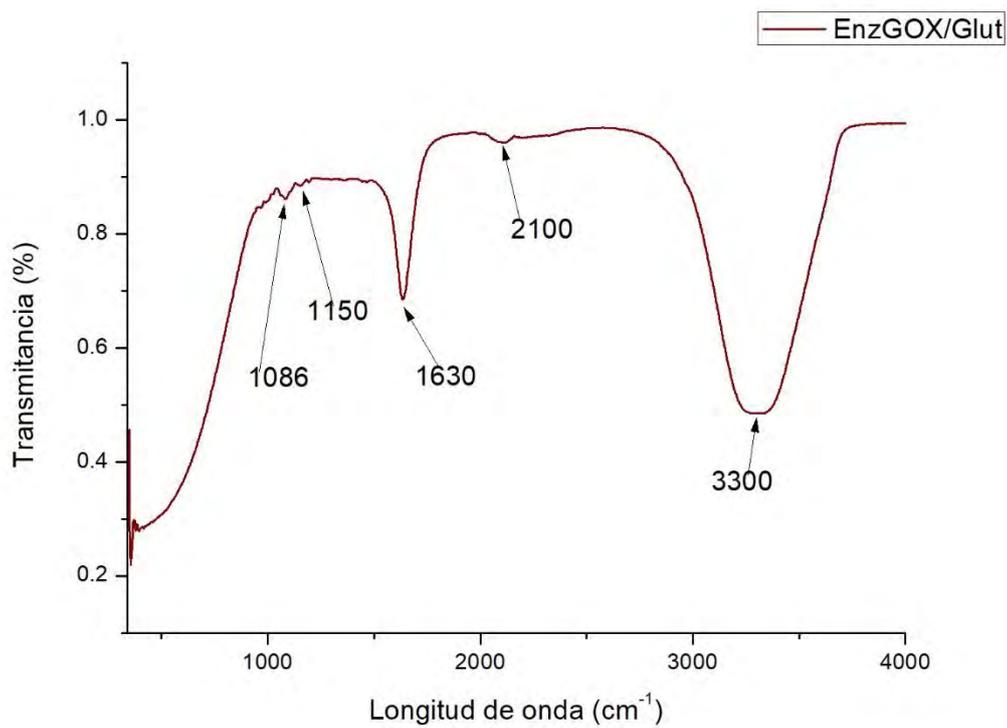


Figura 43. Espectro IR de glucosa oxidasa/gluteraldehído.

En la fig. 44 se aprecia el espectro FTIR de los soles de TiO_2 y TiO_2 dopado con Ni al 2, 5 y 10%w en la que se aprecian las bandas características para el TiO_2 y NiTiO_3 descritas en la caracterización de infrarrojo.

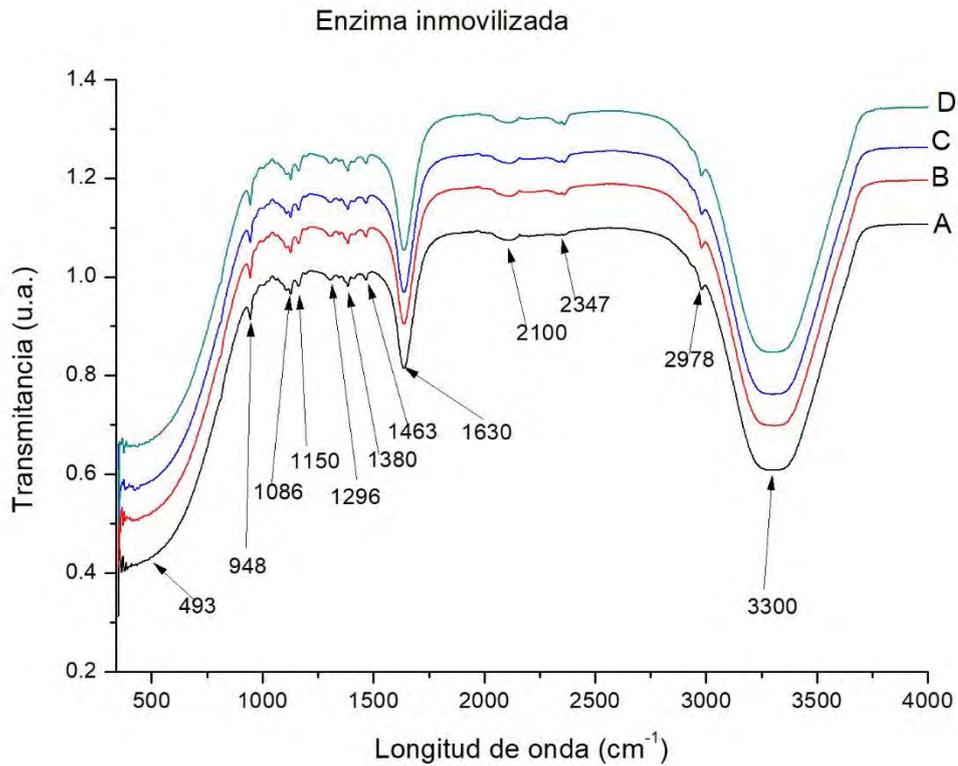


Figura 44. Espectro IR enzima inmovilizada en sol gel, A) TiO_2 , B) TiO_2 -Ni2%, C) TiO_2 -Ni5% y D) TiO_2 -Ni10%.

5.8 Espectroscopia electroquímica de impedancia

En la fig. 45 se observa el diagrama de Nyquist para las películas de TiO_2 y TiO_2 dopado al 2, 5 y 10%W sin la enzima.

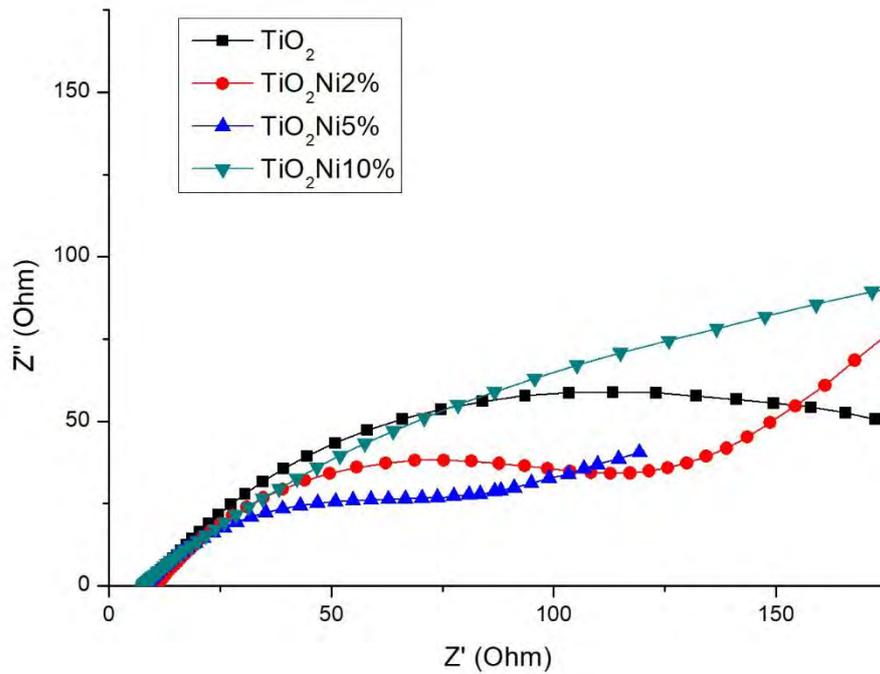


Figura 45. Diagrama de Nyquist para películas de TiO_2 y TiO_2 dopado con Ni al 2, 5 y 10%w.

En la fig. 46 se observa el diagrama de Nyquist para las películas de TiO_2 y TiO_2 dopado con Ni al 2, 5 y 10%w con la enzima inmovilizada, en el que se aprecia una baja resistencia al paso de electrones, sin embargo la respuesta es lineal como si no existiera la película, lo que se puede deber a que el material conduce fácilmente los electrones.

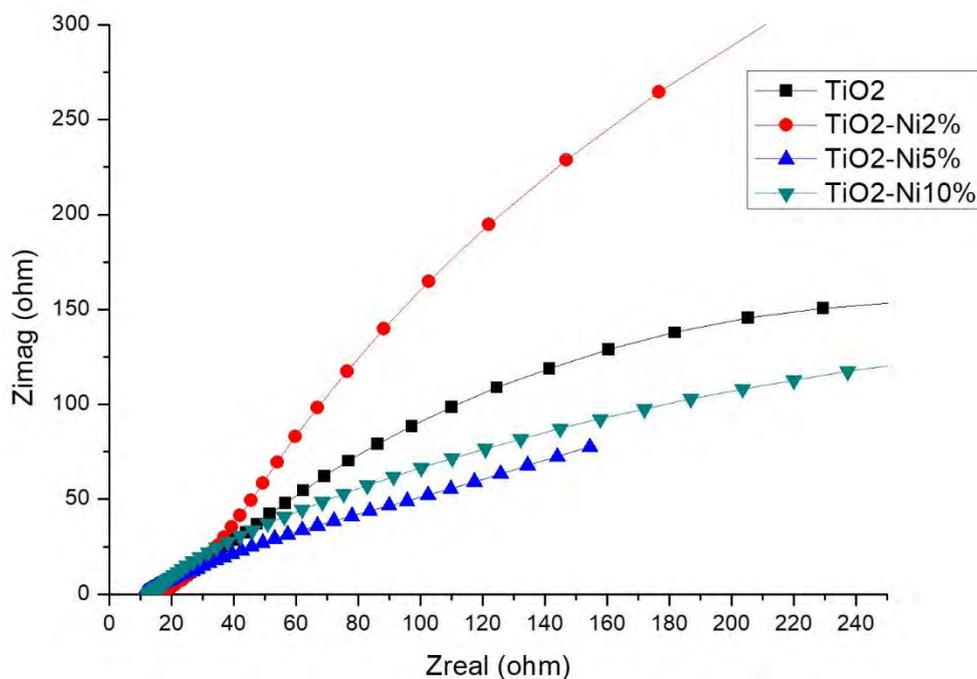


Figura 46. Diagrama Nyquist películas de TiO_2 y dopajes con Ni al 2, 5 y 10%w con enzima y gluteraldehído.

5.9 Voltimetría cíclica

Se probaron los electrodos con y sin enzima glucosa oxidasa inmovilizada en una solución de ferrocianato/ferrocianuro de potasio 0.1M para comprobar su respuesta electroquímica, a continuación, en buffer de fosfatos 0.1M a pH7, se añadieron alícuotas de glucosa y midieron con cada electrodo.

La respuesta de los electrodos con película de TiO_2 , TiO_2 dopado con níquel y gluteraldehído sin enzima se aprecia en la fig. 47, donde se parecía una respuesta intensa por parte de la muestra de TiO_2 dopado al 5%w. También se aprecia una respuesta similar entre la muestra de TiO_2 y la muestra dopada al 10%, además de una respuesta débil por parte de la muestra dopada al 2%.

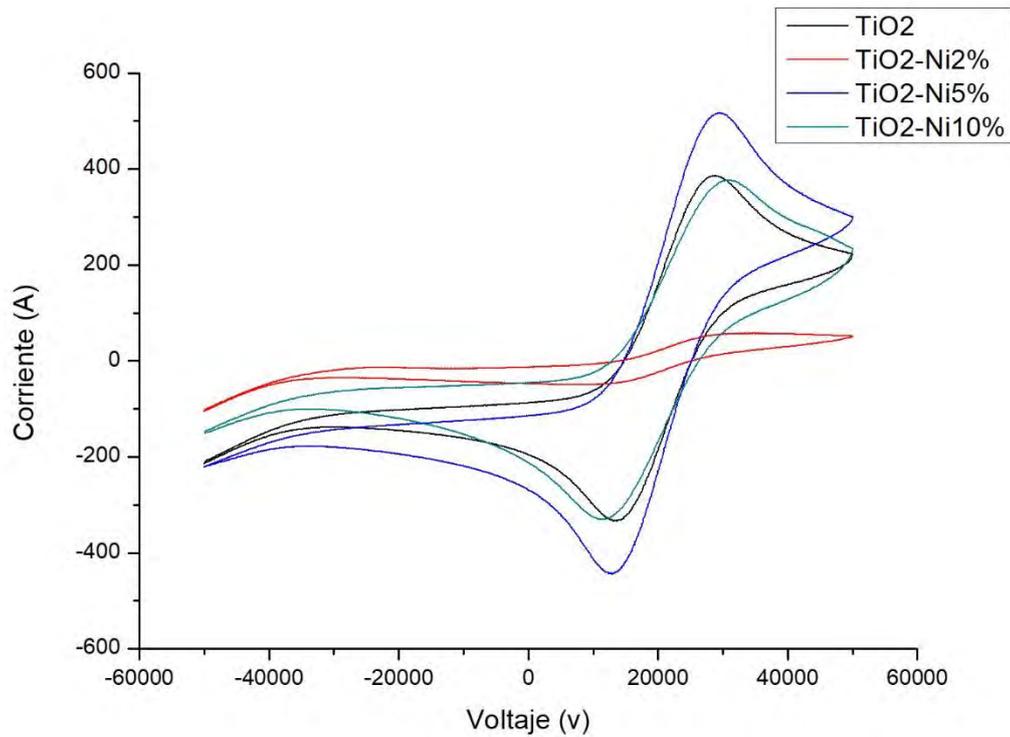


Figura 47. Electrodo con película de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-Ni}$ 2, 5 y 10%w en solución de ferrocianato/ferrocianuro de potasio 0.1M.

Se probaron los electrodos con enzima glucosa oxidasa inmovilizada y glutaraldehído en una solución de ferrocianato/ferrocianuro de potasio 0.1M para comprobar su respuesta electroquímica (fig. 48). Las muestras dopadas con níquel, mostraron una respuesta similar entre sí, pero menos intensas que la muestra de TiO_2 . La respuesta de los electrodos con la enzima inmovilizada fue menor debido a que la enzima no conduce corriente.

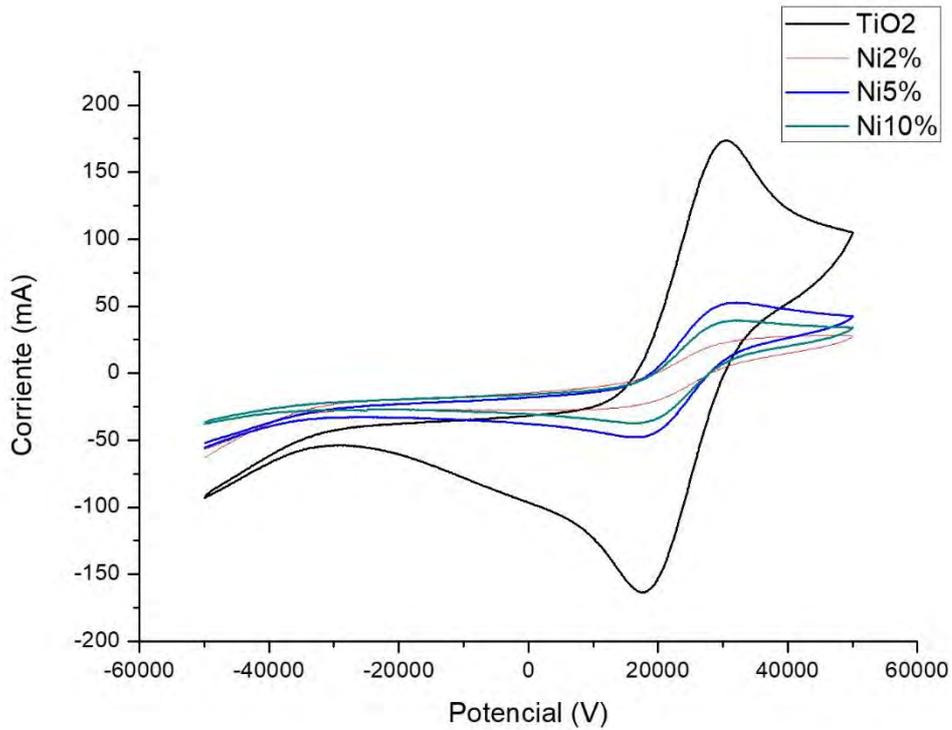


Figura 48. Voltimetría cíclica de la enzima inmovilizada con glutaraldehído y soles de TiO₂ y TiO₂ dopado con Ni.

5.9.1 Respuesta electroquímica de glucosa en los biosensores

Para evaluar la detección electroquímica, se utilizó una solución de glucosa 1M, la cuál fue agregada en alícuotas de 50, 100 y 500 μ l en una solución buffer de pH 7. Los voltamperogramas del biosensor de TiO₂/Glut/Enz, TiO₂-Ni2%/Glut/Enz, TiO₂-Ni5%/Glut/Enz y TiO₂-Ni10%/Glut/Enz se muestran en las fig. 49, 50, 51 y 52 respectivamente.

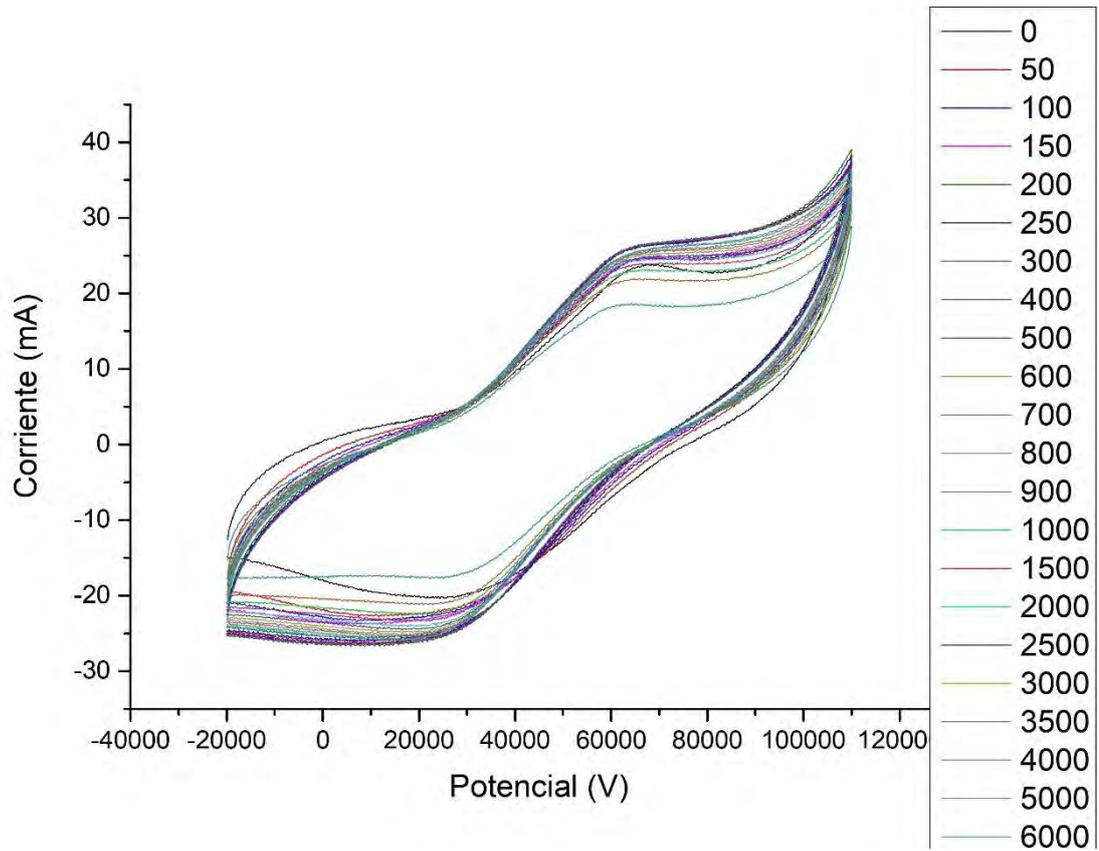


Figura 49. Respuesta de voltimetría cíclica de TiO_2 -Glut-Enzima a glucosa.

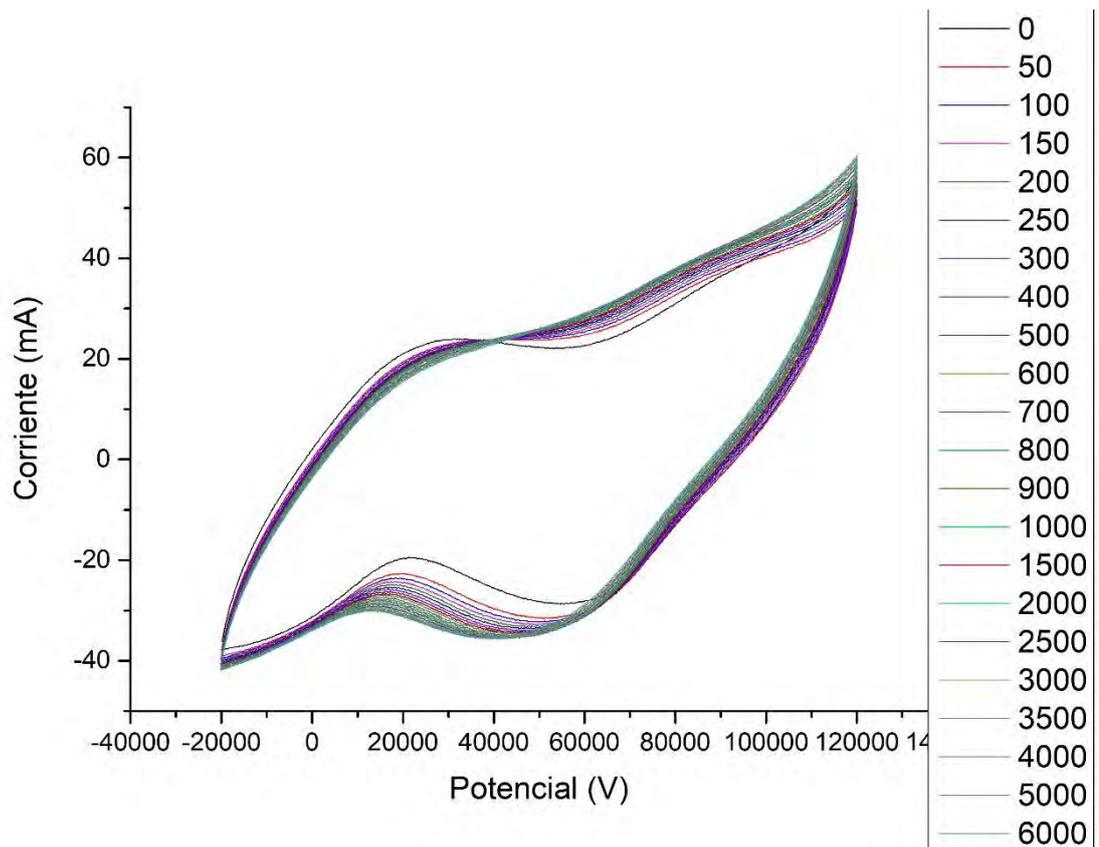


Figura 50. Respuesta de voltimetría cíclica de TiO_2 -Ni²⁺-Glut-Enzima a glucosa.

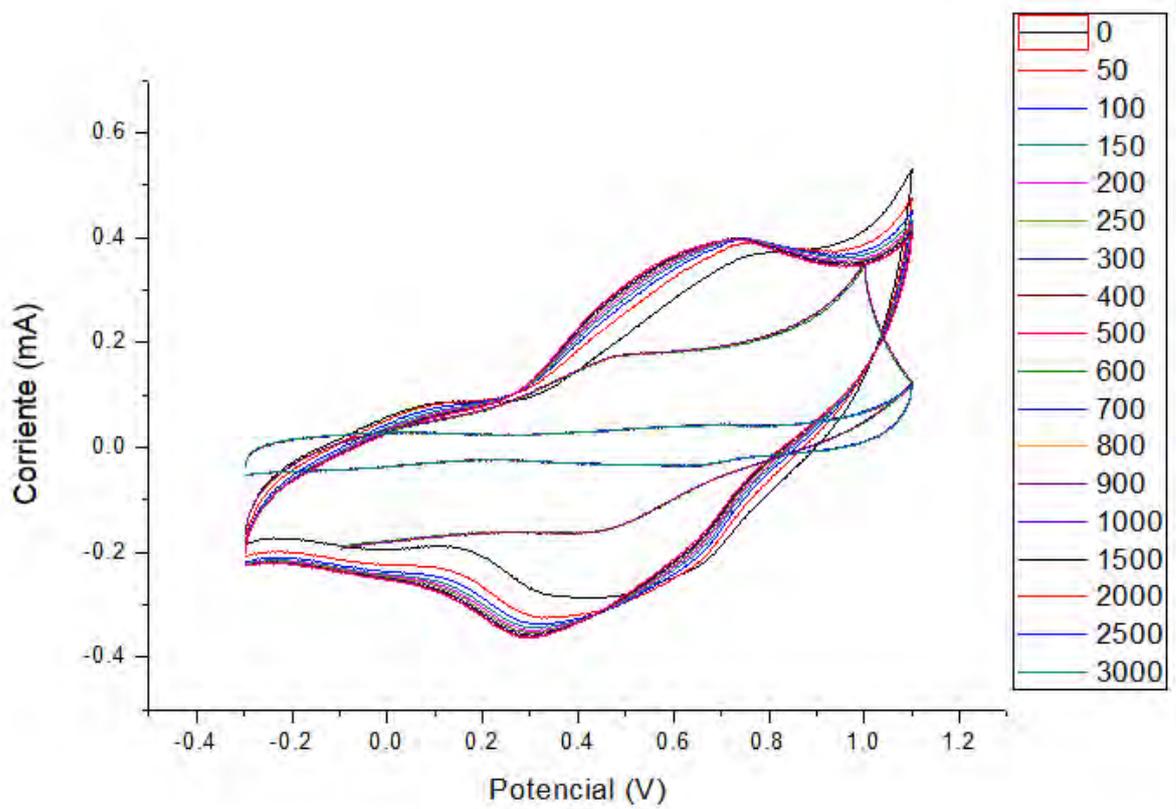


Figura 51. Respuesta de voltimetría cíclica de $\text{TiO}_2\text{-Ni}5\%\text{-Glut-Enzima}$ a glucosa.

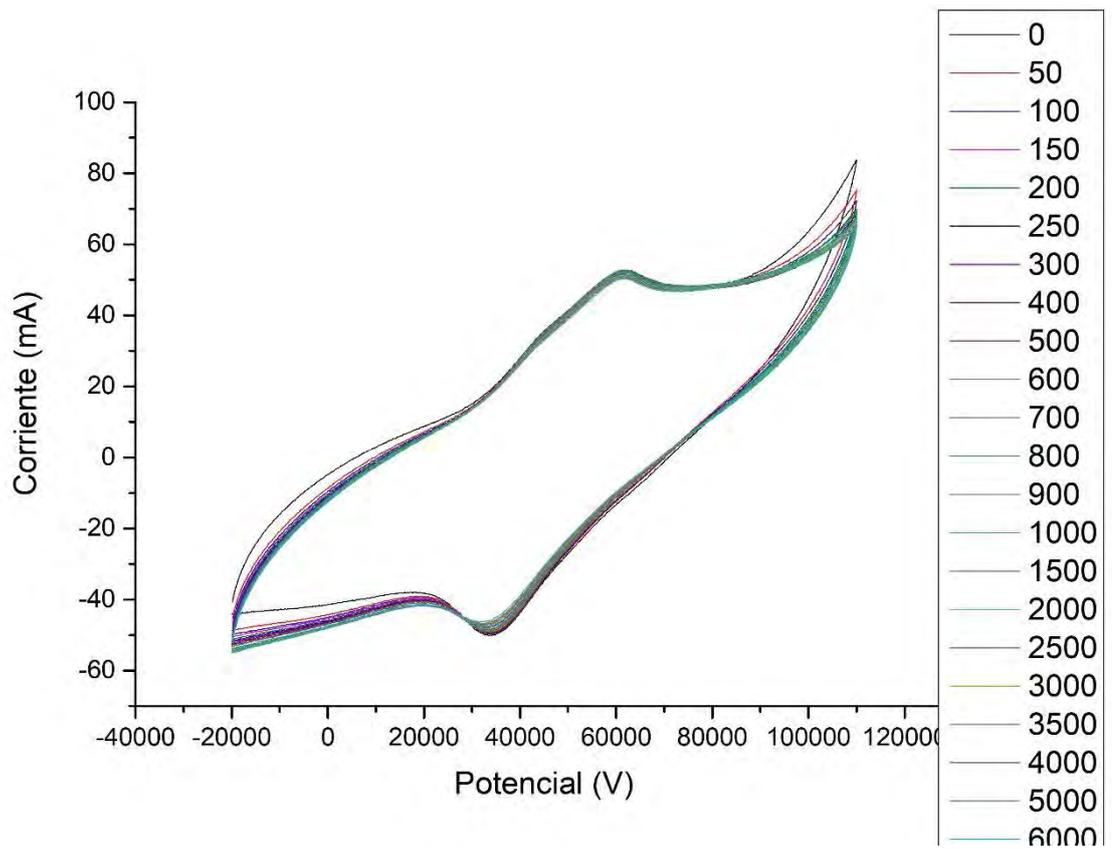


Figura 52. Respuesta de voltimetría cíclica de $\text{TiO}_2\text{-Ni}10\%\text{-Glut-Enzima}$ a glucosa.

El biosensor de $\text{TiO}_2\text{-Ni}10\%$ presentó respuesta más intensa en amperaje que los demás biosensores, indicando que permite un mayor paso de carga eléctrica. Los biosensores TiO_2 y TiO_2 dopado al 2, 5 y 10%w con Ni, mostraron una sensibilidad 1.040339299, 0.534533999, 0.1806805, 0.625224599 mA/mMol respectivamente.

CAPÍTULO VI CONCLUSIÓN

La síntesis y dopaje del TiO_2 con Ni (2, 5 y 10 %w) fue exitosa ya que se observó que las fases presentes en las muestras independientemente del contenido de Ni fue anatasa y conforme aumentó el porcentaje de níquel en peso, se evidenció la presencia de la fase titanato de níquel lo cual fue corroborado a través de las técnicas de caracterización de difracción de rayos X, espectroscopia de Infrarrojo, espectroscopia RAMAN y reflectancia difusa.

Con la síntesis obtenida del TiO_2 y TiO_2 dopado con níquel se obtuvieron nanoestructuras en la cual se pudo inmovilizar la enzima glucosa oxidasa, lo cuál fue observado en la pruebas de voltimetría cíclica con una solución redox. Una vez observada la respuesta de oxidación y reducción.

Las pruebas electroquímicas indicaron que el material sintetizado presenta baja resistencia a paso de electrones y que tanto los soles como la enzima inmovilizada si presentan respuesta electroquímica como se comprobó con la voltimetría cíclica en solución redox. Los electrodos fueron sensibles y capaces de responder a las alícuotas añadidas de glucosa, siendo el electrodo con película de TiO_2 el que mostró mayor sensibilidad, sin embargo, el electrodo de TiO_2 dopado al 10% fue el que mostró respuesta con mayor transferencia de carga.

CAPÍTULO VII REFERENCIAS

Chou, J. C., Huang, M. S., Liao, Y. H., Lai, C. H., Chen, J. S., Chou, H. T., & Hsu, C. C. (2016). Fabrication of the enzymatic glucose biosensor based on indium gallium zinc oxide sensing electrode. *Materials Letters*, 176, 94-96.

Wang, X., Kim, S. B., Khang, D., Kim, H. H., & Kim, C. J. (2016). Optimization and characterization of covalent immobilization of glucose oxidase for bioelectronic devices. *Biochemical engineering journal*, 112, 20-31.

Choi, H. N., Kim, M. A., & Lee, W. Y. (2005). Amperometric glucose biosensor based on sol-gel-derived metal oxide/Nafion composite films. *Analytica Chimica Acta*, 537(1-2), 179-187.

Rafighi, P., Tavahodi, M., & Haghghi, B. (2016). Fabrication of a third-generation glucose biosensor using graphene-polyethyleneimine-gold nanoparticles hybrid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 232, 454-461.

Raymundo-Pereira, P. A., Shimizu, F. M., Coelho, D., Piazzeta, M. H., Gobbi, A. L., Machado, S. A., & Oliveira Jr, O. N. (2016). A nanostructured bifunctional platform for sensing of glucose biomarker in artificial saliva: Synergy in hybrid Pt/Au surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 369-376.

Jaime, J., Rangel, G., Muñoz-Bonilla, A., Mayoral, A., & Herrasti, P. (2017). Magnetite as a platform material in the detection of glucose, ethanol and cholesterol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 238, 693-701.

Munje, R. D., Muthukumar, S., & Prasad, S. (2017). Lancet-free and label-free diagnostics of glucose in sweat using Zinc Oxide based flexible bioelectronics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 238, 482-490.

Huang, J., Li, M., Zhang, P., Zhang, P., & Ding, L. (2016). Temperature controlling fiber optic glucose sensor based on hydrogel-immobilized GOD complex. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 237, 24-29.

Alsufyani, T., & Fadlallah, S. A. (2017). Detection of glucose in the growth media of *Ulva lactuca* using a Ni-Cu/TiO₂/Ti self-assembly nanostructure sensor under the influence of crude oil. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 14, 7-16.

Kaushik, A., Khan, R., Solanki, P. R., Pandey, P., Alam, J., Ahmad, S., & Malhotra, B. D. (2008). Iron oxide nanoparticles-chitosan composite based glucose biosensor. *Biosensors and bioelectronics*, 24(4), 676-683.

Guisseppi-Elie, A., Choi, S. H., & Geckeler, K. E. (2009). Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 118-123.

Mascagni, D. B. T., Miyazaki, C. M., da Cruz, N. C., de Moraes, M. L., Riul Jr, A., & Ferreira, M. (2016). Layer-by-layer assembly of functionalized reduced graphene oxide for direct electrochemistry and glucose detection. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 739-745.

Mao, W., Cai, B., Ye, Z., & Huang, J. (2018). A nanostructured p-NiO/n-Bi₄Ti₃O₁₂ heterojunction for direct GOx electrochemistry and high-sensitivity glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 261, 385-391.

Nguyen, N. D., Van Nguyen, T., Chu, A. D., Tran, H. V., Tran, L. T., & Huynh, C. D. (2018). A label-free colorimetric sensor based on silver nanoparticles directed to hydrogen peroxide and glucose. *Arabian Journal of Chemistry*.

Zhang, X., Lu, B., Li, R., Fan, C., Liang, Z., & Han, P. (2015). Structural, electronic and optical properties of Ilmenite ATiO₃ (A= Fe, Co, Ni). *Materials Science in Semiconductor Processing*, 39, 6-16.

Cuadros-Moreno, A., Pimentel, R. C., Martínez, E. S. M., & Fernandez, J. Y. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), 14.

Liu, X., Hu, Q., Wu, Q., Zhang, W., Fang, Z., & Xie, Q. (2009). Aligned ZnO nanorods: a useful film to fabricate amperometric glucose biosensor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 154-158.

Zang, J., Li, C. M., Cui, X., Wang, J., Sun, X., Dong, H., & Sun, C. Q. (2007). Tailoring zinc oxide nanowires for high performance amperometric glucose sensor. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 19(9), 1008-1014.

Yang, H., & Zhu, Y. (2006). Size dependence of SiO₂ particles enhanced glucose biosensor. *Talanta*, 68(3), 569-574.

Basu, S., Kang, W. P., Davidson, J. L., Choi, B. K., Bonds, A. B., & Cliffel, D. E. (2006). Electrochemical sensing using nanodiamond microprobe. *Diamond and related materials*, 15(2-3), 269-274.

Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J. F., & Willner, I. (2003). "Plugging into enzymes": Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. *Science*, 299(5614), 1877-1881.

Liu, S., & Ju, H. (2003). Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(3), 177-183.

Shervedani, R. K., Mehrjardi, A. H., & Zamiri, N. (2006). A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor. *Bioelectrochemistry*, 69(2), 201-208.

Zhang, Y., Yang, Y., Xiao, P., Zhang, X., Lu, L., & Li, L. (2009). Preparation of Ni nanoparticle-TiO₂ nanotube composite by pulse electrodeposition. *Materials Letters*, 63(28), 2429-2431.

Sousa, C. P., Polo, A. S., Torresi, R. M., de Torresi, S. I. C., & Alves, W. A. (2010). Chemical modification of a nanocrystalline TiO₂ film for efficient electric connection of glucose oxidase. *Journal of colloid and interface science*, 346(2), 442-447.

Zhang, T., Tian, B., Kong, J., Yang, P., & Liu, B. (2003). A sensitive mediator-free tyrosinase biosensor based on an inorganic–organic hybrid titania sol–gel matrix. *Analytica Chimica Acta*, 489(2), 199-206.

Watson, S., Beydoun, D., Scott, J., & Amal, R. (2004). Preparation of nanosized crystalline TiO₂ particles at low temperature for photocatalysis. *Journal of Nanoparticle Research*, 6(2), 193-207.

Porkodi, K., & Arokiamary, S. D. (2007). Synthesis and spectroscopic characterization of nanostructured anatase titania: A photocatalyst. *Materials Characterization*, 58(6), 495-503.

Wang, J. (1999). Sol–gel materials for electrochemical biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 399(1-2), 21-27.

Tsai, Y. C., & Chiu, C. C. (2007). Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125(1), 10-16.

Tortolini, C., Rea, S., Carota, E., Cannistraro, S., & Mazzei, F. (2012). Influence of the immobilization procedures on the electroanalytical performances of *Trametes versicolor* laccase based bioelectrode. *Microchemical Journal*, 100, 8-13.

Quan, D., Kim, Y., & Shin, W. (2004). Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 561, 181-189.

Romero-Arcos, M., Garnica-Romo, M. G., Martínez-Flores, H. E., Vázquez-Marrufo, G., Ramírez-Bon, R., González-Hernández, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2016). Enzyme immobilization by amperometric biosensors with tio₂ nanoparticles used to detect phenol compounds. *Food Engineering Reviews*, 8(2), 235-250.

Bashiri, R., Norani, M. M., Kait, C. F., & Sufian, S. (2014). Study on Synthesis and Characterization of Cu-Ni Doped TiO₂ by Sol-Gel Hydrothermal. In *Advanced Materials Research* (Vol. 925, pp. 248-252). Trans Tech Publications.

Ganesh, I., Gupta, A. K., Kumar, P. P., Sekhar, P. S. C., Radha, K., Padmanabham, G., & Sundararajan, G. (2012). Preparation and characterization of Ni-doped TiO₂ materials for photocurrent and photocatalytic applications. *The Scientific World Journal*, 2012.

Ganesh, I., Kumar, P. P., Annapoorna, I., Sumliner, J. M., Ramakrishna, M., Hebalkar, N. Y., Padmanabham, G. & Sundararajan, G. (2014). Preparation and characterization of Cu-doped TiO₂ materials for electrochemical, photoelectrochemical, and photocatalytic applications. *Applied Surface Science*, 293, 229-247.

Tanaka, S., Kaneti, Y. V., Bhattacharjee, R., Islam, M. N., Nakahata, R., Abdullah, N., Yusa, S., Nguyen, N., Shiddiky, M. J. A., Yamauchi, Y. & Hossain, M. S. A. (2017). Mesoporous Iron Oxide Synthesized Using Poly (styrene-b-acrylic acid-b-ethylene glycol) Block Copolymer Micelles as Templates for Colorimetric and

Electrochemical Detection of Glucose. *ACS applied materials & interfaces*, 10(1), 1039-1049.

Salehnia, F., Hosseini, M., & Ganjali, M. R. (2018). Enhanced electrochemiluminescence of luminol by an in situ silver nanoparticle-decorated graphene dot for glucose analysis. *Analytical Methods*, 10(5), 508-514.

Gao, Z. D., Qu, Y., Li, T., Shrestha, N. K., & Song, Y. Y. (2014). Development of amperometric glucose biosensor based on Prussian Blue functionalized TiO₂ nanotube arrays. *Scientific reports*, 4, 6891.

Kim, M. A., & Lee, W. Y. (2003). Amperometric phenol biosensor based on sol-gel silicate/Nafion composite film. *Analytica Chimica Acta*, 479(2), 143-150.

Sapountzi, E., Braiek, M., Vocanson, F., Chateaux, J. F., Jaffrezic-Renault, N., & Lagarde, F. (2017). Gold nanoparticles assembly on electrospun poly (vinyl alcohol)/poly (ethyleneimine)/glucose oxidase nanofibers for ultrasensitive electrochemical glucose biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 238, 392-401.

Montañez, J. L., Ramos, E. G., Alegret, S., & Delgado, R. J. (2011). Biosensor de glucosa basado en un biocompósito disperso de grafito-epoxi-platino-glucosa oxidasa. *Información tecnológica*, 22(1), 29-40.

Rahman, M. M., Ahammad, A. J., Jin, J. H., Ahn, S. J., & Lee, J. J. (2010). A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. *Sensors*, 10(5), 4855-4886.

Olarte, O., Chilo, J., Pelegri-Sebastia, J., Barbe, K., & Van Moer, W. (2013, July). Glucose detection in human sweat using an electronic nose. In *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2013 35th Annual International Conference of the IEEE*(pp. 1462-1465). IEEE.

Dudchenko, O. Y., Pyeshkova, V. M., Soldatkin, O. O., Akata, B., Kasap, B. O., Soldatkin, A. P., & Dzyadevych, S. V. (2016). Development of silicalite/glucose oxidase-based biosensor and its application for glucose determination in juices and nectars. *Nanoscale research letters*, 11(1), 59.

Hatada, M., Loew, N., Inose-Takahashi, Y., Okuda-Shimazaki, J., Tsugawa, W., Mulchandani, A., & Sode, K. (2018). Development of a glucose sensor employing quick and easy modification method with mediator for altering electron acceptor preference. *Bioelectrochemistry*, 121, 185-190.

Gao, Z. D., Guo, J., Shrestha, N. K., Hahn, R., Song, Y. Y., & Schmuki, P. (2013). Nickel Hydroxide Nanoparticle Activated Semi-metallic TiO₂ Nanotube Arrays for Non-enzymatic Glucose Sensing. *Chemistry—A European Journal*, 19(46), 15530-15534.

Guo, C., Huo, H., Han, X., Xu, C., & Li, H. (2013). Ni/CdS bifunctional Ti@ TiO₂ core-shell nanowire electrode for high-performance nonenzymatic glucose sensing. *Analytical chemistry*, 86(1), 876-883.

Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews*, 108(2), 814-825.

Ansari, A. A., Alhoshan, M., Alsalhi, M. S., & Aldwayyan, A. S. (2010). Nanostructured metal oxides based enzymatic electrochemical biosensors. In *Biosensors*. InTech.

Ranjitha, A., Muthukumarasamy, N., Thambidurai, M., Velauthapillai, D., Balasundaraprabhu, R., & Agilan, S. (2014). Fabrication of Ni-doped TiO₂ thin film photoelectrode for solar cells. *Solar Energy*, 106, 159-165.

Wang, G., Thai, N. M., & Yau, S. T. (2006). Preserved enzymatic activity of glucose oxidase immobilized on an unmodified electrode. *Electrochemistry communications*, 8(6), 987-992.

Mohamed, N. M., Bashiri, R., Chong, F. K., Sufian, S., & Kakooei, S. (2015). Photoelectrochemical behavior of bimetallic Cu–Ni and monometallic Cu, Ni doped TiO₂ for hydrogen production. *international journal of hydrogen energy*, 40(40), 14031-14038.

López, G. M. A., & Ortiz de Apodaca, F. O. (2002). Inmunosensores: herramientas analíticas con un gran potencial de futuro. *Schironia*, 1, 51-59.

Gatti, P. S. Electroodos para medir Glucosa (Junio 2004).

De Luca, P., Lepore, M., Portaccio, M., Esposito, R., Rossi, S., Bencivenga, U., & Mita, D. G. (2007). Glucose determination by means of steady-state and time-course UV fluorescence in free or immobilized glucose oxidase. *Sensors*, 7(11), 2612-2625.

Sysoev, V. V., Button, B. K., Wepsiec, K., Dmitriev, S., & Kolmakov, A. (2006). Toward the nanoscopic “electronic nose”: Hydrogen vs carbon monoxide discrimination with an array of individual metal oxide nano- and mesowire sensors. *Nano letters*, 6(8), 1584-1588.

Harper, A., & Anderson, M. R. (2010). Electrochemical glucose sensors—developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction. *Sensors*, 10(9), 8248-8274.

Dominguez, R. B., Orozco, M. A., Chávez, G., & Márquez-Lucero, A. (2017). The Evaluation of a Low-Cost Colorimeter for Glucose Detection in Salivary Samples. *Sensors*, 17(11), 2495.

Sedrati, H., Bensaha, R., Bensouyad, H., Miska, P., & Robert, S. (2014). Structural, optical and waveguiding properties improvement of SiO₂/TiO₂ Bragg reflectors processed by the sol–gel method under the effect of Ni-doped TiO₂ and annealing duration. *Materials Research Bulletin*, 57, 287-292.

Ziller, C., Lin, J., Knittel, P., Friedrich, L., Andronescu, C., Pöller, S., Schuhmann, W. & Kranz, C. (2017). Poly (benzoxazine) as an immobilization matrix for miniaturized ATP and glucose biosensors. *ChemElectroChem*, 4(4), 864-871.

- Yoo, E. H., & Lee, S. Y. (2010). Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors*, *10*(5), 4558-4576.
- Tortolini, C., Rea, S., Carota, E., Cannistraro, S., & Mazzei, F. (2012). Influence of the immobilization procedures on the electroanalytical performances of *Trametes versicolor* laccase based bioelectrode. *Microchemical Journal*, *100*, 8-13.
- Vijayalakshmi, K., & Monamary, A. (2016). Novel hydrogen sensor based on p-type Ni: TiO₂ nanorods fabricated on ITO substrate. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, *27*(1), 140-145.
- Wang, C., Yin, L., Zhang, L., & Gao, R. (2010). Ti/TiO₂ nanotube array/Ni composite electrodes for nonenzymatic amperometric glucose sensing. *The Journal of Physical Chemistry C*, *114*(10), 4408-4413.
- Tahir, A. A., Mazhar, M., Hamid, M., Wijayantha, K. U., & Molloy, K. C. (2009). Photooxidation of water by NiTiO₃ deposited from single source precursor [Ni₂Ti₂(OEt)₂(μ-OEt)₆(acac)₄] by AACVD. *Dalton Transactions*, (19), 3674-3680.
- Mahshid, S., Askari, M., & Ghamsari, M. S. (2007). Synthesis of TiO₂ nanoparticles by hydrolysis and peptization of titanium isopropoxide solution. *Journal of Materials Processing Technology*, *189*(1-3), 296-300.
- Ganesh, I. (2017). Effects of phosphorus-doping on energy band-gap, structural, surface, and photocatalytic characteristics of emulsion-based sol-gel derived TiO₂ nano-powder. *Applied Surface Science*, *414*, 277-291.
- Mi, L., Huang, Y., Qin, L., & Seo, H. J. (2018). Improved photo-degradation of dyes over Ag-loaded NiTiO₃: V nanorods on visible-light-irradiation. *Materials Research Bulletin*, *102*, 269-276.
- Dong, X., Sun, Z., Jiang, L., Li, C., & Zheng, S. (2017). Investigation on the film-coating mechanism of alumina-coated rutile TiO₂ and its dispersion stability. *Advanced Powder Technology*, *28*(8), 1982-1988.
- Lopes, K. P., Cavalcante, L. S., Simões, A. Z., Gonçalves, R. F., Escote, M. T., Varela, J. A., Longo, E. & Leite, E. R. (2008). NiTiO₃ nanoparticles encapsulated with SiO₂ prepared by sol-gel method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, *45*(2), 151-155.
- Budhi, S., Wu, C. M., Zhao, D., & Koodali, R. T. (2015). Investigation of Room Temperature Synthesis of Titanium Dioxide Nanoclusters Dispersed on Cubic MCM-48 Mesoporous Materials. *Catalysts*, *5*(3), 1603-1621.
- Chuang, S. H., Hsieh, M. L., & Wang, D. Y. (2012). Structure and Dielectric Properties of NiTiO₃ Powders Synthesized by the Modified Sol-Gel Method. *Journal of the Chinese Chemical Society*, *59*(5), 628-632.
- Alphonse, P., Varghese, A., & Tendero, C. (2010). Stable hydrosols for TiO₂ coatings. *Journal of sol-gel science and technology*, *56*(3), 250-263.
- Teimouri, M., Aberoomand, P., Moradi, S., Zhalechin, M., & Piramoon, S. (2012, March). Synthesis of Nickel-doped TiO₂ nano crystalline by the sol-gel method and

influence of ultrasonic irradiation for the photo catalytic degradation of Tartrazine dye. In *Proceedings of the 4th International Conference on Nanostructures (ICNS 4)* (pp. 994-995).

Hermawan, P., Pranowo, H. D., & Kartini, I. (2011). Physical characterization of Ni (II) doped TiO₂ nanocrystal by sol-gel process. *Indonesian Journal of Chemistry*, 11(2), 135-139.

Varga, T., Droubay, T. C., Bowden, M. E., Nachimuthu, P., Shutthanandan, V., Bolin, T. B., Shelton, W. A. & Chambers, S. A. (2012). Epitaxial growth of NiTiO₃ with a distorted ilmenite structure. *Thin Solid Films*, 520(17), 5534-5541.

Chuang, S. H., Hsieh, M. L., Wu, S. C., Lin, H. C., Chao, T. S., & Hou, T. H. (2011). Fabrication and Characterization of High-k Dielectric Nickel Titanate Thin Films Using a Modified Sol-Gel Method. *Journal of the American ceramic society*, 94(1), 250-254.

Chuang, C. C., Lin, C. K., Wang, T. T., Srinivasadesikan, V., Raghunath, P., & Lin, M. C. (2015). Computational and experimental studies on the effect of hydrogenation of Ni-doped TiO₂ anatase nanoparticles for the application of water splitting. *RSC Advances*, 5(99), 81371-81377.

Lakhera, S. K., Hafeez, H. Y., Veluswamy, P., Ganesh, V., Khan, A., Ikeda, H., & Neppolian, B. (2018). Enhanced photocatalytic degradation and hydrogen production activity of in situ grown TiO₂ coupled NiTiO₃ nanocomposites. *Applied Surface Science*, 449, 790-798.

Ruiz-Preciado, M. A., Kassiba, A., Gibaud, A., & Morales-Acevedo, A. (2015). Comparison of nickel titanate (NiTiO₃) powders synthesized by sol-gel and solid state reaction. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 37, 171-178.

Lerch, M., Boysen, H., Neder, R., Frey, F., & Laqua, W. (1992). Neutron scattering investigation of the high temperature phase transition in NiTiO₃. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 53(9), 1153-1156.

Li, X., Yao, J., Liu, F., He, H., Zhou, M., Mao, N., Xiao, P. & Zhang, Y. (2013). Nickel/Copper nanoparticles modified TiO₂ nanotubes for non-enzymatic glucose biosensors. *Sensors and actuators B: Chemical*, 181, 501-508.

Al-Shabander, B. M., & AL-Ajaj, E. A. (2016). Study the photocatalytic behavior of TiO₂ nanoparticles doped with Ni synthesized by sol-gel method. *International journal of applications or innovation in engineering & management*, vol. 5, issue 2.

Jensen, S., & Kilin, D. S. (2015). Electronic properties of nickel-doped TiO₂ anatase. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 27(13), 134207.

Modak, M., Pal, N., Mondal, S., Sardar, M., & Banerjee, S. (2018). Magnetic behavior of nanostructured NiTiO₃ and NiO material: Anomalous increase in coercivity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 448, 221-227.

- Pal, N., Saha, B., Kundu, S. K., Bhaumik, A., & Banerjee, S. (2015). A highly efficient non-enzymatic glucose biosensor based on a nanostructured NiTiO₃/NiO material. *New Journal of Chemistry*, 39(10), 8035-8043.
- Jaramillo, J., Garzón, B. A., & Mejía, L. T. (2016, February). Influence of the pH of the synthesis using sol-gel method on the structural and optical properties of TiO₂. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 687, No. 1, p. 012099). IOP Publishing.
- Boudjellal, L., Belhadi, A., Brahimi, R., Boumaza, S., & Trari, M. (2018). Physical and photoelectrochemical properties of the ilmenite NiTiO₃ prepared by wet chemical method and its application for O₂ evolution under visible light. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 75, 247-252.
- Qiao, H., Wei, Z., Yang, H., Zhu, L., & Yan, X. (2009). Preparation and characterization of NiO nanoparticles by anodic arc plasma method. *Journal of Nanomaterials*, 2009, 2.
- Wan, Y., Xu, Z., Chao, W., & Zhang, J. (2013). Sol-gel derived nickel-doped TiO₂ films as wear protection coatings. *Journal of Experimental Nanoscience*, 8(5), 782-787.
- Phani, A. R., & Santucci, S. (2001). Structural characterization of nickel titanium oxide synthesized by sol-gel spin coating technique. *Thin Solid Films*, 396(1-2), 1-4.
- Hernández Enríquez, J. M., García Serrano, L. A., Zeifert Soares, B. H., García Alamilla, R., Zermeño Resendiz, B. B., Del Angel Sánchez, T., & Cueto Hernández, A. (2008). Síntesis y caracterización de nanopartículas de N-TiO₂-Anatasa. *Superficies y vacío*, 21(4), 1-5.
- Traistaru, G. A., Covaliu, C. I., Matei, V., Cursaru, D., & Jitaru, I. (2011). Synthesis and characterization of NiTiO₃ and NiFe₂O₄ as catalysts for toluene oxidation. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(3), 1257-1263.
- Esch, T. R., Gadaczek, I., & Bredow, T. (2014). Surface structures and thermodynamics of low-index of rutile, brookite and anatase—A comparative DFT study. *Applied Surface Science*, 288, 275-287.
- Torres Martínez, L. M., & Ruiz Gómez, M. A. (2011). Estudio de las propiedades estructurales, texturales y catalíticas de TiO₂ dopado con indio y níquel. *Ingenierías*, 14(53), 23-34.
- Chellasamy, V., & Thangadurai, P. (2017). Structural and electrochemical investigations of nanostructured NiTiO₃ in acidic environment. *Frontiers of Materials Science*, 11(2), 162-170.
- Aparicio Ceja, M. E., & Carbajal Arizaga, G. G. (2010). Utilidad de la difracción de rayos x en las nanociencias. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 3(2).

- Kharoubi, A., Bouaza, A., Benrabah, B., Ammari, A., & Khiali, A. (2015). Characterization of Ni-doped TiO₂ thin films deposited by dip-coating technique. *The European Physical Journal Applied Physics*, 72(3), 30301.
- Ochoa, Y., Ortegón, Y., Vargas, M., & Páez, J. R. (2009). Síntesis TiO₂, fase Anatasa, por el método Pechini. *Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales S*, 1(3), 931-937.
- Vega, M. P. B., Hinojosa-Reyes, M., Hernández-Ramírez, A., Mar, J. L. G., Rodríguez-González, V., & Hinojosa-Reyes, L. (2018). Visible light photocatalytic activity of sol-gel Ni-doped TiO₂ on p-arsanilic acid degradation. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 85(3), 723-731.
- Zhou, G. W., & Soo Kang, Y. (2006). Synthesis and characterization of the nickel titanate NiTiO₃ nanoparticles in CTAB micelle. *Journal of dispersion science and technology*, 27(5), 727-730.
- Beranek, R., & Kisch, H. (2008). Tuning the optical and photoelectrochemical properties of surface-modified TiO₂. *Photochemical & photobiological sciences*, 7(1), 40-48.
- Camargo Amado, R. J., Benavides-Guerrero, J., Basante-Romo, M., Rodríguez, J., & Gómez, F. (2011). Síntesis De Una Matriz Nanocerámica De TiO₂ Reforzada Con Nanotubos De Carbono Mediante El Proceso De Sol-Gel. *Revista Colombiana de Física*, 43(2), 490.
- Guzmán, A., Fernández, A., & Rodríguez, J. (2007). Estudio de las reacciones de hidrólisis y condensación del titanio en presencia de acetilacetona. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 31(121), 529-536.
- Nybacka, L. (2016). FTIR spectroscopy of glucose.
- Pecharromás, C., Gracia, F., Holgado, J. P., Ocana, M., González-Elipe, A. R., Bassas, J., Santiso, J. & Figueras, A. (2003). Determination of texture by infrared spectroscopy in titanium oxide-anatase thin films. *Journal of applied physics*, 93(8), 4634-4645.
- Grujić-Brojčin, M., Šćepanović, M. J., Dohčević-Mitrović, Z. D., Hinić, I., Matović, B., Stanišić, G., & Popović, Z. V. (2005). Infrared study of laser synthesized anatase TiO₂ nanopowders. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38(9), 1415.
- Nolan, N. T., Seery, M. K., & Pillai, S. C. (2009). Spectroscopic investigation of the anatase-to-rutile transformation of sol-gel-synthesized TiO₂ photocatalysts. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(36), 16151-16157.
- Jiang, K., Pham, T. T., Kang, S. G., Men, Y., & Shin, E. W. (2018). Modification of the structural properties of NiTiO₃ materials by transition metal dopants: The dopant size effect. *Journal of Alloys and Compounds*, 739, 393-400.
- Bellam, J. B., Ruiz-Preciado, M. A., Edely, M., Szade, J., Jouanneaux, A., & Kassiba, A. H. (2015). Visible-light photocatalytic activity of nitrogen-doped NiTiO₃ thin films prepared by a co-sputtering process. *RSC Advances*, 5(14), 10551-10559.

- Ruiz-Preciado, M. A., Bulou, A., Makowska-Janusik, M., Gibaud, A., Morales-Acevedo, A., & Kassiba, A. (2016). Nickel titanate (NiTiO₃) thin films: RF-sputtering synthesis and investigation of related features for photocatalysis. *CrystEngComm*, 18(18), 3229-3236.
- Tursun, R., Tan, J., Yu, Q., Su, Y., & Xiao, L. (2018). Effect of annealing temperature on the structural and solar heat shielding performance of NiTiO₃ nanopowder. *Solar Energy*, 159, 697-703.
- Cubeddu, R., Pifferi, A., Taroni, P., Torriceli, A., Valentini, G., Valero Ubierna, C., & Ruiz-Altisent, M. (1999). Aplicación de la espectroscopia de reflectancia difusa (TRR) láser a la medida de parámetros de calidad en frutas.
- Moghiminia, S., Farsi, H., & Raissi, H. (2014). Comparative optical and electrochemical studies of nanostructured NiTiO₃ and NiTiO₃-TiO₂ prepared by a low temperature modified Sol-Gel route. *Electrochimica Acta*, 132, 512-523.
- Campins Falcó, P., & Querol Piñón, F. M. (2012). Aplicaciones del uso de la técnica de espectroscopía de reflectancia difusa en química forense para la caracterización de autenticidad de los sellos de correos de España.
- Gao, A., Zhang, X., Peng, X., Wu, H., Bai, L., Jin, W., Wu, G., Hang, R. & Chu, P. K. (2016). In situ synthesis of Ni(OH)₂/TiO₂ composite film on NiTi alloy for non-enzymatic glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 232, 150-157.
- Mi, L., Huang, Y., Qin, L., & Seo, H. J. (2018). Improved photo-degradation of dyes over Ag-loaded NiTiO₃: V nanorods on visible-light-irradiation. *Materials Research Bulletin*, 102, 269-276.
- Xu, J., Xu, N., Zhang, X., Xu, P., Gao, B., Peng, X., Mooni, S., Li, Y., Fu, J. & Huo, K. (2017). Phase separation induced rhizobia-like Ni nanoparticles and TiO₂ nanowires composite arrays for enzyme-free glucose sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 244, 38-46.
- Gu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, B., & An, Y. (2015). Electrocatalytic glucose oxidation via hybrid nanomaterial catalyst of multi-wall TiO₂ nanotubes supported Ni(OH)₂ nanoparticles: Optimization of the loading level. *Electrochimica Acta*, 160, 263-270.
- Segura, B., Jiménez, F. N., & Giraldo, L. R. (2016). Prototipo de potenciostato con aplicaciones en procesos electroquímicos. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 10(19), 61-69.
- Huo, K., Li, Y., Chen, R., Gao, B., Peng, C., Zhang, W., Hu, L., Zhang, X. & Chu, P. K. (2015). Recyclable Non-Enzymatic Glucose Sensor Based on Ni/NiTiO₃/TiO₂ Nanotube Arrays. *ChemPlusChem*, 80(3), 576-582.
- Xu, J., Xu, N., Zhang, X., Gao, B., Zhang, B., Peng, X., Fu, J., Chu, P. K. & Huo, K. (2017). In situ fabrication of Ni nanoparticles on N-doped TiO₂ nanowire arrays by nitridation of NiTiO₃ for highly sensitive and enzyme-free glucose sensing. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(9), 1779-1786.

Gao, Z. D., Han, Y., Wang, Y., Xu, J., & Song, Y. Y. (2013). One-step to prepare self-organized nanoporous NiO/TiO₂ layers and its use in non-enzymatic glucose sensing. *Scientific reports*, 3, 3323.

Hou, J., Dong, G., Ye, Y., & Chen, V. (2014). Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. *Journal of Membrane Science*, 452, 229-240.

Sayilkan, F., ASİLTÜRK, M., Sayilkan, H., Önal, Y., Akarsu, M., & Arpaç, E. (2006). Characterization of TiO₂ Synthesized in Alcohol by a Sol-Gel Process: The Effects of Annealing Temperature and Acid Catalyst. *Turkish Journal of Chemistry*, 29(6), 697-706.

Kochana, J., Gala, A., Parczewski, A., & Adamski, J. (2008). Titania sol-gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(4), 1275-1281.

Habibi, M. H., & Nasr-Esfahani, M. (2007). Preparation, characterization and photocatalytic activity of a novel nanostructure composite film derived from nanopowder TiO₂ and sol-gel process using organic dispersant. *Dyes and pigments*, 75(3), 714-722.

Yu, J., & Ju, H. (2004). Pure Organic Phase Phenol Biosensor Based on Tyrosinase Entrapped in a Vapor Deposited Titania Sol-Gel Membrane. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 16(16), 1305-1310.

Mosquera, E., Rosas, N., Debut, A., & Guerrero, V. H. (2015). Síntesis y caracterización de nanopartículas de dióxido de titanio obtenidas por el método de sol-gel. *Revista Politécnica*, 36(3), 7.

Feijóo, J., Osorio, A. M., Bustamante, Á., Valladares, L. D. L. S., Castro, A., Carhuancho, M. H., & Aguirre, R. (2007). Caracterización del cerámico superconductor CaLaBaCu₃O_{7-δ} obtenido por el método Sol-Gel. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(4), 208-214.

Tonyushkina, K., & Nichols, J. H. (2009). Glucose meters: a review of technical challenges to obtaining accurate results. *Journal of diabetes science and technology*, 3(4), 971-980.

Romero-Arcos, M., Garnica-Romo, M. G., & Martínez-Flores, H. E. (2016). Electrochemical study and characterization of an amperometric biosensor based on the immobilization of laccase in a nanostructure of TiO₂ synthesized by the sol-gel method. *Materials*, 9(7), 543.

Gutiérrez, M. P., Castellanos, M. A., & Castellanos, M. A. (2011). Síntesis por el método sol-gel aplicado al estudio del polimorfismo en nanopartículas de TiO₂. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 4(1).

Ochoa, Y., Ortegón, Y., & Páez, J. E. R. (2010). Síntesis de TiO₂, fase anatasa, por el método solgel: estudio del efecto de la presencia de AcacH en el sistema. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (52), 29-40.

Brinker, C. J., & Scherer, G. W. (2013). *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. Academic press.

Vargas Urbano, M. A., Ochoa Muñoz, Y. H., Ortegón Fernández, Y., Mosquera, P., Rodríguez Páez, J. E., & Camargo Amado, R. J. (2011). Nanopartículas de TiO₂, fase anatasa, sintetizadas por métodos químicos. *Ingeniería Y Desarrollo*, 29(2).

Carrera-López, R., & Castillo-Cervantes, S. (2012). Effect of the phase composition and crystallite size of sol-gel TiO₂ nanoparticles on the acetaldehyde photodecomposition. *Superficies y vacío*, 25(2), 82-87.

Carrazón, J. M. P., & García, A. J. R. (2000). Biosensores electroquímicos: una herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario y clínico. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 2, pp. 5-15). Real Sociedad Española de Química.

Liu, J., & Li, G. (2000). Application of biosensors for diagnostic analysis and bioprocess monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 65(1-3), 26-31.

Sciarra-Gatti, P. (2004). Electrodo para medir glucosa XIII Seminarios de Ingeniería biomédica Junio 2004 1-5

Liu, Y., Wang, M., Zhao, F., Xu, Z., & Dong, S. (2005). The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(6), 984-988.

Torres-Ramirez, E. Mendez-Albores, A. (2014). Biosensores enzimáticos. *Revista digital Universitaria*, 15(12), 1-8

Keilin, D., & Hartree, E. F. (1952). Specificity of glucose oxidase (notatin). *Biochemical Journal*, 50(3), 331.

Espinoza-Jalapa, N.A., Cerón-Camacho, R., & Le Lagadec, R. (2009). Biosensores: enzimas y compuestos organometálicos para el bienestar. *Revista Materiales avanzados No.13*, Instituto de Química, UNAM 2009 27-32

Wang, J. (2005). Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 17(1), 7-14.

Bioquímica 3ª Edición Christopher K. Mathews, Kensal E. Van Holden y Kevin G. Ahern Editorial Pearson Página 438 y 439

Hausinger, R. P. (2013). *Biochemistry of nickel* (Vol. 12). Springer Science & Business Media.

Vollath, D. (2013). *Nanomaterials*. Wiley-Vch..

Holler, F. J., Skoog, D. A., & Crouch, S. R. 6.ª Edición. *Principios de Análisis Instrumental*. CENGAGE Learning.

Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). 3^a Edición. Bioquímica. Pearson Education. Páginas 438 y 439

NANO PARTICLE ANALYZER SZ-100 Instruction manual, CODE:GZ0000232997C

<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/PDBsum/cf/1cf3//chainA.jpg>

<https://qro.cinvestav.mx/~ceramics/hibridos.htm>