



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

“Decoración de nanotubos de carbono con óxidos de hierro
e inmovilización de la enzima glucosa oxidasa para su
aplicación en biosensores”

Tesis que presenta

Erbin Guillermo Uc Cayetano

En opción al título de

Doctor en Ciencias

(Materiales Poliméricos)

Directores de tesis

Dr. Francis Avilés Cetina

Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez

Mérida, Yucatán, México, Julio de 2015.

DECLARACION DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asigno para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la ley federal del derecho de autor y la ley de la propiedad industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho centro de investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de los correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida Yucatán, México; a 2 de Julio de 2015



Erbin Guillermo Uc Cayetano



**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS EN MATERIALES POLIMÉRICOS**

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado

**Decoración de nanotubos de carbono con óxidos de hierro e
inmovilización de la enzima glucosa oxidasa para su aplicación en
biosensores**

Perteneciente al Programa de Doctorado en Ciencias (Materiales Poliméricos) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Materiales bajo la dirección del Dr. Francis Avilés Cetina y del Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Índice

Agradecimientos	iv
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
Prefacio	xi
Introducción	xiii
Hipótesis y objetivos	xvi
Capítulo 1. Antecedentes	
1.1 Nanotubos de carbono.....	1
1.1.1 Clasificación y propiedades.....	1
1.1.2 Funcionalización y oxidación.....	2
1.1.3 Decoración.....	2
1.2 Enzimas y carbohidratos.....	3
1.2.1 Definición y clasificación.....	3
1.2.2 Glucosa, glucosa oxidasa y su mecanismo de reacción.....	4
1.2.3 Inmovilización de enzimas.....	5
1.3 Biosensores.....	7
1.3.1 Sensores de glucosa.....	8
1.3.2 Sensores de glucosa con nanotubos de carbono.....	11
1.4 Técnicas electroquímicas para la detección de glucosa.....	13
1.4.1 Voltametría cíclica.....	14
1.4.2 Espectroscopía de impedancia electroquímica.....	15

1.4.3 Cronoamperometría.....	18
Capítulo 2. Decoración de nanotubos de carbono con óxidos de hierro	
2.1 Introducción.....	19
2.2 Materiales.....	20
2.3 Métodos.....	20
2.3.1 Oxidación de nanotubos de carbono.....	21
2.3.2 Decoración de nanotubos de carbono	22
2.3.3 Técnicas de caracterización empleadas.....	23
2.4 Resultados.....	24
2.5 Caracterización fisicoquímica de nanotubos de carbono.....	24
2.5.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.....	24
2.5.2 Microscopía electrónica de transmisión.....	25
2.5.3 Análisis de área superficial por isothermas de adsorción de nitrógeno.....	26
2.5.4 Espectroscopía Raman.....	27
2.6 Decoración de nanotubos de carbono con partículas de óxidos de hierro.....	29
2.6.1 Microscopía electrónica de transmisión.....	29
2.6.2 Análisis por energía dispersiva de rayos X.....	32
2.6.3 Espectroscopía de rayos X.....	32
2.6.4 Análisis termogravimétrico.....	33
2.6.5 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X.....	35
2.6.6 Magnetometría de muestra vibrante.....	37
Capítulo 3. Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre nanotubos de carbono	
3.1 Introducción.....	40
3.2 Materiales.....	41

3.3 Métodos.....	41
3.3.1 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre nanotubos de carbono...	41
3.3.2 Caracterización fisicoquímica.....	42
3.3.3 Caracterización electroquímica.....	42
3.4 Resultados.....	44
3.4.1 Análisis electroquímico de nanotubos de carbono decorados con partículas de óxidos de hierro.....	44
3.4.2 Análisis fisicoquímico de la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre los nanotubos de carbono.....	47
3.4.3 Detección de glucosa por voltametría cíclica.....	53
3.4.4 Detección de glucosa por espectroscopía de impedancia electroquímica.....	59
3.4.5 Detección de glucosa por cronoamperometría.....	62
Conclusiones.....	66
Apéndice A: Variación de las condiciones experimentales en la decoración de nanotubos de carbono con nanopartículas de óxidos de hierro.....	68
Referencias.....	70

Agradecimientos

A Dios por todas sus bendiciones, y por permitirme concluir esta etapa, la más importante de mi formación académica.

A mi esposa Alejandra, por su amor, comprensión, apoyo incondicional y por la bendición compartida en nuestra pequeña hija Alyssa Valentina.

A mis padres, hermanos, sobrino y cuñado por estar siempre a mi lado y facilitarme el camino hacia mis sueños.

A la familia de mi esposa por su apoyo y cariño.

Al CONACYT por el apoyo económico a través de mi beca doctoral y a través de los proyectos de ciencia básica No. 220513 y CIAM No. 188089, a cargo del Dr. Avilés, quienes financiaron esta investigación.

A mi director de tesis, el Dr. Francis Avilés por su amistad, la oportunidad brindada, las enseñanzas, los consejos y el constante aprendizaje.

A mi codirector de tesis, el Dr. Juan V. Cauich, por el interés, seguimiento y su valiosa aportación en el trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Luis C. Ordoñez, por el apoyo y dirección brindados en la caracterización electroquímica y su valiosa aportación en el desarrollo de mi trabajo; a el Dr. Mark H. Rummeli, por sus valiosas revisiones y su ayuda en los análisis de microscopía.

Al Dr. Alejandro May Pat y la Lic. Rossana F. Vargas Coronado, por la asistencia técnica que me brindaron durante el desarrollo de mi trabajo.

Al M.C. Daniel Aguilar y la Dra. Patricia Quintana por las mediciones de difracción de rayos X realizadas en el LANNBIO del Cinvestav-Mérida, con el apoyo de los proyectos FOMIX-YUCATÁN 2008-108160 y CONACYT LAB-2009-01 No. 123913.

Al grupo de trabajo del Dr. Avilés, por su amistad, apoyo y enseñanzas compartidas.

A mis compañeros del CICY y la UMAT, profesores, técnicos y personal en general por los momentos compartidos.

Finalmente agradezco a mis revisores de tesis y miembros del sínodo, por su tiempo y amabilidad para la revisión de este trabajo.

Resumen

En este trabajo se estudia la decoración de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) con nanopartículas de óxidos de hierro y la posterior inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx) para su aplicación como sensores de glucosa. En particular, se investiga el papel de las partículas de óxidos de hierro en el funcionamiento del sensor.

Dos tipos de MWCNTs con características estructurales diferentes se oxidan por un método ácido (mezcla a 8.0 M de H_2SO_4 y HNO_3) con el fin de generar grupos funcionales (-OH, -CO y -COOH principalmente) en su superficie. Los MWCNTs oxidados se dispersan por agitación ultrasónica en trietilenglicol y se decoran con nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro, mediante la adición de cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a la solución en hidrólisis a alta temperatura. Antes de la inmovilización de la enzima GOx sobre los MWCNTs, se emplea 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida en combinación con N-hidroxisuccinimida para generar grupos amida en la superficie (afines a la enzima GOx) y de este modo generar la unión entre los MWCNTs y enzima. El éxito de las funcionalizaciones realizadas se estudia por diversas técnicas de caracterización fisicoquímica como espectroscopía de infrarrojo y energía dispersiva de rayos X.

La detección de glucosa se estudia por técnicas electroquímicas depositando en un electrodo de carbón vítreo una pequeña cantidad de MWCNTs (con y sin decoración de partículas de óxidos de hierro) con la enzima GOx inmovilizada, utilizado como electrodo de trabajo en un sistema de una celda electroquímica de tres electrodos. Este electrodo se pone en contacto con una disolución de buffer de fosfatos (electrolito) que contiene D(+)-glucosa disuelta a diferentes concentraciones. Los incrementos en las corrientes de oxidación y reducción obtenidos muestran que el sensado de glucosa es posible utilizando MWCNTs inmovilizados con la enzima GOx. Se observaron diferencias notables en la detección de glucosa entre los MWCNTs con y sin la decoración con partículas de óxidos de hierro.

Abstract

This PhD work studies the decoration of multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) with magnetic iron oxide nanoparticles and the subsequent immobilization of the enzyme glucose oxidase (GOx) for its use as a glucose sensor. The role of the iron oxide nanoparticles in the sensing properties is particularly investigated.

Two types of MWCNTs with different structural characteristics are oxidized by an acid method (mixture of 8.0 M H_2SO_4 and HNO_3) in order to generate oxygen-containing (-OH, -COOH and -CO) functional groups on its surface. Oxidized MWCNTs are dispersed by ultrasonic agitation in triethylene glycol and decorated with iron oxide magnetic nanoparticles by adding an iron precursor ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in the solution subjected to high temperature hydrolysis. Before GOx enzyme immobilization on the MWCNTs GOx, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide is used in combination with N-hydroxysuccinimide to generate amide groups on the MWCNTs surface and promoting covalent bonds between the MWCNTs and the GOx enzyme. Successful functionalization was proven by physicochemical characterization techniques.

Glucose sensing is investigated by electrochemical techniques, by depositing a small amount of MWCNTs (with and without decoration) containing immobilized GOx on a working glassy carbon electrode of an electrochemical cell of three electrodes. This electrode is soaked in a phosphate buffer solution (electrolyte) containing dissolved D(+)-glucose at different concentrations. The results show that glucose sensing is possible using MWCNTs with immobilized GOx enzyme. Significant differences in the glucose sensing features are observed when using MWCNTs with or without iron oxide particle decoration.

Lista de tablas

Tabla 2.1 Características fisicoquímicas de los MWCNTs estudiados.

Tabla 2.2 Tratamientos de decoración realizados a los MWCNTs y su identificación de acuerdo al tipo de MWCNT y concentración del precursor metálico.

Tabla 2.3 Valores característicos de los espectros Raman de los MWCNTs sin tratamiento y la deconvolución de la banda a $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$.

Tabla 3.1 Ajustes obtenidos en los cambios observados en las corrientes de oxidación y reducción de los procesos ante el sensado de glucosa.

Tabla A.1 Tratamientos adicionales realizados en la decoración de MWCNTs.

Lista de figuras

Fig. 1.1 Estructura química de la glucosa.

Fig. 1.2 Diferentes enfoques de inmovilización de la enzima GOx sobre los CNTs. a) Diagrama esquemático de adsorción física de la enzima alrededor de los CNTs, b) inmovilización covalente de la enzima sobre los CNTs a través de carbodiimida, c) funcionalización de los CNTs amidados con la enzima oxidada. [Yang et al., 2015]

Fig. 1.3 Productos no-invasivos para el monitoreo de glucosa en la sangre comercializados por OrSense © [OrSense, 2015].

Fig. 1.4. Esquema de la fabricación de un sensor de glucosa [Lin et al., 2004]. a) Tratamiento electroquímico de los CNTs (ensambles nanoelectrónicos), b) acoplamiento de la enzima GOx sobre los ensambles de CNTs.

Fig. 1.5. Esquema de una señal de excitación en VC [Bard y Faulkner, 2000; Atkins y De Paula, 2006].

Fig. 1.6. Esquema típico de un circuito eléctrico equivalente para un sistema con proceso de transferencia de carga simple con difusión de especies a la interface. Donde R_s es la resistencia de la disolución, CPE es el elemento de fase constante, n es el valor del exponente del elemento de fase constante y R_p es la resistencia de polarización.

Fig. 1.7. Ejemplo del ajuste logrado en los gráficos de Nyquist entre el ensayo de EIS experimental y el obtenido por el análisis del circuito equivalente.

Fig. 1.8. Descripción de un experimento cronoamperométrico. a) Perfil potencial-tiempo aplicado durante el experimento, E_i es el valor inicial y E_1 es el potencial donde ya no ocurre reducción, b) la respuesta correspondiente de la corriente debida a los cambios del potencial.

Fig. 2.1 Esquema de la metodología empleada para el desarrollo del trabajo.

Fig. 2.2 Espectros FT-IR de MWCNTs sin tratamiento (A y B) y oxidado tipo A (recuadro de la figura). Las etiquetas A y B corresponden a la Tabla 2.1.

Fig. 2.3 Micrografías TEM de los MWCNTs. a) Tipo A sin tratamiento, b) tipo B sin tratamiento, c) tipo A oxidado, d) tipo B oxidado.

Fig. 2.4 Isotermas de adsorción-desorción de N_2 para los MWCNTs sin tratamiento. El recuadro muestra un acercamiento del intervalo usado para calcular el área superficial S_{BET} .

Fig. 2.5 Espectros Raman de los MWCNTs sin tratamiento. a) Tipo A, b) tipo B. El recuadro muestra la deconvolución de la banda G.

Fig. 2.6 Micrografías TEM y distribución de diámetros de partículas de óxidos de hierro decorando los MWCNTs (Tipos A y B) con razones 1:1 y 1:2 (MWCNTs: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La identificación de los tratamientos corresponde a la Tabla 2.2.

Fig. 2.7 Patrones de difracción de rayos X de los MWCNTs oxidados y de los MWCNTs decorados con dos diferentes concentraciones de precursor metálico. a) MWCNTs del tipo A, b) MWCNTs del tipo B.

Fig. 2.8 Termogramas de TGA de los MWCNTs oxidados y decorados con diferente concentración en peso del precursor metálico. a) MWCNTs del tipo A, b) MWCNTs del tipo B.

Fig. 2.9 Espectros XPS de los MWCNTs (A y B) oxidados y decorados con distinta concentración de precursor metálico (1:1 y 1:2). a) MWCNTs del tipo A, b) orbital O 1s de los MWCNTs del tipo A, c) MWCNTs del tipo B, d) orbital O 1s de los MWCNTs del tipo B.

Fig. 2.10 Experimentos magnéticos usando MWCNTs (A y B) decorados con la concentración de precursor metálico 1:2. a) Tipo A solo oxidados, b) tipo A decorados, c) tipo B solo oxidados, d) tipo B decorados.

Fig. 2.11 Curvas de magnetización de los MWCNTs decorados con tratamientos de diferente concentración de precursor metálico (1:1 y 1:2). a) MWCNTs del tipo A, b) MWCNTs del tipo B.

Fig. 3.1 Celda electroquímica de tres electrodos utilizada en la caracterización electroquímica.

Fig. 3.2 Voltamperogramas de los MWCNTs B en PBS. a) MWCNTs sin tratamiento a diferentes velocidades de barrido, b) MWCNTs oxidados a 50 mV/s por 30 ciclos.

Fig. 3.3 Voltamperogramas (a 50 mV/s) en PBS para los diferentes tratamientos realizados a los MWCNTs. a) MWCNTs A, b) MWCNTs B.

Fig. 3.4 Análisis EDX de los tratamientos de inmovilización de la enzima GOx sobre los MWCNTs B decorados a diferentes concentraciones de la enzima GOx. a) 4 mg, b) 8 mg y c) 12 mg.

Fig. 3.5 Espectros FT-IR de la enzima GOx y los MWCNTs oxidados.

Fig. 3.6 Espectros FT-IR de los MWCNTs conteniendo GOx inmovilizada. a) MWCNTs oxidados y decorados con GOx inmovilizada, b) deconvolución de la región de 1700-1550 cm^{-1} para los MWCNTs oxidados, c) deconvolución de la región de 1700-1550 cm^{-1} para los MWCNTs decorados.

Fig. 3.7 Espectros FT-IR de los tratamientos de inmovilización realizados a los MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro a distintas concentraciones de la enzima GOx.

Fig. 3.8 Voltamperogramas cíclicos de los MWCNTs con la enzima GOx inmovilizada. a) MWCNTs oxidados, b) MWCNTs decorados con nanopartículas de óxidos de hierro. Velocidad de barrido 50 mV/s, en PBS (pH=7.4).

Fig. 3.9 Voltamperogramas cíclicos de MWCNTs con GOx inmovilizada en diferentes disoluciones electrolíticas a 50 mV/s. a) Oxidados y b) decorados con nanopartículas de óxidos de hierro. 1mM \approx 18 mg/dL.

Fig. 3.10 Variación en las densidades de corriente de oxidación y reducción de los MWCNTs oxidados y decorados con partículas de óxidos de hierro ante la presencia de glucosa. a) Oxidación, b) reducción.

Fig. 3.11 Gráficos de Nyquist para los MWCNTs obtenidos con una amplitud de 0.075 V eficaces a un potencial de -0.5 V en una disolución de 5 mM de glucosa en PBS.

Fig. 3.12 Valores obtenidos de los gráficos de Nyquist ajustados al modelo eléctrico propuesto para los MWCNTs con y sin GOx inmovilizada. a) Capacitancia de la doble capa eléctrica, b) resistencia de polarización y c) resistencia de la disolución.

Fig. 3.13 Resultados obtenidos en el sensado de glucosa por CA. a) Cronoamperogramas de los MWCNTs oxidados, b) cronoamperogramas de los MWCNTs decorados, c) incremento en la corriente como función de la concentración de glucosa para MWCNTs oxidados, d) incremento en la corriente como función de la concentración de glucosa para MWCNTs decorados.

Fig. A.1 Micrografías TEM de los tratamientos de decoración adicionales realizados a los MWCNTs del tipo A.

Prefacio

El presente escrito tiene como finalidad exponer los resultados obtenidos en el trabajo de investigación titulado “Decoración de nanotubos de carbono con óxidos de hierro e inmovilización de la enzima glucosa oxidasa para su aplicación en biosensores”, cuyo contenido y estructura se describen a continuación.

El capítulo uno describe los orígenes y motivaciones del trabajo, parte de su fundamento teórico, conceptos esenciales y algunos trabajos de investigación destacados realizados con anterioridad, para sustento y fundamento del nuestro. En él se puede encontrar un panorama de las propiedades y características de los nanotubos de carbono y la enzima glucosa oxidasa, así como algunos de los procedimientos fisicoquímicos comunes para este tipo de materiales. Finalmente se define a los biosensores y se describe la importancia y utilidad de los sensores de glucosa, así como las técnicas electroquímicas empleadas en su caracterización.

La decoración de nanotubos de carbono con nanopartículas de óxidos de hierro se discute en el capítulo dos. Se describen los antecedentes y trabajos importantes realizados, materiales empleados, metodología y las caracterizaciones realizadas a los nanotubos de carbono antes y después de su decoración, tales como microscopía electrónica de transmisión, espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier, espectroscopía Raman, espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X, difracción de rayos X, análisis por energía dispersiva de rayos X, isothermas de adsorción de nitrógeno y magnetometría de muestra vibrante.

El capítulo tres presenta los antecedentes, materiales, y métodos utilizados en la inmovilización de enzimas sobre sustratos. En nuestro caso se estudia específicamente la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre los nanotubos de carbono por método de inmovilización covalente, así como la detección de glucosa. Los resultados obtenidos se presentan mediante caracterizaciones fisicoquímicas y electroquímicas para nanotubos de carbono con y sin la decoración de partículas de óxidos de hierro. Para la caracterización electroquímica, se utilizan técnicas como voltamperometría cíclica, espectroscopía de impedancia electroquímica y cronoamperometría.

Finalmente, se discuten las conclusiones obtenidas durante el desarrollo de este trabajo, las referencias utilizadas y un apéndice que contiene algunos resultados adicionales de los nanotubos decorados con partículas de óxidos de hierro.

Introducción

La diabetes mellitus o simplemente diabetes, es una enfermedad crónico-degenerativa que se presenta cuando el páncreas no produce insulina, o bien, la que se produce no es utilizada de manera eficiente por el organismo; ésta es la hormona responsable de que la glucosa de los alimentos sea absorbida por las células y dotar de energía al organismo [OMS, 2014]. Un efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos [OMS, 2014].

La federación internacional de diabetes estima que había 382 millones de personas con diabetes en el 2013 y espera que esta cifra aumente a 592 millones en el 2035 [Guariguata et al., 2014]. Esto es resultado de una combinación de numerosos factores que incluyen el bajo rendimiento de los sistemas de salud, la escasa conciencia de las personas y profesionales de la salud, y que la enfermedad no presenta síntomas notables en etapas tempranas, lo cual hace difícil su diagnóstico.

En México, según el sistema nacional de salud en 2013 existían 6.8 millones de pacientes con diabetes, es decir, poco más del 9% de los adultos en México habían recibido ya un diagnóstico de diabetes. Se estima que para el año 2030 la cantidad de afectados aumentará a 11.9 millones, lo que representa un incremento de 175% [Gil-Velázquez et al., 2013]. Como se sabe, la diabetes es una enfermedad crónica de larga duración y por lo general de progresión lenta, no es curable y es por esto que el empleo de métodos de control se ha vuelto indispensable en la vida de las personas que la padecen.

El diagnóstico se puede establecer tempranamente con un análisis de sangre y su tratamiento consiste en la reducción de los niveles de glucosa en la sangre entre otros factores de riesgo como el sobrepeso, el sedentarismo, entre otros. En los últimos años se han patentado distintos métodos de análisis para la detección de glucosa en la sangre, algunos basados en la predisposición genética del individuo a partir de pruebas en el ADN. Actualmente destacan entre los métodos de control los llamados sensores de glucosa, por ser portátiles (incluso dentro del cuerpo) de fácil funcionamiento, y capaces de monitorear la variación en los niveles de glucosa de la sangre u otros líquidos presentes en el cuerpo humano.

Los sensores son dispositivos que transforman la información física o química en una señal útil que pueda ser procesada y, por tanto, que facilite información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos [Ristic, 1994]. Estas características, combinadas con la incorporación de los últimos avances en tecnologías de miniaturización, han sido objeto de numerosos estudios científicos y avances tecnológicos en el área de biosensores durante los últimos años. En un biosensor se acopla un componente biológico (enzima, anticuerpo, gen, receptor celular, célula o tejido) junto con un transductor, de forma que la interacción con un analito permite que se establezca (o al contrario, que no se lleve a cabo) una reacción química. Si el transductor es amperométrico, la reacción que se establece sería del tipo electroquímica, y de esta manera el dispositivo toma el nombre de biosensor electroquímico [Wang et al., 2003; Lin et al., 2004].

Un ejemplo claro es el uso de enzimas oxido-reductoras para las que la reacción con el sustrato (molécula sobre la que actúa la enzima) ya supone una transferencia de electrones, o el seguimiento de reacciones de afinidad a través de elementos de marcado enzimático. Con esta integración se logran conjugar las prestaciones de la medida amperométrica con la selectividad de los reactivos biológicos. La glucosa oxidasa es la enzima más comúnmente empleada como reactivo analítico, utilizada para la detección de glucosa en sensores enzimáticos, con un costo relativamente bajo, buena estabilidad, alta selectividad y especificidad encargada de catalizar la oxidación de glucosa en ácido glucónico [Raba y Mottola, 1995].

Una nueva alternativa en la fabricación de biosensores es el uso potencial de nanotubos de carbono (CNTs, por sus siglas en inglés), utilizados como soporte o sustrato sobre los que se deposita el componente biológico (enzima). Se ha reportado tanto su fuerte actividad electrocatalítica [Li et al., 2003] como sus altas velocidades para la transferencia de electrones [Cheng et al., 2010]. Se ha reportado también su uso como electrodos en el desarrollo de sensores electroquímicos de glucosa en la escala macroscópica [Wang et al., 2003] así como microscópica [Lin et al., 2004]. Para el desarrollo de estos microelectrodos se han empleado nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs, por sus siglas en inglés) [Hrapovic et al., 2004] y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) [Qiu et al., 2009], obteniendo buena sensibilidad para la detección de glucosa, resaltando el papel de la funcionalización. De igual forma se ha reportado que la incorporación de nanopartículas

metálicas y/o magnéticas en biosensores, puede mejorar su conductividad eléctrica y magnética, sensibilidad y selectividad amperométrica [Hrapovic et al., 2004; Ishikawa et al., 2009; Qiu et al., 2009; Li et al., 2010]. Sin embargo, aún no es claro cómo el ordenamiento estructural y las propiedades físico-químicas iniciales de los CNTs influyen en su decoración; tampoco se ha profundizado en el papel de estas partículas magnéticas sobre los CNTs en la detección amperométrica, temas que se abordan en el desarrollo de este documento.

Así, este trabajo estudia la decoración de MWCNTs con nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro y evalúa su influencia en la detección de glucosa a través de la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre los mismos.

Hipótesis

Los nanotubos de carbono de pared múltiple decorados con nanopartículas de óxidos de hierro presentan excelentes propiedades para la inmovilización de enzimas en su superficie y el desarrollo de sensores de glucosa.

Objetivos

Objetivo general

Decorar nanotubos de carbono de pared múltiple con nanopartículas de óxidos de hierro e inmovilizar la enzima glucosa oxidasa sobre su superficie, evaluando el papel de las propiedades fisicoquímicas del nanotubo y la decoración con estas nanopartículas en la detección de glucosa.

Objetivos específicos

- Decorar nanotubos de carbono de pared múltiple con nanopartículas de óxido de hierro y caracterizarlos fisicoquímicamente.
- Evaluar el papel de las propiedades fisicoquímicas iniciales de los nanotubos de carbono en la decoración con partículas de óxidos de hierro.
- Inmovilizar la enzima glucosa oxidasa sobre los nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados y decorados con nanopartículas de óxidos de hierro.
- Evaluar el funcionamiento como sensor de glucosa de nanotubos de carbono oxidados con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada.
- Evaluar el funcionamiento como sensor de glucosa de los nanotubos de carbono decorados con partículas de óxidos de hierro con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada.
- Comparar la sensibilidad y funcionamiento del sensor de glucosa cuando se usan nanotubos de carbono con y sin la decoración con nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 Nanotubos de carbono

1.1.1 Clasificación y propiedades

Los nanotubos de carbono (CNTs, por sus siglas en inglés) son estructuras tubulares constituidas por átomos de carbono dispuestos en una red hexagonal cilíndrica, cuyo diámetro está en el orden de los nanómetros [Iijima, 1991]. Si los CNTs se forman de una sola capa de átomos de carbono reciben el nombre de nanotubo de carbono monocapa o de pared sencilla (SWCNT, por sus siglas en inglés), y si se forman de varias capas coaxiales, reciben el nombre de nanotubos de carbono multicapa o de pared múltiple (MWCNTs, por sus siglas en inglés).

Los nanotubos de carbono pueden poseer propiedades eléctricas singulares así como propiedades mecánicas extraordinarias [Ruoff et al., 2003]. Desde el punto de vista eléctrico, los CNTs presentan un amplio intervalo de comportamientos, desde el comportamiento metálico y semiconductor [Odom, 2001] hasta presentar, en algunos casos, superconductividad [Zhong et al., 2006]. Este amplio margen de conductividades viene dado por su geometría, en función de su diámetro, helicidad (quiralidad) y el número de capas de su estructura [Dresselhaus et al., 1996]. Su capacidad para conducir la corriente eléctrica puede llegar a 10^9 A/cm², mientras que los alambres de cobre convencionales se funden al llegar a densidades de corriente del orden de 10^6 A/cm² [Yao et al., 2000]. La estabilidad y robustez de los enlaces entre los átomos de carbono (del tipo sp²) les proporciona una gran resistencia mecánica y un módulo elástico que podría llegar a oscilar entre 2.8-3.6 TPa para SWCNTs y de 1.7-2.4 TPa para MWCNTs [Lourie y Wagner, 1998; Ajayan et al., 2000; Ruoff et al., 2003].

Algunos modelos predicen que la conductividad térmica de los nanotubos de carbono perfectos puede llegar a ser tan alta como 6000 W/mK a temperatura ambiente, comparable con el diamante, que reporta 3320 W/mK [Hone et al., 1999]. Asimismo, son muy estables térmicamente, siendo aún estables a 2800°C en el vacío y a 750°C en aire [Collins y Avouris, 2000]. Las propiedades de los nanotubos pueden modificarse reteniendo metales o incluso gases en su interior (proceso conocido como “dopado”), o depositándolos en sus paredes externas (proceso conocido como “decorado”).

Otras aplicaciones de los CNTs son el desarrollo de supercondensadores [Baughman et al., 2002], dispositivos para el almacenamiento de hidrógeno [Daenen et al., 2006], sensores biológicos [Kaushik et al., 2008; Minnikanti et al., 2009; Cai y Chen, 2004; Liu et al., 2007], fabricación de celdas solares, fabricación de dispositivos electrónicos (entre los que destacan los transistores y las memorias informáticas), en biomedicina, en la industria automotriz, en la rama aeroespacial, deportiva, entre otras [Marroquín, 2007].

1.1.2 Funcionalización y oxidación

La funcionalización de nanotubos de carbono es el proceso por el cual se genera una superficie activa mediante la incorporación de grupos funcionales superficiales. Con ellos se logra incrementar la reactividad química, lo cual típicamente aumenta su capacidad de reaccionar o combinarse con otros materiales, dispersabilidad y procesabilidad [Martínez et al., 2003; Hong et al., 2007; Wepasnick et al., 2011].

La oxidación ácida es una de las técnicas más comúnmente empleadas para una primera funcionalización de los CNTs. Algunos agentes oxidantes empleados en fase líquida son: HNO_3 [Veld et al., 2008], H_2SO_4 [Ye et al., 2006], KMnO_4 [Liu et al., 2003], H_2O_2 [Marega et al., 2009], y mezclas de ellos [Wepasnick et al., 2011; Avilés et al., 2009]. Con estos tratamientos se ha conseguido generar una gran cantidad de grupos $-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$ y $-\text{COOH}$ en la superficie de los nanotubos de carbono. Como desventaja de este tipo de procedimientos de oxidación es el daño estructural en las capas gráficas de los nanotubos y, en casos extremos, la reducción de sus longitudes [Liu et al., 2003; Marega et al., 2009; Avilés et al., 2009].

1.1.3 Decoración

La decoración de CNTs consiste en el depósito de nanopartículas en las paredes y/o extremos de los mismos, unidos por interacciones físicas o fisicoquímicas [Lu, 2007]. En los últimos años, la decoración de CNTs ha recibido gran atención debido a sus prometedoras aplicaciones en campos como la catálisis, los biosensores, el almacenamiento de datos magnéticos y dispositivos electrónicos [Li et al., 2010; Wu et al., 2011; Liu et al., 2009a; Zhang et al., 2009; Huiqun et al., 2006]. Existen varios métodos propuestos para lograr la decoración de CNTs con nanopartículas metálicas, como la precipitación, la hidrólisis a alta temperatura y de la descomposición química de un precursor metálico [Lu, 2007; Liu et al., 2009b; Wan et al., 2007; Wang et al., 2009; Zamudio et al., 2006]. El tipo

de partícula metálica utilizada en la decoración puede ser diverso dependiendo de la aplicación que se requiera, y varía desde metales de transición como Co [Wan et al., 2007], Ni [Wan et al., 2007], y Ru [Lu, 2007], hasta metales nobles tales como Ag [Hou et al., 2009], Au [Xing, 2004] o Pt [Lu et al., 2012].

El uso de nanopartículas de óxido de hierro se ha sugerido en el desarrollo de sensores, dispositivos biológicos, eléctricos y magnéticos debido a que tales partículas presentan un comportamiento ferromagnético, ferrimagnético o superparamagnético, que potencia su uso en mecanismos de administración de fármacos, focalización de células, y diferentes terapias contra el cáncer [Liu et al., 2009; Zhang et al., 2009; Huiqun et al., 2006; Liu et al., 2009b; Wan et al., 2007; Wang et al., 2009; Zamudio et al., 2006; Chu et al., 2013; Kardimi et al., 2012]. Varios estudios sobre la decoración de CNTs hacen énfasis en la necesidad de una modificación inicial de su superficie a través de un tratamiento oxidativo para el éxito de la decoración [Lu, 2007; Xiu-Juan et al., 2012; Chopra, 2011].

1.2 Enzimas y carbohidratos

1.2.1 Definición y clasificación

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de procesos biológicos muy potentes (aumentan la rapidez) y altamente selectivos, tanto en el sustrato como en la acción. La principal función de una enzima consiste en disminuir la energía de activación para facilitar que una reacción química específica tenga lugar. Entre los factores más importantes que afectan la actividad de una enzima se encuentran la concentración de la enzima, la concentración del sustrato, el pH y la temperatura [Montoya, 2008]. Según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular se ha establecido un sistema de nomenclatura basado en las reacciones catalizadas. Todas las enzimas se dividen en seis grupos o clases principales: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas o sintetasas. De acuerdo a esta clasificación para nombrar a las enzimas se toma en cuenta su clase, subclase, la subdivisión de la subclase y la función específica de la enzima [IUPAC-IUBMB, 2015]. A cada enzima se le asigna un código numérico antecedido por las letras EC (por “comisión de enzimas”), seguido de cuatro dígitos separados por puntos, para tener un nombre sistemático. El primer dígito corresponde a la clase, el segundo a la

subclase, el tercero a la sub-subclase y el cuarto es el número de serie de la enzima en su sub-subclase.

1.2.2 Glucosa, glucosa oxidasa y su mecanismo de reacción

La glucosa es un monosacárido con fórmula empírica $C_6H_{12}O_6$ (ver Fig. 1.1), la misma que la fructosa pero con diferente posición relativa de los grupos $-OH$ y $O=$. Es una hexosa, es decir, que contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, pues el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula, (ver Fig. 1.1). Las propiedades de la glucosa se explican por la presencia simultánea de un grupo característico aldehído y de un grupo característico de los alcoholes. La glucosa, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza. Es la fuente primaria de síntesis de energía de las células y el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón y el glucógeno. En su forma D-glucosa (por la proyección de Fischer se definen como pertenecientes a la serie D- aquellos monosacáridos que tienen el último carbono asimétrico con la misma configuración que el carbono 2 del D-gliceraldehído), se absorbe directamente en el torrente sanguíneo durante la digestión. Las células lo utilizan como fuente primaria de energía y es un intermediario metabólico. La glucosa es uno de los principales productos de la fotosíntesis y combustible para la respiración celular.

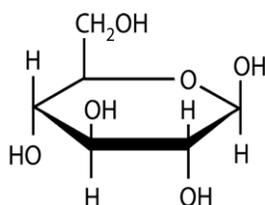
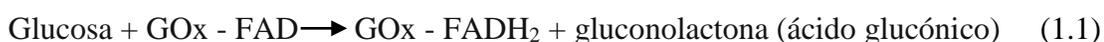


Fig. 1.1 Estructura química de la glucosa.

La enzima glucosa oxidasa (GOx), cuya clasificación es EC 1.1.3.4, es una oxidoreductasa que cataliza la oxidación de la glucosa, reduciendo el oxígeno a peróxido de hidrógeno [Chen et al., 2013]. Es la enzima más ampliamente empleada como reactivo analítico, cuya actividad máxima se encuentra entre 20 y 45 °C con pH entre 3.0 a 8.0 y se inactiva fácilmente a temperaturas superiores a 60 °C. Es una flava proteína que contiene flavín adenín dinucleótido (FAD), y es altamente específica para D-glucosa, siendo esta reacción la base de algunas aplicaciones analíticas y médicas [Raba y Mottola, 1995; Sun et al.,

2006]. Es producida por algunos organismos del reino fungi (*Aspergillus niger*), y tiene actividad antibacterial en presencia de glucosa y oxígeno debido al peróxido de hidrógeno producido. La enzima GOx se usa para estimar la concentración de glucosa en la sangre o en la orina gracias a la formación de tintas coloreadas por el peróxido de hidrógeno [Chen et al., 2013]. Su utilidad en la determinación de la glucosa, su costo relativamente bajo y una buena estabilidad, hacen del sistema glucosa/GOx un modelo muy conveniente para el desarrollo de métodos de detección en el ámbito de biosensores.

El mecanismo de reacción para la detección de glucosa está basado en su interacción con la enzima GOx [Tu et al., 2012]:



1.2.3 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es el proceso en el cual se restringen parcial o totalmente los grados de libertad de movimiento de las enzimas mediante la unión o adhesión a un soporte [Taylor, 1991]. En general existen varios métodos de inmovilización de enzimas, tales como la adsorción física, micro-encapsulación, atrapamiento (en matrices poliméricas, por ejemplo), unión covalente y reticulación. Generalmente no hay un método aceptado como el mejor para la inmovilización de enzimas, por lo que es muy importante en la experimentación disponer de análisis para valorar los métodos disponibles. El método de inmovilización usado depende de una gran variedad de aspectos científicos, ingenieriles y económicos del proceso. La inmovilización utilizada debe permitir el fácil control de la cantidad de enzima y que esta no abandone el soporte a lo largo del proceso.

Como soportes de inmovilización para las enzimas se emplean una gran variedad de compuestos naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos, que difieren en tamaño, forma, densidad y porosidad, y que se utilizan en forma de láminas, tubos, fibras, cilindros, o esferas. El tamaño de partícula del soporte es un factor crucial puesto que determina la extensión de las restricciones de difusión de la actividad enzimática. La actividad, estabilidad y facilidad en el uso de las enzimas inmovilizadas pueden variar enormemente en función del método de inmovilización utilizado [Leca-Bouvier y Blum, 2010].

Debido a sus excelentes propiedades eléctricas y mecánicas, así como su área superficial elevada, y la posibilidad de generar grupos funcionales compatibles con la enzima en su superficie, los CNTs ofrecen nuevas oportunidades y capacidades diferentes a las de los

materiales existentes utilizados para la inmovilización de enzimas [Vashist et al., 2011; Tu et al., 2012]. En el campo de sensores electroquímicos de glucosa, la simple adsorción física directa de enzimas sobre superficies electródicas metálicas puede generar su desnaturalización o la pérdida de su bioactividad. Sin embargo, se ha demostrado que macromoléculas tales como anticuerpos, antígenos y enzimas, retienen su actividad cuando son inmovilizadas sobre superficies modificadas con nanopartículas metálicas [Luo et al. 2004], ya que éstas proporcionan un ambiente similar a su entorno natural. Además las nanopartículas metálicas pueden actuar como medio de conducción electrónico facilitando la transferencia electrónica y permitiendo alcanzar elevados niveles de estabilidad y sensibilidad [Li et al., 2010; Liu y Ju, 2003].

En la unión entre CNTs y GOx a través de enlaces covalentes tiene la capacidad de controlar la ubicación de las biomoléculas, por lo que mejoran la estabilidad, accesibilidad y selectividad. Para esta unión covalente es conveniente oxidar los CNTs, donde los grupos provenientes del ácido carboxílico son a menudo la mejor opción [Vashist et al., 2011; Tu et al., 2012]; controlando la densidad de los grupos funcionales, se puede controlar también el acoplamiento de las biomoléculas (enzimas). La reacción de amidación (diimida) es uno de los métodos más comunes para la inmovilización de biomoléculas a otros materiales; para ello el acoplamiento directo entre el ácido carboxílico y la proteína requiere el uso de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC o EDC) y/o N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) como agentes de acoplamiento [Lin et al., 2004; M. Bogner et al., 2010; Deeken et al., 2011]. En estas moléculas los grupos carboxílicos de los CNTs se convierten primero a ésteres activos a través de la activación de la diimida y, después que los ésteres se activan, se hacen reaccionar con los grupos amina de las proteínas, generando así una unión covalente (Fig. 1.2).

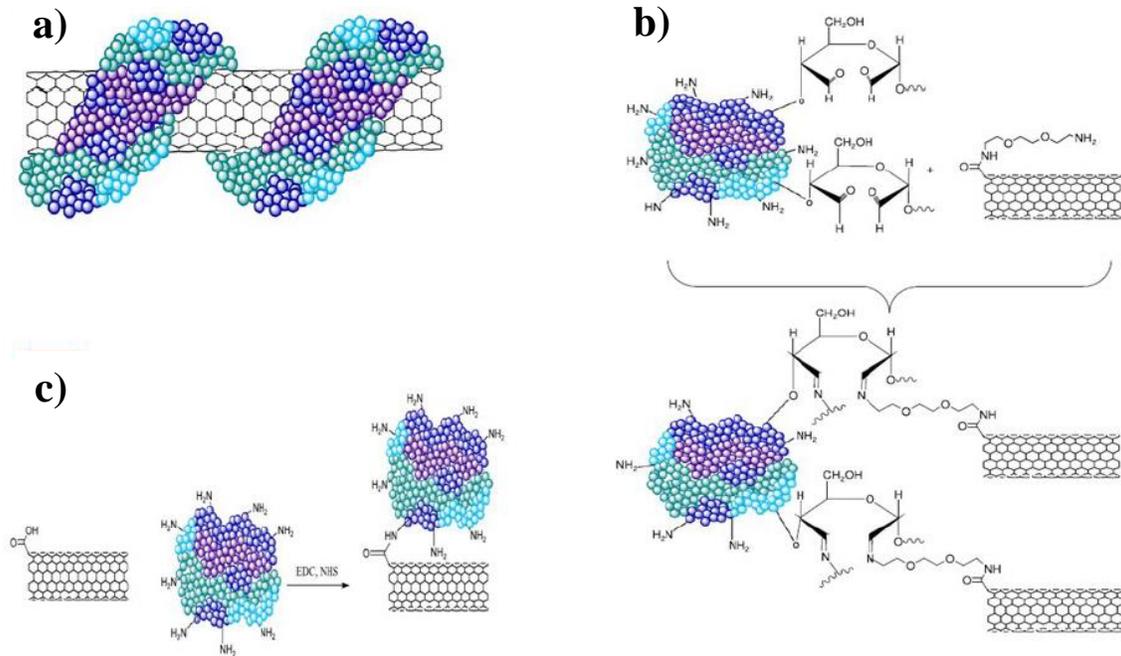


Fig. 1.2 Diferentes enfoques de inmovilización de la enzima GOx sobre los CNTs. a) diagrama esquemático de adsorción física de la enzima alrededor de los CNTs, b) inmovilización covalente de la enzima sobre los CNTs a través de carbodiimida, c) funcionalización de los CNTs amidados con la enzima oxidada. [Yang et al., 2015]

1.3 Biosensores

Un biosensor es un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico, o biomimético, íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico que en presencia del analito produce una señal eléctrica discreta o continua, proporcional a la cantidad presente del mismo [Turner et al., 1987]. El elemento de detección puede ser un material de origen biológico (enzima, anticuerpo, proteínas) o biomimético (catalizadores sintéticos, polímeros impresos, polímeros conductores). El transductor convierte cualquier cambio fisicoquímico que tiene lugar en su proximidad en señales eléctricas. Los biosensores comúnmente se basan en principios electroquímicos, ópticos, sensibles a la masa, térmicos o electrónicos para su operación.

Los biosensores catalíticos se obtienen mediante el uso de enzimas que utilizan su eficacia catalítica hacia un analito. Una tendencia novedosa y con gran aceptación en la actualidad para la preparación de biosensores es el empleo de superficies modificadas con CNTs, y en algunas ocasiones modificados a su vez con nanopartículas metálicas. Esta tendencia

obedece a que los CNTs exhiben efectos electrocatalíticos significativos y a su vez las nanopartículas metálicas permiten la transferencia electrónica directa entre la enzima y el electrodo, sin observarse aparentemente pérdida de su actividad biológica [Liu et al., 2005]. Se espera que con estos dispositivos se mejore la capacidad para la inmovilización estable de biomoléculas y de este modo, se obtengan materiales híbridos con una elevada estabilidad y capacidad de biosensorización [Minnikanti et al., 2009].

Los biosensores electroquímicos se pueden subdividir en sensores potenciométricos, amperométricos, impedométricos y conductimétricos. Los biosensores electroquímicos son económicos y requieren de instrumentación simple. Un biosensor amperométrico contiene comúnmente un sistema de tres electrodos (celda electroquímica) que consiste en un electrodo de detección o de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar o contraelectrodo; estos electrodos se sumergen en el electrolito adecuado a un potencial constante aplicado y la corriente resultante se relaciona con la concentración del analito [Wang et al., 2003]. Algunos sensores electroquímicos utilizan técnicas electroquímicas tales como la voltametría cíclica. En experimentos potenciométricos la diferencia de potencial entre dos electrodos se mide mediante un voltímetro. El elemento biológico está unido al electrodo de detección y el otro electrodo sirve como electrodo de referencia. En los sensores impedométricos, se utiliza un sistema de tres electrodos en presencia de un compuesto redox utilizado como electrolito, mientras que en un sensor conductimétrico se monitorea la resistencia o conductividad del sensor al imponer una corriente alterna entre dos electrodos. Los CNTs se han utilizado principalmente en sensores amperométricos, impedométricos o basados en voltametría [Wang et al., 2003; Lin et al., 2004].

1.3.1 Sensores de glucosa

En 1962 el médico americano Leland Clark (reconocido posteriormente como padre del concepto de biosensor), en vista de la incomodidad y sufrimiento que suponía para los enfermos diabéticos someterse a continuos análisis de sangre, ideó un dispositivo que permitía realizar dichos análisis con tan sólo unas gotas de sangre y que fuera capaz de responder en pocos minutos [Clark y Lyons, 1962]. Este sistema ha evolucionado con el paso del tiempo, con la idea de generar nuevos dispositivos cada vez más pequeños, prácticos y de respuesta rápida, capaces de detectar los cambios en los niveles de glucosa en la sangre. Uno de los sistemas propuestos actualmente y quizá el más utilizado, son las

tiras reactivas, en las que se penetra el tejido del dedo del paciente con una aguja para recolectar una gota de sangre en la tira reactiva y posteriormente se coloca la gota sobre un monitor (sensor) que lee los niveles de glucosa en la sangre [McGarraugh et al., 2001; Betachek®, 2010]. Este método, como todos los que requieren una muestra de sangre, se considera invasivo, al penetrar los tejidos del cuerpo.

Los métodos no invasivos (ver Fig. 1.3) aparecieron recientemente y en ellos no se requiere una muestra de sangre para medir los niveles de glucosa. Estos métodos están siendo investigados para proveer a los pacientes con diabetes nuevas alternativas de monitoreo; entre ellos destacan el uso de luz infrarroja para iluminar a través del brazo o del dedo, el uso de corrientes eléctricas de bajo nivel para obtener sangre a través de la piel y el uso de saliva o de lágrimas para medir los niveles de glucosa, entre otros [López-García, 2010]. Sin embargo, estos métodos todavía no han sido aprobados por la administración de alimentos y medicamentos de E.U.A. (FDA por sus siglas en inglés) [FDA, 2013].



Fig. 1.3 Productos no-invasivos para el monitoreo de glucosa en la sangre comercializados por OrSense © [OrSense, 2015].

Otra alternativa reciente es el uso de dispositivos a escalas menores, sensores de glucosa a escala micrométrica, nanométrica e incluso a escala atómica basados en reacciones electroenzimáticas dentro de celdas electroquímicas diseñadas con electrodos de distintos tipos de nanomateriales [Patel et al., 2007; Nagarale et al., 2009; Kong et al., 2000].

Clark, basado en sus estudios en electrodos de oxígeno decidió por primera vez atrapar transductores enzimáticos en su superficie para aumentar el número de sustancias analizables en el cuerpo humano [Clark y Lyons, 1962]. Este dispositivo trató de mimetizar la acción biológica al incorporar enzimas que degradaban la glucosa con la ayuda de un electrodo encargado de traducir dicha señal a un valor de concentración de glucosa presente

en la sangre. Bautizado con el nombre de electrodo enzimático, este considera la inclusión de la enzima GOx en la superficie de un electrodo de oxígeno con una membrana de diálisis. Este sensor permite relacionar directamente la concentración de glucosa con la disminución que se produce en la concentración de oxígeno. Posteriormente, Guilbault y Montalvo [1969], desarrollaron el primer electrodo enzimático potenciométrico basado en la inmovilización de la enzima ureasa sobre un electrodo selectivo de amonio. Estas ideas acabaron plasmadas en el lanzamiento comercial en 1975 de un dispositivo para el análisis de glucosa basado en la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno por “Yellow Springs Instrument Company” [2010], siendo así el primero de los numerosos biosensores comercializados posteriormente a lo largo de todo el mundo. Desde su descubrimiento, los biosensores y su investigación han ido creciendo de forma continua y exponencial, partiendo de su masiva introducción al mercado durante los años 90. Esto se debe a que son utilizados diariamente por miles de personas en todo el mundo, para ayudar a miles de pacientes diabéticos a mantener una mejor calidad de vida. La tendencia actual es hacer estos dispositivos cada vez de menor tamaño, y aumentar sus propiedades tanto sensitivas como selectivas.

El principio de detección electro-enzimática desarrollado por Clark es la base fundamental de los sistemas que actualmente se reportan en la literatura. Por ejemplo, Patel et al. [2007] han desarrollado sensores de monocapas de polímero ensambladas a electrodos de oro con la enzima GOx. Kaushik et al. [2008] usaron nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) preparadas por coprecipitación, las cuales fueron dispersadas en una disolución de quitosano y después, depositadas sobre un sustrato en forma de película delgada de óxido de estaño e indio (ITO), a las que posteriormente se les inmovilizó la enzima GOx por adsorción física. Nagarale et al. [2009] también prepararon nanocompuestos de polisiloxano/quitosano y usaron las propiedades electroquímicas del ferroceno $(\text{C}_5\text{H}_5)_2\text{Fe}$, para proponer su aplicación como sensores de glucosa. Otro tipo de sensores, como el fabricado por Kafka et al. [2010] aprovecha las bondades de polímeros conductores como el poli 3,4-etileno-dioxitiofeno estampados en caliente y el uso de electrodos convencionales para la fabricación de sensores electroquímicos. También existen sensores que utilizan la capacidad de la fibra óptica para detectar la variación de glucosa [Binu et al. 2009], y finalmente, sensores de glucosa continuos basados en ingeniería genética, que

reportan aplicaciones en vivo a temperatura ambiente con enlaces polipéptidos en una matriz de hidrogel de poliacrilamida, utilizando equipo de fibra óptica [Siegrist et al. 2010]. Otro tipo de estos sensores incorporan electrodos hechos de nanofibras de metales y mezclas de ellos con nanofibras de carbono [Ding et al. 2010, Wang et al. 2003]. Como se puede apreciar, la tendencia a la miniaturización y la eficiencia es una constante en el desarrollo de este tipo de dispositivos. En la actualidad la literatura científica presenta nuevos sistemas con características de eficiencia importantes cada vez más pequeños, incorporando materiales inteligentes.

1.3.2 Sensores de glucosa con nanotubos de carbono

Las excelentes propiedades multifuncionales de los CNTs hacen atractivo su uso para el desarrollo de biosensores. Su funcionalización ha sido el medio que permite su uso en el desarrollo de sensores de glucosa, pues a través de ella es factible la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en su superficie. Otro aspecto de interés es la posibilidad de decorar los CNTs con partículas metálicas, ya que esto podría ayudar a mejorar su conductividad, sensibilidad y selectividad, así como su posible manipulación magnética en matrices poliméricas [Ishikawa et al., 2009; Li et al., 2010]. Generalmente se ha presentado el uso de CNTs (MWCNTs y SWCNTs) como electrodos dentro de dispositivos electroquímicos, inmersos en matrices metálicas o poliméricas [Palwai et al., 2007; Wang et al. 2003], aunque también se les ha utilizado de forma individual [Ishikawa et al., 2009]. Wang et al. [2003] reportan la fabricación de un sensor de glucosa usando nanotubos de carbono multipared usados como electrodo con una película delgada de oro evaporada sobre su superficie. Los MWCNTs se sintetizaron sobre sustratos de silicio por el método de depósito químico en fase de vapor en un horno de plasma asistido por microondas, sobre los que posteriormente se inmovilizó sobre ellos la enzima GOx, resultando en un biosensor con buena sensibilidad y estabilidad en la detección de glucosa. Otro método utilizado en el desarrollo de sensores de glucosa es el descrito por Lin et al. [2004], quienes utilizaron ensambles nanoelectrónicos de CNTs en los que la enzima glucosa oxidasa se inmoviliza covalentemente vía carbodiimida como se describe en la Fig. 1.4.

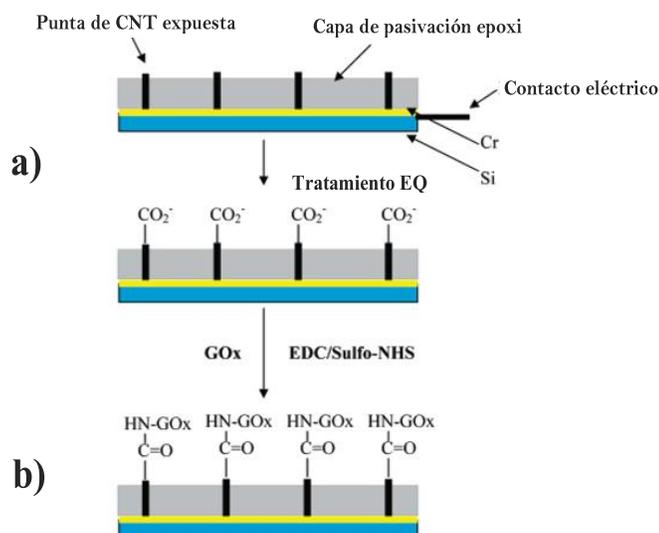


Fig. 1.4. Esquema de la fabricación de un sensor de glucosa [Lin et al., 2004].
a) Tratamiento electroquímico de los CNTs (ensambles nanoelectrónicos),
b) acoplamiento de la enzima GOx sobre los ensambles de CNTs.

Recientes reportes mencionan el uso de nanotubos de carbono decorados con nanopartículas metálicas de Fe y sus óxidos magnéticos en el desarrollo de biosensores [Kaushik et al., 2008; Nagarale et al., 2009; Cheng et al., 2010]. En estos trabajos se reporta una buena sensibilidad y selectividad amperométrica, así como buena respuesta a la conversión de señales biológicas o químicas en señales eléctricas, donde las nanopartículas metálicas juegan un papel importante al presentar afinidad con los componentes biológicos utilizados. Otros mencionan la fabricación por electrodeposición de nanopartículas de Pt en materiales compuestos magnéticos de MWCNTs/quitosano/ Fe_yO_x [Li et al., 2010], así como el uso de nanopartículas de oro en matrices poliméricas, utilizando CNTs como canales entre dos electrodos para detectar los pequeños cambios de voltaje y amplificar estas señales [Kerman et al., 2008]. Cabe mencionar que los CNTs se han usado para esta aplicación sin decoración [Wang et al., 2003; Kamyabi et al., 2013; Janegitz et al., 2011] y decorados con partículas metálicas [Ishikawa et al. 2009, Li et al. 2010], e incluso se han utilizado solamente las nanopartículas magnéticas sin CNTs [Cheng et al. 2010, Nagarale et al. 2009], sin que se reporte en la literatura una comparación o estudio sistemático del efecto. Finalmente, existen algunos sensores de glucosa que a diferencia de los anteriores no se basan en la detección enzimática de glucosa, por ejemplo, los basados en la

intensidad de los pulsos de luz inducida por aleaciones de Pt-Au formadas sobre los CNTs [Ryu et al., 2010].

En la literatura se reportan una gran variedad de sensores de glucosa desarrollados a partir de nanotubos de carbono, tanto de pared simple como de paredes múltiples, sin discutir el papel que juega la morfología del nanotubo ni tampoco la relevancia de utilizarlos decorados o no con nanopartículas metálicas.

1.4 Técnicas electroquímicas para la detección de glucosa

Un sensor electroquímico es un dispositivo químico que responde a cambios específicos en el potencial o en la corriente eléctrica como consecuencia de la presencia de una especie química que interactúa con él [Frew y Hill, 1987]. Para aumentar la selectividad del sensor se pueden utilizar elementos bioquímicos o biológicos, y entonces el sensor recibe el nombre de biosensor, como se mencionó con anterioridad. Aquellos biosensores que solo miden una diferencia de potencial en la interfase sensor-analito con respecto al electrodo de referencia, son los llamados biosensores potenciométricos y el sistema de medida que requieren es un potenciómetro a corriente nula. En los biosensores amperométricos (cambio en la corriente del electrodo de trabajo), se impone un potencial externo para electrotransformar algún producto de la interacción sensor-analito, y requieren un transductor extra para cerrar el circuito de corriente de electrólisis [Frew y Hill, 1987].

Un biosensor electroquímico hace posible la combinación de la sensibilidad de las técnicas electroquímicas con la selectividad de los procesos de reconocimiento biológico de una forma sencilla, dando lugar a dispositivos de bajo costo, sobre todo si se considera que para su construcción se utilizan como transductores electrodos convencionales.

Dado que las reacciones se detectan generalmente sólo en las proximidades de la superficie del electrodo, los electrodos juegan un papel crucial en el desarrollo de biosensores electroquímicos. Por lo que la función de un electrodo específico elegido, el material del electrodo, su modificación superficial o sus dimensiones, influyen considerablemente en su capacidad de detección. La detección electroquímica por lo general requiere un electrodo de referencia, un contraelectrodo o electrodo auxiliar y un electrodo de trabajo, también conocido como el sensor o electrodo redox.

El electrodo de referencia, en nuestro caso, electrodo saturado de calomel (SCE, por sus siglas en inglés), se mantiene a una distancia desde el sitio de reacción con el fin de mantener un potencial conocido y estable. El electrodo de trabajo sirve como elemento de transducción en la reacción bioquímica, mientras que el contraelectrodo otorga la corriente necesaria al electrodo de trabajo sin que, de alguna manera, se vea limitada la respuesta de la celda. Estos electrodos deben ser a la vez conductores y químicamente estables, por lo que, platino, oro, carbono (en nuestro caso CNTs) y compuestos de silicio son comúnmente utilizados, dependiendo del anolito [Chaubey y Malhotra, 2002].

Las técnicas electroquímicas comunes hacen posible el estudio y caracterización de los biosensores generados en este trabajo, tal como la voltametría cíclica, la espectroscopía de impedancia electroquímica y la cronoamperometría.

1.4.1 Voltametría cíclica

La voltametría comprende un grupo técnicas electroquímicas que se basan en la respuesta corriente-potencial de un electrodo polarizable. Para asegurar su polarización, el electrodo generalmente tiene dimensiones reducidas. En estas técnicas se estudian los cambios de corriente en función del potencial aplicado a través de la celda electrolítica. El proceso involucra la electrólisis de una o más especies electroactivas, que comprenden la reacción de la especie electroactiva en el electrodo.

La voltamperometría cíclica (VC) es quizá la técnica electroanalítica más estable para el estudio de especies electroactivas, ofreciendo una rápida localización de potenciales redox de las especies en estudio, su versatilidad aunado a su facilidad de medición da lugar a un amplio uso en los campos de electroquímica, química orgánica e inorgánica y bioquímica [Kissinger y Heineman, 1983]. En VC se cicla el potencial aplicado a un electrodo, el cual se sumerge en una solución sin agitar (electrolito) y se mide la corriente eléctrica resultante. El potencial del electrodo de trabajo es controlado frente a un electrodo de referencia (en nuestro caso SCE). El potencial de control que se aplica a través de estos dos electrodos es considerado una señal de excitación. La señal de excitación para VC es un barrido de potencial de forma triangular, tal como se muestra en la Fig. 1.5 [Bard y Faulkner, 2000; Atkins y De Paula, 2006]. El potencial se varía linealmente desde E_0 hasta E_f , y cuando se ha alcanzado este valor el sentido de barrido se invierte y el potencial vuelve a su valor original E_0 . Este ciclo de excitación puede ser repetido cuantas veces se requiera. Los

potenciales a los que tiene lugar la inversión se llaman potenciales de cambio. El intervalo de potenciales de cambio elegido para un experimento dado, es aquel en el que tiene lugar la oxidación o reducción controlada por la difusión de una o más especies. Dependiendo del tipo de estudio la dirección del barrido inicial puede ser negativa o positiva [Ortíz et al., 2006]. La información que esta técnica proporciona está contenida en una gráfica voltaje-corriente, indicando la presencia de diferentes especies a diferentes voltajes.

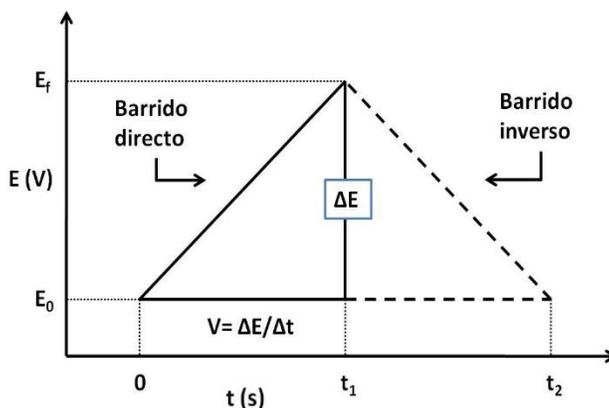


Fig. 1.5. Esquema de una señal de excitación en VC [Bard y Faulkner, 2000].

1.4.2 Espectroscopía de impedancia electroquímica

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es una poderosa herramienta para la investigación de los mecanismos de las reacciones electroquímicas, para medir las propiedades dieléctricas y de transporte de materiales, para explorar las propiedades de los electrodos porosos, y para investigar superficies pasivas [Macdonald, 2006].

EIS debe su existencia a la aparición de circuitos electrónicos suficientemente rápidos y sensibles para generar y analizar una señal de frecuencia y fase variable. Se trata de una técnica no destructiva (cuando se trabaja en condiciones de equilibrio), particularmente sensible a pequeños cambios en el sistema, que permite la caracterización de las propiedades de materiales y sistemas electroquímicos incluso en medios poco conductores. En muchos materiales y sistemas electroquímicos la impedancia varía con la frecuencia del potencial aplicado en una forma que está relacionada con las propiedades de dichos materiales. Esto se debe a la estructura física del material, a los procesos electroquímicos que tengan lugar, o a una combinación de ambos.

Para el análisis del comportamiento de una celda electroquímica mediante esta técnica se representa el sistema en estudio mediante un circuito equivalente. Un circuito equivalente es un modelo eléctrico con una representación matemática que intenta reproducir el comportamiento del circuito eléctrico real. De esta forma, nuestro sistema electroquímico se puede representar por una resistencia de polarización o resistencia a la transferencia de carga ion/electrón (R_p), la resistencia de la disolución o electrolito (R_s) y un condensador o un elemento de fase constante (CPE). La configuración del circuito se muestra en la Fig. 1.6, basado en el modelo de Boukamp [Boukamp, 1986], escogido frecuentemente para el ajuste del sistema a partir de los datos obtenidos experimentalmente. En este modelo de circuito eléctrico R_p es de suma importancia, pues de su valor depende la velocidad de transferencia electrónica entre el electrodo y la disolución; en paralelo a ella, está CPE, que simula la interfase electrodo/disolución y en serie con un elemento R_s , que representa la resistencia entre el electrodo de trabajo y el de referencia y engloba la resistencia del electrolito, la resistencia del cableado para conectar la celda al sistema de medición, etc. La resistencia a la transferencia de carga varía cuando se depositan o adsorben sobre electrodo sustancias diferentes.

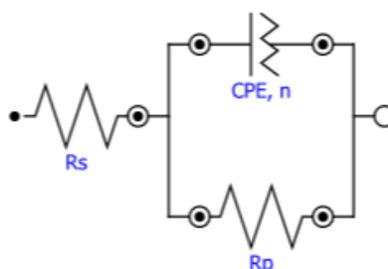


Fig. 1.6. Esquema típico de un circuito eléctrico equivalente para un sistema con proceso de transferencia de carga simple con difusión de especies a la interface. Donde R_s es la resistencia de la disolución, CPE es el elemento de fase constante, n es el valor del exponente del elemento de fase constante y R_p es la resistencia de polarización.

Existen dos formas típicas de representar gráficamente los resultados obtenidos en un ensayo EIS; la primera es el diagrama de Nyquist [Nyquist, 1924; Seeler, 2014], donde se representa la parte imaginaria de la impedancia ($-Z''$) contra la parte real (Z') para cada valor de frecuencia aplicada. La segunda forma es el diagrama de Bode [Bode, 1945; Seeler, 2014], donde se representan los valores absolutos de la impedancia o ángulo de fase

(logaritmo del módulo de la impedancia ($\log |Z|$) y el desfase (ϕ)) en función del logaritmo de la frecuencia ($\log \omega$). Ambos diagramas brindan la información necesaria sobre la interfaz electrodo-electrolito y la reacción. La interpretación del espectro de impedancias requiere la selección de un circuito eléctrico modelo apropiado para ajustarse a los datos experimentales. A través del circuito eléctrico, los valores de los parámetros simulados obtenidos al utilizar esta técnica, proporcionan información relacionada con la resistencia de la disolución, la resistencia de polarización y la capacitancia de la doble capa capacitiva. Aunque en varios casos se ha demostrado que los cambios en la capacitancia interfacial están relacionados con la concentración del analito, los cambios en la resistencia de polarización en general pueden mostrar una mayor sensibilidad en los sensores electroquímicos [Lasia, 1999].

El elemento de fase constante (CPE) toma en cuenta las heterogeneidades de la superficie pasiva del electrodo. Con el uso del CPE se obtiene un excelente ajuste de los datos experimentales, cuyo principal objetivo es comprobar la validez de la técnica de EIS para este tipo de sistemas. En la Fig. 1.7 se presenta un ejemplo del gráfico de Nyquist obtenido entre un ensayo de EIS y el mismo obtenido por el circuito equivalente de Boukamp (impedancia electroquímica de MWCNTs oxidados).

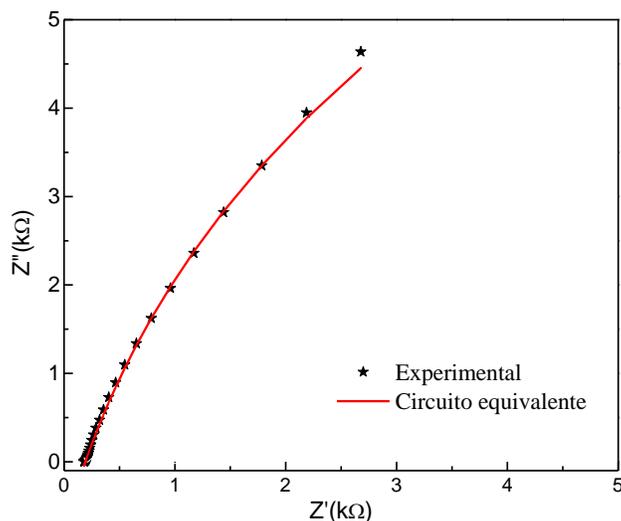


Fig. 1.7. Ejemplo del ajuste logrado en los gráficos de Nyquist entre el ensayo de EIS experimental y el obtenido por el análisis del circuito equivalente.

1.4.3 Cronoamperometría

En la cronoamperometría (CA), Fig. 1.8, se aplica un pulso de potencial o una secuencia de ellos al sistema (suficiente para causar la reacción electroquímica) y se estudia la variación de la corriente contra el tiempo. La CA es una técnica sencilla, pero importante para la caracterización electroquímica de un sistema, pues puede ser utilizada para obtener coeficientes de difusión, así como parámetros y mecanismos cinéticos de los elementos participantes [Moretto y Seeber, 2014]. El registro puede ser analizado y su naturaleza identificada a partir de las variaciones con el tiempo. A tiempos cortos la corriente capacitiva es dominante, mientras en escalas de tiempo más largos la difusión farádica limitada podría prevalecer.

Al comienzo del experimento transitorio se mantiene el potencial del electrodo de trabajo constante en E_i (Fig. 1.8a). En $t = 0$ el potencial se cambia instantáneamente a un nuevo valor E_1 , y el tiempo de respuesta de la corriente correspondiente se registra como se muestra en la Fig. 1.8b.

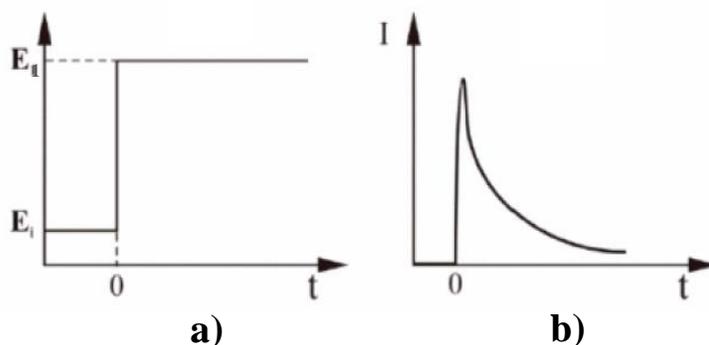


Fig. 1.8. Descripción de un experimento cronoamperométrico. a) Perfil potencial-tiempo aplicado durante el experimento, E_i es el valor inicial y E_1 es el potencial donde ya no ocurre reducción, b) la respuesta correspondiente de la corriente debida a los cambios del potencial.

Capítulo 2. Decoración de nanotubos de carbono con óxidos de hierro

2.1 Introducción

La decoración de CNTs consiste en la adhesión de nanopartículas (generalmente metálicas) a las paredes externas y/o extremos de estos por interacciones físicas o fisicoquímicas [Lu, 2007]. Frecuentemente la decoración de CNTs con partículas metálicas incrementa su potencial aplicación en campos como la catálisis, los biosensores, el almacenamiento de datos magnéticos y dispositivos electrónicos [Huiqun et al., 2006; Liu et al., 2009; Zhang et al., 2009; Li et al., 2010; Wu et al., 2011].

Los métodos propuestos para lograr este objetivo incluyen: la precipitación, la hidrólisis a alta temperatura, y la descomposición química de un precursor metálico [Huiqun et al., 2006; Lu, 2007; Wan et al., 2007; Liu et al., 2009a; Wang et al., 2009]. El tipo de nanopartículas metálicas utilizadas es diverso y depende de la aplicación final que se requiera. En particular, las nanopartículas de óxido de hierro se han empleado en el desarrollo de sensores, dispositivos biológicos, eléctricos y magnéticos, debido a su comportamiento ferromagnético, ferrimagnético o superparamagnético.

Un aspecto crítico en la decoración de MWCNTs con nanopartículas metálicas es la distribución homogénea de las nanopartículas sobre su superficie. Varios estudios hacen énfasis en la necesidad de una modificación superficial previa a la decoración a través de tratamientos oxidantes [Lu, 2007; Chopra et al., 2011; Kardimi et al., 2012; Fan y Li, 2012]. Aunque se han propuesto varios métodos para la decoración de MWCNTs con nanopartículas de óxido de hierro magnético [Wu et al. 2011, Liu et al. 2009a, Zhang et al. 2009, Huiqun et al. 2006, Liu et al. 2009b, Wan et al. 2007, Wang et al. 2009], aún no está claro cómo influyen la morfología, el ordenamiento estructural inicial y las propiedades fisicoquímicas del MWCNT en su decoración.

En el presente trabajo de tesis doctoral se investigó el uso de tricloruro de hierro como precursor para obtener MWCNTs decorados con nanopartículas de óxidos de hierro magnético para su posterior aplicación como biosensor electroquímico (tema que se abordara en el capítulo 3). Uno de los objetivos principales en este capítulo es evaluar la influencia de dos tipos de MWCNTs con diferente morfología inicial y ordenamiento estructural en la decoración de MWCNTs con nanopartículas de óxido de hierro magnético.

2.2 Materiales

Los MWCNTs utilizados en el presente estudio (tipos “A” y “B”) fueron obtenidos comercialmente, y sus características principales pueden observarse en la Tabla 2.1. Los MWCNTs tipo "A" (Baytubes C150P, pureza > 95 % en peso (p/p)) se obtuvieron de Bayer MaterialScience AG, (Leverkusen, Alemania), mientras que los MWCNTs del tipo "B" (pureza > 95 % p/p) fueron obtenidos de Cheap Tubes Inc., (Brattleboro, USA). El área superficial BET y la relación de la intensidades (I_G/I_D) obtenidas por espectroscopía Raman incluidos en la Tabla 2.1, son resultados de esta investigación que serán discutidos en la sección de resultados, y se incluyen con antelación para facilitar la discusión. También se emplearon para los tratamientos oxidativos ácido sulfúrico al 98.6 % en volumen (v/v) y ácido nítrico al 70% v/v, adquiridos de JT Baker. Para la decoración de MWCNTs con nanopartículas de óxidos de hierro se utilizó trietilenglicol (TREG) al 99 % v/v (Sigma-Aldrich, San Luis MO, EUA), tricloruro de hierro hexahidratado (99 % p/p) y acetato de sodio anhidro (99 % p/p) Merck.

Tabla 2.1 Características fisicoquímicas de los MWCNTs estudiados.

MWCNTs	Diámetro interno (nm)	Diámetro externo (nm)	Longitud (μm)	Área superficial BET (m^2/g)	Intensidad Raman (I_G/I_D)
A (Bayer MaterialScience)	2-6	13-16	0.5-2.5	197	0.42±0.01
B (Cheap Tubes Inc.)	5-10	50-80	1-6	110	0.89±0.01

2.3 Métodos

Con la finalidad de esclarecer la metodología seguida en el desarrollo de este trabajo de tesis, se describen a continuación mediante un diagrama (Fig. 2.1), los métodos más importantes que fueron utilizados, así como el tipo de caracterización empleada.

Como se observa en el diagrama de la Fig. 2.1 el trabajo inicia con la adquisición de dos tipos de MWCNTs con características diferentes (ver Tabla 2.1), los cuales fueron caracterizados sin tratamiento por diversas técnicas fisicoquímicas y por voltamperometría cíclica (Cap. 3). Estos MWCNTs fueron oxidados mediante un tratamiento con ácidos para generar una superficie activa, y una vez oxidados se decoraron con nanopartículas de óxido de hierro. Ambos tipos de MWCNTs oxidados y decorados fueron posteriormente

inmovilizados mediante uniones covalentes con la enzima GOx y caracterizados por técnicas de fisicoquímicas y electroquímicas (Cap. 3). Mediante análisis de los resultados obtenidos de las caracterizaciones, se decidió utilizar solamente los MWCNTs del tipo B (tanto oxidados como decorados) inmovilizados con la enzima GOx en la detección electroquímica de glucosa.

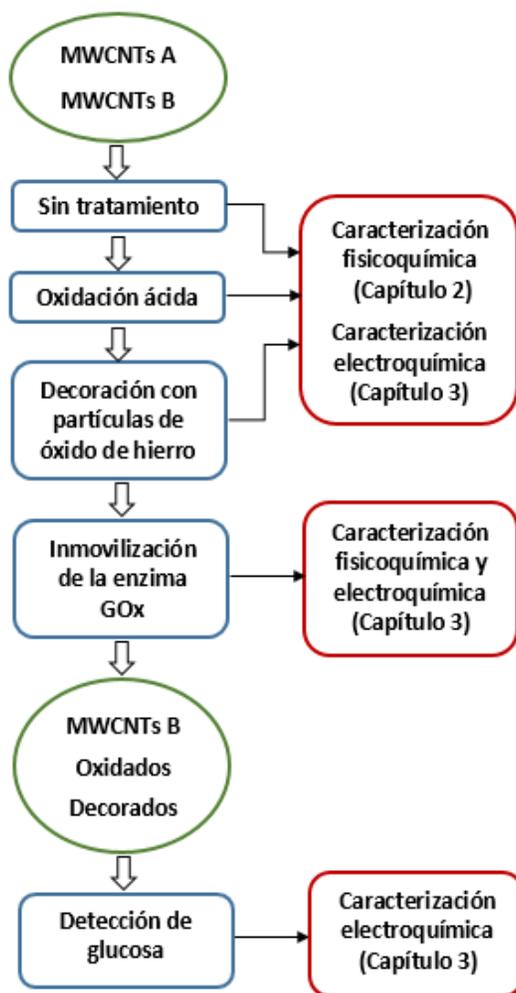


Fig. 2.1 Esquema de la metodología empleada para el desarrollo del trabajo.

2.3.1 Oxidación de nanotubos de carbono

Los MWCNTs fueron oxidados por medio de un tratamiento oxidativo con una mezcla de HNO₃ y H₂SO₄. Con ello se favorece la generación de grupos -OH, -CO y -COOH sobre la superficie [Avilés et al., 2009; Wepasnick et al., 2011]. Este procedimiento consiste en la dispersión de 0.3 g de MWCNTs en 70 mL de una mezcla de 35 mL de HNO₃ al 8.0 M y

35 mL de H₂SO₄ al 8.0 M. Los MWCNTs se dispersaron mecánicamente en esta mezcla de ácidos durante 15 min a 60 °C, seguido de 2 h de dispersión en un baño de ultrasonido (100 W, 42 kHz) [Avilés et al. 2009]. Los MWCNTs tratados se lavaron y filtraron con abundante agua destilada y se secaron a 100 °C durante 12 h.

2.3.2 Decoración de nanotubos de carbono

El método utilizado para la decoración de MWCNTs con nanopartículas de óxido de hierro consistió en la dispersión por 1 h en baño ultrasónico de 100 mg de MWCNTs oxidados en 50 mL de TREG. Después de la dispersión, 100 mg o 200 mg de FeCl₃*6H₂O (tratamientos 1:1 y 1:2, respectivamente) y 3.6 g de acetato de sodio anhidro se añadieron a la disolución. La mezcla resultante se llevó a reflujo a 200 °C durante 30 min. Después del reflujo, la muestra se dejó reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente y los MWCNTs obtenidos se centrifugaron en 150 mL de acetona para separar las fases y retirar los residuos de TREG. Posterior a la centrifugación los MWCNTs se filtraron y lavaron con abundante agua destilada, para finalmente secarse a 100 °C por 12 h. La Tabla 2.2 muestra los tratamientos de decoración discutidos en el presente documento para los dos tipos de MWCNTs oxidados y las dos concentraciones en peso de precursor de metal utilizado.

Tabla 2.2 Tratamientos de decoración realizados a los MWCNTs y su identificación de acuerdo al tipo de MWCNT y concentración del precursor metálico.

Tipo de MWCNT	A		B	
Razón en peso de MWCNTs: FeCl ₃ *6H ₂ O	1:1	1:2	1:1	1:2
Identificación	1:1-A	1:2-A	1:1-B	1:2-B

Estas dos concentraciones fueron seleccionadas sobre la base de un primer análisis que evaluó diferentes concentraciones de precursores metálicos y tiempos de reflujo utilizando únicamente MWCNTs del tipo A (véase Apéndice A). Mediante el análisis experimental de varias concentraciones y tiempos de reflujo (ver Apéndice A), se concluyó que el aumento en la concentración del precursor metálico sobre 1:2 y del tiempo de reflujo sobre 30 min producen una decoración no homogénea de las nanopartículas sobre los MWCNTs, y por ello los resultados de la Tabla 2.2 son únicamente presentados en este capítulo.

Microscopías de transmisión de las concentraciones y tiempos no seleccionados para el estudio final se presentan en el Apéndice A.

2.3.3 Técnicas de caracterización empleadas

Los MWCNTs sin tratamiento se caracterizaron por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) utilizando un equipo de 460 Nicolet Protege en un intervalo espectral de 4000-400 cm^{-1} . Los espectros se obtuvieron en modo transmitancia. Para ello se dispersó una pequeña cantidad de MWCNTs en KBr y se preparó una pastilla. La espectroscopía Raman se llevó a cabo con un sistema óptico Kaiser y un láser de Helio-Neón con 632 nm de longitud de onda; las muestras se prepararon mediante la dispersión de 5 mg de MWCNTs en 10 mL de acetona en un baño ultrasónico. La mezcla MWCNT/acetona se depositó, gota a gota, en una lámina de aluminio a 60 °C, para la evaporación de la acetona. Las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno se midieron utilizando un equipo Micromeritics TriStar 3000 a 77 K. Las áreas específicas (S_{BET}) se determinaron utilizando la ecuación de Brunauer, Emmett y Teller (método BET) [Brunauer et al., 1938; Gregg y Sing, 1982]. Finalmente, los análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizaron con un equipo Jeol JEM-2010F operado a 80 kV.

Después de la oxidación ácida, los MWCNTs decorados con nanopartículas de óxidos de hierro se caracterizaron por las técnicas TEM y espectroscopía Raman en condiciones similares a las utilizadas con los MWCNTs sin tratamiento. El análisis de energía dispersiva de rayos X (EDX) se llevó a cabo en un microscopio Jeol SEM 6360LB; la difracción de rayos X (DRX) se llevó a cabo en un difractómetro Siemens D5000 a 40 kV, 20 mA, a un tiempo de 10 s por paso y ángulos de paso de 0.02°; el análisis termogravimétrico (TGA) se llevó a cabo utilizando un analizador Perkin Elmer Pyris 1 a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo un flujo de aire sintético (O_2/N_2) de 20 ml/min; la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) se llevó a cabo con un espectrómetro Thermo K-alfa equipado con una fuente de Al monocromático de rayos X (1486.6 eV) y tamaño de punto de 400 μm ; finalmente, la respuesta magnética de los MWCNTs decorados se probó en un magnetómetro vibratorio LDJ-9600 aplicando un campo máximo de 15000 Oe a temperatura ambiente.

2.4 Resultados

2.5 Caracterización fisicoquímica de nanotubos de carbono sin tratamiento y oxidados

2.5.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Los MWCNTs sin tratamiento se caracterizaron a detalle con el fin de investigar la influencia de sus propiedades iniciales en su decoración. La caracterización de la oxidación de los MWCNTs es discutida brevemente en esta sección, debido a que el método ha sido ya reportado y caracterizado extensivamente en la literatura [Avilés et al., 2009; Wepasnick et al., 2011; Schönfelder et al., 2011]. La Fig. 2.2 muestra espectros FT-IR representativos de los MWCNTs sin tratamiento del tipo A y B (cuyas propiedades se presentan en la Tabla 2.1). Los espectros FT-IR se normalizaron con la banda de absorción correspondiente al enlace C=C que se encuentra a $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$, con la intención de observar cambios en la intensidad de las otras bandas de absorción presentes. Como se observa en la Fig. 2.2, las bandas de absorción detectadas son similares para los MWCNTs sin tratamiento (A y B). Ambos MWCNTs exhibieron absorciones entre $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$, lo que indica la presencia de grupos funcionales hidroxilo; la banda a $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ se asignan a la vibración del C=C conjugado, mientras que entre ~ 2850 y $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$ se observaron vibraciones de estiramientos C-H [Avilés et al., 2009]. La vibración de estiramiento de grupos carbonilo relacionada con la presencia de los ácidos carboxílicos se observó a $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$ [Avilés et al., 2009], mientras que la banda a $\sim 1110\text{ cm}^{-1}$ fue asignada a enlaces C-O [Wepasnick et al., 2011]. La intensidad de la banda a $\sim 1110\text{ cm}^{-1}$ (enlaces C-O) fue ligeramente superior para MWCNTs del tipo A con respecto a los del tipo B. Por lo tanto, a través del análisis FT-IR se observa que los MWCNTs contienen una cantidad significativa de grupos funcionales desde su síntesis y que estos están presentes de manera similar en ambos tipos de MWCNTs antes de oxidarlos. Sin embargo, la cantidad de grupos funcionales que contienen oxígeno en los MWCNTs del tipo A puede ser ligeramente más alto que en los MWCNTs del tipo B.

En cuanto a la oxidación ácida de los MWCNTs, se ha demostrado previamente que la oxidación empleada aumenta la densidad de grupos funcionales, específicamente -OH, -CO y -COOH [Avilés et al., 2009; Wepasnick et al., 2011; Schönfelder et al., 2011]. Los espectros FT-IR de ambos tipos de MWCNTs después de la oxidación, no presentaron cambios notables con respecto a los observados en los MWCNTs sin tratamiento (ver

recuadro de la Fig. 2.2 para los MWCNTs del tipo A, es decir, no aparecieron nuevas bandas de absorción con la oxidación, pero si fue posible observar el incremento de algunas bandas de absorción, principalmente a $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ por el probable incremento de grupos funcionales hidroxilo y a ~ 2850 y $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$ relacionadas con las vibraciones de estiramientos C-H.

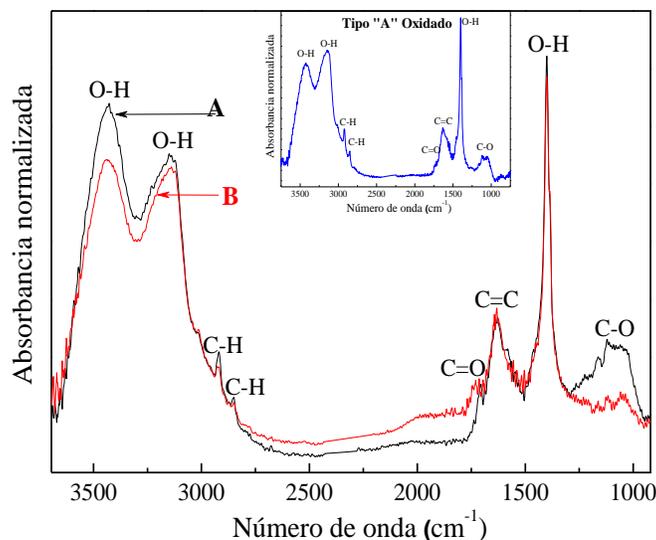


Fig. 2.2 Espectros FT-IR de MWCNTs sin tratamiento (A y B) y oxidado tipo A (recuadro de la figura). Las etiquetas A y B corresponden a la Tabla 2.1.

2.5.2 Microscopía electrónica de transmisión

La Fig. 2.3 muestra las imágenes TEM de MWCNTs del tipo A (Fig. 2.3a) y tipo B (Fig. 2.3b) tal como se recibieron del proveedor, así como los oxidados tipo A (Fig. 2.3c) y B (Fig. 2.3d). Las dimensiones de ambos nanotubos están razonablemente de acuerdo con los datos proporcionados por el fabricante, ver Tabla 2.1. Para MWCNTs de tipo A (Fig. 2.3a), se observa daño estructural en las paredes tanto externas como internas, así como una superficie con rugosidad importante y curvaturas significativas a lo largo de su longitud. En los MWCNTs del tipo B (Fig. 2.3b) se presenta el mismo tipo de defectos pero ligeramente menos extendidos.

Se ha reportado que la oxidación ácida efectuada sobre los MWCNTs, aumenta la densidad y extensión de dichos defectos estructurales en su superficie [Avilés et al., 2012], lo cual puede observarse en la Fig. 2.3c para los MWCNTs del tipo A y la Fig. 2.3d para el tipo B.

En los MWCNTs del tipo A se observa más claramente este hecho (Fig. 2.3c), pues la rugosidad y el daño estructural en las paredes externas es más evidente, algo que no se puede observar claramente en los MWCNTs del tipo B (Fig. 2.3d) probablemente debido a su mejor ordenamiento estructural inicial.

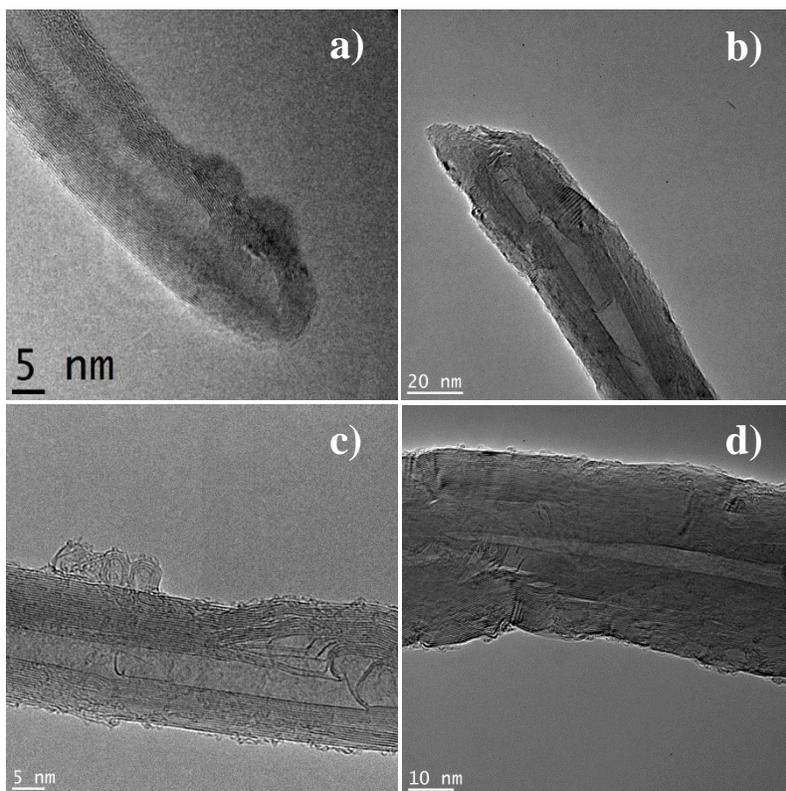


Fig. 2.3 Micrografías TEM de los MWCNTs. a) Tipo A sin tratamiento, b) tipo B sin tratamiento, c) tipo A oxidado, d) tipo B oxidado.

2.5.3 Análisis de área superficial por isothermas de adsorción de nitrógeno

La Fig. 2.4 muestra las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno (N_2) de los MWCNTs sin tratamiento. Estas isothermas se pueden identificar como "Tipo IV" de acuerdo con la clasificación de la IUPAC, correspondiente a materiales mesoporosos con ciclos de histéresis que ocurre alrededor de $0.60 < P/P_0 < 1$ [Sing et al., 1985]. Las áreas específicas (S_{BET}) se determinaron utilizando la ecuación de Brunauer, Emmett y Teller [Brunauer et al., 1938; Gregg y Sing, 1982]. El recuadro de la figura 2.4 muestra una ampliación del intervalo $P/P_0 = 0.05-0.30$ utilizado para el cálculo de la de S_{BET} . Las áreas específicas obtenidas fueron $S_{BET} = 197 \text{ m}^2/\text{g}$ para los MWCNTs del tipo A y $S_{BET} = 110 \text{ m}^2/\text{g}$ para los MWCNTs del tipo B, lo cual se correlaciona con la superficie más rugosa e

irregular de los MWCNTs del tipo A observada en las micrografías TEM. También se ha reportado que la oxidación ácida genera más defectos y elimina los rastros de carbono amorfo de la superficie, por lo que aumenta el área superficial S_{BET} [Avilés et al., 2013].

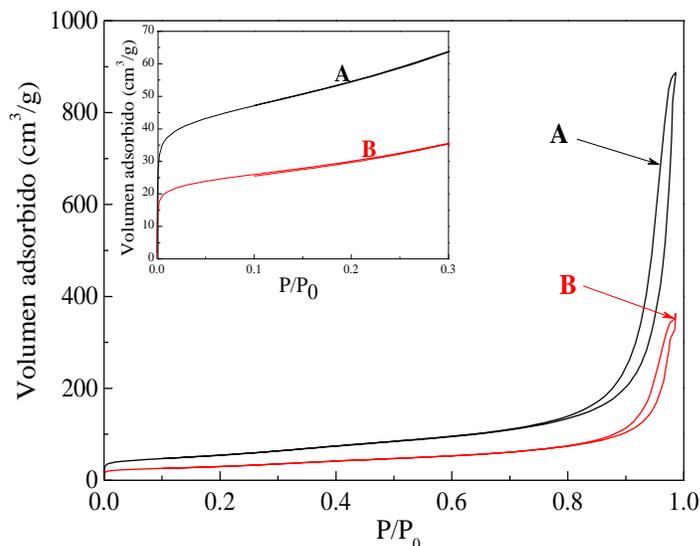


Fig. 2.4 Isothermas de adsorción-desorción de N_2 para los MWCNTs sin tratamiento. El recuadro muestra un acercamiento del intervalo usado para calcular el área superficial S_{BET} .

2.5.4 Espectroscopía Raman

La Fig. 2.5 muestra los espectros Raman representativos para ambos tipos de MWCNTs sin tratamiento. La banda G es un modo de primer orden en Raman situado alrededor de $1580\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ y que corresponde a las vibraciones sp^2 de los átomos de carbono. La banda D se origina a partir de un proceso de dispersión de segundo orden que se produce alrededor de $1280\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ y representa la pérdida de simetría de translación en la red, por lo que proporciona información sobre la presencia de vacancias, defectos y el tamaño finito de la red [Dresselhaus et al., 2010].

Para caracterizar el orden estructural de los MWCNTs puede utilizarse la relación de intensidades entre las bandas G y D (I_G/I_D) [Dresselhaus et al., 2010; Dresselhaus et al., 2005; Antunes et al., 2006]. Esta estrategia se utilizó para la deconvolución de la banda G y los resultados se presentan en la Tabla 2.3.

Las bandas G y D observadas en la Fig. 2.5a y 2.5b son anchas, algo que es característico de los MWCNTs comerciales fabricados por depósito de vapor químico [Dresselhaus et al.

2010, Dresselhaus et al. 2005]. El ancho aparente de la banda G está compuesto de dos bandas principales, la propia G ubicada a $\sim 1585 \text{ cm}^{-1}$ y una segunda banda llamada D' situada a $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ [Dresselhaus et al., 2010; Dresselhaus et al., 2005; Antunes et al., 2006]. Las bandas D y D' se explican por la teoría de doble resonancia y se relacionan con defectos estructurales. En los procesos de doble resonancia, el origen de las bandas D y D' y otros modos dispersivos débiles en los espectros Raman de grafito se explican por la mejora de resonancia de la intensidad Raman en dos procesos consecutivos de dispersión [Antunes et al., 2006]. La forma de la banda situada entre 1550 y 1650 cm^{-1} es muy diferente entre MWCNTs de ambos tipos (A o B), lo cual fue reproducible para varias muestras analizadas. El ancho de banda alrededor de 1620 cm^{-1} correspondiente a D' es claramente más intenso para los MWCNTs del tipo A con respecto a los del tipo B, pero está unida con la banda G. Debido a esto se realizó la deconvolución de las bandas G y D' utilizando la distribución de Lorentz. Las bandas deconvolucionadas se muestran en los recuadros de las Figs. 2.5a y 2.5b.

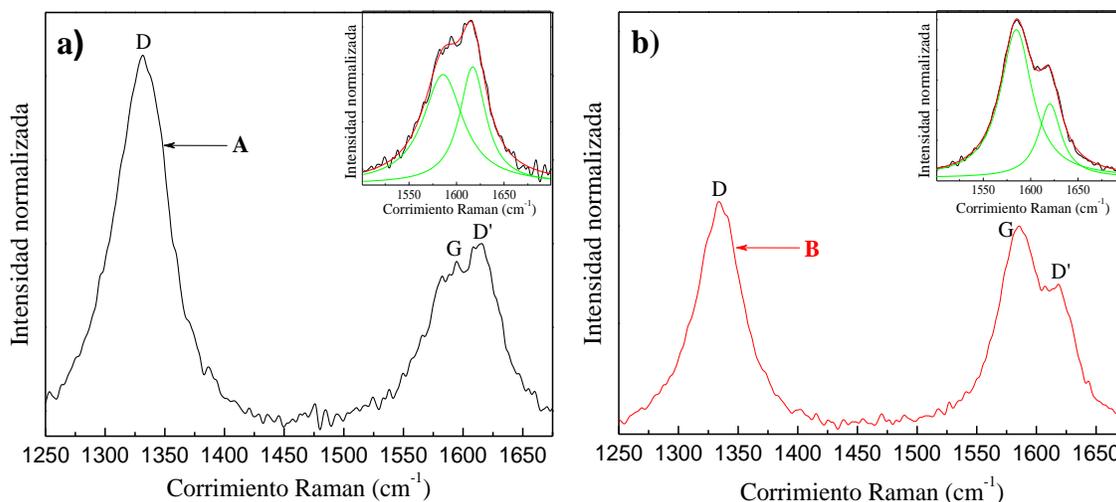


Fig. 2.5 Espectros Raman de los MWCNTs sin tratamiento. a) Tipo A, b) Tipo B. El recuadro muestra la deconvolución de la banda G.

Se realizó la deconvolución de la banda centrada a $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ en dos bandas centradas en 1585 cm^{-1} (G) y 1620 cm^{-1} (D') para ambos tipos de MWCNTs y los resultados se muestran en la Tabla 2.3. El análisis del ancho total a la altura media máxima (FWHM, por sus siglas en inglés) también indica que las bandas G y D son significativamente más anchos para los

MWCNTs del tipo A, lo que señala un desorden estructural mayor para estos nanotubos [Dillon et al. 2004]. En los MWCNTs del tipo A las relaciones de intensidades fueron $I_G/I_D = 0.42$ y $I_G/I_{D'} = 0.90$, mientras que para los MWCNTs del tipo B $I_G/I_D = 0.89$ y $I_G/I_{D'} = 1.43$. El menor valor de I_G/I_D e $I_G/I_{D'}$ (aumento en la intensidad de las bandas D y D'), así como los mayores valores de FWHM para los MWCNTs del tipo A con respecto a los del tipo B son una clara indicación de que el orden estructural es significativamente menor para este tipo de MWCNTs. Esto quiere decir que el número de defectos por unidad de superficie es mayor para los MWCNTs del tipo A y estos defectos en la estructura del MWCNT pueden funcionar como sitios reactivos para la decoración.

Tabla 2.3 Valores característicos de los espectros Raman de los MWCNTs sin tratamiento y la deconvolución de la banda a $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$.

MWCNT	Corrimiento Raman (cm^{-1})			FWHM (cm^{-1})			I_G/I_D	$I_G/I_{D'}$
	G	D	D'	G	D	D'		
A	1586	1331	1617	51.0 ± 0.1	57.0 ± 0.3	33.7 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.90 ± 0.01
B	1585	1334	1620	40.3 ± 0.04	47.7 ± 0.2	28.9 ± 0.03	0.89 ± 0.01	1.43 ± 0.01

No se encontraron cambios significativos en los espectros Raman de MWCNTs sin tratamiento con respecto a los MWCNTs después del tratamiento de oxidación ácida, ni tampoco después de su decoración con partículas de óxido de hierro; esto que sugiere que esta técnica de caracterización no es la idónea para la detección y análisis de dichos cambios, por lo que los espectros Raman no se discuten.

2.6 Decoración de nanotubos de carbono con partículas de óxidos de hierro

2.6.1 Microscopía electrónica de transmisión

En la Fig. 2.6 se observan las micrografías TEM obtenidas de los MWCNTs decorados con nanopartículas de óxidos de hierro; como se mencionó anteriormente, estos resultados se seleccionaron con base a variantes experimentales de la metodología de decoración probadas que no tuvieron el éxito deseado, algunas de las cuales se presentan en el Apéndice A.

En la Fig. 2.6 se comparan los resultados a magnificaciones que capturan grupos de MWCNTs y MWCNTs individuales. Las concentraciones en peso del precursor metálico fueron 100 y 200 mg, manteniendo constantes los 100 mg de MWCNTs; todos los tratamientos de la Fig. 2.6 utilizaron un tiempo de reacción de 30 min (ver tratamientos 1:1 y 1:2 descritos en la Tabla 2.2 para ambos tipos de MWCNTs).

La unión de las nanopartículas de óxido de hierro a las paredes del MWCNT se logra principalmente mediante enlaces físicos y atracciones electrostáticas [Lu, 2007]. El mecanismo para la decoración de los MWCNTs con nanopartículas de óxido de hierro se basa en la descomposición a altas temperaturas del tricloruro de hierro hexahidratado en forma de óxidos de hierro, que se nuclean sobre la superficie de los MWCNTs y proporcionan una plantilla para el crecimiento de nanopartículas, siguiendo probablemente las siguientes reacciones químicas [Li et al., 2010]:



Los grupos funcionales cargados negativamente en la superficie del MWCNT oxidado proporciona sitios activos para las interacciones físicas con los iones metálicos [Liu et al., 2009; Zhang et al., 2009].

El diámetro de las partículas de óxidos de hierro decorando los MWCNTs se midió a partir de varias imágenes correspondientes al mismo tratamiento de decoración y tipo de MWCNT, y su histograma de distribución de diámetros de partícula se muestra en la última columna de la Fig. 2.6. En dicha figura, se observa que los MWCNTs del tipo A decorados a una concentración de precursor de 1:2 presentan una gran densidad de nanopartículas y una distribución bastante homogénea de estas en las paredes de los MWCNTs. Además, las nanopartículas de óxidos de hierro no sólo se concentran en los nanotubos individuales, sino que también se distribuyen homogéneamente en grupos de MWCNTs. El diámetro de las partículas de óxido de hierro oscila entre 2-9 nm para el tratamiento 1:2-A, con un diámetro de partícula característico de ~5 nm. Para el tratamiento 1:1-A (disminuyendo la concentración de precursor de hierro para el mismo tipo de MWCNT) también se observa una distribución homogénea de las partículas en las paredes de los MWCNTs, aunque la cantidad de partículas se reduce ligeramente. Tendencias similares se observan para los MWCNTs del tipo B tratados con concentraciones de precursores de 1:2 (tratamiento 1:2-

B) y 1:1 (tratamiento 1:1-B); sin embargo, para los MWCNTs del tipo A se observó una mayor densidad de partículas por superficie de nanotubo con una distribución más homogénea de nanopartículas decoradas con respecto a los del tipo B.

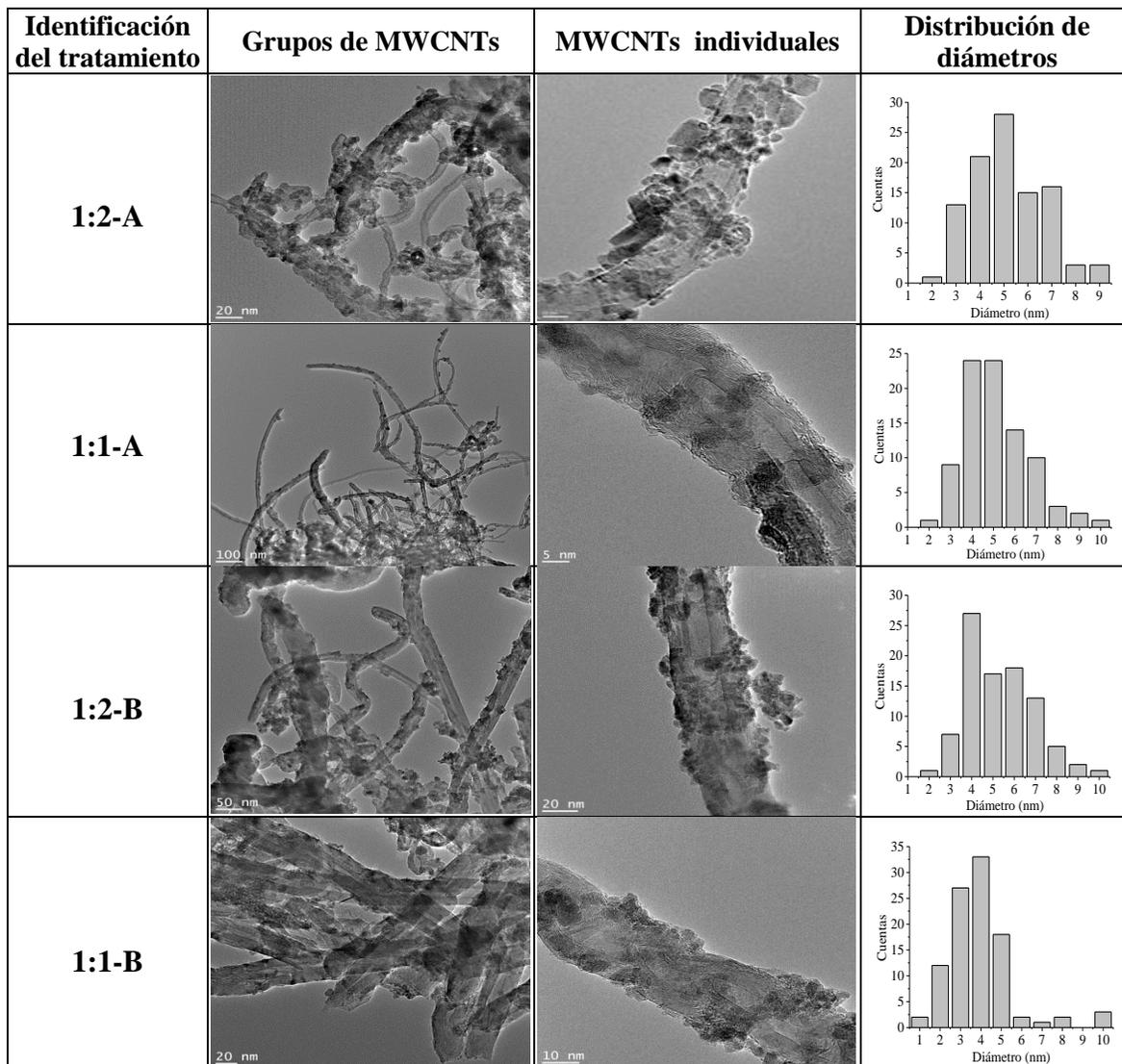


Fig. 2.6 Micrografías TEM y distribución de diámetros de partículas de óxidos de hierro decorando los MWCNTs (Tipos A y B) con razones 1:1 y 1:2 (MWCNTs: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La identificación de los tratamientos corresponde a la Tabla 2.2.

Simulaciones de mecánica cuántica utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT) para estudiar la adsorción de un átomo metálico en nanotubos de carbono indican que la energía de enlace más fuerte para la adsorción de nanopartículas sobre MWCNTs se da en los sitios con una alta densidad de defectos [Park et al., 2007]. Cálculos de DFT revelan

también que las interacciones entre nanotubos de carbono funcionalizados y partículas de óxido de hierro se mejoran por los defectos del carbono tales como vacancias [Yin et al., 2011]. Esta evidencia teórica, así como los resultados de las caracterizaciones realizadas a los MWCNTs antes de la decoración, donde el área superficial y la cantidad de sitios defectuosos son mayores para los MWCNTs del tipo A, y se incrementan con el tratamiento oxidativo, son evidencia de que los MWCNTs del tipo A son más adecuados para la decoración con respecto a los MWCNTs del tipo B.

2.6.2 *Análisis por energía dispersiva de rayos X*

Se realizó un análisis elemental de los MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro por EDX. Por este análisis se comprobó que los principales elementos presentes en ambos tipos de MWCNTs decorados son carbono, oxígeno y hierro. El tratamiento 1:2 en ambos tipos de MWCNTs (A y B), mostró valores similares de carbono $\sim 60\text{-}63\%$ p/p, de oxígeno $\sim 18\%$ p/p, y hierro $\sim 18\text{-}21\%$ p/p. En los tratamiento 1:1, se encontró una reducción en la cantidad de Fe (del $\sim 18\text{-}21\%$ a $\sim 12\%$ p/p) en ambos tipos de MWCNTs, aumentando en $\sim 10\%$ p/p la cantidad de carbono de las muestras. En principio, el hierro presente en las muestras de MWCNTs decorados podría surgir del elemento Fe o de óxidos de hierro. La cantidad de contenido de oxígeno en los MWCNTs decorados aumentó en $\sim 10\%$ p/p con respecto a los MWCNTs oxidados, lo que sugiere la formación de óxidos de hierro. Esto fue verificado con difracción de rayos X y XPS.

2.6.3 *Difracción de rayos X*

La Fig. 2.7 presenta los patrones de difracción para ambos tipos de MWCNTs oxidados. Ambos MWCNTs muestran picos de difracción a ángulos $2\theta = 26.6^\circ$ y 43.5° , que se atribuyen a los planos (002) y (100) de los MWCNTs, respectivamente [Zhang et al., 2005]. Los picos de difracción observados se mantienen en el análisis de los espectros obtenidos para ambos tipos de MWCNTs decorados, pero la aparición de nuevas reflexiones confirman la presencia de partículas de óxidos de hierro [Jiang et al., 2011]. Los MWCNTs decorados del tipo A (Fig. 2.7a) presentaron nuevos picos de difracción a $2\theta = 35.5^\circ$, 54.0° y 63.0° , que corresponden a los planos (311), (422) y (400) de magnetita (Fe_3O_4), pero al mismo tiempo se superponen con algunos picos de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), de acuerdo con el estándar de difracción de polvos (JCPDS, por sus siglas en inglés) con las tarjetas N° 19-629 para magnetita (Fe_3O_4) y N° 39-1346 para maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [Anthony et al., 2015].

Los MWCNTs decorados del tipo B (Fig. 2.7b) presentaron picos de difracción similares a $2\theta = 35.5^\circ$, 54.0° y 63.0° , lo que sugiere la coexistencia de Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en ambas muestras de MWCNTs decorados.

La intensidad de los picos correspondientes a las partículas de óxido de hierro entre los MWCNTs A y B decorados fue diferente, sobre todo cuando se comparó la relación de las intensidades del pico de difracción principal para Fe_3O_4 a $2\theta = 35.5^\circ$ ($I_{35.5^\circ}$), con el pico de difracción principal observado en los MWCNTs a $2\theta = 26.6^\circ$ ($I_{26.6^\circ}$). Para los MWCNTs del tipo A la relación $I_{26.6^\circ}/I_{35.5^\circ}$ fue de 0.91, mientras que para los MWCNTs del tipo B $I_{26.6^\circ}/I_{35.5^\circ}$ fue 8.74. Esto mostró que la intensidad del pico de difracción asignado a los óxidos de hierro en los MWCNTs decorados del tipo A (tratamiento 1:2-A) es mucho mayor que la intensidad entre ambos picos obtenida en los MWCNTs del tipo B (tratamiento 1:2-B), lo cual consistentemente sugiere una mayor densidad de nanopartículas decoradas por unidad de área en la superficie de los MWCNTs que contienen una cantidad mayor de sitios defectuosos o activos (es decir, los del tipo A).

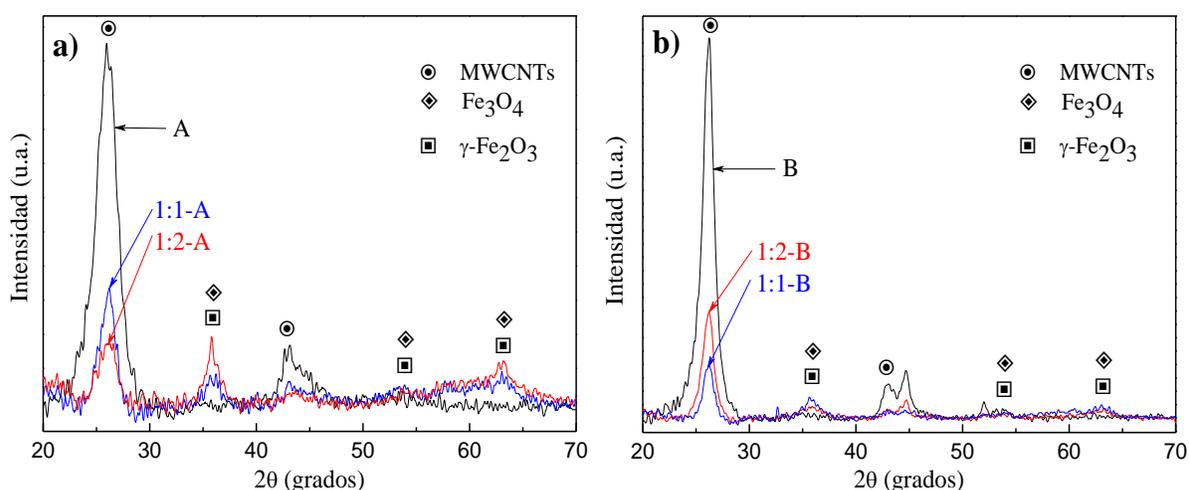


Fig. 2.7 Patrones de difracción de rayos X de los MWCNTs oxidados y de los MWCNTs decorados con dos concentraciones de precursor metálico.
a) MWCNTs del tipo A, b) MWCNTs del tipo B.

2.6.4 Análisis termogravimétrico

La Fig. 2.8 muestra el análisis termogravimétrico bajo un flujo de aire sintético (O_2/N_2) de ambos tipos de MWCNTs oxidados y decorados con diferente concentración en peso de precursor metálico (1:1 y 1:2). Las pérdidas de peso antes de $\sim 150^\circ\text{C}$ están asociadas a la

evaporación del agua adsorbida físicamente y la probable descomposición de grupos funcionales que contienen oxígeno. Se ha reportado que la deshidratación y descarboxilación de grupos funcionales se lleva a cabo entre 150 y 350 °C para los MWCNTs oxidados [Wepasnick et al., 2011; Rosario-Castro et al., 2009]. Sin embargo, en los MWCNTs decorados, las nanopartículas de óxidos de hierro catalizan la degradación térmica tanto de carbono amorfo, como de la propia nanoestructura del carbono grafitico [Wepasnick et al., 2011; Rosario-Castro et al., 2009; Zhao et al., 2012], lo que produce una pérdida de peso marcada en la región de 200 a 300 °C. Una degradación térmica más pronunciada ocurrió para ambos tipos de MWCNTs decorados a la concentración 1:2 que a la 1:1, lo que indica una mayor densidad de partículas presentes en los MWCNTs con esta concentración. Después de esta zona, se produce la degradación térmica de la estructura de grafito (sp^2) de los MWCNTs, algo que ocurre a temperaturas más bajas en los MWCNTs decorados. La tasa máxima de pérdida de peso y la temperatura a la que esta descomposición se produce más rápidamente (T_d) se pueden identificar por la derivada de la curva de los análisis TGA (recuadro en la Fig. 2.8). Para los MWCNTs del tipo A, la T_d de las muestras oxidadas fue de ~621 °C, correspondiente a la oxidación de la estructura del grafito; sin embargo, para los MWCNTs del mismo tipo decorados con una concentración de precursor metálico de 1:1 y 1:2 la T_d fue de ~505 °C y ~448 °C, respectivamente. Para los MWCNTs del tipo B la T_d de las muestras oxidadas fue de ~626 °C, mientras que en las muestras decoradas con una concentración del precursor metálico de 1:1 y 1:2 fue de 451 °C y 476 °C, respectivamente. Una mayor estabilidad térmica se encontró en los MWCNTs del tipo B con respecto a los de tipo A; esto se correlaciona bien con la estructura menos defectuosa caracterizada por espectroscopía Raman. La T_d inferior observada en las muestras decoradas confirma la mayor actividad catalítica de oxidación de las nanopartículas de óxido de hierro, lo cual ha sido también sugerido por otros autores [Wepasnick et al. 2011, Rosario-Castro et al 2009, Zhao et al. 2012, Kauffman et al. 2010]. El hecho de que la descomposición se produce a temperaturas más bajas para las concentraciones de 1:2 con respecto a 1:1, especialmente para los MWCNTs del tipo A (ver inserciones en Fig. 2.8), indica una mayor cantidad de nanopartículas de óxido de hierro.

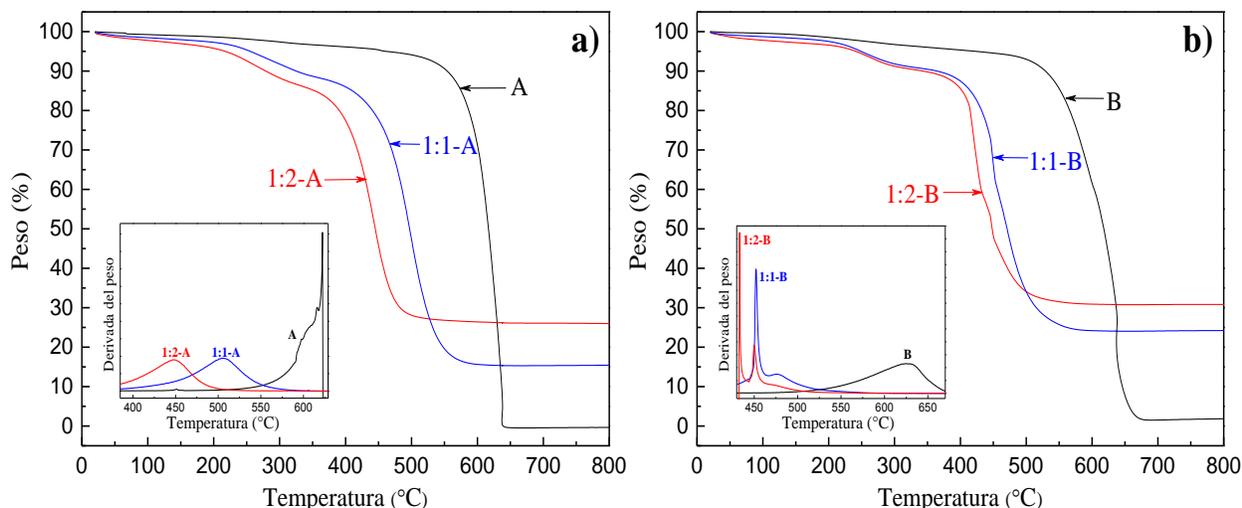


Fig. 2.8 Termogramas de TGA de los MWCNTs oxidados y decorados con diferente concentración en peso del precursor metálico. a) MWCNTs del tipo A, b) MWCNTs del tipo B.

Los MWCNTs oxidados de ambos tipos pierden prácticamente la totalidad de su masa a ~ 650 °C. La masa residual después de 650 °C para ambos tipos de MWCNTs decorados con diferente concentración de precursor metálico proporciona información valiosa acerca de la cantidad de partículas de óxido de hierro presentes en las muestras. En los MWCNTs del tipo A la masa residual para el tratamiento 1:2 fue 26.5 % y para el tratamiento 1:1 fue 15.2 %. La masa residual observada en los MWCNTs del tipo B fue de 30.8 % para el tratamiento 1:2 y 24.2 % para el tratamiento 1:1. Los valores porcentuales obtenidos para la masa residual están en razonable concordancia con los valores obtenidos por el análisis EDX para los mismos tratamientos de decoración. La mayoría de este porcentaje debe corresponder al peso de las nanopartículas de óxido de hierro que decoran los MWCNTs, ya que las impurezas metálicas presentes en los MWCNTs antes de la decoración son < 1% en peso.

2.6.5 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X

La Fig. 2.9 muestra los espectros de XPS de los MWCNTs decorados (A y B) preparados con diferentes concentraciones en peso de precursor (1:1 y 1:2). El estudio XPS de ambos MWCNTs decorados (Figs. 2.9a y 2.9c) mostró bandas a ~ 285, 532 y 711 eV, que se atribuyen a la distribución energética de los orbitales C 1s, O 1s y Fe 2p, respectivamente [Liu et al., 2009; Fan y Li, 2012; Han et al., 2012]. Fe 2p_{1/2} y Fe 2p_{3/2} son bandas situadas a 711 y 724.9 eV respectivamente, relacionadas con los estados químicos del Fe en Fe₃O₄

[Missana et al., 2003; Torres Sánchez, 1990; Jiang et al., 2011]; el orbital entre Fe 2p_{1/2} y Fe 2p_{3/2} (inserciones en las figuras 2.8a y 2.8c) sugiere que los estados de Fe adicionales pueden encontrarse en la forma γ -Fe₂O₃ [Kauffman et al., 2010; Han et al., 2012; Jiang et al., 2011]. Se observó un corrimiento de 532 a 530 eV y una ampliación del ancho de la banda del orbital O 1s para las muestras decoradas (Figs. 2.9b y 2.9d). Esta banda se analizó adicionalmente por deconvolución empleando distribuciones Lorentzianas (véase el recuadro de la deconvolución en las Figs. 2.9b y 2.9d). Tres bandas están presentes en los espectros de deconvolución del orbital O 1s (recuadro de las Figs. 2.9b y 2.9d) que corresponden a C=O en 532.8 eV, C-O-H en 531.3 eV y Fe-O-Fe en 530.2 eV [Han et al., 2012]. El FWHM de esas bandas es 2.29 eV para C=O, 1.50 eV para C-O-H y 0.99 eV para Fe-O-Fe en los MWCNTs del tipo A, y 2.13 eV para C=O, 1.50 eV para C-O-H y 0.98 eV para Fe-O-Fe en los MWCNTs del tipo B. Estas bandas puede relacionarse con la contribución de oxígeno en Fe₃O₄ [Han et al., 2012]. La relación entre las intensidades XPS de Fe-O-Fe (530.2 eV) y C-O-H (531.3 eV) en los MWCNTs del tipo A ($I_{\text{Fe-O-Fe}}/I_{\text{C-O-H}}$) fue de ~2.5, mientras que para MWCNTs de tipo B $I_{\text{Fe-O-Fe}}/I_{\text{C-O-H}}$ fue de ~2.2. La diferencia entre estas relaciones de intensidad sugirió consistentemente que existe una mayor densidad de nanopartículas de Fe₃O₄ en los MWCNTs del tipo A. Así, el análisis XPS confirmó que la magnetita (Fe₃O₄) es la fase dominante presente en las nanopartículas de decoración y que coexiste con maghemita (γ -Fe₂O₃). La relación de intensidades en el análisis de deconvolución también sugirió que una mayor densidad de nanopartículas de decoración está presente en los MWCNTs del tipo A comparado con los MWCNTs del tipo B, lo que es consistente con los resultados obtenidos por DRX y TGA.

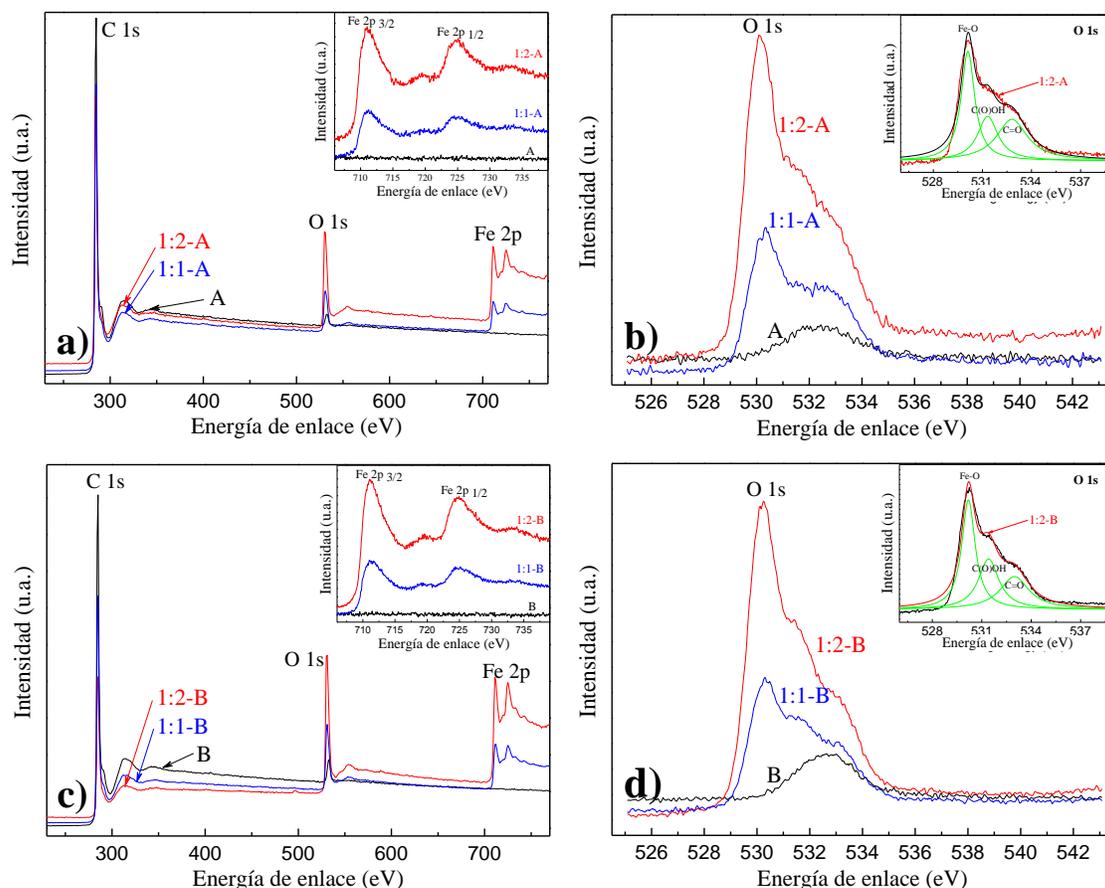


Fig. 2.9 Espectros XPS de los MWCNTs (A y B) oxidados y decorados con distinta concentración de precursor metálico (1:1 y 1:2). a) MWCNTs del tipo A, b) Orbital O 1s de los MWCNTs del tipo A, c) MWCNTs del tipo B, d) Orbital O 1s de los MWCNTs del tipo B.

2.6.6 Magnetometría de muestra vibrante

Para conocer de manera preliminar el carácter magnético de los MWCNTs decorados con partículas de óxido de hierro se realizó un experimento con un pequeño imán comercial de 0.4 T en su superficie. Para ello se depositó 3 mg de los MWCNTs (oxidados y decorados) en contenedores de vidrio y se pusieron en contacto con el imán. En la Fig. 2.10 se observa como los MWCNTs decorados con nanopartículas de óxido de hierro son atraídos por el imán (Figs. 2.10b y 2.10d), a diferencia de los MWCNTs solamente oxidados (Figs. 2.10a y 2.10c), quienes permanecen en el fondo del contenedor.

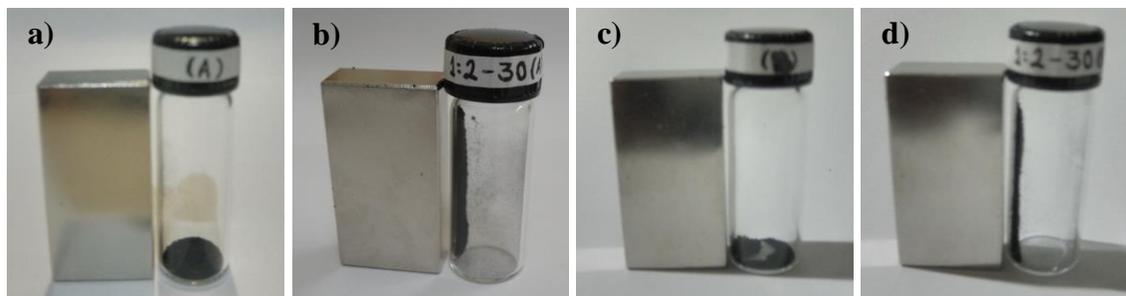


Fig. 2.10 Experimentos magnéticos usando MWCNTs (A y B) decorados con la concentración de precursor metálico 1:2. a) Tipo A solo oxidados, b) Tipo A decorados, c) Tipo B solo oxidados, d) Tipo B decorados.

Con el fin de cuantificar de modo más formal el comportamiento magnético de los MWCNTs decorados con partículas magnéticas, se utilizó la técnica de magnetometría de muestra vibrante. La Fig. 2.11 muestra los bucles de histéresis magnética de ambos tipos de MWCNTs decorados utilizando esta técnica. En los MWCNTs del tipo A la magnetización de saturación de las muestras decoradas con los tratamientos 1:1-A y 1:2-A fue de ~ 1.7 y ~ 5.6 emu/g, respectivamente, con campos coercitivos de 90.9 Oe para el tratamiento 1:1-A y 92.9 Oe para 1:2-A. Para los MWCNTs del tipo B la magnetización de saturación es ~ 2 emu/g con un campo coercitivo de 179.5 Oe en el tratamiento 1:1-B, y ~ 4.3 emu/g con un campo coercitivo de 161.5 Oe para el tratamiento 1:2-B. Aunque pequeña, la histéresis en las curvas no es cero, de modo que el comportamiento puede ser clasificado como ferrimagnético. Los valores relativamente bajos de magnetización de saturación evidencian aún más la presencia de maghemita. Con la concentración 1:1 de precursor metálico, ambos MWCNTs decorados presentan valores similares de magnetización de saturación, pero para los tratamientos de decoración con la concentración del precursor de 1:2, los valores de saturación son más altos para los MWCNTs del tipo A con respecto a los del tipo B. Las diferencias en los valores de magnetización de saturación pueden ser atribuidas a las diferencias en el grado de cobertura de Fe_3O_4 sobre los MWCNTs, la dispersión y el tamaño de partícula [Wan et al., 2007; Fan y Li, 2012; Gao et al., 2009].

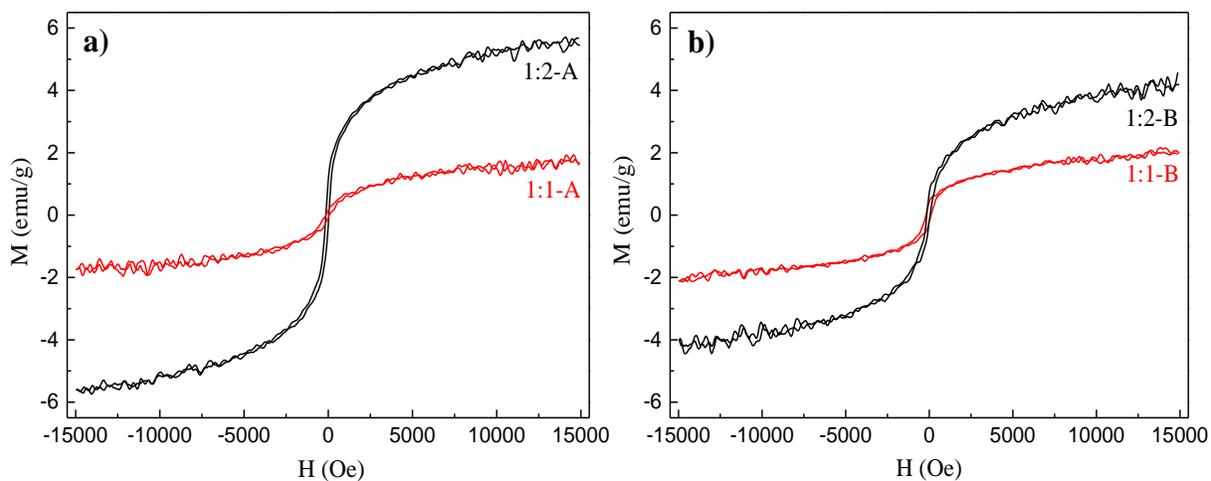


Fig. 2.11 Curvas de magnetización de los MWCNTs decorados con tratamientos de diferente concentración de precursor metálico (1:1 y 1:2). a) MWCNTs del tipo A, b) MWCNTs del tipo B.

Capítulo 3. Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre nanotubos de carbono

3.1 Introducción

Los biosensores electroquímicos son actualmente de los más populares entre los distintos tipos de biosensores. En el campo de los biosensores electroquímicos, los MWCNTs han sido utilizados en los últimos años como sustratos o mediadores en electrodos compuestos, demostrando una transferencia directa de electrones hacia un gran número de moléculas activas [Carrara et al., 2014; Balasubramanian y Burghard, 2006]. La explicación más simple a este hecho es que el área superficial de los MWCNTs contribuye a la zona electroquímicamente activa del electrodo de trabajo en el que se depositan, aunque el mecanismo para la transferencia de electrones entre los MWCNTs y las biomoléculas aún no es entendido completamente y debe considerarse el sistema específico en estudio [Carrara et al., 2014].

La inmovilización de enzimas sobre MWCNTs representa una alternativa atractiva en el estudio de sensores electroquímicos de glucosa [Balasubramanian y Burghard, 2006; Rivas et al., 2007]. Estudios recientes demuestran que las enzimas retienen su actividad cuando se inmovilizan sobre superficies modificadas con nanopartículas metálicas [Palwai et al., 2007], además de proporcionar un medio de conducción electrónico para alcanzar elevados niveles de estabilidad y sensibilidad [Lin et al., 2004; Gao et al., 2007]. Se ha reportado también que los electrodos modificados con la combinación de MWCNTs y nanopartículas metálicas producen mejoras en sus propiedades electrocatalíticas y con ello en las propiedades de detección de los biosensores electroquímicos desarrollados a partir de estos electrodos [Teymourian et al., 2012]. Utilizando voltametría cíclica se ha demostrado el papel importante que juegan las nanopartículas metálicas en los sensores de glucosa con MWCNTs, facilitando la transferencia directa de electrones entre los centros activos de las enzimas y el electrodo (esto al reducir la distancia existente), además de incrementar la corriente eléctrica de los procesos [Zhang et al., 2011].

Es por ello que en este trabajo se siguieron dos estrategias de funcionalización previas a la inmovilización de la enzima sobre la superficie de los MWCNTs, una que plantea solamente la oxidación de los MWCNTs y otra en la que estos MWCNTs oxidados se decoran con nanopartículas de óxido de hierro, para posteriormente inmovilizar la enzima

GOx sobre la superficie de los MWCNTs. Los resultados incluyen la caracterización de la inmovilización de las enzimas sobre los MWCNTs por técnicas fisicoquímicas y electroquímicas, así como la respuesta obtenida en el sensado de glucosa en disolución por diferentes técnicas electroquímicas, enfatizando las diferencias de utilizar MWCNTs con o sin decoración, pues este punto en particular aún no se encuentra reportado en la literatura científica.

3.2 Materiales

Para la caracterización fisicoquímica y electroquímica inicial se emplearon dos tipos de MWCNTs comerciales adquiridos de Bayer MaterialScience (MWCNTs A) y de Cheap Tubes Inc. (MWCNTs B), cuyas especificaciones se encuentran en la Tabla 2.1. Posteriormente, la caracterización electroquímica del sensado de glucosa fue llevada a cabo solamente con los MWCNTs del tipo B. La enzima utilizada fue glucosa oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger* en polvo liofilizado con 100,000 u/g sólido sin oxígeno añadido (Sigma Aldrich, San Luis MO., EUA). Otros reactivos utilizados fueron N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) y N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), utilizados como agentes de acoplamiento en la inmovilización de la enzima. Una disolución buffer fosfato salino (PBS) a 1 M y pH=7.4 fue empleada como electrolito y D-(+)-glucosa grado reactivo fue utilizada en la preparación de disoluciones milimolares con glucosa añadida, todos adquiridos de Sigma Aldrich (San Luis MO, EUA).

3.3 Métodos

3.3.1 Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre nanotubos de carbono

La metodología utilizada para la inmovilización de las enzimas requiere realizar modificaciones superficiales previas a los MWCNTs. Primeramente, los MWCNTs son oxidados mediante un tratamiento ácido (ver sección 2.3.1) y posteriormente, decorados con nanopartículas de óxidos de hierro (ver sección 2.3.2), para finalmente inmovilizar en su superficie a la enzima GOx.

Para la inmovilización de la enzima GOx sobre los MWCNTs se utilizó un mecanismo de amidación basado en el acoplamiento entre los grupos funcionales carboxílicos presentes en los MWCNTs y la enzima GOx (unión covalente). La inmovilización se realizó para ambos

tipos de MWCNTs oxidados y también para ambos tipos de MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro utilizando la siguiente metodología: primero se dispersó en baño de ultrasonido 10 mg de MWCNTs en 10 mL de agua desionizada por 1 h; seguidamente se llevo la dispersión a agitación mecánica (100 rpm) durante 5 min y continuando con la agitación mecánica se generó una atmósfera inerte dentro del recipiente con nitrógeno gas. Bajo atmósfera inerte se agregaron 20 mg de EDAC y a continuación 30 mg de NHS (agentes de acoplamiento); una vez disueltos, se añadió 8 mg de la enzima GOx y se continuó la agitación durante 24 h. Los MWCNTs inmovilizados con la enzima GOx se filtraron y lavaron con agua desionizada y se guardaron para su posterior uso en refrigeración.

3.3.2 Caracterización fisicoquímica

Los análisis FT-IR de las muestras de MWCNTs y la enzima se realizaron utilizando la técnica de absorbancia en el equipo FT-IR Thermo Scientific Nicolet 8700 trabajando a un intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . Los espectros IR se obtuvieron de pastillas preparadas con KBr (110 mg secado a 80 °C) con una pequeña cantidad de muestra (~1 mg); los espectros se normalizaron con la banda de absorción del enlace C-H (2920-2850 cm^{-1}) para su mejor análisis.

Para el análisis por EDX se empleó un equipo JEOL modelo SEM 6360LB realizando barridos en zonas de 50 μm y para el caso de la enzima GOx se recubrió la muestra con un depósito de oro-paladio.

3.3.3 Caracterización electroquímica

Los experimentos electroquímicos se realizaron en un potenciostato Autolab PGSTAT 302-72971 Eco-Chemie utilizando una celda electroquímica de tres electrodos (Fig. 3.1) y el software “Nova”. Como electrodo de referencia (ER), se empleó un SCE, como contraelectrodo o electrodo auxiliar una barra de grafito (EA) y como electrodo de trabajo se empleó un disco de carbón vítreo de 3 mm de diámetro (ET).

Partiendo de una dispersión en ultrasonido de 10 mg de MWCNTs en 10 mL de agua desionizada (1 mg/mL), se tomó la cantidad ~6 μL de la muestra a estudiar con la ayuda de una micropipeta y se depositó gota a gota sobre la superficie activa del electrodo de carbón vítreo.

Se utilizó PBS como electrolito soporte ya que su uso ha sido frecuentemente reportado en la caracterización electroquímica de MWCNTs en biosensores [Buzanovskii, 2012; Janegitz et al., 2011]. Para los experimentos de sensado de glucosa, se añadieron cantidades milimolares de D+(-)glucosa a la disolución de PBS. Antes de cada prueba la disolución electrolítica (PBS) se burbujeó 3 minutos con nitrógeno con el fin de generar una atmósfera inerte y eliminar el oxígeno disuelto. La preparación del ET se realizó de la misma forma en todos los experimentos electroquímicos.

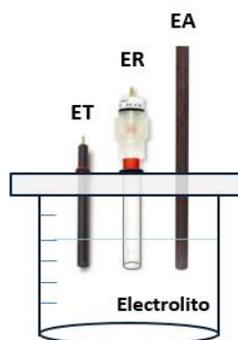


Fig. 3.1 Celda electroquímica de tres electrodos utilizada en la caracterización electroquímica.

La caracterización electroquímica se llevó a cabo utilizando tres técnicas, voltametría cíclica (VC), espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) y cronoamperometría (CA). Para la técnica de voltametría cíclica se utilizaron intervalos de potencial de -1 a 1 V y de -0.7 a -0.3 V (en relación al electrodo de referencia utilizado, SCE) con velocidades de barrido entre 10-100 mV/s y diferentes concentraciones de glucosa disuelta en PBS. En el análisis EIS se utilizó un intervalo logarítmico de frecuencia desde 75 mHz hasta 20 kHz, a un potencial de -0.5 V (intervalo de potencial en el que se registró la mayor actividad de la enzima GOx en VC) y una amplitud de 0.075 V efectivos (RMS), a una sola concentración de glucosa disuelta en PBS (5 mM). Por otra parte, en cronoamperometría se empleó el mismo potencial que para EIS, a diferentes tiempos y concentraciones de glucosa en PBS. Cada experimento realizado se repitió en las mismas condiciones al menos cinco ocasiones, utilizando electrodos de trabajo diferentes en cada experimento.

3.4 Resultados

3.4.1 Análisis electroquímico de nanotubos de carbono decorados con partículas de óxidos de hierro

Inicialmente se caracterizaron por voltamperometría cíclica los MWCNTs de ambos tipos (A y B) sin tratamiento, oxidados y decorados con partículas de óxidos de hierro. Los voltamperogramas obtenidos muestran la densidad de corriente obtenida en el proceso (j , que es la corriente dividida por el área), en función del potencial aplicado (E) en referencia al SCE [Mabbott, 1983]. Los parámetros más importantes de un voltamperograma cíclico son la magnitud de la corriente de pico anódico (i_{pa}) y del pico catódico (i_{pc}), así como sus potenciales correspondientes (E_{pa} y E_{pc}). La Fig. 3.2a muestra los voltamperogramas obtenidos de MWCNTs del tipo B sin tratamiento en PBS a diferentes velocidades de barrido de potencial, en donde se han indicado los valores de E_{pa} , i_{pa} , E_{pc} e i_{pc} , para una velocidad de barrido de 100 mV/s. Para ejemplificar lo observado sólo se presentan los MWCNTs del tipo B, pues los resultados fueron muy similares. Inicialmente para cada tipo de MWCNT, se estudió el efecto de la velocidad de barrido del potencial (100, 75, 50, 25 y 10 mV/s) en PBS, ver Fig. 3.2a.

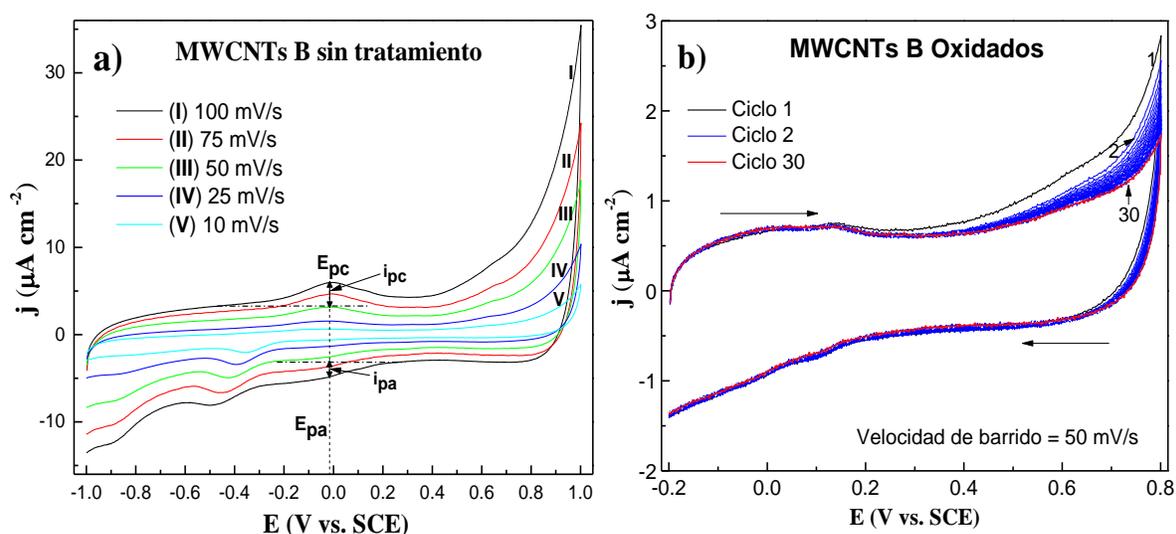


Fig. 3.2 Voltamperogramas de los MWCNTs B en PBS. a) MWCNTs sin tratamiento a diferentes velocidades de barrido, b) MWCNTs oxidados a 50 mV/s por 30 ciclos.

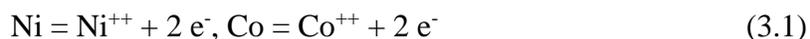
Como se observa en la Fig. 3.2a, el pico redox simétrico observado a -0.01 V no cambia de posición por efecto de la velocidad de barrido. Con la disminución de la velocidad de

barrido se mejora ligeramente la definición de los picos redox, pero su posición y forma son muy similares. De este modo, se eligió la velocidad de 50 mV/s para reportar todos los espectros subsecuentes analizados. En esta velocidad de barrido se observa una buena definición de los picos redox de las especies presentes y un tiempo de análisis aceptable, propicio para llevarse a cabo la reacción.

En la Fig. 3.2b se presenta el proceso de estabilización de la superficie del electrodo en una misma velocidad de barrido (50 mV/s). Como se observa existe una ligera disminución en la densidad de corriente eléctrica del proceso conforme aumenta el número de ciclos en la voltamperometría. Esto es característico de la formación de la doble capa electroquímica (zona interfacial metal-solución donde existen las especies cargadas y los dipolos orientados) y la absorción de iones del electrólito que presenta una carga capacitiva [Janegitz et al., 2011]. Como se observa en la Fig. 3.2b, la estabilización se obtiene del tercer ciclo en adelante, a partir de este ciclo la disminución en la corriente eléctrica del proceso es casi constante, por lo que se eligió el tercer ciclo para presentar todos los voltamperogramas realizados posteriormente.

En la Fig. 3.3 se presentan los voltamperogramas de ambos tipos de MWCNTs sin tratamiento, oxidados y decorados con partículas de óxidos de hierro. La velocidad de barrido de potencial usada en este voltamperograma fue 50 mV/s, con una ventana de potencial de -1 a 1 V. En general se observaron características similares entre ambos tipos de MWCNTs, como se describen a continuación.

La Fig. 3.3a, presenta los resultados obtenidos por voltametría cíclica de los MWCNTs del tipo A. El electrodo de carbón vítreo sin material depositado (I) presenta un comportamiento característico de este tipo de electrodos sin presentar procesos de oxidación o reducción de especie alguna (ver recuadro en la Fig. 3.3a), como era de esperarse. Sin embargo, en los voltamperogramas obtenidos con los MWCNTs del tipo A sin tratamiento (II), se observan pequeños picos reversibles correspondientes a los procesos propios del carbono [Minnikanti et al., 2009] y al potencial de ~ -0.25 V y más negativos (-0.25 a -0.35 V), que corresponde probablemente a la reacción mostrada en la Ec. 3.1 [Pourbaix, 1974], por las especies metálicas utilizadas como precursores durante la síntesis de MWCNTs.



Con el número III dentro de la Fig. 3.3a se presentan los voltamperogramas de los MWCNTs oxidados en donde se observa un comportamiento similar al observado en los MWCNTs sin tratamiento pero desaparecen los picos correspondientes a las especies metálicas, evidencia de que con el tratamiento oxidativo se eliminan este tipo de impurezas [Hou et al., 2008]; esto provoca a su vez una disminución de la corriente eléctrica del proceso. Los voltamperogramas de los MWCNTs del tipo A decorados con partículas de óxidos de hierro se presentan en la Fig. 3.3a con el número IV, y su comportamiento es marcadamente diferente comparado con lo observado en los MWCNTs oxidados o sin tratamiento. Las nanopartículas metálicas de óxidos de hierro presentes sobre los MWCNTs incrementan significativamente la densidad de corriente eléctrica del proceso, especialmente en los picos asignados a estas especies metálicas (uno catódico a -0.2 V y otro anódico a -0.39 V), por lo que algunos procesos redox observados anteriormente se enmascaran, debido a la cantidad importante de nanopartículas presentes. Los picos dominantes observados a -0.2 V y -0.39 V corresponden a las nanopartículas de óxidos de hierro depositado sobre las paredes de los MWCNTs, siguiendo probablemente la reacción mostrada en la Ec. 3.2 [Pourbaix, 1974].

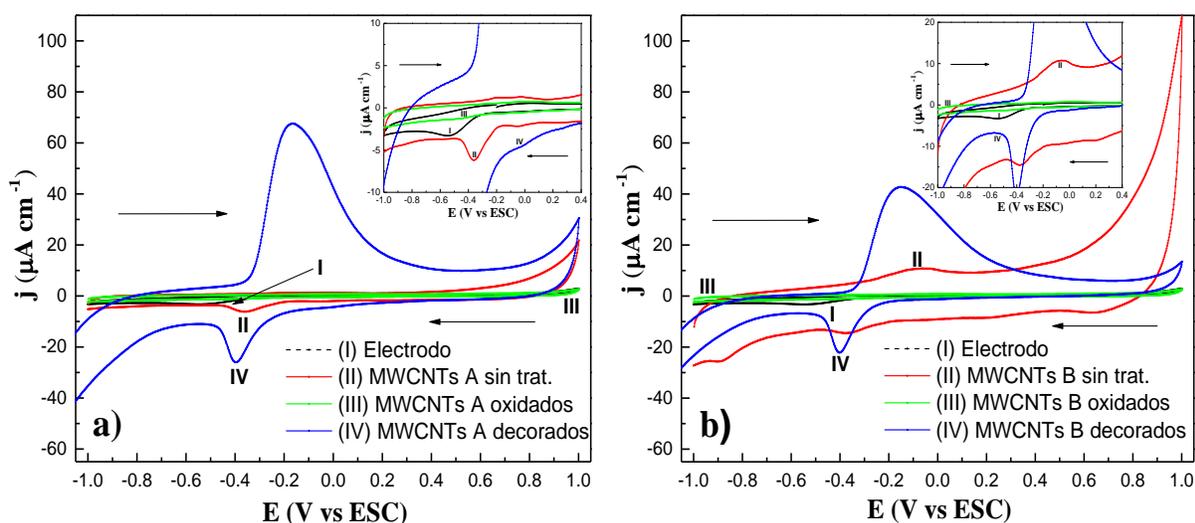
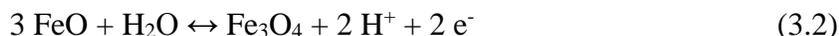


Fig. 3.3 Voltamperogramas (a 50 mV/s) en PBS para los diferentes tratamientos realizados a los MWCNTs. a) MWCNTs A, b) MWCNTs B.

En la Fig. 3.3b se presentan los voltamperogramas obtenidos para los MWCNTs del tipo B, los resultados son similares a los observados en los MWCNTs del tipo A, es decir, en los MWCNTs sin tratamiento (II) se observan de nueva cuenta los picos de las impurezas metálicas así como un incremento en la corriente del proceso. Con la oxidación (III), el voltamperograma muestra la desaparición de los picos de las impurezas metálicas y una disminución en su corriente; finalmente los MWCNTs del tipo B decorados con partículas de óxidos de hierro (IV) presentan los mismos tipos dominantes observados en la Fig. 3.3a, siguiendo probablemente la reacción mostrada en el Ec. 3.2.

Comparando los resultados entre ambos tipos de MWCNTs se observan corrientes eléctricas ligeramente mayores en los procesos de los MWCNTs del tipo B (Fig. 3.3b) con respecto a los de MWCNTs del tipo A (Fig. 3.3a) antes de la decoración, probablemente debido a su mayor calidad estructural, como fue señalado en el análisis por espectroscopía Raman del capítulo 2. La mayor densidad de nanopartículas de óxido de hierro para el MWCNT del tipo A decorado (ver Cap. 2) se hace también evidente en los mayores valores de corriente de los picos a -0.2 V y -0.39 V.

Basándonos en los resultados obtenidos para los MWCNTs por voltamperometría cíclica, el comportamiento electroquímico/electrocatalítico sobresaliente de los MWCNTs del tipo B, su mayor longitud, mejor calidad estructural, excelentes propiedades eléctricas, y al no observar diferencias notables en la inmovilización con la enzima GOx en pruebas preliminares, se decidió continuar el desarrollo del trabajo utilizando únicamente los MWCNTs del tipo B.

3.4.2 Análisis fisicoquímico de la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre los nanotubos de carbono

Con la finalidad de corroborar la inmovilización de la enzima GOx sobre los MWCNTs se realizaron análisis por energía dispersiva de rayos X (EDX) y espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR). Estos análisis, como el resto de la tesis, fueron hechos solo a los MWCNTs tipo B (ver Tabla 2.1).

El análisis de la composición elemental de la enzima GOx y de los MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro se obtuvo por EDX para distintas zonas de las muestras, usando tres muestras diferentes. Los elementos presentes en las muestras de los MWCNTs decorados con óxidos de hierro, fueron carbono con ~61 % en peso, oxígeno con ~18 % y

hierro con ~21 %. La enzima GOx presentó en su composición elemental, carbono con ~49 % en peso, nitrógeno con ~17 % y oxígeno con ~35 %.

Utilizando las concentraciones de 4, 8 y 12 mg de enzima GOx depositada sobre los MWCNTs B decorados, se realizó el análisis de su composición elemental. La Fig. 3.4 presenta el análisis de la composición elemental obtenido en cada una de las variantes efectuadas en los tratamientos de inmovilización para tres zonas diferentes en cada muestra. Esto nos proporciona una idea del promedio de la cantidad de enzima inmovilizada.

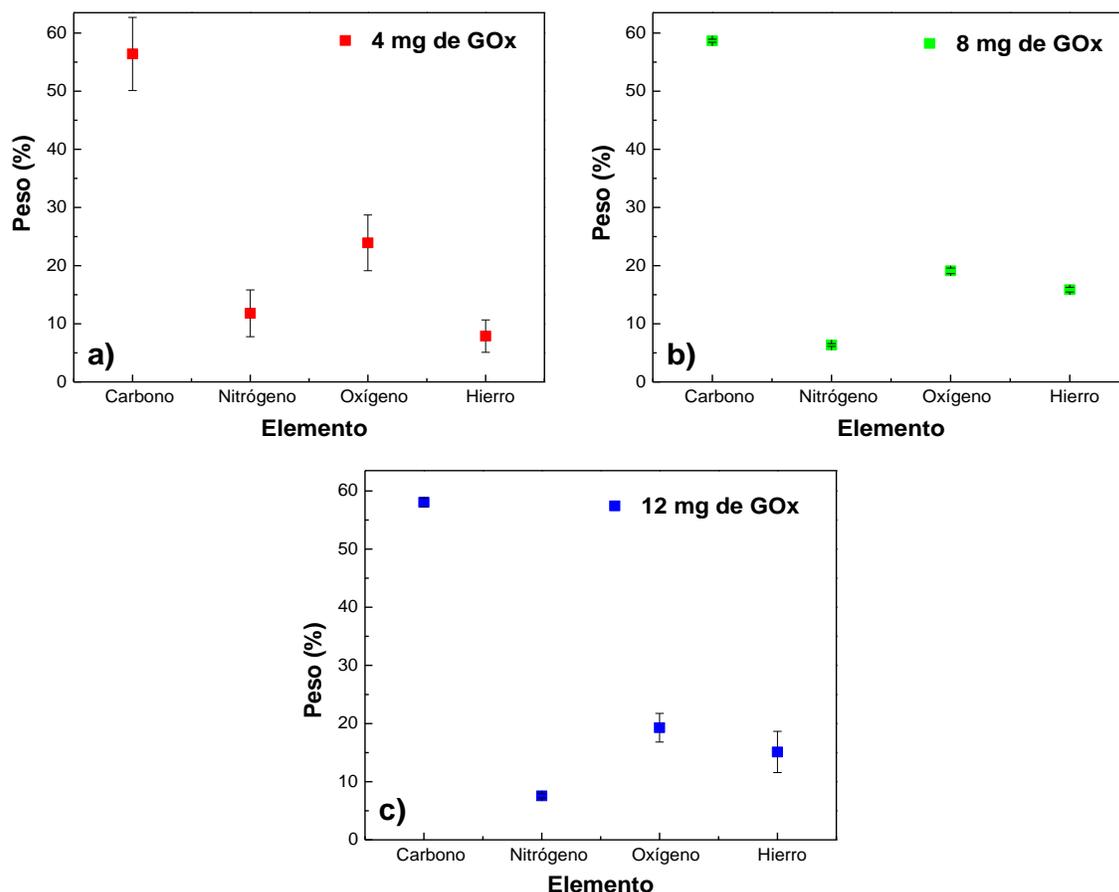


Fig. 3.4 Análisis EDX de los tratamientos de inmovilización de la enzima GOx sobre los MWCNTs B decorados a diferentes concentraciones de la enzima GOx. a) 4 mg, b) 8 mg, c) 12 mg.

Los resultados obtenidos para las tres concentraciones en peso de enzima GOx inmovilizadas sobre los MWCNTs B decorados, mostraron la aparición de nitrógeno con 7 a 15 % p/p, manteniéndose en promedio el porcentaje en peso del carbono y disminuyendo para el oxígeno y hierro con respecto al análisis elemental de los MWCNTs decorados (ver

sección 2.5.2). Como se observa en la Fig. 3.4, la desviación estándar es mucho menor para el tratamiento con la concentración de 8 mg de la enzima GOx (Fig. 3.4b), con respecto a los tratamientos con 4 y 12 mg (Figs. 3.4a y 3.4c, respectivamente). Para el tratamiento en el que se utilizó 4 mg de GOx se asume que la cantidad puede no ser suficiente y no existe una dispersión homogénea de la enzima sobre los MWCNTs, pues se observan cantidades con relativa variación (barras de desviación estándar) en su composición porcentual. Cuando se utilizó 8 mg de GOx la desviación estándar de los análisis EDX disminuye considerablemente, prácticamente manteniéndose el porcentaje de nitrógeno. Finalmente para el tratamiento en el que se utilizó 12 mg de GOx, no se observó un incremento considerable en el porcentaje en peso de nitrógeno con respecto al tratamiento en el que se emplearon 8 mg de la enzima (y las barras de desviación estándar de nuevo aumentan), lo que se puede traducir en una saturación de la enzima inmovilizada sobre los sitios activos generados en los MWCNTs. Así, mediante el análisis EDX y al no observar diferencias significativas en el análisis FT-IR (a ser discutido), se decidió utilizar 8 mg de la enzima GOx para su inmovilización sobre los MWCNTs.

En la Fig. 3.5 se observan los espectros FT-IR de los MWCNTs oxidados y la enzima GOx. Los MWCNTs oxidados presentan bandas entre $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$, lo que indica la presencia de grupos funcionales hidroxilo; a $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ se encuentra la vibración fundamental del carbono en sus enlaces sp^2 , y también se observan estiramientos de grupos C-H a 2920 y 2850 cm^{-1} [Schönfelder et al., 2011]; la vibración de estiramientos de grupos carbonilo relacionados con la presencia de ácidos carboxílicos se asigna a $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$ [Avilés et al., 2009] y finalmente la banda encontrada a $\sim 1110\text{ cm}^{-1}$ se asigna a enlaces CO [Schönfelder et al., 2011].

La enzima GOx presenta tres bandas de absorción que no son observadas en los MWCNTs oxidados, asignadas a las amidas I, II y III [Wille et al., 2003]. En el espectro FT-IR de la GOx se observan también bandas de absorción de 3400 a 3440 cm^{-1} asignadas a la amida A [Wille et al., 2003], correspondiente a la vibración de alargamiento de grupos N-H libres. Las posiciones de la amida B se encontraron a 2926 y 2928 cm^{-1} (región de estiramientos asimétricos de enlaces CH_2). Las posiciones de las bandas de la amida I se encontraron en el intervalo de 1600 y 1700 cm^{-1} asociadas principalmente a las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo a lo largo de la estructura secundaria del péptido [Singh et al., 2011].

La banda de absorción de la amida II (enlaces N-H) se encuentra a 1551 cm^{-1} , y las de la amida III (enlaces C-H) se encuentran a 1242 y 1244 cm^{-1} [Singh et al., 2011].

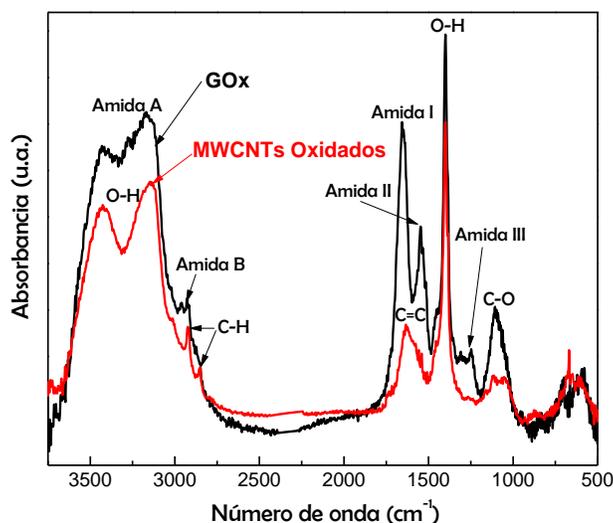


Fig. 3.5 Espectros FT-IR de la enzima GOx y los MWCNTs oxidados.

Las bandas de absorción diferentes entre los MWCNTs y la enzima GOx son importantes para identificar la presencia de algún enlace generado después de la reacción de inmovilización por la interacción entre los grupos funcionales de la enzima y los MWCNTs. Los espectros obtenidos después de la reacción de inmovilización de la enzima GOx sobre los MWCNTs oxidados y subsecuentemente decorados con partículas de óxidos de hierro se muestra en la Fig. 3.6. En la Fig. 3.6a se presentan los espectros obtenidos para los MWCNTs, oxidados (arriba) y decorados (abajo) con partículas de óxidos de hierro después de la reacción de inmovilización utilizando 8 mg de la enzima GOx. No se observan diferencias significativas entre los espectros de MWCNTs oxidados respecto a los MWCNTs decorados después de la inmovilización, lo cual indica que las partículas de óxido de hierro no generan una acción desfavorable en la inmovilización de la enzima GOx sobre los MWCNTs.

Comparando los espectros de la Fig. 3.6a con los de la Fig. 3.5 (antes y después de la inmovilización) se observan algunos cambios significativos. En las bandas de absorción entre $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ se observa un ligero incremento en la intensidad y la convolución de las bandas a una sola banda de absorción significativa a $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$, lo que sugiere que las vibraciones de estiramientos OH son dominantes en la muestra o tal vez por la presencia de

agua residual. Otras diferencias que encontramos son el incremento en la intensidad de los enlaces C-H y en el ancho de banda de los enlaces O-H a 1400 cm^{-1} y C-O a $\sim 1110\text{ cm}^{-1}$. Existe un traslape en las bandas de absorción asignadas a la amida III en la enzima GOx y de los enlaces C-O en los MWCNTs, ya que en los espectros propios de cada muestra (Fig. 3.6) presentan bandas de absorción marcadamente distintas y en el espectro de la Fig. 3.6a (producto de la reacción de inmovilización), se traslapan. Sin embargo, la identificación de ambas bandas es notoria.

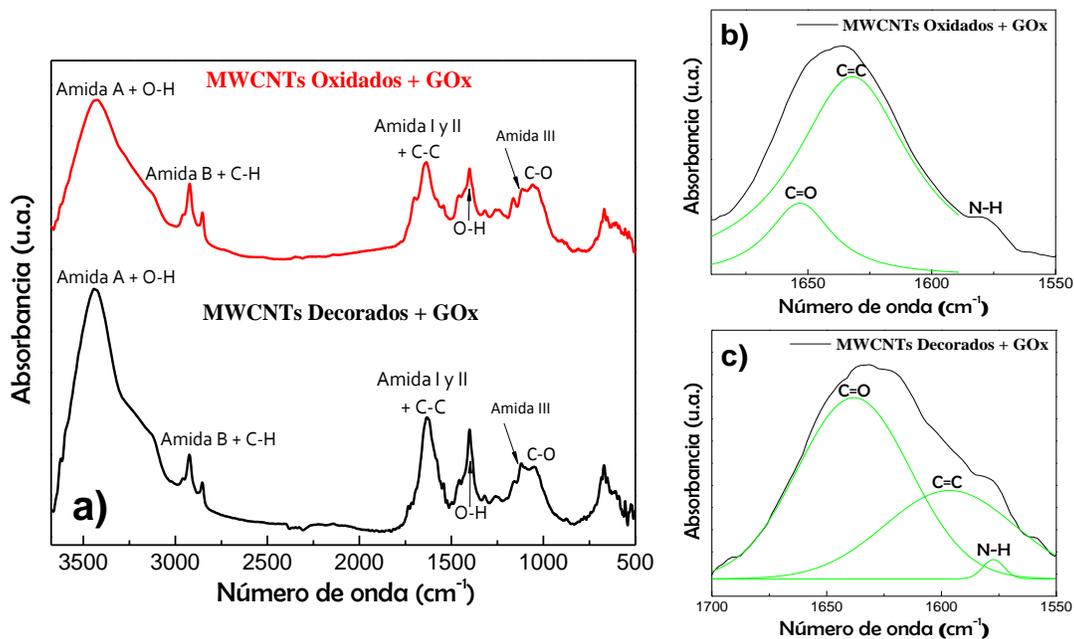


Fig. 3.6 Espectros FT-IR de los MWCNTs conteniendo GOx inmovilizada. a) MWCNTs oxidados y decorados con GOx inmovilizada, b) deconvolución de la región de $1700\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ para los MWCNTs oxidados, c) deconvolución de la región de $1700\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ para los MWCNTs decorados.

El cambio más significativo en los espectros con la inmovilización de la enzima GOx sobre los MWCNTs se presenta entre 1700 y 1550 cm^{-1} , donde encontramos antes de la reacción de inmovilización (Fig. 3.6) a los enlaces C=C de los MWCNTs (a $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$), y las amidas I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) y II (1551 cm^{-1}) propias de la enzima GOx. Después de la reacción de inmovilización se nota un traslape en estas bandas que no permite identificar con facilidad los grupos funcionales característicos. Para un análisis más puntual, y con el fin de identificar las posiciones exactas de la contribución de ambas especies en la nueva banda observada, se realizó la deconvolución de esta región como se muestra en la Fig.

3.6b para los MWCNTs oxidados y en la Fig. 3.6c para los MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro. Las deconvoluciones se realizaron tomando como valores de referencia los valores observados en las bandas de absorción de los espectros de la enzima GOx y los MWCNTs antes de la inmovilización (Fig. 3.5).

Las deconvoluciones demostraron que la nueva banda observada en los espectros de los MWCNTs después de la inmovilización con la enzima GOx, provienen del traslape de tres bandas características de las especies antes de la inmovilización, C=C a $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, amida I entre $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ y amida II a 1551 cm^{-1} . Esto sugiere la generación de nuevos enlaces (probablemente uniones covalentes) entre la enzima GOx y los MWCNTs, como ha sido discutido en la literatura [Wu et al., 2010].

Finalmente, en la Fig. 3.7 se presentan los espectros FTIR obtenidos de las diferentes concentraciones de enzima (4, 8 y 12 mg) estudiadas en la inmovilización de GOx sobre los MWCNTs decorados. Como se puede observar, no se generan nuevas bandas de absorción, ni cambios significativos en los espectros al variar la concentración de la enzima GOx. La definición de las bandas mejora ligeramente conforme incrementa la cantidad de enzima GOx depositada. Por esta razón y por las razones expuestas en el análisis por EDX se utilizaron 8mg de GOx para los análisis subsecuentes en este trabajo.

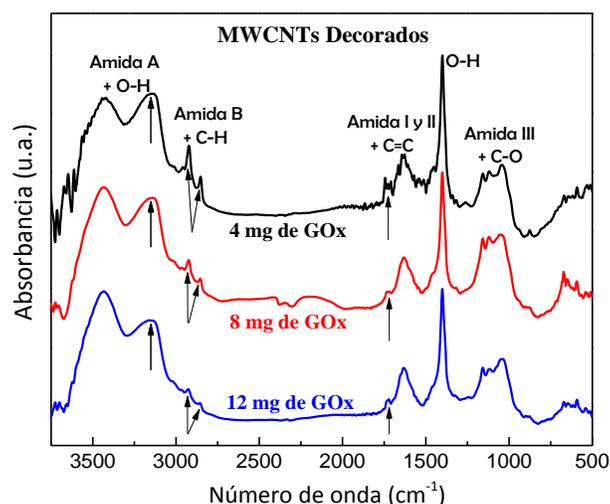


Fig. 3.7 Espectros FT-IR de los tratamientos de inmovilización realizados a los MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro a distintas concentraciones de la enzima GOx.

3.4.3 Detección de glucosa por voltamperometría cíclica

En la Fig. 3.8 se presentan los voltamperogramas obtenidos del depósito sobre el electrodo de trabajo de los MWCNTs con la enzima GOx inmovilizada, utilizando PBS como electrolito (pH=7.4). En la Fig. 3.8a, correspondiente a los MWCNTs oxidados, se observan claramente tres picos redox, el primero a un potencial de ~ -0.5 V (ver recuadro de la Fig. 3.8a), simétrico y característico de la actividad de la enzima GOx inmovilizada sobre los MWCNTs y su transferencia directa de electrones [Grosse et al., 2013]. El pico de potencial al que sucede este proceso puede variar ligeramente dependiendo del pH de la disolución electrolítica en la que se lleve a cabo [Cai y Chen, 2004; Janegitz et al. 2011]. Este pico redox se relaciona con la oxidación y reducción de la enzima GOx por la acción de un electrón sobre su grupo prostético FAD que actúa como sitio activo, y ha sido reportada como la transferencia directa de electrones de la enzima GOx inmovilizada sobre electrodos modificados con MWCNTs [Guascito et al. 2011; Cai et al 2004; Liu et al. 2007b; Yin et al. 2005; Janegitz et al. 2011]. El segundo y tercer pico redox se encuentran entre 0.05-0.2 V y 0.5 V, relacionados con la oxidación de la enzima en la región de la doble capa y la oxidación de los grupos superficiales presentes en los MWCNTs, identificados en otros trabajos [Guascito et al. 2011; Kinoshita, 1988].

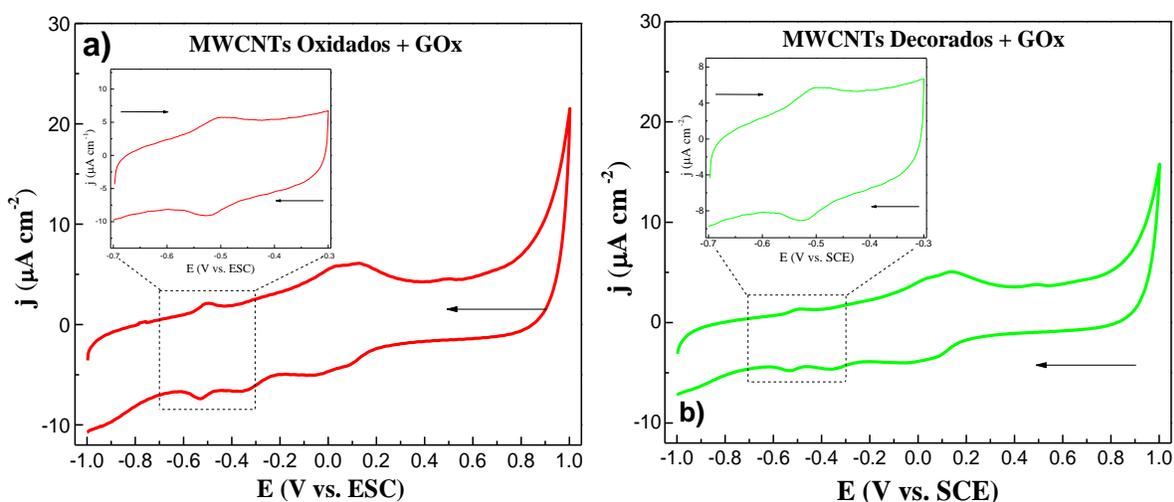
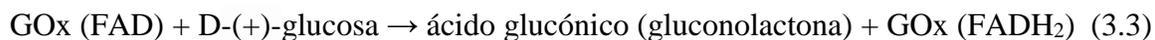


Fig. 3.8 Voltamperogramas cíclicos de los MWCNTs con la enzima GOx inmovilizada. a) MWCNTs oxidados, b) MWCNTs decorados con nanopartículas de óxidos de hierro. Velocidad de barrido 50 mV/s, en PBS (pH=7.4).

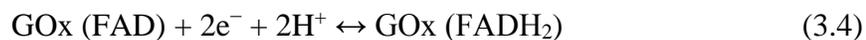
En la Fig. 3.8b se presenta el voltamperograma obtenido de los MWCNTs decorados con nanopartículas de óxidos de hierro con la enzima GOx inmovilizada; en este espectro se observan de nuevo los tres picos redox descritos en la Fig. 3.8a, confirmando también el éxito en la inmovilización de la enzima GOx sobre los MWCNTs decorados. La detección electroquímica de la enzima GOx inmovilizada sobre los MWCNTs decorados corrobora que la decoración no obstaculiza la inmovilización y detección de la enzima GOx sobre los MWCNTs, como fue también observado en el análisis por FT-IR. La única diferencia significativa que se observa entre los espectros de los MWCNTs decorados y oxidados se encuentra quizá en la magnitud de la densidad de corriente (j). Para potenciales positivos, cercanos a 1 V, las corrientes de los MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro se vuelven ligeramente mayores.

En los recuadros de la Fig. 3.8 se observa la repetición del análisis por VC de los MWCNTs decorados con GOx inmovilizada, pero en este caso se ha reducido la ventana de potencial utilizada a una de -0.7 a -0.3 V, debido a que en este intervalo de potencial (alrededor de -0.5 V) ocurre la transferencia de electrones entre la enzima y la glucosa en disolución [Grosse et al., 2013]. De este modo, se decidió utilizar este intervalo de potencial (de -0.7 a -0.3 V) para todos los análisis posteriores.

Seguidamente, la caracterización de la detección de glucosa por VC para los MWCNTs con la enzima GOx inmovilizada, se realizó preparando disoluciones de 1, 2.5, 5 y 10 milimoles por litro (mM/L) con D-(+) glucosa en PBS, Fig. 3.9. Trabajos previos utilizando este tipo de análisis han observado una respuesta de la interacción entre la enzima GOx y la glucosa en disolución como función de su concentración [Li et al., 2010; Cui et al., 2011]. Esta interacción enzima-glucosa sigue probablemente la reacción enzimática [Degani y Heller, 1987; Wu et al., 2010],



Si se oxida o reduce el grupo prostético de la enzima se tiene que,



Estas concentraciones se encuentran en el intervalo de las reportadas en la literatura para sensores de glucosa [Shan et al., 2009; Liu et al., 2007; Kong et al., 2009] e igualmente se encuentran en el intervalo fisiológico de la sangre humana [Mandal, 2013]. Los niveles de

glucosa en la sangre suelen expresarse en mg/dL, y el intervalo encontrado en el ser humano (antes de una comida completa) está entre 82-110 mg/dL (~4.4-6.1 mM/L) y post-comida hasta ~180 mg/dL (~10 mM/L) [Chen et al., 2013; Mandal, 2013].

En la Fig. 3.9 se presentan los resultados obtenidos en el sensado de glucosa con concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10 mM/L de glucosa disuelta en PBS, incluyendo como referencia la disolución de PBS sin glucosa; el gráfico obtenido fue realizado a una velocidad de barrido de 50 mV/s, con una ventana de potencial de -0.7 a -0.3 V, ya que la oxidación y reducción de la enzima GOx y la glucosa disuelta en solución ocurre a ~ -0.5 V. En la Fig. 3.9a se presentan los voltamperogramas obtenidos de los MWCNTs oxidados e inmovilizados con la enzima GOx. Marcado con el número I, el electrolito soporte (PBS) y el sensado de glucosa se evalúa para cuatro diferentes concentraciones (1 mM/L marcado con el número II, 2.5 mM/L número III, 5 mM/L número IV y 10 mM/L número V). Todas ellas presentan un pico de oxidación a -0.49 V y de reducción a -0.54 V, teniendo entre ambos un desplazamiento de 0.05 V.

En la Fig. 3.9b se observa el comportamiento de los voltamperogramas obtenidos en el análisis de los MWCNTs decorados con nanopartículas de óxidos de hierro con la enzima GOx inmovilizada. Los potenciales de oxidación-reducción fueron iguales a los observados en los MWCNTs oxidados (Fig. 3.9a); sin embargo la forma del voltamperograma cambia drásticamente; así mismo, se observa un incremento en la densidad de corriente de los procesos con respecto a los MWCNTs oxidados. Además se observó que la densidad de corriente eléctrica (j) incrementa conforme incrementa la concentración de GOx en disolución para MWCNTs, tanto oxidados como decorados.

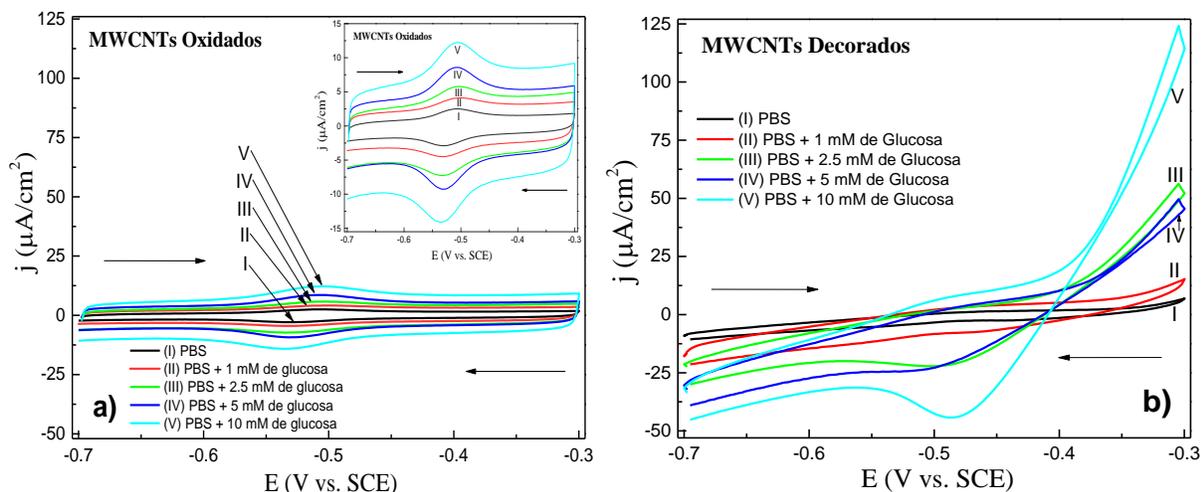


Fig. 3.9 Voltamperogramas cíclicos de MWCNTs con GOx inmovilizada en diferentes disoluciones electrolíticas a 50 mV/s. a) Oxidados y b) Decorados con nanopartículas de óxidos de hierro. 1mM \approx 18 mg/dL.

Para una mejor cuantificación de la sensibilidad de la densidad de corriente (j) a los cambios en concentración de glucosa, la densidad de corriente correspondiente a los picos de oxidación (-0.49 V) y reducción (-0.54 V) fue registrada y su diferencia ($\Delta j = j - j_0$) respecto a la corriente correspondiente a la referencia de PBS sin glucosa (j_0) se grafica en la Fig. 3.10. Como puede observarse, tanto para las corrientes de oxidación (Fig. 3.10a) como las de reducción (Fig. 3.10b) los cambios en Δj son mucho mayores cuando se emplean MWCNTs decorados con partículas de óxido de hierro que cuando se emplea MWCNTs solamente oxidados. Esto confirmó que los MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro tienen mayor sensibilidad amperométrica a la detección de glucosa.

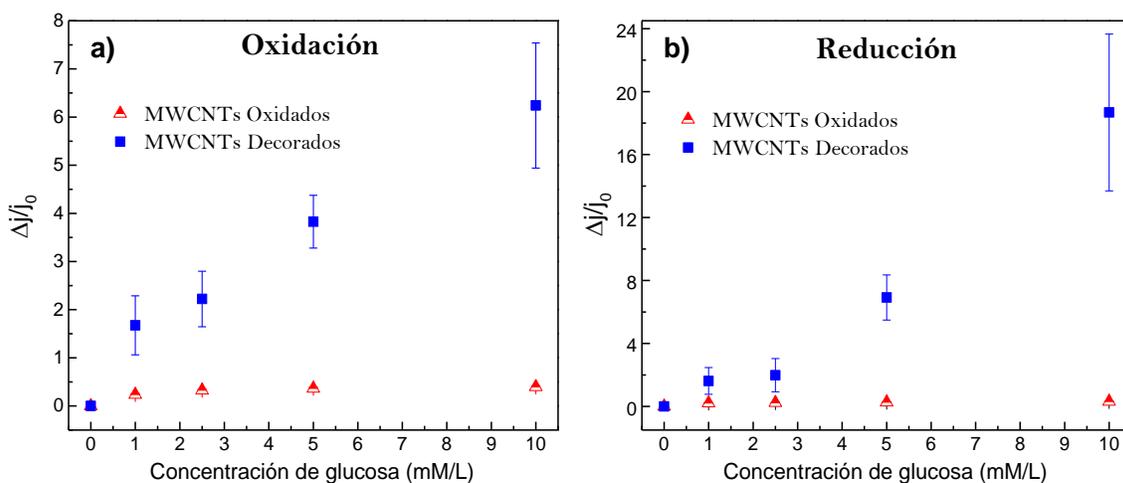


Fig. 3.10 Variación en las densidades de corriente de oxidación y reducción de los MWCNTs oxidados y decorados con partículas de óxidos de hierro ante la presencia de glucosa. a) Oxidación, b) Reducción.

Para proporcionar una idea cuantitativa de la sensibilidad de los MWCNTs utilizados como sensores de glucosa se realizaron ajustes lineales a las gráficas de la Fig. 3.10, tanto para la corriente de oxidación como para la de reducción. La Tabla 3.1 presenta los valores de los ajustes lineales obtenidos para los cambios en la densidad de corriente de oxidación y reducción en ambos MWCNTs, con y sin decoración de partículas de óxidos de hierro, así como el coeficiente de ajuste lineal (R^2). La tendencia de los MWCNTs solamente oxidados no es lineal en el intervalo de glucosa estudiado (1-10 mM/L) y por ello para el caso de los MWCNTs oxidados, se requirieron dos ajustes lineales para describir su comportamiento. Estos dos intervalos se dividieron de 0 a 2.5 mM/L y de 2.5 a 10 mM/L para la densidad de corriente de oxidación y de 0 a 1 mM/L y de 1 a 10 mM/L para la densidad de corriente de reducción. Para los MWCNTs decorados la situación fue diferente pues sus cambios en la densidad de corriente se ajustan razonablemente a una recta en todo el intervalo estudiado (1-10 mM/L).

Tabla 3.1 Pendientes obtenidas de los ajustes lineales a las curvas de la Fig. 3.10, como indicativos de sensibilidad.

Tratamiento a los MWCNTs	Tipo de corriente	Pendiente del ajuste lineal (mM ⁻¹)	R ²	Sensibilidad amperométrica (μA/mMcm ²)
Oxidados	Oxidación	0.13 y 0.09	0.740 (de 0 a 2.5 mM/L) y 0.898 (de 2.5 a 10 mM/L)	0.33 y 0.23
	Reducción	0.21 y 0.01	1 (de 0 a 1 mM/L) y 0.988 (de 1 a 10 mM/L)	0.61 y 0.03
Decorados	Oxidación	0.58	0.954 (de 0 a 10 mM/L)	0.85
	Reducción	1.87	0.957 (de 0 a 10 mM/L)	4.75

Las pendientes obtenidas de las rectas proporcionan información de la sensibilidad del sensor. En el caso de los MWCNTs que fueron solamente oxidados en la corriente de oxidación se obtuvo una pendiente de 0.13 mM⁻¹ (multiplicada por $j_0 = 2.51 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, obtenemos una sensibilidad de 0.33 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$) para el intervalo de 0 a 2.5 mM/L y 0.09 mM⁻¹ ($j_0 = 2.51 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, sensibilidad= 0.23 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$) para el intervalo de 2.5 a 10 mM/L. Para la corriente de reducción de estos mismos MWCNTs se obtuvo la pendiente de 0.21 mM⁻¹ ($j_0 = 2.89 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, sensibilidad= 0.61 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$) el intervalo de 0 a 1 mM/L y otra pendiente de 0.01 mM⁻¹ ($j_0 = 2.89 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, sensibilidad= 0.03 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$) en el intervalo de 1 a 10 mM/L. Para los MWCNTs decorados con partículas de óxido de hierro en la corriente de oxidación se obtuvo una pendiente de 0.58 mM⁻¹ ($j_0 = 1.46 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, sensibilidad= 0.85 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$) para el intervalo de 0 a 10 mM/L y en la corriente de reducción el valor de la pendiente fue 1.87 mM⁻¹ ($j_0 = 2.54 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, sensibilidad= 4.75 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$) en el mismo intervalo. Esto confirmó una mejor sensibilidad para los MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro con respecto a los oxidados y una mayor sensibilidad ante los cambios en la corriente de reducción que en la de oxidación. En general la sensibilidad obtenida es alta, en el rango de los valores reportados en la literatura, por ejemplo sensibilidades de 0.24 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ [Pang et al., 2009], 0.47 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ [Jose et al., 2012], aunque también existen trabajos con sensibilidades mayores como 58.9 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ [Baby y Ramaprabhu, 2010] y 112 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ [Chen et al., 2012]. Esto puede explicarse si consideramos que las nanopartículas de óxidos de hierro actúan

como centros activos para la enzima GOx, lo que mejora de manera notable la transferencia de electrones entre la enzima GOx y el electrodo. Así, se espera que las partículas de óxido de hierro promuevan una mejor interacción entre la enzima GOx inmovilizada en las primeras capas del electrodo y la glucosa en disolución (interfase electrodo-electrolito), reflejándose en esto cambios más significativos en la densidad de corriente eléctrica. Esto se ha explicado en estudios anteriores basándose en la interacción del grupo prostético de la enzima GOx (FAD) con las partículas metálicas [Wang y Yao, 2012].

3.4.4 Detección de glucosa por espectroscopía de impedancia electroquímica

Para complementar el análisis electroquímico se realizaron también experimentos mediante las técnicas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) y cronoamperometría (CA). Mediante EIS, se estudió la influencia de la enzima GOx en la detección de glucosa, analizando la respuesta de los MWCNTs oxidados y decorados con y sin la enzima GOx inmovilizada en su superficie. El comportamiento por impedancia electroquímica de los MWCNTs con y sin la enzima GOx se estudia a través de los gráficos de Nyquist, (ver sección 1.4), donde se representa la parte imaginaria ($-Z''$) contra la parte real (Z') de los valores de impedancia obtenidos para cada valor de frecuencia aplicada. Para este estudio se fijó un valor de amplitud igual a 0.075 V eficaces (RMS) a un potencial de -0.5 V. Estos valores fueron obtenidos de estudios preliminares realizados como parte de este trabajo, pero no discutidos en esta tesis.

La Fig. 3.11 presenta los gráficos de Nyquist obtenidos del análisis de los MWCNTs a un mismo intervalo de frecuencia (0.075-20000 Hz) y potencial (-0.5 V), utilizando como electrolito una solución de 5 mM de glucosa disuelta en PBS.

Como se observa en la Fig. 3.11, existe un comportamiento diferente para cada tipo de MWCNTs, sobre todo a altas frecuencias (5-25 k Ω). El diámetro del semicírculo de los diagramas de Nyquist disminuye con la inmovilización de la enzima GOx, con lo que se beneficia la transferencia de carga del sistema.

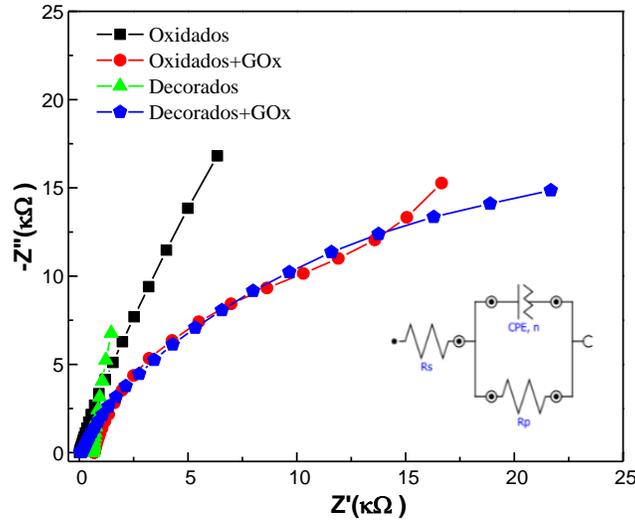


Fig. 3.11 Gráficos de Nyquist para los MWCNTs obtenidos con una amplitud de 0.075 V eficaces a un potencial de -0.5 V en una disolución de 5 mM de glucosa en PBS.

Las mediciones obtenidas fueron ajustadas al modelo eléctrico de Boukamp [Boukamp, 1986] que proporciona información sobre la resistencia de la disolución (R_s), la resistencia de polarización o a la transferencia de carga (R_p) y un elemento de fase constante (CPE), donde “n” es su exponente y de acuerdo a su valor obtenido se puede determinar el comportamiento del CPE (Wadburg, capacitor, resistor, etc.). Los valores de CPE, R_p y R_s obtenidos del ajuste de las mediciones de EIS al modelo eléctrico (recuadro en la Fig. 3.11) se presentan en la Fig. 3.12. Las barras de dispersión corresponden a 4 repeticiones para cada tipo de MWCNT. Los valores obtenidos para n (exponente del elemento de fase constante), en todos los casos resultaron muy cercanos a 1, por lo que se puede considerar el comportamiento del CPE como capacitivo.

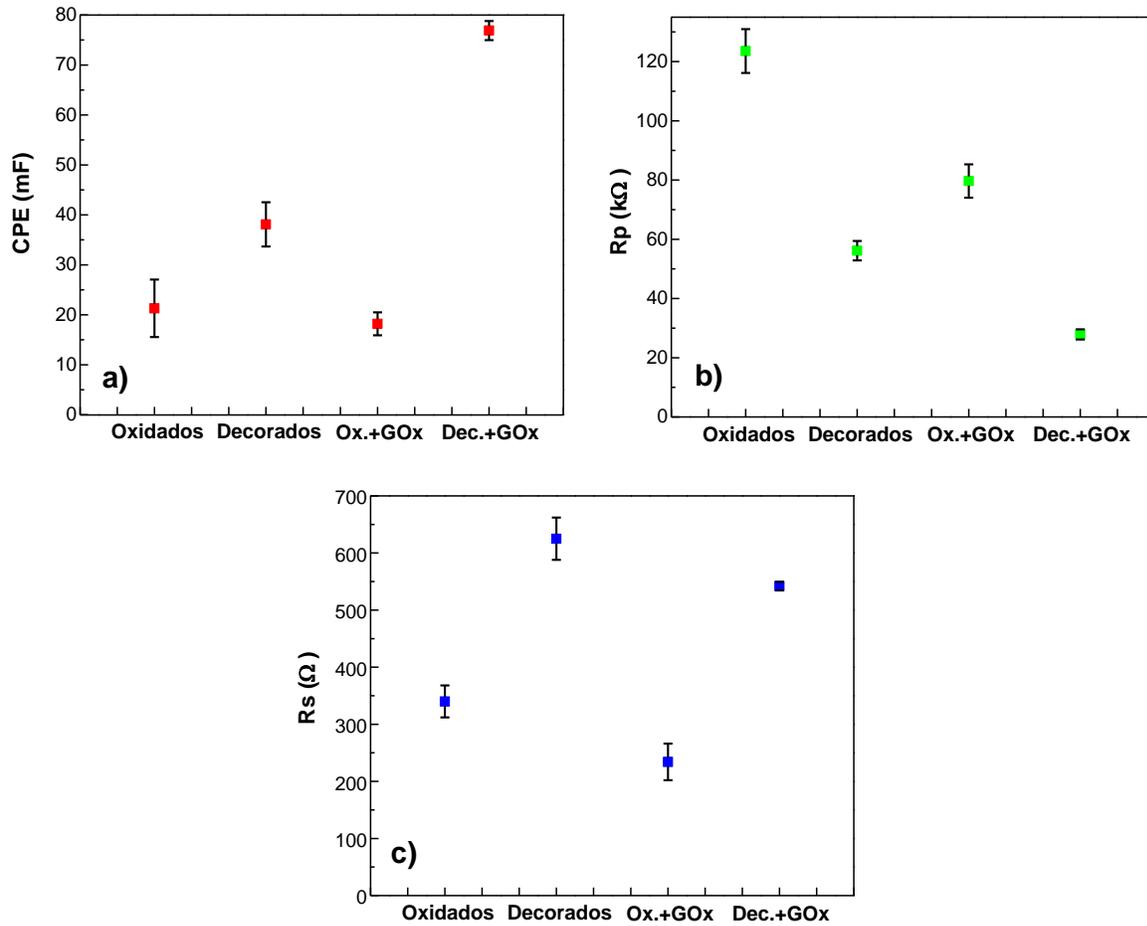


Fig. 3.12 Valores obtenidos de los gráficos de Nyquist ajustados al modelo eléctrico propuesto para los MWCNTs con y sin GOx inmovilizada. a) Capacitancia de la doble capa eléctrica, b) resistencia de polarización y c) resistencia de la disolución.

En la Fig. 3.12b se presentan los valores obtenidos de la simulación de la resistencia a la polarización del sistema (R_p), también llamada resistencia a la transferencia de carga. Esta resistencia se relaciona directamente con la actividad de la celda electroquímica, pues es la que determina la velocidad de las reacciones a efectuarse en la superficie del electrodo de trabajo, es decir, la rapidez de la transferencia de electrones; mientras menor sea R_p , las reacciones se desarrollan en menor tiempo [Adekunle y Ozoemena, 2010; Tiwari et al., 2015]. En los sistemas estudiados, se observó que el valor de R_p disminuyó notablemente en ambos tipos de MWCNTs (oxidados y decorados) con la inmovilización de la enzima GOx en su superficie, lo cual se relaciona con la cantidad de cargas negativas de la superficie de los MWCNTs [Jeykumari y Narayanan, 2009; Tiwari et al., 2015]. Cuando el

MWCNT se oxida, se carga con una cantidad importante de grupos funcionales de carga negativa, principalmente carboxílicos, lo que genera repulsión electrostática en su superficie y por ende en la superficie del electrodo de trabajo donde son depositados. Con la inmovilización covalente de la enzima GOx, se reduce drásticamente esa carga negativa al ser los grupos funcionales carboxílicos los que interactúan con la enzima GOx, con lo que R_p se reduce notablemente. Con la decoración con partículas de óxidos de hierro sucede algo similar, las partículas se adhieren a la superficie de los MWCNTs principalmente por fuerzas electrostáticas, con lo que se reduce la repulsión electrónica; al no cubrirse en su totalidad la superficie de los MWCNTs con las partículas de óxidos de hierro, la repulsión aún existe. Finalmente, por los mismos argumentos, en los MWCNTs decorados y después inmovilizados con la enzima GOx se reduce drásticamente la carga negativa generada en su superficie, por lo que se reduce notablemente R_p al incorporar la enzima. Otra probable explicación puede ser en función de la cantidad de enzima depositada sobre los MWCNTs, es decir, la transferencia de carga en los MWCNTs debe estar influenciada por la cantidad de enzima GOx inmovilizada, de tal forma que los MWCNTs con una distribución más homogénea de GOx, tendrán valores más pequeños de R_p .

En la Fig. 3.12c se observan los valores obtenidos de la resistencia de la disolución (R_s). En esta grafica se observa una ligera disminución en los valores de R_s con la inmovilización. Esto puede explicarse si entendemos que con la inmovilización de la enzima sobre los MWCNTs (depositados en el electrodo de trabajo), se incrementa el transporte de electrones y disminuye la resistencia entre el electrodo de referencia y el de trabajo.

Con los resultados de EIS se concluye que la actividad de los MWCNTs oxidados al ser usados como electrodos de trabajo en la celda electroquímica incrementa con la incorporación de nanopartículas de óxidos de hierro; con la inmovilización de la enzima GOx se reduce notablemente R_p lo que permite una mejor reactividad y tiempos de reacción más cortos.

3.4.5 Detección de glucosa por cronoamperometría

Para concluir el análisis electroquímico se utilizó la técnica de cronoamperometría. La Fig. 3.13 muestra los resultados obtenidos en el sensado de glucosa mediante la técnica de CA, utilizando soluciones de 1 a 10 mM de glucosa a un potencial constante de -0.5 V. La

respuesta de la intensidad de corriente en el proceso de sensado de glucosa en función del tiempo se presenta en las Figs. 3.13a para MWCNTs oxidados y Fig. 3.13b para MWCNTs decorados con nanopartículas de óxido de hierro.

Similar a lo observado en VC, al incrementar la cantidad de glucosa en la solución PBS incrementa la intensidad de corriente medida. Para el caso de CA, al tener un potencial fijo se limita la capacidad de respuesta ante la oxidación y reducción de las especies, lo que se traduce en cambios pequeños en CA en comparación con lo observado en VC.

De las Figs. 3.13a y 3.13b es posible obtener el tiempo de respuesta de los MWCNTs cuando son utilizados como sensores de glucosa en disolución. Este tiempo de respuesta se define como el tiempo en el que el espectro se estabiliza, es decir, cuando la corriente de respuesta es constante en el tiempo (ver recuadro dentro de las Figs. 3.13a y 3.13b). En nuestro caso, este valor fue considerado como constante cuando la línea horizontal convergió a variaciones menores al 3 %. En los MWCNTs oxidados los tiempos de respuesta fueron similares para todas las concentraciones de glucosa estudiadas, mientras que en el caso de los MWCNTs decorados con partículas de óxido de hierro los tiempos de respuesta fueron más cortos y disminuyen ligeramente conforme incrementa la concentración de glucosa en disolución. Así, el promedio del tiempo de respuesta del sensor utilizando MWCNTs oxidados en el intervalo de 1-10 mM/L de glucosa fue de 8.6 s, y cuando se utilizaron MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro fue de 6.6 s. Los resultados obtenidos en el tiempo de respuesta son comparables con trabajos reportados en la literatura en los que se reportan tiempos de respuesta de 5-10 s en intervalos de concentración incluso menores [Li et al. 2010, Upadhyay et al. 2009].

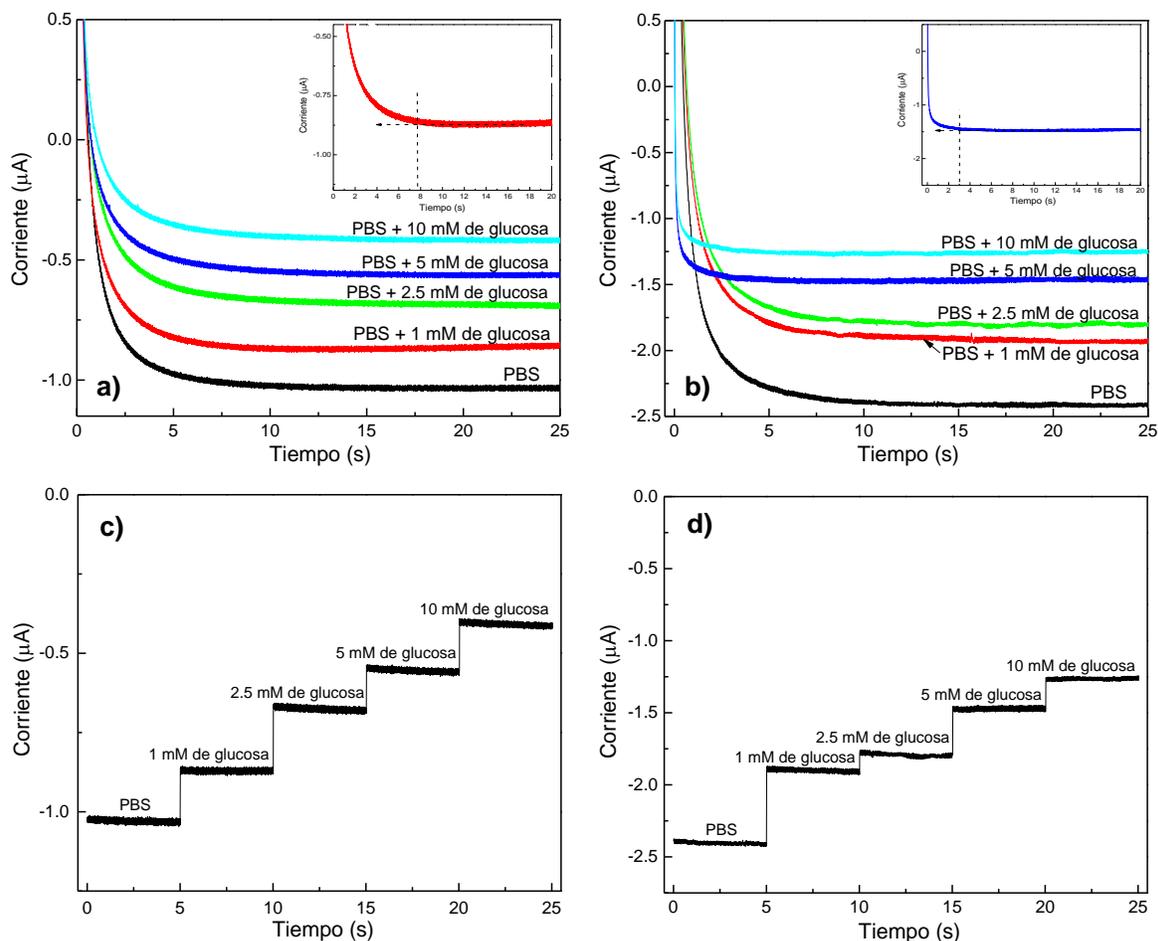


Fig. 3.13 Resultados obtenidos en la detección de glucosa por CA. a) Cronoamperogramas de los MWCNTs oxidados, b) cronoamperogramas de los MWCNTs decorados, c) incremento en la corriente como función de la concentración de glucosa para MWCNTs oxidados, d) Incremento en la corriente como función de la concentración de glucosa para MWCNTs decorados.

Las Figs. 3.13c y 3.13d se obtuvieron de las Figs. 3.13a y 3.13b graficando una sección de 5 s para cada concentración diferente de glucosa en PBS. La sección del espectro tomada corresponde al tiempo de estabilización del mismo, donde la respuesta en la intensidad de corriente para cada concentración de glucosa en PBS es constante en el tiempo (esto es las variaciones son menores al 3 %). Esta sección se graficó para cada concentración de glucosa disuelta en PBS de forma continua con el fin de observar el incremento en la densidad de corriente en función de la concentración. Podemos observar que los incrementos son más notables para los MWCNTs decorados con partículas de óxidos de hierro con respecto a los solo oxidados, lo que confirmó lo observado en VC. Así, cuando

los MWCNTs están decorados con partículas de óxidos de hierro y se inmoviliza GOx sobre ellos, la sensibilidad y el tiempo de respuesta del sensor se mejoran con respecto a los MWCNTs que solamente son oxidados.

Conclusiones

En el presente trabajo de tesis doctoral se estudió la decoración de nanotubos de carbono de pared múltiple con partículas magnéticas de óxido de hierro y su subsecuente uso en el sensado electroquímico de glucosa en disolución (1-10 mM/L) utilizando MWCNTs con y sin decoración de partículas de óxidos de hierro con la enzima GOx inmovilizada. Inicialmente se oxidaron dos tipos de MWCNTs con diferente morfología mediante un tratamiento ácido (mezcla de H_2SO_4 y HNO_3 8.0 M). Con ello, se generó una superficie activa mediante la incorporación de grupos funcionales, principalmente OH, CO y COOH. Los MWCNTs oxidados fueron decorados con 20-30 % en peso de nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro (magnetita, Fe_3O_4 coexistiendo con maghemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) cuyos diámetros fueron de 2-9 nm. Posterior a la decoración con nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro se realizó la inmovilización de la enzima GOx sobre la superficie de los MWCNTs con y sin decoración.

Para el análisis electroquímico, los MWCNTs con la enzima GOx inmovilizada en estudio fueron depositados sobre la superficie activa de un electrodo de carbón vítreo a partir de una dispersión en ultrasonido de 10 mg de MWCNTs en 10 mL de agua desionizada. Este electrodo de trabajo se utilizó en una celda electroquímica de tres electrodos utilizando diferentes concentraciones milimolares de glucosa (1-10 mM/L) disuelta en PBS, cubriendo el intervalo de pacientes sanos y con diabetes.

El análisis electroquímico por voltamperometría cíclica de los MWCNTs tanto oxidados como decorados con la enzima GOx inmovilizada demostró el éxito en la detección electroquímica de glucosa en solución para un intervalo de concentraciones entre 1-10 mM/L de glucosa. Este sensado amperométrico se registró a través del cambio en la densidad de corriente de los picos de oxidación y reducción generados por la interacción entre la glucosa y la enzima glucosa oxidasa y para el caso de los MWCNTs decorados con nanopartículas de óxido de hierro la sensibilidad fue de $0.85 \mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ en la corriente de oxidación y $4.75 \mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ en la corriente de reducción.

La simulación por circuito eléctrico equivalente de los gráficos de Nyquist obtenidos por espectroscopía de impedancia electroquímica de los MWCNTs tanto oxidados como decorados mostraron diferencias notables en los parámetros eléctricos estudiados (elemento de fase constante, resistencia de polarización del sistema, y resistencia de la solución)

cuando contienen glucosa oxidasa inmovilizada respecto a cuándo no, evidenciando la mejora en la transferencia electrónica del sistema con la decoración e inmovilización de la enzima GOx sobre los MWCNTs.

El análisis amperométrico de los MWCNTs tanto oxidados como decorados con la enzima GOx inmovilizada, utilizando como electrolito PBS con diferentes concentraciones milimolares de glucosa mostró un tiempo de detección rápido (8.6 s en MWCNTs oxidados y 6.6 s en los MWCNTs decorados) y estable.

La sensibilidad y el tiempo de detección de los MWCNTs con la enzima GOx inmovilizada cuando se utilizan como sensores amperométricos de glucosa son mejores cuando los MWCNTs son decorados con nanopartículas de óxidos de hierro que cuando solo son oxidados. Así, los nanotubos decorados con nanopartículas de óxido de hierro obtuvieron una sensibilidad de $4.75 \mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ con una velocidad de respuesta de 6.6 s, lo cual es comparable con los mejores parámetros reportados en la literatura con tiempos de respuesta de 5-10 s en intervalos de concentración incluso menores.

De este modo, podemos afirmar que el biosensor electroquímico desarrollado en este trabajo presenta excelentes características analíticas, amplificando la respuesta amperométrica mediante el uso de nanopartículas de óxidos de hierro y mejorando la sensibilidad y los tiempos de respuesta alcanzados con otras configuraciones similares.

Además se observó una reproducibilidad y estabilidad aceptable, lo que demuestra su potencial utilidad y versatilidad para llevar a cabo la detección de glucosa siguiendo la tendencia de miniaturización de este tipo de dispositivos.

Apéndice A: Variación de las condiciones experimentales en la decoración de nanotubos de carbono con nanopartículas de óxidos de hierro

Este apéndice reporta algunas variaciones a las condiciones experimentales utilizadas para la decoración de nanopartículas de óxidos de hierro sobre la superficie de MWCNTs, las cuales no resultaron en las decoraciones con mejores resultados, pero sirven para definir las condiciones experimentales finales.

Inicialmente la relación en peso entre los MWCNTs y el precursor metálico (MWCNTs: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) fue variándose entre 1:1 y 1:4, y el tiempo de reacción (reflujo) se varió entre 30 y 120 min, ver Tabla A1. Los nanotubos del tipo A (ver Tabla 2.1) fueron seleccionados para estas pruebas. En la Fig. A1 se presentan los resultados obtenidos de las variaciones en los tratamientos de decoración descritos en la Tabla A1.

Tabla A.1 Tratamientos adicionales realizados en la decoración de MWCNTs.

MWCNT Tipo A			
Razón en peso de MWCNTs: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1:2	1:4	1:4
Tiempo de reflujo (min)	120	30	120
Identificación	1:2-120	1:4-30	1:4-120

Las micrografías corresponden a tratamientos con un tiempo de reflujo prolongado de 120 min, etiqueta 1:2-120, y un aumento en la concentración del precursor metálico a 1:4 con tiempos cortos de reflujo (etiqueta 1:4-30); una combinación de ambos (1:4-120) es también reportada. De acuerdo al análisis TEM de estos tratamientos, Fig. A1, se concluye que a razones de concentración de precursor mayores a 1:2 (100 mg de MWCNTs: 200 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y tiempos de reflujo mayores a 30 min se presentan aglomeraciones de nanopartículas de óxido de hierro y una decoración no homogénea de los MWCNTs. De este análisis se concluye que el aumento en la concentración del precursor y/o tiempo de reacción respecto a 1:2 y 30 min producen aglomeraciones en las partículas producidas y su distribución sobre los MWCNTs es heterogénea. Debido a esto, el cuerpo principal de esta

tesis solo discute a detalle los resultados obtenidos para razones de concentración de MWCNTs y precursor metálico de 1:1 y 1:2 con 30 min de tiempo de reflujo.

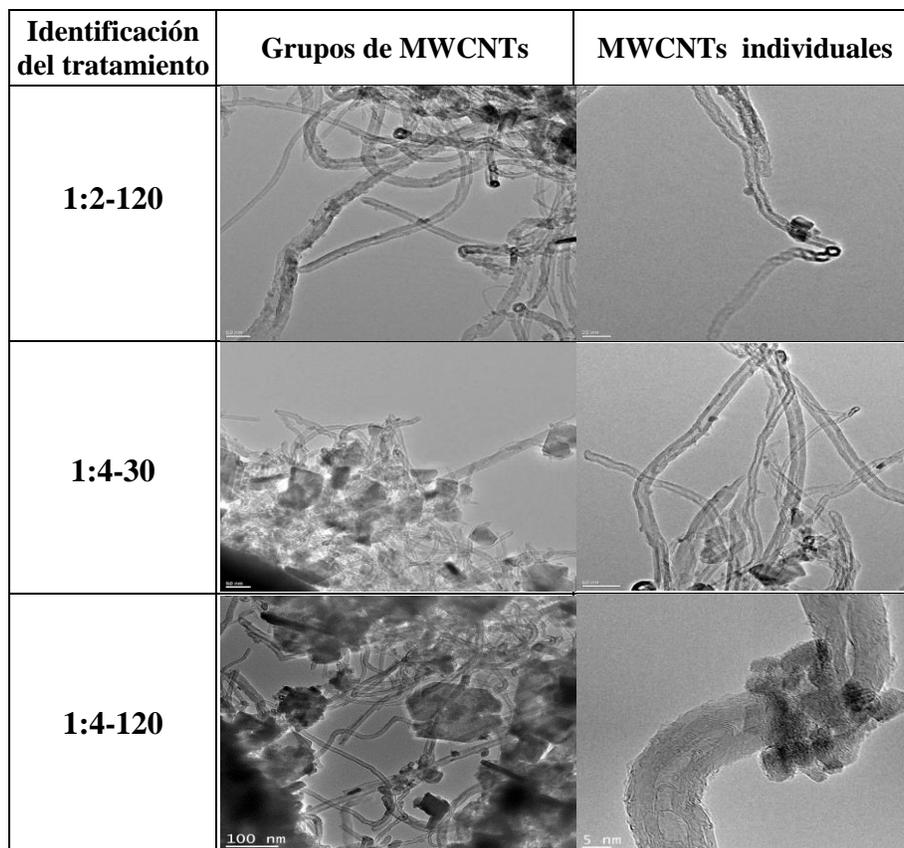


Fig. A.1 Micrografías TEM de los tratamientos de decoración adicionales realizados a los MWCNTs del tipo A.

Referencias

- Adekunle A.S., Ozoemena K.I. *International Journal of Electrochemical Science*, 5: 1726-1742 (2010).
- Ajayan P.M., Schadler L.S., Giannaris C., Rubio A. *Advanced Materials* 10: 750-753 (2000).
- Anthony J.W., Bideaux R.A., Bladh K.W., Nichols M.C. Eds., *Handbook of Mineralogy*, Mineralogical Society of America, Chantilly, VA. <http://www.handbookofmineralogy.org> Consultado en Enero (2015).
- Antunes E.F., Lobo A.O., Corat E.J., Trava-Airoldi V.J., Martin A.A., Veríssimo C. *Carbon* 44: 2202-2211 (2006).
- Atkins P., De Paula J. *Atkin's Physical Chemistry* 8th edition, Oxford University Press (2006).
- Avilés F., Cauich-Rodríguez J.V., Moo-Tah L., May-Pat A., Vargas-Coronado R. *Carbon* 47: 2970-2975 (2009).
- Avilés F., Ponce A., Cauich-Rodríguez J.V., Martínez G.T. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures* 20: 49-55 (2012).
- Aviles F., Sierra-Chi C.A., Nistal A., May-Pat A., Rubio F., Rubio J. *Carbon* 57: 520-529 (2013).
- Baby T.T., Ramaprabhu S. *Talanta* 80: 2016-2022 (2010).
- Balasubramanian K., Burghard M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385: 452-468 (2006).
- Bard A.J., Faulkner L.R. "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications", John Wiley & Sons, Inc., New Jersey (2000).
- Baughman R.H., Zakhidov A.A., De Heer W.A. *Science* 297: 787-791 (2002).
- Betachek® G5 Tiras de prueba de glucosa en la sangre. www.betachek.com Consultado en Diciembre (2010).
- Binu S., Pillai V.P.M., Pradeepkumar V., Padhy B.B., Joseph C.S., Chandrasekaran N. *Materials Science and Engineering C* 29: 183-186 (2009).
- Bode H.W. *Network Analysis and Feedback Amplifier Design*. D. Van Nostrand Company, Inc. New York (1945).

Bogner M., Schnaithmann M., Sägebarth J., Sandmaier H. *Procedia Engineering* 5: 1047–1050 (2010).

Boukamp. B.A. *Solids State Ionics* 20: 31-34 (1986).

Brunauer S., Emmett P.H., Teller E. *Journal of the American Chemical Society* 60: 309–319 (1938).

Buzanovskii V.A. *Review Journal of Chemistry* 2: 53-78 (2012).

Cai C., Chen J. *Analytical Biochemistry* 332: 75-83 (2004).

Carrara S., Baj-Rossi C., Boero C., De Micheli G. *Electrochimica Acta* 128: 102-112 (2014).

Chaubey A., Malhotra B.D. *Biosensors and Bioelectronics* 17: 441-456 (2002).

Chen C., Xie Q., Yang D., Xiao H., Fu Y., Tan Y., Yao S. *Royal Society of Chemistry Advances* 3: 4473-4491 (2013).

Chen K.J., Lee C.F., Rick J., Wang S.H., Liu C.C., Hwang B.J. *Biosensors and Bioelectronics* 33: 75-81 (2012).

Cheng T.M., Huang T.K., Lin H.K., Tung S.P., Chen Y.L., Lee C.Y., Chiu H.T. *Applied Materials and Interfaces* 10: 2773-2780 (2010).

Chopra N., McWhinney H.G., Shi W. *Materials Characterization* 62: 635-641 (2011).

Chu M., Shao Y., Peng J., Dai X., Li H., Wu Q., Shi D. *Biomaterials* 34: 4078-4088 (2013).

Clark, L.C., Lyons C. *Annals of the New York Academy of Sciences* 102: 29-45 (1962).

Collins P.G., Avouris P. *Scientific American* 283: 62-69 (2000).

Cui R., Han Z., Pan J., Abdel-Halim E.S., Zhu J.J. *Electrochimica Acta* 58: 179-183 (2011).

Daenen M., de Fouw R.D., Hamers B., Janssen P.G.A., Schouteden K., Veld M.A.J. *The Wondrous World of Carbon Nanotubes. Multidisciplinary Project Group, Eindhoven University of Technology, Eindhoven* (2003).

Deeken C.R., Cozad M.J., Bachman S.L., Ramshaw B.J., Grant S.A. *Journal of Biomedical Materials Research A* 96: 584-594 (2011).

Degani Y., Heller A. *The Journal of Physical Chemistry* 91 (6): 1285-1289 (1987).

Dillon A.C., Yudasaka M., Dresselhaus M.S. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 4: 691-703 (2004).

Ding Y., Wang Y., Su L., Bellagamba M., Zhang H., Lei Y. *Biosensor and Bioelectronics* 26: 542-548 (2010).

Dominguez C.M., Quitanilla A., Ocón P., Casas J.A., Rodriguez J.J. *Carbon* 60: 76-83 (2013).

Dresselhaus G., Dresselhaus M.S., Nakada K., Fujita M. *Physical Review B* 54: 17954-17961 (1996).

Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Saito R., Jorio A. *Physics Reports* 409: 47-99 (2005).

Dresselhaus M.S., Jorio A., Souza Filho A.G., Saito R. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 368: 5355-5377 (2010).

Fan X.J., Li X. *New Carbon Matererials* 27: 111-116 (2012)

Frew J.E., Hill H.A.O. *Analytical Chemistry* 59: 933-944 (1987).

Gao L.Z., Zhuang J., Nie L., Zhang J.B., Zhang Y., Gu N., Wang T.H., Feng J., Yang D.L., Perrett S., Yan X.Y. *Nature Nanotechnology* 2: 577-583 (2007).

Gao Q., Chen F., Zhang J., Hong G., Ni J., Wei X., Wang D. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321: 1052-1057 (2009).

Gil-Velázquez L.E., Sil-Acosta M.J., Aguilar-Sanchez L., Echevarría-Nuno S., Michaus-Romero F., Torres-Arreola L.P. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 51: 58-67 (2013).

Gregg S.J., Sing K.S.W. *Adsorption, surface area and porosity*. Academic Press, New York (1982).

Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J., Reimhult E. *Sensors* 8: 1400-1458 (2008).

Grosse W., Champavert J., Gambhir S., Wallace G.G., Moulton S.E. *Carbon* 61: 467-475 (2013).

Guariguata L., Whiting D.R., Hambleton I., Beagley J., Linnenkamp U., Shaw J.E. *Diabetes Research and Clinical Practice* 103: 137-149 (2014).

Guilbault G.G., Montalvo J. *Journal of the American Chemical Society* 91: 2164-2565 (1969).

Guascito M.R., Chirizzi D., Malitesta C., Mazzotta E. *Analyst* 136: 164-173 (2011).

Han Q., Wang Z., Xia J., Chen S., Zhang X., Ding M. *Talanta* 101: 388-395 (2012).

Hong C.E., Lee J.H., Kalappa P., Advani S.G. *Composites Science and Technology* 67: 1027-1034 (2007).

Hou X., Wang L., Zhou F., Wang F. *Carbon* 47: 1209-1213 (2009).

Hou P.X., Liu C., Cheng H.M. *Carbon* 46: 2003–2025 (2008).

Hrapovic S., Liu Y., Male K.B., Luong J.H.T. *Analytical Chemistry* 76: 1083-1088 (2004).

Huiqun C., Meifang Z., Yaogang L. *Journal of Solid State Chemistry* 179: 1208-1213 (2006).

Ijima S. *Nature* 354: 56-58 (1991).

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). “Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes”. <http://www.doc4net.es/doc/1686576997822>. Consultado en Noviembre (2013).

Ishikawa F.N., Stauffer B., Caron D.A., Zhou C. *Biosensors and Bioelectronics* 24: 2967-2972 (2009).

IUPAC-IUBMB, International union of pure and applied chemistry-International union of biochemistry and molecular biology. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/>. Consultado en Enero (2015).

Janegitz B.C., Pauliukaite R., Ghica M.E., Brett C.M.A., Fatibello-Filho O. *Sensors and Actuators B* 158: 411-417 (2011).

Jeykumari D.R.S., Narayanan S.S. *Carbon* 47: 957–966 (2009).

Jiang W., Lai K.L., Hu H., Zeng X.B., Lan F., Liu K.X., Wu Y., Gu Z.W. *Journal of Nanoparticle Research* 13: 5135-5145 (2011).

Jose M.V., Marx S., Murata H., Koepsel R.R., Rusell A.J. *Carbon* 50: 4110-4020 (2012).

Kafka J., Larsen N.B., Skaarup S., Gerchke O. *Microelectronics Engineering* 87: 1239-1241 (2010).

Kamyabi M.A., Hajari N., Turner A.P.F., Tiwari A. *Talanta* 116: 801–808 (2013).

Kardimi K., Tsoufis T., Tomou A., Kooi B.J., Prodromidis M., Gournis D. *International Journal of Hydrogen Energy* 37: 1243-1253 (2012).

Kauffman D.R., Sorescu D.C., Schofield D.P., Allen B.L., Jordan K.D., Star A. *Nano Letters* 10: 958-963 (2010).

Kaushik A., Khan R., Solanki P.R., Pandey P., Alam J., Ahmad S., Malhotra B.D. *Biosensors and Bioelectronics* 24: 676-683 (2008).

Kerman K., Saito M., Yamamura S., Takamura Y., Tamiya E. *Trends in Analytical Chemistry* 27: 585-592 (2008).

Kinoshita K. Carbon: Electrochemical and Physicochemical Properties. Wiley-Interscience, London (1988)

Kissinger P.T., Heineman W.R. Cyclic Voltammetry. Journal of Chemical Education 60: 772-776 (1983).

Kong J., Franklin N.R., Zhou C., Chapline M.G., Peng S., Cho K., Dai H. Science 287: 622-625 (2000).

Kong T., Chen Y., Ye Y., Zhang K., Wang Z., Wang X. Sensors and Actuators B 138: 344-350 (2009).

Kuvarega A.T., Krause R.W.M., Mamba B.B. Journal of Nanoparticle Research 14: 776-792 (2012).

Lasia A. Electrochemical Impedance Spectroscopy and Its Applications, Modern Aspects of Electrochemistry. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (1999).

Leca-Bouvier B.D., Blum L.J. Recognition Receptors in Biosensors, Chapter 4 Enzyme for Biosensing Applications. Springer, New York (2010).

Li J., Ng H.T., Cassell A., Fan W., Chen H., Ye Q., Koehne J., Han J., Meyyappan M. Nano Letters 3: 597-602 (2003).

Li J., Yuan R., Chai Y., Che X. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 66: 8-14 (2010).

Lin Y., Lu F., Luo Tu Y., Ren Z. Nano Letters 4: 191-195 (2004).

Liu L., Quin Y., Guo Z.X., Zhu D. Carbon 41: 331-335 (2003).

Liu S.N., Yin Y.J., Cai C.X. Chinese Journal of Chemistry 25: 439-447 (2007).

Liu S.Q., Ju H. Biosensors and Bioelectronics 19: 177-183 (2003).

Liu Y., Jiang W., Li S., Cheng Z.P., Song D., Zhang X.J., Li F.S. Materials Chemistry and Physics 116: 438-441 (2009).

Liu Y., Jiang W., Xu L., Yang X., Li F. Materials Letters 63: 2526-2528 (2009).

Liu Y., Liu L., Dong S. Electroanalysis 19: 55-59 (2007).

Liu Y., Wang M., Zhao F., Xu Z., Dong S. Biosensors and Bioelectronics 21: 984-988 (2005).

López-García M.J. Monitorización del control glucémico continuo/discontinuo. www.seep.es/privado/download.asp?url=Publicaciones/2004PDIAB/monitorizacion_ponencia.pdf. Consultado en Diciembre (2010).

Lourie O., Wagner H.D. *Journal of Materials Research* 13: 2418-2422 (1998).

Lu J. *Carbon* 45: 1599-1605 (2007).

Lu X.Y., Zhang N.Y., Wei L., Deng Q.Y., Lu X., Duan K., Weng J. *Applied Surface Science* 262: 110-113 (2012).

Luo X.L., Xu J.J., Du Y., Chen H.Y. *Analytical Biochemistry* 334: 284-289 (2004).

Mabbott G.A. *Journal of Chemical Education* 60: 697-702 (1928).

Macdonald D.D. *Electrochimica Acta* 51: 1376-1388 (2006).

Mandal A. *News Medical*. <http://www.news-medical.net/health/Blood-Sugar-Normal-Values.aspx>. Consultado en Abril (2014).

Marega R., Accorsi G., Meneghetti M., Parisini A., Prato M., Bonifazi D. *Carbon* 47: 675-682 (2009).

Marroquín V.G. *Aplicaciones industriales de la nanotecnología*. Universidad de Oviedo, Oviedo (2007).

Martínez M.T., Callejas M.A., Benito A.M., Cochet M., Seeger T., Ansón A., Schreiber J., Gordon C., Marhic C., Chauvet O., Fierro J.L.G., Maser W.K. *Carbon* 41: 2247-2256 (2003).

McGarraugh G., Price D., Schwartz S., Weinstein R. *Diabetes Technology and Therapeutics* 3: 367-376 (2001).

Minnikanti S., Skeath P., Peixoto N. *Carbon* 47: 884-893 (2009).

Missana T., Maffiotte C., García-Gutiérrez M. *Journal of Colloid and Interface Science* 261: 154-160 (2003).

Montoya H.H. *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. 2da edición. Universidad de Antioquía, Colombia (2008).

Moretto L.M., Seeber R. *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors*. Springer New York (2014).

Nagarale R.K., Lee J.M., Shin W. *Electrochimica Acta* 54: 6508-6514 (2009).

Nyquist H. *Bell System Technical Journal* 3: 324-352 (1924).

Odom T.W. *Australian Journal of Chemistry* 54: 601-604 (2001).

Organización Mundial de la Salud (OMS). Nota descriptiva No. 312 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es>. Consultado en Abril (2014).

OrSense © non-invasive technologies. <http://www.orsense.com>. Consultado en Enero (2015).

Ortíz R., Martínez Y., Hernández R. Técnicas electroanalíticas parte II. Voltametría. Universidad de los Andes. Facultad de ciencias. Departamento de química. Mérida (2006).

Palwai N.R., Martyn D.E., Neves L.F.F., Tan Y., Resasco D.E., Harrison R.G. Nanotechnology 18: 1-5 (2007).

Pang X., He D., Luo S., Cai Q. Sensors and actuators B 137: 134-138 (2009).

Park Y., Lahaye R.J.W.E., Lee Y.H. Computer Physics Communications 177: 46 (2007).

Patel J.N., Kaminska B., Gray B., Gates B.D. Proceedings 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS, Lyon, France. August 23-26 (2007).

Pourbaix M. Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions. National Association of Corrosion engineers, CEBELCOR, Houston, Texas (1974).

Qiu J.D., Zhou W.M., Guo J., Wang R., Liang R.P. Anal. Biochem. 385: 264-269 (2009).

Ristic L. Sensor technology and devices. Ed. I. Artech House, Norwood (1994).

Rivas G.A., Rubianes M.D., Pedano M.L., Ferreyra N.F., Luque G.L., Rodríguez M.C., Miscoria S.A. Electroanalysis 19: 823-828 (2007).

Rosario-Castro B.I., Contés E.J., Lebrón-Colón M., Meador M.A., Sánchez-Pomales G., Cabrera C.R. Materials Characterization 60: 1442-1453 (2009).

Ruoff R.S., Qianb D., Liua W.K. Comptes Rendus Physique 4: 993-1008 (2003).

Ryu J., Kim K., Kim H.S., Hahn H.T., Lashmore D. Biosensors and Bioelectronics 26: 602-607 (2010).

Schönfelder R., Avilés F., Bachmatiuk A., Cauich-Rodriguez J.V., Knupfer M., Büchner B., Rümeli M.H. Applied Physics A-Materials Science and Processing 106: 843-852 (2011).

Seeler K.A. System Dynamics. An introduction for mechanical engineers. Springer, New York (2014).

Shan C., Yang H., Song J., Han D., Ivaska A., Niu L. Analytical Chemistry 81: 2378-2382 (2009).

Siegrist J., Kazarian T., Ensor C., Joel S., Madou M., Wang P., Daunert S. Sensors and Actuators B 149: 51-58 (2010).

Sing K.S.W., Everett D.H., Haul R.A.W., Moscou L., Pierotti R.A., Rouquérol J. Reporting Physisorption data for gas/solid systems. International union of pure and applied chemistry (IUPAC). *Pure and Applied Chemistry* 57: 603-619 (1985).

Singh P., Benjakul S., Maqsood S., Kishimura H. *Food Chemistry* 124: 97-105 (2011).

Sun Y., Yan F., Yang W., Sun C. *Biomaterials* 27: 4042-4049 (2006).

Taylor R.F. *Protein Immobilization: fundamentals and applications*, Marcel Dekker, New York (1991).

Teymourian H., Salimi A., Hallaj R. *Biosensors and Bioelectronics* 33: 60-68 (2012).

Tiwari I., Singh M., Pandey C.M., Suman G. *Sensors and Actuators B* 206: 276-283 (2015).

Torres Sanchez R.M., Curt E.M., Volzone C., Mercader R.C., Cavalieri A.L. *Materials Research Bulletin* 25: 553-561 (1990).

Tu X., Zhao Y., Luo S., Luo X., Feng L. *Microchimica Acta* 177: 159-166 (2012).

Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford (1987).

United States Food and Drug Administration (FDA). <http://google2.fda.gov>. Consultado en Abril (2014).

Upadhyay A.K., Peng Y.Y., Chen S.M. *Sensors and Actuators B* 141: 557-565 (2009).

Vashist S.K., Zheng D., Al-Rubeaan K., Luong J.H.T., Sheu F.S. *Biotechnology Advances* 29: 169-188 (2011).

Veld M.A.J., Hou P.X., Liu C. Cheng H.M. *Carbon* 46: 2003-25 (2008).

Wan J., Cai W., Feng J., Meng X., Liu E. *Journal of Materials Chemistry* 17: 1188-1192 (2007).

Wang H., Cao L., Yan S., Huang N., Xiao Z. *Materials Science and Engineering B* 164: 191-194 (2009).

Wang S.G., Zhang Q., Wang R., Yoon S.F., Ahn J., Yang D.J., Tian J.Z., Li J.Q., Zhou Q. *Electrochemistry Communications* 5: 800-803 (2003).

Wang Y., Yao Y. *Microchimica Acta* 176: 271-277 (2012).

Wepasnick K.A., Smith B.A., Schrote K.E., Wilson H.K., Diegelmann S.R., Fairbrother D.H. *Carbon* 49: 24-36 (2011).

Wille G., Ritter M., Friedemann R., Mäntele W., Hübner G. *Biochemistry* 42: 14814-14821 (2003).

Wu H., Liu G., Zhuang Y., Wu D., Zhang H., Yang H., Hu H., Yang S. *Biomaterials* 32: 4867-4876 (2011).

Wu P., Shao Q., Hu Y., Jin J., Yin Y., Zhang H., Cai C. *Electrochimica Acta* 55: 8606-8614 (2010).

Xing Y. *The Journal of Physical Chemistry B* 108: 19255-19259 (2004).

Xiu-Juan F., Xin L. *New Carbon Materials* 27: 111-116 (2012).

Yang N., Chen X., Ren T., Zhang P., Yang D. *Sensors and Actuators B: Chemical* 207: 690-715 (2015).

Yao Z., Kane C.L., Dekker C. *Physical Review Letters* 84: 2941-2944 (2000).

Ye X.R., Chen L.H., Wang C., Aubuchon J.F., Chen I.C., Gapin A.I. *The Journal of Physical Chemistry B* 26: 12938-12942 (2006).

Yellow Springs Instrument Company. <http://www.yysi.com/index.php>. Consultado en Noviembre (2010).

Yin W.J., Wei S.H., Ban C., Wu Z., Al-Jassim M.M., Yan Y. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2: 2853-2858 (2011).

Yin Y., Lü Y., Wu P., Cai C. *Sensors* 5: 220-234 (2005).

Zamudio A., Elas A.L., Rodríguez-Manzo J.A., López-Uras F., Rodríguez-Gattorno G., Lupo F., Rühle M., Smith D.J., Terrones H., Díaz D., Terrones M. *Small* 2: 346-350 (2006).

Zhang D., Shi L., Fang J., Dai K. *Materials Letters* 59: 4044-4047 (2005).

Zhang Q., Zhu M., Zhang Q., Li Y., Wang H. *Materials Chemistry and Physics* 116: 658-662 (2009).

Zhang H., Meng Z., Wang Q., Jianbin Z. *Sensors and Actuators B* 158: 23-27 (2011).

Zhao F., Duan H., Wang W., Wang J. *Physica B: Condensed Matter* 407: 2495-2499 (2012).

Zhong Y.L., Akazaki T., Kanzaki K., Kobayashi Y., Takayanagi H. *Science and Technology of Advanced Materials* 7: 78-82 (2006).