

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento Físicoquímica y Química Orgánica
Laboratorio CIPREX

**“ELECTROCATÁLISIS DE COMPUESTOS BIOLÓGICOS POR
MEDIADORES ENCAPSULADOS EN ELECTRODOS
MODIFICADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO”**

Memoria para optar al Título Profesional de Químico

PIA TAMARA ORTÚZAR SALAZAR

PROFESOR PATROCINANTE
Dr. Juan Arturo Squella Serrano

DIRECTORES DE MEMORIA
Dr. Juan Arturo Squella Serrano
Dr. Raúl Moscoso Cabello

Santiago, Chile 2018

RESUMEN

Los nanotubos de carbono (NTCs) han generado una enorme actividad en la mayoría de las áreas de la ciencia y la ingeniería debido a sus propiedades estructurales, mecánicas y electrónicas únicas. Entre las cuales incluyen alta estabilidad química y térmica, alta elasticidad y alta resistencia a la tracción. Estas propiedades hacen que los nanotubos sean ideales para el desarrollo de electrodos modificados con estas nanoestructuras.

Debido al pequeño tamaño y a su conductividad los NTCs también pueden considerarse como uno de los electrodos más pequeños. Se ha demostrado que tienen la capacidad de promover la transferencia de electrones siendo utilizados para fines electroanalíticos tales como el desarrollo de biosensores, impartiendo una fuerte actividad electrocatalítica a importantes biomoléculas. Su aplicación en métodos voltamétricos es especialmente favorable, pero también se emplean para la adsorción de diferentes analitos y en métodos de separación electroquímica.

La modificación directa de un electrodo con una dispersión de NTCs, presenta ventajas tales como el aumento del área superficial efectiva, la mejora en la transferencia de masa, el aumento de la sensibilidad del electrodo y en algunos casos la reducción de los sobrepotenciales. Así como también mejora la reversibilidad de los procesos electroquímicos. En esta tesis se han modificado electrodos con NTC y compuestos con grupos y estructuras tipo cumarinas.

Los nitrocompuestos se usan en productos farmacéuticos debido a su acción en organismos vivos donde a menudo están implicados en procesos de oxidación-reducción. Los principales usos farmacéuticos de este tipo de compuestos nitroaromáticos son como agentes antibacterianos, antiprotozoarios y anticancerosos. Como compuestos tóxicos y sospechosos de carcinogenicidad, los nitrobencenos liberados al medio ambiente representan una gran amenaza para la salud humana. La reducción del grupo nitro es un paso fundamental para la actividad biológica, debido a que se generan intermediarios altamente reactivos.

Las cumarinas son moléculas heterocíclicas orgánicas, conocidas como benzopironas. Tienen una amplia variedad de actividades biológicas, características anticancerígenas, Anti-VIH, anti-Alzheimer, antimicrobiana, antioxidante y antiviral. Las propiedades fotofísicas de los derivados cumarínicos están fuertemente relacionadas con la capacidad de donación de

electrones o de captura de electrones de los sustituyentes unidos a su núcleo y el grado de conjugación de las moléculas.

La nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), es una coenzima que se encuentra en todas las células vivas. Es útil para la detección electroenzimática de ciertos azúcares, alcoholes y aminoácidos. La oxidación electroquímica de NADH a la correspondiente forma oxidada (NAD^+) es de gran interés, debido a su papel como cofactor en muchas reacciones enzimáticas.

En intentos de reducir el sobrepotencial y pasivación del electrodo, ha surgido una preferencia general por los electrodos de carbono; y compuestos mediadores de transferencia de electrones, como quinonas, diaminas, ferroceno, fenazina y L-glutamato. Tales mediadores pueden estar presentes en solución o pueden ser inmovilizados sobre la superficie del electrodo. La reducción electroquímica de uno o más grupos nitro de un nitrocompuesto, genera el par redox nitroso-hidroxilamina (NO/NHOH) en el electrodo. Esta reacción se ha utilizado para la oxidación electrocatalítica de NADH.

Debido a los antecedentes anteriormente mencionados, en esta tesis se ha estudiado el efecto de los electrodos de carbono vítreo, recubiertos con NTC. Demostrando una detección amperométrica sensible, por parte de mediadores electroquímicos, con el objetivo de estudiar la oxidación de NADH.

En el presente trabajo se utilizan electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTC). Los electrodos fueron modificados con diversos nitrocompuestos y compuestos cumarínicos como posibles mediadores redox en la electro oxidación de NADH.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
Electrodos modificados con nanotubos de carbono	4
Compuestos nitroaromáticos	5
Compuestos cumarínicos	7
Electrodos modificados y su aplicación electrocatalítica	8
Detección electroquímica de NADH	9
2. OBJETIVO	12
2.1 OBJETIVO GENERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Reactivos y solventes	13
3.2. Equipos	14
3.3. Métodos	15
3.3.1. Preparación de soluciones	15
3.4. Desarrollo experimental	17
3.4.1. Dispersión de nanotubos de carbono	17
3.4.2. Preparación de electrodos con NTCs	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. Caracterización electroquímica de compuestos	20
4.2. Estabilidad de los compuestos en solución	27
4.3. Estudio de pH de los compuestos en electrodos GC-NTC	30
4.3.1 Estudio del pH con electrodos GC-NTC, medidos por VPD	38
4.4 Estabilidad de los compuestos encapsulados en los electrodos modificados	40
4.5 Efecto de la velocidad de barrido sobre los compuestos en electrodos GC-NTC	43
4.6 Determinación de la constante de transferencia heterogénea k_h ..	45
4.7 Caracterización electroquímica del NADH	50

4.8 Electrocatálisis de electrodos modificados con NTC y compuestos sobre NADH	51
4.9 Estudio de las señales a distintos tiempos de interacción en NADH	54
4.10 Determinación de la concentración mínima de mediador para electrocatálisis de NADH	59
4.11 Efecto de la concentración de NADH sobre el electrodo GC-NTC-Med	62
4.12 Determinación de la constante de velocidad k_s del NADH	64
4.13 Comportamiento de la corriente electrocatalítica del sistema GNTCC-Med-NADH.....	69
4.14 Electrocatálisis de electrodos modificados con NTC y diferentes nitrocompuestos sobre NADH	76
5. Conclusión.....	79
6. Bibliografía.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de diferentes alótropos de carbono: A) grafito; B) diamante; C) fullereno; D) nanotubo de carbono de pared simple; E) nanotubo de carbono de multipared; F) grafeno.	1
Figura 2. A) Formación esquemática de nanotubos de pared simple (SWNTC). B) Formación esquemática de nanotubos de multipared (MWNTC).....	2
Figura 3. Dispersión de MWNTC. A) Baja estabilidad de la dispersión de nanotubos. B) Dispersión estable de los nanotubos.....	3
Figura 4. Funcionalizaciones más comunes de los NTCs. A) Funcionalización de defectos. B) Funcionalización de flancos. C) Apilamiento π . D) Funcionalización no covalente. E) Funcionalización endoedical.....	3
Figura 5. Ejemplo de la estructura de un nitrocompuesto.	5
Figura 6. Ejemplo de la reducción del nitrobenzeno. A) Nitrobenzeno, B) Fenilhidroxilamina y C) Nitrosobenzeno.	6
Figura 7. Estructura química de 2h-cromen-2-ona (cumarina).....	7
Figura 8. Estructura y reacción electroquímica de NADH.	10
Figura 9. Metodología general para la modificación de un electrodo GC con nanotubos de carbono.	17
Figura 10. Metodología para la modificación por dipping de los electrodos con NTC.	18
Figura 11. Metodología para el estudio de electrocatálisis de NADH 1) Inmersión del electrodo GC-NTC en la solución de nitrocompuesto o cumarina en solvente. 2) Lavado del electrodo con abundante agua nano pura. 3) Cambio de celda del electrodo a una celda con NADH.....	19
Figura 12. Estructura química de los compuestos. 1) 1,4-Dinitrobenzeno (1,4-DNB). 2) 1,8-Dinitroantraquinona (1,8-DNA). 3) 3-acetil-7,8-dihidroxi-2H-chromen-2-ona (1-cum). 4) 7,8-dihidroxi-4-metil-2H-chromen-2-ona (5-cum). .	20
Figura 13. Voltamograma cíclico de los compuestos con electrodos GC buffer B-R 0,1 M pH 7.	21
Figura 14. Voltamograma cíclico de los compuestos con electrodos GC-NTC buffer B-R 0,1 M pH 7.	23
Figura 15. Voltamogramas cíclicos de los compuestos en electrodos GC-NTC en buffer B-R 0,1 M pH 7, con un grupo nitro reducido (línea continua) con los correspondientes pares redox aislados (línea discontinua).	26
Figura 16. Estudio de estabilidad de los nitrocompuestos en buffer B-R 0,1 M pH 7 con electrodos GC-NTC modificados con A) 1,4-DNB 1 mM. B) 1,8-DNA 0,3 mM.....	27
Figura 17. Estudio de estabilidad de las cumarinas en buffer B-R 0,1 M pH 7 con electrodos GC-NTC modificados con. A) 1-cum 1 mM B) 5-cum 1 mM.....	28

Figura 18. Voltamogramas cíclicos de los electrodos modificados con GC-NTC-1,4-DNB. Medido en una celda con buffer B-R 0,1 M a pHs 11, 7 y 2.	31
Figura 19. Voltamogramas cíclicos de electrodo modificado con NTC-1,8-DNA. Celda con buffer B-R 0,1 M a pHs 11, 7 y 2.	32
Figura 20. Voltamogramas cíclicos de electrodo modificado con NTC-1-cum. Celda con buffer B-R 0,1 M a pHs 11, 7 y 2.	33
Figura 21. Voltamogramas cíclicos de electrodo modificado con NTC-5-cum. Celda con buffer B-R 0,1 M a pHs 11, 7 y 2.	36
Figura 22. Estudio de pH de los nitrocompuestos y cumarinas en buffer B-R 0,1 M pH ajustado, con electrodos GC-NTC modificados con. A) 1,4-DNB 1 mM B) 1,8-DNA 0,3 mM. C) 1-cum 1 mM. D) 5-cum 1 mM.	38
Figura 23. Voltamograma cíclico y variación de corriente pico de reducción para los electrodos GC-NTC medido en buffer B-R pH 7, a distintos tiempos. A y A') 1,4-DNB. B y B') 1,8-DNA. C y C') 5-cum.	41
Figura 24. Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para los electrodos A) GC-NTC-1,4-DNB y B) GC-NTC-1,8-DNA, respectivamente, medidos en buffer B-R pH 7.	43
Figura 25. Voltamograma cíclico a distintas velocidades de barrido para los electrodos GC-NTC-5-cum medidos en buffer B-R pH 7.	44
Figura 26. Variación del potencial de pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido anódico y catódico. A) 1,4-DNB. B) 1,8-DNA. C) 5-cum.	46
Figura 27. Voltamograma cíclico del NADH sobre electrodo GC-NTC en buffer B-R 0,1 mM pH 7.	50
Figura 28. Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC-Mediador. En línea segmentada, el par redox hidroxilamina/nitroso para cada compuesto medido en buffer B-R 0,1 M pH 7. En línea continua, electrodos con par redox encapsulado en el electrodo (GC-NTC-Mediador) medido en una solución NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. A) Electrodo GC-NTC-1,4-DNB B) GC-NTC-1,8-DNA.	52
Figura 29. Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC-Mediador. En línea discontinua, sin NADH. En línea continua, en presencia de NADH. A) electrodo GC-NTC-1-cum. B) GC-NTC-5-cum.	53
Figura 30. Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC medido a distintos tiempos de interacción con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. A) 1,4-DNB. B) 1,8-DNA.	55
Figura 31. Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC-1-cum medido a distintos tiempos de interacción con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. ..	56
Figura 32. Voltamograma cíclico en electrodo GC-NTC. A) 1-cum. B) 1-cum con NADH.	57
Figura 33. Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC-5-cum medido a distintos tiempos de interacción con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. ..	58

Figura 34. Voltamograma de electrodos GC-NTC-Med modificados con distintas concentraciones de mediador a una concentración constante de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. A) 1,4-DNB. B) 1,8-DNA. C) 5-cum.....	60
Figura 35. Voltamograma cíclico a distintas concentraciones de NADH en buffer B-R 0,1 M pH 7 a una concentración fija de A) 1,4-DNB 2 mM y B) 1,8-DNA 0,1 mM, en electrodos GC-NTC.....	62
Figura 36. Voltamograma cíclico a distintas concentraciones de NADH en buffer B-R 0,1 M pH 7 a una concentración fija de A) 1-cum 0,3 mM y B) 5-cum 0,05 mM, en electrodos GC-NTC.....	63
Figura 37. Voltamograma cíclico del NADH sobre electrodo GC-NTC en buffer B-R 0,1 M pH 7, velocidad de barrido desde 50 mV hasta 1500 mV.	65
Figura 38. Relación entre el potencial de pico y la velocidad de barrido del NADH.....	65
Figura 39. Relación entre el potencial pico y el logaritmo natural de la velocidad de barrido del NADH.....	66
Figura 40. A) Relación entre el potencial pico y la velocidad de barrido del NADH, B) Relación entre el potencial pico y el logaritmo natural de la velocidad de barrido del NADH, para velocidad de barrido entre 200 mV y 500 mV.	66
Figura 41. Voltamograma cíclico del NADH sobre electrodo GC en buffer B-R 0,1 M pH 7, velocidad de barrido desde 50 mV hasta 1500 mV. A) Relación entre el potencial pico y la velocidad de barrido del NADH, B) Relación entre el potencial pico y el logaritmo natural de la velocidad de barrido del NADH, para velocidad de barrido entre 200 mV y 500 mV.	67
Figura 42. Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para electrodos GC-NTCM modificados con 1,8-DNA 0,3 mM en NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.	70
Figura 43. Voltamogramas cíclicos para electrodos GC-NTC modificado con A. A') 1,4-DNB 1 mM B. B') 1,8-DNA 0,3 mM C. C') 1-cum 1 mM D. D') 5-cum 1 mM. A', B', C' y D' medidos en celda con NADH 3 mM buffer B-R pH 7. A, B, C y D medido en celda con buffer B-R 0,1 M pH 7. $V = 100$ mV/s con 30 barridos consecutivos. Las flechas indican la disminución de las señales de mediador redox.....	73
Figura 44. Variación de las corrientes anódicas y catódicas de los voltamogramas de la figura 43. en rojo las corrientes de pico de oxidación (\square) y de reducción (\circ) del mediador en presencia de NADH. En negro las corrientes pico de oxidación (\blacksquare) y reducción (\bullet) del mediador en ausencia de NADH. A) 1,4-DNB 1 mM B) 1,8-DNA 0,3 mM C) 5-cum 1 mM.	74
Figura 45. Voltamograma cíclico de electrodo GC-NTC-1,4-DNB en NADH 3 mM buffer B-R 0,1 M pH 7.	76

Figura 46. Ilustración gráfica del proceso de electrocatálisis. **1.** Oxidación del mediador redox encapsulado en los electrodos GC-NTC. **2.** Reducción del mediador redox y Oxidación del NADH. **3.** Interfase solución/ zona de reacción. Proceso sin agitación..... 77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Potenciales de pico de las señales de reducción de los compuestos en estudio (señales I y II, Fig. 13 y 14) sobre GC y GC-NTC.	24
Tabla 2. Compuestos con sus respectivas tasas de decaimiento en $\mu\text{A/hr}$	29
Tabla 3. Variación del potencial de pico por unidad de pH.....	39
Tabla 4. Resultados obtenidos para la pendiente de la recta anódica y catódica, y su respectivo valor de α para los distintos compuestos.	47
Tabla 5. Resultados obtenidos para la pendiente de la recta anódica y catódica, y su respectivo valor de α para los distintos compuestos.	48
Tabla 6. Resultados obtenidos para la constante de transferencia anódica y catódica.	48
Tabla 7. Valores obtenidos del intercepto y la pendiente de la Fig. 40 y 41. A) , E° obtenido de la Fig. 40 y 41. B) , αn y k_s	68
Tabla 8. Relación entre el promedio de la corriente electrocatalítica (Med-NADH) y el promedio del triplicado de la corriente de pico de la señal de reducción del mediador a diferentes velocidades de barrido.	71
Tabla 9. Entre la velocidad de barrido y el porcentaje de corriente electrocatalítica.	71
Tabla 10. Resultados de las tasas de disminución de los compuestos en buffer B-R en presencia y en ausencia de NADH.	75
Tabla 11. Potencial de oxidación de NADH en presencia de los mediadores electro-químicos.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

1-cum: 3-acetil-7,8-dihidroxi-2H-chromen-2-ona

5-cum: 7,8-dihidroxi-4-metil-2H-chromen-2-ona

B-R: buffer Britton-Robinson

1,4-DNB: 1,4-dinitrobenceno

1,8-DNA: 1,8-dinitroantraquinona

Ep: Potencial de pico

GC: Electrodo de carbono vítreo (Glassy Carbon Electrode, GCE)

GC-NTC: Electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono

GC-NTC-Med: Electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono y mediador

ip: Corriente de pico

kh: Constante de transferencia heterogénea

Med: Mediador

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido en forma oxidada

NTC: Nanotubos de carbono

VC: Voltametría cíclica

VDP: Voltametría de pulso diferencial

SW: Nanotubos de carbono de pared simple

MWCNT: Nanotubos de carbono de multipared

1. INTRODUCCIÓN

Nanotubos de carbono

Desde su re-descubrimiento en 1991 [1], los nanotubos de carbono han generado una enorme actividad en la mayoría de las áreas de la ciencia y la ingeniería debido a sus propiedades estructurales, mecánicas y electrónicas únicas. Estas propiedades incluyen alta estabilidad química y térmica, alta elasticidad, alta resistencia a la tracción [2]. Ningún material anterior ha mostrado la combinación de propiedades mecánicas, térmicas y electrónicas superlativas que se les atribuyen. Estas propiedades hacen que los nanotubos sean ideales para una amplia gama de aplicaciones [3].

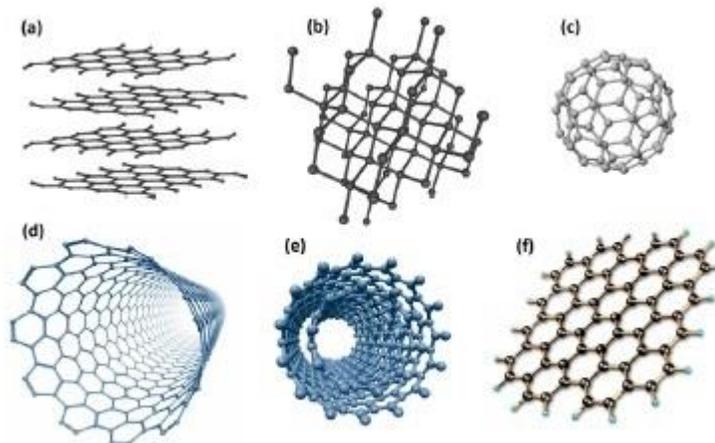


Figura 1. Representación esquemática de diferentes alótropos de carbono: **A)** grafito; **B)** diamante; **C)** fullereno; **D)** nanotubo de carbono de pared simple; **E)** nanotubo de carbono de multipared; **F)** grafeno.

Los nanotubos son alótropos (Fig. 1) del carbono (*carbon nanotubes*, CNTs), hay dos tipos principales de nanotubos. Los de una sola pared (*single walled carbon nanotubes*, SWCNT [4], Fig. 2 A) los cuales consisten esquemáticamente de una lámina de grafeno, envuelta sobre su eje formando un cilindro con extremos abiertos, con un diámetro entre 0,4 y 2 nm [2] y una longitud de hasta centímetros. Y los nanotubos de paredes múltiples (*multi walled carbon nanotubes*, MWCNT, Fig. 2 B) consisten esquemáticamente en múltiples capas concéntricas de grafeno formando varios tubos cilíndricos [5] y separados por 0,35 nm, similar a la separación del plano basal en grafito. Los

MWNTC pueden tener diámetros de 2 a 100 nm y longitudes de decenas de micras [3].

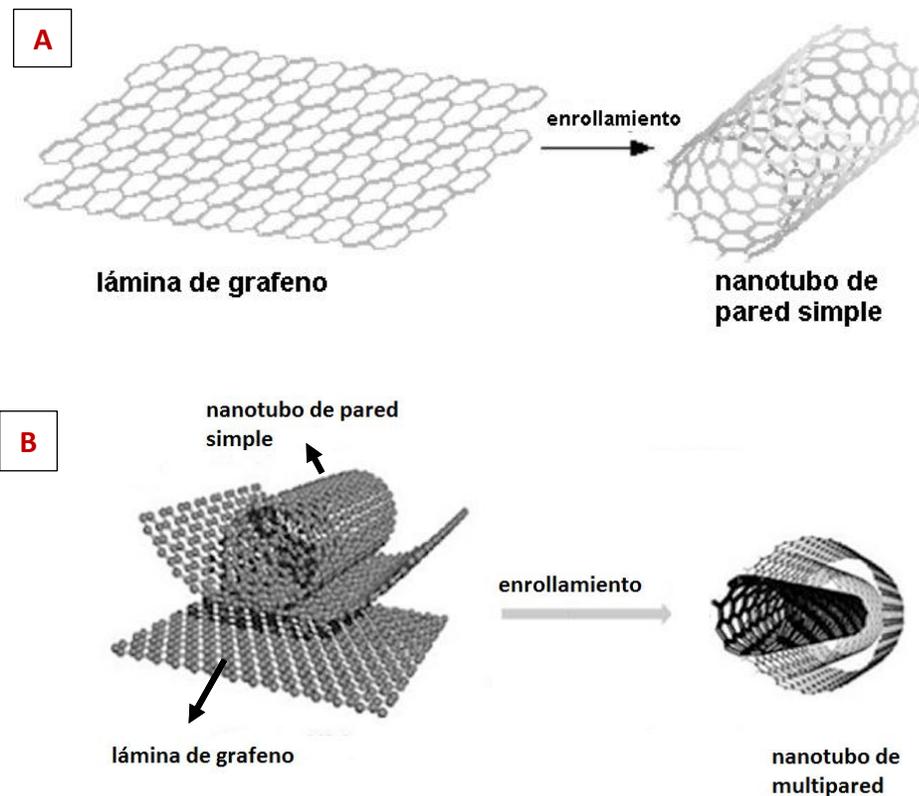


Figura 2. A) Formación esquemática de nanotubos de pared simple (SWCNT). **B)** Formación esquemática de nanotubos de multipared (MWCNT).

Una de las dificultades experimentales que tienen los nanotubos de carbono, es su insolubilidad en cualquier solvente, lo que dificulta su manipulación, haciendo necesario buscar solventes capaces de generar dispersiones de nanotubos, Fig. 3. Una de las posibilidades para mejorar la dispersión, puede ser agregar grupos funcionales por enlaces covalentes o favorecer las interacciones no covalentes con otras moléculas.



Figura 3. Dispersión de MWNTC. **A)** Baja estabilidad de la dispersión de nanotubos. **B)** Dispersión estable de los nanotubos.

Una de las características más importantes que tienen los materiales de carbono, es su estado de hibridación, que básicamente determina las características de la variedad de nanoestructura. Los fullerenos y los nanotubos de carbono pertenecen a una familia que no tienen hibridación sp^2 genuina debido a las superficies curvas con que están formados. En otras palabras, tienen la hibridación $sp^{2+\delta}$, un poco más cerca del sp^3 . Por otro lado, se considera que estos dos materiales poseen sistema de conjugación π [6]. Esta característica se ha mencionado como enlace- σ de hibridación debido a la mezcla de más orbitales atómicos 2s [7]. Esto permite incorporar a su estructura distintos grupos funcionales o favorecer interacciones no-covalentes con otras moléculas como (bio)polímeros, surfactantes, etc (figura 4).

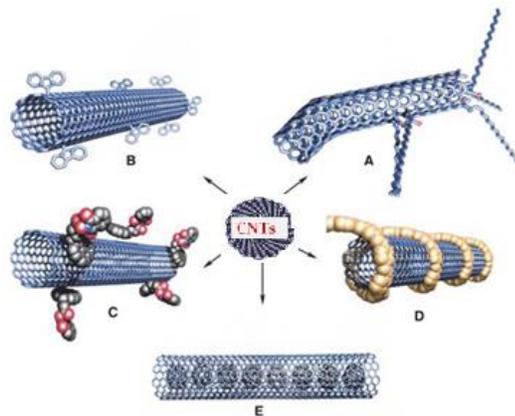


Figura 4. Funcionalizaciones más comunes de los NTCs. **A)** Funcionalización de defectos. **B)** Funcionalización de flancos. **C)** Apilamiento π . **D)** Funcionalización no covalente. **E)** Funcionalización endoedical.

Las paredes de NTC no son reactivas, pero la funcionalización (como, por ejemplo: formación de grupos carboxilos, aminas, entre otros) final de NTC ocurre en las puntas, las cuales son de tipo fullereno, siendo las más reactivas. Utilizándose con frecuencia para la generación de grupos funcionales (por ejemplo, -COOH, -OH o -C=O). La funcionalización del tipo no covalentes de los NTC puede basarse en interacciones débiles (por ejemplo, puente de hidrógeno, apilamiento de p-p, fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas). Esto se puede utilizar para unir pequeñas moléculas o moléculas bioquímicamente activas (por ejemplo, para la inmovilización de proteínas), o para envolver las cadenas de un polímero en la pared lateral de los NTCs [8].

Electrodos modificados con nanotubos de carbono

Debido a las propiedades eléctricas mencionadas anteriormente, en la última década el desarrollo de electrodos modificados se ha concentrado en el uso de nanoestructuras (Fig.1).

El pequeño tamaño y conductividad de los NTCs implica que también pueden considerarse como uno de los electrodos más pequeños. Se han fabricado electrodos macroscópicos modificando su superficie con NTC aleatoriamente dispersos. Se ha demostrado que los NTC tienen la capacidad de promover la transferencia de electrones siendo utilizados para fines electroanalíticos tales como el desarrollo de biosensores [8], impartiendo una fuerte actividad electrocatalítica a importantes biomoléculas [9-10]. Su aplicación en métodos voltamétricos es especialmente favorable, pero también se emplean para la adsorción de diferentes analitos y en métodos de separación electroquímica.

La modificación directa de un electrodo con una dispersión de NTCs representa un enorme atractivo. Hay cuatro ventajas principales para un electrodo modificado con nanotubos en comparación con uno sin modificar: aumenta el área superficial efectiva, mejora la transferencia de masa, aumenta la sensibilidad del electrodo y reduce sobrepotenciales (electrocatalisis) al aumentar el número de sitios activos [11-14].

Al trabajar con electrodos modificados con NTCs, mejora la reversibilidad de los procesos electroquímicos, como por ejemplo se ha podido observar para la dopamina y otros neurotransmisores [8].

En este trabajo se utilizan electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTC), con el objeto de evaluar diversos nitrocompuestos y compuestos cumarínicos como posibles mediadores redox [15].

Compuestos nitroaromáticos

Los nitrocompuestos (Fig. 5) se usan en productos farmacéuticos debido a su acción en organismos vivos donde a menudo están implicados en procesos de oxidación-reducción.

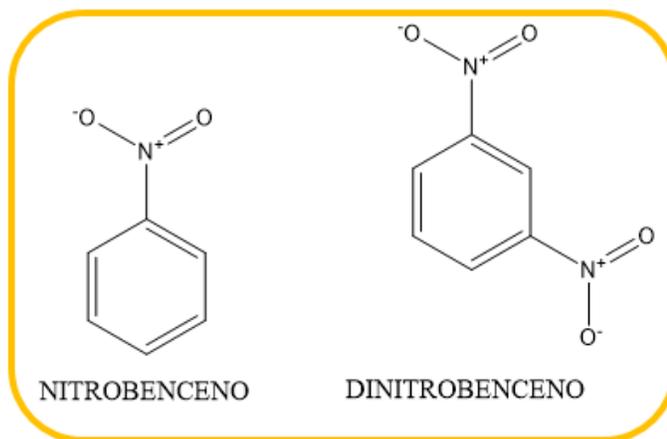


Figura 5. Ejemplo de la estructura de un nitrocompuesto.

Los principales usos farmacéuticos de este tipo de compuestos nitroaromáticos son como agentes antibacterianos, antiprotozoarios y anticancerosos [16]. Desde otro punto de vista no farmacéutico los nitro bencenos se presentan como compuestos tóxicos y sospechosos de carcinogenicidad, los nitrobencenos liberados al medio ambiente representan una gran amenaza para la salud humana. Incluso en concentraciones bajas, pueden presentar altos riesgos para el medio ambiente. La fuerte afinidad electrónica del grupo nitro reduce la densidad de la nube de electrones del anillo de benceno y hace que el nitrobenceno, por ejemplo, sea muy estable. Por lo tanto, el nitrobenceno está clasificado como un contaminante peligroso por muchos países. Además, esta

exhibe citotoxicidad en varios sistemas celulares, incluyendo mamíferos, protozoarios y células bacterianas [17].

La vía metabólica de los compuestos nitroaromáticos se basa en la generación del anión radical nitro ($R\text{-NO}_2^{\bullet-}$) a partir de una reacción de reducción de un electrón [16]. Los compuestos nitroaromáticos son a menudo aceptores de electrones debido a la baja densidad de la nube de electrones en su anillo de benceno por lo que la oxidación de los compuestos nitroaromáticos es muy difícil de conseguir, esto explica porque es un tipo de contaminante que se mantiene en el ambiente [17]. El uso de voltamperometría cíclica ha demostrado ser una herramienta importante para estudiar esta especie radical a partir de diferentes nitro-compuestos. En la figura 6 se muestra la ecuación de reducción del nitrobenceno, donde el paso de A a B es un proceso irreversible, y el paso B a C corresponde a un proceso reversible [16].

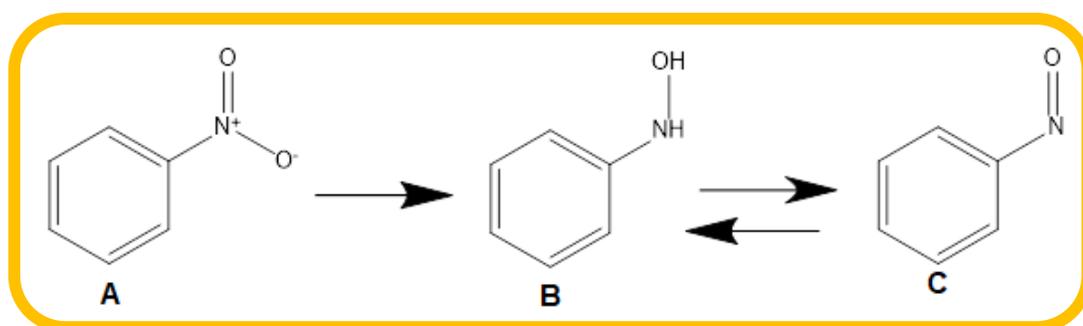
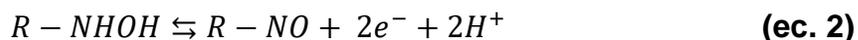
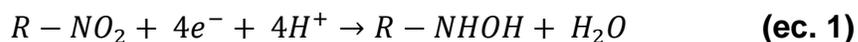


Figura 6. Ejemplo de la reducción del nitrobenceno. **A)** Nitrobenceno, **B)** Fenilhidroxilamina y **C)** Nitrosobenceno.

El mecanismo de reducción electroquímico de nitrocompuestos ha sido estudiado ampliamente. Se puede obtener una amplia variedad de productos de reacción cuando se hacen reducciones en medios próticos, pero en disolventes apróticos dipolares el único producto de reducción de un compuesto mononitro es el radical aniónico, que en muchos casos es una especie persistente que puede caracterizarse de diversas maneras [18].

La reducción de las moléculas que poseen dos grupos nitro ha aumentado la atención en los últimos años, debido a los efectos que se producen en la estabilización de aniones de radicales electrogenerados por la interacción de los grupos presentes en la estructura. La reducción de los compuestos dinitroaromáticos, es de forma similar a los mononitroaromáticos, por lo general también son seguidos por pasos de reacción química [19].

En solución acuosa, los compuestos nitroaromáticos estudiados en esta memoria se reducen a fenilhidroxilamina que implica la reducción vía cuatro electrones a todos los valores de pH (ecuación 1) [20]. La ecuación dos (ec.2) describe la oxidación de hidroxilamina a nitroso, proceso posterior que ocurre vía 2 electrones y dos protones para formar un derivado nitroso en un proceso reversible a hidroxilamina.



La electroquímica de compuestos nitroaromáticos ha sido ampliamente estudiada en solución y con electrodos convencionales, sin embargo, pocos trabajos se dedican a aplicaciones de nitro compuestos sobre electrodos modificados con nanotubos de carbono (NTC) [15].

Compuestos cumarínicos

Las benzopironas son una clase importante de moléculas heterocíclicas orgánicas, conocidas como cumarinas [21]. Con estructura general como se muestra en Fig. 7:

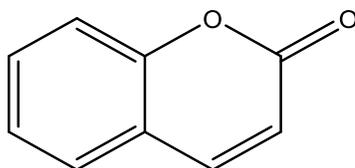


Figura 7. Estructura química de 2h-cromen-2-ona (cumarina).

Muchos derivados naturales y sintéticos de la cumarina han sido ampliamente estudiados debido a sus diversas actividades no tóxicas [21].

Cabe destacar que las cumarinas presentan propiedades fotofísicas favorables tales como grandes desplazamientos de carga, rendimientos cuánticos de alta fluorescencia, longitudes de onda de excitación y emisión visibles [22]. Algunos derivados cumarínicos se han utilizado como potenciales materiales de fluorescencia, así como también emisivos dopantes en diodos emisores de luz orgánicos (OLEDs) [23]. Las propiedades fotofísicas de los derivados cumarínicos están fuertemente relacionadas con la capacidad de donación de

electrones o de captura de electrones de los sustituyentes unidos a su núcleo y el grado de conjugación de las moléculas [24].

Debido a lo poco solubles, este tipo de compuestos son ideales para modificar electrodos. Los compuestos se fijan en los nanotubos para hacer voltametría en medio acuoso. Debido a que el proceso redox de este tipo de cumarinas es vía dos electrones al igual que el proceso de oxidación con NADH, se espera una interacción del tipo mediador en la electrooxidación de NADH.

Por otro lado, no se han encontrado investigaciones electroquímicas de compuestos cumarínicos y aplicaciones de estos compuestos en nanotubos de carbono (NTC).

Con el fin de estudiar el efecto electrocatalítico sobre NADH utilizando un electrodo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTC), se evaluaron nitrocompuestos y compuestos cumarínicos como un nuevo mediador redox. Y mediadores electroquímicos tales como derivados de cumarinas, como 3-acetil-7,8-dihidroxi-2H-chromen-2-ona y el 7,8-dihidroxi-4-metil-2H-chromen-2-ona y nitrocompuestos tales como 1,4-dinitrobenceno, 1,8-dinitroantraquinona, este tipo de estructuras son conocidas, por generar un efecto electrocatalítico sobre la oxidación de NADH. Estos mediadores son encapsulados en los intersticios de los NTC.

Electrodos modificados y su aplicación electrocatalítica

La electrocatálisis es la rama de la electroquímica dedicada a comprender y modificar los mecanismos de reacción mediante el uso de materiales catalíticos [25].

El objetivo principal es dilucidar el efecto del material del electrodo sobre la cinética de la reacción, con el propósito de encontrar los caminos para acelerar el proceso y, así, minimizar las pérdidas de potencial resultante de la polarización del electrodo [26], así como conseguir aumentar la corriente de intercambio.

Los catalizadores pueden estar adsorbidos sobre el electrodo o estar en solución. Existen muchas reacciones que son muy importantes en la electroquímica que son catalizadas por especies adsorbidas. Entre ellas se destacan la producción de hidrógeno, oxígeno y cloro.

Desde el punto de vista de su aplicación industrial los electrodos deben presentar no solo una óptima actividad catalítica para la reacción de interés, sino que también, por ejemplo, que presente baja actividad catalítica para reacciones que compitan con la principal y que permita realizar distintos diseños con ese material [27].

Las propiedades electrocatalíticas que posean dependerán de las características que tenga el material. Los aspectos más relevantes relacionados con la actividad electrocatalítica son: Composición, estructura o tipos de grupos funcionales en la superficie y morfología.

Investigadores que han modificado electrodos GC-NTC con grupos nitro o nitrocompuestos [28]. Han introducido eficientemente grupos nitro en la superficie de los MWNTC por procedimientos convencionales de nitración [29]. Investigaciones anteriores demostraron la interacción del mediador de un grupo nitro en la electro-oxidación del NADH [28].

La modificación de MWNTC se basa en una unión covalente del compuesto nitro con los MWNTC. Recientemente se ha desarrollado un método diferente que no implica la formación de enlaces covalentes con la nanoestructura. Este método se basa en la adsorción de compuestos en MWNTC, mediante la encapsulación del compuesto nitro en la red tridimensional formada por los NTC [28].

La reducción de uno o más grupos nitro del nitrocompuesto genera el par redox de RNO/RNHOH en el electrodo [15]. Esta reacción se ha utilizado para la oxidación electrocatalítica de NADH [30].

Detección electroquímica de NADH

La nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH), es una coenzima que se encuentra en todas las células vivas. Participa en la detección electroenzimática de, por ejemplo, ciertos azúcares, alcoholes y aminoácidos [31]. El compuesto es un dinucleótido, ya que consta de dos nucleótidos unidos a través de sus grupos fosfatos con un nucleótido que contiene un anillo adenosina y el otro que contiene nicotinamida (Fig. 8).

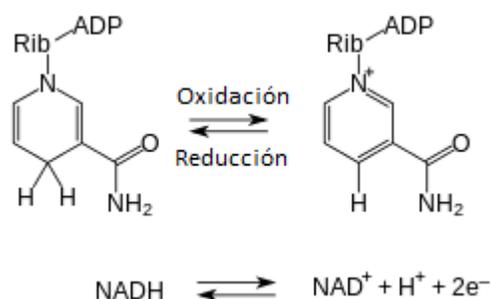


Figura 8. Estructura y reacción electroquímica de NADH.

En el metabolismo, el NAD^+ participa en reacciones redox (oxidorreducción), llevando los electrones de una reacción a otra. La coenzima, por tanto, se encuentra en dos formas en las células: NAD^+ y NADH . El NAD^+ , que es un agente oxidante, acepta electrones de otras moléculas y se reduce, formándose NADH , que puede ser utilizado entonces como agente reductor para donar electrones. Estas reacciones de transferencia de electrones son la principal función de NAD^+ [32].

El NAD^+ y NADH son los principales portadores de carga central en células vivas. La gran mayoría de las enzimas redox, requieren coenzimas NADH/NAD^+ para su acción catalítica. Las deshidrogenasas dependientes de NADH/NAD^+ se han utilizado frecuentemente en química analítica y química orgánica. En la electroquímica, el acoplamiento de las reacciones enzimáticas dependientes de NAD^+ con los procesos de electrodo han sido de interés en el diseño y desarrollo de biosensores amperométricos y células de biocombustible. En tales sistemas, una regeneración electroquímica eficiente del par redox NADH/NAD^+ es esencial. Por lo tanto, la oxidación electroquímica reversible y eficiente de NADH a su forma enzimáticamente activa se considera como la clave en la aplicación de cualquiera de las deshidrogenasas dependientes de NAD^+ como compuestos receptores en biosensores amperométricos. La oxidación electroquímica del NADH se produce comúnmente sólo a altos sobrepotenciales en los electrodos convencionales debido al alto potencial del par $\text{NADH}^+/\text{NADH}$, lo que hace que esta sea una limitación [31]. En vista de estos antecedentes, se han desarrollado electrocatalizadores para la oxidación y reducción de la pareja NADH/NAD^+ [33].

El uso de compuestos mediadores es necesario ya que el producto de oxidación de NADH , el NAD^+ , se puede adsorber en la superficie de los electrodos de carbono impidiendo la transferencia de electrones. Además, los

altos valores de los potenciales de oxidación requeridos para NADH, frecuentemente generan reacciones secundarias no deseadas que generan especies que se adsorben en la superficie del electrodo, provocando disminución del área activa, es decir un "ensuciamiento" del electrodo. Este fenómeno conduce a una menor sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad de los biosensores dedicados a NADH [34].

La función del mediador es limitar el acceso de NADH a los NTC y proveer mejor selectividad, actuar como un mediador de transferencia de electrones entre la molécula objetivo y el electrodo, e inducir una rápida oxidación. Comúnmente compuestos como quinonas, diaminas, ferroceno, fenazina y L-glutamato [34].

Tales mediadores pueden estar presentes en solución o pueden ser inmovilizados sobre la superficie del electrodo. En este sentido, la modificación de los electrodos de carbono con otros materiales como los polímeros conductores y nanotubos de carbono, que también puede mediar en la transferencia de electrones, ha demostrado ser prometedor.

Los carbonos del tipo sp^2 , como en los nanotubos de carbono (NTCs) presentan una curvatura especial de la pared lateral y poseen una estructura conjugada con una superficie hidrofóbica. Los NTC con grupos funcionales oxigenados en la pared lateral exterior y/o en los extremos dan un rendimiento mejorado como un modificador de electrodo para la transferencia de electrones a especies redox en solución. Debido a los antecedentes anteriormente mencionados, en esta memoria de título se estudiará el efecto de los electrodos de carbono vítreo, recubiertos con NTC [31].

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GENERAL

Modificar electrodos de carbono vítreo con nanotubos de carbono utilizando nitrocompuestos y cumarinas como mediadores electrocatalíticos de la oxidación de NADH y estudiar el efecto de diferentes factores en la actividad electrocatalítica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono, nitrocompuesto y cumarinas.
- Comparar el comportamiento electroquímico de los nitrocompuestos y cumarinas sobre electrodos de carbono vítreo sin modificar y modificados con nanotubos de carbono.
- Caracterizar electroquímicamente los nitrocompuestos y cumarinas encapsulados en electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono.
- Realizar la caracterización electroquímica del NADH en electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono.
- Determinar la capacidad electrocatalítica de los mediadores; 1,4-dinitrobenceno, 1,8-dinitroantraquinona, 3-acetil-7,8-dihidroxi-2H-chromen-2-ona y el 7,8-dihidroxi-4-metil-2H-chromen-2-ona, sobre el NADH.
- Evaluar el comportamiento electroquímico del conjunto mediador - NADH.
- Optimizar y cuantificar los parámetros que afectan la oxidación electrocatalítica de NADH.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y solventes

- 1,4-dinitrobenceno (1,4-DNB), Sigma Aldrich CAS: 100-25-4.
- 1,8-dinitroantraquinona (1,8-DNA), Sigma Aldrich CAS: 129-39-5.
- 3-acetil-7,8-dihidroxi-2H-cromen-2-ona (1-cum), sintetizados previamente en el laboratorio.
- 7,8-dihidroxi-4-metil-2H-cromen-2-ona (5-cum), sintetizados previamente en el laboratorio.
- Ácido bórico (99%) p.a, Fluka Chemica
- Ácido acético glacial p.a, Mallinckrodt
- Ácido clorhídrico (36%) p.a, Reutter
- Ácido fosfórico (85%) p.a, Merck
- Agua desionizada nano pura (18,2 MΩ cm)
- Etanol absoluto (99,8%) p.a, Merck
- Hidróxido de sodio (pellets) p.a, Merck
- Nitrógeno extra puro (99,9%), Linde Gas Chile S.A.
- Nanotubos de carbono de multipared (> 95 % en C), DropSens
- 1,3- dioxolano, Sigma Aldrich

*Todos los reactivos fueron utilizados sin previa purificación.

3.2. Equipos

A) Equipos de uso general

- Agitador Heidolph Reax 2000
- Balanza de precisión Precisa 40SM-200a (sensibilidad 0,01 mg)
- Medidor de pH WTW modelo pMx 3000
- Medidor de pH OAKTON pH 700
- Sistema purificador de agua Milli-Q Ultra- Pure Water System.
- Sonificador Branson Branson 2510

B) Sistema voltamétrico y computacional

- Equipo potencióstato BAS CV-50W
- Equipo potencióstato CHInstrument 650C y 760C
- Celda electroquímica:
 - Celda electroquímica 10 mL
 - Electrodo de trabajo: Carbono vítreo y carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono.
 - Soporte de carbono vítreo, como electrodo de trabajo. Ted Pella, INC.
 - Electrodo de referencia: Ag/AgCl KCl 1M
 - Electrodo auxiliar: Alambre de platino.

3.3. Métodos

3.3.1. Preparación de soluciones

- *Preparación solución Buffer 0,1 M Britton-Robinson*

En un matraz de 1 L se agregaron 6,18 g de ácido bórico, 5,71 mL de ácido acético glacial y 6,75 mL de ácido fosfórico en agua nanopura. Posteriormente se coloca en un baño de ultrasonido durante 10 min para eliminar las burbujas y se afora con agua nanopura. Finalmente, el pH de trabajo se ajusta con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio concentrado.

- *Solución stock de compuestos en estudio*
 - 1,4-DNB: se prepararon 5 mL de solución stock de concentración 4 mM de nitrocompuesto en etanol p.a. La solución stock se guardó refrigerada en envase de vidrio.
 - 1,8-DNA: se prepararon 50 mL de solución stock de concentración 0,4 mM de nitrocompuesto en acetonitrilo p.a. La solución stock se guardó refrigerada en envase de vidrio.
 - Cum-1: se prepararon 5 mL de solución stock de concentración 4 mM de nitrocompuesto en acetonitrilo p.a. La solución stock se guardó refrigerada en envase de vidrio.
 - Cum-5: se prepararon 1 mL de solución stock de concentración 20 mM de nitrocompuesto en acetonitrilo p.a. La solución stock se guardó refrigerada en envase de vidrio.
- *Solución de NADH*

Se prepararon 5 mL de solución stock de NADH concentración 3 mM en buffer Britton-Robinson 0,1 M pH 7. La solución se mantuvo con atmosfera de nitrógeno y hielo en cada medición, durante todo el experimento.

- *Soluciones de trabajo*

Electroquímica clásica: Todas las soluciones fueron preparadas antes del experimento a partir de soluciones stock de nitrocompuesto o cumarina y tampón Britton-Robinson, ajustado según el pH de trabajo en la celda electroquímica con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio concentrado.

En electrodos modificados por inmersión (dipping): Las soluciones de trabajo consistieron en una solución de nitrocompuesto o cumarina preparada a partir de la solución stock y etanol o acetonitrilo, donde fueron sumergidos los electrodos GC-NTC durante 10 segundos. Luego estos electrodos fueron medidos en una celda que solo contiene buffer.

3.4. Desarrollo experimental

3.4.1. Dispersión de nanotubos de carbono

Las dispersiones se prepararon pesando una cantidad adecuada de nanotubos de carbono y agregando una cantidad apropiada de 1,3-dioxolano para obtener una concentración de 3 mg/mL. Luego la dispersión se somete a baño de ultrasonido 3 veces por periodos de 5 min. La dispersión es agitada entre cada periodo de baño ultrasónico.

3.4.2. Preparación de electrodos con NTCs

Método general de preparación de electrodos modificados con nanotubos de carbono:

En todos los experimentos se utilizó un electrodo de carbono vítreo (GC; *glassy carbon electrode*), previamente pulidos con alúmina de 0,3 y 0,05 μm , lavado con abundante agua antes de cada modificación. El electrodo de carbono vítreo se modifica utilizando la dispersión de nanotubos de carbono 3 mg/mL. La inmovilización de los nanotubos de carbono en el electrodo se realiza tomando una alícuota de 5 μL de la dispersión, que se deposita sobre la superficie del electrodo GC. El electrodo se deja secar a temperatura ambiente y los nanotubos quedan inmovilizados sobre la superficie del electrodo (Fig. 9).

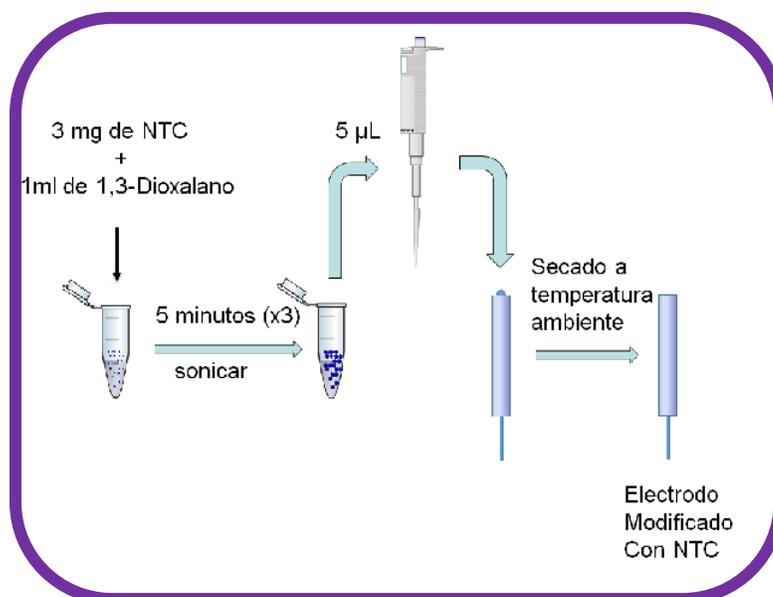


Figura 9. Metodología general para la modificación de un electrodo GC con nanotubos de carbono.

I. Modificación de electrodos con NTC y nitrocompuestos por dipping.

Los electrodos modificados con NTCs fueron sumergidos por 10 segundos en una solución de nitrocompuesto o de cumarinas en solvente orgánico, la cual es preparada a partir de soluciones stock. Posteriormente fueron lavados con abundante agua y fueron introducidos en una celda con solución buffer B-R 0,1 M, sin compuesto (Fig. 10).

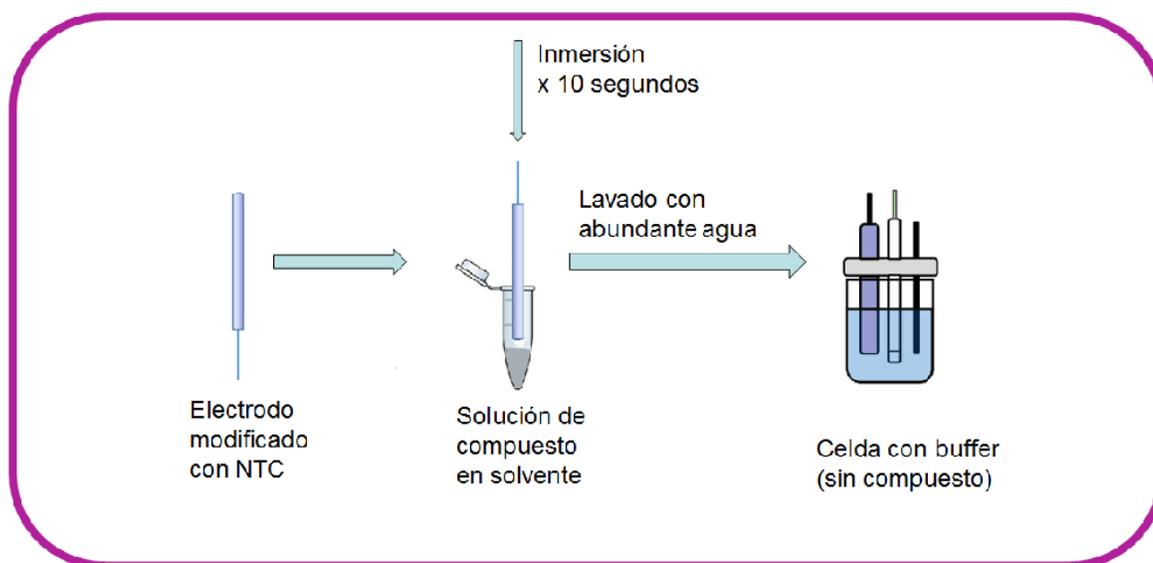


Figura 10. Metodología para la modificación por dipping de los electrodos con NTC.

II. Estudio de electrocatálisis

En los estudios de electrocatálisis, los electrodos de GC fueron modificados con NTCs, nitrocompuesto o compuestos cumarínicos. Estos compuestos encapsulados en el electrodo fueron evaluados como mediadores electroquímicos, en su forma oxidada o reducida. En este experimento, para la modificación con nitrocompuestos los electrodos se modificaron electroquímicamente en una celda diferente de la que se evaluó el efecto electrocatalítico.

En el estudio de electrocatálisis para el caso de los nitrocompuestos, se utilizaron electrodos GC modificados con NTCs (GC-NTC) y nitrocompuestos mediante la técnica de dipping (inmersión del electrodo en una solución de

compuesto orgánico). Se aplica un barrido de potencial que permita reducir un solo grupo nitro presente en la molécula del nitrocompuesto encapsulado en los intersticios de los NTC.

El estudio de electrocatálisis utilizando cumarinas, se realizó directamente en la celda que contiene la solución de NADH (Fig. 11). A diferencia de los nitrocompuestos, las cumarinas no requieren la generación de un par redox.

Para evaluar la respuesta electroquímica del mediador con el NADH el electrodo es sumergido en otra celda que contiene una solución de NADH en buffer B-R 0,1 M pH 7. Donde se obtuvo la respuesta electroquímica del mediador con NADH (Fig. 11).

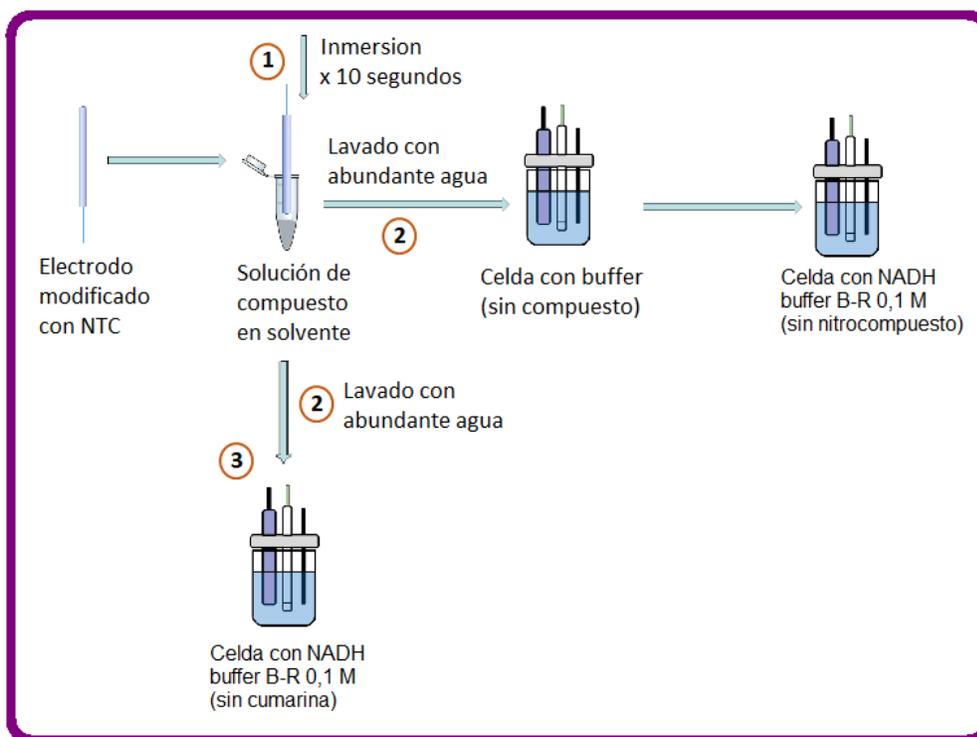


Figura 11. Metodología para el estudio de electrocatálisis de NADH **1)** Inmersión del electrodo GC-NTC en la solución de nitrocompuesto o cumarina en solvente. **2)** Lavado del electrodo con abundante agua nano pura. **3)** Cambio de celda del electrodo a una celda con NADH.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización electroquímica de compuestos

En este trabajo se utilizaron dos nitrocompuestos y dos cumarinas. Los cuales son interesantes para la encapsulación en los electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono (GC-NTC). Los compuestos estudiados fueron los siguientes: 1,4-dinitrobenceno (1,4-DNB), 1,8-dinitroantraquinona (1,8-DNA), 3-acetil-7,8-dihidroxi-2H-chromen-2-ona (1-cum) y 7,8-dihidroxi-4-metil-2H-chromen-2-ona (5-cum) (Fig. 12).

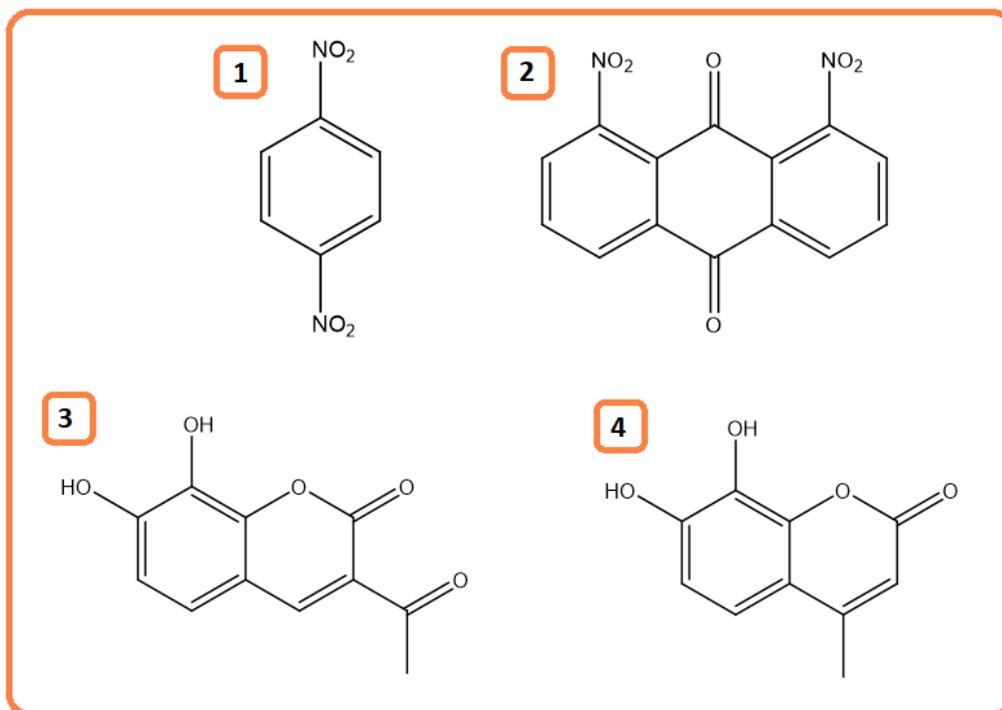


Figura 12. Estructura química de los compuestos. **1)** 1,4-Dinitrobenceno (1,4-DNB). **2)** 1,8-Dinitroantraquinona (1,8-DNA). **3)** 3-acetil-7,8-dihidroxi-2H-chromen-2-ona (1-cum). **4)** 7,8-dihidroxi-4-metil-2H-chromen-2-ona (5-cum).

a) Caracterización de los nitrocompuestos y cumarinas sobre electrodos de carbono vítreo.

El comportamiento electroquímico de los compuestos sobre electrodos GC se caracterizó mediante voltametría cíclica de los grupos nitro de los nitrocompuestos e hidroxilos de las cumarinas, respectivamente. En la figura 13 se muestran los voltamogramas cíclicos de los compuestos obtenidos utilizando un electrodo GC. Para estas mediciones, los electrodos fueron modificados por inmersión durante 10 segundos y posteriormente transferidos a una celda con buffer B-R pH 7, en la cual se realiza la voltametría.

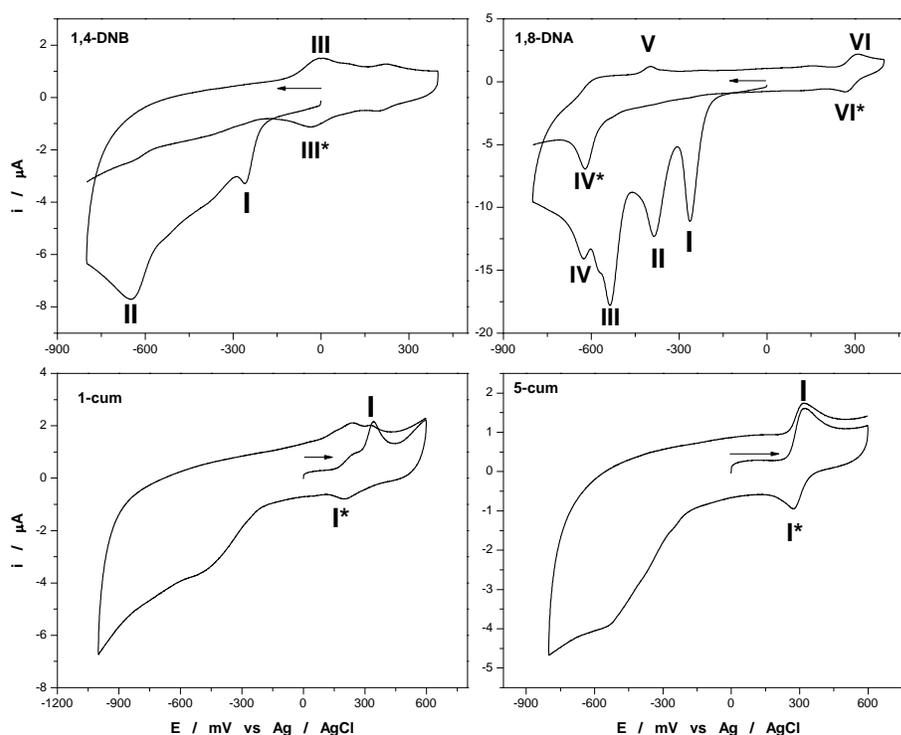
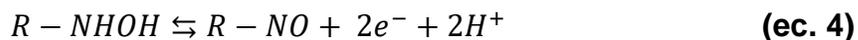
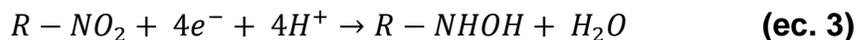


Figura 13. Voltamograma cíclico de los compuestos con electrodos GC buffer B-R 0,1 M pH 7.

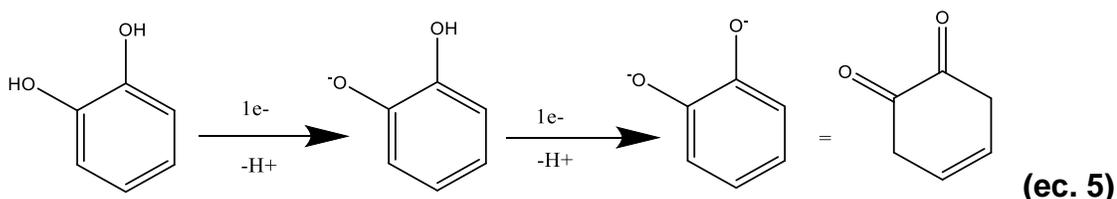
En la figura 13 para el 1,4-DNB, en el primer barrido catódico se observan dos señales irreversibles centradas en -260 mV y -643 mV las cuales desaparecen en un segundo barrido catódico (señales I y II en Fig. 13). Además, en

aproximadamente 0 mV se observa un par redox de los derivados hidroxilamina/nitroso. Los procesos redox involucrados son:



Para la 1,8-DNA (Fig. 13) se observan varias señales de tipo irreversible en el primer barrido hacia potenciales negativos, en el siguiente barrido de reducción se observa una señal de baja intensidad (señal IV*), posiblemente asociada a la señal V y generada por la señal III. Las señales I y II corresponderían a la reducción de cada grupo nitro según la ec. 3. A su vez en 300 mV se observa el par redox VI/VI* correspondiente a la ec. 4.

En el caso de las cumarinas, el tipo de reacción depende del pH. A pH ácido la molécula se encuentra completamente protonada, a pH básico estará en su forma desprotonada. A pH neutro puede mantener un equilibrio ácido base de un solo grupo fenol. En medio acuoso y a pH neutro, el tipo de reacción es similar a la de compuestos polifenólicos. En este tipo de reacciones se pierde un protón y un electrón de cada grupo hidroxilo para generar un derivado de o-benzoquinonas (ec. 5).



b) Caracterización de los compuestos sobre electrodos GC con NTCs.

Se estudió el comportamiento electroquímico de los compuestos sobre electrodos GC modificados con nanotubos de carbono (GC-NTC). En la figura 15 se muestran los voltamogramas cíclicos de los compuestos utilizando GC-NTC.

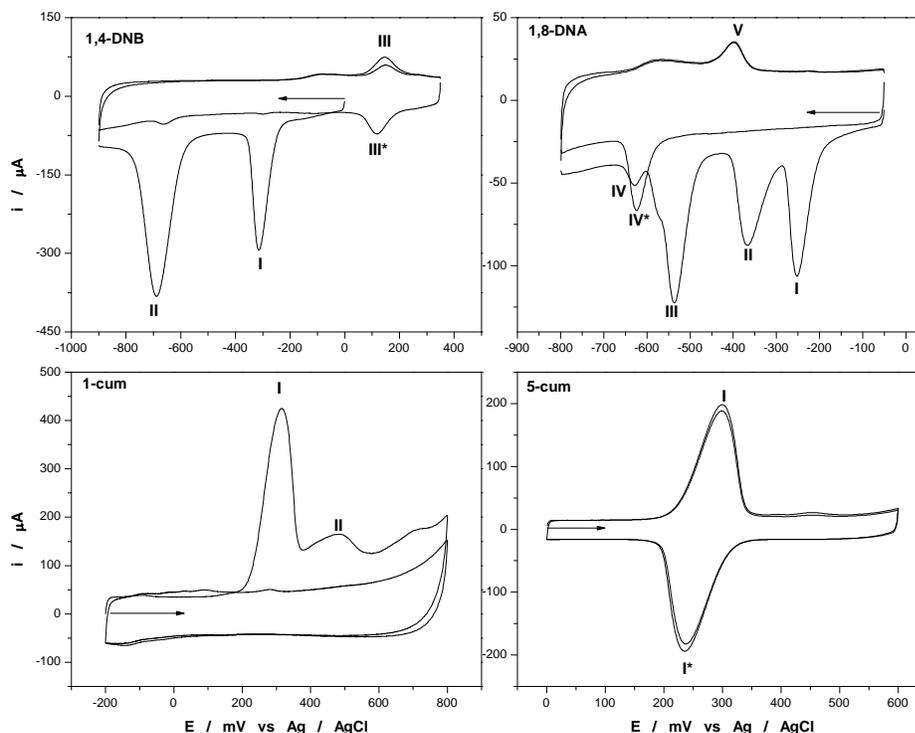


Figura 14. Voltamograma cíclico de los compuestos con electrodos GC-NTC buffer B-R 0,1 M pH 7.

Se puede observar en la figura 14 que para la 1,4-DNB hay una corriente capacitiva bien definida con tres señales correspondientes a tres procesos de transferencia electrónica de los compuestos, siendo las señales I y II de tipo irreversible, y la señal del par redox III/III* de tipo reversible. Los potenciales aparecen en $E_{pI} = -316$ mV y $E_{pII} = -689$ mV. Al comparar estos voltamogramas con los voltamogramas de la figura 13, se observa que hay variación en los potenciales de reducción de los grupos nitro.

En el caso del compuesto 1,8-DNA al comparar el comportamiento a potenciales negativos con los de la figura 13, se observa el mismo número de señales y un aumento en la intensidad de la corriente.

En las cumarinas al trabajar con electrodos modificados con nanotubos de carbono se puede observar claramente las señales de oxidación (Fig. 14, señales I y II, para 1-cum, y I para 5-cum). En 1-cum no se observan señales de

reducción, por lo que el proceso es de tipo irreversible. En 5-cum se observa una señal reversible en el barrido de oxidación (Fig. 14, señal I/I*, 5-cum), la cual es contante en barridos posteriores con una leve disminución en la corriente de pico.

En general al comparar la figura 13 y 14, se observa que en Fig. 13 (electrodo GC) las corrientes de pico son de menor intensidad y las señales no están bien definidas, en cambio utilizando electrodo GC-NTC se observan señales bien definidas y con corrientes de pico altas. Esta diferencia se debe a que la capa de NTC adherida a la superficie del electrodo aumenta la capacidad de encapsulamiento de los compuestos y como consecuencia, se obtienen señales más intensas. Para los nitrocompuestos las señales de los derivados hidroxilamina/nitroso aparecen bien definidas.

Este comportamiento es similar al que se observa en la voltametría de difusión de capa fina en comparación a difusión semiinfinita. En particular, ha habido un trabajo muy considerable en el uso de nanotubos de carbono para crear capas porosas en la superficie de los electrodos [35].

Básicamente la difusión de capa fina consiste en que los productos atrapados de la solución que contiene analitos actúan como pequeñas celdas de capa delgada. Un indicador clave de este comportamiento, es que al observar las corrientes máximas que fluyen asociadas con el comportamiento de la capa delgada pueden ser significativamente mayores que las que se observan para la difusión semiinfinita en un electrodo de la misma área geométrica [35].

	GC		GC-NTC	
	Ep I (mV)	Ep II (mV)	Ep I (mV)	Ep II (mV)
1,4-DNB	-260	-643	-316	-689
1,8-DNA	-269	-392	-249	-361
1-cum	348	-	315	481
5-cum	332	-	301	-

Tabla 1. Potenciales de pico de las señales de reducción de los compuestos en estudio (señales I y II, Fig. 13 y 14) sobre GC y GC-NTC.

En la tabla 1 se tabulan los Ep que corresponden a los nitrocompuestos, y sus señales de los dos grupos nitros presentes en la molécula. En el caso de las cumarinas corresponden a las señales de los compuestos 5-cum y 1-cum figura 14. A partir de los datos obtenidos en la tabla 1 se observa para la 1,4-DNB un aumento en el potencial de pico catódico con electrodos GC-NTC. Esto es

diferente para los otros compuestos donde se observa una disminución de los potenciales de pico catódicos de los compuestos con electrodos GC modificados con NTCs, lo que indicaría una actividad electrocatalítica por parte de los NTC, ya que facilitan la reducción de los compuestos.

c) Caracterización de los procesos redox utilizando electrodos GC-NTC.

En los electrodos GC-NTC los nitrocompuestos se encuentran en el interior de la nanoestructura porosa, formada por los nanotubos adheridos al electrodo de carbono vítreo. Entonces, para describir el estado de los nitrocompuestos en el electrodo se usará el término de “compuesto encapsulado”.

Debido a la versatilidad que tienen este tipo de electrodos (GC-NTC) es que se pueden reducir selectivamente uno, dos o tres grupos nitro presente en la molécula aplicando un determinado potencial, generando electroquímicamente derivados hidroxilamina/nitroso.

El objetivo de este método es aislar las señales de reducción de un grupo nitro, y estudiar la estabilidad del par redox de los derivados hidroxilamina/nitroso, generados en los barridos posteriores. Se utilizaron distintos electrodos modificados con nanotubos de carbono; modificados por inmersión de 10 segundos en una solución de 1,4-DNB 2 mM y 1,8-DNA 0,3 mM disuelto en solvente orgánico, medidos en una celda con buffer Britton-Robinson 0,1 M ajustado a pH 7. Para realizar una comparación entre las corrientes, se obtuvieron los siguientes voltamogramas.

En la figura 15 se observan los voltamogramas cíclicos de los nitrocompuestos, en línea segmentada los derivados hidroxilamina/nitroso aislados. En línea continua el voltamograma completo que genera el par redox.

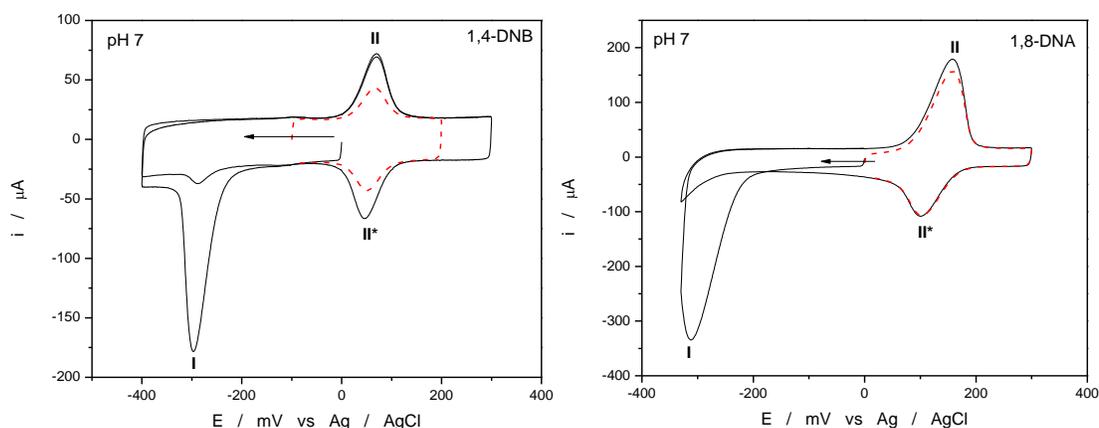


Figura 15. Voltamogramas cíclicos de los compuestos en electrodos GC-NTC en buffer B-R 0,1 M pH 7, con un grupo nitro reducido (línea continua) con los correspondientes pares redox aislados (línea discontinua).

En la figura 15 se observa que para el 1,4-DNB, al reducir un grupo nitro disminuye la señal aislada del par redox, en cambio para el 1,8-DNA, casi no disminuye el par redox nitroso/hidroxilamina en un barrido posterior. Esto se puede explicar, debido a las diferencias en sus estructuras, 1,8-DNA tiene dos anillos aromáticos con electrones π lo que permite que se retenga mejor en el electrodo debido al solapamiento π - π entre el compuesto y la pared de los nanotubos de carbono. Debido a este fenómeno no se observa una disminución de la señal del par redox como ocurre con 1,4-DNB, que solo tiene un anillo aromático.

4.2. Estabilidad de los compuestos en solución

Este experimento tiene como objetivo estudiar la estabilidad de los compuestos en solución a pH 7, para determinar el tiempo con el que se puede trabajar con la solución de nitrocompuesto. El estudio se realizó con un electrodo de carbono vítreo modificado con NTC mediante la técnica de voltametría de pulso diferencial (VPD). Las mediciones se realizaron en una solución buffer Britton-Robinson 0,1 M a pH 7.

Se estudió la variación de la corriente de pico (i_p) de la reducción del primer grupo nitro de 1,4-DNB y 1,8-DNA. Cada medición se realizó por triplicado y cada triplicado se midió con un lapso de 30 minutos. Se utilizaron distintos electrodos para cada medición. El tiempo total del experimento fueron 2 horas. Los resultados se muestran en la Fig.16.

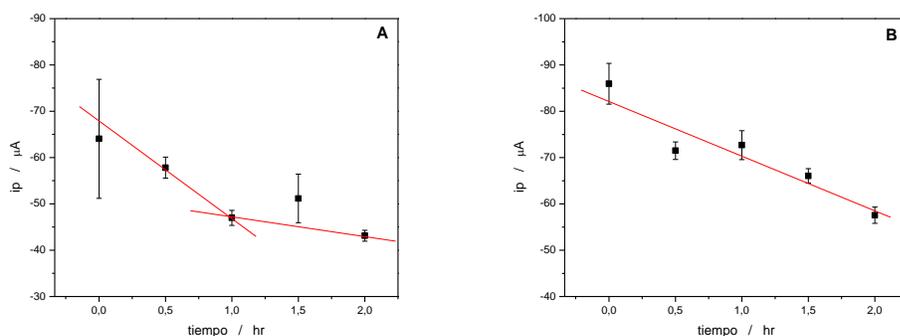


Figura 16. Estudio de estabilidad de los nitrocompuestos en buffer B-R 0,1 M pH 7 con electrodos GC-NTC modificados con **A)** 1,4-DNB 1 mM. **B)** 1,8-DNA 0,3 mM.

En la figura 16 se observa que en la 1,4-DNB existe una disminución en el tiempo hasta una hora de estudio, luego de ese tiempo se observa un cambio en la disminución de la corriente de pico hacia un comportamiento constante hasta finalizar el tiempo de estudio. En el caso de la 1,8-DNA se observó una tasa de disminución en la corriente de reducción del grupo nitro al transcurrir el tiempo del experimento. Estos resultados se pueden deber a una descomposición del compuesto en solución.

Además, se puede observar que las corrientes de reducción fueron poco estables, lo cual se ve reflejado en las desviaciones estándar, lo que se puede deber a que la modificación de los electrodos no es muy reproducible.

Para las cumarinas se estudió la variación de la corriente de pico (ip) de oxidación. Cada medición se realizó por triplicado y cada triplicado se midió con un lapso de 30 minutos. Se utilizaron distintos electrodos para cada medición. El tiempo total del experimento fue 2 horas. Los resultados se muestran en la Fig. 17.

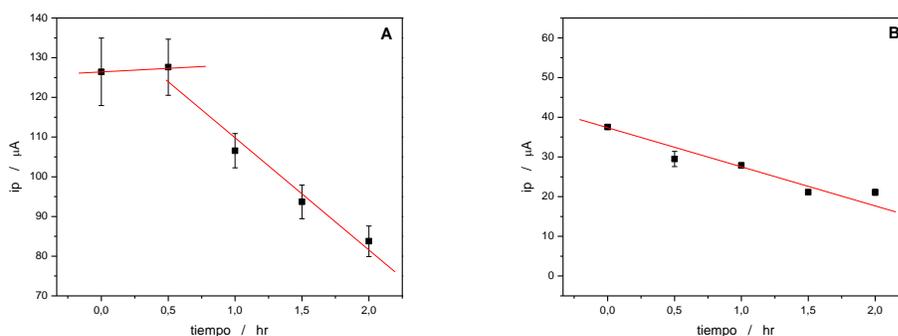


Figura 17. Estudio de estabilidad de las cumarinas en buffer B-R 0,1 M pH 7 con electrodos GC-NTC modificados con. **A)** 1-cum 1 mM **B)** 5-cum 1 mM.

En la figura 17 se observa que 5-cum es relativamente estable durante el experimento. En el caso de la 1-cum se observó una constante en la corriente durante los primeros 30 minutos, luego de este tiempo existe una significativa disminución de la corriente de reducción al transcurrir el tiempo, debido a una posible descomposición del compuesto en la solución.

A partir de los gráficos obtenidos en las figuras 16 y 17, se obtuvieron las tasas de decaimiento (tabla 2) de cada uno de los compuestos en estudio. Las cuales se determinaron a partir de la pendiente de los gráficos anteriores.

Compuestos	Tasa de Decaimiento ($\mu\text{A} / \text{hr}$)	Tasa de Decaimiento ($\mu\text{A} / \text{hr}$)	N° mayor Tasa de Decaimiento
1,4-DNB	$3,51 \text{ E}^{-1}$	$6,66 \text{ E}^{-2}$	2°
1,8-DNA	$1,73 \text{ E}^{-1}$		3°
1-cum	$3,89 \text{ E}^{-2}$	$4,43 \text{ E}^{-1}$	1°
5-cum	$1,64 \text{ E}^1$		4°

Tabla 2. Compuestos con sus respectivas tasas de decaimiento en $\mu\text{A}/\text{hr}$.

Debido a la forma del gráfico 17 A, se considera a tasa de decaimiento $4,43 \text{ E}^{-1}$ de la 1-cum como valor de comparación con los otros compuestos. De la tabla 2 se observa que el compuesto con menor tasa de descomposición es la 5-cum, por lo que es el compuesto más estable en comparación con los otros compuestos.

4.3. Estudio de pH de los compuestos en electrodos GC-NTC.

a) Nitrocompuestos

Para este estudio se utilizaron diferentes electrodos de carbono vítreo con nanotubos de carbono modificados por inmersión en una solución de 1,4-DNB 2 mM en etanol y 1,8-DNA 0,3 mM en acetonitrilo. La modificación por inmersión se hace por 10 seg. Posteriormente los electrodos se lavan con abundante agua y buffer después de cada modificación. Las mediciones electroquímicas se realizaron en diferentes celdas que contienen solo solución buffer B-R 0,1 M ajustado a pH 2, 7 y 11 respectivamente.

El mismo procedimiento se realizó para los compuestos 1-cum y 5-cum a concentración 1 mM.

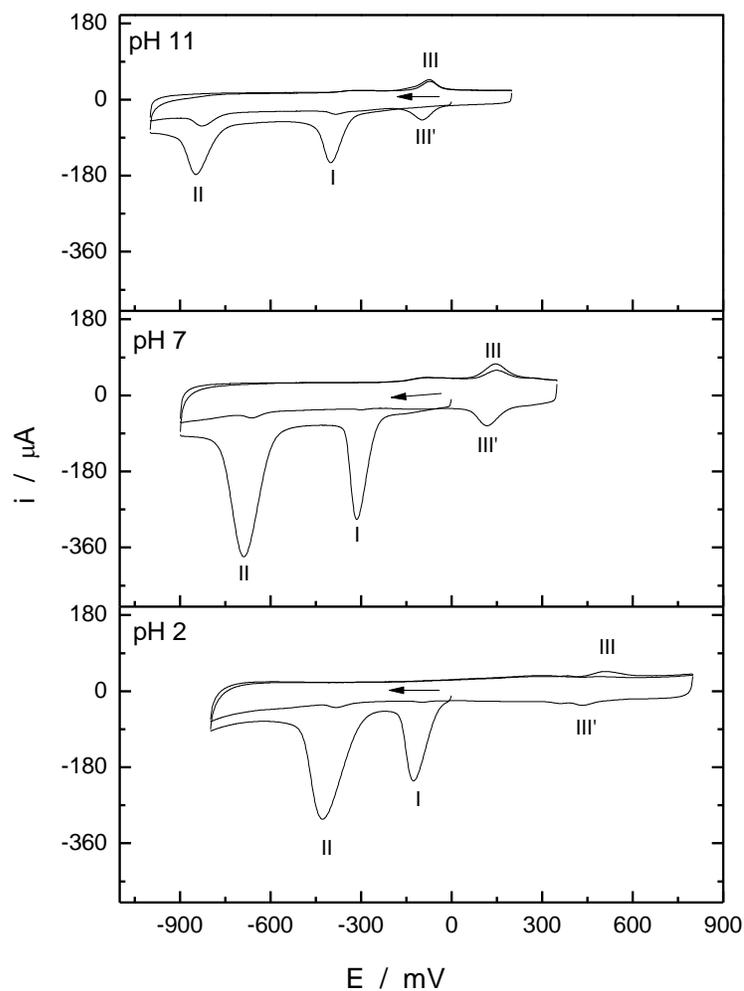


Figura 18. Voltamogramas cíclicos de los electrodos modificados con GC-NTC-1,4-DNB. Medido en una celda con buffer B-R 0,1 M a pHs 11, 7 y 2.

En la figura 18 se puede observar un desplazamiento en las señales hacia potenciales más negativos a medida que aumenta el pH de la solución de trabajo. Además, se puede observar que las señales III/III' son más definidas a pH 7. Además, se observa que la relación entre las intensidades de corrientes entre las señales I y II cambian con el aumento de pH. A pH básico la relación entre las corrientes de las señales I y II es parecida.

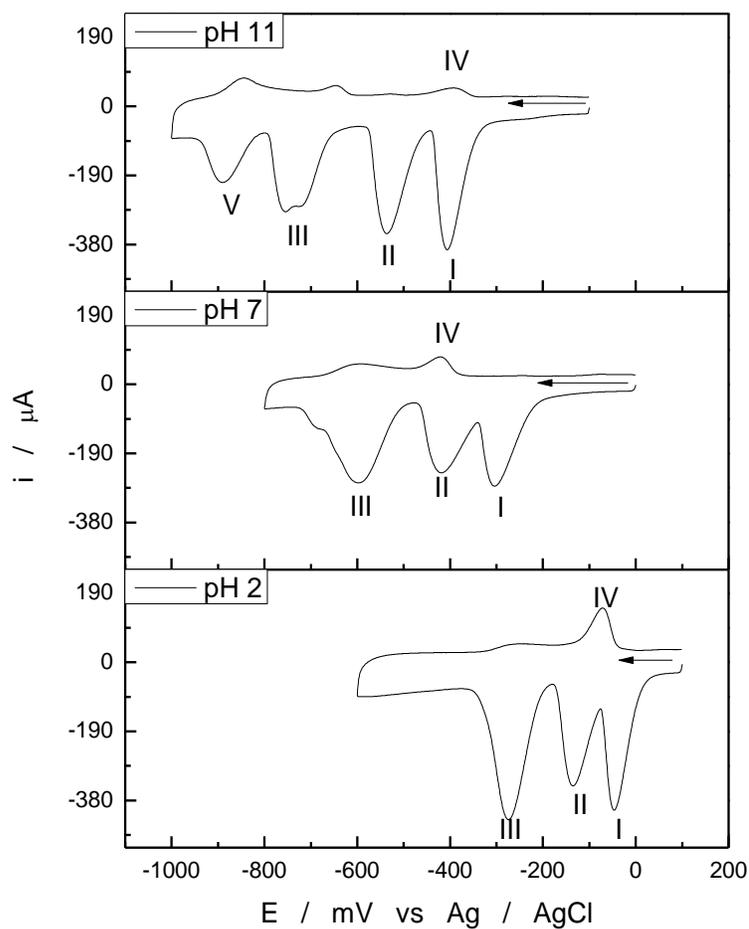


Figura 19. Voltamogramas cíclicos de electrodo modificado con NTC-1,8-DNA. Celda con buffer B-R 0,1 M a pHs 11, 7 y 2.

En la figura 19 se pueden observar cambios en la intensidad de la corriente de reducción en el grupo nitro presente. A pH ácido se observan claramente las señales del compuesto 1,8-DNA que corresponden a la reducción de cada grupo nitro. A pH neutro las señales son un poco más anchas, en la señal III se observa una señal acoplada de baja intensidad en -690 mV. A pH básico las señales de los nitrocompuestos corresponden a las señales I y II, la señal III aparece desdoblada a -890 mV. A este pH existe una nueva señal de reducción, señal V, Fig. 19.

Esto hace sospechar que el 1,8-DNA es un compuesto que no está completamente puro, ya que en el barrido de oxidación se observan señales de baja intensidad. Lo cual no concuerda con el comportamiento típico de un nitrocompuesto.

b) Estudio de pH de 1-cum

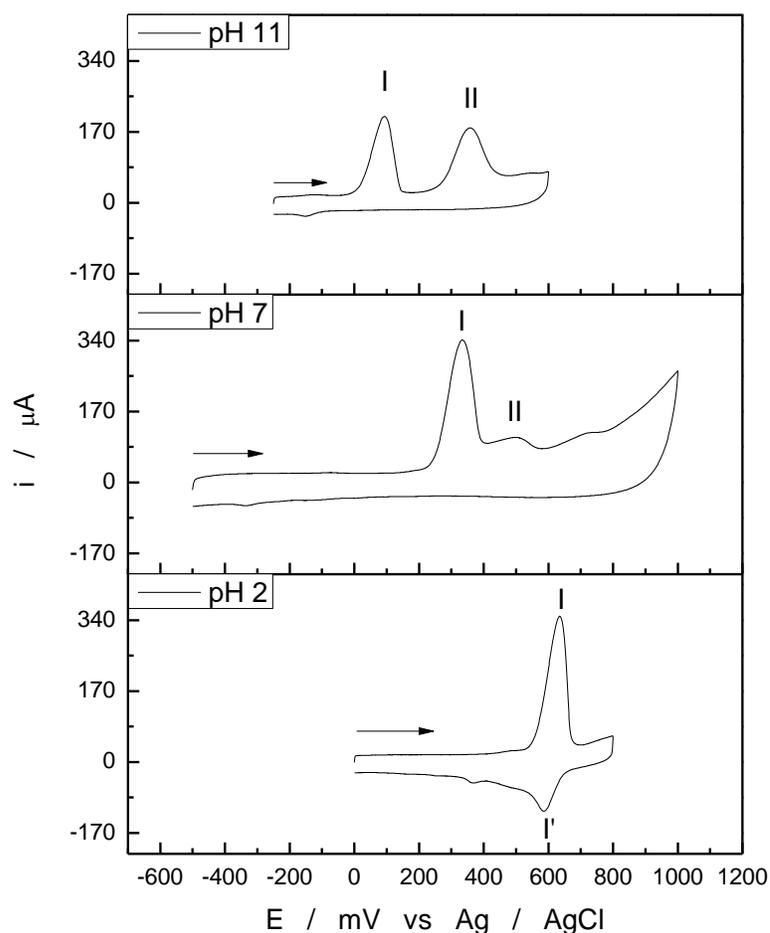
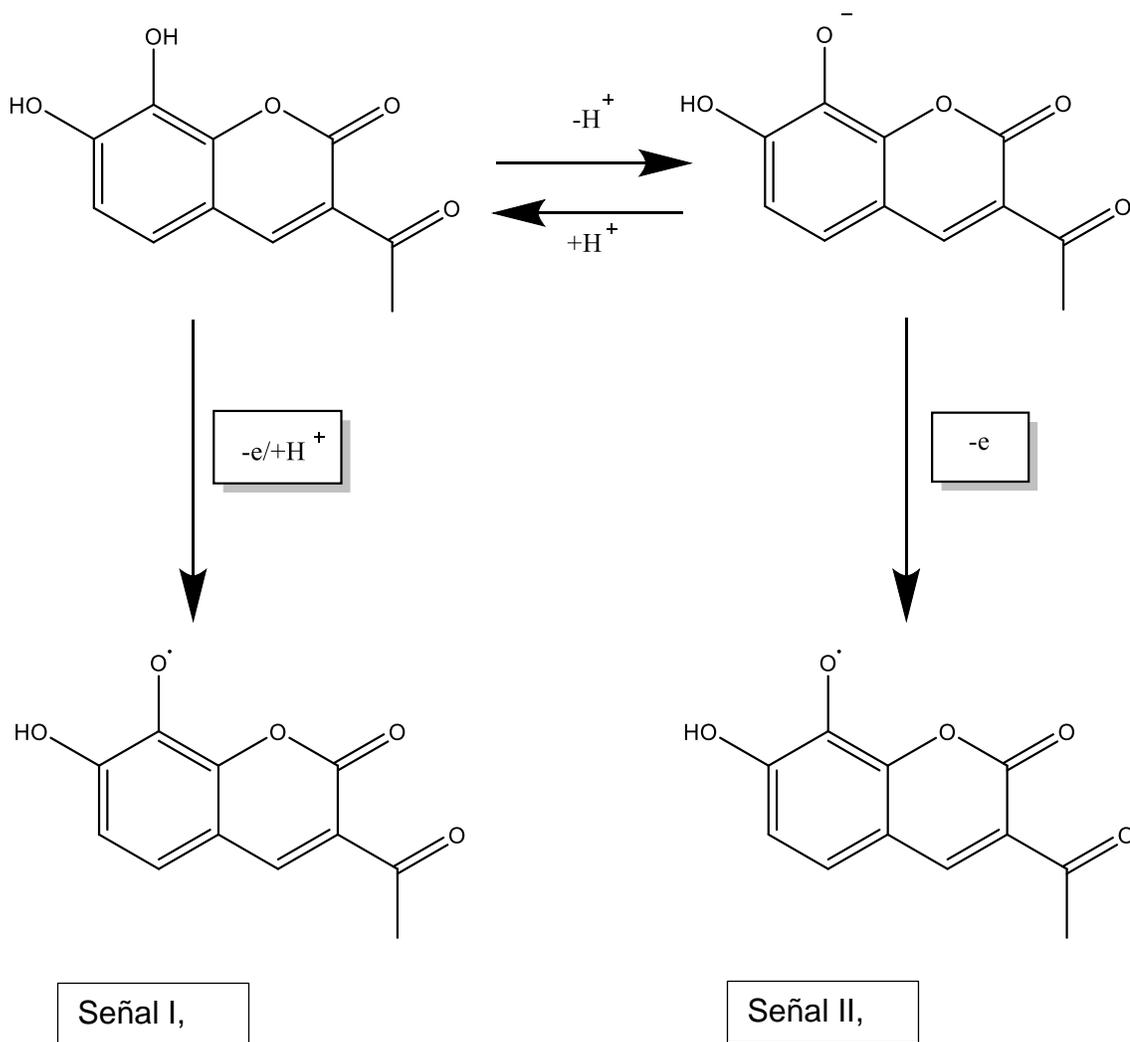


Figura 20. Voltamogramas cíclicos de electrodo modificado con NTC-1-cum. Celda con buffer B-R 0,1 M a pHs 11, 7 y 2.

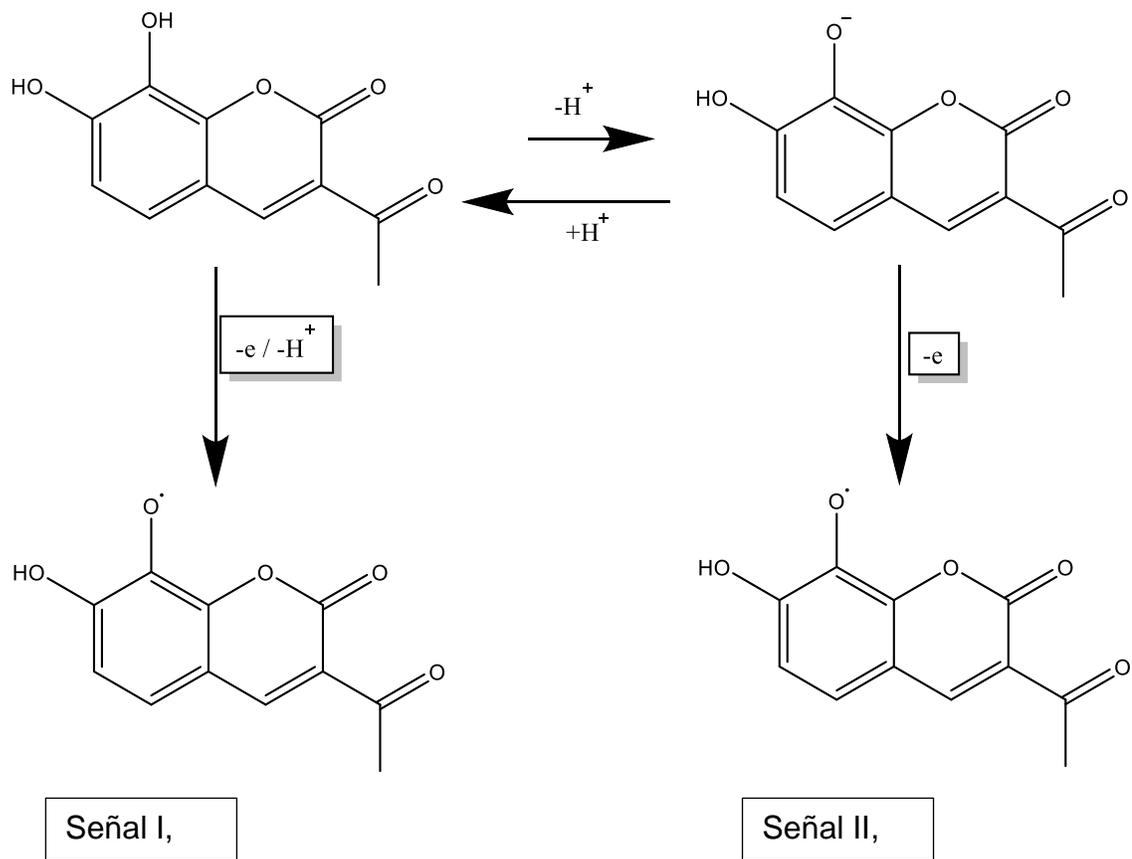
A partir de la figura 20 se observa que a pH básico se observa un comportamiento en donde debiera existir un equilibrio iónico, es por esto por lo que se ven dos señales definidas. La diferencia en las intensidades en las

señales se debe a que uno de los dos hidroxilos se desprotona primero y por ende el otro hidroxilo es más difícil que se desprotone (ecuación 6) [36].



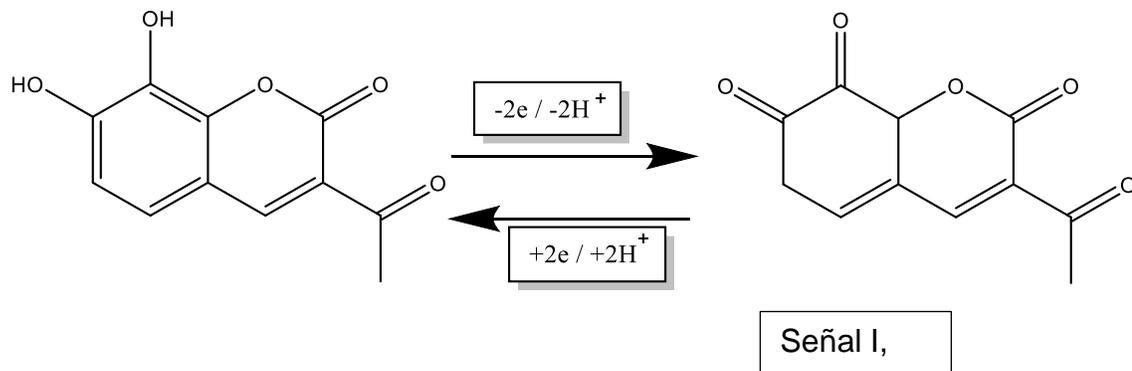
(ec. 6)

A pH neutro se observa un cambio en el mecanismo donde se desprotona uno de los dos hidroxilos de la molécula, y se forma un equilibrio de dos especies (ecuación 7) [36].



(ec. 7)

A pH ácido se puede observar una señal reversible de oxidación. El compuesto está en su forma protonada y la señal reversible corresponde a (ecuación 8) [36]:



(ec. 8)

c) Estudio de pH de 5-cum

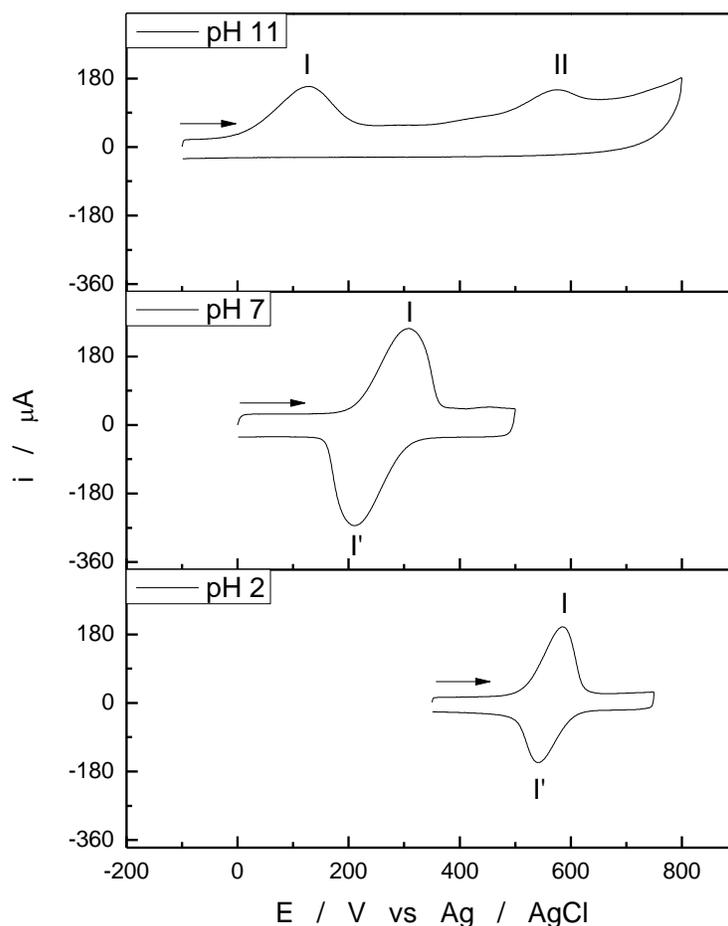
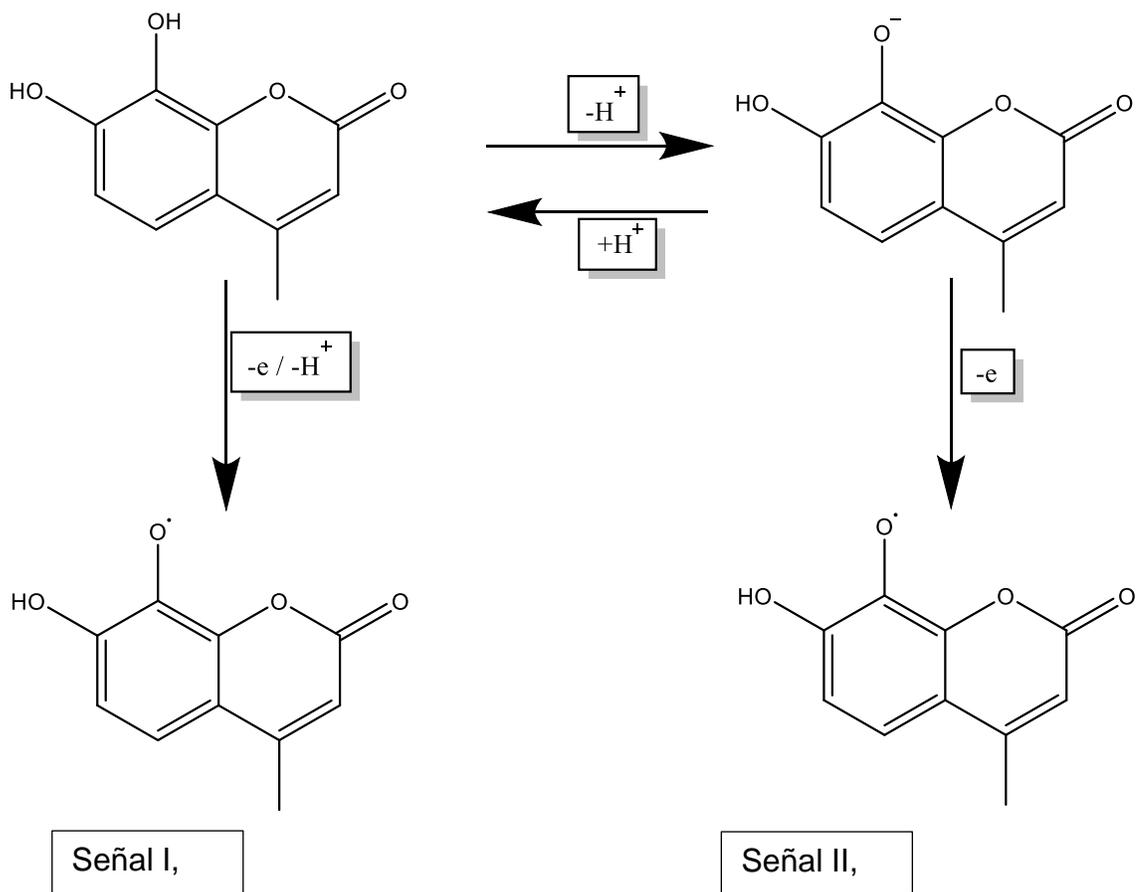


Figura 21. Voltamogramas cíclicos de electrodo modificado con NTC-5-cum. Celda con buffer B-R 0,1 M a pHs 11, 7 y 2.

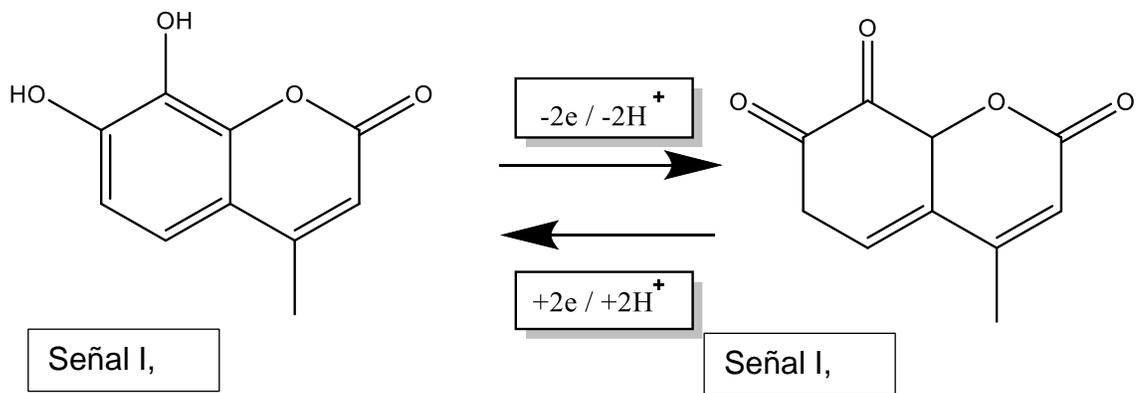
Al igual que con los otros compuestos, en la figura 21 se observa un desplazamiento de las señales de reducción hacia potenciales menores a medida que aumenta el pH del buffer B-R 0,1 M. Además, se observa que en general para esta cumarina las señales a los distintos pHs se encuentran bien definidas. A pH ácido se observa una señal reversible. A medida que aumenta el pH se observa un leve desplazamiento en las señales I/I'.

A pH básico se observan dos señales de oxidación, la primera a un $E_{pI} = 100$ mV y la segunda a $E_{pII} = 600$ mV, en el barrido catódico ya no se ve la señal I',

lo que implica que el producto formado no se reduce electroquímicamente. Las señales reversibles de 5-cum corresponden a procesos según (ecuación 9 y 10):



(ec. 9)



(ec. 10)

4.3.1 Estudio del pH con electrodos GC-NTC

Se realizó un estudio de la corriente de reducción de los compuestos a distintos pH, se utilizó un electrodo de carbono vítreo modificado con NTC mediante la técnica de voltametría de pulso diferencial (VDP). Las mediciones se realizaron en una solución buffer Britton-Robinson 0,1 M ajustado desde pH ácido hasta pH básico.

Se estudió la variación de potencial de pico (E_p) de la reducción de las cumarinas y los nitrocompuestos. Cada medición se realizó por triplicado ajustado al pH en estudio. Se utilizaron distintos electrodos para cada medición con el fin de evaluar el pH al cual trabajar (Fig. 22).

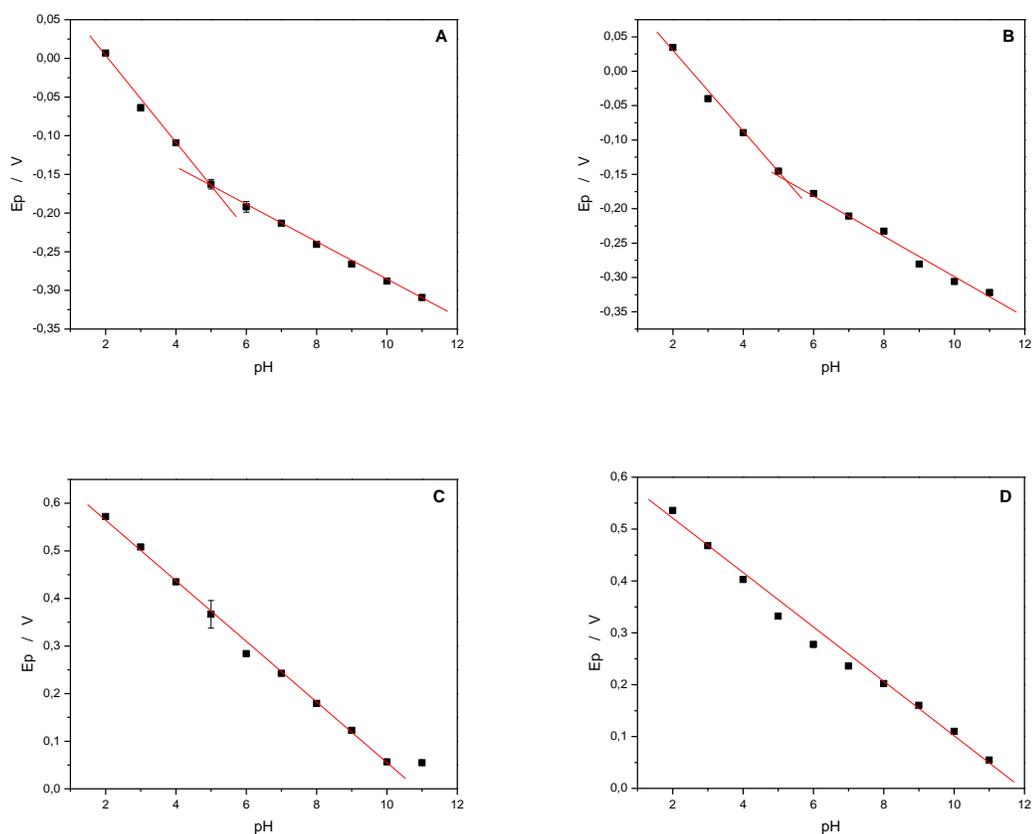


Figura 22. Estudio de pH de los nitrocompuestos y cumarinas en buffer B-R 0,1 M pH ajustado, con electrodos GC-NTC modificados con. **A)** 1,4-DNB 1 mM **B)** 1,8-DNA 0,3 mM. **C)** 1-cum 1 mM. **D)** 5-cum 1 mM.

En la figura 22 el potencial de pico varia linealmente con el pH para todo el intervalo estudiado, con un quiebre característico. En el caso de cum-1 se observa un quiebre a pH 10 que probablemente se debe a un cambio en el equilibrio de protonación-desprotonación de la especie electroactiva. Se observó que los potenciales de pico se desplazan levemente a valores menos positivos, a medida que aumenta el pH de la solución buffer.

Compuestos	Pendientes (V/pH)	Pendientes (V/pH)	Orden de sensibilidad
1,4-DNB	-0,057	-0,025	3°
1,8-DNA	-0,059	-0,030	2°
1-cum	-0,064		1°
5-cum	-0,051		4°

Tabla 3. Variación del potencial de pico por unidad de pH.

A partir de las pendientes obtenidas de la tabla 3, se observa que el compuesto más sensible al cambio de pH es la 1-cum. Además, este comportamiento pH-dependiente tiene relación lineal (E_p vs pH), con una pendiente de -64 mV por unidad de pH. Este comportamiento podría deberse a que, con la disminución de protones con el aumento de pH, la oxidación es menos favorecida, por lo que se observa una disminución en los potenciales de pico.

4.4 Estabilidad de los compuestos encapsulados en los electrodos modificados.

Debido a que los electrodos modificados con nanotubos de carbono funcionan reteniendo compuestos poco solubles en la red de nanotubos. En este experimento se tiene como objetivo estudiar la estabilidad de los compuestos encapsulados en el electrodo modificado. Este estudio se realizó con un electrodo de carbono vítreo modificado con NTC y dipping en nitrocompuesto. Se utilizó la técnica de voltametría cíclica (VC) y las mediciones se realizaron en una solución buffer Britton-Robinson 0,1 M a pH 7.

Cada medición voltamétrica se realizó sin sacar el electrodo de la celda, haciendo barridos de potencial cada 5 minutos para seguir la variación de la señal electroquímica en el tiempo.

En el caso de los nitrocompuestos se estudió la variación de la corriente de pico (ip) (Fig. 23 A y B). Para cada medición se utilizaron distintos electrodos, el tiempo total de medición fue 1 hora. El mismo procedimiento se realizó para la 5-cumarina (Fig. 23 C).

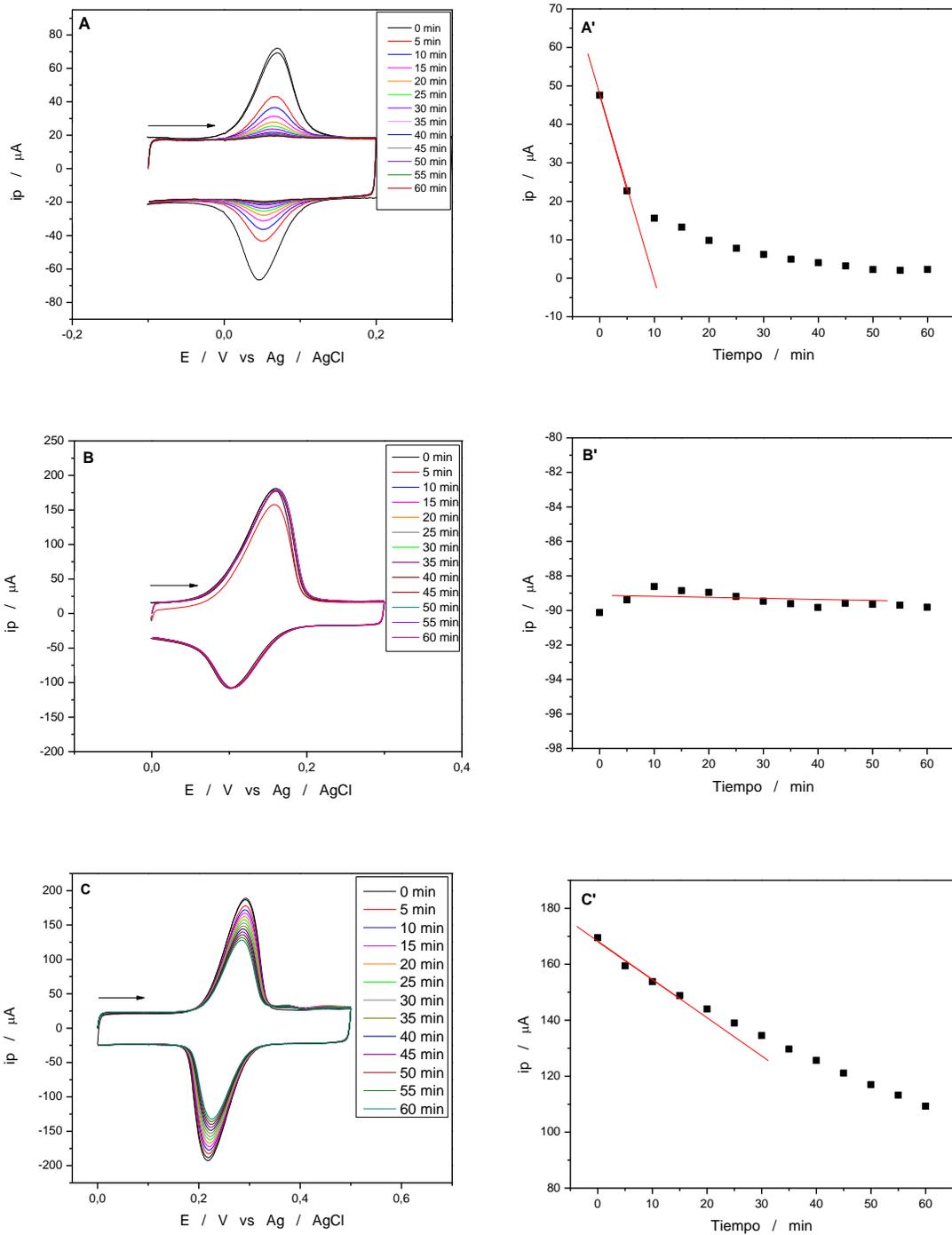


Figura 23. Voltamograma cíclico y variación de corriente pico de reducción para los electrodos GC-NTC medido en buffer B-R pH 7, a distintos tiempos. **A y A')** 1,4-DNB. **B y B')** 1,8-DNA. **C y C')** 5-cum.

Al observar los voltamogramas obtenidos en la figura 23 B, las señales de oxidación y reducción se mantienen en el tiempo sin mayor variación en la corriente, por lo que se deduce que el compuesto es retenido de manera estable por el electrodo.

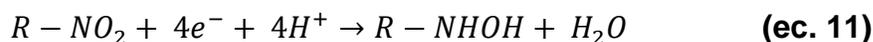
Para 1,4-DNB se observa solo en el primer barrido una señal intensa de corriente de pico del par redox. En los barridos posteriores se observa una considerable disminución en las corrientes de pico del mediador con el número de barridos aplicados. En Fig. 23 A' se observa un decaimiento de la señal de corriente es del tipo exponencial, con una tasa de disminución instantánea de pendiente $4,97 \times 10^{-6} \text{ A min}^{-1}$.

En la figura 23 C se observa una leve disminución de las corrientes de pico del par redox con los barridos a distintos tiempos, por lo que el mediador no es muy estable en el electrodo. En la Fig. 23 C' se observa una disminución constante en la corriente con una pendiente de $1,354 \times 10^{-6} \text{ A min}^{-1}$.

Por lo que, se concluye que estos compuestos 1,4-DNB y 5-cum se retienen menos en el electrodo.

4.5 Efecto de la velocidad de barrido sobre los compuestos en electrodos GC-NTC

Utilizando voltametría cíclica se evaluó el efecto de la velocidad de barrido sobre las señales del par redox de los compuestos encapsulados en el electrodo. En el caso de los nitrocompuestos, 1,4-DNB y 1,8-DNA, para generar el par redox de cada uno de ellos, se redujo solo el primer grupo nitro de cada molécula, obteniéndose el par redox nitroso/hidroxilamina (ec. 11). El efecto de la velocidad de barrido se estudió entre 50 y 1500 mV/s.



Todas las mediciones se realizaron en una celda con buffer B-R 0,1 M pH 7, por triplicado usando el mismo electrodo por cada nitrocompuesto. Las mediciones se realizaron con electrodos GC-NTC modificados por el método de dipping durante 10 segundos, en una solución de 1,4-DNB y 1,8-DNA, 1 y 0,3 mM, respectivamente. En la figura 24 se muestran los voltamogramas de los nitrocompuestos a distintas velocidades de barrido.

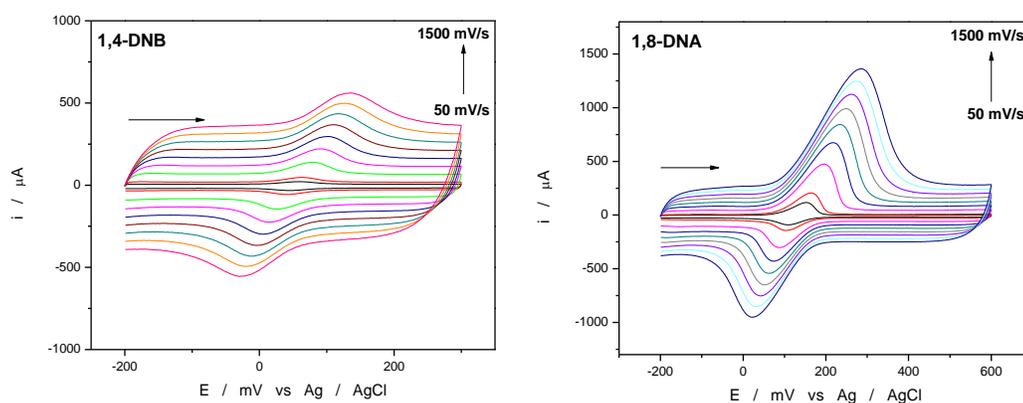


Figura 24. Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para los electrodos **A)** GC-NTC-1,4-DNB y **B)** GC-NTC-1,8-DNA, respectivamente, medidos en buffer B-R pH 7.

En la figura 24 se puede observar que, en los nitrocompuestos, las corrientes de oxidación y reducción del par redox aumentan con el aumento de la velocidad de barrido. Además, se observó un desplazamiento de los potenciales de pico anódico y catódico, hacia potenciales más positivos y negativos respectivamente, con el aumento de la velocidad de barrido.

Para las mediciones de la 5-cum, compuesto no nitrado, se evaluó por voltametría cíclica el efecto de la velocidad de barrido sobre las señales del par redox (Fig. 25). Las mediciones se realizaron con electrodos GC-NTC modificados por el método de dipping durante 10 s, en una solución de 5-cum 1 mM en acetonitrilo. Todas las mediciones se realizaron en una celda con buffer B-R 0,1 M pH 7 por triplicado, usando electrodos GC-NTC.

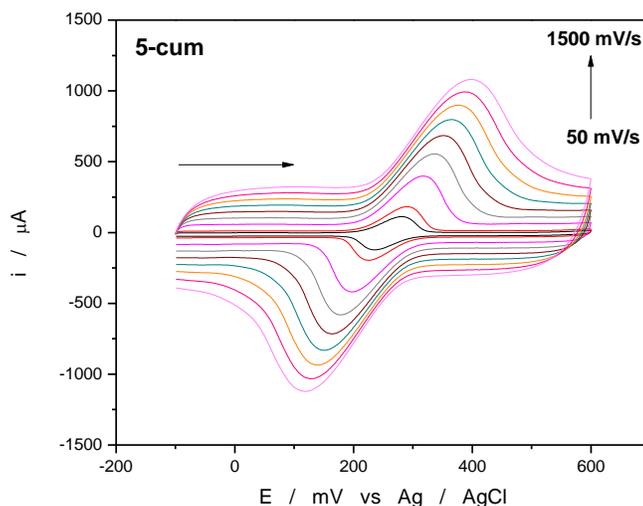


Figura 25. Voltamograma cíclico a distintas velocidades de barrido para los electrodos GC-NTC-5-cum medidos en buffer B-R pH 7.

En la figura 25 se puede observar el mismo comportamiento que en los nitrocompuestos (Fig. 24). Al aumentar la velocidad de barrido se observa un aumento en el par redox y un desplazamiento de los potenciales de pico anódico, hacia potenciales más positivos y un desplazamiento del pico catódico hacia potenciales menos positivos.

4.6 Determinación de la constante de transferencia heterogénea k_h

Para la reacción de electrocatálisis, los compuestos deben actuar como mediadores de la transferencia de electrones del proceso. Por lo que conocer la constante de transferencia heterogénea nos da información de que mediadores interactúan mejor con los NTC. El coeficiente de transferencia de carga, α , y la constante de transferencia heterogénea del proceso redox, k_h , pueden ser obtenidos experimentalmente utilizando el método de Laviron. El cual se aplica para especies adsorbidas en electrodos. El método de Laviron permite calcular el coeficiente de transferencia de carga, la cual es una medida de la simetría de la barrera de energía de la reacción redox. Para la determinación de k_h es necesario determinar el valor de α , el cual se determina a partir del gráfico de potencial de pico, E_p , frente al logaritmo de la velocidad de barrido.

A partir de las figuras 24 y 25, se obtuvieron los datos de los potenciales de picos anódicos y catódicos, a distintas velocidades de barrido, $E_{p,a,c}$ versus $\log v$ (figura 26).

Según el método de Laviron se deben usar datos con $\Delta E_p \gg (200/n)$, donde n es el número de electrones transferidos. Tanto para las reacciones del par redox nitroso/hidroxilamina y para la cumarina, hay 2 electrones transferidos, por lo tanto, $n=2$, y se usa $\Delta E_p \gg 100$ mV en el cálculo de la constante de transferencia heterogénea k_h . Estas condiciones se cumplen a altas velocidades de barrido con un comportamiento lineal entre E_p y $\log v$. A continuación, se presentan las regresiones lineales en el gráfico de E_p versus $\log v$ (figura 26). Cada punto en los gráficos se hizo por triplicado.

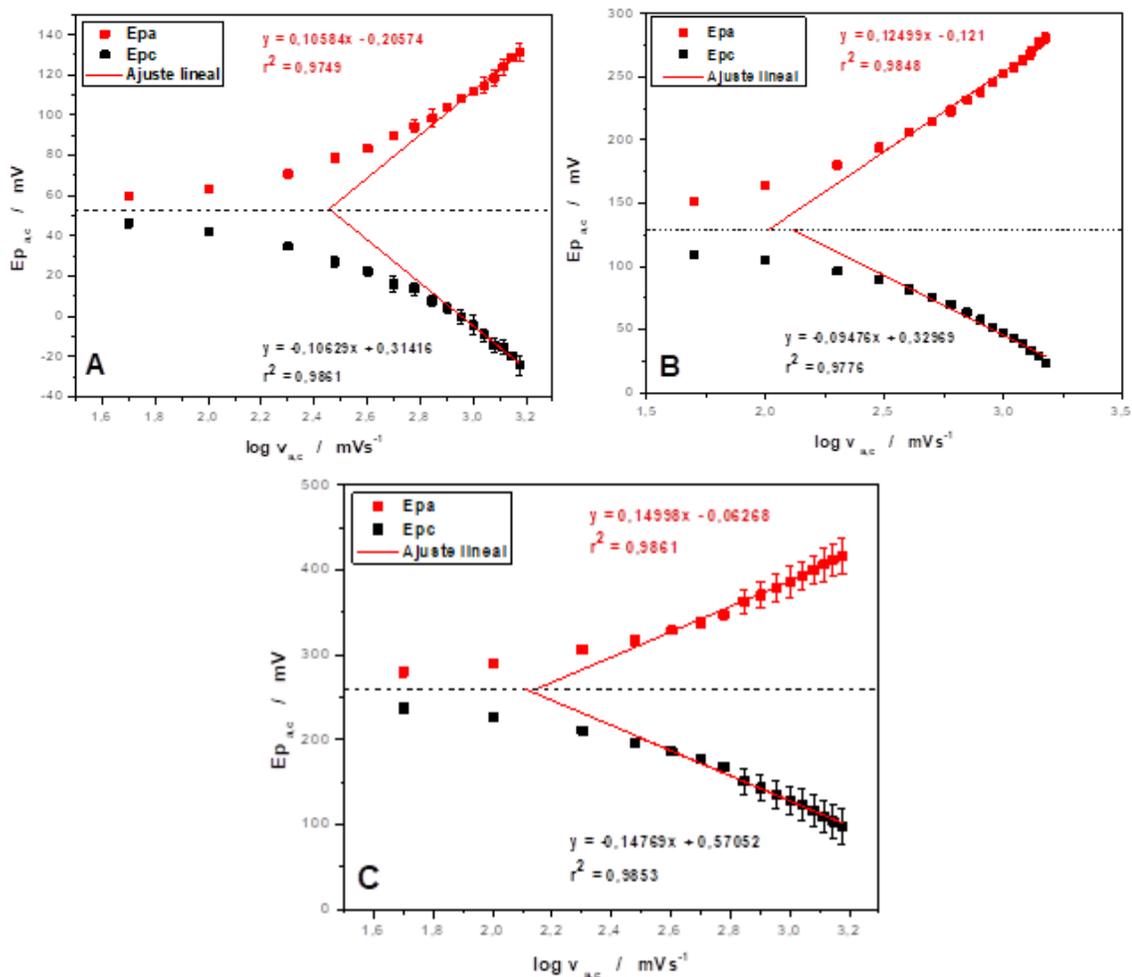


Figura 26. Variación del potencial de pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido anódico y catódico. **A)** 1,4-DNB. **B)** 1,8-DNA. **C)** 5-cum.

A partir de la figura 26 se obtuvieron las pendientes de las rectas, de las cuales al utilizar las ecuaciones 12 y 13, se obtuvo α anódico o catódico, respectivamente.

Caso anódico:
$$ma = \frac{2,3RT}{(1-\alpha)nF} \quad (\text{ec. 12})$$

Caso catódico:
$$mc = \frac{-2,3RT}{\alpha nF} \quad (\text{ec. 13})$$

Donde:

m: es la pendiente, anódica o catódica dependiendo del caso.

R: Constante Universal de los gases, 8,314 (J/molK).

T: temperatura, 298 (K).

n: número de electrones transferidos, n = 2.

F: constante de Faraday, 96500 (C/mol).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

	Pendiente anódica	α_a	Pendiente catódica	α_c
A) 1,4-DNB	0,11	0,72	-0,11	0,28
B) 1,8-DNA	0,13	0,76	-0,95	0,31
C) 5-cum	0,15	0,80	-0,15	0,20

Tabla 4. Resultados obtenidos para la pendiente de la recta anódica y catódica, y su respectivo valor de α para los distintos compuestos.

Los α anódicos (tabla 4) obtenidos para todos los compuestos encapsulados en los electrodos GC-NTC, 1,4-DNB, 18-DNA y 5-cum, son aproximadamente igual a 0,8, el cual es el valor más cercano a 1, lo que indica que el intermediario es más parecido a los productos. Por otra parte, los α catódicos (tabla 4) son cercanos a 0,3 en el caso de los nitrocompuestos y 0,2 en el caso de la cumarina (valores cercanos a 0, para todos los compuestos), lo que indicaría que los intermediarios formados en la reducción son más parecidos a los reactantes.

A partir de los datos obtenidos de la tabla 4, se calcularon las velocidades de barrido anódico y catódico. Estas velocidades de barrido se calcularon a partir de las ecuaciones obtenidas de las regresiones, a continuación, se muestra un ejemplo, utilizando los datos obtenidos del compuesto 1,4-DNB.

Caso anódico:
$$E_{pa} = 0,10584 \log v_a - 0,20574 \quad (\text{ec. 14})$$

Caso catódico:
$$E_{pc} = -0,10629 \log v_c + 0,31416 \quad (\text{ec. 15})$$

A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

	Epa/ Epc (V)	v _a (mV/s)	v _c (mV/s)
A) 1,4-DNB	0,053	279,4	285,4
B) 1,8-DNA	0,131	103,1	126,0
C) 5-cum	0,258	137,8	130,3

Tabla 5. Resultados obtenidos para la pendiente de la recta anódica y catódica, y su respectivo valor de α para los distintos compuestos.

Una vez obtenidas las velocidades para los procesos de oxidación y reducción (tabla 5), se procede a calcular la constante de transferencia, k_h . Utilizando las ecuaciones 16 y 17.

Caso anódico:
$$k_{ha} = \frac{(1-\alpha_a)nFv_a}{RT} \quad (\text{ec. 16})$$

Caso catódico:
$$k_{hc} = \frac{\alpha_c nFv_c}{RT} \quad (\text{ec. 17})$$

A continuación, se muestran los resultados obtenidos, a partir de las ecuaciones 16 y 17.

	K _{ha} (s ⁻¹)	K _{hc} (s ⁻¹)	K _h (s ⁻¹)
A) 1,4-DNB	6,09	6,23	6,16
B) 1,8-DNA	1,93	3,04	2,49
C) 5-cum	2,15	2,03	2,09

Tabla 6. Resultados obtenidos para la constante de transferencia anódica y catódica.

En la tabla 6 se observa que el compuesto con mayor valor de k_h , es decir, que transfiere los electrones a una mayor velocidad es el 1,4-DNB con 6,16 s⁻¹, a continuación le sigue 1,8-DNA con 2,49 s⁻¹ y la 5-cum con 2,09 s⁻¹. Por lo tanto, el compuesto más eficiente como mediador redox, en términos de velocidad de transferencia, es la 1,4-DNB.

Al observar los datos reportados en tesis Inostroza R., E. G. 2016. Compuestos polinitrados como mediadores electrocatalíticos de NADH en electrodos modificados con nanotubos de carbono. Memoria de Químico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas., el nitrocompuesto con el mayor valor de k_h , es el 1,3-dinitrobenzono (DNB) con 5,08 s⁻¹, luego le sigue 1,3,5-trinitrobenzono (TNB) con 4,36 s⁻¹ y ácido

dinitrobenceno (3,5-DNB) con $4,16 \text{ s}^{-1}$. En este caso el compuesto más eficiente como mediador electrocatalítico es el DNB.

Al comparar los valores obtenidos con los valores reportados GC-NTC modificados con DNB como mediador redox del NADH ($k_h = 5,08 \text{ s}^{-1}$), se obtuvieron valores mucho mayores. Lo que implica que el compuesto más eficiente como mediador electrocatalítico, comparado con los datos de la referencia sería el 1,4-DNB.

4.7 Caracterización electroquímica del NADH

Mediante voltametría cíclica se estudió la respuesta electroquímica del NADH sobre un electrodo GC-NTC. La medición se realizó en una celda con solución de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. En la figura 27 se muestra el voltamograma cíclico característico de NADH 3 mM en buffer B-R 1 M pH 7.

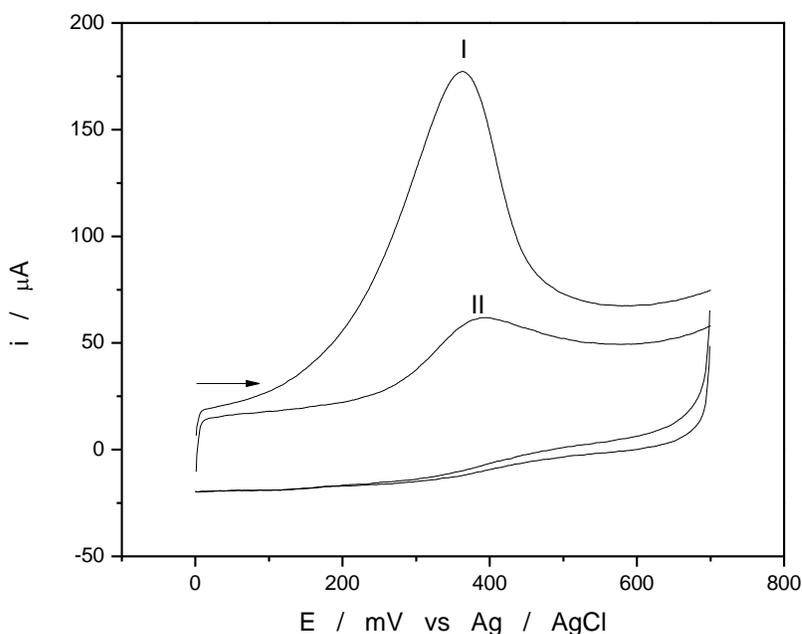
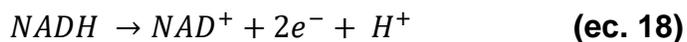


Figura 27. Voltamograma cíclico del NADH sobre electrodo GC-NTC en buffer B-R 0,1 mM pH 7.

En el primer barrido de oxidación del NADH (señal I, Fig. 27), se observa una señal a un potencial de 370 mV. En el segundo barrido anódico se observa la misma señal, pero con menor intensidad de corriente, esto se debe a la lenta renovación del NADH en el electrodo desde el seno de la solución (señal II, Fig. 27) [37].

El proceso de oxidación del NADH involucra dos electrones y un protón para formar la especie oxidada NAD^+ . El proceso de oxidación se describe a continuación (ec. 18).



4.8 Electrocatalisis de electrodos modificados con NTC con diferentes mediadores sobre NADH

En este estudio se evaluó la posibilidad de que los pares redox generados electroquímicamente, a partir de los nitrocompuestos y las cumarinas encapsulados, en los NTC puedan actuar como mediadores de reacciones electroquímicas de un compuesto de interés biológico como el NADH. El nitrocompuesto encapsulado en el electrodo fue evaluado como mediador electroquímico, después de la reducción electroquímica de uno de sus grupos nitro. En este experimento se utilizaron dos celdas, una de ellas con solución buffer B-R 1 M pH 7 y la otra con NADH 3 mM (Fig 28).

En la celda que contiene el buffer se utilizó un electrodo modificado con nanotubos de carbono previamente sumergido en una solución de nitrocompuesto por 10 segundos, para encapsular el compuesto y formar electroquímicamente el derivado hidroxilamina o nitroso encapsulado en la red de nanotubos de carbono.

En la figura 28 se observan en línea segmentada los voltamogramas que muestran la modificación electroquímica de los electrodos GC-NTC con el mediador redox hidroxilamina/nitroso en buffer B-R 0,1 M pH 7. En estos voltamogramas se observa que las señales del mediador tienen mayor intensidad de corriente que los obtenidos en presencia de NADH. En línea continua se observa que en el primer barrido de potencial aparece la señal de oxidación de NADH electrocatalizado (señal I, continua Fig. 28) más intensa que en el segundo barrido de potencial, esta señal se observa en un potencial cercano al del mediador redox (señal IV en A y señal III en B, de la Fig. 28).

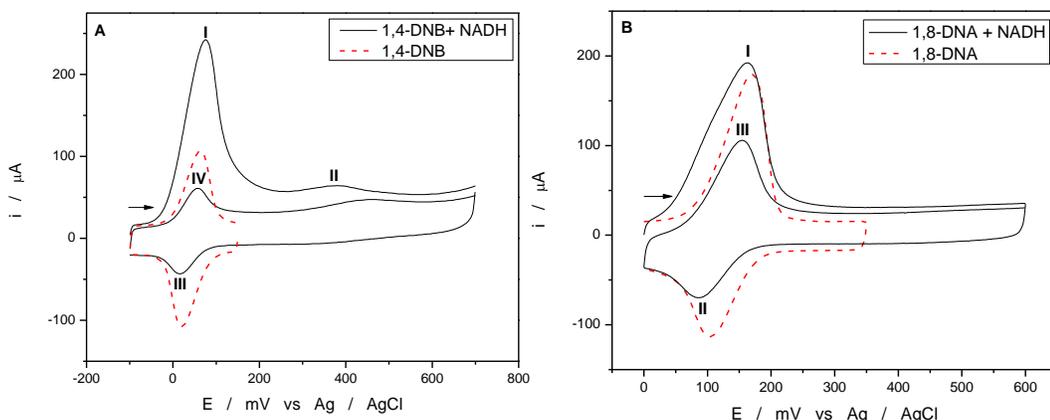


Figura 28. Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC-Mediador. En línea segmentada, el par redox hidroxilamina/nitroso para cada compuesto medido en buffer B-R 0,1 M pH 7. En línea continua, electrodos con par redox encapsulado en el electrodo (GC-NTC-Mediador) medido en una solución NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. **A)** Electrodo GC-NTC-1,4-DNB **B)** GC-NTC-1,8-DNA.

En la figura 28 A se observa en línea continua el primer barrido, donde la señal I corresponde a la oxidación del mediador y al NADH electrocatalizado, la señal II a 373 mV corresponde a la oxidación del NADH sin electrocatalizar con una intensidad de corriente muy baja (señal II, Fig. 28 A), la señal III corresponde a la reducción del mediador (de nitrosos a hidroxilamina) y la señal IV corresponde a la oxidación del mediador (de hidroxilamina a nitroso). En cambio, en el caso del voltamograma figura 28 B no aparece la señal característica del NADH. Para ambos casos se indicaría una actividad electrocatalítica por parte de los mediadores redox, desplazando el potencial de oxidación del NADH a un potencial cercano al del mediador.

Al observar el voltamograma obtenido en la figura 28 A se puede determinar la corriente electrocatalítica, la cual corresponde a la diferencia entre el primer y segundo barrido con sentido positivo (corrientes de la señal I – señal IV, en Fig. 28 A). Y donde el par redox (señales III y IV, en Fig. 28A) corresponde a la señal del mediador encapsulado en el electrodo. Esto indica que no se observa electrocatálisis en un barrido de oxidación consecutivo.

Para el caso de las cumarinas los experimentos se realizaron en una celda con solución de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7, para cada medición se usaron distintos electrodos GC-NTC. En cada experimento el electrodo GC-

NTC es sumergido por 10 segundos en solución de 1-cum y 5-cum, luego es lavado con abundante agua y llevado a la celda que contiene NADH (Fig. 29).

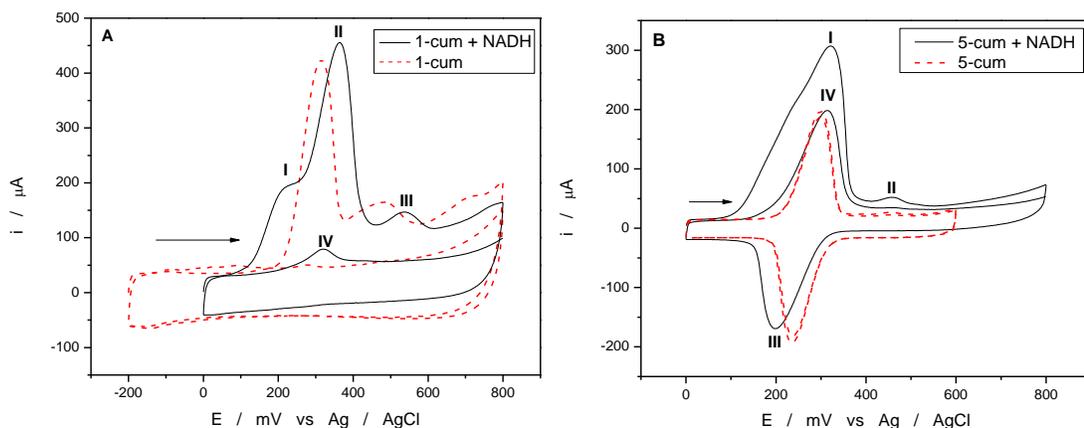


Figura 29. Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC-Mediador. En línea discontinua, sin NADH. En línea continua, en presencia de NADH. **A)** electrodo GC-NTC-1-cum. **B)** GC-NTC-5-cum.

En la figura 29 A, se observan varias señales en el barrido de oxidación, las cuales corresponden a las señales de la 1-cumarina y la del NADH.

En la figura 29 B, se muestran los voltamogramas cíclicos de la 5-cum y la 5-cum en presencia de NADH. Cuando la cumarina está en presencia de NADH, la señal obtenida en el primer barrido de oxidación es más ancha y más alta, con una preonda en la señal I. La señal de oxidación en línea segmentada de la 5-cum, se observa en el mismo potencial del NADH en presencia de 5 cum. La señal de 5-cum es reversible con corrientes de oxidación y reducción equivalentes en intensidad de corriente. En presencia de NADH la señal de oxidación siempre es más intensa debido a NADH.

Las comparaciones como la de la figura 29, son necesarias para las cumarinas porque en los nitrocompuestos se puede detectar con claridad la señal que corresponde a NADH y cual señal corresponde al mediador. Sin embargo, en las cumarinas la diferencia no es clara, debido a que la electroquímica de una de las cumarinas es del tipo irreversible y la otra del tipo reversible. Además, el desplazamiento de la señal de NADH está en la zona de potenciales de las cumarinas. Más adelante se mostrará la diferencia entre la corriente catalítica y la corriente de oxidación del mediador.

4.9 Estudio de las señales a distintos tiempos de interacción en NADH

El tiempo de inmersión del electrodo GC-NTC en NADH tiene directa relación con la corriente de pico de la señal de oxidación del NADH. Este experimento tiene como objetivo estudiar el efecto del tiempo de interacción del electrodo GC modificado con nanotubos de carbono y mediador (GC-NTC-Med) en la electrocatálisis de NADH, antes de aplicar el barrido de potencial.

El experimento se realizó con un electrodo modificado con el mediador redox. La modificación para los nitrocompuestos se realizó mediante dipping por 10s. posteriormente el electrodo es lavado con abundante agua y sumergido en una celda que contiene buffer B-R 0,1 M pH 7, aplicando un barrido de potencial que permita reducir un solo grupo nitro presente en la molécula del nitrocompuesto encapsulado en los intersticios de los NTC, y así generando el correspondiente mediador redox. Luego este mismo electrodo es colocado en la celda que contiene NADH 3 mM en B-R 0,1 M pH 7, donde es medido a distintos tiempos de interacción. En el caso de las cumarinas, estas fueron modificadas mediante dipping por 10 s, lavado con abundante agua y sumergido en celda que contiene NADH 3 mM en B-R 0,1 M pH 7 [37].

En la figura 30, 31 y 33 se muestran los voltamogramas cíclicos de los electrodos modificados (GC-NTC-Med) con distintos tiempos de interacción en NADH.

a) 1,4-DNB y 1,8-DNA

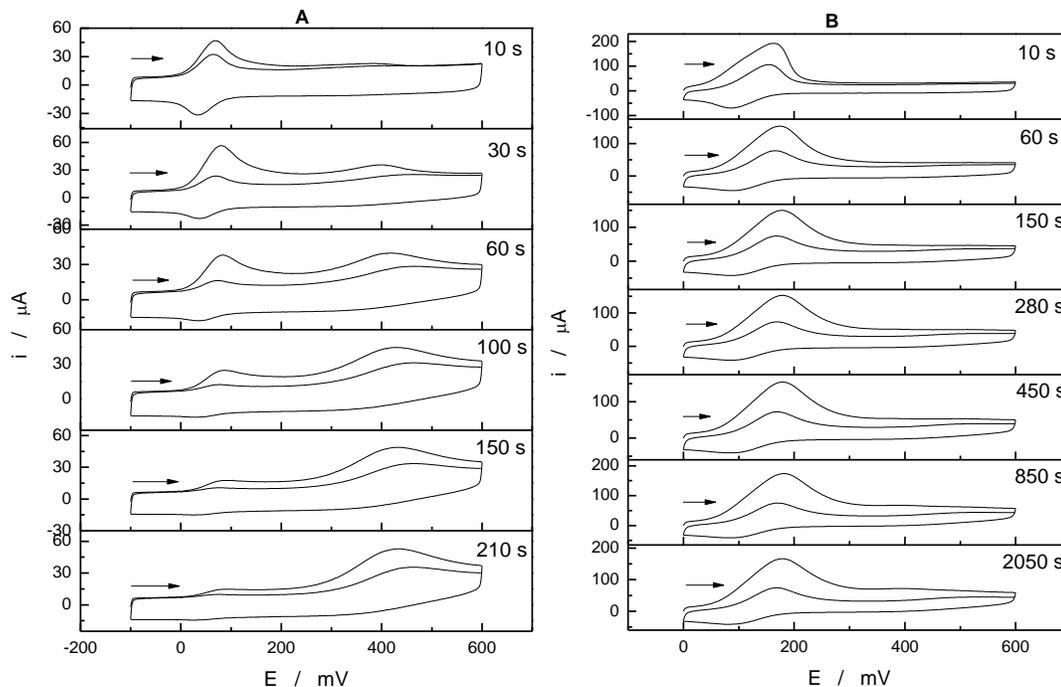


Figura 30. Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC medido a distintos tiempos de interacción con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. **A)** 1,4-DNB. **B)** 1,8-DNA.

En la figura 30 A se puede observar la variación de la señal electrocatalítica del NADH ($E_p = 70$ mV) en el potencial de oxidación del mediador, en cambio la señal de oxidación del NADH sin electrocatalizar se observa en $E_p = 400$ mV. Además, el máximo de corriente catalítica i_p , del conjunto Med-NADH se obtiene a los 10 segundos de inmersión del electrodo previo a la aplicación del barrido de potencial en NADH. Para tiempos mayores de inmersión se observó una disminución de las i_p catalíticas Med-NADH. Desde los 30 segundos de interacción, se observó un aumento de la señal del NADH sin electrocatalizar ($E_p = 400$ mV). Esto indica una disminución del mediador en el electrodo, a medida que avanza el tiempo de interacción con NADH, lo cual sugiere que el mediador difunde desde el electrodo hacia la solución en presencia de NADH.

En B se puede observar que cuando se usa 1,8-DNA como mediador, se observa que la mayor corriente catalítica se observa a los 10 segundos de inmersión ($E_p = 160$ mV). La señal de corriente de oxidación del NADH sin

electrocatalizar ($E_p = 400$ mV) aparece al cabo de 850 segundos de inmersión del electrodo, aumentando un poco hasta los 34 min de duración del experimento. La señal del mediador disminuye poco a poco con el tiempo de interacción.

b) 1-cum

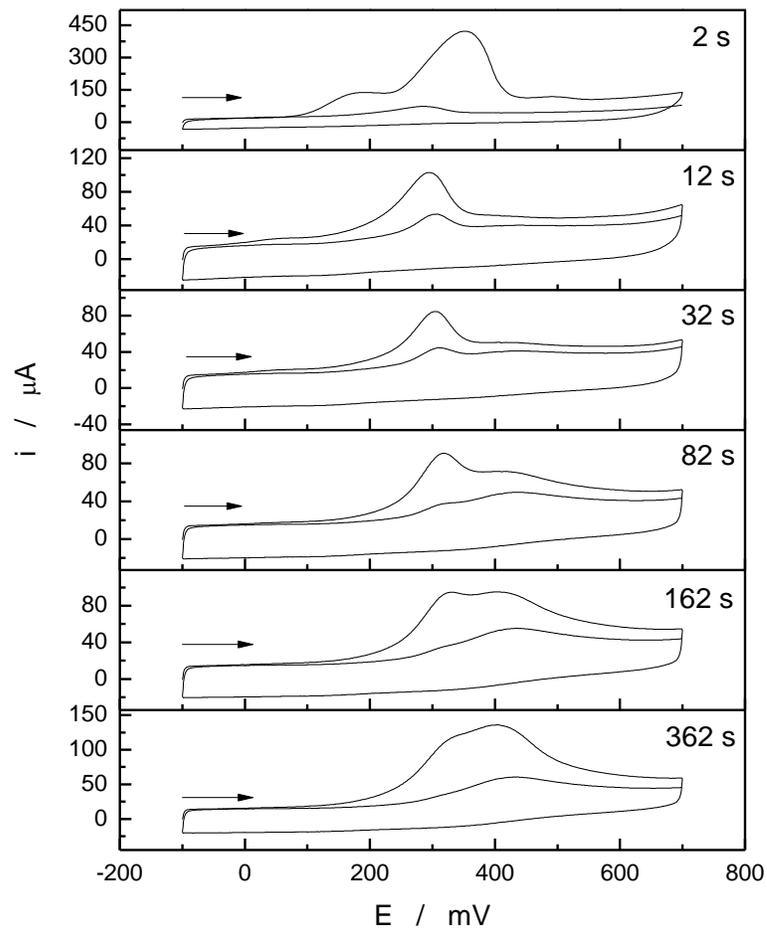


Figura 31. Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC-1-cum medido a distintos tiempos de interacción con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

En los voltamogramas obtenidos de la figura 31 se observa la electrocatálisis del compuesto a los 2 segundos. En un posterior barrido se observa que el compuesto inicial ya no se encuentra en el del electrodo, debido a un proceso de desorción, que muestra la disminución en la corriente. A los 33 segundos de

la primera medición se puede observar la señal del NADH sin electrocatalizar. Después de 82 segundos la señal es más clara a un potencial de 300 mV. En el último voltamograma (a los 362 segundos) se puede observar un aumento en la corriente, por lo que se puede deducir que del compuesto ya no se encuentra en la superficie del electrodo y el NADH sin electrocatalizar está aumentando.

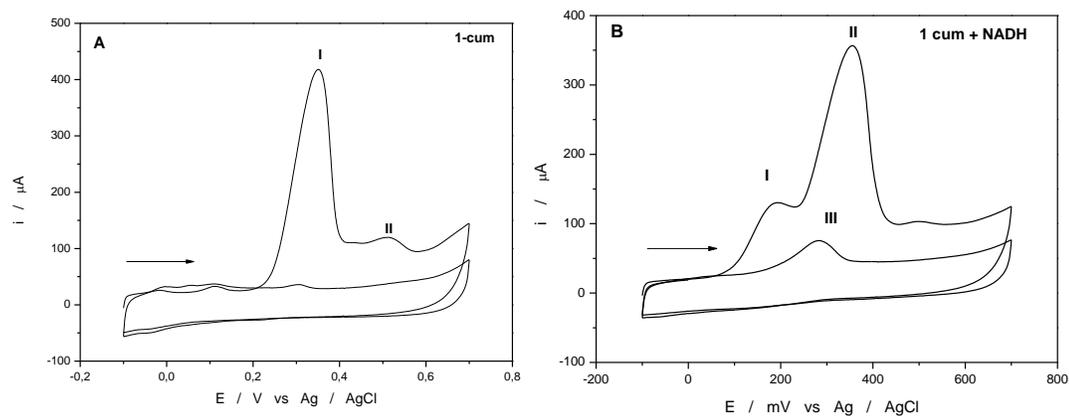


Figura 32. Voltamograma cíclico en electrodo GC-NTC. **A)** 1-cum. **B)** 1-cum con NADH.

El voltamograma característico de la 1-cum se muestra en la figura 32 A, donde se observan las señales características de la 1-cum en electrodos con GC-NTC, en ausencia de NADH, al comparar con el voltamograma obtenido en la figura 32 B donde se puede ver que cuando hay interacciones entre la 1-cum y el NADH (Fig. 32 B), la señal de la 1-cum se divide en 2 señales de diferente intensidad de corriente, las señales I y II. La señal III, es mucho más baja, la cual correspondería al mediador. Como también podría corresponder al NADH.

c) 5-cum

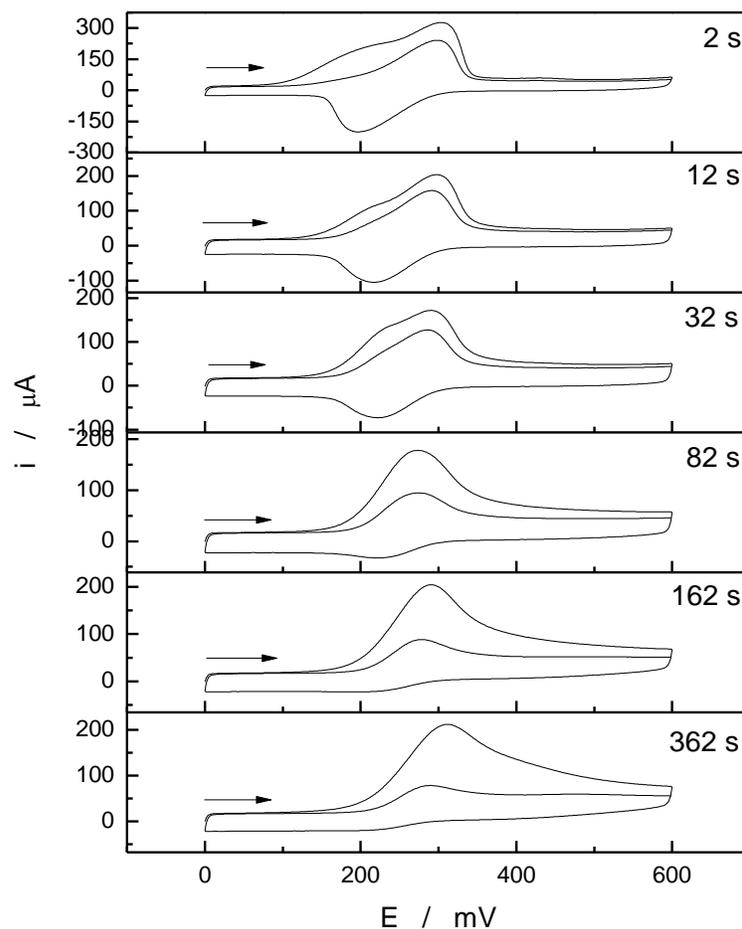


Figura 33. Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC-5-cum medido a distintos tiempos de interacción con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

En la figura 33 a los dos segundos de inmersión se puede observar la señal electrocatalítica de NADH, la cual solo cambia en la intensidad de corriente hasta los 82 segundos de interacción del electrodo con el NADH. A los 82 segundos se observa que en el segundo barrido disminuye en la intensidad de corriente, lo cual sería un indicador de una reacción química que genera productos no electroquímicamente activos, ya que desaparece la corriente catódica.

4.10 Determinación de la concentración mínima de mediador para electrocatálisis de NADH

Con el objetivo de encontrar la concentración mínima de nitrocompuesto capaz de electrocatalizar todo el NADH presente en el electrodo con NTCs, se estudió la variación de la concentración del nitrocompuesto en los electrodos GC-NTC-Med. El experimento se realizó utilizando una concentración fija de NADH de 3 mM en buffer B-R siguiendo la metodología de “Estudios de electrocatálisis”, descrita en el punto 3. En las siguientes figuras se muestran los voltamogramas cíclicos a diferentes concentraciones de mediador en electrodos GC-NTC, medidos en celdas con NADH 3 mM en B-R 0,1 M pH 7 con el tiempo de interacción optimizado para cada compuesto durante 10 segundos.

En este experimento las concentraciones del mediador se disminuyen hasta que aparece la señal del NADH sin electrocatalizar. Las concentraciones utilizadas aparecen en la figura 34 para cada mediador, respectivamente.

Para el caso de la cumarina, esta se analizó solo en la celda con NADH, descrita en el punto 2 y se utilizó un tiempo óptimo de inmersión en la celda de 10 segundos.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

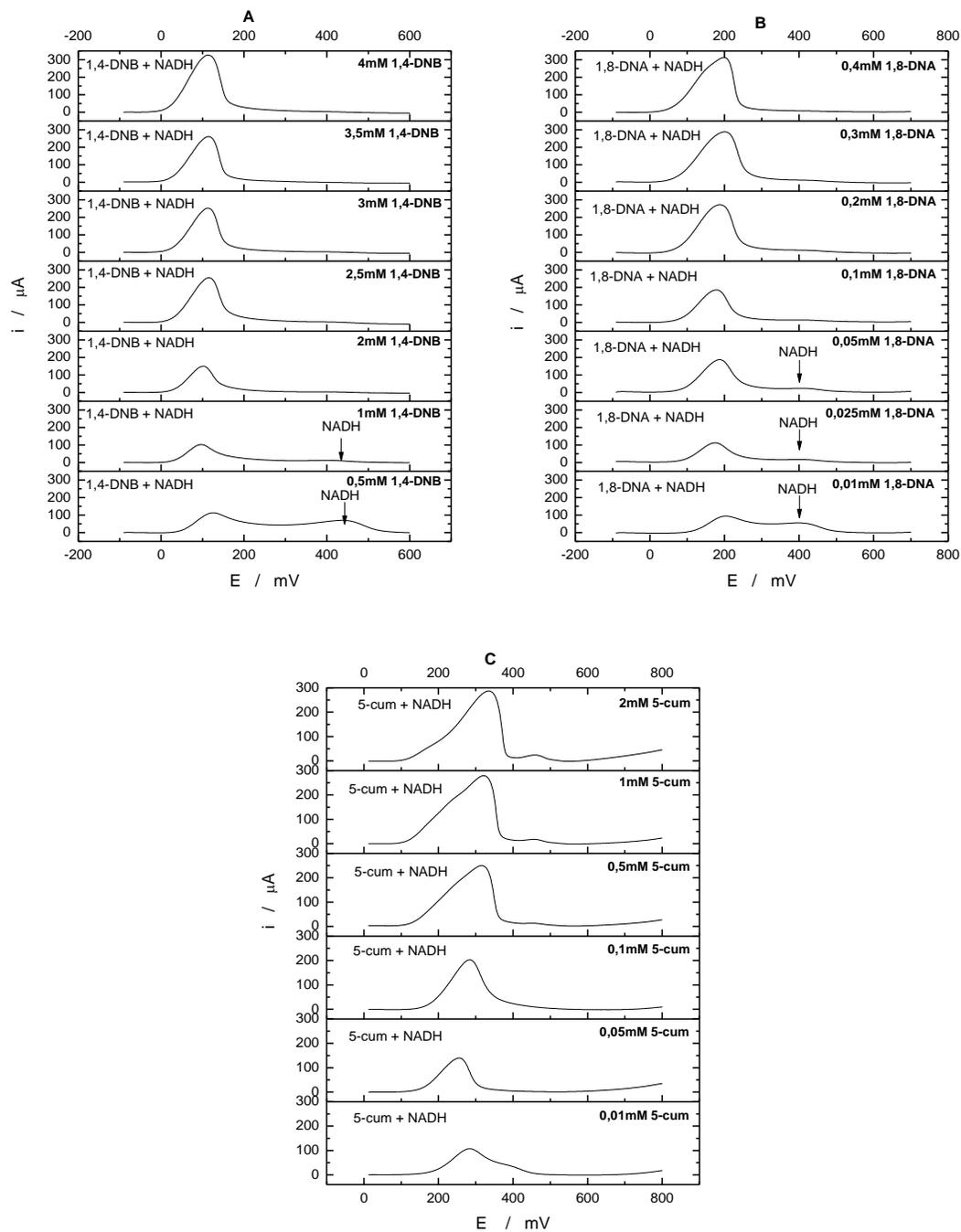


Figura 34. Voltamograma de electrodos GC-NTC-Med modificados con distintas concentraciones de mediador a una concentración constante de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. **A)** 1,4-DNB. **B)** 1,8-DNA. **C)** 5-cum.

En la figura 34, se observan los voltamogramas cíclicos de oxidación de mediador en presencia de NADH, a distintas concentraciones de mediador. Donde a medida que disminuye la concentración, también lo hace la corriente y aparece la señal de NADH sin electrocatalizar. Se observa que la concentración mínima de 1,4-DNB y 1,8-DNA, es de 2 mM y 0,1 mM, respectivamente, concentraciones en las cuales no se observa la señal de NADH sin electrocatalizar.

Para el caso de la 5-cum se puede observar cualitativamente que existe un cambio en las señales voltamétricas a medida que se disminuyen las concentraciones de cumarina. A medida que va disminuyendo la concentración, disminuye la corriente.

4.11 Efecto de la concentración de NADH sobre el electrodo GC-NTC-Med

A partir del estudio anterior 4.10 se determinó la concentración mínima de mediador requerida para la electrocatalisis de NADH, en estos experimentos se busca determinar la concentración máxima de NADH que puede electrocatalizar esta cantidad de mediador bajo las mismas condiciones.

Para esto se realizó un experimento para estudiar la variación de la concentración de NADH en electrodos modificados GC-NTC-Med, se utilizó la concentración mínima de mediador ya determinado anteriormente. En las figuras A y B se muestran los voltamogramas cíclicos obtenidos al variar la concentración de NADH. En todos los experimentos, las concentraciones de mediador fueron 2 mM para 1,4-DNB (Fig. 35 A), 0,1 mM para 1,8-DNA (Fig. 35 B), 0,3 mM para 1-cum (Fig. 36 A) y 0,05 mM para 5-cum (Fig. 36 B), en buffer B-R 0,1 M pH 7.

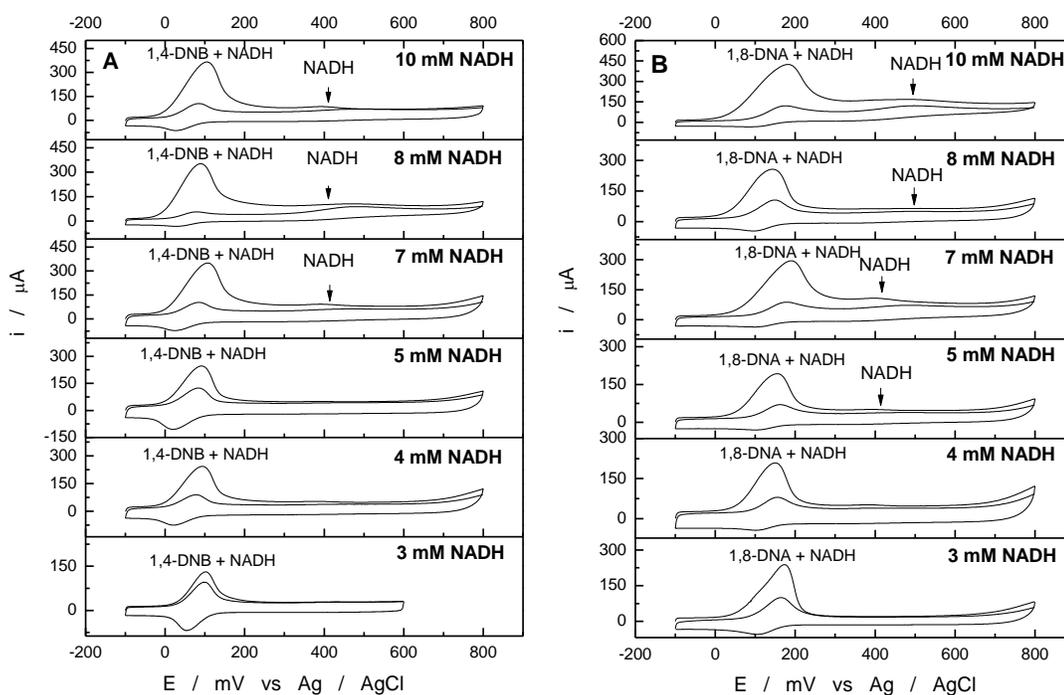


Figura 35. Voltamograma cíclico a distintas concentraciones de NADH en buffer B-R 0,1 M pH 7 a una concentración fija de **A)** 1,4-DNB 2 mM y **B)** 1,8-DNA 0,1 mM, en electrodos GC-NTC.

En la figura 35 se observa un aumento de corriente de la señal de NADH sin electrocatalizar cercana a 400 mV, al aumentar la concentración de NADH en la celda.

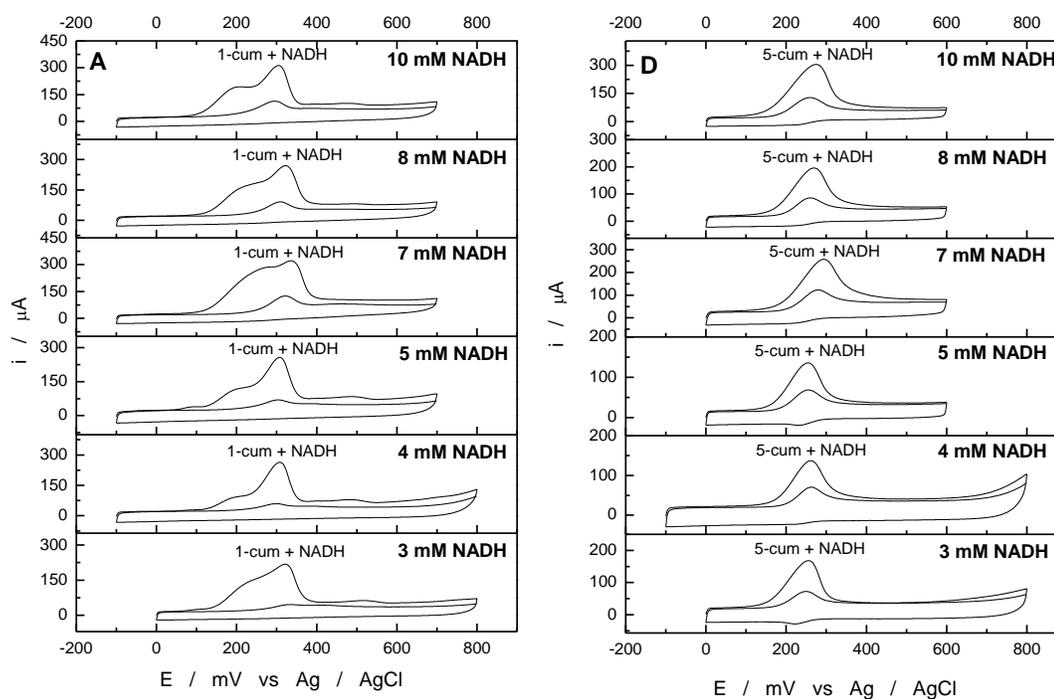


Figura 36. Voltamograma cíclico a distintas concentraciones de NADH en buffer B-R 0,1 M pH 7 a una concentración fija de **A)** 1-cum 0,3 mM y **B)** 5-cum 0,05 mM, en electrodos GC-NTC.

Se observa para la figura 36 A un cambio entre los voltamogramas cíclicos con la variación de las concentraciones de NADH. Como la señal de la cumarina sale en potenciales cercanos a los potenciales de NADH sin electrocatalizar ($E_p = 400$ mV) no es posible determinar con claridad las señales. Además, las corrientes picos se mantienen constantes al ir aumentando las concentraciones de NADH.

En el caso de la figura 36 A y B se observa el mismo comportamiento en todos los voltamogramas cíclicos con la variación de las concentraciones de NADH. Al igual que en el caso anterior no se puede determinar NADH sin electrocatalizar.

4.12 Determinación de la constante de velocidad k_s del NADH

Para este experimento se estudió la respuesta electroquímica de NADH sobre un electrodo GC-NTC (Fig. 37), a distintas velocidades de barrido con el objetivo de utilizar el método de Laviron en la determinación de la constante de velocidad heterogénea.

Las mediciones se realizaron en una celda electroquímica con solución NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. Los barridos electroquímicos se inician después de 3 minutos de la inmersión del electrodo en la celda con NADH. Se aplican barridos de velocidad desde 50 mV a 1500 mV, el electrodo no se retiró de la celda, una vez realizado el primer voltamograma a velocidad de barrido de 50 mV se inicia el siguiente voltamograma a velocidad de 100 mV, y así consecutivamente, hasta llegar a velocidad máxima (1500 mV). Las mediciones se realizaron con tres electrodos, para obtener un triplicado de las mediciones. Para evaluar la constante cinética del proceso se utilizó la ecuación de Laviron (ec. 14):

$$E_p = E^0 + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{RTk_s}{\alpha nF} - \frac{RT}{\alpha nF} \ln v \quad (\text{ec. 14})$$

Donde α es el coeficiente de transferencia de electrones, k_s la constante de velocidad estándar de la reacción de superficie, v la velocidad de barrido, E^0 el potencial formal y n el número de electrones transferidos [38]. De acuerdo con la ecuación 14, el gráfico de E_p vs $\ln v$ debe ser lineal para los voltamogramas a diferentes velocidades de barrido. El valor α se puede determinar a partir de la pendiente y el valor de k_s se puede calcular a partir del intercepto. El valor de E^0 se puede determinar a partir de E_p vs. v extrapolando la línea a $v = 0$.

Los voltamogramas cíclicos del experimento se muestran en la figura 37.

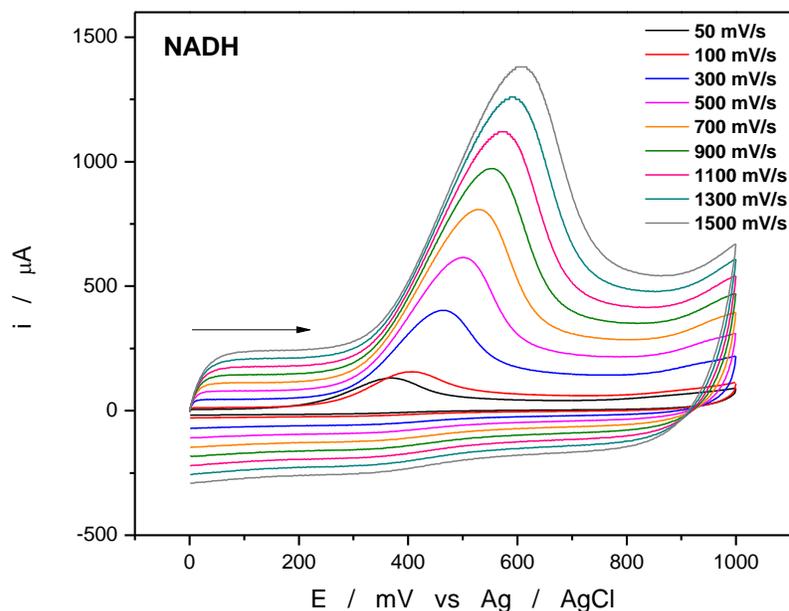


Figura 37. Voltamograma cíclico del NADH sobre electrodo GC-NTC en buffer B-R 0,1 M pH 7, velocidad de barrido desde 50 mV hasta 1500 mV.

En la figura 37 se observa que, al aumentar la velocidad de barrido, aumenta la corriente anódica y, además, se observa un desplazamiento en los potenciales al aumentar la velocidad de barrido. A partir de la figura 37 se grafican los potenciales de pico versus la velocidad de barrido, obteniéndose la figura 38.

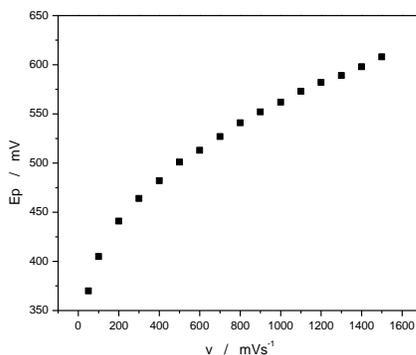


Figura 38. Relación entre el potencial de pico y la velocidad de barrido del NADH.

En la figura 38 se puede observar que la relación entre el potencial de pico y la velocidad de barrido del NADH no es lineal en los primeros puntos (aproximadamente entre 0 y 200 mV/s⁻¹). Por lo que, para la determinación de la constante heterogénea, se determina donde es lineal entre 200 mV/s⁻¹ y 500 mV/s⁻¹. Tomando los potenciales de pico y las velocidades de barrido descritas anteriormente se obtuvo la figura 39.

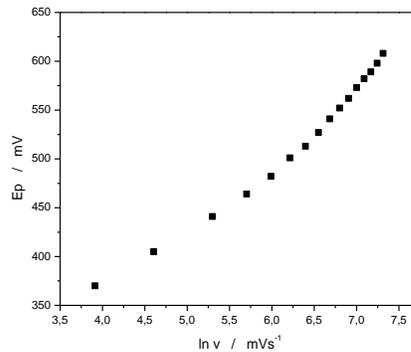


Figura 39. Relación entre el potencial pico y el logaritmo natural de la velocidad de barrido del NADH.

Al observar los datos obtenidos en la figura 38 y 39, se puede observar que no es lineal por lo que se escogieron valores de velocidad de barrido desde 200 mV/s⁻¹ hasta 500 mV/s⁻¹, como se observa en la figura 40. Los valores de baja velocidad con tendencia lineal permiten obtener una buena aproximación de E° cuando v = 0. Con esta aproximación se puede resolver la ecuación de Laviron (ec. 14) [38].

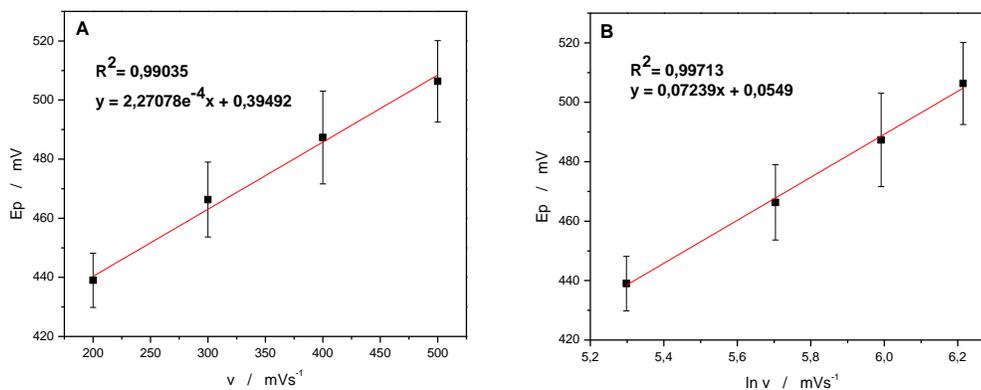


Figura 40. A) Relación entre el potencial pico y la velocidad de barrido del NADH, **B)** Relación entre el potencial pico y el logaritmo natural de la velocidad de barrido del NADH, para velocidad de barrido entre 200 mV y 500 mV.

La Fig. 40 A muestra las gráficas de potencial de pico versus el logaritmo natural de la velocidad del pico anódico, mientras que en la figura 40 B se observa el potencial de pico versus la velocidad para el pico anódico.

En la figura 41 se observan los resultados de la repetición del experimento anteriormente mencionado en electrodos de carbono vítreo (resultados vistos en figura 37), las mediciones se hicieron bajo los mismos parámetros.

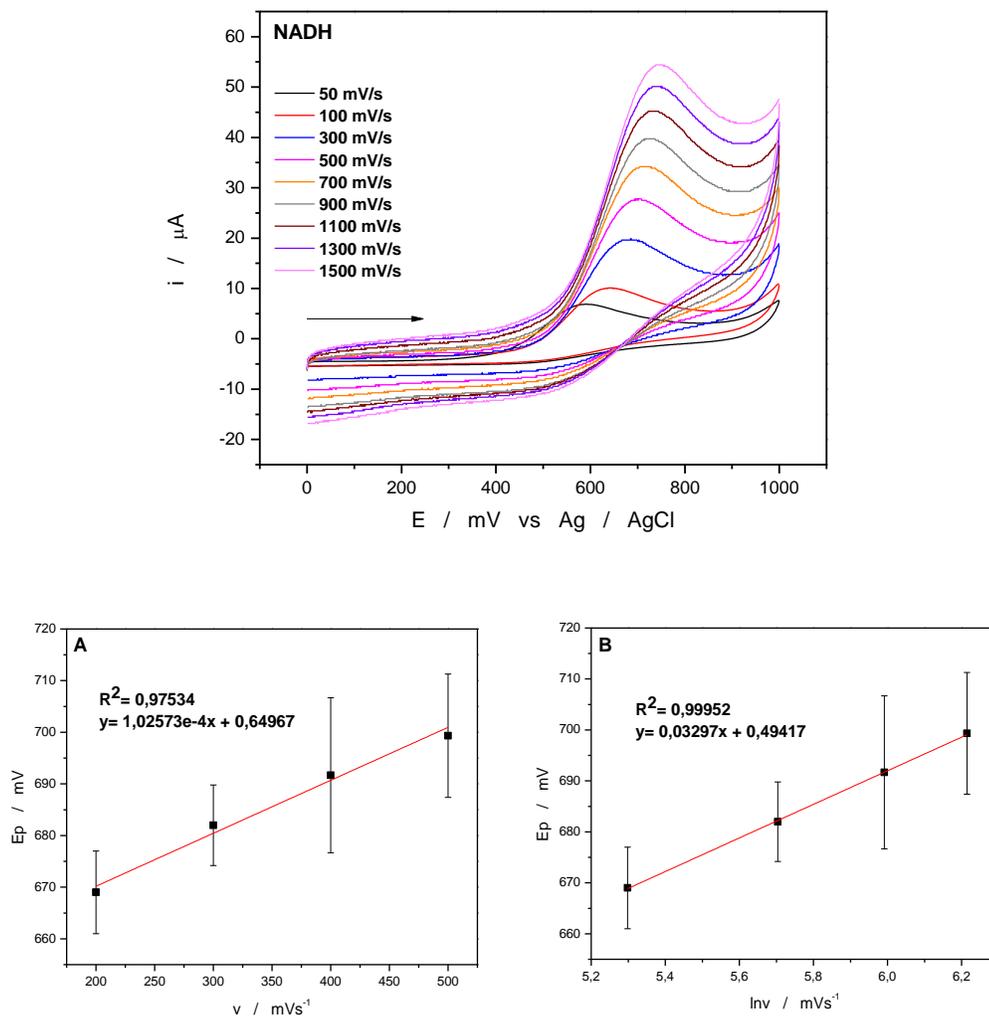


Figura 41. Voltamograma cíclico del NADH sobre electrodo GC en buffer B-R 0,1 M pH 7, velocidad de barrido desde 50 mV hasta 1500 mV. **A)** Relación entre el potencial pico y la velocidad de barrido del NADH, **B)** Relación entre el potencial pico y el logaritmo natural de la velocidad de barrido del NADH, para velocidad de barrido entre 200 mV y 500 mV.

En la figura 41 se tomaron en cuenta los mismos parámetros que en electrodos GC-NTC, para el cálculo de la constante de velocidad. Los datos obtenidos, se reemplazaron en la ecuación 14. Los resultados obtenidos a partir de la figura 37 y 41, reemplazados en la ecuación 14, se muestran en la tabla 7.

Electrodo	Intercepto	pendiente	E°	an	k_s
GC-NTC	0,055	0,072	0,395	0,36	0,13
GC	0,494	0,033	0,650	0,78	0,27

Tabla 7. Valores obtenidos del intercepto y la pendiente de la Fig. 40 y 41. **A)**, E° obtenido de la Fig. 40 y 41. **B)**, an y k_s .

De la tabla 7 se observa que el compuesto con mayor valor de k_s , es decir, que donde ocurre con mayor velocidad las reacciones es en electrodos GC $0,27 \text{ s}^{-1}$.

4.13 Comportamiento de la corriente electrocatalítica del sistema GCNTC-Med-NADH

Con el fin de determinar el comportamiento de la corriente electrocatalítica en relación con la corriente de la 1,8-DNA como mediador redox, se evaluó el efecto de la difusión del mediador en presencia de NADH.

Este experimento se realizó a distintas velocidades de barrido de 100 a 1000 mVs^{-1} . Se utilizaron electrodos GC-NTC -1,8-DNA modificados con 1,8-DNA 0,3 mM. En la figura 42 se muestran los voltamogramas obtenidos para los electrodos en solución de NADH 3 mM en buffer B-R pH 7. Las corrientes que fueron obtenidas a cada velocidad se expresaron en términos de porcentaje, Tabla 8.

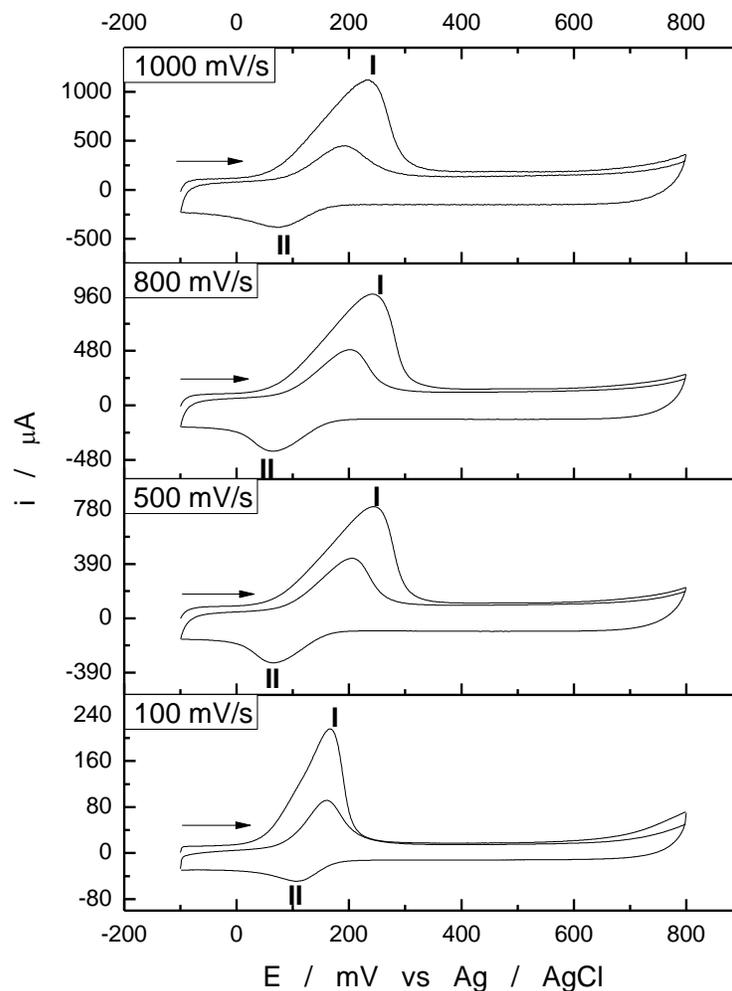


Figura 42. Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para electrodos GC-NTCM modificados con 1,8-DNA 0,3 mM en NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

Para los voltamogramas cíclicos de la figura 42 la corriente catalítica se define como la diferencia entre la señal I, Fig. 42 (conjunto Med-NADH) y la señal de reducción del mediador (señal II en Fig. 42) (ec. 15).

$$I_p \text{ electrocatalítica} = i_p \text{ señal I} - i_p \text{ señal II} \quad (\text{ec. 15})$$

Velocidad de barrido (mV/s)	$\frac{i_p \text{ catalítica}}{i_p \text{ señal I}} \times 100$	Desviación estándar
100	79,9	3,48
500	70,0	1,75
800	72,6	4,26
1000	75,7	2,74

Tabla 8. Relación entre el promedio de la corriente electrocatalítica (Med-NADH) y el promedio del triplicado de la corriente de pico de la señal de reducción del mediador a diferentes velocidades de barrido.

Al observar la tabla 8, al aumentar la velocidad de barrido existe una pequeña disminución en el porcentaje que relaciona la corriente electrocatalítica con la corriente del mediador. La concentración del NADH es la misma en todo el experimento, por lo que la leve disminución del porcentaje al aumentar la velocidad de barrido se debe a que la señal de oxidación se hace más ancha al aumentar la velocidad de barrido. En la tabla 9 se muestra el cálculo de los porcentajes que relacionan la corriente catalítica y la del mediador utilizando las áreas bajo la curva de las señales I y II de la Fig. 42.

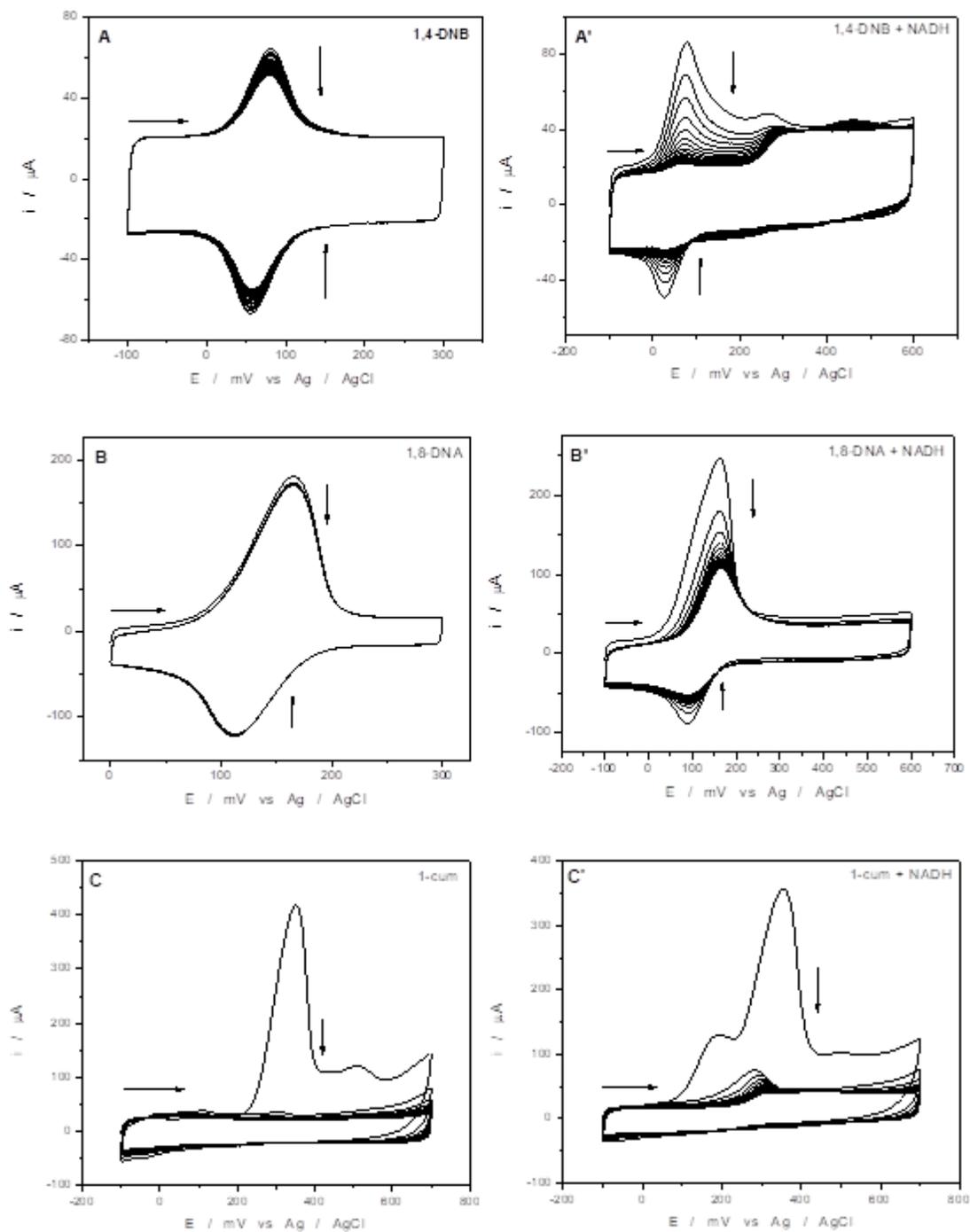
Velocidad de barrido (mV/s)	$\frac{i \text{ catalítica}}{i \text{ señal I}} \times 100$
100	82.3
500	79.4
800	78.5
1000	82.7

Tabla 9. Entre la velocidad de barrido y el porcentaje de corriente electrocatalítica.

Según los resultados de la tabla 9, el porcentaje de corriente electrocatalítica al aumentar la velocidad de barrido se mantiene cerca del 80% con respecto a la corriente del mediador.

Debido a que la actividad electrocatalítica ocurre solo en el primer barrido anódico, los barridos posteriores dan cuenta del comportamiento del mediador y no del conjunto mediador/NADH.

Con el objetivo de estudiar la disminución de las corrientes del mediador en presencia de NADH, se analizó la evolución de las señales en ausencia y en presencia de NADH en buffer B-R 0,1 M pH 7. Para cada medición se realizaron 30 barridos cíclicos consecutivos a una velocidad de barrido de 100 mVs⁻¹ (Fig. 43).



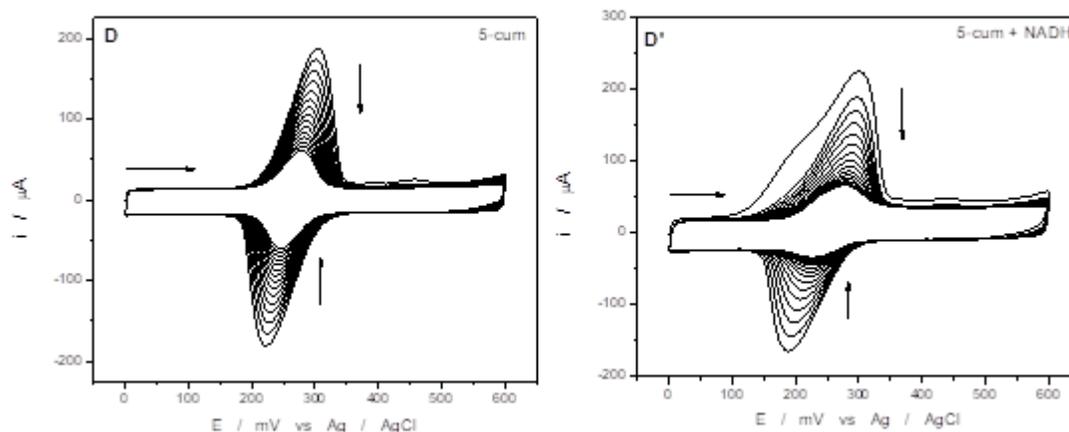


Figura 43. Voltamogramas cíclicos para electrodos GC-NTC modificado con **A.** **A')** 1,4-DNB 1 mM **B.** **B')** 1,8-DNA 0,3 mM **C.** **C')** 1-cum 1 mM **D.** **D')** 5-cum 1 mM. A', B', C' y D' medidos en celda con NADH 3 mM buffer B-R pH 7. A, B, C y D medido en celda con buffer B-R 0,1 M pH 7. $V = 100$ mV/s con 30 barridos consecutivos. Las flechas indican la disminución de las señales de mediador redox.

En la figura 43 A se observa una leve disminución de las corrientes de pico (reducción y oxidación) del par redox con los barridos consecutivos. En el caso de la Fig. 43 D se observa la disminución en las corrientes de pico del par redox en ausencia y presencia de NADH. Por el contrario, en la Fig. 43 B no hay un cambio notorio en la disminución de la corriente de pico. Para Fig. 43 C se observa solo en el primer barrido de oxidación las señales características de la cumarina, porque se trata de un proceso irreversible, en barridos posteriores solo se observa la corriente capacitiva, en presencia de NADH después del primer barrido solo queda la señal de NADH electrocatalizada. Todas las mediciones fueron hechas en buffer B-R pH 7, por lo que Fig. 43 A. B. y D. son estables en ausencia de NADH. En la figura 43 A'. B'. D'. se observa actividad electrocatalítica del mediador redox sobre el NADH solo en el primer barrido de oxidación para los tres compuestos. En barridos posteriores se observa una considerable disminución en las corrientes de pico del mediador con el número de barridos aplicados.

Como la corriente está asociada a la cantidad de mediador en el electrodo, la disminución del par redox con el número de barridos en presencia de NADH daría cuenta de una difusión del mediador desde el electrodo hacia la solución.

En la figura 44, se observa la dependencia de la corriente de pico (anódica y catódica) en presencia y ausencia de NADH con el número de barridos.

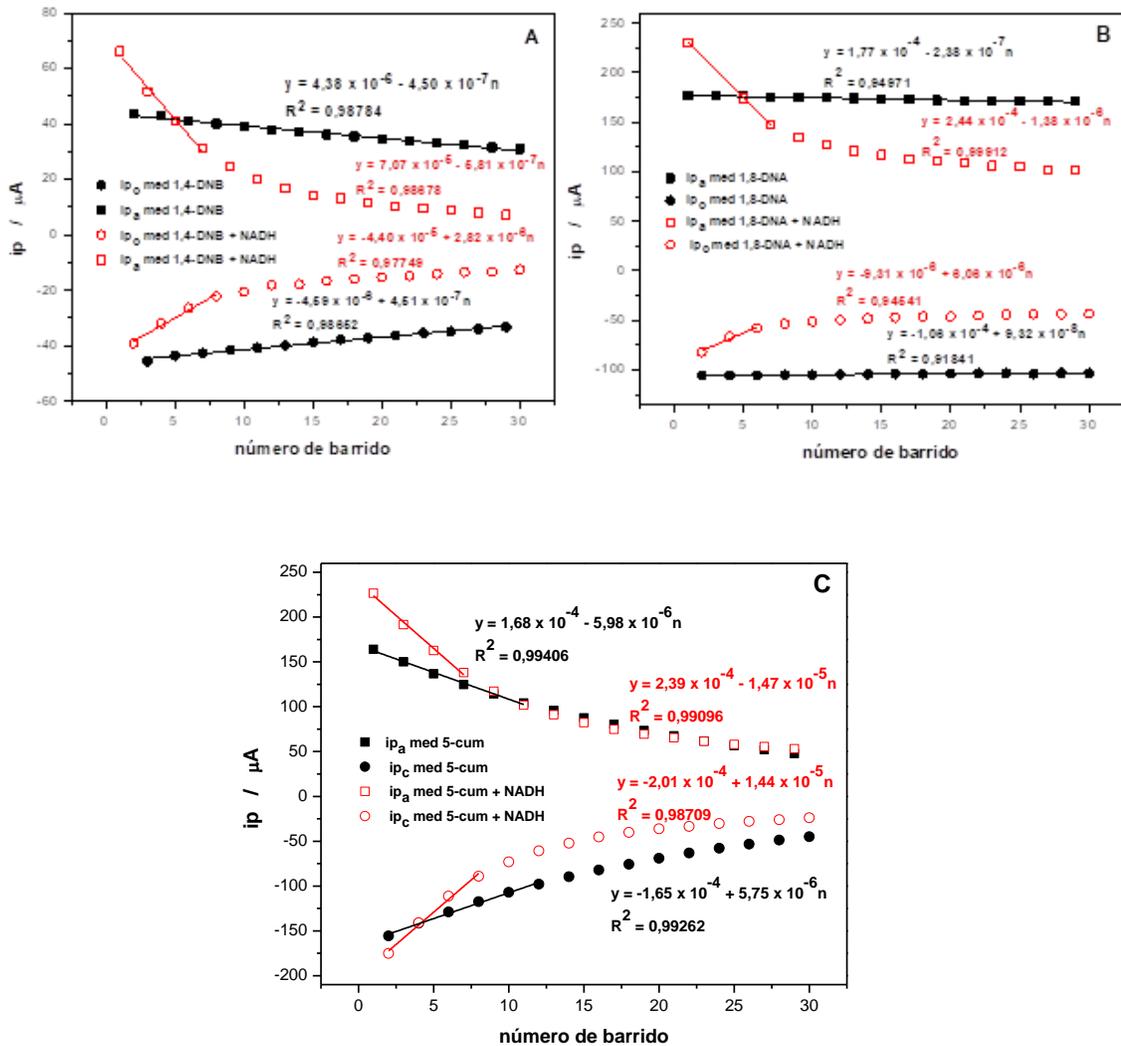


Figura 44. Variación de las corrientes anódicas y catódicas de los voltamogramas de la figura 43. en rojo las corrientes de pico de oxidación (\square) y de reducción (\circ) del mediador en presencia de NADH. En negro las corrientes pico de oxidación (\blacksquare) y reducción (\bullet) del mediador en ausencia de NADH. **A)** 1,4-DNB 1 mM **B)** 1,8-DNA 0,3 mM **C)** 5-cum 1 mM.

En la figura 44 se observa que para los electrodos GC-NTC modificados con los mediadores redox en buffer B-R pH 7, el decaimiento de las señales del par

redox tiene un comportamiento lineal en todos los nitrocompuestos. La ecuación de ajuste que caracteriza este comportamiento es la siguiente (ec. 21):

$$i_p = m \times n + i_{p0} \quad (\text{ec. 21})$$

Donde, n es el número de barridos, i_{p0} es el intercepto y m es la pendiente de la recta. La pendiente indica la tasa de disminución lineal del par redox en los electrodos GC-NTC-Med medidos en una celda que contiene solo buffer B-R.

El compuesto 5-cum presenta un decaimiento exponencial en una celda que contiene solamente buffer B-R. Todos los compuestos en presencia de NADH tienen un decaimiento exponencial caracterizado por las siguientes ecuaciones (ec. 22):

$$i_p = i_{pe} + i_{p0} e^{-kt} \quad (\text{ec. 22})$$

Donde, i_{pe} es la corriente de equilibrio (cuando n tiende a infinito), i_{p0} es la corriente inicial, n el número de barridos, y $1/t$ la constante de decaimiento de la corriente.

En la tabla 10 se resumen las pendientes obtenidas para electrodos GC-NTC modificados con los nitrocompuestos, medidos en NADH en buffer B-R pH 7. Para estos decaimientos exponenciales se realizó un ajuste lineal en los primeros puntos, y así realizar una comparación entre ellos.

	Buffer B-R pH 7		NADH en B-R pH 7	
	Pendiente de la recta (m) [$\mu\text{A}/n$]		Pendiente de la recta [$\mu\text{A}/n$]	
	Barrido anódico	Barrido catódico	Barrido anódico	Barrido catódico
1,4-DNB	$-4,50 \times 10^{-1}$	$4,51 \times 10^{-1}$	$-5,81 \times 10^{-1}$	2,82
1,8-DNA	$-2,38 \times 10^{-1}$	$9,32 \times 10^{-2}$	-1,38	6,06
5-cum	-5,98	5,75	$-1,47 \times 10$	$1,44 \times 10$

Tabla 10. Resultados de las tasas de disminución de los compuestos en buffer B-R en presencia y en ausencia de NADH.

Al comparar las pendientes anódicas (tabla 10) se obtienen valores más altos en presencia de NADH. Para las pendientes catódicas los valores más altos también son en presencia de NADH. Esto indica una mayor tasa de decaimiento instantánea por cada barrido de potencial en presencia de NADH, dando cuenta que la retención del compuesto en el electrodo es menor cuando está presente NADH.

4.14 Electrocatalisis de electrodos modificados con NTC y diferentes nitrocompuestos sobre NADH

En esta memoria de titulo se ha descrito el procedimiento de modificación de electrodos utilizando nanotubos de carbono con compuestos nitroaromáticos y cumarínicos, a través del encapsulamiento y la modificación electroquímica en la nanoestructura formada por los nanotubos de carbono adheridos a la superficie en el electrodo y estos a su vez actuando como mediadores de reacciones electroquímicas con NADH (figura 45).

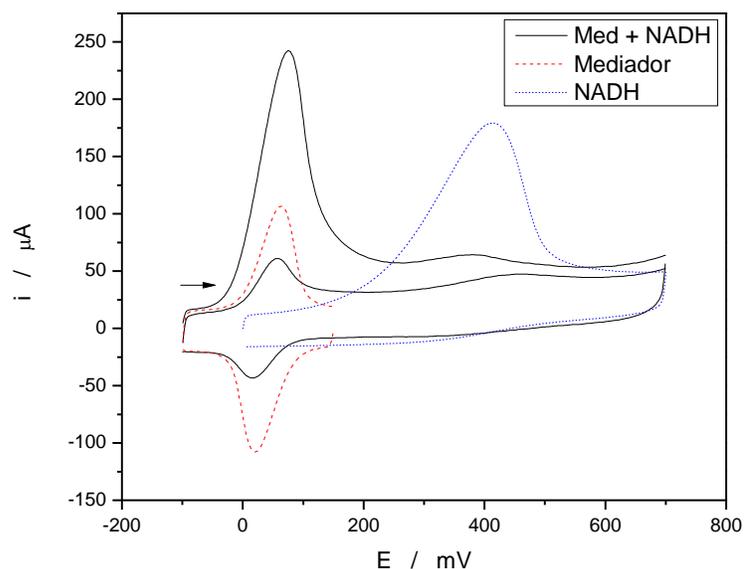


Figura 45. Voltamograma cíclico de electrodo GC-NTC-1,4-DNB en NADH 3 mM buffer B-R 0,1 M pH 7.

Muchos autores describen el proceso electrocatalítico en un electrodo modificado de la forma mostrada en el esquema de la figura 46 [39].

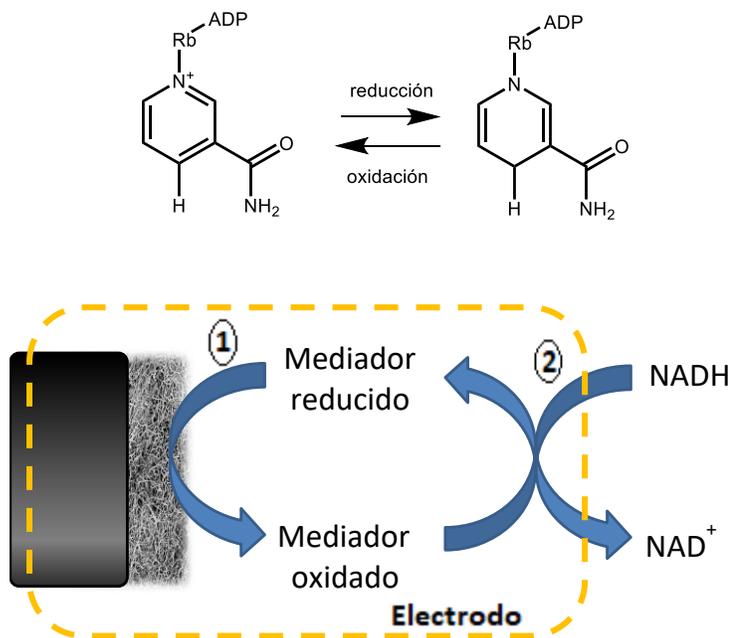


Figura 46. Ilustración gráfica del proceso de electrocatalisis. **1.** Oxidación del mediador redox encapsulado en los electrodos GC-NTC. **2.** Reducción del mediador redox y Oxidación del NADH. **3.** Interfase solución/ zona de reacción. Proceso sin agitación.

Un criterio para evaluar la capacidad electrocatalítica de los mediadores es el desplazamiento de potencial que se obtiene al compararlos con la oxidación de NADH en un electrodo GC-MWNTC sin mediador. Un mayor desplazamiento implica que NADH se oxida más fácilmente. En la tabla 11 se compara el potencial de oxidación del conjunto mediador/NADH a pH 7 frente al potencial de oxidación de NADH sin mediador, El mayor desplazamiento se obtiene con 1,4-DNB y 1,8-DNA.

Estructuras				
Compuestos	1,4-DNB	1,8-DNA	1-cum	5-cum
NADH	400 mV	400 mV	400 mV	400 mV
E _{ox} (mV), pH 7	76 mV	163 mV	365 mV	322 mV

Tabla 11. Potencial de oxidación de NADH en presencia de los mediadores electro-químicos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 2, el mejor en términos de permanecer por más tiempo retenido en el electrodo GC-MWNTC es el 1,4-DNB. Ya que, tiene una menor tasa de decaimiento en comparación con los otros mediadores. Así como también es el mediador que presenta mayor valor en la constante de transferencia heterogénea. Siendo así el mediador electrocatalítico más eficiente.

Las moléculas con dos grupos nitro, como 1,4-DNB y 1,8-DNA, presentan actividad electrocatalítica. En el caso de las cumarinas, las moléculas con un solo grupo hidroxilo, no presentan actividad electrocatalítica. Por lo que se necesitan al menos dos grupos hidroxilo en la molécula para electrocatalizar NADH. Este comportamiento es similar al observado con los nitrocompuestos en los cuales las moléculas con un solo grupo nitro no presentan actividad electrocatalítica hacia NADH.

El último criterio que se puede tomar en cuenta es la cantidad de corriente electrocatalítica que se obtiene del mediador frente a NADH. Desde este punto de vista los mediadores que presentan mayor corriente electrocatalítica del conjunto evaluado son las cumarinas.

5. Conclusión

- Los electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono y compuestos estudiados en esta tesis tienen ventajas en la respuesta electroquímica de los mediadores en comparación con los electrodos sin modificar; se obtienen mayores intensidades de corriente, mayor definición de las señales de los derivados hidroxilamina/nitroso y un desplazamiento electrocatalítico de las señales.
- Se determinó que el tiempo óptimo de inmersión son 10 segundos para todos los compuestos.
- Es posible trabajar con 1,4-DNB y 5-cum, en largos tiempos, sin que sufran descomposición en la solución.
- Para 1,8-DNA y 1-cum, sucede lo contrario, la corriente de reducción disminuye al pasar el tiempo. No es posible trabajar con estos compuestos en largos periodos de tiempo, ya que son inestables.
- Los compuestos 1,4-Dinitrobenceno, 1,8-Dinitroantraquinona, 3-acetil-7,8-dihidroxi-2H-chromen-2-ona y 7,8-dihidroxi-4-metil-2H-chromen-2-ona tienen actividad electrocatalítica sobre el NADH y NADPH.
- Los nanotubos de carbono forman una nano estructura la cual encapsula el mediador de cada uno de los compuestos en estudio, donde compete con el NADH por los sitios disponibles desplazado al mediador del electrodo.
- Es posible que la actividad electrocatalítica se deba a que las cumarinas que poseen dos hidroxilos en el anillo aromático. Ya que los resultados obtenidos demostraron que las cumarinas que poseen solo un grupo hidroxilo no presentaron actividad electrocatalítica.
- Compuesto más estable en el tiempo 1,2-DNB, como se muestra en tabla 1.
- En las figuras 3, 4 y 5 se puede ver un desplazamiento en las señales hacia potenciales más negativos a medida que aumenta el pH de la solución de trabajo.
- Concentración mínima de trabajo de mediador donde hay electrocatálisis son de 0,1 mM, 2 mM, para 1,8-DNA y 1,4-DNB, respectivamente.
- A todas las concentraciones de trabajo se observó electrocatálisis de NADH, con la cumarina.

- Al observar los resultados obtenidos para la constante de transferencia heterogénea el compuesto que presenta el mayor valor de k_h es 1,4-DNB.
- Por último, los resultados obtenidos, al compararlos con los datos anteriores demuestran que la 1,4-DNB presenta un mayor valor de k_h que el DNB.

6. Bibliografía

- [1] S. Iijima, "Helical microtubules of graphitic carbon," *Nature*, vol. 354, no. 6348, pp. 56–58, Nov. 1991.
- [2] J. J. Gooding, "Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing," *Electrochim. Acta*, vol. 50, no. 15, pp. 3049–3060, May 2005.
- [3] J. N. Coleman, U. Khan, W. J. Blau, and Y. K. Gun'ko, "Small but strong: A review of the mechanical properties of carbon nanotube–polymer composites," *Carbon N. Y.*, vol. 44, no. 9, pp. 1624–1652, Aug. 2006.
- [4] S. Iijima and T. Ichihashi, "Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter," *Nature*, vol. 363, no. 6430, pp. 603–605, Jun. 1993.
- [5] A. Y. Kasumov; H. Bouchiat; B. Reulet, "Conductivity and atomic structure of isolated multiwalled carbon nanotubes," *Europhys. Lett.*, vol. 43, no. 1, pp. 89–94, Jul. 1998.
- [6] K. Tanaka, "Classification of Carbon," in *Carbon Nanotubes and Graphene*, Second Edi., Elsevier, 2014, pp. 1–5.
- [7] R. C. Haddon, "Electronic structure, conductivity and superconductivity of alkali metal doped (C60)," *Acc. Chem. Res.*, vol. 25, no. 3, pp. 127–133, Mar. 1992.
- [8] M. Trojanowicz, "Analytical applications of carbon nanotubes: a review," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 25, no. 5, pp. 480–489, May 2006.
- [9] S. G. Wang, R. Wang, P. J. Sellin, and Q. Zhang, "DNA biosensors based on self-assembled carbon nanotubes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 325, no. 4, pp. 1433–1437, Dec. 2004.
- [10] M. Guo, J. Chen, L. Nie, and S. Yao, "Electrostatic assembly of calf thymus DNA on multi-walled carbon nanotube modified gold electrode and its interaction with chlorpromazine hydrochloride," *Electrochim. Acta*, vol. 49, no. 16, pp. 2637–2643, Jul. 2004.
- [11] E. Katz, I. Willner, and J. Wang, "Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles," *Electroanalysis*, vol. 16, no. 12, pp. 19–44, Jan. 2004.
- [12] D. Zheng, H. Li, B. Lu, Z. Xu, and H. Chen, "Electrochemical properties of ferrocene adsorbed on multi-walled carbon nanotubes electrode," *Thin Solid Films*, vol. 516, no. 8, pp. 2151–2157, Feb. 2008.
- [13] C. M. Welch and R. G. Compton, "The use of nanoparticles in electroanalysis: a review," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 384, no. 3, pp. 601–

619, Feb. 2006.

- [14] H. Xiong, Y. Zhao, P. Liu, X. Zhang, and S. Wang, "Electrochemical properties and the determination of nicotine at a multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode," *Microchim. Acta*, vol. 168, no. 1–2, pp. 31–36, Feb. 2010.
- [15] R. Moscoso, J. Carbajo, M. Lopez, L. J. Núñez-Vergara, and J. A. Squella, "A simple derivatization of multiwalled carbon nanotubes with nitroaromatics in aqueous media: Modification with nitroso/hydroxylamine groups," *Electrochem. commun.*, vol. 13, no. 2, pp. 217–220, Feb. 2011.
- [16] J. Carbajo, S. Bollo, L. J. Nuñez-Vergara, P. Navarrete, and J. A. Squella, "Voltammetric studies of aromatic nitro compounds: pH-dependence on decay of the nitro radical anion in mixed media," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 494, no. 1, pp. 69–76, Dec. 2000.
- [17] Y.-P. Li, H.-B. Cao, C.-M. Liu, and Y. Zhang, "Electrochemical reduction of nitrobenzene at carbon nanotube electrode," *J. Hazard. Mater.*, vol. 148, no. 1–2, pp. 158–163, Sep. 2007.
- [18] J. Squella, S. Bollo, and L. Nuñez-Vergara, "Recent Developments in the Electrochemistry of Some Nitro Compounds of Biological Significance," *Curr. Org. Chem.*, vol. 9, no. 6, pp. 565–581, Apr. 2005.
- [19] L. S. Hernández-Muñoz; F. González, "Revisiting the electrochemical formation, stability and structure of radical and biradical anionic structures in dinitrobenzenes," *Electrochim. Acta*, vol. 55, no. 27, pp. 8325–8335, Nov. 2010.
- [20] D. Tian and B. Jin, "FT-IR spectroelectrochemical study of the reduction of 1,4-dinitrobenzene on Au electrode: Hydrogen bonding and protonation in proton donor mixed media," *Electrochim. Acta*, vol. 56, no. 25, pp. 9144–9151, Oct. 2011.
- [21] M. J. Matos, D. Viña, P. Janeiro, and F. Orallo, "Synthesis and pharmacological evaluation of coumarins as new scaffold on the Parkinson's disease," pp. 1–11, 2009.
- [22] M. R. Shreykar and N. Sekar, "Stimuli-responsive luminescent coumarin thiazole hybrid dye: Synthesis, aggregation induced emission, thermochromism and DFT study," *Dye. Pigment.*, vol. 142, pp. 121–125, Jul. 2017.
- [23] A. Matta, V. Bahadur, T. Taniike, J. Van der Eycken, and B. K. Singh, "Synthesis, characterisation and photophysical studies of oxadiazolyl coumarin: A new class of blue light emitting fluorescent dyes," *Dye. Pigment.*, vol. 140, pp. 250–260, May 2017.

- [24] H. Zhang, Q. Luo, Y. Mao, Y. Zhao, and T. Yu, "Synthesis and characterization of coumarin-biphenyl derivatives as organic luminescent materials," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 346, pp. 10–16, Sep. 2017.
- [25] A. Lavacchi, H. Miller, and F. Vizza, *Nanotechnology in Electrocatalysis for Energy*, vol. 170. New York, NY: Springer New York, 2013.
- [26] Universidad de la República de Uruguay, "Electrocatalisis," pp. 1–11, 2007.
- [27] CINÉTICA ELECTROQUÍMICA, Diseño de electrodos electrocatalíticos, [Material Docente], texto en español.
- [28] R. Moscoso, J. Carbajo, J. D. Mozo, and J. A. Squella, "Voltammetric behavior of 3,5-dinitrobenzoic acid in solution on GCE and encapsulated on multiwalled carbon nanotube modified electrode," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 765, pp. 149–154, Mar. 2016.
- [29] L. Wang; S. Feng; J. Zhao; J. Zheng; Z. Wang; L. Li, Z. Zhu, "A facile method to modify carbon nanotubes with nitro/amino groups," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 256, no. 20, pp. 6060–6064, Aug. 2010.
- [30] R. Moscoso, E. Inostroza, and J. A. Squella, "A non-conventional way to perform voltammetry," *Electrochem. commun.*, vol. 81, no. May, pp. 61–64, Aug. 2017.
- [31] L. Feng, H.-P. Li, K. Galatsis, and H. G. Monbouquette, "Effective NADH sensing by electrooxidation on carbon-nanotube-coated platinum electrodes," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 773, pp. 7–12, Jul. 2016.
- [32] Peter J. Kennelly, PhD y Victor W. Rodwell, PhD; 2010. Enzimas: mecanismo de acción. En: R. K. Murray; D. A. Bender; K. M. Kennelly; V. W. Rodwell; P. A. Weil. HARPER, Bioquímica ilustrada. 28ª edición. Mc Graw Hill. pp. 52-53.
- [33] F. S. Saleh, M. R. Rahman, T. Okajima, L. Mao, and T. Ohsaka, "Determination of formal potential of NADH/NAD⁺ redox couple and catalytic oxidation of NADH using poly(phenosafranin)-modified carbon electrodes," *Bioelectrochemistry*, vol. 80, no. 2, pp. 121–127, Feb. 2011.
- [34] A. Radoi and D. Compagnone, "Recent advances in NADH electrochemical sensing design," *Bioelectrochemistry*, vol. 76, no. 1–2, pp. 126–134, Sep. 2009.
- [35] C. Batchelor-McAuley, E. Kätelhön, E. O. Barnes, R. G. Compton, E. Laborda, and A. Molina, "Recent Advances in Voltammetry," *ChemistryOpen*, vol. 4, no. 3, pp. 224–260, Jun. 2015.

- [36] C. Barrientos, P. Navarrete-Encina, J. Carbajo, and J. A. Squella, "New voltammetric method useful for water insoluble or weakly soluble compounds: application to pKa determination of hydroxyl coumarin derivatives," *J. Solid State Electrochem.*, vol. 22, no. 5, pp. 1423–1429, May 2018.
- [37] Inostroza R., E. G., 2016. "Compuestos polinitrados como mediadores electrocatalíticos de NADH en electrodos modificados con nanotubos de carbono". Memoria de Químico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- [38] Y.-L. Zhang, C.-X. Zhang, and H.-X. Shen, "Studies on Electrocatalytically Kinetic Behavior of Horseradish Peroxidase at Salt Bridge Supported Bilayer Lipid Membrane," *Anal. Lett.*, vol. 33, no. 12, pp. 2425–2439, Jan. 2000.
- [39] A. Radoi and D. Compagnone, "Recent advances in NADH electrochemical sensing design," *Bioelectrochemistry*, vol. 76, no. 1–2, pp. 126–134, 2009.