



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento Físicoquímica y Química Orgánica
Centro de Investigación de Procesos Redox, CIPREX

**“ESTUDIO DE NITROAROMÁTICO ACTIVADO COMO MODIFICADOR
REDOX SUPERFICIAL Y SU APLICACIÓN COMO BIOSENSOR DE
ETANOL”**

Memoria para optar al Título Profesional de Químico

MATIAS RODRIGO PALMA MATURANA

PROFESOR PATROCINANTE
Dr. Juan Arturo Squella Serrano

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

Santiago, Chile
2024

Agradecimientos

Primero que todo, quiero agradecer a todos y a todas las personas que estuvieron conmigo durante este larguísimo periodo de universidad, quienes siempre estuvieron conmigo apoyándome para sacar la carrera adelante y también a cada uno y una que brindo de su tiempo.

Agradecer en especial a mi familia, a mis padres y hermana, por siempre estar conmigo, insistiendo constantemente en la obtención del título y por nunca dejar de confiar en mí. Por toda la preocupación y apoyo incondicional sabiendo lo difícil lo que estar fuera de la casa y estudiar en otra región.

Quiero también agradecer al profe Arturo y a Raúl por guiarme en el desarrollo de la tesis, en especial al profe por estar siempre preocupado de los avances y el desarrollo de los experimentos; y sobre todo a Raúl, por su apoyo incondicional tanto en lo académico como en lo fuera de ello y por supuesto todo su tiempo en estar ahí para lo que necesitará, ya sea dentro o fuera de la universidad, a la hora que fuese, siempre estuvo ahí para ayudarme en todo.

No quiero dejar de lado a grandes docentes que me acompañaron es este camino. Agradecer de todo corazón a la profe Loreto por su compañía, cariño y considerarme siempre en las ayudantías de analíticas. Al profesor Orlando, Q.E.P.D, quien fue el primer profesor en confiar en mis habilidades para ser ayudante, siempre con un chiste por delante y una disposición tremenda. Agradecer al Feña de Operaciones Unitarias que, si bien no es docente, su buena onda, disposición y atención sin duda marcan la diferencia y hace que todo funcione de maravilla. y así podría seguir con muchos docentes más.

Agradecer especialmente a mi gran amiga Claudia por todo su apoyo, apañe, horas de estudios, carretes y miles de experiencias juntos, de verdad un pilar fundamental en toda la carrera. Agradecer a mis compañeros de casa, al Chino y al Mati por siempre acompañarme. Obviamente no quiero dejar fuera mis compañeros de generación; la Panchis, la Dani, el José. También a mis compañeros de centro de alumnos; Carlos, Carla, Cata, Giovanni, Vicho. Mis compañeros de carrera de química, compañeros que se fueron de la carrera y otras carreras de la facultad; la Javi, Vale, Paul, Choca, José,

Gabu. A mis compañeros de Taekwondo y al profe Cristian por ayudar a quitar el estrés. A mi grupo de laboratorio: A Elías por sus enseñanzas y simpatía, a la Any por los incontables días y noches hasta muy tarde haciendo experimentos; y por supuesto a Martín, Rodrigo, Cata, Seba QF, Coni, Tania por la ayuda y buen ambiente dentro el equipo.

Agradecer a mis amigas y amigos de Curicó; Richy, Tomás, Christian, Checho, Palomo, Pasache, Rosario y su familia, las Javis, Javier, el Feña, Gabi, la Mayo, Diego, Franco. A todos y a todas les agradezco de todo corazón haber seguido manteniendo nuestra amistad a pesar de la lejanía.

Por último, pero no menos importante, agradecer de todo corazón a la Feñita, por su ayuda en el proceso final, sus revisiones y redacciones, por su insistencia a terminar y seguir adelante y por supuesto, su compañía en todo momento.

Resumen

La tecnología y avances científicos en diversos ámbitos nos ha ayudado a comprender de mejor manera el funcionamiento del universo y explicar fenómenos de diferentes indoles. Esto ha sido gracias, en gran parte, a que se ha podido determinar que partículas, átomos o moléculas están involucradas en cada reacción. Una de las tantas moléculas que se han podido identificar es el etanol. El etanol es un alcohol primario usado ampliamente a nivel mundial como biocombustible, siendo este su principal uso dado que estudios han demostrado que el uso de esta molécula contribuye positivamente a disminuir las emisiones de CO₂. No podemos dejar de lado su gran aplicación en el ámbito de síntesis de productos químicos como resinas sintéticas, así como también sus usos en la industria farmacéutica y alimentaria. Es por ello, y por todos sus usos y aplicaciones no mencionadas, que se hace necesario detectar y cuantificar esta molécula en sus diversos ámbitos de aplicación.

Dentro de la gama de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de dicha molécula, la electroquímica y en específico el uso de biosensores, se ha presentado como una herramienta poderosa a la hora de determinar etanol en variados tipos de muestras. Su detección ha tomado dos caminos a través de los biosensores. La primera vía, la oxidación de etanol en presencia de oxígeno, dando como productos acetaldehído y peróxido de hidrógeno, siendo este último el analito para cuantificar por el biosensor. Mientras que la segunda vía, la oxidación de etanol, esta vez en presencia de NAD⁺, para obtener como productos NADH y acetaldehído. Esta vez es el NADH la molécula de interés a determinar por el biosensor y es la vía por la cual se desarrollo esta memoria.

El NADH es un cofactor bastante estudiado debido a su importante rol a nivel biológico como molécula transportadora de electrones. Su oxidación directa en electrodos convencionales de carbono vitreo ha sido tema de investigación dado los altos sobrepotenciales que conlleva el proceso redox oxidativo, además de existir una contaminación en la superficie del electrodo por parte de los productos de la reacción. Es por esto que, en nuestro laboratorio Ciprex, nos hemos centrado en la búsqueda de nuevos materiales y moléculas que nos ayuden mejorar la respuesta de los electrodos usados en la determinación de NADH, siendo los nanotubos de carbono de multipared

en conjunto con el uso de mediadores redox, una buena alternativa para dar solución a estos inconvenientes.

Dado a lo anteriormente detallado, es que en este trabajo de tesis se estudió el uso de electrodos de carbono vitreo modificados con nanotubos de carbonos de multipared, siendo estos a su vez modificados con un posible mediador redox nitroaromático encapsulado en la red de nanotubos para la oxidación de NADH. Posteriormente, se evaluará la posibilidad de usar el electrodo para la construcción de una curva de calibración amperométrica, con el fin de determinar etanol producido enzimáticamente.

Summary

Technology and scientific advances in various fields have helped us better understand the functioning of the universe and explain phenomena of different kinds. This has been thanks, in large part, to being able to determine which particles, atoms or molecules are involved in each reaction. One of the many molecules that have been identified is ethanol. Ethanol is a primary alcohol widely used worldwide as a biofuel, this being its main use given that studies have shown that the use of this molecule positively contributes to reducing CO₂ emissions. We cannot ignore its great application in the field of synthesis of chemical products such as synthetic resins, as well as its uses in the pharmaceutical and food industries. It is for this reason, and for all its uses and applications not mentioned, that it is necessary to detect and quantify this molecule in its various areas of application.

Within the range of analytical techniques for the detection and quantification of said molecule, electrochemistry and specifically the use of biosensors, has been presented as a powerful tool when determining ethanol in various types of samples. Its detection has taken two paths through biosensors. The first route, the oxidation of ethanol in the presence of oxygen, giving acetaldehyde and hydrogen peroxide as products, the latter being the analyte to be quantified by the biosensor. While the second route, the oxidation of ethanol, this time in the presence of NAD⁺, to obtain NADH and acetaldehyde as products. This time NADH is the molecule of interest to be determined by the biosensor and it is the pathway by which this memory was developed.

NADH is a well-studied cofactor due to its important biological role as an electron transport molecule. Its direct oxidation in conventional glassy carbon electrodes has been the subject of research given the high overpotentials that the oxidative redox process entails, in addition to the existence of contamination on the surface of the electrode by the reaction products. This is why, in our Ciprex laboratory, we have focused on the search for new materials and molecules that help us improve the response of the electrodes used in the determination of NADH, being multiwall carbon nanotubes in conjunction with the use of redox mediators, a good alternative to solve these problems.

Given the above detail, in this thesis work the use of glassy carbon electrodes modified with multiwall carbon nanotubes was studied, these in turn being modified with a possible nitroaromatic redox mediator encapsulated in the nanotube network for the oxidation of NADH. Subsequently, the possibility of using the electrode for the construction of an amperometric calibration curve will be evaluated, in order to determine enzymatically produced ethanol.

Índice de Abreviaturas

1. **NTCMW**: Nanotubos de carbonos de multipared.
2. **NTCSW**: Nanotubos de carbono de pared simple.
3. **GC**: Electrodo de carbono vitreo.
4. **GC-NTC**: Electrodo de carbono vitreo modificado con dispersión de nanotubos de carbono de multipared.
5. **GC-NTC-NO₂**: Electrodo de carbono vitreo modificado con dispersión de nanotubos de carbono de multipared y con encapsulamiento de nitrocompuesto.
6. **GC-NTC-med**: Electrodo de carbono vitreo modificado con dispersión de nanotubos de carbono de multipared y con encapsulamiento de nitrocompuesto activado electroquímicamente (mediador).
7. **B-R**: Buffer Britton Robinson.
8. **SC**: Buffer semicarbazida.
9. **B-R+SC**: Buffer Britton Robinson + semicarbazida.
10. **PBS**: Buffer fosfato salino.
11. **PBS+SC**: Buffer PBS 10X + semicarbazida.
12. **PBS 10X**: Buffer fosfato salino concentrado 10 veces.
13. **PBS 10X+SC**: Buffer PBS 10X + semicarbazida.
14. **R-NHOH**: Derivado hidroxilamino del nitrocompuesto.
15. **R-NO**: Derivado nitroso del nitrocompuesto.
16. **Med**: Mediador electroquímico.
17. **NADH**: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.
18. **NAD⁺**: Nicotinamida adenina dinucleótido.
19. **ADH**: Enzima alcohol deshidrogenasa.
20. **4NBP_y**: 4-nitrobenzoato de 4-(piren-1-il)butilo.
21. **SC**: Semicarbazida.
22. **VC**: Voltametría cíclica.
23. **E_p**: Potencial de pico.
24. **EDS**: Electrodo de disco rotatorio.
25. **E_{pa}**: Potencial aplicado en amperometría.

Índice de Figura

Figura 1: Esquema del funcionamiento de un sensor electroquímico.	16
Figura 2: Alótropos de carbono según su dimensionalidad.....	18
Figura 3: Esquema general de las reacciones enzimáticas en las que interviene el NADH.	20
Figura 4: Reacción de oxidación de etanol catalizada por la enzima ADH en presencia de NAD ⁺ (1). Reacción de oxidación de NADH (2).	22
Figura 5: Modificación de electrodos de carbono vitreo con nanotubos de carbono de multipared.	30
Figura 6: Modificación de electrodos GC-NTC con nitrocompuesto.....	30
Figura 7: Activación de nitrocompuesto encapsulado en electrodos GC-NTC y posterior oxidación electrocatalítica de NADH.	31
Figura 8: Producción de NADH a partir de ADH y posterior medición de NADH generado.	32
Figura 9: Curva de calibración amperométrica para NADH.	32
Figura 10: Estructura Molecular de 4NBPY.	34
Figura 11: Voltamograma cíclico de nitrocompuesto en solución sobre electrodo GC.	35
Figura 12: Voltamograma cíclico de nitrocompuesto adsorbido sobre electrodo GC....	36
Figura 13 :Voltamograma cíclico de nitrocompuesto en solución sobre electrodo GC-NTC.....	37
Figura 14: Voltametría cíclica de nitrocompuesto adsorbido sobre electrodo GC-NTC.....	38
Figura 15: Ecuación 1; Reducción irreversible del grupo nitro al derivado hidroxilamina Ecuación 2; Proceso redox reversible de la oxidación del derivado hidroxilamina al derivado nitroso ⁴²	39
Figura 16: Voltametrías de pulso diferencial de nitrocompuesto adsorbido sobre electrodo GC-NTC.....	39
Figura 17: Gráfico de barras para los valores de corriente de pico obtenidos por voltametría de pulso diferencial.....	40
Figura 18: Voltametrías cíclicas a distintos tiempos de inmersión del electrodo en solución de nitrocompuesto.....	41
Figura 19: Gráfico de corriente de pico de reducción por triplicado vs. tiempo de dipping del electrodo en la solución de nitrocompuesto.	42
Figura 20: Voltametrías cíclicas para el par redox de 4NBPY a diferentes tiempos de medición.....	43

Figura 21: Gráfico tiempo vs. corriente de pico de oxidación del par redox de 4NBPpy y su respectivo ajuste.....	43
Figura 22: Voltametrías cíclica de 4NBPpy a pH 3, 7 y 11.....	45
Figura 23: Voltametrías de pulso diferencial de 4NBPpy para el rango de pH.....	46
Figura 24: Grafica de pH vs potencial de pico de reducción obtenido en la voltametría de pulso diferencial.	47
Figura 27: Voltametrías cíclicas a distintas velocidades para el par redox de 4NBPpy. .	48
Figura 28: Grafica de potencial de pico anódico y catódica en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el par redox de 4NBPpy, en triplicado.....	48
Figura 29: VC de la oxidación de NADH sobre GCE-NTC en buffer B-R 0,1 M pH 7. ...	51
Figura 30: VC de la oxidación de NADH sobre GCE-NTC-med en buffer B-R 0,1 M pH 7.	52
Figura 31: Voltametrías cíclicas para la oxidación de NADH. La línea negra, usando un electrodo GC-NTC-med. La línea roja segmentada, usando un electrodo GC-NTC.....	53
Figura 32: Esquema general del proceso electrocatalítico para la oxidación de NADH.	53
Figura 33: Voltametrías cíclicas de la oxidación electrocatalítica de NADH a diferentes tiempos de reposo.....	55
Figura 34: NADH electrocatalizado, señal I (■) y NADH no electrocatalizado, señal II (●) en función del tiempo de reposo.	56
Figura 35: VC a distintas concentraciones de la solución modificadora de nitrocompuesto, con concentración de NADH 3 mM en buffer B-R pH 7.	57
Figura 36: Influencia de corriente de pico electrocatalítica NADH+med (■) y la corriente de pico de NADH sin electrocatalizar (●) de acuerdo con la concentración de la solución modificadora de nitrocompuesto	58
Figura 37: Voltametrías cíclicas para el par redox de 4NBPpy a diferentes tiempos de medición. Influencia de corriente.....	59
Figura 38: Gráfico tiempo v/s corriente de pico de oxidación del par redox de 4NBPpy y su respectivo ajuste.....	59
Figura 39: Voltametrías cíclicas de la electrocatalisis de NADH a diferentes concentraciones.	61
Figura 40: Influencia de corriente de pico electrocatalítica NADH+med (■) y la corriente de pico de NADH sin electro catalizar (●) de acuerdo con la concentración de NADH en solución.....	62
Figura 41: Curvas i vs.E obtenidas por EDS a distintas velocidades de rotación.	64
Figura 42: Gráfico de corriente límite (i_{lim}) vs. (Velocidad de rotación) ^{0,5} , junto con su respectivo ajuste lineal.....	64

Figura 43: A. VC de buffer SC pH 8,7. B. VC celda de trabajo.	66
Figura 44: La línea negra segmentada, Voltametría cíclica del mediador. La línea roja, Voltametría cíclica de electrocatálisis de NADH enzimático. Concentración de solución de nitrocompuesto de 0,1 mM (A) y 0,42 mM (B).....	66
Figura 45: Voltametrías cíclicas de la electrocatálisis de NADH con 0,42 mM de solución modificadora de nitrocompuesto. Medidas usando el mismo electrodo modificado.....	68
Figura 46: VC electrocatálisis de NADH usando una concentración de la solución modificadora de 0,42 mM. Medidas usando el mismo electrodo modificado.	69
Figura 47: A. Curva de estabilidad de mediador retenido en el electrodo modificado en la celda enzimática. B. Voltametrías cíclicas del mediador a distintos tiempos.	70
Figura 48: Voltametrías cíclicas de electrocatálisis de NADH enzimático en buffer SC pH 8,7 (A) y buffer BR+SC pH 8,7 (B).....	72
Figura 49: VC electrocatálisis de NADH en buffer SC pH 8,7 (A) y en buffer PBS+SC pH 8,7 (B).....	73
Figura 50: VC de NADH en la celda de trabajo (rojo) y VC de NADH 3 mM en buffer PBS 10X pH 8,7 (negro).....	74
Figura 51: VC de electrocatálisis de NADH de la celda de trabajo con 13,2 mM de etanol, usando mediador 0,42 mM.....	75
Figura 52: Curvas Amperométricas a distinto potencial aplicado (A). Curvas de calibración amperométricas (B).....	76
Figura 53: Amperometría (A) y curva de calibración (B) para electrocatálisis de NADH.	77
Figura 54: Amperometría de la celda de trabajo. NADH generado enzimáticamente, en duplicado, usando un electrodo GC-MWCNT(3 mg/mL)-med(0,42mM).....	79
Figura 55: Curvas Amperométricas para las diferentes condiciones experimentales (A). Curvas de calibración amperométricas (B).	80
Figura 56: VC de mediador antes (rojo) y después (negro) de una amperometría para cada condición experimental.....	81
Figura 57: Amperometría (A) y curva de calibración (B) para NADH con mediador 0,42 (negro) mM y 0,85 (rojo).....	83
Figura 58: Amperometría de las celdas enzimáticas con mediador 0,42 mM (A) y 0,85 mM (B).	85

Índice de Tabla

Tabla 1: Datos obtenidos del método.....	49
Tabla 2: Obtención de constante de transferencia heterogénea.....	50
Tabla 3: Pendiente, intercepto y coeficiente de correlación para las curvas de calibración amperométricas a diferentes potenciales de aplicación.....	76
Tabla 4: Pendiente, intercepto y coeficiente de correlación para las curvas de calibración amperométricas para cada configuración experimental.....	80
Tabla 5: Área bajo la curva de la señal de reducción para el mediador antes y después de la amperometría.....	82
Tabla 6: Concentración y recuperación de etanol de la celda enzimática.....	85

5.2.3.	Concentración mínima de mediador para generar electrocatálisis de NADH.	56
5.2.4.	Retención del mediador frente a NADH.....	58
5.2.5.	Influencia de la concentración de NADH en la electrocatálisis.	61
5.2.6.	Coeficiente de difusión de NADH.	63
5.3.	Pruebas enzimáticas.....	65
5.3.1.	Adaptación metodología electroquímica.....	65
5.3.2.	Estabilidad del mediador retenido en el electrodo en presencia del medio enzimático.	67
5.3.3.	Cambio de Buffer y Optimización de condiciones experimentales.	71
5.4.	Medidas amperométricas.....	75
5.4.1.	Detección amperométrica de NADH en electrodo GC-NTC-med.....	75
5.4.2.	Determinación amperométrica de NADH generado enzimáticamente.	78
5.5.	Curvas de calibración y medición de NADH enzimático	82
6.	Conclusión.....	87
7.	Bibliografía.....	88

1. Introducción

Nuestra comprensión del mundo que nos rodea ha sido mejorada en gran parte por la capacidad para detectar y cuantificar analitos. En muchas situaciones, estos analitos requieren una detección inmediata en el lugar de interés con el fin de evaluar su efecto. La entrega rápida de información analítica durante sucesos como catástrofes ambientales, diagnósticos de salud, seguridad alimenticia, entre otros, es clave a la hora de tomar decisiones. Un enfoque excelente, económico y portátil para las mediciones en el lugar de interés es el electroanálisis, específicamente, la utilización de sensores electroquímicos¹.

Desde la primera publicación referida a sensores realizada el año 1975, a la fecha existen cerca de 800.000 artículos relacionados a dichos dispositivos, donde cada año se ha visto un incremento en las publicaciones aludidas a este tema². Tal aumento, se debe a que los métodos analíticos convencionales, como cromatografía y espectroscopia, requieren de pretratamientos de la muestra, extensos tiempos de análisis, reactivos especializados, equipamiento costoso y personal capacitado para su uso³. En este mismo contexto, los sensores se han desarrollado en un enfoque analítico alternativo, siendo una opción prometedora debido a sus ventajas inherentes, tales como son su bajo costo, su rápida entrega de la información, su operación más simple y portabilidad^{4, 5}. Pese a sus destacadas características, muchos de estos sensores no son capaces de entregar una medición completamente exitosa, dado que el análisis fuera del laboratorio proporciona una serie de desafíos, así como lo son la temperatura, la presión, el pH, la humedad y la fuerza iónica⁶.

Teniendo presente lo mencionado con anterioridad, y considerando que las mediciones en muestras reales de los analitos requieren de una alta sensibilidad, selectividad, estabilidad y reproducibilidad del dispositivo⁷, es necesario tener en cuenta que es fundamental para el funcionamiento del sensor que su superficie pueda ser capaz de interactuar de manera estable con el analito y así entregar una medición confiable, independientemente de las condiciones en las cuales se lleve a cabo la determinación.

Para mejorar las mediciones, se han creado una amplia gama de sensores, dentro de los cuales podemos encontrar los sensores químicos. Según la IUPAC, un sensor químico tiene por definición: “un dispositivo que transforma la información química, desde la concentración de un componente de muestra específico hasta el análisis de composición total, en una señal analíticamente útil⁸”. Dicho de otro modo, la información química entregada por el sensor es transformada en una señal medible y de fácil interpretación. En cuanto a la composición de los sensores químicos, estos presentan dos partes básicas: un receptor y un transductor. El receptor obtiene la información química por la reacción química relacionada y le transfiere la energía recolectada al transductor, quien convierte la energía de la información química en una señal analítica útil⁹. Cuando el transductor corresponde a un electrodo, hablamos de sensor electroquímico. La información química es convertida por el electrodo en una señal eléctrica medible, que está relacionada con la concentración del analito en estudio, siendo las respuestas eléctricas más comunes el potencial, la resistencia y la corriente⁵. La *figura 1*, muestra el esquema simplificado de un sensor electroquímico¹⁰.

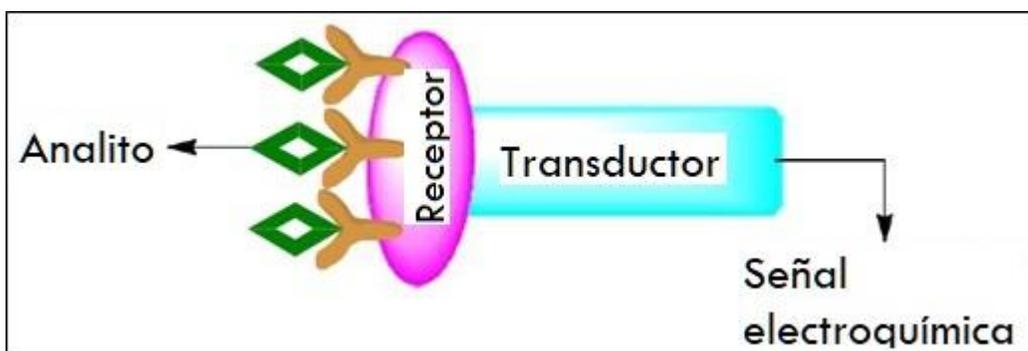


Figura 1: Esquema del funcionamiento de un sensor electroquímico.

Un sistema de análisis electroquímico se compone de tres electrodos: un electrodo de referencia, un electrodo auxiliar y un electrodo de trabajo. Este último es el componente central y determina en gran medida el rendimiento del sensor. En cuanto a los materiales más utilizados que componen un electrodo de trabajo se encuentran el platino, oro, carbono y mercurio¹¹. Estos tipos de electrodos convencionales presentan dificultades en cuanto a la confiabilidad de su medición: i) lenta cinética de reacción en la superficie desnuda del electrodo, que requiere de un alto potencial para proceder la reacción, a tal

punto que en ocasiones se hace necesario la presencia de un catalizador para lograr disminuir el potencial redox; ii) ensanchamiento en las señales redox de los analitos, que generan dificultades al momentos de resolver sus señales electroquímicas, lo que además se complementa con la desaparición de la señal a concentraciones bajas¹². A causa de lo señalado, se han realizado bastantes investigaciones para resolver estos obstáculos, siendo uno de los métodos más prometedores la modificación de la superficie del electrodo.

La integración de nanomateriales en la fabricación de electrodos modificados ha logrado mejorar la superficie de detección. Entre las principales ventajas que exhiben los nanomateriales se encuentran: i) proporcionan un soporte estable, ii) mejoran la cinética de la reacción electroquímica, iii) proporcionan aumento del área de la superficie electroactiva y iv) generan mayor adsorción de los analitos en la superficie. Sin embargo, para que todas las cualidades del nanomaterial cumplan con su objetivo de mejora es imprescindible una adecuada inmovilización en la superficie del electrodo y su posterior funcionalización, pues son pasos claves a la hora de evaluar la eficacia del sensor ¹². Entre los nanomateriales comúnmente usados para la modificación de electrodos podemos mencionar los nanomateriales de metales nobles (oro, plata, platino, paladio, aleaciones bimetálicas entre ellos), de óxidos metálicos (cobre, zinc, titanio, níquel, hierro, cobalto, estaño), a base de carbono (nanotubos de carbono de pared simple (NTCSW) y pared múltiple (NTCMW), grafeno y sus derivados, fullereno) y poliméricos (dendrímeros, polímeros conductores, polímeros molecularmente impresos), siendo estos incluidos en los electrodos a través de métodos como la electrodeposición, polimerización, adsorción física y química^{13, 14}.

Dentro de los nanomateriales usualmente utilizados para la modificación de electrodos, la familia de los nanomateriales de carbono es interesante dadas sus propiedades, tales como: alta conductividad eléctrica, resistencia mecánica, estabilidad química, gran relación superficie/volumen y biocompatibilidad^{12, 13}. La forma y la geometría de los diversos nanomateriales se observan en la *figura 2*¹².

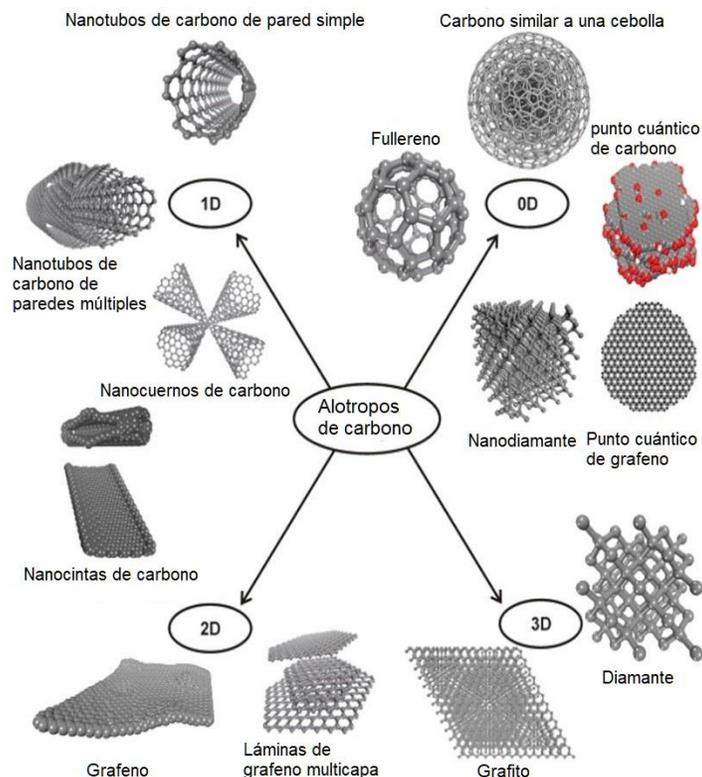


Figura 2: Alótropos de carbono según su dimensionalidad.

Los nanotubos de carbono (CNT) son tubos cilíndricos unidimensionales de átomos de carbono híbridos sp^2 . Tienen un diámetro en el rango de una fracción de nanómetro a decenas de nanómetros y su longitud puede ser de varios centímetros. La relación de aspecto del CNT está en el rango de 100-1000. Los CNT, en función del número de capas de grafeno laminadas, se pueden clasificar en nanotubos de carbono de pared simple (NTCSW) y nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCMW). Los NTCMW consisten en túbulos coaxiales de muchas láminas enrolladas de grafeno que tienen una distancia entre las láminas de alrededor de 0,34 nm. Los NTC muestran unas sorprendentes propiedades de adsorción, eléctricas, mecánicas y térmicas que los convierten en un material atractivo para la fabricación de sensores electroquímicos y biosensores^{12, 15}.

Sin embargo, un factor que limita la utilización y compromete las propiedades únicas de los CNT es su inherente insolubilidad y tendencia para aglomerarse. Una opción para

dar solución a este problema es la funcionalización química de los NTC, incorporando grupos funcionales oxigenados en su estructura¹⁶.

Gracias a las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, hemos podido realizar buenas dispersiones de NTCMW utilizando 1,3-dioxolano como solvente dispersante, sin la necesidad de agregar funcionalidad en el nanomaterial¹⁷.

Dentro de los enfoques que podemos encontrar para la funcionalización de los NTC, se pueden agrupar en modificaciones covalentes y no covalentes. La modificación covalente o química tiene la ventaja de producir anclajes fuertes y estables entre los NTC y las moléculas modificadoras. Sin embargo, esta produce la rehibridación de los átomos de carbono sp^2 a sp^3 , disminuyendo la deslocalización electrónica y, por ende, perturbando las propiedades intrínsecas del material de carbono. En tanto, en la modificación no covalente o física, la adsorción de pequeñas moléculas en la superficie del nanomaterial se realiza a través de interacciones π - π e hidrofóbicas, cuya ventaja es que el nanomaterial de carbono conserva sus propiedades intrínsecas^{18, 19}.

Existen una variada gama de moléculas orgánicas e inorgánicas que podemos incorporar a esta red de NTC, con el fin de mejorar algunas de las propiedades del nanomaterial ya mencionadas. Dentro de estas moléculas están los mediadores. El mediador es una molécula con un par redox que participa activamente en la reacción electroquímica, ayudando con una rápida transferencia de electrones a la superficie del electrodo de trabajo. Normalmente estas moléculas mediadoras se encuentran inmovilizadas en electrodo a través de variadas fuerzas de interacción, pudiendo estar en su forma oxidada o reducida, dependiendo del proceso electroquímico que se lleve a cabo. Se ha visto que estos mediadores han logrado facilitar la detección de variadas moléculas, como por ejemplo glutatión²⁰, peróxido de hidrogeno^{21, 22}, Cromo(VI)²³, glucosa^{24, 25}, insulina²⁶, NADH²⁷⁻³¹, alcoholes^{32, 33}, entre otros^{34, 35}.

Dentro de esta gran gamma de moléculas, el NADH ha atraído gran interés debido a su importante rol en áreas de la bioquímica, química analítica y electroquímica. El NADH, nicotinamida adenina dinucleótido-reducida, es un cofactor que desempeña un papel crucial en las reacciones biológicas como principales transportadores redox en la cadena biológica de transferencia de electrones, dado que muchas enzimas deshidrogenasas,

depende de este cofactor o de su forma oxidada, NAD^+ , para lograr convertir productos como alcohol, aldehídos o carbohidratos. El NADH es una combinación de dos mononucleótidos, monofosfato de adenosina y mononucleótido de nicotinamida, y es un cosustrato soluble, lo que quiere decir que no está unido permanentemente al sitio activo de la enzima. En la siguiente imagen se representa la estructura de la coenzima y la reacción enzimática en general²⁷.

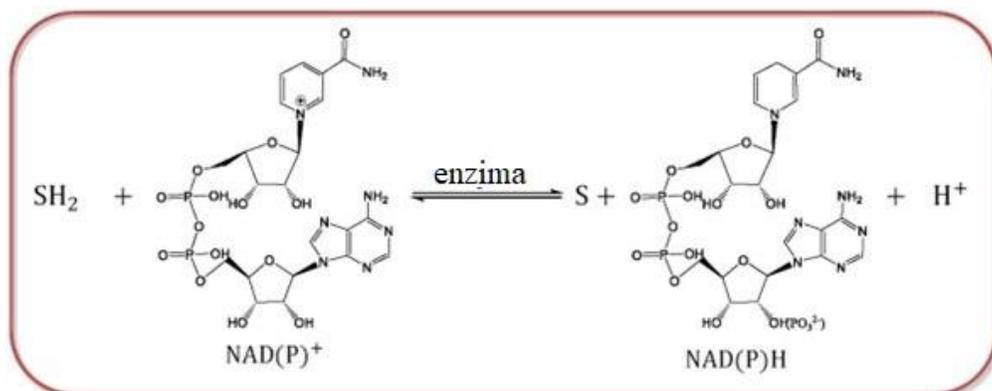


Figura 3: Esquema general de las reacciones enzimáticas en las que interviene el NADH.

Debido a su participación en reacciones enzimáticas, es que muchos estudios se han centrado en la oxidación electroquímica de NADH para desarrollar biosensores enzimáticos dependientes NAD^+ para ser aplicados en distintas áreas³⁶. Aunque se estima que el potencial reversible del par redox NADH/NAD^+ es de 0,32 V³⁷ (vs. NHE), la oxidación electroquímica directa de NADH en electrodos desnudos, como oro, platino y carbono, siempre presenta un alto sobrepotencial (valores superiores a 1 V a pH 7) debido a la lentitud de la cinética de transferencia de carga, lo que limita en gran medida la aplicación práctica de los biosensores, debido al deterioro de la selectividad, reproducibilidad y estabilidad. Un sobrepotencial tan alto también produce algunos atenuadores fisiológicamente inactivos que contaminan las superficies de los electrodos y provocan el ensuciamiento de este, como por ejemplo la fuerte adsorción del NAD^+ ³⁸. Se ha dedicado un esfuerzo considerable a identificar nuevos materiales de electrodos y/o mediadores de transferencia de electrones eficientes para catalizar la oxidación electroquímica de NADH a bajos potenciales, por ejemplo, quinonas, nanopartículas

metálicas, sales orgánicas, compuestos organometálicos, nanomateriales de carbono (NTC, grafeno) con el fin superar las dificultades mencionadas^{39, 40}.

En nuestro laboratorio de investigación, CiPRex, nos hemos centrado en el uso de electrodos de carbono vitreo modificado con NTCMW y mediadores capaces de lograr mejores detecciones de NADH, reduciéndose el potencial de trabajo aplicado necesario para la oxidación del analito a potencial redox formal cercano del mediador, con una eficiencia relativamente mejorada del proceso de oxidación electrocatalítica^{41, 42}.

Se ha encontrado una gran variedad de moléculas capaces de interactuar como mediador frente a NADH donde podemos encontrar derivados de flourenonas, benzoquinonas y naftoquinonas, benzoquinonas diiminas, benzonitrilos, nitrobencenos, fenoles, compuestos de coordinación, entre otros^{43, 44}.

Como se mencionó anteriormente, la molécula de NADH participa en variadas reacciones enzimáticas, lo que la hacen un compuesto atractivo en la fabricación de biosensores enzimáticos dependientes de este cofactor⁴⁵. Las alcohol deshidrogenasas, ADH, pertenecen a la clase de enzimas oxidorreductasas que catalizan la oxidación reversible de alcoholes a los correspondientes compuestos carbonílicos mediante hidrogenación. Este mecanismo de oxidación biocatalítica implica la transferencia de hidruro desde un átomo de carbono sustituido con oxígeno a una molécula de nicotinamida adenina dinucleótido, NAD^+ , dando como productos al compuesto carbonílico proveniente del alcohol y NADH ⁴⁶.

Un alcohol de gran interés es el etanol. Su impacto a nivel celular dentro del organismo, afectando principalmente al hígado y agravando el estrés oxidativo durante su excesivo consumo⁴⁷, así como también sus usos a niveles industriales, en controles de calidad de productos alimenticios en procesos de fermentación y su mayor uso a nivel mundial como biocombustible^{48, 49}, hacen necesaria crear metodologías que puedan detectar esta molécula de manera rápida y sensible. Es aquí donde los biosensores son utilizados para estas mediciones⁵⁰.

La detección de etanol a partir de un biosensor tiene dos vías. La primera, a través de la oxidación del etanol en presencia de oxígeno, reacción catalizada por una enzima alcohol

oxidasa, dando como productos acetaldehído y peróxido de hidrogeno⁵¹; siendo este último el analito para cuantificar por el biosensor, como una medida indirecta de cuantificar la cantidad presente de etanol en la muestra. La segunda, vía por la cual se hizo este trabajo, la enzima ADH cataliza la reacción de oxidación de etanol en presencia de NAD⁺, para dar como productos acetaldehído y NADH^{52, 53}. El NADH es analito que será medido por biosensor, al igual que en método anterior, como una medida indirecta para cuantificar el etanol presente en la muestra, tal como se observa en la siguiente imagen⁵⁴.

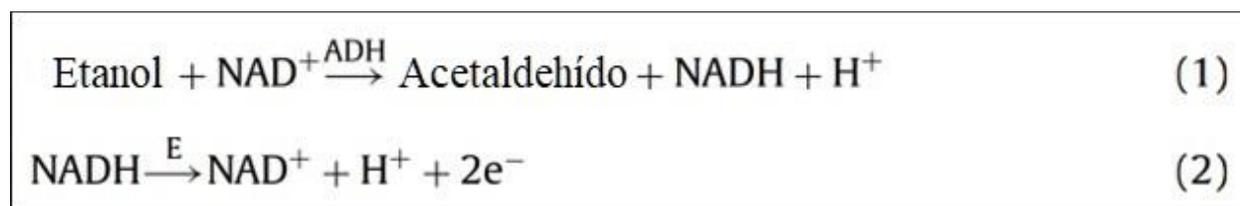


Figura 4: Reacción de oxidación de etanol catalizada por la enzima ADH en presencia de NAD⁺ (1). Reacción de oxidación de NADH (2).

En esta memoria, se estudió un posible mediador electrocatalítico para la oxidación de NADH, siendo este adsorbido en un electrodo de carbono vitreo modificado con NTCMW. Tras su posterior determinación como potencial mediador, se utilizó para detectar NADH generado a partir de la reacción de oxidación de etanol catalizada por ADH en presencia de NAD⁺, usando la técnica de amperometría. Por último, se diseñó una curva de calibración amperométrica para determinar etanol de una muestra de concentración conocida.

2. Hipótesis

La respuesta electrocatalítica de interfaces nanoestructuradas que contienen nanotubos de carbono de multipared y nitrocompuestos aromáticos que se unen de forma no covalente, puede mejorarse mediante la selección adecuada de compuesto nitroaromático con alta conjugación, una disposición adecuada de los grupos nitro y baja solubilidad, como precursor de la pareja mediadora redox R-NHOH / R-NO.

Dicha pareja mediadora será capaz de electrocatalizar la oxidación de NADH, presentando una estabilidad adecuada para su uso como biosensor electroquímico de etanol.

3. Objetivos de la memoria

3.1. Objetivo general

Obtener electrodos modificados con nanotubos de carbono y compuesto nitroaromático activado como modificador REDOX superficial encapsulado, fáciles de preparar, con actividad electrocatalítica hacia la oxidación de NADH y que puedan ser reutilizados. Estudiar y dilucidar el efecto mediador y electrocatalítico sobre compuestos de interés biológico. Aprovechar la electrocatálisis de NADH, para determinar indirectamente etanol producido a partir de la enzima ADH.

3.2. Objetivos Específicos

- Optimizar la preparación de electrodos modificados con nanotubos de carbono y compuesto Nitroaromático activado como modificador REDOX superficiales encapsulado.
- Caracterizar el comportamiento electroquímico del compuesto encapsulado en los electrodos.

- Determinar las condiciones óptimas de electro-catálisis del mediador electroquímicos.
- Determinar el mecanismo electro-catalítico de la interacción entre nanotubos de carbono, mediador y molécula objetivo.
- Determinar las condiciones necesarias para un proceso electro-catalítico en los electrodos modificados.
- Adaptar una metodología bioquímica espectrofotométrica (anexo 1) al sistema electroquímico convencional usado para la oxidación electrocatalítica de NADH.
- Optimizar las condiciones experimentales para producir NADH a partir de la enzima alcohol deshidrogenasa.
- Determinar la concentración de etanol a partir del NADH producido enzimáticamente.

4. Materiales y Métodos

4.1. Reactivos y Solventes

- 4-nitrobenzoato de 4-(piren-1-il)butilo. Sintetizado anteriormente en el laboratorio.
- 1,3 – Dioxolano 99,75% Sigma Aldrich.
- Acetonitrilo 99,% p.a. Merck.
- Ácido Acético Glacial Merck.
- Ácido Bórico 99,5% Merck.
- Ácido Clorhídrico 36% Merck.
- Ácido Orto-Fosfórico 85% Merck.
- Agua desionizada Milli-Q.
- Etanol absoluto 99,5% Merck.
- Hidróxido de Sodio 98% Merck.
- Nitrógeno extra puro 99,9%.
- Nanotubos de Carbono Multipared 95% de C, DropSens.
- Nicotinamida Adenina Dinucleótido, Hidrato de sal disódica reducido 97% Sigma Aldrich (CAS: 606-68-8).
- Nicotinamida Adenina Dinucleótido, sal sódica 95% Sigma Aldrich (CAS:20111-18-6).
- Enzima Alcohol Deshidrogenasa.
- Pirofosfato de Sodio 95% Sigma Aldrich.
- Fosfato mono ácido de sodio dihidratado.
- Fosfato di ácido de sodio.
- Cloruro de sodio.
- Clorhidrato de Semicarbazida 99% Sigma Aldrich.
- Glicina.

4.2. Equipos

Equipos de uso general:

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

Equipos Voltamétricos y computacional:

- Equipo Potenciostato BAS CV-100W.
- Equipo Potenciostato de 4 Canales, PalmSens.
- Equipo Potenciostato CHInstrument 650c y 650e.
- Celda Electroquímica:
 - Celda electroquímica: BAS (10 mL)
 - Electrodo de Trabajo: Carbono vítreo y carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de multipared.
 - Soporte de carbono vítreo, como electrodo de trabajo: Ted Pella, INC.
 - Electrodo de Referencia: Ag/AgCl KCl 3M
 - Electrodo Auxiliar: Alambre de Platino.

4.3. Métodos

4.3.1. Preparación de Soluciones

- Soluciones Tampón:
 - Buffer Britton Robinson 0,1 M: En un matraz de 500 mL, se agregaron 3,09 g de ácido bórico que se disuelven en una pequeña cantidad de agua Milli-

Q. Luego se agregan 4 mL de ácido orto-fosfórico y 2,85 mL de ácido acético glacial. Se vuelve agregar agua Milli-Q y se lleva al sonicador por 10 minutos para eliminar burbujas. Por último, se completa el aforo.

- Buffer Semicarbazida 0,125 M: En un matraz de 25 mL, se agregaron 0,208 g de clorhidrato de semicarbazida, 0,831 g de pirofosfato de sodio y 0,039 g de glicina que se disuelven en agua Milli-Q. Luego se lleva al sonicador por 10 minutos para eliminar burbujas y se completa el aforo. Se ajusta el pH a un valor de 8,7.
- Buffer Fosfato salino 0,1 M: En un matraz de 25 mL, se agregaron 0,307 g de fosfato mono ácido sódico y 0,039 g de fosfato di ácido sódico, disolviéndose en agua Milli-Q. Luego se lleva al sonicador por 10 minutos para eliminar burbujas y se completa el aforo. Se ajusta el pH a un valor de 8,7.
- Buffer Fosfato salino 10X: En un matraz de 500 mL, se agregaron 8,9 g de fosfato mono ácido de sodio dihidratado, 1,2 g de fosfato di-ácido de sodio, 40 g de cloruro de sodio y 2 g de cloruro de potasio, disolviéndose en agua Milli-Q. Se lleva al baño de ultrasonido por 10 minutos para eliminar burbujas y se completa el aforo. Se ajusta el pH a 8,7.
- Buffer B-R+SC, PBS+SC, PBS 10X+SC: Los tres buffers fueron preparadas adicionando semicarbazida hasta lograr una concentración de este de 0,075 M.

- Soluciones stock de nitrocompuestos:

Se prepararon 10 mL de solución stock de 4NBP y 0,28 mM en acetonitrilo y 10 mL de solución stock 0,85 mM en 1,3-dioxolano. Las soluciones se almacenan refrigeradas hasta el momento de su uso.

- Solución stock de NADH:

Se prepararon 5 mL de solución stock de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7 y solución stock de NADH 3 mM y 15 mM en buffer PBS 10X+SC pH 8,7. Estas

soluciones se prepararon en el momento de su uso, manteniéndose sin aire por inyección de N₂ en el frasco contenedor.

- Solución stock de NAD⁺

Se preparó 1 mL de solución stock de NAD⁺ 50 mM en buffer SC pH 8,7 y en buffer PBS 10X+SC pH 8,7. Posteriormente se almacena congelada hasta el momento de su uso.

- Solución stock de ADH:

Se prepararon 10 mL de solución stock de ADH 0,25 mg/mL en buffer SC pH 8,7 y 2 mg/mL en buffer PBS 10X+SC. Posteriormente el buffer se almacena congelado hasta el momento de su uso.

- Solución stock de Etanol:

Se prepararon 10 mL de soluciones de etanol de composición 1:10, 1:100 y 1:500, tomando alícuotas de 0,1 mL, 0,01 mL o 0,005 mL de etanol absoluto, respectivamente disuelto en agua Milli-Q.

- Soluciones de Trabajo:

Según el experimento a realizar, la celda electroquímica se prepara de las siguientes maneras:

1. Se emplearon 5 mL de solución Buffer B-R, ajustado pH 7, para los experimentos de estudio electrocatalítico.
2. Se emplearon 5 mL de solución de NADH 3 mM pH 7, para los experimentos de estudio electrocatalítico.
3. Se emplearon 1 mL de solución Buffer SC pH 8,7 y, para los experimentos de adaptación metodología electroquímica.
4. Se emplearon 1 mL de solución Buffer B-R pH 8,7+SC, 1 mL de solución Buffer PBS+SC pH 8,7 y 1 mL de solución Buffer PBS 10X+SC pH 8,7, para los experimentos cambio de Buffer.

5. Se emplearon 3 mL de solución Buffer PBS 10X+SC pH 8,7 para los experimentos amperométricos.

4.3.2. Desarrollo Experimental

- **Dispersión de nanotubos de carbono multipared:**
En un Eppendorf, se pesa 1 mg o 3 mg de NTCMW y se agrega 1 mL de 1,3-dioxolano, para generar una dispersión de concentración 3 mg/mL o 1 mg/mL, respectivamente. La dispersión es sonicada 3 veces por períodos de 5 minutos. Entre cada período, la dispersión es agitada en vortex.
- **Modificación de electrodo de carbono vítreo con nanotubos de carbono multipared:**
En todos los experimentos se usaron electrodos de carbono vítreo. Los electrodos fueron previamente pulidos con alúmina de 0,3 y 0,05 μm y lavados con agua Milli-Q. La modificación se realiza utilizando la dispersión de nanotubos de carbono descrita anteriormente. Para ello, se toma una alícuota de 5 μL y se deposita en la superficie del electrodo. Los electrodos son secados hasta la evaporación del agente dispersante a temperatura ambiente. Se obtiene un electrodo denominado GC-NTC. La *figura 5* muestra el desarrollo experimental descrito.

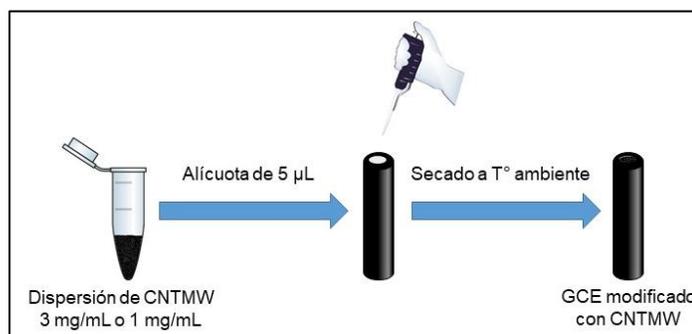


Figura 5: Modificación de electrodos de carbono vitreo con nanotubos de carbono de multipared.

- Modificación de electrodos GC-NTC con nitrocompuesto:

Los electrodos GC-NTC son sumergidos en una solución de nitrocompuesto en 1,3-dioxolano o acetonitrilo de concentración conocida. Se establece un tiempo de 1 minuto de inmersión. Posteriormente, el electrodo se lava con abundante agua Milli-Q para luego ser sumergido en la celda con buffer B-R pH 7, como se muestra en la *figura 6*. Se obtiene un electrodo del tipo GC-NTC-NO₂.

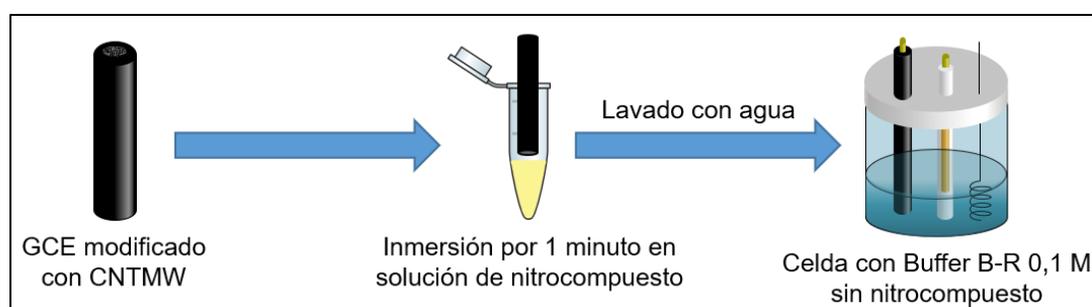


Figura 6: Modificación de electrodos GC-NTC con nitrocompuesto.

- Experimento de electrocatálisis de NADH:

Una vez realizada la modificación descrita en el punto anterior, se utiliza el nitrocompuesto atrapado en los NTC como precursor del mediador en la reacción de oxidación de NADH.

El GC-NTC-NO₂ es sumergido en una celda con buffer B-R pH 7, donde el nitrocompuesto es activado electroquímicamente para generar el par redox hidroxilamina/nitroso correspondiente (mediador). Luego, el electrodo GC-NTC-med es sumergido en una celda con NADH a una concentración dada en buffer B-R pH 7, y se aplica un barrido de potencial que permite la oxidación NADH en presencia de mediador. El proceso desarrollado es ilustrado en la *figura 7*.

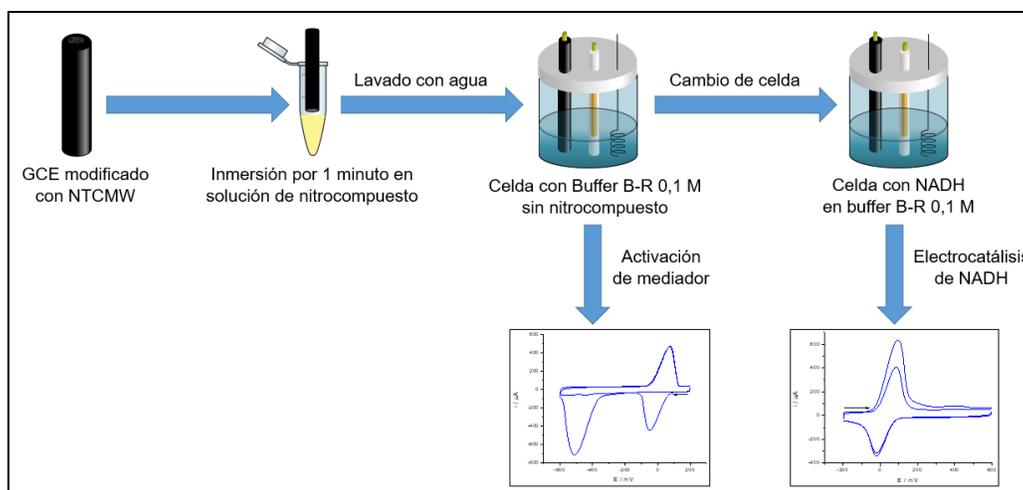


Figura 7: Activación de nitrocompuesto encapsulado en electrodos GC-NTC y posterior oxidación electrocatalítica de NADH.

- Producción de NADH vía proceso enzimático a partir de la metodología espectrofotométrica⁵⁵:

Para la generación de NADH a partir de la enzima ADH, se mezclaron en un Eppendorf 1 mL de buffer SC pH 8,7, 0,5 mL de solución stock de enzima ADH, 0,1 mL de solución stock de 50 mM de NAD⁺ y 0,01 mL de etanol absoluto diluido (1:10). Este fue incubado en un baño termostático a 35 °C por un tiempo de 40 minutos. Transcurrido el tiempo, la solución fue vertida a una celda, donde se midió la respuesta electroquímica de NADH, utilizando la metodología descrita en el apartado “*Experimento de electrocatalisis de NADH*”.

- Producción de NADH vía proceso enzimático, metodología electroquímica:

Para la generación de NADH a partir de la enzima ADH, se mezclaron en un Eppendorf; 1 mL de buffer PBS 10X+SC pH 8,7, 0,1 mL de solución stock de enzima ADH, NAD⁺ y etanol diluido 1:100, dependiendo de la elección del reactivo limitante para determinado experimento, se ajustaron las proporciones de estos dos últimos reactivos. La solución fue incubada en un baño termostático a 35 °C por un tiempo de 40 minutos. Transcurrido el tiempo, la solución fue vertida a

una celda, donde se midió la respuesta electroquímica de NADH, usando voltametría cíclica, utilizando los electrodos GC-NTC y GC-NTC-med. El proceso de preparación de la celda enzimática y su posterior medición se ilustra en la *figura 8*.

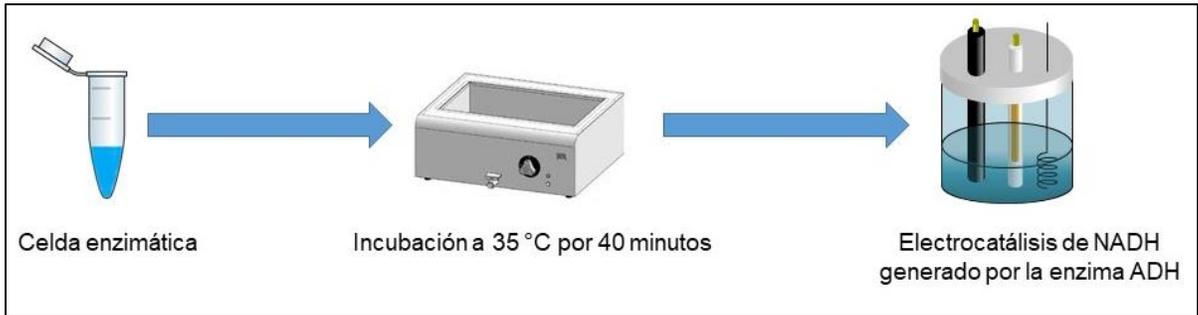


Figura 8: Producción de NADH a partir de ADH y posterior medición de NADH generado.

- Curva de calibración amperométrica:

Para la curva de calibración amperométrica, se utilizó una celda con 3 mL de buffer PBS 10X+SCpH 8,7, utilizando un electrodo GC-NTC-med con una dispersión de NTC 1 mg/mL y una concentración de mediador de 0,85 mM. Se agregaron alícuotas de 40 μ L de concentración 15 mM de NADH, con agitación y a un potencial de 30 mV. Se espera 60 segundos para estabilizar la corriente. La alícuotas se agregaron cada 60 segundos. La *figura 9* ilustra el desarrollo el experimento.

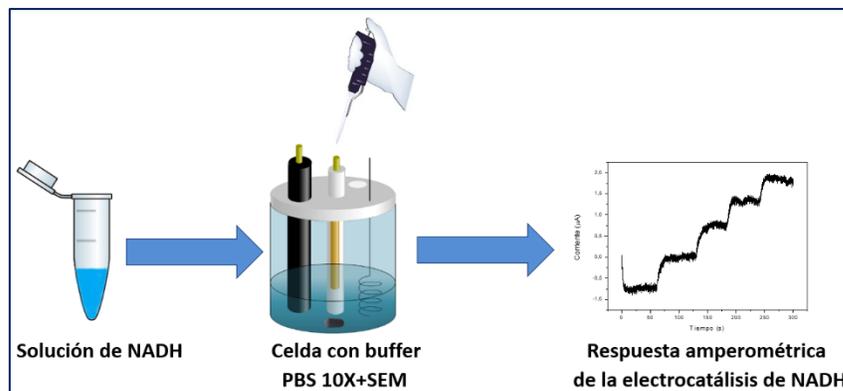


Figura 9: Curva de calibración amperométrica para NADH.

- Determinación de etanol en una muestra enriquecida:

Para la determinación de etanol en una muestra enriquecida, se preparó la celda enzimática con 3 mL de buffer PBS 10X+SC pH 8,7, 0,05 mL de NAD⁺ 50 mM, 0,05 mL de enzima ADH 2 mg/mL y 0,01 mL de etanol 1:500. La celda fue incubada como se describió en el apartado “*producción de NADH vía proceso enzimático, metodología electroquímica*”. Transcurrido el tiempo, se midió el NADH generado bajo las mismas condiciones amperométricas descritas en el apartado “*curva de calibración amperométrica*” utilizando la curva de calibración para NADH.

5. Resultados y Discusión

5.1. Estudio Electroquímico

5.1.1. Caracterización electroquímica del nitrocompuesto.

El nitrocompuesto estudiado corresponde a 4-nitrobenzoato de 4-(piren-1-il) butilo (4NBPY), cuya estructura molecular se observan en la figura 10.

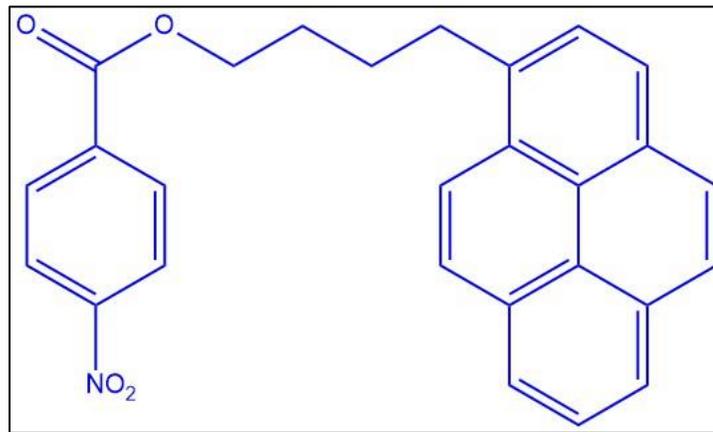


Figura 10: Estructura Molecular de 4NBPY.

A) Caracterización electroquímica de nitrocompuesto usando electrodo GC.

El estudio electroquímico de los nitrocompuestos se realizó utilizando la técnica de voltametría cíclica. Para ello se preparó una celda con medio mixto 70% buffer B-R pH 7 - 30% solución de nitrocompuesto en acetonitrilo, obteniéndose una concentración final de 0,087 mM de nitrocompuesto. El electrodo GC fue mojado con etanol, lavado con agua y puesto en la celda, donde se esperó 1 minuto antes de aplicar el barrido de potencial. Se obtuvieron las respuestas electroquímicas por VC, cuyos voltamogramas se muestran en la *figura 11*, para el nitrocompuesto.

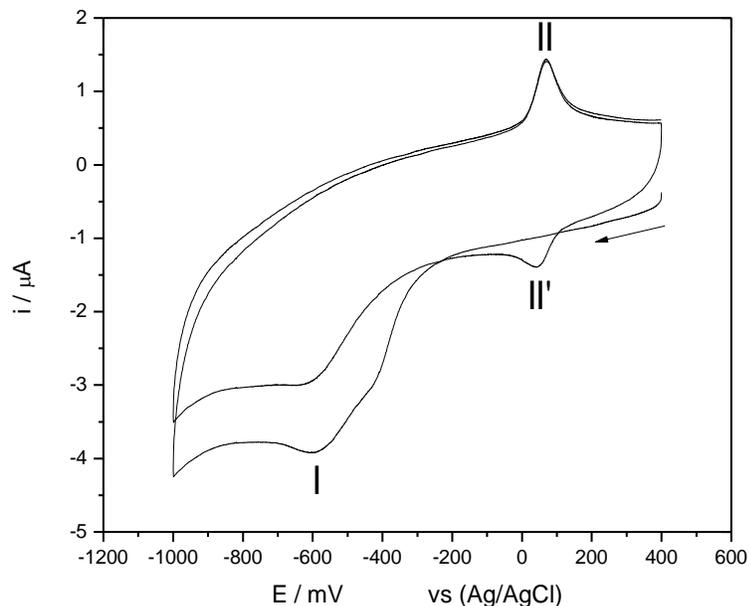


Figura 11: Voltamograma cíclico de nitrocompuesto en solución sobre electrodo GC.

En la *figura 11*, se observa en el primer barrido la señal irreversible correspondiente a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina (señal I), con un potencial de reducción cercano a los -600 mV. La misma señal vuelve a aparecer en el segundo barrido de reducción, dado que el nitrocompuesto difunde desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo. Además, se observa la señal reversible perteneciente al par redox hidroxilamina/nitroso (señal II y II'), con un potencial de oxidación de 70 mV y de reducción de 40 mV, aproximadamente⁵⁶.

También se realizaron medidas con solución modificadora de nitrocompuesto 0,087 mM, donde el electrodo GC fue sumergido por 1 minuto, lavado con agua y llevado a la celda con buffer B-R pH 7. Las medidas obtenidas de VC se muestran en la *figura 12*.

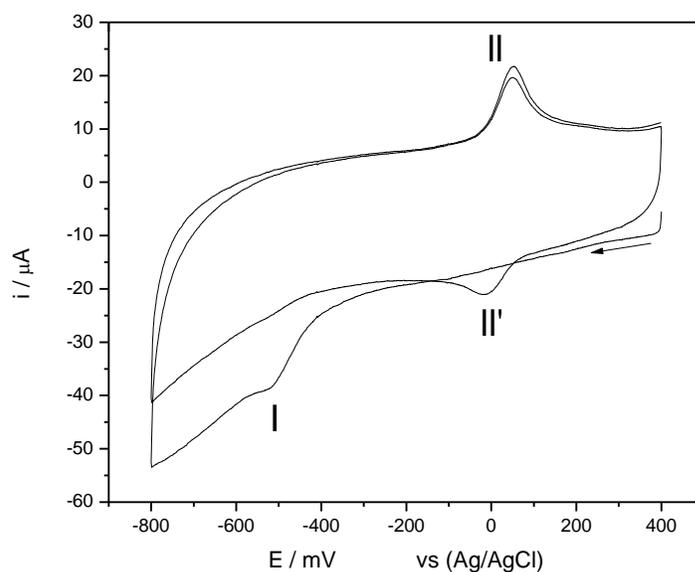


Figura 12: Voltamograma cíclico de nitrocompuesto adsorbido sobre electrodo GC.

En la *figura 12*, se observa una señal irreversible asociada al proceso de reducción del grupo nitro, con un potencial de reducción cercano a -520 mV (señal I), producto del primer barrido. En el segundo barrido y tercer barrido es posible ver un par de señales reversibles, las cuales corresponden al proceso oxidación-reducción del par redox reversible con un potencial de oxidación 50 mV y un potencial de reducción de -15 mV, aproximadamente.

A diferencia del VC anterior, no es posible ver la misma señal de reducción irreversible en el segundo barrido de potencial, dado que en el medio no existe nitrocompuesto que pueda difundir a la superficie del electrodo.

B) Caracterización electroquímica de nitrocompuesto usando electrodo GC-NTC.

Se estudió el comportamiento electroquímico del nitrocompuesto, sobre electrodo GC-NTC. Del mismo modo se preparó una celda con medio mixto 70% buffer B-R pH 7 - 30% solución de nitrocompuesto en acetonitrilo, de concentración final 0,087 mM de nitrocompuesto. El electrodo GC-NTC fue mojado con etanol, lavado con agua y puesto

en la celda, donde se esperó 1 minuto antes de aplicar el barrido de potencial. El voltamograma obtenido que se muestra en la *figura 13*.

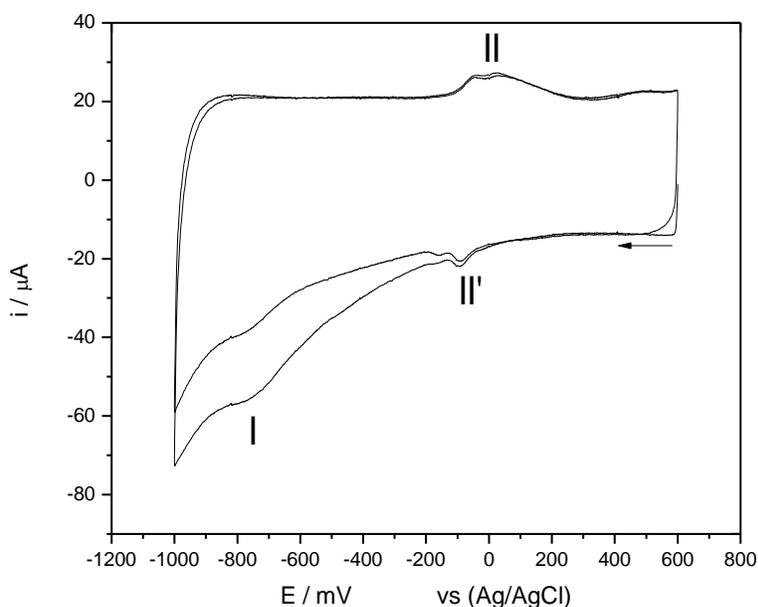


Figura 13: Voltamograma cíclico de nitrocompuesto en solución sobre electrodo GC-NTC.

En el voltamograma es posible observar una corriente capacitiva generada por los NTC de $40 \mu\text{A}$. En el primer barrido, se observa una pequeña señal asociada a la reducción del grupo nitro en -760 mV , señal que vuelve a aparecer en el segundo barrido de reducción, debido a la difusión del nitrocompuesto hacia la superficie del electrodo modificado. Asimismo, se observa la señal reversible perteneciente al par redox hidroxilamina/nitroso (señal II y II'), con un potencial de oxidación de -30 mV y de reducción de -90 mV , aproximadamente.

A su vez, se realizaron medidas con solución modificadora de nitrocompuesto $0,087 \text{ mM}$. El electrodo GC-NTC fue sumergido por 1 minuto en dichas soluciones, lavado con agua y llevado a la celda con buffer B-R pH 7. El voltamograma del experimento es presentado en la *figura 14*.

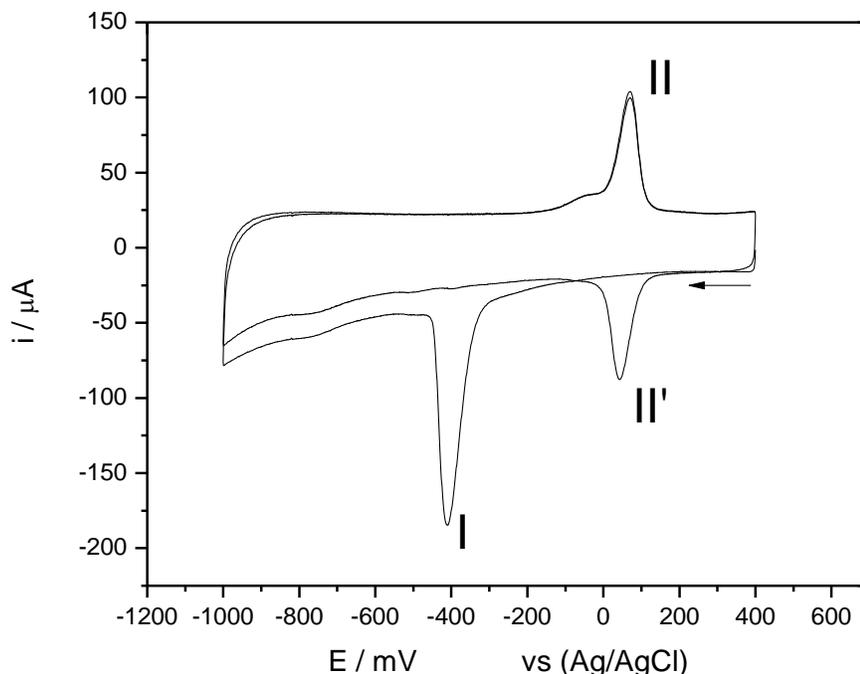


Figura 14: Voltametría cíclica de nitrocompuesto adsorbido sobre electrodo GC-NTC.

En el voltamograma es posible observar una corriente capacitiva generada por los NTC de $50 \mu\text{A}$. En el primer barrido, se observa una gran señal asociada a la reducción del grupo nitro en -410 mV , señal que desaparece en el segundo barrido de reducción, debido al agotamiento del compuesto electroactivo adsorbido en la superficie del electrodo modificado. Es posible, además, observar la señal reversible perteneciente al par redox hidroxilamina/nitroso (señal II y II'), con un potencial de oxidación de 69 mV y de reducción de 43 mV , aproximadamente.

La primera reacción de reducción, del grupo nitro a hidroxilamina, implica una transferencia de 4 electrones (*Ecuación 1*), mientras que, en la segunda reacción de reducción, del grupo nitroso a hidroxilamina, se transfieren 2 electrones (*Ecuación 2*). De esta manera, se puede apreciar una relación directa entre los electrones transferidos de la reacción y la intensidad de la corriente, generando en la primera reducción el doble de corriente con respecto a la segunda reducción⁵⁷.



Figura 15: Ecuación 1; Reducción irreversible del grupo nitro al derivado hidroxilamina
Ecuación 2; Proceso redox reversible de la oxidación del derivado hidroxilamina al derivado nitroso⁴².

5.1.2. Repetibilidad Inter Electrodo.

Se estudió la repetibilidad inter-electrodo, llevando a cabo medidas de voltametría de pulso diferencial del proceso de reducción del grupo nitro a hidroxilamina. Los electrodos fueron preparados según el método ya descrito en el apartado 4.3.2, con una concentración de la solución modificadora de nitrocompuesto de 0,12 mM en acetonitrilo.

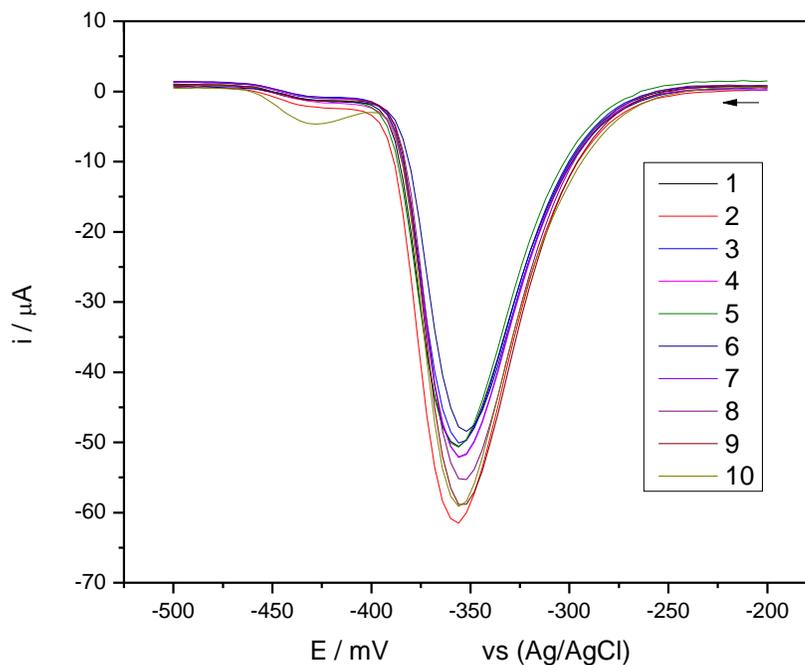


Figura 16: Voltametrías de pulso diferencial de nitrocompuesto adsorbido sobre electrodo GC-NTC.

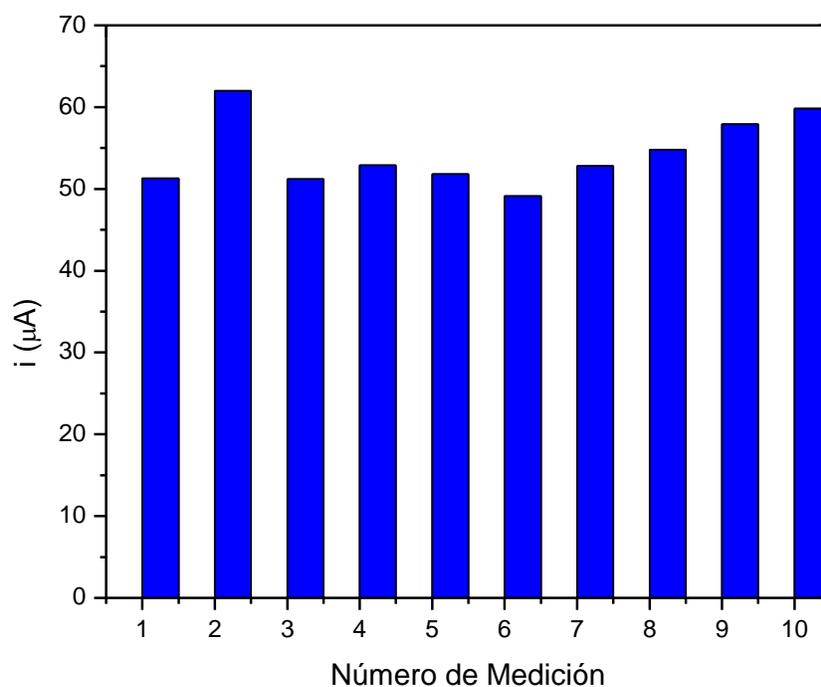


Figura 17: Gráfico de barras para los valores de corriente de pico obtenidos por voltametría de pulso diferencial.

Se muestra en la *figura 16*, los voltamogramas de pulso diferencial del grupo nitro, con un potencial de reducción promedio de -355 ± 1 mV.

A su vez, se obtuvo un coeficiente de variación asociado a la corriente de las 10 mediciones igual a 7,73% (*figura 17*), indicando que la metodología de modificación de electrodos por esta vía es bastante reproducible, generando así electrodos modificados muy similares entre ellos.

5.1.3. Influencia del tiempo de dipping del electrodo en la solución modificadora.

Se estudió el efecto del tiempo de inmersión o dipping del electrodo GC-NTC en la solución de nitrocompuesto, con el fin de establecer el tiempo óptimo de inmersión para la modificación de los electrodos. Para ello, se tomaron 3 electrodos modificados para

obtener datos en triplicado, los cuales fueron sumergidos juntos en solución de nitrocompuesto 0,14 mM, para luego hacer la medición electroquímica en Buffer B-R pH 7. Posteriormente, los electrodos son nuevamente modificados con NTC y utilizados en otro rango de tiempo de inmersión. El rango de tiempo utilizado fue desde 30 segundos hasta 8 minutos.

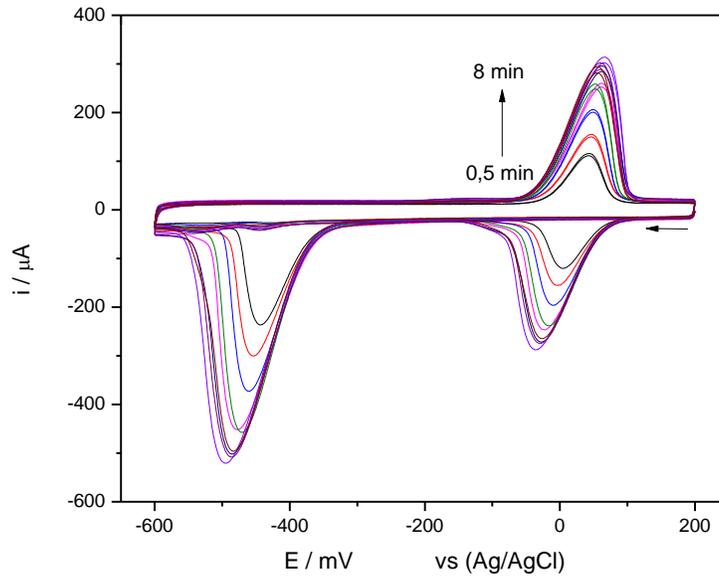


Figura 18: Voltametrías cíclicas a distintos tiempos de inmersión del electrodo en solución de nitrocompuesto.

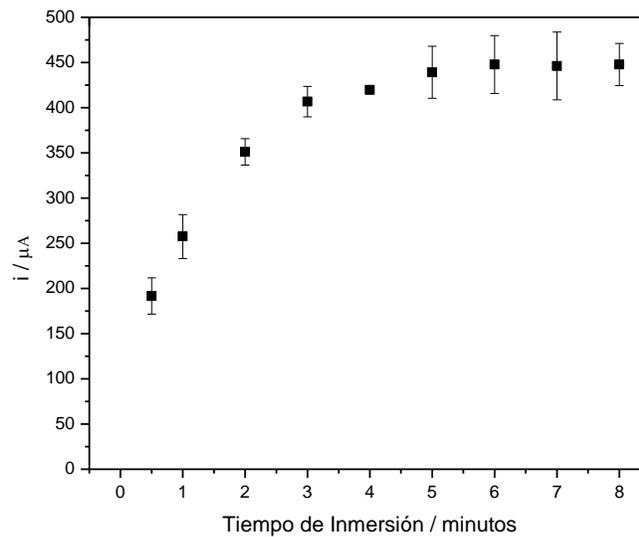


Figura 19: Gráfico de corriente de pico de reducción por triplicado vs. tiempo de dipping del electrodo en la solución de nitrocompuesto.

En la *figura 18*, se observa un aumento de la corriente de pico de la reducción del grupo nitro, a medida que el tiempo de inmersión aumenta hasta 4 minutos. A tiempo superiores, la corriente de pico tiende a mantenerse constante de 450 μA (*figura 19*).

Se definió como tiempo óptimo de inmersión 2 minutos, dado que con este tiempo se alcanza un 78% de la corriente máxima. Sin embargo, para experimentos posteriores se definió 1 minuto, dado que la diferencia de intensidad de corriente entre ambos tiempos es solo del 20%. Además, se evita que el electrodo modificado permanezca un tiempo mayor en contacto con el solvente de la solución de nitrocompuesto. A mayor tiempo de contacto del electrodo con el solvente orgánico se observó que la pérdida de NTC del electrodo modificado ocurre con mayor frecuencia.

5.1.4. Retención del mediador en el electrodo modificado.

Se realizó el estudio de la retención del mediador en el electrodo modificado, con el fin de evaluar cuánto es la disminución de la corriente y conocer su comportamiento. Para lo anterior, se modificó un electrodo GC-NTC, usando una concentración de nitrocompuesto de 0,6 mM, sumergido por 1 minuto, para luego generar el par redox reversible en buffer B-R pH 7. Las medidas de voltametría cíclicas fueron realizadas cada 5 minutos, manteniendo el mismo electrodo sumergido en la celda de trabajo.

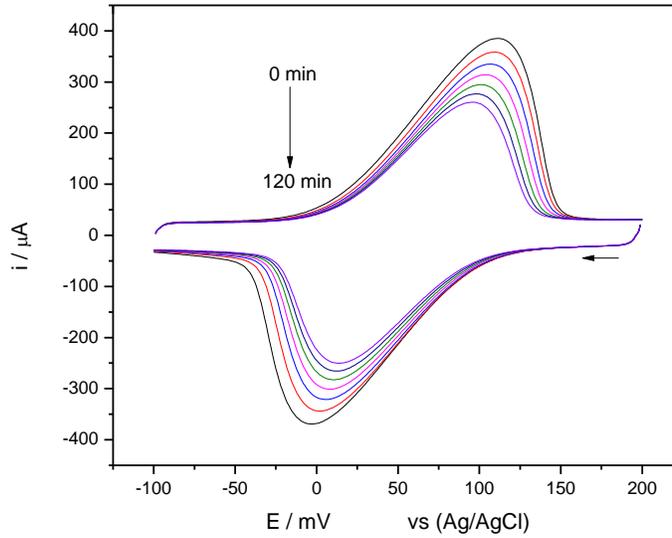


Figura 20: Voltametrías cíclicas para el par redox de 4NBPY a diferentes tiempos de medición.

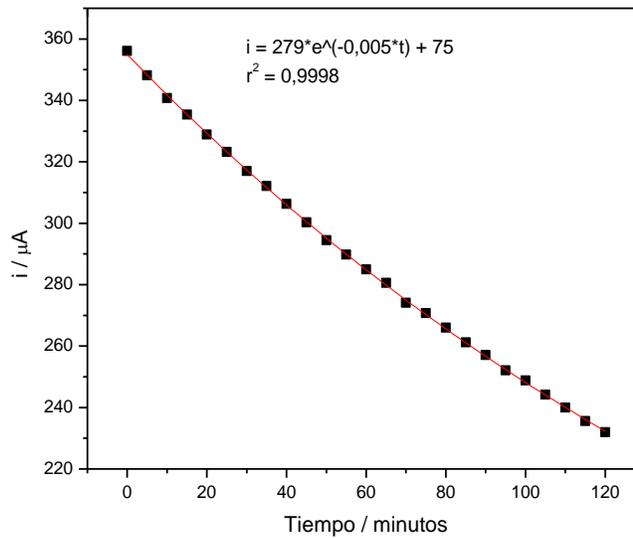


Figura 21: Gráfico tiempo vs. corriente de pico de oxidación del par redox de 4NBPY y su respectivo ajuste.

Se observa en la *figura 20* una disminución en la intensidad de corriente de ambos procesos, la cual disminuyó a un 67,61% de la corriente inicial luego de transcurrir 2 horas desde la primera medición.

Se obtuvo el ajuste correspondiente al decaimiento de la corriente de pico en función del tiempo (*figura 21*), el cual tuvo su mejor descripción con ajuste exponencial de orden 1, descrito en la *ecuación 3*, cuyo parámetro de mayor importancia es el parámetro k , definido como la constante de decaimiento. Este valor indica la rapidez con que disminuye la corriente, relacionada directamente con la concentración de analito en el electrodo, cuyo valor es de $0,005 \text{ min}^{-1}$.

$$\text{Ajuste del decaimiento} \quad i = A * e^{-kt} + B \quad \text{ecuación 3}$$

Donde:

- i : Corriente de pico anódica a tiempo t del mediador, expresada en μA .
- A : Corriente perdida a tiempos largos, expresada en μA .
- k : Constante de decaimiento; $0,005 \text{ min}^{-1}$.
- t : Tiempo de medida, expresado en minutos.
- B : Corriente anódica cuando t tiende a infinito, expresada en μA .

A partir del ajuste, se puede inferir que, a tiempos muy largos, la corriente tiende a ser igual al valor de B , correspondiente a $75 \mu\text{A}$. Este parámetro indica que, tras múltiples mediciones, usando el mismo electrodo, la corriente no disminuirá de $75 \mu\text{A}$. Este comportamiento es debido al encapsulamiento del nitrocompuesto en la red de nanotubos, siendo fuertemente retenidos en el electrodo. Sin embargo, otras moléculas de nitrocompuesto son retenidas en la superficie de los nanotubos, estando en contacto con la solución y por ende siendo desplazadas en menor tiempo al seno de la solución.

El parámetro A indica la corriente perdida a tiempos largos cuyo valor según el ajuste, corresponde a $279 \mu\text{A}$. De esta manera, la corriente de pico disminuirá a un $78,76\%$. La suma de los parámetros A y B dan cuenta de la corriente inicial. A partir de los datos obtenidos, se calculó el tiempo de vida media cuyo valor es de 138 minutos.

5.1.5. Estudio de pH del nitrocompuesto.

El efecto del pH de la respuesta electroquímica de la reducción de 4NBP_y se estudió mediante voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial con el nitrocompuesto inmovilizado en el electrodo. Se preparó un set de buffer B-R en el rango de pH de 2 a 11.

Para ambos experimentos, se usaron distintos electrodos GC-NTC modificados con solución de nitrocompuesto 0,12 mM, con tiempo de inmersión de 1 minuto.

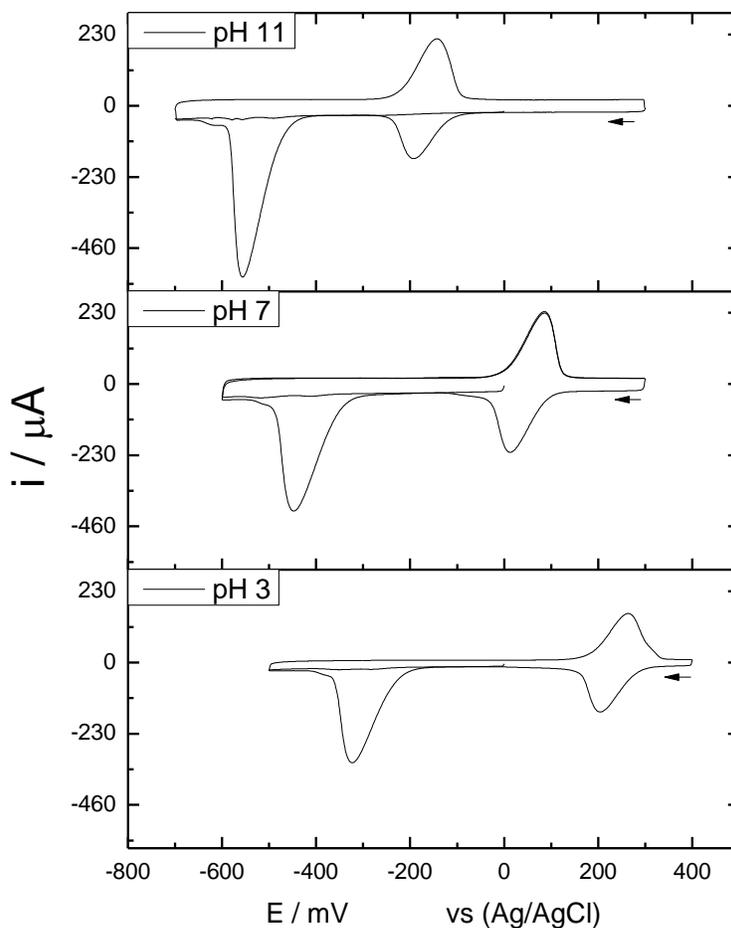


Figura 22: Voltametrías cíclica de 4NBP_y a pH 3, 7 y 11.

En la *figura 22* se muestra la voltametría cíclica de 4NBP_y a pH 3, pH 7 y pH 11. Se observa un desplazamiento en el potencial de pico tanto en la reducción del grupo nitro

como en el par redox, hacia potenciales más negativos a medida que el pH aumenta de valor.

Este comportamiento se debe a que el mecanismo de reducción del grupo nitro depende de la concentración de protones existente en el medio. Por ende, a una mayor concentración de protones, pH más bajo, la reducción requiere una menor energía, implicando valores de potencial más cercanos a 0 V.

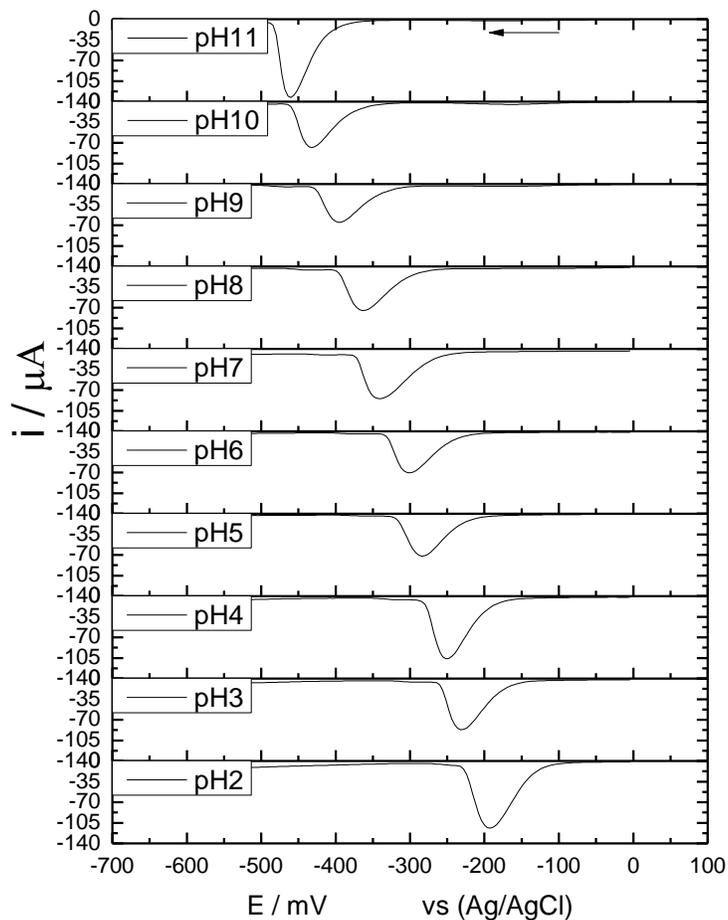


Figura 23: Voltametrías de pulso diferencial de 4NBPY para el rango de pH.

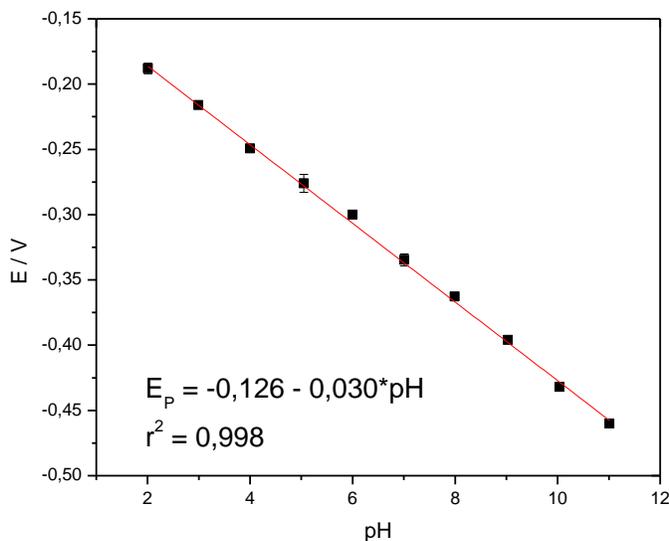


Figura 24: Grafica de pH vs potencial de pico de reducción obtenido en la voltametría de pulso diferencial.

De manera similar al comportamiento en voltametría cíclica, en los voltamogramas de pulso diferencial (*figura 23*) se observa un desplazamiento a valores de potencial más negativos a medida que el pH del buffer aumenta.

Se encontró un ajuste lineal para todo el rango de pH estudiado, lo cual señala que el mecanismo de reducción del grupo nitro a hidroxilamina no varía con el pH^{58, 59} (*figura 24*).

5.1.6. Determinación de la constante de transferencia heterogénea.

Con el objetivo de obtener la constante de transferencia heterogénea de 4NBPY, se estudió el efecto de la velocidad de barrido en el proceso redox por medio de voltametría cíclica.

Esta constante puede ser calculada de forma experimental a través del método de Laviron^{41, 60}, el cual se puede aplicar a especies electroactivas adsorbidas en el electrodo. Para lograr calcular la constante, es necesario estimar el coeficiente de transferencia de carga α , parámetro que indica la simetría de la barrera energética de la reacción redox⁶¹.

Para aplicar el método de Laviron, se debe medir el potencial de pico anódico y catódico a diferentes velocidades de barrido (figura 27). A partir de estos datos se grafica E_p vs el logaritmo de la velocidad de barrido (figura 28).

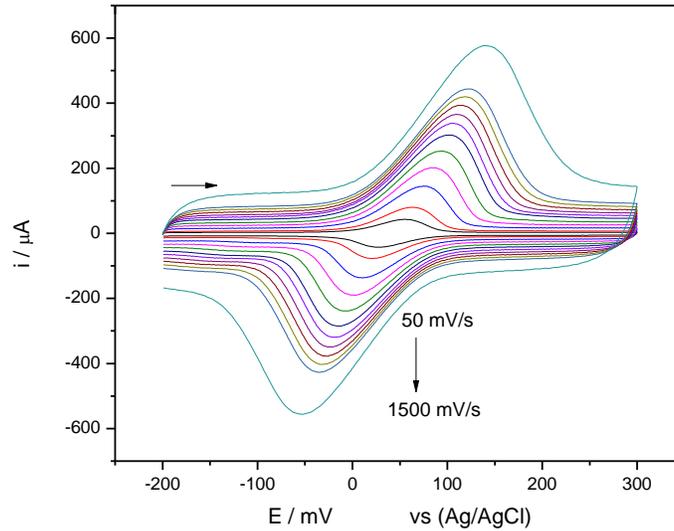


Figura 27: Voltametrías cíclicas a distintas velocidades para el par redox de 4NBPY.

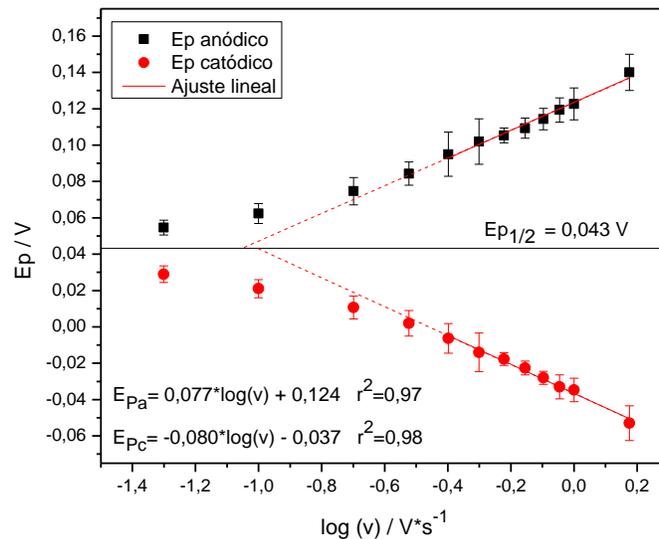


Figura 28: Grafica de potencial de pico anódico y catódico en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el par redox de 4NBPY, en triplicado.

De acuerdo con el método de Laviron, se deben usar los datos con $\Delta E_P > (200/n)$ mV, siendo n el número de electrones implicados en la reacción redox, los cuales son 2. Por ende, los datos a utilizar en el ajuste lineal, corresponde a los datos con $\Delta E_P > 100$ mV. Los datos de las regresiones lineales se muestran en la *figura 28*, cuyas pendientes se usarán en las ecuaciones 4 y 5, para obtener los coeficientes de transferencia de carga anódico (α_A) y catódico (α_C).

$$\alpha \text{ anódico:} \quad m_a = \frac{2,3RT}{(1-\alpha_a)nF} \quad \text{ecuación 4}$$

$$\alpha \text{ catódico:} \quad m_c = \frac{2,3RT}{(1-\alpha_c)nF} \quad \text{ecuación 5}$$

Donde:

- R = Constante universal de los gases; 8,314 [J/mol*K].
- T = Temperatura; 298 [K].
- n = Número de electrones transferidos; 2.
- F = Constante de Faraday; 96500 [C/mol].
- m_a = Pendiente gráfico E_{Pa} vs $\log(v)$.
- m_c = Pendiente gráfico E_{Pc} vs $\log(v)$.

Los datos obtenidos de las pendientes y de los coeficientes de transferencia se muestran en la tabla 1.

m_a	α_a	m_c	α_c
0,077	0,62	0,080	0,37

Tabla 1: Datos obtenidos del método.

Dados los resultados de la tabla 1, el valor de α_a es 0,62 (resultado cercano a 1) por lo que el intermediario de la reacción de oxidación es similar a los productos, mientras que

el valor de α_c es de 0,37 (resultado cercano a 0) lo cual indicaría que el intermediario de la reacción de reducción es similar a los reactantes.

En ambos casos, el intermediario se parece más a la forma nitroso.

Obtenidos los valores de α , se continua con el cálculo de la velocidad anódica (v_a) y catódica (v_c), valores que se obtienen de la regresión del grafico de la *figura 28*, cuando el potencial es igual a $E_{p1/2}$.

Con los valores de α y v ya estimados para ambos procesos, se continua con la estimación de la constante de transferencia k_h , a partir del promedio de las constantes del proceso redox, utilizando las ecuaciones 6 y 7.

Caso anódico: $k_{ha} = \frac{(1-\alpha_a)nFv_a}{RT}$ ecuación 6

Caso catódico: $k_{hc} = \frac{\alpha_c nFv_c}{RT}$ ecuación 7

En la siguiente tabla, se muestran los resultados obtenidos.

$v_a [mv/s]$	$v_c [mv/s]$	$k_{ha} [s^{-1}]$	$k_{hc} [s^{-1}]$	$k_h [s^{-1}]$
90,36	99,54	2,70	2,87	2,78

Tabla 2: Obtención de constante de transferencia heterogénea.

Este valor indica una buena capacidad de los NTC para promover la transferencia de electrones entre el mediador y la superficie del electrodo. Al comparar el valor de la constante de transferencia con datos reportados de compuestos similares y otros mediadores para NADH^{38, 41}, se obtuvo un valor análogo.

5.2. Estudio Electrocatalítico

5.2.1. Electroquímica de NADH.

Usando voltametría cíclica se caracterizó la señal de oxidación de NADH usando un electrodo modificado aplicando la metodología anteriormente descrita. La medida fue realizada en una celda con 5 mL de solución de NADH 3 mM en buffer B-R pH 7. En la *figura 29* se muestra el voltamograma cíclico de la oxidación de NADH usando un electrodo modificado.

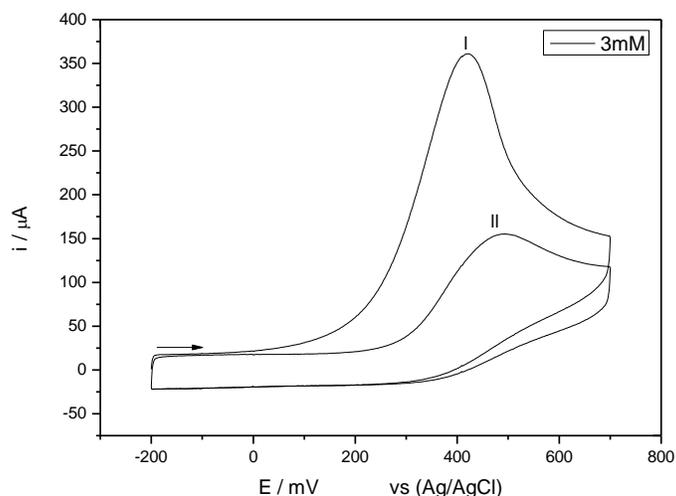


Figura 29: VC de la oxidación de NADH sobre GCE-NTC en buffer B-R 0,1 M pH 7.

Para el primer barrido, se observa una señal irreversible con un potencial de pico $E_p = 421$ mV, que corresponde a la oxidación de NADH (*figura 29, señal I*). En el segundo barrido, se observa una señal similar, pero esta vez con menor intensidad, debido a la demorada difusión de NADH desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo modificado, el cual no alcanza a ser renovado (*figura 29, señal II*).

El proceso de oxidación de NADH se describe en la *ecuación 2*. En comparación a lo reportado en otros trabajos, la señal obtenida es bien definida y con una corriente bastante elevada⁶².

Se espera que el uso del mediador redox, formado por la reducción del nitrocompuesto (el precursor) disminuya el potencial de oxidación de NADH. Aplicando la metodología descrita “*experimento de electrocatálisis de NADH, sección 4.3.2*”, se obtuvo el voltamograma de la *figura 30*, para la oxidación de NADH en presencia del mediador.

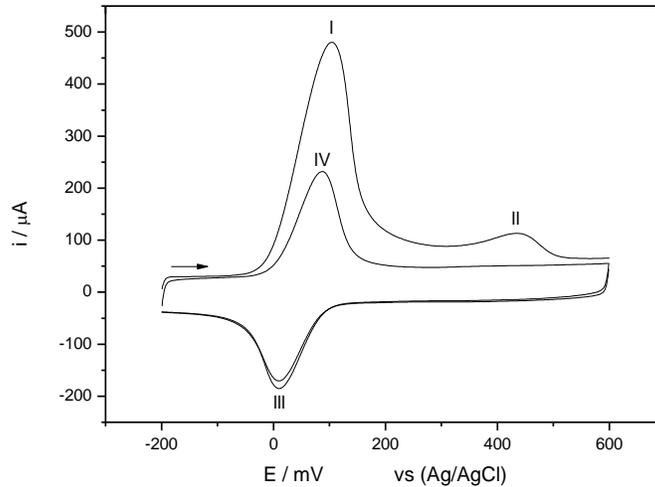


Figura 30: VC de la oxidación de NADH sobre GCE-NTC-med en buffer B-R 0,1 M pH 7.

El voltamograma cíclico muestra una primera señal I, la cual corresponde a electrocatálisis de la oxidación de NADH. La señal II corresponde a la oxidación de NADH que llega por difusión a la superficie del electrodo y, no interactúa con el mediador en una reacción de electrocatálisis. Esta señal se genera debido a que la cantidad de mediador no es suficiente para electrocatalizar todo el NADH en el electrodo. Es claro que, al comparar ambas señales de oxidación de NADH es mayor la señal I, indicando una mayor proporción de NADH electrocatalizado por el mediador. La señal III y IV corresponde a la reducción y oxidación del mediador, respectivamente en los siguientes barridos. No se observa en el segundo barrido de oxidación la aparición de la señal electrocatalizada, debido a que el barrido se produce más rápido que la difusión de nuevo NADH al electrodo. Esto se corrobora con la desaparición de la señal II en el segundo barrido de oxidación.

El aumento de corriente de oxidación y el desplazamiento del potencial de oxidación de NADH desde $E_p = 421$ mV a $E_p = 103$ mV (*figura 31*) evidencia la capacidad del nitrocompuesto activado para funcionar como mediador electroquímico en la oxidación de NADH en las condiciones experimentales estudiadas.

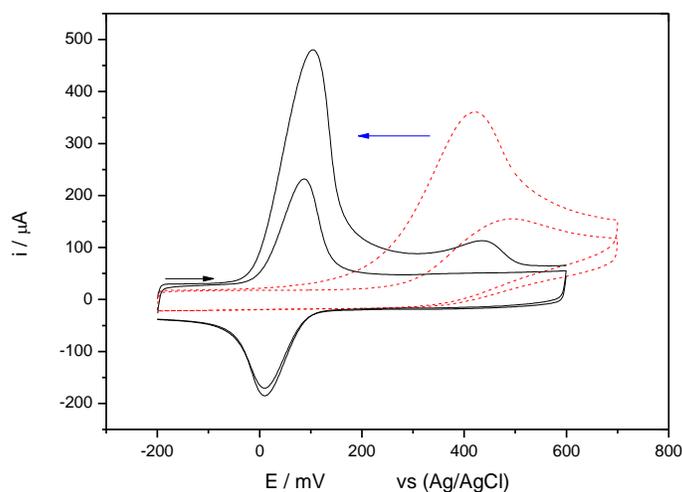


Figura 31: Voltametrías cíclicas para la oxidación de NADH. La línea negra, usando un electrodo GC-NTC-med. La línea roja segmentada, usando un electrodo GC-NTC.

Muchos^{37, 38, 44, 63} autores describen el proceso electrocatalítico en el electrodo como se muestra en la figura 32⁶⁴.

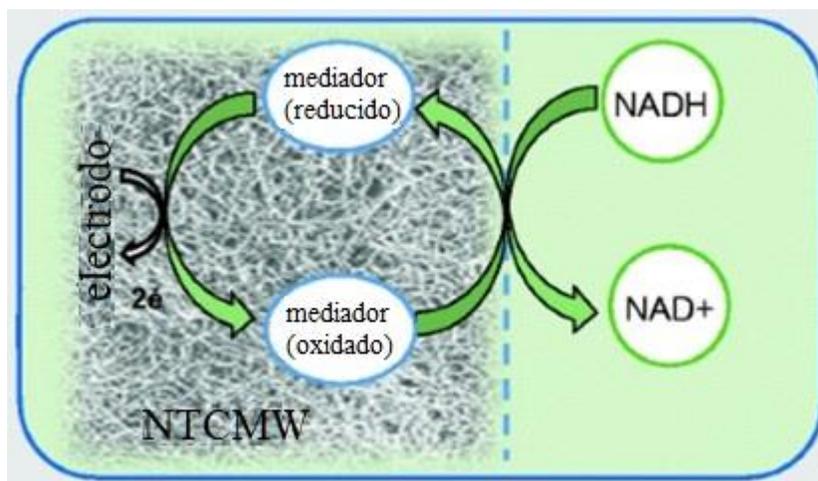


Figura 32: Esquema general del proceso electrocatalítico para la oxidación de NADH.

A partir de figura 31 y del esquema de la figura 32, es posible describir las etapas asociadas al proceso electrocatalítico de la oxidación de NADH;

- Oxidación del mediador redox retenido en el electrodo GC-NTCMW.
- Reducción del mediador y oxidación de NADH, proveniente desde la solución.

- Al ser un proceso sin agitación, las moléculas de NAD^+ quedan en la interfase solución / región de reacción, bloqueando el electrodo.

Se espera que la corriente asociada al proceso electrocatalítico disminuya con el pasar del tiempo, dada la pérdida de las moléculas de mediador encapsuladas en los nanotubos.

5.2.2. Efecto del tiempo de reposo.

Se estudió el efecto del tiempo de reposo que tiene sobre la electrocatálisis, el cual corresponde al tiempo de interacción entre el electrodo y la solución antes de comenzar con el barrido de potencial.

Se estudió un rango de 20 a 100 segundos, con intervalos de 20 segundos, obteniéndose los voltamogramas de la *figura 33*, usando una solución de nitrocompuesto de 0,6 mM y una concentración de NADH de 3 mM.

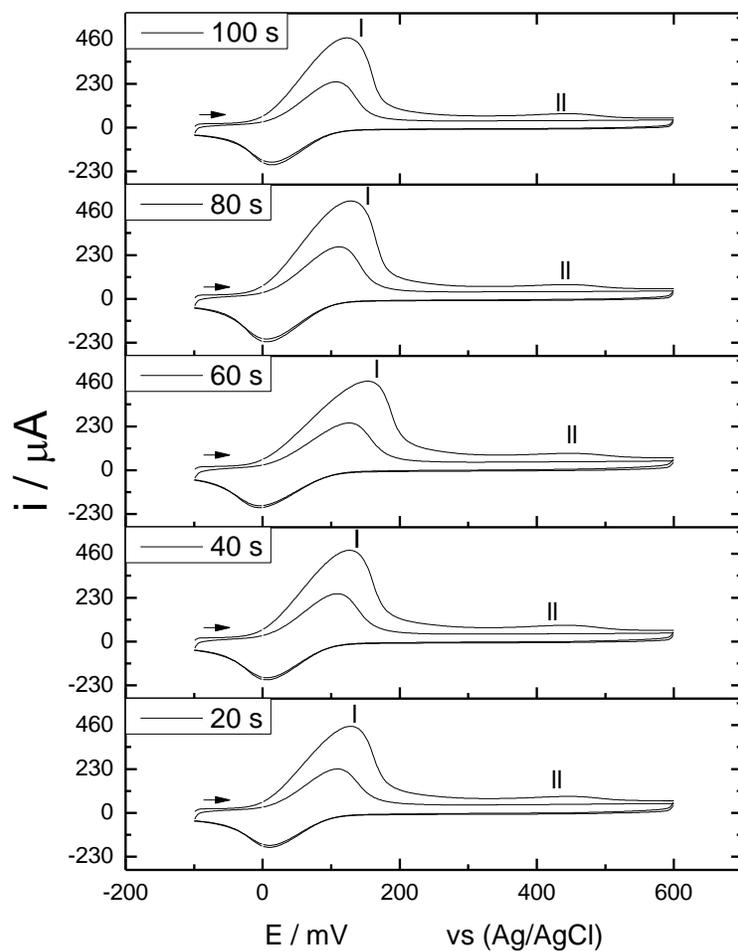


Figura 33: Voltametrías cíclicas de la oxidación electrocatalítica de NADH a diferentes tiempos de reposo.

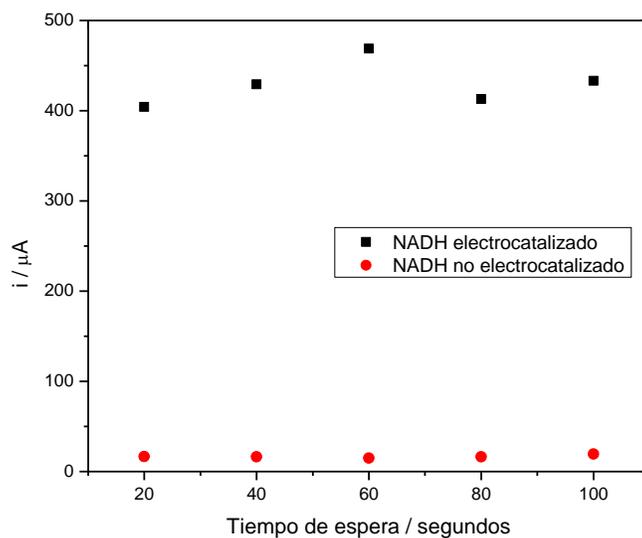


Figura 34: NADH electrocatalizado, señal I (■) y NADH no electrocatalizado, señal II (●) en función del tiempo de reposo.

Se puede apreciar que las intensidades de corrientes para los 5 tiempos estudiados son similares (*figura 33, señal I*), tanto para la corriente generada por la oxidación de NADH electro catalizado y no electro catalizado. El tiempo de interacción de 60 segundos es en donde se generó una mayor intensidad de corriente electrocatalítica (468,8 μA) y menor intensidad de corriente para el NADH no electro catalizado (15 μA), *figura 34*.

A partir de los resultados obtenidos, se estableció el tiempo de 60 segundo como el óptimo para los experimentos posteriores.

5.2.3. Concentración mínima de mediador para generar electrocatálisis de NADH.

Una mayor cantidad de mediador presente en el electrodo implica una mayor probabilidad de interacción con el NADH y generar la electrocatálisis. Por ende, se estudió el efecto de la concentración de la solución de nitrocompuesto con la que se modifica el electrodo con el fin de determinar la cantidad mínima de mediador apto para generar la electrocatálisis de todo el NADH. Se estableció una concentración de 3 mM de NADH y un tiempo de espera de 1 minuto, siguiendo la metodología “*experimento de electrocatálisis de NADH*”. En la *figura 35*, se muestran los voltamogramas cíclicos obtenidos a diferentes concentraciones de solución de nitrocompuesto, mientras que en la *figura 36*, el gráfico resume los voltamogramas de la *figura 35*, donde se muestran las corrientes de pico electrocatalíticas NADH+med y las corrientes de pico de NADH sin electrocatalizar.

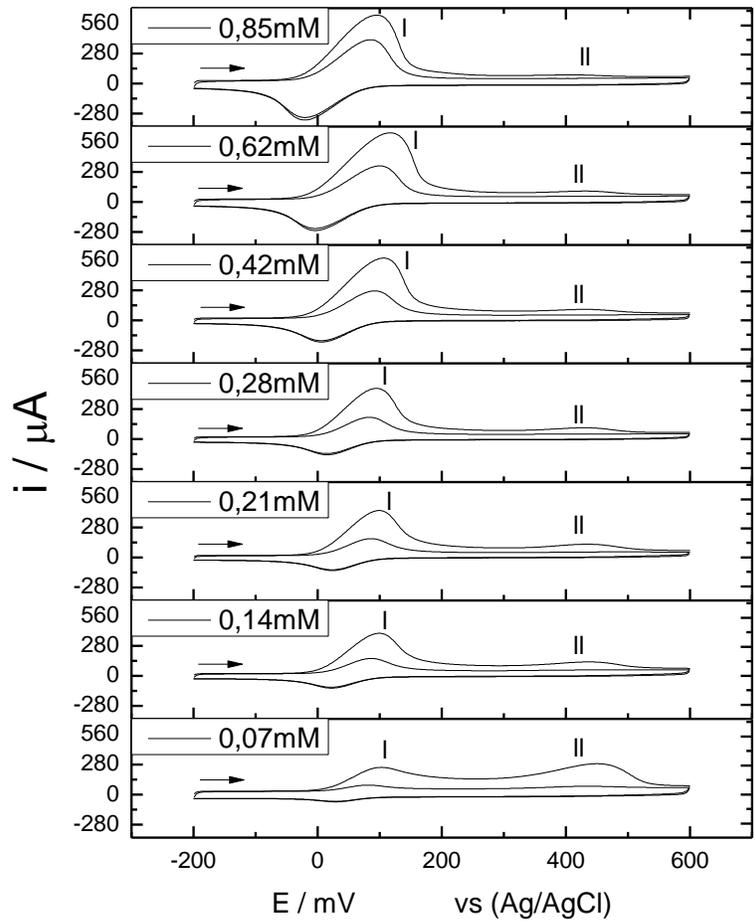


Figura 35: VC a distintas concentraciones de la solución modificadora de nitrocompuesto, con concentración de NADH 3 mM en buffer B-R pH 7.

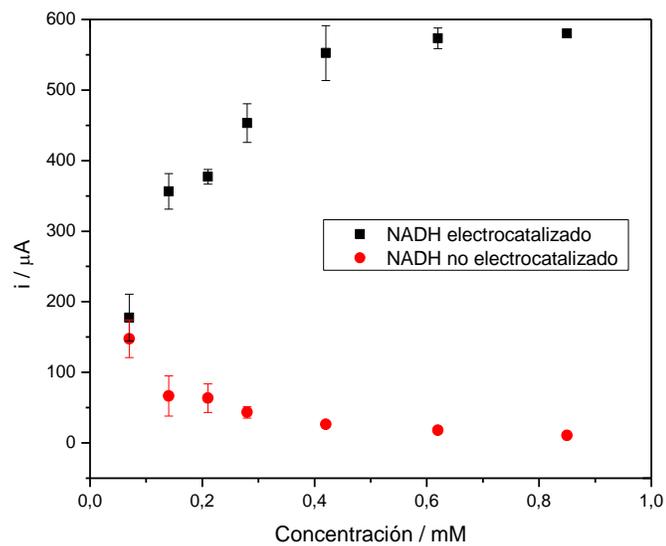


Figura 36: Influencia de corriente de pico electrocatalítica NADH+med (■) y la corriente de pico de NADH sin electrocatalizar (●) de acuerdo con la concentración de la solución modificadora de nitrocompuesto.

Se observa en la *figura 35*, una disminución de la señal de oxidación de NADH no electrocatalizado a medida que aumenta la concentración del mediador, acompañada por un aumento en la señal electrocatalítica. En la máxima concentración utilizada, es posible ver una pequeña señal de NADH no electrocatalizado, por lo cual no se puede asegurar que la concentración de 0,85 mM sea capaz de electrocatalizar completamente todo el NADH que llega al electrodo.

En la gráfica de la *figura 36*, se observa que un aumento en la cantidad de mediador implica un aumento en la corriente electrocatalítica NADH+med y una disminución en la corriente de NADH no electrocatalizado. Este comportamiento se aprecia hasta una concentración de 0,42 mM. Es posible observar un aumento de la señal electrocatalítica en el segundo barrido, debido al aumento del mediador en el electrodo. Después de dicha concentración, ambas corrientes tienden a permanecer constantes. Por ende, se concluye que la concentración mínima de la solución modificadora de nitrocompuesto para la electrocatalisis de NADH es de 0,42 mM. A esta concentración se obtiene la señal más baja de NADH no electrocatalizado.

5.2.4. Retención del mediador frente a NADH.

De forma similar, se estudió la retención del mediador por parte del electrodo frente a NADH en buffer B-R. La retención del mediador se estudió en presencia de NADH 3 mM. Para ello se usó una solución de nitrocompuesto de 0,6 mM, con el fin de comparar las retenciones, tanto en ausencia como en presencia de NADH.

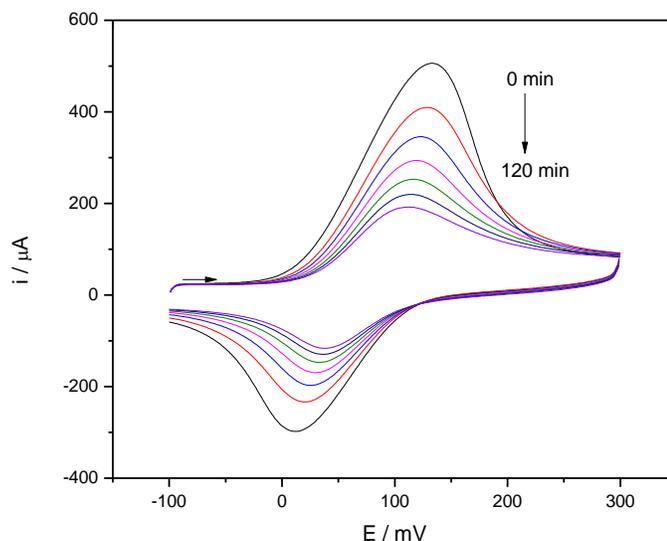


Figura 37: Voltametrías cíclicas para el par redox de 4NBPy a diferentes tiempos de medición. Influencia de corriente.

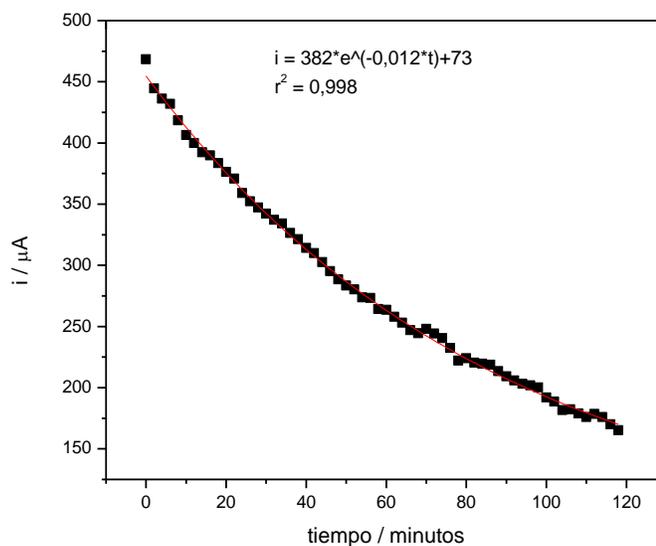


Figura 38: Gráfico tiempo v/s corriente de pico de oxidación del par redox de 4NBPy y su respectivo ajuste.

De manera similar al caso donde solo estaba presente el mediador en interacción con la solución, existe una disminución de la corriente, relacionada directamente con la concentración de mediador presente en el electrodo.

En comparación con la retención en buffer, donde la corriente disminuyó a un 67,61% respecto a la primera medida, en este caso la corriente disminuyó a un 35,30%. Este aumento en el porcentaje de pérdida de corriente respecto al valor inicial se debe principalmente al desplazamiento de moléculas de mediador provocado por el NAD^+ generado como producto de la oxidación de NADH.

De igual manera que la retención en buffer, se obtuvo un ajuste exponencial de orden 1, descrito en la ecuación 8. El parámetro k , valor da a conocer la rapidez con que disminuye la corriente, un valor de $0,012 \text{ min}^{-1}$, cerca de 2 veces menor que la constante obtenida en ausencia de NADH.

$$\text{Ajuste del decaimiento} \quad i = A * e^{-kt} + B \quad \text{ecuación 8}$$

Donde:

- i : Corriente de pico anódica a tiempo t el mediador, expresada en μA .
- A : Corriente perdida a tiempo largos, expresada en μA .
- k : Constante de decaimiento; $0,012 \text{ min}^{-1}$.
- t : Tiempo de medida, expresado en minutos.
- B : Corriente anódica cuando t tiende a infinito, expresada en μA .

Nuevamente, a tiempos muy largos, la corriente tiende a ser igual a parámetro B , con un valor de $73 \mu\text{A}$, mientras que la corriente perdida en tiempos largos, el parámetro A , es igual a $382 \mu\text{A}$ según el ajuste, el cual da cuenta de que la corriente disminuiría un 83,94%.

De igual manera, se obtuvo el valor del tiempo de vida media igual a $57,76$ minutos, siendo este más de 2 veces menor en comparación con la retención en ausencia de NADH.

5.2.5. Influencia de la concentración de NADH en la electrocatálisis.

A partir del experimento anterior, en el cual se determinó a la concentración mínima de mediador para que exista electrocatálisis, esta vez se estudió la influencia de la concentración de NADH sobre la electrocatálisis, dejando fija la concentración de mediador de 0,42 mM. Aplicando la misma metodología “*experimento de electrocatálisis de NADH*”, se obtuvieron los voltamogramas cíclicos de la *figura 39* y la gráfica de la *figura 40* con las corrientes de pico de electrocatálisis respectiva para cada concentración de NADH.

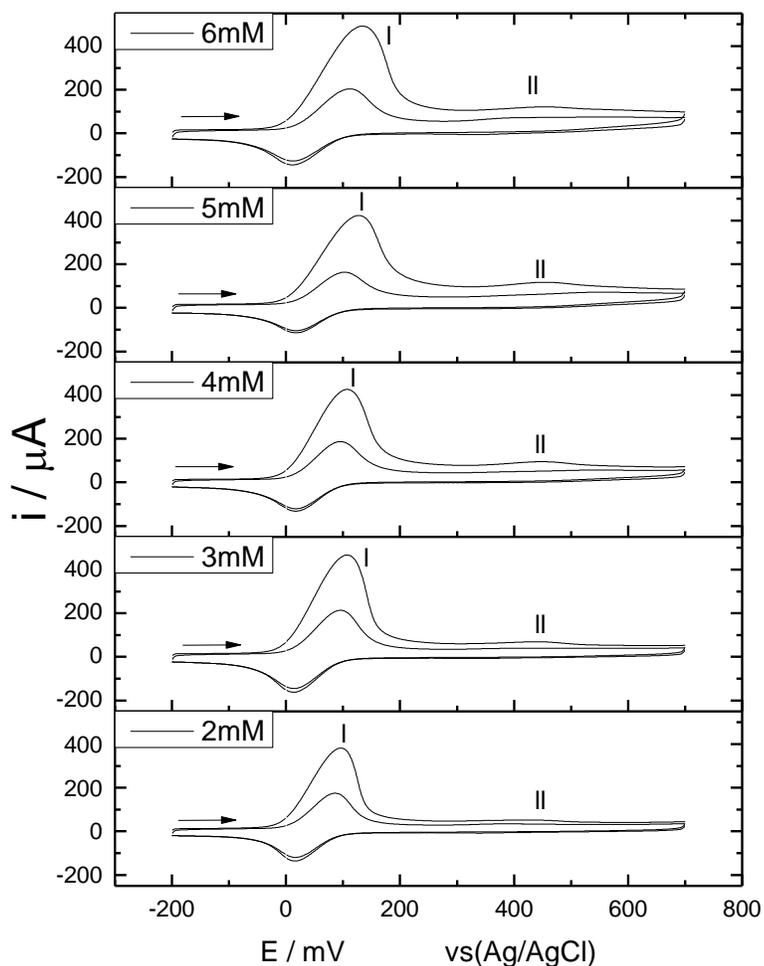


Figura 39: Voltametrías cíclicas de la electrocatálisis de NADH a diferentes concentraciones.

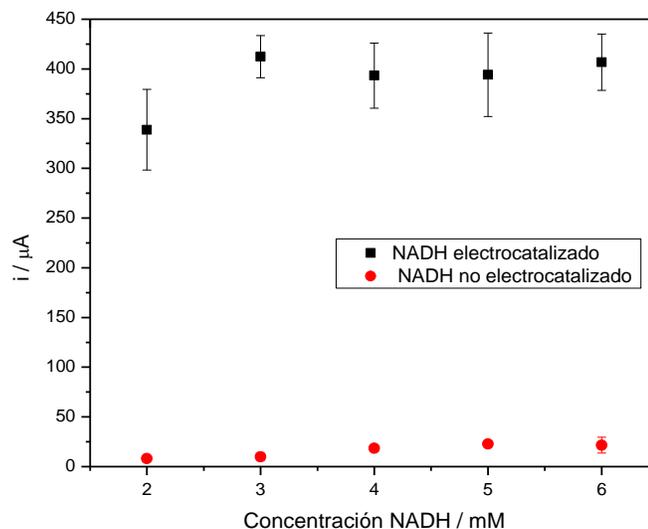


Figura 40: Influencia de corriente de pico electrocatalítica NADH+med (■) y la corriente de pico de NADH sin electro catalizar (●) de acuerdo con la concentración de NADH en solución.

Se observa en la *figura 39* un aumento en la señal cuando la concentración de NADH aumenta de 2 mM a 3 mM. Para concentraciones más elevadas, la intensidad de corriente electrocatalítica se mantiene casi constante. En el caso de la corriente correspondiente al NADH no electrocatalizado, es posible ver que la señal para 2 y 3 mM es casi imperceptible. A medida que aumenta la concentración, se aprecia un pequeño aumento en la zona de potencial de oxidación de NADH sin electrocatalizar. Las corrientes de NADH electrocatalizado se mantienen constantes a concentración de 3 mM hasta 6 mM. Debido al aumento de concentración de NADH, la difusión desde el seno de la solución se ve reflejada en el aumento de la señal de NADH sin electrocatalizar. Como la cantidad de mediador es constantes en el electrodo, el aumento de la concentración de NADH no tiene efecto en la señal electrocatalizada, lo que indica el límite de concentración a electrocatalizar para un electrodo modificado con 0,42 mM de mediador es 3 mM de NADH. En resumen, para una señal electrocatalítica más intensa es necesario modificar el electrodo con una cantidad más concentrar de mediador.

5.2.6. Coeficiente de difusión de NADH.

Usando un electrodo de disco rotatorio, se determinó el coeficiente de difusión de NADH en buffer B-R pH 7 0,1 M usando una concentración de 0,13 mM de NADH. Para ello se utilizó un electrodo de carbono vítreo de 3 mm de diámetro. En la *figura 41*, se muestran las curvas obtenidas a diferentes velocidades de rotación dentro de un rango de 200 a 2000 rpm, aplicando un barrido de potencial oxidativo desde -100 mV hasta 800 mV. Mientras que en la *figura 42*, corresponde a la gráfica de corriente límite para cada valor de velocidad de rotación.

Para calcular el coeficiente de difusión se utilizó la ecuación 7⁶¹:

$$I_{limite} = 0,20 * n * F * A * D^{\frac{2}{3}} * v^{-\frac{1}{6}} * C * rpm^{1/2} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

- n: número de electrones transferidos; 2.
- F: constante de Faraday; 96500 [C/mol] aprox.
- A: área del electrodo; 0,0707 [cm²].
- D: coeficiente de difusión; [cm²/s].
- v: viscosidad cinemática; [cm²/s].
- C: concentración de NADH; 0,13 mM
- rpm: velocidad de rotación del electrodo.

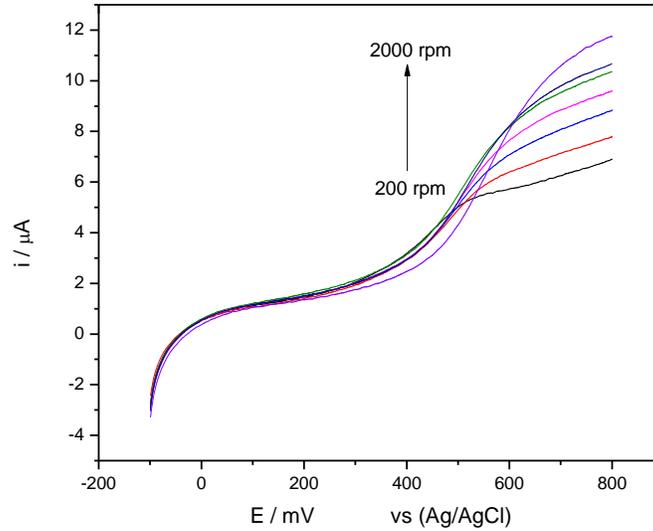


Figura 41: Curvas i vs. E obtenidas por EDS a distintas velocidades de rotación.

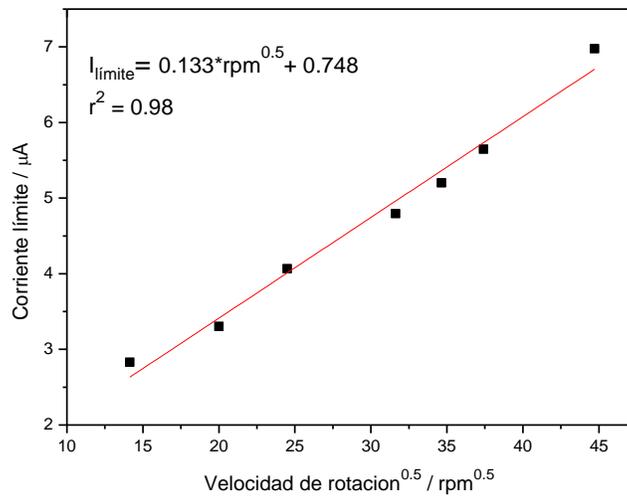


Figura 42: Gráfico de corriente límite (i_{lim}) vs. $(\text{Velocidad de rotación})^{0.5}$, junto con su respectivo ajuste lineal.

A partir del valor de la pendiente de la recta (*figura 42*) se obtuvo un valor para el coeficiente de difusión de $2,302 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. dicho resultado se acerca bastante a lo reportado en buffer fosfato, con un valor de $(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ⁶⁵.

5.3. Pruebas enzimáticas

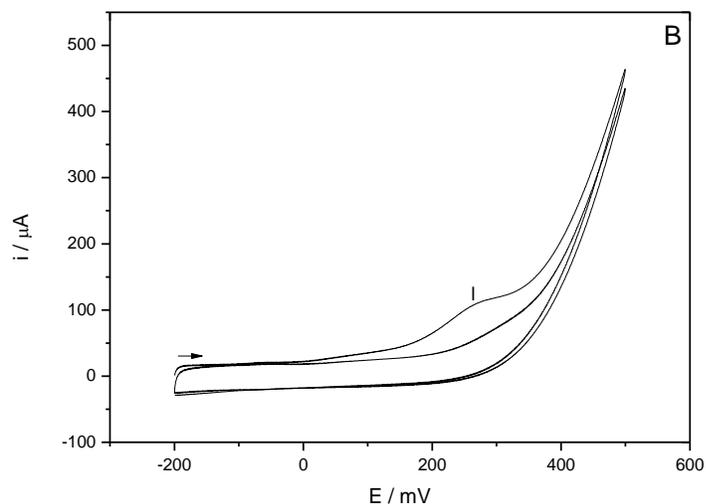
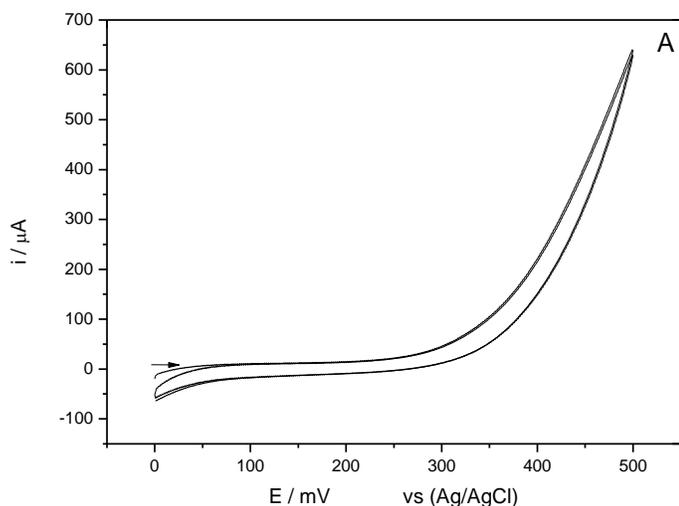
5.3.1. Adaptación metodología electroquímica.

Como objetivo se propuso adaptar una metodología bioquímica espectrofotométrica en la cual se determina enzimáticamente la concentración de etanol, cuantificando la cantidad de NADH producido debido a la oxidación de etanol catalizada por la enzima ADH, a nuestro sistema electroquímico usado para la oxidación de NADH y de esta manera lograr determinar la concentración de etanol, a partir de la cuantificación de NADH producido por la enzima ADH.

Se realizó el blanco del electrodo en buffer SC pH 8,7. La *figura 43.A* muestra el voltamograma del buffer SC pH 8,7 usando un electrodo GC-NTC, mientras que la *figura 43.B* muestra el voltamograma de la celda de trabajo. Esta celda esta formada por la enzima ADH, NAD⁺ y etanol, todos ellos disueltos en buffer SC pH 8,7.

Se espera que la enzima ADH, en presencia de NAD⁺, oxide el etanol a acetaldehído (*figura 4.1*) y que genere NADH producto de la reducción de NAD⁺, siendo el NADH el analito de interés a detectar y cuantificar por el electrodo.

Al realizar el cálculo de las concentraciones finales en la celda de trabajo, se obtuvo una concentración de 3,13 mM de NAD⁺, el cual debiese ser convertido en su totalidad a NADH, dada su condición de reactivo limitante de la reacción enzimática (1,07 M de



etanol), sabiendo, además, que la relación estequiométrica entre reactivos y productos es 1:1.

Figura 43: A. VC de buffer SC pH 8,7. B. VC celda de trabajo.

El aumento de la corriente a partir de 400 mV aprox. se debe a la oxidación de SC, ya que, al realizar en mismo experimento para el mismo buffer sin SC, esta señal desaparece. La señal I corresponde la señal de oxidación de NADH en un electrodo GC-NTC. El desplazamiento del potencial de oxidación a valores cercano a 280 mV se debe al aumento del pH en la celda de trabajo, superior al valor de pH 7 utilizado típicamente para los experimentos anteriores de estudio electrocatalítico.

Se realizaron los experimentos de electrocatalisis usando el mediador ya estudiado en concentraciones de 0,1 mM y 0,42 mM. La *figura 44* muestra, en línea negra segmentada, el voltamograma del mediador generado a partir de precursor en una celda con buffer SC pH 8,7 de concentraciones de la solución modificadora de 0,1 mM (A) y 0,42 mM (B). El voltamograma en línea roja muestra la oxidación electrocatalítica de NADH producido por la enzima en la celda de trabajo.

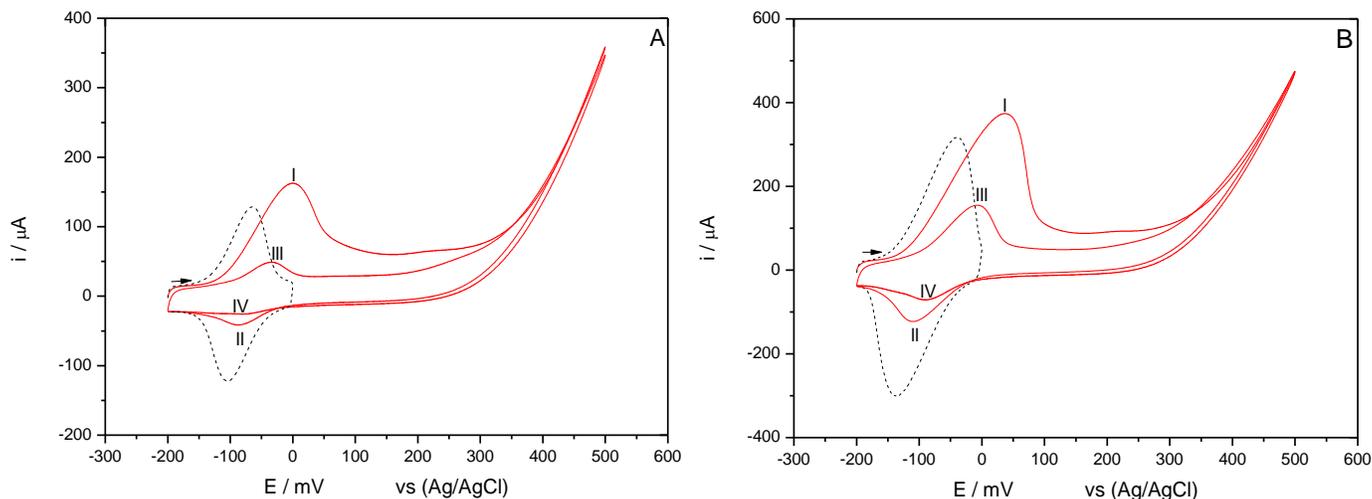


Figura 44: La línea negra segmentada, Voltametría cíclica del mediador. La línea roja, Voltametría cíclica de electrocatalisis de NADH enzimático. Concentración de solución de nitrocompuesto de 0,1 mM (A) y 0,42 mM (B).

Para el voltamograma cíclico en rojo, se observa la señal I correspondiente al NADH electrocatalizado y la oxidación del mediador. La señal II es la reducción del mediador, en esta señal el mediador es regenerado a su derivado hidroxilamínico. La señal III, corresponde nuevamente a la oxidación del mediador y un pequeño aporte de la electrocatálisis de NADH que es renovado en la superficie del electrodo. La señal IV nuevamente es la reducción del mediador, evidenciando una clara pérdida con respecto al primer barrido de alrededor del 50%, comparación entre la señal II y IV. Este comportamiento no se había visto anteriormente, ya que la pérdida del mediador en presencia de NADH es casi despreciable al momento de realizar un segundo barrido, como se puede observar en experimentos anteriores.

5.3.2. Estabilidad del mediador retenido en el electrodo en presencia del medio enzimático.

Con el objetivo de evaluar la retención del mediador en el electrodo, en presencia del medio de trabajo enzimático, se realizaron medidas consecutivas, cada dos minutos, para establecer cuantas medidas es capaz de soportar el mediador.

La *figura 45* muestra las voltametrías cíclicas de 4 medidas consecutivas de la oxidación electrocatalítica de NADH usando una concentración de la solución modificadora de 0,42 mM.

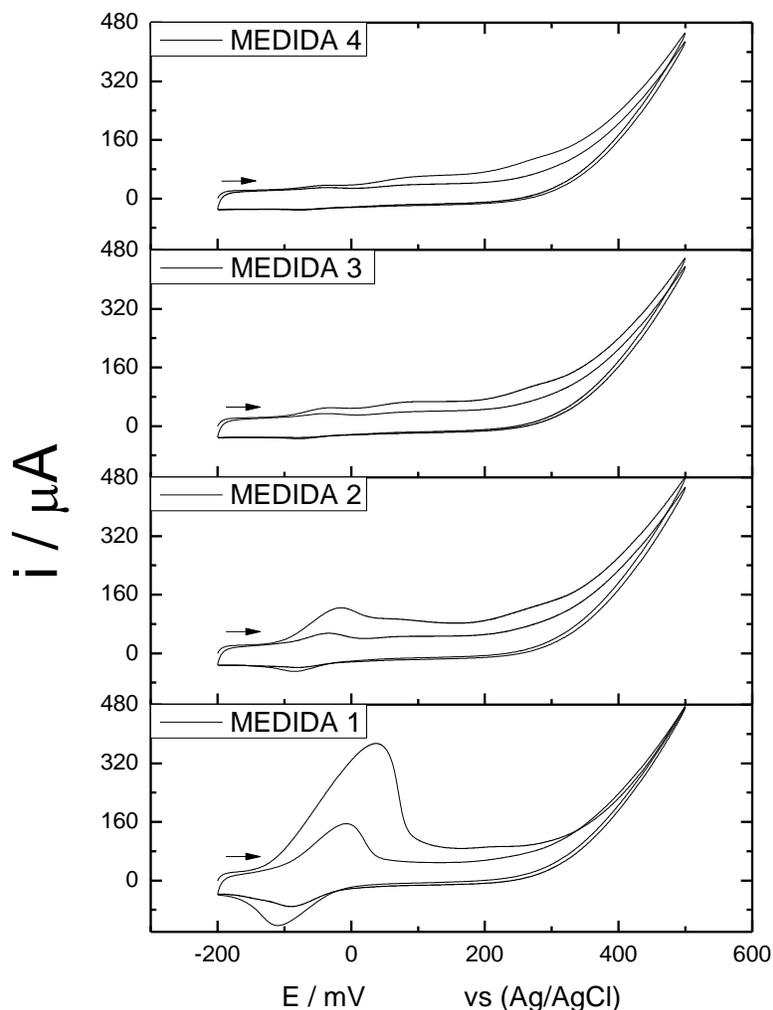


Figura 45: Voltametrías cíclicas de la electrocatálisis de NADH con 0,42 mM de solución modificadora de nitrocompuesto. Medidas usando el mismo electrodo modificado.

Se observa que, al término de la cuarta medida consecutiva la señal del mediador ha desaparecido, lo que implica una pérdida total del mediador encapsulado en los nanotubos de carbono del electrodo modificado. Esta pérdida se atribuye a dos reactivos presentes en la celda de trabajo: la alta concentración de etanol (1,07 M) y al derivado oxidado de SC. Fue por ello por lo que se cambió el valor de potencial de switching a 300 mV para evitar generar el derivado oxidado de SEM. La *figura 46* muestra los voltamogramas cíclicos de la oxidación electrocatalítica de NADH usando las mismas condiciones. Las mediciones fueron realizadas cada 8 minutos.

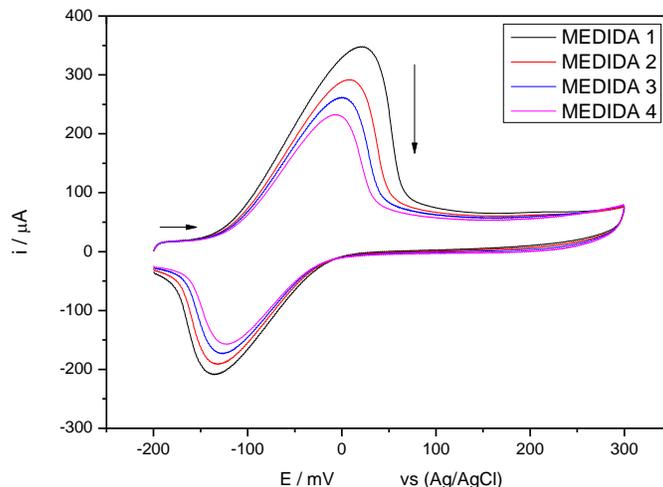


Figura 46: VC electrocatalisis de NADH usando una concentración de la solución modificadora de 0,42 mM. Medidas usando el mismo electrodo modificado.

Al cabo de 24 minutos se ha perdido cerca del 25% inicial de mediador (*figura 45*), mejorando significativamente la permanencia del mediador en el electrodo, concluyendo que el derivado oxidado de SC produce un desplazamiento de mediador del electrodo.

Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de etanol en la celda de trabajo en la retención del mediador en electrodo, se estudió la estabilidad del mediador retenido en el electrodo en la celda de trabajo. La *figura 47* muestra la curva de decaimiento de la corriente electrocatalítica de NADH usando la concentración de solución modificado al 0,1 mM (A) y las medidas voltamétricas durante el transcurso del experimento (B). Se usó una concentración modificadora de 0,1 mM ya que es mediador suficiente para generar la oxidación electrocatalítica de todo el NADH producido por la enzima en la celda de trabajo (*figura 44.A*).

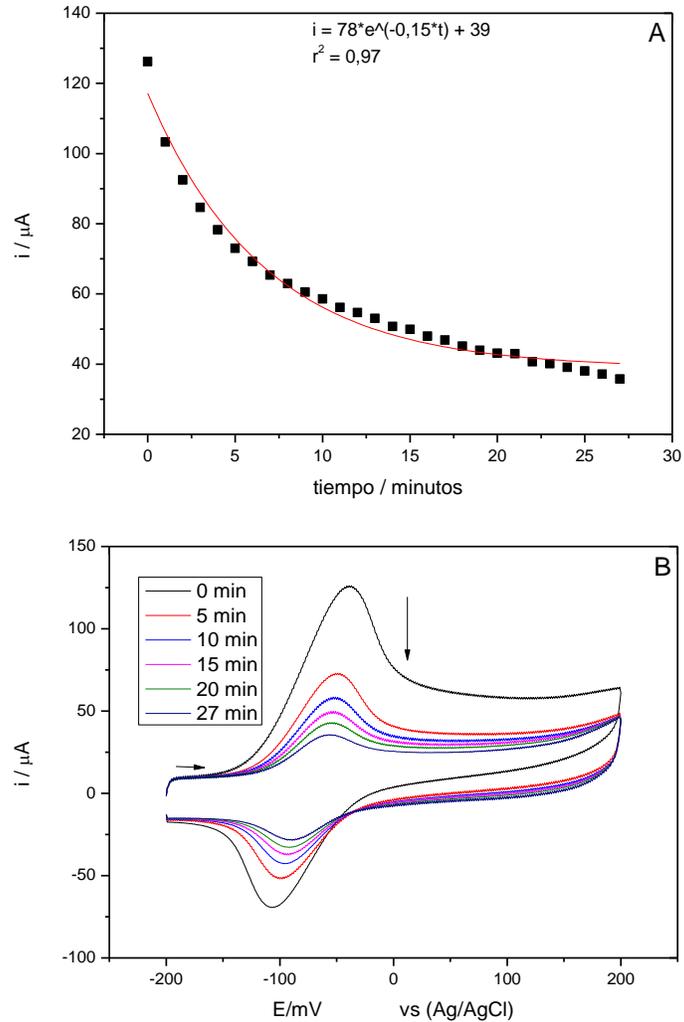


Figura 47: A. Curva de estabilidad de mediador retenido en el electrodo modificado en la celda enzimática. B. Voltametrías cíclicas del mediador a distintos tiempos.

Se obtuvo un ajuste exponencial de orden 1, descrito en la ecuación 10.

$$\text{Ajuste del decaimiento} \quad i = A * e^{-kt} + B \quad \text{ecuación 10}$$

Donde:

- i : Corriente de pico anódica a tiempo t el mediador, expresada en μA .
- A : $78 \mu\text{A}$.
- k : $0,15 \text{ min}^{-1}$.
- t : Tiempo de medida, expresado en minutos.

- B: 39 μ A.

A partir del valor de B, se concluye que el electrodo retiene aproximadamente 1/3 del mediador en el electrodo modificado y que esta cantidad no disminuirá más después de medidas sucesivas. El valor de parámetro A, se concluye que 2/3 de la cantidad de mediador no estaba fuertemente encapsulado en la red de nanotubos y, por ende, es desplazado del electrodo hacia la solución. El valor de k es aproximadamente 30 veces menor a la obtenida en solo buffer B-R pH 7, lo que implica que la baja estabilidad del mediador en la celda de trabajo, bajo estas condiciones experimentales, es producto de la alta concentración de etanol.

5.3.3. Cambio de Buffer y Optimización de condiciones experimentales.

Con el fin de mejorar la producción de NADH, disminuir la pérdida de mediador y una mejor conversión de reactivos a productos, se modificaron las cantidades de los reactivos involucrados en la reacción enzimática.

En principio, se intentó realizar la misma reacción, esta vez en buffer B-R+SC pH 8,7. La *figura 48* muestra el voltamograma de la electrocatálisis de NADH generado por la enzima usando buffer SC (A) y buffer BR+SC (B). Ambos experimentos con 0,1 mM de mediador a pH 8,7.

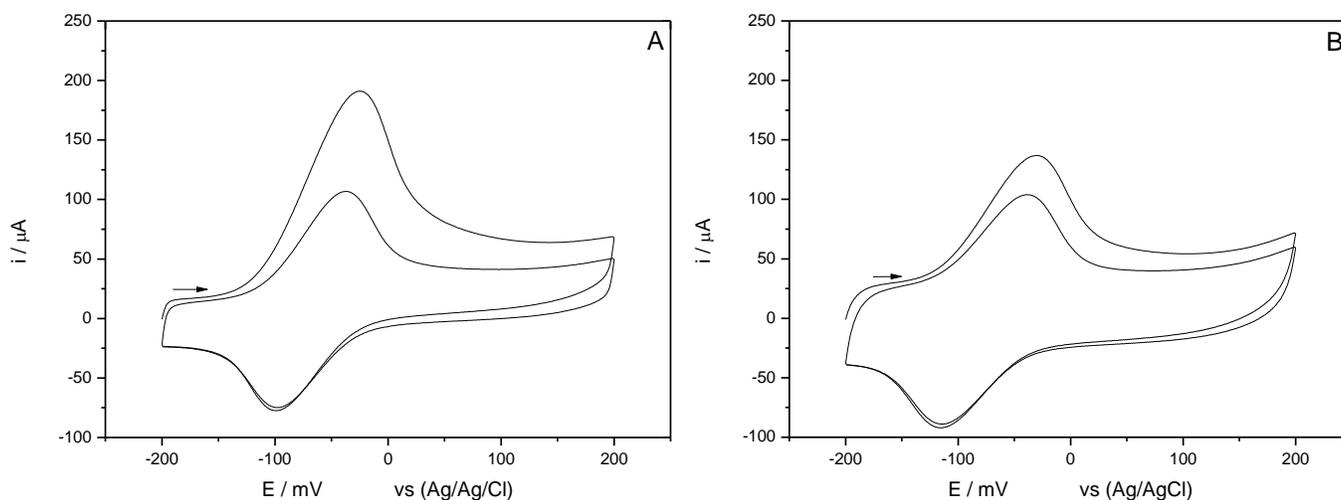


Figura 48: Voltametrías cíclicas de electrocatálisis de NADH enzimático en buffer SC pH 8,7 (A) y buffer BR+SC pH 8,7 (B).

El NADH generado a partir de buffer SC (*figura 48.A*) es muy similar al generado anteriormente (*figura 44.B*), donde la cantidad de etanol agregada no tiene un efecto significativo en la señal de NADH electrocatalizado, a pesar de que la concentración de etanol fue de 113,7 mM y de NAD⁺ de 3,3 mM. Al cambiar a buffer B-R+SC, se observa una disminución en la corriente electrocatalítica, lo que se atribuye a una menor producción de NADH por parte de la enzima (*figura 48.B*).

Se realizó el cambio a buffer PBS, junto con una disminución de la concentración de etanol en la celda quedando en 10,67 mM, manteniendo la concentración de NAD⁺. La *figura 49* muestra el voltamograma de la oxidación electrocatalítica de NADH en buffer SC (A) y en buffer PBS+SC (B), esta vez se aumentó el mediador a 0,42 mM, dado que las nuevas condiciones experimentales generaron más NADH con el objetivo de lograr la completa electrocatálisis.

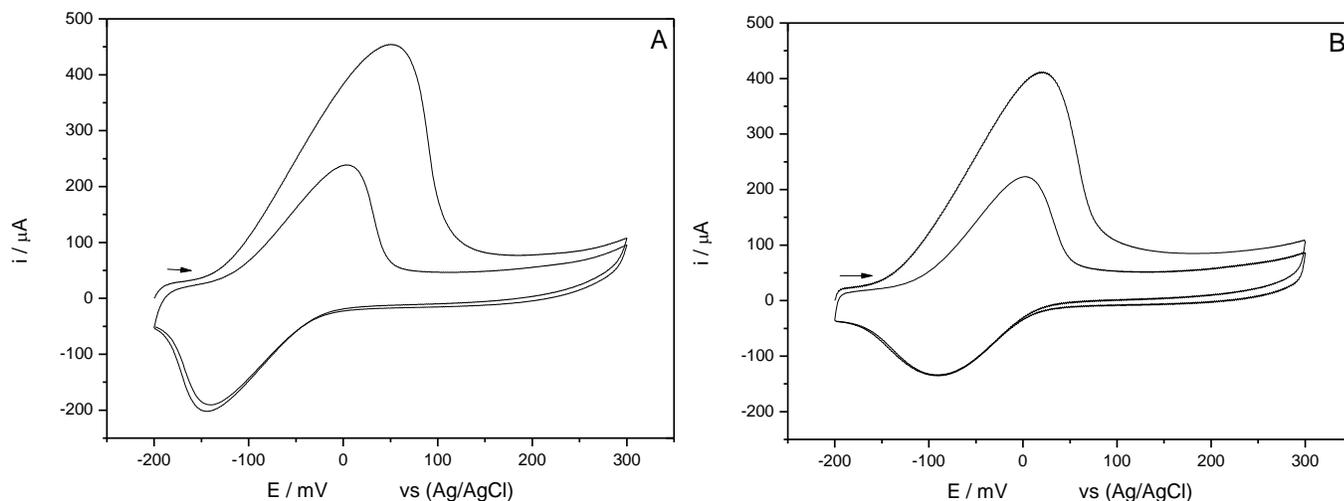


Figura 49: VC electrocátalisis de NADH en buffer SC pH 8,7 (A) y en buffer PBS+SC pH 8,7 (B).

Se observa en la *figura 49* que la producción de NADH enzimática resultó favorable en las nuevas condiciones, tanto para el buffer SC (A) y para el buffer PBS (B). También se observa una deformación en la señal de reducción del mediador en buffer PBS (*señal indicada, figura 49.B*). Se espera que un aumento de la fuerza iónica del buffer permita obtener señales mejor definidas al pH de trabajo y evitar la deformación de la señal indicada de la *figura 49.B*. Es por ello, que se utilizó buffer PBS 10X.

Se cambió el buffer SC por buffer PBS 10X+SC, disminuyendo nuevamente la concentración de etanol en la celda de trabajo. Las concentraciones finales de NAD^+ y etanol fueron de 3,8 mM y 13,2 mM, respectivamente. La *figura 50* muestra, en negro, la VC señal de NADH 3 mM en buffer PBS 10X+SC pH 8,7 no electrocatalizada, usando un electrodo GC-NTC. En rojo, el NADH generado por la enzima, sin electrocatalizar.

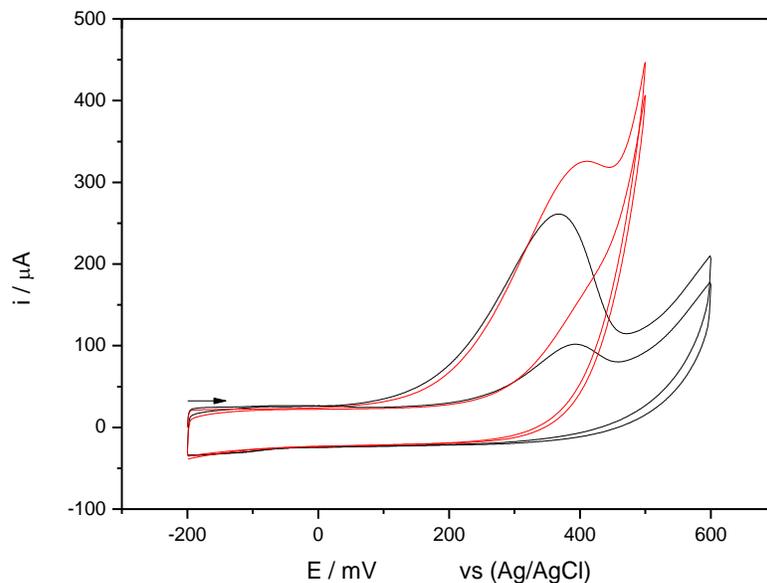


Figura 50: VC de NADH en la celda de trabajo (rojo) y VC de NADH 3 mM en buffer PBS 10X pH 8,7 (negro).

El NADH generado por la enzima (*figura 50, VC rojo*) es comparable a la señal de 3 mM de NADH (*figura 50, VC negro*). Es razonable que con el NADH generado por la enzima se obtenga más corriente, ya que al parecer todo el NAD^+ fue convertido a NADH con una concentración de 3,8 mM. Esta vez, la corriente coincide con la cantidad de NADH enzimático. Por lo tanto, se usó el buffer PBS 10X+SC pH 8,7 para los posteriores experimentos.

Por último, se realizaron los experimentos electrocatalíticos con una concentración de 3,8 mM de NAD^+ y 13,2 mM de etanol, usando solución modificadora de nitrocompuesto de concentración 0,42 mM en buffer PBS 10X+SC pH 8,7. La *figura 51* muestra los VCs de la oxidación electrocatalítica de NADH de la celda de trabajo.

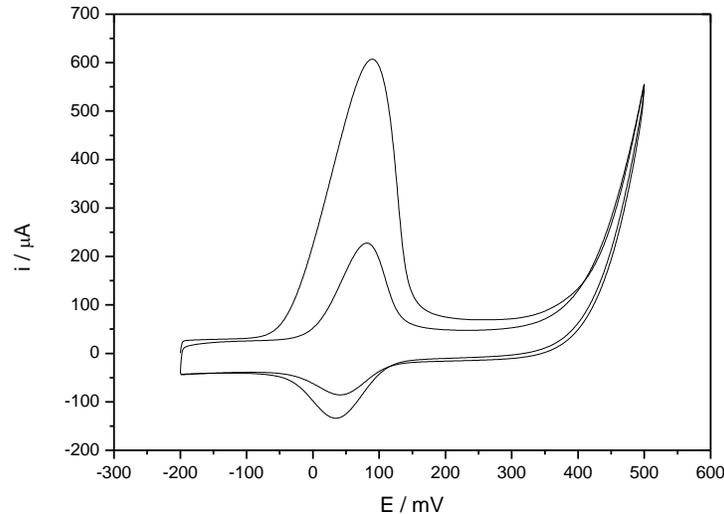


Figura 51: VC de electrocatálisis de NADH de la celda de trabajo con 13,2 mM de etanol, usando mediador 0,42 mM.

Se observa un claro pico de oxidación cercano a 90 mV, correspondiente a la electrocatálisis de NADH generado por la enzima ADH. Es posible observar que en la zona de oxidación no electrocatalítica de NADH no tenemos señal, concluyendo que la concentración de mediador fue capaz de electrocatalizar todo el NADH generado enzimáticamente. Esto concuerda con experimentos anteriores donde para una concentración de 3 mM de NADH y 0,42 mM de mediador, fue posible un completa electrocatálisis, a pesar de que, en esta ocasión, la concentración de NADH fue un poco mayor, asumiendo una total conversión de NAD^+ .

5.4. Medidas amperométricas

5.4.1. Detección amperométrica de NADH en electrodo GC-NTC-med.

Con el objetivo de obtener una cuantificación de etanol indirectamente a partir del NADH producido vía proceso enzimático, se utilizó la técnica electroquímica de amperometría. En base al voltamograma cíclico de la electrocatálisis de NADH se estudiaron 5 potenciales redox para realizar amperometría, se seleccionaron valores cercanos al potencial en el que ocurre la electrocatálisis²⁸: $E_{ap} = -50 \text{ mV}, -30 \text{ mV}, 0 \text{ mV}, 30 \text{ mV}$ y

50mV (vs Ag/AgCl). Se usó una concentración de la solución modificadora de nitrocompuesto de 0,1 mM, dada la baja concentración de NADH en la celda de trabajo. En una celda de 5 mL de buffer PBS 10X+SC pH 8,7 se agregaron alícuotas de 0,05 mL de NADH 3 mM en el mismo buffer. Se dio un tiempo de espera de 60 segundos para estabilizar la corriente. Las alícuotas fueron agregadas cada 60 segundos. La *figura 52* muestra los experimentos amperométricos para los distintos potenciales de aplicación (A), junto con las curvas de calibración para cada uno (B). Además, en la tabla 1, se resumen los ajustes lineales obtenidas de dichas curvas.

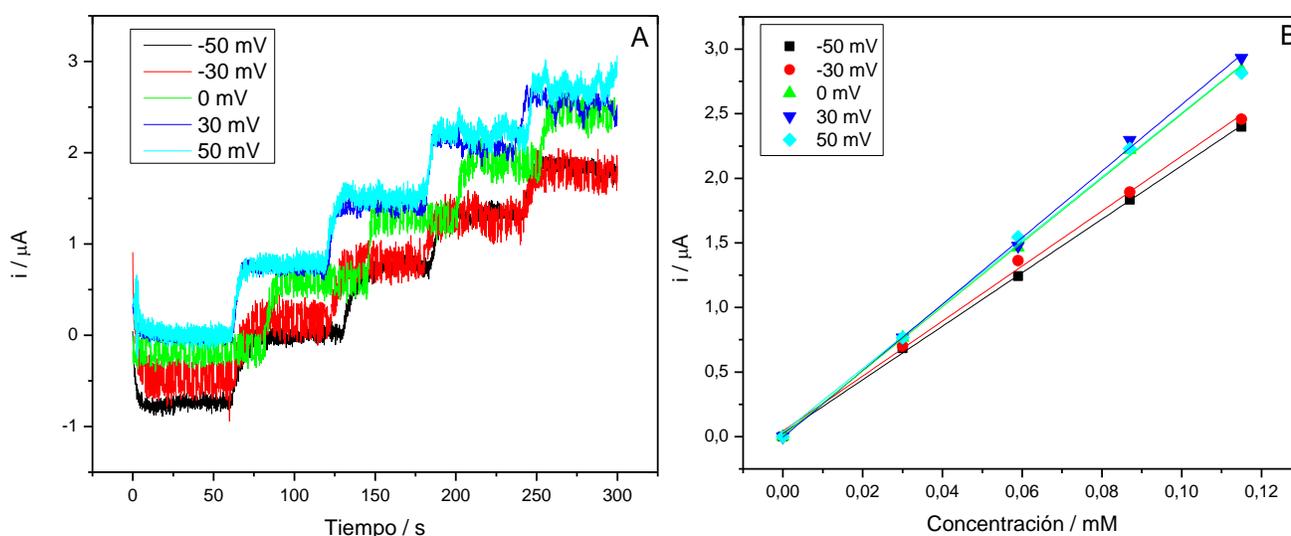


Figura 52: Curvas Amperométricas a distinto potencial aplicado (A). Curvas de calibración amperométricas (B).

Potencial / mV	Pendiente / $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	Intercepto / μA	R^2
-50	20,7	0,020	0,9992
-30	21,3	0,040	0,9970
0	24,9	0,010	0,9990
30	25,8	0,004	0,9980
50	24,7	0,030	0,9970

Tabla 3: Pendiente, intercepto y coeficiente de correlación para las curvas de calibración amperométricas a diferentes potenciales de aplicación.

De acuerdo con los resultados obtenidos, todas las curvas amperométricas poseen similares coeficientes de correlación. En cuanto a la pendiente, se obtuvo el mayor valor aplicando un potencial de 30 mV (tabla 1). A pesar del mejor coeficiente de correlación obtenido aplicando un potencial de 0 mV y bajas diferencias entre las pendientes, se decidió trabajar con el potencial de 30 mV, ya que la amperometría exhibe un ruido menor en comparación con la amperometría a 0 mV.

Con el objetivo de aumentar la concentración de NADH en la celda amperométrica se aumentó la concentración de solución stock de NADH de la alícuota tomada a 15 mM. La siguiente grafica muestra la amperometría obtenida, bajo estas nuevas condiciones.

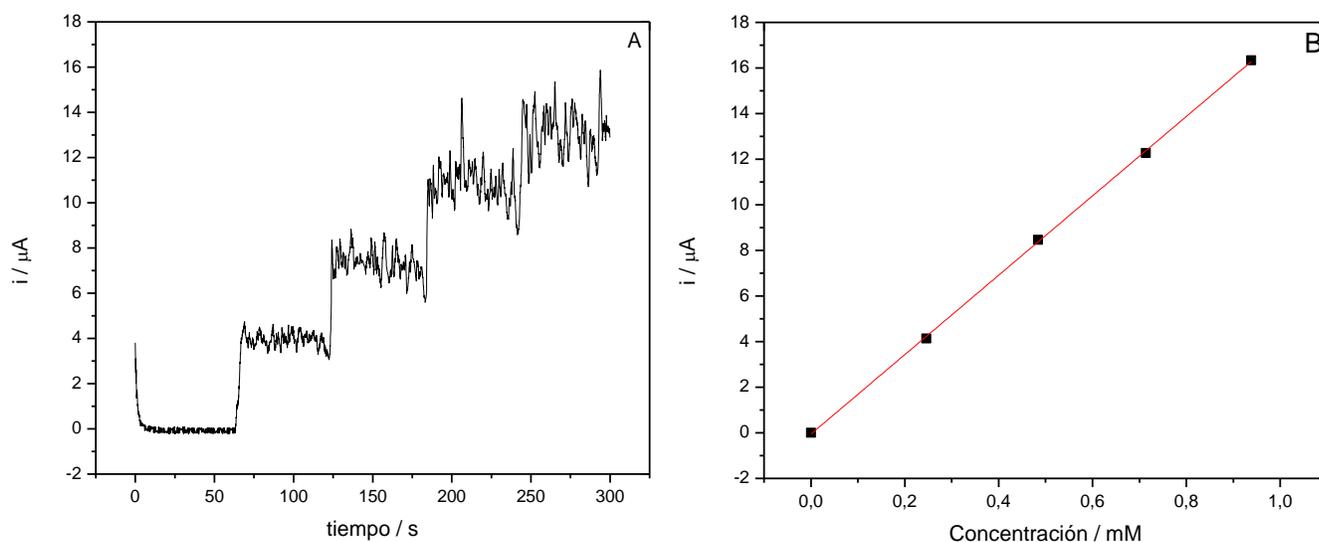


Figura 53: Amperometría (A) y curva de calibración (B) para electrocatálisis de NADH.

Se observa que a medida que se adicionan las alícuotas de NADH, la corriente de cada escalón deja de ser estable, aumentando el ruido en cada una de las adiciones. Este comportamiento es posiblemente causado por la alta concentración de la alícuota de NADH agregada a la celda. De igual manera, se construyó una curva de calibración, donde el ajuste lineal obtenido fue $i = 17,4 \cdot [\text{NADH}] (\text{mM}) + 0,05$; $r^2 = 0,9997$ (figura 53.B).

5.4.2. Determinación amperométrica de NADH generado enzimáticamente.

Con el fin de verificar la validez de la curva de calibración, se preparó, en duplicado, una celda enzimática, con una concentración de etanol de 1,07 mM. Si todo el etanol es convertido a producto, se espera obtener la misma concentración de NADH en la celda de trabajo.

Se usaron electrodos modificados distintos, con las mismas condiciones experimentales de la amperometría de la *figura 53.A*. La *figura 54* muestra las medidas amperométricas obtenidas en las celdas de trabajo. La amperométricas de la *figura 54* se inician después de que en la celda ha transcurrido el tiempo necesario para la conversión de NAD^+ en NADH por la enzima ADH.

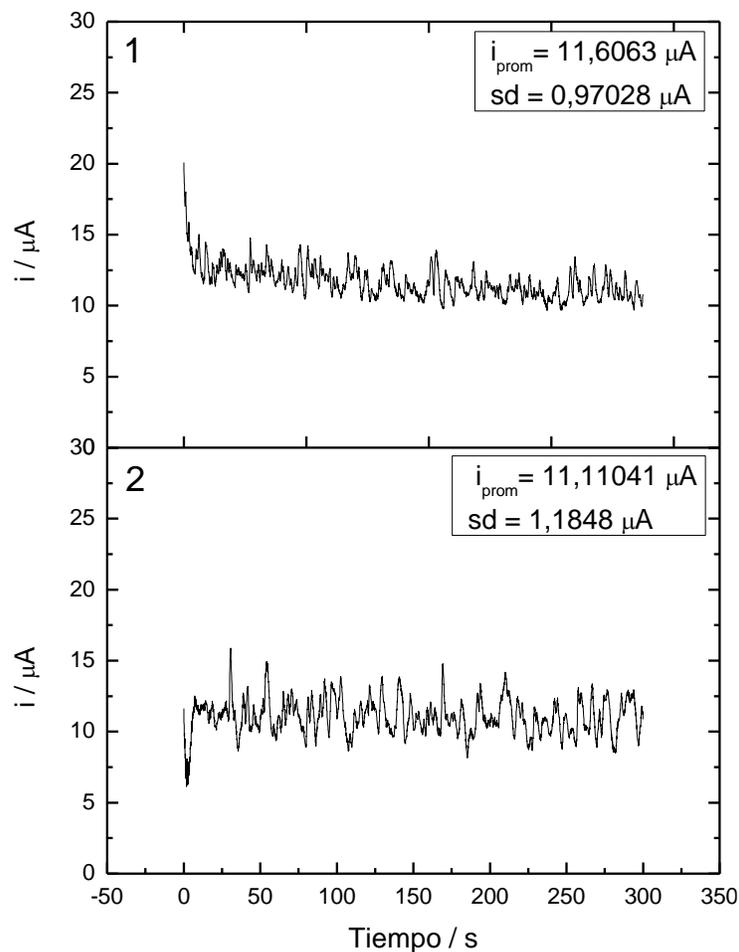


Figura 54: Amperometría de la celda de trabajo. NADH generado enzimáticamente, en duplicado, usando un electrodo GC-MWCNT(3 mg/mL)-med(0,42mM).

Los valores de cada corriente promedio fueron interpoladas en la curva de calibración (*figura 53.B*), resultando $0,68 \pm 0,06$ mM (*figura 54.1*) y $0,65 \pm 0,08$ mM (*figura 54.2*). También se calcularon los porcentajes de recuperación, obteniéndose los valores de 64 ± 6 % y 61 ± 7 %, respectivamente. Al igual que la amperometría de la *figura 53*, las amperometrías de las muestras problema son muy ruidosas, con desviaciones estándar de $1\mu\text{A}$, lo que se traduce en desviaciones estándar de los porcentajes de recuperación del 5 %.

El ruido generado en las medidas amperométricas se debe, en parte, a la gran corriente capacitiva que posee en electrodo modificado con nanotubos de carbono⁶⁶⁻⁶⁸. Debido a esto, se realizaron curvas de calibración, disminuyendo la concentración de la dispersión de nanotubos a 1 mg/mL. Una disminución en la cantidad de nanotubos de carbono depositada en electrodo de carbono vítreo implica una menor retención del mediador en el electrodo. Por esta razón, es que también se probaron dos concentraciones de mediador, 0,1 mM y 0,42 mM, en conjunto con dos concentraciones de dispersión de nanotubos de carbono, 1 y 3 mg/mL. La *figura 55* muestra los experimentos amperométricos para las 4 posibles configuraciones experimentales (A), junto con las curvas de calibración para cada una (B). La tabla 2 resume los ajustes lineales obtenidos para dichas curvas.

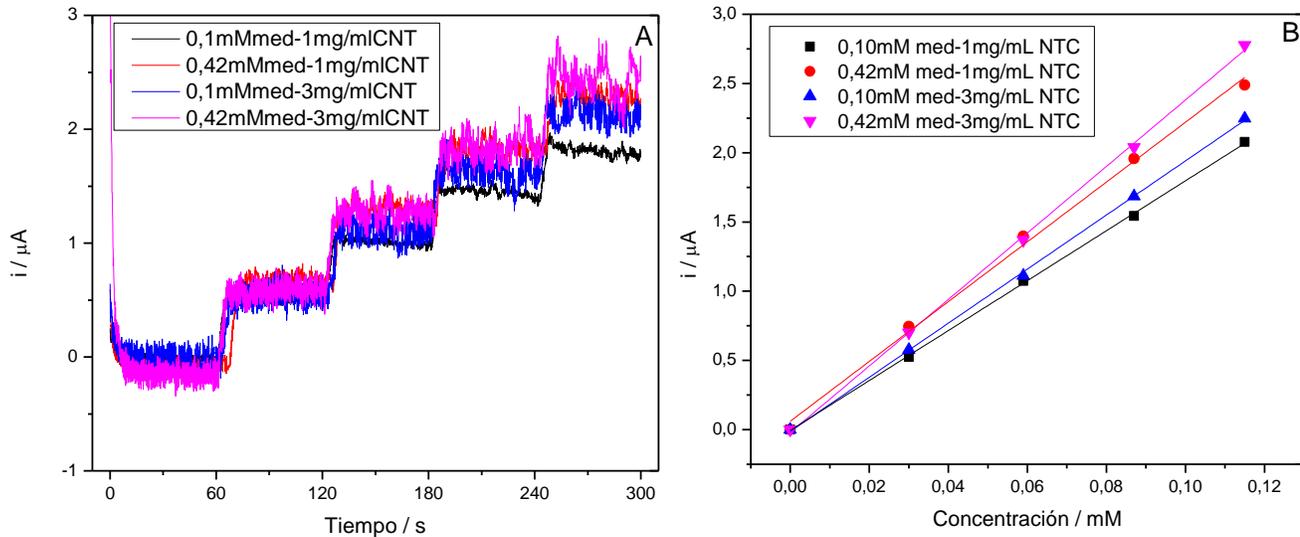


Figura 55: Curvas Amperométricas para las diferentes condiciones experimentales (A).
Curvas de calibración amperométricas (B).

Condición Experimental	Pendiente / $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Intercepto / μA	R^2
1 mg/ml – 0,10 mM	18,02	-0,005	0,9996
1 mg/ml – 0,42 mM	21,50	0,060	0,9960
3 mg/ml – 0,10 mM	19,50	-0,010	0,9995
3 mg/ml – 0,42 mM	24,01	-0,020	0,9991

Tabla 4: Pendiente, intercepto y coeficiente de correlación para las curvas de calibración amperométricas para cada configuración experimental.

Se observa una disminución del ruido en las amperometrías realizadas con dispersión de nanotubos de carbono de 1 mg/mL (*figura 55.A*), concluyendo que la cantidad de nanotubos de carbono en el electrodo influye significativamente en el ruido de la amperometría, donde una mayor cantidad de nanotubos genera más ruido.

Existe un claro aumento de las pendientes al usar un mediador más concentrado (*tabla 4*), debido a que las posibilidades de realizar la electrocatálisis de NADH es mayor, al tener una mayor cantidad de mediador retenido en electrodo. Dado este comportamiento, se realizaron voltametrías cíclicas al mediador antes y después de cada experimento amperométrico, con el fin de evaluar la pérdida de este en el transcurso de la amperometría. La *figura 56* muestra los voltamogramas antes (rojo) y después (negro

segmentado) de una medida amperométrica, para cada condición experimental. La *tabla 5* muestra el área bajo la curva correspondiente a la señal de reducción del mediador antes y después de cada amperometría, para las diferentes condiciones experimentales. La cantidad de mediador retenida en el electrodo modificado, esta expresada como porcentaje.

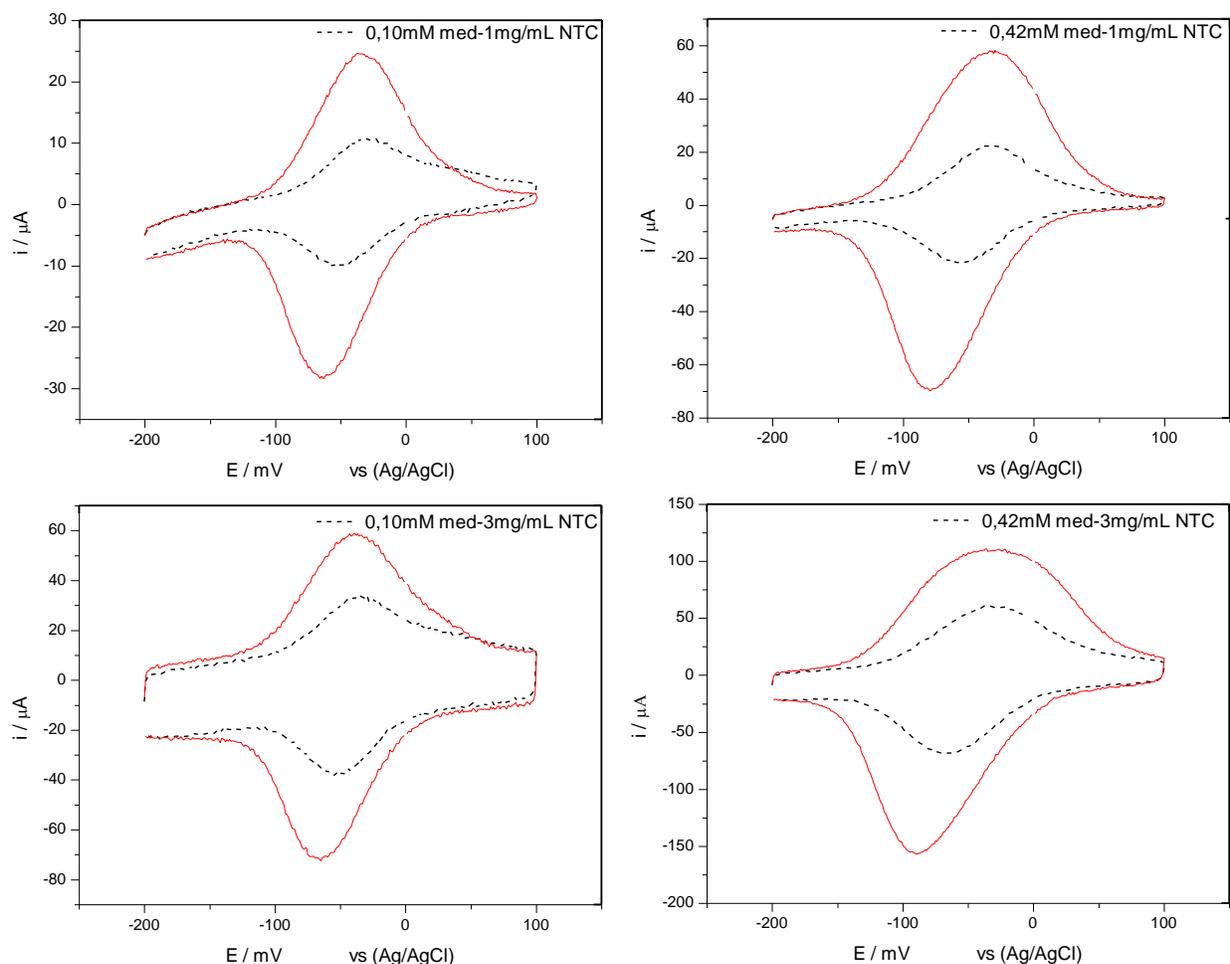


Figura 56: VC de mediador antes (rojo) y después (negro) de una amperometría para cada condición experimental.

Condiciones Experimental	Área bajo la curva mediador antes de la amperometría / μC	Área bajo la curva mediador después de la amperometría / μC	% de retención
1 mg/ml – 0,10 mM	1,63	0,42	25,77
1 mg/ml – 0,42 mM	5,17	1,23	23,79
3 mg/ml – 0,10 mM	3,80	1,34	35,26

3 mg/ml – 0,42 mM	12,58	4,31	34,26
-------------------	-------	------	-------

Tabla 5: Área bajo la curva de la señal de reducción para el mediador antes y después de la amperometría.

Se observan importantes disminuciones en la cantidad de mediador después de realizar el experimento amperométrico con una duración de 5 minutos, producto de la agitación aplicada en cada medida (*figura 56*). Las mayores disminuciones se observan en las amperometrías donde la dispersión de nanotubos de carbono es de 1 mg/mL (*tabla 5*), ya que una menor cantidad nanotubos de carbono en electrodo, disminuye la superficie de retención del mediador en el electrodo modificado.

A partir de los resultados observados en la *figura 55 y 56* y de las *tablas 4 y 5*, se concluyó que la configuración 1 mg/mL – 0,42 mM fue la mejor para realizar los experimentos amperométricos posteriores.

5.5. Curvas de calibración y medición de NADH enzimático

Para realizar una nueva curva de calibración con el objetivo de disminuir la concentración de etanol en la celda de trabajo, se diluyó etanol absoluto 500 veces. De esta manera la concentración de etanol en la celda de trabajo fue de 0,110 mM.

Se trabajó con 2 concentraciones de mediador, 0,42 y 0,85 mM usando la dispersión de nanotubos de carbono de 1 mg/mL. Se experimentó un mediador más concentrado, con el fin de aumentar el tiempo de trabajo de la amperometría, ya que como fue discutido, la agitación y la menor cantidad de nanotubos de carbono provoca una menor presencia del mediador del electrodo. Con el aumento de la concentración de mediador se aseguró una completa oxidación electrocatalítica de NADH en todo el transcurso de tiempo de la amperometría.

Las alícuotas fueron de 40 μ L de concentración 1,5 mM de NADH. Las muestras para validar las curvas de calibración fueron preparadas en triplicado, usando el mediador correspondiente para cada curva de calibración. La *figura 57* muestra la

amperometría (A) y la curva de calibración de NADH (B) con mediador 0,42 mM (negro) y 0,85 mM (rojo).

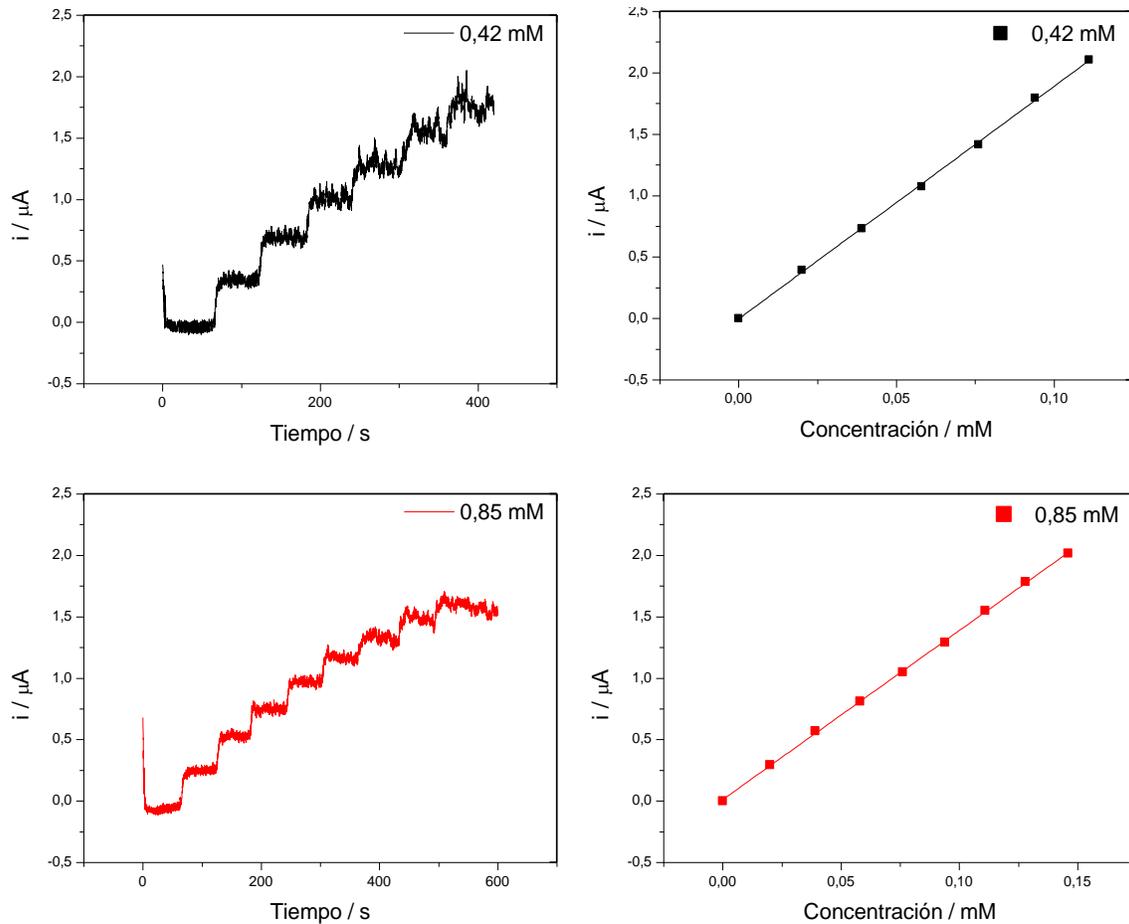


Figura 57: Amperometría (A) y curva de calibración (B) para NADH con mediador 0,42 (negro) mM y 0,85 (rojo).

Para ambas amperometrías, se observa un comportamiento similar donde el ruido comienza a aumentar a medida que avanza el tiempo en la amperometría. Para el caso de la amperometría con 0,85 mM, se extendió el tiempo del experimento, para obtener mayor rango lineal de la curva de calibración.

La ecuación 11 y 12 muestra los ajustes lineales para la curva de calibración con mediador 0,42 y 0,85 mM, respectivamente.

$$i = 18,90 \cdot [\text{NADH}] - 0,002; r^2 = 0,9994 \quad \text{Ecuación 11}$$

$$i = 13,76 \cdot [\text{NADH}] + 0,013; r^2 = 0,9996 \quad \text{Ecuación 12}$$

Las curvas muestran una buena linealidad para la cuantificación de NADH. Para la curva con mediador 0,42 mM, se obtuvo una sensibilidad de $18 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, un límite de detección de $1,81 \mu\text{M}$ y un límite de cuantificación de $13,62 \mu\text{M}$.

Para la curva con mediador 0,85 mM se obtuvo una sensibilidad de $13,76 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$, un límite de detección de $0,12 \mu\text{M}$ y un límite de cuantificación de $11,38 \mu\text{M}$.

El electrodo con mediador 0,85 mM muestra mejores límites de detección y cuantificación, pero una menor sensibilidad en comparación con el electrodo con mediador 0,42 mM. Esto implica que el electrodo con mediador 0,85 mM detecta y cuantifica concentraciones bajas de NADH, mientras que el electrodo con mediador 0,42 mM detecta mayores cambios en la corriente con los cambios de concentración de NADH. Ambas curvas muestran límites de detección y cuantificación similares a los reportados^{69, 70}.

Se realizaron las medidas amperométricas para las celdas enzimáticas, en triplicado, usando las dos concentraciones de mediador. Además, se disminuyó la concentración de etanol a un valor de final de $0,110 \text{ mM}$, dejándolo como reactivo limitante en comparación con el NAD^+ , cuya concentración en la celda fue de $0,804 \text{ mM}$.

La *figura 58* muestra las amperometrías en triplicado para las celdas enzimáticas usando mediador $0,42 \text{ mM}$ (A) y $0,85 \text{ mM}$ (B). La *tabla 6* muestra las concentraciones de NADH obtenida a partir de las ecuaciones (3) y (4), que es equivalente al etanol que había inicialmente en la celda, y los porcentajes de recuperación de etanol.

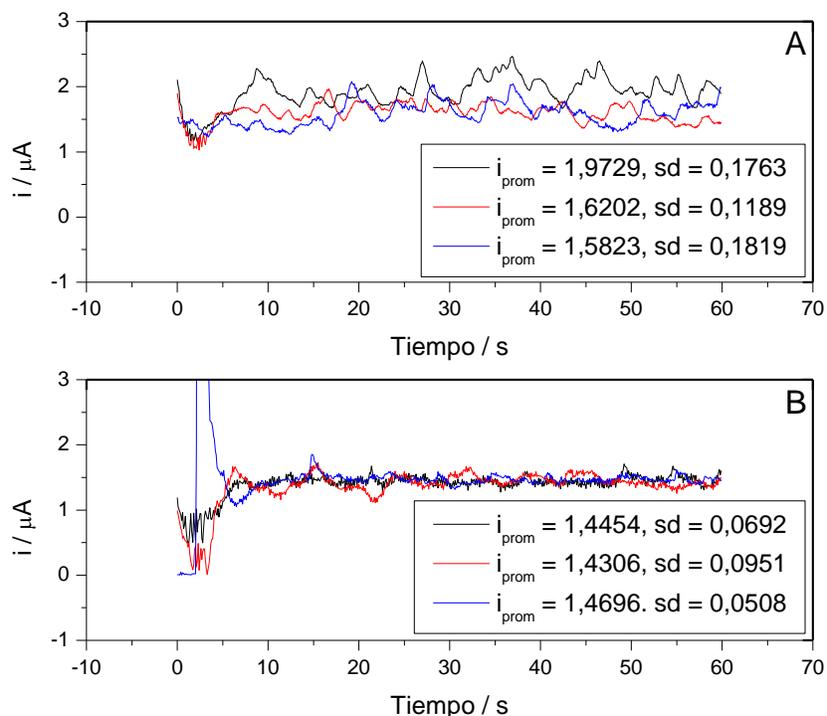


Figura 58: Amperometría de las celdas enzimáticas con mediador 0,42 mM (A) y 0,85 mM (B).

Medida amperométrica	Concentración de Etanol / mM	Recuperación de etanol / %
0,42 mM 1	$0,11 \pm 0,01$	100 ± 9
0,42 mM 2	$0,087 \pm 0,009$	79 ± 8
0,42 mM 3	$0,09 \pm 0,01$	82 ± 9
0,85 mM 1	$0,11 \pm 0,01$	100 ± 9
0,85 mM 2	$0,11 \pm 0,01$	100 ± 9
0,85 mM 3	$0,11 \pm 0,01$	100 ± 9

Tabla 6: Concentración y recuperación de etanol de la celda enzimática.

Se observa menores fluctuaciones de corriente en las amperometrías con mediador 0,85 mM (sd de la *figura 58.B*). La existencia de una mayor cantidad de mediador en electrodo modificado disminuye las oscilaciones de corriente y tiende a mantener la corriente más estable. A pesar de ello, las desviaciones estándar tanto de las concentraciones de etanol calculados como del porcentaje de recuperación son prácticamente iguales para ambas concentraciones de mediador (tabla 6).

Se obtuvieron mejores porcentajes de recuperaciones de etanol usando el mediador de concentración 0,85 mM, siendo los 3 valores iguales a 100 % (tabla 6). Si bien también

se obtuvo un valor de 100 % usando un mediador de concentración 0,42 mM, este valor se encuentra en límite superior del rango lineal de la curva, pudiendo generar errores al momento de interpolar los resultados de corriente en las curvas de calibración.

Otro punto para considerar es que la reacción enzimática está en equilibrio, lo que implica que por muy desplazada que este la reacción hacia los productos con la ayuda de la semicarbazida, algo de etanol queda sin ser convertido a acetaldehído, impidiendo obtener porcentajes de recuperación del 100 %, como fue para el caso de la medida 2 y 3 con 0,42 mM de mediador.

6. Conclusión

- Se optimizó la preparación de electrodos modificados con NTC y nitrocompuesto, obteniendo una baja dispersión en la repetibilidad de los electrodos.
- Se caracterizó el comportamiento electroquímico de nitrocompuesto, obteniéndose el potencial de reducción y la generación de un par redox reversible. Se obtuvo la constante de transferencia heterogénea con un valor de $2,78 \text{ s}^{-1}$.
- Se determinaron las mejores condiciones para lograr la electrocatálisis de NADH, confirmando que el mediador cumple su función de disminuir el potencial de oxidación de NADH.
- Se determinó el mecanismo de interacción, evidenciando las etapas del proceso electrocatalítico y como estas están relacionadas a las señales obtenidas en los voltamogramas cíclicos.
- Se adaptó una metodología bioquímica a nuestro sistema electroquímica, logrando detectar el NADH generado por la enzima ADH, realizando la oxidación de este, en ausencia y presencia de mediador.
- Se optimizaron las condiciones experimentales para mejorar la producción de NADH, modificando el buffer de la celda y modificando las concentraciones de los reactivos para una mejor conversión.
- Se determinó la concentración de etanol de una muestra conocida a partir de la electrocatálisis de NADH, usando la curva amperométrica. Se obtuvo una recuperación del 100% con buenos límites de detección y cuantificación.

7. Bibliografía

1. Hersey, M.; Berger, S. N.; Holmes, J.; West, A.; Hashemi, P., Recent Developments in Carbon Sensors for At-Source Electroanalysis. *Anal Chem* **2019**, *91* (1), 27-43.
2. Science, W. O. Analyze Result <https://www.webofscience.com/wos/woscc/analyze-results/b12dcc16-2bdd-495c-9e75-16b2ff7060ad-b8aec06a>.
3. Luka, G.; Ahmad, S.; Falcone, N.; Kraatz, H.-B., Advances in enzyme-based electrochemical sensors: current trends, benefits, and constraints. In *Bioelectronics and Medical Devices*, 2019; pp 555-590.
4. Luo, H.; Chen, L.-X.; Ge, Q.-M.; Liu, M.; Tao, Z.; Zhou, Y.-H.; Cong, H., Applications of macrocyclic compounds for electrochemical sensors to improve selectivity and sensitivity. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2019**, *95* (3-4), 171-198.
5. Simões, F. R.; Xavier, M. G., Electrochemical Sensors. In *Nanoscience and its Applications*, 2017; pp 155-178.
6. Shanbhag, M. M.; Manasa, G.; Mascarenhas, R. J.; Mondal, K.; Shetti, N. P., Fundamentals of bio-electrochemical sensing. *Chemical Engineering Journal Advances* **2023**, *16*.
7. Islam, M. N.; Channon, R. B., Electrochemical sensors. In *Bioengineering Innovative Solutions for Cancer*, 2020; pp 47-71.
8. Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F., Chemical Sensors Definitions and Classification. *Pure & Appl. Chem.* **1991**, *6*, 1247-1250.
9. Kurbanoglu, S.; Bakirhan, N. K.; Shah, A.; Ozkan, S. A., Chemical Nanosensors in Pharmaceutical Analysis. In *New Developments in Nanosensors for Pharmaceutical Analysis*, 2019; pp 141-170.
10. Raj, M. A.; John, S. A., Graphene-Modified Electrochemical Sensors. In *Graphene-Based Electrochemical Sensors for Biomolecules*, 2019; pp 1-41.
11. Rezaei, B.; Irannejad, N., Metal-based electrodes. In *Electrochemical Sensors*, 2022; pp 51-78.

12. Baig, N.; Sajid, M.; Saleh, T. A., Recent trends in nanomaterial-modified electrodes for electroanalytical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *111*, 47-61.
13. Maduraiveeran, G.; Sasidharan, M.; Ganesan, V., Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. *Biosens Bioelectron* **2018**, *103*, 113-129.
14. Justino, C. I. L.; Duarte, A. C.; Rocha-Santos, T. A. P., Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis. *Trends Analyt Chem* **2016**, *85*, 36-60.
15. Yang, C.; Denno, M. E.; Pyakurel, P.; Venton, B. J., Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review. *Anal Chim Acta* **2015**, *887*, 17-37.
16. Moraitis, G.; Špitalský, Z.; Ravani, F.; Siokou, A.; Galiotis, C., Electrochemical oxidation of multi-wall carbon nanotubes. *Carbon* **2011**, *49* (8), 2702-2708.
17. Moscoso, R.; Carbajo, J.; Squella, J. A., 1,3-Dioxolane: A green solvent for the preparation of carbon nanotube-modified electrodes. *Electrochemistry Communications* **2014**, *48*, 69-72.
18. Schroeder, V.; Savagatrup, S.; He, M.; Lin, S.; Swager, T. M., Carbon Nanotube Chemical Sensors. *Chem Rev* **2019**, *119* (1), 599-663.
19. Ferreira Vargas, F.; De Simone Cividanis, L.; Sales Brito, F.; Canuto de Menezes, B. R.; Franceshi, W.; Alves Nunes Simonetti, E.; Patrocínio Thim, G., Functionalizing Graphene and Carbon Nanotubes A review. *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology* **2016**, *1*, 63.
20. Nesakumar, N.; Berchmans, S.; Alwarappan, S., Chemically modified carbon based electrodes for the detection of reduced glutathione. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *264*, 448-466.
21. Hamidi, H.; Haghghi, B., Fabrication of a sensitive amperometric sensor for NADH and H₂O₂ using palladium nanoparticles-multiwalled carbon nanotube nanohybrid. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2016**, *62*, 423-8.

22. Klun, U.; Zorko, D.; Stojanov, L.; Mirčeski, V.; Jovanovski, V., Amperometric sensor for gaseous H₂O₂ based on copper redox mediator incorporated electrolyte. *Sensors and Actuators Reports* **2023**, *5*.
23. Zhang, F.; Xu, W.; Zhang, L.; Xi, L.; Du, Y.; Ma, L.; Chen, S.; Du, D., Riboflavin as a non-quinone redox mediator for enhanced Cr(VI) removal by *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, *351*.
24. Blanco-López, M. C.; Lobo-Castañón, M. J.; Fernández Abedul, M. T., Bionzymatic amperometric glucose biosensor. In *Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis*, 2020; pp 173-181.
25. Deng, H.; Teo, A. K. L.; Gao, Z., An interference-free glucose biosensor based on a novel low potential redox polymer mediator. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *191*, 522-528.
26. Shafiei-Irannejad, V.; Soleymani, J.; Azizi, S.; KhoubnasabJafari, M.; Jouyban, A.; Hasanzadeh, M., Advanced nanomaterials towards biosensing of insulin: Analytical approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *116*, 1-12.
27. Miranda-Castro, R.; de los Santos Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J., Amperometric detection of NADH using carbon-based electrodes. In *Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis*, 2020; pp 67-74.
28. Gorton, L.; Domínguez, E., Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, *82*, 371-392.
29. Chen, J.; Bao, J.; Cai, C.; Lu, T., Electrocatalytic oxidation of NADH at an ordered carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *516* (1-2), 29-34.
30. Popescu, I. C.; Domínguez, E.; Narváez, A.; Pavlov, V., Electrocatalytic oxidation of NADH at graphite electrodes modified with osmium phenanthroline-dione. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, *464*, 208-214.
31. Sahin, M.; Ayranci, E., Electrooxidation of NADH on Modified Screen-Printed Electrodes: Effects of Conducting Polymer and Nanomaterials. *Electrochimica Acta* **2015**, *166*, 261-270.

32. Santos, A. S.; Pereira, A. C.; Durán, N.; Kubota, L. T., Amperometric biosensor for ethanol based on co-immobilization of alcohol dehydrogenase and Meldola's Blue on multi-wall carbon nanotube. *Electrochimica Acta* **2006**, *52* (1), 215-220.
33. Liu, Q.; Kirchhoff, J. R., Amperometric detection of methanol with a methanol dehydrogenase modified electrode sensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2007**, *601* (1-2), 125-131.
34. Rivas, G. A.; Rodríguez, M. C.; Rubianes, M. D.; Gutierrez, F. A.; Eguílaz, M.; Dalmaso, P. R.; Primo, E. N.; Tettamanti, C.; Ramírez, M. L.; Montemerlo, A.; Gallay, P.; Parrado, C., Carbon nanotubes-based electrochemical (bio)sensors for biomarkers. *Applied Materials Today* **2017**, *9*, 566-588.
35. Oliveira, T.; Morais, S., New Generation of Electrochemical Sensors Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Applied Sciences* **2018**, *8* (10).
36. Raj, C. R.; Behera, S., Mediatorless voltammetric oxidation of NADH and sensing of ethanol. *Biosens Bioelectron* **2005**, *21* (6), 949-56.
37. Radoi, A.; Compagnone, D., Recent advances in NADH electrochemical sensing design. *Bioelectrochemistry* **2009**, *76* (1-2), 126-34.
38. Teymourian, H.; Salimi, A.; Hallaj, R., Electrocatalytic oxidation of NADH at electrogenerated NAD⁺ oxidation product immobilized onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid nanocomposite: application to ethanol biosensing. *Talanta* **2012**, *90*, 91-8.
39. Maduraiveeran, G.; Jin, W., Functional nanomaterial-derived electrochemical sensor and biosensor platforms for biomedical applications. In *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry*, 2020; pp 297-327.
40. Zeng, Y.; Zhu, Z.; Du, D.; Lin, Y., Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2016**, *781*, 147-154.
41. Moscoso, R.; Barrientos, C.; Moris, S.; Squella, J. A., Electrocatalytic oxidation of NADH in a new nanostructured interface with an entrapped butylpyrene nitroaromatic derivative. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2019**, *837*, 48-54.
42. Moscoso, R.; Barrientos, C.; Abarca, S.; Squella, J. A., Electrochemical characterization of nitrocoumarin-modified nanostructured electrode platforms: New precursors for the electrocatalysis of NADH. *Electrochimica Acta* **2023**, *443*.

43. Kumar, S. A.; Chen, S.-M., Electroanalysis of NADH Using Conducting and Redox Active Polymer/Carbon Nanotubes Modified Electrodes-A review. *Sensors* **2008**, *8* (2), 739-766.
44. Li, J.; Sun, Q.; Mao, Y.; Bai, Z.; Ning, X.; Zheng, J., Sensitive and low-potential detection of NADH based on boronic acid functionalized multi-walled carbon nanotubes coupling with an electrocatalysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2017**, *794*, 1-7.
45. Raj, C. R.; Chakraborty, S., Carbon nanotubes-polymer-redox mediator hybrid thin film for electrocatalytic sensing. *Biosens Bioelectron* **2006**, *22* (5), 700-6.
46. Milagre, C. D. F.; Milagre, H. M. S., Alcohol dehydrogenase-catalyzed oxidation. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2022**, *38*.
47. Mao, X.; wen, Y.; Xiong, M.; Niu, Z.; Jiang, L.; Zhang, H.; Yang, L.; Chen, R., Electrochemical Biosensors Based on Carbon Nanocages for the Detection of NADH and Ethanol. *International Journal of Electrochemical Science* **2021**, *16* (4).
48. Shkotova, L. V.; Soldatkin, A. P.; Gonchar, M. V.; Schuhmann, W.; Dzyadevych, S. V., Amperometric biosensor for ethanol detection based on alcohol oxidase immobilised within electrochemically deposited Resydrol film. *Materials Science and Engineering: C* **2006**, *26* (2-3), 411-414.
49. Lorenzo, J. M.; Munekata, P. E.; Muchenje, V.; Saraiva, J. A.; Pinto, C. A.; Barba, F. J.; Santos, E. M., Biosensors Applied to Quantification of Ethanol in Beverages. In *Engineering Tools in the Beverage Industry*, 2019; pp 447-468.
50. Kuralay, F., Nanomaterials-Based Enzyme Biosensors for Electrochemical Applications: Recent Trends and Future Prospects. In *New Developments in Nanosensors for Pharmaceutical Analysis*, 2019; pp 381-408.
51. Costa Rama, E.; Biscay, J.; Gonzalez Garcia, M. B.; Julio Reviejo, A.; Pingarron Carrazon, J. M.; Costa Garcia, A., Comparative study of different alcohol sensors based on Screen-Printed Carbon Electrodes. *Anal Chim Acta* **2012**, *728*, 69-76.
52. Bilgi, M.; Ayranci, E., Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *237*, 849-855.

53. Miranda-Castro, R.; Lobo-Castañón, M. J., Determination of ethyl alcohol in beverages using an electrochemical enzymatic sensor. In *Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis*, 2020; pp 183-192.
54. Lee, C.-A.; Tsai, Y.-C., Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *138* (2), 518-523.
55. Guía de laboratorio del curso Toxicología: Determinación enzimática de la concentración de etanol. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
56. Moscoso, R.; Inostroza, E.; Squella, J. A., A non-conventional way to perform voltammetry. *Electrochemistry Communications* **2017**, *81*, 61-64.
57. Moscoso, R.; Carbajo, J.; Mozo, J. D.; Squella, J. A., Voltammetric behavior of 3,5-dinitrobenzoic acid in solution on GCE and encapsulated on multiwalled carbon nanotube modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2016**, *765*, 149-154.
58. Amooshahi, P.; Khazalpour, S.; Amani, A.; Masoumi, H., Green electrochemical method for the synthesis of nitro and azo derivatives based on mefenamic acid. *Sci Rep* **2022**, *12* (1), 1106.
59. Bollo, S.; Núñez-Vergara, L. J.; Martínez, C.; Chauviere, G.; Périé, J.; Squella, J. A., Voltammetric study of nitro radical anion generated from some nitrofuran compounds of pharmacological significance. *Electroanalysis* **2023**, *15* (1), 19-25.
60. Urzúa, J.; Yañez, C.; Carbajo, J.; Mozo, J. D.; Squella, J. A., Nitrofluorene derivatives trapped within MWCNTs for electrocatalysis of NADH: Substituent effects on π - π stacking interaction strength. *Electrochemistry Communications* **2020**, *121*.
61. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. Second ed.; New York, 2001; p 833.
62. Musameh, M.; Wang, J.; Merkoci, A.; Lin, Y., Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. *Electrochemistry Communications* **2002**, *4*, 743-746.
63. Bilgi, M.; Sahin, E. M.; Ayranci, E., Sensor and biosensor application of a new redox mediator: Rosmarinic acid modified screen-printed carbon electrode for

electrochemical determination of NADH and ethanol. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2018**, 813, 67-74.

64. Moscoso, R.; Inostroza, E.; Bollo, S.; Squella, J. A., Electrocatalysis of NADH on 3,5-Dinitrobenzoic Acid Encapsulated on Multiwalled Carbon Nanotube-Modified Electrode. *Electrocatalysis* **2016**, 7 (5), 357-361.

65. Jian-Jun Sun, J.-J. X., Hui-Qun Fang, Hong-Yuan Chen, Electrocatalytical oxidation of NADH with dopamine covalently bound to self-assembled cysteamine monolayers on a gold electrode. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1997**, Volume 44 (1), 45-50.

66. Kaliyaraj Selva Kumar, A.; Compton, R. G., Understanding Carbon Nanotube Voltammetry: Distinguishing Adsorptive and Thin Layer Effects via "Single-Entity" Electrochemistry. *J Phys Chem Lett* **2022**, 13 (24), 5557-5562.

67. Escobar-Teran, F.; Perrot, H.; Sel, O., Carbon-Based Materials for Energy Storage Devices: Types and Characterization Techniques. *Physchem* **2023**, 3 (3), 355-384.

68. Tu, Y.; Lin, Y.; Yantasee, W.; Ren, Z., Carbon Nanotubes Based Nanoelectrode Arrays: Fabrication, Evaluation, and Application in Voltammetric Analysis. *Electroanalysis* **2005**, 17 (1), 79-84.

69. Jacobs, C. B.; Peairs, M. J.; Venton, B. J., Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Anal Chim Acta* **2010**, 662 (2), 105-27.

70. Alim, S.; Vejayan, J.; Yusoff, M. M.; Kafi, A. K. M., Recent uses of carbon nanotubes & gold nanoparticles in electrochemistry with application in biosensing: A review. *Biosens Bioelectron* **2018**, 121, 125-136.