



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica
Centro de investigación de procesos redox CiPRex

**“DETERMINACIÓN Y ELECTROCATÁLISIS DE NADH POR MEDIADORES
DEL TIPO NITROCOMPUESTOS ENCAPSULADOS EN NANOTUBOS DE
CARBONO”**

Memoria para optar al título profesional de Químico

Proyecto Fondecyt N° 1170054

GABRIELA ANDREA CONTRERAS CONTRERAS

Profesor Patrocinante

Dr. Arturo Squella Serrano

Directores de memoria

Dr. Arturo Squella Serrano

Dr. Raúl Moscoso Cabello

Santiago, Chile

2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, profesores y amigos que me han acompañado en mi proceso universitario con su apoyo incondicional.

También quiero agradecer al proyecto Fondecyt 1170054 por el financiamiento de esta memoria y al profesor Dr. Arturo Squella y al Dr. Raúl Moscoso por permitirme terminar mi proceso universitario en su unidad de investigación y por la excelente guía que me han entregado.

RESUMEN

Desde hace unas décadas, los nanomateriales han captado la atención de los investigadores alrededor del mundo, debido a sus diversas propiedades y aplicaciones. La mayoría de los nanomateriales utilizados están basados en las diferentes formas alotrópicas de carbono, ya que son de bajo costo, ligeros y buenos conductores de calor y electricidad. Desde un punto de vista electroquímico, el carbono es relativamente inerte, además de poseer un amplio rango de potencial de trabajo y actividad electrocatalítica, lo que lo hace un material óptimo para aplicaciones tanto analíticas como industriales.

Uno de los materiales más interesantes basados en carbono son los nanotubos de carbono ya que debido a sus propiedades electroquímicas, permiten la encapsulación de diversas moléculas por fisisorción. Dependiendo del compuesto encapsulado, es posible obtener electrocatálisis de una amplia gama de moléculas, entre ellas moléculas de interés biológico como la coenzima NADH, cuyo principal interés radica en reacciones biológicas de sustratos para enzimas que modifican proteínas añadiendo o eliminando grupos químicos.

La electrocatálisis consiste en una reacción electroquímica que favorece energéticamente una reacción en específico, reduciendo sobrepotenciales e incrementando la magnitud de las señales voltamétricas, lo que permite bajos límites de detección.

Las moléculas estudiadas actúan como mediadores electrocatalíticos y poseen dos grupos nitro que modificadas electroquímicamente son capaces de interactuar en el

proceso de electro oxidación de NADH. En esta memoria se estudiaron mediante voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial los mediadores 3,5-dinitrobenzoato de 4-fenilbutilo y (E)-6-nitro-3-(3-(4nitrofenil)acriloil-2H-cromen-2-ona, los cuales se encuentran inmovilizados sobre un electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono. Esta inmovilización se lleva a cabo mediante una novedosa y sencilla técnica de encapsulación, en la cual los electrodos modificados con nanotubos son sumergidos en una solución de los compuestos estudiados, los cuales son insolubles en agua, permitiendo así realizar electrocatálisis en medios acuosos.

SUMMARY

Due to their diverse properties and applications, nanomaterials have been captivating the attention of research all around the world for the last few decades. Most of the nanomaterials used today are based on the different allotropic forms of carbon, due to its low cost, lightweight and, good heat and electric conductivity. Looking at the carbon from an electrochemical view, this element is relatively inert and it has a wide range of electrocatalytic activity and working potential, which makes it an optime material for analytical and industrial applications.

One of the most interesting materials out of carbon are the carbon nanotubes, since its electrochemical properties allow the capture of many molecules by physio-addition. Depending of the encapsulated compound, it's possible to apply electrocatalysis to a wide variety of molecules, such as molecules with a biological interest like NADH coenzyme, which is able to participate in biological reactions that can modify proteins, adding or eliminating chemical groups (functional groups).

The electrocatalysis technique can be defined as an electrochemical reaction that favours energetically a specific reaction through the reduction of overpotentials and increments in the magnitude of voltammetric signals, allowing lower detection limits.

The studied molecules act as electrocatalytic mediators and have two nitro-groups that, after electrochemical modifications, are capable of interacting with the oxidation of NADH. In this thesis, the objective molecules were 4-phenylbutyl-3,5-

dinitrobenzoate and (E)-6-nitro-3-(3-(4-nitrophenyl)acryloyl-2H-cromen-2-one) through cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. These mediators were immobilized on vitreous carbon electrodes, modified with carbon nanotubes. This process was achieved through a novel and simple technique of encapsulation, where the modified electrodes are submerged in a solution of the objective molecules, which are insoluble in water, allowing an electrocatalysis in aqueous medium.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
SUMMARY.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS DE LA MEMORIA.....	7
2.1. Objetivo general.....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. HIPÓTESIS.....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1 Reactivos y solventes.....	9
4.1 Equipos.....	9
4.3 Métodos.....	10
4.3.1 Preparación de soluciones.....	10
4.4 Métodos experimentales de trabajo.....	12
4.4.1 Dispersión de nanotubos de carbono.....	12
4.4.2. Modificación de la superficie de electrodos de carbono vítreo con nanotubos de carbono multipared (MWCNT).....	13
4.4.3. Modificación de electrodos GC con MWCNT y nitrocompuestos.....	14
4.4.4 Electrocatálisis.....	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	17
5.1. Caracterización electroquímica de los nitrocompuestos estudiados en electrodos GC-MWCNT.....	17
5.2. Tiempo óptimo de dipping de los electrodos GC-MWCNT en las soluciones de nitrocompuestos.....	24
5.3. Estabilidad de las soluciones de los nitrocompuestos en el tiempo.....	26
5.4. Estudios bajo diferentes condiciones de pH para los electrodos GC-MWCNT-Med.....	28
5.4.1. Caracterización electroquímica mediante voltametría cíclica de los precursores a pH ácido, básico y neutro.....	28
5.4.2. Dependencia del potencial de reducción con el pH.....	30
5.5. Influencia de la velocidad de barrido para los electrodos GC-MWCNT-Med.....	35
5.6. Estabilidad de los mediadores encapsulados en los electrodos modificados.....	41
5.7. Caracterización de NADH en electrodos CG-MWCNT.....	44
5.8. Electrocatálisis de NADH sobre electrodos GC-MWCNT-Med.....	48
5.9. Determinación del tiempo de interacción óptimo del electrodo GC-MWCNT-Med con NADH.....	53
5.10. Variación del pH en el experimento de electrocatálisis.....	59
5.11. Rango de pH de electrocatálisis.....	63
5.12. Variación de concentración NADH/Med.....	65
5.12.1. Concentración mínima de 3,5-DNBF.....	66
5.12.2. Concentración mínima de NADH para ser electrocatalizado por CM4.....	69
5.13. Curva de calibración.....	72
6. CONCLUSIONES.....	79
7. REFERENCIAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

1. **B-R**: Buffer Britton Robinson.
2. **CM4**: (E)-6-nitro-3-(3-(4nitrofenil)acriloil-2H-cromen-2-(ona).
3. **CM4(I)**: (E)-6-nitro-3-(3-(4nitrofenil)acriloil-2H-cromen-2-(ona) con un grupo nitro reducido.
4. **CM4(II)**: (E)-6-nitro-3-(3-(4nitrofenil)acriloil-2H-cromen-2-(ona) con dos grupos nitro reducidos.
5. **3,5-DNBF**: 3,5-dinitrobenzoato de 4-fenilbutilo.
6. **3,5-DNBF(I)**: 3,5-dinitrobenzoato de 4-fenilbutilo con un grupo nitro reducido
7. **Ep**: Potencial de pico.
8. **GC**: Electrodo de carbono vítreo (*Glassy carbon electrode*).
9. **GC-MWNTC**: Electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono multipared.
10. **GC-MWNTC-Med**: Electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono multipared y con mediador encapsulado.
11. **ip_a**: Corriente de pico anódica.
12. **ip_c**: Corriente de pico catódica.
13. **i_{ecat}**: Corriente de pico electrocatalítica.
14. **%i_{ecat}**: Porcentaje de corriente de pico electrocatalítica.
15. **k_h**: Constante de transferencia electrónica heterogénea.
16. **Med**: Mediador.
17. **NADH**: Nicotinamida adenina dinucleótido.
18. **NAD⁺**: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado.

19. **MWNTC**: Nanotubos de carbono multipared.

20. **VC**: Voltametría cíclica.

21. **VPD**: Voltametría de pulso diferencial.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A. Nanotubo de carbono de pared simple B. Nanotubo de carbono de pared múltiple...	2
Figura 2. Nicotinamida adenina dinucleótido, NADH.....	5
Figura 3. Modificación de un electrodo de carbono vítreo con nanotubos de carbono.....	13
Figura 4. Modificación de un electrodo GC-MWNTC con nitrocompuesto por <i>dipping</i> . A. Inmersión del electrodo GC-MWCNT en la solución de acetonitrilo con nitrocompuesto. B. Lavado con agua nanopura C. Inmersión del electrodo GC-MWCNT en una celda con buffer BR 0.1M.....	14
Figura 5. Pasos para llevar a cabo electrocatálisis con el mediador en estudio. A. Inmersión del electrodo GC-MWCNT una solución del nitrocompuesto preparado en acetonitrilo. B. Electrodo GC-MWCNT-Med, donde Med= 3,5-DNBF o CM4, en una celda con buffer BR 0.1 M. C. Reducción selectiva del grupo -NO ₂ mediante un barrido de potencial. D. Electrodo GC-MWCNT-Med en una celda que contiene NADH. E. Respuesta electroquímica de NADH frente al mediador mediante un barrido de potencial.....	16
Figura 6. Nitrocompuestos utilizados A. 3,5-dinitrobenzoato de 4-fenilbutilo (3,5-DNBF). B. (E)-6-nitro-3-(3-(4-nitrofenil) acrilol)-2H-cromen-2-(ona) (CM4).....	17
Figura 7. Voltamogramas cíclicos de los compuestos estudiados en buffer B-R 0.1M pH 7 sobre un electrodo GC-MWCNT con precursor A. 3,5-DNBF B. CM4.....	18
Figura 8. Superposición de dos voltamogramas cíclicos en buffer B-R 0.1M pH 7 sobre GC-MWCNT para el precursor 3,5-DNBF. Línea continua corresponde a un potencial de corte de -410mV y línea punteada a un potencial de corte de -700mV.....	20
Figura 9. Superposición de dos voltamogramas cíclicos en buffer B-R 0.1M pH 7 sobre GC-MWCNT para el precursor CM4. Línea continua corresponde a un potencial de corte de -410mV y línea punteada a un potencial de corte de -600mV.....	21
Figura 10. Intensidad de corriente de pico con respecto al tiempo de inmersión del electrodo GC-MWCNT para A. una solución 0.3mM de 3,5-DNBF en acetonitrilo (pH=7.00, E ₀ = -0.1V, E _F = -0.45V) B. una solución 0.048mM de CM4 en acetonitrilo (pH=7.00, E ₀ = -0.1V, E _F = -0.45V).....	25
Figura 11. Variación de la corriente de pico I y II respecto al tiempo para un electrodo con precursor encapsulado A. GC-MWCNT-35DNBF (pH=7.00 E ₀ = -0.1V, E _F = -0.6V) B. GC-MWCNT-CM4 (pH=7.00 E ₀ = -0.1V, E _F = -0.6V).....	27
Figura 12. Voltametría cíclica a distintos pH en buffer B-R para los precursores A. 3,5-DNBF B. CM4.....	29
Figura 13. A. Voltametría diferencial de pulso en buffer B-R a diferentes pH para un electrodo con precursor GC-MWCNT-35DNBF B. Regresión lineal para los potenciales de pico de reducción para el precursor 3,5-DNBF.....	31
Figura 14. A. Voltametría diferencial de pulso en buffer B-R a diferentes pH para un electrodo con precursor GC-MWCNT-CM4 B. Regresión lineal para los potenciales de pico de reducción para el precursor CM4.....	33
Figura 15. A. Voltamograma cíclico a distintas velocidades de barrido para un electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) (<i>dipping</i> en 0.3mM de 3,5-DNBF en CH ₃ CN, pH =7.00, E ₀ = -0.36 V, E _H = +0.50V, E _L = -0.36V) B. Variación del potencial de pico anódico y catódico en función del logaritmo de la velocidad de barrido para un electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I).....	36

Figura 16. A. Voltamograma cíclico a distintas velocidades de barrido para un electrodo GC-MWCNT-CM4(I) (<i>dipping</i> en 0.048mM de CM4 en CH ₃ CN, pH =7.00, E ₀ = -0.35 V, E _H = +0.28V, E _L = -0.35V) B. Variación del potencial de pico anódico y catódico en función del logaritmo de la velocidad de barrido para un electrodo GC-MWCNT-CM4(I).....	36
Figura 17. A. Voltamograma cíclico a distintas velocidades de barrido para un electrodo GC-MWCNT-CM4(II) (<i>dipping</i> en 0.048mM de CM4 en CH ₃ CN, pH =7.00, E ₀ = -0.35 V, E _H = +0.28V, E _L = -0.35V) B. Variación del potencial de pico anódico y catódico en función del logaritmo de la velocidad de barrido para un electrodo GC-MWCNT-CM4(II).....	37
Figura 18. A. Voltamograma cíclico para la variación de la intensidad de corriente con respecto al tiempo para un electrodo GC-MWCNT-3,5DNBF(I) B. Relación entre el tiempo y la corriente de oxidación y reducción para un electrodo GC-MWCNT-35DNBF.....	42
Figura 19. A. Voltamograma cíclico para la variación de la intensidad de corriente con respecto al tiempo para un electrodo GC-MWCNT-CM4(I) B. Relación entre el tiempo y la corriente de oxidación y reducción para un electrodo GC-MWCNT-CM4(I).....	42
Figura 20. A. Voltamograma cíclico para la variación de la intensidad de corriente con respecto al tiempo un electrodo GC-MWCNT-CM4(II) B. Relación entre el tiempo y la corriente de oxidación y reducción para un electrodo GC-MWCNT-CM4(II).....	42
Figura 21. Caracterización mediante voltametría cíclica de NADH en buffer B-R (pH=7.00, E ₀ = 0.0 V, E _H = +0.6V, E _L = -0.2V).....	45
Figura 22. Voltamogramas cíclicos de la electrocatálisis de NADH sobre A. Un electrodo GC-MWCNT con mediador 3,5-DNBF(I) encapsulado B. Un electrodo GC-MWCNT con mediador CM4(II) encapsulado. (Buffer B-R, pH 7.00 E ₀ = -0.2V, E _i = -0.2V E _n =+0.6V).....	47
Figura 23. Obtención gráfica de i _{NHOH/NO} y i _{NHOH/NO + NADH} . A. Línea negra corresponde al mediador en ausencia de NADH y B. Línea roja corresponde a la electrocatálisis de NADH en presencia del mediador.....	50
Figura 24. Superposición de voltamogramas cíclicos de NADH sin mediador (línea punteada roja) con NADH electrocatalizado sobre un electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) (línea sólida negra) (Buffer B-R, pH 7.00 E ₀ = -0.2V, E _i = -0.2V E _n =+0.6V).....	51
Figura 25. Esquema de electrocatálisis de NADH A. Oxidación del mediador. B. Reducción del mediador y oxidación de NADH. C. Interfase seno de la solución/zona de reacción.....	52
Figura 26. A. Superposición de voltamogramas cíclicos de mediador sin NADH (línea punteada azul), NADH sin mediador (línea punteada negra) con NADH electrocatalizado sobre un electrodo GC-MWCNT-Med	55
Figura 27. A. Voltamogramas cíclicos de la electrocatálisis de NADH a diferentes tiempos de interacción del electrodo GC-MWCNT con mediador CM4(I) encapsulado B. %i _{ecat} con respecto al tiempo de interacción del electrodo GC-MWCNT-CM4(I) con NADH 3mM (E ₀ = -0.2 V, E _H = +0.6V, E _L = -0.2V).....	56
Figura 28. A. Voltamogramas cíclicos de la electrocatálisis de NADH a diferentes tiempos de interacción del electrodo GC-MWCNT con mediador CM4(II) encapsulado B. %i _{ecat} con respecto	

al tiempo de interacción del electrodo GC-MWCNT-CM4(II) con NADH 3mM ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).....	57
Figura 29. Voltamogramas cíclicos obtenidos a diferentes pH para la electrocatálisis realizada con un electrodo GC-MWCNT con mediador encapsulado 3,5DNBF(I) sobre NADH 3mM en buffer B-R 0.1M ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).....	60
Figura 30. Voltamogramas cíclicos obtenidos a diferentes pH para la electrocatálisis realizada con un electrodo GC-MWCNT con mediador encapsulado CM4(I) sobre NADH 3mM en buffer B-R 0.1M ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).....	61
Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtenidos a diferentes pH para la electrocatálisis realizada con un electrodo GC-MWCNT con mediador encapsulado CM4(II) sobre NADH 3mM en buffer B-R 0.1M ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).....	62
Figura 32. Gráficos % $_{i_{ecat}}$ vs pH para la electrocatálisis de NADH 3mM preparado en buffer B-R con un electrodo GC-MWCNT con mediador encapsulado donde A. 3,5-DNBF(I). B. CM4(I). C. CM4(II). ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).....	64
Figura 33. Voltamogramas cíclicos obtenidos para un electrodo GC-MWCN-3,5-DNBF(I), modificado con soluciones de diferentes concentraciones de precursor 3,5-DNBF sobre NADH 3mM en buffer B-R pH 7.00 ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).....	67
Figura 34. Voltamograma cíclico obtenido para la electrocatálisis realizada con un electrodo con mediador GC-MWCNT-35DNBF(I), modificado con una solución 0.3mM de 3,5-DNBF en acetonitrilo sobre NADH 0.75mM en buffer B-R pH=7.00 ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).....	68
Figura 35. Voltamogramas cíclicos obtenidos para un electrodo con mediador GC-MWCN-CM4(I), modificado sobre NADH a diferentes concentraciones en buffer B-R pH 7.00 ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).....	70
Figura 36. Voltamogramas cíclicos obtenidos para un electrodo con mediador GC-MWCN-CM4(II), modificado sobre NADH a diferentes concentraciones en buffer B-R pH 7.00 ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).....	71
Figura 37. Curvas de calibración obtenidas a diferentes concentraciones de NADH preparado en buffer B-R para los mediadores encapsulados en un electrodo GC-MWCNT con mediador encapsulado A. 3,5-DNBF(I) B. CM4(II).....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Potenciales de reducción para los precursores 3,5-DNBF y CM4 en buffer B-R pH 7.00.....	19
Tabla II. Potenciales oxido reducción del par redox para los precursores 3,5-DNBF y CM4 en buffer B-R pH 7.00.....	22
Tabla III. Valores de carga y corriente para la señal I y III para CM4.....	23
Tabla IV. Variables obtenidas mediante ajustes lineales para los precursores 3,5-DNBF y CM4.....	35
Tabla V. Resultados de la pendiente de las regresiones lineales y α catódicas y α anódicas.....	39
Tabla VI. Resultados obtenidos mediante el método de Laviron para el cálculo de v y k_h a 25°C.....	40
Tabla VII. Tasas de disminución de corriente y tiempos permanencia para los electrodos GC-MWCNT con mediador encapsulado, sumergidos en buffer B-R 0.1M pH 7.00.....	44
Tabla VIII. Tiempo de interacción óptimo del electrodo GC-MWCNT-Med en una solución de NADH 3mM pH 7.00 en buffer B-R y $\%i_{ecat}$ obtenido a ese tiempo de interacción.....	59
Tabla IX. pH adecuado para electrocatálisis para los mediadores 3,5-DNBF, CM4(I) y CM4(II).....	65
Tabla X. Técnica, potenciales de electrocatálisis y límites de detección para diferentes electrodos.....	76
Tabla XI. Valores analíticos obtenidos para electrodos GC-MWCNT-Med, donde Med 3,5-DNBF(I) o CM4(II).....	78

1.INTRODUCCIÓN

Los materiales basados en carbono se han utilizado en diversas aplicaciones electroquímicas debido a su versatilidad con respecto a otros elementos de la tabla periódica¹. Desde el estudio de Sir Humphry Davy de los electrodos basados en carbono para la producción de metales alcalinos^{2,3}, se ha abierto a una amplia área de aplicación como la química analítica o la producción industrial, ya que desde un punto de vista electroquímico, poseen un amplio rango de potencial y baja reactividad electroquímica entre otras propiedades⁴.

Uno de los materiales más interesantes para su aplicación electroquímica son las nanoestructuras basadas en carbono, ya que muestran interesantes resultados electroquímicos en comparación a los materiales tradicionales⁵. Existen variadas formas de nanomateriales basados en carbono dependiendo del tipo de hibridación y de la disposición atómica, entre ellos se puede mencionar a grafeno, fulerenos, y nanotubos de carbono de pared simple (Figura 1 A) o múltiple (Figura 1 B). Estos últimos están conformados por varios tubos concéntricos con un eje en común⁶, los cuales se encuentran inmersos uno dentro de otro.

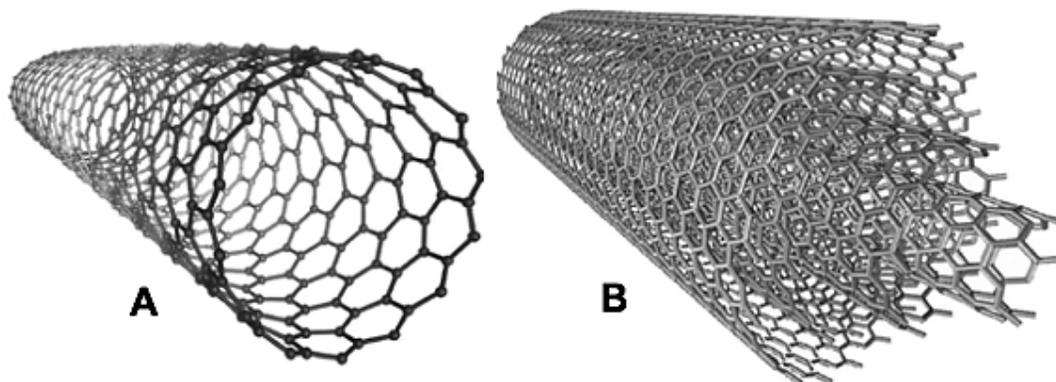


Figura 1. A. Nanotubo de carbono de pared simple **B.** Nanotubo de carbono de pared múltiple.

Los nanotubos de carbono poseen una novedosa actividad catalítica, la cual se complementa con sus propiedades electrónicas únicas como su gran superficie de trabajo, una rápida cinética electrónica, inercia química, alta sensibilidad, selectividad y bajos límites de detección^{5, 7, 8, 9}, los cuales los convierte en sensores electroquímicos¹⁰ y soportes electrocatalíticos⁸.

El término electrocatálisis es utilizado para designar un proceso redox que involucra una interacción química específica en la superficie del electrodo, la cual reduce sobrepotenciales en la transferencia electrónica^{4, 11} y acelera la reacción electrónica por una sustancia que generalmente no es consumida¹². El proceso de transferencia electrónico en la electrocatálisis puede considerarse de dos maneras:

- Un fenómeno de transferencia heterogénea debido a las diferencias entre la fase sólida y la fase líquida, lo que formaría una interfase electrificada¹³.

- Un fenómeno de transferencia homogénea de un proceso electroquímico que sucede en la interfase^{13,14}.

La relación de la electrocatálisis con la superficie del electrodo depende en gran medida del material del electrodo, ya que este actúa como soporte electrocatalítico, por lo que determina el rendimiento y la eficacia de la reacción¹⁵. Debido a que la superficie del electrodo es fundamental en una reacción electrocatalítica, muchas veces es necesario modificarla para obtener las propiedades adecuadas para realizar un proceso electrolítico.

Un electrodo modificado es aquel que, mediante la incorporación de algún compuesto en específico, promueve una reacción de transferencia de carga y aumenta la reactividad del electrodo frente a una especie electroactiva¹⁶. Los electrodos modificados a base de carbono como por ejemplo los electrodos de grafito, fibra de carbono, carbono vítreo entre otros, son usualmente utilizados como electrodos de trabajo para la detección de moléculas de interés biológico^{17, 18}. Debido a ello, la modificación de estos electrodos de trabajo genera sensores electroquímicos con propiedades interesantes, ya que mejoran su actividad de varias maneras¹⁹:

- La modificación de la superficie limita a los interferentes químicos, lo que se ve reflejado en un aumento de la selectividad de la molécula de interés.

- Una mejor sensibilidad producto de la gran área superficial del material modificante.

Estas propiedades convierten a los electrodos modificados en sensores de interés analítico.

Los nanotubos de carbono pueden ser utilizados para modificar un electrodo de carbono vítreo²⁰, ya que cumplen con todas las características anteriormente señaladas. Se ha comprobado que los nanotubos de carbono tienen la particularidad de encapsular compuestos en la red tridimensional mediante fisioadsorción²¹, propiedad que puede utilizarse para funcionalizar la superficie del electrodo modificado con moléculas que pueden actuar como potenciales mediadores a través de enlaces covalentes²², o interacciones no covalentes como fuerzas de Van der Waals²³, entre otras. Estos mediadores pueden actuar como sensores electroquímicos para especies de interés biológico como por ejemplo serotonina¹⁹, peróxido de hidrógeno²⁴, triptófano²⁵, NADH^{10, 26}, entre otras.

NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido, Figura 2), es una coenzima indispensable para las reacciones redox en las células, utilizada mayormente en la respiración celular, por lo que es una especie importante en el transporte de cargas a nivel biológico. Su forma oxidada NAD⁺ es un excelente aceptor de especies reducidas que son producidas por diferentes procesos oxidativos²⁷ de sustratos celulares provenientes de, por ejemplo, la glicólisis²⁸ y como cofactor de enzimas

deshidrogenasas^{27, 31}. Por otro lado, su forma reducida NADH puede ser re-oxidada mediante reacciones catalíticas producidas por enzimas como la NADH deshidrogenasa en la cadena de transporte electrónico²⁷. Debido a su gran influencia en sistemas biológicos, NADH es monitoreado en diferentes procesos industriales, ambientales y médicos mediante biosensores²⁹. En el caso de los biosensores electroquímicos, la oxidación de NADH ocurre a potenciales mayores a +0.5V en electrodos no modificados, lo cual resulta problemático debido a que la superficie del electrodo se ve saturada de mezclas de productos de oxidación, incluyendo productos de acoplamiento radicalario³⁰.

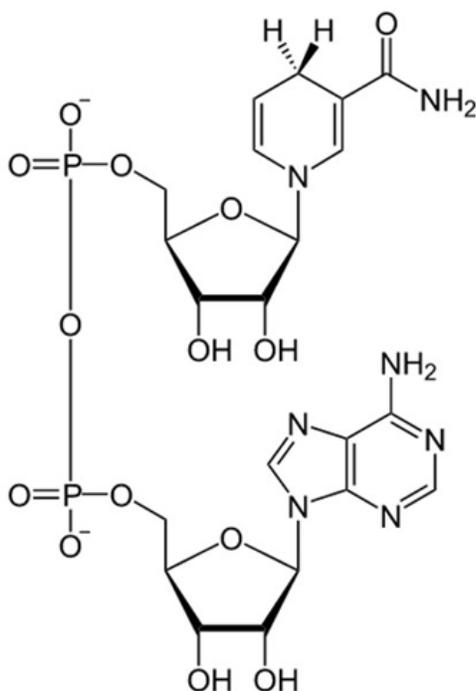


Figura2. Nicotinamida adenina dinucleótido, NADH.

Varios investigadores han utilizado electrodos modificados con nanotubos de carbono con compuestos inmovilizados en la red tridimensional, ya que permiten

una rápida transferencia electrónica, reduciendo el sobrepotencial de oxidación de NADH^{10,31, 32}. En trabajos anteriores, se ha demostrado que nitrocompuestos aromáticos pueden ser encapsulados en nanotubos de carbono y estos muestran actividad electrocatalítica sobre NADH^{20, 33}. En esta memoria, se estudiaron dos potenciales mediadores electrocatalíticos para la reacción de oxidación de NADH, los cuales están inmovilizados en la red tridimensional de electrodos modificados con nanotubos de carbono. La inmovilización de los mediadores nitro se consigue sumergiendo el electrodo modificado con MWCNT en una solución del nitrocompuesto en medio no acuoso. Posteriormente el mediador nitro se activa electroquímicamente para generar el par redox nitroso-hidroxilamina, el cual en definitiva actúa como mediador redox.

2. OBJETIVOS DE LA MEMORIA

2.1 Objetivo general:

Obtener electrodos modificados mediante encapsulamiento de nitrocompuestos que son potenciales precursores de mediadores electrocatalíticos de NADH en electrodos de carbono vítreo con nanotubos de carbono, para estudiar diferentes condiciones experimentales de electrocatálisis.

2.2 Objetivos específicos:

- Modificar electrodos de carbono vítreo y nanotubos de carbono con nitrocompuestos.
- Obtener la caracterización electroquímica de los nitrocompuestos mediante voltametría cíclica y voltametría diferencial de pulso.
- Obtener la caracterización electroquímica de NADH en presencia de electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono con nitrocompuestos encapsulados.
- Determinar electroquímicamente el comportamiento electrocatalítico de los mediadores 3,5-dinitrobenzoato de 4-fenibutilo (3,5-DNBF) y (E)-6-nitro-3-(3-(4nitrofenil)acrilolil-2H-cromen-2(ona) (CM4).
- Obtener una curva de calibración para la variación de la concentración de NADH para los mediadores 3,5-DNBF y CM4.

3. HIPÓTESIS

Los electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbonos pueden encapsular nitrocompuestos, los cuales son potenciales precursores de mediadores electrocatalíticos de oxidación de NADH, el cual podrá ser cuantificado mediante un estudio electroquímico.

4.MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos y solventes.

Se utilizaron los siguientes reactivos sin previa purificación:

- Ácido bórico (99%) p.a, Aldrich.
- Ácido acético glacial p.a, Merck.
- Ácido clorhídrico (36%) p.a, Merck.
- Ácido fosfórico (85%) p.a, Merck.
- Agua desionizada nano pura (18.2 MΩ cm).
- Etanol absoluto (99,8%) p.a, Merck.
- Hidróxido de sodio 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.
- (E)-6-nitro-3-(3-(4-nitrofenil)acrilolil-2H-cromen-2-(ona) (CM4).
- 3,5-dinitrobenzoato de 4-fenilbutilo (3,5-DNBF).

4.2. Equipos.

A) Equipos de uso general.

- Agitador magnético HeidolphReax 2000.

- Balanza de precisión Precisa 40SM-200^a (sensibilidad 0.01 mg).
- Medidor de pH WTW modelo pMx 3000.
- Medidor de pH OAKTON pH 700.
- Sistema purificador de agua Milli-Q *Ultra- Pure Water System*.
- Sonicador Branson Branson 2510.

B) Sistema voltamétrico y computacional.

- Equipo potenciostato BAS CV-50W y BAS CV-100W.
- Equipo potenciostato CHInstrument 760c y 760e.
- Celda electroquímica:
 - Celda electroquímica: BAS (10 mL).
 - Electrodo de trabajo: 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: Platino.

4.3. Métodos

4.3.1. Preparación de soluciones.

- **Preparación de solución tampón.**
- Buffer Britton Robinson 0.1 M: En un matraz de 1L que contiene una pequeña cantidad de agua nanopura, se añaden 6.18 g de ácido bórico, 5.71 mL de ácido

acético glacial y 6.75 mL de ácido fosfórico, para luego llevar a baño de ultrasonido hasta la disolución del ácido bórico. Se afora con agua nanopura y se ajusta el pH con ácido clorhídrico concentrado e hidróxido de sodio concentrado.

- **Preparación de soluciones stock de nitrocompuestos.**

CM4: Se preparan 50 mL de solución de concentración 0.048 mM en acetonitrilo. La solución se lleva a baño de ultrasonido por 15 minutos hasta la disolución del compuesto. La solución se almacena refrigerada hasta el momento de su uso.

3,5-DNBF: Se preparan 5 mL de solución de concentración 0.3mM en acetonitrilo. Se lleva a baño de ultrasonido hasta la disolución del compuesto y se almacena refrigerada hasta su uso.

- **Preparación de solución stock 3mM de NADH.**

Se prepara una solución de 5mL 3mM de NADH en buffer Britton – Robinson 0.1M pH 7.00. La solución debe ser preparada para cada día de experimentación y previamente purgada con N₂ extrapuro antes de cada medición.

- **Soluciones de trabajo.**

- Celda Electroquímica: Dependiendo del experimento, la celda se prepara de dos maneras:

- 1) Se colocan 5 mL de solución tampón Britton-Robinson 0.1M con pH ajustado según los requerimientos del experimento.
- 2) Se colocan 5 mL de NADH de concentración y pH variable según el experimento, preparada a partir de la solución stock.

4.4. Métodos experimentales de trabajo.

4.4.1. Dispersión de nanotubos de carbono.

En un Eppendorf se coloca una cantidad determinada de nanotubos de carbono multipared y se añade como agente dispersante 1,3-dioxolano, para obtener una concentración final de dispersión de 3 mg/mL. Posteriormente la dispersión se lleva a un baño de ultrasonido por 5 minutos en triplicado. Tras cada baño de ultrasonido, la dispersión debe ser agitada con el objetivo de favorecer la desaglomeración de nanotubos. La dispersión de NTC se guarda refrigerada y al momento del uso, se lleva a baño de ultrasonido nuevamente por 5 minutos.

4.4.2. Modificación de la superficie de electrodos de carbono vítreo con nanotubos de carbono multipared (MWCNT).

En todos los experimentos se utilizan electrodos de carbono vítreo, los cuales son lavados con etanol para posteriormente ser pulidos con alúmina de 0.3 y 0.5 μm y lavados con abundante agua nanopura. Una vez que la superficie del electrodo se encuentra seca, se modifican utilizando la dispersión de nanotubos de carbono en 1,3-dioxolano 3 mg/mL. Para ello se agrega una alícuota de 5 μL desde la dispersión y se deposita en la superficie vítrea del electrodo. Los electrodos son secados al aire durante aproximadamente 2 minutos, hasta la evaporación completa del 1,3-dioxolano (Figura 3).

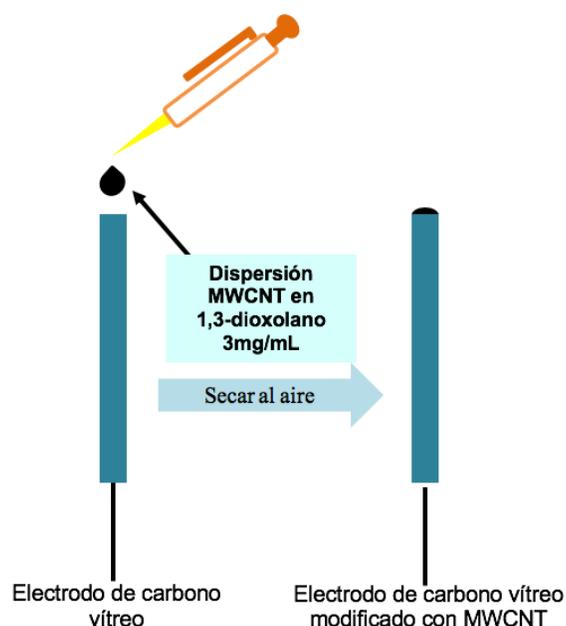


Figura 3. Modificación de un electrodo de carbono vítreo con nanotubos de carbono.

4.4.3. Modificación de electrodos GC con MWCNT y nitrocompuestos.

Preparados los electrodos GC-MWCNT completamente secos, se sumergen en una solución de concentración conocida del nitrocompuesto a estudiar preparado en acetonitrilo (Figura 4, paso A). Se cuentan 10 segundos desde que la superficie modificada entra en contacto con la solución, en seguida, el electrodo es lavado con abundante agua nanopura (Figura 4 paso B) y se sumerge en la celda electroquímica, la cual contiene buffer BR 0.1M sin nitrocompuesto (Figura 4 paso C)

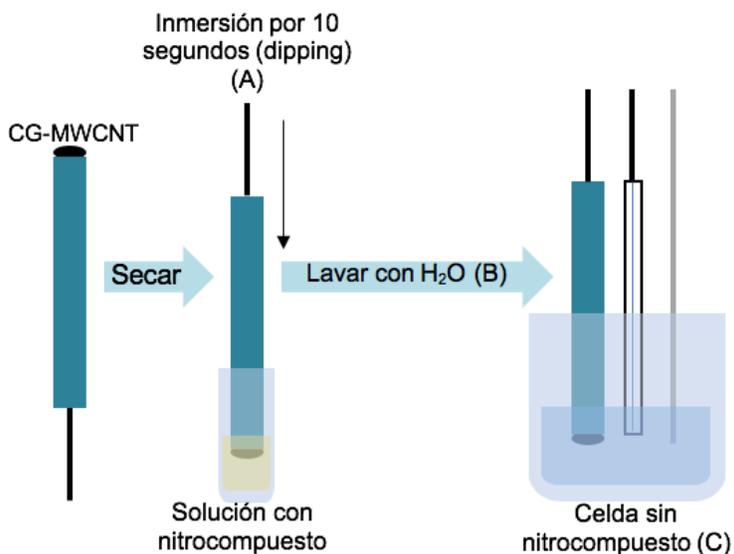


Figura 4. Modificación de un electrodo GC-MWNTC con nitrocompuesto por *dipping*. **A.** Inmersión del electrodo GC-MWCNT en la solución de acetonitrilo con nitrocompuesto. **B.** Lavado con agua nanopura **C.** Inmersión del electrodo GC-MWCNT en una celda con buffer BR 0.1M.

4.4.4. Electrocatálisis.

Una vez modificados los electrodos GC-MWCNT siguiendo los pasos de la sección 3.4.3 (Figura 4), se utiliza el nitrocompuesto encapsulado en la red tridimensional de nanotubos como precursor del mediador electrocatalítico para la oxidación de NADH.

Obtenido el electrodo GC-MWCNT-Med (Figura 5, paso A), donde Med es el derivado hidroxilamínico de 3,5-DNBF o CM4, el electrodo se sumerge en una celda que contiene buffer Britton Robinson 0.1M (Figura 5 paso B) y se somete a un barrido de potencial para reducir selectivamente los grupos nitro presentes en la molécula. Se puede obtener selectivamente uno o dos pares redox NHOH/NO (Figura 5 paso C). Posteriormente, el electrodo se sumerge en una celda que contiene NADH a una concentración y pH específico (Figura 5 paso D), en donde se aplica otro barrido de potencial para obtener la respuesta electroquímica de NADH en presencia del mediador (Figura 5 paso E).

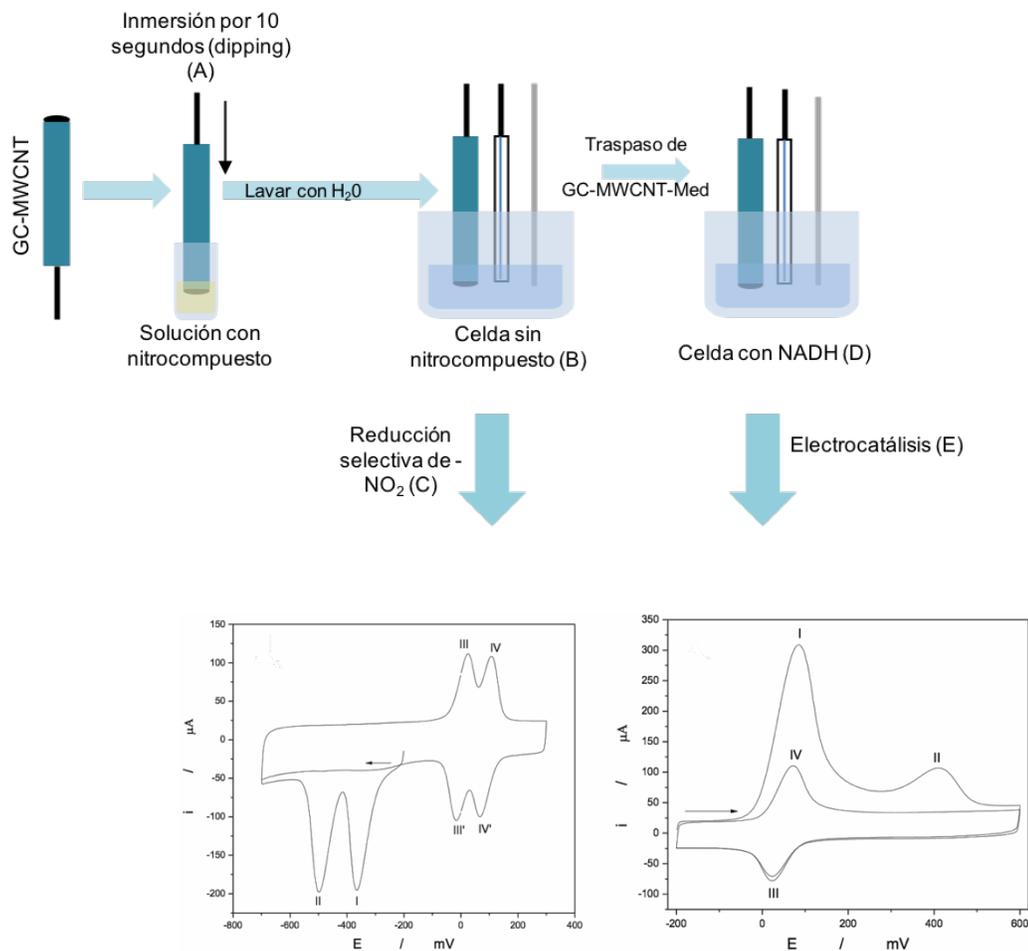


Figura 5. Pasos para llevar a cabo electrocatálisis con el mediador en estudio. **A.** Inmersión del electrodo GC-MWCNT una solución del nitrocompuesto preparado en acetonitrilo. **B.** Electrodo GC-MWCNT-Med, donde Med= 3,5-DNBF o CM4, en una celda con buffer BR 0.1 M. **C.** Reducción selectiva del grupo $-NO_2$ mediante un barrido de potencial. **D.** Electrodo GC-MWCNT-Med en una celda que contiene NADH. **E.** Respuesta electroquímica de NADH frente al mediador mediante un barrido de potencial.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización electroquímica de los nitrocompuestos estudiados en electrodos GC-MWCNT.

Los dos nitro compuestos estudiados en este trabajo corresponden a 3,5-dinitrobenzoato de 4-fenilbutilo (3,5-DNBF, figura 6 A) y (E)-6-nitro-3-(3-(4-nitrofenil)acrilóil)-2H-cromen-2-ona (CM4, figura 6 B), los cuales son encapsulados mediante *dipping* en la red tridimensional de nanotubos de carbonos inmovilizados en la superficie del electrodo GC tal como indica en el punto 3.4.3.

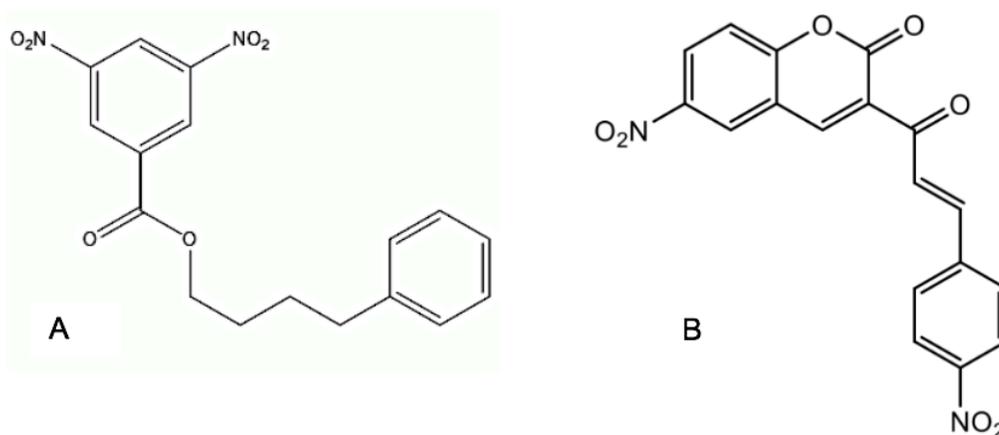


Figura 6. Nitrocompuestos utilizados **A.** 3,5-dinitrobenzoato de 4-fenilbutilo (3,5-DNBF). **B.**(E)-6-nitro-3-(3-(4-nitrofenil)acrilóil)-2H-cromen-2-(ona) (CM4).

Ambos compuestos poseen anillos aromáticos sustituidos con grupos nitro. Para el compuesto 3,5-DNBF se puede observar un sustituyente del tipo apolar para el éster en posición meta al anillo nitro sustituido, mientras que para el compuesto CM4 del tipo cumarina, se observan dos grupos nitro asociados a una red de resonancia en

toda la molécula. La forma estructural de los compuestos estudiados indica baja solubilidad en solventes polares debido a su comportamiento apolar. Los carbonos de hibridación sp^2 presentes en ambas moléculas facilitan el encapsulamiento en la red tridimensional de nanotubos de carbono debido a sus similitudes estructurales y las interacciones del tipo van der Waals e interacciones del tipo $\pi - \pi$ de los anillos aromáticos con los anillos presentes en la red de nanotubos³⁴.

Mediante voltametría cíclica (VC), se estudió el comportamiento electroquímico de las moléculas de la figura 6 mediante la reducción de los grupos nitro presente en sus estructuras. Para ello, se utilizaron electrodos GC-MWCNT y se modificaron mediante *dipping* en soluciones 0.3 mM de 3,5-DNBF y 0.048mM de CM4, ambos nitrocompuestos disueltos en acetonitrilo y posteriormente colocados en una celda sin nitrocompuesto con buffer B-R a pH 7.00. En la Figura 7 se muestra los voltamogramas cíclicos obtenidos para ambos compuestos.

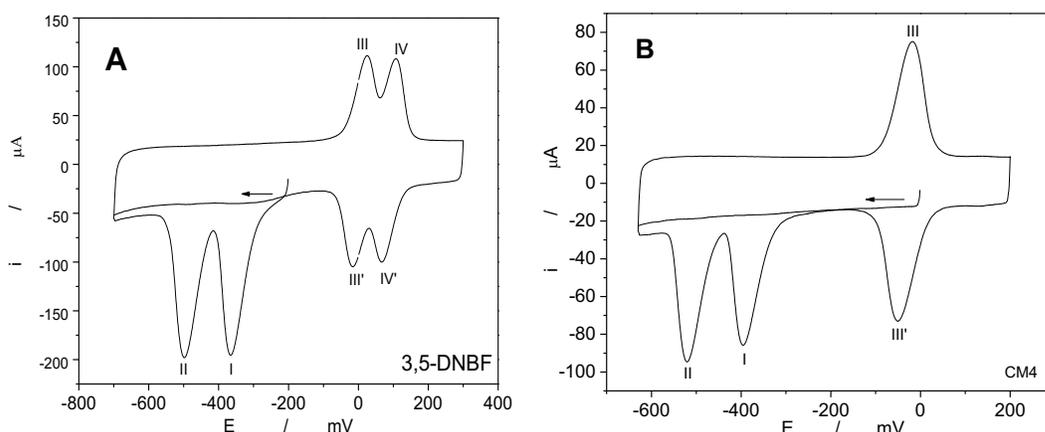


Figura 7. Voltamogramas cíclicos de los compuestos estudiados en buffer B-R 0.1M pH 7 sobre un electrodo GC-MWCNT con precursor **A.** 3,5-DNBF **B.** CM4.

Para ambos compuestos se observan dos señales irreversibles de reducción I y II que corresponden a la respuesta electroquímica de los grupos nitro presentes. En la tabla I se muestran los potenciales de reducción para ambas moléculas.

Tabla I. Potenciales de reducción para los precursores 3,5-DNBF y CM4 en buffer B-R pH 7.00.

Señal	3,5-DNBF / V	CM4 / V
I	-0.367	-0.395
II	-0.501	-0.520

La reducción de los grupos nitro presentes en 3,5-DNBF genera un doble derivado hidroxilamina (señales I y II de la Fig. 7 A), los cuales forman dos pares redox reversibles III/III' y IV/IV' (Figura 7 A). Los pares redox se encuentran parcialmente acoplados, por lo que se acotó la ventana de potencial para identificar qué pico anódico genera el correspondiente par redox (Figura 8)

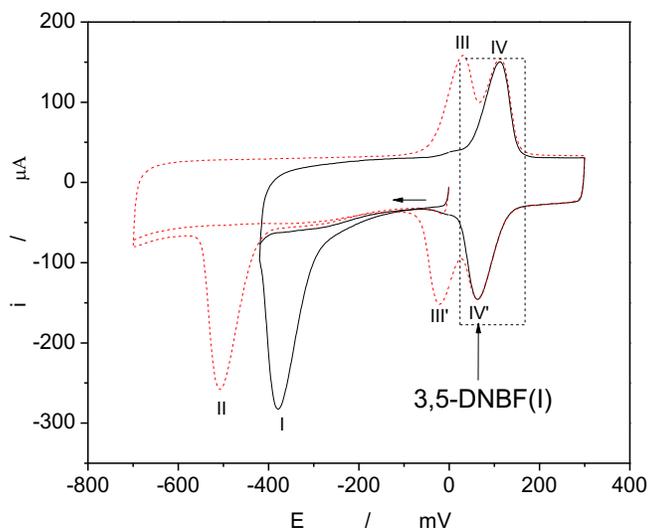


Figura 8. Superposición de dos voltamogramas cíclicos en buffer B-R 0.1M pH 7 sobre GC-MWCNT para el precursor 3,5-DNBF. Línea continua corresponde a un potencial de corte de -410mV y línea punteada a un potencial de corte de -700mV.

Se observa que la señal I a -367mV genera el par redox IV/IV' (3,5-DNBF(I)) a $+0.108/+0.068\text{ V}$, el cual se encuentra más desplazado hacia los valores positivos.

En la Figura 7B se observa que para CM4 el par redox III/III' (CM4(II)) corresponden a una señal de área similar a las señales de reducción I y II. Esto es debido a que la oxidación de ambas hidroxilaminas generadas en el proceso de reducción ocurre al mismo potencial, por lo que la intensidad de corriente de pico del par redox es similar en magnitud a la de la reducción de los grupos nitro. Este fenómeno podría deberse al entorno resonante de la molécula, la cual posee simetría electrónica con respecto a los grupos nitro, por lo que los intermediarios son iguales y la energía necesaria para oxidar los grupos hidroxilamina es la misma ^{35, 36}.

En la figura 9 se observa la superposición de dos voltamogramas cíclicos para demostrar la proporcionalidad de las áreas discutido anteriormente.

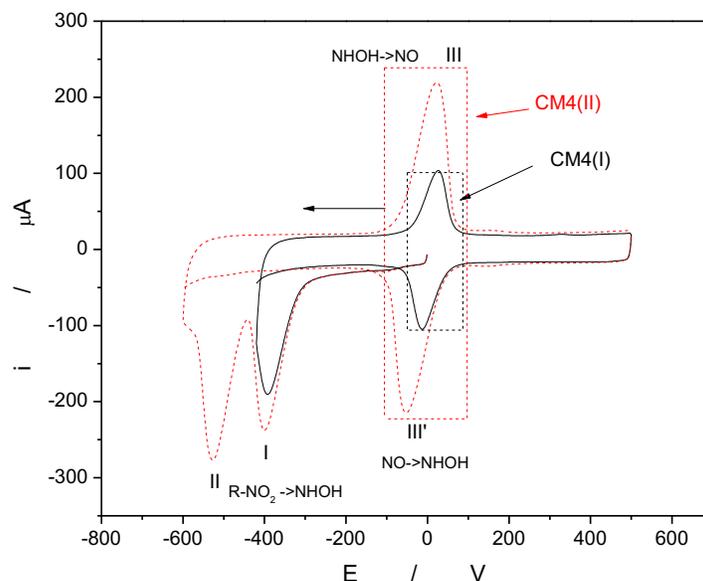


Figura 9. Superposición de dos voltamogramas cíclicos en buffer B-R 0.1M pH 7 sobre GC-MWCNT para el precursor CM4. Línea continua corresponde a CM4(I) con un grupo nitro reducido con un potencial de corte de -410mV y línea punteada corresponde a CM4(II) con dos grupos nitros reducidos con un potencial de corte de -600mV.

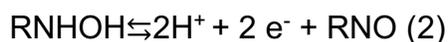
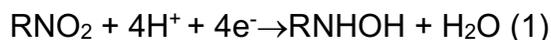
Se puede observar en la figura 9 que la generación de la señal I origina un par redox de aproximadamente la mitad del valor de la intensidad de corriente de pico del par redox III/III' (CM4(I)) por lo que el doble derivado hidroxilamina actúa como una molécula simétrica y el potencial de oxidación resulta ser el mismo.

En la tabla II se muestran los potenciales de reducción y oxidación de los pares redox de ambas moléculas.

Tabla II. Potenciales oxido reducción del par redox para los precursores 3,5-DNBF y CM4 en buffer B-R pH 7.00.

Señal	3,5-DNBF / V	CM4 / V
III	+0.031	-0.022
III'	-0.017	-0.053
IV	+0.112	--
IV'	+0.061	--

La reacción de reducción del grupo nitro al derivado hidroxilamina de las moléculas involucra el traspaso de 4 electrones³⁷ (ecuación 1) , y el proceso del par redox es vía 2 electrones (ecuación 2), por lo que la intensidad de la corriente de la señal del par redox es la mitad de la intensidad de la corriente de la señal generada por los grupos nitro de la molécula (Señales I y II Figura 7 A y B), por lo tanto, el área bajo la curva tiene una relación directa con el intercambio de electrones como muestra las siguientes ecuaciones:



Si se compara el área bajo la curva con velocidad de barrido 100mV/s, se puede obtener la carga para el mediador CM4(I). La carga de la señal I para CM4(I) es de 0.0120 C mientras que para la señal III es de 0.0056 C. El área de la señal I es 2.1 veces mayor que la de III, lo que comprueba lo anteriormente dicho, ya que concuerda con la razón de los electrones visto en la ecuación 1 y 2.

Con respecto a la corriente, la corriente de pico para la señal I de CM4(I) es de 194.7 μA y la corriente de pico III para el mismo mediador es de 101.2 μA . La corriente de pico de la señal I es 1.9 veces mayor que la de la señal III.

Para el mediador CM4(II), el área bajo la curva para las señales I y II es de 0.0339 C y para la señal III es de 0.0168 C. La corriente de pico para la señal I de CM4(II) es de 235.5 μA , para la señal II es de 276.0 μA y para la señal III es de 221.5 μA . Al comparar las corrientes de pico I y III (Figura 9, línea segmentada), se obtiene una relación aproximada de 1:1, debido a que la señal III está compuesta en este caso, por el aporte de corriente de oxidación de dos hidroxilaminas generadas en el barrido de reducción y no de un par redox NHOH/NO.

En la tabla III se muestran los valores obtenidos.

Tabla III: Valores de carga y corriente para la señal I y III para CM4.

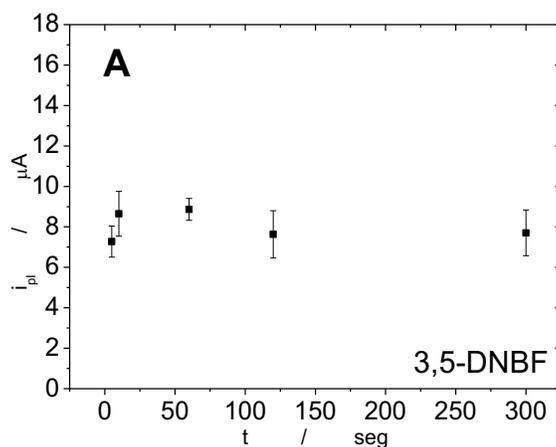
	CM4(I)			CM4(II)			
	Señal I	Señal III	Razón señal I/III	Señal I	Señal II	Señal III	Razón señal I/III
Carga / C	0.0120	0.0056	2.1	0.0339		0.0168	2
Corriente / μA	194.7	101.2	1.9	235.5	276.0	221.5	1.2

Según los datos de la tabla, se puede utilizar el área de las señales voltamétricas o el valor de la corriente de pico.

Los electrodos modificados con nanotubos de carbono presentan un coeficiente de variación de aproximadamente el 10%, esto implica que se deben realizar continuamente mediciones al menos por triplicado. Debido a esta característica de los electrodos, es más practico medir directamente la corriente de pico que el área bajo la curva de cada uno de los voltamogramas obtenidos. En esta tesis, el resto de los resultados serán expresados en función de la corriente, sin desconocer que la carga cumple también con las condiciones necesarias.

5.2. Tiempo óptimo de *dipping* de los electrodos GC-MWCNT en las soluciones de nitrocompuestos.

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de *dipping*, se sumerge en triplicado electrodos GC-MWCNT durante 5s, 10s, 120s y 300s, en soluciones 0.3mM de 3,5-DNBF y 0.048mM de CM4 en acetonitrilo. Mediante VDP se reduce el grupo nitro I para 3.5-DNBF y CM4, obteniéndose los gráficos de la figura 10. El electrodo se descarta una vez realizada la voltametría.



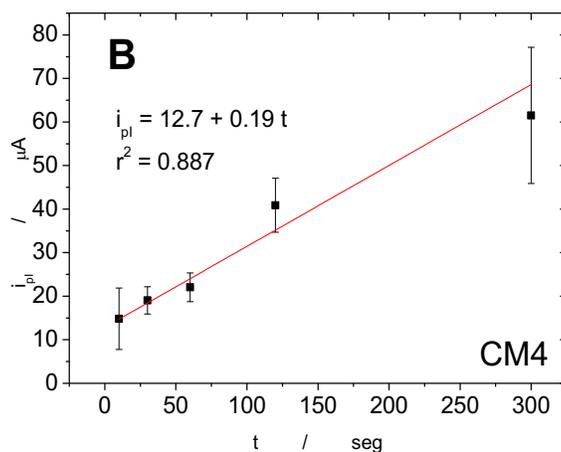


Figura 10. Intensidad de corriente de pico con respecto al tiempo de inmersión del electrodo GC-MWCNT para **A.** una solución 0.3mM de 3,5-DNBF en acetonitrilo (pH=7.00, $E_0 = -0.1V$, $E_F = -0.45V$) **B.** una solución 0.048mM de CM4 en acetonitrilo (pH=7.00, $E_0 = -0.1V$, $E_F = -0.45V$).

En la figura 10. A se observa para 3,5-DNBF que la intensidad de corriente de pico no varía significativamente con el aumento del tiempo de inmersión del electrodo GC-MWCNT en la solución del nitrocompuesto, por lo que utilizar largos tiempos de inmersión no aumenta la intensidad de corriente de pico, ya que los nanotubos se encuentran saturados de nitrocompuesto.

En la figura 10. B se observa para CM4 que la intensidad de corriente de pico aumenta linealmente durante 5 minutos según la siguiente ecuación:

$$i_{p1} = 12.7 + 0.19t \quad (\mu A, t \text{ en seg}) \quad r^2 = 0.887 \quad (3)$$

La ecuación indica que el aumento de la señal electroquímica es lineal, por lo que los nanotubos no se encuentran saturados con nitrocompuesto.

De la pendiente se obtiene que la señal aumenta $0.19 \mu\text{A}/\text{seg}$, lo que puede resultar en una ventaja, ya que para aumentar la intensidad de corriente para CM4, se puede modificar el tiempo de inmersión en la solución de precursor. Para aumentar la intensidad de la señal al doble, se necesita aproximadamente 2 minutos de inmersión.

Para ambos compuestos se considerará 10 segundos de inmersión en las soluciones de los nitrocompuestos, ya que es un tiempo óptimo en el que se obtienen intensidades de corriente similares para ambas moléculas.

5.3. Estabilidad de las soluciones de los nitrocompuestos en el tiempo.

Ya que se necesita que las soluciones modificantes se mantengan estables durante el tiempo, es necesario determinar el tiempo adecuado de trabajo de las soluciones modificantes. Para ello se monitorea cada solución modificadora en triplicado por periodos de 30 minutos mediante la técnica de voltametría de pulso diferencial (VPD). Se obtienen las señales I y II de los nitrocompuestos encapsulados en un solo electrodo GC-MWCNT-Med. En donde los mediadores para cada estudio son 3,5-DNBF y CM4. Se utiliza una solución 0.3 mM de 3,5-DNBF y 0.048 mM de CM4, ambas en acetonitrilo.

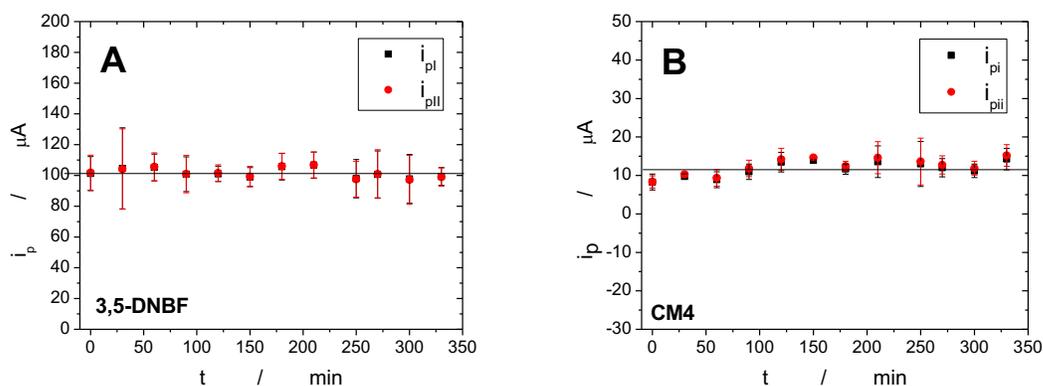


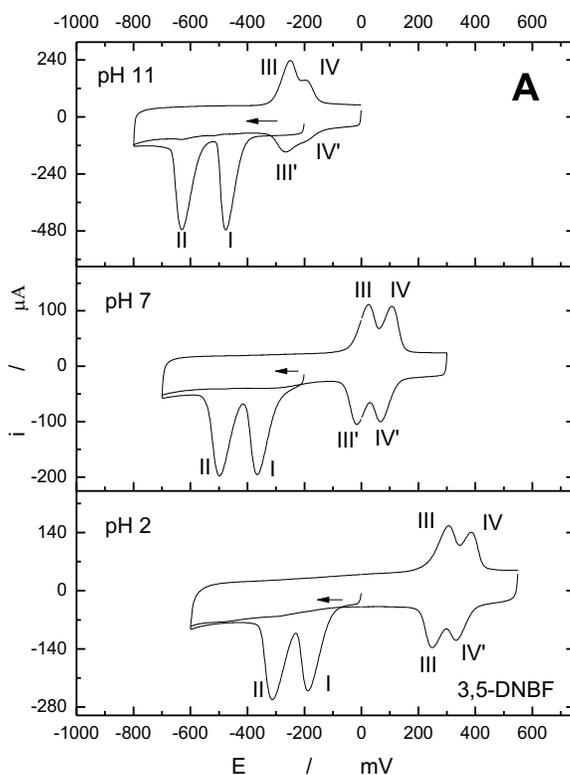
Figura 11. Variación de la corriente de pico I y II respecto al tiempo para un electrodo con precursor encapsulado **A.** GC-MWCNT-35DNBF ($\text{pH}=7.00$ $E_0= -0.1\text{V}$, $E_F= -0.6\text{V}$) **B.** GC-MWCNT-CM4 ($\text{pH}=7.00$ $E_0= -0.1\text{V}$, $E_F= -0.6\text{V}$).

En la Figura 11 A y B se muestra que la intensidad de corriente se mantiene estable por al menos 6 horas para ambos nitrocompuestos disueltos en CH_3CN , por lo tanto, la concentración de la solución no varía con el tiempo, no se observa disminución de corriente por reacciones químicas de descomposición y tampoco se observa aumento de las corrientes de pico por aumento de la concentración debido a la evaporación de solvente. La solución se puede utilizar desde el momento de su preparación hasta 6 horas después de preparada.

5.4. Estudios bajo diferentes condiciones de pH para los electrodos GC-MWCNT-Med.

5.4.1. Caracterización electroquímica mediante voltametría cíclica de los precursores a pH ácido, neutro y básico.

Con el fin de observar la influencia del pH en el proceso redox, se sumergen electrodos GC-MWCNT en soluciones de acetonitrilo 0.3mM de 3,5-DNBF y 0.048mM de CM4 por 10 segundos para luego hacer una caracterización de los nitrocompuestos mediante voltametría cíclica a pH ácido (pH 2), neutro (pH 7) y básico (pH 11) en buffer B-R. Los resultados se muestran en la figura 12.



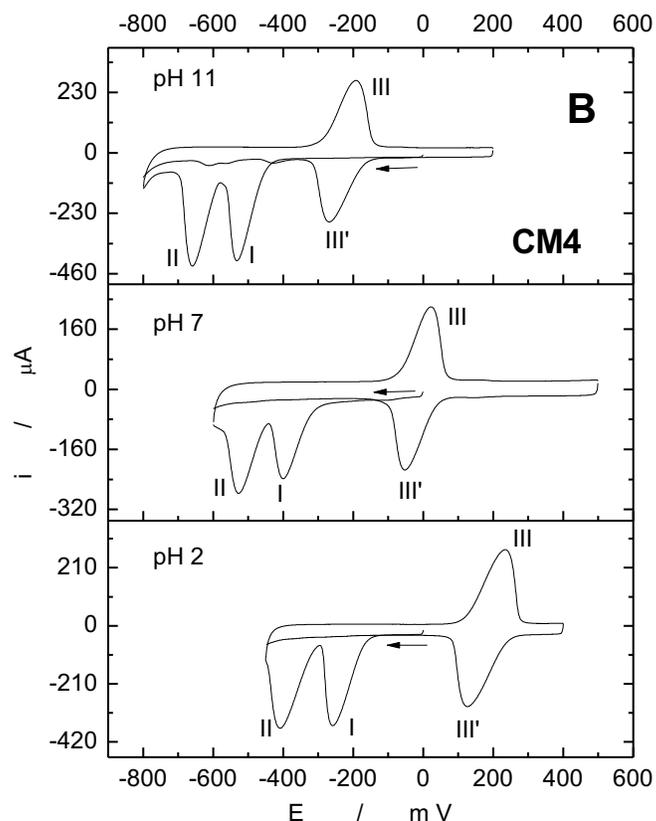


Figura 12. Voltametría cíclica a distintos pH en buffer B-R para los precursores **A.** 3,5-DNBF **B.** CM4.

Se observa en la figura 12 A. y B. que a medida que desciende el pH, el voltamograma se desplaza hacia potenciales más positivos. Esto es debido a que el mecanismo de reducción de los grupos nitro es dependiente del pH (Ecuación 1 y 2). En todo el rango de pH, el número de señales no cambia para ambos nitrocompuestos, manteniéndose la generación del par redox NHOH/NO acoplado como señal reversible, por lo que el mecanismo es el mismo a todos los pH estudiados. Otro punto para considerar es la buena separación de las señales de reducción (figura 12 A. y B. señales I y II), lo que permite una buena resolución.

5.4.2. Dependencia del potencial de reducción con el pH.

En 5.4.1 se observó que hay un desplazamiento de las señales, por lo que el potencial redox depende directamente del pH. Para conocer el tipo de dependencia, los electrodos GC-MWCNT son modificados mediante inmersión en una solución 0.3mM de 3,5-DNBF y 0.048mM de CM4, ambas en acetonitrilo, para estudiar el potencial de reducción grupos nitro presentes en las moléculas mediante VPD. Se utiliza como medio acuoso buffer B-R con rango de pH utilizado de 1.8 a 11.7, con un aumento gradual de aproximadamente 2 unidades de pH.

Los resultados se muestran en la figura 13 para 3,5-DNBF y en la figura 14 para CM4.

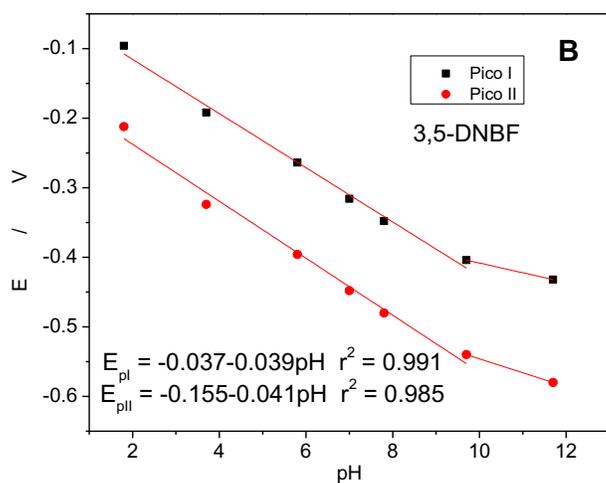
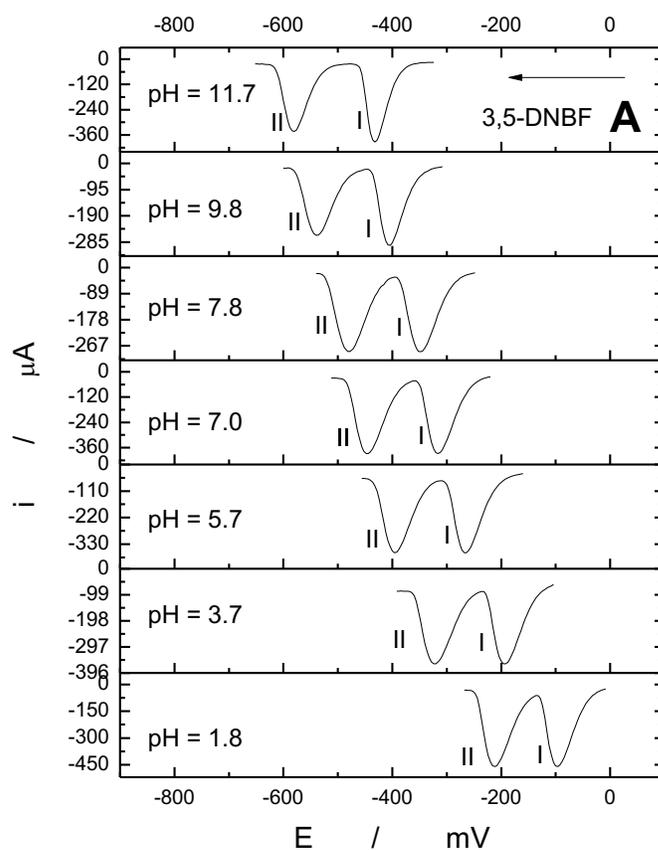


Figura 13. A. Voltametría diferencial de pulso en buffer B-R a diferentes pH para un electrodo con precursor GC-MWCNT-35DNBF **B.** Regresión lineal para los potenciales de pico de reducción para el precursor 3,5-DNBF.

En la figura 13 A. se observan las señales de reducción de 3,5-DNBF a 7 pH distintos mediante VPD. El compuesto 3,5-DNBF presenta un comportamiento similar en el desplazamiento de las señales de reducción a medida que el pH aumenta.

En la figura 13. B. se muestra una recta E_p vs pH realizada desde pH 1.8 a 9.8, excluyendo el último punto a pH ~12 en la ecuación de la recta. El quiebre en la gráfica indica que a pH ~10 se produce un cambio en el mecanismo de la reducción de los grupos nitro presentes.

El ajuste lineal obtenido para ambos picos de reducción de figura 13 A, permite obtener el potencial de reducción de los grupos nitro. Según la regresión lineal E_{pI} (figura 13 B.), el potencial de pico I a pH 7 es de -0.310 V y en todo el rango de pH mientras que para el pico 2, utilizando la regresión lineal E_{pII} (figura 13 B.), se obtiene un potencial de reducción a pH 7 de -0.442V. La variación obtenida desde la pendiente es de 39.9mV/pH en promedio, desde pH ~2 a pH ~10. Esto significa que la variación de una unidad de pH involucra un cambio en el potencial de reducción de aproximadamente 40mV para el compuesto 3,5-DNBF.

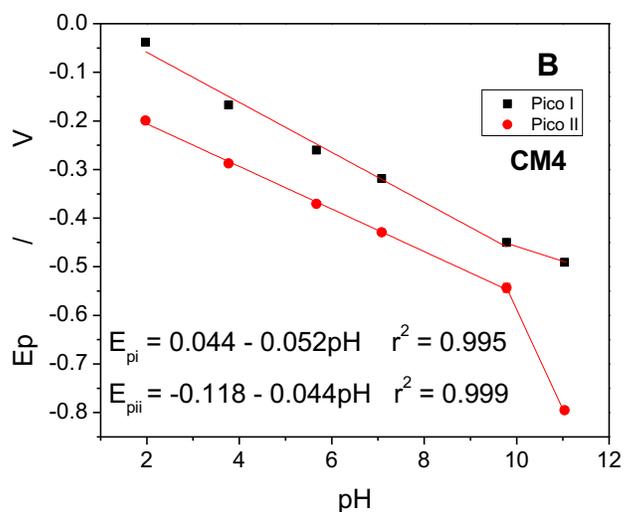
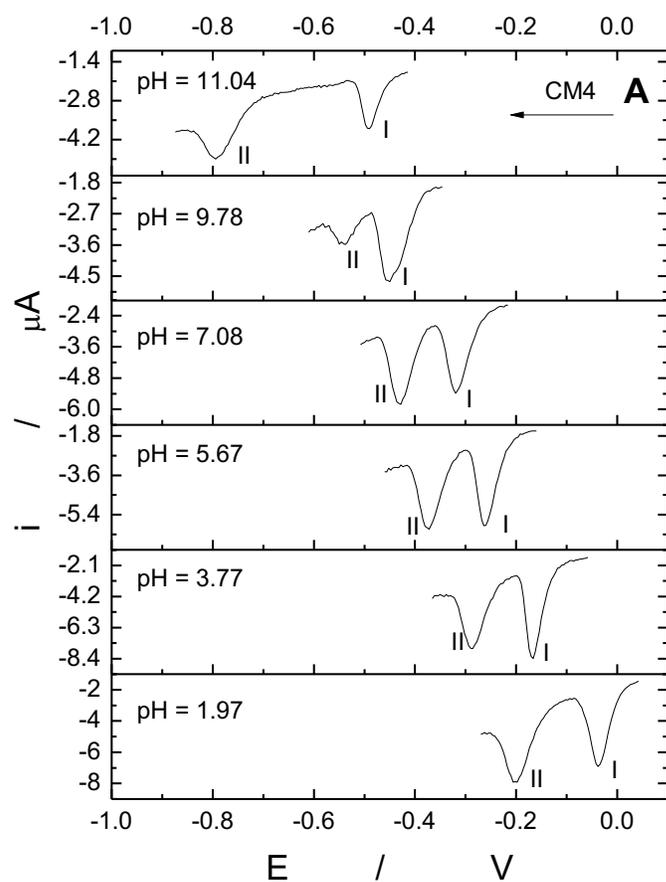


Figura 14. A. Voltametría diferencial de pulso en buffer B-R a diferentes pH para un electrodo con precursor GC-MWCNT-CM4 **B.** Regresión lineal para los potenciales de pico de reducción para el precursor CM4.

En la figura 14 A Se observan los resultados obtenidos para CM4. Como se mostró anteriormente, a medida que el pH aumenta, el potencial de reducción para los grupos nitro se desplaza hacia valores negativos de manera similar para el rango de pH estudiado. A pH aproximadamente 11 (figura 14 A.), se observa un cambio en el comportamiento de las señales, lo que indica un claro cambio en el mecanismo de reducción.

Para determinar su dependencia con el pH, se obtuvo una regresión lineal E_p vs pH, el cual se muestra en la figura 14. B. La regresión lineal se obtuvo con los pH 1.9 a 9.7, ya que a pH aproximadamente 11 se ve el cambio de pendiente que indica un cambio en el mecanismo de reacción desde pH 10.

Los potenciales de pico se pueden obtener de las ecuaciones E_{pI} y E_{pII} de la figura 14 B. Las señales I y II a pH 7 son de $-0.320V$ y $-0.426V$ respectivamente, con una variación correspondiente a 48.0 mV/pH desde pH ~ 2 a pH ~ 10 . Esto, al igual que para 3,5-DNBF, involucra un cambio de 48 mV en el desplazamiento del potencial con la variación del pH. En la tabla IV se muestra un resumen de los datos obtenidos.

Tabla IV. Variables obtenidas mediante ajustes lineales para los precursores 3,5-DNBF y CM4.

parámetro	3,5-DNBF / V	CM4 / V
E_p/V	-0.310	-0.320
E_{pII}/V	-0.422	-0.426
Pendiente /mVpH ⁻¹	39.9	48.0

Como la electrocatálisis de NADH se debe realizar a pH neutros³⁸, pH muy ácido o básico no son adecuados, por lo que los resultados obtenidos para pH aproximadamente 11 no influyen futuros experimentos.

5.5. Influencia de la velocidad de barrido para los electrodos GC-MWCNT-Med.

Con el fin de calcular la constante de transferencia heterogénea (k_t) para 3,5-DNBF y CM4 se estudió la dependencia de la velocidad de barrido desde 0.05 a 2.5 V/s para ambos compuestos mediante VC. Para ello, en una celda que contiene buffer B-R 0.1M pH 7.00 se generó el par redox NO/NHOH para obtener los mediadores 3,5-DNBF(I), CM4(I) Y CM4(II).

Los resultados experimentales permiten obtener mediante el método de Laviron³⁹ los valores de coeficiente de transferencia anódico α_a y catódico α_c los cuales indican el grado del cambio energético de las especies involucradas en el proceso redox. En las figuras 15, 16 y 17 se muestran los voltamogramas cíclicos obtenidos a diferentes velocidades de barrido para 3,5-DNBF y CM4, además del gráfico E_p vs $\log(v)$.

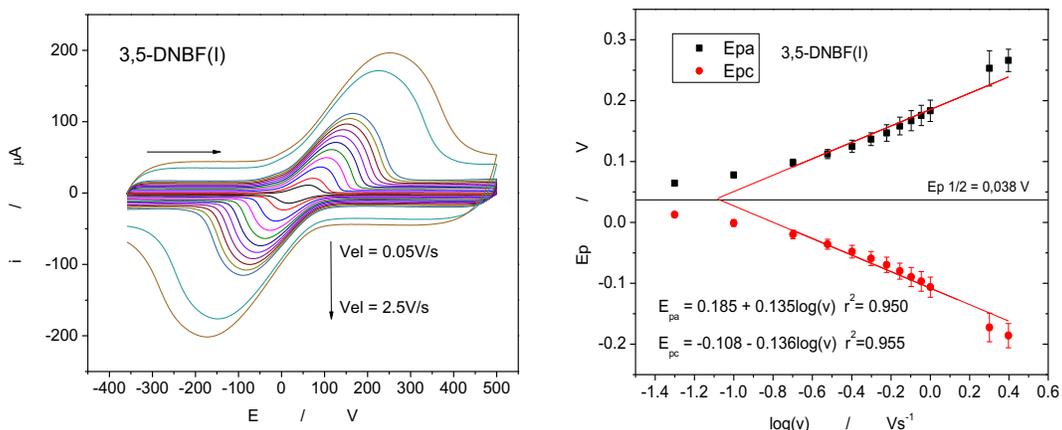


Figura 15. A. Voltamograma cíclico a distintas velocidades de barrido para un electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) **B.** Variación del potencial de pico anódico y catódico en función del logaritmo de la velocidad de barrido para un electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I).

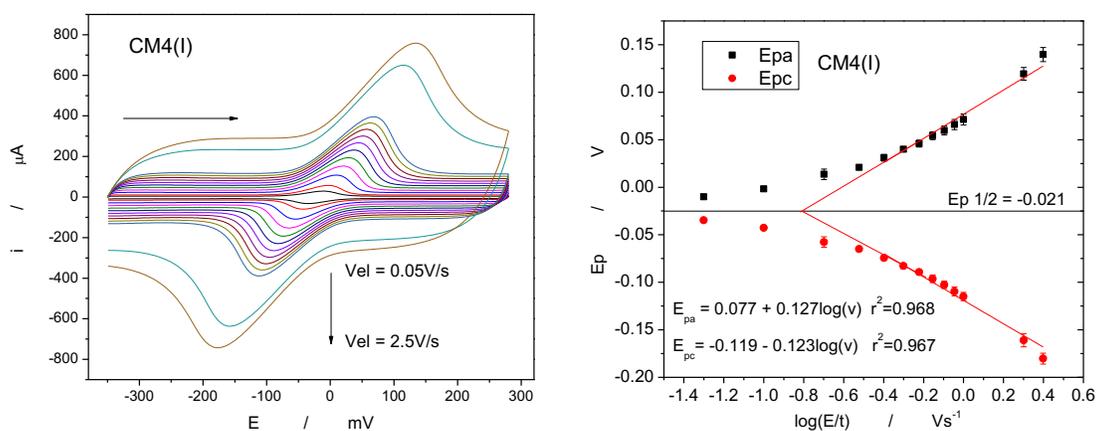


Figura 16. A. Voltamograma cíclico a distintas velocidades de barrido para un electrodo GC-MWCNT-CM4(I) **B.** Variación del potencial de pico anódico y catódico en función del logaritmo de la velocidad de barrido para un electrodo GC-MWCNT-CM4(I).

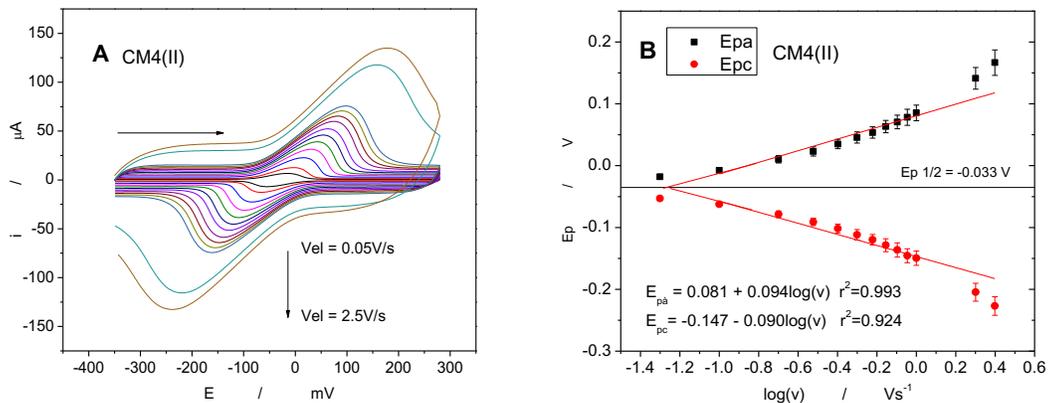


Figura 17. A. Voltamograma cíclico a distintas velocidades de barrido para un electrodo GC-MWCNT-CM4(II) **B.** Variación del potencial de pico anódico y catódico en función del logaritmo de la velocidad de barrido para un electrodo GC-MWCNT-CM4(II).

Según el método de Laviron, para obtener k_h y α con el mínimo de error, debe cumplirse con la condición de $\Delta E_p > 200/n$, donde n corresponde al número de electrones involucrados en el proceso redox. Para el caso de 3,5-DNBF(I) los electrones involucrados son dos (ecuación 1 y 2), por lo que los datos utilizados para obtener el ajuste lineal corresponden a $\Delta E_p > 100\text{mV}$.

Para CM4, se obtiene lo siguiente:

- Para CM4(I), el cual corresponde a la generación de un par NHOH/NO, los electrones involucrados son 2, por lo que los datos utilizados para el ajuste lineal son $\Delta E_p > 100\text{mV}$.
- Para CM4(II), se general dos pares NHOH/NO, por lo tanto, 4 electrones están involucrados y los datos a utilizar corresponden a $\Delta E_p > 50\text{mV}$

Se muestra en las Figuras 15 B, 16 B y 17 B dos regresiones lineales para cada gráfico, donde corresponde al logaritmo de velocidad de barrido en V/s. A partir del valor de las pendientes de los ajustes lineales, se pueden obtener los valores de coeficiente de transferencia anódico α_a y catódico α_c según la ecuación 4 y 5:

$$\alpha_a = \frac{-2.3 R T}{n F m_a} - 1 \quad (4)$$

$$\alpha_c = \frac{2.3 R T}{n F m_c} \quad (5)$$

Dónde:

- R : Constante de los gases; 8.314 J/molK
- T : Temperatura en grados K; 298K
- n : nº de electrones transferidos;
- F : Constante de Faraday; 96599 C/mol
- m_a : Pendiente ajuste lineal para E_{p_a} vs $\log(v)$
- m_c : Pendiente ajuste lineal para E_{p_c} vs $\log(v)$

Los valores de α y las pendientes obtenidas se muestran en la tabla V.

Tabla V. Resultados de la pendiente de las regresiones lineales y α catódicas y α anódicas.

Compuesto	Pendiente anódica/V	α_a	Pendiente catódica/V	α_c
3,5-DNBF	0.135	0.78	-0.136	0.22
CM4(I)	0.127	0.768	-0.123	0.240
CM4(II)	0.094	0.893	-0.090	0.165

Los valores de α_a para 3,5-DNBF(I), CM4(I) y CM4(II) son cercanos a 1, lo que indica que en la oxidación de la hidroxilamina, el intermediario de los nitrocompuestos es más parecido a su forma nitroso, mientras que los valores de α_c indica que el estado de transición de la reducción del grupo nitroso a hidroxilamina se parece más a los reactantes, es decir, a la forma nitroso⁴⁰.

El valor de la constante de transferencia heterogénea k_h se calcula a través de las siguientes ecuaciones:

$$k_a = \frac{(1 - \alpha_a)nFv_a}{RT} \quad (6)$$

$$k_c = \frac{\alpha_c nFv_c}{RT} \quad (7)$$

Las constantes heterogéneas calculadas para estos compuestos se muestran en la tabla VI:

Tabla VI. Resultados obtenidos mediante el método de Laviron para el cálculo de v y k_h a 25°C.

Compuesto	v_a (mV/S)	v_c (mV/S)	k_a/s^{-1}	k_c/s^{-1}	k_h/s^{-1}
3,5-DNBF(I)	81.01	83.60	1.39	1.41	1.40
CM4(I)	171.00	160.00	3.08	2.99	3.04
CM4(II)	54.00	54.00	0.90	1.38	1.14

El valor de k_h define la velocidad de transferencia de electrones por parte del compuesto. Para el caso de 3,5-DNBF(I) se obtiene una k_h de 1.40 seg^{-1} , mientras que para CM4(I) es de 3.04 seg^{-1} y de 1.14 seg^{-1} para CM4(II). Al ser mayor k_h para CM4(I), presenta una ventaja por sobre 3,5-DNBF(I) y CM4(II), ya que a mayor k_h , más rápida la transferencia electrónica. En el caso de CM4, a pesar de que ambos pares redox NHOH/NO se encuentra en la misma zona de potencial, se obtiene un valor de k_h menor para el caso de los dos grupos nitro reducidos. Esto puede deberse a dos razones:

- La transferencia de electrones por parte del electrodo es el doble a que en el caso de un grupo nitro reducido, a pesar de que el par redox NHOH/NO aparece en el mismo potencial y la transferencia electrónica ocurre a la misma energía.
- El compuesto CM4(I) es mucho más insoluble que CM4(II) por lo que tiende a retenerse más en la red de nanotubos.

En orden de mayor a menor k_h , se obtiene que $k_{h\text{CM4(I)}} > k_{h\text{3,5-DNBF(I)}} > k_{h\text{CM4(II)}}$.

5.6. Efecto del tiempo de reposos en los electrodos modificados con nitrocompuesto.

Para considerar un electrodo como sensor electroquímico, es importante saber la disminución de la intensidad de la corriente durante el tiempo de reposo, ya que el electrodo queda sumergido en la solución sin recibir perturbaciones electroquímicas y esto se verá reflejado en la electrocatálisis, debido a que parte del mediador se moverá mediante difusión al seno de la solución.

Con el fin de determinar el tiempo de trabajo y para un electrodo GC-MWCNT-Med, se llevó a cabo un experimento mediante VC, aislando el par redox NHOH/NO, para generar los mediadores 3,5-DNBF(I) (figura 18), CM4(I) (figura 19) y CM4(II) (figura 20) en una celda con buffer B-R 0.1M pH 7.00. Para ello, con un sólo electrodo, se hicieron 37 voltamogramas cíclicos con un tiempo de reposo de 5 minutos tras cada medición, y una velocidad de barrido de 0.1 V/s. Se considera la medida número uno la realizada a $t = 0$ segundos. A continuación, se muestran los voltamogramas cíclicos obtenidos:

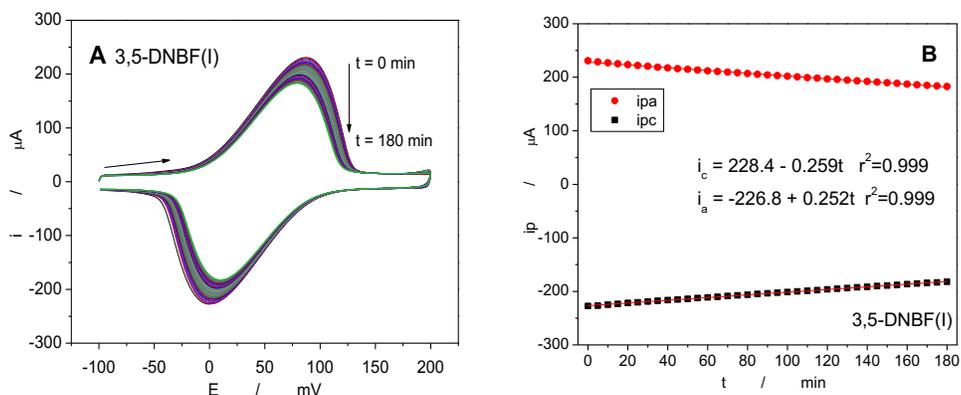


Figura 18. A. Voltamograma cíclico para la variación de la intensidad de corriente con respecto al tiempo para un electrodo GC-MWCNT-3,5DNBF(I) **B.** Relación entre el tiempo y la corriente de oxidación y reducción para un electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I).

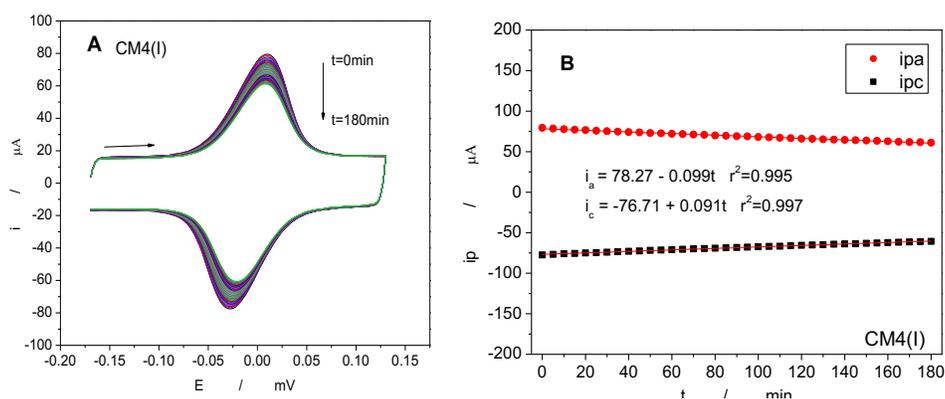


Figura 19. A. Voltamograma cíclico para la variación de la intensidad de corriente con respecto al tiempo para un electrodo GC-MWCNT-CM4(I) **B.** Relación entre el tiempo y la corriente de oxidación y reducción para un electrodo GC-MWCNT-CM4(I).

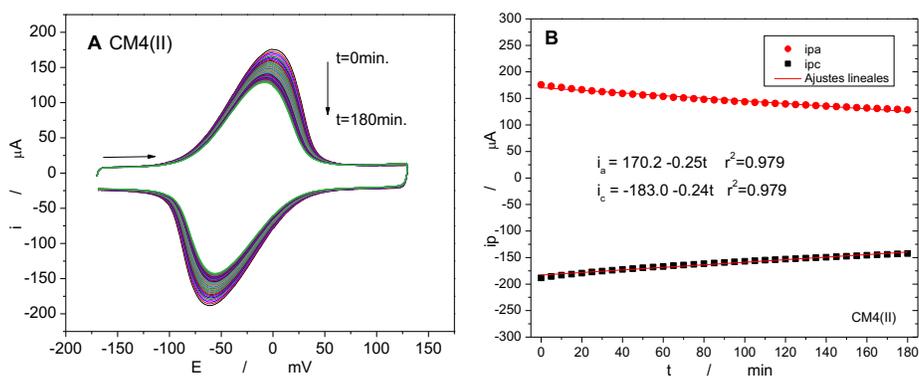


Figura 20. A. Voltamograma cíclico para la variación de la intensidad de corriente con respecto al tiempo un electrodo GC-MWCNT-CM4(II) **B.** Relación entre el tiempo y la corriente de oxidación y reducción para un electrodo GC-MWCNT-CM4(II).

La disminución de la respuesta de la corriente de pico en función del tiempo de reposo para par redox en las dos moléculas es lineal con un cambio bajo en la pendiente. Graficando la intensidad de corriente de pico catódica y anódica, se puede obtener una relación entre la intensidad de corriente de pico y el tiempo de reposo tras cada medición para ambos nitrocompuestos en estudio.

Para 3,5-DNBF(I), el promedio de las pendientes de las curvas de oxidación y reducción indica que la tasa de disminución de intensidad de corriente de pico para el par redox es $0.25 \mu\text{Amin}^{-1}$. Este indica que transcurrido un minuto la disminución de la intensidad de la señal, la cual se relaciona directamente con la cantidad de compuesto encapsulada en la red de nanotubos, es del orden de los $0.25 \mu\text{A}$. Considerando los ajustes lineales, se espera que para $t = 878 \text{ min}$, la intensidad de corriente del par redox sea $\sim 0 \mu\text{A}$, por lo que el compuesto se mantiene retenido aproximadamente 15 horas.

Para el caso de CM4(I) (figura 19B), la tasa de disminución del par redox es $0.095 \mu\text{Amin}^{-1}$. Al cabo de un minuto, la disminución de la corriente de respuesta del par redox es de $0.09 \mu\text{A}$ para CM4(I). Para el $t = 790 \text{ min}$, la corriente de respuesta se habrá reducido a $\sim 0 \mu\text{A}$.

Para CM4(II) (figura 20B), la disminución de la corriente de respuesta para el par redox es de $0.245 \mu\text{A}$ por minuto y para $t = 721 \text{ min}$, la corriente de pico del par redox se reduce a $\sim 0 \mu\text{A}$.

En la tabla VII se muestran los valores obtenidos.

Tabla VII. Tasas de disminución de corriente y tiempos permanencia para los electrodos GC-MWCNT con mediador encapsulado, sumergidos en buffer B-R 0.1M pH 7.00.

Mediador	Tasa de disminución de la corriente del par redox / μAmin^{-1}	Tiempo de permanencia en el electrodo /h
3,5-DNBF(I)	0.25	15
CM4(I)	0.09	13
CM4(II)	0.245	12

En orden de permanencia en el electrodo, 3,5-DNBF > CM4(I) > CM4(II), ya que CM4(II) es la especie que presenta mayor solubilidad producto de los dos grupos NHOH lo que vuelve a la molécula más polar. 3,5-DNBF(I) presenta el mayor tiempo de permanencia, debido a la extensión alifática de la molécula que interacciona con la red de nanotubos y la presencia de un solo grupo redox NHOH/NO.

5.7. Caracterización de NADH en electrodos GC-MWCNT.

Con el objetivo de obtener la caracterización de NADH mediante voltametría cíclica, se utilizó un electrodo GC-MWCNT con un tiempo de acumulación de 60 segundos en una solución 3mM de NADH en buffer B-R pH 7.00. Los resultados se muestran en la Figura 21.

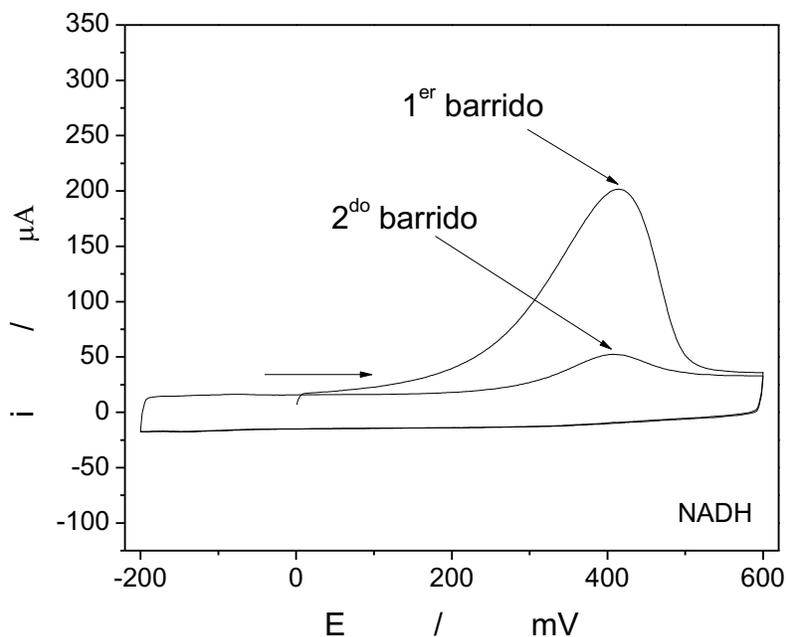
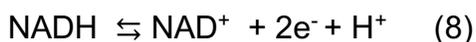


Figura 21. Caracterización mediante voltametría cíclica de NADH 3mM en buffer B-R (pH=7.00, $E_0=0.0$ V, $E_H= +0.6$ V, $E_L= -0.2$ V).

En la Figura 21 se muestra una señal intensa e irreversible a +0.41V versus Ag/AgCl, cuyo valor también es reportado en literatura⁴³. Este proceso correspondiente a la oxidación de NADH según la siguiente ecuación⁴¹:



En estudios anteriores se ha encontrado que el valor de potencial de oxidación para NADH en electrodos de carbono vítreo es de 0.62V⁴¹. La reducción del sobrepotencial observada en la figura 21 es debido a que los nanotubos de carbono presentan un efecto de difusión de capa fina, mientras que en los electrodos tradicionales (GC), se produce una difusión semi infinita ^{42, 43}.

En un segundo barrido anódico se observa la misma señal irreversible de oxidación de NADH a menor intensidad, producto de la acumulación de NAD^+ en la superficie del electrodo, lo que no permite la difusión de NADH desde el seno de la solución.

5.8. Electrocatálisis de NADH sobre electrodos GC-MWCNT-Med.

A partir de los mediadores encapsulados en electrodos GC-MWCNT en su forma NHOH/NO, se espera que el mediador reaccione electroquímicamente con NADH y reduzca los sobrepotenciales de oxidación. Siguiendo la metodología explicada en 4.4.4 se encapsularon los compuestos 3,5-DNBF y CM4 en electrodos GC-MWCNT y se generó los pares redox NHOH/NO para obtener los mediadores 3,5-DNBF(I) y CM4(II). Todos los mediadores fueron generados electroquímicamente a partir de su respectivo precursor RNO_2 en una celda que contienen solamente buffer B-R 0.1M pH 7.00. Posteriormente, el electrodo GC-MWCNT-Med se sumerge con un tiempo de acumulación de 60 segundos en una celda con NADH 3mM en buffer B-R 0.1M pH 7.00. En la figura 22 se muestran los voltamogramas cíclicos obtenidos para ambos compuestos.

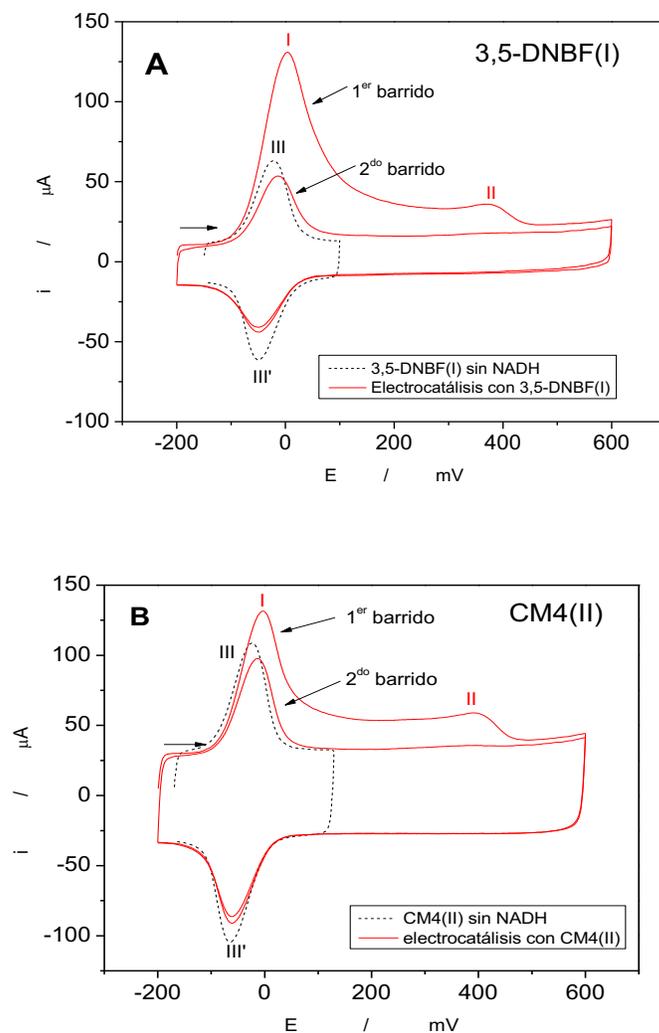


Figura 22. Voltamogramas cíclicos de la electrocatalisis de NADH sobre **A.** Un electrodo GC-MWCNT con mediador 3,5-DNBF(I) encapsulado **B.** Un electrodo GC-MWCNT con mediador CM4(II) encapsulado. Línea roja continua es electrocatalisis de NADH con su respectivo mediador y línea punteada negra es mediador sin presencia de NADH (Buffer B-R, pH 7.00 $E_0 = -0.2V$, $E_i = -0.2V$ $E_h = +0.6V$).

En la figura 22 se observa el voltamograma cíclico de un proceso electrocatalítico sobre un electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) (figura 22 A) y un electrodo GC-MWCNT-CM4(II) (figura 22 B).

En ambos gráficos de la figura 22 se observa una señal de oxidación a potenciales cercanos a cero, correspondientes a la oxidación electrocatalítica de NADH (señal I figura 22 A y B) y otra señal reversible, correspondiente al par redox del mediador encapsulado (señal III/III' para CM4(I) y para 3,5-DNBF figura 22 A y B). A potenciales más positivos se encuentra la señal de NADH no electrocatalizado presente en la superficie del electrodo más el NADH proveniente del seno de la solución (señal II figura 22 A y B). Bajo las condiciones de estudio, el mediador no es capaz de electrocatalizar todo el NADH presente en el electrodo, razón por la cual aparece la señal II en los voltamogramas de la figura 22. Por otro lado, se puede señalar que en el segundo barrido de oxidación, el cual no presenta tiempo de acumulación, la señal II desaparece, ya que todo el NADH presente en la superficie del electrodo pudo ser electrocatalizado.

El desplazamiento de la señal irreversible (Señal II figura 22 A y B) de oxidación de NADH a potenciales cercanos a 0 V demuestra que ambos nitrocompuestos encapsulados en electrodos GC-MWCNT poseen actividad como mediador electrocatalítico para NADH bajo las condiciones de estudio. La señal I de la figura 22 A y B presenta mayor intensidad que la señal II debido a la superposición de las señales del par redox de los mediadores (señal IV figura 22 A y B) más la señal electrocatalítica de NADH que se oxida a ese mismo potencial.

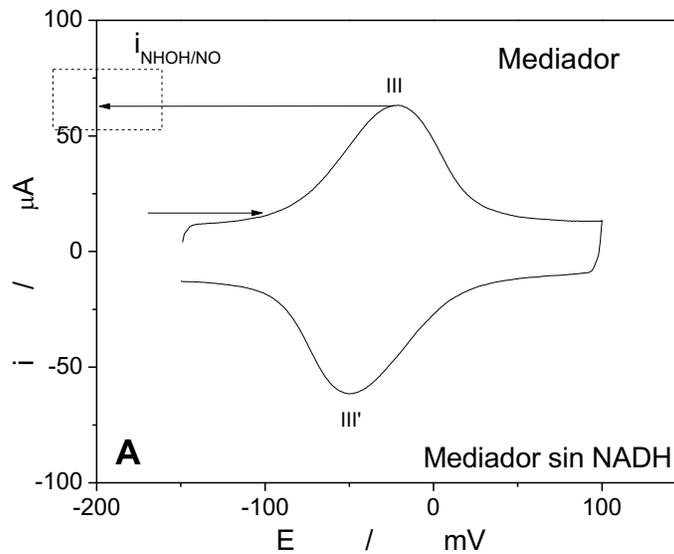
La corriente de electrocatalisis se ha definido en esta memoria como la diferencia entre la señal I y III del mediador en ausencia de NADH. Es posible expresar el % de corriente electrocatalítica dada la siguiente ecuación:

$$\%i_{ecat} = 100 - \frac{i_{NHOH/NO} * 100}{i_{(NHOH/NO+NADH_{cat})}} \quad (9)$$

Dónde:

- $\%i_{ecat}$: % de corriente de pico correspondiente de NADH catalizado.
- $i_{NHOH/NO}$: Corriente de pico de la oxidación NHOH/NO sin presencia de NADH.
- $i_{(NHOH/NO+NADH_{cat})}$: Corriente de pico NADH electrocatalizado más oxidación NHOH/NO.

A continuación, se presenta la obtención gráfica de los valores anteriormente descritos:



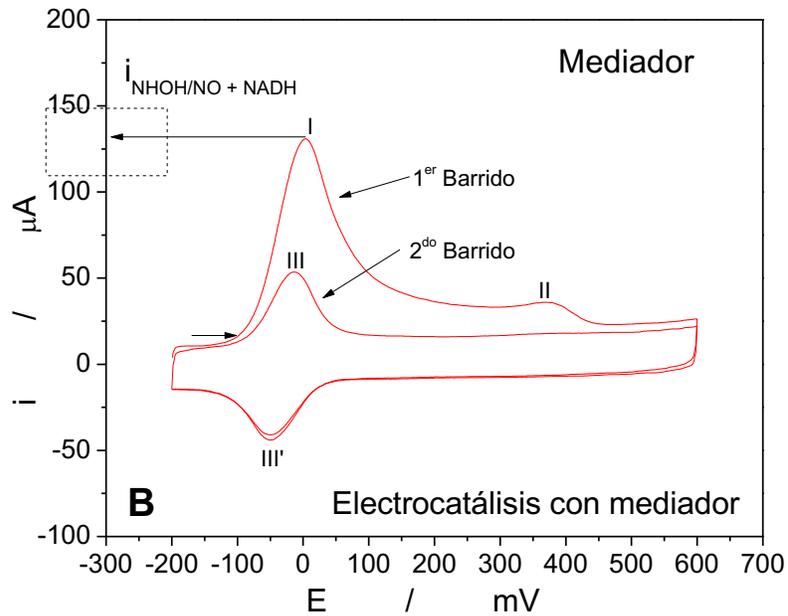


Figura 23. Obtención gráfica de $i_{\text{NHOH/NO}}$ y $i_{\text{NHOH/NO} + \text{NADH}}$. **A.** Línea negra corresponde al mediador en ausencia de NADH y **B.** Línea roja corresponde a la electrocatalisis de NADH en presencia del mediador.

En la preparación de los electrodos modificados con MWCNT, la cantidad de nanotubos agregados a cada electrodo GC, genera un mayor coeficiente de variación inter – electrodo (el coeficiente de variación típico obtenido para estos electrodos es de un 10%), provocando variación en la medida con cada electrodo. Producto de esto, la i_{ecat} varía en función de la cantidad de nanotubos de carbono, ya que, a mayor cantidad de nanotubos depositados sobre el electrodo de carbono vítreo, más mediador encapsulado se encuentra presente en la red tridimensional. La ventaja de obtener el % de corriente electrocatalítica, es que el resultado es expresado como una fracción porcentual de la suma entre las corrientes I y IV, es decir la suma de la corriente de oxidación del derivado hidroxilamina del mediador y la corriente electrocatalítica, lo que resulta en normalizar el valor de la corriente electrocatalítica.

En la figura 24 se muestra un esquema general electroquímico para este tipo de análisis:

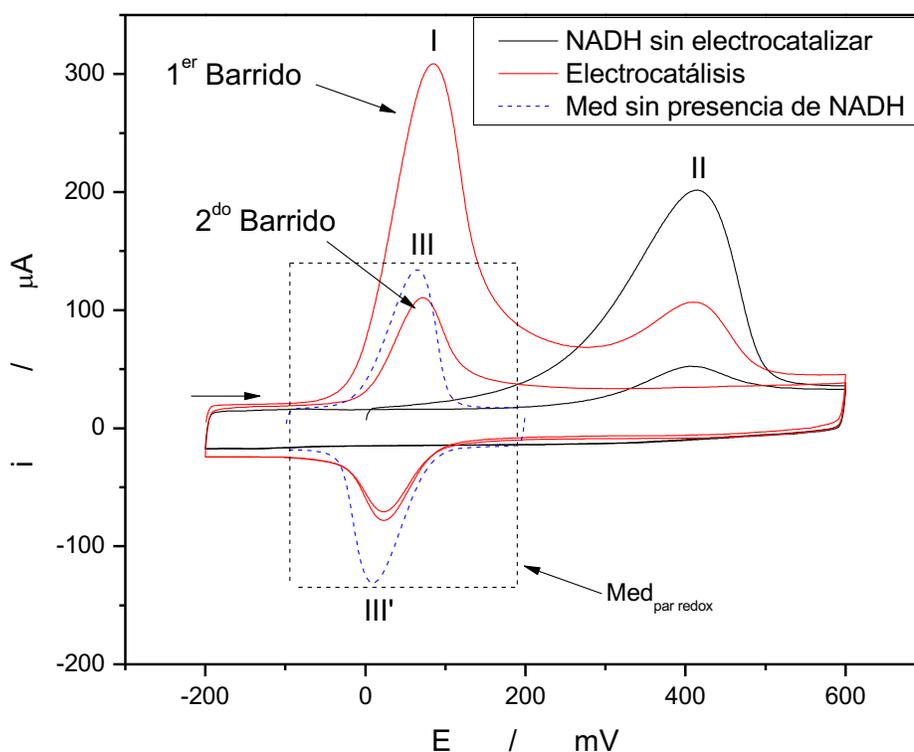


Figura 24. Superposición de voltamogramas cíclicos de mediador sin NADH (línea punteada azul), NADH sin mediador (línea punteada negra) con NADH electrocatalizado sobre un electrodo GC-MWCNT-Med (línea sólida roja).

La línea punteada muestra la caracterización electroquímica de NADH mientras que la línea sólida muestra la caracterización de la señal de electrocatalisis con mediadores del tipo nitrocompuestos. Es posible observar:

- 1) La suma de las corrientes de oxidación del derivado hidroxilamina y la de electrocatalisis de NADH (Línea continua roja señal I figura 24).

- 2) La señal de NADH no electrocatalizado (Línea roja continua señal II figura 24).
- 3) Un par redox reversible correspondiente a la generación de los derivados NHOH/NO del mediador encapsulado en presencia de NADH (Línea roja continua, señales III y III' de la figura 24).

El proceso electrocatalítico ocurrido en el electrodo puede explicarse según el siguiente esquema²⁹:

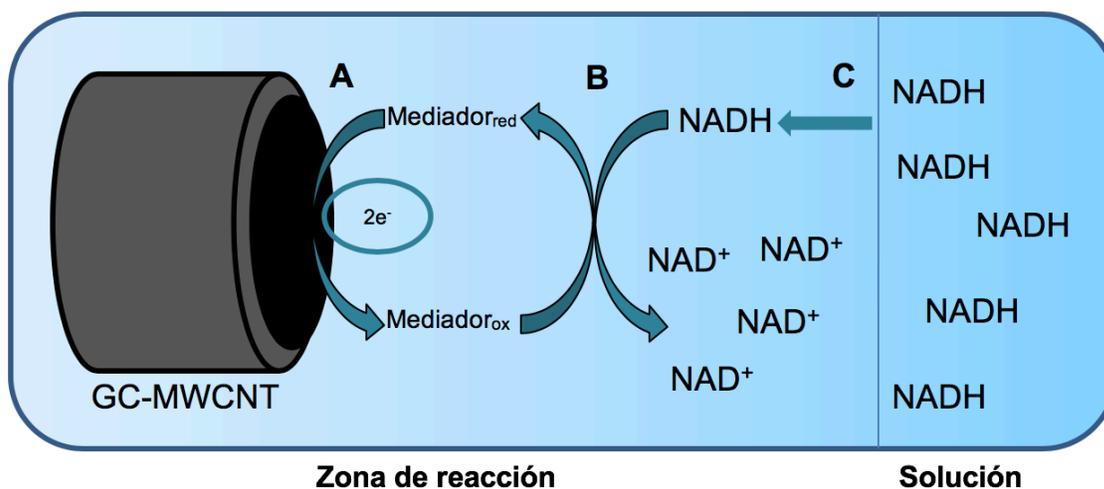


Figura 25: Esquema de electrocatalisis de NADH **A.** Oxidación del mediador. **B.** Reducción del mediador y oxidación de NADH. **C.** Interfase seno de la solución/zona de reacción.

En la figura 25 se muestra un proceso con tres etapas diferentes:

- A) El mediador encapsulado en la red tridimensional de los nanotubos se oxida según la siguiente ecuación:



- B) Moléculas de NADH provenientes del seno de la solución se oxidan, produciendo la especie NAD^+ , según la ecuación 8.
- C) Las moléculas de NAD^+ se van acumulando en la interfase, ya que la electrocatálisis se produce en un sistema sin agitación.

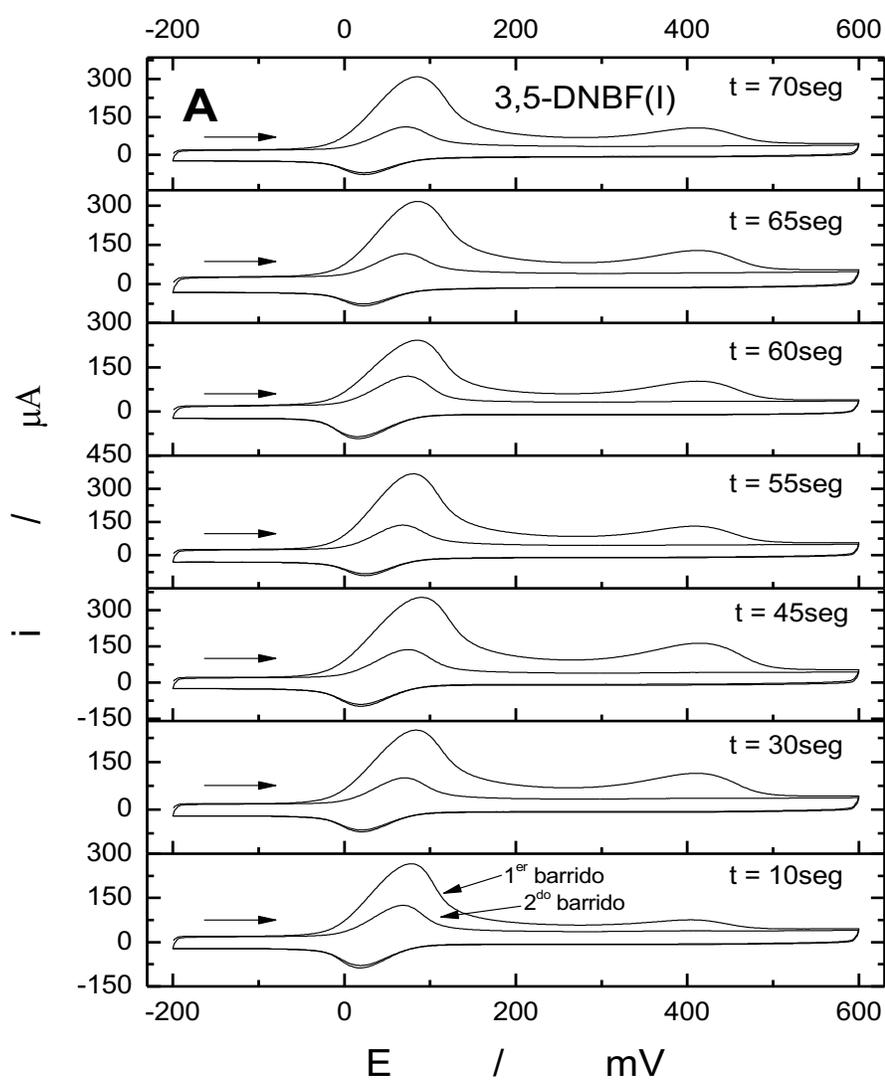
Dado el esquema anterior, se espera que las señales electrocatalíticas disminuyan con respecto al tiempo, debido al desplazamiento de las moléculas de mediador por NAD^+ en la superficie del electrodo.

Queda demostrado que ambos nitrocompuestos estudiados son mediadores electroquímicos en la electrocatálisis de NADH.

5.9. Determinación del tiempo de interacción óptimo del electrodo GC-MWCNT-Med con NADH.

Dependiendo del tiempo de interacción del electrodo modificado con la solución de NADH, la concentración de NADH en la red de nanotubos puede variar, por lo que es necesario conocer la influencia del tiempo de interacción en la intensidad de corriente. Con el fin de determinar el tiempo óptimo de interacción del electrodo GC-MWCNT-Med con una solución 3mM de NADH, se utilizó voltametría cíclica para obtener las corrientes de pico electrocatalíticas y no electrocatalíticas. Para ello, se aisló en una celda con buffer B-R pH 7.00 el par redox NO/NHOH de los grupos nitro de los mediadores encapsulados en un electrodo GC-MWCNT para generar

los mediadores 3,5-DNBF(I), CM4(I) y CM4(II) y sin tiempo de acumulación previo de NADH, los electrodos se sumergieron durante 10, 30, 45, 55, 60, 65 y 70 segundos en una solución NADH 3mM en buffer B-R pH 7.00. Para cada tiempo el experimento fue hecho en triplicado y el electrodo fue descartado tras cada medición. Los resultados se muestran en la figura 26 para 3,5-DNBF(I), figura 27 para CM4(I) y figura 28 para CM4(II)



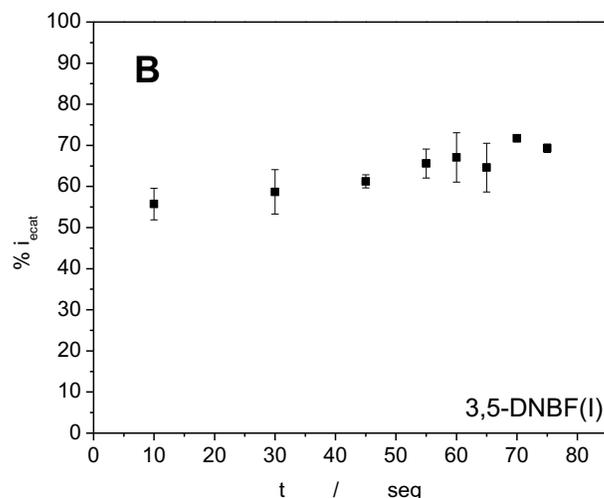


Figura 26. A. Voltamogramas cíclicos de la electrocatalisis de NADH a diferentes tiempos de interacción del electrodo GC-MWCNT con mediador 3,5-DNBF(I) encapsulado **B.** $\%i_{ecat}$ con respecto al tiempo de interacción del electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) con NADH 3mM ($E_0= -0.2$ V, $E_H= +0.6$ V, $E_L= -0.2$ V).

En la figura 26 A, se observa los voltamogramas obtenidos a diferentes tiempos de interacción con la solución de NADH. En la figura 26 B se expresa el $\%i_{ecat}$ con respecto al tiempo. La señal de NADH electrocatalizado ($NADH_{ecat}$) aumenta levemente con el aumento del tiempo de interacción del electrodo GC-MWCNT-3,5-DNBF. En todo el rango estudiado de tiempo, los aumentos de la intensidad de corriente de $NADH_{ecat}$ no son significativos, por lo que se puede considerar que aproximadamente 1 minuto de interacción del electrodo con la solución de NADH 3 mM es suficiente para obtener intensidades de corriente constantes, el cual corresponde a aproximadamente 65% de i_{ecat} y para obtener un error menor de variación de la corriente electrocatalítica producto del tiempo de inmersión. Se elige $t = 55$ segundos para que sea similar al tiempo de inmersión de CM4(II).

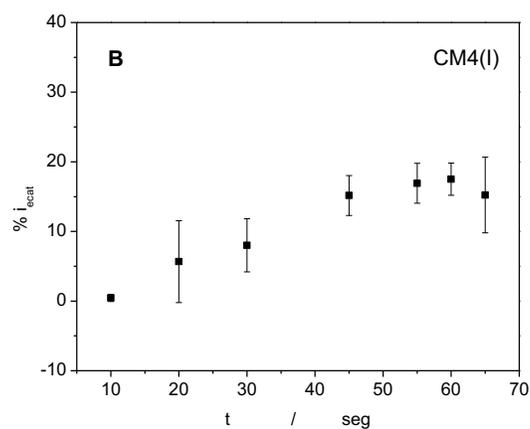
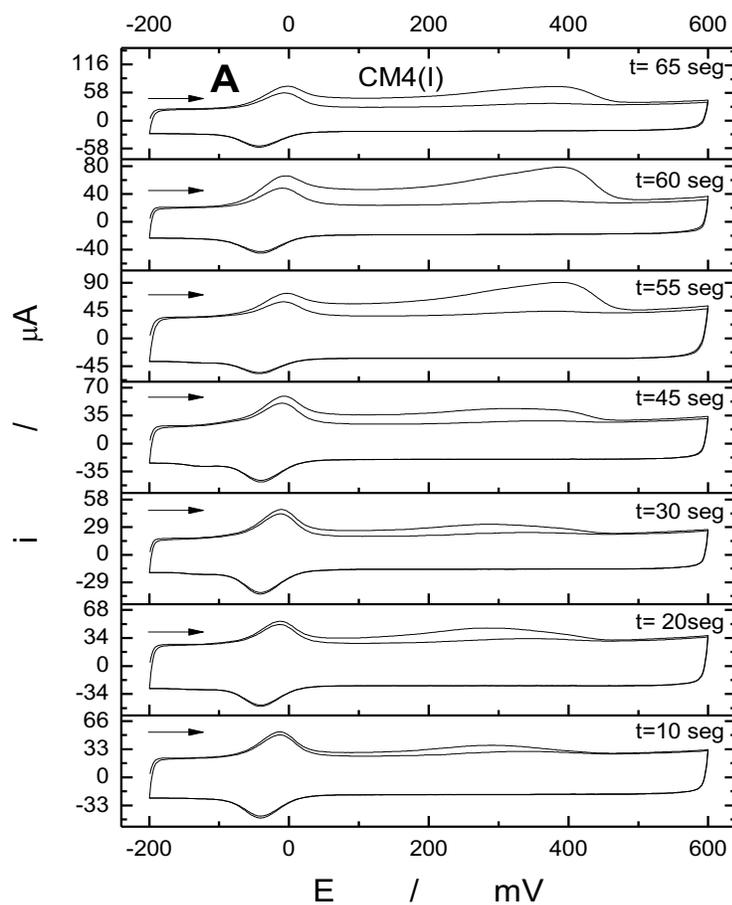


Figura 27. A. Voltamogramas cíclicos de la electrocatalisis de NADH a diferentes tiempos de interacción del electrodo GC-MWCNT con mediador CM4(I) encapsulado **B.** % i_{cat} con respecto al tiempo de interacción del electrodo GC-MWCNT-CM4(I) con NADH 3mM ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).

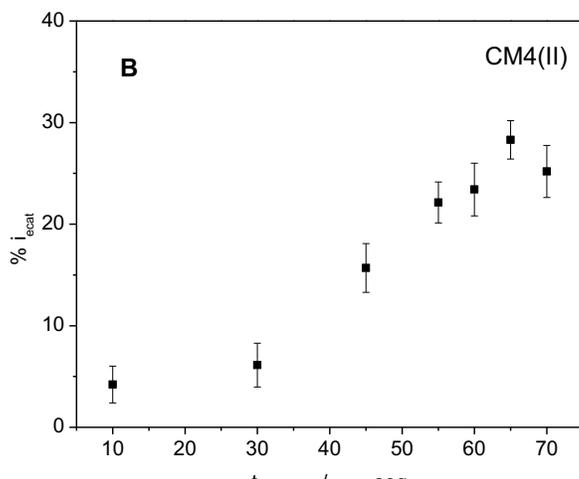
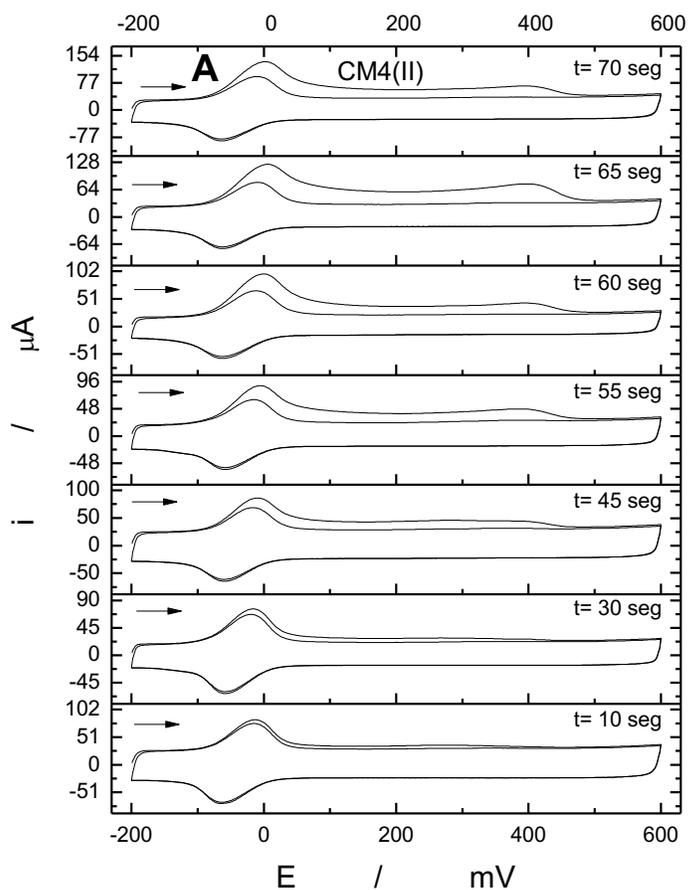


Figura 28. A. Voltamogramas cíclicos de la electrocatalisis de NADH a diferentes tiempos de interacción del electrodo GC-MWCNT con mediador CM4(II) encapsulado **B.** % i_{cat} con respecto al tiempo de interacción del electrodo GC-MWCNT-CM4(II) con NADH 3mM ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).

En la figura 27 A y 28 B, se muestran los voltamogramas para CM4(I) y CM4(II) respectivamente a diferentes tiempos de acumulación con NADH 3 mM, en donde los primeros 30 segundos no se puede afirmar con seguridad de que existe electrocatalisis. Para el caso de CM4(I) y CM4(II), la intensidad de i_{ecat} aumenta gradualmente. El *plateau* electrocatalítico para CM4(I) se obtiene a los 55 segundos con un 17 % de i_{ecat} y para CM4(II) a los 60 segundos con un 23% de i_{ecat} , lo que indica que son tiempos óptimos de interacción.

También es posible señalar que la aparición de NADH no electrocatalizado en el caso de 3,5-DNBF(I) (figura 26 A) y CM4(I) (figura 27 A) se observó en todos los tiempos estudiados, lo que indica que el nitrocompuesto encapsulado en la red de nanotubos no electrocataliza todo el NADH que logra moverse mediante difusión desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo, por lo que podría considerarse que la concentración de NADH es alta para el mediador encapsulado. Para el caso de CM4(II) (figura 28 A), a partir de los 45 segundos de interacción, se observa la aparición de la señal de NADH no electrocatalizado, por lo que a tiempos menores a lo indicado, el mediador es capaz de electrocatalizar todo el NADH de la superficie del electrodo antes de la reposición de NADH desde el seno de la solución.

Según los % de corriente electrocatalítica respecto al tiempo de interacción, los tres mediadores presentan tiempos similares de interacción. 3,5-DNBF(I) presenta % i_{ecat} mayor con un 65%, mientras que CM4(I) es el mediador con % i_{ecat} menor.

En la tabla VIII se muestran los resultados obtenidos.

Tabla VIII. Tiempo de interacción óptimo del electrodo GC-MWCNT-Med en una solución de NADH 3mM pH 7.00 en buffer B-R y % i_{ecat} obtenido a ese tiempo de interacción.

	3,5-DNBF(I)	CM4(I)	CM4(II)
Tiempo óptimo de interacción (s)	55	45	55
% i_{ecat}	65	17	23

5.10. Variación del pH en el experimento de electrocatálisis.

La reacción de oxidación de NADH (ecuación 12) es pH dependiente producto del equivalente entregado en la transferencia electrónica, es por ello que el pH del medio influye directamente en la electrocatálisis.

Para determinar el rango de pH donde ocurre electrocatálisis, se lleva a cabo mediante voltametría cíclica barridos a pH entre 4 y 8 con una unidad de pH de incremento en ambas celdas de trabajo. Para ello se utilizó un electrodo GC-MWCNT-Med, aislando previamente en una celda con buffer B-R, el par redox NO/NHOH con el fin de generar los mediadores 3,5-DNBF(I), CM4(I) y CM4(II). Posteriormente se sumerge el electrodo en una solución 3mM de NADH en buffer B-R. Para el caso de 3,5-DNBF(I) se utilizan 55 segundos de tiempo de acumulación, para CM4(I) se utilizan 45 segundos y para CM4(II) 55 segundos.

En la figura 29 se muestran los resultados para 3,5-DNBF(I), en la figura 30 para CM4(I) y en la figura 31 para CM4(II).

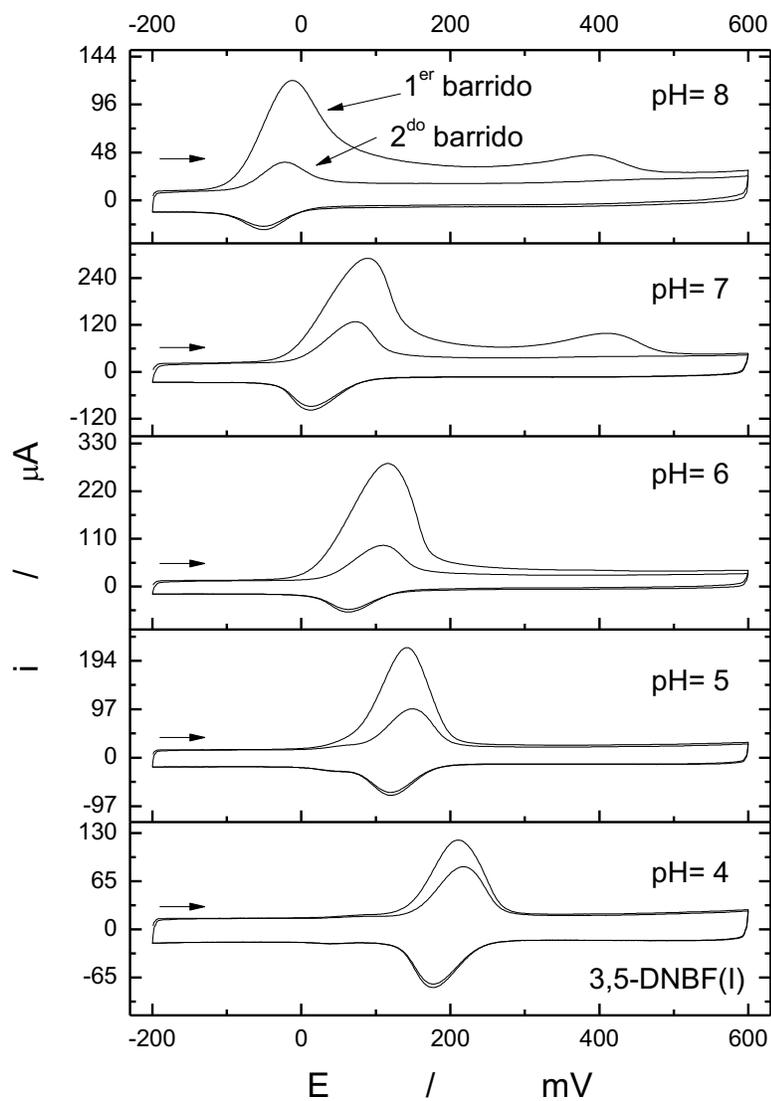


Figura 29. Voltamogramas cíclicos obtenidos a diferentes pH para la electrocatálisis realizada con un electrodo GC-MWCNT con mediador encapsulado 3,5DNBF(I) sobre NADH 3mM en buffer B-R 0.1M ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).

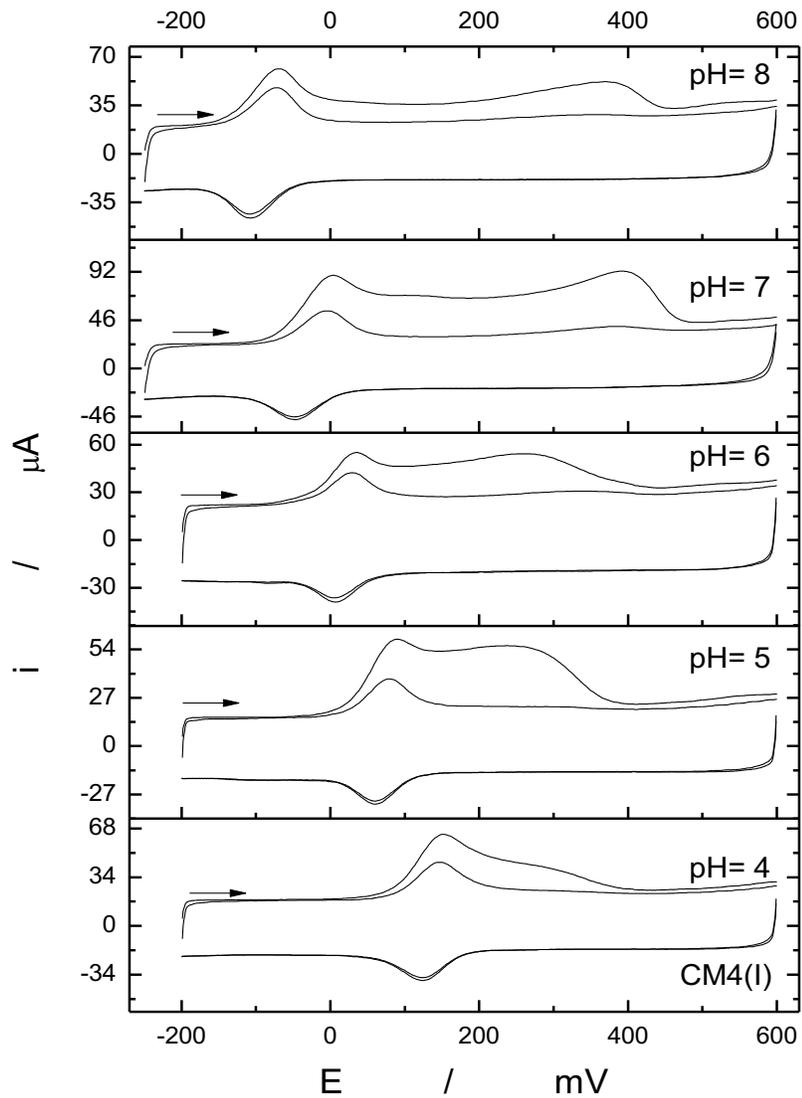


Figura 30. Voltamogramas cíclicos obtenidos a diferentes pH para la electrocatálisis realizada con un electrodo GC-MWCNT con mediador encapsulado CM4(I) sobre NADH 3mM en buffer B-R 0.1M ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).

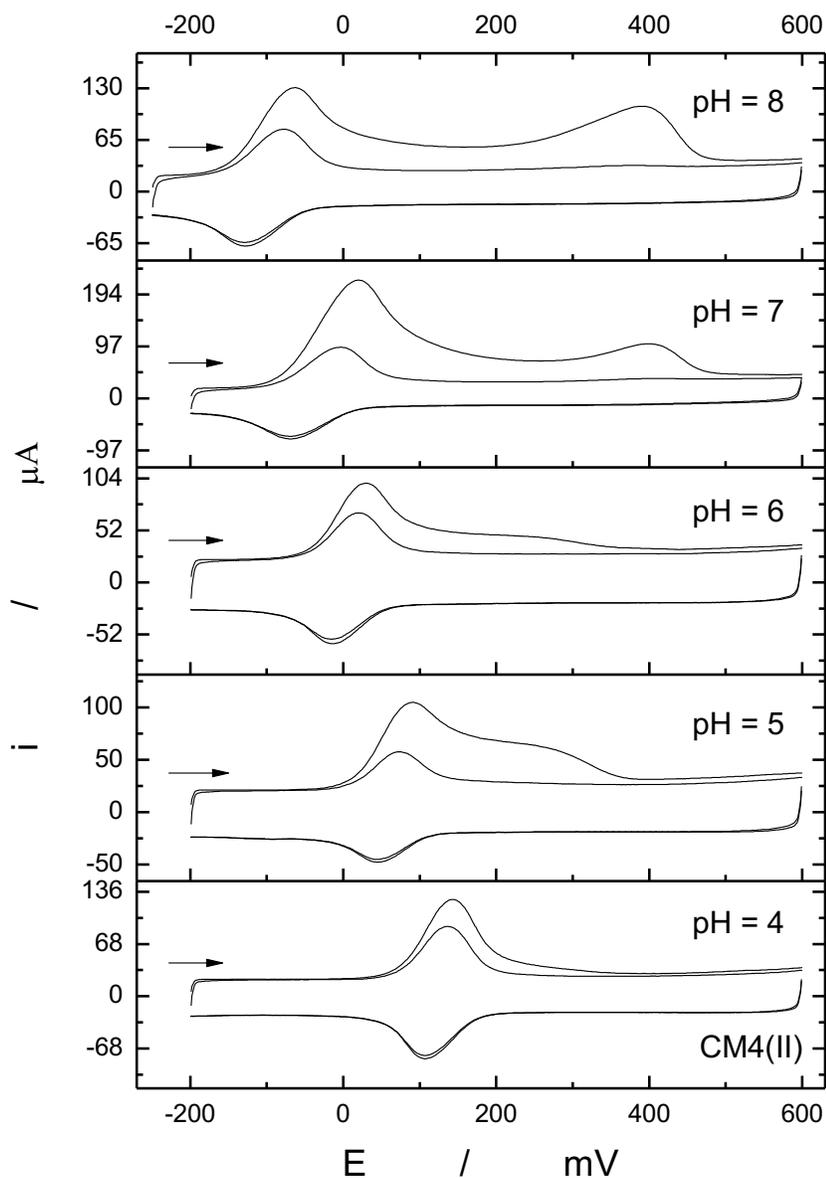


Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtenidos a diferentes pH para la electrocatálisis realizada con un electrodo GC-MWCNT con mediador encapsulado CM4(II) sobre NADH 3mM en buffer B-R 0.1M ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).

En las figuras 29, 30 y 31 se observa que para todo el rango de pH estudiado, se obtiene electrocatálisis de NADH. A pH ácidos, las señales electrocatalíticas se desplazan a potenciales más positivos por la presencia de una mayor concentración

de H^+ en el seno de la solución, mientras que a pH básicos, las señales de NADH electrocatalizado y de NADH sin electrocatalizar se separan. Esto es debido a que la señal de los pares redox NO/NHOH se desplaza a potenciales cercanos a cero a medida que aumenta el pH y por ende, la señal de NADH electrocatalizado también se desplaza.

5.11. Rango de pH de electrocatálisis.

El interés en la obtención de un biosensor es que pueda ser utilizado a pH neutros o cercanamente neutros. NADH es una molécula involucrada en diferentes procesos biológicos por lo que el pH de electrocatálisis óptimo debiese ser cercano a 7.00.

Con el fin de obtener el pH óptimo de electrocatálisis, se lleva a cabo mediante voltametría cíclica barridos de pH 6 a 8 con un incremento aproximado de 0.2 unidades de pH para ambas celdas utilizadas. Se usaron electrodos GC-MWCNT-Med, donde se aisló el par redox previamente en una celda que sólo contiene buffer B-R, para generar las especies 3,5-DNBF, CM4(I) y CM4(II). A continuación, el electrodo se sumergió a una celda con NADH 3mM preparado en buffer B-R. Para el caso de 3,5-DNBF se utilizan 55 s de inmersión, para CM4(I) se utilizan 45 s y para CM4(II) 55 s.

Los resultados son mostrados en la figura 32 A para 3,5-DNBF(I), 32 B para CM4(I) y 32 C para CM4(II).

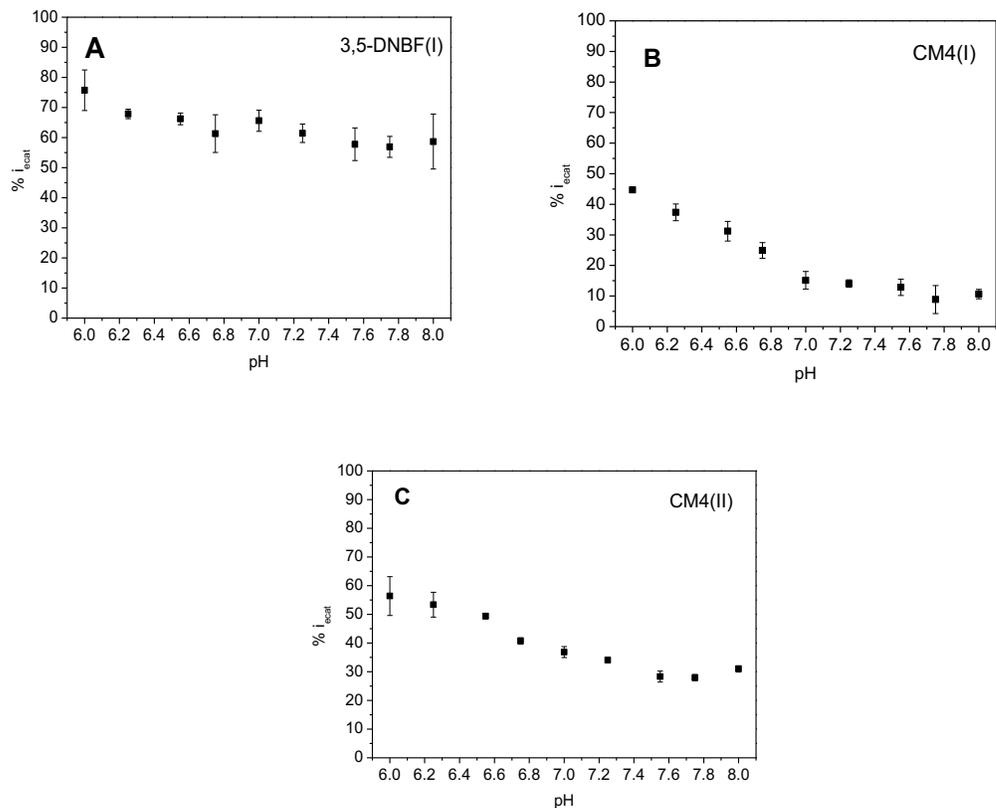


Figura 32. Gráficos $\%i_{cat}$ vs pH para la electrocatalisis de NADH 3mM preparado en buffer B-R con un electrodo GC-MWCNT con mediador encapsulado donde A. 3,5-DNBF(I). B. CM4(I). C. CM4(II). ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).

En la figura 32, se observa que para todos los casos, el mayor $\%i_{cat}$ se obtiene a pH 6.00, debido a la mayor presencia de H^+ en la celda de NADH 3mM.

Para el caso de 3,5-DNBF (figura 32 A), la $\%i_{cat}$ se mantiene relativamente constante desde pH 6.20 a pH 7.25, lo que indica que no hay un aumento significativo en el $\%i_{cat}$ en valores cercanos a pH 7.00, por lo que de pH 6.20 a pH 7.25 es un rango de pH adecuado de trabajo. En el caso de CM4(I) (figura 32 B) y

CM4(II) (figura 32 C), el pH en la electrocatálisis de NADH es mucho más influyente que en el caso de 3,5-DNBF. El rango de pH óptimo para experimentos posteriores de pH 7.00 a 8.00 para CM4(I). Para CM4(II) se observa una variación desde pH 6.00 a 7.25 y se observa que hay una zona relativamente lineal desde pH 7.50 a 8.00. A pesar del resultado obtenido, se elige pH de electrocatálisis de 7, ya que ese pH es el más adecuado para electrocatalizar moléculas biológicas.

Debido a la similitud del rango de pH para los tres mediadores estudiados, se elige pH 7 de electrocatálisis para los experimentos posteriores.

En la tabla IX se muestra un resumen de los valores obtenidos.

Tabla IX. pH adecuado para electrocatálisis para los mediadores 3,5-DNBF, CM4(I) y CM4(II).

	3,5-DNBF	CM4(I)	CM4(II)
pH óptimo electrocatálisis	6.20 a 7.25	7.00 a 7.55	7.25 a 8.00

5.12. Variación de concentración de NADH/Med.

La cantidad de mediador encapsulado en los nanotubos de carbono es determinante de la electrocatálisis de NADH, ya que a mayor cantidad de mediador, más NADH puede ser electrocatalizado.

En el caso de los mediadores estudiados se tienen dos situaciones diferentes:

- Para 3,5-DNBF 0.3mM, el electrodo se encuentra saturado de mediador, por lo que indica que la difusión desde la solución modificante hasta la superficie del electrodo es rápida. Debido a la alta solubilidad del compuesto en acetonitrilo, es posible modificar la concentración de la solución.
- Para CM4 0.048 mM, el electrodo no se encuentra saturado de mediador, producto de la baja concentración de la solución modificante. En el caso de CM4, no es posible modificar la concentración de la solución modificante, debido a la baja solubilidad en acetonitrilo. En metanol, etanol y dimetil sulfóxido no se observa disolución.

Dada las razones anteriores, se realizaron dos experimentos distintos para cada situación.

5.12.1. Concentración mínima de 3,5-DNBF.

Con el fin de determinar la concentración mínima de mediador para la electrocatálisis de NADH, se prepararon soluciones de 3,5-DNBF en acetonitrilo de 0.3, 0.8, 1.0 y 1.2 mM, en donde se sumergieron electrodos GC-MWCNT y se aisló el par redox NO/NHOH en una celda que contiene sólo buffer B-R 0.1mM pH 7.00.

A continuación, se sumergió el electrodo en una solución de NADH 3mM en buffer B-R pH 7.00 con un tiempo de acumulación de 55 segundos. Los resultados son mostrados en la figura 33.

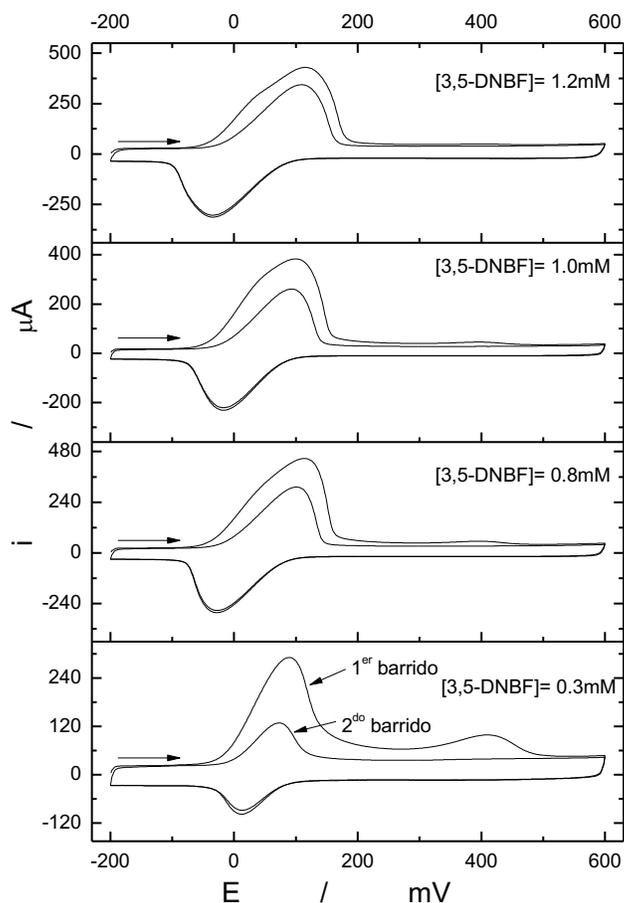


Figura 33. Voltamogramas cíclicos obtenidos para un electrodo GC-MWCNT-3,5-DNBF(I), modificado con soluciones de diferentes concentraciones de precursor 3,5-DNBF sobre NADH 3mM en buffer B-R pH 7.00 ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).

En la figura 33 se observa que a medida que aumenta la concentración de la solución modificante de 3,5-DNBF, la intensidad de la señal de NADH sin electrocatalizar disminuye hasta finalmente desaparecer cuando el electrodo GC-MWCNT-35DNBF es modificado con una solución 1.2mM, sin embargo, el ancho

de las señales de electrocatálisis aumenta dejando de ser gaussianas, lo que indica que la concentración del mediador es muy alta.

Para ajustar la concentración de mediador, se calculó la razón entre la concentración de NADH en la celda y la concentración de 3,5-DNBF en la solución modificadora, obteniéndose que la concentración de NADH debe ser 2.5 veces mayor que la de 3,5-DNBF. Para comprobar esto, se modificó un electrodo GC-MWCNT con una solución 0.3mM de 3,5-DNBF en acetonitrilo y posteriormente se colocó en una celda con NADH 0.75mM, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente (figura 34).

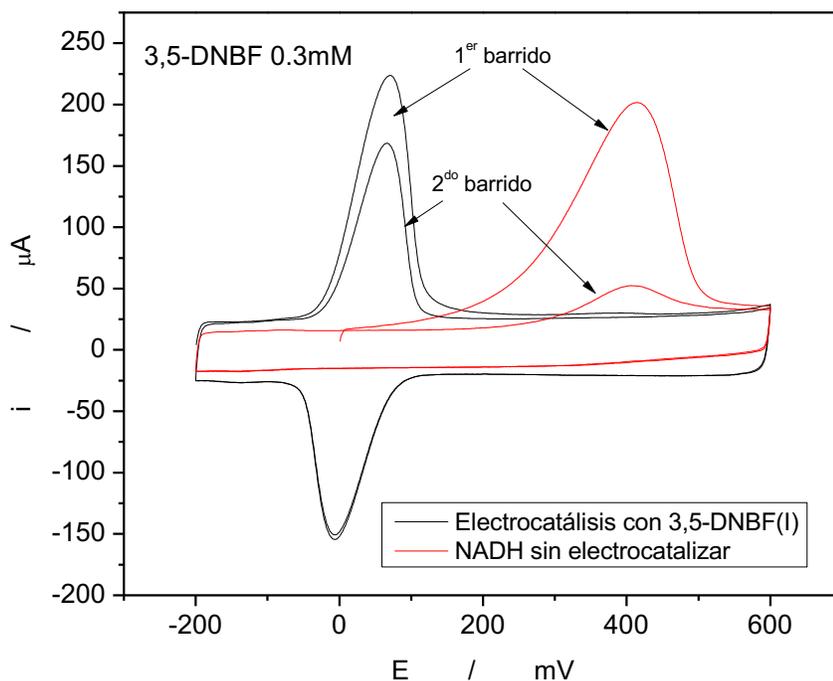


Figura 34. Voltamograma cíclico obtenido para la electrocatálisis realizada con un electrodo con mediador GC-MWCNT-35DNBF(I), modificado con una solución 0.3mM de 3,5-DNBF en acetonitrilo sobre NADH 0.75mM en buffer B-R pH=7.00 ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).

En la figura 34 se observa la ausencia de la señal de NADH sin electrocatalizar, lo que indica que el mediador encapsulado es capaz de electrocatalizar todo el NADH proveniente de la solución y que el tiempo transcurrido después de la oxidación no es suficiente para que migre NADH desde la solución. Lo anterior comprueba que la razón NADH/3,5-DNBF es de 5/2 para obtener electrocatálisis completa.

5.12.2. Concentración mínima de NADH para ser electrocatalizado por CM4.

Debido a la baja solubilidad de CM4 en acetonitrilo (0.02 mg/mL), es difícil modificar la concentración del precursor para determinar la concentración adecuada de CM4 que electrocataliza todo el NADH en la superficie del electrodo, sin embargo, se puede modificar la concentración de NADH para encontrar la razón NADH/Med.

Para determinar la concentración mínima de NADH para llevar a cabo electrocatálisis completa en la superficie del electrodo, se prepararon diferentes soluciones de NADH de concentración 0.1, 0.3, 0.4, 0.5, y 3 mM en buffer B-R pH 7.00. Se modificó un electrodo GC-MWCNT con una solución 0.048mM de CM4 en acetonitrilo y se redujeron selectivamente los grupos nitro para obtener los mediadores CM4(I) y CM4(II) en una celda que contiene sólo buffer B-R pH 7.00. Posteriormente el electrodo es sumergido en las soluciones de NADH con un tiempo de acumulación de 45 segundos para CM4(I) y de 55 segundos para CM4(II). Los resultados se muestran en la figura 35 para CM4(I) y en la figura 36 para CM4(II).

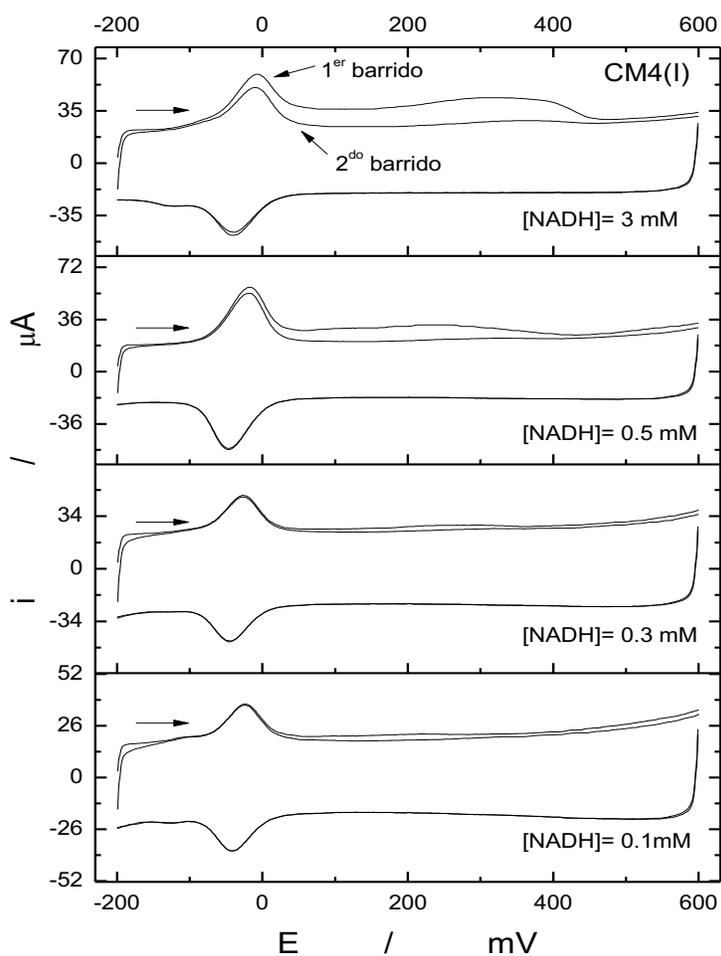


Figura 35. Voltamogramas cíclicos obtenidos para un electrodo con mediador GC-MWCN-CM4(I), modificado sobre NADH a diferentes concentraciones en buffer B-R pH 7.00 ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).

Para el caso de CM4(I), en la figura 35 se observa que a medida que disminuye la concentración de NADH, disminuye la intensidad de corriente de NADH sin electrocatalizar, sin embargo, la señal no desaparece al sumergir el electrodo en una solución de NADH 0.1mM. A partir de NADH 0.3mM no es posible determinar si existe electrocatalisis debido a que la i_{ecat} no se logra distinguir de la corriente de oxidación del derivado hidroxilamina, por lo que la concentración de NADH en la

solución puede ser muy baja y el tiempo de migración bajo esas condiciones no es suficiente para cubrir la superficie del electrodo.

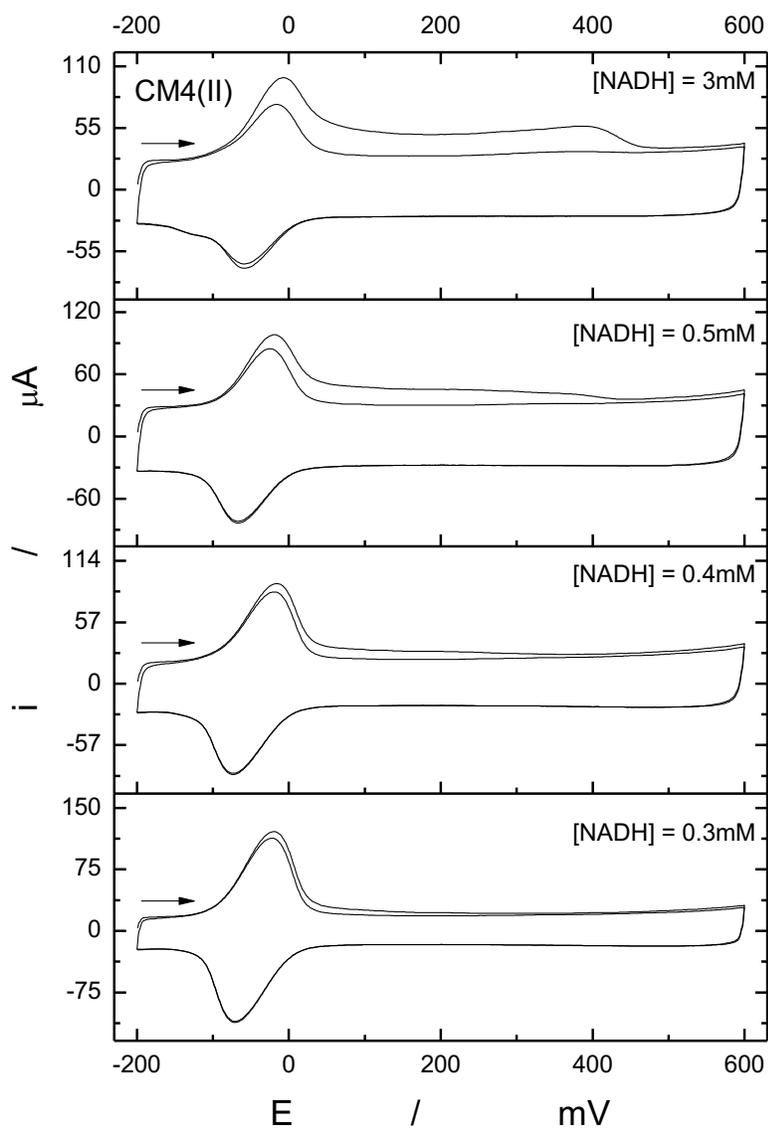


Figura 36. Voltamogramas cíclicos obtenidos para un electrodo con mediador GC-MWCN-CM4(II), modificado sobre NADH a diferentes concentraciones en buffer B-R pH 7.00 ($E_0 = -0.2$ V, $E_H = +0.6$ V, $E_L = -0.2$ V).

En la figura 36 se muestra la electrocatálisis para CM4(II). Al igual que con CM4(I), la disminución de la concentración de NADH también disminuye la intensidad de

corriente de NADH no electrocatalizado. A NADH 0.3mM se observa la desaparición de la señal de NADH sin electrocatalizar, por lo tanto es la concentración óptima para la electrocatálisis. Además, se distingue la corriente de NADH electrocatalizado del par redox NO/NHOH. La concentración de NADH presente en la superficie del electrodo durante el tiempo de contacto debe ser 6.25 veces mayor que la concentración de la solución modificante de CM4(II), lo cual indica que CM4(II) necesita mayor cantidad de NADH que 3,5-DNBF para poder observar electrocatálisis.

5.13 Curva de calibración.

La función de un biosensor es captar el cambio de la concentración de algún sustrato con el que se encuentre en contacto⁴⁴. La sensibilidad de un método es importante para un biosensor, ya que de ello dependerá su utilidad.

Para determinar un rango en donde los mediadores electrocatalíticos presentan una respuesta lineal, se llevó a cabo mediante la técnica de voltametría cíclica un estudio de la i_{ecat} en función de la variación de concentración de NADH. Para ello, se aisló el par redox de los mediadores en una celda con B-R 0.1M pH 7.00 y se generaron las especies 3,5-DNBF(I) y CM4(II), y se midieron en una celda con NADH en buffer B-R 0.1M pH 7.00. Todas las medidas se hicieron con concentraciones que van desde 0.1mM hasta 0.6mM de NADH para el mediador 3,5-DNBF(I), y con rango de concentración de 0.3mM hasta 1.4mM para CM4(II). Cada medición de la curva de

calibración fue hecha en triplicado. Los resultados se muestran en la figura 37 A para 3,5-DNBF(I) y 37 B para CM4(II).

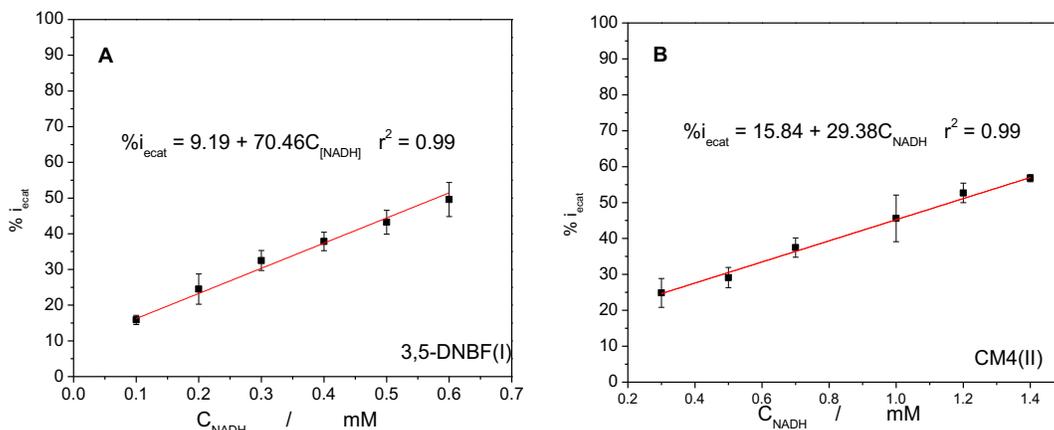


Figura 37. Curvas de calibración obtenidas a diferentes concentraciones de NADH preparado en buffer B-R para los mediadores encapsulados en un electrodo GC-MWCNT con mediador encapsulado **A.** 3,5-DNBF(I) **B.** CM4(II).

Las figuras anteriores muestran una buena linealidad para ambos casos. La ecuación 11 muestra la curva de calibración de 3,5-DNBF y la ecuación 12 para CM4(II) donde se muestra la concentración de NADH en función de %i_{ecat}, cuyo valor es calculado según la ecuación 9.

$$\%i_{ecat} = 9.19 + 70.46 \cdot C_{[NADH]} \quad r^2 = 0.999 \quad (11)$$

$$\%i_{ecat} = 15.84 + 29.38 \cdot C_{[NADH]} \quad r^2 = 0.999 \quad (12)$$

Los límites de detección (ecuación 13) y de cuantificación (ecuación 14) se calculados de la siguiente manera:

$$\text{Limite detección} = \text{Señal blanco} + 3S_B \quad (13)$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \text{Señal blanco} + 10S_B \quad (14)$$

Debido a la ausencia de blanco producto de la presencia del mediador en el electrodo como parte del sistema, el cual da respuesta electroquímica producto de la formación del par redox, es necesario obtener la desviación estándar del blanco (S_B) a través de un método computacional. Usando Origin versión 8 se puede obtener S_B a través de la ecuación 15⁵¹, la cual se hace computacionalmente:

$$S_B = \frac{S_{(x/y)w}}{b} \left\{ \frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_w)^2}{b^2(\sum_i w_i y_i^2 - n\bar{x}_w^2)} \right\} \quad (15)$$

Dónde:

- n : Número de datos utilizados.
- b : Pendiente en el origen de la recta ponderada.
- $S_{(x/y)w}$: Desviación estándar media ponderada.
- y_0 : Valor experimental de y ponderado.
- w_0 : Ponderaciones de y_0 .
- y_i : y ponderado.
- w_i : Ponderaciones de y_i .
- \bar{x}_w : Centro de gravedad ponderado de x .
- \bar{y}_w : Centro de gravedad ponderado de y .

Para el caso de 3,5-DNBF, la sensibilidad de la curva es de $70.46 \%i_{\text{ecat}}/C_{\text{NADH}}$. Se obtuvo un límite de detección es de $22.3\mu\text{M}$, lo que indica la concentración más baja de NADH que el electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) puede captar mientras que el límite de cuantificación es de $74.2\mu\text{M}$, cuyo valor es la concentración más baja capaz de ser detectada y cuantificada por el electrodo.

Para CM4(II) se obtiene una sensibilidad de $29.38 [\%i_{\text{ecat}}/ [\text{NADH}]$, un límite de detección de $45.3\mu\text{M}$ y un límite de cuantificación de $151.1\mu\text{M}$.

El electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) tiene los límites de detección y cuantificación más bajos, lo que lo hace adecuado para experimentos con concentraciones bajas de NADH, además, es mucho más sensible a cambios de concentraciones pequeños de NADH que el electrodo GC-MWCNT-CM4(II).

El rango lineal obtenido para el electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) comprende entre los 0.1mM y 0.6mM de NADH, mientras que para GC-MWCNT-CM4(II) es de 0.3mM hasta 1.4mM de NADH. La diferencia se debe a que para CM4(II) no se observa electrocatálisis a concentraciones bajas de NADH, por lo que se hizo la curva de calibración con concentraciones altas de NADH. El intercepto para GC-MWCNT-35DNBF(I) es de $9.19\%i_{\text{ecat}}$ mientras que para GC-MWCNT-CM4(II) es de $15.84\%i_{\text{ecat}}$. El coeficiente de correlación indica una buena correlación de los datos para ambos electrodos (0.99 para ambos electrodos en estudio).

Bajo los parámetros discutidos anteriormente, el electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) resulta mejor para estudiar NADH que GC-MWCNT-CM4(II) con respecto a los límites de detección, cuantificación y sensibilidad.

En la tabla X se muestran las técnicas, potenciales de electrocatálisis y límites de detección de otros biosensores para la oxidación de NADH:

Tabla X. Técnica, potenciales de electrocatálisis y límites de detección para diferentes electrodos.

Electrodo	Técnica	Potencial de electrocatálisis /V	Límite de detección /μM
GC-CNF⁴⁵	Amperometría	+0.32 (PBS pH 7.00)	11
GC-Grafeno⁴⁶	Amperometría	+0.5 (PBS pH 7.4)	20
GC-BGMC⁴⁷	Amperometría	+0.046 (PBS pH 7.2)	1
GC-IL-Grafeno-chitosan⁴⁸	Amperometría	+0.45 (PBS pH 7.4)	5
CPE-NiONPs⁴⁹	Cronoamperometría	+0.4 (PBS pH 7.4)	76
GC-PP-MWCNT⁵⁰	Amperometría	+0.6 (PBS pH 7.00)	12
GC-MWCNT-35DNBF(I)	Voltametría cíclica	+0.083 (B-R pH 7.00)	22
GC-MWCNT-CM4(II)	Voltametría cíclica	+0.038 (B-R pH 7.00)	45

CNF carbon nanofiber, BGMC bicontinuous gyroidal mesoporous, IL ionic liquid. NiONPs NiO nanoparticles, CPE carbon paste electrode, PP dyphenil alanine peptide, PBS buffer fosfato salino.

De acuerdo a la tabla X, otros electrodos tienen límites de detección mucho más bajos, sin embargo, los potenciales de electrocatálisis para los electrodos

estudiados GC-MWCNT-Med son cercanos a 0V, por lo que requiere menos energía para la oxidación de NADH. El electrodo GC-MWCNT-CM4(II) electrocataliza a potenciales más cercanos a 0 que el electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I), lo que resulta en una ventaja. Otra diferencia importante es el tiempo preparación de los electrodos, ya que requiere tiempos cortos de modificación y encapsulamiento del precursor en la red de nanotubos de carbono; la preparación de los electrodos por el método de dipping tiene dos ventajas importantes:

- Se pueden encapsular moléculas insolubles en medios acuosos en la red de nanotubos y llevar a cabo reacciones redox en medios acuosos.
- Un mayor rendimiento en las medidas, ya que al ser de fácil preparación, se pueden utilizar más electrodos en un tiempo corto de trabajo.

Bajo los parámetros anteriormente discutidos, los electrodos GC-MWCNT-35DNBF(I) y GC-MWCNT-CM4(II) pueden ser considerados potenciales biosensores electroquímicos para el monitoreo de la oxidación de NADH.

En la tabla XI se muestra un resumen de los datos obtenidos.

Tabla XI. Valores analíticos obtenidos para electrodos GC-MWCNT-Med, donde Med 3,5-DNBF(I) o CM4(II).

	3,5DNBF(I)	CM4(II)
Sensibilidad / %i_{ecat} μM^{-1}	70.46	29.38
Intercepto / %i_{ecat}	9.19	15.84
Límite de detección / μM	22.3	45.3
Límite de cuantificación / μM	74.2	151.1

6. CONCLUSIONES

- Se ha demostrado que los electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono encapsulan nitrocompuestos que pudieron ser caracterizados electroquímicamente.
- Debido a que los electrodos GC-MWCNT-Med pueden ser utilizados a pH neutro y los mediadores permanecen retenidos en la superficie del electrodo, pueden ser utilizados para electrocatálisis de NADH.
- En presencia de los mediadores encapsulados en los electrodos de trabajo, se observa un desplazamiento de la señal de oxidación de NADH hacia potenciales cercanos a 0 V, lo que indica que hay electrocálisis.
- La normalización de la corriente electrocatalítica permite trabajar con electrodos GC-MWCNT que presentan variaciones inter – electrodo producto de la cantidad de nanotubos de carbono en la superficie.
- El electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) es más sensible a la variación de la concentración de NADH que el electrodo GC-MWCNT-CM4(II), además de poseer límites de detección y cuantificación más bajo, por lo que lo convierte en un potencial sensor electroquímico para NADH.
- El electrodo GC-MWCNT-35DNBF(I) es mejor que los electrodos GC-MWCNT-CM4(I) y GC-MWCNT-CM4(II) para electrocatalizar NADH, ya que posee los $\%i_{\text{ecat}}$ más altos.

- El estudio hecho en esta memoria es un método rápido de laboratorio para determinar si un mediador presenta actividad electrocatalítica sobre una molécula de interés.

7. REFERENCIAS

1. Dinadayalane, T. and Leszczynski, J. Remarkable diversity of carbon-carbon bonds: structures and properties of fullerenes, carbon nanotubes, and graphene. *Structural Chemistry*, **2010**, *21(6)*, 1155-1169.
2. Russell, C. The electrochemical theory of Sir Humphry Davy. *Annals of Science*, **1959**, *15(1)*, 1-13.
3. Russell, C. The electrochemical theory of Sir Humphry Davy. *Annals of Science*, **1959**, *15(1)*, 15-25.
4. McCreery, R. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chemical Reviews*, **2008**, *108(7)*, 2646-2687.
5. Wang, J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews*, **2008**, *108(2)*, 814-825.
6. Wildgoose, G., Banks, C., Leventis, H. and Compton, R. Chemically Modified Carbon Nanotubes for Use in Electroanalysis. *Microchimica Acta*, **2005**, *152(3-4)*, 187-214.
7. Gooding, J. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. *Electrochimica Acta*, **2005**, *50(15)*, 3049-3060.
8. Zhou, M. and Guo, S. Electrocatalytic Interface Based on Novel Carbon Nanomaterials for Advanced Electrochemical Sensors. *Chem Cat Chem*, **2015**, *7(18)*, 2744-2764.
9. Vieira, R., Pham-Huu, C., Keller, N. and Ledoux, M. New carbon nanofiber/graphite felt composite for use as a catalyst support for hydrazine catalytic decomposition. *Chemical Communications*, **2002**, (9), 954-955.
10. Sobczak, A., Rębiś, T. and Milczarek, G. Electrocatalysis of NADH oxidation using electrochemically activated fluphenazine on carbon nanotube electrode. *Bioelectrochemistry*, **2015**, *106*, 308-315.
11. Yang, H. and McCreery, R. Elucidation of the Mechanism of Dioxygen Reduction on Metal-Free Carbon Electrodes. *Journal of The Electrochemical Society*, **2000**, *147(9)*, 3420-3428.
12. J.O'M. Bockris and S. Srinivasan, Fuel Cells: Their Electrochemistry, MG Crow-Hill, New York, 1969.
13. Horányi, G. Heterogeneous catalysis and electrocatalysis. *Catalysis Today*, **1994**, *19(2)*, 285-311.
14. Michman, M. Homogeneous vs. heterogeneous processes in electrocatalysis. Different types of catalysis in organic electrooxidation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **1996**, *107(1-3)*, 393-398.
15. Sierra-Rosales, P., Torres, R., Sepúlveda, C., Kogan, M. and Squella, J. Electrochemical Characterization and Electrocatalytic Application of Gold Nanoparticles Synthesized with Different Stabilizing Agents. *Electroanalysis*, **2017**, *30(2)*, 386-396.
16. Moses, P. Wier, L. and Murray, R. Chemically modified tin oxide electrode. *Analytical Chemistry*, **1975**, *47(12)*, 1882-1886.
17. Lydon, B., Germann, A. and Yang, J. Chemical modification of gold electrodes via non-covalent interactions. *Inorganic Chemistry Frontiers*, **2016**, *3(6)*, 836-841.

18. Uslu, B. and Ozkan, S. Electroanalytical Application of Carbon Based Electrodes to the Pharmaceuticals. *Analytical Letters*, **2007**, *40*(5), 817-853.
19. Sharma, S., Singh, N., Tomar, V. and Chandra, R. A review on electrochemical detection of serotonin based on surface modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, **2018**, *107*, 76-93.
20. Moscoso, R., Inostroza, E. and Squella, J. A non-conventional way to perform voltammetry. *Electrochemistry Communications*, **2017**, *81*, 61-64.
21. Moscoso, R., Carbajo, J. and Squella, J. 1, 3-Dioxolane: A green solvent for the preparation of carbon nanotube-modified electrodes. *Electrochemistry Communications* **2014**, *48*, 69-72.
22. Banerjee, S., Hemraj-Benny, T. and Wong, S. Covalent Surface Chemistry of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Advanced Materials*, **2005**, *17*(1), 17-29.
23. Bahr, J., Yang, J., Kosynkin, D., Bronikowski, M., Smalley, R. and Tour, J. Functionalization of Carbon Nanotubes by Electrochemical Reduction of Aryl Diazonium Salts: A Bucky Paper Electrode. *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, *123*(27), 6536-6542.
24. Fang, B., Zhang, N., Zhang, W., Gu, A. and Wang, G. A novel hydrogen peroxide sensor based on multiwalled carbon nanotubes/poly(pyrocatechol violet)-modified glassy carbon electrode. *Journal of Applied Polymer Science*, **2009**, *112*(6), 3488-3493.
25. Ensafi, A. and Karimi-Maleh, H. A Voltammetric Sensor Based on Modified Multiwall Carbon Nanotubes for Cysteamine Determination in the Presence of Tryptophan Using p-Aminophenol as a Mediator. *Electroanalysis*, **2010**, *22*(21), 2558-2568.
26. Liu, S., Dai, G., Yuan, L. and Zhao, Y. A NADH Sensor Based on 1,2-Naphthoquinone Electropolymerized on Multi-walled Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **2012**, *59*(11), 1409-1414.
27. Bilan, D. and Belousov, V. Genetically encoded probes for NAD⁺/NADH monitoring. *Free Radical Biology and Medicine*, **2016**, *100*, 32-42.
28. Gaude, E., Schmidt, C., Gammage, P., Dugourd, A., Blacker, T., Chew, S., Saez-Rodriguez, J., O'Neill, J., Szabadkai, G., Minczuk, M. and Frezza, C. NADH Shuttling Couples Cytosolic Reductive Carboxylation of Glutamine with Glycolysis in Cells with Mitochondrial Dysfunction. *Molecular Cell*, **2018**, *69*(4), 581-593.e7.
29. Radoi, A. and Compagnone, D. Recent advances in NADH electrochemical sensing design. *Bioelectrochemistry*, **2009**, *76* (1–2), 126-134
30. Deore, B. and Freund, M. Reactivity of Poly(aniline boronic acid) with NAD⁺ and NADH. *Chemistry of Materials*, **2005**, *17*(11), 2918-2923.
31. Ge, B., Tan, Y., Xie, Q., Ma, M. and Yao, S. (2009). 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.
32. Teymourian, H., Salimi, A. and Hallaj, R. Electrocatalytic oxidation of NADH at electro generated NAD⁺ oxidation product immobilized onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid nanocomposite: Application to ethanol biosensing. *Talanta*, **2012**, *90*, 91-98.

33. Moscoso, R., Barrientos, C., Moris, S. and Squella, J. Electrocatalytic oxidation of NADH in a new nanostructured interface with an entrapped butylpyrene nitroaromatic derivative. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2019**, 837(90), 48-54.
34. Moscoso, R., Carbajo, J., Mozo, J. and 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*, **2016**, 765, 149-154.
35. Mandal, S., Thompson, L. and Hanson, A. Binuclear antiferromagnetically-coupled hydroxo-bridged copper(II) complexes with positive reduction potentials and involving sequential two electron transfer at the same potential. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1985**, (23), 1709.
36. Fenton, R., Schroeder, R. and Lintvedt, R. A unique two-electron, reversible reduction of a binuclear copper(ii) complex. observation of the electrochemical behavior predicted by polcyn and shainfo the sequential transfer of two electrons at the same potential. *Chemischer Informations dienst*, **1978**, 9(27), 1931-1932
37. Silvester, D., Wain, A., Aldous, L., Hardacre, C. Compton, and R. Electrochemical reduction of nitrobenzene and 4-nitrophenol in the room temperature ionic liquid [C4dmim][N(Tf)2]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2006**, 596(2), 131-140.
38. Saleh, F., Rahnam, M. Takeyoshi, O. Lanqun, M. and Takeo, O. "Determination of formal potential of NADH/NAD⁺ redox couple and catalytic oxidation of NADH using poly(phenosafranin)-modified carbon electrodes." *Bioelectrochemistry*. **2011**, 80(2): 121-127.
39. R. 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.
40. Fischer, A. Electrode dynamics. Oxford Univ. Press: 1996
41. Karyakin, A., Karyakina, E., Schuhmann, W. and Schmidt, H. Electro polymerized Azines: Part II. In a Search of the Best Electrocatalyst of NADH Oxidation. *Electroanalysis*, **1999**, 11(8), 553-557.
42. Batchelor-McAuley, C., Kätelhön, E., Barnes, E., Compton, R., Laborda, and E. Molina, A. Recent Advances in Voltammetry. *Chemistry Open*, **2015**, 4(3), 224-260.
43. Santhiago, M., Lima, P., Santos, W., Oliveira, A. and Kubota, L. In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached to nanostructured platform for NADH electrooxidation. *Electrochimica Acta*, **2009**, 54(26), 6609-6616.
44. Kazemi-Darsanaki, R., Azizzadeh, A., Nourbakhsh, M., Raeisi, G. and Azizollahi Aliabadi, M. Biosensors: Functions and Applications. *Journal of Biology and Today's World*, **2013**, 2(1), 20-23.
45. Arvinte A, Valentini F, Radoi A, Arduini F, Tamburri E, Rotariu L, Palleschi G, and Bala C. The NADH electrochemical detection performed at carbon nanofibers modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, **2007**, 19(14), 1455–1459
46. Guo K, Qian K, Zhang S, Kong J, Yu C, and Liu B. Bio- electrocatalysis of NADH and ethanol based on graphene sheets modified electrodes. *Talanta*, **2011**, 85(2), 1174–1179.

47. You C, Xuewu Y, Wang Y, Zhang S, Kong J, Zhao D, and Liu B Electrocatalytic oxidation of NADH based on bicontinuous gyroidal mesoporous carbon with low overpotential. *Electrochemistry Communications*, **2009**, *11(1)*, 227–230.
48. Shan C, Yang H, Han D, Zhang Q, Ivaska A, and Niu L Electrochemical determination of NADH and ethanol based on ionic liquid-functionalized graphene. *Biosensors Bioelectronics*, **2010**, *25(6)*, 1504–1508.
49. Aydoğdu, G., Zeybek, D., Zeybek, B. and Pekyardımcı, Ş. Electrochemical sensing of NADH on NiO nanoparticles-modified carbon paste electrode and fabrication of ethanol dehydrogenase-based biosensor. *Journal of Applied Electrochemistry*, **2013**, *43(5)*, 523-531.
50. Yuan, J., Chen, J., Wu, X., Fang, K. and Niu, L. A NADH biosensor based on diphenylalanine peptide/carbon nanotube nanocomposite. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2011**, *656(1-2)*, 120-124.
51. Miller, J. C. Miller J. N Estadística para química analítica. Addison Wesley iberoamericana. Press: 1998