

UCH-FC,
DOC-Química
C128
C.1



BIOSENSORES DE ADN BASADOS EN NANOTUBOS DE CARBONO MODIFICADOS QUIMICAMENTE"

Facultad de Ciencias

Tesis entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Doctor en Química

Por

Paulina Alejandra Cañete Rosales

Septiembre, 2011

Director de Tesis:

Dra. Soledad Bollo Dragnic

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

Co-director de Tesis:

Alejandro Álvarez-Lueje

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

PAULINA ALEJANDRA CAÑETE ROSALES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de Agosto de 2011.

Director de Tesis:

Dra. Soledad Bollo Dragnic

Co-Director de Tesis:

Dr. Alejandro Álvarez-Lueje

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Claudio Olea

Dr. Marcelo Campos

Dr. Pablo Richter

Dr. José Zagal



The right side of the document features four handwritten signatures in blue ink, each positioned above a horizontal dotted line. The signatures are: 1) Dra. Soledad Bollo Dragnic, 2) Dr. Alejandro Álvarez-Lueje, 3) Dr. Claudio Olea, and 4) Dr. José Zagal. A circular stamp is located in the center-right area, overlapping the second and third signatures. The stamp contains the text 'FACULTAD DE CIENCIAS', 'BIBLIOTECA CENTRAL', and 'U. DE CHILE' around a central emblem.



Dedico esta tesis a mi madre Angelina

RESUMEN BIOGRÁFICO



Paulina Cañete Rosales nació en Santiago de Chile el 20 de Septiembre de 1982. Egresó de cuarto medio en el año 2000, del Liceo B-50 Lenka Franulic. En el año 2001 ingresó al Programa de Bachillerato de la Universidad de Chile donde obtuvo el grado de Bachiller en Ciencias Naturales y Exactas. Posteriormente, en el año 2004 ingresó a la Facultad de Ciencias de la misma Universidad, para obtener el grado de Licenciada en Ciencias con mención en Química, desempeñándose como ayudante de laboratorio en los cursos de Química de Aguas y Físicoquímica. Su Unidad de Investigación fue realizada en el Laboratorio de Físicoquímica de la misma Facultad, bajo la tutela de la Dra. Marcela Urzúa y el Dr. Mauricio Isaacs, con la cual obtiene su grado académico el año 2006. En el año 2007, ingresa al Programa de Doctorado en Química de la Universidad de Chile, desarrollando su trabajo de Tesis en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, bajo la dirección de los Dres. Soledad Bollo Dragnic y Alejandro Alvarez Lueje.

AGRADECIMIENTOS



Quisiera agradecer sinceramente a:

Mis tutores los Dres. Soledad Bollo y Alejandro Álvarez por su constante apoyo, dedicación, comprensión y guía durante estos cuatro años. Gracias por compartir su experiencia y ser parte de mi formación como científica y persona.

A los miembros de mi comisión evaluadora, los profesores Dr. Claudio Olea, Dr. Pablo Richter, Dr. Marcelo Campos y Dr. José Zagal, por su activa participación en el desarrollo de esta tesis, cuyos comentarios y sugerencias han colaborado también en mi formación académica.

A la beca de Doctorado "Luis Sepúlveda" de la Facultad de Ciencias, a CONICYT por otorgarme la beca "Para estudios de Postgrado" y "Apoyo de Tesis Doctoral" con las cuales pude desarrollar y finalizar este trabajo. A la beca de "Pasantía Doctoral en el extranjero" BECAS-CHILE, por permitirme llevar a cabo parte de mi investigación en un prestigioso centro de investigación en España. Al proyecto FONDECYT 1080526 por el financiamiento otorgado para desarrollar esta investigación.

Agradezco profundamente a todas las personas del Instituto de Carboquímica en Zaragoza (España), en especial a la Dra. María Teresa Martínez, Dr. Alejandro Ansón, José Miguel González, Mercedes Vico y Mónica González por recibirme, ayudarme, enseñarme y hacerme partícipe del grupo durante mi estadía.

A quienes fueron fundamentales en mis inicios en la investigación en la Facultad de Ciencias los profesores Dr. Mauricio Isaacs y Dra. Marcela Urzúa, por entregarme las bases necesarias para desarrollarme en el programa de doctorado.

A todas las personas que formaron parte del Laboratorio de Bioelectroquímica durante el desarrollo de mi tesis que hicieron mucho más agradable el trabajo diario y compartieron no sólo conocimiento, sino que también amistad, especialmente a: Seba Finger, Magda, Claudio, Karina P., Karina G., Pali, Paola S., Ricardo, Pao, Vale, Cubana. A los profesores Juan Carlos Sturm, Dr. Marcelo Kogan, Dra. Nancy Ferreira y, especialmente a la Dra. Claudia Yañez por su dedicación y disposición.

A mis amigas de infancia Loreto Prieto y Ana Fuentes y mis amigos dentro y fuera de la universidad: María Luz Peña, Javier González, Carolina Adura y Karla Calfumán por brindarme su amistad y cariño cuando más lo necesitaba. Muchas gracias.

A mis bachi-amigos Catalina Cienfuegos y Jaime Bauzá por ser siempre un apoyo fundamental e incondicional.

A Sebastián por entregarme su amor, comprensión y apoyo en estos años. Gracias por creer en mí y darme la fuerza necesaria para sacar este proyecto y muchos más adelante. Agradezco especialmente a sus padres, Miguel y Erica, y hermanos, Gustavo y Miguel, por recibirme en su hogar y aceptarme con cariño.

A mi familia por apoyarme siempre en cada decisión que he tomado tanto profesional como personal. Agradezco a mis tíos, primos, sobrinos, mi abuela y bisabuela por entender mis ausencias y compartir mis logros y alegrías. Quiero agradecer especialmente a mis padres, Angelina y Arnaldo, quienes han sido un ejemplo de amor, esfuerzo y dedicación y siempre se han preocupado de que logremos ser buenos profesionales y personas. Gracias a mis hermanos, Jano y Maca, quienes fueron mi motivación para seguir adelante en los momentos más difíciles.

Finalmente, quiero agradecer a Dios por ser la luz que me ha guiado en momentos de oscuridad.



INDICE DE MATERIAS



INDICE DE MATERIAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMEN	xix
SUMMARY.....	xxi
INTRODUCCION	1
1.1 <u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	12
1.2 <u>OBJETIVOS</u>	12
1.2.1 Objetivo general.....	12
1.2.2 Objetivos específicos	12
MATERIALES Y METODOS.....	14
2.1 <u>MATERIALES</u>	14
2.1.1 Reactivos y Disolventes	14
2.1.2 Material de laboratorio.....	15
2.2 <u>EQUIPOS</u>	15
2.2.1 Equipos de uso general.....	15
2.2.2 Equipos utilizados para caracterización de muestras	16
2.2.3 Equipos voltamperométricos	16
2.2.4 Equipos espectroscópicos UV-visible	17
2.3 <u>MÉTODOS</u>	17
2.3.1 Tampones utilizados	17
2.3.2 Preparación de soluciones de trabajo.....	18
2.3.3 Funcionalización de <i>MWNT</i>	19
2.3.4 Caracterización de <i>MWNT</i> oxidados y aminados	22
2.3.5 Preparación de dispersiones de <i>MWNT</i> y estudios de estabilidad.....	24
2.3.6 Interacción de <i>MWNT</i> con ADN en disolución	24
2.3.7 Estudios electroquímicos.....	27

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
<i>PRIMERA PARTE: Oxidación y amidación de MWNT y su aplicación en la detección de ADN.....</i>	37
3.1 <u>EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MWNT FUNCIONALIZADOS</u>.....	38
3.1.1 Oxidación de MWNT	38
3.1.2 Amidación de MWNT (NTC-NH ₂).....	61
3.1.3 Dispersabilidad de MWNT funcionalizados.....	68
3.1.4 Electrodo modificado con MWNT dispersos en DMF y PBS.....	75
3.2 <u>INTERACCIÓN DE MWNT FUNCIONALIZADOS CON ADN EN DISOLUCIÓN</u>	84
3.2.1 Curva de calibración de ds-DNA.....	84
3.2.2 Evaluación de la interacción entre MWNT y ds-DNA	85
3.3... <u>APLICACIÓN DE MWNT FUNCIONALIZADOS EN LA GENERACION DE ELECTRODOS MODIFICADOS PARA LA DETECCIÓN DE ADN</u>.....	89
3.3.1 Electrodo modificado con MWNT dispersos en DMF	89
3.3.2 Electrodo modificado con MWNT dispersos en PBS	89
3.3.3 Electrodo modificado con MWNT dispersos en Cloruro de bencetonio. 97	
3.3.4 Electrodo modificado con MWNT dispersos en Quitosano.....	97
<i>SEGUNDA PARTE: Funcionalización de MWNT con ADN y su aplicación en biosensores de hibridación</i>	107
3.4 <u>FUNCIONALIZACION DE MWNT CON ADN</u>	108
3.4.1 Curva de calibración de ss-ODN	108
3.4.2 Isotermas de adsorción de ss-ODN.....	109
3.4.3 Electrodo modificado con dispersiones de MWNT/ss-ODN.....	111
3.5 <u>APLICACIÓN DE (MWNT/ss-ODN) EN BIOSENSORES DE HIBRIDACIÓN</u>	123
3.5.1 Estudios de hibridación de MWNT/ss-ODN en tampón fosfato. Señal de oxidación de las bases guaninas.....	124
3.5.2 Detección de hibridación utilizando azul de metileno.....	126
CONCLUSIONES.....	130
BIBLIOGRAFÍA.....	132
ANEXO I: PRESENTACIONES A CONGRESOS	140
ANEXO II: PUBLICACIONES	142

LISTA DE TABLAS



Tabla III. 1. Valores de área superficial BET y volumen de mesoporo.	44
Tabla III. 2. Efecto del tiempo de oxidación con mezcla sulfo-nítrica 3:1 (3M), en los valores de R para nanotubos cortos y largos.....	47
Tabla III. 3. Porcentajes de pérdida en peso de las muestras de menor longitud. A la derecha los grupos asociados al rango de temperatura [75].....	49
Tabla III. 4. Porcentajes de pérdida en peso de las muestras de mayor longitud. A la derecha los grupos asociados al rango de temperatura [75].....	50
Tabla III. 5. Análisis elemental de las muestras comerciales y oxidadas: (violeta) mezcla sulfo-nítrica 3 M y (azul) HNO ₃ 7 M.	51
Tabla III. 6. Grupos ácidos totales (%Na (NaOH)) y grupos carboxílicos (%Na (NaHCO ₃)) incorporados a NC y NL después de diferentes tratamientos oxidativos. ...	55
Tabla III. 7. Porcentajes de pérdida en peso y los grupos asociados a NC y sus derivados oxidados y aminados.	63
Tabla III. 8. Análisis elemental de la muestra comercial NC, sus derivados oxidados (NCO3 y NCO6) y las muestras aminadas a partir de las oxidadas (NC+3 y NC+6)....	64
Tabla III. 9. Porcentajes promedio de la disminución de <i>ds-DNA</i> en función del NTC utilizado y el tiempo de incubación, correspondiente a tres mediciones.	88
Tabla III. 10. Valores promedio de <i>i_p</i> y <i>E_p</i> para la señal de oxidación de guanina, obtenida con electrodos modificados.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura I. 1. (a) Hebra simple de ADN donde se observan las bases A, C y T unidas al esqueleto azúcar-fosfato. (b) Modelo de la doble hélice de ADN de Watson y Crick.	2
Figura I. 2. Mecanismo electroquímico de oxidación de guanina.	3
Figura I. 3. (A) Nanotubo de pared simple (<i>SWNT</i>), (B) Nanotubo de pared múltiple (<i>MWNT</i>).....	5
Figura I. 4. Posibles funcionalizaciones de NTC: (A) Funcionalización covalente de los sitios defectuosos, (B) Funcionalización covalente con moléculas orgánicas pequeñas en las paredes del nanotubo, (C) Funcionalización no covalente con surfactantes, (D) Funcionalización no covalente con polímeros y (E) Funcionalización endohedral con, por ejemplo, C_{60}	6
Figura I. 5. Sitios defectuosos en NTC: (A) anillos de 5 ó 7 miembros que provocan la curvatura de la pared, (B) átomos de carbono con hibridación sp^3 , (C) daño de la pared por condiciones oxidativas y (D) extremo abierto.	8
Figura I. 6. Diseño general para un biosensor de hibridación. La hebra complementaria (analito) es reconocida por la hebra inmovilizada en el electrodo y el proceso de hibridación es reconocido por el transductor dando como resultado una respuesta electroquímica.	10
Figura I. 7. Reacción redox de azul de metileno a valores de pH superiores a 6.	11
Figura II. 1. Reacción general de la amidación de NTC oxidados con etilendiamina...	20
Figura II. 2. Funcionalización no covalente de <i>MWNT</i> con un oligonucleótido.	21
Figura II. 3. Funcionalización covalente con un oligonucleótido vía carbodiimida.	21
Figura II. 4. Reacción de ninhidrina con aminas primarias para el Test de Kaiser.	23
Figura II. 5. Voltamperograma cíclico de una disolución de $K_3Fe(CN)_6$ donde se observan las corrientes consideradas para la ecuación de Nicholson.	29
Figura II. 6. (A) Representación esquemática de un experimento SECM. (B) Curvas de aproximación teóricas para un <i>tip</i> sobre un sustrato conductor y otro aislante.	32
Figura II. 7. Ajuste de línea base para la señal de reducción de azul de metileno en electrodos modificados con <i>MWNT/ss-ODN</i>	36

Figura III. 1. Grupos superficiales posibles de ser incorporados en la estructura de carbono.	38
Figura III. 2. Imágenes SEM de nanotubos comerciales y sus derivados oxidados: (A) NC, (B) NL, (C) NCO3, (D) NLO3, (E) NCO6 y (F) NLO6.	39
Figura III. 3. Imágenes HR-TEM para NTC comerciales sin oxidar (A y B) y NTC oxidados 3 y 6 h (C y D).	41
Figura III. 4. Isotermas BET para NC y sus derivados oxidados. Las flechas negras indican el proceso de adsorción (hacia arriba) y el proceso de desorción (hacia abajo).	42
Figura III. 5. Isotermas BET para NL y sus derivados oxidados. Las flechas negras indican el proceso de adsorción (hacia arriba) y el proceso de desorción (hacia abajo).	43
Figura III. 6. Espectro Raman característico para <i>MWNT</i>	45
Figura III. 7. Espectros Raman de NTC con y sin tratamiento oxidativo con mezcla sulfo-nítrica 3:1 (3M), luego de 3 y 6 h: (A) NTC largos y (B) NTC cortos.	46
Figura III. 8. Curvas termogravimétricas para NC y sus derivados oxidados con mezcla sulfo-nítrica 3:1 (3M) (NCO3 y NCO6) y con HNO ₃ 7M (NCO7N).	48
Figura III. 9. Curvas TG para NL y sus derivados oxidados con mezcla sulfo-nítrica 3:1 (3 M) (NLO3 y NLO6) y con HNO ₃ 7 M (NLO7N).	50
Figura III. 10. Espectros IR para nanotubos largos sin tratamiento oxidativo (NL), NL oxidados con mezcla sulfo-nítrica por 3 h (NLO3) y 6 h (NLO6), y NL oxidados con HNO ₃ por 6 h (NLO7N).	52
Figura III. 11. Espectros IR para nanotubos cortos sin tratamiento oxidativo (NC) y NC oxidados con mezcla sulfo-nítrica por 3 h (NCO3) y 6 h (NCO6).	54
Figura III. 12. Esquema general de clasificación de bandas para espectros XPS.	56
Figura III. 13. Espectros XPS de oxígeno 1s para: a) NL, b) NLO3, c) NLO6 y d) NLO7N.	57
Figura III. 14. Espectro XPS para Fe 2p: (a) NL, (b) NLO3, (c) NLO6, (d) NLO7N.	59
Figura III. 15. Cuantificación del contenido de oxígeno a partir del espectro XPS de O 1s: (a) nanotubos largos, (b) nanotubos cortos.	60
Figura III. 16. Curvas TG para NC y sus derivados oxidados y aminados.	62

- Figura III. 17.** Espectros IR para nanotubos cortos (NC), NC oxidado por 3 h (NCO3) y NCO3 funcionalizado con etilendiamina (NC+3)..... 64
- Figura III. 18.** Fotografía digital de dispersiones en agua (0,5 mg/mL) luego de 1 hora de sonicado, a diferentes tiempos de reposo. Izquierda: muestras recién sonicadas, Derecha: luego de un mes de reposo. (A1) NC, (A2) NCO6, (A3) NC+6. 69
- Figura III. 19.** Fotografía digital de dispersiones en agua/etanol (50/50) (0,5 mg/mL) luego de 1 hora de sonicado, a diferentes tiempos de reposo. Izquierda: muestras recién sonicadas, Derecha: luego de un mes de reposo. (B1) NC, (B2) NCO6, (B3) NC+6..... 70
- Figura III. 20.** Fotografía digital de dispersiones en etanol (0,5 mg/mL) luego de 1 hora de sonicado, a diferentes tiempos de reposo. Izquierda: muestras recién sonicadas, Derecha: luego de un mes de reposo. (C1) NC, (C2) NCO6, (C3) NC+6. 70
- Figura III. 21.** Fotografía digital de dispersiones en DMF (0,5 mg/mL) luego de 1 hora de sonicado, a diferentes tiempos de reposo. Izquierda: muestras recién sonicadas, Derecha: luego de un mes de reposo. (D1) NC, (D2) NCO6, (D3) NC+6. 71
- Figura III. 22.** Micrografía óptica de diferentes *MWNT* dispersos en agua (0,5 mg/mL), luego de una hora de sonicado. (A) NC, (B) NCO6, (C) NC+6. 72
- Figura III. 23.** Micrografía óptica de diferentes *MWNT* dispersos en agua/etanol (50/50) (0,5 mg/mL), luego de una hora de sonicado. (A) NC, (B) NCO6, (C) NC+6. 73
- Figura III. 24.** Micrografía óptica de diferentes *MWNT* dispersos en etanol (0,5 mg/mL), luego de una hora de sonicado. (A) NC, (B) NCO6, (C) NC+6. 73
- Figura III. 25.** Micrografía óptica de diferentes *MWNT* dispersos en DMF (0,5 mg/mL), luego de sonicado una hora. (A) NC, (B) NCO6, (C) NC+6. 74
- Figura III. 26.** Voltamperogramas cíclicos para electrodos modificados con diferentes NTC dispersos en PBS 10 mM con NaCl 0,1 M a pH 7,0. La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL y la velocidad de barrido a 50 mV/s. (A) NTC cortos (B) NTC largos. 75
- Figura III. 27.** Relación entre la intensidad de corriente anódica (I_{pa}) y el contenido en oxígeno (O%) en el tratamiento oxidativo de NTC (A) cortos y (B) largos..... 76
- Figura III. 28.** Efecto de la amidación de NC oxidados por (A) 3 horas y (B) 6 horas. Los NTC están dispersos en PBS 10 mM con NaCl 0,1 M a pH 7,0. La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL y la velocidad de barrido a 50 mV/s..... 77

Figura III. 29. Voltamperogramas cíclicos de $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4})$ 10 mM en PBS 10 mM pH 7,4, obtenidos con electrodos modificados con NTC cortos dispersos en DMF. La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL y la velocidad de barrido a 50 mV/s.....	80
Figura III. 30. Voltamperogramas cíclicos de $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4})$ 10 mM en PBS 10 mM pH 7,4, obtenidos en electrodos modificados con NTC largos dispersos en DMF. La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL y la velocidad de barrido a 50 mV/s.....	80
Figura III. 31. Valores de i_{pc}/i_{pa} para NTC dispersos en DMF y PBS: (a) NTC cortos, (b) NTC largos.....	81
Figura III. 32. Valores de ΔE_p para NTC dispersos en DMF y PBS. (a) NTC cortos, (b) NTC largos.....	82
Figura III. 33. Efecto de la amidación de NC oxidados por (A) 3 horas y (B) 6 horas, sobre los voltamperogramas cíclicos de $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4})$ 10 mM. Electrodo modificado con NTC dispersos en DMF de concentración 1 mg/mL. Velocidad de barrido de 50 mV/s.....	83
Figura III. 34. Curva de calibración para <i>ds-DNA</i> en PBS 0,2 M pH 7,4.....	84
Figura III. 35. Espectros UV de distintos NTC y su interacción con 45 ppm de <i>ds-DNA</i> , luego de 24 h de incubación, en tampón formiato pH 5,0: (A) NC, (B) NC-COOH y (C) NC-NH ₂ . La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL.....	86
Figura III. 36. Espectros UV de distintos NTC y su interacción con 45 ppm de <i>ds-DNA</i> luego de 1 h de incubación, en tampón formiato pH 5,0: (A) NC, (B) NC-COOH y (C) NC-NH ₂ . La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL.....	87
Figura III. 37. (A) Corrientes promedio obtenidas en los voltamperogramas de pulso diferencial para 45 ppm de <i>ds-DNA</i> , utilizando diferentes concentraciones de NTC dispersos en PBS 0,2 M pH 7,4. (B) Valores promedio de corrientes obtenidas por VPD versus concentración de la dispersión de <i>MWNT</i> en PBS ($t_{acc} = 5$ min).....	90
Figura III. 38. Valores de corriente promedio de 45 ppm de <i>ds-DNA</i> , en función del t_{acc} para NL y NC dispersos en PBS 0,2 M pH 7,4. Los valores se obtuvieron por VPD y la concentración de la dispersión corresponde a 0,5 mg/mL.....	91
Figura III. 39. Valores de corriente promedio de 45 ppm de <i>ds-DNA</i> , en función del t_{acc} para las muestras oxidadas de diferente longitud. (A) NTC largos, (B) NTC cortos, dispersos en PBS 0,2 M pH 7,4 con una concentración de 0,5 mg/mL.....	93

- Figura III. 40.** Valores promedio de corriente en función del t_{acc} para los sistemas aminados dispersos en PBS 0,2 M pH 7,4 con una concentración de 0,5 mg/mL. 94
- Figura III. 41.** Efecto del grupo funcional de NC, en la respuesta electroquímica de *ds-DNA*. La concentración de las dispersiones corresponde a 0,5 mg/mL en PBS 0,2 M a pH 7,4. 95
- Figura III. 42.** (A) Voltamperogramas de pulso diferencial de 45 ppm de *ds-DNA* con diferentes electrodos modificados con NTC/PBS (0,5 mg/mL), en PBS 0,2 M pH 7,4 con t_{acc} de 3min, (B) Voltamperogramas obtenidos con el mismo electrodo reutilizado. (C) Valores de corriente promedio en función de la concentración de *ds-DNA*..... 96
- Figura III. 43.** Voltamperogramas de pulso diferencial de 45 ppm de *ds-DNA* en electrodos modificados con QUI/NTC (1 mg/mL), el film fue estabilizado con GTA (3% v/v) por 2 s, en tampón formiato 0,2 M pH 5,0 a diferentes tiempos de acumulación: (a) blanco, (b) $t_{acc} = 1$ min, (c) $t_{acc} = 3$ min, (d) $t_{acc} = 5$ min..... 98
- Figura III. 44.** (A) Perfiles voltamperométricos de 45 ppm de *ds-DNA* sobre electrodos modificados, con $t_{acc} = 4$ min. El film fue estabilizado con GTA (3% v/v) por 2 s, en tampón formiato 0,2 M pH 5,0. (---) CV/QUI/NC, (—) CV/QUI/NL. (B) Valores promedio de corriente en función del t_{acc} para los sistemas de la figura (A)..... 99
- Figura III. 45.** (A) Perfiles voltamperométricos de 45 ppm de *ds-DNA* sobre electrodos modificados con muestras oxidadas por 3 h, $t_{acc} = 5$ min. El film fue estabilizado con GTA (3% v/v) por 2 s, en tampón formiato 0,2 M pH 5,0. (---) CV/QUI/NCO₃, (—) CV/QUI/NLO₃. (B) Valores promedio de corriente en función del t_{acc} para los sistemas de la figura (A)..... 100
- Figura III. 46.** (A) Perfiles voltamperométricos de 45 ppm de *ds-DNA* sobre electrodos modificados con muestras oxidadas por 6 h, $t_{acc} = 5$ min. El *film* fue estabilizado con GTA (3% v/v) por 2 s, en tampón formiato 0,2 M pH 5,0. (---) CV/QUI/NCO₆, (—) CV/QUI/NLO₆. (B) Valores promedio de corriente en función del t_{acc} para los sistemas de la figura (A). El análisis estadístico corresponde al *Test de Student*: (***) $p_{value} < 0,001$, (**) $p_{value} < 0,01$ 101
- Figura III. 47.** Voltamperogramas de pulso diferencial para electrodos modificados con dispersiones 1 mg/mL de NTC aminados, a diferentes tiempos de acumulación de 45 ppm de *ds-DNA*. El *film* fue estabilizado con GTA, en tampón formiato 0,2 M pH 5,0. (a) blanco, (b) $t_{acc} = 1$ min, (c) $t_{acc} = 3$ min, (d) $t_{acc} = 5$ min, (e) $t_{acc} = 7$ min. 104

- Figura III. 48.** (A) Voltamperogramas de pulso diferencial de 45 ppm de *ds-DNA* con diferentes electrodos modificados con NTC/QUI (1 mg/mL), en tampón formiato 0,2 M pH 5,0 con t_{acc} de 4 min. El *film* fue estabilizado con GTA 3% v/v por 2 s. (B) Voltamperogramas obtenidos con el mismo electrodo reutilizado. (C) Valores de corriente promedio en función de la concentración de *ds-DNA*, para NTC dispersos en quitosano (QUI) y tampón fosfato (PBS) en las condiciones óptimas de cada sistema. 105
- Figura III. 49.** Curva de calibración para el oligonucleótido en PBS 10 mM pH 7,4. Cada medición fue obtenida con el promedio de tres disoluciones preparadas en forma independiente..... 108
- Figura III. 50.** Isotermas de adsorción de las funcionalizaciones covalente y no covalente (o de adsorción) de NTC con ss-ODN. Concentraciones de ss-ODN utilizadas: 3,9 – 5,9 – 7,9 – 16 y 32 μ M, en PBS 10 mM pH 7,4. Tiempo de incubación: 24 h. 110
- Figura III. 51.** Respuesta electroquímica de electrodos modificados con dispersiones de MWNT_{COOH}, MWNT/ss-ODN_{COV} y MWNT/ss-ODN_{ADS} en tampón acetato 0,2 M a pH 5,0. Dispersiones preparadas a 1 mg/mL. Concentración de ss-ODN para funcionalizar los MWNT: 7,9 μ M..... 112
- Figura III. 52.** Estudio de la concentración de la dispersión de MWNT/ss-ODN_{ADS} en tampón acetato 0,2 M a pH 5,0. MWNT/ss-ODN funcionalizados con una concentración de ODN de 7,9 μ M. Cada medición fue obtenida con el promedio de cuatro electrodos. 113
- Figura III. 53.** Respuesta electroquímica de MWNT funcionalizados con diferentes concentraciones de ss-ODN por adsorción: 3,9 – 5,9 – 7,9 y 32 μ M. Dispersiones preparadas en tampón acetato 0,2 M a pH 5,0 a una concentración de 1 mg/mL Técnica utilizada: VPD. Cada medición fue obtenida con el promedio de cuatro electrodos..... 113
- Figura III. 54.** Comparación de funcionalizaciones covalente y no covalente de NTC con ss-ODN a través de VPD. Concentración de las dispersiones: 1 mg/mL en tampón acetato 0,2 M a pH 5,0. Cada medición fue obtenida con el promedio de cuatro electrodos..... 114

- Figura III. 55.** Voltamperogramas cíclicos del electrodo solo (CV) y modificado con las dispersiones de MWNT_{COOH}, MWNT/ss-ODN_{COV} y MWNT/ss-ODN_{ADS} en PBS 10 mM con NaCl 0,1 M a pH 7,4. Concentración de la dispersión: 1 mg/mL. MWNT funcionalizados con una concentración de ss-ODN de 7,9 μM. Velocidad de barrido: 50 mV/s..... 115
- Figura III. 56.** Voltamperometrías cíclicas de (Fe(CN)₆⁻³/Fe(CN)₆⁻⁴) para dispersiones de MWNT_{COOH}, MWNT/ss-ODN_{COV} y MWNT/ss-ODN_{ADS} en PBS 10 mM con NaCl 0,1 M a pH 7,4. Concentración de la dispersión: 1 mg/mL. MWNT funcionalizados con una concentración de ss-ODN de 7,9 μM. Velocidad de barrido de: 50 mV/s..... 117
- Figura III. 57.** Imágenes SECM (2D y 3D) para electrodo de carbono vítreo sin modificar en modo *feedback*. Mediador redox: FcOH 10 mM en PBS 0,2 M pH 7,4. Velocidad de adquisición: 1 μm/s. 119
- Figura III. 58.** Imágenes SECM (2D y 3D) para MWNT_{COOH} en modo *feedback*. Mediador redox: FcOH 10 mM en PBS 0,2 M pH 7,4. Velocidad de adquisición: 1 μm/s. 119
- Figura III. 59.** Imágenes SECM (2D y 3D) para MWNT/ss-ODN_{COV} en modo *feedback*. Mediador redox: FcOH 10 mM en PBS 0,2 M pH 7,4. Velocidad de adquisición: 1 μm/s. 120
- Figura III. 60.** Imágenes SECM (2D y 3D) para MWNT/ss-ODN_{ADS} en modo *feedback*. Mediador redox: FcOH 10 mM en PBS 0,2 M pH 7,4. Velocidad de adquisición: 1 μm/s. 121
- Figura III. 61.** Posibles conformaciones de ss-ODN al funcionalizar MWNT mediante: (A) adsorción (MWNT/ss-ODN_{ADS}) y (B) unión covalente (MWNT/ss-ODN_{COV})..... 122
- Figura III. 62.** Respuesta electroquímica de MWNT/ss-ODN luego de someterse a: (a) incubación en PBS, (b) incubación con ODN_b, (c) incubación con ODN_c, (d) incubación con ODN_b y luego ODN_c. Las dispersiones de MWNT/ss-ODN fueron preparadas en PBS 0,2 M a pH 7,4 a una concentración de 1 mg/mL. Técnica utilizada: VPD. Cada medición fue obtenida con el promedio de tres electrodos. 124
- Figura III. 63.** Respuesta electroquímica de 20 μM de azul de metileno en PBS 0,2 M pH 7,4 y NaCl 0,1 M sobre electrodos modificados con MWNT/ss-ODN. Dispersiones preparadas en PBS a una concentración de 1 mg/mL. Técnica utilizada: VPD. Cada medición fue obtenida con el promedio de cuatro electrodos. 127

Figura III. 64. Interacción de azul de metileno (puntos azules) con ADN. En (A) y (B), ss-ODN y ds-ODN están adsorbidos sobre los nanotubos (MWNT/ss-ODN_{ADS}), mientras en (C) y (D) ss-ODN y ds-ODN están unidos en forma covalente al nanotubo (MWNT/ss-ODN_{COV}). Las bases guaninas se representan como puntos negros en la cadena del oligonucleótido. (*Adaptación de la figura mostrada en ref. 72*). 128

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Análisis elemental
AM	Azul de metileno
CB	Cloruro de bencetonio
CV	Carbono vítreo
ds-DNA¹	ADN de doble hebra
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FT-IR	Espectroscopía infrarroja
GTA	Glutaraldehído
HRTEM²	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
MWNT³	Nanotubo de carbono de pared múltiple
NC	Nanotubo corto comercial
NCO3	NC oxidado por 3 horas con mezcla sulfonítrica.
NCO6	NC oxidado por 6 horas con mezcla sulfonítrica.
NCO7N	NC oxidado por 6 horas con ácido nítrico.
NC+3	NCO3 modificado con etilendiamina.
NC+6	NCO6 modificado con etilendiamina.
NHS	N-hidroxisuccinimida
NL	Nanotubo largo comercial
NLO3	NL oxidado por 3 horas con mezcla sulfonítrica.
NLO6	NL oxidado por 6 horas con mezcla sulfonítrica.
NLO7N	NL oxidado por 6 horas con ácido nítrico
NTC	Nanotubo de Carbono
ODN_b	Oligonucleótido de bloqueo
ODN_c	Oligonucleótido complementario de ss-ODN
PBS⁴	Disolución tampón de fosfato
QUI	Quitosano
ss-DNA⁵	ADN de una hebra
ss-ODN	Oligonucleótido de una hebra

SEM ⁶	Microscopía electrónica de barrido
SWNT ⁷	Nanotubo de carbono de pared única
TGA ⁸	Análisis termogravimétrico
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano
XPS ⁹	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

De la sigla en inglés:

- 1 *"Double strand deoxyribonucleic acid"*
- 2 *"High Resolution Transmission Electron Microscopy"*
- 3 *"Multi-walled carbon nanotube"*
- 4 *"Phosphate Buffer Solution"*
- 5 *"Single strand deoxyribonucleic acid"*
- 6 *"Scanning Electron Microscopy"*
- 7 *"Single-walled carbon nanotube"*
- 8 *"Thermogravimetric analysis"*
- 9 *"X-Ray Photoelectron Microscopy"*

RESUMEN

Muchos de los desórdenes genéticos conocidos en la actualidad son provocados por cambios en el ADN, ya sea heredados o producidos por daño del material genético, por lo que la detección de estas secuencias específicas y/o su daño es muy importante. En la actualidad se han descrito numerosos métodos para detectar ADN, siendo los biosensores electroquímicos o genosensores los que ofrecen una alternativa de detección continua, rápida, sensible y selectiva.

En esta Tesis se desarrollaron nuevos genosensores basados en nanotubos de carbono (NTC) modificados químicamente. Primero, los NTC fueron funcionalizados con grupos que generan cargas positivas en disolución (NTC-NH₂), a través de uniones covalentes del tipo amida. Esto permitió dispersarlos en medio acuoso, evaluar su interacción en disolución con ADN y favorecer la inmovilización de éste sobre electrodos modificados, sin utilizar agentes dispersantes catiónicos. La caracterización de estas funcionalizaciones se realizó a través de diferentes técnicas espectroscópicas (FT-IR, Raman, XPS) y microscópicas (HR-TEM, SEM), entre otras; mientras que los electrodos modificados se caracterizaron por diferentes técnicas electroquímicas (VC, VPD). Estos electrodos mostraron ser altamente reproducibles y sensibles en la detección de ADN.

En segundo lugar, se generaron biosensores para estudios de hibridación a partir de NTC funcionalizados con un oligonucleótido de hebra simple (ss-ODN). Se evaluaron dos formas de inmovilización: adsorción directa y unión covalente; y se estudió la respuesta electroquímica de ambos sistemas. La caracterización de estas funcionalizaciones se llevó a cabo con diferentes técnicas electroquímicas (VC, VPD, SECM), las que permitieron proponer la conformación que adoptaría el oligonucleótido

sobre el NTC que dependió del tipo de funcionalización realizada. Los electrodos modificados fueron empleados para estudios de hibridación indicando que ambas conformaciones de ss-ODN sobre el nanotubo permiten la hibridación de hebras complementarias, resultados que fueron corroborados con la utilización de un agente intercalante electroactivo como azul de metileno. Finalmente, se determinó que la funcionalización por adsorción del NTC con oligonucleótidos es más sensible a la detección del proceso de hibridación que la funcionalización covalente.

DNA BIOSENSORS BASED ON CHEMICALLY MODIFIED CARBON NANOTUBES

SUMMARY

Many genetics disorders known nowadays are caused by changes in DNA, either inherited or caused by damage of genes, so that the determination of a specific sequence and/or its damage is very important. Currently, many techniques have been described to detect DNA, being the electrochemical biosensors or genosensors the ones that offer a continuous, fast, sensitive and selective detection.

This thesis developed new DNA biosensors based on chemically modified carbon nanotubes (CNT). On one side, CNTs were covalently functionalized with groups that generated positives charges in solution (NTC-NH₂). These modifications allowed their dispersion in aqueous media, to evaluate their interaction with DNA in solution and to improve their immobilization onto modified electrodes without using cationic dispersants. The characterization of modified CNTs was performed by different spectroscopic (IR, Raman, XPS) and microscopic (SEM, HRTEM) techniques, among others. Whereas, modified electrodes were characterized by different electrochemical techniques (CV, DPV). The resulting electrodes proved to be highly reproducible and sensitive in the detection of DNA.

On the other hand, biosensors for hybridization were also generated. For this purpose, functionalized CNTs with a single strand oligonucleotide (ss-ODN) were used. Two methods of immobilization were evaluated: direct adsorption and covalent attachment, and the electrochemical behavior of both systems were characterized. The

results allowed to propose two different spatial conformations of the oligonucleotide on the CNT depending of the type of functionalization. The modified electrodes were applied in hybridization studies revealing that both conformations of ss-ODN upon nanotube allowed the hybridization between complementary strands. This fact was corroborated by using an electroactive intercalant agent such as Methylene blue. Finally, we determined that the functionalization of CNT through direct adsorption of the oligonucleotide is more sensitive to detect the hybridization than the covalent functionalization.

INTRODUCCION

Desde que el primer biosensor fue publicado por Clark y Lyons en 1962 [1], el desarrollo de este tipo de sensores ha crecido en forma exponencial. Las investigaciones actuales radican fundamentalmente en su aplicación en los campos de medicina, agricultura, monitoreo ambiental e industrial, entre otras [2].

Los biosensores son un tipo específico de sensor químico que integra un elemento de "reconocimiento biológico", que detecta selectivamente al analito, y un "transductor" que convierte el reconocimiento en una señal analítica medible. El elemento biológico puede ser un biocatalizador (enzimas, microorganismos) o un bioligando (anticuerpos, ácidos nucleicos), mientras que los transductores tradicionales son electroquímicos [3], ópticos [4], piezoelectrónicos [5] o magnéticos [6].

Los biosensores electroquímicos combinan las técnicas electroquímicas con la especificidad de los procesos de reconocimiento biológico, donde el objetivo es producir biológicamente una señal eléctrica que se relacione con la concentración del analito. Para esto, el electrodo convierte el reconocimiento biológico en una respuesta potenciométrica (a través de una diferencia de potencial) o amperométrica, aplicando un potencial constante y monitoreando la corriente asociada con la oxidación o reducción del analito estudiado [7, 8].

En el caso de los biosensores electroquímicos de ADN (genosensores), el transductor es un electrodo en el cual la especie inmovilizada sobre su superficie es ADN [9]. Estos genosensores han demostrado ser rápidos, simples y de bajo costo para la determinación de enfermedades genéticas e infecciones [10, 11] y para la

detección de daño e interacciones entre el ADN y moléculas pequeñas [12]. Además, ofrecen una alternativa de detección continua, selectiva y reutilizable [13].

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es un polímero aniónico cuyo modelo molecular de doble hélice fue postulado por Watson y Crick en 1953 [14]. Según este modelo, cada hebra de ADN está constituida por una unidad simple llamada nucleótido, formada a su vez por una base nitrogenada (adenina, A; guanina, G; citosina, C; timina, T), un azúcar pentosa (desoxirribosa) y un grupo fosfato (figura I.1a). Además, cada base nitrogenada de una hebra, se complementa con la base opuesta de la otra hebra (A con T y G con C) a través de puentes de hidrógeno [14]. Ambas hebras se complementan en sentido antiparalelo, formando una estructura de doble hebra que se observa en la fig. I.1b.

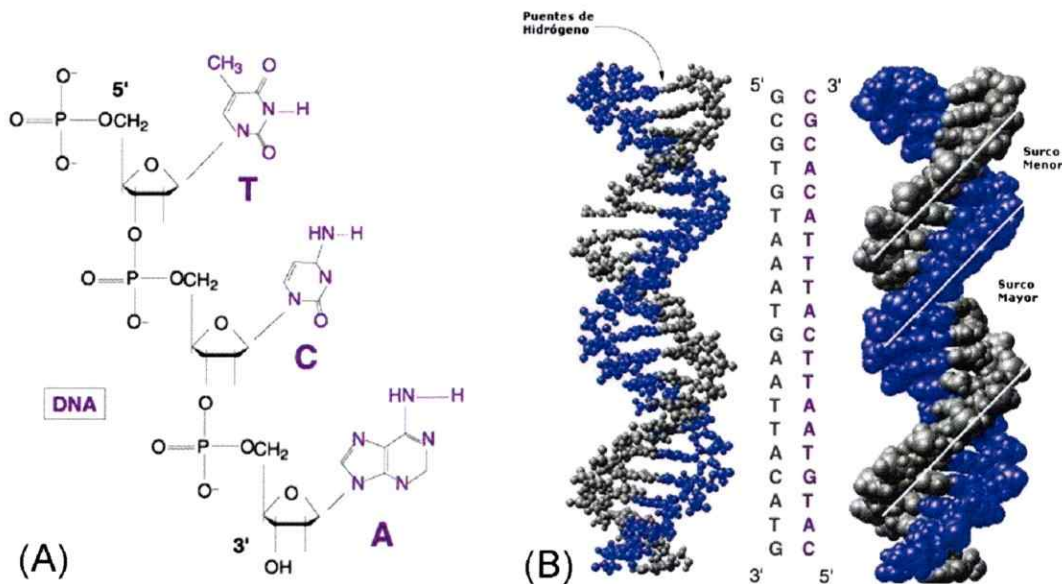


Figura I. 1. (a) Hebra simple de ADN donde se observan las bases A, C y T unidas al esqueleto azúcar-fosfato. (b) Modelo de la doble hélice de ADN de Watson y Crick.

Desde el descubrimiento de la electroactividad de los ácidos nucleicos por Paleček en 1960 [15], ha habido un creciente interés en el desarrollo de genosensores. Se ha establecido que la oxidación del ADN es una fuente importante de inestabilidad genómica desde que se hizo evidente que los productos de oxidación de sus bases juegan un rol importante en mutagénesis, carcinogénesis y en enfermedades relacionadas con la edad. Es por esto que existe gran interés en la determinación y caracterización de los mecanismos involucrados en el daño oxidativo de las bases del ADN [16]. En este sentido, los genosensores electroquímicos han demostrado ser excelentes herramientas para la investigación de daño del material genético, ya que la mayoría de ellos determinan las señales de oxidación de las purinas, principalmente de guanina, para monitoriar el grado del daño provocado al ADN [12, 17, 18]. Esto se debe a que la guanina tiene el potencial de oxidación más bajo de todas las bases nitrogenadas [19] y el producto principal de su oxidación, 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua), es considerado un buen biomarcador de daño a ADN, fácilmente cuantificable por voltamperometría (figura I.2) [20, 21].

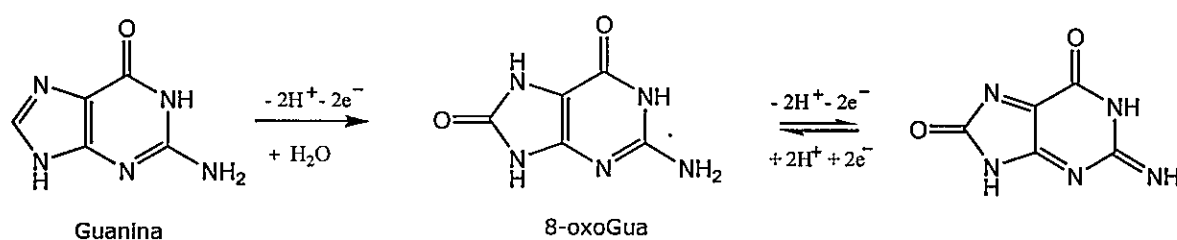


Figura I. 2. Mecanismo electroquímico de oxidación de guanina.

Para desarrollar un genosensor se debe considerar no sólo el tipo de ácido nucleico que será inmovilizado, sino también cómo será la interacción entre el ADN y la

superficie del electrodo, la longitud de las moléculas que acoplarán el ADN al electrodo y la disolución en la que el biosensor será inmerso.

El paso fundamental en la construcción del biosensor es la inmovilización de ADN, ya que la cantidad inmovilizada afectará directamente la exactitud, sensibilidad y selectividad del biosensor. En este sentido, es necesario que la inmovilización sea estable durante los ensayos, que las moléculas inmovilizadas no pierdan sus funcionalidades biológicas y que adopten una conformación y orientación que no restrinja la accesibilidad del analito a estudiar.

En la actualidad, las técnicas utilizadas están siendo complementadas con nanomateriales, principalmente nanopartículas metálicas y nanotubos de carbono, ya que aumentan el área superficial del transductor electroquímico [13, 22, 23].

Los nanotubos de carbono (NTC) han sido reconocidos como uno de los nanomateriales para electrodos más prometedores desde su primera aplicación en la oxidación de dopamina en 1996 [24], lo que se debe a sus propiedades estructurales, mecánicas y electrónicas, entre las que se incluyen: alta estabilidad química y térmica, alta elasticidad y fuerza tensil, y conductividad [25]. A partir de esa fecha, la investigación de los NTC se ha centrado en su comportamiento electrocatalítico hacia la oxidación de biomoléculas y su desempeño ha resultado ser muy superior a los de otros electrodos de carbono en términos de velocidad de reacción, reversibilidad y límites de detección [26].

Los NTC son nanomateriales que fueron descubiertos por lijima en la década de los 90. Son considerados una nueva forma alotrópica del carbono como son el diamante, el grafito o los fulerenos y sus propiedades son extremadamente sensibles a su grado de grafitización, diámetro y quiralidad, y también si son de pared simple (*SWNT*) o de pared múltiple (*MWNT*) (figura 1.3). Los *SWNT* fueron descubiertos en 1993 [27] y son

estructuras cilíndricas que tienen la apariencia de una lámina de grafeno enrollada sobre sí misma, cerrados en sus extremos por semiesferas de fulerenos (fig. 1.3A). Por otra parte, los *MWNT* están formados por dos o más cilindros concéntricos y fueron descubiertos dos años antes [28]. Los diámetros observados varían de 0,4 a 3 nm para *SWNT* y desde 1,4 a 100 nm para *MWNT* [29].

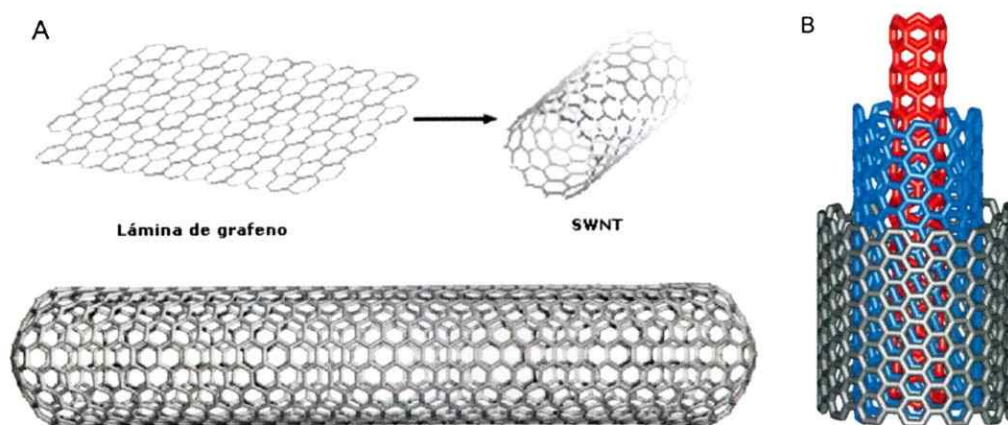


Figura 1. 3. (A) Nanotubo de pared simple (*SWNT*), (B) Nanotubo de pared múltiple (*MWNT*).

Ambos tipos de nanotubos presentan diferentes propiedades eléctricas, donde los *SWNT* pueden ser semiconductores o metálicos, mientras los *MWNT* sólo son semiconductores, pudiendo aplicarlos en diferentes áreas [30]. En la actualidad se están llevando a cabo diversas investigaciones para aplicar los NTC en materiales de emisión de campo [31, 32], transistores [33, 34], diodos [35] y sensores [36-39].

Los *MWNT* se han utilizado en aplicaciones electroquímicas principalmente debido a su efecto electrocatalítico sobre los procesos redox de diferentes analitos [40, 41]. La dificultad experimental que presentan es que son insolubles y difícilmente dispersables en cualquier tipo de disolvente, lo que dificulta su uso para modificar electrodos. Es por

esto que para poder integrar los nanotubos con elementos biológicos se debe mejorar su dispersabilidad, especialmente en medio acuoso. Para resolver este problema se han utilizado diferentes procedimientos como se muestran en la figura I.4 [42].

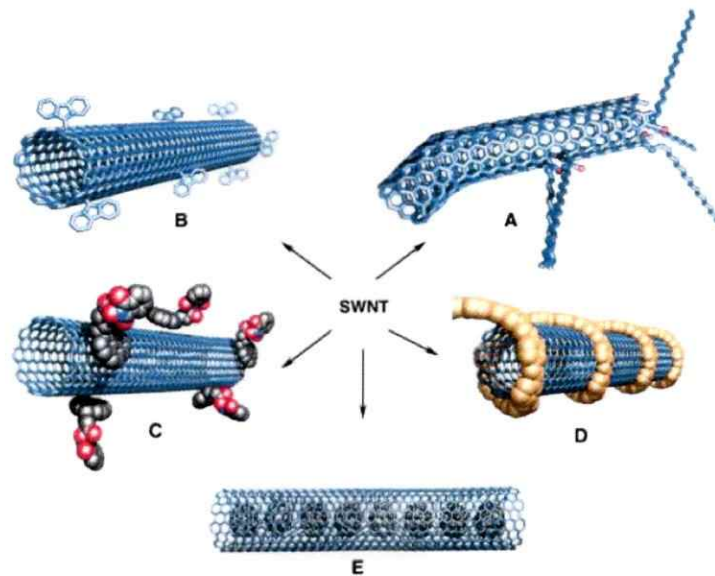


Figura I. 4. Posibles funcionalizaciones de NTC: (A) Funcionalización covalente de los sitios defectuosos, (B) Funcionalización covalente con moléculas orgánicas pequeñas en las paredes del nanotubo, (C) Funcionalización no covalente con surfactantes, (D) Funcionalización no covalente con polímeros y (E) Funcionalización endohedral con, por ejemplo, C_{60} .

El primero involucra una “funcionalización no-covalente” de los nanotubos, lo que implica dispersarlos con surfactantes (fig. I.4c), polímeros y/o biopolímeros (fig. I.4d), manteniendo la estructura electrónica de la superficie aromática del nanotubo [43-48]. Los surfactantes son un medio adecuado para la dispersión, ya que sus colas hidrofóbicas interactúan con los NTC, mientras la parte hidrofílica mejora la solubilidad en medio acuoso. Por otra parte, los ácidos nucleicos son candidatos ideales para formar complejos supramoleculares, basados en interacciones del tipo π - π entre las bases aromáticas del biopolímero y la superficie del NTC. Incluso, Zeng y col. [49] han

descrito una forma fácil de dispersar NTC por simple sonicación en presencia de ss-DNA. Por último, los polímeros representan una buena alternativa a pesar de no ser más eficientes que los surfactantes, envolviendo el nanotubo a través de interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas, dependiendo del polímero utilizado [44], mejorando su dispersión tanto en disolventes orgánicos [50, 51] como en medio acuoso [52].

En el desarrollo de genosensores con NTC se han utilizado distintos agentes dispersantes para modificar el electrodo y lograr la inmovilización de ADN. Se ha trabajado tanto con surfactantes [53] como con polímeros catiónicos [54-56], ya que además de permitir la dispersión de los NTC, favorecen la adsorción de moléculas de ADN que presentan una estructura cargada negativamente debido a su cadena fosfatada. El uso de estos agentes dispersantes aumenta la respuesta del sensor respecto al electrodo sin modificar, sin embargo la presencia del agente dispersante puede disminuir las propiedades eléctricas de los nanotubos nativos, desaprovechándose una de las principales características de estas nanoestructuras [57].

Otra metodología para mejorar la dispersión de los NTC se basa en funcionalizarlos covalentemente (fig. 1.4 a y b), donde, en general, los nanotubos son en un primer paso oxidados, generando grupos carboxílicos que pueden derivatizarse con distintos tipos de moléculas [58]. Al introducir grupos funcionales a las paredes del NTC se pueden crear repulsiones electrostáticas entre ellos provocando su dispersión en el disolvente. Por ejemplo, Georgakilas y col. [59] han unido covalentemente pequeñas cadenas alquílicas con grupos amino terminales en las paredes de *SWNT* y *MWNT*, mejorando su dispersabilidad en medio acuoso, permitiendo explorar el uso de estos sistemas en aplicaciones biológicas.

Por otro lado, la incorporación de grupos funcionales al nanotubo también permite aplicar estos sistemas en estudios de interacción con biomoléculas como ADN. En este sentido, Yang y col. [60] compararon la adsorción en solución de ADN en NTC sin cargas y NTC cargados positivamente (NTC-NH₃⁺), encontrando que la adsorción en NTC-NH₃⁺ es ~4,2 veces mayor que para NTC sin cargas positivas. Sin embargo, los estudios de NTC cargados positivamente y ADN sólo se han enfocado a su interacción en disolución y no en la generación de biosensores.

Los NTC poseen regiones con distinta reactividad frente a funcionalizaciones covalentes. La funcionalización en sus extremos es más favorable que en las paredes, ya que la pared presenta una pronunciada curvatura en dos dimensiones, a diferencia de la baja curvatura de los extremos [61]; además, en las paredes se requiere un cambio de hibridación del átomo de carbono de sp² a sp³ [58]. Como se observa en la figura I.5, los nanotubos presentan sitios defectuosos que se forman durante la síntesis (entre 1-3% de los átomos de carbono) los que son un importante punto de partida para el desarrollo de NTC modificados.

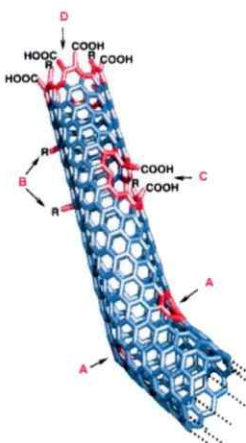


Figura I. 5. Sitios defectuosos en NTC: (A) anillos de 5 ó 7 miembros que provocan la curvatura de la pared, (B) átomos de carbono con hibridación sp³, (C) daño de la pared por condiciones oxidativas y (D) extremo abierto.

Para incorporar grupos funcionales en los NTC se han utilizado diferentes métodos de oxidación que involucran algunos agentes oxidantes como: H_2SO_4 , HNO_3 , HCl , H_2O_2 , O_2 , etc., que introducen en la superficie y los extremos, distintos grupos funcionales oxigenados (carbonilos, carboxilos e hidroxilos). Debido a las propiedades oxidantes de los agentes mencionados, algunos producen preferentemente grupos ácidos ($-COOH$), mientras otros producen preferentemente grupos hidroxilos ($-OH$) [62]. Estas modificaciones son las más utilizadas debido a que mejoran la dispersabilidad de los NTC y sus propiedades eléctricas permanecen intactas, a pesar de que en la mayoría de los casos se observa una disminución en la longitud de los nanotubos [29].

La presencia de grupos carboxílicos permite una segunda funcionalización de los NTC, por ejemplo, una reacción de amidación. Esto se puede hacer activando el grupo carbonilo con $SOCl_2$ y luego, haciéndolo reaccionar con aminas o puede llevarse a cabo a través de una condensación directa de los grupos carboxílicos con aminas [63]. Este tipo de reacción ha permitido unir a los nanotubos diferentes moléculas como polipéptidos [64] y ácidos nucleicos [60, 65], lo que permite generar, por ejemplo, biosensores de hibridación (fig. 1.6). En este tipo de biosensor se inmoviliza sobre el electrodo una hebra simple de ADN (*ss-DNA*), y luego se hace interactuar con su hebra complementaria (analito) bajo ciertas condiciones experimentales de pH, fuerza iónica y temperatura [66, 67]. En la figura 1.6 se observa un esquema general de hibridación [9]. Estos genosensores tienen un papel importante tanto en aplicaciones de tipo farmacéuticas como clínicas [68].

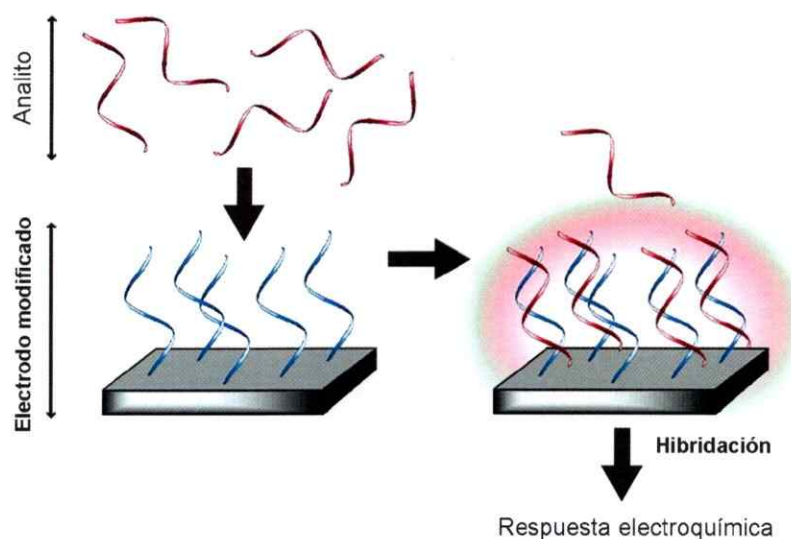


Figura I. 6. Diseño general para un biosensor de hibridación. La hebra complementaria (analito) es reconocida por la hebra inmovilizada en el electrodo y el proceso de hibridación es reconocido por el transductor dando como resultado una respuesta electroquímica.

La detección de la hibridación entre dos hebras complementarias puede obtenerse a través de una medición directa de la oxidación de las guaninas presentes en las hebras, o por un método indirecto de medición utilizando un agente intercalante electroactivo que distinga entre ADN de doble hebra (*ds-DNA*) y de una hebra (*ss-DNA*). De estos dos métodos el más utilizado corresponde al último, dado que ofrece una amplia variedad de formas con las cuales se puede detectar la hibridación, con alta selectividad y sensibilidad [69].

El trabajo realizado por Erdem y col. [70] utilizando el indicador redox azul de metileno (AM) en la detección de secuencias relacionadas con el virus de la hepatitis B, es uno de los mejores ejemplos en biosensores de hibridación. La interacción de esta

molécula redox puede seguirse a través de su señal de reducción [71], como se observa en la figura I.7.

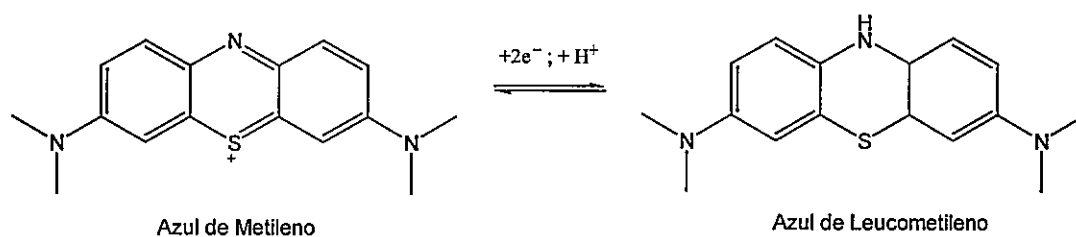


Figura I. 7. Reacción redox de azul de metileno a valores de pH superiores a 6.

El AM presenta una alta afinidad con ADN de una hebra (*ss-DNA*) debido a su interacción con las bases guaninas libres [68, 72, 73]. Según lo observado por Erdem, luego de la hibridación se observa una disminución de la señal de AM debido a que su acceso a las bases guaninas se encuentra restringido. Este comportamiento también ha sido observado por Kerman y col. donde el ADN ha sido inmovilizado sobre electrodos de oro [68] y por Kara y col. en electrodos de pasta de carbono [73].

En base a todos los antecedentes presentados, en esta tesis se llevó a cabo la funcionalización de *MWNT* con diferentes moléculas para generar distintos tipos de biosensores de ADN. En primer lugar, al funcionalizar nanotubos de carbono con moléculas que le otorguen cargas positivas, permite su aplicación en biosensores capaces de detectar ADN. Y por otra parte, la funcionalización de *MWNT* con un oligonucleótido (*ss-ODN*), permite su aplicación en biosensores de hibridación.

1.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

- (a) La funcionalización covalente de NTC con grupos que generen carga positiva mejorará su dispersabilidad en medio acuoso, favorecerá la adsorción de moléculas de ADN y en consecuencia mejorará la respuesta de un biosensor electroquímico de ADN.
- (b) El método utilizado para funcionalizar los NTC con un oligonucleótido, afectará la sensibilidad del biosensor electroquímico para estudios de hibridación.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Desarrollar, caracterizar y evaluar biosensores electroquímicos de ADN, basados en nanotubos de carbono modificados químicamente, para futuros estudios de daño en el material genético y/o estudios de hibridación.

1.2.2 Objetivos específicos

- **Desarrollar, caracterizar y evaluar biosensores electroquímicos de ADN, basados en NTC modificados químicamente, para futuros estudios de daño en el material genético.**
 - a. Funcionalizar NTC a través de uniones covalentes con grupos que generen una carga positiva en medio acuoso (NTC-NH₂).
 - b. Caracterizar los NTC funcionalizados y sin funcionalizar.
 - c. Evaluar comparativamente la capacidad de dispersión de los NTC funcionalizados y sin funcionalizar en diferentes medios.

- d. Modificar electrodos de carbono vítreo con los NTC y caracterizarlos por técnicas electroquímicas.
 - e. Evaluar la interacción de los diferentes NTC funcionalizados con ADN en solución.
 - f. Evaluar la adsorción de moléculas de ADN sobre electrodos de carbono vítreo modificados con NTC.
 - g. Comparar los genosensores construidos con NTC, utilizando diferentes agentes dispersantes.
- **Desarrollar, caracterizar y evaluar biosensores electroquímicos de ADN, basados en nanotubos de carbono modificados químicamente, para estudios de hibridación.**
 - a. Funcionalizar NTC con un oligonucleótido a través de dos metodologías diferentes (MWNT/ss-ODN).
 - b. Modificar electrodos de carbono vítreo con MWNT/ss-ODN y caracterizarlos por técnicas electroquímicas.
 - c. Estudiar la hibridación de los diferentes MWNT/ss-ODN, a través de la señal de oxidación de las bases guaninas.
 - d. Estudiar la hibridación de los diferentes MWNT/ss-ODN, a través de la señal de reducción de azul de metileno.

MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Reactivos y Disolventes

- Acetona, Lab-Tech.
- Ácido acético glacial (99.8%), Merck.
- Ácido bórico (99%) p.a., Fluka Chemika.
- Ácido clorhídrico (37%), Merck.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Merck.
- Acido nítrico (65%), Merck.
- Ácido *orto*-fosfórico (85%) p.a., Merck.
- Acido sulfúrico (95-97%), Merck.
- ADN doble hebra (*ds-DNA*), Sigma Aldrich.
- Agua desionizada Milli-Q.
- Azul de metileno, Merck.
- Bicarbonato de sodio, Merck.
- Cloruro de bencetonio (CAS 121-54-0), Sigma Aldrich.
- Cloruro de tionilo, Merck.
- 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida-HCl (EDC), Acrös Organics.
- Etanol p.a., Merck.
- Etilendiamina, Merck.
- Ferricianuro de potasio (99%), Merck.
- Ferroceno metanol (97%), Sigma Aldrich.
- Ferrocianuro de potasio (99%), Merck.
- Glutaraldehído (25% v/v disolución acuosa), CALBIOCHEM.
- Hidróxido de sodio (pellets), Merck.
- Kit "Test de Kaiser", Sigma-Aldrich.
- Nanotubos de carbono de multipared (*MWNT*) de dos longitudes: cortos (1-5 μm y 30 ± 15 nm de diámetro) y largos (5-20 μm y 30 ± 15 nm de diámetro), NanoLab (USA).

- N,N - dimetilformamida p.a., Merck.
- N-hidroxisuccinimida, Pierce.
- Oligo-20 amino (5'-NH₂-CTCGATGACTCAATGACTCG-3'), Eurogentec.
- Oligo-20 complementario (5'-CGAGTCATTGAGTCATCGAG-3'), E. Reilley.
- Oligo-21 de bloqueo (5'-TATACATCTACATCTACATAT-3'), E. Reilley.
- Quitosano (PM medio, Cat. N° 44887-7, viscosidad 200.000 cps), Sigma Aldrich.
- Tris(hidroximetil)-aminometano p.a., Merck.

2.1.2 Material de laboratorio

- Alumina Micropolish 0,3 y 0,05 µm, Buehtler.
- Barras magnéticas de diferentes tamaños.
- Cubetas de cuarzo (Spectrophotometer Cell VWR International, 10 mm Light path), Merck.
- Espátulas
- Material de vidrio clase A.
- Membranas para filtración en medio acuoso (Nylon membrane filters 0,2 µm 47 mm, Cat. N° 7402-004), Whatman.
- Micropipetas de 0,5-10 µL, 10-100 µL y 100-1000 µL, Eppendorf.
- Microtubos Safe-Lock de 0,5 – 1,5 y 2,0 mL, Eppendorf.
- Paño para pulir electrodos, Buehtler.
- Papel de pesar encerado, VWR Scientific Products.
- Puntas para micropipetas de 0,5-10 µL, 10-100 µL y 100-1000 µL, Eppendorf.

2.2 EQUIPOS

2.2.1 Equipos de uso general

- Agitador magnético, HANNA Instruments HI 190.
- Balanza de precisión, Precisa 40SM-200^a (sensibilidad 0,01 mg)
- Cámara digital
- Estufa de secado con control de temperatura, WTC binder.
- Heidolph Vortex-Shaker Reax 2000, 200-2400 rpm, 220 V, 42 W.
- Medidor de pH, WTW modelo pMx 3000.

- Microscopio óptico, B3 professional series (MOTIC). Software Motic Images Plus 2.0.
- Placa calefactora, Hotplate stirrer LabTech Darhan Labtech, Ltd.
- Rotavapor Heidolph VV 2000.
- Sistema purificador de agua, Milli-Q, Ultra-Pure Water System.
- Sonificador Branson Branson 2210.
- *Software* para análisis estadístico STATA 9.1. *Test* utilizado: *Test de Student* con un intervalo de confianza del 95%.

2.2.2 Equipos utilizados para caracterización de muestras

- Análisis Elemental: Flas 1112, Thermofisher.
- Análisis Termogravimétrico: SETARAM Setsys Evolution 16/18 analyzer.
- Espectroscopía FT-IR: Espectrómetro Bruker Vertex 70.
- Espectroscopía Raman: Espectrómetro micro-Raman Renishaw serie 1000
- HRTEM: Jeol 1010. SIS Megaview III Camera.
- Isotermas de adsorción: BET Micromeritics ASAP2020.
- SEM: Microscopio Hitachi S3400 N
- XPS: ESCAPlus Omicron.
- Determinación de sodio: Jobin-Yvon 2000 ICP instrument.

2.2.3 Equipos voltamperométricos

- Analizador voltamperométrico CHI 900 (CH Instruments, Inc., USA)
- Celda electroquímica de vidrio
- Electrodo de Trabajo: electrodo de carbono vítreo (CVJ CHI 104P)
- Electrodo de Referencia: Ag/AgCl (0,3 M) (BAS, RE5B)
- Electrodo Auxiliar: alambre de platino (BASi MW-1032)
- SECM (Electrodo de trabajo 1): microelectrodo de fibra de carbono de 10 μm de diámetro.
- SECM (Electrodo de trabajo 2): electrodo de carbono vítreo corto (CVJ CHI 104P)

2.2.4 Equipos espectroscópicos UV-visible

- Para medir disolución de *ds-DNA*: Espectrofotómetro UV-vis UNICAM modelo UV-3. Software VISION 3.2 para control del instrumento
- Para medir disolución de *ss-ODN*: Espectrofotómetro UV-2401PC Shimadzu. Software UVProbe para control de instrumento.

2.3 MÉTODOS

Todas las soluciones fueron preparadas con agua Milli-Q.

2.3.1 Tampones utilizados

a) Tampón acetato 0,2 M, pH 5,0.

Se preparó con 11,44 mL de ácido acético glacial, aforando a un volumen de 1 L. El pH fue ajustado con una disolución concentrada de NaOH.

b) Tampón Britton-Robinson 0,1 M pH 7,4.

Preparada con 6,18 g. de ácido bórico, 6,7 mL de ácido o-fosfórico y 5,7 mL de ácido acético glacial, enrasando a un volumen de 1 L. El pH fue ajustado con una disolución concentrada de NaOH.

c) Tampón formiato 0,2 M pH 5,0.

Se preparó con 7,62 mL de ácido fórmico, aforando hasta un volumen de 1 L. El pH fue ajustado con una disolución concentrada de NaOH.

d) Tampón fosfato (PBS) 0,2 M y 10 mM, pH 7,4.

Se prepararon con 13,4 y 0,67 mL de ácido o-fosfórico, respectivamente. Ambas fueron aforadas hasta un volumen de 1 L. El pH fue ajustado con una disolución concentrada de NaOH.

e) Tampón TRIS-EDTA (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), pH 8,0.

Se preparó con 121,1 mg de Tris(hidroximetil)-aminometano y 18,6 mg de EDTA, los cuales se disolvieron en un volumen final de 50 mL. El pH de la disolución fue ajustado con disolución concentrada de HCl.

2.3.2 Preparación de soluciones de trabajo

a) Ácido acético 1% v/v

Se preparó con 1 mL de ácido acético glacial, aforado a un volumen de 100 mL.

f) Ácido clorhídrico 0,1 M

Se preparó con 8,40 mL de ácido clorhídrico, aforando a un volumen de 1 L.

g) Ácido nítrico 7 M

Se preparó con 242 mL de ácido nítrico, aforando a un volumen de 500 mL.

h) Azul de metileno 1 mM

Se preparó con 7,82 mg de azul de metileno, aforando a un volumen total de 25 mL.

i) Bicarbonato de sodio 0,05 M

Se preparó con 200 mg de NaHCO_3 , aforando a un volumen de 100 mL.

j) Cloruro de bencetonio 10 mM

Se disolvió 44,78 mg en 10 mL de tampón Britton-Robinson 0,1 M pH 7,4 (ver 2.3.1 b).

k) (Ferri/Ferro)cianuro 10 mM, NaCl 0,1 M

Se disolvió 32,9 mg de ferricianuro de potasio, 42,2 mg de ferrocianuro de potasio y 58,4 mg de NaCl, en 10 mL de tampón fosfato (PBS) 10 mM pH 7,4 (ver 2.3.1 d).

l) Ferrocenometanol 10 mM

Se disolvió 2,16 mg de ferrocenometanol, en 10 mL de PBS 10 mM pH 7,4 (ver 2.3.1 d).

m) Glutaraldehído 3% v/v

Se preparó tomando 1,2 mL de la disolución inicial de 25% y se aforó a 10 mL.

n) Hidróxido de sodio 0,05 M

Se disolvió 420 mg de NaOH, aforando a un volumen total de 100 mL.

o) Mezcla sulfo-nítrica 3 M (3:1)

Se preparó 100 mL de H_2SO_4 con 16,66 mL de ácido sulfúrico y 25 mL de HNO_3 con 5,19 mL del ácido. Para la disolución final se mezclaron 60 mL de H_2SO_4 con 20 mL de HNO_3 .

p) Quitosano 1% p/v

Se disolvió 0,1 g de quitosano en 10 mL de disolución de ácido acético 1% v/v (ver 2.3.2 a). La disolución es sonicada por 1 hora y luego aforada.

q) Disolución de etanol al 60%

Para preparar 500 mL de disolución se toman 312,5 mL de EtOH al 96% comercial y se completa el volumen total con agua Milli-Q.

r) Disolución de hebra complementaria (ODN_c) y de bloqueo (ODN_b), para estudios de hibridación.

Se disuelve el oligonucleótido en un volumen determinado de tampón fosfato (PBS) 10 mM pH 7,4 (ver 2.3.1 d) para obtener una muestra final de 1000 ppm. El peso molecular se indica por el fabricante en la etiqueta. La disolución se almacena a -20 °C.

s) Disolución stock de ds-DNA de 1000 ppm

Se disolvió 1 mg de ds-DNA liofilizado en 1 mL de tampón TRIS-EDTA (ver 2.3.1 e). La concentración final de esta disolución es aproximadamente 1000 ppm, la cual se determina a través de mediciones por UV-visible. La muestra final es alicuotada en microtubos de 0,5 mL y almacenada a -20 °C.

t) Disolución stock de ss-ODN de 100 μM

Se disuelve el oligonucleótido en PBS 10 mM, pH 7,4 (ver 2.3.1 d). La muestra final tiene una concentración de 100 μM, la que se calcula según el valor de peso molecular entregado por el proveedor. La disolución es alicuotada en microtubos de 0,5 mL y se almacena a -20 °C.

2.3.3 Funcionalización de MWNT

a) Oxidación con mezcla sulfo-nítrica

Una pequeña cantidad de MWNT (< 100 mg) son puestos a reflujo en 80 mL de una mezcla H₂SO₄/HNO₃ (3:1 v/v, 3 M), a dos tiempos de oxidación (3 y 6 h). El tiempo de reflujo empieza cuando cae la primera gota. Luego de transcurrido el tiempo de reacción, las muestras se filtran y lavan hasta pH neutro. Las muestras se secan a 50 °C por 12 h.

b) Oxidación con ácido nítrico

250 mg de *MWNT* se sometieron a reflujo con 100 mL de HNO_3 7 M, por 6 h. El tiempo de reflujo empieza cuando cae la primera gota. Transcurrido el tiempo de reacción la muestra se filtra y lava hasta pH neutro. La muestra filtrada y lavada se seca en estufa de vacío por 12 h.

c) Amidación con etilendiamina (EDA)

100 mg de *MWNT* cortos oxidados con mezcla sulfo-nítrica (NCO_3 y NCO_6) se hicieron reaccionar con SOCl_2 (20 mL) por 24 h a reflujo. El tiempo de reflujo empieza cuando cae la primera gota. La temperatura del sistema fue mantenida entre 65-70 °C. Pasado el tiempo de reacción, el SOCl_2 residual fue extraído utilizando un rotavapor, obteniendo así *MWNT-COCl*. Inmediatamente después se adicionó 20 mL de etilendiamina (EDA) y se hizo reaccionar por 12 h a 30-40 °C en agitación. La etilendiamina que no reaccionó se extrajo con rotavapor hasta sequedad. Luego las muestras se lavaron primero con HCl 0,1 M, luego agua Milli-Q y finalmente acetona. El sólido se secó a 50 °C por 24 h, obteniendo así las muestras aminadas ($\text{NC}+3$ y $\text{NC}+6$). Los pasos de la funcionalización se resumen en la figura II.1.

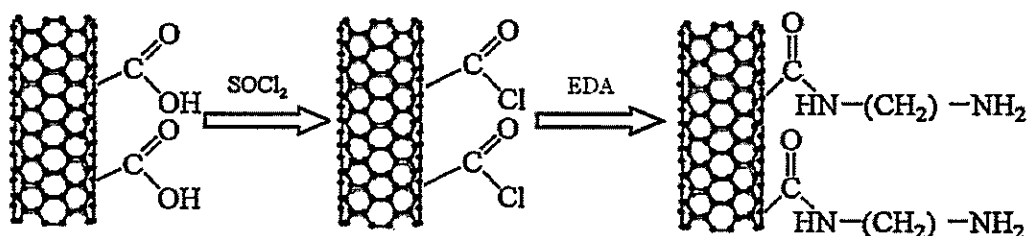


Figura II. 1. Reacción general de la amidación de NTC oxidados con etilendiamina

d) Funcionalización no covalente con oligonucleótido (MWNT/ss-ODN_{ADS})

3 mg de NLO6 se colocaron en agitación, a temperatura ambiente, con una disolución del oligonucleótido (ss-ODN) (de diferentes concentraciones preparadas a partir de la disolución *stock* (ver 2.3.2 t)). Un volumen final de 3 mL se completó con PBS 10 mM pH 7,4. Luego de 24 h las dispersiones se centrifugan por 60 min a 13.000 rpm y se recolectaron los sobrenadantes.

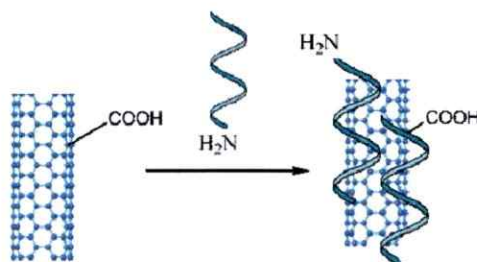


Figura II. 2. Funcionalización no covalente de MWNT con un oligonucleótido.

e) Funcionalización covalente con oligonucleótido (MWNT/ss-ODN_{COV})

Los grupos carboxílicos de NLO6 (3 mg) se activaron a través de una reacción vía carbodiimida, adicionando 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida-HCl (EDC, 0,4 mg/mL) y N-hidroxisuccinimida (NHS, 0,6 mg/mL) en una disolución de PBS 10 mM pH 7,0. Se sonica por 15 min, se centrifuga por 30 min a 13.000 rpm y posteriormente se extrae el sobrenadante que contiene el EDC y NHS en exceso. Al sólido se le adiciona una disolución de ss-ODN (el volumen varía según la concentración de ss-ODN deseada), completando el volumen final con PBS 10 mM pH 7,0 y se coloca todo en agitación por 24 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción, se centrifuga por 60 min a 13.000 rpm y se extrae el sobrenadante.

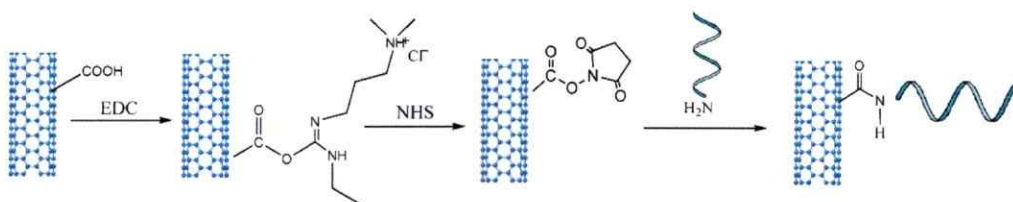


Figura II. 3. Funcionalización covalente con un oligonucleótido vía carbodiimida.

2.3.4 Caracterización de *MWNT* oxidados y aminados

- Análisis termogravimétrico (TGA)

Los resultados se obtuvieron calentando la muestra sólida de 0 a 1450 °C, con una rampa de calor de 5 °C/min y un caudal de 50 mL/min, bajo atmósfera de nitrógeno.

- Espectroscopía Raman

Se utilizó un láser de He-Ne (632,8 nm). Cada espectro se obtuvo utilizando una potencia del 25%, con un tiempo de adquisición de 10 segundos, escaneo continuo y 25x de objetivo

- Determinación de grupos ácidos

Se colocaron 50 mg de *MWNT* oxidados con 25 mL de NaHCO₃ 0,05 M en sonicación por 30 min. En atmósfera inerte y temperatura ambiente se deja en agitación por 48 h, luego de este tiempo la muestra se filtró y lavó. De esta forma se neutralizan sólo los grupos -COOH presentes (1).



Del mismo modo, se colocaron 50 mg de *MWNT* oxidados en agitación, atmósfera inerte y temperatura ambiente, con un volumen y concentración determinada de NaOH por 48 h. Luego, la muestra se filtró y lavó (2). De esta forma se neutralizarán todos los grupos ácidos de la nanoestructura.



A ambas muestras se les midió la cantidad de sodio, por lo tanto es posible comparar la cantidad de sodio presente en cada muestra, diferenciando la cantidad de sodio que neutraliza todos los grupos (2), al que neutraliza sólo grupos carboxílicos (1).

- Test de Kaiser

Este test se basa en la generación de color por la reacción de ninhidrina con aminas primarias, la que varía de azul a violeta. Este producto llamado púrpura de Ruhemanns es estabilizado por resonancia y la coloración producida por la reacción es independiente del color inicial de la muestra (figura II.4).

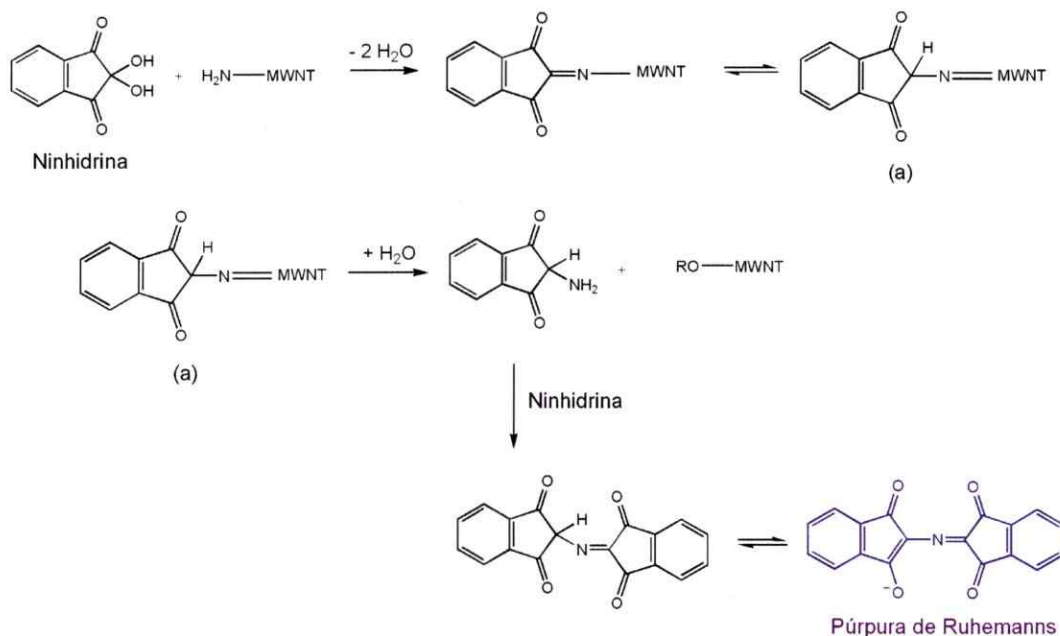


Figura II. 4. Reacción de ninhidrina con aminas primarias para el Test de Kaiser.

Para llevar a cabo esta reacción, se obtuvo comercialmente el kit de "Test de Kaiser" el cual contiene tres soluciones: (1) ninhidrina al 6% en EtOH, (2) Disolución de fenol al 80% en EtOH y (3) Disolución de KCN en piridina. Así, a 2 mg de MWNT-NH₂ se añaden volúmenes determinados de las soluciones del kit comercial. A continuación se sonica la mezcla por 30 min y se calienta durante 5 min a 110 °C. Pasado este tiempo se retira la muestra y se añaden 17,5 mL de EtOH 60% obteniendo un volumen final de 20 mL. Se filtra la muestra para retirar los NTC dispersados. Se mide la absorbancia de la disolución azul-violeta obtenida a 540 nm. Los parámetros utilizados en el equipo UV-visible son:

- Intervalo de medición: 450 a 650 nm
- Velocidad: media
- Intervalo de medición: 0,5 nm
- Línea base: etanol 60 %

Para hacer la línea base se repite el mismo procedimiento, pero sin utilizar MWNT-NH₂. Obtenidos los espectros, se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} = \frac{(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}) \times \text{dilución (mL)} \times 10^6}{\text{Coeficiente de extinción molar} \times \text{peso muestra (mg)}} \quad (3)$$

Donde el valor a utilizar en disolución es 20 y el coeficiente de extinción corresponde a 15.000 M⁻¹ cm⁻¹.

2.3.5 Preparación de dispersiones de MWNT y estudios de estabilidad

Se prepararon dispersiones de concentración 0,5 mg/mL para cada tipo de NTC. Las dispersiones se sonicaron por una hora y fueron evaluadas utilizando fotografías digitales y microscopía óptica.

- a) Microscopía óptica: De las dispersiones sonicadas se depositaron 8 µL sobre el porta objeto. Los aumentos utilizados corresponden a 4x y 10x.
- b) Fotografía digital: Una vez sonicadas las dispersiones se obtiene una imagen sin tiempo de reposo, y otra imagen luego de un mes de reposo.

2.3.6 Interacción de MWNT con ADN en disolución

- a) Determinación de la concentración de la disolución stock de ds-DNA

Se prepara una disolución de ds-DNA (ver punto 2.3.2 s). En una celda de cuarzo se colocan 10 µL de la disolución de ds-DNA preparada y 1990 µL de agua Milli-Q, de esta forma el volumen total de la celda corresponde a 2 mL. Luego de homogeneizar la disolución, se mide la absorbancia en 260 nm. Los parámetros utilizados en el equipo UV-visible fueron los siguientes:

- Intervalo de medición: 200-400 nm
- Ancho de banda: 1,5 nm
- Velocidad de escaneo: 400 nm/min
- Cambio de lámpara: 370 nm
- Línea base: agua Milli-Q

Para calcular la concentración de *ds-DNA* se sigue la ecuación:

$$\mu\text{g/mL de } ds\text{-DNA} = (A_{260}) \times (50 \mu\text{g/mL}) \times (\text{factor de dilución}) \quad (4)$$

En este caso, el factor de dilución corresponde a 200 (10 μL de disolución en un volumen total de 2 mL).

b) Curva de calibración de *ds-DNA*

En una celda de cuarzo se agregan 5 μL de la disolución de *ds-DNA* y se completa el volumen total de 1 mL con agua Milli-Q. Se mide la absorbancia en 260 nm. Se van adicionando 5 μL de la disolución de *ds-DNA* a la celda de cuarzo, se homogeniza y se mide su absorbancia. Para cada adición se debe recalcular el valor de la concentración final de la celda considerando los cambios de volumen total. Finalmente, se grafica "absorbancia versus concentración" y aplicando regresión lineal se obtiene la curva de calibración.

c) Interacción entre *MWNT* y *ds-DNA* en disolución

Para este estudio se puso en contacto diferentes dispersiones de NTC, de concentración 1 mg/mL, con un volumen de *ds-DNA* que corresponda a 45 ppm de concentración (según la concentración de la disolución *stock* calculada por UV-visible). Para cada estudio se prepararon tres muestras con un volumen total de 2 mL en tampón formiato 0,2 M a pH 5,0:

- Primera muestra: *ds-DNA* + tampón
- Segunda muestra: NTC + tampón
- Tercera muestra: NTC + *ds-DNA* + tampón

Estas muestras fueron incubadas a dos tiempos diferentes (1 h y 24 h), con agitación, en oscuridad y temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se ultracentrifugaron a 13.500 rpm por 150 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se midió la absorbancia a 260 nm, interpolando los datos obtenidos en la curva de calibración. Comparando la 1ª y 3ª muestra se puede obtener el porcentaje de pérdida de señal de *ds-DNA* al incorporar nanotubos.

d) Curva de calibración del oligonucleótido ss-ODN

Se obtuvo la curva de calibración preparando disoluciones de diferentes concentraciones a partir del *stock* de 100 μM (ver 2.3.2 t). El intervalo de concentración utilizado varió desde 2 μM hasta 32 μM y todas las concentraciones se prepararon por triplicado. En una celda de cuarzo se agrega un volumen determinado de la disolución *stock* y se completa el volumen total de 400 μL con agua Milli-Q. Se homogeneiza y se mide su absorbancia en 260 nm. Para obtener la curva se sigue el procedimiento descrito en el punto 2.3.6 b.

e) Isotermas de adsorción de ss-ODN sobre MWNT. Funcionalización covalente y no-covalente.

Se prepararon disoluciones de ss-ODN de diferentes concentraciones: 3,9 – 5,9 – 7,9 – 16 y 32 μM en PBS 10 mM pH 7,4. Los NTC utilizados para estas funcionalizaciones corresponden a NLO6. Los NTC se funcionalizaron con las diferentes concentraciones de ss-ODN según lo indicado en los puntos (2.3.3 d) y (2.3.3 e). Una vez funcionalizados los NTC en forma covalente y no-covalente, se extrajeron los sobrenadantes respectivos, los que se midieron por UV-Visible siguiendo la absorbancia a 260 nm para determinar la concentración de ss-ODN. Como la concentración inicial se conoce, la adsorción de ss-ODN puede determinarse por diferencia. Las gráficas se presentan como isotermas de adsorción, es decir, “cantidad de ss-ODN adsorbido por cantidad de NTC *versus* cantidad de ss-ODN en disolución”.

2.3.7 Estudios electroquímicos

Para todos los estudios electroquímicos se deben realizar dos pasos fundamentales antes de cada medición:

- Limpieza del electrodo de carbono vítreo: El electrodo se pule con alúmina 0,3 y 0,05 μm por 1 min, lavando entre cada una con agua Milli-Q. Se deja secar el electrodo a temperatura ambiente.
- Modificación del electrodo: Sobre la superficie recién pulida se depositan 8 μL de la dispersión de NTC y se coloca en estufa a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min.

2.3.7.1 Electrodo modificado con dispersiones de MWNT en DMF y PBS

a) Caracterización por voltamperometría cíclica en tampón fosfato

Se prepararon dispersiones de NTC en DMF y PBS 10 mM con NaCl 0,1 M a pH 7, obteniendo una concentración final de 1 mg/mL. Los electrodos modificados fueron puestos en la celda electroquímica, la que se burbujeó por 5 min con N_2 antes de cada medición. Los parámetros utilizados fueron:

- Potencial inicial: +0,4 V
- Potencial final: -0,4 V
- Sensibilidad: $1\text{e-}5$ A/V
- Velocidad de barrido: 50 mV/s
- Tiempo de espera: 2 s
- Segmentos: 2

b) Cálculos de capacitancia y evaluación del área electroactiva

Se prepararon dispersiones de NTC en PBS 10 mM a pH 7,4, de concentración 1 mg/mL. Los electrodos modificados con la dispersión fueron puestos en la celda electroquímica y se realizaron voltamperogramas cíclicos en PBS 0,2 M pH 7,4 a diferentes velocidades de barrido. Los parámetros utilizados son:

- Potencial inicial: -0,6 V
- Potencial final: +0,8 V

- Sensibilidad: 1e-5 A/V
- Tiempo de espera: 2 s
- Velocidad de barrido: 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300 mV/s

Las mediciones se hicieron por duplicado. Se midieron los valores de corrientes de cada segmento del voltamperograma cíclico a un potencial de 0,2 V. Se calculó la diferencia de corriente entre cada segmento, obteniendo un valor de corriente. Se graficaron los valores de "corriente promedio *versus* velocidad de barrido" obteniendo una recta, cuya pendiente corresponde al valor de capacitancia. Estos valores dan cuenta del área electroactiva del electrodo.

c) Caracterización por voltamperometría cíclica utilizando un mediador redox

El procedimiento es el mismo que para el estudio en tampón fosfato, pero ahora se incorpora un mediador redox. El par redox utilizado corresponde a (ferri/ferro)cianuro ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$) 10 mM y los parámetros utilizados fueron:

- Potencial inicial: -0,3 V
- Potencial final: +0,6 V
- Sensibilidad: 1e-4 A/V
- Velocidad de barrido: 50 mV/s
- Tiempo de espera: 2 s
- Segmentos: 2

La razón de corriente i_{pc}/i_{pa} fue obtenida para cada voltamperograma, aplicando el método desarrollado por Nicholson [74]:

$$\frac{i_{pc}}{i_{pa}} = \frac{(i_{pc})_0}{(i_{pa})_0} + 0,485 \frac{(i_{ps})_0}{(i_{pa})_0} + 0,086 \quad (5)$$

Donde: $(i_{pc})_0$ = Intensidad de la corriente catódica

$(i_{pa})_0$ = Intensidad de la corriente anódica

$(i_{ps})_0$ = Intensidad de la corriente en el potencial de *switching*

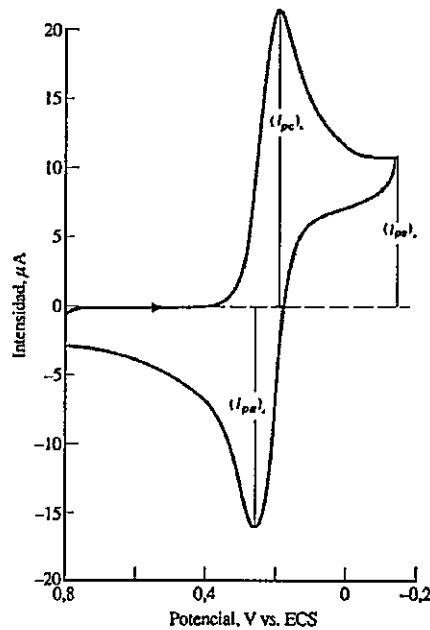


Figura II. 5. Voltamperograma cíclico de una disolución de $K_3Fe(CN)_6$ donde se observan las corrientes consideradas para la ecuación de Nicholson.

2.3.7.2 Aplicación de *MWNT* funcionalizados en la detección de ADN

La señal electroquímica estudiada es la oxidación de las bases guaninas del *ds*-DNA. Las mediciones se hicieron a través de voltamperometría de pulso diferencial (VPD) y los parámetros utilizados para todos los sistemas fueron:

- Potencial inicial: +0,5 V
- Potencial final: +1,3 V
- Sensibilidad: $1e-5$ A/V
- Amplitud: 0,05 V
- Ancho del pulso: 0,05 s
- Periodo del pulso: 0,2 s
- Tiempo de espera: 10 s

a) Electrodos modificados con *MWNT* dispersos en DMF.

Los NTC se dispersaron en DMF con una concentración de 1 mg/mL. Se sonica la dispersión por 45 minutos para homogenizar y se modifica el electrodo pulido. Las mediciones electroquímicas se hicieron según el siguiente protocolo:

1. El electrodo modificado se coloca en una celda que contiene una disolución de 45 ppm de *ds-DNA*. La adsorción de *ds-DNA* sobre la superficie del electrodo se realiza a circuito abierto y se favorece por agitación. El tiempo de acumulación es una variable de estudio.
2. Terminado el tiempo de acumulación el electrodo es introducido en PBS 0,2 M pH 7,4 por 3 segundos, para eliminar el *ds-DNA* que no haya sido adsorbido. Posteriormente se introduce el electrodo en una celda electroquímica que contiene el mismo tampón y se realiza el barrido voltamperométrico.

b) Electrodos modificados con MWNT dispersos en PBS.

Los NTC se dispersaron en PBS 0,2 M pH 7,4 y se sonicaron por 45 minutos para homogenizar y se modifica el electrodo pulido. La concentración final de la dispersión es una variable de estudio. Las mediciones electroquímicas se hicieron según el mismo protocolo que MWNT/DMF.

c) Electrodos modificados con MWNT dispersos en Cloruro de bencetonio.

Los NTC se dispersaron en una disolución 10 mM de cloruro de bencetonio en tampón Britton-Robinson 0,1 M a pH 7,4, con una concentración de 1 mg/mL. Se sonicó la dispersión por 45 minutos para homogenizar y se modificó el electrodo. Las mediciones electroquímicas se hicieron según el protocolo aplicado para MWNT/DMF, pero el tampón de lavado utilizado fue Britton-Robinson.

d) Electrodos modificados con MWNT dispersos en Quitosano

Los NTC se dispersaron en una disolución 1% p/v de quitosano preparada en 1% v/v de ácido acético, con una concentración de 1 mg/mL. Se sonicó la dispersión por 45 minutos para homogenizar y se modificó el electrodo pulido. Las mediciones electroquímicas se hicieron según el siguiente protocolo:

1. El electrodo modificado es introducido en una disolución de glutaraldehído (GTA) al 3% por un tiempo de 2 segundos y luego es lavado en una disolución de tampón formiato 0,2 M pH 5,0 por 10 segundos. Con este

procedimiento incorporamos GTA para estabilizar el film de quitosano y luego lavamos para eliminar el GTA en exceso.

2. El electrodo lavado se coloca en una celda que contiene una disolución de 45 ppm de *ds-DNA*. La adsorción sobre la superficie del electrodo se realiza a circuito abierto y es favorecida por agitación. El tiempo de acumulación es una variable de estudio.
3. Terminado el tiempo de acumulación el electrodo es nuevamente introducido en tampón formiato 0,2 M a pH 5,0 por 3 segundos para eliminar el *ds-DNA* que no ha sido adsorbido. Posteriormente se introduce el electrodo en la celda electroquímica y se realiza el barrido voltamperométrico.

2.3.7.3 Caracterización electroquímica de MWNT/ss-ODN

a) Voltamperometría de pulso diferencial (VPD)

Se prepararon dispersiones de MWNT_{COOH}, MWNT/ss-ODN_{COV} y MWNT/ss-ODN_{ADS} en tampón acetato 0,2 M a pH 5,0. Se prepararon dispersiones de cuatro concentraciones diferentes (0,5 – 1,0 – 2,0 – 4,0 mg/mL) para estudiar el efecto de la concentración de MWNT en la dispersión sobre el electrodo.

Para el estudio de la concentración de ss-ODN en la funcionalización de MWNT, las concentraciones de ss-ODN utilizadas fueron: 3,9 – 5,9 – 7,9 y 32 µM. A partir de las muestras sólidas se prepararon dispersiones de concentración 1 mg/mL en tampón acetato 0,2 M a pH 5,0. Los electrodos modificados con la dispersión fueron puestos en la celda electroquímica. Los parámetros utilizados fueron:

- Potencial inicial: +0,5 V
- Sensibilidad: 1e-5 A/V
- Potencial final: +1,3 V

b) Voltamperometría cíclica en tampón fosfato

Se prepararon dispersiones de MWNT_{COOH}, MWNT/ss-ODN_{COV} y MWNT/ss-ODN_{ADS} en PBS 10 mM con NaCl 0,1 M a pH 7,4, obteniendo una concentración final de 1 mg/mL. Los electrodos modificados con la dispersión fueron puestos en la celda electroquímica y los parámetros utilizados fueron:

- Potencial inicial: -0,3 V
- Potencial final: +0,5 V
- Sensibilidad: $1e-5$ A/V
- Velocidad de barrido: 50 mV/s

c) Voltamperometría cíclica utilizando un mediador redox

El procedimiento es el mismo que para el estudio con mediador redox descrito en el punto 2.3.7.1 c.

d) Caracterización por microscopía de barrido electroquímico (SECM)

En este sistema se trabaja con dos electrodos de trabajo, por una parte un microelectrodo (*tip*) en la parte superior y en la parte inferior el electrodo modificado que se quiere caracterizar o sustrato (figura II.6A).

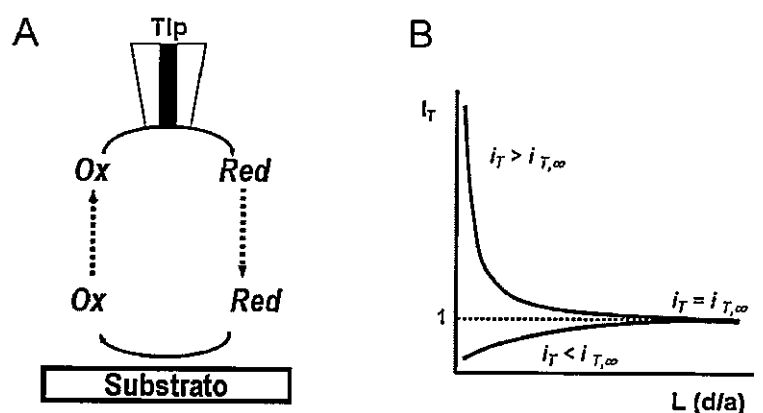


Figura II. 6. (A) Representación esquemática de un experimento SECM. (B) Curvas de aproximación teóricas para un *tip* sobre un sustrato conductor y otro aislante.

En un primer paso se modifica el electrodo con la dispersión a estudiar, luego se retira parte de la capa modificadora para dejar una zona del CV desnuda. En esta zona de CV sin modificar se obtiene una curva de aproximación con la cual se conoce el valor de la corriente al infinito ($i_{T,∞}$), es decir, cuando el microelectrodo y el CV se encuentran muy alejados sin afectar uno al otro en la reacción redox del mediador (esquema II.5A). En este punto, la corriente del

estado estacionario está dada por $i_{T,\infty} = 4nFDCa$ (donde F es la constante de Faraday, n es el número de electrones transferidos en la reacción del *tip*, D es el coeficiente de difusión de las especies electroactivas, C es la concentración de las especies en disolución y " a " es el radio del *tip*). En el caso del *feedback* positivo, hay un valor de corriente mayor a $i_{T,\infty}$ ($i_T > i_{T,\infty}$) cuando el *tip* se acerca al sustrato, lo que da cuenta que el sustrato actúa como una superficie conductora lo que produce un flujo adicional del mediador redox hacia la superficie del *tip*. Por otro lado, en el *feedback* negativo hay un valor de corriente menor a $i_{T,\infty}$ ($i_T < i_{T,\infty}$) cuando el *tip* se acerca al sustrato, lo que significa que el sustrato actúa como un aislante eléctrico impidiendo el flujo del mediador redox hacia la superficie del *tip* (esquema II.5B).

Los experimentos se realizaron en PBS 0,2 M pH 7,4 utilizando el par redox $FcOH/FcOH^+$ como mediador. El potencial del *tip* se mantuvo en +0,6 V para producir la oxidación de $FcOH$, mientras que el del sustrato se mantuvo en -0,1 V para permitir el *feedback* entre los electrodos. La curva de aproximación se obtuvo con una velocidad de barrido del *tip* de 0,5 $\mu\text{m/s}$. El *tip* es detenido cuando i_T alcanza 1,25 veces el valor de $i_{T,\infty}$. De acuerdo a la curva teórica que describe la dependencia de i_T con la distancia entre el *tip* y el sustrato (d), 1,25 veces de $i_{T,\infty}$ corresponde a una $d \approx 10 \mu\text{m}$, cuando se utiliza un *tip* con un radio de 5 μm [56]. Una vez que se ha obtenido la curva de aproximación, el *tip* es movido en el eje x para asegurarse que el *tip* está sobre la parte modificada, y se registran las imágenes SECM de 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, a una velocidad de 1 $\mu\text{m/s}$. Conociendo el valor de la corriente al infinito, i_∞ , se obtiene un valor de corriente normalizado (I_T), el que se utiliza para la representación final de las imágenes SECM. Para cada electrodo se obtuvieron imágenes en distintas zonas de la superficie, de manera de obtener un barrido general.

2.3.7.4 Aplicación de MWNT/ss-ODN en biosensores de hibridación

Se prepararon dispersiones de 1 mg/mL de MWNT/ss-ODN_{COV} y MWNT/ss-ODN_{ADS} con PBS 0,2 M a pH 7,4 y NaCl 0,1 M, las que se sonicaron por 20 min. Los electrodos se modificaron con las dispersiones y se colocaron en estufa a 50 °C por 15 min.

a) Estudios de hibridación de MWNT/ss-ODN en tampón fosfato.

Los electrodos modificados con MWNT/ss-ODN_{COV} y MWNT/ss-ODN_{ADS} se colocaron en dos celdas a diferentes condiciones, lavando entre cada una de ellas con PBS 0,2 M pH 7,4 por 3 segundos. El volumen total de las celdas es de 500 μ L y las condiciones fueron:

- Celda 1: 30 minutos en agitación, a temperatura ambiente.
- Celda 2: 30 minutos en agitación, a 34-36 °C.

El contenido de las celdas fue modificado con diferentes sistemas:

- Sistema A: ambas celdas contienen PBS 0,2 M pH 7,4 y NaCl 0,1 M. Los valores obtenidos corresponden a los blancos.
- Sistema B: en la celda 1 se coloca PBS 0,2 M pH 7,4 y NaCl 0,1 M. La celda 2 contiene 44 ppm de la hebra de bloqueo (ODN_b), que cubrirá la superficie del NTC.
- Sistema C: en la celda 1 se coloca PBS 0,2 M pH 7,4 y NaCl 0,1 M. La celda 2 contiene 44 ppm de la hebra complementaria (ODN_c), que puede hibridarse o adsorberse.
- Sistema D: en la celda 1 se coloca 44 ppm de la hebra de bloqueo (ODN_b), que cubrirá la superficie del NTC y evitará la adsorción de la hebra complementaria. La celda 2 contiene 44 ppm de la hebra complementaria (ODN_c) para que se hibridice, sin adsorberse.

Una vez que los electrodos han pasado por ambas celdas, se lavan nuevamente y se colocan en la celda electroquímica. Por voltamperometría de pulso diferencial (VPD) se sigue la señal de oxidación de las guaninas presentes, utilizando los siguientes parámetros:

- Potencial inicial: +0,5 V
- Potencial final: +1,3 V
- Sensibilidad: 1e-5 A/V

b) Detección de hibridación utilizando azul de metileno.

Los electrodos modificados con MWNT/ss-ODN_{COV} y MWNT/ss-ODN_{ADS} se colocaron en dos celdas a diferentes condiciones, lavando entre cada una de ellas con PBS 0,2 M pH 7,4 por 3 segundos. El volumen total de las celdas es de 500 μ L y las condiciones fueron:

- Celda 1: 30 minutos en agitación, a temperatura ambiente.
- Celda 2: 30 minutos en agitación, a 34-36 °C.

El contenido de las celdas fue modificado con diferentes sistemas:

- Sistema A: en la celda 1 se coloca 44 ppm de la hebra de bloqueo (ODN_b), que cubrirá la superficie del NTC. La celda 2 contiene PBS 0,2 M pH 7,4 y NaCl 0,1 M.
- Sistema B: en la celda 1 se coloca 44 ppm de la hebra de bloqueo (ODN_b), que cubrirá la superficie del NTC y evitará la adsorción de la hebra complementaria. La celda 2 contiene 44 ppm de la hebra complementaria (ODN_c) para que se hibride, sin adsorberse.

Los electrodos modificados que han pasado por estos sistemas se lavan nuevamente y se colocan en una disolución 20 μ M de azul de metileno (AM) en PBS 0,2 M pH 7,4 y NaCl 0,1 M. La acumulación de AM se realizó a circuito abierto, con agitación, por 5 min. Pasado el tiempo de adsorción el electrodo fue lavado en PBS 0,2 M pH 7,4 por 3 s. Por voltamperometría de pulso diferencial (VPD) se sigue la señal de reducción de AM, utilizando los siguientes parámetros:

- Potencial inicial: +0,3 V
- Potencial final: -0,5 V
- Sensibilidad: 1e-4 A/V

Para el tratamiento de datos se debe considerar que en el rango de potencial aplicado los nanotubos arrojan una señal, por lo que se debe ajustar la línea base para observar la señal de reducción de azul de metileno, como se muestra en la figura II. 7.

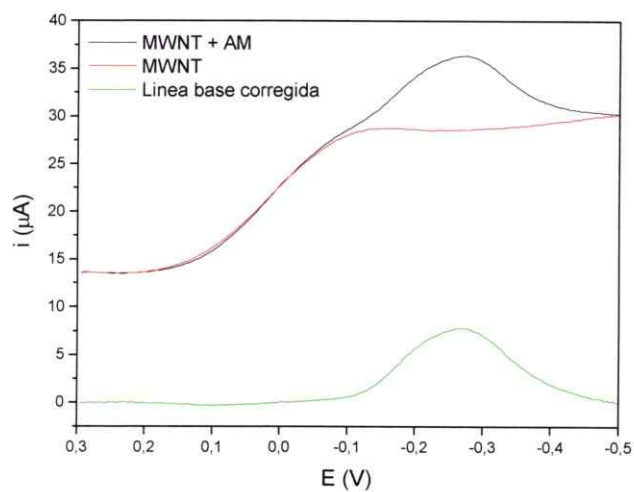


Figura II. 7. Ajuste de línea base para la señal de reducción de azul de metileno en electrodos modificados con MWNT/ss-ODN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMERA PARTE: Oxidación y amidación de MWNT y su aplicación en la detección de ADN

3.1 EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MWNT FUNCIONALIZADOS

3.1.1 Oxidación de MWNT

De acuerdo a lo descrito en la literatura [75] existe una amplia gama de grupos funcionales que pueden ser incorporados en la estructura de un nanotubo de carbono al someterlo a un proceso de oxidación química. En la figura III.1 se muestra en forma esquemática estos posibles grupos.

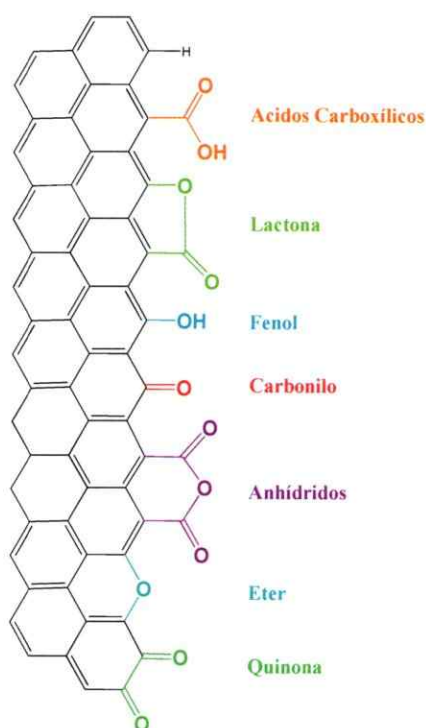


Figura III. 1. Grupos superficiales posibles de ser incorporados en la estructura de carbono.

Las siguientes técnicas fueron utilizadas para determinar cuál de los métodos de oxidación utilizados en esta tesis permite incorporar a la superficie la mayor cantidad de grupos carboxílicos.

a) Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta microscopía fue utilizada para detectar posibles cambios morfológicos, como fragmentación o destrucción de los nanotubos, que el tratamiento oxidativo pudo haber provocado a las muestras comerciales NC y NL (figura III.2).

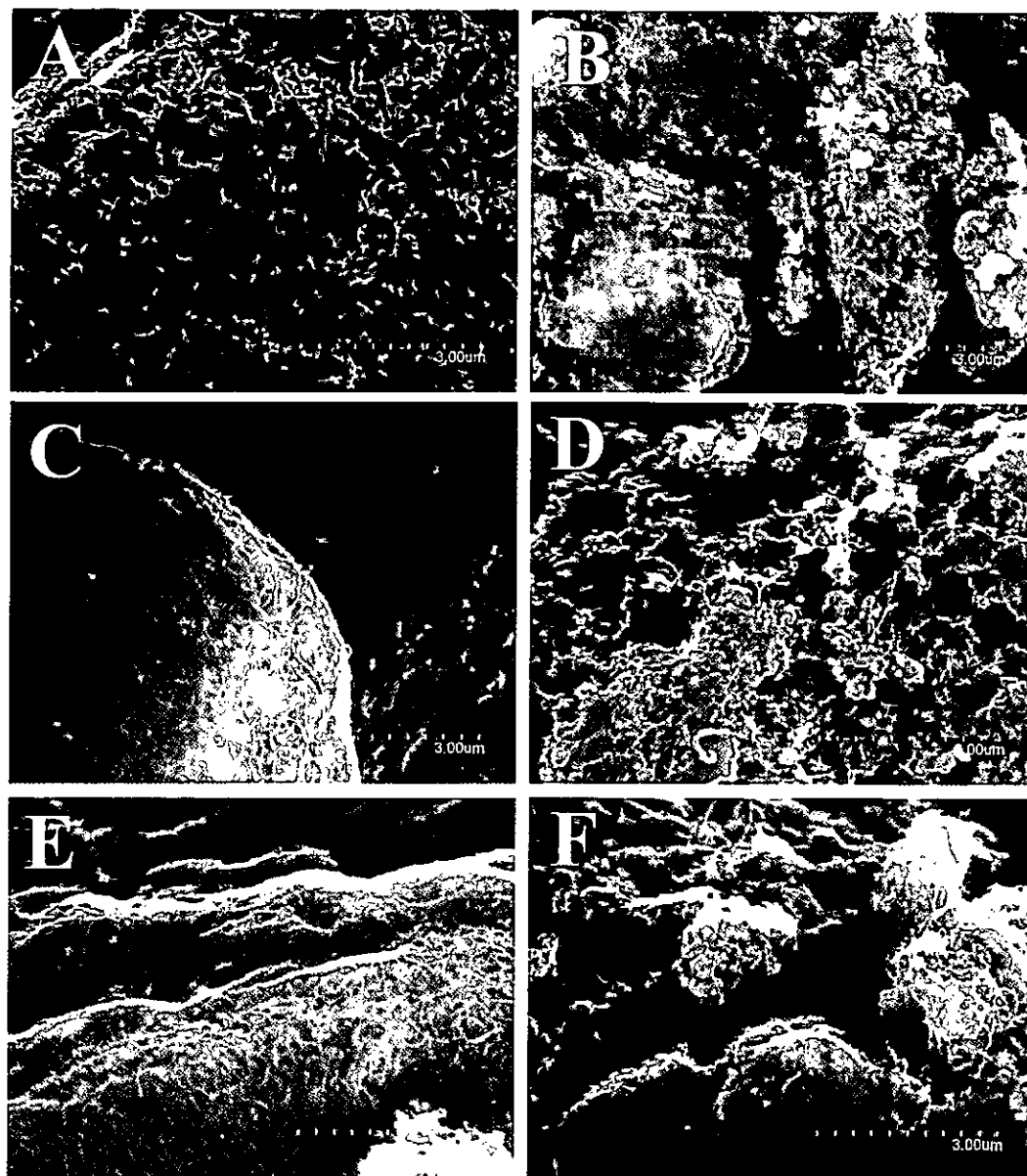


Figura III. 2. Imágenes SEM de nanotubos comerciales y sus derivados oxidados: (A) NC, (B) NL, (C) NCO3, (D) NLO3, (E) NCO6 y (F) NLO6.

Las imágenes de los nanotubos cortos (fig. III.2A) muestran estructuras largas y finas, mientras que para los nanotubos largos (fig. III.2B) se observan bloques que sugieren un mayor grado de empaquetamiento. Por otro lado, no se observan impurezas derivadas de metales, que generalmente son descritas para muestras comerciales.

Al tratar *MWNT* con un agente oxidante fuerte por largos tiempos de oxidación, se esperaría que se produzca algún nivel de daño en las paredes o fragmentación de los nanotubos en pequeños tamaños [76]. Incluso, al oxidar *SWNT* con HNO_3 por 6 horas, se ha observado por SEM una completa destrucción de la muestra, donde los *SWNT* han sido consumidos por el proceso oxidativo, reduciendo los nanotubos a carbono amorfo [77]. En nuestro caso, para NC y NL (fig. III.2, C-F) no se observan daños en las estructuras ni degradación de las nanoestructuras, lo que también se ha obtenido por Avilés y col. [78] al oxidar *MWNT* con diferentes agentes oxidantes. Las imágenes no muestran un aumento importante en el grado de empaquetamiento de los NTC con el tiempo de oxidación, probablemente debido a las repulsiones electrostáticas entre los NTC como consecuencia de la incorporación de grupos oxigenados. Las muestras más largas (NLO3 y NLO6) parecen estar más compactadas que las cortas, dando como resultado superficies rugosas, porosas y, por lo tanto, menos homogéneas.

b) Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución (HR-TEM)

El objetivo de utilizar esta técnica es observar el efecto del tratamiento químico sobre las estructuras de los NTC a una escala nanométrica. En la figura III.3 se observan las imágenes HR-TEM para NTC largos comerciales (A, B) y sus derivados oxidados (C, D).

En la figura III.3A se observa que la muestra comercial tiene nanotubos con diferentes diámetros internos (3,76 y 6,32 nm), diámetros externos (9,13 y 19,26 nm) y número de capas (8 y 19, respectivamente) como ha sido observado también por Zhu y col. [79]. En la figura III.3B se observa la punta de un nanotubo con zonas irregulares debido posiblemente a la presencia de carbono amorfo en las paredes. Luego de la oxidación con mezcla sulfo-nítrica por 3 y 6 h (fig. III.3 C y D) se observa principalmente que el tratamiento químico provoca cortes en las láminas de grafeno y aumenta la cantidad de carbono amorfo sobre las paredes (indicado con flechas). Tal como ha observado Su y col. [76] la oxidación con mezcla sulfo-nítrica abre las puntas de los MWNT como se muestra en la figura III.3 C.

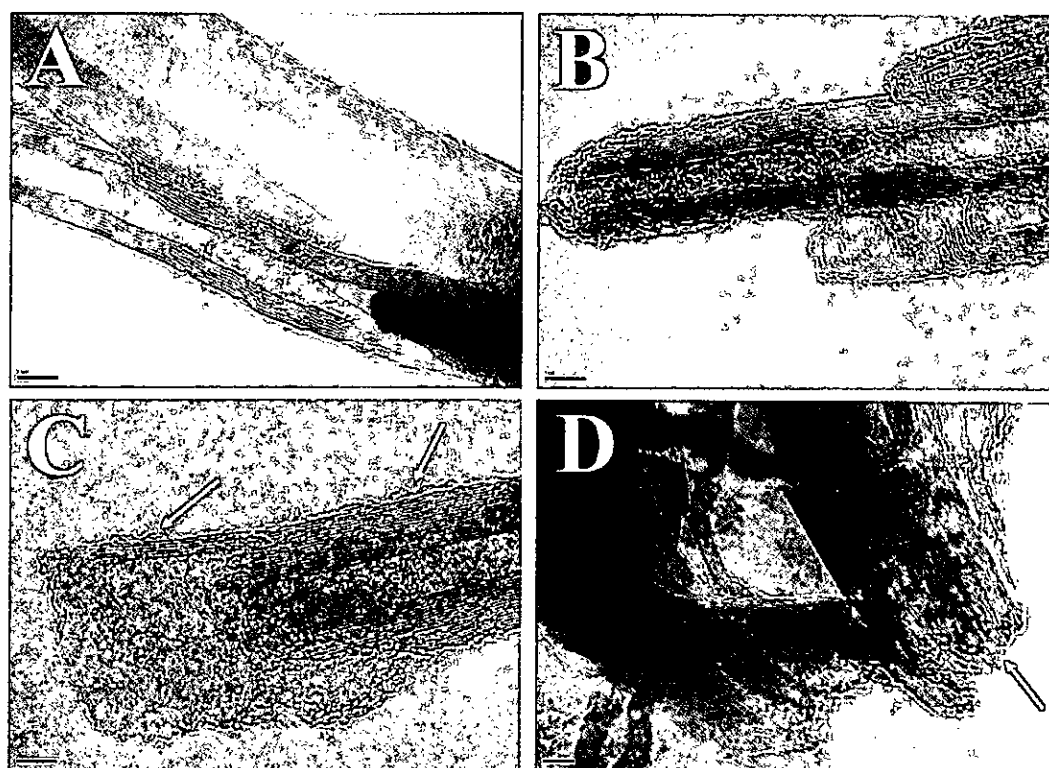


Figura III. 3. Imágenes HR-TEM para NTC comerciales sin oxidar (A y B) y NTC oxidados 3 y 6 h (C y D).

c) Isotermas de adsorción y determinación de área superficial específica.

El área superficial específica de los NTC es un parámetro que da cuenta de la estructura porosa del nanotubo. Este parámetro puede obtenerse a partir del modelo de multicapas propuesto por Brauner, Emmet y Teller (isotermas BET) [75, 80]. En las figuras III.4 y III.5 se observan las isotermas obtenidas para NC, NL y sus derivados oxidados. Todas las muestras presentan una isoterma de adsorción y desorción de N_2 del tipo-II según la clasificación IUPAC [81].

En todas las muestras de la figura III.4 se observa que la adsorción de nitrógeno aumenta lentamente hasta un valor de P/P_0 cercano a 0,8; esto da cuenta de un proceso de adsorción superficial en el cual el nitrógeno estaría formando una monocapa sobre la pared del nanotubo. Después de este valor, la cantidad adsorbida aumenta considerablemente por sobre ocho veces su valor inicial.

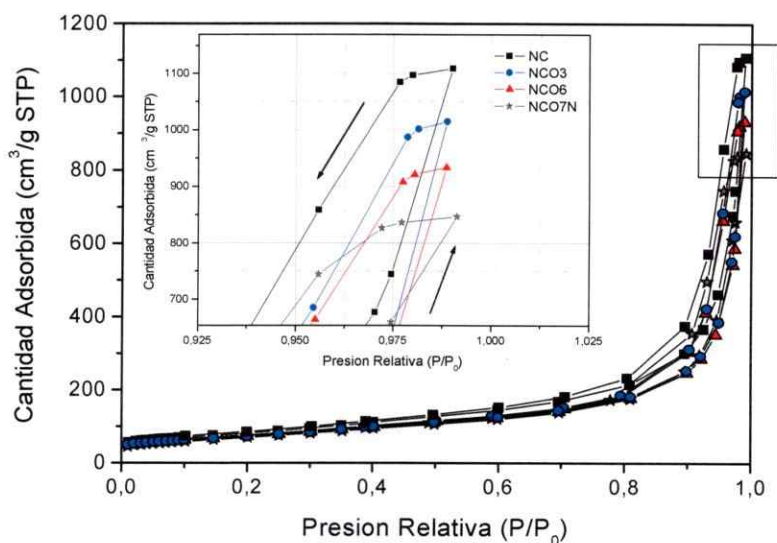


Figura III. 4. Isotermas BET para NC y sus derivados oxidados. Las flechas negras indican el proceso de adsorción (hacia arriba) y el proceso de desorción (hacia abajo).

Realizando una magnificación de la zona de máxima adsorción (insertos figuras III.4 y III.5) se observa que el máximo alcanzado disminuye a medida que la muestra se expone a mayor tiempo de oxidación, cuando se utiliza la mezcla sulfo-nitrica. Por otra parte, al utilizar HNO_3 por 6 h el valor de nitrógeno adsorbido es aún menor (NCO7N). La disminución de estos valores da cuenta de una mayor compactación de las muestras lo que se correlaciona con lo observado por SEM, es decir, mientras más tiempo son expuestas las muestras a los agentes oxidantes, mayor es el grado de compactación, dejando menos superficie expuesta para adsorber el gas.

Cuando $P/P_0 \sim 1$ comienza el proceso de desorción. Se observa histéresis debido a que las moléculas de nitrógeno, que se encuentran en los poros internos, son desorbidas por un proceso diferente a como fueron adsorbidas en el primer paso. Esto estaría asociado a la formación de poros, debido a que los nanotubos de diferentes diámetros y orientaciones interactúan entre ellos.

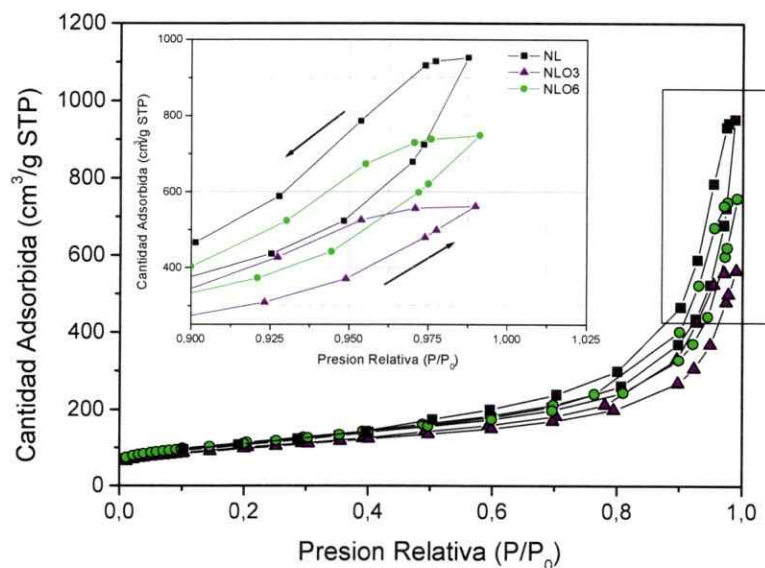


Figura III. 5. Isothermas BET para NL y sus derivados oxidados. Las flechas negras indican el proceso de adsorción (hacia arriba) y el proceso de desorción (hacia abajo).

Por último, de las isotermas de las figuras III.4 y III.5 podemos decir que son convexas respecto a las presiones relativas en todo el rango del eje, lo que indicaría que las interacciones nitrógeno-nitrógeno son más fuertes que las generadas entre nitrógeno-nanotubo [79].

En la tabla III.1 se presentan los valores de superficie BET (Σ_{BET}) y volumen de mesoporos para cada una de las muestras.

Tabla III. 1. Valores de área superficial BET y volumen de mesoporo.

	$\Sigma_{\text{BET}} (\text{m}^2\text{g}^{-1})$	$V_{\text{Mesoporo}} (\text{cm}^3\text{g})$
NC	298	0,731
NCO3	267	0,577
NCO6	266	0,556
NCO7N	256	0,644
NL	378	0,826
NLO3	380	0,685
NLO6	336	0,535

Como se observa, cuando las muestras se han oxidado, las superficies BET disminuyen entre un 10,8 y un 14,1 %, lo que también ha sido observado para nanotubos de doble pared oxidados con ácido nítrico [82]. Estas disminuciones podrían explicarse debido a que los nanotubos de diferentes diámetros y orientaciones interactúan a través de fuerzas intermoleculares formando agregados que disminuyen el área superficial. Por otra parte, las muestras oxidadas con la mezcla sulfo-nítrica muestran un descenso en el volumen de mesoporo a medida que el tiempo de oxidación aumenta, probablemente debido a la formación de agregados más compactos. Esto también se observó en las imágenes SEM (fig. III.2), donde el

tratamiento oxidativo favorece la formación de bloques más compactos, dejando menor superficie expuesta para la adsorción de nitrógeno. Para las muestras de mayor longitud se observaron mayores valores de superficie BET (Σ_{BET}), incluso después de haber sido oxidadas.

d) Espectroscopía Raman

De acuerdo a la literatura el espectro Raman de MWNT muestra tres bandas características, como se observa en la figura III.6. La banda *G* (*tangential stretching*) corresponde al modo vibracional fundamental (primer orden) asociado a la estructura hexagonal de los carbonos con hibridación sp^2 ($\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$), mientras que la banda *G'* ($\sim 2650 \text{ cm}^{-1}$) corresponde a un sobretono (segundo orden). La tercera banda corresponde a la banda *D* (*disorder-induced*) que aparece en $\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$ y es indicadora de la presencia de defectos en las paredes inducidos por hibridaciones sp^3 [83]. La relación de intensidades entre las bandas principales *D* y *G* (I_D/I_G) se utiliza para extraer información sobre el número de defectos introducidos al nanotubo [83].

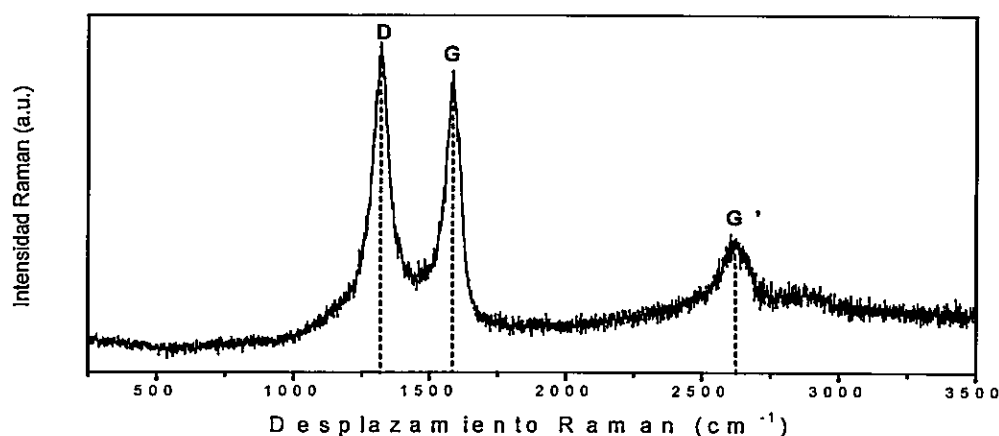


Figura III. 6. Espectro Raman característico para MWNT.

En la figura III.7 se presentan los espectros obtenidos para las muestras comerciales y oxidadas. Para poder comparar los resultados, todos los espectros fueron normalizados respecto a la intensidad de la banda D.

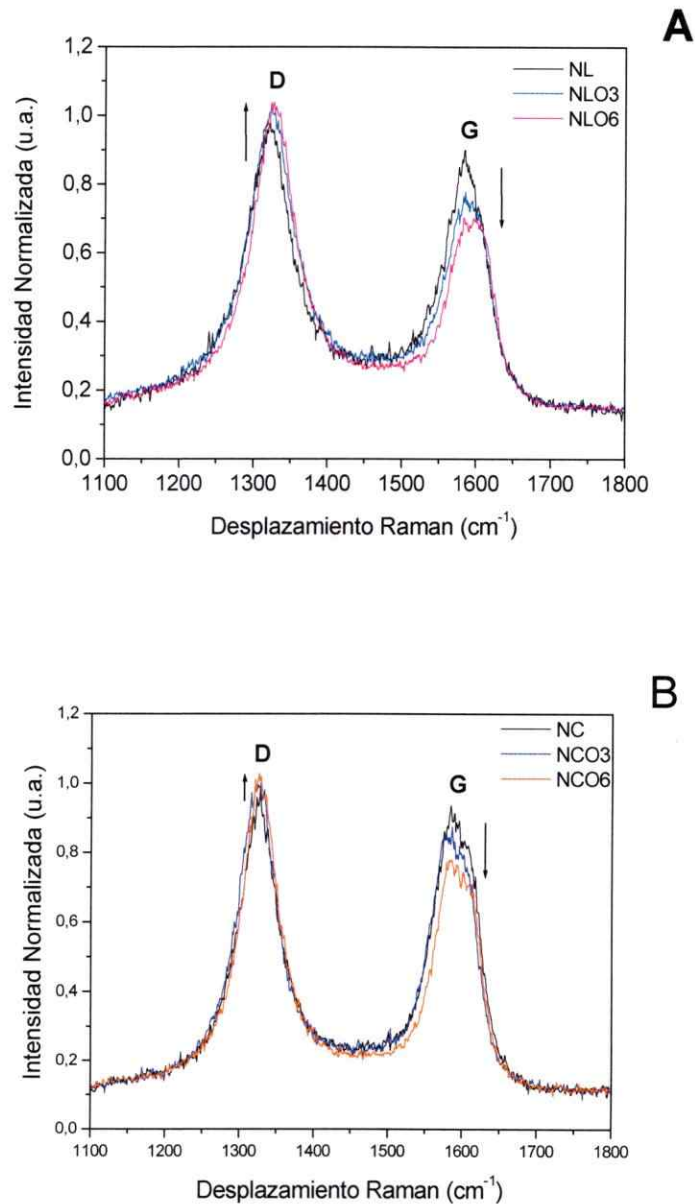


Figura III. 7. Espectros Raman de NTC con y sin tratamiento oxidativo con mezcla sulfuro-nítrica 3:1 (3M), luego de 3 y 6 h: (A) NTC largos y (B) NTC cortos.

Para las muestras largas (fig. III.7A) se observa que a medida que aumenta el tiempo de oxidación la banda *D* aumenta levemente en intensidad, mientras la banda *G* disminuye; esto produce un aumento en la razón de las intensidades I_D/I_G . Este aumento corresponde a una alta proporción de carbono sp^3 , el que se atribuye generalmente a la presencia de más defectos estructurales [83]. Este comportamiento también es observado para las muestras cortas pero con menor intensidad (fig. III.7B).

En la tabla III.2 se resumen los valores de *R* (I_D/I_G) obtenidos para todas las muestras. Con el tiempo de oxidación la razón I_D/I_G aumenta, lo que sugiere que más grupos funcionales son introducidos al nanotubo. Los valores de *R* son mayores para las muestras de mayor longitud, ya que estas muestras además de modificar sus paredes podrían sufrir acortamientos, incorporando más defectos a la estructura.

Tabla III. 2. Efecto del tiempo de oxidación con mezcla sulfo-nítrica 3:1 (3M), en los valores de *R* para nanotubos cortos y largos.

MWNT	$R = I_D/I_G$
<i>NC</i>	1,02
<i>NCO3</i>	1,15
<i>NCO6</i>	1,33
<i>NL</i>	1,09
<i>NLO3</i>	1,35
<i>NLO6</i>	1,49

e) Análisis termogravimétrico (TGA)

Esta técnica fue utilizada para determinar la estabilidad térmica de los NTC, pudiendo correlacionar las pérdidas en peso con los grupos funcionales presentes en las muestras.

Los resultados para las muestras cortas se muestran en la figura III.8, donde se observa que la degradación térmica de los NTC oxidados es mayor que la muestra comercial.

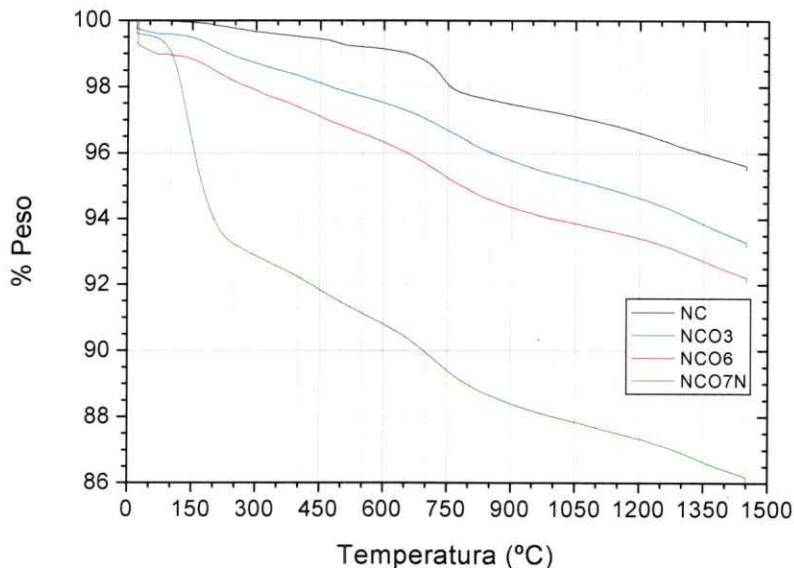


Figura III. 8. Curvas termogravimétricas para NC y sus derivados oxidados con mezcla sulfo-nítrica 3:1 (3M) (NCO3 y NCO6) y con HNO₃ 7M (NCO7N).

Por debajo de 150 °C se observa una pérdida menor al 2% del peso para todas las muestras, lo que correspondería a la evaporación de H₂O adsorbida. Entre 150-350 °C se observa la descarboxilación de los -COOH presentes en las paredes, siendo la mayor pérdida para NCO7N (6,35%). La degradación térmica observada entre los 350-500 °C correspondería a la eliminación de grupos funcionales oxigenados del tipo

hidroxilo/éter. Finalmente, a temperaturas entre 500-600 °C, se observa una degradación correspondiente a la descarboxilación de lactona y grupos carboxílicos de anhídridos. Por sobre 600 °C la pérdida en peso podría deberse a los fenoles, éteres y carbonilos/quinonas [75].

Considerando los valores iniciales y finales de peso, la muestra que presenta mayor pérdida en peso es NCO7N, con más de un 10% a 800 °C, lo que está relacionado con la mayor cantidad de grupos funcionales obtenidos con el tratamiento oxidativo utilizado (7M) en comparación con la usada en la mezcla sulfo-nítrica (3M) [78]. Los porcentajes de pérdida de peso se observan de forma más completa en la tabla III.3.

Tabla III. 3. Porcentajes de pérdida en peso de las muestras de menor longitud. A la derecha los grupos asociados al rango de temperatura [75].

Muestras Rango temperatura (° C)	NC	NCO3	NCO6	NCO7N	Grupo Funcional asociado
0 - 150	0,01	0,20	0,44	0,07	H ₂ O adsorbida
150 - 350	0,42	0,89	0,95	6,35	-COOH
350 - 500	0,30	0,48	0,76	1,44	-OH, Lactona
Sobre 500	1,36	1,56	1,47	2,40	Carbono amorfo
Pérdida en peso total (%)	2,09	3,15	3,62	10,26	-----

Para las muestras de mayor longitud se obtuvo las curvas termogravimétricas presentadas en la figura III.9 y las pérdidas en peso se evaluaron de igual forma que para los nanotubos cortos. Los porcentajes se resumen en la tabla III.4.

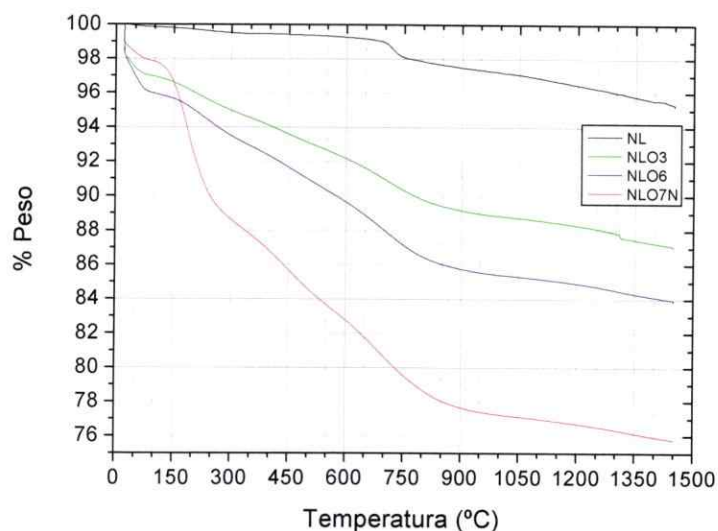


Figura III. 9. Curvas TG para NL y sus derivados oxidados con mezcla sulfo-nítrica 3:1 (3 M) (NLO3 y NLO6) y con HNO₃ 7 M (NLO7N).

Tabla III. 4. Porcentajes de pérdida en peso de las muestras de mayor longitud. A la derecha los grupos asociados al rango de temperatura [75].

Rango temperatura (° C)	Muestras	NL	NLO3	NLO6	NLO7N	Grupo Funcional
0 - 150		0,13	2,80	1,62	0,98	H ₂ O adsorbida
150 - 350		0,35	2,17	3,00	9,65	-COOH
350 - 500		0,01	2,50	2,50	4,49	-OH, Lactona
Sobre 500		1,23	3,31	4,00	4,53	Carbono amorfo
Pérdida en peso total (%)		1,72	10,78	11,12	19,65	-----

La muestra con la mayor pérdida en peso en todo el intervalo de temperatura corresponde a NLO7N (cercano al 20%). Esto se debería a los diferentes grupos funcionales mayoritarios incorporados al nanotubo, comparados con aquellos introducidos por la mezcla sulfo-nítrica.

f) Análisis elemental (AE)

Con los resultados obtenidos por análisis elemental se obtuvo el porcentaje de cada elemento presente en las muestras comerciales como oxidadas (tabla III.5).

El porcentaje de oxígeno en las muestras indica que tanto NC y NL presentan una pequeña cantidad de grupos funcionales oxigenados. Cuando las muestras han sido tratadas con mezcla sulfo-nítrica, el contenido de oxígeno aumenta y puede relacionarse el tiempo de oxidación con el porcentaje de oxígeno. Por otra parte, el porcentaje de oxígeno es mayor para las muestras tratadas con HNO₃ (NCO7N y NLO7N). Sin embargo, estas muestras presentan un importante aumento en el porcentaje de nitrógeno, lo que sugiere que parte del incremento en oxígeno podría deberse a la capacidad del ácido nítrico de incorporar grupos nitro en anillos aromáticos [84, 85].

Tabla III. 5. Análisis elemental de las muestras comerciales y oxidadas: (violeta) mezcla sulfo-nítrica 3 M y (azul) HNO₃ 7 M.

	C	H	O	N	S
NC	98,08	0,13	1,02	0,07	0,00
NCO3	97,31	0,15	2,49	0,15	0,04
NCO6	96,32	0,16	3,49	0,17	0,00
NCO7N	98,08	0,29	3,88	0,44	0,00
NL	93,64	0,22	1,18	0,21	0,07
NLO3	90,25	0,30	6,60	0,32	0,05
NLO6	88,31	0,36	9,26	0,26	0,00
NLO7N	85,97	0,93	11,48	1,45	0,00

Finalmente, según los valores de la tabla III.5 el porcentaje de metales de las muestras son inferiores al 0,1%, lo que incluso puede asociarse al error experimental de la medición.

g) Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

En la figura III.10 se presentan los espectros IR para las muestras de mayor longitud sin oxidar (NL) y sus derivados oxidados (NLO3, NLO6 y NLO7N).

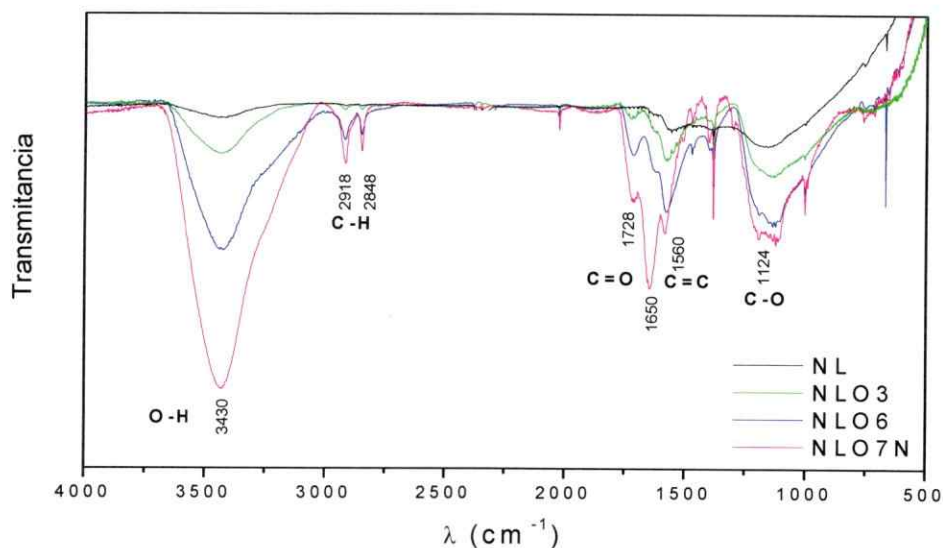


Figura III. 10. Espectros IR para nanotubos largos sin tratamiento oxidativo (NL), NL oxidados con mezcla sulfo-nítrica por 3 h (NLO3) y 6 h (NLO6), y NL oxidados con HNO₃ por 6 h (NLO7N).

Para todas las muestras se observan prácticamente las mismas bandas de absorción. La banda en 1560 cm⁻¹ corresponde a la vibración del enlace C=C que conforman las paredes del nanotubo; esta banda sufre un corrimiento hacia frecuencias más altas (1558/1572/1576/1582 cm⁻¹) a medida que las muestras son

oxidadas, debido al aumento de los grupos funcionales oxigenados [85]. Además, para todas las muestras los espectros presentan una banda de absorción ancha en 3430 cm^{-1} atribuida al estiramiento del enlace O-H (asociados a grupos carboxílicos o hidroxilos debido a la presencia de agua o fenoles). Las bandas en 2916 y 2848 cm^{-1} corresponden al estiramiento simétrico y antisimétrico del enlace C-H [86, 87] las que aumentan debido a la generación de defectos en las paredes. Por último, una banda ancha entre 1050 y 1300 cm^{-1} se puede atribuir a la contribución del enlace C-O tanto de grupos éteres, alcoholes, anhídridos, lactonas o ácidos carboxílicos. Todas estas bandas presentes en los NTC comerciales indican que durante el proceso de síntesis como de purificación se introducen algunos grupos funcionales oxigenados.

Después del tratamiento oxidativo hay un aumento en la intensidad de las bandas entre 3400 y 1100 cm^{-1} y aparece una nueva banda en 1700 cm^{-1} , que corresponde al grupo C=O presente en los ácidos carboxílicos. La intensidad de esta banda, respecto a la presente en 1560 cm^{-1} , aumenta a medida que el tiempo de oxidación es mayor, independiente del agente oxidante utilizado; del mismo modo, también se observa un leve corrimiento de esta banda hacia frecuencias más altas con el tiempo de oxidación ($1708/1711/1728\text{ cm}^{-1}$). Luego del tratamiento oxidativo, todas las bandas asociadas a grupos oxigenados aumentan en intensidad entre 1050 - 1300 cm^{-1} , correspondiente a grupos éteres, alcoholes y fenoles. Las muestras oxidadas muestran también un aumento en la intensidad de las bandas entre 1600 - 1800 cm^{-1} correspondientes a: quinonas (1550 - 1600 cm^{-1}), lactonas (1675 - 1790 cm^{-1}) y C=O de anhídridos (1790 - 1880 cm^{-1}). Cercano a 1650 cm^{-1} se observa una banda para NLO3 que es asignada a grupos quinona; esta banda se hace más prominente para NLO6 e incrementa su intensidad considerablemente para NLO7N, por lo tanto, el tratamiento oxidativo con ácido nítrico introduciría mayor cantidad de grupos quinona que grupos carboxílicos,

comparado con la mezcla sulfo-nítrica. Esto también se observa para las muestras cortas, pero con intensidades aún más pequeñas (fig. III.11).

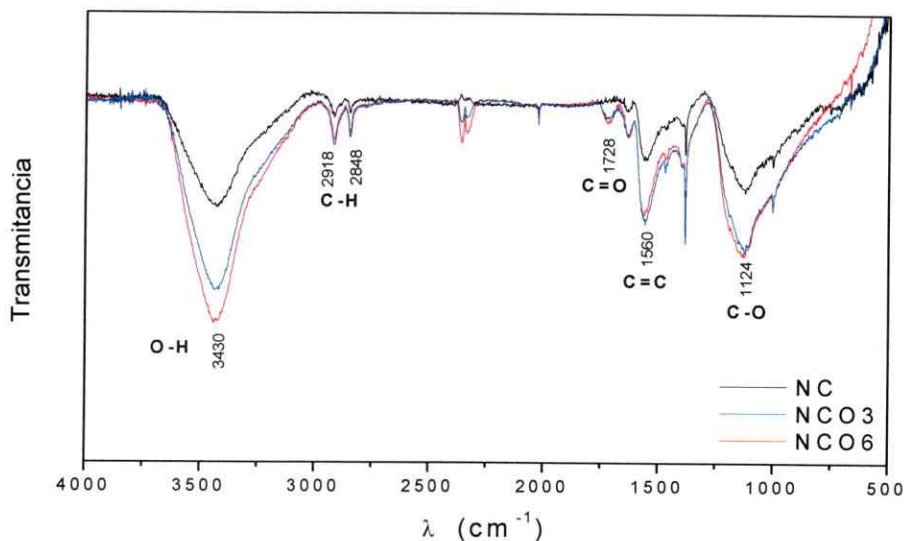


Figura III. 11. Espectros IR para nanotubos cortos sin tratamiento oxidativo (NC) y NC oxidados con mezcla sulfo-nítrica por 3 h (NCO3) y 6 h (NCO6).

La introducción de grupos nitro (-NO₂) no puede descartarse, ya que, al ser isoelectrónico con el grupo carboxílico (-CO₂) ambos entregan espectros muy similares lo que dificulta su identificación a través de espectros IR [88].

h) Determinación de grupos ácidos

Para cuantificar los grupos ácidos introducidos por la oxidación realizamos una modificación a un método de titulación ya descrito [89, 90], considerando que los grupos ácidos totales (carboxílicos, lactónicos y fenólicos) pueden determinarse titulando con NaOH, mientras que aquellos grupos más ácidos pueden titularse con NaHCO₃ (pK_a = 6,37) [84]. En la tabla III.6 se muestran los valores obtenidos para ambas neutralizaciones.

Tabla III. 6. Grupos ácidos totales (%Na (NaOH)) y grupos carboxílicos (%Na (NaHCO₃)) incorporados a NC y NL después de diferentes tratamientos oxidativos.

	% Na (NaOH)	% Na (NaHCO₃)
NC	0,57	0,51
NCO3	1,63	1,55
NCO6	1,92	1,91
NCO7N	1,96	1,39
NL	0,66	0,42
NLO3	2,35	1,83
NLO6	2,87	2,39
NLO7N	3,35	3,38

Los nanotubos largos (NL) una vez oxidados, muestran un alto contenido de grupos ácidos comparado con la muestra comercial corta (NC). Además, se observa que la oxidación de NL con ácido nítrico por 6 h (NLO7N) introduce más grupos carboxílicos que la mezcla sulfo-nítrica en iguales condiciones (NLO6). Esto no es observado para NC, donde la máxima cantidad de grupos ácidos corresponde a NCO6.

Se sabe que los procesos oxidativos involucran átomos de carbono de partida con hibridación sp^2 , a partir de los cuales se generan grupos alcoholes, seguidos de cetonas y finalmente de ácidos carboxílicos [90, 91]. Considerando lo anterior, el alto grado de oxidación de NL podría explicar el alto contenido de grupos ácidos que esta muestra presenta, comparado con NC.

Teniendo en cuenta el tipo de grupo ácido oxigenado, varios estudios han demostrado que de la cantidad total de grupos oxigenados introducidos por oxidación, sólo aquellos con un valor de pK_a entre 3 y 10 pueden ser determinados [92-94]. Aquellos grupos con valores de pK_a por debajo o encima de este rango no son

detectados por una titulación, por lo tanto, los resultados de la tabla III.6 pueden estar subestimando la cantidad de grupos ácidos. Además, se sabe que en un anillo aromático, ciertos grupos en posición *orto*- aumentan la acidez de grupos ácidos (como $-\text{COOH}$). Por ejemplo, un grupo $-\text{NO}_2$ en posición *orto*- en el ácido benzoico disminuye su pK_a de 4,2 a 2,2 [95]. Como se mostró en el análisis elemental, las muestras oxidadas con HNO_3 presentan grupos nitro (intercalados o unidos al nanotubo) que pueden estar modificando la acidez de los grupos carboxílicos, dejándolos fuera del límite de detección del método.

i) Espectroscopía Fotelectrónica de rayos X (XPS)

XPS es una de las técnicas de análisis de superficie que proporciona información sobre la naturaleza de los grupos funcionales y de la presencia de defectos estructurales en la superficie del nanotubo. Se realizó la interpretación de oxígeno 1s de acuerdo a la siguiente clasificación de bandas [75, 96]:

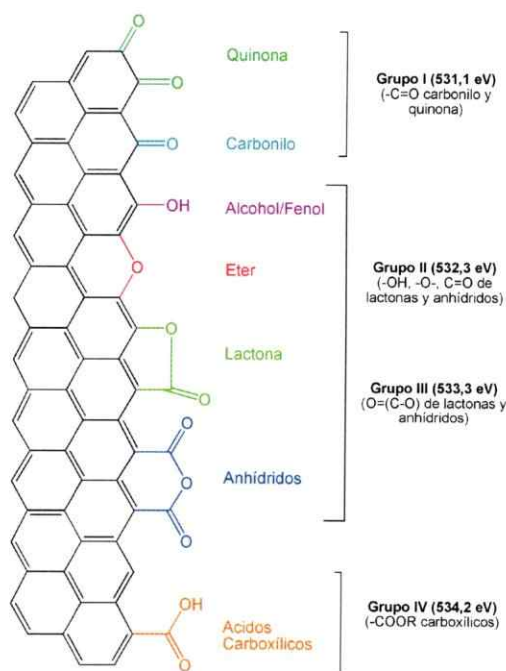


Figura III. 12. Esquema general de clasificación de bandas para espectros XPS.

Para la muestra NL se obtuvo un espectro con una banda de intensidad muy baja (figura III.13a), debido a su bajo contenido de oxígeno. Esta banda se encuentra centrada en 532,2 eV y corresponde a la posición de grupos alcoholes, fenoles y éteres. Este resultado es consistente con las bandas obtenidas por FT-IR alrededor de 3400 cm^{-1} y en la región de $1050\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ (sección 3.1.1 g).

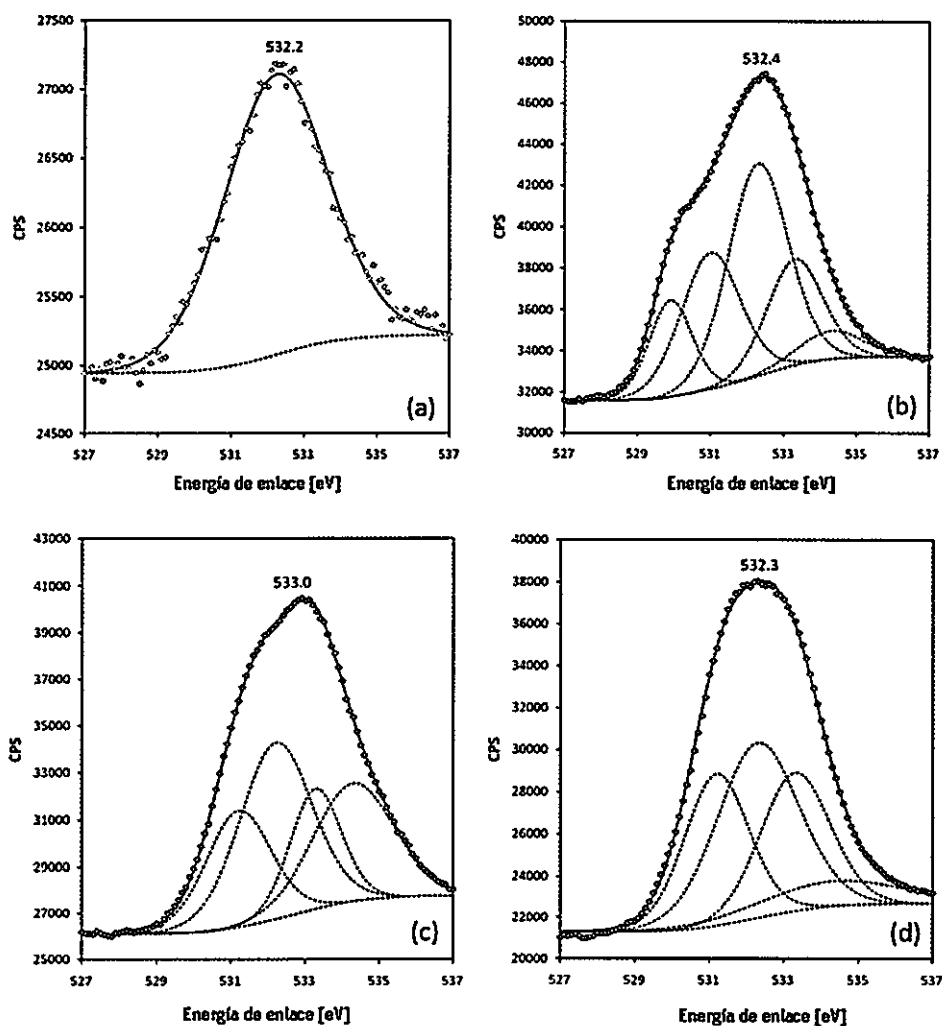


Figura III. 13. Espectros XPS de oxígeno 1s para: a) NL, b) NLO3, c) NLO6 y d) NLO7N.

De acuerdo a los resultados del análisis termogravimétrico (sección 3.1.1 e), se asume que NL presenta una cierta cantidad de grupos carbonilos y anhídridos, aunque sus señales en XPS podrían estar solapadas dentro de la banda de alcohol/éter.

Para NLO3 (fig. III.13b) se observa una banda intensa centrada en 532,4 eV, con un hombro en 529,9 eV. Las sub-bandas en 532,3 y 533,3 eV indican un alto contenido de grupos anhídridos. Sin embargo, la combinación de ambas bandas podría deberse a grupos alcohol/fenol y lactonas. La sub-banda en 534,2 eV confirma la formación de algunos grupos $-\text{COOH}$ y la sub-banda observada en 531,3 eV corresponde a grupos carbonilo/quinona. Adicionalmente, se observa la formación de óxido de hierro asociada a la sub-banda en 529,9 eV [97].

El espectro de la muestra NLO6 (fig. III.13c) presenta una banda en 533,0 eV con un hombro entre 531-532 eV. La sub-banda de los grupos carboxílicos a 534,2 eV aumenta sustancialmente y es posible observar también la presencia de grupos lactona, anhídrido, hidroxilo y carbonilo. Los datos obtenidos para NLO3 y NLO6 concuerdan con la aparición de la banda IR en 1700 cm^{-1} , que corresponde a los grupos $-\text{COOH}$ y con el aumento de la intensidad del estiramiento del enlace $\text{C}=\text{O}$ entre $1120\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ y el enlace $\text{C}-\text{O}$ en éteres ($1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$), lactonas ($1160\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$) y anhídridos ($980\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$) [98].

El espectro para NLO7N (fig. III.13d) presenta una banda ancha centrada en 532,3 eV. El contenido en grupos carboxílicos es menor que el obtenido para NLO6. La sub-banda en 533,3 eV indica un aumento en la cantidad de grupos lactona. Esto se relaciona con el aumento de la banda de quinona observada en el espectro IR (1650 cm^{-1}). Los grupos anhídrido, hidroxilo y carbonilo también se encuentran presentes en la superficie de NLO7N.

Por otra parte, las muestras comerciales presentan un bajo contenido de hierro (0,94 %) que es posible de observar en el espectro XPS de Fe 2p a 707,5 eV (fig. III.14). De acuerdo a la asignación hecha por Yang y col. [99] esta banda se debería a la presencia de Fe^0 . Después del tratamiento oxidativo con mezcla sulfo-nítrica esta banda casi desaparece para la muestra NLO3 y una nueva banda se observa en 710,2 eV, que correspondería a Fe_3O_4 . Poulin y col. [100] atribuyen las bandas a 709,6 eV y 710,2 eV a las formas octaédricas de Fe^{II} y Fe^{III} , respectivamente. La presencia de estas bandas se relacionan con la sub-banda observada a 529,9 eV presente en el espectro XPS de O 2p, que indica la formación del óxido de hierro (fig. III.14b).

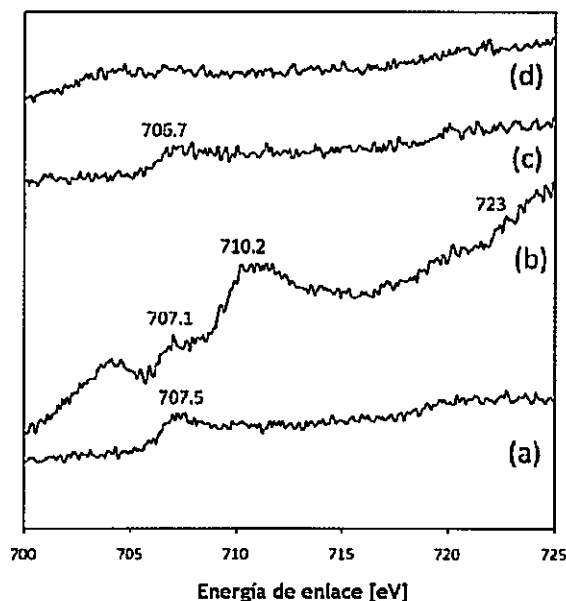


Figura III. 14. Espectro XPS para Fe 2p: (a) NL, (b) NLO3, (c) NLO6, (d) NLO7N.

Cuando las muestras se han oxidado por 6 h (NLO6 y NLO7N), la banda en 710 eV desaparece, indicando que el óxido de hierro ha sido removido, sobretodo en la muestra oxidada con HNO_3 . Las pequeñas señales cercanas a 707 eV (para NLO3 y

NLO6) pueden deberse a pequeñas trazas de nanopartículas de hierro cubiertas por carbono y que no son removidas por el tratamiento con mezcla sulfo-nítrica.

En la figura III.15 se presenta un histograma de distribución de grupos oxigenados en las muestras comerciales y oxidadas. Para esta determinación se ha descontado el oxígeno que correspondería al óxido de hierro.

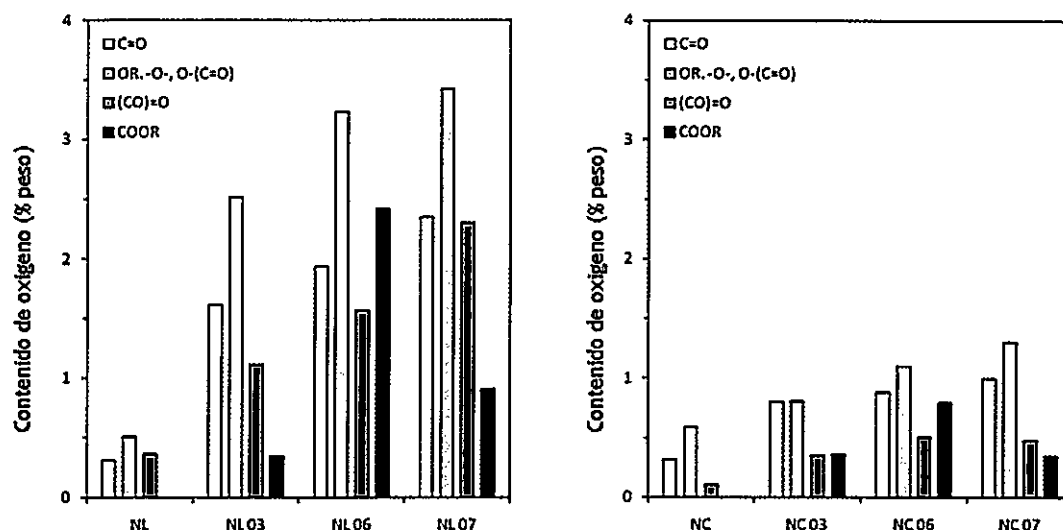


Figura III. 15. Cuantificación del contenido de oxígeno a partir del espectro XPS de O 1s: (a) nanotubos largos, (b) nanotubos cortos.

Como se observan en los histogramas, ambos tratamientos oxidativos aumentan progresivamente la cantidad de grupos carbonilo/quinona (C=O, barras blancas) y grupos oxigenados correspondientes a alcoholes/fenoles, éteres, y grupos carbonilo de anhídridos/lactonas (OR, -O-, O-(C=O), (C-O)=O, barras grises). El contenido de estos últimos es máximo cuando se oxida con HNO₃, tanto para NL como para NC. Por el contrario, los grupos carboxílicos/carboxilatos (COOR, barras más oscuras) aumentan con el tiempo de oxidación al utilizar la mezcla sulfo-nítrica, pero es menor para las

muestras oxidadas con HNO_3 . Tanto NLO6 como NCO6 presentan una cantidad máxima de grupos carboxílicos (barra más oscura). Del grupo III, correspondiente a grupos anhídrido/lactonas ((C-O)=O), hay una tendencia diferente para NL y NC. Para NL estos grupos funcionales aumentan desde NLO3 a NLO6 y NLO7N. Sin embargo, para NC la cantidad de estos grupos no aumenta con el tratamiento de ácido nítrico. Esto podría explicarse debido a que los grupos quinona, lactona o anhídridos se generan en mayor cantidad que los grupos carboxílicos con este tratamiento oxidativo.

Por otra parte, se realizó el espectro XPS para N 1s para las muestras largas oxidadas donde se observaron dos picos a 400,5 y 405,7 eV los que pueden atribuirse a átomos de nitrógeno unidos a carbono (N-C) y a oxígeno (N-O), respectivamente, confirmando la incorporación de nitrógeno a la estructura del nanotubo.

3.1.2 Amidación de MWNT (NTC-NH₂)

Mediante reacciones de amidación, los NTC oxidados (NCO3 y NCO6) fueron funcionalizados con etilendiamina (NTC-NH₂). Se utilizó sólo un tipo de nanotubo (los de menor longitud) para probar la síntesis. La nomenclatura utilizada para las muestras aminadas corresponde a NC+3 y NC+6, dependiendo de la muestra oxidada utilizada como partida. Así, como la muestra NCO6 presenta mayor cantidad de grupos carboxílicos, al funcionalizar estos grupos con EDA la muestra NC+6 debería presentar más grupos amino terminales que NC+3.

a) Análisis termogravimétrico (TGA)

Los análisis TG de la figura III.16 muestran que la degradación de las muestras aminadas es mayor que la muestra comercial y su derivado oxidado respectivo.

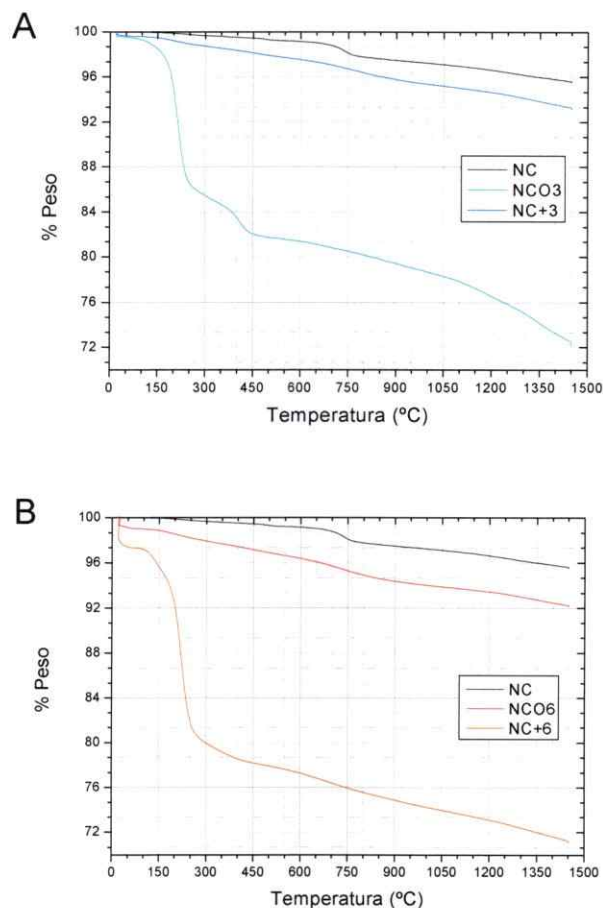


Figura III. 16. Curvas TG para NC y sus derivados oxidados y aminados.

Para las muestras oxidadas la degradación comienza a menor temperatura que NC, donde a bajas temperaturas existe una pequeña pérdida asociada al H₂O adsorbida (inferior a 0,5%), para posteriormente a temperaturas entre 150-300 °C perder un 1% correspondiente a los grupos carboxílicos. Para las muestras aminadas se observa una pérdida importante en peso entre 150-300 °C que puede relacionarse con la

etilendiamina unida covalentemente, ya que estaría dentro del rango en que las muestras oxidadas pierden los grupos carboxílicos. La pérdida en peso en este rango de temperatura corresponde a un 13,75% para NC+3 y un 18,02% para NC+6. Las pérdidas en peso de todas las muestras se resumen en la tabla III.7.

Tabla III. 7. Porcentajes de pérdida en peso y los grupos asociados a NC y sus derivados oxidados y aminados.

Muestras Rango temperatura (° C)	NC	NCO3	NC+3	NCO6	NC+6	Grupo Funcional
0 - 150	0,01	0,20	0,57	0,44	2,17	H ₂ O adsorbida
150 - 350	0,42	0,89	13,75	0,95	18,02	-COOH, -CONHR
350 - 500	0,30	0,48	2,98	0,76	1,08	-OH, Lactona
Sobre 500	1,36	1,56	-	1,47	-	Carbono amorfo
Pérdida en peso total (%)	2,09	3,13	17,30	3,62	21,27	-----

b) Análisis elemental (AE)

En la tabla III.8 se observa que con la incorporación de etilendiamina hay un aumento en los porcentajes de H y N. La muestra NCO6 presenta mayor contenido de grupos -COOH que NCO3, por lo tanto, más grupos susceptibles para ser funcionalizados con la diamina, lo que coincide con el mayor contenido de N y H observados en NC+6. Esto coincide con lo observado por Montesa y col. [101] al funcionalizar SWNT con aminas.

Tabla III. 8. Análisis elemental de la muestra comercial NC, sus derivados oxidados (NCO3 y NCO6) y las muestras aminadas a partir de las oxidadas (NC+3 y NC+6)

	C	H	O	N
NC	98,08	0,13	1,02	0,07
NCO3	97,31	0,15	2,49	0,15
NCO6	96,32	0,16	3,49	0,17
NC+3	85,22	1,44	1,75	5,15
NC+6	80,91	1,70	1,34	6,15

c) Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se compararon los espectros IR obtenidos para la muestra comercial NC, las muestras oxidadas (NCO3 y NCO6) y las muestras aminadas a partir de las oxidadas (NC+3 y NC+6). Los resultados fueron similares para ambos tiempos de oxidación por lo que se presenta sólo el espectro obtenido para NC+3. En la figura III.17 se muestran los espectros para NC, NCO3 y NC+3.

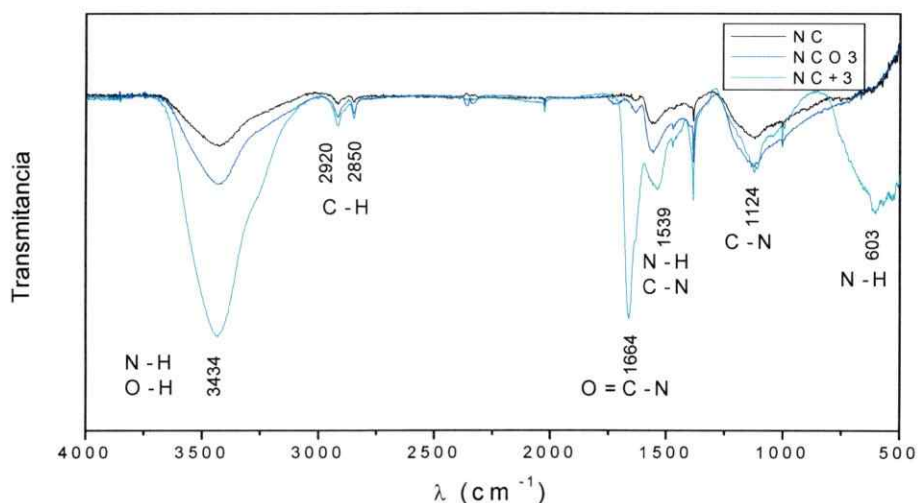


Figura III. 17. Espectros IR para nanotubos cortos (NC), NC oxidado por 3 h (NCO3) y NCO3 funcionalizado con etilendiamina (NC+3).

En el espectro IR se esperan bandas asociadas al grupo amida, aminas primarias y secundarias, así como también para la cadena alifática incorporada. La banda más pronunciada es la que se encuentra en 3434 cm^{-1} ; esta banda corresponde a la tensión del enlace O-H en las muestras NC y NCO3, la que se encuentra intensificada para NC+3, ya que, en ese rango de longitud de onda se encuentra también la tensión del enlace N-H proveniente de la etilendiamina. El enlace N-H presenta también una banda en 1539 cm^{-1} que da cuenta de la torsión o deformación de aminas primarias. La unión de EDA con el nanotubo de carbono se confirma con la aparición de la banda en 1664 cm^{-1} que corresponde al carbonilo del enlace amida. El enlace amida estaría confirmado por la presencia de dos bandas más: una en 603 cm^{-1} , que corresponde a la deformación del enlace N-H de aminas secundarias, y la deformación del enlace C-N en 1539 cm^{-1} . Por otra parte, las bandas en 2850 y 2920 cm^{-1} asociadas al enlace C-H aumentan en intensidad debido a la cadena alifática de la EDA que es unida al nanotubo. Por último, se observa una banda en 1124 cm^{-1} que puede asociarse a grupos C-O y a la tensión del enlace C-N del carbono unido al grupo amino terminal [88].

Para la muestra NC+6 se observó un espectro similar, dando cuenta ambos espectros de la modificación realizada a la muestra oxidada. Con las siguientes técnicas se espera determinar si NC+6 presenta mayor cantidad de grupos amino que la muestra NC+3, ya que ésta partió de una muestra con menor cantidad de grupos –COOH (NCO3).

d) Test de Kaiser

El test de Kaiser es un método simple para determinar grupos amino-terminal libres, utilizado principalmente para el análisis de aminoácidos en disolución y que posteriormente fue adaptado por Kaiser para la síntesis de péptidos en fase sólida [102]. Es un test de color, generado por la reacción de ninhidrina con aminas primarias que otorga una coloración que varía de azul a violeta. Este producto llamado púrpura de Ryhemann es estabilizado por resonancia y la coloración producida por la reacción es independiente del color inicial de la muestra.

El experimento se realizó por duplicado a ambas muestras. Los resultados arrojaron un valor promedio de grupos aminos de $191,54 \pm 20,83$ ($\mu\text{mol/g}$) para NC+3 y $301,60 \pm 0,04$ ($\mu\text{mol/g}$) para NC+6. Estos valores son menores a los valores esperados según el A.E., lo que indicaría que no todos los grupos amino terminal de EDA estarían libres, sino que podría haberse unido un grupo EDA a dos nanotubos diferentes. Estos resultados son concordantes con lo observado para SWNT modificados con EDA [101]. Al no estar protegido uno de los grupo amino de EDA no hay control sobre la reacción para lograr que cada EDA se una a un solo grupo -COOH.

A través de los experimentos realizados es posible concluir que la cantidad y tipo de grupos funcionales oxigenados que son incorporados a la superficie del NTC, depende fuertemente del agente oxidante utilizado y el tiempo del tratamiento. El área superficial específica y el volumen de mesoporo disminuyen con el tratamiento oxidativo debido a una mayor compactación de los nanotubos. Las imágenes SEM y los espectros Raman muestran que el tratamiento oxidativo no daña la estructura del nanotubo y a través de los espectros IR y XPS fue posible observar que el tratamiento con HNO_3 introduce una gran cantidad de grupos quinona, lactona y anhídrido, mientras que la mezcla sulfo-nítrica introduce una mayor cantidad de grupos carboxílicos. A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta que el objetivo de esta tesis es modificar los nanotubos con otros grupos funcionales, se decidió utilizar los nanotubos funcionalizados con la mayor cantidad de grupos carboxílicos incorporados.

Los grupos carboxílicos fueron modificados con etilendiamina a través de la formación de un enlace amida, lo que fue confirmado a través de análisis elemental, termogravimétrico y espectros IR. Mientras más grupos carboxílicos presenta la muestra, mayor es la cantidad de grupos amino que son incorporados al nanotubo. Sin embargo, el número de grupos amino libres determinado a través del test de Kaiser, indican que parte de los grupos amino terminales pueden estar uniendo nanotubos entre sí, mientras otra parte quedaría unido a la superficie del nanotubo.

Las funcionalizaciones realizadas a los nanotubos de carbono con etilendiamina tienen por objetivo mejorar las dispersiones de las muestras en medio acuoso, haciendo más fácil su utilización para modificar electrodos y mejorar su interacción con ADN. Finalmente, la funcionalización de nanotubos oxidados a través de un enlace amida, permite utilizar moléculas más complejas, generando nuevos biosensores dependiendo de la aplicación que se necesite estudiar.

3.1.3 Dispersabilidad de *MWNT* funcionalizados

Los nanotubos de carbono son poco dispersables en casi todos los disolventes conocidos, por este motivo es que se han incorporado a su superficie diferentes grupos funcionales para mejorar esta propiedad. Los tres tipos de NTC (NC, NCO6 y NC+6) se dispersaron en cuatro disolventes diferentes, seleccionados según lo reportado en diferentes trabajos publicados [78, 97]:

Dispersión A = H₂O

Dispersión B = H₂O/etanol (50/50)

Dispersión C = etanol

Dispersión D = N,N – dimetilformamida (DMF)

Las dispersiones se evaluaron a través de fotografía digital, microscopía óptica y voltamperometría cíclica.

a) Fotografía Digital

A través de fotografías digitales es posible estudiar la estabilidad de las dispersiones a través del tiempo. En las siguientes figuras se observan las dispersiones después de sonicar las muestras por 1 hora (tiempo de reposo = 0 min.) y luego de un mes de reposo.

- Dispersión A = H₂O

En este caso las dispersiones acuosas mostraron ser poco estables para los tres tipos de NTC, incluso a diferentes valores de pH (3, 7 y 11). Tanto la muestra comercial

NC (A1), como la oxidada (A2) y aminada (A3) sedimentaron completamente al término del tiempo de sonicado (Fig. III.18, izquierda).

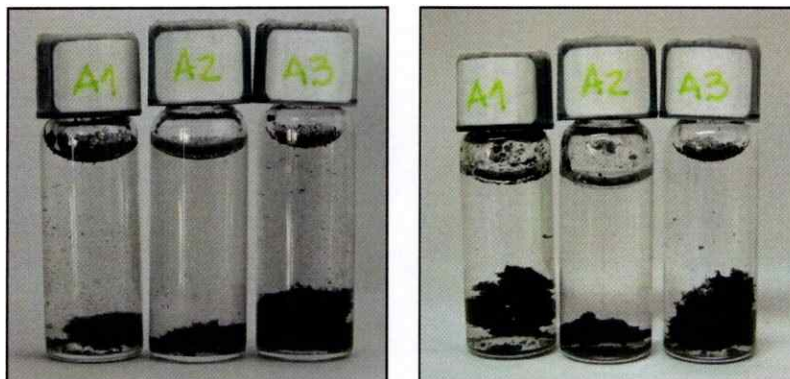


Figura III. 18. Fotografía digital de dispersiones en agua (0,5 mg/mL) luego de 1 hora de sonicado, a diferentes tiempos de reposo. Izquierda: muestras recién sonicadas, Derecha: luego de un mes de reposo. (A1) NC, (A2) NCO6, (A3) NC+6.

Esto podría deberse a que las interacciones de tipo Van der Waals favorecen las interacciones entre los nanotubos, por sobre las interacciones intermoleculares con el disolvente. Luego de un mes de reposo (Fig. III.18, derecha) se observa que las pequeñas partículas de NTC que podrían haber quedado en suspensión decantan, dejando el disolvente totalmente traslúcido.

- Dispersión B = H₂O/etanol (50/50)

En la figura III.19 (izquierda) se observa que al incorporar etanol al medio acuoso se observa una mayor dispersión de los NTC, comparados con la dispersión en agua (fig. III.18). Las muestras NC (B1), NCO6 (B2) y NC+6 (B3) presentan un grado de dispersabilidad similar entre ellas. Luego de un mes de reposo (fig. III.19, derecha), las

dispersiones se mantienen estables comparadas con las iniciales, lo que indicaría que presencia de etanol permitiría una mayor interacción de los NTC con el disolvente.

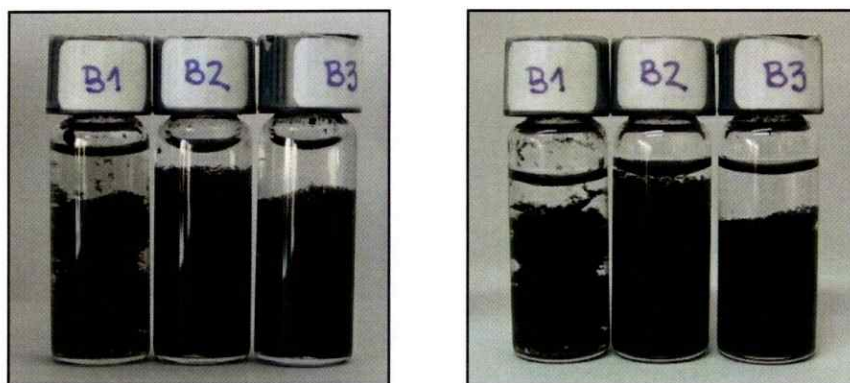


Figura III. 19. Fotografía digital de dispersiones en agua/etanol (50/50) (0,5 mg/mL) luego de 1 hora de sonicado, a diferentes tiempos de reposo. Izquierda: muestras recién sonicadas, Derecha: luego de un mes de reposo. (B1) NC, (B2) NCO6, (B3) NC+6.

- Dispersión C = etanol



Figura III. 20. Fotografía digital de dispersiones en etanol (0,5 mg/mL) luego de 1 hora de sonicado, a diferentes tiempos de reposo. Izquierda: muestras recién sonicadas, Derecha: luego de un mes de reposo. (C1) NC, (C2) NCO6, (C3) NC+6.

El etanol (EtOH) es un disolvente prótico, cuyas principales interacciones con otras moléculas estarían dadas por puentes de hidrógeno, esto permite un alto grado de dispersabilidad para los tres tipos de NTC (fig. III.20, izquierda), la cual se mantiene a lo largo de un mes de reposo. Sin embargo con el tiempo se observa una evaporación importante del disolvente, por lo que al trabajar con EtOH se debe de tener en cuenta para no concentrar los NTC (fig. III.20, derecha).

- Dispersión D = N,N-dimetilformamida (DMF)

Como se observa en la figura III.21, N,N-dimetilformamida (DMF) resultó ser el mejor dispersante para los diferentes NTC.

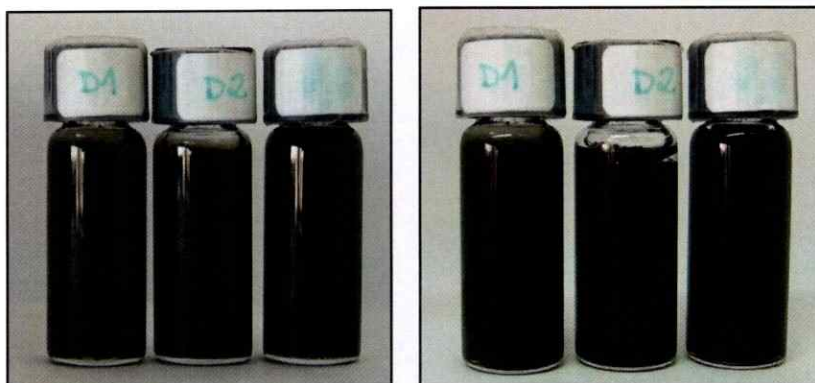


Figura III. 21. Fotografía digital de dispersiones en DMF (0,5 mg/mL) luego de 1 hora de sonicado, a diferentes tiempos de reposo. Izquierda: muestras recién sonicadas, Derecha: luego de un mes de reposo. (D1) NC, (D2) NCO6, (D3) NC+6.

Las interacciones del disolvente con los NTC podrían explicarse a través de interacciones del tipo dispersivas o de Van der Waals, que serían interacciones similares a las que se producen entre los NTC. De esta forma, el disolvente es capaz de generar interacciones con los NTC permitiendo su separación de otras estructuras,

obteniendo una dispersión estable en el tiempo. Los tres tipos de NTC se dispersan homogéneamente con DMF por lo que la presencia de los diferentes grupos funcionales no altera las interacciones NTC-disolvente.

b) Microscopía Óptica

Se utilizó la microscopía óptica para obtener imágenes de las dispersiones realizadas y así determinar si existen diferencias entre las muestras, según los grupos funcionales que presentan.

- Dispersión A = H₂O

Tal como se observó con las fotografías digitales, las dispersiones en agua no son homogéneas (fig. III.22). Todas las dispersiones presentan diferentes tamaños de agregados, siendo menores para NC que no presenta grupos funcionales (fig. III.22A). Al estar en contacto con el agua, los NTC se compactan favoreciendo las interacciones entre ellos, formando pequeños agregados. La compactación aumenta en el orden NC+6 < NCO6 < NC.

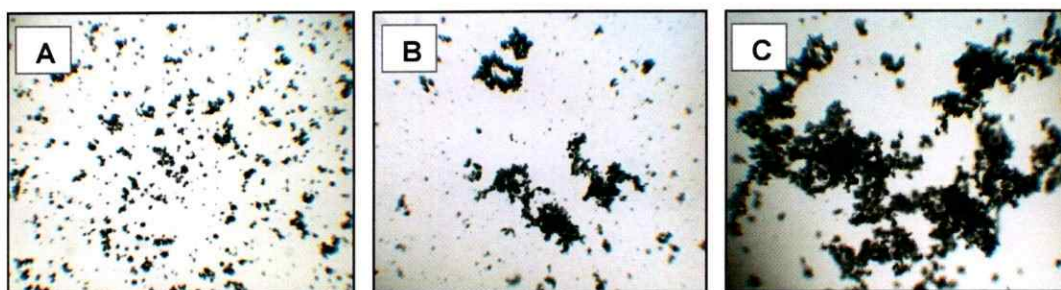


Figura III. 22. Micrografía óptica de diferentes *MWNT* dispersos en agua (0,5 mg/mL), luego de una hora de sonicado. (A) NC, (B) NCO6, (C) NC+6.

- Dispersión B = H₂O/EtOH (50/50)

Al incorporar etanol se observa que mejoran las dispersiones para los tres tipos de NTC (fig. III.23), con presencia de agregados de mayor tamaño, lo que podría deberse a que la interacción con el disolvente se vería favorecida. Como se observó por fotografía digital en la figura III.19, no es posible distinguir entre los tres tipos de NTC, ya que la interacción es indistinta de los grupos funcionales que se encuentran en las paredes del NTC.

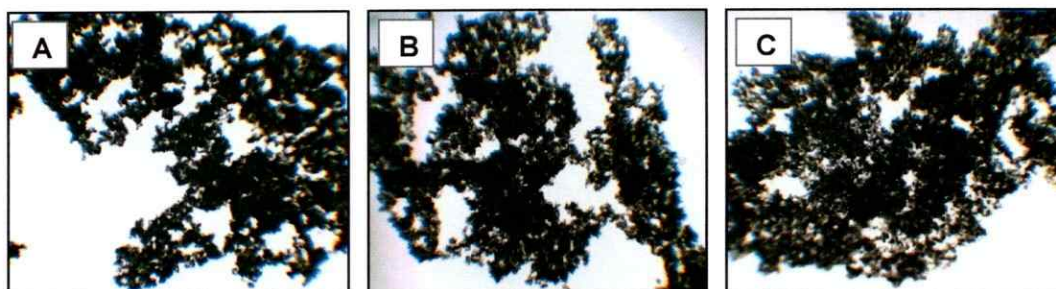


Figura III. 23. Micrografía óptica de diferentes *MWNT* dispersos en agua/etanol (50/50) (0,5 mg/mL), luego de una hora de sonicado. (A) NC, (B) NCO6, (C) NC+6.

- Dispersión C = etanol

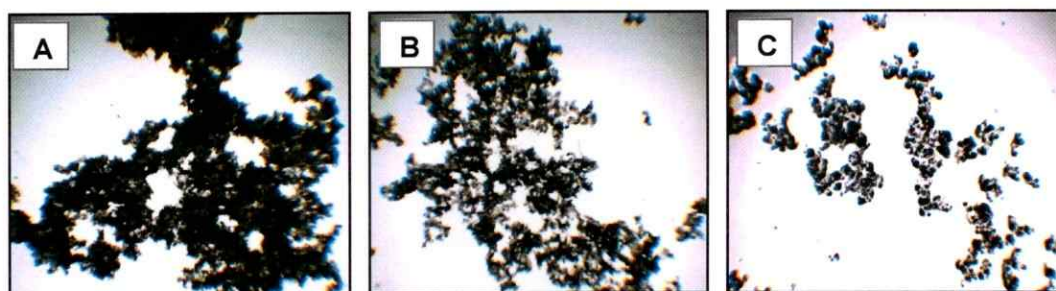


Figura III. 24. Micrografía óptica de diferentes *MWNT* dispersos en etanol (0,5 mg/mL), luego de una hora de sonicado. (A) NC, (B) NCO6, (C) NC+6.

Cuando el dispersante es sólo etanol se obtienen dispersiones muy homogéneas para los tres casos como se observó en la fig. III.20, sin embargo, no es posible observar por esta técnica diferencias entre los tres NTC.

- Dispersión D = DMF

En las imágenes de la figura III.25 se observa que los tres tipos de NTC se dispersan independiente de los grupos funcionales incorporados. Las zonas de disolvente sin agregados se ven con coloración, ya que, los NTC se dispersan interactuando con el DMF, dejando la disolución turbia.

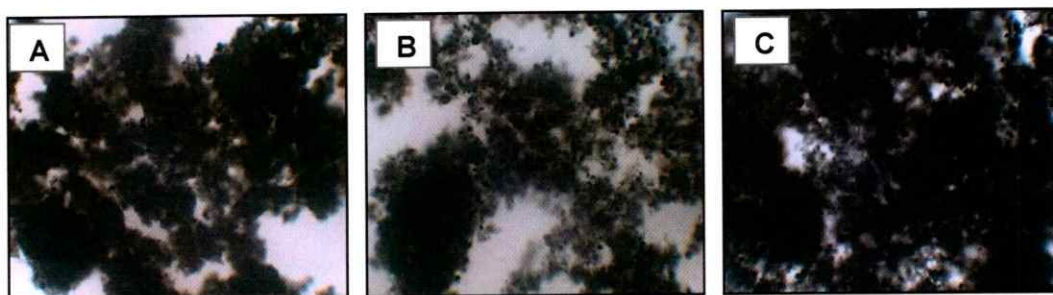


Figura III. 25. Micrografía óptica de diferentes *MWNT* dispersos en DMF (0,5 mg/mL), luego de sonicado una hora. (A) NC, (B) NCO6, (C) NC+6.

Con estos resultados observamos que para *MWNT* el mejor dispersante es DMF y el peor dispersante es H_2O . Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Ausman y col. para *SWNT* [103], donde los mejores dispersantes son aquellos que tienen pares de electrones libres y además no son dadores de puentes de hidrógeno. En nuestro caso, ese disolvente es DMF.

Tanto H_2O como DMF serán utilizados para dispersar los nanotubos y estudiar así el efecto de estas dispersiones en la respuesta electroquímica de los electrodos.

3.1.4 Electrodo modificado con MWNT dispersos en DMF y PBS

a) Voltamperometría cíclica en tampón fosfato (PBS)

Las mediciones se realizaron siguiendo el protocolo utilizado por Luo y col [104] y los resultados se muestran en la figura III.26.

El electrodo de carbono vítreo sin modificar no presenta ninguna señal en todo el rango de potencial aplicado. Cuando el electrodo es modificado con NTC comerciales (NC y NL) tampoco se observa una señal electroquímica, indicando que las pequeñas cantidades de oxígeno obtenidos por XPS (alcohol/fenol y éter) no son especies electroactivas o no alcanzan a ser detectados por esta técnica. Los voltamperogramas cíclicos para NC y NL son rectangulares y simétricos, lo que da cuenta del comportamiento típico de la doble capa eléctrica [105].

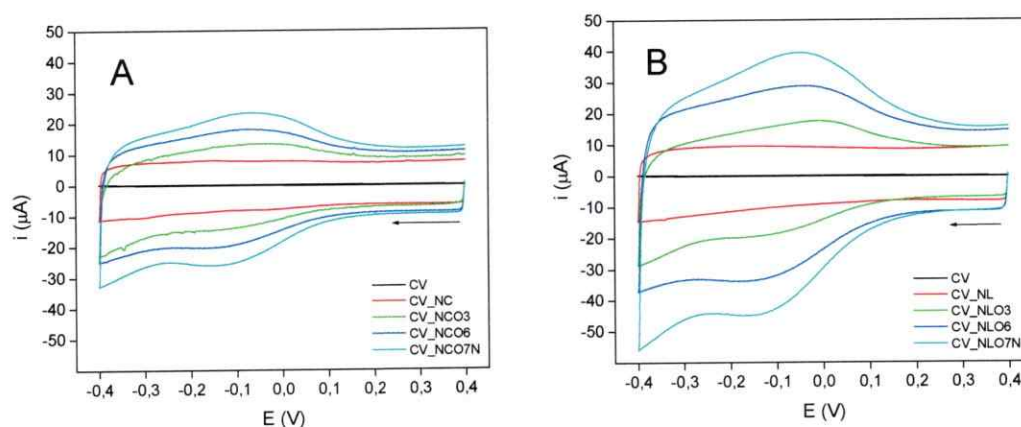


Figura III. 26. Voltamperogramas cíclicos para electrodos modificados con diferentes NTC dispersos en PBS 10 mM con NaCl 0,1 M a pH 7,0. La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL y la velocidad de barrido a 50 mV/s. (A) NTC cortos (B) NTC largos.

Por otra parte, los electrodos modificados con NTC oxidados con mezcla sulfonítrica (cortos o largos) muestran un pico anódico y uno catódico alrededor de -0,05 y -0,15 V, respectivamente. Estas señales se asocian principalmente a procesos redox de los ácidos carboxílicos presentes en la estructura de los NTC oxidados [106], aunque otros grupos oxigenados electroactivos podrían estar contribuyendo, como las quinonas [107].

La intensidad de corriente de los voltamperogramas aumenta con el tiempo de oxidación al que se expuso la muestra. Estas señales dan cuenta de que a mayor tiempo de oxidación, mayor es la cantidad de grupos electroactivos incorporados, lo que es corroborado si consideramos que el porcentaje en peso de los grupos carboxílicos y quinonas, considerados electroactivos, es mayor para las muestras oxidadas por 6 horas que las oxidadas por 3 horas (figura III.27). Además, los NTC largos muestran un grado de mayor oxidación y mayores valores de corrientes, indicando que incorporan más grupos electroactivos.

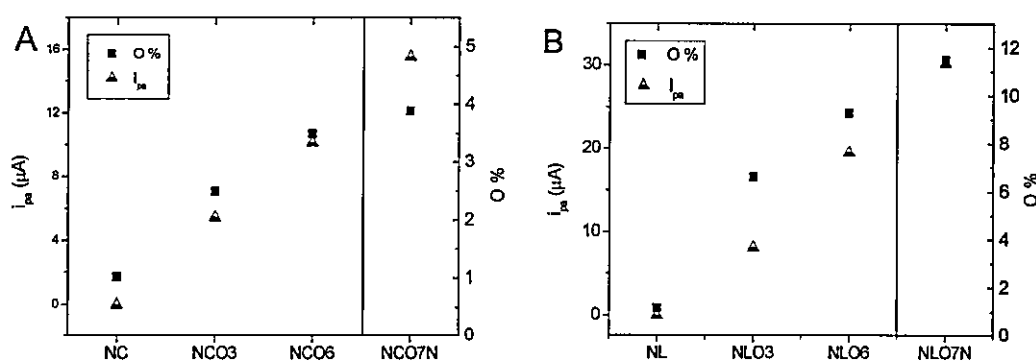


Figura III. 27. Relación entre la intensidad de corriente anódica (I_{pa}) y el contenido en oxígeno (O%) en el tratamiento oxidativo de NTC (A) cortos y (B) largos.

En la misma figura es posible apreciar que el tratamiento oxidativo con HNO_3 introduce mayor cantidad de grupos electroactivos (mayores valores de I_{pa}). Sin embargo, por XPS se obtuvo que el número de grupos carboxílicos es menor al que se obtiene con mezcla sulfo-nítrica por 6 horas. Los resultados electroquímicos indican que además de ácidos carboxílicos, este tratamiento introduce también quinonas, lactonas y grupos anhídridos que aumentan el valor de la corriente, a pesar de contener menos grupos $-\text{COOH}$.

Al analizar la reversibilidad de los voltamperogramas se observa que las muestras oxidadas cortas muestran un valor de ΔE_p menor a las largas (100 vs 140 mV, respectivamente). Estos resultados indicarían que la transferencia electrónica es más rápida con las muestras cortas.

Los voltamperogramas cíclicos se realizaron también a las muestras aminadas para observar si existía algún cambio en la señal de ácidos carboxílicos al formarse el enlace amida. En la figura III.28A se observa el voltamperograma para NC, su muestra oxidada por 3 horas (NCO3) y la muestra aminada (NC+3).

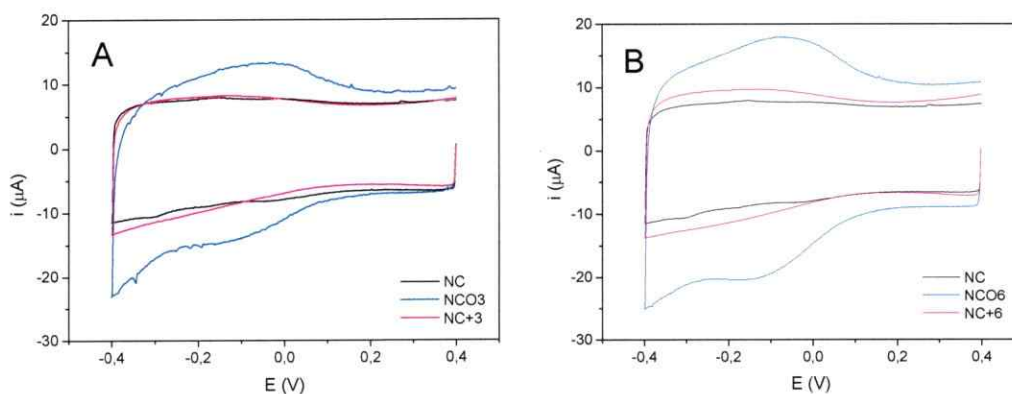


Figura III. 28. Efecto de la amidación de NC oxidados por (A) 3 horas y (B) 6 horas. Los NTC están dispersos en PBS 10 mM con NaCl 0,1 M a pH 7,0. La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL y la velocidad de barrido a 50 mV/s.

La señal asociada al proceso redox de ácidos carboxílicos se pierde completamente una vez que la muestra es aminada dejando un voltamperograma similar al obtenido con NC, es decir, sin grupos carboxílicos libres. Una pérdida similar de señal se observa para la muestra NC+6 (figura III.28B). En ambos casos, la señal redox de los ácidos carboxílicos desaparece con la amidación, indicando la ausencia de estos grupos que han sido sustituidos por enlaces amida.

Estas mediciones fueron repetidas con *MWNT* dispersos en DMF, obteniendo el mismo comportamiento para todas las muestras.

b) Cálculos de capacitancia y evaluación del área electroactiva

A través de mediciones de voltamperometría cíclica se obtuvieron los valores de capacitancia como un reflejo del área electroactiva de cada electrodo.

Cuando los electrodos son modificados con las muestras comerciales (NC y NL) los valores de capacitancia que se obtienen son superiores al electrodo solo ($10,3 \mu\text{As/V}$) y similares entre sí (310 y $332 \mu\text{As/V}$ para NC y NL, respectivamente). Luego de 6 h de oxidación, los valores de capacitancia aumentan a 394 y $890 \mu\text{As/V}$ para NCO6 y NLO6, donde se observa una correlación entre la cantidad de grupos oxigenados incorporados y la capacitancia cuando el agente oxidante corresponde a la mezcla sulfo-nítrica. Por otra parte, cuando los nanotubos son oxidados con ácido nítrico por 6 h, los valores de capacitancia corresponden a 432 y $653 \mu\text{As/V}$ para NCO7N y NLO7N, respectivamente.

Según los resultados de superficie BET, el tratamiento oxidativo provocaría una disminución del área superficial y del volumen de mesoporos, lo que implicaría menor área disponible para la formación de la doble capa. Sin embargo, de acuerdo a Hsieh y col. [108] esto no es completamente cierto debido a que no toda la superficie del

nanotubo es electroquímicamente activa. Así, el aumento de las capacitancias puede atribuirse al incremento de superficie libre disponible una vez que la oxidación incorpora nuevos grupos electroactivos a la superficie.

Por otra parte, cuando las muestras son aminadas, los valores de capacitancia, y por lo tanto de área electroactiva, disminuyen hasta valores similares a las muestras comerciales.

c) Voltamperometría cíclica utilizando un mediador redox

Para caracterizar las superficies modificadas con los diferentes *MWNT* se comparó la respuesta del electrodo sin modificar, con los electrodos modificados frente a un mediador redox. Para esto se utilizó $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4})$, que posee un proceso reversible monoelectrónico característico, donde cualquier cambio observado en su comportamiento puede ser atribuido a la superficie estudiada.

- NTC oxidados

La figura III.29 muestra los voltamperogramas cíclicos del mediador redox, obtenidos a partir de electrodos de CV modificados con NTC dispersos en DMF. La presencia de los NTC sobre el electrodo incrementa los valores de corriente en comparación con el electrodo sin modificar, lo que podría explicarse por el aumento de área electroactiva de los electrodos al incorporar NTC. Estos valores de corriente aumentan con el tiempo de oxidación y aún más con la oxidación utilizando ácido nítrico.

Con los nanotubos de mayor longitud (figura III.30) se observó un comportamiento similar pero con valores de corriente menores. Esto posiblemente se deba a que la mayor cantidad de grupos carboxílicos en la superficie pueden

desfavorecer el acercamiento de la especie redox (negativa) hacia la superficie del electrodo. En este caso la muestra NLO7N presenta un voltamperograma muy similar a la muestra NL, a diferencia de lo observado para las muestras cortas.

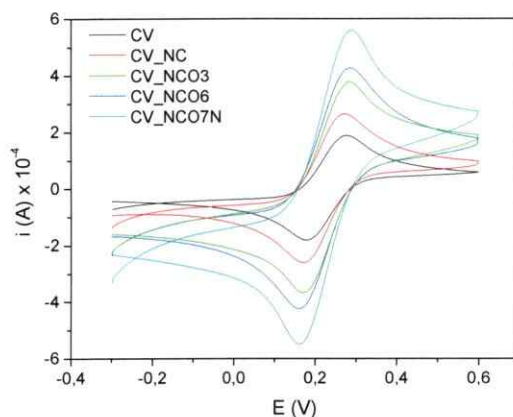


Figura III. 29. Voltamperogramas cíclicos de $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{-3}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ 10 mM en PBS 10 mM pH 7,4, obtenidos con electrodos modificados con NTC cortos dispersos en DMF. La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL y la velocidad de barrido a 50 mV/s.

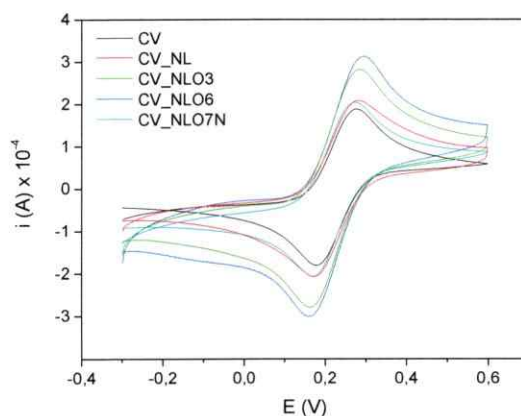


Figura III. 30. Voltamperogramas cíclicos de $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{-3}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ 10 mM en PBS 10 mM pH 7,4, obtenidos en electrodos modificados con NTC largos dispersos en DMF. La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL y la velocidad de barrido a 50 mV/s.

Se repitieron las mediciones con los NTC dispersos en tampón fosfato para evaluar el efecto de la homogeneidad de la dispersión sobre la respuesta del electrodo, las que mostraron voltamperogramas con valores promedio de corriente similares a los obtenidos con DMF. En la figura III.31 se muestran los valores de i_{pc}/i_{pa} calculados para ambos sistemas, los que se obtuvieron según la ecuación de Nicholson [74].

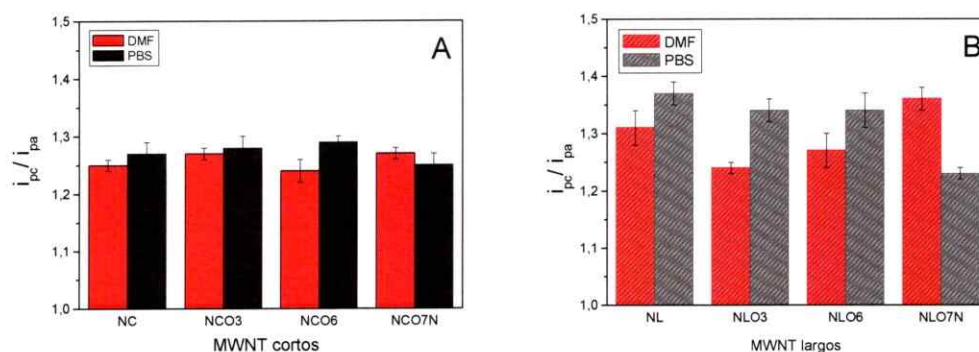


Figura III. 31. Valores de i_{pc}/i_{pa} para NTC dispersos en DMF y PBS: (a) NTC cortos, (b) NTC largos.

En la figura III.31 se observa que con PBS las razones de corriente son similares a las obtenidas para DMF, lo que indicaría que el agente dispersante no afecta la transferencia electrónica del mediador redox. Los valores obtenidos además indicarían que en ambos sistemas se favorecería la reducción del mediador a $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$, ya que los valores de i_{pc} son superiores a los de i_{pa} . Los resultados muestran una independencia del tipo, tamaño y tratamiento oxidativo del NTC.

Al evaluar los valores de ΔE_p (fig. III.32) se observa que en todos los casos, el valor obtenido con los electrodos modificados es mayor comparado con el electrodo sin modificar y es mayor que el valor esperado para un sistema reversible monoelectrónico.

Para las muestras cortas dispersas en DMF (fig. III.32A, rojo) hay un aumento de

ΔE_p con el aumento del tiempo de oxidación, indicando que el proceso pierde reversibilidad. Esto probablemente se deba a que el acceso del mediador a la superficie se vea dificultada por la presencia de cargas negativas al oxidar el nanotubo. Este comportamiento también se observa para los NTC largos dispersos en DMF, excepto para la muestra NLO7N que muestra un valor de ΔE_p similar a NL (fig. III.32B).

Cuando los NTC cortos están dispersos en PBS el valor de ΔE_p permanece cercano a 120 mV, es decir, la señal es independiente de la modificación del NTC, ya que, las dispersiones formarían *films* similares sobre los electrodos. Mientras, los NTC largos presentan mayor error y valores de corriente que no se relacionan con el tiempo de oxidación.

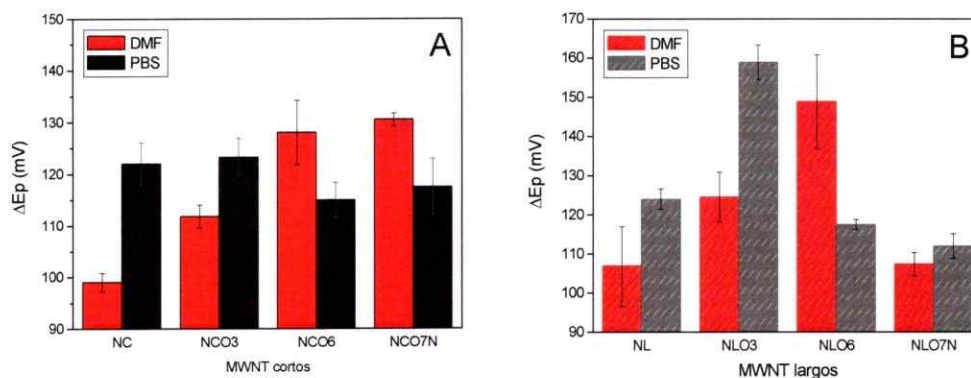


Figura III. 32. Valores de ΔE_p para NTC dispersos en DMF y PBS. (a) NTC cortos, (b) NTC largos.

La presencia de los nanotubos en la superficie del electrodo podría estar afectando la cinética del mediador redox o éste podría estar siendo adsorbido sobre los nanotubos. Esto último se correlacionaría con los valores obtenidos para i_{pc}/i_{pa} que superan la unidad, lo que daría cuenta de una adsorción débil de la especie oxidada (producto), que muestra mayor valor de corriente catódica que anódica, como ha sido descrito por Wopschall y Shain [109].

- NTC aminados

Como se explicó en la sección 3.1.4 a, la señal asociada al proceso redox de ácidos carboxílicos se pierde completamente una vez que la muestra es aminada, dejando un voltamperograma similar a NC (fig. III.28A). Cuando las mediciones se hacen con el mediador redox (fig. III.33A), se observa que la muestra oxidada NCO3 presenta un voltamperograma con mayor intensidad de corriente que NC asociado a la mayor área electroactiva. Con la muestra aminada, a pesar de mostrar áreas electroactivas similares con NC, se obtienen mayores valores de corriente. Esto puede asociarse a que las cargas positivas de NC+3 atraerían electrostáticamente más moléculas del mediador (negativo) hacia la superficie, comparado con NC que no posee grupos cargados. De esta forma se concentra mayor cantidad de mediador sobre el electrodo y, por lo tanto, los valores de corriente son superiores.

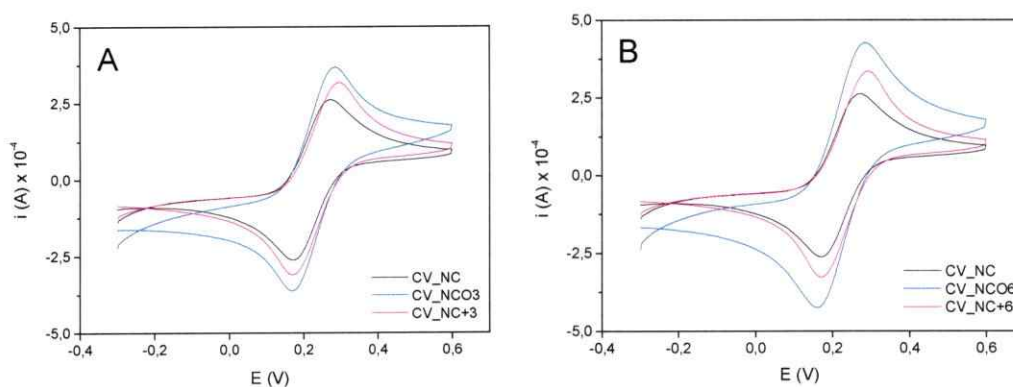


Figura III. 33. Efecto de la amidación de NC oxidados por (A) 3 horas y (B) 6 horas, sobre los voltamperogramas cíclicos de $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{-3}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ 10 mM. Electrodo modificado con NTC dispersos en DMF de concentración 1 mg/mL. Velocidad de barrido de 50 mV/s.

Para la muestra NC+6 (fig. III.33B) se observa el mismo comportamiento. En ambos casos, la pérdida de área electroactiva no bloquea el acercamiento del

mediador redox. Las cargas positivas incorporadas en el nanotubo mejoran la respuesta del sensor comparado con NC, a pesar de que presentan menores valores de corriente que NCO6 debido a la pérdida de área electroactiva.

3.2 INTERACCIÓN DE *MWNT* FUNCIONALIZADOS CON ADN EN DISOLUCIÓN

El primer paso para aplicar los NTC en electrodos para la detección de ADN es demostrar y caracterizar su interacción.

3.2.1 Curva de calibración de *ds-DNA*

El ADN presenta una banda de absorción característica en 260 nm [110]. A través de esta señal se construyó una curva de calibración. Como se observa en la figura III.34, la curva de calibración muestra un comportamiento lineal hasta una concentración de 90 ppm.

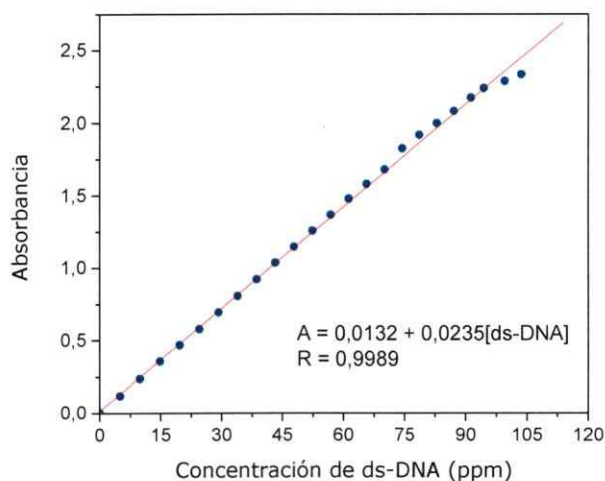


Figura III. 34. Curva de calibración para *ds-DNA* en PBS 0,2 M pH 7,4.

3.2.2 Evaluación de la interacción entre *MWNT* y *ds-DNA*

La interacción en disolución de los distintos NTC y las moléculas de ADN se estudió siguiendo el protocolo de Xiao y colaboradores [60]. El medio de interacción fue realizado a pH 5,0 condición en que los grupos carboxílicos se encontrarían en su mayoría desprotonados ($-\text{COO}^-$) y los grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$).

Sabemos que NC es la muestra que presenta menos sitios defectuosos en sus paredes y que por su estructura es capaz de interactuar con las bases del ADN a través de interacciones de Van der Waals, principalmente del tipo π - π [111]. Por otra parte, al oxidar el NTC, en su estructura se incorporan grupos que generan cargas negativas. En este caso, el ADN debería interactuar con el NTC sólo en los sitios que pueden haber interacciones de Van der Waals, ya que se generarían repulsiones electrostáticas entre los grupos $-\text{COOH}$ desprotonados del nanotubo con los grupos fosfato del ADN; de esta manera, la interacción con ADN sería menor a la que presente NC. Por último, la muestra aminada presenta cargas positivas en su superficie y por lo tanto, además de las posibles interacciones de Van der Waals, el ADN sería atraído al NTC por interacciones electrostáticas [112]. El resultado que se espera es que la interacción con ADN aumente en el orden: $\text{NC-NH}_3^+ > \text{NC} > \text{NC-COO}^-$. En la figura III.35 se muestran los espectros obtenidos para estas muestras luego de 24 h de incubación.

En la figura III.35 se observan tres espectros, donde uno correspondiente al ADN solo, con un máximo en 260 nm. Un segundo espectro (con línea punteada) con un máximo en 230 nm corresponde a la absorción del NTC [113]. Esta banda es independiente de los grupos funcionales presentes en la nanoestructura, ya que, tanto el $-\text{COOH}$ (en la muestra oxidada) como los $-\text{NH}_2$ (en la muestra aminada) no presentan bandas de absorción. Por último, el tercer espectro corresponde al

sobrenadante de la mezcla de reacción de *ds-DNA* y NTC. Así, el *ds-DNA* que no ha interactuado con el NTC permanecerá en el sobrenadante pudiendo cuantificarse mediante la absorción remanente en 260 nm. Luego de 24 h de interacción, la disminución de la señal de ADN para la interacción con NC fue de un 79%, de un 77% para NC-COOH y de 81% para NC-NH₂. Si bien la interacción fue muy similar entre los tres NTC, se observa que NC-NH₃⁺ tendría una mayor interacción con *ds-DNA* dado que presenta el mayor porcentaje de disminución de señal. La similitud entre los porcentajes de interacción puede ser atribuida al largo tiempo de incubación de 24 h.

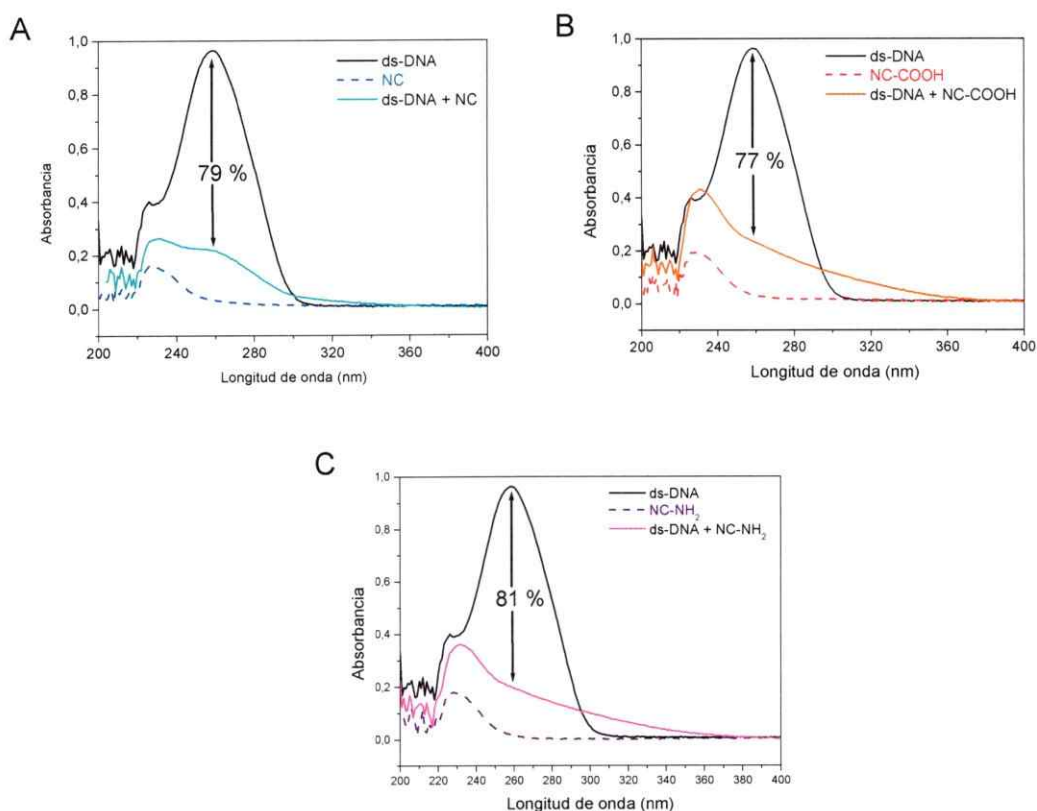


Figura III. 35. Espectros UV de distintos NTC y su interacción con 45 ppm de *ds-DNA*, luego de 24 h de incubación, en tampón formiato pH 5,0: (A) NC, (B) NC-COOH y (C) NC-NH₂. La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL.

Para evaluar si efectivamente este tiempo es relevante en los porcentajes obtenidos, se repitió el procedimiento pero esta vez con un tiempo de incubación de 1 h. Los resultados se muestran en la figura III.36.

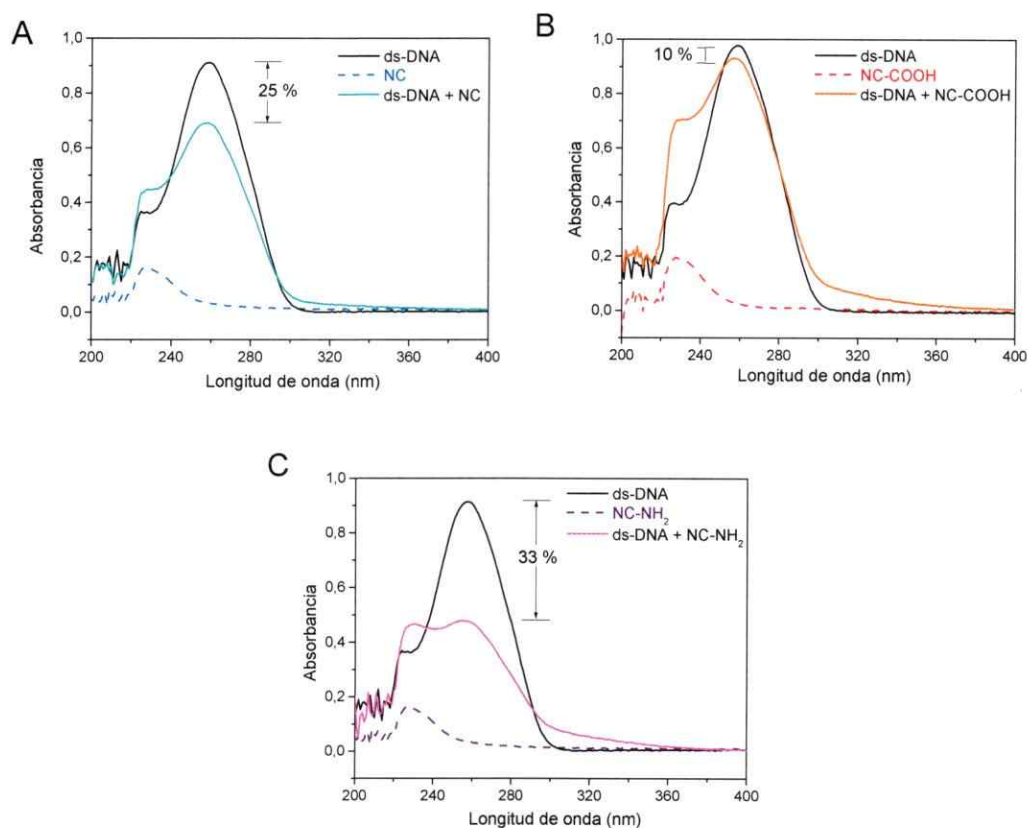


Figura III. 36. Espectros UV de distintos NTC y su interacción con 45 ppm de *ds-DNA* luego de 1 h de incubación, en tampón formiato pH 5,0: (A) NC, (B) NC-COOH y (C) NC-NH₂. La concentración de la dispersión corresponde a 1 mg/mL.

En este caso sí fue posible observar diferencias entre los porcentajes de disminución de señal de ADN, los que permiten elaborar un orden de interacción de $\text{NC-NH}_3^+ > \text{NC} > \text{NC-COO}^-$. Con un tiempo de incubación de 1 h se puede inferir que existe un predominio de las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de

los NC-NH_3^+ y los grupos fosfato del ADN, permitiendo una mayor adsorción comparado a NC, el cual interactúa con el ADN principalmente a través de interacciones del tipo Van der Waals. Por último, los NC-COO^- poseen grupos cargados negativamente que pueden disminuir la interacción con ADN debido a la repulsión con los grupos fosfato presentes en la biomolécula. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla III.9.

Tabla III. 9. Porcentajes promedio de la disminución de *ds-DNA* en función del NTC utilizado y el tiempo de incubación, correspondiente a tres mediciones.

Muestras \ $T_{\text{incubación}}$	NC	NC-COOH	NC-NH ₂
1 hora	25	10	33
24 horas	79	77	81

A tiempos mayores de incubación, los porcentajes de interacción se hacen similares para todas las muestras dado que el ADN puede adoptar diferentes conformaciones espaciales alrededor del NTC [114]. Las interacciones electrostáticas que inicialmente acercan a la macromolécula hacia el NTC dejan de ser las principales y el ADN adopta una conformación que permitiría que sus bases nitrogenadas interactúen con el nanotubo a través de interacciones del tipo π - π . En cambio, con 1 h de incubación observamos que las interacciones electrostáticas estarían predominando en un primer paso, según lo descrito anteriormente.

3.3 APLICACIÓN DE MWNT FUNCIONALIZADOS EN LA GENERACION DE ELECTRODOS MODIFICADOS PARA LA DETECCIÓN DE ADN

Los NTC ya caracterizados se utilizaron para generar electrodos modificados para la detección de ADN. Para maximizar el efecto del grupo funcional incorporado al NTC se seleccionaron DMF y PBS como agentes dispersantes. Posteriormente, la eficiencia de los biosensores construidos será comparada con sensores construidos a partir de los mismos NTC, pero ahora dispersos con agentes catiónicos, como quitosano (polímero) y cloruro de bencetonio (surfactante).

3.3.1 Electrodo modificado con MWNT dispersos en DMF

El disolvente DMF demostró ser un buen agente dispersante para diferentes tipos de NTC, permitiendo generar un *film* homogéneo sobre la superficie del electrodo. Sin embargo, cuando se utilizó esta dispersión para adsorber ADN los resultados fueron diferentes. Luego de aplicar el protocolo de adsorción del ADN no se registró señal electroquímica que dé cuenta de la oxidación de la muestra sobre el electrodo. Es así que, probablemente, el ADN no esté siendo capaz de adsorberse sobre el electrodo y por lo tanto no se registra señal. La DMF formaría interacciones fuertes con los NTC, favoreciendo su dispersión pero bloquearía el acceso del ADN al NTC, lo que hace que no sea posible aplicar este sistema como genosensor.

3.3.2 Electrodo modificado con MWNT dispersos en PBS

La utilización de un tampón en la dispersión de nanotubos favorece el estudio de la interacción entre diferentes NTC y *ds-DNA*, eliminando el efecto del agente dispersante sobre la respuesta electroquímica del sensor. Con este sistema fue posible evaluar la

concentración de la dispersión y la presencia de diferentes grupos funcionales en el NTC en la generación del biosensor.

a) Estudio de la concentración de *MWNT* en la dispersión

Un primer paso es determinar la concentración de nanotubos en la dispersión que nos permita obtener el mayor valor de corriente. Como se muestra en la figura III.37, se obtiene una señal correspondiente a la oxidación de *ds-ADN* en la zona de 1,0 V. Los valores más altos de corriente se obtuvieron con una concentración de 1 mg/mL (fig. III.37B). Sin embargo la concentración elegida para trabajar fue 0,5 mg/mL, lo que se explica porque a esa concentración de NTC se obtiene un voltamperogramas más definido y con una menor corriente capacitiva (fig. III.37A). La corriente capacitiva hace más difícil la medición de la señal de oxidación de *ds-DNA*, generando, por ejemplo para 4 mg/mL, una señal difícil de cuantificar.

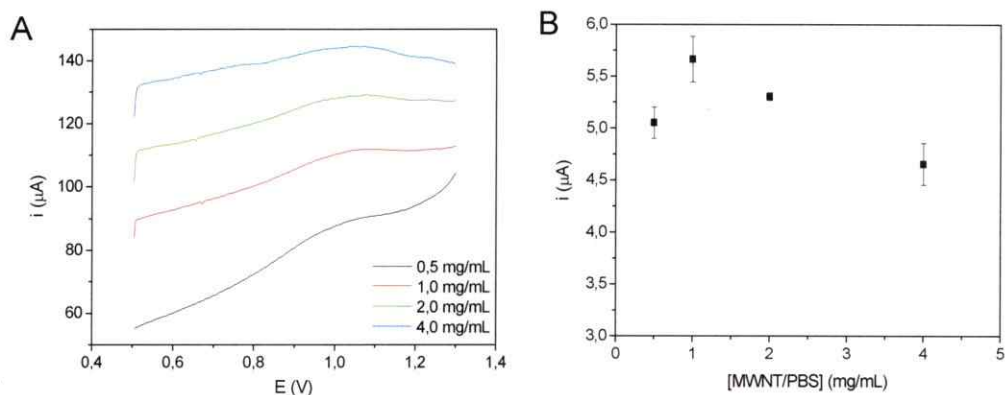


Figura III. 37. (A) Corrientes promedio obtenidas en los voltamperogramas de pulso diferencial para 45 ppm de *ds-DNA*, utilizando diferentes concentraciones de NTC dispersos en PBS 0,2 M pH 7,4. (B) Valores promedio de corrientes obtenidas por VPD versus concentración de la dispersión de *MWNT* en PBS ($t_{\text{acc}} = 5$ min).

Una vez determinada la concentración de los NTC en la dispersión, estudiamos el efecto del tiempo de acumulación de *ds-DNA* sobre el electrodo para todas las muestras.

b) Efecto del tiempo de acumulación de ADN en la respuesta electroquímica del sensor

La fig. III.38 muestra los valores promedio de corriente obtenidos por VPD para la señal de oxidación de las guaninas presentes en *ds-DNA*, cuando se modifica el electrodo de carbono vítreo con dispersiones de NL y NC.

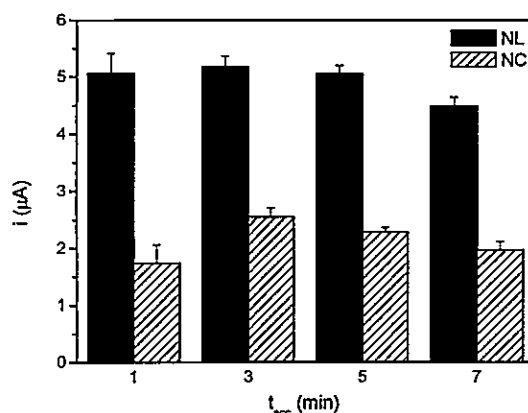


Figura III. 38. Valores de corriente promedio de 45 ppm de *ds-DNA*, en función del t_{acc} para NL y NC dispersos en PBS 0,2 M pH 7,4. Los valores se obtuvieron por VPD y la concentración de la dispersión corresponde a 0,5 mg/mL.

En ambos casos la señal del ADN aparece a potenciales cercanos a 1,0 V y la respuesta en corriente de CV/NL es mayor que la obtenida con los electrodos modificados con NC, lo que estaría relacionado con la mayor superficie disponible de los NL según lo visto por análisis de BET. Este comportamiento se observó a todos los tiempos de acumulación estudiados, donde la señal obtenida con CV/NL es un ~45% mayor que las señales obtenidas por CV/NC. Además, se obtuvo un valor constante de

corriente con el tiempo de acumulación, con una pequeña disminución al $t_{acc} = 7$ min. Este resultado muestra que la acumulación de *ds-DNA* ocurre muy rápidamente y se produciría una saturación de la superficie electrodo.

La oxidación de las guaninas del ADN ocurrió en el caso de CV/NC a un potencial 70 mV menor que la observada con NL, lo que indicaría un leve efecto electrocatalítico de los nanotubos cortos respecto de los largos, debido posiblemente a una mejor transferencia electrónica en el sistema. Por otra parte, mientras más sitios defectuosos tenga la estructura grafitica, mayor es el corrimiento del potencial hacia valores más bajos lo que indicaría que estos sitios son los electroactivamente dominantes para la oxidación de las guaninas [21].

c) Efecto del tiempo de oxidación de NC y NL en la respuesta electroquímica del sensor

Utilizando nanotubos largos se observa una fuerte disminución de la corriente resultante cuando los electrodos son modificados con sus derivados oxidados, NLO3 y NLO6 (fig. III.39A). Con el electrodo CV/NLO3 se observó un máximo de señal a los 3 min de acumulación, pero el valor de corriente obtenido corresponde sólo a un 18,2 % de la obtenida con CV/NL. Cuando la muestra se ha oxidado por 6 h la señal decae a 4,4 %, y desaparece completamente a los 7 min.

Para los estudios realizados con los nanotubos cortos (fig. III.39B) también se observa una pérdida de señal al utilizar las muestras oxidadas. En este caso NCO3 presenta señales más altas que su análogo NLO3, en cambio para las muestras oxidadas por 6 h la señal es casi la misma.

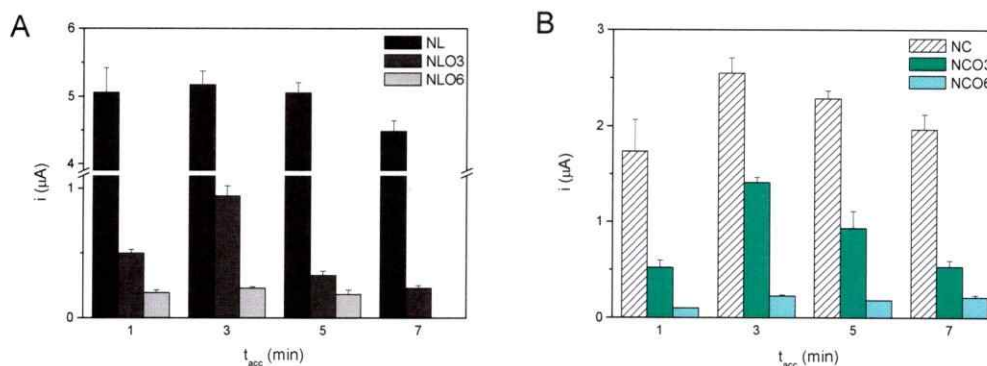


Figura III. 39. Valores de corriente promedio de 45 ppm de *ds-DNA*, en función del t_{acc} para las muestras oxidadas de diferente longitud. (A) NTC largos, (B) NTC cortos, dispersos en PBS 0,2 M pH 7,4 con una concentración de 0,5 mg/mL.

Con la oxidación aumenta la presencia de grupos funcionales, particularmente de grupos carboxílicos, lo que hace que la adsorción del *ds-DNA* probablemente se vea bloqueada sobre el NTC. Este bloqueo podría producirse tanto por una disminución en el área superficial del NTC, como por repulsiones electrostáticas entre los grupos COO^- y los grupos fosfato del *ds-DNA*. Por otra parte, los nanotubos largos oxidados depositados sobre el electrodo formarían agregados, lo que disminuiría el área electroactiva en mayor proporción que los nanotubos cortos oxidados, esto explicaría que NCO3 presente mayores valores de corriente que NLO3.

d) Efecto del grupo funcional en la respuesta electroquímica del sensor. Oxidación y amidación de NC

Para estudiar el efecto del grupo funcional sobre en la adsorción de ADN, se evaluó su respuesta electroquímica utilizando electrodos modificados con las muestras aminadas (NC+3 y NC+6). En la figura III.40 se resumen dichos experimentos comparados con los NC sin modificar.

Las muestras aminadas presentan menores valores de corriente que NC, indicando que la presencia de grupos funcionales disminuye la adsorción directa del *ds-DNA* sobre el nanotubo, tal como se observó para las oxidaciones. Sin embargo, ambas muestras, NC+3 y NC+6, presentan un aumento de la corriente con el tiempo de acumulación, siendo NC+3 la que presenta mayor señal a los 7 min que NC, incluso podría esperarse un aumento de la respuesta si se aumenta aun más el tiempo de oxidación. NC+6 a pesar de tener más grupos cargados positivamente, presenta menos valores de corriente que NC+3, lo que podría estar asociado a la menor área electroactiva que posee comparado con NC+3. Por otra parte, puede atraer moléculas de *ds-DNA* que interacciones con más grupos aminos superficiales, bloqueando la adsorción de otras moléculas de ADN. Esto puede observarse a medida que aumenta el tiempo de acumulación, la cantidad adsorbida por NC+6 aumenta levemente con el tiempo, siendo cada vez mayor la diferencia con NC+3.

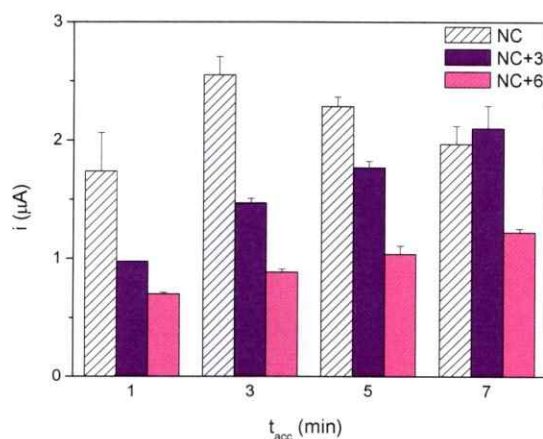


Figura III. 40. Valores promedio de corriente en función del t_{acc} para los sistemas aminados dispersos en PBS 0,2 M pH 7,4 con una concentración de 0,5 mg/mL.

Comparando todas las muestras en la fig. III.41, vemos que para NC y sus derivados oxidados el máximo de corriente se alcanza a un t_{acc} de 3 min, pero con las muestras aminadas la señal aumenta linealmente en todo el intervalo de tiempo estudiado. Estos resultados indican que la adsorción de *ds-DNA* se ve favorecida cuando la muestra funcionalizada presenta cargas positivas en su estructura. Cuando la muestra está oxidada, como NCO3, la presencia de grupos carboxílicos desfavorecería la adsorción de *ds-DNA*, sin embargo cuando este grupo es transformado a un grupo amino, como NC+3, el grupo funcional $-NH_3^+$ favorece la adsorción de *ds-DNA*, incluso superando la adsorción de NC cuando el t_{acc} es de 7 min. (fig. III.41A).

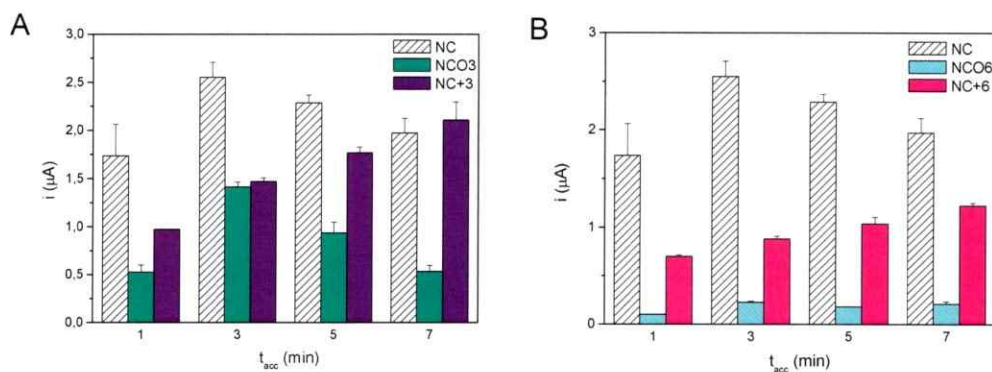


Figura III. 41. Efecto del grupo funcional de NC, en la respuesta electroquímica de *ds-DNA*. La concentración de las dispersiones corresponde a 0,5 mg/mL en PBS 0,2 M a pH 7,4.

e) Reproducibilidad de los electrodos modificados.

En la figura III.42A se observa la respuesta electroquímica de *ds-DNA* sobre un electrodo modificado con NC. Bajo las mejores condiciones de trabajo determinadas en los puntos anteriores (concentración de la dispersión y tiempo de acumulación), se

observa la señal de oxidación de *ds-DNA* para cuatro electrodos diferentes, obteniéndose un coeficiente de variación del 4%, indicando que la medición es reproducible. Por otra parte, como se observa en la fig. III.42B, una vez que el electrodo ha sido utilizado en una primera medición, no es posible reutilizarlo para una segunda adsorción, ya que los valores de corriente caen. Por lo tanto, para cada medición se requiere modificar el electrodo de nuevo.

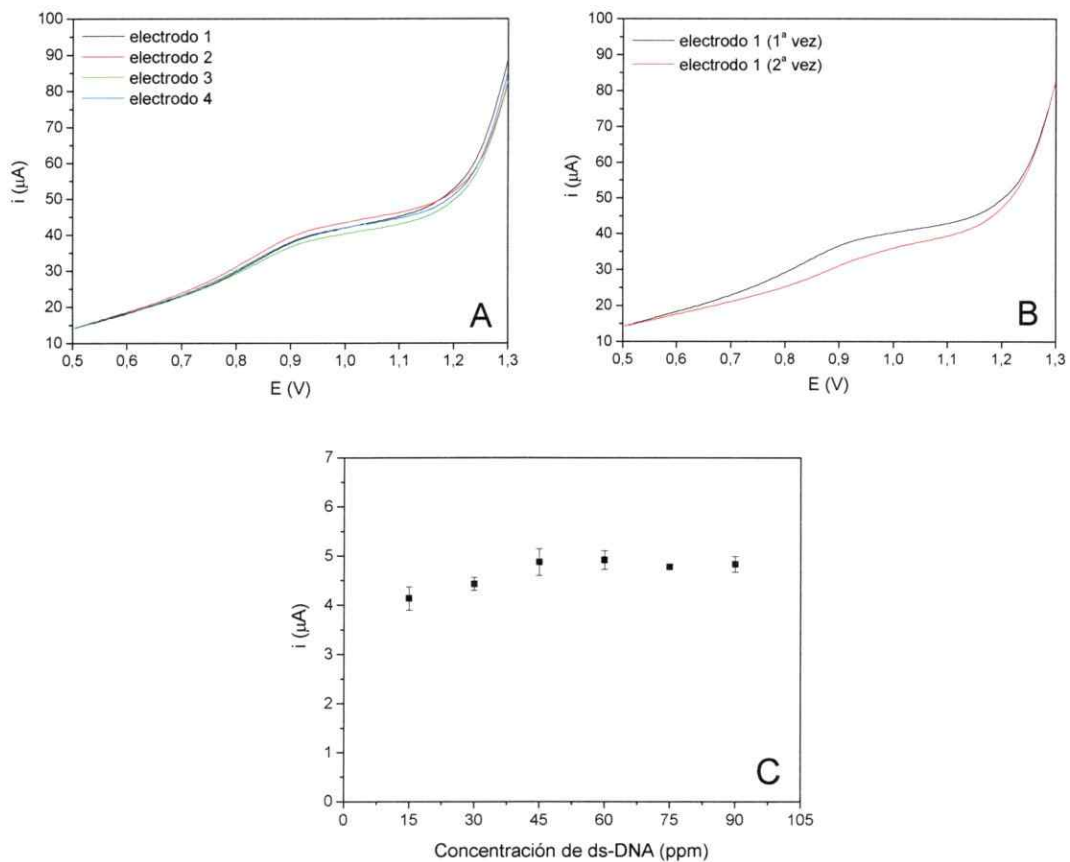


Figura III. 42. (A) Voltamperogramas de pulso diferencial de 45 ppm de *ds-DNA* con diferentes electrodos modificados con NTC/PBS (0,5 mg/mL), en PBS 0,2 M pH 7,4 con t_{acc} de 3min, (B) Voltamperogramas obtenidos con el mismo electrodo reutilizado. (C) Valores de corriente promedio en función de la concentración de *ds-DNA*.

Por último, en la fig. III.42C vemos que la respuesta electroquímica de *ds-DNA* es prácticamente independiente de la concentración utilizada, observándose valores de corriente entre 4 y 5 μA entre 15 y 90 ppm de muestra. Este resultado indicaría que este sistema es eficaz para la detección de ADN, pero no así para su cuantificación.

3.3.3 Electrodo modificado con *MWNT* dispersos en Cloruro de bencetonio.

Uno de los agentes dispersantes seleccionados para comparar la respuesta electroquímica de los NTC modificados fue el surfactante catiónico cloruro de bencetonio (CB). Las dispersiones preparadas mostraron ser homogéneas y estables. Sin embargo, al introducir el electrodo modificado en la celda electroquímica conteniendo ADN para su acumulación, los NTC depositados en su superficie se desprenden haciendo imposible llevar a cabo las mediciones. Por lo tanto, el uso de CB como agente dispersante si bien permite obtener dispersiones estables de NTC, no genera electrodos modificados estables y por ende útiles para construir un genosensor.

3.3.4 Electrodo modificado con *MWNT* dispersos en Quitosano.

El quitosano es un polímero catiónico capaz de interactuar con moléculas que tengan cargas negativas como el *ds-DNA*, mientras los NTC mejoran la transferencia electrónica en comparación al electrodo solo con quitosano. Las dispersiones de NTC con quitosano han mostrado alta estabilidad y capacidad para adsorber ADN una vez que los electrodos son modificados [56]. A continuación se presentan los resultados comparativos para diferentes NTC dispersos en quitosano.

a) Efecto del tiempo de acumulación de *ds-DNA* en la respuesta del sensor

Para determinar si el sistema CV/QUI/NTC adsorbe *ds-DNA* estudiamos el efecto del tiempo de acumulación sobre un electrodo, de esta forma si el *ds-DNA* es adsorbido se observará un aumento de corriente debido a la oxidación de las bases guanina a través del tiempo. En la figura III.43 se observa que la disolución tampón no arroja ninguna señal en todo el potencial aplicado (curva a). Luego de acumular *ds-DNA* por 1 min (curva b), aparece una señal cercana a 1,0 V la cual incrementa en forma lineal con el tiempo (curvas c y d).

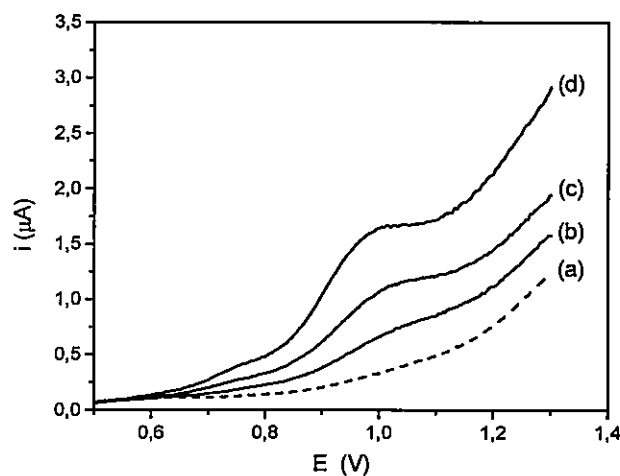


Figura III. 43. Voltamperogramas de pulso diferencial de 45 ppm de *ds-DNA* en electrodos modificados con QUI/NTC (1 mg/mL), el film fue estabilizado con GTA (3% v/v) por 2 s, en tampón formiato 0,2 M pH 5,0 a diferentes tiempos de acumulación: (a) blanco, (b) $t_{\text{acc}} = 1\text{min}$, (c) $t_{\text{acc}} = 3\text{min}$, (d) $t_{\text{acc}} = 5\text{min}$.

Según los resultados obtenidos, el incremento en corriente indica que el electrodo modificado adsorbe *ds-DNA*, obteniendo la mejor señal con un tiempo de acumulación de 5 min. La adsorción de ADN sobre la superficie del electrodo podría asociarse, en primera instancia, a la interacción de éste con los grupos amino del quitosano a través

de interacciones electrostáticas; sin embargo, el uso de glutaraldehído como agente estabilizante del polímero puede jugar un rol importante también en la adsorción [56]. Para estudiar el rol que tienen los NTC en las señales obtenidas en la figura III.43 es que trabajamos con diferentes nanotubos.

b) Efecto de la longitud del NTC en la respuesta electroquímica del sensor

Para estudiar el efecto de la superficie de los NTC en la respuesta del biosensor se utilizaron nanotubos largos (NL) y cortos (NC).

La figura III.44A muestra los voltamperogramas obtenidos por VPD para la señal de oxidación de guanina cuando se modifica el electrodo de carbono vítreo (CV) con NL y NC (t_{acc} de 4 min). En ambos casos se observa una señal a un potencial cercano a 1,0 V, donde la respuesta en corriente de CV/QUI/NL es mayor a los electrodos modificados con NC, tal como se observó para los *MWNT* dispersos en PBS.

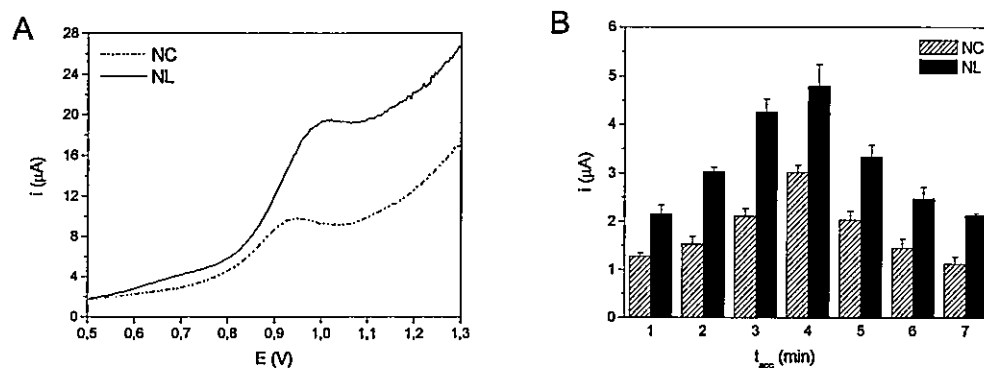


Figura III. 44. (A) Perfiles voltamperométricos de 45 ppm de *ds-DNA* sobre electrodos modificados, con $t_{acc} = 4$ min. El film fue estabilizado con GTA (3% v/v) por 2 s, en tampón formiato 0,2 M pH 5,0. (---) CV/QUI/NC, (—) CV/QUI/NL. (B) Valores promedio de corriente en función del t_{acc} para los sistemas de la figura (A).

Este comportamiento se observó a distintos tiempos de acumulación, donde la señal obtenida con CV/QUI/NL es mayor que CV/QUI/NC en un $\sim 45\%$. La máxima señal de corriente se obtuvo a los 4 min para ambos electrodos (Figura III.44B).

Para CV/QUI/NC se observa que la oxidación de las guaninas ocurre a un potencial aproximadamente 70 mV más bajo que con NL, lo que indica una mejor transferencia electrónica en el sistema para los nanotubos cortos.

c) Efecto de la oxidación de NTC en la respuesta electroquímica del sensor

La figura III.45A muestra las señales obtenidas por VPD para las muestras comerciales largas y cortas, oxidadas por 3 h.

Los NTC de mayor longitud presentan señales de corriente mayores que para los NTC cortos. A distintos tiempos de acumulación las señales de CV/QUI/NLO3 superaron a los CV/QUI/NCO3 en un 40%, con un máximo de señal a un t_{acc} de 5 min (figura III.44B). En la figura III.45A además se observa un desplazamiento en el potencial para CV/QUI/NLO3 hacia valores más negativos.

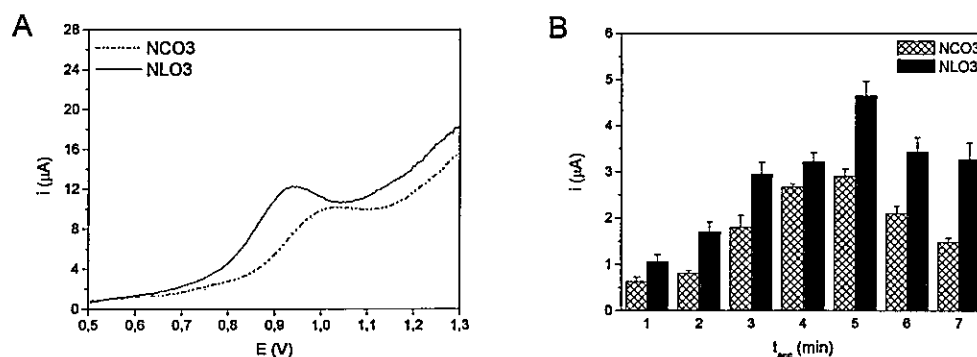


Figura III. 45. (A) Perfiles voltamperométricos de 45 ppm de *ds-DNA* sobre electrodos modificados con muestras oxidadas por 3 h, $t_{acc} = 5$ min. El film fue estabilizado con GTA (3% v/v) por 2 s, en tampón formiato 0,2 M pH 5,0. (---) CV/QUI/NCO3, (—) CV/QUI/NLO3. (B) Valores promedio de corriente en función del t_{acc} para los sistemas de la figura (A).

Comparando estos resultados con los mostrados en la figura III.44, la intensidad de corriente disminuye con el tratamiento oxidativo, tanto para las muestras cortas como largas. Esto podría explicarse debido a dos efectos: (1) primero, los grupos $-\text{COO}^-$ introducidos con el proceso de oxidación interaccionarían con las cargas positivas del quitosano mejorando la dispersión de los NTC, pero disminuyendo la contribución electrostática del quitosano en la adsorción de *ds-DNA*. (2) El segundo efecto estaría dado por la disminución del área superficial de las muestras con el proceso de oxidación (observado por análisis BET), lo que dejaría menos superficie disponible para la adsorción de *ds-DNA*.

Con 6 h de tratamiento oxidativo (fig. III.46), los NTC presentan más grupos $-\text{COOH}$ en su superficie, los que neutralizarían más el film de quitosano y además podrían impedir la adsorción de *ds-DNA* por repulsión electrostática.

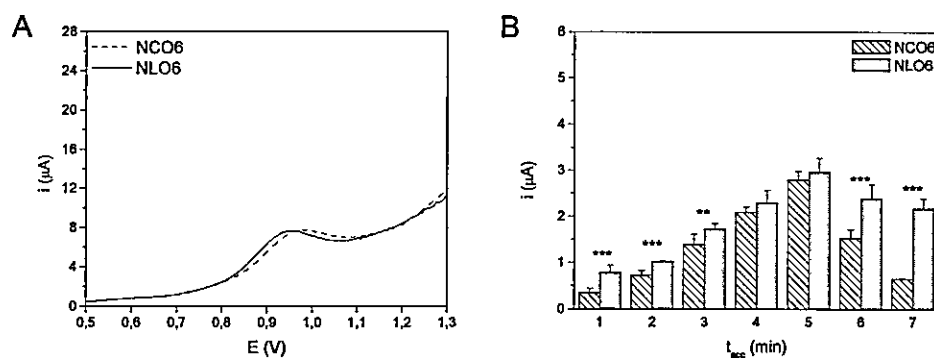


Figura III. 46. (A) Perfiles voltamperométricos de 45 ppm de *ds-DNA* sobre electrodos modificados con muestras oxidadas por 6 h, $t_{\text{acc}} = 5$ min. El *film* fue estabilizado con GTA (3% v/v) por 2 s, en tampón formiato 0,2 M pH 5,0. (---) CV/QUI/NCO6, (—) CV/QUI/NLO6. (B) Valores promedio de corriente en función del t_{acc} para los sistemas de la figura (A). El análisis estadístico corresponde al *Test de Student*: (***) $p_{\text{value}} < 0,001$, (**) $p_{\text{value}} < 0,01$.

Adicionalmente, estas muestras presentan menor superficie que las oxidadas por 3 h, lo que también estaría disminuyendo la adsorción de *ds-DNA*. La intensidad de corriente sigue siendo mayor para los electrodos modificados con los nanotubos largos, pero en este caso sólo superan a los de menor longitud por un 25%.

Como se observa en los voltamperogramas de la figura III.46, los valores de corriente disminuyen al aumentar el tiempo de oxidación de los nanotubos a 6 h, lo que puede asociarse a que se introducirían más grupos funcionales a las paredes de los NTC, desfavoreciendo la adsorción de *ds-DNA* sobre el electrodo CV modificado.

En la tabla III.10 se resumen los valores obtenidos de los distintos electrodos modificados con NTC cortos (NC) y largos (NL), y oxidados a distintos tiempos. Como se observa, con el tiempo de oxidación los valores de corriente obtenidos disminuyen tanto para NC como para NL. La incorporación de grupos $-COOH$ a los nanotubos dificultaría la adsorción de *ds-DNA*, ya sea por la neutralización del film, disminuyendo los puntos de atracción entre quitosano y *ds-DNA*, o por repulsión electrostática de las cargas negativas de los nanotubos con las cargas negativas de los grupos fosfato de *ds-DNA*.

Tabla III. 10. Valores promedio de i_p y E_p para la señal de oxidación de guanina, obtenida con electrodos modificados.

t_{oxid} (hrs.)	NC		NL	
	E_p (V)	i_p (μA)	E_p (V)	i_p (μA)
0	927 \pm 4	3,01 \pm 0,16	1024 \pm 74	4,79 \pm 0,44
3	968 \pm 14	2,67 \pm 0,07	929 \pm 6	3,22 \pm 0,19
6	964 \pm 6	2,09 \pm 0,12	932 \pm 4	2,29 \pm 0,27

Adicionalmente se hizo un estudio estadístico a todas las muestras, encontrando para las muestras comerciales (NC y NL) y oxidadas por 3 h (NCO3) un $p_{\text{value}} < 0,001$, lo que indica que todos los valores obtenidos son estadísticamente diferentes. Para las muestras oxidadas por 6 h, y con un tiempo de acumulación de 4 y 5 minutos, se obtuvo un $p_{\text{value}} > 0,05$ por lo que ambas muestras NCO6 y NLO6 no presentan diferencias significativas en los valores de corriente obtenidos.

El coeficiente de variación para todas las muestras no superó el 10%, valor aceptado para este tipo de modificaciones.

d) Efecto de la amidación de NCO3 y NCO6 sobre la respuesta electroquímica del sensor

Como se observa en la figura III.47, a diferencia de lo observado para las muestras comerciales y oxidadas, el blanco presenta una señal cercana a 0,7 V. Al realizar la adsorción de *ds-DNA* a diferentes tiempos de acumulación no se observa la aparición de la señal de oxidación de las guaninas en la zona de 1,0 V, sólo se insinúa a los tiempos de acumulación más altos (5 y 7 min.). La señal del blanco se mantiene en todos los experimentos realizados.

Esta señal del blanco podría estar asociada a la oxidación del electrolito soporte, lo que también ha sido observado para *MWNT* dispersos en polietilenimina (PEI), que es un polímero catiónico con grupos $-\text{NH}_3^+$ [115]. Por otra parte, los grupos amino del quitosano y de los NTC aminados, podrían estar bloqueados por su interacción con glutaraldehído, lo que impediría la adsorción de *ds-DNA*.

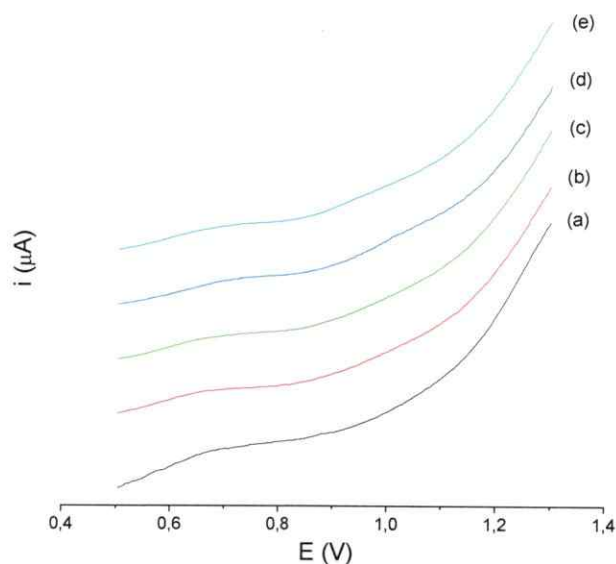


Figura III. 47. Voltamperogramas de pulso diferencial para electrodos modificados con dispersiones 1 mg/mL de NTC aminados, a diferentes tiempos de acumulaci3n de 45 ppm de *ds-DNA*. El *film* fue estabilizado con GTA, en tamp3n formiato 0,2 M pH 5,0. (a) blanco, (b) $t_{acc} = 1$ min, (c) $t_{acc} = 3$ min, (d) $t_{acc} = 5$ min, (e) $t_{acc} = 7$ min.

f) Reproducibilidad de los electrodos modificados.

En la figura III.48A se observa la respuesta electroquímica de ADN sobre un electrodo modificado con NC disperso en quitosano. Tal como se hizo para la muestra dispersa en PBS (secci3n 3.3.2 e), se tomaron las mejores condiciones de trabajo determinadas en los puntos anteriores (concentraci3n de la dispersi3n y tiempo de acumulaci3n), observándose la seña de oxidaci3n de *ds-DNA* para tres electrodos diferentes con un coeficiente de variaci3n de la medici3n de un 4%, indicando que la medici3n es reproducible.

Por otra parte (fig. III.48B) una vez que el electrodo ha sido medido no es posible reutilizarlo para una posterior adsorci3n, ya que los valores de corriente caen. Por lo tanto, para cada medici3n se requiere modificar el electrodo de nuevo, tal como se

debe hacer para las dispersiones con PBS. Por último, en la fig. III.48C vemos que cuando el electrodo es modificado con una dispersión de NTC/QUI la respuesta electroquímica de *ds-DNA* es dependiente de la concentración utilizada, a diferencia de lo obtenido con NTC/PBS, observándose un aumento de los valores de corriente con la concentración hasta alcanzar un máximo en 75 ppm.

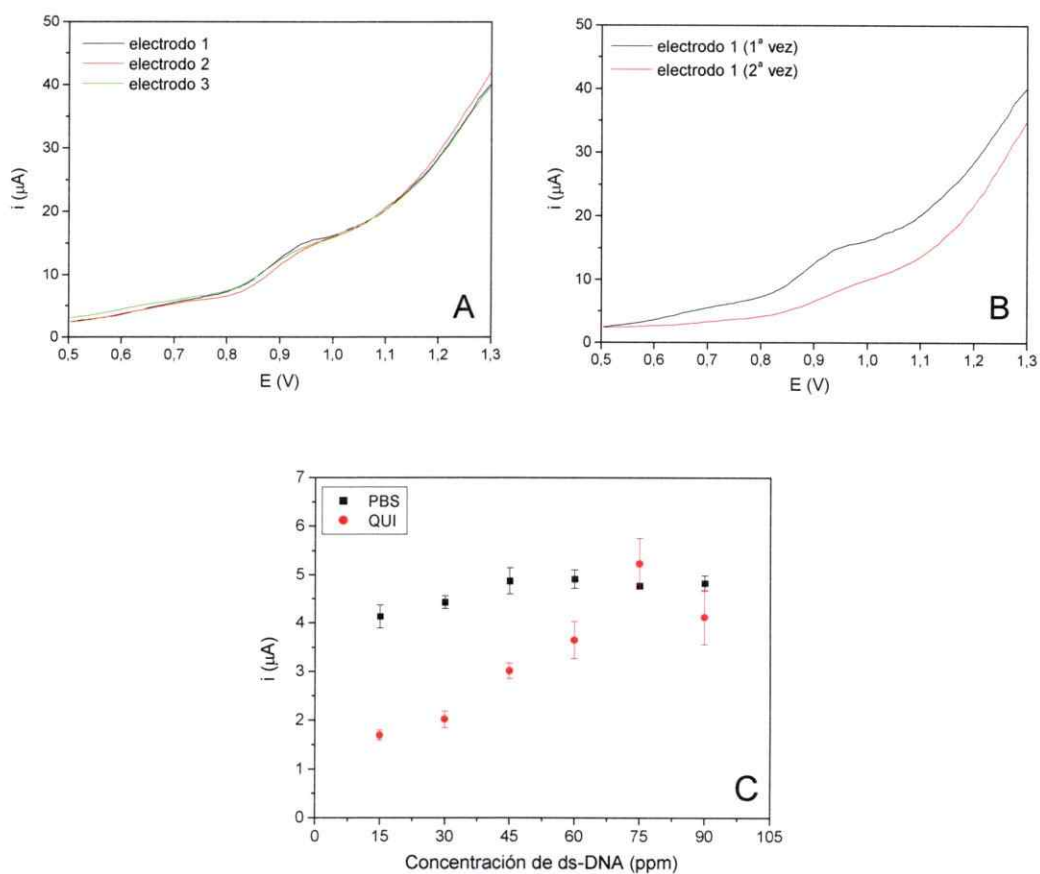


Figura III. 48. (A) Voltamperogramas de pulso diferencial de 45 ppm de *ds-DNA* con diferentes electrodos modificados con NTC/QUI (1 mg/mL), en tampón formiato 0,2 M pH 5,0 con t_{acc} de 4 min. El *film* fue estabilizado con GTA 3% v/v por 2 s. (B) Voltamperogramas obtenidos con el mismo electrodo reutilizado. (C) Valores de corriente promedio en función de la concentración de *ds-DNA*, para NTC dispersos en quitosano (QUI) y tampón fosfato (PBS) en las condiciones óptimas de cada sistema.

Estos resultados muestran que el uso de un polímero como agente dispersante disminuye las propiedades intrínsecas de los NTC, ya que la respuesta electroquímica del sistema es menor que la obtenida con PBS, pero que la señal es dependiente de la concentración de *ds-DNA* lo que permitiría una aplicación cuantitativa.

**SEGUNDA PARTE: Funcionalización de MWNT con
ADN y su aplicación en biosensores de hibridación**

3.4 FUNCIONALIZACION DE MWNT CON ADN

Las funcionalizaciones realizadas a los nanotubos y su completa caracterización tienen como objetivo final incorporar ADN a la nanoestructura, para ampliar su aplicación a biosensores de hibridación.

El ADN puede unirse a las paredes del NTC en forma covalente y/o no covalente, siendo difícil hasta el momento poder diferenciar entre ambas interacciones y determinar cuál de ellas predomina. Para comparar estos sistemas se funcionalizaron NTC con un oligonucleótido de una hebra 5'-CTC-GAT-GAC-TCA-ATG-ACT-CG-3' (ss-ODN) por los dos métodos, covalente y no covalente o adsorción y se analizaron las muestras mediante espectroscopía UV-visible y técnicas electroquímicas.

3.4.1 Curva de calibración de ss-ODN

Siguiendo la banda de absorción característica del ADN a 260 nm [110] se realizó un estudio con la concentración del ss-ODN (figura III.49).

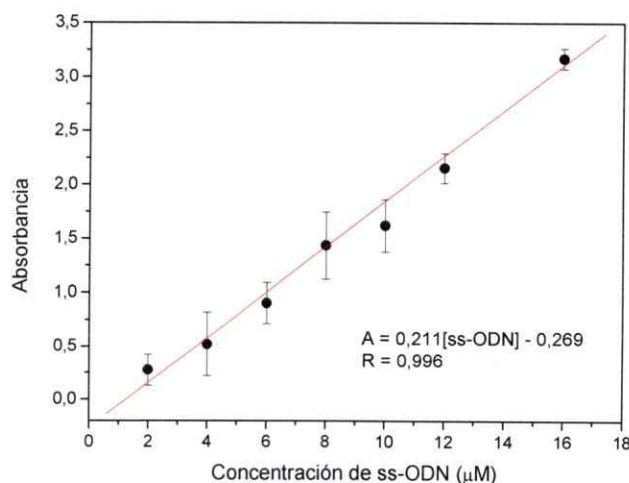


Figura III. 49. Curva de calibración para el oligonucleótido en PBS 10 mM pH 7,4. Cada medición fue obtenida con el promedio de tres disoluciones preparadas en forma independiente.

El rango de concentración utilizado fue de 2 a 32 μM , obteniéndose un comportamiento lineal hasta 16 μM .

3.4.2 Isotermas de adsorción de ss-ODN

Como se determinó en la primera parte de los resultados, de las muestras oxidadas con mezcla sulfo-nítrica la que presenta mayor cantidad de grupos carboxílicos es NLO6, por lo tanto, se decidió utilizar esta muestra para funcionalizarla con el oligonucleótido.

Se llevaron a cabo dos tipos de funcionalizaciones: (1) Funcionalización covalente del NTC con ss-ODN a través de la formación de un enlace amida ($\text{MWNT/ss-ODN}_{\text{COV}}$) y (2) Funcionalización no covalente, donde el ss-ODN es adsorbido sobre la superficie del NTC ($\text{MWNT/ss-ODN}_{\text{ADS}}$). Para ambas funcionalizaciones se utilizaron diferentes concentraciones del oligonucleótido y los resultados se presentan como isotermas de adsorción en la figura III.50.

Cuando la funcionalización es covalente ($\text{MWNT/ss-ODN}_{\text{COV}}$) se observa que la superficie del nanotubo es rápidamente saturada alcanzando un valor constante de 0,2 mmol/g. Esto da cuenta de que la incorporación de ss-ODN al nanotubo se debe principalmente a la funcionalización de los grupos carboxílicos disponibles, y que la adsorción del oligonucleótido ocurre en concentraciones muy pequeñas. Por otra parte, cuando el oligonucleótido se adsorbe sobre el nanotubo ($\text{MWNT/ss-ODN}_{\text{ADS}}$), la cantidad incorporada aumenta hasta alcanzar un valor constante cercano a 2 mmol/g. Estos resultados indicarían que cuando no se activan los grupos $-\text{COOH}$ para la unión covalente (esquema II.3), se favorecería la adsorción del ss-ODN sobre las paredes del nanotubo. Esto ocurriría a través de interacciones de tipo Van der Waals entre las

bases nitrogenadas de la cadena del oligonucleótido y el nanotubo, independiente de la presencia de grupos funcionales en el nanotubo.

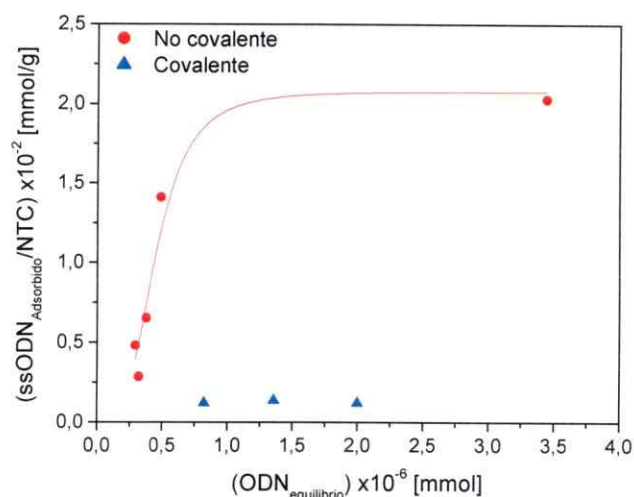


Figura III. 50. Isotermas de adsorción de las funcionalizaciones covalente y no covalente (o de adsorción) de NTC con ss-ODN. Concentraciones de ss-ODN utilizadas: 3,9 – 5,9 – 7,9 – 16 y 32 μ M, en PBS 10 mM pH 7,4. Tiempo de incubación: 24 h.

En disolución acuosa, los *MWNT* inducirían un cambio conformacional de la cadena de ss-ODN, lo que permitiría una adsorción vía interacción de tipo π - π . Esta interacción sería igual para cualquier cadena de ss-ODN, y debido a la flexibilidad de la misma se observarían diferentes conformaciones sobre los NTC, incluyendo enrollamientos en diferentes direcciones, formaciones de “loops” [46] y agregados desordenados sobre la superficie [116]. Estos complejos NTC-ODN se han observado a través de imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica (AFM) [117] y microscopía electrónica de transmisión (TEM) [118].

Por otra parte, al activar los grupos carboxílicos, se favorecería la unión covalente del oligonucleótido y la cantidad incorporada dependería solamente de la cantidad de grupos carboxílicos activados.

En ambos casos se observa una isoterma de tipo L (Langmuir), donde este comportamiento es más claro para MWNT/ss-ODN_{ADS}. Para este tipo de sistemas la adsorción ocurre en superficies planas, homogéneas, la adsorción es reversible y no hay interacción entre las moléculas del adsorbato, es decir, la molécula adsorbida se comporta de forma ideal [119].

3.4.3 Electrodo modificado con dispersiones de MWNT/ss-ODN

Se modificaron electrodos de carbono vítreo con dispersiones acuosas de MWNT funcionalizados con ss-ODN. Estos electrodos se caracterizaron con diferentes técnicas electroquímicas para estudiar si el tipo de funcionalización puede condicionar la respuesta del biosensor.

a) Voltamperometría de pulso diferencial (VPD)

En la figura III.51 se observa que al aplicar un barrido de potencial a los electrodos modificados aparece una señal de oxidación a un potencial cercano a 1,0 V usando MWNT/ss-ODN_{COV} como MWNT/ss-ODN_{ADS}.

La señal a 1,0 V no aparece cuando el electrodo es modificado con MWNT_{COOH}, lo que nos indica que la señal observada correspondería a la oxidación de las bases guaninas que se encuentran en el oligonucleótido, pero no en el nanotubo oxidado sin funcionalizar.

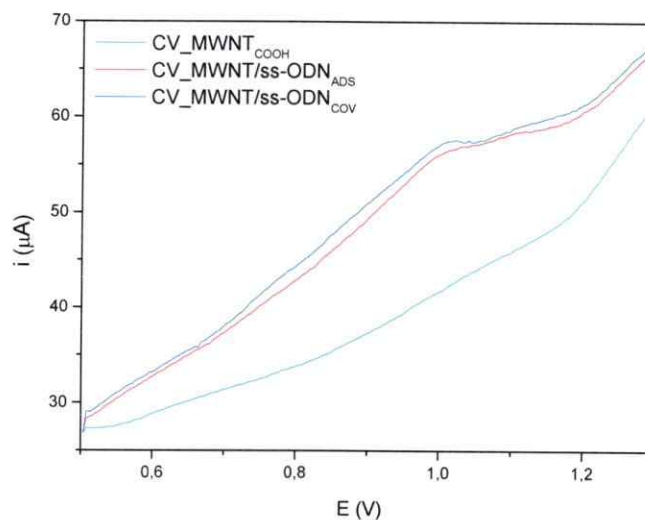


Figura III. 51. Respuesta electroquímica de electrodos modificados con dispersiones de $\text{MWNT}_{\text{COOH}}$, $\text{MWNT/ss-ODN}_{\text{COV}}$ y $\text{MWNT/ss-ODN}_{\text{ADS}}$ en tampón acetato 0,2 M a pH 5,0. Dispersiones preparadas a 1 mg/mL. Concentración de ss-ODN para funcionalizar los MWNT: 7,9 μM .

- Efecto de la concentración de la dispersión sobre el electrodo

Utilizando la señal de oxidación de las guaninas del ss-ODN observada en la fig. III.51, es posible estudiar la respuesta electroquímica del sensor en función de la concentración de MWNT/ss-ODN en la dispersión. Los resultados se muestran en la figura III.52.

De la figura se observa que existe un aumento de la señal cercano al 80% al cambiar la concentración de la dispersión de 0,5 a 1,0 mg/mL. A mayores concentraciones no se observa un aumento de la corriente, incluso a 4,0 mg/mL la señal decae a valores cercanos a los obtenidos utilizando la menor concentración. A partir de estos resultados, se seleccionó 1,0 mg/mL como concentración óptima para

los experimentos posteriores, ya que con ella se obtuvo el valor de corriente más alto y con menor desviación estándar.

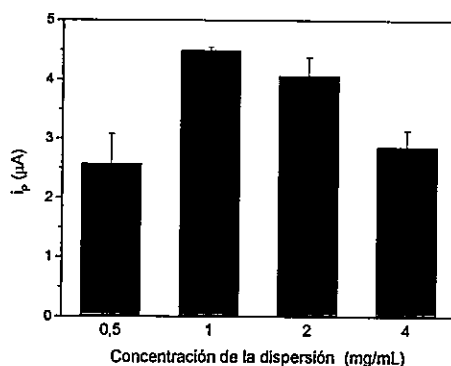


Figura III. 52. Estudio de la concentración de la dispersión de MWNT/ss-ODN_{ADS} en tampón acetato 0,2 M a pH 5,0. MWNT/ss-ODN funcionalizados con una concentración de ODN de 7,9 μM . Cada medición fue obtenida con el promedio de cuatro electrodos.

- Efecto de la concentración de ss-ODN en la funcionalización de MWNT

La respuesta electroquímica de los electrodos modificados utilizando MWNT funcionalizados con diferentes concentraciones de ss-ODN (MWNT/ss-ODN_{ADS}) se presenta en la figura III.53.

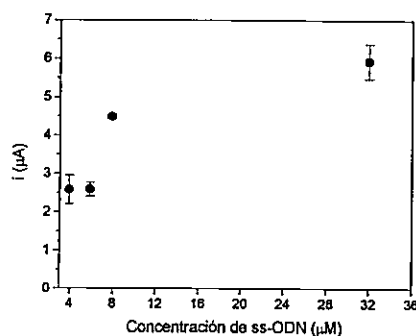


Figura III. 53. Respuesta electroquímica de MWNT funcionalizados con diferentes concentraciones de ss-ODN por adsorción: 3,9 – 5,9 – 7,9 y 32 μM . Dispersiones preparadas en tampón acetato 0,2 M a pH 5,0 a una concentración de 1 mg/mL. Técnica utilizada: VPD. Cada medición fue obtenida con el promedio de cuatro electrodos.

La gráfica muestra un aumento de la corriente con la concentración de ss-ODN utilizada para modificar el MWNT. Esto indicaría que al aumentar la cantidad del oligonucleótido en solución, mayor es la cantidad adsorbida sobre el NTC y, por lo tanto, mayor la respuesta electroquímica producto de la cantidad de guaninas disponibles para ser oxidadas, lo que está de acuerdo con la isoterma de adsorción presentada en la figura III.50.

A modo de comparación, se llevó a cabo el mismo experimento pero utilizando MWNT/ss-ODN_{COV}. En la figura III.54 se presentan los resultados obtenidos con ambos tipos de funcionalizaciones, observándose que para ambas hay un aumento de la corriente con la concentración de oligonucleótido y que las respuestas electroquímicas son similares.

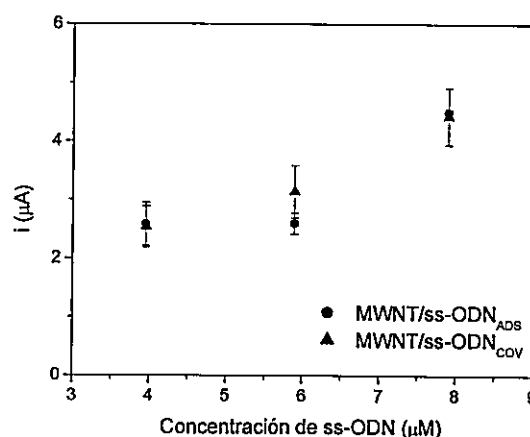


Figura III. 54. Comparación de funcionalizaciones covalente y no covalente de NTC con ss-ODN a través de VPD. Concentración de las dispersiones: 1 mg/mL en tampón acetato 0,2 M a pH 5,0. Cada medición fue obtenida con el promedio de cuatro electrodos.

En conclusión, por esta técnica electroquímica fue posible detectar la presencia de ss-ODN en el NTC, pero no fue posible diferenciar entre la unión covalente y la adsorción de ss-ODN sobre los nanotubos de carbono. Según lo observado en la

gráfica III.54, la cantidad de ss-ODN en los *MWNT* funcionalizados sería la misma, pero no podemos diferenciar en qué forma se encuentra sobre la superficie. Sólo se puede evidenciar que cuando el ss-ODN está unido covalentemente la desviación estándar asociada a las mediciones es mayor.

b) Voltamperometría cíclica en PBS

En la figura III.55 se presenta el perfil ciclo voltamperométrico de electrodos modificados con $MWNT_{COOH}$, $MWNT/ss-ODN_{COV}$ y $MWNT/ss-ODN_{ADS}$, comparados con el electrodo sin modificar (CV).

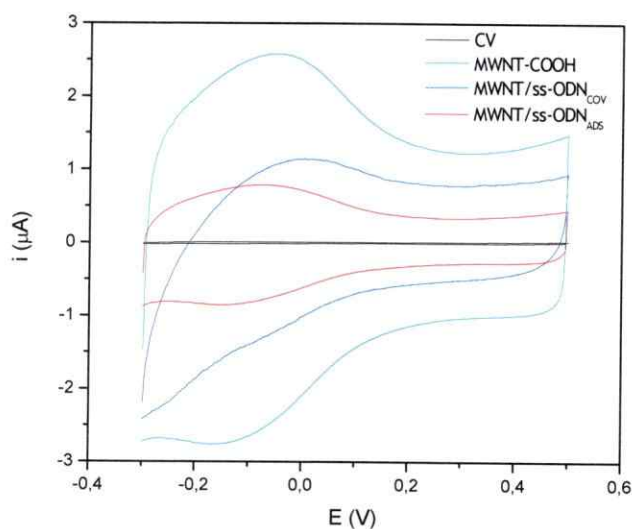


Figura III. 55. Voltamperogramas cíclicos del electrodo solo (CV) y modificado con las dispersiones de $MWNT_{COOH}$, $MWNT/ss-ODN_{COV}$ y $MWNT/ss-ODN_{ADS}$ en PBS 10 mM con NaCl 0,1 M a pH 7,4. Concentración de la dispersión: 1 mg/mL. *MWNT* funcionalizados con una concentración de ss-ODN de 7,9 μ M. Velocidad de barrido: 50 mV/s.

Se observa que el electrodo de carbono vítreo no presenta ninguna señal electroquímica en todo el rango de potencial aplicado y además tiene una respuesta capacitiva muy baja. Cuando modificamos la superficie del electrodo con $MWNT_{COOH}$ observamos un aumento de la corriente de fondo o capacitiva, lo que implica un aumento del área superficial del electrodo. Además, al utilizar estos $MWNT$ se observa un pico anódico y uno catódico asociados a la reacción redox de los ácidos carboxílicos [106].

Cuando se utiliza $MWNT/ss-ODN_{ADS}$, observamos una disminución en la corriente de los picos asociados a los grupos $-COOH$, sin un desplazamiento de potenciales. Este comportamiento indicaría que al estar el $ss-ODN$ adsorbido sobre el $MWNT$, la superficie del nanotubo expuesta a la solución disminuye, lo que afecta la cantidad de grupos carboxílicos disponibles para sufrir un proceso redox; sin embargo, los que sí se encuentran disponibles lo hacen sin cambios energéticos o cinéticos, ya que los potenciales observados no sufren cambios.

Cuando se modifica el electrodo con $MWNT/ss-ODN_{COV}$, se observa una disminución de la corriente, pero además un claro desplazamiento de la señal hacia potenciales más positivos (en ~ 100 mV) y una casi pérdida de la reversibilidad en el barrido de vuelta. Esta diferencia, con respecto a $MWNT/ss-ODN_{ADS}$, se debería a que la unión covalente del oligonucleótido a través de un enlace amida al $MWNT$, disminuye la cantidad de grupos carboxílicos para ser reducidos, y los grupos que quedan disponibles estarían impedidos para este proceso por la presencia del $ss-ODN$.

En conclusión, por voltamperometría cíclica es posible observar una diferencia en la respuesta de los grupos carboxílicos presentes en el $MWNT$, lo que permitiría diferenciar las conformaciones que adopta el $ss-ODN$ sobre la nanoestructura al utilizar diferentes métodos de modificación.

c) Voltamperometría cíclica utilizando un mediador redox

Si el oligonucleótido adopta diferentes conformaciones sobre el *MWNT* según el tipo de funcionalización, la respuesta del electrodo frente a un mediador redox determinado debería ser diferente dependiendo si favorece o no la transferencia electrónica. Para esto realizamos voltamperogramas cíclicos utilizando el mediador redox ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$) (fig. III.56).

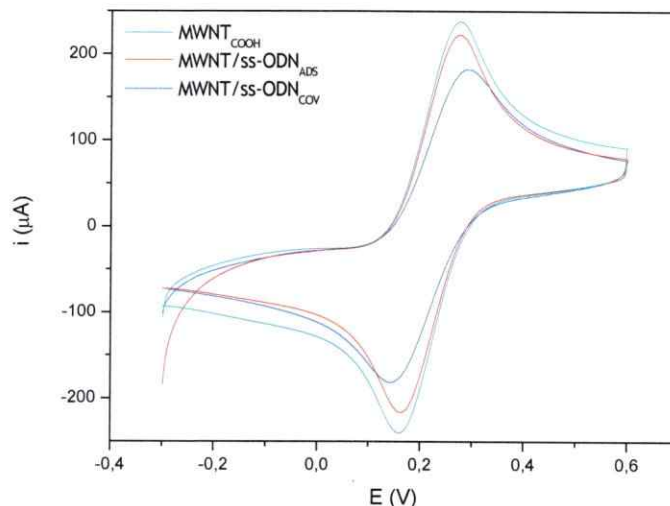


Figura III. 56. Voltamperometrías cíclicas de ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$) para dispersiones de $\text{MWNT}_{\text{COOH}}$, $\text{MWNT}/\text{ss-ODN}_{\text{COV}}$ y $\text{MWNT}/\text{ss-ODN}_{\text{ADS}}$ en PBS 10 mM con NaCl 0,1 M a pH 7,4. Concentración de la dispersión: 1 mg/mL. *MWNT* funcionalizados con una concentración de ss-ODN de 7,9 μM . Velocidad de barrido de: 50 mV/s.

Los voltamperogramas cíclicos muestran diferentes comportamientos según el tipo de funcionalización que se realizó con la nanoestructura. Para $\text{MWNT}/\text{ss-ODN}_{\text{ADS}}$ el par redox presenta potenciales de pico similares a los obtenidos cuando se utiliza el electrodo modificado con $\text{MWNT}_{\text{COOH}}$, pero la intensidad de corriente disminuye levemente. Estos resultados están en concordancia con lo observado en la figura III.55,

donde el ss-ODN al estar adsorbido se encontraría sobre el nanotubo disminuyendo el área superficial electroactiva, pero no interferiría en la cinética de la transferencia electrónica entre el mediador redox y el electrodo.

Por otro lado, cuando la unión es covalente (MWNT/ss-ODN_{COV}) el voltamperograma del par redox pierde reversibilidad en comparación a las muestras con MWNT_{COOH} aumentando su ΔE_p desde 117 mV a 150 mV. La intensidad de corriente disminuye en mayor proporción que con ss-ODN_{ADS} lo que podría deberse a una menor accesibilidad del mediador redox a la superficie del electrodo producto de una diferente conformación adoptadas por las cadenas de ss-ODN al estar unidas en forma covalente.

En conclusión, la modificación covalente del MWNT con el oligonucleótido desfavorecería la transferencia electrónica del mediador, probablemente por una disminución en su accesibilidad hacia el electrodo.

d) Microscopía de barrido electroquímico (SECM)

Con esta técnica se observaron los cambios en la superficie del electrodo al modificarlo con los diferentes nanotubos funcionalizados.

La fig. III.57 muestra las imágenes correspondientes al electrodo sin modificar. A la izquierda se muestra la imagen en 2D y a la derecha, en 3D. Como se esperaba de acuerdo a la literatura [56] la superficie es homogénea y los valores de corrientes I_T fueron 1,25 veces la i_{∞} .

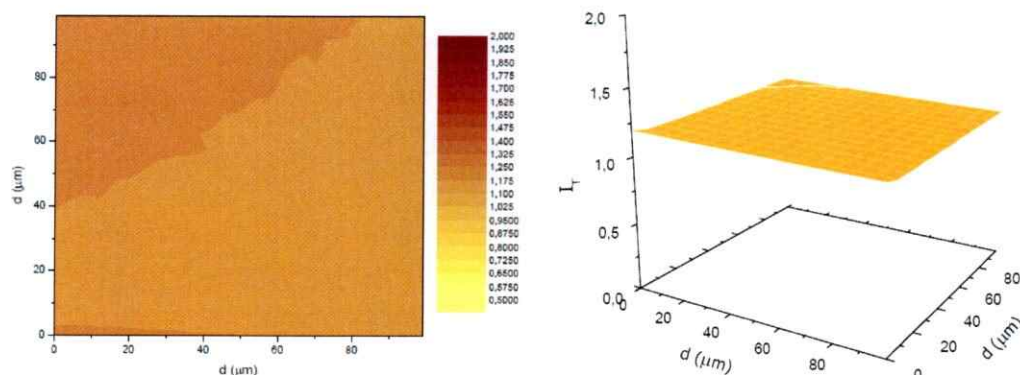


Figura III. 57. Imágenes SECM (2D y 3D) para electrodo de carbono vítreo sin modificar en modo *feedback*. Mediador redox: FcOH 10 mM en PBS 0,2 M pH 7,4. Velocidad de adquisición: 1 $\mu\text{m/s}$.

Al evaluar la superficie modificada con $\text{MWNT}_{\text{COOH}}$ (fig. III.58) sobre la superficie del electrodo se observan zonas de alta y baja conductividad dando cuenta de una superficie no homogénea, probablemente debido a la formación de agregados de *MWNT*.

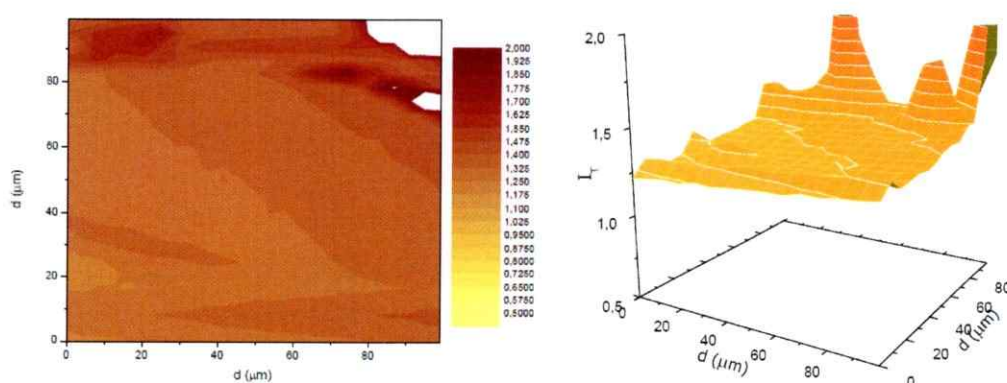


Figura III. 58. Imágenes SECM (2D y 3D) para $\text{MWNT}_{\text{COOH}}$ en modo *feedback*. Mediador redox: FcOH 10 mM en PBS 0,2 M pH 7,4. Velocidad de adquisición: 1 $\mu\text{m/s}$.

Cuando los $\text{MWNT}_{\text{COOH}}$ fueron funcionalizados covalentemente con ss-ODN se obtuvo una superficie bastante más homogénea, lo que indica que hay una considerable disminución en la formación de agregados (fig. III.59). Esto se explicaría por una mejor dispersabilidad debido a la presencia del oligonucleótido.

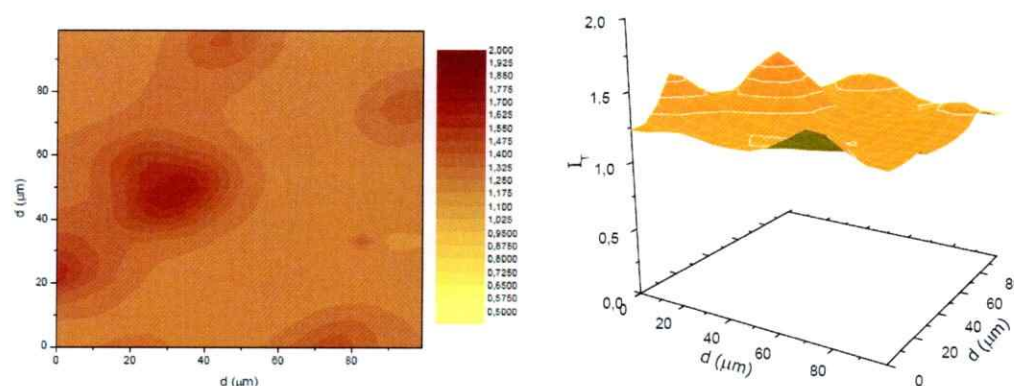


Figura III. 59. Imágenes SECM (2D y 3D) para $\text{MWNT}/\text{ss-ODN}_{\text{COV}}$ en modo *feedback*. Mediador redox: FcOH 10 mM en PBS 0,2 M pH 7,4. Velocidad de adquisición: 1 $\mu\text{m}/\text{s}$.

A pesar de que se observa una leve disminución en los valores de corriente, comparado con el electrodo de carbono vítreo sin modificar, de igual manera no se bloquea la transferencia electrónica, lo que coincide con lo observado en los voltamperogramas cíclicos de la figura III.56.

La figura III.60 muestra las imágenes obtenidas cuando los *MWNT* son funcionalizados en forma no covalente con ss-ODN. En este caso se observa una superficie completamente homogénea, similar al electrodo sin modificar (fig. III.57), pero con valores de corriente inferiores, disminuyendo de 1,25 a valores cercanos a 1,00. Al estar el ss-ODN adsorbido en el nanotubo se cubriría mejor la superficie de éste, permitiendo una mejor dispersión entre ellos ya que se mejora la interacción con el disolvente. Los valores de corriente levemente menores son concordantes con lo

observado en los voltamperogramas cíclicos, lo que podría deberse a la disposición espacial del ss-ODN sobre el nanotubo.

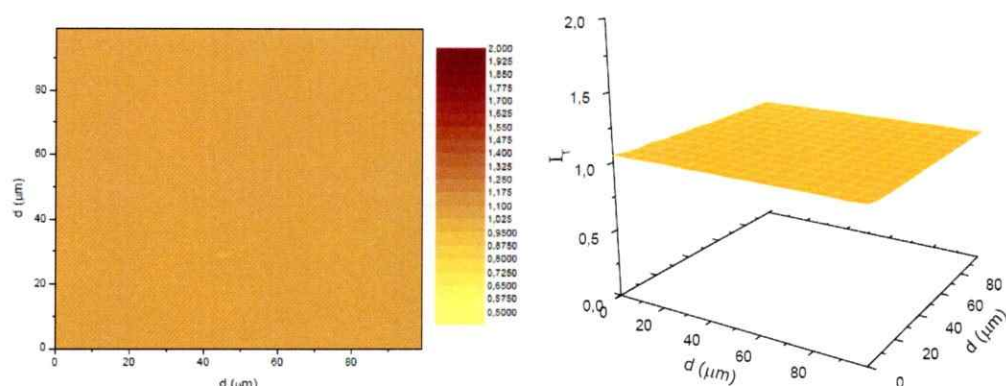


Figura III. 60. Imágenes SECM (2D y 3D) para MWNT/ss-ODN_{ADS} en modo *feedback*. Mediador redox: FcOH 10 mM en PBS 0,2 M pH 7,4. Velocidad de adquisición: 1 $\mu\text{m/s}$.

A partir de los resultados obtenidos, en la figura III.61, se muestran las posibles conformaciones del oligonucleótido para ambas funcionalizaciones. En ambos casos la conformación de ss-ODN sería diferente. Cuando se adsorbe sobre la superficie (fig. III.61A) lo haría de forma desordenada, adoptando una estructura que permita la interacción de las bases con las paredes del nanotubo. Por otra parte, cuando ss-ODN se une covalentemente al nanotubo (fig. III.61B), la cantidad de oligonucleótido unido es menor, debido a que depende de la cantidad y disponibilidad de los grupos $-\text{COOH}$. La unión covalente permitiría cierta flexibilidad a la cadena, por lo que su conformación sobre el nanotubo estará dada por su entorno, y no formaría estructuras ordenadas.

A



B



Figura III. 61. Posibles conformaciones de ss-ODN al funcionalizar *MWNT* mediante: (A) adsorción ($MWNT/ss-ODN_{ADS}$) y (B) unión covalente ($MWNT/ss-ODN_{COV}$).

Lo más importante es que ambas conformaciones no bloquean la respuesta electroquímica del sensor. Además, la presencia del oligonucleótido mejora la dispersión del nanotubo en medio acuoso, lo que permitiría aplicar estos sistemas en estudios de hibridación.

3.5 APLICACIÓN DE (MWNT/ss-ODN) EN BIOSENSORES DE HIBRIDACIÓN

Debido a las diferentes conformaciones que adopta el oligonucleótido sobre el *MWNT*, al ser adsorbido o unido covalente a él (figura III.61), se espera que frente a un proceso de hibridación ambas muestras presenten diferentes resultados. Los *MWNT/ss-ODN_{COV}* al estar en contacto con la hebra complementaria se deberían hibridar, mientras que para *MWNT/ss-ODN_{ADS}* sólo se observaría la adsorción de la hebra. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron tres oligonucleótidos diferentes:

- **ss-ODN** = 5' - CTCGATGACTCAATGACTCG - 3'
- **ODN_c** = 5' - CGAGTCATTGAGTCATCGAG - 3'
- **ODN_b** = 5' - TATACATCTACATCTACATAT - 3'

El primero de ellos (ss-ODN) corresponde a la hebra utilizada para funcionalizar los *MWNT* (covalente y no covalente), cuya caracterización se presentó en la sección 3.4. El segundo oligonucleótido (ODN_c) corresponde a la hebra complementaria de ss-ODN, con la cual puede hibridarse. Por otra parte, ODN_b es un oligonucleótido de una hebra que no es complementaria de ss-ODN y que además de no hibridar, no posee guaninas en su estructura, así no contribuye en la respuesta electroquímica del sensor.

Para corroborar la hibridación de ss-ODN se realizaron dos estudios electroquímicos. En el primer caso, el proceso de hibridación se estudió a través de los cambios en la señal de oxidación de las guaninas al incubar los *MWNT/ss-ODN* con ambas hebras. En un segundo estudio, el proceso de hibridación se siguió a través de la interacción de un agente intercalante con el oligonucleótido.

3.5.1 Estudios de hibridación de MWNT/ss-ODN en tampón fosfato. Señal de oxidación de las bases guaninas

En la figura III.62 se muestran las respuestas electroquímicas de los electrodos modificados con MWNT/ss-ODN (covalente y adsorbido), luego de someterlos a diferentes condiciones de hibridación.

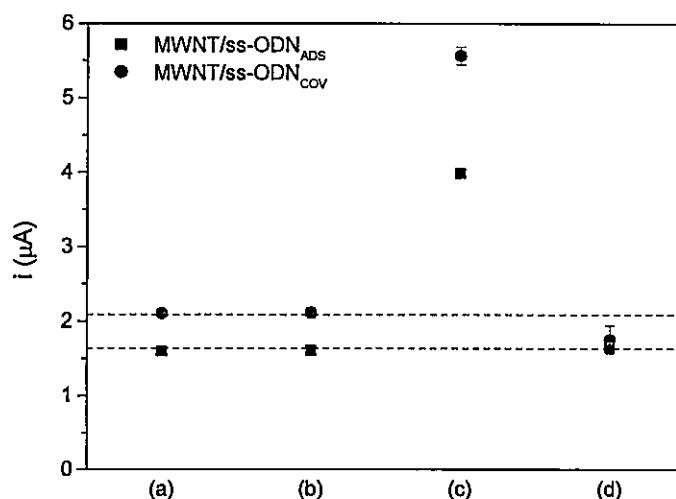


Figura III. 62. Respuesta electroquímica de MWNT/ss-ODN luego de someterse a: (a) incubación en PBS, (b) incubación con ODN_b, (c) incubación con ODN_c, (d) incubación con ODN_b y luego ODN_c. Las dispersiones de MWNT/ss-ODN fueron preparadas en PBS 0,2 M a pH 7,4 a una concentración de 1 mg/mL. Técnica utilizada: VPD. Cada medición fue obtenida con el promedio de tres electrodos.

En la figura III.62a, los valores obtenidos corresponden a la incubación de los electrodos en PBS (blancos). Para esto, a los electrodos modificados se les hace el tratamiento de hibridación pero en celdas que contienen sólo el tampón de trabajo. Como se observa en la gráfica, ambos MWNT funcionalizados arrojan un valor de corriente que corresponden a la oxidación de las guaninas presentes en el

oligonucleótido. Cuando ss-ODN es adsorbido sobre la superficie del nanotubo (MWNT/ss-ODN_{ADS}), no todas las guaninas quedan disponibles para su oxidación, por lo tanto el valor de corriente observado es levemente menor al obtenido cuando la funcionalización es covalente (MWNT/ss-ODN_{COV}).

A continuación, los electrodos modificados se pusieron en contacto con un oligonucleótido denominado "hebra de bloqueo" (ODN_b, fig. III.62b). Esta hebra no contiene en su estructura bases guaninas, de esta forma, si es adsorbida no contribuirá a la corriente total. Los resultados obtenidos muestran dos posibilidades: (1) ODN_b no se adsorbería sobre la superficie, o (2) ODN_b se adsorbe sobre el nanotubo, pero no produce cambios en los valores de corriente respecto a los blancos (sistema (a)).

Por otra parte, los electrodos modificados se pusieron en contacto sólo con la hebra complementaria (ODN_c, fig. III.62c). Los resultados de la gráfica muestran un aumento de los valores de corriente para ambos MWNT/ss-ODN (covalente y adsorbido). Cuando hay hibridación se debe observar una disminución de la corriente de las guaninas, ya que al encontrarse dentro de la doble hélice se dificulta su oxidación. Los resultados obtenidos indicarían que ODN_c estaría siendo preferentemente adsorbido sobre la superficie libre de los nanotubos. Los valores de corriente son superiores para MWNT/ss-ODN_{COV}, lo que se explicaría por la menor cantidad de ss-ODN que hay en el nanotubo, dejando más área superficial libre comparada con MWNT/ss-ODN_{ADS} (figura III.61).

Finalmente, los electrodos modificados fueron puestos en contacto con la hebra de bloqueo (ODN_b), que cubrirá la superficie del NTC y evitará la adsorción de la hebra complementaria, y luego, se pusieron en contacto con la hebra complementaria (ODN_c) para que se hibride (fig. III.62d). En la figura se observa que para MWNT/ss-ODN_{ADS} no hay cambios en los valores de corriente comparados con los sistemas (a) y (b), lo que

indicaría que la superficie del nanotubo estaría bloqueada por ODN_b , impidiendo la adsorción de la hebra complementaria ODN_c . Además, al no variar los valores respecto del blanco, daría cuenta de que no hay hibridación. Por otra parte, para MWNT/ss- ODN_{COV} se observa una leve disminución de la corriente. Estos resultados indicarían que una vez bloqueada la superficie, el ODN_c no es adsorbido (ya que no hay aumento en corriente como en (c)) y podría haber hibridación debido a la disminución de la corriente comparado con su blanco.

Para corroborar que la disminución en corriente de MWNT/ss- ODN_{COV} se debe a la hibridación con su complementario ODN_c , se utilizó un agente intercalante que reconoce entre una hebra simple (ss-) y doble (ds-) de ADN.

3.5.2 Detección de hibridación utilizando azul de metileno

El proceso de hibridación utilizando MWNT funcionalizados con ss-ODN se puede corroborar estudiando la electroactividad de un agente intercalante que pueda discriminar entre una hebra hibridada (ds-ODN) y otra libre (ss-ODN). Uno de los agentes intercalantes más utilizados corresponde a azul de metileno (AM) que presenta una alta afinidad por las bases guaninas del ADN [68, 120]. El proceso de hibridación puede ser detectado a través de la señal de reducción de AM, ya que la accesibilidad del AM hacia las bases guaninas disminuye en la doble hélice de ds-ODN, lo que se refleja en una señal de reducción de menor magnitud.

En la figura III.63 se muestran las corrientes normalizadas de AM al interactuar con MWNT/ss- ODN_{COV} y MWNT/ss- ODN_{ADS} bajo dos condiciones diferentes:

- a. ODN_b/PBS: Primero, los electrodos modificados fueron incubados con la hebra de bloqueo (ODN_b) y luego se incubaron en PBS (ausencia de la hebra complementaria). Una vez terminado el proceso, se acumula AM y se evalúa su señal de reducción. Con este procedimiento evitamos la adsorción directa de AM sobre las paredes del nanotubo (al bloquearla con ODN_b) y el oligonucleótido queda expuesto como hebra simple (ss-ODN) para interactuar con AM.
- b. ODN_b/ODN_c: Los electrodos modificados fueron incubados con la hebra de bloqueo (ODN_b) y luego con la hebra complementaria (ODN_c) para que hubiera hibridación. Una vez terminado el proceso, se acumula AM y se evalúa su señal de reducción. Con este procedimiento el oligonucleótido que se hibrida queda como ds-ODN, por lo tanto, la señal de reducción de AM debería ser menor.

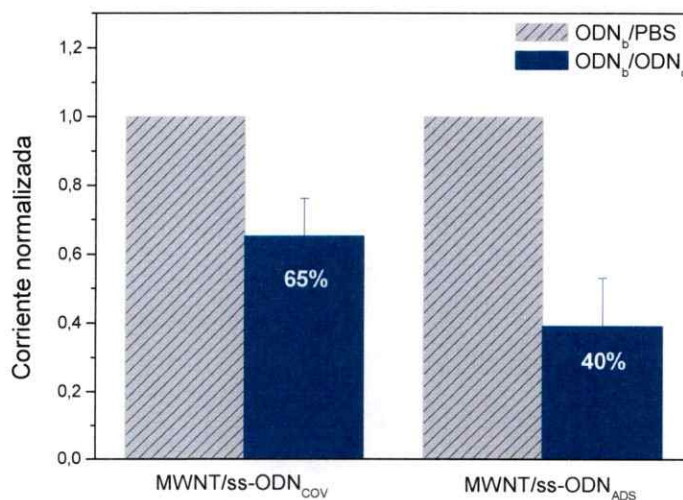


Figura III. 63. Respuesta electroquímica de 20 μM de azul de metileno en PBS 0,2 M pH 7,4 y NaCl 0,1 M sobre electrodos modificados con MWNT/ss-ODN. Dispersiones preparadas en PBS a una concentración de 1 mg/mL. Técnica utilizada: VPD. Cada medición fue obtenida con el promedio de cuatro electrodos.

Como en ambos casos la superficie del nanotubo primero fue bloqueada, para evitar la adsorción directa de AM sobre el nanotubo libre, y el electrodo es lavado para remover el AM adsorbido no específicamente, la corriente observada correspondería al AM que interacciona con las guaninas del ss-ODN (barras achuradas figura III.63). Luego del proceso de hibridación, se observa una disminución de la corriente de AM en ambos sistemas indicando que la hibridación ha ocurrido en las dos funcionalizaciones. Este proceso sería independiente de la conformación espacial que ha adoptado el oligonucleótido en el nanotubo y la sensibilidad de la detección estaría condicionada a la estrategia de inmovilización; ya que en el caso de la modificación covalente la pérdida de respuesta fue del 35% y en el caso de la adsorción fue del 60%. Estos resultados podrían explicarse a lo planteado por Pan y col. [72] y que es esquematizado en la figura III.64.

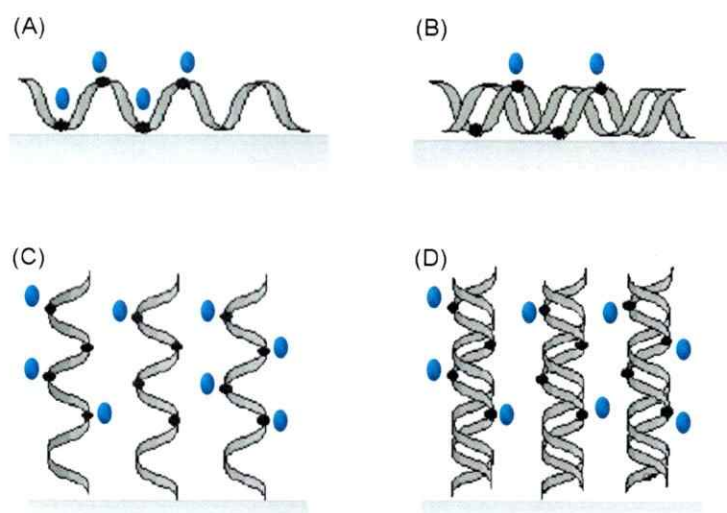


Figura III. 64. Interacción de azul de metileno (puntos azules) con ADN. En (A) y (B), ss-ODN y ds-ODN están adsorbidos sobre los nanotubos ($MWNT/ss-ODN_{ADS}$), mientras en (C) y (D) ss-ODN y ds-ODN están unidos en forma covalente al nanotubo ($MWNT/ss-ODN_{COV}$). Las bases guaninas se representan como puntos negros en la cadena del oligonucleótido. (Adaptación de la figura mostrada en ref. 72).

Podemos ver que en la figura III.64A, cuando el oligonucleótido se encuentra adsorbido sobre una superficie se observa una corriente de reducción de AM debido a su alta afinidad hacia las guaninas, a las que puede acceder fácilmente. Sin embargo, luego de la hibridación (fig. III.64B) las guaninas más cercanas a la superficie quedan dentro de la doble hélice, impidiéndose la interacción del AM con esas guaninas. Esto provoca una disminución en la señal de reducción de AM, que en nuestro sistema fue del 60%. Este comportamiento ha sido observado también por Ozkan y col. [121].

Por otra parte, cuando el oligonucleótido se encuentra unido en forma covalente (fig. III.64, C y D), su conformación vertical permitiría que incluso después de hibridarse el ss-ODN, el AM pueda interactuar con las guaninas. Debido a que la doble hélice permite la transferencia electrónica, luego de ocurrida la hibridación, los valores de corriente no disminuyen considerablemente lo que fue observado en nuestro sistema donde la pérdida asociada a MWNT/ss-ODN_{cov} fue del 35%.

Con estos resultados podemos concluir que AM puede interactuar con ss-ODN independiente de la conformación adoptada sobre el nanotubo, pudiendo llevar a cabo estudios de hibridación en ambos sistemas siendo más sensible en esta detección el biosensor construido a partir de un oligonucleótido adsorbido sobre el nanotubo de carbono.

CONCLUSIONES

Los principales resultados obtenidos en esta Tesis son:

- La cantidad y tipo de grupos funcionales oxigenados que son incorporados a la superficie del NTC, depende fuertemente del agente oxidante utilizado y el tiempo del tratamiento oxidativo.
- La incorporación de grupos funcionales que generan cargas (negativas o positivas) no cambia significativamente la dispersabilidad de los NTC en medio acuoso, sin embargo si permite generar biosensores de ADN de alta reproducibilidad y sensibilidad.
- La respuesta electroquímica del genosensor mejora con la incorporación de grupos con cargas positivas en la estructura del NTC, en comparación a las muestras oxidadas.
- El uso de un polímero como agente dispersante disminuye las propiedades intrínsecas de los NTC, ya que la respuesta electroquímica del sistema es menor que cuando son dispersados en medio acuoso. La señal es dependiente de la concentración de ADN lo que permitiría una aplicación cuantitativa.
- La funcionalización covalente y/o no covalente de NTC con oligonucleótidos de hebra simple, mejora la dispersión del nanotubo en medio acuoso, y permite generar biosensores para estudios de hibridación, independiente de la conformación adoptada por el oligonucleótido sobre el nanotubo.

- El proceso de hibridación es detectado de forma más eficiente utilizando un agente intercalante electroactivo, como azul de metileno, que realizando mediciones directas de oxidación de las guaninas presentes en el ADN.
- Mediante el uso de azul de metileno se determinó que la funcionalización no covalente de NTC con oligonucleótidos, es más sensible a la detección del proceso de hibridación que la funcionalización covalente.

Por lo cual podemos concluir que:

- (a) Al incorporar cargas positivas al nanotubo es posible generar un electrodo modificado reproducible y sensible frente a la adsorción de ADN, sin la necesidad de utilizar un agente polimérico catiónico.
- (b) La sensibilidad de un genosensor para estudios de hibridación, es dependiente del método de funcionalización utilizado para incorporar el ODN en el nanotubo de carbono. Bajo nuestras condiciones de trabajo, la mejor respuesta se obtuvo utilizando un método no covalente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Clark, L. C., Jr.; Lyons, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1962**, 102, 29-45.
2. Luong, J. H. T.; Male, K. B.; Glennon, J. D., Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotechnology Advances* **2008**, 26, (5), 492-500.
3. Teles, F. R. R.; Fonseca, L. P., Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. *Materials Science and Engineering: C* **2008**, 28, (8), 1530-1543.
4. Wang, J., SURVEY AND SUMMARY: From DNA biosensors to gene chips *Nucleic Acids Research* **2000**, 28, (16), 3011-3016.
5. Lucarelli, F.; Tombelli, S.; Minunni, M.; Marrazza, G.; Mascini, M., Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 609, (2), 139-159.
6. Mak, L. H.; Knoll, M.; Dankbar, N.; Sundermeier, C.; Gorschlüter, A., Electro-magnetic biosensor for binding force measurements on ligand-receptor complexes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, 114, (1), 132-140.
7. Wang, J., Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, 21, (10), 1887-1892.
8. Wang, J., *Analytical Electrochemistry*. 3rd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2006; p 201.
9. Drummond, T. G.; Hill, M. G.; Barton, J. K., Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotechnology* **2003**, 21, (10), 1192-1199.
10. Christopoulos, T. K., Nucleic Acid Analysis. *Analytical Chemistry* **1999**, 71, (18), 425-438.
11. Zhai, J.; Cui, H.; Yang, R., DNA based biosensors. *Biotechnology Advances* **1997**, 15, (1), 43-58.
12. Palecek, E.; Fojta, M.; Tomschik, M.; Wang, J., Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosensors and Bioelectronics* **1998**, 13, (6), 621-628.
13. Sassolas, A.; Leca-Bouvier, B. D.; Blum, L. J., DNA Biosensors and Microarrays. *Chemical Reviews* **2007**, 108, (1), 109-139.
14. Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, 171, (4356), 737-738.
15. Palecek, E., Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid. *Nature* **1960**, 188, (4751), 656-657.
16. Oliveira-Brett, A. M.; Piedade, J. A. P.; Silva, L. A.; Diculescu, V. C., Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Analytical Biochemistry* **2004**, 332, (2), 321-329.
17. Oliveira-Brett, A. M.; Vivan, M.; Fernandes, I. R.; Piedade, J. A. P., Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA. *Talanta* **2002**, 56, (5), 959-970.

18. Pedano, M. L.; Rivas, G. A., Adsorption and electrooxidation of nucleic acids at carbon nanotubes paste electrodes. *Electrochemistry Communications* **2004**, *6*, (1), 10-16.
19. Steenken, S., Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *Chemical Reviews* **1989**, *89*, (3), 503-520.
20. Brett, A. M. O.; Piedade, J. A. P.; Serrano, S. H. P., Electrochemical Oxidation of 8-Oxoguanine. *Electroanalysis* **2000**, *12*, (12), 969-973.
21. Li, Q.; Batchelor-McAuley, C.; Compton, R. G., Electrochemical Oxidation of Guanine: Electrode Reaction Mechanism and Tailoring Carbon Electrode Surfaces To Switch between Adsorptive and Diffusional Responses. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, (21), 7423-7428.
22. de-los-Santos-Álvarez, P.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A.; Tuñón-Blanco, P., Current strategies for electrochemical detection of DNA with solid electrodes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378*, (1), 104-118.
23. Xu, K.; Huang, J.; Ye, Z.; Ying, Y.; Li, Y., Recent Development of Nano-Materials Used in DNA Biosensors. *Sensors* **2009**, *9*, (7), 5534-5557.
24. Britto, P. J.; Santhanam, K. S. V.; Ajayan, P. M., Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1996**, *41*, (1), 121-125.
25. Gooding, J. J., Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. *Electrochimica Acta* **2005**, *50*, (15), 3049-3060.
26. Li, G.; Liao, J. M.; Hu, G. Q.; Ma, N. Z.; Wu, P. J., Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *20*, (10), 2140-2144.
27. Iijima, S.; Ichihashi, T., Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* **1993**, *363*, (6430), 603-605.
28. Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354*, (6348), 56-58.
29. Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Georgakilas, V.; Prato, M., Soluble Carbon Nanotubes. *Chemistry – A European Journal* **2003**, *9*, (17), 4000-4008.
30. Klumpp, C.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A., Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*, (3), 404-412.
31. Tseng, S. C.; Yao, B. C.; Tsai, C. H., Field Emission from Individual Free-Standing Carbon Nanotubes. *Japanese Journal of Applied Physics* **2010**, *49*, (10), -.
32. Roh, S.; Lee, J.; Jang, M.; Shin, M.; Ahn, J.; Park, T.; Yi, W., Characteristic Features of Stone-Wales Defects in Single-Walled Carbon Nanotube; Adsorption, Dispersion, and Field Emission. *Journal of Nanomaterials* **2010**, -.
33. Bourgoin, J. P.; Campidelli, S.; Chenevier, P.; Derycke, V.; Filoramo, A.; Goffman, M. F., Recent Advances in Molecular Electronics Based on Carbon Nanotubes. *Chimia* **2010**, *64*, (6), 414-420.

34. Avouris, P.; Martel, R., Progress in Carbon Nanotube Electronics and Photonics. *MRS Bulletin* **2010**, *35*, (4), 306-313.
35. Sekitani, T.; Someya, T., Stretchable, Large-area Organic Electronics. *Advanced Materials* **2010**, *22*, (20), 2228-2246.
36. Tisch, U.; Haick, H., Nanomaterials for cross-reactive sensor arrays. *MRS Bulletin* **2010**, *35*, (10), 797-803.
37. Saito, M.; Hiep, H. M.; Nagatani, N.; Tamiya, E., Sensors. *Nano/Micro Biotechnology* **2010**, *119*, 231-250.
38. Zhong, W., Nanomaterials in fluorescence-based biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *394*, (1), 47-59.
39. Li, C.; Thostenson, E. T.; Chou, T. W., Sensors and actuators based on carbon nanotubes and their composites: A review. *Composites Science and Technology* **2008**, *68*, (6), 1227-1249.
40. Vashist, S. K.; Zheng, D.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J. H.; Sheu, F. S., Advances in carbon nanotube based electrochemical sensors for bioanalytical applications. *Biotechnology Advances* **2010**.
41. Yanez-Sedeno, P.; Riu, J.; Pingarron, J. M.; Rius, F. X., Electrochemical sensing based on carbon nanotubes. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2010**, *29*, (9), 939-953.
42. Hirsch, A., Functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41*, (11), 1853-1859.
43. Moore, V. C.; Strano, M. S.; Haroz, E. H.; Hauge, R. H.; Smalley, R. E.; Schmidt, J.; Talmon, Y., Individually Suspended Single-Walled Carbon Nanotubes in Various Surfactants. *Nano Letters* **2003**, *3*, (10), 1379-1382.
44. Amiran, J.; Nicolosi, V.; Bergin, S. D.; Khan, U.; Lyons, P. E.; Coleman, J. N., High quality dispersions of functionalized single walled nanotubes at high concentration. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, (10), 3519-3524.
45. Shvartzman-Cohen, R.; Nativ-Roth, E.; Baskaran, E.; Levi-Kalisman, Y.; Szleifer, I.; Yerushalmi-Rozen, R., Selective Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes in the Presence of Polymers:□ the Role of Molecular and Colloidal Length Scales. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, (45), 14850-14857.
46. Li, Z. Z.; Wu, Z. Y.; Li, K., The high dispersion of DNA-multiwalled carbon nanotubes and their properties. *Analytical Biochemistry* **2009**, *387*, (2), 267-270.
47. Nakashima, N. O., S.; Murakami, H.; Nakai, T. and Yoshikawa, K., DNA Dissolves Single-walled Carbon Nanotubes in Water. *Chemistry Letters* **2003**, *32*, (5), 456.
48. Rastogi, R.; Kaushal, R.; Tripathi, S. K.; Sharma, A. L.; Kaur, I.; Bharadwaj, L. M., Comparative study of carbon nanotube dispersion using surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *328*, (2), 421-428.
49. Zheng, M.; Jagota, A.; Semke, E. D.; Diner, B. A.; McLean, R. S.; Lustig, S. R.; Richardson, R. E.; Tassi, N. G., DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nature Materials* **2003**, *2*, (5), 338-342.

50. Bandyopadhyaya, R.; Nativ-Roth, E.; Regev, O.; Yerushalmi-Rozen, R., Stabilization of Individual Carbon Nanotubes in Aqueous Solutions. *Nano Letters* **2001**, *2*, (1), 25-28.
51. O'Connell, M. J.; Boul, P.; Ericson, L. M.; Huffman, C.; Wang, Y.; Haroz, E.; Kuper, C.; Tour, J.; Ausman, K. D.; Smalley, R. E., Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping. *Chemical Physics Letters* **2001**, *342*, (3-4), 265-271.
52. Kang, Y.; Taton, T. A., Micelle-Encapsulated Carbon Nanotubes: A Route to Nanotube Composites. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, (19), 5650-5651.
53. Tkac, J.; Ruzgas, T., Dispersion of single walled carbon nanotubes. Comparison of different dispersing strategies for preparation of modified electrodes toward hydrogen peroxide detection. *Electrochemistry Communications* **2006**, *8*, (5), 899-903.
54. Fernández-Abedul, M.; Costa-García, A., Carbon nanotubes (CNTs)-based electroanalysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, (1), 293-298.
55. Sano, M.; Kamino, A.; Okamura, J.; Shinkai, S., Self-Organization of PEO-graft-Single-Walled Carbon Nanotubes in Solutions and Langmuir-Blodgett Films. *Langmuir* **2001**, *17*, (17), 5125-5128.
56. Bollo, S.; Ferreyra, N. F.; Rivas, G. A., Electrooxidation of DNA at glassy carbon electrodes modified with multiwall carbon nanotubes dispersed in chitosan. *Electroanalysis* **2007**, *19*, (7-8), 833-840.
57. Vaisman, L.; Wagner, H. D.; Marom, G., The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes. *Advances in Colloid and Interface Science* **2006**, *128*, 37-46.
58. Banerjee, S.; Hemraj-Benny, T.; Wong, S. S., Covalent Surface Chemistry of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Advanced Materials* **2005**, *17*, (1), 17-29.
59. Georgakilas, V.; Bourlino, A.; Gournis, D.; Tsoufis, T.; Trapalis, C.; Mateo-Alonso, A.; Prato, M., Multipurpose organically modified carbon nanotubes: From functionalization to nanotube composites. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, (27), 8733-8740.
60. Yang, X. Y.; Liu, Z. F.; Mao, J.; Wang, S. J.; Ma, Y. F.; Chen, Y. S., The preparation of functionalized single walled carbon nanotubes as high efficiency DNA carriers. *Chinese Chemical Letters* **2007**, *18*, (12), 1551-1553.
61. Balasubramanian, K.; Burghard, M., Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *Small* **2005**, *1*, (2), 180-192.
62. Peng, Y.; Liu, H., Effects of Oxidation by Hydrogen Peroxide on the Structures of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2006**, *45*, (19), 6483-6488.
63. Hamon, M. A.; Chen, J.; Hu, H.; Chen, Y. S.; Itkis, M. E.; Rao, A. M.; Eklund, P. C.; Haddon, R. C., Dissolution of single-walled carbon nanotubes. *Advanced Materials* **1999**, *11*, (10), 834-+.
64. Yao, Y.; Li, W.; Wang, S.; Yan, D.; Chen, X., Polypeptide Modification of Multiwalled Carbon Nanotubes by a Graft-From Approach. *Macromolecular Rapid Communications* **2006**, *27*, (23), 2019-2025.

65. Yang, W.; Moghaddam, M. J.; Taylor, S.; Bojarski, B.; Wieczorek, L.; Herrmann, J.; McCall, M. J., Single-walled carbon nanotubes with DNA recognition. *Chemical Physics Letters* **2007**, 443, (4-6), 169-172.
66. Thorp, H. H., Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation. *Trends in Biotechnology* **1998**, 16, (3), 117-121.
67. Rivas, G. P., M.; Ferreyra, N., Electrochemical Biosensors for Sequence-Specific DNA Detection. *Analytical Letters* **2005**, 38, (15), 2653 - 2703
68. Kerman, K.; Ozkan, D.; Kara, P.; Meric, B.; Gooding, J. J.; Ozsoz, M., Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes. *Analytica Chimica Acta* **2002**, 462, (1), 39-47.
69. Odenthal, K. J.; Gooding, J. J., An introduction to electrochemical DNA biosensors. *Analyst* **2007**, 132, (7), 603-610.
70. Erdem, A.; Kerman, K.; Meric, B.; Akarca, U. S.; Ozsoz, M., Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 422, (2), 139-149.
71. Farjami, E.; Clima, L.; Gothelf, K. V.; Ferapontova, E. E., DNA interactions with a Methylene Blue redoxindicator depend on the DNA length and are sequence specific. *Analyst* **2010**, 135, (6), 1443-1448.
72. Pan, D.; Zuo, X.; Wan, Y.; Wang, L.; Zhang, J.; Song, S.; Fan, C., Electrochemical Interrogation of Interactions between Surface-Confined DNA and Methylene Blue. *Sensors* **2007**, 7, (11), 2671-2680.
73. Kara, P.; Kerman, K.; Ozkan, D.; Meric, B.; Erdem, A.; Ozkan, Z.; Ozsoz, M., Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA. *Electrochemistry Communications* **2002**, 4, (9), 705-709.
74. Nicholson, R. S.; Shain, I., Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. *Analytical Chemistry* **1964**, 36, (4), 706-723.
75. Figueiredo, J. L.; Pereira, M. F. R.; Freitas, M. M. A.; Orfao, J. J. M., Modification of the surface chemistry of activated carbons. *Carbon* **1999**, 37, (9), 1379-1389.
76. Su, S.-H.; Chiang, W.-T.; Lin, C.-C.; Yokoyama, M., Multi-wall carbon nanotubes: Purification, morphology and field emission performance. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2008**, 40, (7), 2322-2326.
77. Hu, H.; Zhao, B.; Itkis, M. E.; Haddon, R. C., Nitric Acid Purification of Single-Walled Carbon Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107, (50), 13838-13842.
78. Avilés, F.; Cauich-Rodríguez, J. V.; Moo-Tah, L.; May-Pat, A.; Vargas-Coronado, R., Evaluation of mild acid oxidation treatments for MWCNT functionalization. *Carbon* **2009**, 47, (13), 2970-2975.
79. Zhu, W. Z.; Miser, D. E.; Chan, W. G.; Hajaligol, M. R., Characterization of multiwalled carbon nanotubes prepared by carbon arc cathode deposit. *Materials Chemistry and Physics* **2003**, 82, (3), 638-647.

80. Zacharia, R.; Kim, K. Y.; Hwang, S. W.; Nahm, K. S., Intrinsic linear scaling of hydrogen storage capacity of carbon nanotubes with the specific surface area. *Catalysis Today* **2007**, 120, (3-4), 426-431.
81. Sing, K. S. W., Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure and Applied Chemistry* **1985**, 57, 603-619.
82. Jang, I. Y.; Muramatsu, H.; Park, K. C.; Kim, Y. J.; Endo, M., Capacitance response of double-walled carbon nanotubes depending on surface modification. *Electrochemistry Communications* **2009**, 11, (4), 719-723.
83. Domingo, C. S., G., Espectroscopía Raman de nanotubos de carbono. *Óptica Pura y Aplicada* **2007**, 40, 175-186.
84. Salame, I. I.; Bandosz, T. J., Surface Chemistry of Activated Carbons: Combining the Results of Temperature-Programmed Desorption, Boehm, and Potentiometric Titrations. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, 240, (1), 252-258.
85. Bower, C.; Kleinhammes, A.; Wu, Y.; Zhou, O., Intercalation and partial exfoliation of single-walled carbon nanotubes by nitric acid. *Chemical Physics Letters* **1998**, 288, (2-4), 481-486.
86. Yang, D.-Q.; Rochette, J.-F.; Sacher, E., Functionalization of Multiwalled Carbon Nanotubes by Mild Aqueous Sonication. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, (16), 7788-7794.
87. Cao, L.; Chen, H.; Wang, M.; Sun, J.; Zhang, X.; Kong, F., Photoconductivity Study of Modified Carbon Nanotube/Oxotitanium Phthalocyanine Composites. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106, (35), 8971-8975.
88. Coates, J., *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. John Wiley & Sons Ltd: 2000; p 10815-10837.
89. Hu, H.; Bhowmik, P.; Zhao, B.; Hamon, M. A.; Itkis, M. E.; Haddon, R. C., Determination of the acidic sites of purified single-walled carbon nanotubes by acid-base titration. *Chemical Physics Letters* **2001**, 345, (1-2), 25-28.
90. Gonzalez-Guerrero, A. B.; Mendoza, E.; Pellicer, E.; Alsina, F.; Fernandez-Sanchez, C.; Lechuga, L. M., Discriminating the carboxylic groups from the total acidic sites in oxidized multi-wall carbon nanotubes by means of acid-base titration. *Chemical Physics Letters* **2008**, 462, (4-6), 256-259.
91. Solomons, T. W. G.; Fernandez, J. E., *Organic chemistry*. 5th ed.; Wiley: New York, 1992; p 1 v. (various pagings).
92. Briceno, N.; Guzman, M.; Diaz, J., Surface groups on carbonaceous materials. Characterization by different techniques. *Revista Colombiana de Química* **2007**, 36, 121-130.
93. Bandosz, T. J.; Buczek, B.; Grzybek, T.; Jagiello, J., The determination of surface changes in active carbons by potentiometric titration and water vapour adsorption. *Fuel* **76**, (14-15), 1409-1416.
94. Contescu, A.; Contescu, C.; Putyera, K.; Schwarz, J. A., Surface acidity of carbons characterized by their continuous pK distribution and Boehm titration. *Carbon* **1997**, 35, (1), 83-94.

95. Weast, R. C., *CRC Handbook of chemistry and physics*. 1st Student ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1988; p 1 v. (various pagings).
96. Zielke, U.; Huttinger, K. J.; Hoffman, W. P., Surface-oxidized carbon fibers .1. Surface structure and chemistry. *Carbon* **1996**, 34, (8), 983-998.
97. Datsyuk, V.; Kalyva, M.; Papagelis, K.; Parthenios, J.; Tasis, D.; Siokou, A.; Kallitsis, I.; Galiotis, C., Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon* **2008**, 46, (6), 833-840.
98. Fanning, P. E.; Vannice, M. A., A Drifts Study of the Formation of Surface Groups on Carbon by Oxidation. *Carbon* **1993**, 31, (5), 721-730.
99. Yang, D. Q.; Sacher, E., Characterization and Oxidation of Fe Nanoparticles Deposited onto Highly Oriented Pyrolytic Graphite, Using X-ray Photoelectron Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, 113, (16), 6418-6425.
100. Poulin, S.; Franca, R.; Moreau-Belanger, L.; Sacher, E., Confirmation of X-ray Photoelectron Spectroscopy Peak Attributions of Nanoparticulate Iron Oxides, Using Symmetric Peak Component Line Shapes. *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, 114, (24), 10711-10718.
101. Montesa, I.; Muñoz, E.; Benito, A. M.; Maser, W. K.; Martinez, M. T., FTIR and Thermogravimetric Analysis of Biotin-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2007**, 7, 3473-3476.
102. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry* **1970**, 34, (2), 595-598.
103. Ausman, K. D.; Piner, R.; Lourie, O.; Ruoff, R. S.; Korobov, M., Organic Solvent Dispersions of Single-Walled Carbon Nanotubes: Toward Solutions of Pristine Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, 104, (38), 8911-8915.
104. Luo, H.; Shi, Z.; Li, N.; Gu, Z.; Zhuang, Q., Investigation of the Electrochemical and Electrocatalytic Behavior of Single-Wall Carbon Nanotube Film on a Glassy Carbon Electrode. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (5), 915-920.
105. An, K. H.; Jeon, K. K.; Heo, J. K.; Lim, S. C.; Bae, D. J.; Lee, Y. H., High-Capacitance Supercapacitor Using a Nanocomposite Electrode of Single-Walled Carbon Nanotube and Polypyrrole. *Journal of the Electrochemical Society* **2002**, 149, (8), A1058-A1062.
106. Guo, M.; Chen, J.; Liu, D.; Nie, L.; Yao, S., Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes. *Bioelectrochemistry* **2004**, 62, (1), 29-35.
107. Ji, X.; Kadara, R. O.; Krussma, J.; Chen, Q.; Banks, C. E., Understanding the Physicoelectrochemical Properties of Carbon Nanotubes: Current State of the Art. *Electroanalysis* **2010**, 22, (1), 7-19.
108. Hsieh, C.-T.; Teng, H.; Chen, W.-Y.; Cheng, Y.-S., Synthesis, characterization, and electrochemical capacitance of amino-functionalized carbon nanotube/carbon paper electrodes. *Carbon* **2010**, 48, (15), 4219-4229.
109. Wopschall, R. H.; Shain, I., Effects of adsorption of electroactive species in stationary electrode polarography. *Analytical Chemistry* **1967**, 39, (13), 1514-1527.

110. Liu, Q.; Li, J.; Tao, W.; Zhu, Y.; Yao, S., Comparative study on the interaction of DNA with three different kinds of surfactants and the formation of multilayer films. *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, (2), 301-307.
111. Gao, H.; Kong, Y.; Cui, D.; Ozkan, C. S., Spontaneous Insertion of DNA Oligonucleotides into Carbon Nanotubes. *Nano Letters* **2003**, *3*, (4), 471-473.
112. Lacerda, L.; Pastorin, G.; Wu, W.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K., Luminescence of Functionalized Carbon Nanotubes as a Tool to Monitor Bundle Formation and Dissociation in Water: The Effect of Plasmid-DNA Complexation. *Advanced Functional Materials* **2006**, *16*, (14), 1839-1846.
113. Li, J.; Liu, Q.; Liu, Y.; Liu, S.; Yao, S., DNA biosensor based on chitosan film doped with carbon nanotubes. *Analytical Biochemistry* **2005**, *346*, (1), 107-114.
114. Kim, S. N.; Kuang, Z.; Grote, J. G.; Farmer, B. L.; Naik, R. R., Enrichment of (6,5) Single Wall Carbon Nanotubes Using Genomic DNA. *Nano Letters* **2008**, *8*, (12), 4415-4420.
115. Luque, G. Inmovilización de biomoléculas sobre nanoestructuras. Estudios básicos y aplicaciones para el desarrollo de biosensores electroquímicos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina., 2009.
116. Johnson, R. R.; Johnson, A. T. C.; Klein, M. L., Probing the Structure of DNA-Carbon Nanotube Hybrids with Molecular Dynamics. *Nano Letters* **2007**, *8*, (1), 69-75.
117. Zheng, M.; Jagota, A.; Strano, M. S.; Santos, A. P.; Barone, P.; Chou, S. G.; Diner, B. A.; Dresselhaus, M. S.; Mclean, R. S.; Onoa, G. B.; Samsonidze, G. G.; Semke, E. D.; Usrey, M.; Walls, D. J., Structure-Based Carbon Nanotube Sorting by Sequence-Dependent DNA Assembly. *Science* **2003**, *302*, (5650), 1545-1548.
118. Malik, S.; Vogel, S.; Rösner, H.; Arnold, K.; Henrich, F.; Köhler, A.-K.; Richert, C.; Kappes, M. M., Physical chemical characterization of DNA-SWNT suspensions and associated composites. *Composites Science and Technology* **2007**, *67*, (5), 916-921.
119. Sparks, D. L., *Environmental Soil Chemistry*. 2nd ed.; Academic Press: 2003; p 352.
120. Yang, W.; Ozsoz, M.; Hibbert, D. B.; Gooding, J. J., Evidence for the Direct Interaction Between Methylene Blue and Guanine Bases Using DNA-Modified Carbon Paste Electrodes. *Electroanalysis* **2002**, *14*, (18), 1299-1302.
121. Ozkan, D.; Kara, P.; Kerman, K.; Meric, B.; Erdem, A.; Jelen, F.; Nielsen, P. E.; Ozsoz, M., DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label. *Bioelectrochemistry* **2002**, *58*, (1), 119-126.

ANEXO I: PRESENTACIONES A CONGRESOS

1. "Nanotubos de carbono funcionalizados con ADN y su aplicación en biosensores de hibridación"
XXIX Jornadas Chilenas de Química. Sociedad Chilena de Química. Linares, Chile. 8-11 de Noviembre, 2011.
2. "Caracterización química y electroquímica de NTC funcionalizados"
III Simposio de Electroquímica. División de Electroquímica, Sociedad Chilena de Química. Valparaíso, Chile. 17-19 de Noviembre, 2010.
3. "Oxidación de NTC: Efecto sobre el comportamiento electroquímico"
III Simposio de Electroquímica. División de Electroquímica, Sociedad Chilena de Química. Valparaíso, Chile. 17-19 de Noviembre, 2010.
4. "Biosensores de hibridación basados en MWNT: ¿Funcionalización covalente o adsorción del oligonucleótido?"
IV Congreso Iberoamericano de Química Analítica y X Encuentro de Química Analítica y Ambiental. División de Química Analítica y Ambiental, Sociedad Chilena de Química. Viña del Mar, Chile. 14-17 de Noviembre, 2010.
5. "Efecto del tratamiento químico de nanotubos de carbono sobre la respuesta frente a peróxido"
IV Congreso Iberoamericano de Química Analítica y X Encuentro de Química Analítica y Ambiental. División de Química Analítica y Ambiental, Sociedad Chilena de Química. Viña del Mar, Chile. 14-17 de Noviembre, 2010.
6. "Adsorptive/Covalent MWNT-ODN functionalization. A Voltammetric comparison"
61st Annual meeting of the International Society of Electrochemistry. Nice, Francia. 26 Septiembre al 01 de Octubre, 2010.

7. "Funcionalización de Nanotubos de Carbono con ADN para aplicaciones Biomedicas"
XI Congreso Nacional de Materiales. Zaragoza, España. 23-25 de Junio, 2010.
8. "Interacción de *ds-DNA* con diferentes tipos de nanotubos de carbono en solución"
XXVIII Jornadas Chilenas de Química. Sociedad Chilena de Química. Chillán, Chile. 3-6 de Noviembre, 2009.
9. "Nanotubos de carbono: Mejorando la respuesta de sensores electroquímicos de ADN"
I Congreso Nacional de Nanotecnología. Universidad Federico Santa Maria. Valparaíso, Chile. 24-26 de Mayo, 2009.
10. "Efecto del tipo y tratamiento de nanotubos de carbono sobre la respuesta electroquímica de un genosensor"
II Simposio de Electroquímica. División de Electroquímica, Sociedad Chilena de Química. Valparaíso, Chile. 19-22 de Noviembre, 2008.

ANEXO II: PUBLICACIONES

1. "THE ROLE OF LIQUID PHASE OXIDATIVE TREATMENTS ON THE ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES".
P. Cañete-Rosales, A. Álvarez-Lueje, S. Bollo, M. González, A. Ansón, M.T. Martínez. (Redactado)
2. "COMPARATIVE STUDY OF THE OXIDATION STATE OF MWCNT ON THE ELECTROANALYTICAL SENSING PROPERTIES OF MODIFIED GLASSY CARBON ELECTRODES".
P. Cañete-Rosales, V. Ortega, C. Yáñez, A. Álvarez-Lueje, S. Bollo. (Redactado)