



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica  
Laboratorio de Bioelectroquímica**

**“COMPUESTOS POLINITRADOS COMO MEDIADORES  
ELECTROCATALÍTICOS DE NADH EN ELECTRODOS  
MODIFICADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO”**

**Memoria para optar al Título Profesional de Químico**

**ELIZABETH GUILLERMINA INOSTROZA RAMÍREZ**

PROFESOR PATROCINANTE  
Dr. Juan Arturo Squella Serrano

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

**Santiago, Chile**

**2016**

## RESUMEN

Los electrodos modificados con nanotubos de carbono han recibido considerable interés debido a sus amplias propiedades estructurales, mecánicas, químicas y electrónicas. Entre estas propiedades se destacan la alta estabilidad química y térmica, buena conductividad y alta actividad electrocatalítica. Las propiedades electrocatalíticas que se destacan son la disminución de los sobrepotenciales y el incremento en la intensidad de los picos voltamétricos. Además, los nanotubos de carbono tienen la capacidad de encapsular compuestos por fisioadsorción en la nano estructura formada. Estas características permiten desarrollar nuevas metodologías en la modificación de la superficie de los nanotubos de carbono, con lo que se obtiene una mayor capacidad de detección electroquímica de diversas moléculas, por ejemplo, NADH.

El NADH es el cofactor de un gran número de enzimas deshidrogenasa y desempeña un papel importante en la cadena de transferencia de electrones en sistemas biológicos. Muchas reacciones enzimáticas útiles para la fabricación de compuestos en la industria son dependientes de la reacción de este cofactor, pero requieren altos sobrepotenciales. Por este motivo muchos investigadores centran su atención en solucionar este problema a través del uso de electrodos modificados con diversas moléculas.

En esta memoria de título se propone un procedimiento simple y rápido de modificación de los electrodos de carbono vítreo con nanotubos de carbono, basado en el encapsulamiento y modificación electroquímica de compuestos polinitrados como especies mediadoras para estudiar la electrocatálisis sobre NADH. Se estudiaron tres mediadores polinitrados; el ácido 3,5-dinitrobenzoico, el 1,3-dinitrobenzoceno y el 1,3,5-trinitrobenzoceno. Todos presentaron actividad electrocatalítica sobre el NADH. Además, se estudió la influencia de distintos factores en la actividad electrocatalítica, tales como el tiempo de inmersión de los electrodos modificados en

solución de NADH, la variación de la concentración del mediador, el efecto de la concentración del NADH y el efecto de la velocidad de barrido.

La principal ventaja de estos electrodos a diferencia de otros electrodos modificados con mediadores redox, es que la técnica de modificación propuesta consiste en un procedimiento sencillo por medio de la inmersión del electrodo con nanotubos de carbono en una disolución orgánica del nitrocompuesto, obteniendo electrodos modificados con compuestos poco solubles. Estos electrodos pueden ser utilizados en solución acuosa.

# **POLI-NITRATED COMPOUNDS AS ELECTROCATALYTIC MEDIATORS OF NADH ON ELECTRODES MODIFIED WITH CARBON NANOTUBES**

## **SUMMARY**

Electrodes modified with carbon nanotubes had received considerable attention due to their many structural, mechanical, chemical and electrical properties. Among this many properties, high chemical and thermal stability, high conductivity and high electrocatalytic activity outstand. The most important electrocatalytic properties are lowering of overpotential and the increased voltammetric peaks. Additionally, nanotubes have the ability to encapsulate other compound by physisorption onto the nanostructure. These characteristics allow to develop novel methodologies on the modification the surface of the nanotubes, leading to a higher ability to detect electrochemically diverse molecules, for example, NADH.

NADH is cofactor to a large number of dehydrogenase enzymes and plays an important role on the electron transfer chain on biological systems. Many enzymatic reactions with applications on the manufacturing industry rely on this cofactor, though they require high overpotential. Because of that researchers focus their attention on solving this problem though the use of electrodes modified with other molecules.

This degree work proposes a simple and fast procedure for modifying glassy carbon electrode with carbon nanotubes multiwalled, based on the encapsulation and electrochemical modification of poli-nitrated compounds as mediator to study the electrocatalysis on NADH. Three poli-nitrated mediators were studied; 3,5-dinitrobenzoic acid, 1-3 dinitrobenzene and 1,3,5-trinitrobenzene. All of them shown electrocatalytic activity on NADH. Moreover, the influence of other factors on the level of activity were studied. These include immersion time of the modified electrodes on the NADH solution, concentration of the mediator, concentration of NADH and scan rate.

The main advantage of these electrodes compared against other electrodes modified using redox mediators, is that the modification technique consists in a simple procedure based on the immersion of the electrode on a nitro compound solution, obtaining modified electrodes with compounds slightly soluble. These electrodes can be used in aqueous solution.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	ii
SUMMARY .....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS DE LA MEMORIA.....	5
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
3.1. Reactivos y solventes .....	6
3.2. Equipos .....	7
3.3. Métodos.....	8
3.3.1. Preparación de soluciones.....	8
3.4. Desarrollo experimental.....	10
3.4.1. Dispersión de nanotubos de carbono .....	10
3.4.2. Preparación de electrodos con NTCs .....	10
3.4.3. Modificación de electrodos con NTC y nitrocompuestos por dipping.....	11
3.4.4. Estudio de la superficie de los electrodos GC-NTC con microscopía electrónica de barrido (SEM).....	11
3.4.5. Estudio de electrocatálisis.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.01. Caracterización electroquímica de nitrocompuestos.....	14
4.02. Estabilidad de los nitrocompuestos en solución .....	21
4.03. Estudio de pH de los nitrocompuestos en electrodos GC-NTC .....	25
4.04. Efecto de la velocidad de barrido sobre los nitrocompuestos en electrodos GC-NTC .....	28
4.05. Determinación de la constante de transferencia heterogénea $k_h$ de los nitrocompuestos .....	30
4.06. Caracterización electroquímica del NADH .....	34
4.07. Estabilidad del NADH en solución.....	35
4.08. Optimización del tiempo de inmersión del electrodo GC-NTC en solución NADH .....	36
4.09. Electrocatálisis de electrodos modificado con NTC y nitrocompuestos sobre NADH .....	38
4.10. Estudio de la superficie de los electrodos GC-NTC con microscopía electrónica de barrido (SEM).....	41
4.11. Estudio de las señales a distintos tiempos de inmersión en NADH .....	43
4.12. Variación de la concentración del mediador .....	47
4.13. Efecto de la concentración de NADH sobre el electrodo GC-NTC-Med .....	52
4.14. Efecto de la velocidad de barrido en el conjunto mediador-NADH.....	55
4.15. Electrocatálisis de electrodos modificados con NTC y diferentes nitrocompuestos sobre NADH.....	68
5. CONCLUSIONES .....	70
6. REFERENCIAS.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metodología general para la modificación de un electrodo de carbono vítreo. ....	10
<b>Figura 2.</b> Metodología para la modificación de un electrodo con NTC con nitrocompuesto por dipping.....	11
<b>Figura 3.</b> Metodología para el estudio de electrocatálisis de NADH <b>1.</b> Inmersión del electrodo GC-NTC en la solución de nitrocompuesto en etanol. <b>2.</b> Lavado del electrodo con abundante agua nano pura. <b>3.</b> Reducción de un grupo nitro presente en la estructura del nitrocompuesto en celda con solución tampón. <b>4.</b> Cambio de celda del electrodo a una celda con NADH en buffer B-R pH 7. <b>5.</b> Respuesta electroquímica del mediador (nitrocompuesto) con NADH. ....	13
<b>Figura 4.</b> Estructura química de los nitrocompuestos. <b>A.</b> 3,5-DNB <b>B.</b> DNB y <b>C.</b> TNB. ....	14
<b>Figura 5.</b> Voltamogramas cíclicos de los nitrocompuestos en buffer fosfato 0,1 M pH 7. Electrodo de carbono vítreo. <b>A.</b> 3,5-DNB 2 mM <b>B.</b> DNB 2 mM <b>C.</b> TNB 2 mM. ....	15
<b>Figura 6.</b> Voltamogramas cíclicos de los nitrocompuestos sobre electrodos GC-NTC. <b>A.</b> GC-NTC-3,5DNB <b>B.</b> GC-NTC-DNB <b>C.</b> GC-NTC-TNB. Buffer B-R pH 7. $v = 100$ mV/s.....	17
<b>Figura 7.</b> Voltamogramas cíclicos de los compuestos sobre electrodos GC-NTC en buffer B-R 0,1 M pH 7 <b>A, B y C.</b> con dos y tres grupos nitro reducidos (línea continua) con los correspondientes pares redox aislados (línea discontinua), 3-5-DNB, DNB y TNB 2 mM, respectivamente. <b>D.E y F.</b> con un grupo reducido y los pares redox en línea discontinua, 3,5-DNB, DNB y TNB 2 mM, respectivamente. ....	20
<b>Figura 8.</b> Estudio de estabilidad del 3,5-DNB 2 mM en buffer fosfato 0,1 M con electrodo GC. <b>A.</b> 3,5-DNB a pH 2. <b>B.</b> 3,5-DNB a pH 7 y <b>C.</b> 3,5-DNB a pH 11. ....	22
<b>Figura 9.</b> Estudio de estabilidad del DNB 2 mM en buffer fosfato 0,1 M con electrodo GC. <b>A.</b> DNB a pH 2. <b>B.</b> DNB a pH 7 y <b>C.</b> DNB a pH 11. ....	23
<b>Figura 10.</b> Estudio de estabilidad del TNB 2 mM en buffer fosfato 0,1 M con electrodo GC. <b>A.</b> TNB a pH 2 <b>B.</b> TNB a pH 7 y <b>C.</b> TNB a pH 11. ....	24
<b>Figura 11.</b> Efecto del pH sobre la respuesta electroquímica del 3,5-DNB en <b>A.</b> buffer B-R 0,1 M pH 11. <b>B.</b> buffer B-R pH 7. y <b>C.</b> buffer B-R pH 2. ....	25
<b>Figura 12.</b> Efecto del pH sobre la respuesta electroquímica del DNB en <b>A.</b> buffer B-R 0,1 M pH 11. <b>B.</b> buffer B-R pH 7 y <b>C.</b> buffer B-R pH 2. ....	26
<b>Figura 13.</b> Efecto del pH sobre la respuesta electroquímica del DNB en <b>A.</b> buffer B-R 0,1 M pH 11. <b>B.</b> buffer B-R pH 7. Y <b>C.</b> buffer B-R pH 2. ....	27
<b>Figura 14.</b> Estudio de la velocidad de barrido para <b>A.</b> GC-NTC-3,5-DNB en buffer B-R 0,1 M pH 7. <b>B.</b> GC-NTC-DNB en buffer B-R pH 7. <b>C.</b> GC-NTC-TNB en buffer B-R pH 7. ....	28
<b>Figura 15.</b> Relación lineal entre $\log I_p$ versus $\log v$ para los tres nitrocompuestos. (■) GC-NTC-3,5-DNB (●) GC-NTC-DNB (▲) GC-NTC-TNB en buffer B-R pH 7. ....	29
<b>Figura 16.</b> <b>A.</b> Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para los electrodos GC-NTC-3,5-DNB medido en buffer B-R pH 7. <b>B.</b> Variación del potencial de pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido anódica y catódica. ....	31
<b>Figura 17.</b> <b>A.</b> Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para los electrodos GC-NTC-DNB medido en buffer B-R pH 7. <b>B.</b> Variación del potencial de pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido anódica y catódica. ....	31
<b>Figura 18.</b> <b>A.</b> Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para los electrodos GC-NTC-TNB medido en buffer B-R pH 7 <b>B.</b> Variación del potencial de pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido. ....	32

<b>Figura 19.</b> Voltamogramas cíclicos del NADH sobre electrodo GC-NTC en buffer B-R 0,1 M pH 7. $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ .....	34
<b>Figura 20.</b> Estudio de estabilidad del NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7 con un electrodo GC-NTC.....	35
<b>Figura 21.</b> Gráfico de la $i_p$ versus el tiempo de inmersión del electrodo GC-NTC en la celda con solución de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.....	36
<b>Figura 22.</b> Estudio de repetibilidad de electrodos lavados con agua entre cada medición. NADH 3 mM en buffer B-R pH 7. Tiempo de inmersión 10 s. ....	37
<b>Figura 23.</b> Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC-Mediador. En línea discontinua, el par redox hidroxilamina/nitroso para cada compuesto medido en buffer B-R 0,1 M pH 7. En línea continua, electrodos con par redox encapsulado en el electrodo (GC-NTC-Mediador) medido en una solución NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. <b>A.</b> electrodo GC-NTC-3,5-DNB <b>B.</b> GC-NTC-DNB <b>C.</b> GC-NTC-TNB. ....	39
<b>Figura 24.</b> Voltamograma cíclico de electrodo con el par redox encapsulado en el electrodo (GC-NTC-3,5-DNB) medido en una solución NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.....	40
<b>Figura 25.</b> Imágenes SEM de la superficie de discos modificados con NTCs. <b>A.</b> Con 3,5-DNB 12000x. <b>B.</b> Con NADH 12000x. <b>C</b> con 3,5-DNB 20000x. <b>D</b> NADH 20000x. <b>E.</b> con 3,5-DNB 50000x. <b>F.</b> con NADH 50000x.....	42
<b>Figura 26.</b> Voltamogramas cíclicos del electrodo GC-NTC-3,5-DNB medido a distintos tiempos de interacción con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. ....	44
<b>Figura 27.</b> Voltamogramas cíclicos del electrodo GC-NTC-DNB medido a distintos tiempos de interacción con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.....	45
<b>Figura 28.</b> Voltamogramas cíclicos del electrodo GC-NTC-TNB medido a distintos tiempos de interacción sin sacarlo de la celda con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. ....	46
<b>Figura 29.</b> Voltamogramas de pulso diferencial de electrodos GC-NTC-3,5-DNB modificados con distintas concentraciones de 3,5-DNB a una concentración constante de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.....	48
<b>Figura 30.</b> Voltamogramas de pulso diferencial de electrodos GC-NTC-DNB modificados a distintas concentraciones de DNB a una concentración constante de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH7. ....	49
<b>Figura 31.</b> Voltamogramas de pulso diferencial de electrodos GC-NTC-TNB modificado a distintas concentraciones de TNB a una concentración constante de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. ....	50
<b>Figura 32.</b> Dependencia de la corriente de pico catalítica Med-NADH (■) y la corriente del NADH sin electrocatalizar (▲) en función de la variación de la concentración del mediador, con NADH de 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. <b>A.</b> GC-NTC-3,5-DNB <b>B.</b> GC-NTC-DNB <b>C.</b> GC-NTC-TNB.....	51
<b>Figura 33.</b> Voltamogramas de pulso diferencial a distintas concentraciones de NADH en buffer B-R 0,1 M pH 7 a una concentración fija de <b>A.</b> 3,5-DNB 2 mM y <b>B.</b> DNB 2 mM, en electrodos GC-NTC.....	52
<b>Figura 34.</b> Voltamogramas de pulso diferencial a distintas concentraciones de NADH buffer B-R 0,1 M pH 7 a una concentración fija de TNB 2mM en electrodos GC-NTC.....	53
<b>Figura 35.</b> Dependencia de la corriente de pico electrocatalítica del conjunto Med-NADH (■) y la corriente del NADH sin electrocatalizar (●) con la variación de la concentración del NADH en buffer B-R 0,1 M pH 7. <b>A.</b> 3,5-DNB 2 mM en GC-NTC <b>B.</b> DNB 2mM GC-NTC <b>C.</b> TNB 1 mM GC-NTC. ....	54



<b>Figura 36.</b> Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido con electrodos GC-NTC-Med en NADH 3 mM en buffer B-R pH 7. <b>A.</b> 3,5-DNB 2 mM como mediador. <b>B.</b> DNB 2 mM como mediador. <b>C.</b> TNB 2 mM como mediador. ....	56
<b>Figura 37.</b> Gráfico del logaritmo de la corriente de pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido, para electrodos modificados GC-NTC-Med en NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7,0. <b>A.</b> DNB 2 mM. <b>B.</b> 3,5-DNB 2 mM y <b>C.</b> TNB 2 mM. ....	57
<b>Figura 38.</b> Gráfico de $E_p$ versus $\log v$ . Con $v$ desde $50 \text{ mVs}^{-1}$ hasta $2000 \text{ mVs}^{-1}$ para electrodos GC-NTC-Med en NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7,03. <b>A.</b> DNB 2 mM. <b>B.</b> 3,5-DNB 2 mM y <b>C.</b> TNB 2 mM. ....	58
<b>Figura 39.</b> Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para electrodos GC-NTC modificados con TNB 2 mM en NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. ....	59
<b>Figura 40.</b> Voltamogramas cíclicos de un electrodo GC-NTC modificado con TNB 2 mM, medido en NADH 3mM en buffer B-R pH 7 a distintos tiempos de interacción del electrodo <b>A.</b> 1 min. <b>B.</b> 5 min. $v = 500 \text{ mV/s}$ .....	61
<b>Figura 41.</b> Voltamogramas cíclicos para electrodos GC-NTC modificado con <b>A.</b> <b>A'</b> 3,5-DNB 2 mM <b>B.</b> <b>B'</b> DNB y <b>C.</b> <b>C'</b> TNB 2 mM. <b>A'.</b> <b>B'.</b> y <b>C'.</b> Medido en celda con NADH 3 mM buffer B-R pH 7. <b>A.</b> <b>B.</b> y <b>C.</b> Medido en celda con buffer B-R 0,1 M pH 7. $v = 100 \text{ mV/s}$ con 20 barridos consecutivos. Las flechas indican la disminución de las señales de mediador redox. ....	63
<b>Figura 42.</b> Variación de las corrientes anódicas y catódicas de los voltamogramas de la figura 41. En rojo las corrientes de pico de oxidación ( $\square$ ) y reducción ( $\circ$ ) del mediador en presencia de NADH. En negro las corrientes de pico de oxidación ( $\blacksquare$ ) y reducción ( $\bullet$ ) del mediador en ausencia de NADH. <u>No se muestra el correspondiente a la electrocatálisis.</u> <b>A.</b> 3,5-DNB 2 mM <b>B.</b> DNB 2 mM y <b>C.</b> TNB 2mM.....	65
<b>Figura 43.</b> Ilustración gráfica del proceso de electrocatálisis. <b>1.</b> Oxidación del mediador redox encapsulado en los electrodos GC-NTC. <b>2.</b> Reducción del mediador redox y Oxidación del NADH. <b>3.</b> Interfase solución/ zona de reacción. Proceso sin agitación.....	67
<b>Figura 44.</b> Prueba de electrocatálisis sobre NADH 3 mM en buffer B-R pH 7 de electrodos GC-NTC modificados con MNB 10 mM. En línea continua electrodo GC-NTC-MNB en NADH. En línea discontinua electrodos GC-NTC en NADH en buffer B-R pH 7. En línea de puntos, electrodos GC-NTC-MNB en buffer B-R pH 7. ....	68
<b>Figura 45.</b> Prueba de electrocatálisis sobre NADH 3 mM en B-R 0,1 M pH 7 de electrodos GC-NTC modificados con <b>A.</b> 1,2-DNB 5,47 mM <b>B.</b> 1,4-DNB 4,97 mM. En línea continua, electrodo GC-NTC-Med en NADH. En línea de puntos, electrodos GC-NTC-Med en buffer B-R pH 7. En línea discontinua, electrodos GC-NTC en NADH 3 mM en buffer B-R pH 7. ....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Potenciales de pico de las señales de reducción de los grupos nitro (señales I, II y III Fig.6) de los compuestos sobre GC y GC-NTC. ....	18
<b>Tabla II.</b> Resultados obtenidos para la pendiente de la recta y su respectivo valor de $\alpha$ para los distintos compuestos. ....	32
<b>Tabla III.</b> Resultados obtenidos en el cálculo de la constante de transferencia heterogénea para los distintos compuestos a 25°C. ....	33
<b>Tabla IV.</b> Relación entre la corriente electrocatalítica (Med-NADH) y la corriente de pico de la señal de reducción del mediador a diferentes velocidades de barrido. ....	60
<b>Tabla V.</b> Relación entre la corriente catalítica y la corriente de pico de la señal de reducción del mediador a diferentes tiempos de medición del electrodo. ....	61
<b>Tabla VI.</b> Resultados de las tasas de disminución de los nitrocompuestos en buffer B-R en presencia y ausencia de NADH. ....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

**B-R:** buffer Britton-Robinson

**DNB:** 1,3-dinitrobenceno

**1,2-DNB:** 1,2-dinitrobenceno

**1,4-DNB:** 1,4-dinitrobenceno

**3,5-DNB:** Ácido 3,5-dinitrobenzoico

**Ep:** Potencial de pico

**GC:** Electrodo de carbono vítreo (Glassy carbon electrode)

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

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

$i_{lim}$ : Corriente límite

$i_p$ : Corriente de pico

$k_h$ : Constante de transferencia heterogénea

**Med:** Mediador

**MNB:** nitrobenceno o mononitrobenceno

**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida

**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótido en forma oxidada

**NTC:** Nanotubos de carbono

**SEM:** Microscopía electrónica de barrido

**TNB:** 1,3,5-trinitrobenceno

**VC:** Voltametría cíclica

**VDP:** Voltametría de pulso diferencial

## 1. INTRODUCCIÓN

Electrocatalisis según “The Encyclopedia of Applied Electrochemistry” se define como la ciencia que explora las velocidades de las reacciones electroquímicas, en función de las propiedades de la superficie del electrodo<sup>1</sup>. La electrocatalisis es una extensión de la electroquímica de la palabra catalisis. La palabra catalisis que deriva del griego: kata (abajo) y lyein (aflojar, ayudar o facilitar) fue introducida aparentemente por J. J. Berzelius en 1835<sup>2</sup>. La catalisis en general, puede ser clasificada como catalisis homogénea, en la que sólo una fase está involucrada y catalisis heterogénea, en la que se produce la reacción cerca del límite entre las fases<sup>3</sup>. El uso de este último concepto se extiende a los sistemas que conforman una interfaz sólido/líquido, donde se llevan a cabo las reacciones electroquímicas. Algunos autores afirman que la electrocatalisis es un fenómeno de catalisis heterogénea<sup>4</sup>. Sin embargo, otros autores afirman que existen algunas diferencias clave entre la catalisis heterogénea y electrocatalisis debido a la presencia de la doble capa electroquímica en la interfase electrodo-electrolito, y como influencia el potencial aplicado a la velocidad de reacción<sup>5</sup>.

El término electrocatalisis fue introducido por N. Kobozev y W. Monblanowa en 1934<sup>6</sup> y usado posteriormente desde principios de 1960 en relación al desarrollo de la investigación de las celdas combustibles<sup>7</sup>. Existe un sin número de reacciones electrocatalíticas de gran importancia. Algunas de las reacciones electrocatalizadas que han sido estudiadas son: reacciones anódicas en celdas combustible de baja temperatura que utilizan hidrógeno<sup>8</sup>, metanol<sup>9</sup> y etanol<sup>10</sup>, como combustibles en medio ácido; reacción de desprendimiento de cloro<sup>11</sup>; reducción de oxígeno<sup>12</sup>; la oxidación de pequeñas moléculas orgánicas útiles para la conversión de energía (metanol, etanol, ácido fórmico)<sup>13</sup>; reacciones de síntesis orgánicas<sup>14</sup> y reacciones de oxidación de moléculas de interés biológico (NADH<sup>15</sup>, cisteína<sup>16</sup>, glutatión<sup>17</sup>, etc.).

En general, el papel de la superficie electrocatalítica es proveer un camino energéticamente favorable para que una reacción ocurra, y actuar como soporte para las

moléculas que sirven como mediador en la transferencia electrónica en una reacción determinada, actuando como un electrocatalizador <sup>4</sup>. Por lo tanto, las propiedades de la superficie del electrodo son de gran importancia y determina la actividad electrocatalítica en las reacciones redox. En muchos casos, las propiedades superficiales originales de un material no son adecuadas para ciertas aplicaciones, por lo que es necesario modificar la superficie, lo que permite obtener electrodos modificados. Los primeros en usar el término de electrodos modificados fueron PR Moses *et al* en 1975<sup>18</sup>, al estudiar el aumento de la reactividad de los electrodos mediante la incorporación de moléculas con propiedades específicas en la superficie del electrodo, y promover una reacción de transferencia de carga. Luego del trabajo de estos pioneros, las investigaciones acerca de las propiedades y aplicaciones de los electrodos modificados han experimentado un desarrollo constante, tanto por las aplicaciones en electroanálisis como en electrocatálisis de diversos sistemas <sup>19</sup>. En la primera mitad del siglo XX se estudió la adsorción física de moléculas en las superficies <sup>20</sup> y la modificación por unión covalente a superficies <sup>21</sup>. A finales del siglo XX, el desarrollo de técnicas como la microscopía de barrido electrónico <sup>22</sup> y los avances de la nanotecnología permitieron la creación de nuevos métodos para la modificación de las superficies y el estudio de películas finas.

Actualmente el término de electrodo modificado se utiliza para denominar a cualquier superficie de electrodo tratada con moléculas o sustancias que cambian sus propiedades. Estas sustancias pueden ser moléculas orgánicas, complejos metálicos, polímeros conductores, depósitos metálicos, nanotubos de carbono (NTC), etc <sup>4</sup>.

Entre los electrodos modificados, un nano material muy utilizado en las últimas décadas son los NTCs, debido a sus propiedades estructurales, mecánicas, químicas y electrónicas <sup>23</sup>. Entre estas propiedades se pueden mencionar la alta estabilidad química y térmica, alta elasticidad, buena conductividad, y alta actividad electrocatalítica <sup>24</sup>. Estudios recientes han reportado una propiedad muy interesante de este tipo de electrodos, la capacidad de encapsular

compuestos por fisi-adsorción en la nano estructura formada por los nanotubos <sup>25</sup>. Las propiedades electrocatalíticas de los NTCs incluyen disminución de los sobrepotenciales, e incremento en las intensidades de los picos voltamétricos lo que permite menores límites de detección y mayores sensibilidades en la detección analítica <sup>26</sup>. Una de las principales ventajas de los NTCs en electroanálisis, se basa en que se generan electrodos con mayor superficie activa y que se pueden modificar los NTCs funcionalizándolos con moléculas mediadoras, ya sea a través de la formación de un enlace covalente<sup>27</sup>, por adsorción de las moléculas a las paredes de los nanotubos <sup>28</sup> o a través de métodos de incorporación a superficies de polímeros <sup>29</sup>. Estas metodologías de modificación de los NTCs permiten una mayor capacidad de detección electroquímica <sup>30</sup>, un aumento de la actividad electrocatalítica sobre la oxidación de ciertas moléculas (por ejemplo NADH) <sup>1</sup>, y la construcción de sensores y biosensores <sup>31</sup>.

El interés en la electrocatálisis de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) se debe a que es el cofactor para un gran número de enzimas deshidrogenasa, y desempeña un papel importante en la cadena de transferencia de electrones en sistemas biológicos. Por lo tanto, se utiliza en la construcción de biosensores en la industria alimentaria, la monitorización ambiental y el análisis médico<sup>32</sup>. Una complicación en este campo, es que la oxidación directa de NADH en las superficies de los electrodos no modificados ocurre a un alto sobre potencial (> 0,5 V) y por lo general conduce al bloqueo de la superficie del electrodo <sup>33</sup>.

Con el objetivo de solucionar este problema muchos autores han modificado los NTCs, inmovilizando sobre la superficie especies mediadoras para acelerar la velocidad de transferencia de electrones, tales como: diaminas ; quinonas <sup>35</sup>; polímeros conductores <sup>36</sup> ; colorantes de fenoxazina <sup>37</sup>; flufenacina <sup>1</sup>, entre otros.

En el presente trabajo de memoria de título se utilizaron compuestos polinitrados como especies mediadoras para estudiar la electrocatálisis de NADH. A la fecha, se han reportado pocos trabajos acerca del uso de nitrocompuestos como mediadores electrocatalíticos <sup>38</sup>. En este

estudio se aprovecha la versatilidad de modificación electroquímica y encapsulación de los electrodos con NTCs y compuestos polinitrados en los NTCs.

## **2. OBJETIVOS DE LA MEMORIA**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Modificar electrodos de carbono vítreo con nanotubos de carbono utilizando nitrocompuestos como mediador electrocatalítico de NADH y estudiar el efecto de diferentes factores en la actividad electrocatalítica.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono y nitrocompuestos.
- Comparar el comportamiento electroquímico de los nitrocompuestos sobre electrodos de carbono vítreo sin modificar y modificados con nanotubos de carbono.
- Caracterizar electroquímicamente los nitrocompuestos encapsulados en electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono.
- Realizar la caracterización electroquímica del NADH en electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono.
- Determinar la capacidad electrocatalítica de los mediadores; ácido 3,5-dinitrobenzoico, 1,3-dinitrobenzoceno y el 1,3,5-trinitrobenzoceno, sobre el NADH.
- Evaluar el comportamiento electroquímico del conjunto mediador - NADH.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos y solventes

- Ácido 3,5-dinitrobenzoico, Sigma Aldrich
- 1,3-dinitrobenceno, Merck
- 1,3,5-trinitrobenceno, Kodak
- Ácido bórico (99%) p.a, Fluka Chemica
- Ácido acético glacial p.a, Mallinckrodt
- Ácido clorhídrico (36%) p.a, Reutter
- Ácido fosfórico (85%) p.a, Merck
- Agua desionizada nano pura (18,2 MΩ cm)
- Etanol absoluto (99,8%) p.a, Merck
- Hidróxido de sodio (pellets) p.a, Merck
- Nitrógeno extra puro (99,9%), Linde Gas Chile S.A.
- Nanotubos de carbono de multipared (> 95 % en C), DropSens
- 1,3- dioxolano, Sigma Aldrich

\*Todos los reactivos fueron utilizados sin previa purificación.

## **3.2. Equipos**

### **A) Equipos de uso general**

- Agitador magnético Heidolph MR 3002
- Balanza de precisión Precisa 40SM-200<sup>a</sup> (sensibilidad 0,01 mg)
- Medidor de pH WTW modelo pMx 3000
- Sistema purificador de agua Milli-Q *Ultra- Pure Water System*.
- Sonicador Branson Branson 2210

### **B) Sistema voltamétrico y computacional**

- Equipo potenciostato BAS CV-50W y BAS CV-100W
- Equipo potenciostato CHInstrument 760c
- Celda electroquímica:
  - Celda electroquímica BAS (10 mL)
  - Electrodo de trabajo: Carbono vítreo y carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono.
  - Soporte de carbono vítreo, como electrodo de trabajo. Ted Pella, INC.
  - Electrodo de referencia: Ag/AgCl KCl 1M
  - Electrodo auxiliar: Alambre de platino.

### **C) Equipos para análisis de superficie**

- Microscopio de barrido electrónico (SEM)

Las mediciones se realizaron en un equipo de barrido Inspect Scanning Electron Microscope F50. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de Chile.

### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Preparación de soluciones

- Soluciones tampón
- Buffer Britton Robinson 0,1 M: Para la preparación de 1 L de solución, en un matraz de 1000 mL se agregaron 6,18 g de ácido bórico, 5,71 mL de ácido acético glacial y 6,75 mL de ácido fosfórico en un poco de agua Milli-Q. Posteriormente se colocó en un baño de ultrasonido durante 10 min para eliminar las burbujas y se aforó con agua Milli-Q. Finalmente fue ajustado según el pH de trabajo en la celda electroquímica con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio concentrado.
- Buffer fosfato 0,1 M: Se prepararon 500 mL de una solución de buffer fosfato 0,1 M, en donde se agregaron 7,1 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado a un matraz de 500 mL, se aforó con agua Milli-Q. La solución fue ajustada según el pH de trabajo en la celda electroquímica con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio concentrado.
- Soluciones stock de nitrocompuestos  
Se prepararon 5 mL de solución stock de concentración 10 mM de nitrocompuesto en etanol p.a. Las soluciones stock se guardaron refrigeradas en envase de vidrio ámbar.
- Solución stock de NADH  
Se prepararon 20 mL de solución stock de concentración 20 mM de NADH en buffer Britton-Robinson 0,1 M pH 7. La solución se preparó diariamente y se mantuvo con atmosfera de nitrógeno extra puro.

➤ Soluciones de trabajo

- Electroquímica clásica: Todas las soluciones fueron preparadas antes del experimento a partir de soluciones stock de nitrocompuesto y tampón Britton-Robinson o tampón fosfato, ajustado según el pH de trabajo en la celda electroquímica con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio concentrado.
- En electrodos modificados por dipping: Las soluciones de trabajo consistieron en una solución de nitrocompuesto preparada a partir de la solución stock y etanol, donde fueron sumergidos los electrodos GC-NTC durante 10 segundos. Luego estos electrodos fueron medidos en una celda que solo contiene buffer.

### 3.4. Desarrollo experimental

#### 3.4.1. Dispersión de nanotubos de carbono

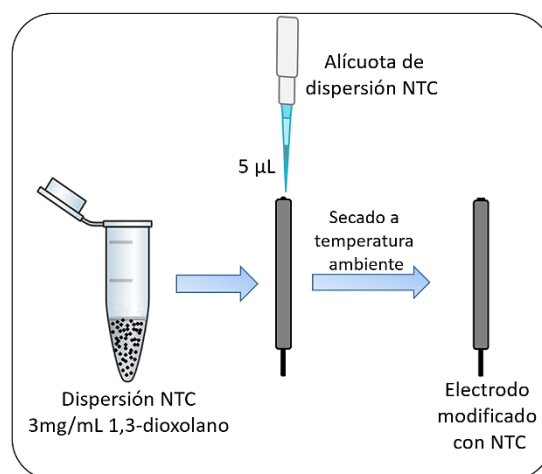
Las dispersiones se prepararon pesando nanotubos de carbono y agregando la cantidad apropiada de 1,3-dioxolano para obtener una concentración de 3 mg/mL. Luego la dispersión se somete a baño de ultrasonido 3 veces por periodos de 5 min. La dispersión se agita entre cada periodo de baño ultrasónico.

#### 3.4.2. Preparación de electrodos con NTCs

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

En todos los experimentos se utilizó electrodos de carbono vítreo (GC; glassy carbon electrode), previamente pulidos con alúmina de 0,3 y 0,05  $\mu\text{m}$  y lavados con abundante agua antes de cada modificación.

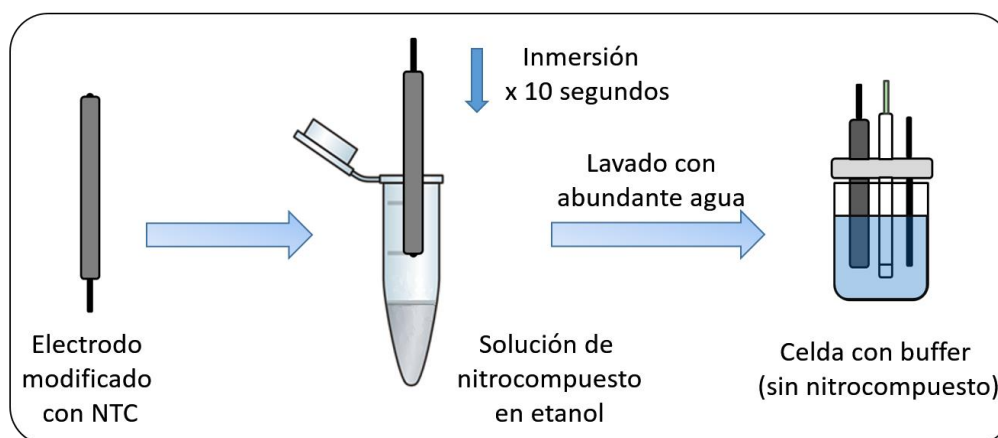
Los electrodos de carbono vítreo se modificaron utilizando la dispersión de nanotubos de carbono 3 mg/mL. La inmovilización de los nanotubos de carbono en el electrodo se realiza tomando una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de la dispersión, que se deposita sobre la superficie del electrodo GC. El electrodo se deja secar a temperatura ambiente y los nanotubos quedan inmovilizados sobre la superficie del electrodo (Fig. 1).



**Figura 1.** Metodología general para la modificación de un electrodo de carbono vítreo.

### 3.4.3. Modificación de electrodos con NTC y nitrocompuestos por dipping.

Los electrodos modificados con NTCs fueron sumergidos en una solución de nitrocompuesto en etanol, preparada a partir de soluciones stock. Posteriormente fueron lavados con abundante agua y fueron medidos en una celda con solución buffer sin nitrocompuesto.



**Figura 2.** Metodología para la modificación de un electrodo con NTC con nitrocompuesto por dipping.

### 3.4.4. Estudio de la superficie de los electrodos GC-NTC con microscopía electrónica de barrido (SEM).

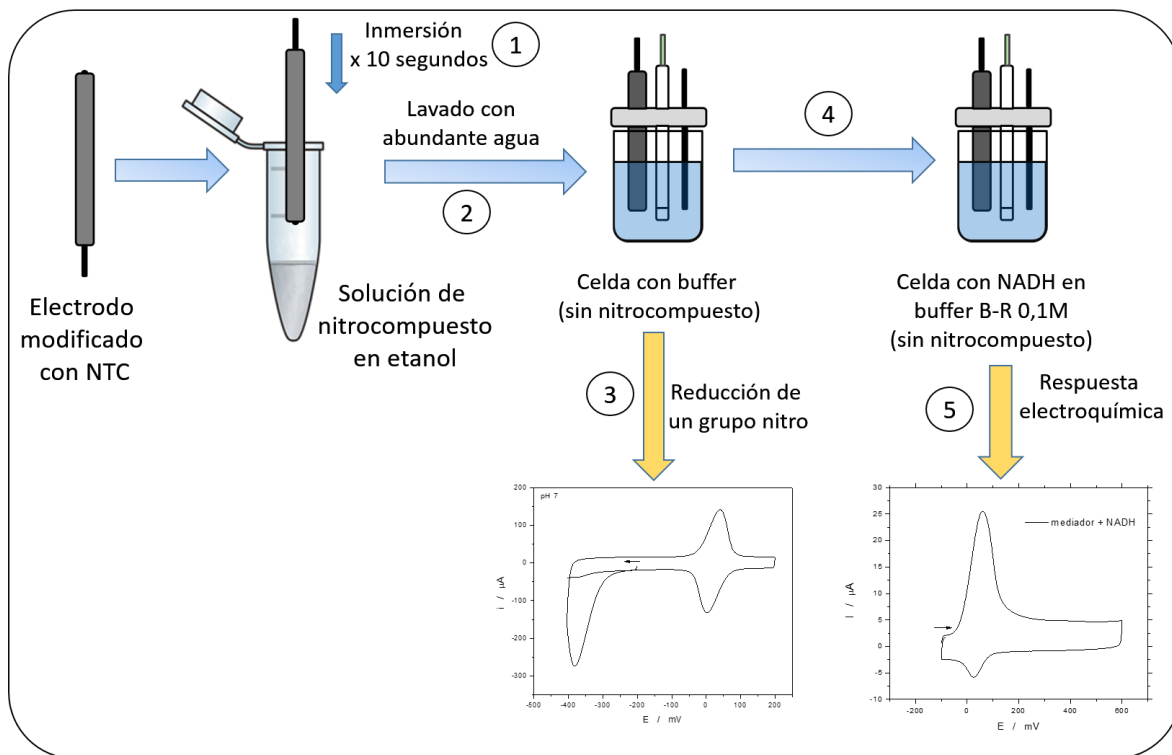
Las mediciones se realizaron con un equipo de barrido electrónico Inspect Scanning Electron Microscope F50.

Para la medición de la capa de nanotubos, se utilizó un soporte de carbono vítreo de 12,7 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Se depositaron los NTCs sobre este soporte utilizando la misma metodología de modificación del punto 3.4.2.

### 3.4.5. Estudio de electrocatálisis.

En los estudios de electrocatálisis, los electrodos de GC fueron modificados con NTCs y nitrocompuestos. El nitrocompuesto encapsulado en el electrodo fue evaluado como mediador electroquímico, en sus formas oxidadas o reducidas, según el cambio de potencial de oxidación del NADH. En estos experimentos el electrodo se preparó en una celda diferente de la que se evaluó el efecto electrocatalítico.

Para realizar el estudio de electrocatálisis se utilizaron electrodos GC modificados con NTCs (GC-NTC) y nitrocompuestos mediante la técnica de dipping. Luego de la inmersión del electrodo GC-NTC en la solución de nitrocompuesto en etanol (paso 1, Fig. 3), los electrodos son lavados con abundante agua e introducidos en una celda electroquímica con buffer Britton-Robinson 0,1 M (B-R) a pH 7 (paso 2, Fig. 3). En la celda electroquímica se aplicó un barrido de potencial que permita reducir un grupo nitro presente en la molécula del nitrocompuesto encapsulado en los intersticios de los NTC (paso 3, Fig. 3). Luego el electrodo es sumergido en otra celda que contiene una solución de NADH en buffer B-R 0,1 M a pH 7 (paso 4, Fig. 3), donde se obtuvo la respuesta electroquímica de mediador (nitrocompuesto) con el NADH (paso 5, Fig. 3).



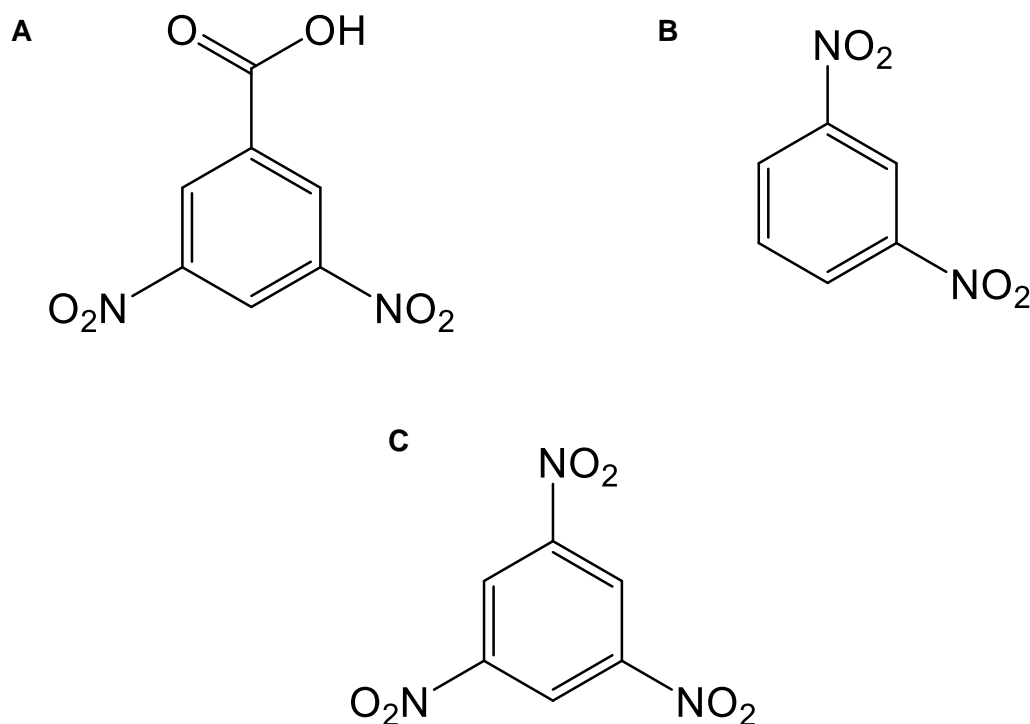
**Figura 3.** Metodología para el estudio de electrocatalisis de NADH **1.** Inmersión del electrodo GC-NTC en la solución de nitrocompuesto en etanol. **2.** Lavado del electrodo con abundante agua nano pura. **3.** Reducción de un grupo nitro presente en la estructura del nitrocompuesto en celda con solución tampón. **4.** Cambio de celda del electrodo a una celda con NADH en buffer B-R pH 7. **5.** Respuesta electroquímica del mediador (nitrocompuesto) con NADH.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.01. Caracterización electroquímica de nitrocompuestos.

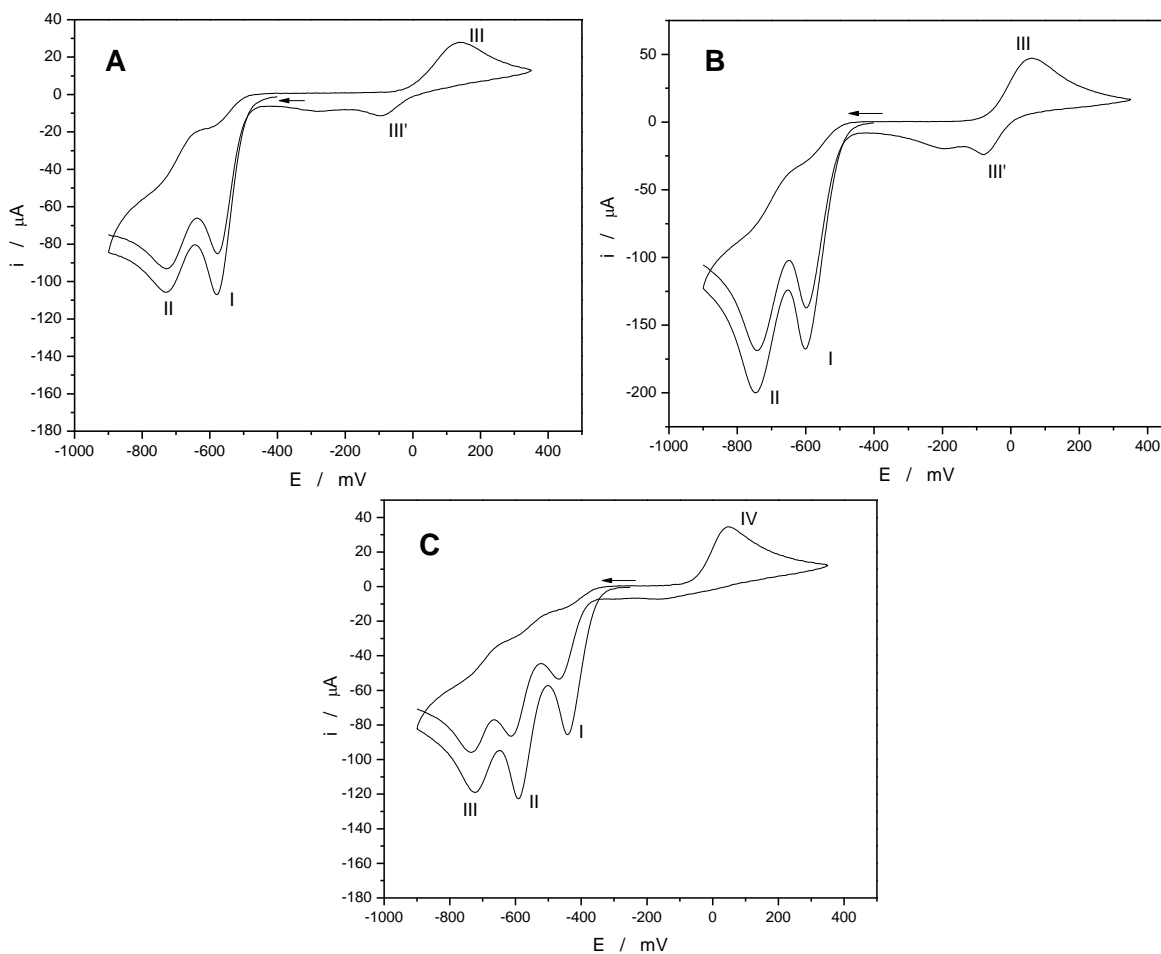
En este trabajo se utilizaron tres nitrocompuestos que presentan características comunes, que los hacen interesantes para la encapsulación en los electrodos de carbono vítreo modificados con NTC (GC-NTC). Los tres nitrocompuestos estudiados fueron: el ácido 3,5-dinitrobenzoico (3,5-DNB), el 1,3-dinitrobenzenceno (DNB) y el 1,3,5-trinitrobenzenceno (TNB). Entre las características se incluyen: anillo aromático como estructura principal y dos o más grupos nitro como sustituyente. Estas características favorecen el encapsulamiento entre los intersticios de los NTC, por las interacciones de Van der Waals, interacción  $\pi - \pi$  con el anillo aromático<sup>39</sup> y la baja solubilidad de los compuestos. En la figura 4 se observan las estructuras químicas de los nitrocompuestos.



**Figura 4.** Estructura química de los nitrocompuestos. **A.** 3,5-DNB **B.** DNB y **C.** TNB.

### a) Caracterización de los nitrocompuestos sobre electrodos de carbono vítreo.

El comportamiento electroquímico de los nitrocompuestos sobre electrodos GC se caracterizó a través de la electroactividad de los grupos nitro. En la figura 5 se muestran los voltamogramas cíclicos de los compuestos con GC.



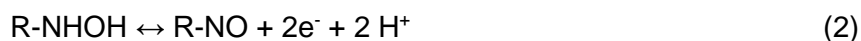
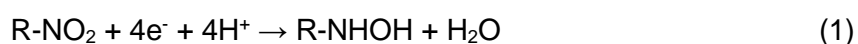
**Figura 5.** Voltamogramas cíclicos de los nitrocompuestos en buffer fosfato 0,1 M pH 7. Electrodo de carbono vítreo. **A.** 3,5-DNB 2 mM **B.** DNB 2 mM **C.** TNB 2 mM.

En la figura 5 para los compuestos dinitrados (DNB y 3,5-DNB), en el primer barrido catódico se observan dos señales irreversibles centradas en -580 mV y -730 mV que vuelven a aparecer en un barrido posterior, pero con menor intensidad (señales I y II en Fig. 5 A y B).

En general, el proceso de reducción de los grupos nitro involucra cuatro protones y cuatro electrones, para formar un derivado hidroxilamínico (ec. 1, señales I, II y III en Fig. 5 A, B y C).

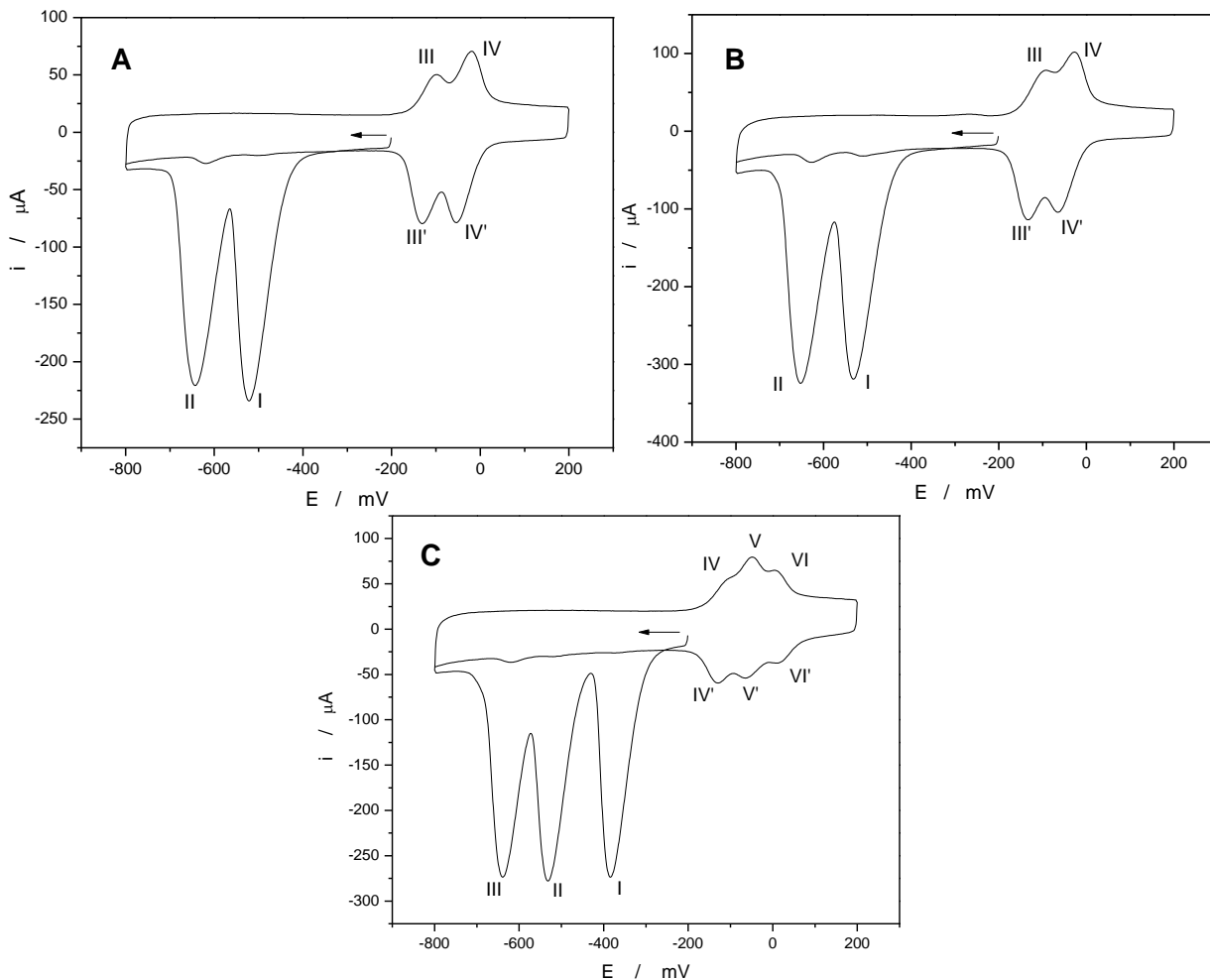
Luego, en los barridos posteriores, a la generación de los derivados nitroso/ hidroxilamina (ec. 2, señales III/III' en Fig. 5 A y B).

Para el TNB (Fig. 5 C), un compuesto trinitrado, se observan tres señales irreversibles que corresponden a cada grupo nitro presente en su estructura, centradas aproximadamente en -440 mV, -590 mV y -730 mV (ec. 1, señal I, II. y III en Fig. 5 C). En los barridos posteriores, a diferencia de los compuestos dinitrados, solo se observa una señal irreversible correspondiente a la generación del derivado nitroso ec. 2. (Señal IV en Fig. 5 C).



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

Se estudió el comportamiento electroquímico de los nitrocompuestos utilizando electrodos de GC modificados con NTCs (GC-NTC), a través de la electroactividad de los grupos nitro. Los electrodos GC-NTC fueron modificados por inmersión durante 10 segundos en una solución de nitrocompuesto 2 mM en etanol, medido en una celda con buffer B-R pH 7. En la figura 6 se muestran los voltamogramas cíclicos de los nitrocompuestos sobre electrodos GC-NTC.



**Figura 6.** Voltamogramas cíclicos de los nitrocompuestos sobre electrodos GC-NTC. **A.** GC-NTC-3,5DNB **B.** GC-NTC-DNB **C.** GC-NTC-TNB. Buffer B-R pH 7.  $v = 100$  mV/s.

En la figura 6 para el 3,5-DNB y el DNB, en el primer barrido catódico se observan dos señales irreversibles intensas, centradas aproximadamente en -530 y -655 mV, correspondientes a la reducción de los dos grupos nitro presentes en las estructuras (ec. 1, señales I, II en Fig. 6 A y B), las cuales no vuelven a aparecer en el barrido catódico posterior, ya que el compuesto a diferencia del experimento anterior está adsorbido en el electrodo, por lo tanto, una vez transcurrido barrido de potencial catódico en el cual se redujeron las especies presentes en el electrodo, no hay especies en solución que reemplacen a las ya reducidas. En consecuencia, no se observan las segundas señales de reducción que aparecen en el estudio con GC.

En los barridos posteriores se observan dos señales reversibles entre 40 y -190 mV, correspondientes a los derivados nitroso/hidroxilamina (ec. 2, señales III/III', IV/IV' en Fig. 6 A y B). Para el TNB (Fig. 6 C). Como es de esperar, se observan 3 señales de reducción de los grupos nitro presentes en su estructura, cada señal centrada en -384, -534 y -638 mV. En los barridos posteriores se observan 3 señales reversibles entre 40 y -170 mV (ec. 2, señales IV/IV', V/V' y VI/VI'), las cuales no aparecen utilizando electrodos GC sin modificar. Además de esta diferencia entre GC y GC-NTCs, los voltamogramas de los nitrocompuestos sobre electrodos GC-NTC presentan señales de mayor intensidad de corriente.

Las diferencias se pueden explicar debido a que la capa de NTC adherida a la superficie del electrodo aumenta la capacidad de encapsulamiento de los compuestos y como consecuencia, se obtienen señales más intensas. Las señales de los derivados hidroxilamina/nitroso aparecen bien definidas, no se observan señales de reducción en el tercer barrido catódico y se observan diferencias en los potenciales de pico de las señales de reducción de los grupos nitro (Tabla I).

**Tabla I.** Potenciales de pico de las señales de reducción de los grupos nitro (señales I, II y III Fig.6) de los compuestos sobre GC y GC-NTC.

	GC			GC-NTC		
	Ep I (mV)	Ep II (mV)	Ep III (mV)	Ep I (mV)	Ep II (mV)	Ep III (mV)
<b>3,5-DNB</b>	-580	- 730	--	- 521	- 644	--
<b>DNB</b>	- 600	-747	--	- 531	- 655	--
<b>TNB</b>	- 440	- 590	- 730	- 384	- 534	- 638

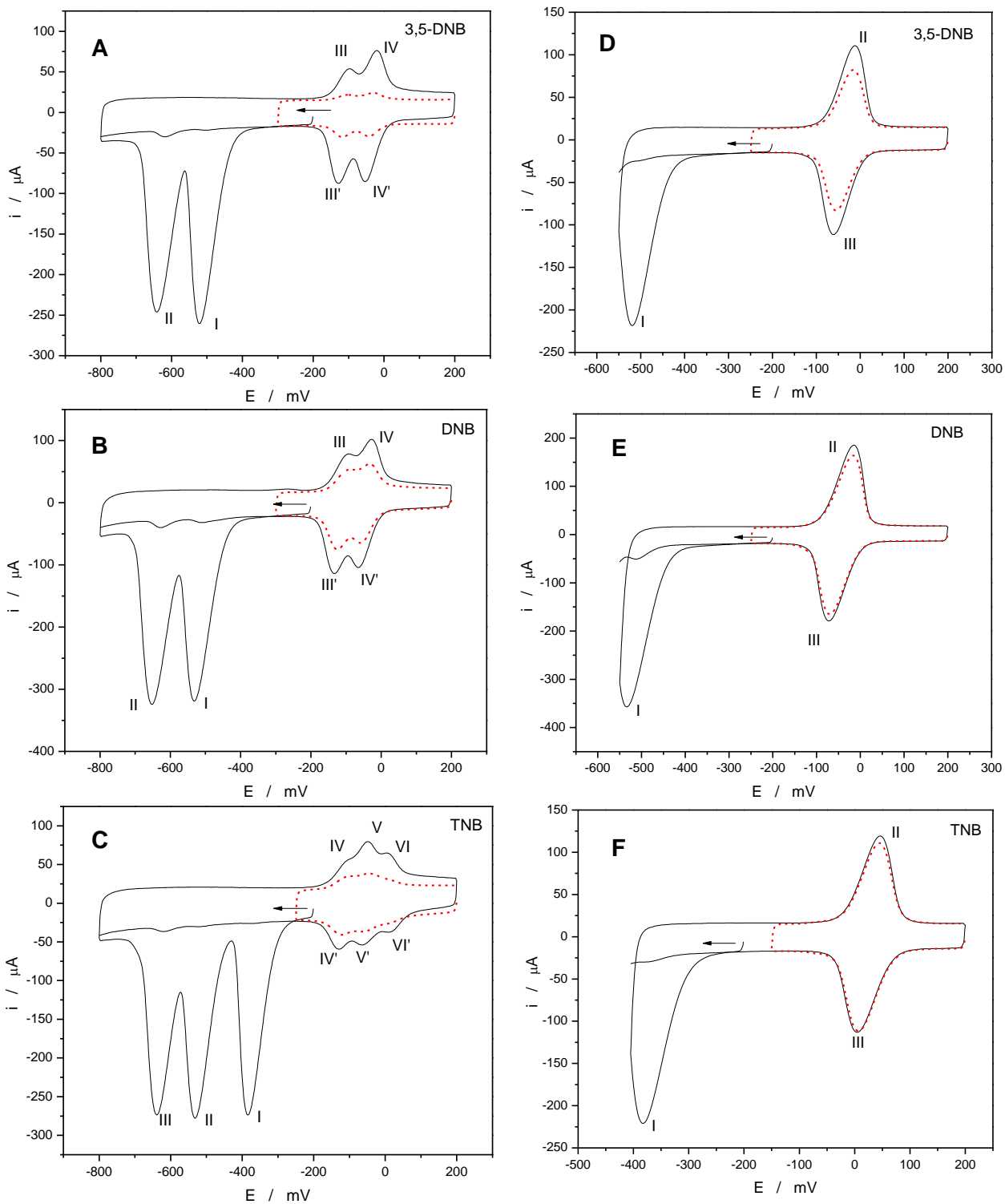
En la Tabla I se observa una disminución de los potenciales de pico catódicos de los grupos nitro para todos los nitrocompuestos con electrodos GC modificados con NTCs, lo que indica una actividad electrocatalítica por parte de los NTC, ya que facilitan la reducción de los nitrocompuestos.

### **c) Caracterización de los pares redox en electrodos GC-NTC.**

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

Debido a la versatilidad que tienen este tipo de electrodos (GC-NTC) se pueden reducir selectivamente uno, dos o tres grupos nitro presente en la molécula aplicando un determinado potencial, generando electroquímicamente derivados hidroxilamina/nitroso. En la figura 7 se observan los voltamogramas cíclicos de los nitrocompuestos con un grupo nitro reducido (línea continua Fig. 7 D, E y F), con dos y tres grupos nitro reducidos (línea continua Fig. 7 A, B y C) utilizando electrodos GC-NTC modificados previamente por dipping en una solución con nitrocompuesto 2 mM en etanol. En línea segmentada, se observan los voltamogramas de los derivados hidroxilamina/nitroso aislados, medidos continuación de cada voltamograma completo en línea continua.

De la Fig. 7 se observa que al reducir todos los grupos nitro presente en cada compuesto disminuyen las señales aisladas de los pares redox (línea segmentada Fig. 7 A, B y C). Sin embargo, al reducir selectivamente un grupo nitro de cada molécula, la disminución de las señales de los pares redox del 3,5-DNB y DNB disminuyen levemente (línea segmentada Fig. 7 D y E). Además, para el TNB las señales del par redox nitroso/ hidroxilamina casi no disminuyen en un barrido de potencial posterior (línea segmentada Fig. 7 F). Este comportamiento se puede explicar debido a que quedan grupos nitros sin reducir, el derivado electroquímico generado tiene una baja solubilidad y permanece encapsulado en el electrodo.



**Figura 7.** Voltamogramas cíclicos de los compuestos sobre electrodos GC-NTC en buffer B-R 0,1 M pH 7 **A, B y C.** con dos y tres grupos nitro reducidos (línea continua) con los correspondientes pares redox aislados (línea discontinua), 3-5-DNB, DNB y TNB 2 mM, respectivamente. **D.E y F.** con un grupo reducido y los pares redox en línea discontinua, 3,5-DNB, DNB y TNB 2 mM, respectivamente.

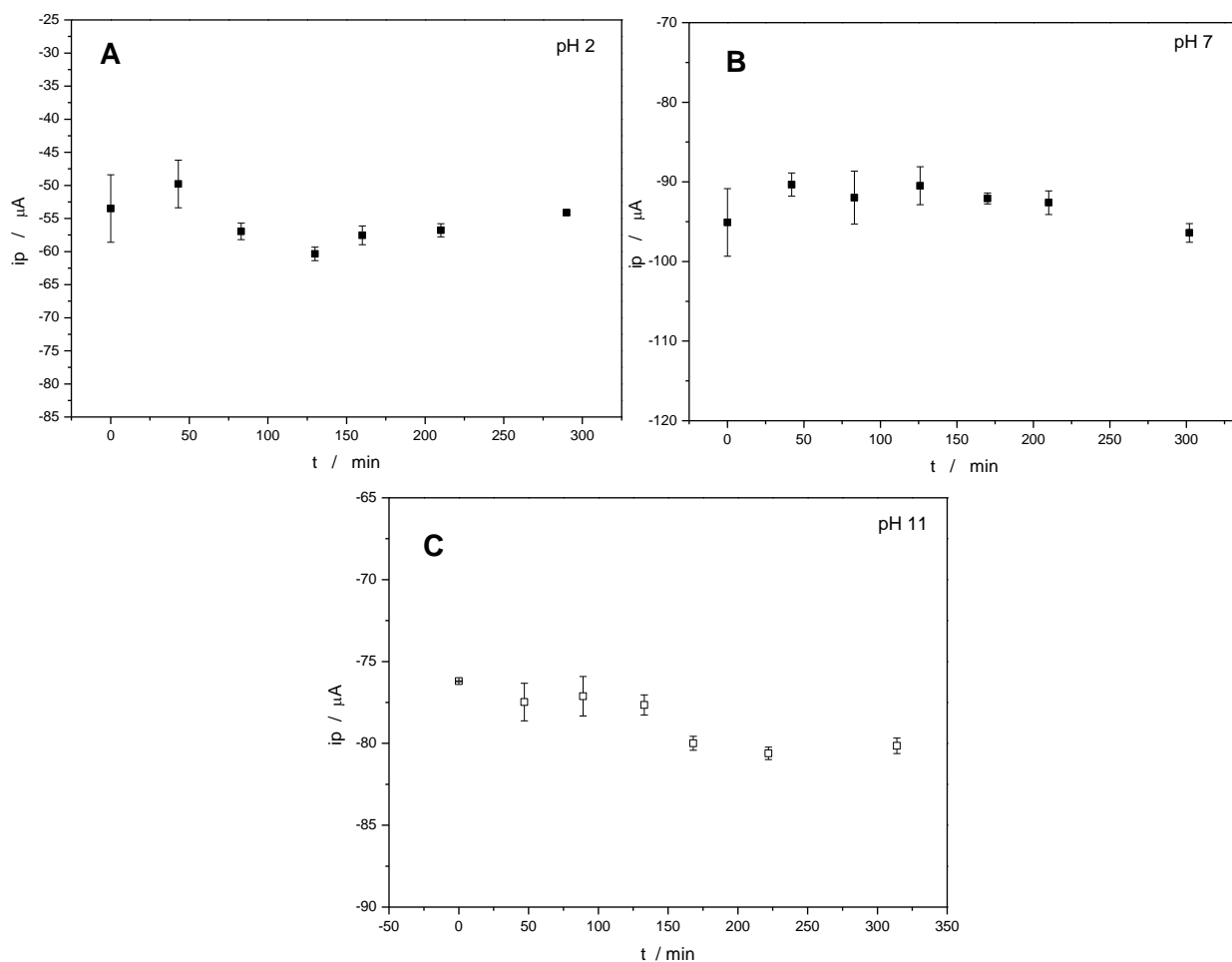
#### **4.02. Estabilidad de los nitrocompuestos en solución.**

Este experimento tiene como objetivo estudiar la estabilidad de los nitrocompuestos en solución a distintos pH, para determinar el tiempo con el que se puede trabajar con la solución. El estudio se realizó con un electrodo de carbono vítreo sin NTC mediante la técnica de voltametría de pulso diferencial (VDP). Se utilizó una celda con nitrocompuesto 2 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 2, 7 y 11, utilizando un electrodo GC distinto (sin modificar) para cada pH.

Se estudió la variación de la corriente de pico ( $i_p$ ) de la reducción del primer grupo nitro (señal I en Fig. 6) en función de la variación del tiempo (Fig. 8). Cada medición se realizó por triplicado cada 45 minutos, utilizando el mismo electrodo para cada medición.



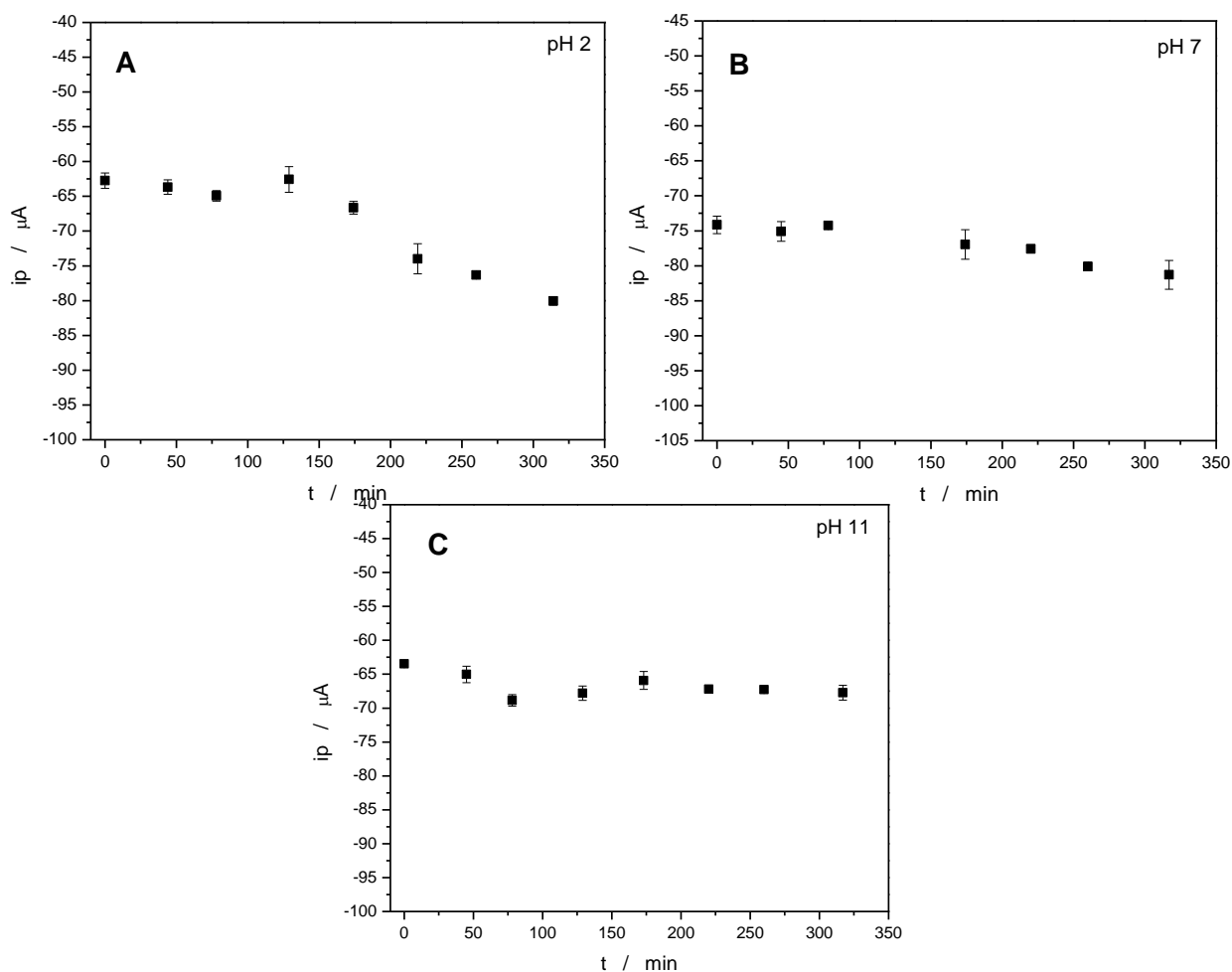
a) Ácido 3,5-dinitrobenzoico (3,5-DNB)



**Figura 8.** Estudio de estabilidad del 3,5-DNB 2 mM en buffer fosfato 0,1 M con electrodo GC. **A** 3,5-DNB a pH 2. **B.** 3,5-DNB a pH 7 y **C.** 3,5-DNB a pH 11.

En la Figura 8 se observa que el 3,5-DNB es estable hasta los 300 min (5 h) de duración del experimento a pH 2 y 7. Sin embargo, a pH 11 se observa una disminución de la corriente de reducción del grupo nitro al transcurrir el tiempo. También se observa una dificultad en la estabilización de las corrientes de reducción a pH ácido y alcalino durante el desarrollo del experimento, al observar una mayor desviación estándar. En cambio, a pH 7 se observa que la corriente de reducción del grupo nitro no varía significativamente en el tiempo. Además, a pH 7 se observan los mayores valores de corriente de reducción del grupo nitro. Por lo tanto, los experimentos posteriores para el 3,5-DNB se realizaron a pH neutro.

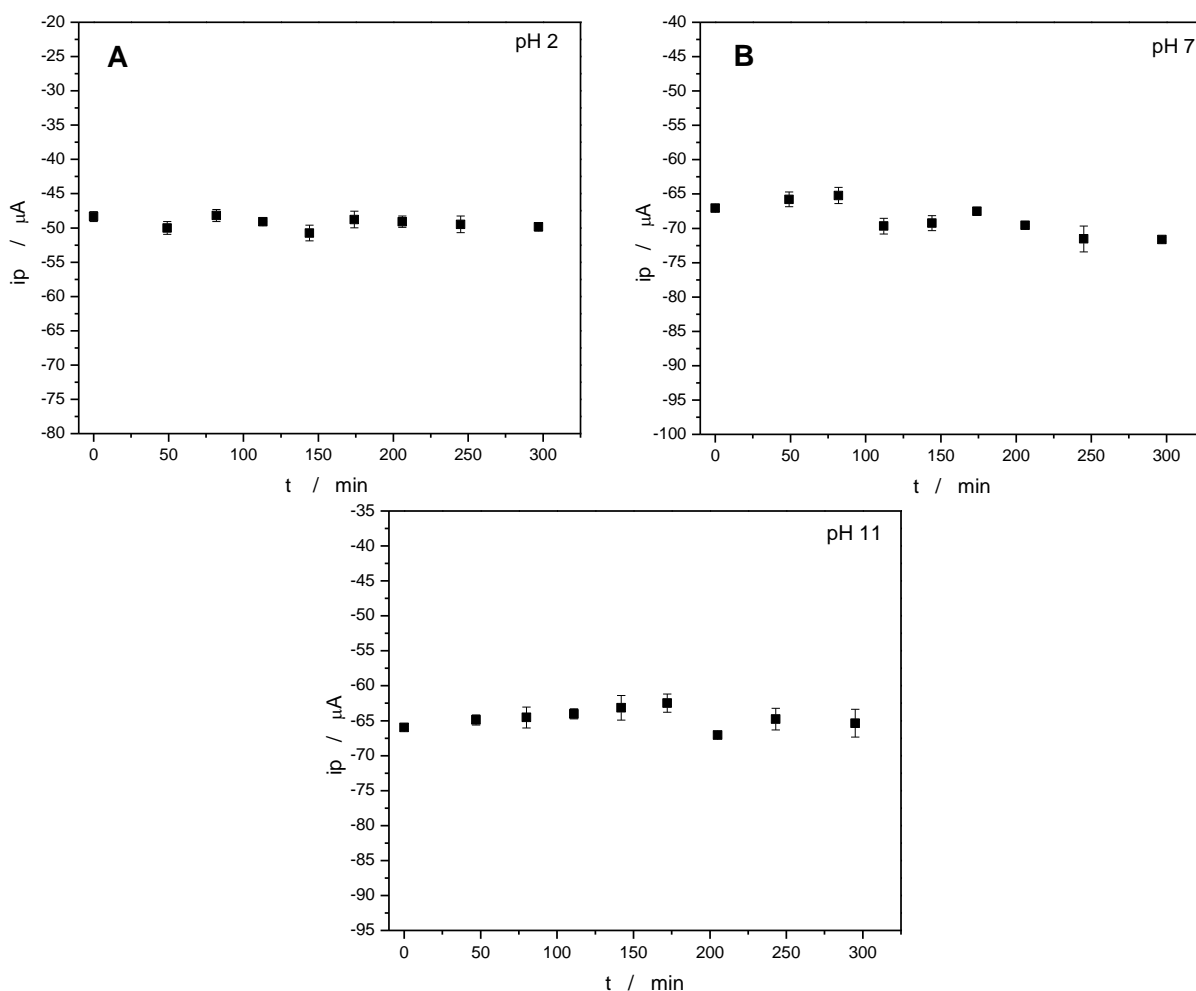
b) 1,3-dinitrobenzeno (DNB)



**Figura 9.** Estudio de estabilidad del DNB 2 mM en buffer fosfato 0,1 M con electrodo GC. **A.** DNB a pH 2. **B.** DNB a pH 7 y **C.** DNB a pH 11.

En la Figura 9 se observa que la corriente de reducción del grupo nitro del DNB es estable en solución hasta los 150 minutos a pH 2, luego comienza a disminuir debido a una posible descomposición del compuesto en solución. Sin embargo, a pH 7 y 11 se observó que el DNB es estable hasta los 320 min (5,3 h) de duración del experimento. Además, se observa que las mayores corrientes de reducción se obtienen a pH 7, por lo tanto, los estudios posteriores del DNB se realizaron a este pH.

c) 1,3,5-trinitrobencono (TNB)



**Figura 10.** Estudio de estabilidad del TNB 2 mM en buffer fosfato 0,1 M con electrodo GC. **A.** TNB a pH 2 **B.** TNB a pH 7 y **C.** TNB a pH 11.

En la figura 10 se observa que el TNB es estable en solución tanto a pH 2, 7 y 11 hasta los 300 min (5 h) de duración del experimento. Para el TNB, tanto a pH 7 como a pH 11 se obtienen los mayores valores de corrientes de reducción del grupo nitro.

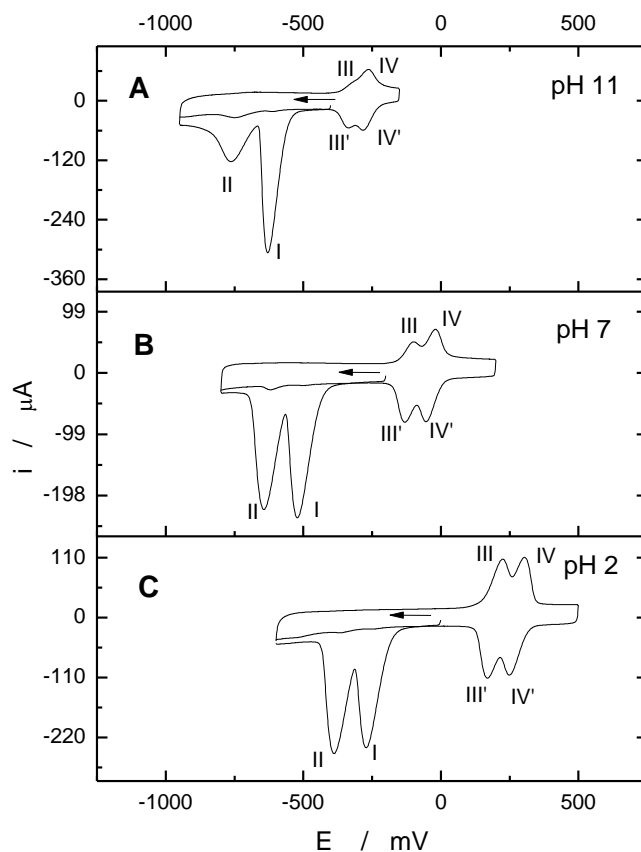
De los resultados obtenidos para el estudio de estabilidad de los nitrocompuestos en solución, se concluye que, aunque es posible trabajar con los tres nitrocompuestos durante largos periodos tiempo (hasta 5 h) usando pH 7 y 11 en la solución, se selecciona trabajar a pH 7 para tener los 3 nitrocompuestos en las mismas condiciones.

#### 4.03. Estudio de pH de los nitrocompuestos en electrodos GC-NTC.

El efecto del pH en la respuesta electroquímica del 3,5-DNB, DNB y TNB se estudió mediante voltametría cíclica. Para realizar este estudio, se utilizaron distintos electrodos GC-NTC modificados por dipping durante 10 segundos en una solución de nitrocompuesto 2 mM en etanol. Los electrodos GC-NTC modificados con nitrocompuestos fueron medidos en una celda electroquímica con una solución buffer B-R 0,1 M ajustado a pH 2, 7 y 11.

En las figuras 11, 12 y 13 se observan los voltamogramas cíclicos de los tres mediadores a diferentes valores de pH (de la solución buffer).

##### a) 3,5-DNB

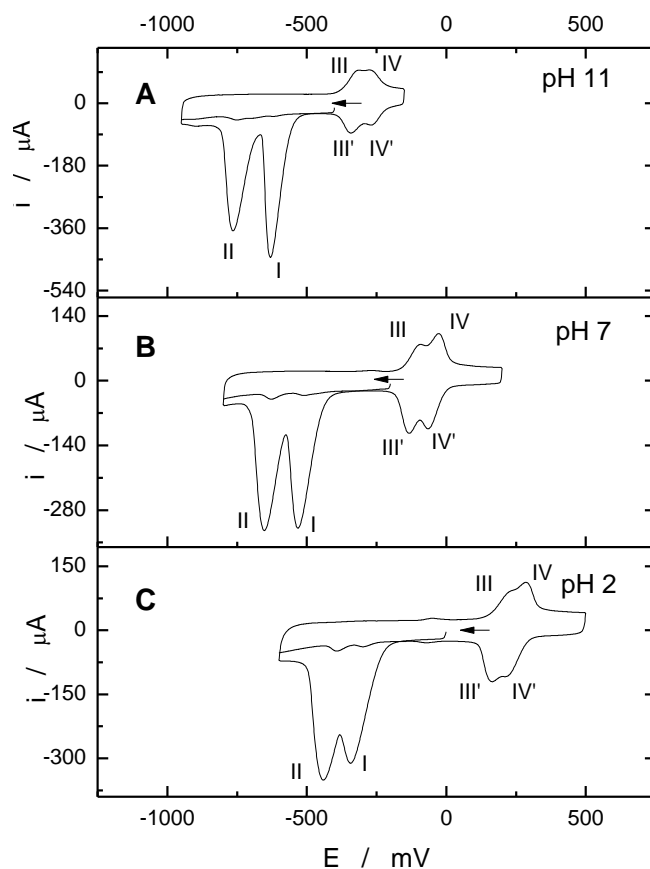


**Figura 11.** Efecto del pH sobre la respuesta electroquímica del 3,5-DNB en **A.** buffer B-R 0,1 M pH 11. **B.** buffer B-R pH 7. y **C.** buffer B-R pH 2.

Para el 3,5-DNB (Fig.11) se observa que a medida que aumenta el pH, las señales de reducción se desplazan hacia potenciales negativos, requiriendo mayor energía para lograr las

reducciones de los grupos nitro. A pH básico, se observa una diferencia considerable de las intensidades de corriente de reducción de los grupos nitro, y las señales de los derivados no aparecen bien definidas (señales III/III' y IV/IV'). Sin embargo, a pH ácido y neutro, se observa una buena separación de los picos de las señales de reducción (señal I y II en Fig. 11) y una buena definición de las señales del par redox (señales III/III' y IV/IV').

b) 1,3-DNB

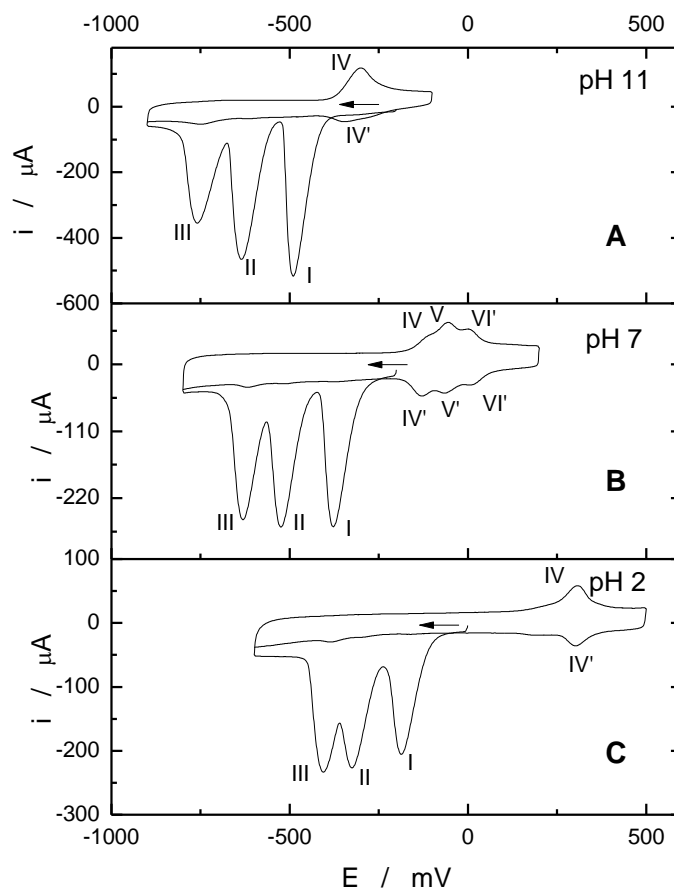


**Figura 12.** Efecto del pH sobre la respuesta electroquímica del DNB en **A.** buffer B-R 0,1 M pH 11. **B.** buffer B-R pH 7 y **C.** buffer B-R pH 2.

Para el DNB (Fig. 12), se observa un desplazamiento de las señales de reducción hacia potenciales negativos a medida que aumenta el pH del buffer B-R 0,1 M. Además, se observan cambios en las intensidades y separación de los picos de reducción de los grupos nitro. A pH neutro, a diferencia de los otros pHs se observa una buena separación de los picos de las señales

de reducción (señales I y II Fig.12) y, además, se observa una buena definición de las señales de los derivados nitroso (señales III y IV, Fig. 12).

c) TNB

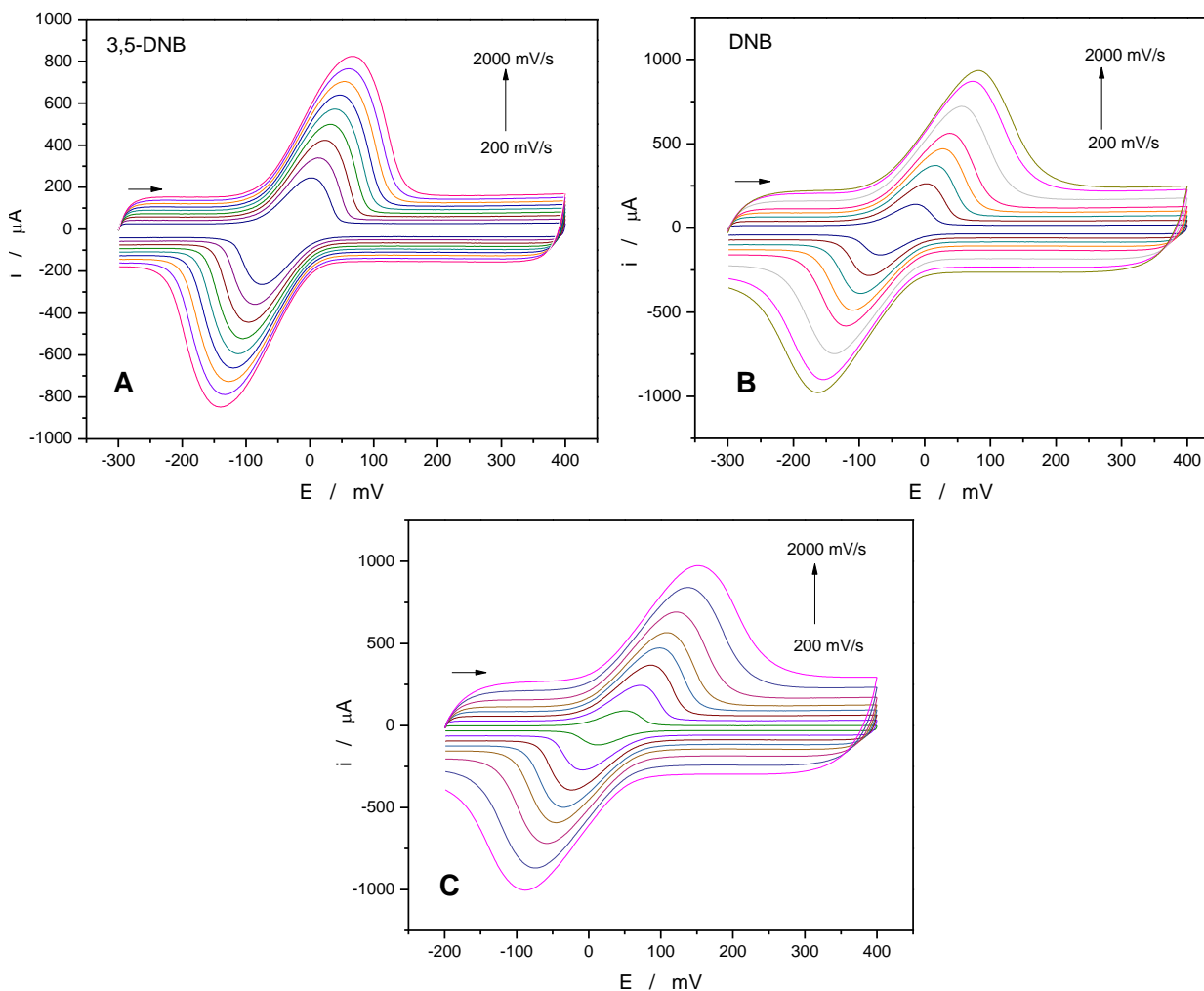


**Figura 13.** Efecto del pH sobre la respuesta electroquímica del DNB en **A.** buffer B-R 0,1 M pH 11. **B.** buffer B-R pH 7. Y **C.** buffer B-R pH 2.

Para el TNB (Fig. 13), al igual que con los otros compuestos, se observa un desplazamiento de las señales de reducción hacia potenciales más negativos a medida que aumenta el pH del buffer B-R 0,1 M. Además, se observa que a pH neutro las señales reducción de los grupos nitro están bien separadas y las señales de los derivados hidroxilamina/nitroso (señales III/III', IV/IV', V/V' y VI/VI' en Fig. 13) aparecen mejor definidas que a pH ácido y alcalino. Por lo tanto, debido a que a pH neutro en todos los nitrocompuestos las señales de reducción de los grupos nitro aparecen más separadas y las señales de los derivados mejor definidas, los experimentos posteriores se realizaron a pH 7.

#### 4.04. Efecto de la velocidad de barrido sobre los nitrocompuestos en electrodos GC-NTC.

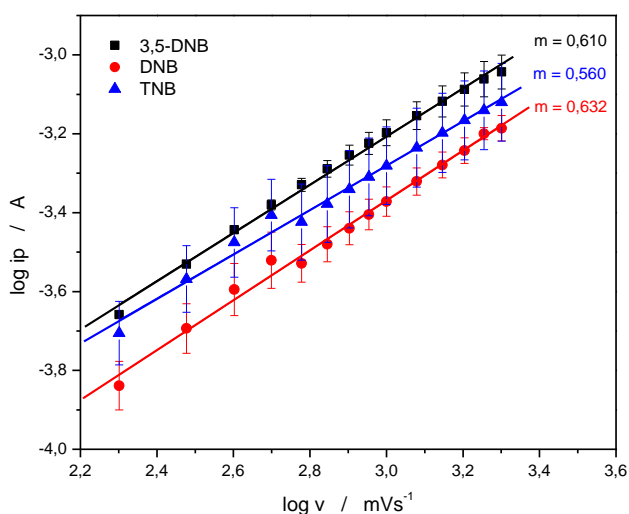
Mediante VC se evaluó el efecto de la velocidad de barrido sobre las señales del par redox nitroso/hidroxilamina. Para generar el par redox se redujo solo el primer grupo nitro de cada molécula. El efecto de la velocidad de barrido se estudió entre 200 y 2000 mV/s. Las mediciones se realizaron con electrodos GC-NTC modificados por el método de dipping durante 10 s, en una solución de nitrocompuesto 2 mM en etanol. Todas las mediciones se realizaron en una celda con buffer B-R 0,1 M a pH 7 por triplicado, usando electrodos GC-NTC con corrientes capacitivas similares. En la figura 14 se observan los voltamogramas de los nitrocompuestos a distintas velocidades de barrido



**Figura 14.** Estudio de la velocidad de barrido para **A.** GC-NTC-3,5-DNB en buffer B-R 0,1 M pH 7. **B.** GC-NTC-DNB en buffer B-R pH 7. **C.** GC-NTC-TNB en buffer B-R pH 7.

Para todos los nitrocompuestos, las corrientes de oxidación y reducción del par redox aumentan con el aumento de la velocidad de barrido (Fig. 14). Además, se observa un desplazamiento de los potenciales de pico anódico y catódicos hacia potenciales más positivos y negativos respectivamente, con el aumento de la velocidad de barrido.

Con los valores obtenidos de la corriente de pico de oxidación del derivado hidroxilamina a nitroso (ec. 2) a distintas velocidades, es posible determinar si el proceso está controlado por difusión o por adsorción. La pendiente de la recta del gráfico de  $\log i_p$  versus  $\log v$  toma valores entre 0,5 y 1. Cuando este valor es cercano a 0,5 el proceso es controlado por difusión y cuando es cercano a 1 el proceso es controlado por adsorción. En la figura 15 se muestra la relación logarítmica entre la corriente de pico y la velocidad de barrido, para los tres nitrocompuestos estudiados.



**Figura 15.** Relación lineal entre  $\log I_p$  versus  $\log v$  para los tres nitrocompuestos. (■) GC-NTC-3,5-DNB (●) GC-NTC-DNB (▲) GC-NTC-TNB en buffer B-R pH 7.

Para todos se obtuvo una relación lineal:

a) 3,5-DNB  $\log i_p = 0,610 \log v - 5,037$ ,  $R^2 = 0,9950$

b) DNB  $\log i_p = 0,632 \log v - 5,265$ ,  $R^2 = 0,9914$

c) TNB  $\log i_p = 0,560 \log v - 4,961$ ,  $R^2 = 0,9872$

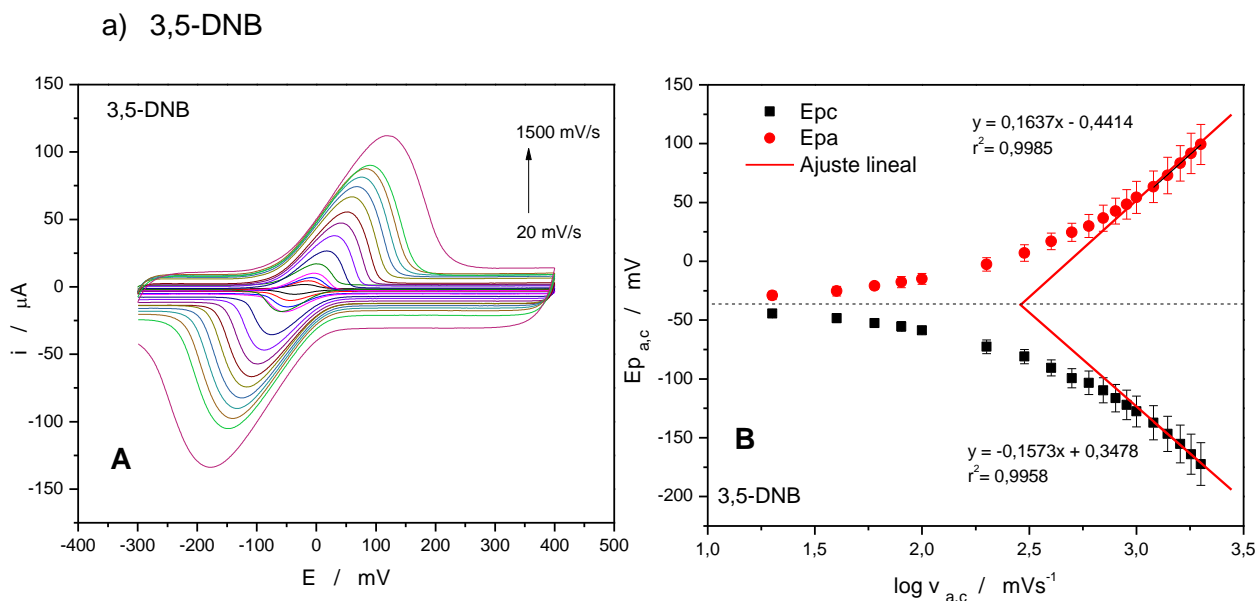


A partir de la figura 15, se puede concluir que el proceso de oxidación (del derivado hidroxilamina al derivado nitroso) para todos los compuestos está controlado por difusión, ya que las pendientes obtenidas (3,5-DNB  $m = 0,610$ , DNB  $m = 0,632$  y TNB  $m = 0,560$ ) son valores cercanos a 0,5.

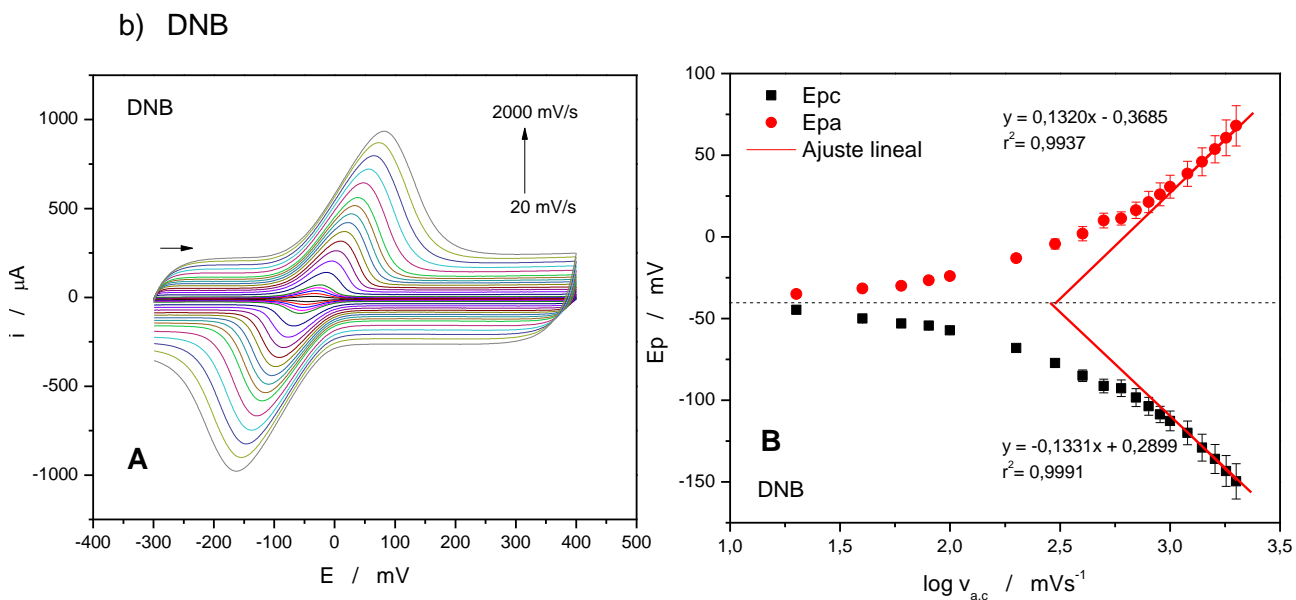
#### **4.05. Determinación de la constante de transferencia heterogénea $k_h$ de los nitrocompuestos.**

En la electrocatálisis de una reacción, los nitrocompuestos deben actuar como mediadores de la transferencia de electrones del proceso. Por lo que es fundamental conocer la constante de la velocidad a la cual se transfieren estos electrones. El coeficiente de transferencia de carga,  $\alpha$ , y la constante de transferencia heterogénea del proceso redox,  $k_h$ , pueden ser obtenidos experimentalmente utilizando el método de Laviron<sup>40</sup>. Este método se aplica para especies adsorbidas en electrodos, como en este estudio. El método permite calcular el coeficiente de transferencia de carga  $\alpha$ , que es una medida de la simetría de la barrera de energía de la reacción redox. La determinación de  $\alpha$  es crucial para encontrar  $k_h$ , la cual se determina por medio del gráfico del potencial de pico,  $E_p$ , frente a logaritmo de la velocidad de barrido,  $v$ .

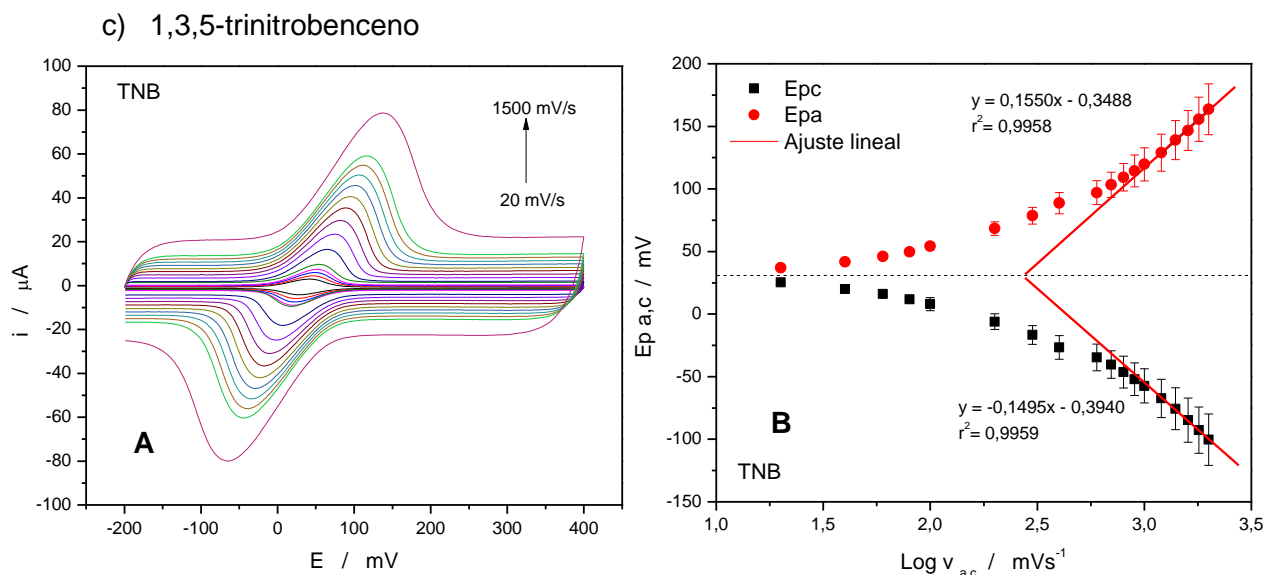
Según el método de Laviron se deben usar datos con  $\Delta E_p > (200/n)$ , donde  $n$  es el número de electrones transferidos. La reacción del mediador redox RNO/RNHOH involucra 2 electrones (ec.2), por lo tanto,  $n = 2$  y  $\Delta E_p > 100$  mV. Esta condición se cumple a altas velocidades de barrido con un comportamiento lineal. A continuación, se presentan los voltamogramas cíclicos obtenidos a distintas velocidades de barrido, que van desde 20 a 1500  $\text{mV/s}^{-1}$  (Figuras 16.A, 17.A y 18.A) y las regresiones lineales en el gráfico del  $E_p$  versus  $\log v$  (Figuras 16.B, 17. B y 18.B).



**Figura 16. A.** Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para los electrodos GC-NTC-3,5-DNB medido en buffer B-R pH 7. **B.** Variación del potencial de pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido anódica y catódica.



**Figura 17. A.** Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para los electrodos GC-NTC-DNB medido en buffer B-R pH 7. **B.** Variación del potencial de pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido anódica y catódica.



**Figura 18. A.** Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para los electrodos GC-NTC-TNB medido en buffer B-R pH 7 **B.** Variación del potencial de pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido.

Luego con las pendientes de las rectas obtenidas utilizando las ecuaciones (3) y (4), dependiendo del caso, se obtiene  $\alpha$  anódico o catódico, respectivamente.

$$\text{Caso catódico} \quad \text{pendiente} = -\frac{2,3 RT}{\alpha n F} \quad (3)$$

$$\text{Caso anódico} \quad \text{pendiente} = \frac{2,3 RT}{(1-\alpha)nF} \quad (4)$$

Donde, R es la constante universal de los gases en J/ mol K, n el número de electrones transferidos en el proceso redox, T la temperatura en grados Kelvin y F la constante de Faraday.

**Tabla II.** Resultados obtenidos para la pendiente de la recta y su respectivo valor de  $\alpha$  para los distintos compuestos.

	<b>Pendiente anódica</b>	$\alpha_a$	<b>Pendiente catódica</b>	$\alpha_c$
<b>3,5-DNB</b>	0,1637	0,8196	-0,1573	0,1877
<b>DNB</b>	0,1320	0,7763	-0,1331	0,2218
<b>TNB</b>	0,1550	0,8095	-0,1495	0,1975

Los  $\alpha$  anódicos obtenidos para los compuestos encapsulados en los electrodos GC-NTC, 3,5-DNB y TNB, son aproximadamente igual a 0,80, valor más cercano a 1, lo que indica que el intermediario es más parecido a los productos<sup>41</sup>. Por lo tanto, en el proceso de oxidación de hidroxilamina a nitroso, el intermediario es más parecido al derivado nitroso. Por otra parte, los  $\alpha$  catódicos son cercanos a 0,2 (valor cercano a 0), lo que indicaría que los intermediarios formados en la reducción del nitroso para dar hidroxilamina serían más parecidos a los reactantes, es decir, al derivado nitroso.

El valor de  $k_h$  se determina mediante la aplicación de la restricción de  $\eta=0$  a la ec. (5) que se reduce a la ecuación 6. La determinación de los interceptos de las líneas con  $E_{p1/2}$ , proporcionan las velocidades  $v_a$  y  $v_c$ , respectivamente, valores que se utilizan en la ecuación 6 para determinar  $k_h$ .

$$\log k_{APP} = \alpha \log (1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \left( \frac{RT}{nFv} \right) - \frac{\alpha(1-\alpha)nF\eta}{2.3RT} \quad (5)$$

$$k_{ET} = \frac{\alpha nF v_c}{RT} = (1 - \alpha) \frac{nF v_a}{RT} \quad (6)$$

Según el ajuste lineal obtenido para el caso anódico y catódico del gráfico  $E_p$  vs  $\log v$  (Fig. 16.B, 17.B y 18.B), utilizando el valor de  $E_p = E_{p1/2}$  se obtienen los siguientes interceptos con los cuales se calcula  $k_h$  (Tabla III).

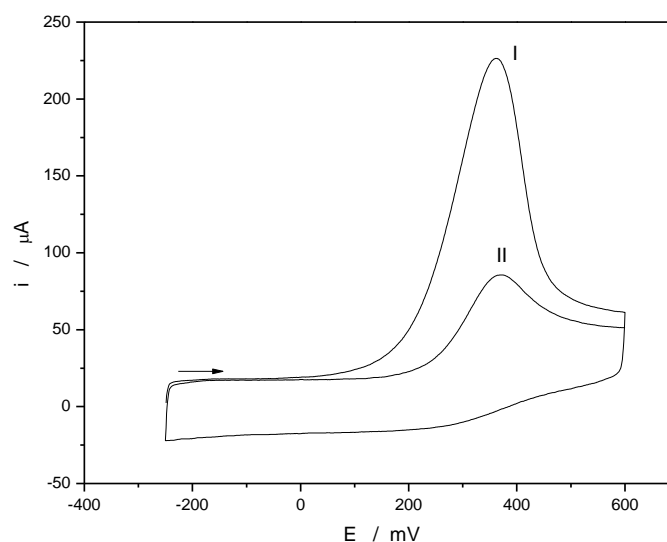
**Tabla III.** Resultados obtenidos en el cálculo de la constante de transferencia heterogénea para los distintos compuestos a 25°C.

	<b>Ep 1/2</b>	<b>Intercepto <math>v_a</math> (mV)</b>	<b><math>k_h(s^{-1})</math></b>	<b>Intercepto <math>v_c</math> (mV)</b>	<b><math>k_h(s^{-1})</math></b>	<b><math>k_h(s^{-1})</math> global</b>
<b>3,5-DNB</b>	-36,18	280,69	3,94	299,13	4,37	<b>4,16</b>
<b>DNB</b>	-40,16	300,82	5,24	284,18	4,91	<b>5,08</b>
<b>TNB</b>	31,36	277,21	4,11	299,13	4,60	<b>4,36</b>

De la tabla III, el nitrocompuesto con el mayor valor de  $k_h$ , es decir, que transfiere los electrones a una mayor velocidad es el DNB con  $5,08 \text{ s}^{-1}$ , luego le sigue el TNB con  $4,36 \text{ s}^{-1}$  y el 3,5-DNB con  $4,16 \text{ s}^{-1}$ . Por lo tanto, el compuesto más eficiente como mediador electrocatalítico, en términos de velocidad de transferencia, es el DNB. Por otro lado, al comparar los valores obtenidos con los valores reportados para electrodos GC-NTC modificados con flufenacina como mediador redox del NADH ( $k_h = 0,99 \text{ s}^{-1}$ )<sup>1</sup>, se obtienen valores mucho mayores.

#### 4.06. Caracterización electroquímica del NADH.

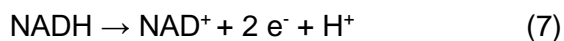
Mediante voltametría cíclica se estudió la respuesta electroquímica del NADH sobre un electrodo GC-NTC. La medición se realizó en una celda con solución de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7, luego de 20 segundos de inmersión del electrodo en la celda. En la figura 19 se muestra el voltamograma cíclico del NADH sobre electrodo de GC-NTC.



**Figura 19.** Voltamogramas cíclicos del NADH sobre electrodo GC-NTC en buffer B-R 0,1 M pH 7.  $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ .

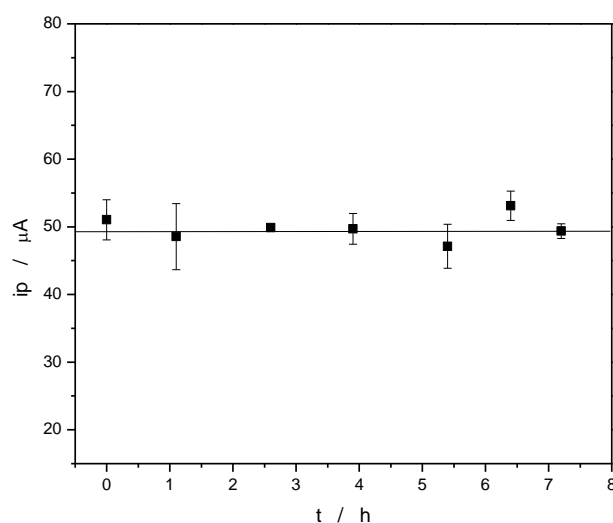
En el primer barrido se observa una señal irreversible con  $E_p = 370 \text{ mV}$  correspondiente a la oxidación del NADH (señal I, Fig. 19). En el segundo barrido anódico se observa la misma señal con menor intensidad debido a la lenta renovación del NADH en el electrodo desde el seno de la solución (señal II. Fig. 19).

El proceso de oxidación del NADH involucra dos electrones y un protón para formar la especie oxidada (ec. 7).



#### 4.07. Estabilidad del NADH en solución.

Este experimento tiene como objetivo estudiar la estabilidad del NADH en solución en buffer B-R 0,1 M pH 7. El estudio se realizó con un electrodo GC-NTC mediante la técnica de voltametría de pulso diferencial. Se utilizó el mismo electrodo durante todo el experimento, lavando con abundante agua nanopura entre cada medición. Cada medición se realizó por triplicado cada 1 hora. En la figura 20 se muestra la variación de la corriente de pico ( $i_p$ ) de la oxidación del NADH en función de la variación del tiempo.

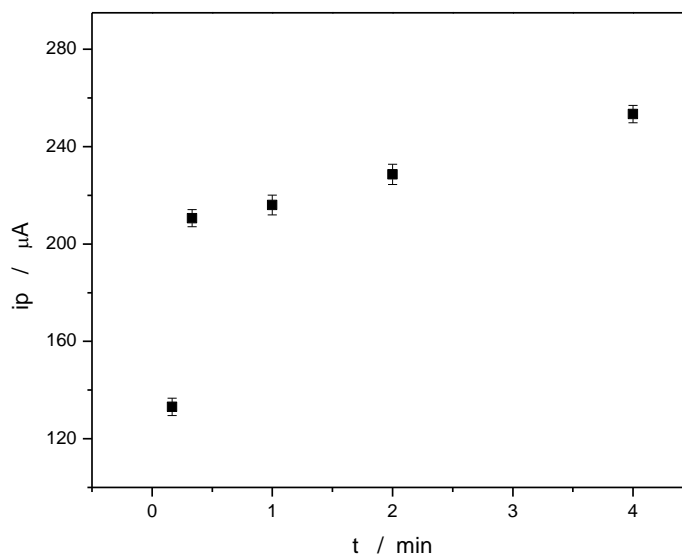


**Figura 20.** Estudio de estabilidad del NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7 con un electrodo GC-NTC.

En la figura 20 se observa que el NADH es estable en buffer B-R 0,1 M pH 7 hasta 7 horas de duración del experimento.

#### 4.08. Optimización del tiempo de inmersión del electrodo GC-NTC en solución NADH.

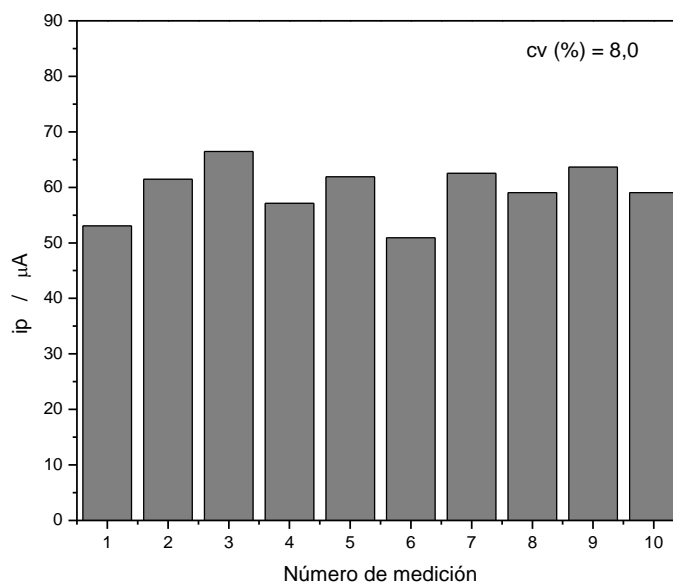
El tiempo de inmersión del electrodo modificado en la celda con NADH afecta la intensidad de corriente observada en cada experimento. Con el objetivo de optimizar y estandarizar el tiempo de inmersión del electrodo GC-NTC en la celda con NADH, se realizó un estudio de la  $i_p$  versus el tiempo de inmersión del electrodo. El experimento se realizó con NADH 3 mM en B-R 0,1 M pH 7, utilizando el mismo electrodo GC-NTC en todo el experimento. Entre cada medición el electrodo fue lavado con abundante agua nanopura. En la figura 21 se observa la relación entre la  $i_p$  de la oxidación del NADH y el tiempo de inmersión del electrodo GC-NTC en la celda con NADH.



**Figura 21.** Gráfico de la  $i_p$  versus el tiempo de inmersión del electrodo GC-NTC en la celda con solución de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

En la figura 21 se observa que la corriente de pico aumenta con el tiempo de inmersión. A los 10 s de inmersión se obtiene un valor de corriente de 133  $\mu$ A, luego a los 20 s se obtiene el doble de intensidad de corriente. Sin embargo, en términos prácticos 10 s son suficientes para obtener una buena señal de NADH. Por lo tanto, para los experimentos posteriores se utilizó 10 s de inmersión del electrodo.

En la figura 22 se muestran los valores de la ip de oxidación del NADH obtenidos con VDP, utilizando el mismo electrodo lavado con agua después de cada medición. Para el total de las mediciones se obtuvo un coeficiente de variación de 8,0 %. Por lo tanto, el procedimiento de lavado del electrodo permite utilizar un mismo electrodo GC-NTC para estudiar el NADH en solución, obteniendo una buena repetibilidad.



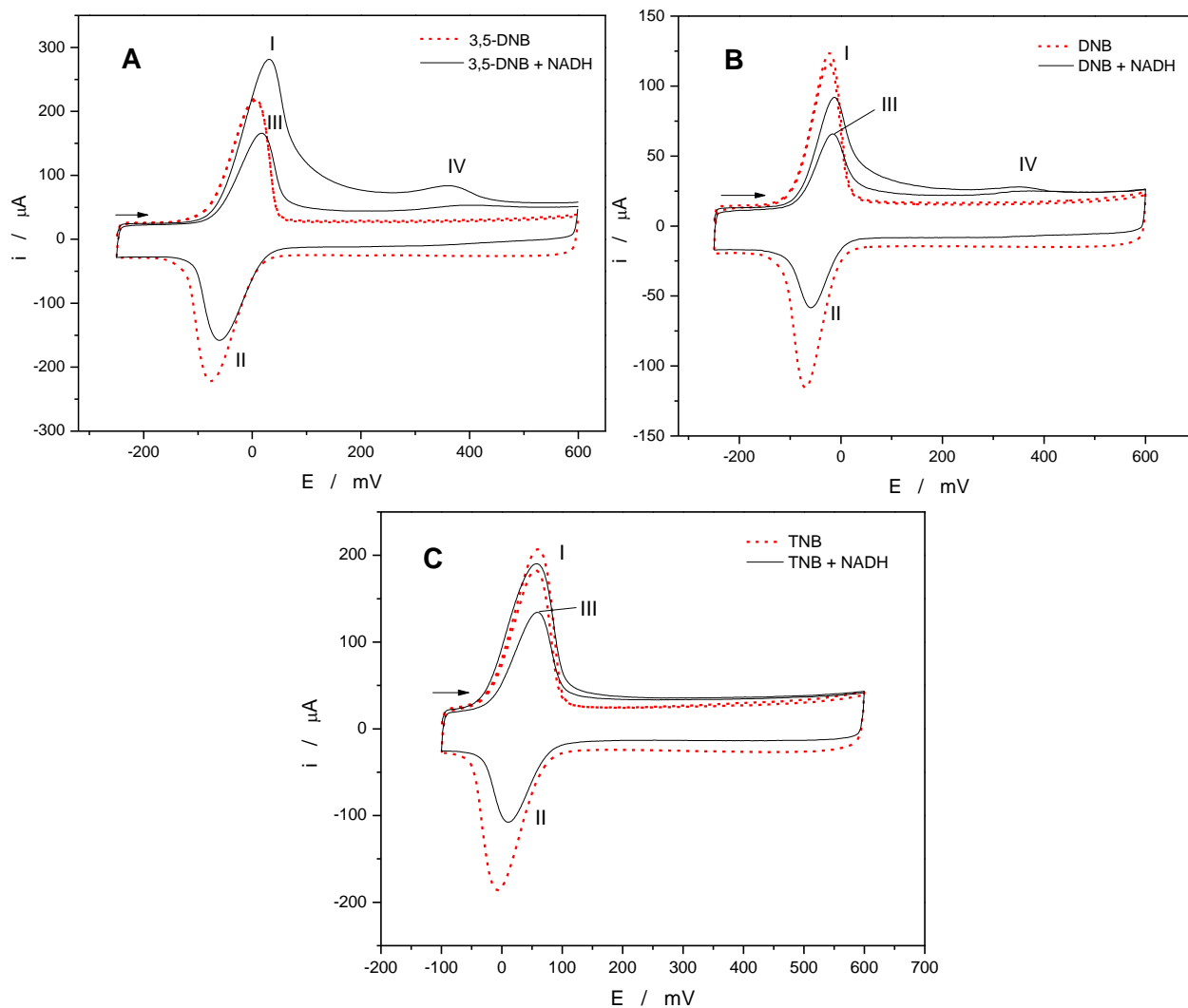
**Figura 22.** Estudio de repetibilidad de electrodos lavados con agua entre cada medición. NADH 3 mM en buffer B-R pH 7. Tiempo de inmersión 10 s.



#### 4.09. Electrocatálisis de electrodos modificado con NTC y nitrocompuestos sobre NADH.

En este estudio se evaluó la posibilidad de que los derivados generados electroquímicamente a partir de los nitrocompuestos, hidroxilamina/nitroso, encapsulados en los NTCs puedan actuar como mediadores de reacciones electroquímicas en un compuesto de interés biológico como el NADH. Siguiendo la metodología de la sección nº 3.4.4 “Estudio de electrocatálisis”. En ese procedimiento se utilizaron electrodos GC-NTC modificados por dipping por 10 s en solución de nitrocompuesto 2 mM en etanol. La reducción del primer grupo nitro y su posterior oxidación a derivado nitroso, se realiza en una celda que solo contiene buffer B-R 0,1 M pH 7. Una vez que el electrodo es modificado electroquímicamente, se lleva a una celda con solución de NADH 3 mM en buffer B-R, donde se evalúa si la señal característica del NADH aparece a un potencial diferente (Fig. 23).

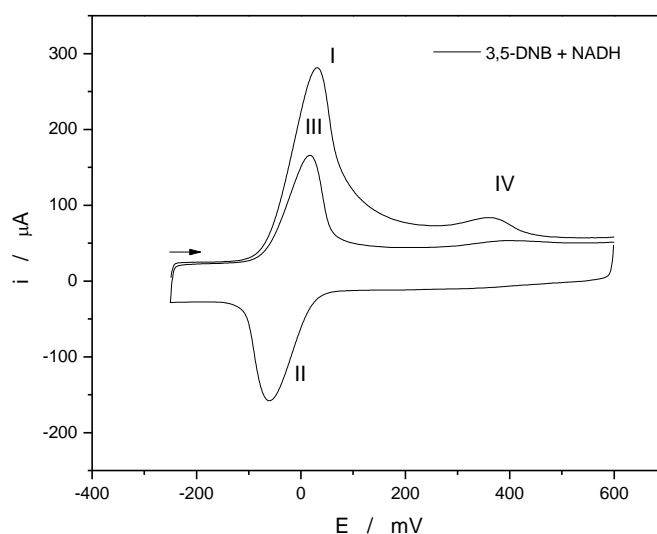
En la figura 23 se observan los voltamogramas con los electrodos modificados (GC-NTC-Med) en NADH. En línea discontinua, se observan los voltamogramas que verifican la modificación electroquímica de los electrodos GC-NTC con el mediador redox hidroxilamina/nitroso en buffer B-R 0,1 M pH 7. En estos voltamogramas se observa que la señal del mediador (señal II, línea discontinua en Fig. 23) tiene una mayor intensidad de corriente que los obtenidos en presencia de NADH (señal II, línea continua Fig. 23), para todos los mediadores. En línea continua, se observa que en el primer barrido aparecen las señales de oxidación (señal I, línea continua Fig. 23) más intensas que en el barrido posterior a un potencial cercano al del mediador redox (29 mV) (señal III, en Fig. 23). Además, en estos voltamogramas (Fig. 23), la señal característica del NADH con  $E_p = 370$  mV aparece con una intensidad de corriente muy baja (señal IV, para DNB y 3,5-DNB en Fig. 23) o no aparece (TNB), lo que indicaría una actividad electrocatalítica por parte de los mediadores redox, desplazando el potencial de oxidación del NADH a un potencial cercano al del mediador.



**Figura 23.** Voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC-Mediador. En línea discontinua, el par redox hidroxilamina/nitroso para cada compuesto medido en buffer B-R 0,1 M pH 7. En línea continua, electrodos con par redox encapsulado en el electrodo (GC-NTC-Mediador) medido en una solución NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. **A.** electrodo GC-NTC-3,5-DNB **B.** GC-NTC-DNB **C.** GC-NTC-TNB.

Las señales características de los voltamogramas del estudio electrocatalítico de los nitrocompuestos encapsulados en los electrodos (GC-NTC-Mediador) se destacan en la figura 24, donde la señal I corresponde a la oxidación del mediador y al NADH electrocatalizado, la señal II corresponde a la reducción del mediador (de nitroso a hidroxilamina), la señal III corresponde a la oxidación del mediador (de hidroxilamina a nitroso) y la señal IV corresponde a la oxidación del NADH sin electrocatalizar.

La corriente electrocatalítica es la diferencia entre el primer y segundo barrido de oxidación (señal I – señal III, en Fig. 24). El par redox (señales II y III, en Fig. 24) corresponde a la señal del mediador encapsulado en el electrodo. Esto indica que no se observa electrocatalisis en un barrido de oxidación consecutivo.



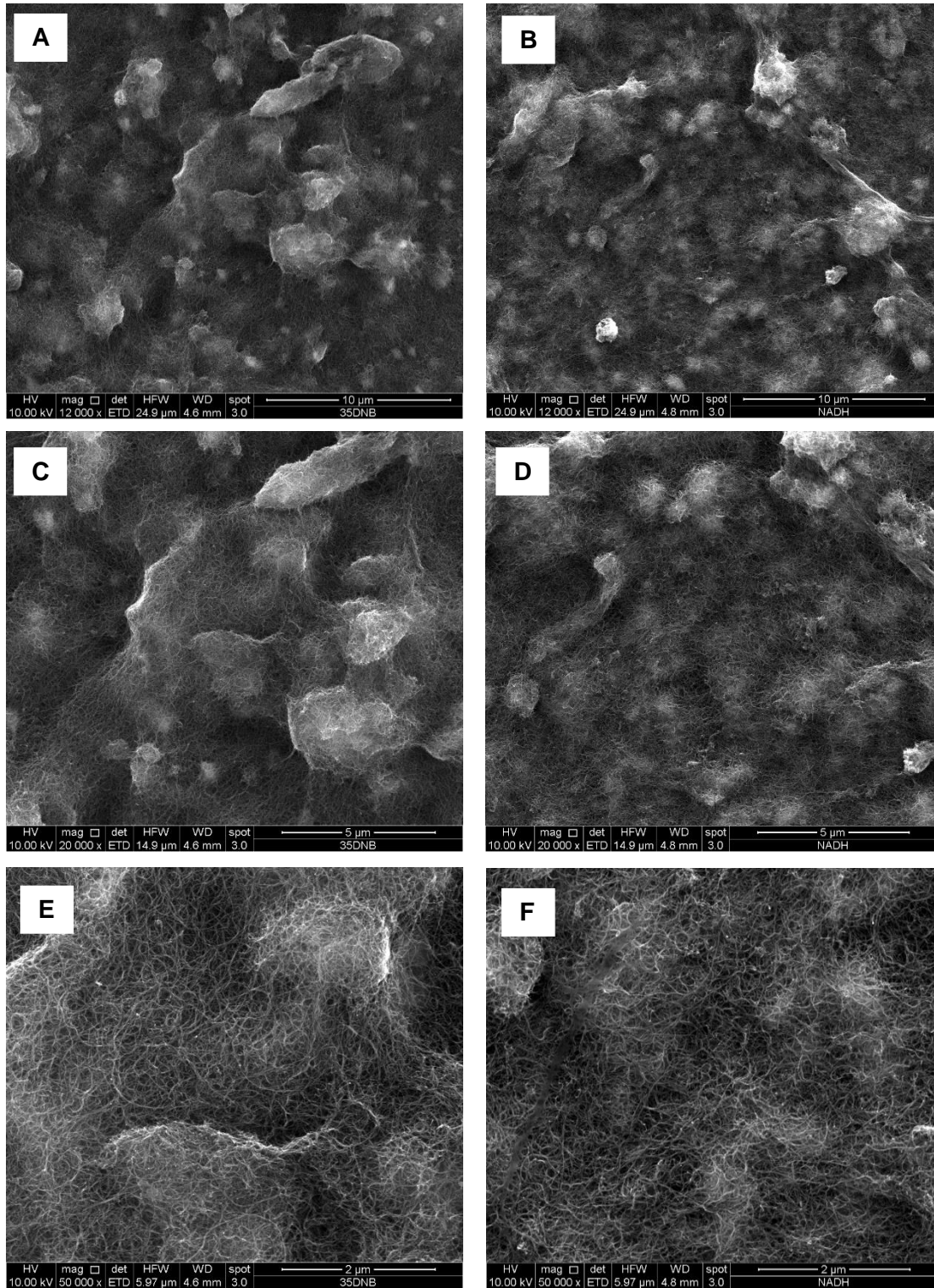
**Figura 24.** Voltamograma cíclico de electrodo con el par redox encapsulado en el electrodo (GC-NTC-3,5-DNB) medido en una solución NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

#### **4.10. Estudio de la superficie de los electrodos GC-NTC con microscopía electrónica de barrido (SEM).**

En la figura 25 se muestran las imágenes obtenidas, tanto para electrodos GC-NTC-Med como para electrodos GC-NTC-NADH. En los electrodos modificados con NTC, hay un conjunto de NTC que forman una estructura de nanotubos desordenada y aleatoria, con intersticios entre los nanotubos, formando una nano estructura con forma de red tridimensional (Fig. 25 E y F).

La nano estructura depende de la calidad de la dispersión de NTC depositada sobre el electrodo. En la preparación de las dispersiones de los NTCs se forman agregados que se mantienen hasta la evaporación del solvente. Estos agregados forman intersticios entre la nano estructura que tienen la capacidad de encapsular compuestos en toda su extensión

En la figura 25, al comparar los electrodos con nitrocompuesto (3,5-DNB) y con NADH, no se observan diferencias en la estructura de los electrodos que puedan atribuirse a agregados de nitrocompuestos o de NADH. Lo que sugiere, que los compuestos estarían encapsulados entre los intersticios de los NTCs y no en la superficie.



**Figura 25.** Imágenes SEM de la superficie de discos modificados con NTCs. **A.** Con 3,5-DNB 12000x. **B.** Con NADH 12000x. **C** con 3,5-DNB 20000x. **D** NADH 20000x. **E.** con 3,5-DNB 50000x. **F.** con NADH 50000x.

#### 4.11. Estudio de las señales a distintos tiempos de interacción en NADH

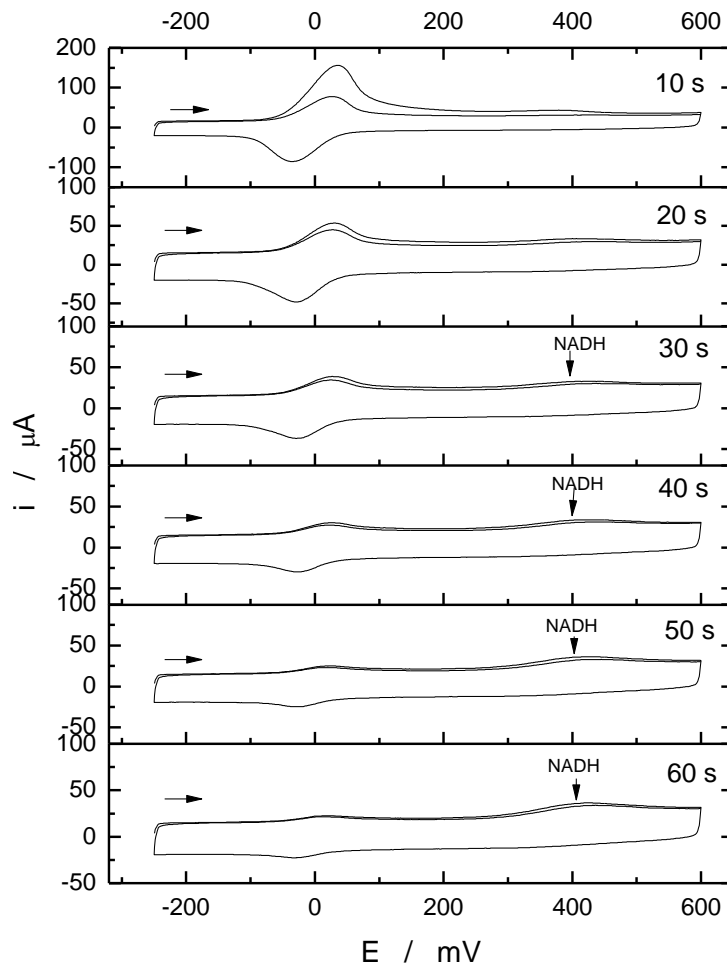
Como se mostró anteriormente, el tiempo de inmersión del electrodo GC-NTC en NADH tiene directa relación con la corriente de pico de la señal de oxidación del NADH. Este experimento tiene como objetivo estudiar el efecto del tiempo de interacción del electrodo GC modificado con nanotubos y mediador (GC-NTC-Med)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

El experimento se realizó con un electrodo modificado con nitrocompuesto o mediador redox (GC-NTC-Med). La modificación se realizó con una solución de nitrocompuesto 2 mM mediante dipping por 10 s, siguiendo la metodología del punto 3.4.5. Una vez obtenido el electrodo modificado electroquímicamente, se realizaron mediciones a distintos tiempos de interacción sin sacar el electrodo de la celda con NADH 3 mM en B-R 0,1 M pH 7.

En las figuras 26, 27 y 28 se muestran los voltamogramas cíclicos de los electrodos modificados (GC-NTC-Med) con distintos tiempos de interacción en NADH.

En las figuras se observa la variación de las señales electrocatalíticas del NADH ( $E_p = 30$  mV) en el potencial de oxidación del mediador y la señal de oxidación del NADH sin electrocatalizar con  $E_p = 400$  mV (señalada con una flecha cuando está presente).

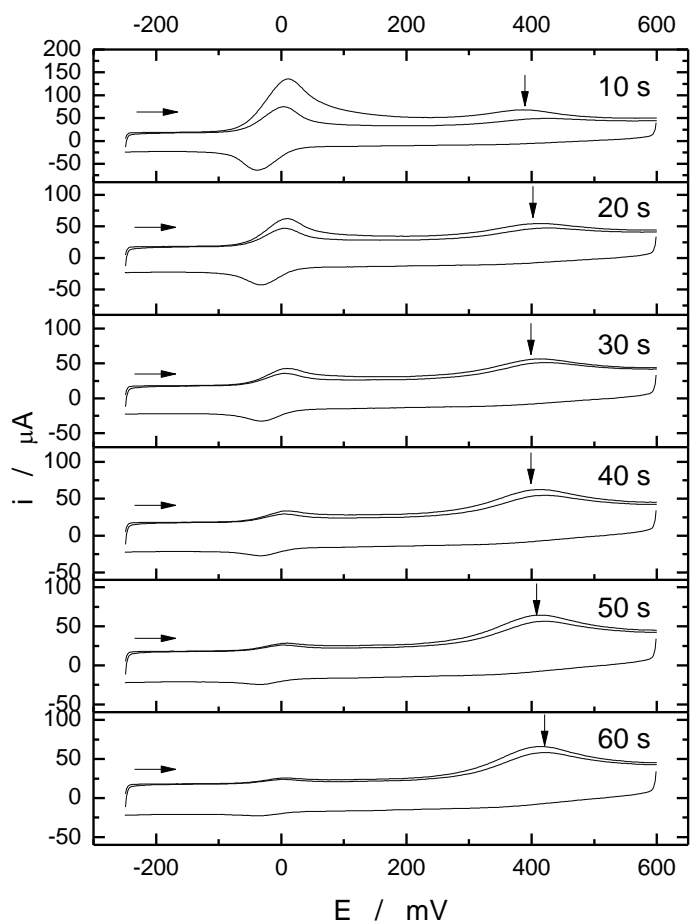
a) 3,5-DNB



**Figura 26.** Voltamogramas cíclicos del electrodo GC-NTC-3,5-DNB medido a distintos tiempos de interacción con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

En la figura 26 se observa que la mayor corriente catalítica,  $i_p$ , Med-NADH se obtiene a los 10 s de inmersión del electrodo previo a la aplicación del barrido de potencial en NADH. Para tiempos mayores a 10 s se observa una disminución de las  $i_p$  catalíticas Med-NADH. Desde los 30 s de interacción, se observa un aumento de la señal del NADH sin electrocatalizar ( $E_p = 400$  mV). Este comportamiento indica una disminución del mediador en el electrodo, a medida que avanza el tiempo de interacción con NADH, lo cual sugiere que el mediador difunde desde el electrodo hacia la solución en presencia de NADH.

b) DNB

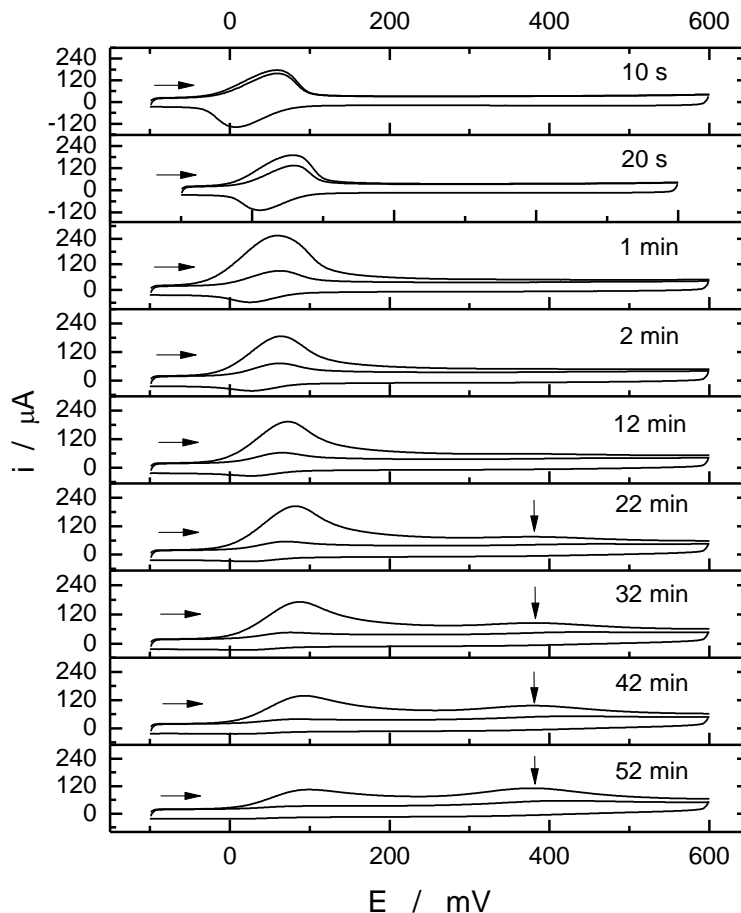


**Figura 27.** Voltamogramas cíclicos del electrodo GC-NTC-DNB medido a distintos tiempos de interacción con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

Para el DNB (Fig. 27), la mayor intensidad de  $i_p$  catalítica se observa a los 10 s de interacción del electrodo GC-NTC-DNB en NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7, luego disminuye con el aumento del tiempo. Además, la señal de oxidación del NADH sin electrocatalizar aparece en todos los voltamogramas ( $E_p = 400$  mV), aumentando con el tiempo de interacción del electrodo con NADH.



c) TNB



**Figura 28.** Voltamogramas cíclicos del electrodo GC-NTC-TNB medido a distintos tiempos de interacción sin sacarlo de la celda con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

Cuando se usa TNB como mediador (Fig. 28), la mayor intensidad de la ip catalítica sin que aparezca la señal de oxidación de NADH, se observa a 1 min de inmersión. Además, se observa que la corriente de la señal de oxidación del NADH solo aparece luego de 22 min de inmersión del electrodo, aumentando hasta los 52 min de duración del experimento. En todos los experimentos se observó la disminución del mediador con el tiempo de interacción.

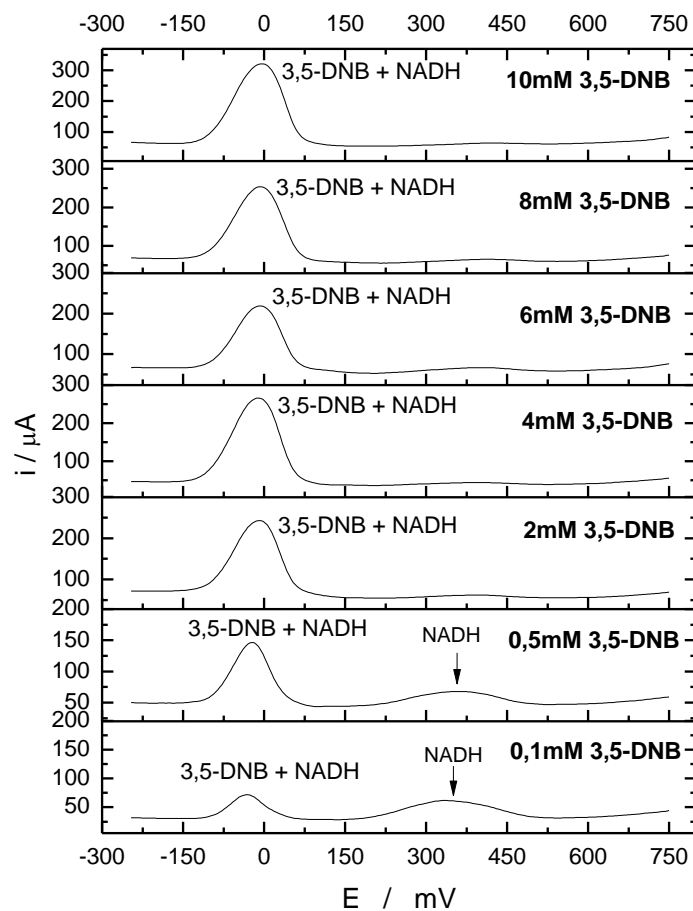
Con los resultados obtenidos, se puede concluir que el tiempo óptimo de interacción con NADH para los compuestos en los electrodos GC-NTC son: para el 3,5-DNB y DNB a los 10 s, y para el TNB es a 1 min. Estos valores corresponden al tiempo en que se observa el mayor valor de ip catalítica por parte del mediador y el menor valor de ip de oxidación de NADH sin

electrocatalizar ( $E_p = 400 \text{ mV}$ ). Además, se sugiere una desorción del mediador desde el electrodo hacia la solución en presencia de NADH, con el aumento del tiempo de interacción, lo que daría cuenta de una cinética de intercambio entre el mediador y el NADH, donde el NADH desplazaría al mediador del electrodo.

#### **4.12. Variación de la concentración del mediador**

Con el objetivo de encontrar la concentración mínima de nitrocompuesto capaz de electrocatalizar todo el NADH presente en el electrodo con NTCs, se estudió la variación de la concentración del nitrocompuesto en la modificación de los electrodos GC-NTC-Med. El experimento se realizó utilizando una concentración fija de NADH de 3 mM en buffer B-R siguiendo la metodología de “Estudio de electrocatálisis”, descrita en el punto 3.4.5. En las figuras 29, 30 y 31, se muestran los voltamogramas de pulso diferencial a diferentes concentraciones de mediador en electrodos GC-NTC-Med medidos en NADH 3 mM en B-R 0,1 M pH 7 con el tiempo de interacción optimizado para cada compuesto.

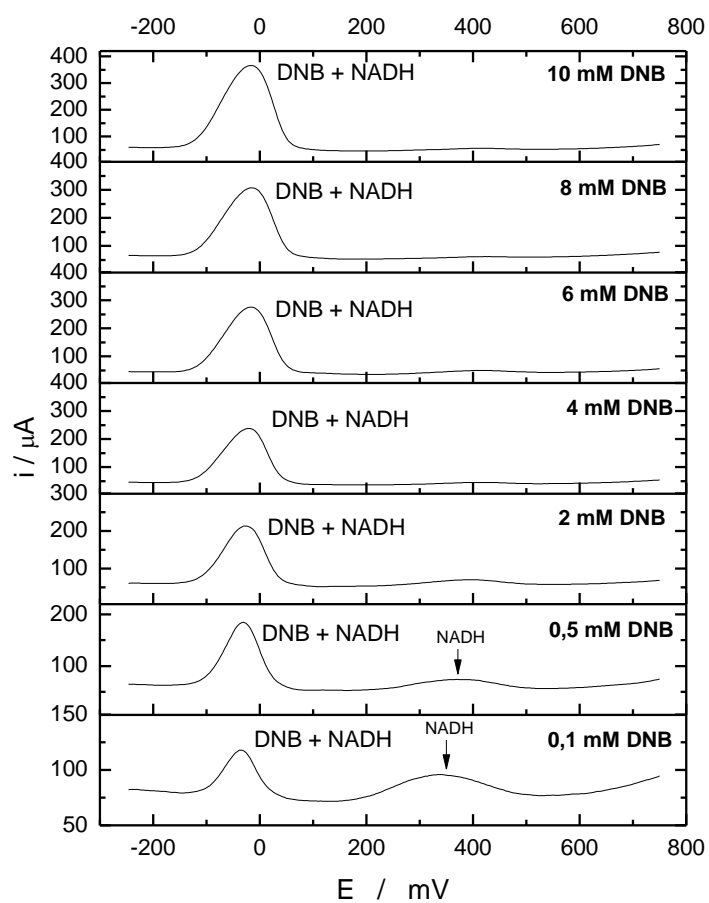
a) 3,5-DNB



**Figura 29.** Voltamogramas de pulso diferencial de electrodos GC-NTC-3,5-DNB modificados con distintas concentraciones de 3,5-DNB a una concentración constante de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

De la figura 29 se puede concluir que la concentración mínima de 3,5-DNB a la cual no aparece la señal de oxidación del NADH sin electrocatalizar ( $E_p = 335$  mV) es a 2 mM de 3,5-DNB.

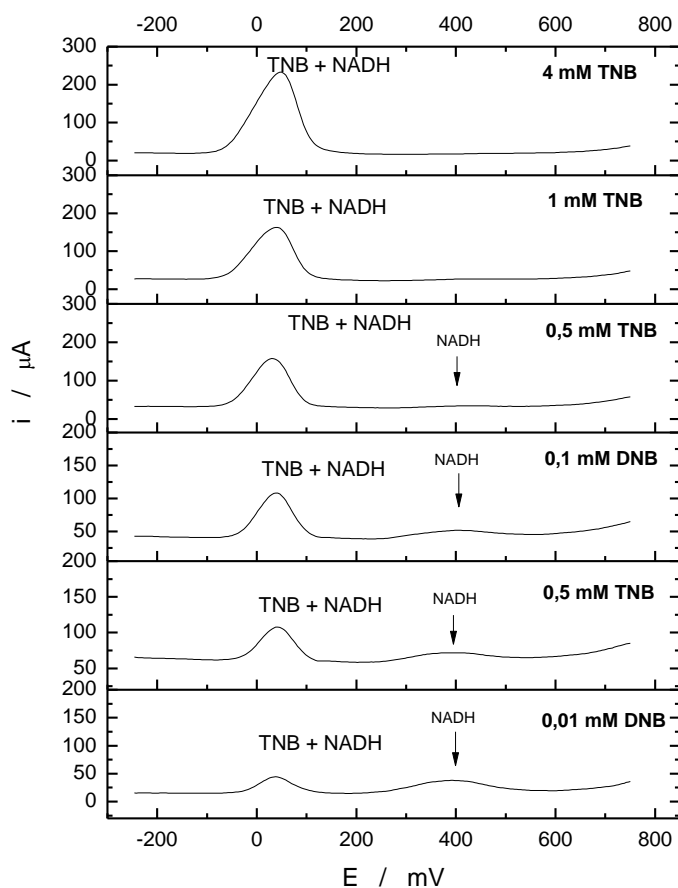
b) DNB



**Figura 30.** Voltamogramas de pulso diferencial de electrodos GC-NTC-DNB modificados a distintas concentraciones de DNB a una concentración constante de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH7.

En la figura 30, se observa que la concentración mínima de DNB a la cual no aparece la señal del NADH sin electrocatalizar ( $E_p = 335$  mV) es a 2 mM de DNB.

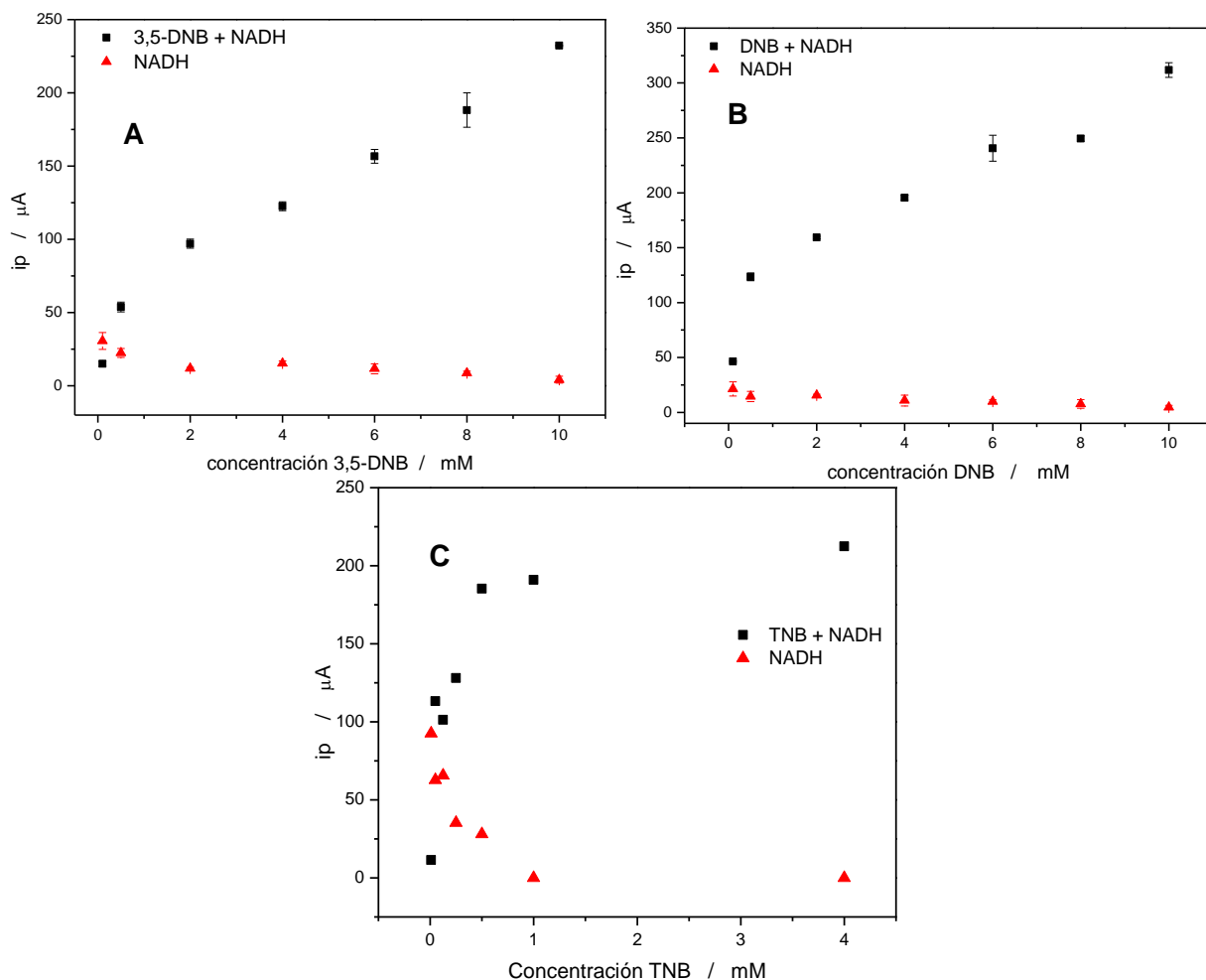
c) TNB



**Figura 31.** Voltamogramas de pulso diferencial de electrodos GC-NTC-TNB modificado a distintas concentraciones de TNB a una concentración constante de NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

En la figura 31, se observa que la mínima concentración de TNB, a la cual no aparece la señal del NADH sin electrocatalizar ( $E_p = 400$  mV) es a 1 mM de TNB.

En la figura 32 se resumen los resultados obtenidos de los voltamogramas de las figuras 29, 30 y 31, en el cual se muestran las corrientes catalíticas NADH-Med y la corriente de pico del NADH sin electrocatalizar, en función de la variación del TNB. Este experimento se realizó en triplicado usando distintos electrodos GC-NTC-Med, con un tiempo de inmersión en NADH optimizado en el punto anterior.



**Figura 32.** Dependencia de la corriente de pico catalítica Med-NADH (■) y la corriente del NADH sin electrocatalizar (▲) en función de la variación de la concentración del mediador, con NADH de 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. **A.** GC-NTC-3,5-DNB **B.** GC-NTC-DNB **C.** GC-NTC-TNB.

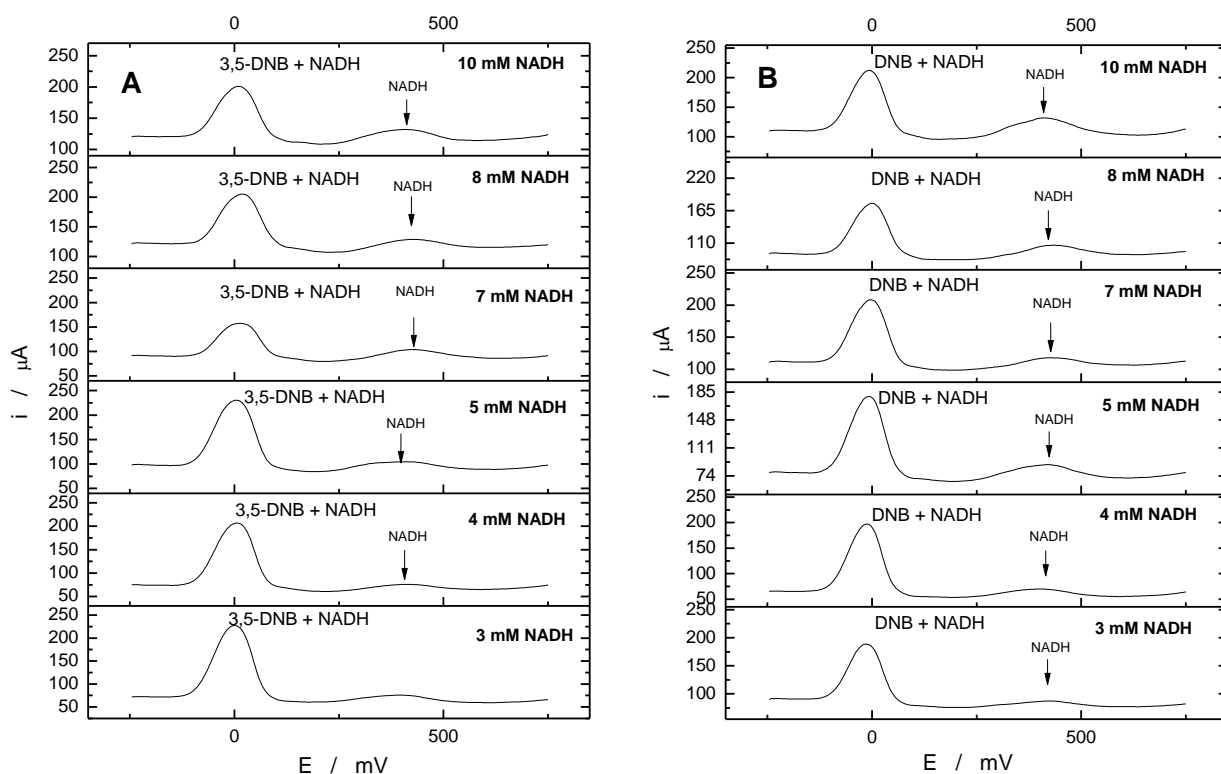
En la figura 32 se observa que al aumentar la concentración de nitrocompuesto la corriente catalítica (Med-NADH, símbolo cuadrado negro en Fig. 32) aumenta y la corriente del NADH sin electrocatalizar disminuye (símbolo triángulo rojo en Fig. 32). Para el TNB (Fig. 32 C), la corriente catalítica Med-NADH aumenta considerablemente hasta 1 mM y luego se mantiene constante, observando un *plateau* entre 1 y 4 mM. Por lo tanto, la mínima concentración que se requiere para electrocatalizar todo el NADH presente en el electrodo es 1 mM, con la cual se obtiene la máxima corriente catalítica Med-NADH para el TNB y la mínima corriente de NADH sin electrocatalizar. Para el 3,5-DNB y el DNB (Fig. 32 A y B) se observa que el valor mínimo de

la corriente del NADH sin electrocatalizar se hace constante desde los 2 mM de nitrocompuesto. Por lo tanto, para ambos compuestos la mínima concentración de nitrocompuesto que se requiere para electrocatalizar el NADH presente en el electrodo es a los 2 mM de nitrocompuesto.

#### 4.13. Efecto de la concentración de NADH sobre el electrodo GC-NTC-Med.

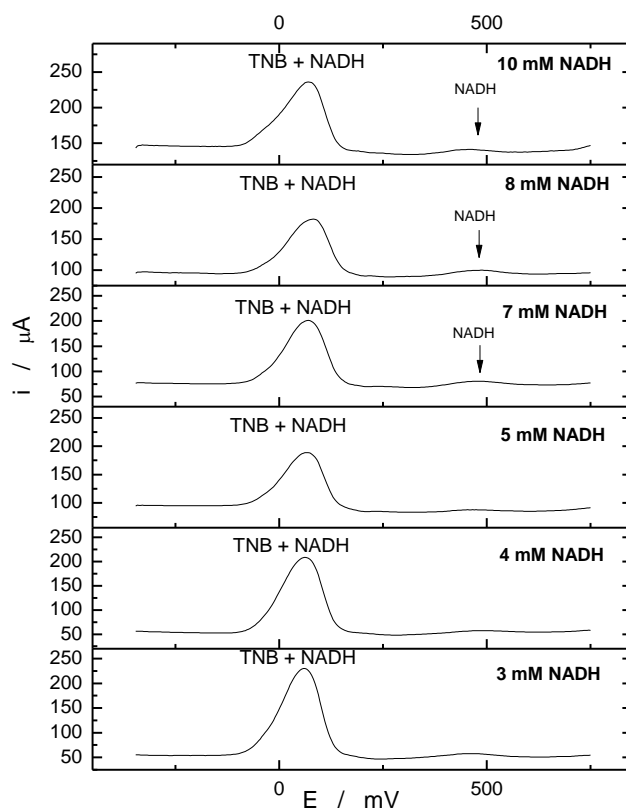
Una vez conocida la mínima concentración de mediador requerida para la electrocatalisis de NADH, se busca encontrar la máxima concentración de NADH que puede electrocatalizar esta cantidad de mediador bajo las mismas condiciones.

En este experimento se estudió la variación de la concentración de NADH en electrodos modificados GC-NTC-Med, utilizando la mínima concentración de mediador determinada en la sección anterior. En la figura 33 se muestran los voltamogramas de pulso diferencial obtenidos al variar la concentración de NADH. En todos los experimentos, las concentraciones de mediador fueron 2 mM para 3,5-DNB, DNB y 1 mM para TNB, en buffer B-R 0,1 M pH 7.



**Figura 33.** Voltamogramas de pulso diferencial a distintas concentraciones de NADH en buffer B-R 0,1 M pH 7 a una concentración fija de **A.** 3,5-DNB 2 mM y **B.** DNB 2 mM, en electrodos GC-NTC.

En la figura 33 se observa que al aumentar la concentración de NADH en la celda, aumenta la corriente de la señal del NADH sin electrocatalizar ( $E_p = 400$  mV).

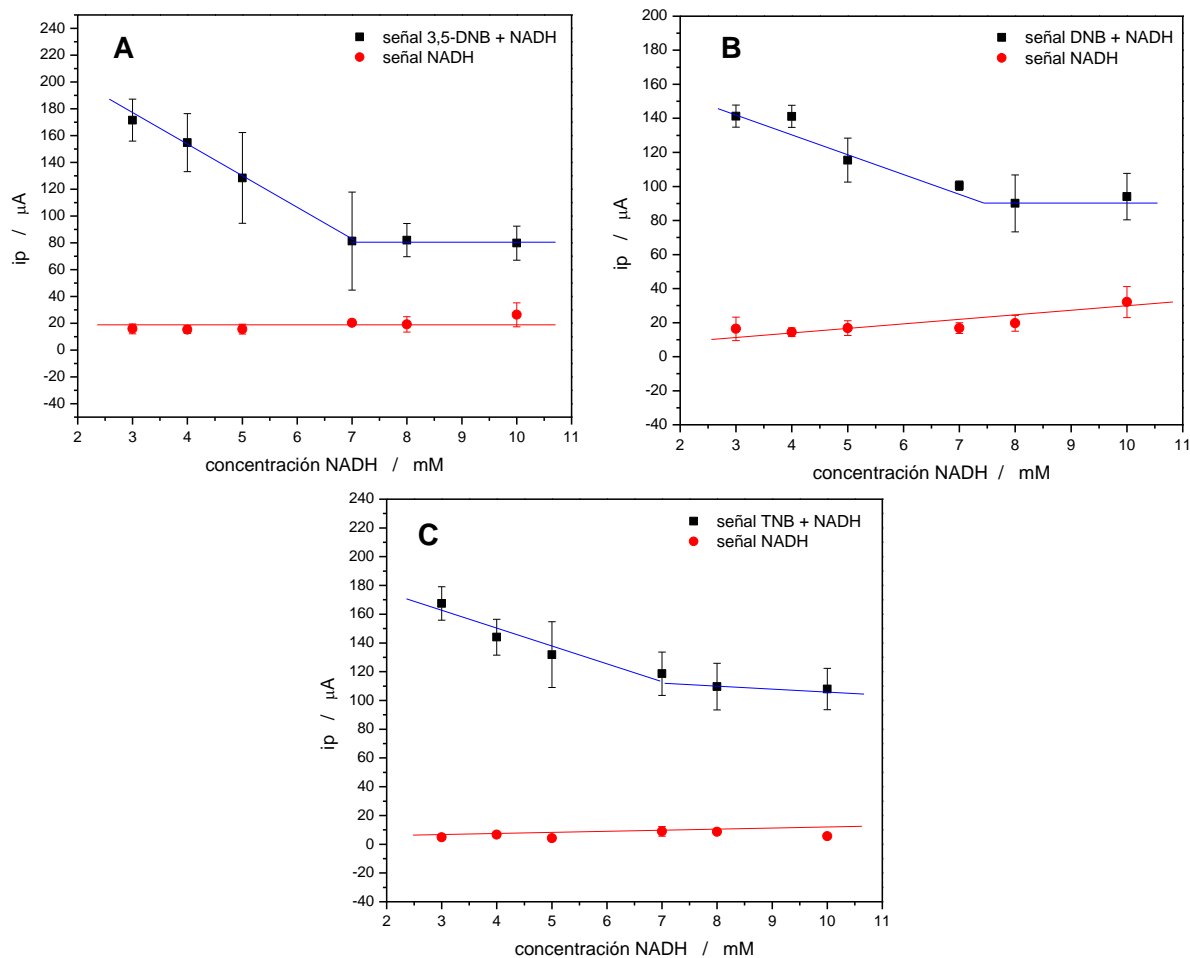


**Figura 34.** Voltamogramas de pulso diferencial a distintas concentraciones de NADH buffer B-R 0,1 M pH 7 a una concentración fija de TNB 2mM en electrodos GC-NTC.

En la figura 34 se observa que con el aumento de la concentración del NADH la corriente de pico del NADH se mantiene prácticamente constante con un valor cercano a cero ( $6,60 \mu A$ ).

En la figura 35 se resumen los resultados obtenidos de los voltamogramas de las figuras 33 y 34. Se muestran las corrientes catalíticas NADH-Med (cuadrado negro en Fig. 35) y la corriente de pico del NADH sin electrocatalizar (círculo rojo en Fig. 35) en función de la variación del TNB. Este experimento se realizó en triplicado usando distintos electrodos GC-NTC-Med, con un tiempo de interacción con NADH optimizado en el punto anterior.





**Figura 35.** Dependencia de la corriente de pico electrocatalítica del conjunto Med-NADH (■) y la corriente del NADH sin electrocatalizador (●) con la variación de la concentración del NADH en buffer B-R 0,1 M pH 7. **A.** 3,5-DNB 2 mM en GC-NTC **B.** DNB 2mM GC-NTC **C.** TNB 1 mM GC-NTC.

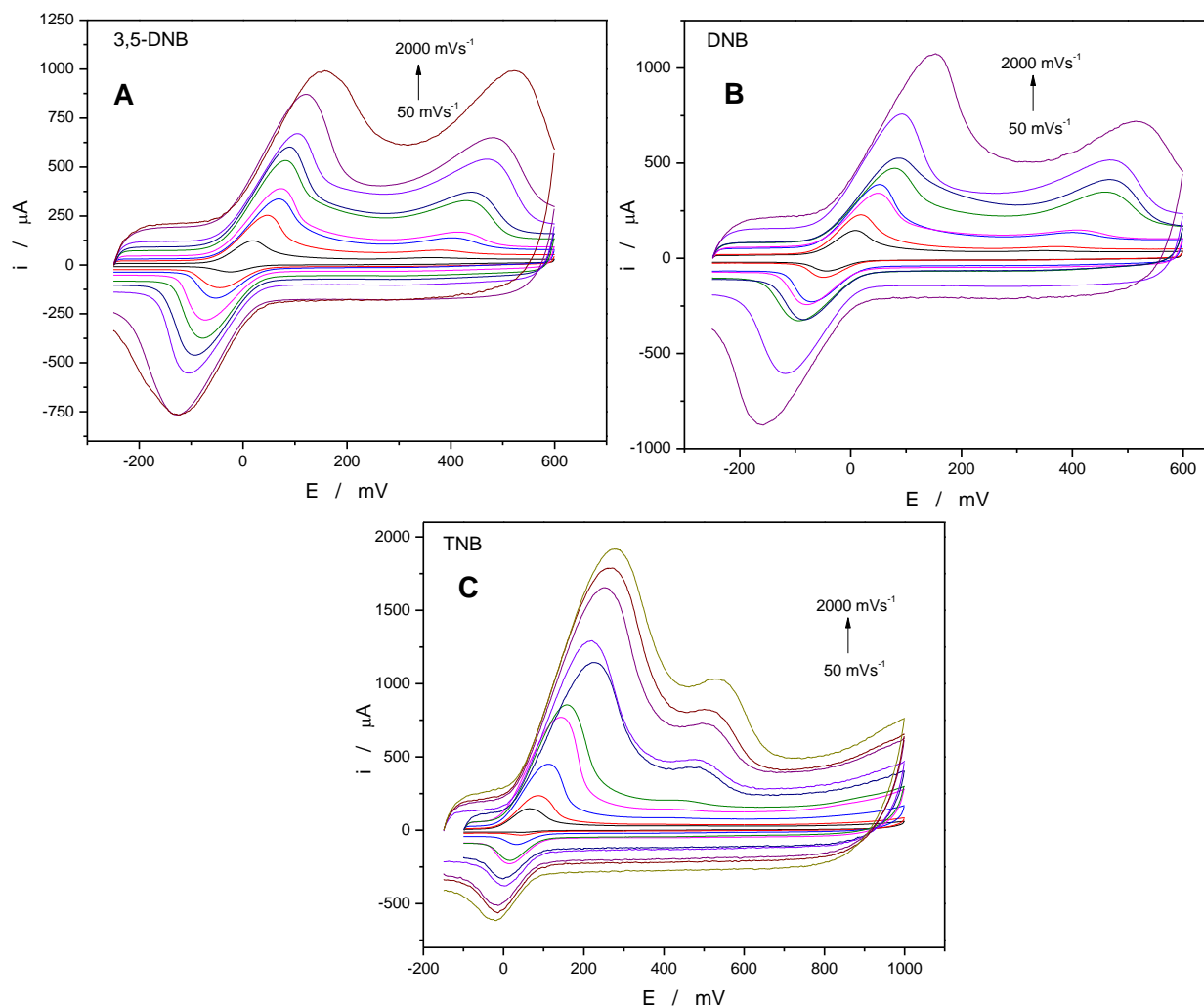
En la figura 35 se observa, con todos los mediadores una disminución de la corriente electrocatalítica del conjunto Med-NADH (cuadrado negro en Fig. 35), con el aumento de la concentración del NADH. Para el 3,5-DNB (Fig. 35 A) la corriente electrocatalítica 3,5-DNB-NADH disminuye hasta los 7 mM de NADH, luego se hace constante. Para el DNB y el TNB (Fig. 35 B y C) la corriente electrocatalítica Med-NADH disminuye hasta los 8 mM de NADH y luego se hace constante. Sin embargo, la corriente del NADH sin electrocatalizar tiene un comportamiento más bien constante con el aumento de la concentración de NADH, observando un leve aumento de la corriente a altas concentraciones. Por lo tanto, la máxima concentración

de NADH que cada mediador puede electrocatalizar es 7 mM para el 3,5-DNB, 2 mM y 8 mM para DNB 2 mM y TNB 1 mM, respectivamente.

#### **4.14. Efecto de la velocidad de barrido en el conjunto mediador-NADH.**

El estudio de la influencia de la velocidad de barrido en el conjunto mediador-NADH se realizó utilizando electrodos GC-NTC-Med. La modificación con mediador se realizó por inmersión simultánea de los electrodos en una solución de nitrocompuesto 2 mM, obteniendo electrodos GC-NTC-Med. Esta metodología se aplica para eliminar errores por tiempo de inmersión en electrodos diferentes.

El experimento se realizó de acuerdo la metodología descrita en el punto 3.4.5. Todos los electrodos GC-NTC-Med fueron medidos con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7. Las mediciones se realizaron a distintas velocidades de barrido desde 50 hasta 2000 mVs<sup>-1</sup> por triplicado, la técnica utilizada fue voltametría cíclica.

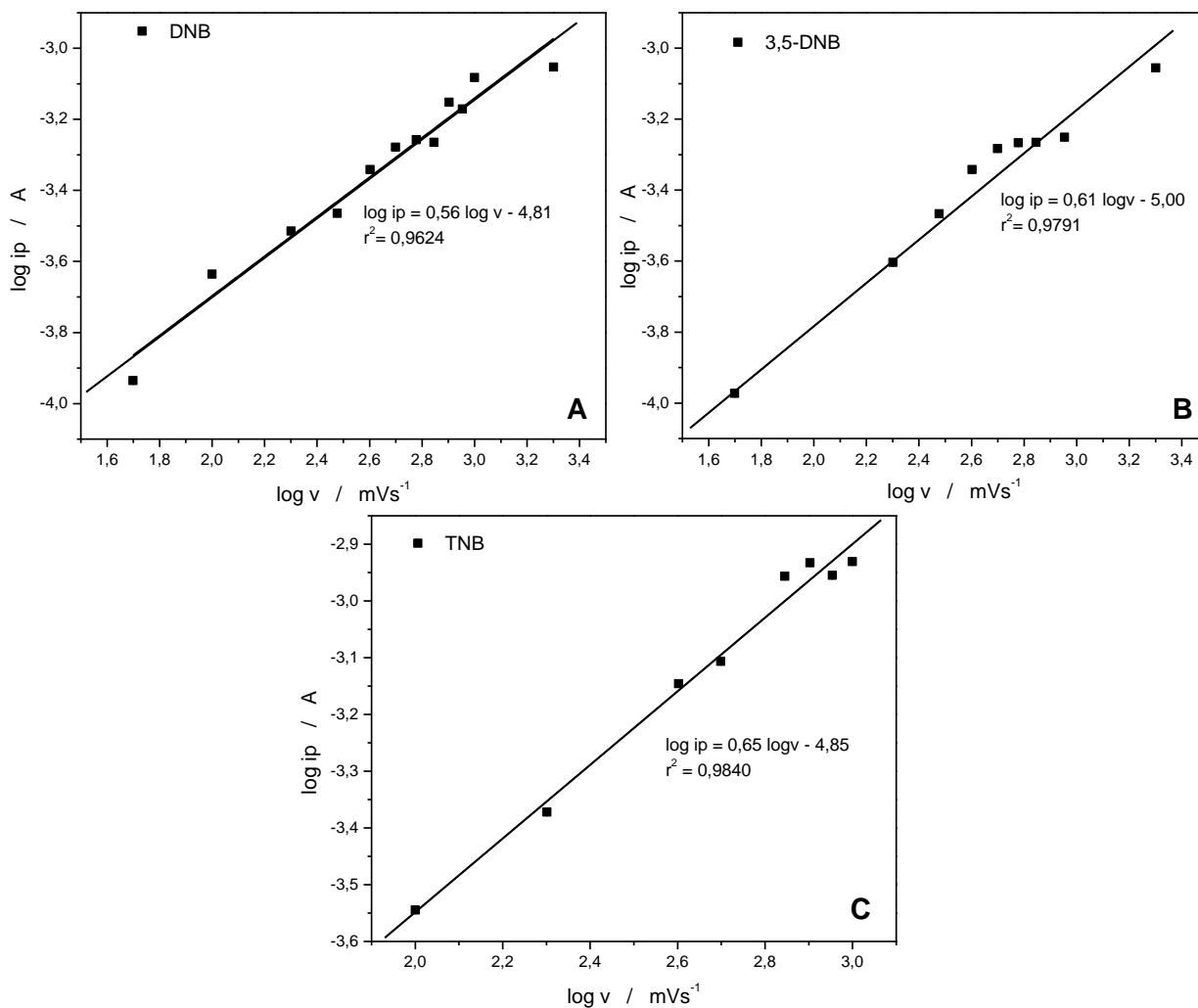


**Figura 36.** Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido con electrodos GC-NTC-Med en NADH 3 mM en buffer B-R pH 7. **A.** 3,5-DNB 2 mM como mediador. **B.** DNB 2 mM como mediador. **C.** TNB 2 mM como mediador.

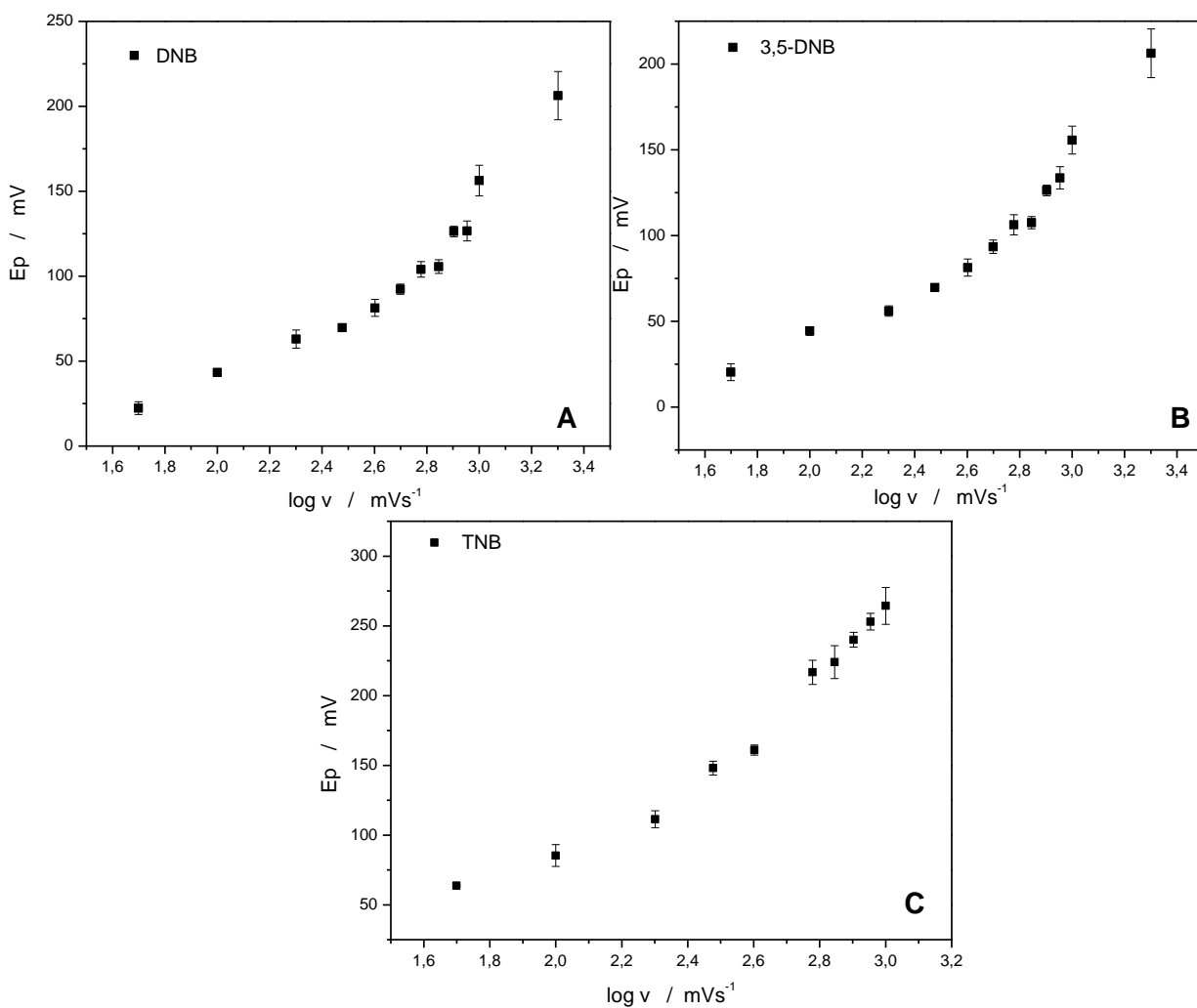
Para todos los voltamogramas (Fig. 36), las corrientes de oxidación y reducción, aumentan con el aumento de la velocidad de barrido.

En la figura 37 se observa una relación lineal de  $\log i_p$  con  $\log v$ . Los valores de las pendientes de los gráficos obtenidos dan cuenta de la naturaleza del mecanismo de transferencia involucrado. Los valores de las pendientes de los compuestos 3,5-DNB y DNB fueron de 0,56 y

0,61, respectivamente. Estos valores son cercanos al esperado teóricamente de 0,5 para procesos controlados por difusión<sup>42</sup>. Sin embargo, el valor obtenido de la pendiente para el TNB, fue de 0,65, un valor cercano al esperado teóricamente 0,7 para procesos mixtos.



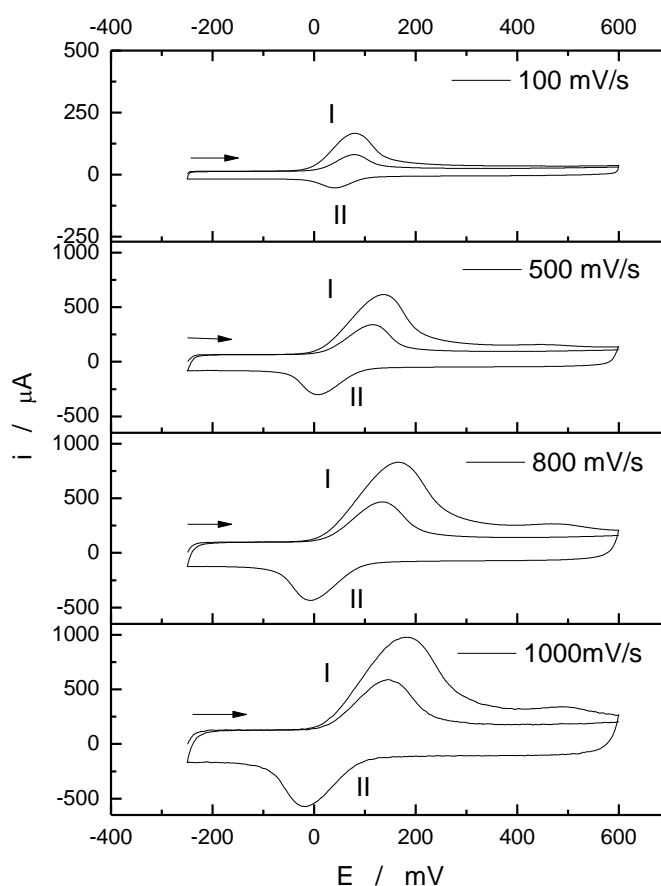
**Figura 37.** Gráfico del logaritmo de la corriente de pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido, para electrodos modificados GC-NTC-Med en NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7,0. **A.** DNB 2 mM. **B.** 3,5-DNB 2 mM y **C.** TNB 2 mM.



**Figura 38.** Gráfico de  $E_p$  versus  $\log v$ . Con  $v$  desde  $50 \text{ mVs}^{-1}$  hasta  $2000 \text{ mVs}^{-1}$  para electrodos GC-NTC-Med en NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7,03. **A.** DNB 2 mM. **B** 3,5-DNB 2 mM y **C.** TNB 2 mM.

En el gráfico de  $E_p$  versus  $\log v$  (Fig. 38), se observa un aumento de  $E_p$  con la velocidad de barrido para todos los compuestos estudiados, lo que indica un comportamiento reversible a bajas velocidades y cuasi reversible a velocidades altas.

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de la corriente electrocatalítica en relación a la corriente del TNB como mediador redox (señal II Fig. 39), se evaluó el efecto de la difusión del mediador en presencia de NADH y se expresaron las corrientes obtenidas a cada velocidad en términos de porcentaje, Tabla IV. Este experimento se realizó a distintas velocidades de barrido de 100 a 1000  $\text{mVs}^{-1}$ . Se utilizaron electrodos GC-NTC -TNB modificados con TNB 2 mM. En la figura 39 se muestran los voltamogramas obtenidos para los electrodos en solución de NADH 3 mM en buffer B-R pH 7.



**Figura 39.** Voltamogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para electrodos GC-NTC modificados con TNB 2 mM en NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.

En la figura 39 se observa que al aumentar la velocidad de barrido aumenta la corriente de pico de los voltamogramas, con un leve desplazamiento en los potenciales de pico, tanto de reducción como de oxidación.

Se define la corriente catalítica como la diferencia entre la señal I, Fig. 39 (conjunto Med-NADH) y la señal de reducción del mediador (señal II en Fig. 39) (ec. 9).

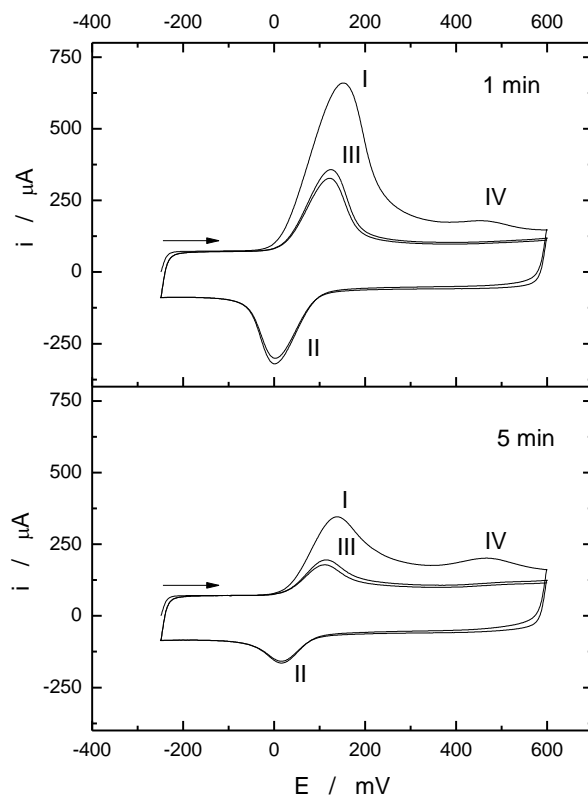
$$I_p \text{ electrocatalítica} = I_p \text{ señal I} - I_p \text{ señal II} \quad (9)$$

**Tabla IV.** Relación entre la corriente electrocatalítica (Med-NADH) y la corriente de pico de la señal de reducción del mediador a diferentes velocidades de barrido.

Velocidad de barrido (mV/s)	$\frac{I_p \text{ catalítica}}{I_p \text{ señal I}} \times 100$
100	69,30
500	54,10
800	51,31
1000	46,54

En la tabla IV se observa que al aumentar la velocidad de barrido disminuye el porcentaje que relaciona la corriente electrocatalítica con la corriente del mediador. Como la concentración de NADH es la misma para todo el experimento, la disminución del porcentaje a velocidades altas se debe a que el mediador tiene menos tiempo para difundir desde el electrodo hacia la solución. En cambio, a velocidades bajas el experimento ciclo voltamétrico es más lento y en el barrido inverso ha difundido mediador del electrodo. Las mediciones a velocidades altas disminuyen el error por difusión del mediador en la estimación de la corriente electrocatalítica. Se puede concluir que la relación entre la corriente del mediador y la corriente electrocatalítica (Med-NADH) es alrededor de 1:1, es decir, de la corriente de la señal I en Fig. 39, el 50 % corresponde a mediador y el 50 % a NADH.

La difusión del mediador es un factor clave en el sistema cuando se electrocataliza NADH. Con el objetivo de ver el comportamiento de las señales del mediador encapsulado al aplicar 5 ciclos continuos de barridos de potencial y seguir la disminución de las señales, se realizó un experimento a una velocidad de barrido de 100 mVs<sup>-1</sup>. La primera medición se realizó a 1 min de interacción del electrodo GC-NTC-TNB con NADH, y la segunda medición se realizó a los 5 min de interacción del electrodo con NADH 3 mM en buffer B-R 0,1 M pH 7.



**Figura 40.** Voltamogramas cíclicos de un electrodo GC-NTC modificado con TNB 2 mM, medido en NADH 3mM en buffer B-R pH 7 a distintos tiempos de interacción del electrodo **A.** 1 min. **B.** 5 min.  $v = 500$  mV/s.

**Tabla V.** Relación entre la corriente catalítica y la corriente de pico de la señal de reducción del medidor a diferentes tiempos de medición del electrodo.

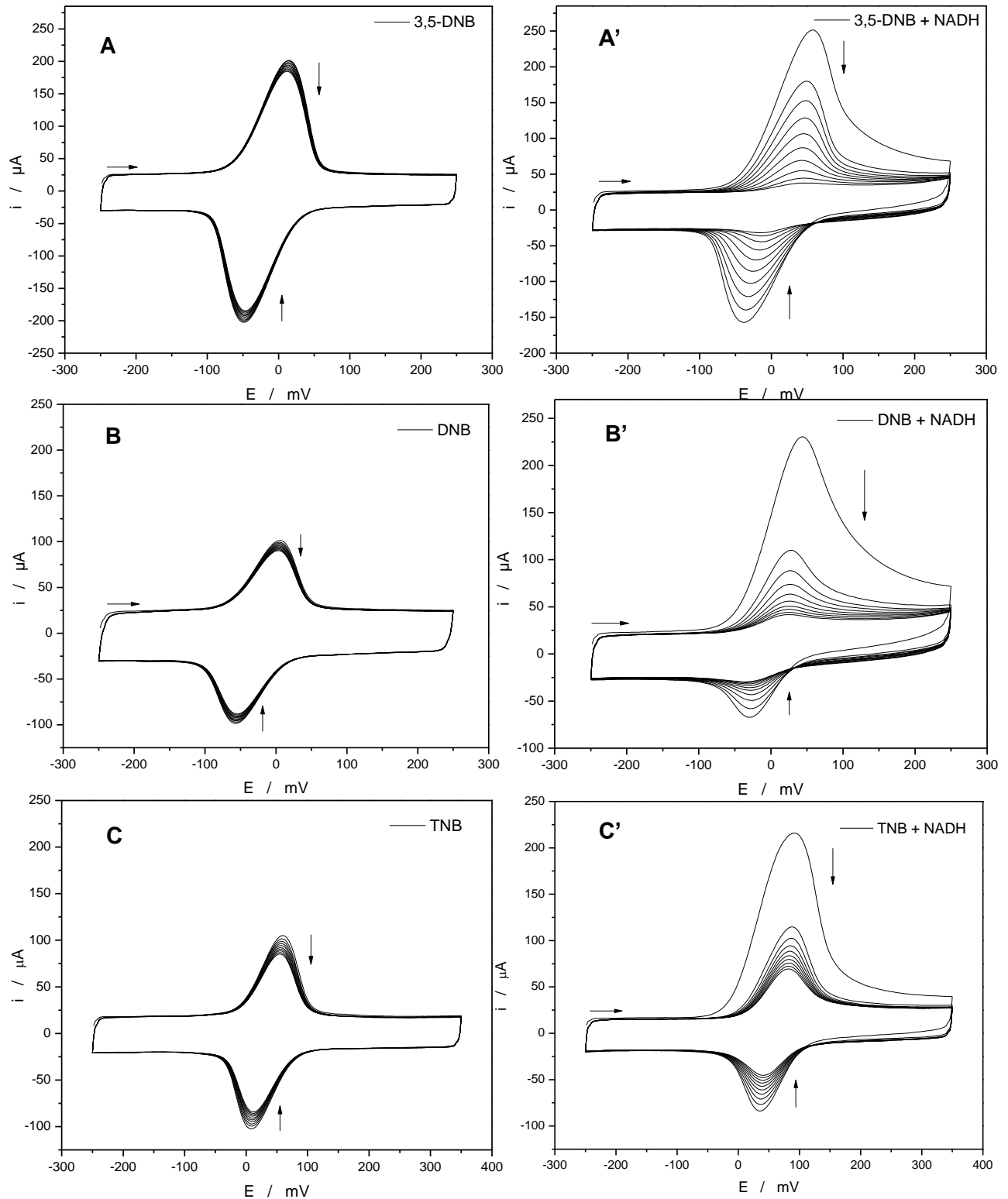
Tiempo (min)	$\frac{i \text{ catalítica}}{i_p \text{ señal I}} \times 100$
1	54,88
5	60,47

Los barridos consecutivos (señales II y III en Fig. 40) indican que no hay actividad electrocatalítica del NADH luego del primer barrido de oxidación, esto se puede deber a que no se alcanza a renovar NADH desde la solución, o a la presencia de  $\text{NAD}^+$  mientras el electrodo está polarizado. Solo después de volver a aplicar un potencial a los 5 min se observó una diferencia entre la corriente electrocatalítica y la corriente de reducción del mediador, pero con menor intensidad de corriente. Esto se debe a que parte del mediador y  $\text{NAD}^+$  generado en la primera oxidación, difundieron desde el interior del electrodo hacia la solución en el tiempo transcurrido entre una y otra medición. Sin embargo, a pesar de la clara disminución del mediador



en el electrodo, la relación porcentual entre la corriente catalítica y la del mediador tienen valores cercanos al 55 % (Tabla V), esto indicaría que, a pesar de la disminución en la intensidad de corriente de las señales, la actividad electrocatalítica del electrodo no cambia significativamente.

Debido a que la actividad electrocatalítica solo ocurre en el primer barrido anódico, los barridos posteriores dan cuenta del comportamiento del mediador en los electrodos al ser medidos en NADH y no del conjunto mediador/NADH. Por lo tanto, con el objetivo de estudiar la disminución de las corrientes del mediador en presencia de NADH, se analizó la evolución de las señales voltamétricas del par redox de cada nitrocompuesto, comparando la disminución de las señales en ausencia y presencia de NADH en buffer B-R pH 7. Para cada medición se realizaron 20 barridos cíclicos consecutivos a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . Todas las mediciones se realizaron con los mismos límites de potencial. Los voltamogramas cíclicos obtenidos se muestran en la figura 41.

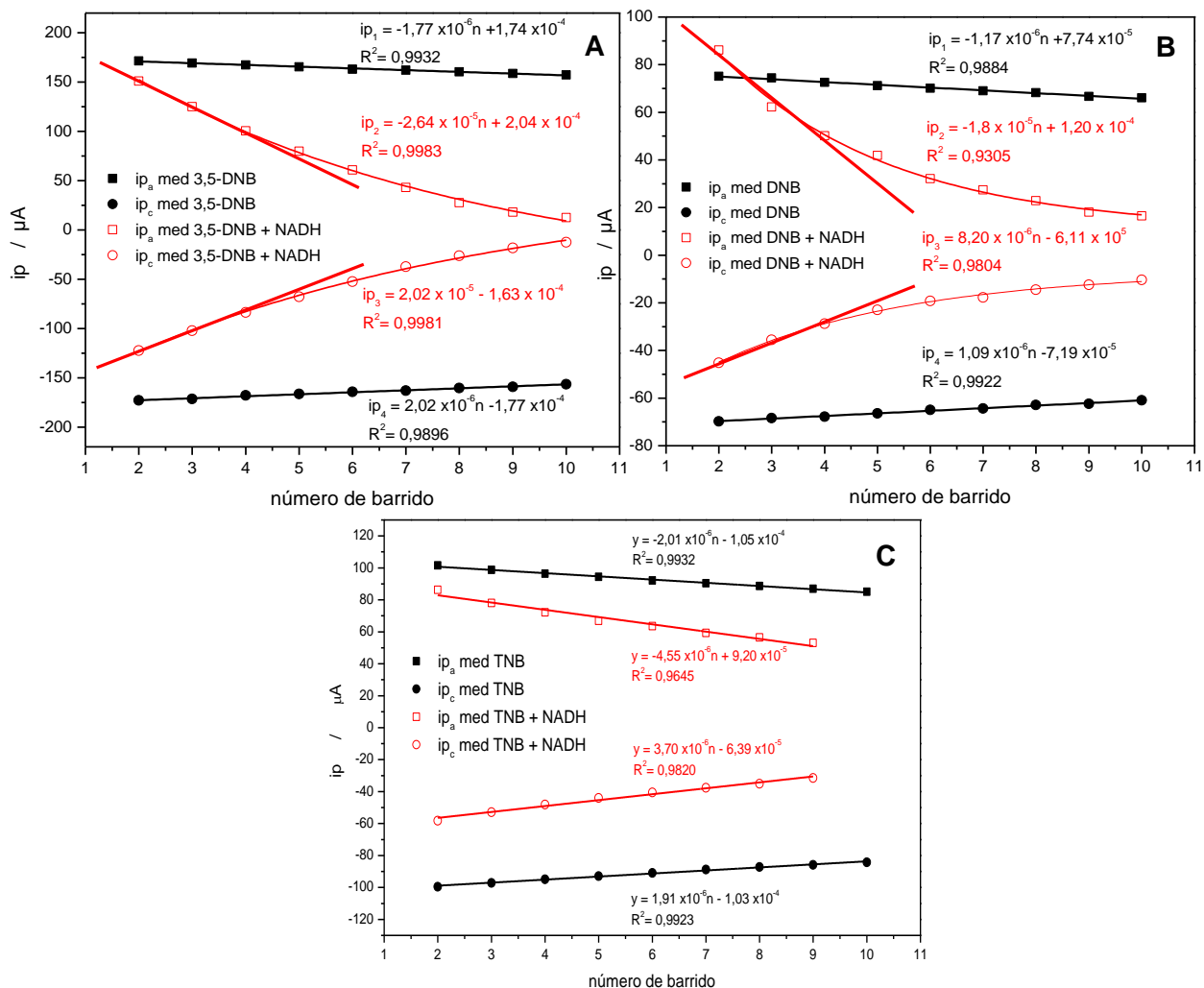


**Figura 41.** Voltamogramas cíclicos para electrodos GC-NTC modificado con **A.** **A'** 3,5-DNB 2 mM **B.** **B'** DNB y **C.** **C'** TNB 2 mM. **A.** **B.** y **C.** Medido en celda con buffer B-R 0,1 M pH 7. **A.** **B.** y **C.** Medido en celda con NADH 3 mM buffer B-R pH 7.  $v = 100$  mV/s con 20 barridos consecutivos. Las flechas indican la disminución de las señales de mediador redox.

En la figura 41. A. B. C. para todos los nitrocompuestos estudiados, se observa una leve disminución de las corrientes de pico (reducción y oxidación) del par redox con los barridos consecutivos medidos en buffer B-R pH 7, por lo que los mediadores son estables en el electrodo en ausencia de NADH. En la figura 41. A'. B'. y C'. se observa actividad electrocatalítica del mediador redox sobre el NADH solo en el primer barrido de oxidación para los tres nitrocompuestos. En los barridos posteriores se observa una considerable disminución en las corrientes de pico del mediador con el número de barridos aplicados.

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

En los gráficos de la figura 42, se observa la dependencia de la corriente de pico (anódica y catódica) en presencia y ausencia de NADH con el número de barridos.



**Figura 42.** Variación de las corrientes anódicas y catódicas de los voltamogramas de la figura 41. En rojo las corrientes de pico de oxidación (□) y reducción (○) del mediador en presencia de NADH. En negro las corrientes de pico de oxidación (■) y reducción (●) del mediador en ausencia de NADH. No se muestra el correspondiente a la electrocatálisis. **A.** 3,5-DNB 2 mM **B.** DNB 2 mM y **C.** TNB 2mM

En la figura 42 se observa que para los electrodos GC-NTC modificados con los mediadores redox en buffer B-R pH 7, el decaimiento de las señales del par redox tiene un comportamiento lineal para todos los nitrocompuestos. La ecuación que caracteriza este comportamiento es la siguiente:

$$ip = m \cdot n + ip_0 \quad (10)$$

Donde, n es el número de barridos,  $ip_0$  es el intercepto y m es la pendiente de la recta. La pendiente indica la tasa de disminución lineal del par redox, para los electrodos GC-NTC-Med

medidos solo en buffer B-R. Los valores de las pendientes lineales obtenidas para este experimento se resumen en la tabla IV.

El decaimiento de las señales de los electrodos GC-NTC-TNB medidos en NADH también tienen un comportamiento lineal, que se puede expresar con la ecuación anterior (Fig. 42. C). Sin embargo, para el DNB y el 3,5-DNB las señales del par redox en presencia de NADH tienen un decaimiento exponencial caracterizado por la siguiente ecuación:

$$ip = ip_e + ip_0 e^{-\frac{n}{t}}$$

Donde,  $ip_e$  es la corriente de equilibrio (cuando  $n$  tiende a infinito),  $ip_0$  es la corriente inicial,  $n$  el número de barridos, y  $1/t$  la constante de decaimiento de la corriente.

Para poder comparar ambos comportamientos (decaimiento lineal y exponencial), se tomaron los primeros tres puntos de cada curva exponencial y se realizó un ajuste lineal, obteniendo tasas de decaimiento instantáneas (pendientes de la recta) para los compuestos 3,5-DNB y DNB en presencia de NADH.

En la tabla VI se resumen las pendientes obtenidas para electrodos GC-NTC modificados con los nitrocompuestos, medidos en NADH en buffer B-R pH7.

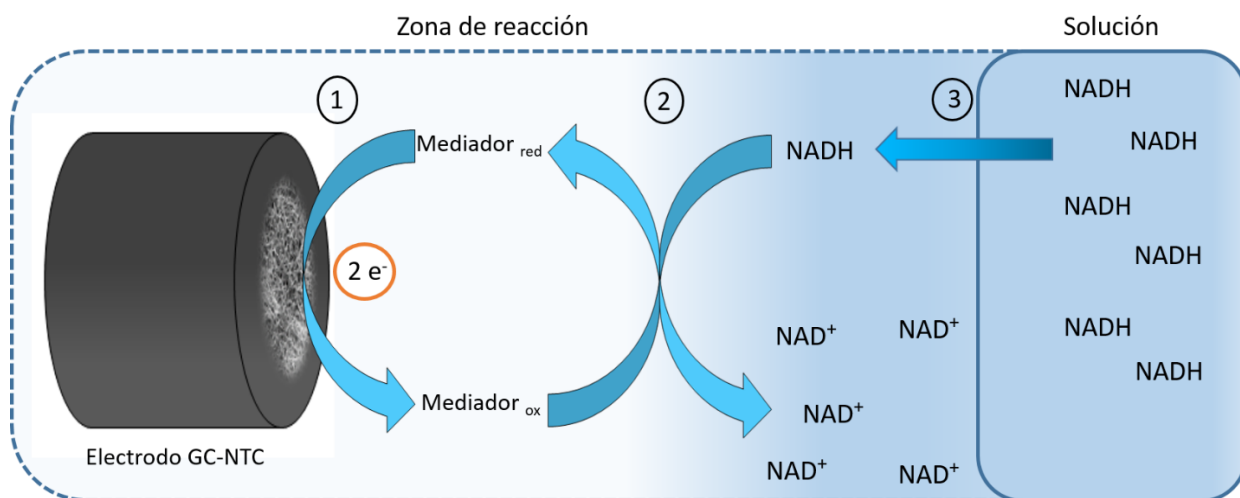
**Tabla VI.** Resultados de las tasas de disminución de los nitrocompuestos en buffer B-R en presencia y ausencia de NADH.

	Buffer B-R pH 7		NADH en B-R pH 7	
	Pendientes de la recta (m) [ $\mu A/n$ ]		Pendiente de la recta [ $\mu A/n$ ]	
	Barrido anódico	Barrido catódico	Barrido anódico	Barrido catódico
<b>DNB</b>	$-1,17 \times 10^{-6}$	$1,09 \times 10^{-6}$	$-2,64 \times 10^{-5}$	$2,02 \times 10^{-5}$
<b>3,5-DNB</b>	$-1,77 \times 10^{-6}$	$2,02 \times 10^{-6}$	$-1,80 \times 10^{-5}$	$8,20 \times 10^{-6}$
<b>TNB</b>	$-2,01 \times 10^{-6}$	$1,91 \times 10^{-6}$	$-4,55 \times 10^{-6}$	$3,70 \times 10^{-6}$

De la tabla VI, se observa que, para todos los nitrocompuestos, los valores de las pendientes en presencia de NADH son mayores que los valores obtenidos en ausencia de NADH. Esto indica una mayor tasa de decaimiento instantánea por cada barrido de potencial en presencia de NADH. Las menores tasas de disminución del nitrocompuesto en presencia de

NADH las presenta el TNB, el único compuesto con tres grupos nitro en su estructura, con dos grupos nitro sin reducir que pueden interactuar con la nano-estructura quedando mayormente retenido.

Muchos autores describen el proceso electrocatalítico en un electrodo modificado de la forma mostrada en el esquema de la figura 43<sup>32a</sup>.



**Figura 43.** Ilustración gráfica del proceso de electrocatalisis. **1.** Oxidación del mediador redox encapsulado en los electrodos GC-NTC. **2.** Reducción del mediador redox y Oxidación del NADH. **3.** Interfase solución/ zona de reacción. Proceso sin agitación.

En la etapa 1, el mediador se oxida según:



Al mismo tiempo ocurre la etapa 2, en la cual el NADH se oxida según la ecuación:

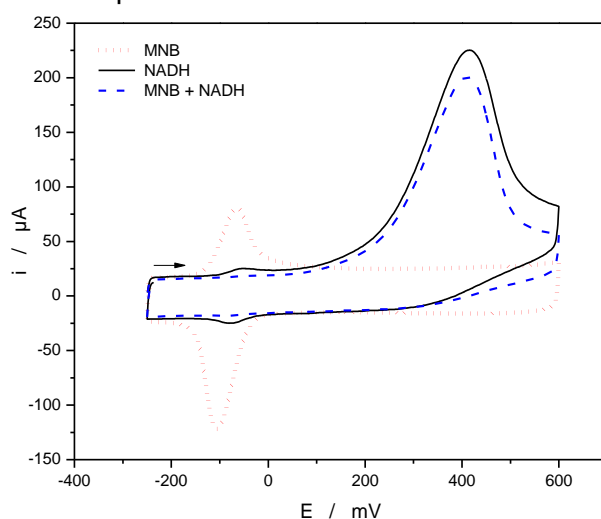


Finalmente, en la etapa 3 se propone una acumulación de NAD<sup>+</sup> en la zona de reacción.

Por lo tanto, se propone que la disminución de las señales del mediador redox se debe al bloqueo de los sitios disponibles en los NTCs por las moléculas de NAD<sup>+</sup>, las cuales son adsorbidas y son generadas por la oxidación de NADH, desplazando al mediador de los NTCs e impidiendo el acceso del NADH a los sitios activos.

#### 4.15. Electrocatálisis de electrodos modificados con NTC y diferentes nitrocompuestos sobre NADH.

Con el objetivo de determinar la capacidad electrocatalítica del nitrobeneno o monitrobenceno (MNB), un nitrocompuesto con una estructura similar a los nitrocompuestos estudiados, pero con un solo grupo nitro en su estructura. Se realizaron pruebas de electrocatálisis siguiendo la metodología descrita en el punto 3.4.5 “Estudio de electrocatálisis”. En la figura 44 se muestra la respuesta electroquímica para un electrodo GC-NTC modificado con MNB 10 mM en buffer B-R pH 7.

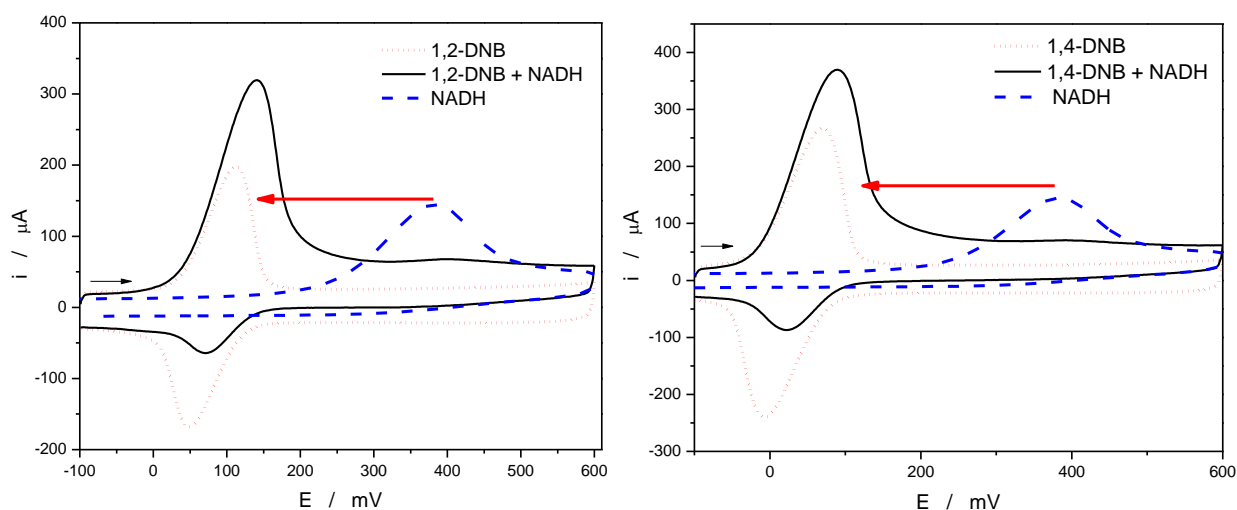


**Figura 44.** Prueba de electrocatálisis sobre NADH 3 mM en buffer B-R pH 7 de electrodos GC-NTC modificados con MNB 10 mM. En línea continua electrodo GC-NTC-MNB en NADH. En línea discontinua electrodos GC-NTC en NADH en buffer B-R pH 7. En línea de puntos, electrodos GC-NTC-MNB en buffer B-R pH 7.

En la figura 44, en línea de puntos se observan las señales de oxidación y reducción del par redox para electrodos GC-NTC-MNB medidos en buffer B-R, centradas a un potencial de -66 y -106 mV, respectivamente. En línea discontinua, se observa una señal intensa centrada en 400 mV correspondiente a la oxidación del NADH. Para los electrodos GC-NTC-MNB en NADH (línea continua Fig. 44), se observan las señales del par redox con una baja intensidad de corriente y una señal intensa centrada en 400 mV, correspondiente al NADH no electrocatalizado. Por lo tanto, el MNB no tiene actividad electrocatalítica sobre el NADH, al no desplazar el potencial de oxidación del NADH. Con este experimento es posible concluir que para que un

nitrocompuesto pueda tener actividad electrocatalítica, la molécula debe contar con al menos dos grupos nitro en el anillo aromático.

Además, con el objetivo de investigar si la posición de los grupos nitro en el anillo bencénico influye en la actividad electrocatalítica sobre el NADH, se estudiaron dos nitrocompuestos dinitrados como mediadores redox, el 1,2-dinitrobenceno (1,2-DNB) y el 1,4-dinitrobenceno (1,4-DNB). El estudio se realizó según la metodología descrita en el punto 3.4.5 “Estudio de electrocatálisis”. En la Figura 45 se muestran los voltamogramas cíclicos de electrodos GC-NTC modificados con 1,2-DNB y 1,4-DNB.



**Figura 45.** Prueba de electrocatálisis sobre NADH 3 mM en B-R 0,1 M pH 7 de electrodos GC-NTC modificados con **A.** 1,2-DNB 5,47 mM **B.** 1,4-DNB 4,97 mM. En línea continua, electrodo GC-NTC-Med en NADH. En línea de puntos, electrodos GC-NTC-Med en buffer B-R pH 7. En línea discontinua, electrodos GC-NTC en NADH 3 mM en buffer B-R pH 7.

En la figura 45 se observa que al realizar la prueba de electrocatálisis con electrodos GC-NTC-Med medido en NADH (en línea continua), en ambos compuestos se obtuvo actividad electrocatalítica, debido al aumento de la corriente de pico en el potencial de oxidación del mediador redox (hidroxilamina/nitroso) y la ausencia de la señal característica del NADH en electrodos sin nitrocompuestos, con  $E_p = 400$  mV. Por lo tanto, se puede afirmar que ambos compuestos tienen actividad electrocatalítica sobre el NADH y que la posición de los grupos nitro en el anillo aromático no influye en la actividad electrocatalítica.



## 5. CONCLUSIONES

- Los electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos y compuestos polinitrados, tienen ventajas en la respuesta electroquímica de los mediadores en comparación con los electrodos sin modificar; se obtienen mayores intensidades de corriente, mayor definición de las señales de los derivados hidroxilamina/nitroso y un desplazamiento electrocatalítico de las señales.
- El ácido 3,5-dinitrobenzoico, el 1,3-dinitrobenzono y el 1,3,5-trinitrobenzono tienen actividad electrocatalítica sobre el NADH.
- De los tres mediadores evaluados, el que requiere una menor concentración para electrocatalizar la misma cantidad de NADH es 1,3,5-trinitrobenzono.
- El mediador que presenta una mayor estabilidad en electrodo en presencia de NADH es el TNB, que en su estructura presenta un grupo nitro adicional que los otros mediadores, favoreciendo la encapsulación del mediador en la nano estructura del electrodo.
- Existe un proceso de intercambio entre el NADH y el mediador encapsulado en la nano estructura formada por los nanotubos de carbono, en el cual el NADH compite por los sitios disponibles desplazando al mediador del electrodo.
- La relación entre la corriente del mediador y la corriente electrocatalítica es alrededor de 1:1 para el 1,3,5-trinitrobenzono.
- Moléculas con un solo grupo nitro, como el nitrobenzono, no presentan actividad electrocatalítica, por lo que se necesitan al menos dos grupos nitro en la molécula para electrocatalizar NADH.
- El 1,2-dinitrobenzono y el 1,4-dinitrobenzono presentan actividad electrocatalítica, por lo que la posición de los grupos nitro en el anillo aromático no influye en la electrocatalisis del NADH.

## 6. REFERENCIAS

1. Sobczak, A.; Rębiś, T.; Milczarek, G. Electrocatalysis of NADH oxidation using electrochemically activated fluphenazine on carbon nanotube electrode. *Bioelectrochemistry* **2015**, *106*, 308-315.
2. Berzelius, J. Ueber die Destillationsproducte der Traubensäure. *Annalen der Physik* **1835**, *112* (9), 1-29.
3. McNaught, A. D.; McNaught, A. D. *Compendium of chemical terminology*. Blackwell Science Oxford: 1997; Vol. 1669.
4. Vante, N. Electroquímica y electrocatálisis. Materiales: aspectos fundamentales y aplicaciones. Vol. Ia. *E-libro. net* **2002**, 317-318.
5. Arvia, A. J.; Bolzán, A. E.; Pasquale, M. Á. Electrocatalysis: A Survey of Fundamental Concepts. *Catalysis in Electrochemistry: From Fundamentals to Strategies for Fuel Cell Development* **2011**, 17-65.
6. Kobosev, N.; Monblanowa, W. Über den Mechanismus der Elektrodifusion des Wasserstoffs durch Palladium. *Acta Physicochim. URSS* **1934**, *1*, 611.
7. Grubb, W. Catalysis, electrocatalysis, and hydrocarbon fuel cells. **1963**.
8. Chan, K.-Y.; Ding, J.; Ren, J.; Cheng, S.; Tsang, K. Y. Supported mixed metal nanoparticles as electrocatalysts in low temperature fuel cells. *Journal of Materials Chemistry* **2004**, *14* (4), 505-516.
9. Dubau, L.; Coutanceau, C.; Garnier, E.; Leger, J.; Lamy, C. Electrooxidation of methanol at platinum–ruthenium catalysts prepared from colloidal precursors: Atomic composition and temperature effects. *Journal of Applied Electrochemistry* **2003**, *33* (5), 419-429.
10. Kowal, A.; Li, M.; Shao, M.; Sasaki, K.; Vukmirovic, M.; Zhang, J.; Marinkovic, N.; Liu, P.; Frenkel, A.; Adzic, R. Ternary Pt/Rh/SnO<sub>2</sub> electrocatalysts for oxidizing ethanol to CO<sub>2</sub>. *Nature materials* **2009**, *8* (4), 325-330.
11. Ferro, S.; De Battisti, A. Electrocatalysis and chlorine evolution reaction at ruthenium dioxide deposited on conductive diamond. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106* (9), 2249-2254.
12. El-Deab, M. S.; Ohsaka, T. An extraordinary electrocatalytic reduction of oxygen on gold nanoparticles-electrodeposited gold electrodes. *Electrochemistry Communications* **2002**, *4* (4), 288-292.
13. Pandey, R. K.; Lakshminarayanan, V. Electro-oxidation of formic acid, methanol, and ethanol on electrodeposited Pd-polyaniline nanofiber films in acidic and alkaline medium. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (52), 21596-21603.
14. Belgsir, E. M. Electrocatalysis in Organic Synthesis. *ChemInform* **1999**, *30* (22).
15. Sundaram, S.; Kumar, A. S.; Jagannathan, M.; Kadir, M. R. A. In situ stabilization of hydroxylamine via electrochemical immobilization of 4-nitrophenol on GCE/MWCNT electrodes: NADH electrocatalysis at zero potential. *Analytical Methods* **2014**, *6* (22), 8894-8900.
16. Nyoni, S.; Mugadza, T.; Nyokong, T. Improved l-cysteine electrocatalysis through a sequential drop dry technique using multi-walled carbon nanotubes and cobalt tetraaminophthalocyanine conjugates. *Electrochimica Acta* **2014**, *128*, 32-40.
17. Sehlotho, N.; Nyokong, T.; Zagal, J. H.; Bedioui, F. Electrocatalysis of oxidation of 2-mercaptoethanol, l-cysteine and reduced glutathione by adsorbed and electrodeposited cobalt tetra phenoxypyrrole and tetra ethoxythiophene substituted phthalocyanines. *Electrochimica Acta* **2006**, *51* (24), 5125-5130.
18. Moses, P.; Wier, L.; Murray, R. Chemically modified tin oxide electrode. *Analytical Chemistry* **1975**, *47* (12), 1882-1886.
19. Murray, R. W.; Ewing, A. G.; Durst, R. A. Chemically modified electrodes molecular design for electroanalysis. *Analytical Chemistry* **1987**, *59* (5), 379A-390<sup>a</sup>.

20. Langmuir, I. Surface Chemistry. *Chemical Reviews* **1933**, 13 (2), 147-191.
21. Murray, R. W. Chemically modified electrodes. *Accounts of Chemical Research* **1980**, 13 (5), 135-141.
22. Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters* **1982**, 49 (1), 57.
23. Rao, C. N. R.; Satishkumar, B.; Govindaraj, A.; Nath, M. Nanotubes. *ChemPhysChem* **2001**, 2 (2), 78-105.
24. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *nature* **1991**, 354 (6348), 56-58.
25. Moscoso, R.; Carbajo, J.; Squella, J. 1, 3-Dioxolane: A green solvent for the preparation of carbon nanotube-modified electrodes. *Electrochemistry Communications* **2014**, 48, 69-72.
26. Banks, C. E.; Compton, R. G. New electrodes for old: from carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite. *Analyst* **2006**, 131 (1), 15-21
27. Ciofani, G.; Genchi, G. G.; Liakos, I.; Athanassiou, A.; Dinucci, D.; Chiellini, F.; Mattoli, V. A simple approach to covalent functionalization of boron nitride nanotubes. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, 374 (1), 308-314
28. Shahrokhian, S.; Zare-Mehrjardi, H. R. Cobalt salophen-modified carbon-paste electrode incorporating a cationic surfactant for simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid and dopamine. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, 121 (2), 530-537
29. Spitalsky, Z.; Tasis, D.; Papagelis, K.; Galiotis, C. Carbon nanotube–polymer composites: chemistry, processing, mechanical and electrical properties. *Progress in polymer science* **2010**, 35 (3), 357-401
30. Pingarrón, J. M.; Yáñez-Sedeño, P.; González-Cortés, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta* **2008**, 53 (19), 5848-5866.
31. Maehashi, K.; Matsumoto, K.; Takamura, Y.; Tamiya, E. Electrochemical Biological Sensors Based on Directly Synthesized Carbon Nanotube Electrodes. In *Frontiers of Graphene and Carbon Nanotubes*, Springer: **2015**; pp 179-186.
32. Radoi, A.; Compagnone, D. Recent advances in NADH electrochemical sensing design. *Bioelectrochemistry* **2009**, 76 (1–2), 126-134
33. Deore, B. A.; Freund, M. S. Reactivity of Poly(anilineboronic acid) with NAD<sup>+</sup> and NADH. *Chemistry of Materials* **2005**, 17 (11), 2918-2923.
34. Kitani, A.; Miller, L. L. Fast oxidants for NADH and electrochemical discrimination between ascorbic acid and NADH. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, 103 (12), 3595-3597.
35. Ge, B.; Tan, Y.; Xie, Q.; Ma, M.; Yao, S. Preparation of chitosan–dopamine-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite for electrocatalytic oxidation and sensitive electroanalysis of NADH. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, 137 (2), 547-554.
36. 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.
37. Lawrence, N. S.; Wang, J. Chemical adsorption of phenothiazine dyes onto carbon nanotubes: Toward the low potential detection of NADH. *Electrochemistry communications* **2006**, 8 (1), 71-76.
38. Mano, N.; Kuhn, A. Immobilized nitro-fluorenone derivatives as electrocatalysts for NADH oxidation. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, 477 (1), 79-88.
39. Moscoso, R.; Carbajo, J.; Mozo, J.; Squella, J. Voltammetric behavior of 3, 5-dinitrobenzoic acid in solution on GCE and encapsulated on multiwalled carbon nanotube modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2015**.
40. Laviron, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1979**, 101 (1), 19-28.
41. Fischer, A. *Electrode dynamics*. Oxford Univ. Press: 1996.

42. Gosser, D. *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*; VCH: New York, 1993; p 43.