

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ELECTRÓNICA

**Inmovilización de la enzima microperoxidasa-11 (MP 11)  
sobre electrodos de grafito-epoxi (GE) modificados con  
nanotubos de carbono(CNT) para su uso potencial en  
biosensores**

PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN  
ENERGÍAS RENOVABLES

**PRESENTA:**

JOCELYNE MARLENY ANTONIO CASTRO



---

**DIRECTOR DE TESIS**

**Vo. Bo. DRA. ALIA MÉNDEZ ALBORES**



---

**CODIRECTOR DE TESIS**

**Vo. Bo. DRA. SANDRA JIMENEZ XOCHIMITL**

Matrícula: 201519968

Ciudad Universitaria

Puebla, Puebla.

Abril, 2022.

*A mi família*

## **Agradecimientos**

Primero que nada, a mi asesora la Dra. Alia Méndez, por iniciarme en este maravilloso mundo que es la investigación, por todos sus consejos y orientaciones, por todas las facilidades que me brindó en mi estadía bajo su tutela, por confiar en mí y convertirme en una profesional, por toda su voluntad en querer un México mejor.

A la Dra. Sandra Jiménez le agradezco por todo el apoyo brindado a lo largo de la carrera, por su tiempo y los conocimientos transmitidos.

A mi madre por estar conmigo desde el primer momento, por su amor, esfuerzo y apoyo continuo, gracias por inspirarme y ser un ejemplo de constancia y dedicación.

A todos mis amigos y familia por apoyarme en este largo camino, por sus consejos, risas y motivaciones para continuar.

Un especial agradecimiento a Luis y a su familia por apoyarme y encaminarme a cumplir mis sueños.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud.

*“La verdad siempre se halla en la simplicidad y no en la multiplicidad y confusión de las cosas.”*

**Isaac Newton**

*“Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Es hora de comprender más y temer menos...”*

**Marie Curie**

## CONTENIDO

Listado de imágenes	6
Listado de gráficas	7
Listado de acrónimos y abreviaciones	8
Resumen	9
Abstract	10
Justificación	11
Hipótesis	12
Objetivos	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
Introducción	14
Antecedentes	16
Capítulo 1. Biosensores	19
1.1 Biosensores electroquímicos enzimáticos	20
1.2 Tipos de inmovilización enzimática sobre soportes o templetes	23
1.3 Microperoxidasa-11	23
1.4 Inmovilización de peroxidasa sobre nanotubos de carbono	25
Capítulo 2. Materiales y métodos	28
2.1 Equipos y reactivos	29
2.2 Electroforesis	30
2.3 Voltametría cíclica	32
2.4 Espectrometría ultravioleta-visible	34
2.5 Espectrofotómetro ultravioleta-visible	35
2.6 Espectroscopia Raman	37
2.7 Microscopio de fuerza atómica (AFM)	37
Capítulo 3. Electrodo GE-MWCNTs	40
3.1 Elaboración del electrodo grafito-epoxi (GE)	41
3.2 Elaboración de una suspensión de nanotubos de carbono	42
3.3 Electroforesis al electrodo GE usando la suspensión de MWCNTs	44
Capítulo 4. Electrodo GE- MWCNTs – MP11	52
4.1 Preparación de la solución microperoxidasa-11	53

4.2 Adsorción de microperoxidasa-11 sobre electrodos grafito-epoxi nanotubos de carbono (GE/MWCNTs)	54
4.3 Cargas y concentraciones de la MP-11 sobre GE-MWCNTs	54
4.4 Efecto del pH de la MP-11 adsorbida sobre GE/MWCNTs	59
4.5 Estudio por AFM	62
Capítulo 5. Resultados y discusiones	64
Conclusiones	72
Capítulo 6. Aplicaciones y alcances	73
6.1 Futuras aplicaciones en las energías renovables	76
Bibliografía	79

## Listado de imágenes

Imagen 1 Obreros de una mina llevando consigo un canario en una jaula. _____	16
Imagen 2 Representación de un biosensor _____	20
Imagen 3 Biosensor de primera generación _____	21
Imagen 4 Biosensor de segunda generación _____	22
Imagen 5 Biosensor de tercera generación _____	22
Imagen 6 Estructura molecular de la Microperoxidasa 11 _____	24
Imagen 7 Tipos de nanotubos de carbono _____	25
Imagen 8 Esquema de una celda electroforética _____	30
Imagen 9 Electroforesis de frente móvil _____	31
Imagen 10 Electroforesis zonal _____	31
Imagen 11 Electroforesis continua _____	32
Imagen 12 Vista típica de un voltamperograma _____	33
Imagen 13 Potenciostato PGZ 301 VoltaLap _____	34
Imagen 14 Esquema de funcionamiento espectrometría _____	35
Imagen 15 Espectrofotómetro Variant Cary _____	36
Imagen 16 Esquema de funcionamiento del microscopio AFM _____	38
Imagen 17 Interacción entre la punta del cantiléver y la muestra _____	38
Imagen 18 Proceso de elaboración del GE. _____	41
Imagen 19 Suspensión homogénea de nanotubos de carbono _____	44
Imagen 20 Deposición electroforética de nanotubos de carbono sobre electrodos de grafito-epoxi _____	45
Imagen 21 Enjuagues de EtOH/HCl a 60°C y NaHCO <sub>3</sub> a temperatura ambiente _____	45
Imagen 22 Distribución de especies de la MPs 11 en función del pH. _____	55
Imagen 23 Micrografías obtenidas mediante AFM modo on top de: a) Electrodo GE/MWCNTs, b) GE/MWCNTs-MPX-11 sintetizado a partir de una disolución conteniendo BAS pH 4+ 2 μM MPX-11, c) Imagen 3D-modo fase del electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 . _____	62

## Listado de gráficas

Gráfica 1 Voltamperograma de electrodo de grafito-epoxi en buffer de amplio espectro pH4 a una velocidad de 0.1 mV. _____	42
Gráfica 2 VC de los electrodos a) GE, b) GE/MWCNTs-T1 (tratado con NaHCO <sub>3</sub> ) y c) GE/MWCNTs-T2 (tratado con HCl-etOH), en buffer de amplio espectro a pH4. v = 100 mV/s. _____	46
Gráfica 3 a) VC de electrodos GE/MWCNTs-T2 en buffer de amplio espectro a diferentes valores de pH, b) gráfico de E <sup>0</sup> vs pH _____	47
Gráfica 4 Espectros Raman de a) MWCNTs-CTAB b) MWCNTs-CTAB tratamiento NaHCO <sub>3</sub> y c) MWCNTs-CTAB tratamiento HCl-etOH. _____	49
Gráfica 5 Scan de buffer pH 4 en celda de cuarzo en ausencia de la enzima MP-11 banda(A) y en presencia de esta banda (B) _____	54
Gráfica 6 VC del electrodo GE/MWCNTs-MP-11 en buffer de amplio espectro a pH 4. La adsorción de la enzima fue obtenida en buffer de amplio espectro bajo las siguientes condiciones: a) pH7 + 50 μM MPX-11, b) pH 7 + 2 μM MPX-11, c) pH 4 + 50 μM MPX-11, d) pH 4 + 2 μM MPX-11 _____	56
Gráfica 7 Efecto del ciclado de potencial para el electrodo GE/MWCNTs-MP-11 en buffer de amplio espectro a pH 4 a partir de la adsorción de la enzima en las siguientes condiciones: a) pH7 + 50 μM MPX-11, b) pH 7 + 2 μM MPX-11, c) pH 4 + 50 μM MPX-11, d) pH 4 + 2 μM MPX-11 _____	58
Gráfica 8 VC de electrodos GE/MWCNTs-MP-11 en buffer de amplio espectro a diferentes valores de pH. La adsorción de la enzima fue obtenida bajo las siguientes condiciones en buffer de amplio espectro: a) pH7 + 50 μM MPX-11, b) pH 7 + 2 μM MPX-11, c) pH 4 + 50 μM _____	60
Gráfica 9 VC del electrodos GE/MP-11 en buffer de amplio espectro pH 4 antes y después de la inmovilización de la enzima MP11. _____	66
Gráfica 10 VCs de los electrodos GE/MWCNTs-2 antes (a) y después de la modificación con la enzima (b), en buffer de amplio espectro a pH 4. v = 100 mV/s. _____	68
Gráfica 11 Efecto del ciclado de potencial en el electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 en buffer de amplio espectro a pH 4. v = 100 mV/s. _____	69
Gráfica 12 Efecto del enjuague en el electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 en buffer de amplio espectro a pH 4 a 100 mV/s. _____	70
Gráfica 13 Respuesta en presencia de peróxido de hidrógeno a pH 4 sobre electrodo modificado GE-MWCNTs-MP-11 _____	74
Gráfica 14 comparativo de la respuesta electroquímica de absorción de microperoxidasa-11 en presencia y ausencia de depósito de nanoparticulas de oro (AuPs) _____	75

## Listado de acrónimos y abreviaciones

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b><math>A_e</math></b>	Área electro activa o real
<b>AFM</b>	Microscopía de fuerza atómica
<b>Au</b>	Oro
<b>BE</b>	Biosensores enzimáticos
<b>CCD</b>	Dispositivo de carga acoplada
<b>CGE</b>	Compositos de grafito epoxi
<b>CNTs</b>	Nanotubos de pared única
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>COOH-</b>	Grupos carboxílicos
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio o Bromuro de cetiltrimetilamonio
<b><math>E_{pa}</math></b>	Potenciales de pico anódico
<b><math>E_{pc}</math></b>	Potenciales de pico catódico
<b>ETOH</b>	Etanol
<b>Fe</b>	Hierro
<b>GE</b>	Grafito epoxi
<b>GPa</b>	Giga pascal
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogeno
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HCO<sub>3</sub></b>	Ion bicarbonato
<b><math>I_{pa}</math></b>	Corriente de pico anódico
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>KDa</b>	Kilo dalton
<b>MP11/MPX11</b>	Microperoxidasa 11
<b>mV</b>	Milivoltio
<b>MWCNT/MWCNTs</b>	Nanotubos de carbono multicapa
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigeno diatómico
<b>PMT</b>	Tubo fotomultiplicador
<b>STM</b>	Microscopía de barrido por tuneleo
<b>TED</b>	Transferencia electrónica directa
<b>TPA</b>	Tera pascal
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromol

## **Resumen**

El incremento de la actividad humana lleva consigo el aumento de productos químicos liberados en el medio ambiente, siendo este uno de los principales causantes en la pérdida de biodiversidad, riesgos naturales y de amenazas en la salud humana. En el presente trabajo de tesis se plantea la modificación de electrodos de grafito con nanotubos de carbono, para la posterior inmovilización de la enzima microperoxidasa-11 sobre su superficie a partir del método físico, creando así un biosensor enzimático. Posteriormente mediante el uso de diversos métodos como: voltamperometría cíclica, espectroscopía UV- Vis y microscopía de fuerza atómica se determinaron las mejores condiciones de fabricación y almacenamiento, así como definir las características únicas del biosensor GE-MWCNT-MP-11. El proyecto forma parte del desarrollo de biosensores para la determinación de compuestos de interés ambiental. El estudio planteado permitirá establecer en el laboratorio de Bioinorgánica Aplicada de la BUAP, la metodología para la inmovilización de enzimas sobre transductores electroquímicos elaborados a base de materiales carbonáceos, además de contribuir al entendimiento de los procesos químicos y electroquímicos involucrados durante su anclaje a la superficie.

## **Abstract**

The increase in human activity brings with it an increase in chemical products released into the environment, this being one of the main causes of biodiversity loss, natural risks and threats to human health. In the present thesis project, it's proposed the modification of graphite electrodes with carbon nanotubes, for the subsequent immobilization of the enzyme microperoxidase-11 on its surface from the physical method, thus creating an enzymatic biosensor. Subsequently, through the use of various methods such as: cyclic voltammetry, UV-Vis spectroscopy and atomic force microscopy, the best manufacturing and storage conditions were determined, as well as defining the unique characteristics of the GE-MWCNT-MP-11 biosensor. The project is part of the development of biosensors for the determination of compounds of environmental interest. The proposed study will allow to establish in the BUAP Applied Bioinorganic Laboratory, the methodology for the immobilization of enzymes on electrochemical transducers made from carbonaceous materials, in addition to contributing to the understanding of the chemical and electrochemical processes involved during their anchoring to the surface.

## Justificación

Debido al constante cambio en las tecnologías de producción y desarrollo, los desechos y residuos que se arrojan sin medida en el entorno, así como la emergente oleada de componentes ambientales modificados que afectan la integridad y desarrollo del ser humano, que además se vuelven una preocupación de carácter médico, ambiental y biológico [1]. Esto nos lleva a la urgente creación de plataformas que permitan transformar con precisión la señal producida por la interacción entre el analito y la superficie de ésta a una fácilmente medible. Una de las plataformas mayormente utilizadas como elemento transductor son las de grafito epoxi (GE), estas se utilizan para el desarrollo de sensores electroquímicos, los cuales se encuentran entre los más empleados [2]. Retrospectivamente estos electrodos carecen de reproducibilidad y repetitividad experimental, para eludir esta complicación se ha incorporado a la superficie del material nanotubos de carbono los cuales debido a sus propiedades estructurales únicas permite una mejor transferencia de electrones y una mayor área de contacto, asimismo por su buena biocompatibilidad permite agregar elementos como enzimas que gracias a su alta selectividad de sustrato objetivo facilitan la detección de especies en específico. Un pequeño contratiempo en el desarrollo de estos electrodos está presente en la metodología para desarrollarlos, ya que ésta depende de diversos factores y procedimientos complejos no totalmente reportados. Por estas razones es necesario realizar investigación científica que desemboque en la consolidación de metodologías para generar dichos transductores de la manera más simple. En la presente tesis, se propone el desarrollo y caracterización de plataformas (electrodos) electroquímicas a base de materiales carbonáceos. Los electrodos de grafito epoxi serán funcionalizados con nanotubos de carbono y la enzima microperoxidasa 11. La inmovilización de la enzima se realizará mediante el método físico, prescindiendo con esto de la funcionalización de la superficie de los nanotubos de carbono con moléculas de anclaje. Lo anterior no se encuentra reportado en literatura para esta enzima, y posee múltiples beneficios para ser utilizado como elemento transductor para la determinación de compuestos de interés ambiental.

## **Hipótesis**

La oxidación de nanotubos de carbono adiciona grupos quinoides sobre su superficie, estos grupos funcionan como moléculas de anclaje a la enzima microperoxidasa 11 a través de su interacción con alguno de los residuos aminoacídicos por posibles interacciones pi. De esta forma, se pueden desarrollar templates los cuales serán capaces de anclar a la microperoxidasa-11 presentando un mayor control en el proceso de adsorción y simplicidad de elaboración.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Inmovilizar la enzima microperoxidasa-11 sobre la superficie de nanotubos de carbono multicapa (MWCNT) mediante el método físico, previamente depositados sobre electrodos de grafito epoxi.

### ***Objetivos específicos***

- Identificar las condiciones necesarias para la adsorción de la enzima microperoxidasa-11 sobre electrodos de grafito-epoxi nanotubos de carbono (GE/MWCNT) a valores de pH por arriba y por debajo de su punto isoeléctrico (4.6).
- Desarrollar una metodología simple, de bajo costo y fácilmente reproducible para la adsorción de la enzima microperoxidasa-11 sobre electrodos de grafito-epoxi nanotubos de carbono(GE/MWCNT).
- Estudiar la adsorción de la microperoxidasa-11 sobre electrodos de GE/MWCNT en su estado monomérico y oligomérico (2 y 50  $\mu$ M).
- Caracterizar de una forma electroquímica, física y espectroscópica los electrodos GE/MWCNT-MPX-11 obtenidos.

## Introducción

La diseminación de una gran variedad de compuestos químicos en prácticamente todos los compartimientos ambientales ha provocado la necesidad de detectarlos y cuantificarlos. Sin embargo, la detección de estos compuestos se ve obstaculizada, ya sea por la presencia de especies interferentes o bien porque se encuentran presentes en concentraciones pequeñas.

Entre los métodos disponibles rutinarios para la detección de gran variedad de compuestos químicos se encuentran los métodos cromatográficos y espectroscópicos [2]. Estos presentan una elevada sensibilidad y exactitud. No obstante, son costosos, complejos, no portátiles, el análisis de las muestras consume mucho tiempo y generan problemas medioambientales asociados. Así, uno de los mayores retos de la química ambiental y analítica, es el desarrollo de nuevos dispositivos que permitan la detección y cuantificación de sustancias químicas en el menor tiempo y al menor costo, sin arriesgar la sensibilidad y la eficiencia requerida.

Los sensores representan una alternativa interesante para inspeccionar de forma rápida, eficiente, automatizada, y económica, la presencia de diferentes especies químicas. Son dispositivos miniaturizados capaces de detectar y cuantificar con precisión uno o múltiples compuestos, y se construyen básicamente por un elemento transductor (electrodo) que es el encargado de detectar la señal entre el analito y su superficie, para luego transformarlo a una señal electrónica que resulta fácil de procesar [3]. Los hay de dos tipos dependiendo de la información que son capaces de transformar

- Físicos: los cuales detectan cambios en parámetros como la temperatura, presión, flujo de masa.
- Químicos: detectan cambios en el pH, concentración, composición.

Los sensores químicos son capaces de suplir a la instrumentación analítica sofisticada que es de coste elevado y presenta problemas a la hora de hacer pruebas de campo (in-situ) o análisis continuos (on-line). Estos constan de dos componentes básicamente: un sistema de reconocimiento y un transductor. El

receptor puede ser físico, químico o biológico dependiendo de la naturaleza de las reacciones involucradas en la detección [4].

Los sensores químicos con receptores biológicos son conocidos como biosensores y se clasifican dependiendo del receptor utilizado, pudiendo ser, enzimas, ADN, células o anticuerpos. Por otra parte, según el tipo de transductor utilizado el biosensor puede ser óptico, piezoeléctrico, térmico o electroquímico [5].

El desarrollo de biosensores electroquímicos ha probado ser un área dinámica y con alto potencial de crecimiento en la detección de analitos de interés ambiental debido a que se aprovecha la sensibilidad de las técnicas electroquímicas hacia la detección de diversos analitos electroactivos [6]. Aunado a esto, la inmovilización enzimática permite la conservación de su actividad catalítica, incrementando su estabilidad y la posible reutilización del biosensor.

Dentro de las enzimas redox más comúnmente utilizadas en el desarrollo de biosensores está la Microperoxidasa-11, la cual además de ser estable y económica, a diferencia de otras peroxidases (que también tienen al grupo hemo en su estructura molecular) ha demostrado tener a su grupo hemo mayormente expuesto, lo cual hace que la transferencia de electrones sea más directa que cuando se utilizan otro tipo de enzimas [7].

Así mismo, los transductores con base en nanotubos de carbono presentan mayor sensibilidad, mayores límites de detección y una cinética de transferencia electrónica más rápida en la detección de material biológico de interés ambiental.

Por todo lo previamente indicado, en la presente tesis se detallan metodologías funcionales y efectivas, llevadas a cabo en el laboratorio para el desarrollo del electrodo con dupla GE/MWCNTs, para posteriormente la inmovilización de la enzima, obteniendo el biosensor electroquímico GE/MWCNTs/MP-11. Para lograr esto, se empleó el surfactante CTAB para lograr las suspensiones de los MWCNTs, posteriormente la estabilidad de los electrodos fue analizada a través voltametría cíclica, para posteriormente realizar lecturas para completar el análisis de adsorbancia y composición a través de UV-vis, Raman y AFM.

## Antecedentes

A los canarios se les atribuye el ser los primeros biosensores; ya que estas aves eran utilizadas antiguamente en las minas de carbón para detectar gases tóxicos como se puede observar en la Imagen 1. Los canarios en presencia de monóxido de carbono o metano morían antes que las personas y como solían cantar en la mayoría del tiempo el hecho de que no lo hicieran se convertía en una alarma sonora.



*Imagen 1 Obreros de una mina llevando consigo un canario en una jaula.*

Leland C. Clark Jr. K (posteriormente reconocido como el padre del criterio del biosensor) finaliza sus trabajos con el electrodo de  $O_2$  en 1956, posteriormente en 1962 con la ayuda de Lyon combinan enzimas y sensores electroquímicos creando el primer biosensor. Éste consistía en un electrodo de  $O_2$  con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada.

Más adelante, Guilbault y Montalvo con bases en la inmovilización de la enzima ureasa sobre un electrodo selectivo de amonio pudieron explicar y detallar el primer electrodo enzimático potenciométrico.

Pero fue hasta 1975 cuando se abre el mercado para los biosensores, entrando en venta el primer analizador de glucosa basado en la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en Ohio.

Además, en este mismo año la pregunta: ¿por qué no se utilizan las bacterias como factor biológico en los biosensores para medir la proporción de alcohol en una muestra? Causaría un enorme revuelo en grandes empresas medioambientales, siendo esta la principal causa para el posterior desarrollo de electrodos microbianos, transductores térmicos y termistores enzimáticos.

En 1984, se publicó un artículo sobre el uso de ferroceno y sus derivados como mediador inmovilizado para su uso con oxidorreductasas (glucosa oxidasa para la detección de glucosa).

Posteriormente en 1988 los investigadores polacos Matuszewski y Trojanowicz, son los primeros en laborar en un biosensor enzimático hecho a base de grafito, especialmente pasta de carbono; adicionando glucosa oxidasa al diseño, conformada por polvo de grafito y un aceite de silicona. A partir de entonces, para la preparación de la parte transductora de los biosensores se usan una gran cantidad de aglutinantes, como lo son diversos aceites como: parafina, mineral, fenilmetilsilicona, Nujol y diversas resinas epóxicas.

En 2004 es fabricado un biosensor de glucosa por Abdollah Salimi, en este trabajo se planteaba la idea de inmovilizar la glucosa oxidasa sobre el área de un electrodo de grafito modificado con nanotubos de carbono. Los nanotubos ofrecían una sobresaliente actividad electrocatalítica, de reducción y oxidación de peróxido de hidrógeno liberado por la actividad enzimática entre la glucosa oxidasa y la glucosa, dando sitio a una detección sensitiva de glucosa. A este trabajo se le atribuye un límite de detección de 50  $\mu\text{M}$ , debido a la detección amperométrica de la glucosa.

Este mismo año Xi Luo Liang y Jing Juan elaboran un biosensor enzimático para la medición de glucosa. Usando una técnica de deposición electroforética lograron combinar las nano partículas de oro con hidrogel de quitosano, mostrando una alta

afinidad con la enzima usada y teniendo como característica un rango de detección de 2.7 M para la glucosa en 7 segundos.

Y en 2007 un electrodo mezclando nanotubos de carbono y polvo de grafito en fracciones iguales fue creado por Bayandori y Kazemzad, utilizando también una pequeña parte en peso de resina epóxica, el electrodo resultante mostró una mejora y un excelente comportamiento electroquímico.

# **Capítulo 1. Biosensores**

Un biosensor es un dispositivo capaz de proporcionar información cualitativa o cuantitativa sobre una muestra a partir de reacciones bioquímicas específicas usando como elemento de reconocimiento un material de procedencia biológica, que al estar en contacto con el analito generan un cambio particular que es reconocido por un transductor que convierte la señal en una fácilmente medible (Imagen 2) [8].

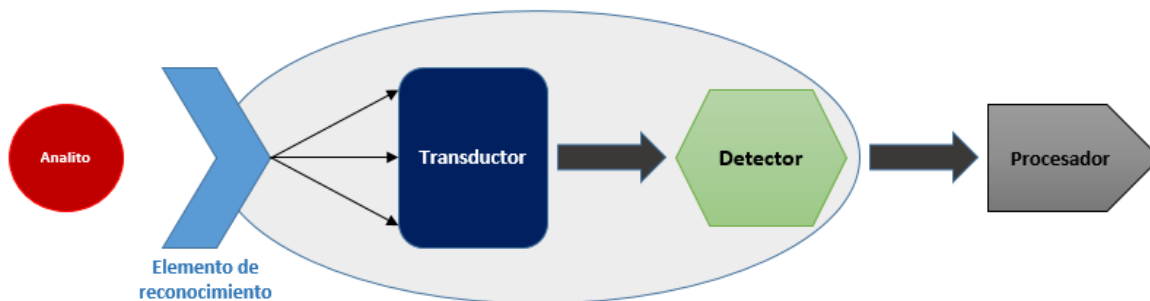


Imagen 2 Representación de un biosensor

Los elementos de reconocimiento, usualmente se dividen dependiendo de la estructura del receptor, clasificándose como en la tabla 1.

Elemento de reconocimiento	
Catalítico	Afinidad
<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Células</li> <li>❖ Enzimas</li> <li>❖ Tejidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Anticuerpos</li> <li>❖ Proteínas</li> <li>❖ Receptores</li> <li>❖ Acidos nucleicos</li> </ul>

Tabla 1 Clasificación del elemento de reconocimiento

Los transductores se pueden clasificar en electroquímico, óptico, térmico, acústico, piezoeléctrico, magnético, calorimétrico y mecánico, siendo los primeros tres los transductores tradicionales mayormente utilizados.

### 1.1 Biosensores electroquímicos enzimáticos

Para el caso de los biosensores enzimáticos (BE), se utiliza como elemento de reconocimiento una enzima, estos son reconocidos por su elevada selectividad, es decir, la capacidad de reconocer un tipo de compuesto en particular en una mezcla donde otros están presentes, lo cual hace que sean utilizados en matrices tan complejas como lo es la sangre, los alimentos e inclusive el agua.

Normalmente, un biosensor enzimático cuantifica la concentración del analito a partir del efecto producido por la reacción catalizada. Como consecuencia de la reacción enzimática pueden ocurrir diversos cambios como en el color, concentración de protones o electrones en la muestra, un desprendimiento, captación de gases, emisión de luz o de calor, o bien la producción de compuestos de productos electroactivos. Todos esos cambios son transformados por medio de un transductor a una señal amplificada, la cual es medible por el usuario final [9].

A la fecha los biosensores enzimáticos basados en transductores electroquímicos son los más populares, esto es por la combinación de técnicas electroquímicas con la selectividad de los procesos de reconocimiento biológico, dando así lugar a dispositivos con ciertas ventajas como el bajo coste y tiempos de respuesta cortos [10].

El funcionamiento de un biosensor enzimático electroquímico es el siguiente, el analito se difunde a través de la solución hasta entrar en contacto con el centro activo de la enzima, donde reacciona generando un producto, con propiedades redox; oxidándose y reduciéndose sobre el electrodo generando un producto que difunde nuevamente a la solución. Existen diferentes métodos para la transferencia de electrones entre la enzima y el transductor amperométrico lo que dio lugar a desarrollar biosensores electroquímicos de primera, segunda y tercera generación.

Los de primera generación se basan en la medida de uno de los productos o del cofactor de la reacción (Imagen 3). Este tipo de biosensores necesitan potenciales de detección elevados, lo que lleva consigo desventajas como el provocar que otros componentes presentes en la solución lleguen a oxidarse o se reduzcan generando interferencias en el análisis [11].

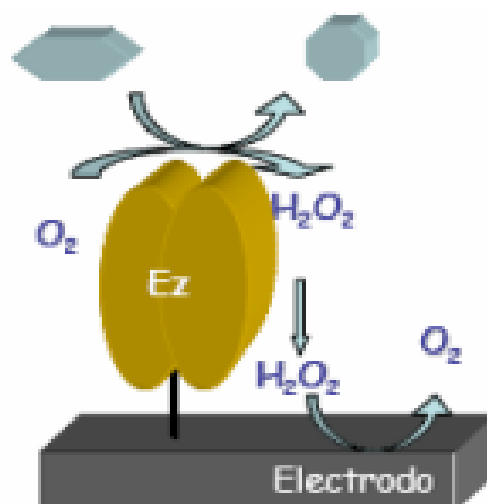


Imagen 3 Biosensor de primera generación

Estas dificultades dieron paso a los biosensores de segunda generación en el cual ya se incorpora un mediador que se encarga de la transferencia electrónica entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo, el mediador puede estar inmovilizado en el electrodo o libre en la solución, el desarrollo de esta metodología minimizo la interferencia debido a que los potenciales redox del mediador son cercanos a cero (Imagen 4). Los mediadores comúnmente utilizados son el ferroceno y sus derivados, tetracianoquinodimetano, quinonas y ferri/ferrocianuro y el azul de metileno, ya que estos tienen un bajo peso molecular, el cual tiene como finalidad acoplarse entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo.

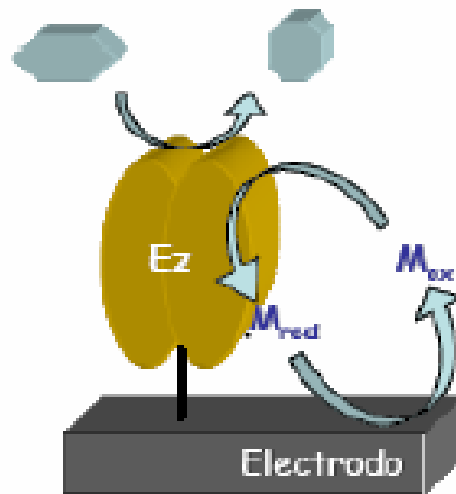


Imagen 4 Biosensor de segunda generación

Por su parte los biosensores de tercera generación realizan la transferencia de electrones del centro activo y la superficie del electrodo de manera directa (Imagen 5). Este tipo de biosensores muestra mayor selectividad debido a que se trabaja a potenciales muy próximos al de la enzima lo que minimiza considerablemente interferentes que se encuentre en el medio, la dificultad de estos biosensores radica en su construcción ya que la mayoría de las enzimas tienen el centro activo en su interior lo que hace imposible el contacto directo entre la superficie del electrodo.

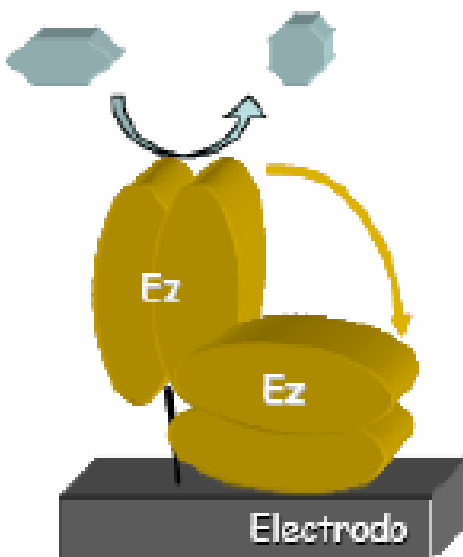


Imagen 5 Biosensor de tercera generación

## **1.2 Tipos de inmovilización enzimática sobre soportes o templetes**

El anclaje o unión de la enzima a un soporte usualmente se produce mediante métodos físicos o covalentes.

En la adsorción física, la fuerza electromotriz de interacción entre la enzima y el soporte pueden ser fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. En este tipo de interacciones los factores que influyen en la adsorción son: el pH del medio, la fuerza iónica y el diámetro de poro. Respecto a las ventajas que exhibe la adsorción de la enzima mediante este método es su preparación sencilla, su bajo coste, y la no afectación de especificidad enzimática. No obstante, dentro de las grandes limitaciones de la metodología se encuentra el hecho que la unión de la enzima al soporte es débil, provocando la filtración de la misma del sustrato, al seno de la disolución [12].

En la adsorción covalente, es imprescindible la activación o funcionalización de la superficie del soporte mediante grupos químicos que reaccionen con los nucleófilos de las proteínas y de esta forma conseguir el anclaje de la enzima a la superficie. Respecto a sus grandes ventajas, se encuentra el incremento de la estabilidad de la proteína a la superficie, mientras que dentro de sus limitantes se encuentra: su alta complejidad, altos costos, y posible pérdida de actividad enzimática [13].

El método óptimo de integración de los componentes del biosensor será aquel que permita una respuesta rápida, sensible, selectiva, reproducible, precisa, exacta, y que le dé estabilidad al dispositivo.

## **1.3 Microperoxidasa-11**

Las microperoxidasas son el hemo férrico que contiene la familia de peroxidasas (enzimas que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno) que se aíslan del citocromo C por digestión enzimática. El citocromo C humano es una proteína hemo que tiene un peso molecular de 12,38 kDa y se encuentra en la membrana

interna de la mitocondria celular como componente de la cadena de transporte de electrones [14].

Las microperoxidasas se denominan en consecuencia dependiendo del número de residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. La microperoxidasa 11 (MP11) es un undecapéptido de 1,8 kDa aislado a partir del citocromo C de mamífero. Contiene los residuos de aminoácidos 11-21 con el resto hemo unido covalentemente a la cadena polipeptídica (Imagen 6). Al igual que las peroxidasas, MP-11 tiene la quinta posición de coordinación del hierro ocupada por la histidina, mientras que el sitio distal está expuesto y disponible para la reactividad del sustrato.

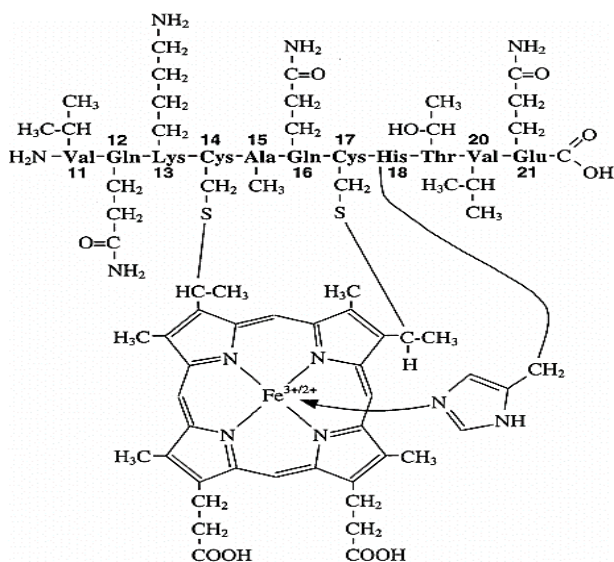
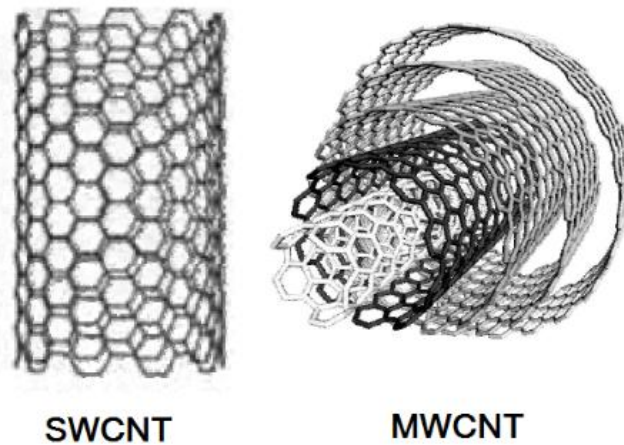


Imagen 6 Estructura molecular de la microperoxidasa 11

En la elaboración de biosensores, la microperoxidasa-11 es usada en la catálisis de la oxigenación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos mediante peróxido de hidrógeno o compuestos relacionados. Por otra parte, debido a que el hierro o mejor conocido como el grupo prostético se encuentra lo suficientemente expuesto, la microperoxidasa-11 presenta la capacidad de transferir electrones directamente entre la enzima y el sustrato utilizado como template para su inmovilización, permitiendo con esto la construcción de biosensores de tercera generación [15].

#### **1.4 Inmovilización de peroxidasas sobre nanotubos de carbono**

Como vemos en la Imagen 7, existen dos clases de nanotubos de carbono, diferenciables por la forma en que tienen dispuestas sus capas: los nanotubos de pared única (CNTs) con un diámetro de orden de 1nm y una longitud bastante mayor a su diámetro, y los nanotubos multicapa (MWCNTs) que consisten de una matriz de dos o más capas cilíndricas concéntricas de grafeno separadas aproximadamente por 0.35 nm con un diámetro de 2 hasta 100 nm y una longitud bastante considerable [16].



*Imagen 7 Tipos de nanotubos de carbono*

Los nanotubos de carbono poseen propiedades únicas, las cuales resultan muy superiores a las que presenta el carbono en forma de grafito; por ejemplo: el grafito es por naturaleza muy quebradizo y no puede ser usado como material estructural, mientras que los nanotubos de carbono poseen un elevado módulo de Young (1.26 TPa) que le confiere la capacidad de soportar presiones desde 50 hasta 200 GPa, clasificándolo como uno de los materiales más resistentes descubiertos hasta el momento [17].

Debido a que el grafito tiene una estructura plana, sus propiedades térmicas, acústicas y electrónicas son altamente anisotrópicas, es decir, que sus propiedades varían dependiendo de la dirección de sus estructuras cristalinas, mientras que los nanotubos de carbono constituidos por una sola capa de átomos, ofrecen

fantásticos niveles de conducción electrónica proveniente de los electrones libres  $\pi$  de cada átomo de carbono. Además, debido a la geometría tubular nanométrica que presentan los nanotubos de carbono, cuando un electrón entra dentro de su estructura, no encuentra resistencia alguna, lo que hace que el valor de resistencia a la conducción eléctrica sea considerablemente pequeño; es este efecto balístico el que canaliza el movimiento del electrón, optimizándolo, hasta el punto de poder ser considerados como conductores “moleculares” [18].

Los dos tipos de nanotubos de carbono CNT y MWCNT se han utilizado para fabricar sensores electroquímicos [19]. Las propiedades electrónicas especiales de los MWCNTs le confieren la capacidad para promover la reacción de transferencia de electrones cuando se utiliza como un electrodo en una reacción electroquímica, esto los hace de especial interés en la comunidad de investigadores electroquímicos, ya que esto proporciona un nuevo enfoque para su aplicación en la modificación de superficies electrónicas para diseñar nuevos sensores electroquímicos y materiales electrocatalíticos nuevos [20].

Aunque son considerados materiales relativamente nuevos, en la actualidad los nanotubos de carbono han sido incorporados en una gran diversidad de transductores electroquímicos incluyendo a aquellos a base de grafito. La incorporación de los MWCNTs se ha realizado principalmente de manera superficial sobre el sustrato, disminuyendo de esta forma la cantidad de material utilizado y con ello los costos de producción. Los transductores a base de nanotubos de carbono obtenidos presentan mayor sensibilidad, mayores límites de detección y una cinética de transferencia electrónica más rápida, con gran desempeño en inmovilización de biomoléculas como las enzimas [21].

Dentro de las enzimas inmovilizadas sobre la superficie de los nanotubos de carbono se encuentran las peroxidasas; respecto a los mecanismos involucrados en el proceso de inmovilización de las peroxidasas se encuentran aquellas gobernadas por interacciones electrostáticas y por la formación de puentes de hidrógeno.

Así, la incorporación de enzimas a nanomateriales como los nanotubos de carbono combina las propiedades catalíticas y de reconocimiento de las enzimas con las propiedades catalíticas del nanomaterial en sí.

## **Capítulo 2. Materiales y métodos**

## **2.1 Equipos y reactivos**

En este apartado se describen todos los equipos y reactivos, técnicas y procesos experimentales utilizados en esta tesis.

Las sustancias y reactivos utilizados en el presente desarrollo experimental fueron de grado analítico, estos fueron empleados sin modificación o intervención alguna a menos que se especifique lo contrario. Los reactivos y soportes de carácter genérico comúnmente empleados en el desarrollo experimental genérico no son detallados en este apartado.

Productos comprados en EPOTEK

- Resina epóxica o parte A, con peso específico de 2.7
- Endurecedor o parte B, con peso específico de 1.22

Productos comprados en Sigma Aldrich

- Grafito sintético de tamaño de grano de 20  $\mu\text{m}$ .
- MWCNTs de tamaño promedio de 25 nm.
- Surfactante CTAB
- Enzima microperoxidasa-11

Las medidas electroquímicas se realizaron con un potenciostato PGZ301 Dynamic EIS Voltammetry de Radiometer analytical. El software usado como interfaz fue VoltaMaster 4 versión 7.0.8. Se usó una configuración de tres electrodos, un electrodo de referencia (SCE), un contra electrodo (Pt), el electrodo de trabajo fue el obtenido en el método de la presente tesis, utilizando una celda electroquímica casera.

Las lecturas de adsorbancia se realizaron con un espectrofotómetro UV/vis Varian Cary 5, utilizando el software Cary winuv.

Se utilizó el modelo POWER PAC 3000 como fuente de potencial para los depósitos, de la marca BIO RAD capaz de proveer voltaje, corriente o potencia constante por minuto o por hora.

Se trabajó con el horno FELISA, para el pos curado de los electrodos, utilizándolo a 100°C constantes. Y el sonicador BRANSON 2500 para los experimentos que requerían una técnica de sonicación.

Para la lectura de AFM se utilizó un microscopio respectivamente.

## 2.2 Electroforesis

La electroforesis tiene como principio separar las partículas o moléculas en relación al movimiento inducido por un campo eléctrico, el campo eléctrico resulta de la aplicación de una fuerza sobre las partículas la cual es proporcional a su carga o potencial de superficie. Por lo tanto, la fuerza resultante induce una velocidad distinta en las diferentes macromoléculas.

El principal enfoque del movimiento electroforético es el potencial eléctrico en la superficie de la macromolécula y la relación de ese potencial con la velocidad del objeto en el campo eléctrico, el potencial de superficie se define por la relación de la superficie de la molécula con el medio que la rodea (Imagen 8).

Las macromoléculas usualmente también son separadas en base a su carga, esto es posible debido a que cuanto más grande sea una molécula mayor será su superficie y por consiguiente el potencial de superficie.

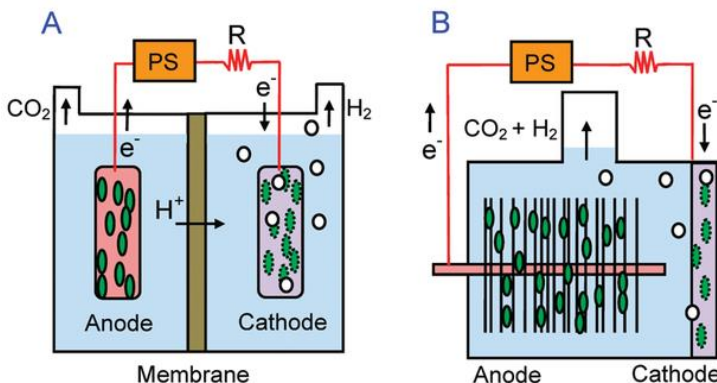


Imagen 8 Esquema de una celda electroforética

Las capas de la macromolécula y la del solvente, son denominadas en conjunto doble capa eléctrica. Usando estos términos, al aplicar el campo eléctrico la porción negativa y positiva de la doble capa se separan. Aunado a esto, uno de los principales problemas en la electroforesis es la generación de calor debido a la resistencia eléctrica del medio.

## Tipos de Electroforesis

### De frente móvil

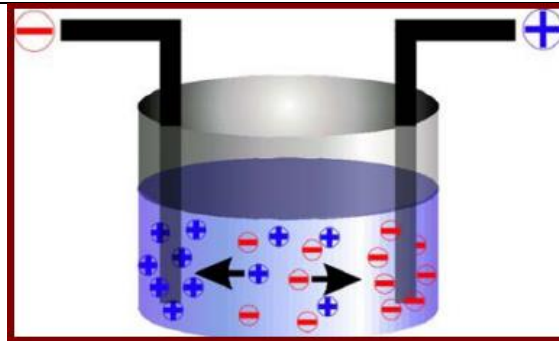


Imagen 9 Electroforesis de frente móvil

- El campo eléctrico se aplica a disoluciones o suspensiones
- Las macromoléculas de la muestra están presentes en toda la disolución
- Las partículas se mueven de forma libre por el medio
- Las sustancias que se desean separar son introducidas a un dispositivo o recipiente, posteriormente son disueltas en un soporte líquido de fuerzas iónicas adecuadas.
- Se colocan los electrodos en ambos extremos del dispositivo, entre los que se crea un campo eléctrico, provocando que las moléculas de la muestra cargadas emigren hacia los electrodos de polaridad opuesta.

### Zonal

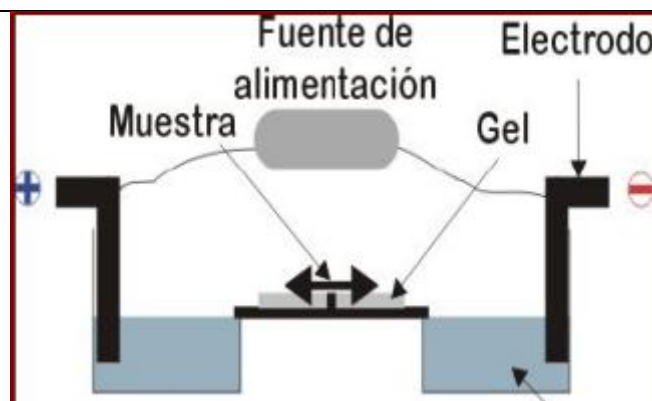
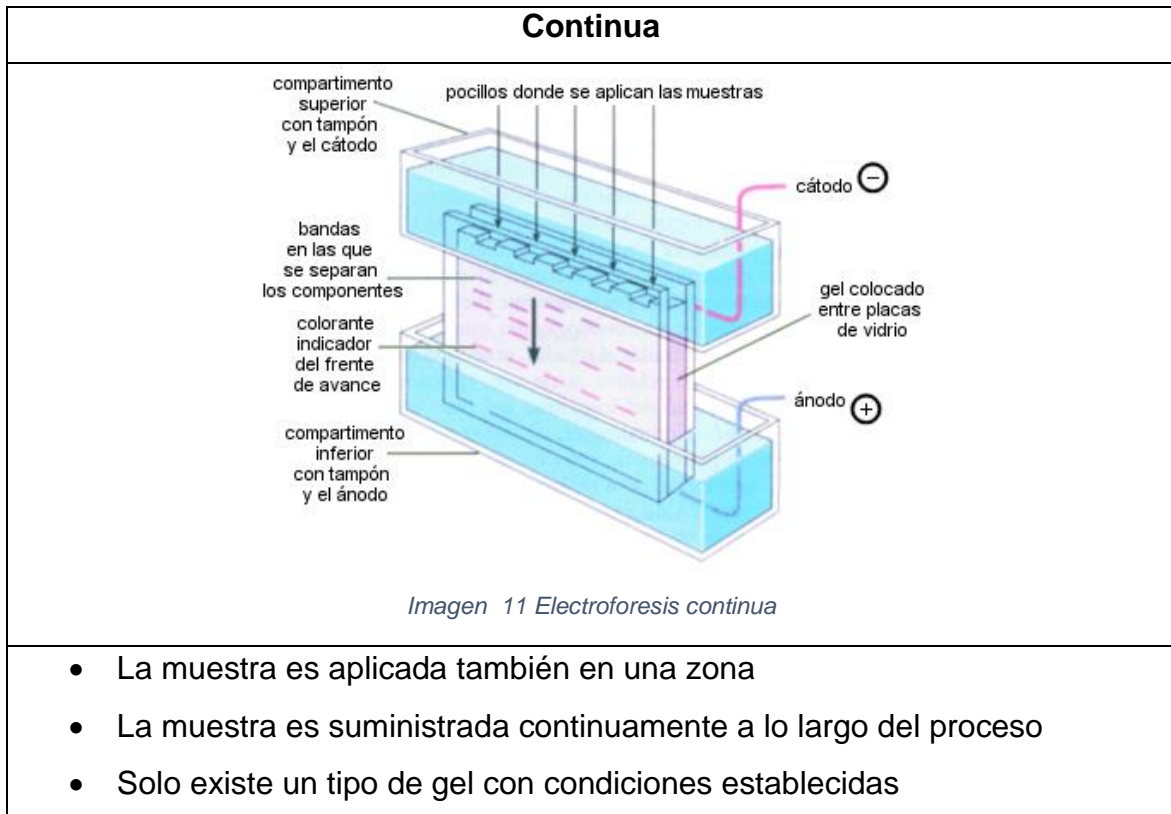


Imagen 10 Electroforesis zonal

- La muestra comúnmente se desplaza sobre un soporte sólido (papel o gel)

- La muestra es aplicada como mancha y sus componentes migrar a través del disolvente
- Tiene como objetivo analizar mezclas, purificación o para detectar cambios de movilidad o conformación



Debido al alcance y simplicidad de la misma se empleó la electroforesis continua para la separación de las suspensiones utilizadas ya que presenta una interacción directa y sin necesidad de un puente de migración de las partículas.

### **2.3 Voltametría cíclica**

Es una técnica con una gran importancia en la electroquímica, la voltametría cíclica se basa en la aplicación de un barrido de potencial, entre un electrodo estacionario inmerso dentro de una solución en reposo y medir la corriente resultante. Teniendo como resultado una señal en forma triangular. Estas velocidades de barrido simétricas triangulares van desde milivolts por segundo hasta cientos de volts por

segundo. Esta voltametría básicamente consta de barrer el potencial del electrodo de trabajo en dirección de ida y vuelta entre un par de valores señalados. En la Imagen 12 podemos visualizar un voltamperograma completo con las formas de las ondas anódicas (oxidación) y catódicas (reducción).

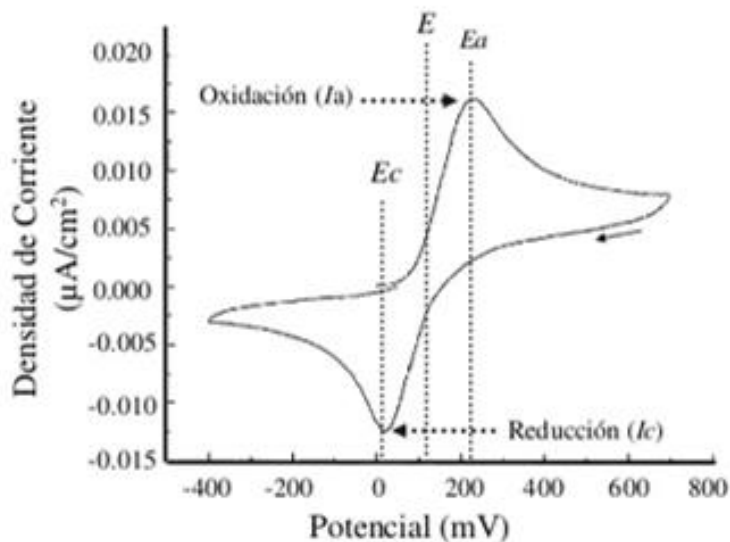


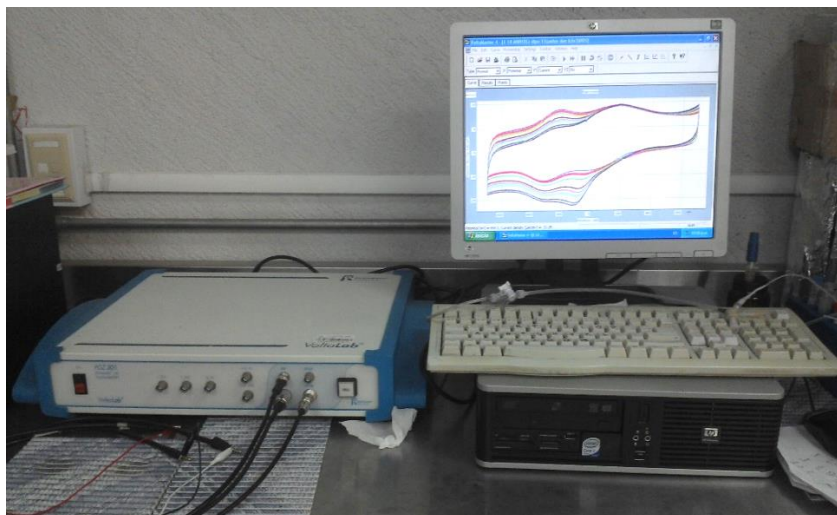
Imagen 12 Vista típica de un voltamperograma

Los parámetros importantes en un voltamperograma cíclico son las magnitudes de la corriente anódica en el pico anódico  $i_{pa}$ , de la corriente catódica en el pico catódico  $i_{pc}$ , el potencial del pico catódico  $E_{pc}$ , el potencial del pico anódico  $E_{pa}$ , y el potencial de semipico  $E_{p/2}$ , que es potencial al cual la corriente es la mitad de la corriente del pico correspondiente.

Una vez que se usa la voltametría cíclica para aprender un sistema por primera ocasión es habitual empezar a realizar experimentos cualitativos con el objetivo de conocer al mismo, procediendo después con los semi-cuantitativos y al final cuantitativos para lograr de esta forma obtener los parámetros cinéticos de interés. En un análisis típico cuantitativo se acostumbra obtener voltamperogramas en un extenso rango de velocidades de barrido e intervalos de potencial.

Comúnmente, en los voltamperogramas hay una cierta cantidad de picos y por medio de la variación de las velocidades de barrido e intervalos de potencial

podemos observar como estos aparecen y desaparecen, notando las diferencias que existen entre el primer y los barridos subsecuentes se determina cómo los procesos representados por los picos están relacionados, al mismo tiempo que de la dependencia de la velocidad de barrido y amplitud del pico explica el papel de la adsorción, difusión y reacciones químicas acopladas dentro del proceso en estudio. En nuestro caso, se uso un potenciostato PGZ 301 VoltaLap (Imagen 13).



*Imagen 13 Potenciostato PGZ 301 VoltaLap*

#### **2.4 Espectrometría ultravioleta-visible**

La espectrometría ultravioleta-visible conocida también por espectrofotometría UV-vis implica la espectroscopia de fotones en la zona de radiación ultravioleta-visible. Esta utiliza una longitud de onda que va de los 380nm a los 780nm, teniendo por lo tanto luz en los rangos visible y ultravioleta (UV) cercano e infrarrojo (IR) cercano. En esta zona del espectro electromagnético, las moléculas son sometidas a transiciones electrónicas (Imagen 14).

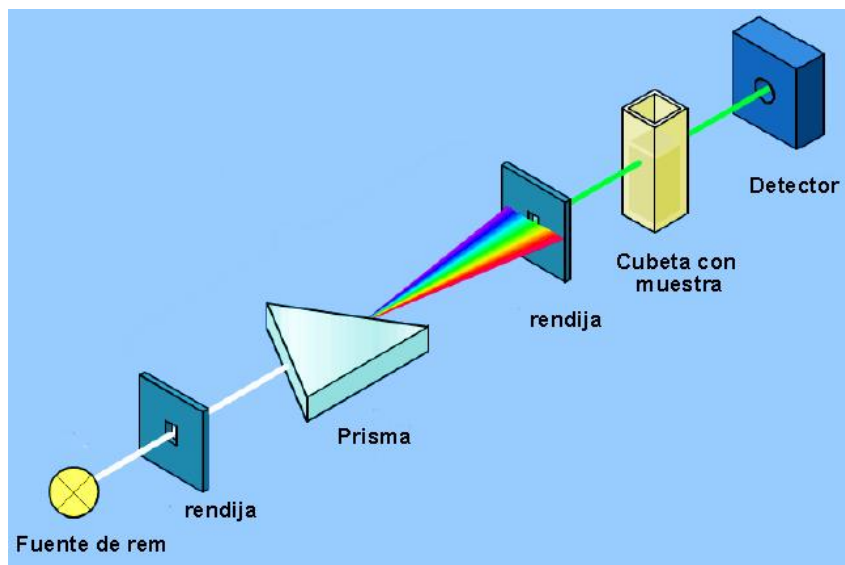


Imagen 14 Esquema de funcionamiento espectrometría

Uno de los principales usos del UV-vis es en forma cuantitativa, esto para escoger las concentraciones de especies (absorbentes) en solución, y de la cual se ayuda de la ley de Lambert-Beer:

$$A = -\log_{10}(I/I_0) = \varepsilon \cdot c \cdot L$$

Donde:

- A es la absorbancia medida.
- $I_0$  es la intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda.
- I es la intensidad de transmisión.
- L la longitud de ruta a través de la muestra.
- c la concentración de las especies absorbentes.

Para cada especie y longitud de onda,  $\varepsilon$  es una constante conocida como absorptividad molar o coeficiente de extinción. Esta constante es una propiedad fundamental molecular en un solvente dado, a una temperatura y presión particular

### **2.5 Espectrofotómetro ultravioleta-visible**

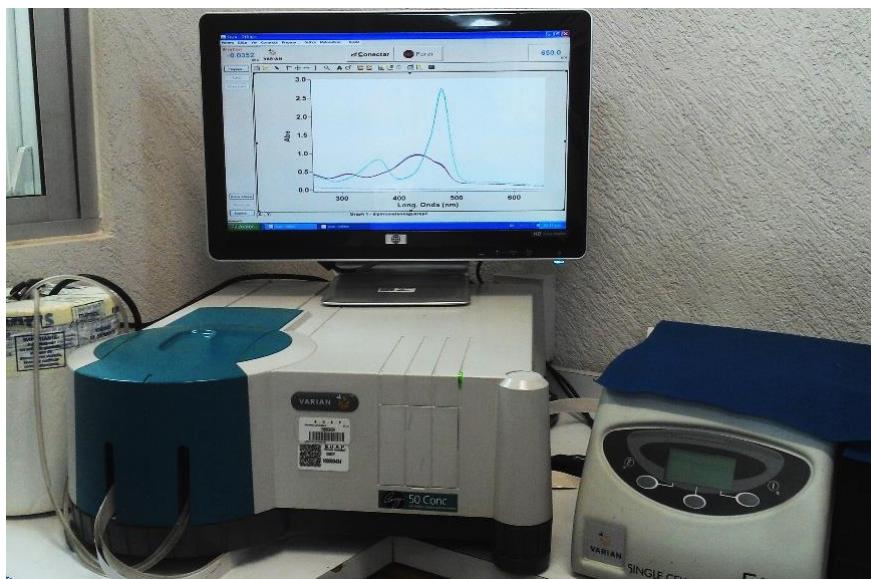
El espectrofotómetro UV-vis es el instrumento utilizado en la espectrometría ultravioleta-visible. Este instrumento es el encargado de medir la intensidad de la

luz que pasa por una muestra ( $I$ ), para posteriormente compararla con la intensidad de luz previa de pasar a través de la muestra ( $I_0$ ).

Se denomina transmitancia a la relación de  $I/I_0$ , y es expresada comúnmente como (%T), y es sumamente importante para fundamentar la absorbancia ( $A$ ), la cual se define como:

$$A = -\log(\%T)$$

Las muestras que se utilizaron en esta tesis, fueron líquidas. Posteriormente fueron colocadas en una celda transparente denominada “cubeta”. Las cubetas usualmente son rectángulos elaborados de cuarzo de una alta calidad, con una anchura interior de 1 centímetro. Esta anchura se utiliza como la longitud de ruta, ( $L$ ), usada en la Ley de Lambert-Beer. Por tal motivo el conocer concentraciones de varias especies es posible, en el caso de la presente tesis se corroborará la concentración del péptido microperoxidasa-11 y la concentración de alguna otra sustancia necesaria. (Imagen 15)



*Imagen 15 Espectrofotómetro Variant Cary*

## **2.6 Espectroscopia Raman**

La espectroscopia Raman forma parte de la categoría de espectroscopia vibratoria. Esto quiere decir que examina una muestra químicamente, por medio de la utilización de la luz para producir movimiento molecular y posteriormente la interpretación de esta relación. En términos generales la espectroscopia Raman se basa en la dispersión inelástica de la luz que se genera una vez que la materia es irradiada por una fuente de luz monocromática. Luego de que esta luz interactúa con la muestra una sección bastante pequeña de ella cambió su longitud de onda (llamado efecto Raman).

El espectro Raman contiene lo que se conoce como “bandas o señales”, las cuales son únicas para cada grupo funcional o sustancias en específico. Es tan exacto que se utiliza para proporcionar información como polimorfismo, contaminaciones y defectos, composición química, cristalinidad e inclusive para cambios en la presión y en la temperatura.

Por las razones mencionadas es posible detectar la presencia y conformación de los nanotubos de carbono y otros compuestos sobre la superficie de los electrodos de grafito-epoxi.

## **2.7 Microscopio de fuerza atómica (AFM)**

El microscopio de fuerza atómica trabaja en la interacción local entre la punta que se ubica en su vértice y la superficie de la muestra, proyectando imágenes tridimensionales de la superficie a analizar teniendo como ventaja una alta resolución espacial en tiempo real.

Todos los AFM's tienen 5 elementos fundamentales (Imagen 16):

- Punta: comúnmente elaboradas de silicio o nitruro de silicio son seleccionadas dependiendo del tipo de muestra y de las propiedades que se requieran obtener.
- Escáner: Teniendo un diseño en forma de tubo y elaborados principalmente con un material cerámico piezoeléctrico, los escáneres son reconocidos por contar con 3 grados de libertad, lo cual ayudará en la expansión de una

dirección y contracción en otra como resultado del voltaje que es aplicado a sus electrodos.

- El detector.
- El sistema de control electrónico.
- El sistema de aislamiento de vibración.

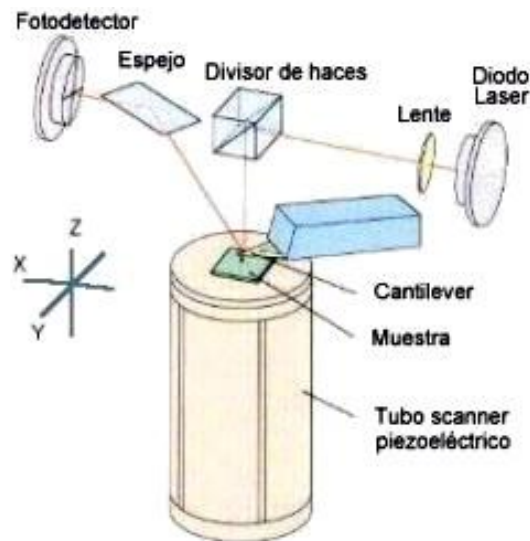


Imagen 16 Esquema de funcionamiento del microscopio AFM

El Microscopio de fuerza atómica monitorea el área de la muestra a través de una punta de afilada la cual se ubica al final de un cantiléver o vértice. Conforme la punta recorre la superficie, estas ocasionan la deflexión del cantiléver al cual se le hace incidir un láser, al mismo tiempo un fotodetector mide estas deflexiones las cuales son traducidas posteriormente por un software (Imagen 17).

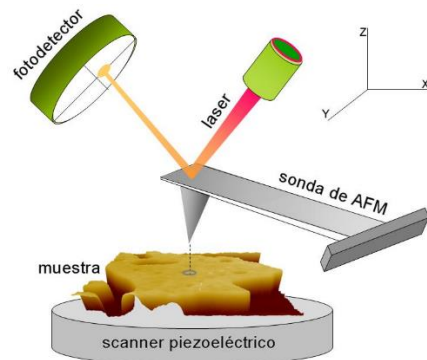


Imagen 17 Interacción entre la punta del cantiléver y la muestra

Dependiendo de las características de operación de acuerdo a propiedades físicas de la muestra y por medir, se utilizan distintos modos de operación por el AFM, entre ellos se encuentran:

- ❖ Contacto: Mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre su superficie.
- ❖ Tapping: También conocido como contacto intermitente, este mide la topografía de la muestra tocando intermitentemente su superficie.
- ❖ Imagen de Fase: Proporciona una imagen contrastada generada a través de las diferencias de adhesión en la superficie de la muestra.

Por mencionar algunos, esta técnica de análisis nos permitirá evaluar las propiedades superficiales de los electrodos y su composición después de aplicadas las modificaciones que en esta tesis se plantean.

## **Capítulo 3. Electrodo GE-MWCNTs**

### 3.1 Elaboración del electrodo grafito-epoxi (GE)

La elaboración de los electrodos de grafito-epoxi consiste en lo siguiente [22]: Primeramente, para volatilizar impurezas se precuró el polvo de grafito por 24 horas.

Se preparó un número deseado de filamentos de cobre de sección transversal de 1mm, del mismo modo se prepara el mismo número de tubos capilares micro hematocrito con sección transversal interna de 1.1-1.2 mm y externa de 1.5-1.6 mm, posteriormente se pesó y se mezcló 0.62 gr de la resina epóxica con 56  $\mu$ L del endurecedor y 0.4 gr del polvo de grafito del tamaño deseado hasta que se obtiene la consistencia deseada; la mezcla obtenida se retaca dentro de los tubos capilares a los cuales previamente se les introduce un filamento de cobre por un extremo contrario a donde se incorporara la mezcla grafito-epoxi (GE), posteriormente se comprimió la mezcla y el filamento dentro del tubo capilar para generar un óptimo acoplamiento entre ambas superficies, seguidamente se depositaron los electrodos preparados dentro del horno por un lapso de 2.5 horas (este proceso nos ayudó a acelerar la solidificación de la mezcla).

Los estudios y análisis de las diferentes variables entre las relaciones grafito-resina-endurecedor fueron previamente realizadas por el laboratorio de Bioinorgánica aplicada de la BUAP.

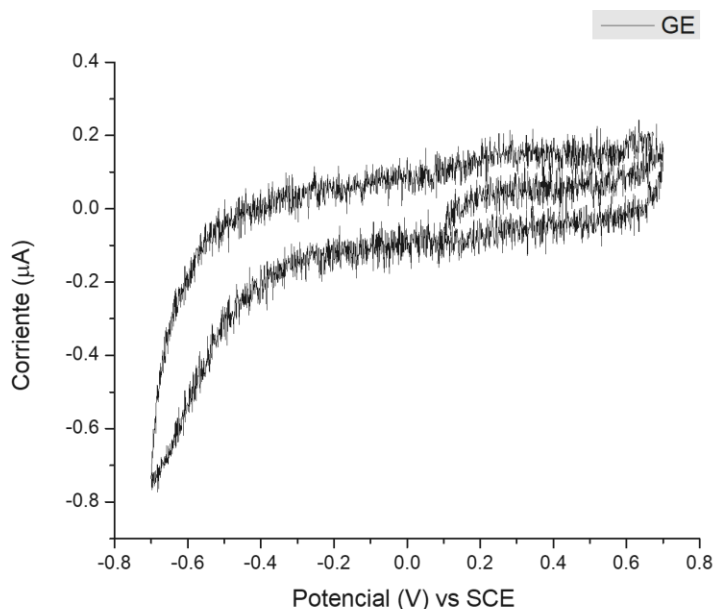


Imagen 18 Proceso de elaboración del GE.

Por último, una vez obtenidos los electrodos con la dupla de grafito-epoxi estos son pulidos mecánicamente con lijas de agua de grados 300, 1200 y 3000 sucesivamente, esto con el fin de:

- Eliminar material excedente.
- Eliminar perturbaciones en la superficie sensitiva del electrodo.

Lo cual nos permitirá una mejor respuesta electroquímica y posteriormente facilitará el agregado de otros compuestos. Obteniendo en la siguiente imagen, en la cual se logra ver un voltamperograma del electrodo GE-MWCNTs sirviendo como blanco para comparar futuras elaboraciones de la dupla, ya que no se observa ningún interferente.



*Gráfica 1 Voltamperograma de electrodo de grafito-epoxi en buffer de amplio espectro pH4 a una velocidad de 0.1 mV.*

### **3.2 Elaboración de una suspensión de nanotubos de carbono**

Un requerimiento para lograr un depósito de los nanotubos de carbono sobre la superficie de los electrodos de GE mediante la técnica de electroforesis es la dispersión homogénea de este material, el cual tiene que ser en algún tipo de disolvente neutro (comúnmente agua).

Los MWCNTs tienden a formar grumos o conglomerados, como resultado de las grandes fuerzas electrostáticas y de Vander Walls que actúan sobre ellos [23] debido a esta desventaja es necesario dispersarlos. Existen dos mecanismos eficientes para dispersar nanotubos:

- Métodos mecánicos como ultrasonificación y centrifugación, los cuales pueden separar nanotubos, pero conllevan procesos de fragmentación, porque la eficacia o porcentaje de dispersión de los nanotubos disminuye.
- Proceso de funcionalización, el cual consiste en ligar de manera física o química ciertas moléculas o grupos funcionales en la superficie de los nanotubos alterando su energía superficial y de este modo mejorar su compatibilidad con el disolvente reduciendo así su tendencia a formar conglomerados [24]. Algunos ejemplos de estos procesos es la adición de grupos carboxílicos y la modificación superficial mediante la adsorción de moléculas surfactantes, las cuales a partir de efectos estéricos previenen la agregación de los nanotubos de carbono [25].

Para este proceso, se elaboró una suspensión de nanotubos de carbono utilizando una combinación del método de funcionalización por oxidación y el uso de un surfactante. Siguiendo

El proceso de funcionalización con grupos ácidos COOH- y posterior interacción con el surfactante consiste en:

1. Poner en contacto directo 2 gr de nanotubos de carbono en una solución de ácido sulfúrico y ácido nítrico, en una relación 3:1, durante 48 horas.
2. Después de esto la solución se filtró hasta obtener un pH neutro.
3. Posteriormente el producto obtenido se dejó secar durante 4 horas a temperatura ambiente en un espacio confinado (evitando contaminación por agentes externos)
4. Envasado y rotulación.
5. Posteriormente se agregaron 0.01 gr de nanotubos de carbono secos y funcionalizados en 100 ml de agua bidestilada.

6. Y como último paso se agregó 0.04 gr de surfactante CTAB como medio dispersor sonicando la mezcla [26].

Como se representa en la Imagen 19, a simple vista se puede observar que la disolución obtenida presenta turbidez total, obteniendo así una dispersión homogénea de nanotubos de carbono. Después de obtener esta suspensión se almacena en refrigeración hasta el momento de su utilización.



*Imagen 19 Suspensión homogénea de nanotubos de carbono*

### **3.3 Electroforesis al electrodo GE usando la suspensión de MWCNTs**

Se utilizó la técnica de electroforesis usando la suspensión de nanotubos de carbono como el medio acuoso en el cual se llevó a cabo el depósito electroforético de los nanotubos de carbono sobre la superficie de los electrodos GE, dando como resultado ser estable respecto al tiempo y una suspensión que permanece inalterada por los valores altos de potencial o corriente, favoreciendo así el proceso de depósito de los nanotubos.

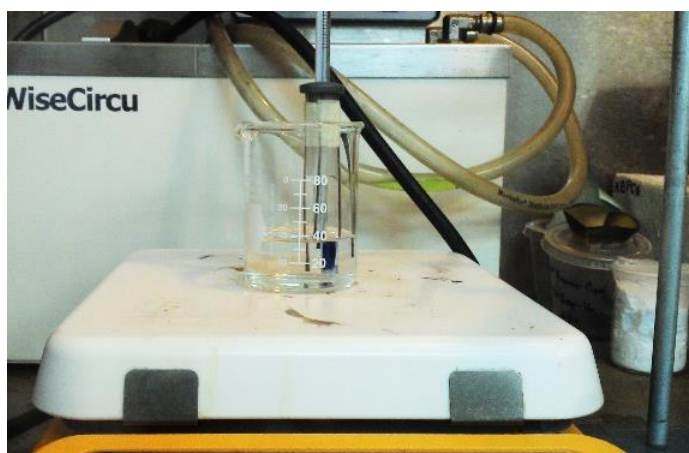
Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: como cátodo se usó el electrodo de trabajo GE y como ánodo una placa de acero inoxidable 300 (Imagen 20). La distancia entre electrodos fue de 2cm y un valor de potencial de 7V a 7 minutos de deposición [27].



*Imagen 20 Deposición electroforética de nanotubos de carbono sobre electrodos de grafito-epoxi*

Una vez transcurrido el tiempo de depósito, el electrodo íntegramente depositado es sometido a dos pretratamientos (Figura 21):

1. El electrodo se sumerge en una disolución de  $\text{NaHCO}_3$  a 0.01 M durante 30 minutos en agitación constante para remover el exceso del surfactante CTAB utilizado durante el proceso de depósito de nanotubos por el método electroforético (curva b) [28]
2. El electrodo se sumerge en una disolución EtOH/HCl (10/1 v/v) durante 90 minutos a  $60^\circ\text{C}$  (curva c), con el fin de extraer el CTAB remanente en la superficie de los nanotubos de carbono [29, 30].



*Imagen 21 Enjuagues de EtOH/HCl a  $60^\circ\text{C}$  y  $\text{NaHCO}_3$  a temperatura ambiente*

Para verificar la eficacia de la suspensión en la agregación de nanotubos de carbono, el electrodo fue evaluado mediante la técnica de voltametría cíclica con el

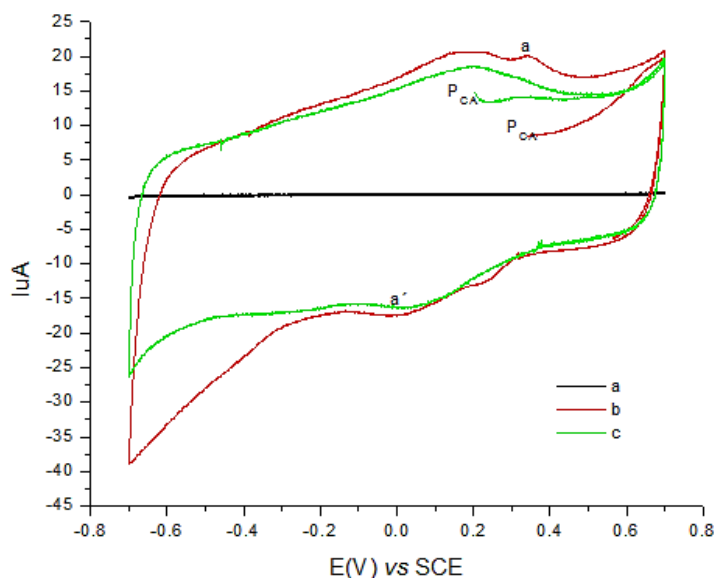
fin de comprobar de manera indirecta que el depósito de los nanotubos de carbono se ha llevado a cabo.

Los parámetros utilizados en todas las pruebas electroquímicas son las siguientes: una ventana de potencial de -0.7 V a 0.7 V, una velocidad de barrido de 0.1 V/s y como potencial inicial se utilizó el potencial de reposo o de circuito abierto del sistema [31].

En la Gráfica 2 podemos observar el comportamiento electroquímico del electrodo GE/MWCNTs en 0.1 M de buffer de amplio espectro a pH4 y 100 mV/s, después de que es sometido a los pretratamientos. Para efecto de comparación se muestra:

- **Curva a:** el perfil del GE en el medio.
- **Curva b:** nanotubos presentes sobre la superficie de GE con el primer pretratamiento ( $\text{NaHCO}_3$ ).
- **Curva c:** nanotubos presentes sobre la superficie de GE después del segundo pretratamiento (EtOH/HCl).

En las curvas b y c se muestra un incremento significativo en la corriente obtenida, y se observa la formación de los picos a y a'. La presencia de estos picos y su reversibilidad química sobre los nanotubos de carbono, ha sido reportada previamente y se atribuye a la existencia de grupos oxigenados sobre la superficie de los nanotubos de carbono [32].



Gráfica 2 VC de los electrodos a) GE, b) GE/MWCNTs-T1 (tratado con  $\text{NaHCO}_3$ ) y c) GE/MWCNTs-T2 (tratado con HCl-etOH), en buffer de amplio espectro a pH4.  $v = 100 \text{ mV/s}$ .

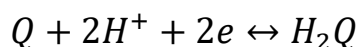
Por su parte, la respuesta redox de la quinona-hidroquinona ha sido reportada anteriormente en esta región de potencial bajo la reacción 1 [33]. Estos grupos son usualmente formados bajo procesos de oxidación prolongada [34].

Quinona (Q):  $C_6H_4O_2$

Hidroquinona:  $H_2C_6H_4O_2$



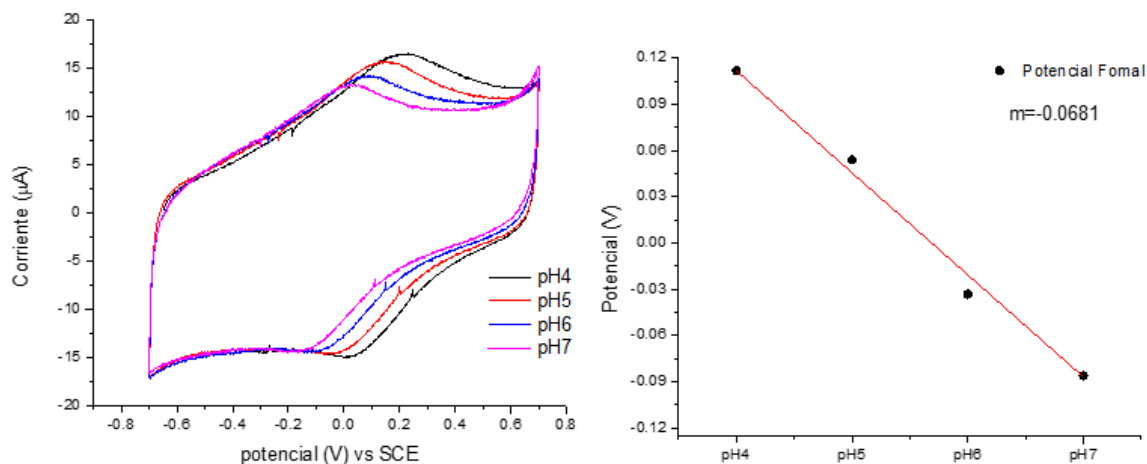
**Reacción 1:**



No obstante, los grupos carboxílicos y la quinona-hidroquinona se oxidan y se reducen a potenciales muy cercanos [35], por lo que hasta este punto se considera que la superficie de los GE/MWCNTs independientemente del tratamiento utilizado puede contener estas dos especies.

Así mismo, se evaluó la respuesta redox de los picos a y a' para el electrodo GE/MWCNTs-T2 a varios valores de pH y se graficó el potencial formal:

$(E^{0'} = E_{pa} - E_{po}/2)$  vs pH (Gráfica 3)



Gráfica 3 a) VC de electrodos GE/MWCNTs-T2 en buffer de amplio espectro a diferentes valores de pH, b) gráfico de  $E^{0'}$  vs pH

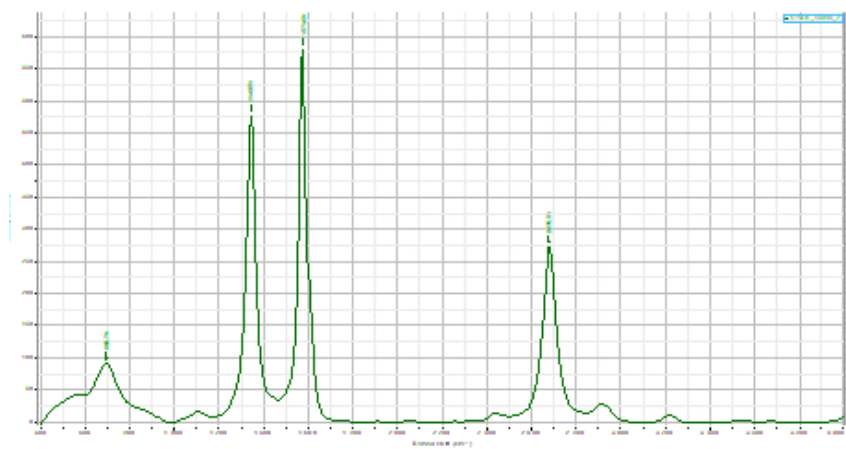
El valor de la pendiente (m) del gráfico de  $E^{0'}$  vs pH es de -68 mV/pH. Lo que indica en el caso de la presencia de quinonas que dos protones y dos electrones están

involucrados en el proceso de reducción. No obstante, también concuerda con la transferencia de cuatro electrones y cuatro protones para los grupos ácidos carboxílicos [36].

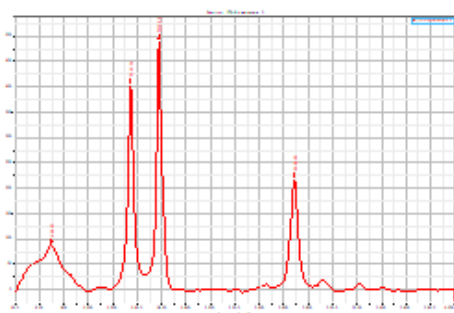
Por otra parte, se utilizó la técnica de espectroscopia Raman para caracterizar el efecto de los tratamientos  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{HCl-etOH}$  sobre los nanotubos de carbono. La figura representa los espectros Raman del polvo de nanotubos de carbono los cuales fueron sometidos a tratamiento ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ ) y disueltos en una solución conteniendo CTAB (filtrados directamente de la solución de depósito electroforética) (a) y de su posterior tratamiento con  $\text{NaHCO}_3$  (b) y  $\text{HCl-etOH}$  durante una hora y media (c) en la región de los 400 a los 4000 nm con un láser de longitud de onda de 532 nm.

En todos los espectros se puede distinguir claramente las señales características de los nanotubos de carbono en los 1343, 1574, 2446 y 2676  $\text{cm}^{-1}$ , adjudicadas a las bandas D, G, D y 2D de las diferentes estructuras de los átomos de carbono [37]. El grado de desorden de los nanotubos fue cuantificada mediante la relación de la intensidad relativa de las bandas D y G. El valor de la relación  $I_D/I_G$  para cada espectro evaluado en la figura fue de 0.826, 0.816 y 0.811 respectivamente, lo que significa que el tratamiento con bicarbonato no adiciona defectos sobre las paredes de los nanotubos de carbono ni incrementa el grado de funcionalización de los mismos [37,38].

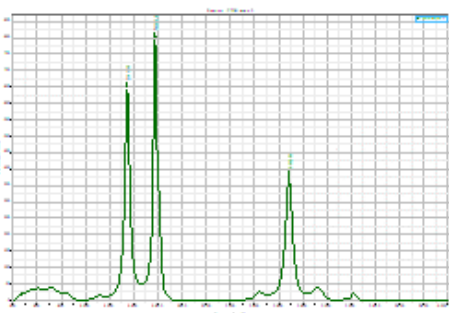
No obstante, el tratamiento con  $\text{HCl-etOH}$ , provoca una ligera disminución de este valor indicando la obtención de nanotubos con mayor calidad estructural. Por otra parte, en los sistemas MWCNT y MWCNT-  $\text{NaHCO}_3$ , se observa una banda a los 692  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la presencia del CTAB en la superficie de los nanotubos de carbono [39]; que desaparece cuando la superficie de los nanotubos es tratada con  $\text{HCl-etOH}$ , indicando que este tratamiento resulta eficiente en la remoción del surfactante y además ocasiona un incremento en la calidad estructural del material carbonáceo.



a



b



c

Gráfica 4 Espectros Raman de a) MWCNTs-CTAB b) MWCNTs-CTAB tratamiento  $\text{NaHCO}_3$  y c) MWCNTs-CTAB tratamiento  $\text{HCl-etOH}$ .

Así también se calculó los valores del área electroactiva o área real ( $A_e$ ), para cada electrodo de la gráfica 1 (Tabla 2).

Electrodo	$A_g / \text{cm}^2$	$A_e / \text{cm}^2$
GE	0.0078 $\text{cm}^2$	0.0094 $\text{cm}^2$
GE/MWCNTs-T1 (tratado con $\text{NaHCO}_3$ )	0.0078 $\text{cm}^2$	0.1015 $\text{cm}^2$
GE/MWCNTs-T2 (Tratado con $\text{HCl} - \text{etOH}$ )	0.0078 $\text{cm}^2$	0.1231 $\text{cm}^2$

Tabla 2 Valores de área geométrica y electroactiva.

Los valores de  $A_e$  considera la rugosidad de los electrodos y fue calculada para cada electrodo presentado en la gráfica 1 mediante experimentos independientes, a través de la respuesta electroquímica de la molécula sonda  $K_3Fe(CN)_6$  sobre cada electrodo en 0.1 M KCl a diferentes velocidades de barrido (20, 30, 40... 130 mV/s). De los VCs obtenidos, se comprobó la cuasi-reversibilidad de los sistemas electroquímicos evaluados mediante la medición de la separación entre los potenciales de pico anódico ( $E_{pa}$ ) y catódico ( $E_{pc}$ ),  $E_p$ , el cual fue mayor de  $59 > n$  mV  $> 153$ . De esta manera, el cálculo del área electroactiva fue realizado utilizando la fórmula corregida de Randles-Sevcik para este tipo de procesos (cuasirreversibles) [40,41]:

$$I_{pa} = (2.99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

Donde:

- $I_{pa}$  se refiere a la corriente de pico anódica
- $n$  es el número de electrones transferidos para el par redox  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$
- $\alpha$  coeficiente de transferencia electrónica
- $A$  es el área electroactiva del electrodo
- $D$  es el coeficiente de difusión
- $v$  la velocidad de barrido
- $C$  es la concentración de la molécula sonda

Para 1.0 mM  $K_3Fe(CN)_6$  en 0.1 M KCl,  $T=298$  K,  $R=8.314$  J/K.mol,  $F=96,480$  C/mol,  $n=1$ ,  $D=7.6 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s.

Así, de la pendiente del gráfico  $I_{pa}$  vs  $v^{1/2}$  se calculó el área electroactiva.

Como se observa en la Tabla 2, el área real del electrodo de GE es mayor a su área geométrica, congruente con la rugosidad inherente del composito grafito-resina epóxica. Cuando los nanotubos de carbono están presentes en la superficie del GE, el área electroactiva incrementa considerablemente ( $\cong 10$  veces) respecto a la obtenida para el electrodo GE, sugiriendo las propiedades de un supercapacitor [42]. Lo anterior, como resultado de la gran área superficial por unidad de volumen

que presentan las nanoestructuras de MWCNT. No obstante, cuando el electrodo GE/MWCNTs es tratado con la combinación HCl-etOH, se obtiene un perfil estable y se incrementa sustancialmente su reproducibilidad, comparado con el electrodo tratado con  $\text{HCO}_3^-$ , por lo que se eligió dicho electrodo para estudiar el proceso de adsorción de la enzima.

## **Capítulo 4. Electrodo GE- MWCNTs – MP11**

#### **4.1 Preparación de la solución microperoxidasa-11**

Para este fin se disolvió por agitación lenta en buffer de amplio espectro a pH 4 y pH 7, los valores de pH se eligieron considerando el punto isoeléctrico de la enzima (4.80); de esta manera, a pH 4 la enzima se encuentra cargada positivamente, mientras que a pH 7 se encuentra cargada negativamente, asimismo la enzima microperoxidasa-11 se preparó a dos valores de concentración. Las concentraciones de enzima fueron 2  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , valores a los cuales se encuentra en estado mono/dimérico y oligomérico, respectivamente.

Para corroborar dichas concentraciones se empleó la técnica de espectrofotometría líquida UV-VIS la cual consistió en colocar dentro del espectrofotómetro una celda contenida de buffer de amplio espectro en forma pura para poder determinar el blanco de la prueba, seguido se procede a extraer de la solución la cantidad necesaria de enzima microperoxidasa-11 en relación 1/10 en celda respectivamente y adicinarla en la misma para obtener la lectura.

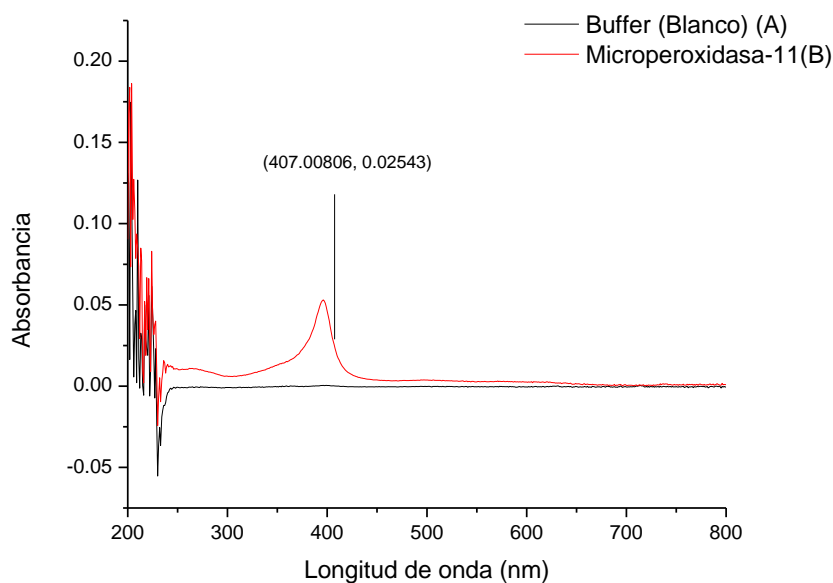
Se sabe que el coeficiente de extinción de la microperoxidasa-11 es  $\epsilon_{407} = 116$  para lo cual después de utilizar el método de escaneo [43]. En el software Cary winuv Scan se obtuvo la siguiente banda y se rastreó la absorbancia dada en este punto y se procedió a calcular mediante la fórmula de Lambert-Beer la concentración obtenida en solución. Por ejemplo: para el caso de la concentración de 2  $\mu\text{M}$ , primeramente, una porción del péptido MP11 fue disuelta en buffer de amplio espectro a pH 4 y se obtuvo la Gráfica 5 y su correspondiente cálculo:

La absorbancia obtenida en la longitud de onda de 407 nm fue de 0.02543 este valor se multiplica por 10 debido a la relación 1/10 que se depositó en celda y se obtiene la concentración con la siguiente ecuación.

$$M = \frac{Abs}{(vol. celda)(cof. ext)}$$

$$M = \frac{0.2543}{(1cm)(116 mM^{-1}/cm^{-1})} = 2.192 * 10^{-3} \mu M$$

Con lo cual se obtiene la concentración de 2.2  $\mu\text{M}$  con la que se trabajó en el presente desarrollo, para las demás soluciones se empleó el mismo método para cuantificarlas, todas las soluciones se obtuvieron de una solución stock de 200  $\mu\text{M}$  de pH4 y pH7 respectivamente.



Gráfica 5 Scan de buffer pH 4 en celda de cuarzo en ausencia de la enzima MP-11 banda(A) y en presencia de esta banda (B)

#### **4.2 Adsorción de microperoxidasa-11 sobre electrodos grafito-epoxi nanotubos de carbono (GE/MWCNTs)**

La adsorción del péptido microperoxidasa 11 (MP11) sobre la superficie de los electrodos GE/MWCNTs-2 se realizó mediante el método físico, se sumergió el electrodo en dicha disolución durante 18 horas bajo agitación constante a 4 °C [44]. Finalmente, el electrodo resultante (GE/MWCNTs-MP-11) fue enjuagado exhaustivamente con buffer de amplio espectro y guardado a 4°C mientras no estuviera en uso [45].

#### **4.3 Cargas y concentraciones de la MP-11 sobre GE-MWCNTs**

Uno de los principales problemas con la mayoría de las microperoxidases es su tendencia a agregarse en solución acuosa [46]. De forma general se acepta que la

agregación de las MPs es causada por la unión del grupo  $NH_2$  de los residuos de la valina y lisina del péptido al hierro del grupo hemo. En literatura no se encuentra reportada con exactitud la concentración a la cual la MP tiende a agregarse. Algunos reportes establecen que ésta tiende a agregarse a concentraciones mayores de 10  $\mu M$ , en donde el grupo amino de la valina 11 de una molécula de MPX-11 se coordina con el hierro de otra molécula, permitiendo su dimerización o polimerización. Otros artículos sugieren que su agregación vía péptido-hemo comienza a 1  $\mu M$ .

Por otra parte, la MP-11 presenta un punto isoeléctrico de 4.80, por lo que a valores de pH mayores que este valor, la enzima se encuentra en solución cargada negativamente y a valores menores su carga será positiva. La imagen siguiente recopila la distribución de especies de la MP-11 como una función del pH:

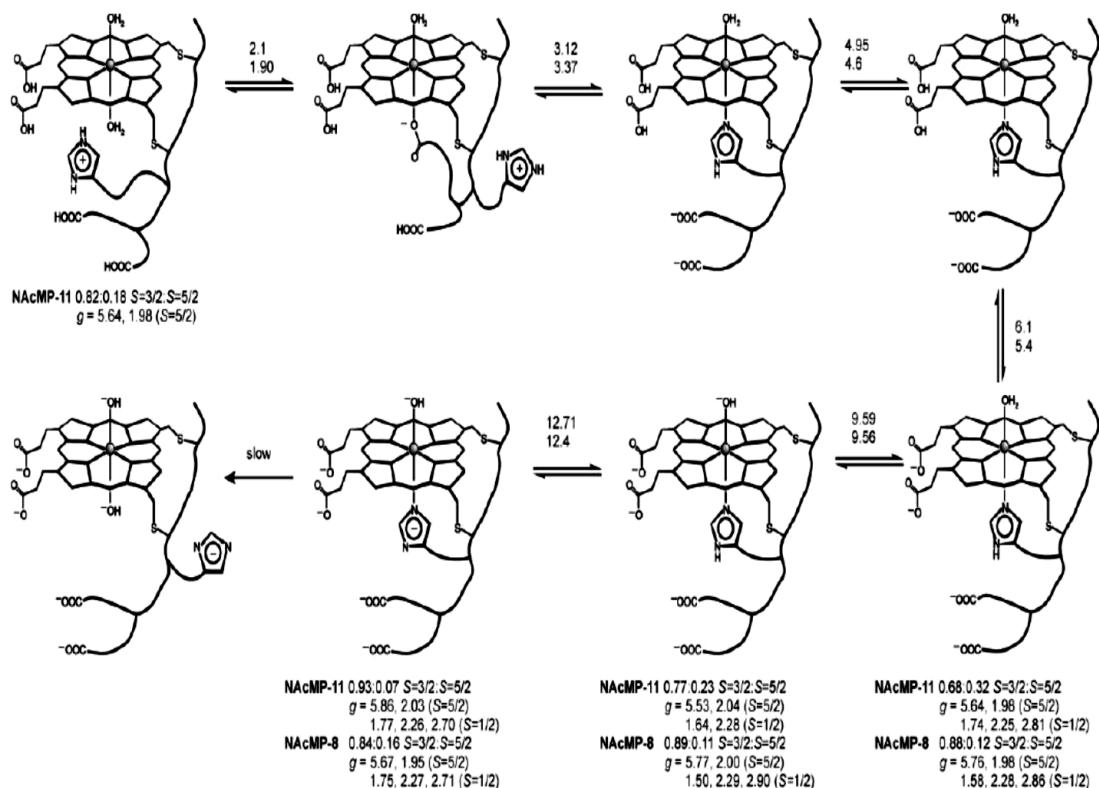
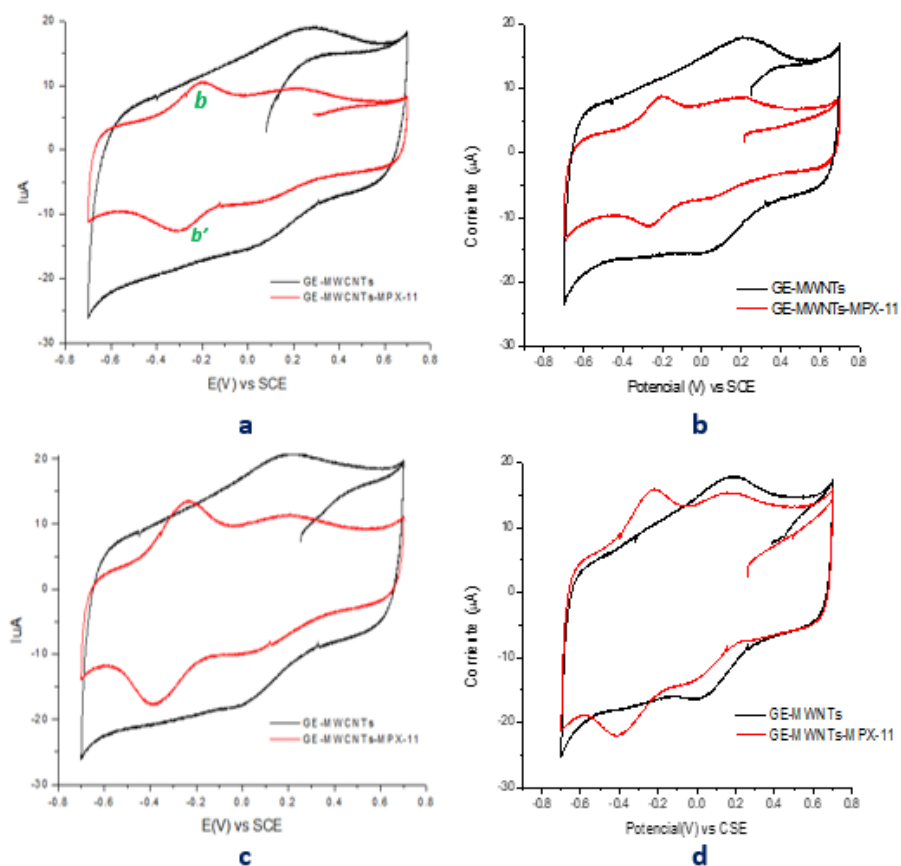


Imagen 22 Distribución de especies de la MPs 11 en función del pH.

En esta tesis, se experimentó el efecto que tiene el estado de agregación y la carga de la enzima MPX-11 en su adsorción física y en su respuesta redox sobre la superficie de los MWCNTs. Para esto, la MPX-11 se disolvió en buffer de amplio espectro a pH 4 y pH 7, a dos valores de concentración. Las concentraciones de enzima fueron 2  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , valores a los cuales se encuentra en estado mono/dimérico y oligomérico, respectivamente. Los VCs en buffer de amplio espectro a pH 4 del electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 (Gráfica 6), obtenido de la adsorción de la MPX-11 en buffer de amplio espectro en las siguientes condiciones:

- 1) pH7 + 50  $\mu\text{M}$  MPX-11 (Figura a)
- 2) pH 7 + 2  $\mu\text{M}$  MPX-11 (Figura b)
- 3) pH 4 + 50  $\mu\text{M}$  MPX-11 (Figura c)
- 4) pH 4 + 2  $\mu\text{M}$  MPX-11 (Figura d).

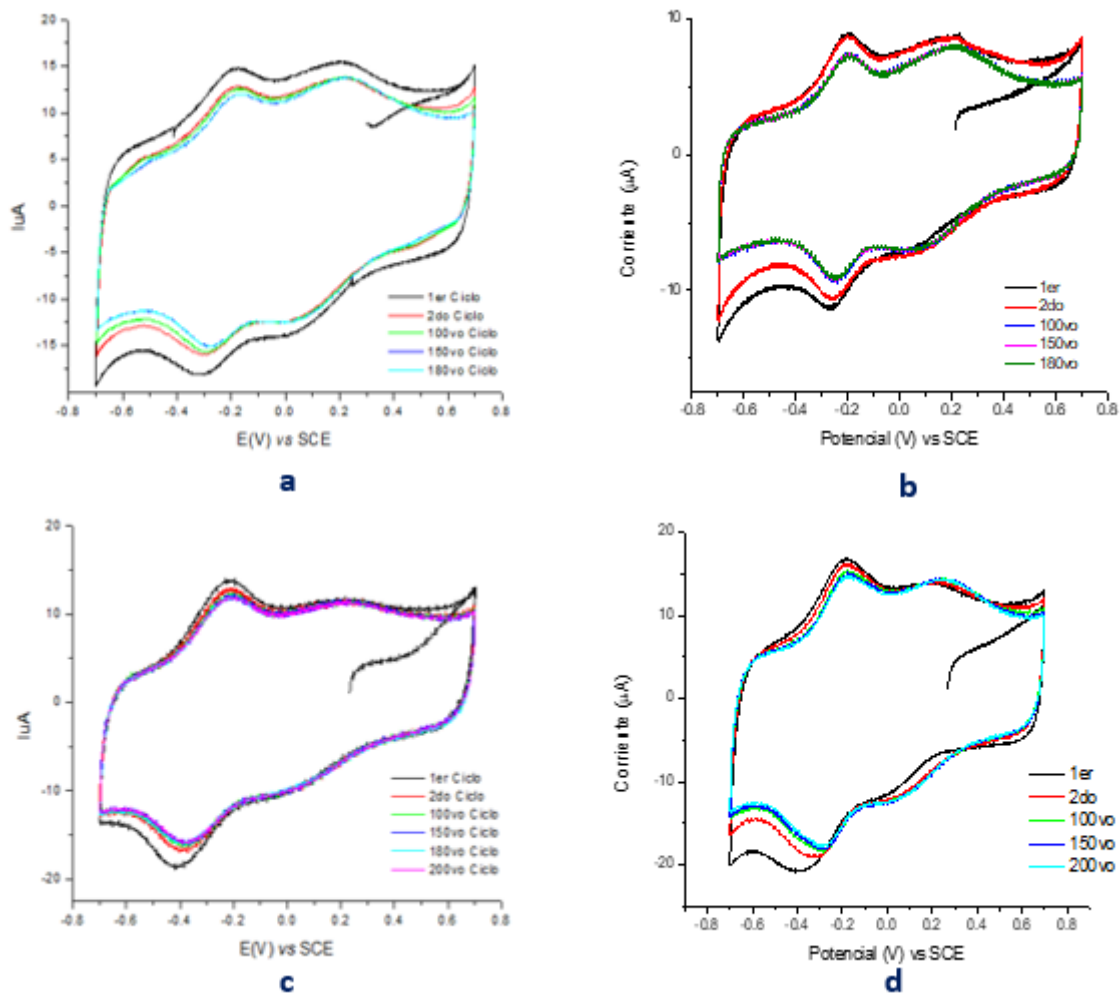


Gráfica 6 VC del electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 en buffer de amplio espectro a pH 4. La adsorción de la enzima fue obtenida en buffer de amplio espectro bajo las siguientes condiciones: a) pH7 + 50  $\mu\text{M}$  MPX-11, b) pH 7 + 2  $\mu\text{M}$  MPX-11, c) pH 4 + 50  $\mu\text{M}$  MPX-11, d) pH 4 + 2  $\mu\text{M}$  MPX-11

La presencia de los picos b y b' en todos los VC presentados en la Gráfica 6 demuestra la eficiencia de la adsorción física de la enzima, y revela la transferencia de electrones directa entre ésta y la superficie de los nanotubos independientemente del pH y el estado de agregación que presenta la solución. Así mismo, se descarta la posibilidad de que la adsorción se lleve a cabo mediante efectos entálpicos que incluyen interacciones electrostáticas entre la MP y el electrodo.

Por otro lado, en las gráficas 5 a, b y c, se observa un perfil voltamperométrico más angosto que el obtenido en ausencia de la proteína. Indicativo de que en estos sistemas, los parámetros  $A$ ,  $\epsilon$ , y  $d$  que influyen en los valores de la capacitancia están siendo afectados. El sistema (a) proviene de disoluciones de adsorción que presentan mayor concentración de enzima, por lo que su estado de agregación en solución es oligomérica. Lo anterior puede estar relacionado con una alteración en la disposición y la configuración que adopten las moléculas de MP-11 en la superficie de los MWCNTs. Por ejemplo, su adsorción en forma de agregados puede expresarse en una menor permitividad al medio, en una alteración en la distribución de cargas y finalmente una disminución en el área real (rugosidad) por el recubrimiento de los defectos superficiales del electrodo GE/MWCNTs. El sistema 5b proviene de una disolución de adsorción con una concentración de enzima a la cual se encuentra reportado su estado monomérico o de dimerización, por lo que se esperaría el mismo efecto presentado y previamente descrito para el sistema 4, sin embargo, la VC a pH 4 exhibe igualmente una disminución en la capacitancia. Esto puede estar relacionado con la reorganización que presentan las moléculas de MP en el sustrato, posiblemente con interacciones de repulsión que experimentan las moléculas sobre la superficie lo que ocasiona su agregación en la superficie del electrodo.

La Tabla 3 presenta los valores de algunos de los parámetros más importantes en la caracterización de la adsorción física de la microperoxidasa sobre los electrodos sintetizados en las condiciones de la Gráfica 7. Los valores de recubrimiento y desorción fueron obtenidos de la Gráfica 7.



Gráfica 7 Efecto del ciclado de potencial para el electrodo GE/MWCNTs-MP-11 en buffer de amplio espectro a pH 4 a partir de la adsorción de la enzima en las siguientes condiciones: a) pH7 + 50  $\mu\text{M}$  MPX-11, b) pH 7 + 2  $\mu\text{M}$  MPX-11, c) pH 4 + 50  $\mu\text{M}$  MPX-11, d) pH 4 + 2  $\mu\text{M}$  MPX-11

Condiciones de modificación	$E_p$ (V)	$C_e$ ( $\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$-E_{1/2}$ (V)	$R_i$ ( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$R_f$ ( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	% desorción	$K$ ( $\text{s}^{-1}$ )
1: BAS pH7+50 $\mu\text{M}$ MPX-11	0.111	205	0.25	3.81E-10	1.26E-10	33%	4
2: BAS pH7+2 $\mu\text{M}$ MPX-11	0.071	159	0.18	3.31E-10	2.86E-10	14%	5
3: BAS pH4+50 $\mu\text{M}$ MPX-11	0.151	195	0.29	4.96E-08	2.79E-08	40%	8
4: BAS pH4+2 $\mu\text{M}$ MPX-11	0.174	242	0.20	1.03E-09	9.49E-10	8%	6

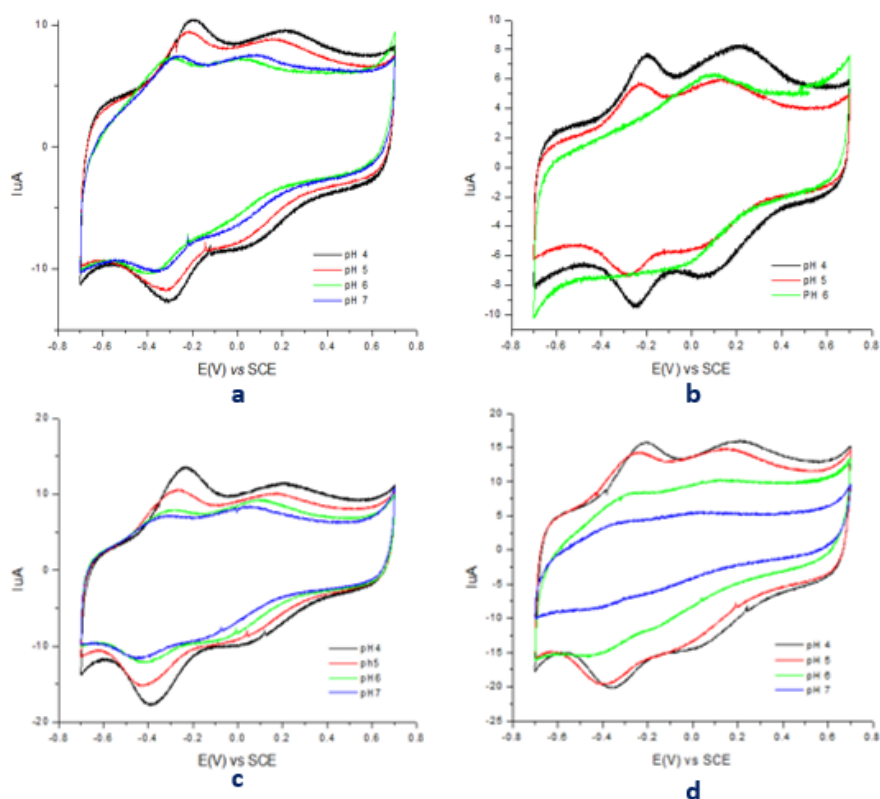
Tabla 3 Valores de separación de los picos ( $E_p$ ), capacitancia específica ( $C_e$ ), potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ), recubrimiento inicial ( $R_i$ ), recubrimiento final después de ciclado exhaustivo ( $R_f$ ), porcentaje de desorción de la enzima (% desorción) y constante  $K$

De la Tabla 3, se observa que los valores menos negativos de  $E_{1/2}$  corresponden a las soluciones de adsorción más diluidas, lo que infiere que la configuración que adopta la MP sobre los nanotubos de carbono en estos sistemas presentan menos energía de activación para conducir la TE con el electrodo. Por su parte, las mayores cargas de enzima se presentan cuando se utiliza como sistema de adsorción una solución de pH 4 independientemente de la concentración de enzima disuelta. La obtención de una mayor bioelectroactividad de las enzimas adsorbidas a este pH infiere que su adsorción puede estar relacionada a interacciones específicas posiblemente por puentes de hidrógeno.

Respecto a las constantes más altas obtenidas a pH 4 (sistema 3 y 4), son un indicativo de la preservación de estructuras activas de MP para lograr una eficiente transferencia electrónica.

#### **4.4 Efecto del pH de la MP-11 adsorbida sobre GE/MWCNTs**

La respuesta redox de la MP-11 adsorbida sobre los electrodos GE/MWCNTs bajo las condiciones presentadas en la Tabla 3 fue evaluada a varios valores de pH [47] (Gráfica 8).



Gráfica 8 VC de electrodos GE/MWCNTs-MP-11 en buffer de amplio espectro a diferentes valores de pH. La adsorción de la enzima fue obtenida bajo las siguientes condiciones en buffer de amplio espectro: a) pH 7 + 50  $\mu$ M MPX-11, b) pH 7 + 2  $\mu$ M MPX-11, c) pH 4 + 50  $\mu$ M

En la Gráfica 8, se observa que:

- Tanto el potencial de pico catódico como anódico correspondientes a la reacción electroquímica de MPX-11 se desplazan negativamente con el incremento en el pH de la disolución
- Al aumentar el pH el proceso redox prácticamente desaparece.
- En todos los sistemas se realizó un VC nuevamente a pH 4 después de evaluar el pH más alto (pH7), la señal de la enzima reaparece, pero exhibiendo una desorción parcial de la enzima.
- Se deduce que al disminuir la disponibilidad prótica se fomenta la desorción de la enzima y se alenta el proceso redox. Concluyendo que los protones están involucrados en el proceso de adsorción posiblemente mediante la formación de puentes de hidrógeno.

Analizando la Gráfica 8, se propone la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo de las quinonas y la terminal amina de los residuos de valina y lisina del péptido. De esta manera, cuando el pH de la solución de ensayo tiende a la neutralidad, se disminuyen las fuerzas electrostáticas y las interacciones de puentes de hidrógeno entre las moléculas polares compiten por su atracción, produciéndose de esta forma la desorción de la enzima. Por otro lado, la corriente pico catódica ( $i_{pc}$ ) máxima para todos los sistemas evaluados se obtiene a pH 4, lo que resulta contrario a lo reportado en literatura, en donde el  $i_{pc}$  máximo se observa a pH 7 [47, 48, 49]. Esta discrepancia puede ser adjudicada a la configuración que la MPX-11 adopta sobre la superficie de los nanotubos. Para cada sistema presentado en la gráfica 8, se obtuvo la pendiente (m) del gráfico de potencial formal.

$$\text{Potencial formal } (E^0 = E_{pa} - E_{pc}/2) \text{ vs pH } \quad (\text{Tabla 4})$$

De los valores reportados en la Tabla 4 se observa que los electrodos GE/MWCNTs-MP-11 provenientes de los sistemas 1 y 3 presentan una pendiente de -39 y -23

mV/pH. Estos resultados son cercanos a la mitad del valor teórico de  $-59 \text{ mV pH}^{-1}$  para un proceso reversible de transferencia de un electrón acoplado a un protón, lo que puede ser adjudicado a la formación de dímeros de MP-11 correspondiente a dos electrones y un protón sobre la superficie de los nanotubos. Por otra parte, para los sistemas 2 y 4, los valores de  $m$  son de  $-48$  y  $-44 \text{ mV/pH}$  correspondiente a la transferencia de un electrón y un protón



Sistema	Pendiente
1: BAS pH7+50 $\mu\text{M}$ MPX-11	-39
2: BAS pH7+2 $\mu\text{M}$ MPX-11	-48
3: BAS pH4+50 $\mu\text{M}$ MPX-11	-23
4: BAS pH4+2 $\mu\text{M}$ MPX-11	-44

Tabla 4 Valores de  $m$  de los gráficos  $E_0'$  vs pH para cada sistema presentado en la gráfica 8

Por lo tanto y tomando en cuenta el hecho de que los depósitos en pH 4 presentan una mejor respuesta electroquímica, así como mejor resistencia a la desorción, esta modalidad de adsorción presenta propiedades favorables para su estudio exhaustivo y futuro desarrollo, así como aplicación para la detección de contaminantes emergentes.

#### 4.5 Estudio por AFM

La morfología superficial del electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 obtenido en solución de buffer de amplio espectro a pH 4 y 2  $\mu\text{M}$  MPX-11, fue caracterizado mediante AFM en su modo *on top*.

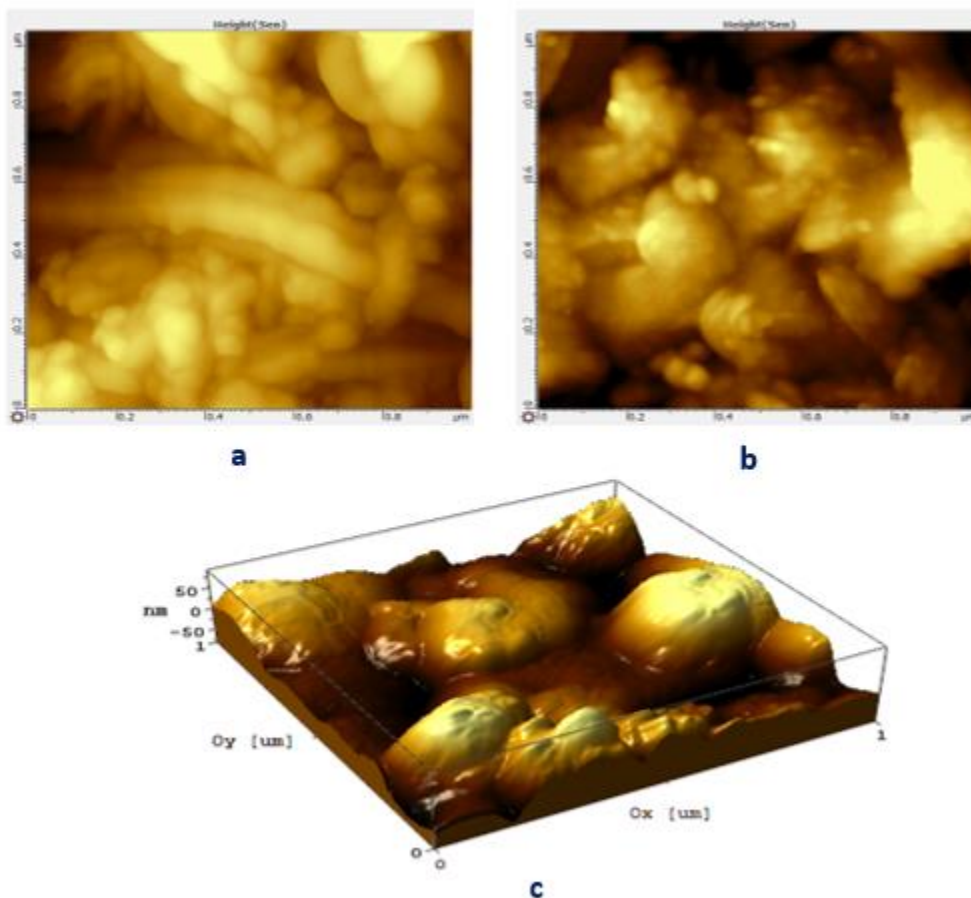


Imagen 23 Micrografías obtenidas mediante AFM modo *on top* de: a) Electrodo GE/MWCNTs, b) GE/MWCNTs-MPX-11 sintetizado a partir de una disolución conteniendo BAS pH 4+ 2  $\mu\text{M}$  MPX-11, c) Imagen 3D-modo fase del electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 .

La Imagen 23 muestra las imágenes de AFM antes (a) y después (b) de la modificación física de los electrodos con la enzima MPX-11, así como una imagen en 3D del electrodo resultante (c).

En presencia de la enzima (Imagen 23b), desaparecen las características distintivas de los nanotubos de carbono y se identifica un recubrimiento uniforme globular por la adsorción de la MPX-11. Un análisis más detallado de la imagen 23b revela la

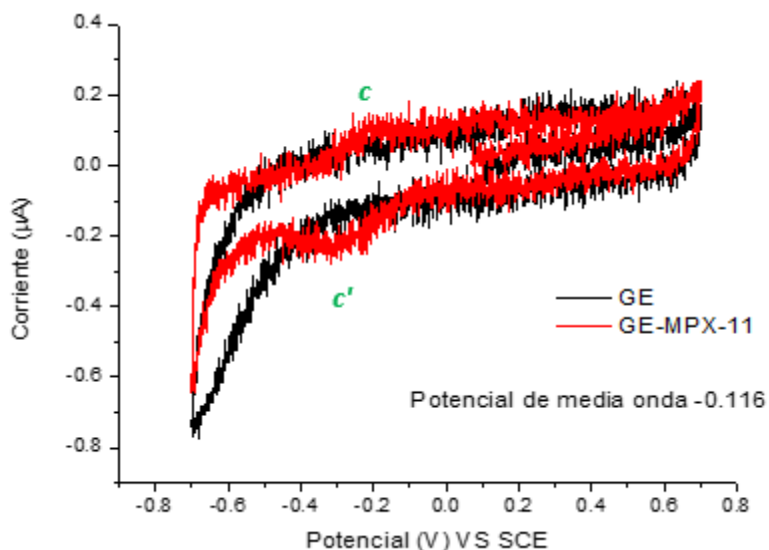
formación de glóbulos de tamaño promedio de 50  $\mu\text{m}$  y de semicírculos más grandes de  $\cong 0.22 \mu\text{m}$ , conformados por el colapso de los glóbulos más pequeños. Satterlee y Col. [50] reportaron a partir del análisis de microscopía de barrido por tuneleo (STM), la adsorción de MP-11 sobre Au(III) a partir de una disolución básica de la enzima en forma pura y conteniendo tanto ligandos neutros (imidazol) como iónicos (sulfuro de sodio,  $\text{S}^{2-}$ ). En ausencia de un agente complejante, la MPX-11 forma clústeres redondos de aproximadamente 40-50 nm de diámetro y de 12 nm de alto. En presencia del ligando neutro en la solución de adsorción, se forman clústeres alargados de 6x15 nm y 2.2 nm de alto sobre la superficie de oro. Así mismo, en presencia del ligando iónico, la MPX-11 se adsorbe como moléculas individuales de 2.4x1.5 nm y 0.85 nm de alto (1.1x1.7x3.3 nm). De esta manera, nuestros resultados concuerdan con la formación de clústeres redondos de aproximadamente 40-50 nm de diámetro, tal como se reporta para la adsorción en ausencia de ligandos. El colapso de estos clústeres en semicírculos más grandes se evidencia en nuestros resultados de AFM.

## **Capítulo 5. Resultados y discusiones**

La gráfica 9 muestra el VC del electrodo GE/MWCNTs-T2 antes y después de la modificación con MP-11. Cuando MPX-11 es adsorbida sobre la superficie de los nanotubos de carbono (curva b), se observa la presencia de un par de picos redox (c y c') en el rango de potencial de 0.1 a -0.6 V vs SCE. Los picos corresponden al centro activo Fe III/II de la microperoxidasa, lo que revela la transferencia electrónica directa (TED) entre el péptido y la superficie del electrodo. Por otra parte, la forma y definición que presentan los picos redox indican que la MPX presenta una orientación preferencial sobre los nanotubos de carbono.

Del valor del potencial a circuito abierto obtenido en presencia de la enzima ( $P_{CA}=0.254$  V) se concluye que la adsorción de MPX-11 se lleva a cabo en su estado de oxidación 3+ ( $Hem_{MP-11}(Fe^{3+})$ ), lo que sugiere la conservación de la bioelectroactividad de la enzima.

El valor de potencial de media onda fue de  $E_{1/2} = -0.20$  V vs SCE, que resulta ser un poco más negativo que el valor de -0.11 V determinado para la enzima adsorbida sobre un electrodo de grafito epoxi a las mismas condiciones. El desplazamiento de este valor indica que el proceso es menos favorable sobre los nanotubos de carbono, debido a posibles cambios conformacionales o bien un efecto en la estructura de coordinación de la MPX-11 durante su adsorción sobre la superficie del electrodo. La separación de los picos ( $E_p$ ) exhibidos para el electrodo GE/MWCNTs-MP-11 a  $100 \text{ mVs}^{-1}$  es de 172 mV, característicos de un sistema cuasi-reversible. Este valor, al igual que el obtenido para el potencial de media onda sugieren la gran reorganización interna y externa que experimenta el centro redox de la enzima, dificultando la transferencia electrónica.



Gráfica 9 VC del electrodos GE/MP-11 en buffer de amplio espectro pH 4 antes y después de la inmovilización de la enzima MP11.

Por otra parte, se observa que la amplitud de los voltamperogramas, que refleja la capacitancia de la superficie ( $i_c$ ), es prácticamente la misma para el electrodo antes y después de la adsorción de la enzima. De los valores de  $i_c$  a -0.6 V para ambas curvas y, considerando el área del electrodo obtenida antes de la adsorción de la enzima, se obtuvieron los valores de capacitancia específica ( $C_e$ ) en presencia ( $499 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) y en ausencia de la MPX-11 ( $486 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ).

El valor de la capacitancia es afectado directamente por el área del electrodo, la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ), e inversamente proporcional a la separación entre las placas ( $d$ ) tal como se representa en la siguiente ecuación:

$$C = \frac{\epsilon A}{d}$$

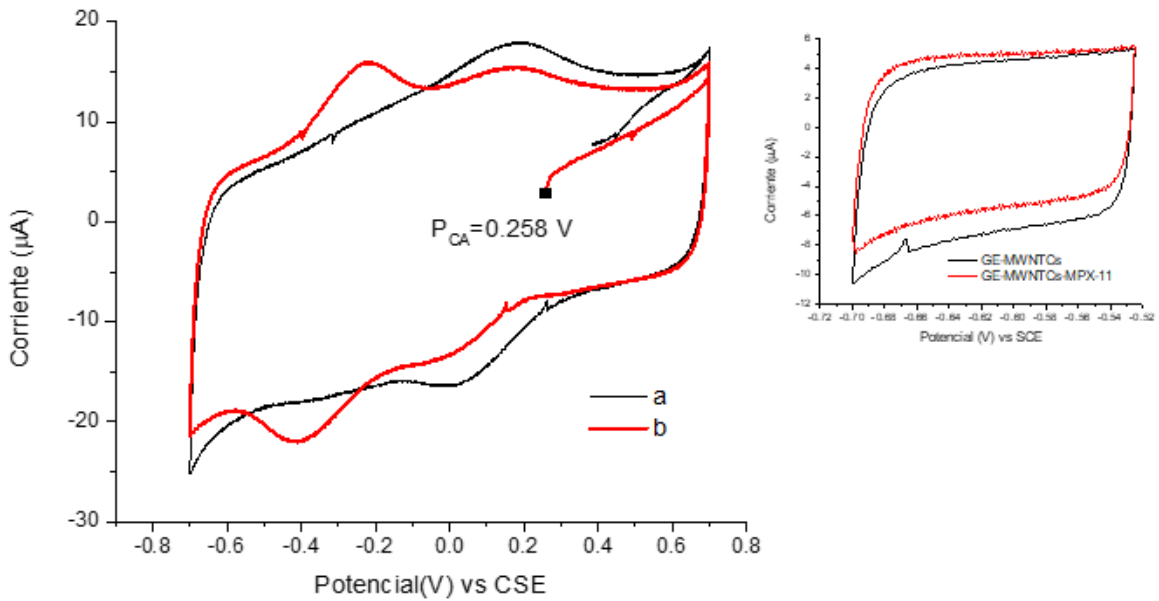
De esta manera, los valores similares de la capacitancia expresada por los VC antes y después de adsorber la enzima indica la poca influencia que tiene el adsorbato en los parámetros  $A$ ,  $\epsilon$ , y  $d$ . Esto puede ser explicado de la siguiente manera:

La obtención de los electrodos GE/MWCNTs-MP-11, se realizó en una solución pH 4 conteniendo  $2 \mu\text{M}$  de la enzima. De acuerdo a lo reportado en literatura, a esta concentración, la enzima se encuentra como monómero o formando dímeros.

Aunado a esto, la acidez de la solución reduce significativamente el fenómeno de asociación mediante la protonación de los grupos amino e incrementa con ello la estabilidad de su forma monomérica. Por tanto, es posible que, durante el proceso de adsorción física, las moléculas de la MP-11 presenten un determinado arreglo sobre los MWCNTs y cierta flexibilidad rotacional, que permita que la interface formada sea libremente penetrada por el agua y el electrolito.

De esta manera, la oposición al campo externo será despreciable y, por lo tanto, la permitividad dieléctrica no diferirá significativamente del bulto de la disolución. Respecto al parámetro  $d$ , se sabe que el grosor de una monocapa de enzima adsorbida es comparable con la dimensión que presenta la enzima en disolución, que para el caso de la MP-11 es de 5 nm de longitud y 2 nm de diámetro. Si consideramos que el grosor típico de la doble capa para un electrolito  $z:z$  con una concentración de 0.1 M es de 1 nm, la longitud de la microperoxidasa excederá a la de la doble capa formada por el medio y por tanto no se espera un cambio drástico en la distribución de las cargas y en consecuencia en el valor de  $d$  de la ecuación 1. Finalmente, es posible deducir la formación de una monocapa considerando el efecto despreciable en el área del electrodo.

De la misma manera, se observa una disminución en la corriente asociada a los picos  $a$  y  $a'$ , lo cual puede indicar un bloqueo parcial de las especies oxigenadas en el electrodo por la enzima. El bloqueo parcial indica que la enzima está interactuando específicamente con algún grupo funcional presente en la superficie de los nanotubos de carbono (carboxilos o carbonilos), además de que revela la permeabilidad de la película de enzima formada por el medio; de acuerdo con lo discutido en el efecto capacitivo de la enzima.



Gráfica 10 VCs de los electrodos GE/MWCNTs-2 antes (a) y después de la modificación con la enzima (b), en buffer de amplio espectro a pH 4.  $v = 100 \text{ mV/s}$ .

Para mejor comparación se ha adicionado la VC de la región no faradéica de ambos sistemas

El recubrimiento superficial ( $\Gamma$ ) de la microperoxidasa electroquímicamente activa fue de  $1.05 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Este valor fue estimado mediante el uso de la ecuación:

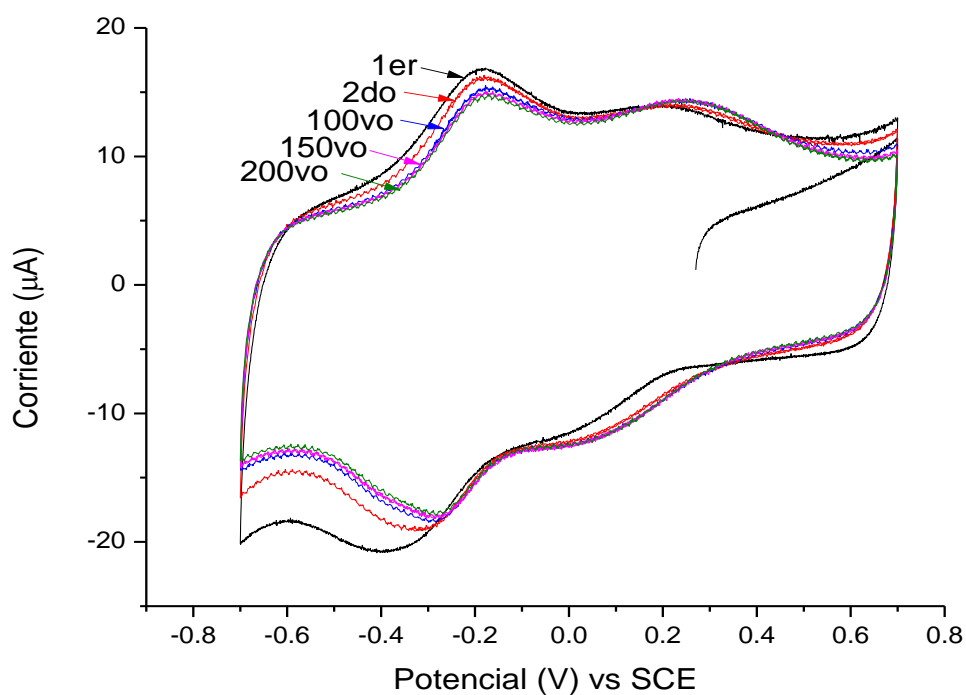
$$\Gamma = Q/nFAQ$$

Donde:

- Q es la carga obtenida por integración del pico catódico
- A el área electroactiva obtenida antes de la adsorción de la enzima.

Es importante mencionar que el valor de recubrimiento obtenido en este trabajo, es mayor que el reportado para la adsorción física de microperoxidasa-11 en nanotubos de carbono ( $8.4 \times 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) [51], y satisfactoriamente comparable con la obtenida para su adsorción covalente ( $1.22 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) [52].

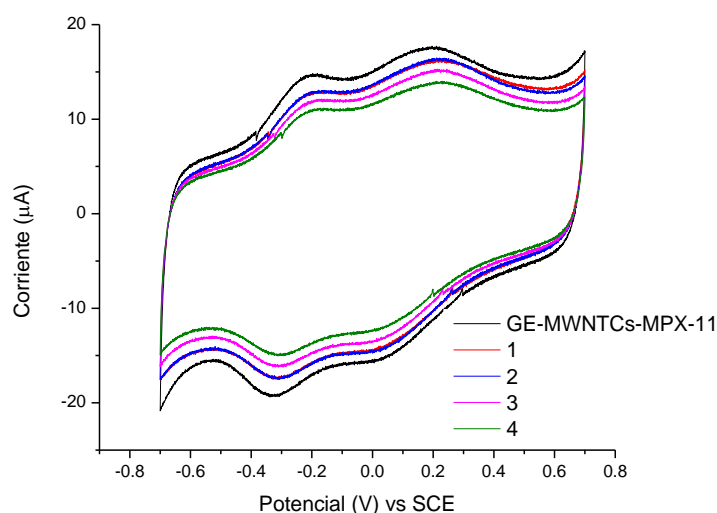
Para determinar la estabilidad de la MP-11 inmovilizada, se realizaron varias repeticiones de VC (Gráfica 11). Se observa una gradual disminución en la intensidad de corriente de pico hasta el 100° ciclo, a partir del cual se mantiene constante incluso después de 200 ciclos. El recubrimiento superficial de la enzima después de 200 ciclos fue de  $9.49 \times 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ , correspondiente a una desorción del 8 %. La desorción parcial de la enzima obtenida al inicio del ciclado, se debe posiblemente a la remoción de la enzima excedente que no se encuentra en contacto directo con la superficie de los MWCNT o bien producto de la débil interacción enzima-superficie. No obstante, es importante resaltar la gran estabilidad que presenta la adsorción de la MP-11 sobre los electrodos sintetizados, comparada con la obtenida en otros trabajos, en donde reportan que la corriente de pico prácticamente desaparece después de 35 ciclos.



Gráfica 11 Efecto del ciclado de potencial en el electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 en buffer de amplio espectro a pH 4.  $v = 100 \text{ mV/s}$ .

De la misma manera, se corroboró la estabilidad de la película respecto al número de enjuagues y al almacenamiento. La Gráfica 12 muestra los perfiles

voltamperométricos del electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 en buffer de amplio espectro a pH 4 después de 4 enjuagues con agua destilada durante 2 minutos.



Gráfica 12 Efecto del enjuague en el electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 en buffer de amplio espectro a pH 4 a 100 mV/s.

Como se observa en la Gráfica 12, después de 4 enjuagues, el electrodo experimenta una reducción considerable en la intensidad de la corriente de los picos asociados a la adsorción de la enzima junto con una simultánea reducción de la capacitancia. Fenómeno que puede ser adjudicado a la desorción de enzima de la superficie de los nanotubos y a la desorción de una fracción de nanotubos que contienen a la enzima. No obstante, el hecho de que aún se observe una respuesta significativa de la enzima, es un indicativo de la interacción fuerte entre el adsorbato y la superficie.

Por otra parte, el perfil voltamperométrico del electrodo GE/MWCNTs-MPX-11 fue el mismo después de dos meses de haber sido elaborado, comprobando con esto su alta estabilidad de almacenamiento (Gráfica 12).

La constante de velocidad de transferencia electrónica ( $k$ ) fue calculada utilizando el método de Laviron, considerando que la caída óhmica es despreciable al tratarse de un estudio en sistema acuoso. El valor obtenido fue de  $6 \text{ s}^{-1}$ . Este valor es similar a los valores reportados para el citocromo c en electrodos de plata y oro ( $2.48$  a  $13 \text{ s}^{-1}$ ), sin embargo, es más pequeño que el reportado para la adsorción física de la

MP sobre nanotubos de carbono ( $38 \text{ s}^{-1}$ ). Esto puede ser debido a diferencias en la forma en que la MP se fija en la superficie del electrodo GE/MWCNTs (punto de anclaje al electrodo) lo que provoca una lenta o menos favorable ruta de ET o bien por la mayor libertad rotacional que presentan las moléculas de MP, la cual puede cambiar el punto de contacto de transferencia de electrones.

A este punto es posible determinar que la opción más favorable y con mejor respuesta y estabilidad es la que presentan los electrodos a concentraciones de  $2 \mu\text{M}$  pH 4 por lo tanto se espera poder emplearlos en procesos de detección y cuantificación.

## Conclusiones

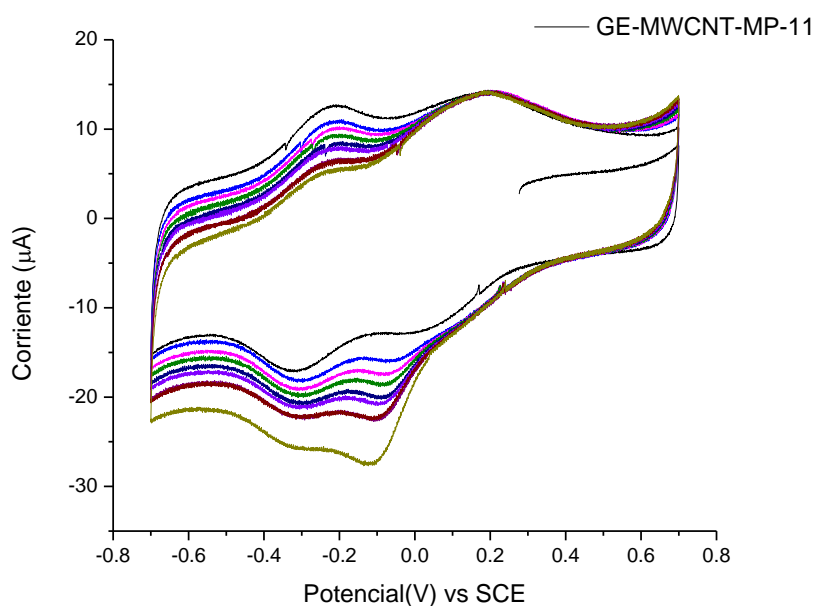
De la tesis previamente descrita se puede concluir lo siguiente:

- Se obtuvo la inmovilización eficiente de la enzima microperoxidasa 11 sobre los electrodos GE-MWCNTs sin procesos de funcionalización posteriores a la precipitación de los nanotubos sobre la superficie de los electrodos.
- La inmovilización de la microperoxidasa 11 se realizó por la ruta “adsorción física” que representa un proceso más simple de retención enzimática sobre sustratos
- Mediante electroquímica, AFM y espectroscopia Raman fue posible confirmar la precipitación de los nanotubos de carbono y de la enzima microperoxidasa 11 sobre los sustratos.
- Se comprobó que una característica para haber utilizado los MWCNTs fue la gran conducción electrónica proveniente de los electrones libres pi de cada átomo de carbono.
- Se logró demostrar la adición de grupos quinoides a través de la oxidación de los nanotubos de carbono, los cuales fueron utilizados para el anclaje de la MP-11.
- Los electrodos obtenidos representan alternativas reales para la elaboración de sensores para la detección de  $H_2O_2$  tal como se demostró en experimentos preliminares.

## **Capítulo 6. Aplicaciones y alcances**

De manera somera los electrodos de GE-MWCNTs modificados con MP-11 fueron empleados para la detección de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) que es ampliamente reconocido como un contaminante presente en aguas residuales, y producto de las reacciones catalizadas de muchas oxidasas, y como principal materia prima de catálisis de la MP-11 por eso es de gran importancia su determinación en los sectores químico, biológico y clínico. En conjunto con esta capacidad de reaccionar en presencia de  $H_2O_2$  también está la capacidad de obtener una respuesta inhibida en presencia de otros compuestos en el medio acuoso que se analiza [53,54]

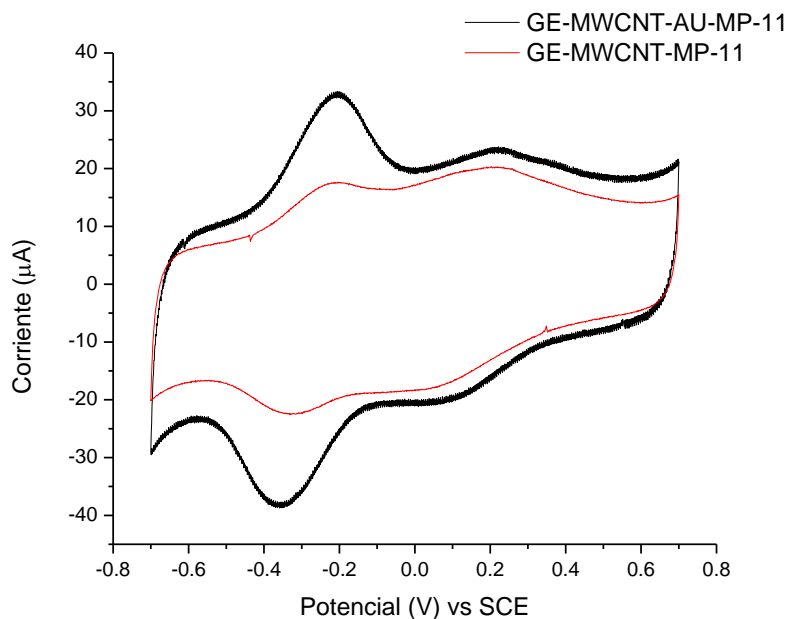
En la gráfica 13 se muestra el comportamiento debido a la agregación de peróxido de hidrógeno de manera escalonada en solución acuosa buffer de amplio espectro pH 4, el desplazamiento del pico de reducción, así como la formación de picos debidos a la oxidación del peróxido de hidrógeno aunado a esto hay una gradual desaparición del pico de oxidación.



Gráfica 13 Respuesta en presencia de peróxido de hidrógeno a pH 4 sobre electrodo modificado GE-MWCNTs-MP-11

Se sabe que existen otros compuestos nano estructurados que mejoran significativamente las propiedades electrocatalíticas y superficiales en electrodos

entre estas se encuentran las nanopartículas de Oro o Plata entre otros metales en soluciones coloidales [55], se realizó un primer ensayo como prueba piloto de un depósito de nanopartículas de oro (AuPs) y nanotubos de carbono sobre electrodos de grafito-epoxi por método electroforético y posteriormente se adsorbió sobre este la enzima microperoxidasa-11 disuelta en pH4 y se probó por voltametría cíclica para corroborar la absorción de la enzima.



*Gráfica 14 comparativo de la respuesta electroquímica de absorción de microperoxidasa-11 en presencia y ausencia de depósito de nanopartículas de oro (AuPs)*

Como se puede apreciar en Gráfica 14 la respuesta electroquímica en presencia de nanopartículas de oro (AuPs) es mucho mayor en área y presenta una mayor amplitud en los picos de oxidación y reducción, lo cual demuestra una mejora satisfactoria y excelente biocompatibilidad entre los elementos que conforman los electrodos en presencia de nanopartículas metálicas.

Habiendo obtenido los resultados anteriormente mencionados, podemos asegurar que los electrodos de GE-MWCNTs modificados con MP-11 podrían ser una opción viable en la detección de diversos sustratos, y podría emplearse para la detección de los compuestos derivados de la fabricación de las celdas o módulos fotovoltaicos.

## 6.1 Futuras aplicaciones en las energías renovables

Existen diversos sustratos y compuestos químicos que actualmente necesitan ser detectados y cuantificados dentro de los procesos de fabricación de ciertas energías renovables. Un ejemplo, es la energía solar, la cual es la energía renovable mayormente utilizada, pero los procesos de fabricación de las celdas fotovoltaicas producen emisiones de gases de efecto invernadero. Además, en la producción de celdas fotovoltaicas los fabricantes tienden a manipular productos químicos, los cuales llegan a ser tóxicos. Sin embargo, esta se considera limpia ya que durante su uso de generación de electricidad no emiten toxinas a la atmósfera. [56]

En la siguiente tabla se pueden observar los principales materiales tóxicos que son usados en la elaboración de algunas celdas fotovoltaicas en función del tipo de celda, así como ciertas propiedades: [57]

<b>Tipo de Celda</b>	<b>Material</b>	<b>Propiedades Físicas</b>	<b>Propiedades Químicas</b>
Silicio Cristalino	Triclorosilano ( $SiHCl_3$ )	Líquido Incoloro Olor Acre Volátil	Punto de ebullición 31.8°C Punto de fusión -126.5°C Solubilidad en agua: Reacciona Punto de inflamación -27°C Moderadamente toxico en caso de ingestión o inhalación
	Óxicloruro de fósforo ( $POCl_3$ )	Líquido Incoloro Olor fuerte acre	Potencialmente explosivo al reaccionar con agua Peso molecular 153.35 g/mol Punto de fusión 1.25°C Punto de ebullición 105.8°C

		Toxico cuando se inhala o ingesta
Ácido Clorhídrico ( <i>HCL</i> )	Líquido de color amarillo o incoloro Olor penetrante	Acido corrosivo Peso molecular 36.46 g/mol pH inferior a 1 Punto de fusión -26°C Punto de ebullición 48°C Al ser ingerido e inhalada produce irritación y corrosión

<b>Tipo de Material celda</b>	<b>Material</b>	<b>Propiedades físicas</b>	<b>Propiedades químicas</b>
<i>Silicio Amorfo</i>	Silano( <i>SiH<sub>4</sub></i> )	Gas Incoloro Análogo del metano A temperatura ambiente el Silano es un gas pirofórico	Sumamente inflamable Masa molar 32.12 g/mol Punto de fusión -185°C Punto de ebullición -112°C Insoluble en agua
	Fosfina ( <i>PH<sub>3</sub></i> )	Gas Incoloro Olor a ajo Levemente soluble en agua Gran combustibilidad	Sumamente toxico Venenoso Punto de fusión -134°C Punto de ebullición -88°C
	Diborano ( <i>B<sub>2</sub>H<sub>6</sub></i> )	Gas Incoloro	Sumamente toxico Corrosivo Sumamente inflamable

		Fuertemente pirofórico a temperatura ambiente Olor dulce repulsivo	Punto de fusión -165°C Punto de ebullición -93°C
<i>CdTe</i>	Cadmio	Metal pesado Blando Color blanco azulado Inestable	Toxicidad alta Cancerígeno Persistente en el ambiente
<i>CIS</i> (Diseleniuro de Cobre Indio)	Hidruro de Selenio ( <i>SeH<sub>2</sub></i> )	Gas Incoloro Inflamable en condiciones normales Es el compuesto más toxico del selenio Olor irritante	Sumamente toxico Punto de ebullición -41°C Punto de fusión -63°C

El biosensor electroquímico previamente elaborado y descrito en esta tesis, podría emplearse en la detección de estos compuestos químicos, como se pudo observar el biosensor tuvo respuestas muy eficaces al analizar el peróxido de hidrogeno, demostrando grandes ventajas para futuras aplicaciones no solo en las emisiones del campo solar, sino también en posibles aplicaciones en las emisiones causadas por la elaboración de hélices en la energía eólica, o en instrumentos de las diferentes energías renovables.

## Bibliografía

1. Willard, HH., Instrumental Methods of Analysis, Wadsworth, Inc., U.S.A., Handbooks of Amersham Pharmacia Biotech, (1988).
2. Harvey D. Analytical Chemistry 2.0. 10A Overview of Spectroscopy. McGraw-Hill Education (ISE Editions); International Ed edición (2009)
3. Pallas A. R. Sensores y acondicionadores de Señal. Ed. Marcombo, (1994).
4. Tineo. G. A. Sensores y Actuadores, Sensores Quimicos. Facultad de ingeniería industrial, Universidad de Zaragoza. (2009)
5. Maquieira A. . (2010). ¿ QUÉ SON LOS BIOSENSORES Y PARA QUÉ LOS PODEMOS UTILIZAR?. Octubre 2021, de Universidad Politécnica de Valencia Sitio web: <http://enclave.cev.es/unoi/wp-content/uploads/2011/01/qu%C3%A9-son-los-biosensores-y-para-qu%C3%A9-los-podemos-utilizar.pdf>
6. Lötzbeyer T.; Schuhmann W.; Schmidt H. Electron transfer principles in amperometric biosensors: direct electron transfer between enzymes and electrode surface. Sens. Actuators, B 33 (1996) 50-54
7. L, Gorton; A. Lindgren; T. Larsson; F.D. Munteanu; T. Ruzgas; I. Gazaryan. Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. Anal. Chim. Acta 400 (1999) 91–108)
8. F.R.R. Teles, L.P. Fonseca. Trends in DNA biosensors. Talanta 77 (2008) 606–623
9. Arkady A. Karyakin, Elena E. Karyakina, Prussian Blue-based `artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors. Sens. Actuators, B 57 (1999) 268–273.
10. J. Wang, M. Musameh. Carbon Nanotube/Teflon Composite Electrochemical Sensors and Biosensors. Anal. Chem. (2003), 75, 2075-2079.
11. W. Putzbach, N. J. Ronkainen. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. Sensors (2013), 13, 4811-4840.
12. Nur Royhaila Mohamada , Nur Haziqah Che Marzukia , Nor Aziah Buanga , Fahrul Huyopb and Roswanira Abdul Wahab. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. Biotechnol Biotechnol Equip (2015) Vol. 29, No. 2, 205-220.
13. Mehtap Gu'ndog'an-Paul, Serdar S. C, elebi, Haluk O' zyo'ru'k, Attila Yıldız. Amperometric enzyme electrode for organic peroxides determination prepared from

- horseradish peroxidase immobilized in poly(vinylferrocenium) film. *Biosens. Bioelectron* 17 (2002) 875-881.
14. Órgano de información de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. (2009). REB 2009. REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA, Vol. 28, No. 3, pp.102-107.
  15. Tautgirdas Ruzgas, Adolfas Gaigalas, Lo Gorton. Tautgirdas Ruzgas a\*, Adolfas Gaigalas b , Lo Gorton. *J. Electroanal. Chem* 469 (1999) pp. 123–131.
  16. D. Ciuparu, Y. Chen, S. Lim, G. L. Haller, L. Pfefferle. Uniform-Diameter Single-Walled Carbon Nanotubes Catalytically Grown in Cobalt-Incorporated MCM-41. *Phys. Chem B* 108 (2004) pp. 503-508.
  17. Jia J. et al. Carbon fibers prepared by pyrolysis of methane over Ni/ MCM-41 catalysts. *Microporous and Mesoporous Mater.* 57, p. 283 (2003).
  18. F. Manea, Electrochemical techniques for characterization and detection application of nanostructures carbón composite. INTECH, (2014).
  19. J. J. Gooding, *Electrochim. Acta* 50, 3049 (2005).
  20. J. M. Nugent, K. S. V. Santhanam, A. Rubio, and P. M. Ajayan, *Nano. Lett.* 1, p. 87 (2001).
  21. Popov, V.N. (2004) *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 43, pp. 61-102.
  22. Ramos Hernández R. Modificación de electrodos grafito-epoxi (GE) con nanotubos de carbono (GE/MWCNTs), nanopartículas de oro (GE/Au-Np) y nanotubos de carbono decorados con nanopartículas de oro (GE/MWCNTs/Au-Np) para su uso potencial en biosensores.(2016) pp. 23-26.
  23. J. Manso, M L Mena, P. Y\_Çez-SedeÇo, Jos\_ M. Pingarr\_n, *Anal. Biochem.* (2008), pp. 345-375.
  24. Peng-Cheng, Naveed A. Siddiqui Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review Volume 41, Issue 10, October 2010, pp. 1345–1367.
  25. Ya-Ping Sun, Kefu Fu Functionalized Carbon Nanotubes: Properties and Applications, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35 (12), pp. 1096–1104.
  26. Ramos Hernández R. Modificación de electrodos grafito-epoxi (GE) con nanotubos de carbono (GE/MWCNTs), nanopartículas de oro (GE/Au-Np) y nanotubos de carbono decorados con nanopartículas de oro (GE/MWCNTs/Au-Np) para su uso potencial en biosensores.(2016) pp. 40-49.

27. Lingjie Meng, Chuanlong Fu, *Advanced technology for functionalization of carbon nanotubes*, Volume 19, Issue 7, 10 July 2009, pp. 801–810.
28. Aldo R. Boccaccini, Johann Cho, Judith A. Roether, Boris J.C. Thomas, E. Jane Minay, Milo S.P. Shaffer. *Electrophoretic deposition of carbon nanotubes*. *Carbon* 44 (2006) pp. 3149–3160.
29. Ping Ge, Fengting Li, Bingru Zhang. *Synthesis of Modified Mesoporous Materials and Comparative Studies of Removal of Heavy Metal from Aqueous Solutions*. *Polish J. of Environ. Stud.* (2010) Vol. 19, No. 2, pp. 301-308.
30. Zi-Le Hua, Jian-Lin Shi, Lin Wang, Wen-Hua Zhang. *Preparation of mesoporous silica films on a glass slide: surfactant template removal by solvent extraction*. *Journal of Non-Crystalline Solids* 292, (2001), pp. 177-183.
31. C. Jeffrey Brinker, Yunfeng Lu, Alan Sellinger, and Hongyou Fan. Hongyun Liu, Naifei Hu. *Heme protein-gluten films: voltammetric studies and their electrocatalytic properties*. *Analytica Chimica Acta* 481 (2003) pp. 91–99.
32. David Salinas-Torres, Francisco Huertab, Francisco Montillaa, Emilia Morallóna. *Study on electroactive and electrocatalytic surfaces of single walled carbon nanotube-modified electrodes*. *Electrochimica Acta* 56 (2011) pp. 2464–2470.
33. *J. Electrochem. Soc* 151(2004)E125
34. *Sains Malaysiana* 41(5)(2012): pp. 603–609.
35. Hongxia Luo, Zujin Shi, Nanqiang Li, Zhennan Gu, and Qiankun Zhuang. *Investigation of the Electrochemical and Electrocatalytic Behavior of Single-Wall Carbon Nanotube Film on a Glassy Carbon Electrode*. *Anal. Chem.* 2001, 73, pp. 915-920.
36. Jeong, Y., Kim, J. & Lee, G.W. 2010. *Optimizing functionalization of multiwalled carbon nanotubes using sodium lignosulfonate*. *Colloid Polymer Science* 288: pp 1–6.
37. Christian Thomsen, Stephanie Reich. *Raman Scattering in Carbon Nanotubes*
38. Zhao Z, Yang Z, Hu Y, Li J, Fan X (2013) *Multiple functionalization of multi-walled carbon nanotubes with carboxyl and amino groups*. *Appl Surf Sci* 276: pp. 476–481.
39. Valdemaras Razumas, J'firat~ Kazlauskait~, Regina Vid~.ignait~. *Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide on the microperoxidase-11 modified carbon paste and graphite electrodes*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 39 (1996) pp. 139-143.
40. A. Gibaud, a J.-F. Bardeau, a M. Dutreilh-Colas, M. Bellour, V. V. Balasubramanian, *Influence of functional organic groups on the structure of CTAB templated organosilica thin films*. *J. Mater. Chem.* (2004), 14, pp. 1854–1860.

41. Allen J. Bard, Larry R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* Cap. (6)
42. Wang, J. (2006). *Analytical Electrochemistry*. Arizona, USA: Wiley-Vch; 3ra ed.
43. J.H Chen, W.Z Li, D.Z Wang, S.X Yang, J.G Wen, Z.F Ren. Electrochemical characterization of carbon nanotubes as electrode in electrochemical double-layer capacitors. *Carbon* 40, 8, (2002), pp.1193–1197.
44. A. Robert, b A. Mehdi, c C. Reyec and R. J. Corriu. S. Farzana, V. Ganesh, and Sheela Berchmans z. A Sensing Platform for Direct Electron Transfer Study of Horseradish Peroxidase. *Journal of The Electrochemical Society*, 160 (9) (2013), pp. 573-580.
45. Niall J. O'Reilly, Edmond Magner. The effect of solvent on the catalytic properties of microperoxidase-11. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, 13, pp. 5304–5313.
46. Jun Hong, Ying-Xue Zhao, Bao-Lin Xiao, Ali Akbar Moosavi-Movahedi, Hedayatollah Ghourchian, Nader Sheibani, Direct Electrochemistry of Hemoglobin Immobilized on a Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles Nanocomplex-Modified Glassy Carbon Electrode. *Sensors* 2013, 13, pp. 8595-8611.
47. Xiaoli Zhua, Ishida Yurib, Xin Gana, Iwao Suzukib, Genxi Lia. Electrochemical study of the effect of nano-zinc oxide on microperoxidase and its application to more sensitive hydrogen peroxide biosensor preparation. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) pp. 1600–1604.
48. Weimin Huang, Zheling Zhang, Xiaojun Han, Jilin Tang, Zhangquan Peng, Shaojun Dong, Erkang Wang. Electrochemistry and spectroscopy study on the interaction of microperoxidase-11 with lipid membrane. *Biophysical Chemistry* 94 (2001) pp. 165-173.
49. Zhiai Xu, Na Gao, Hongjun Chen, and Shaojun Dong. Biopolymer and Carbon Nanotubes Interface Prepared by Self-Assembly for Studying the Electrochemistry of Microperoxidase-11. *Langmuir* 2005, 21, pp. 10808-10813.
50. Yoon-Mee Lee, O-Yul Kwon, Yeo-Joon Yoon, Keungarp Ryu. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Multi-Wall Carbon Nanotubes and its Electrochemical Properties. *Biotechnology Letters* (2006) 28, pp. 39–43.
51. Mingkui Wang, Yan Shen, Ying Liu, Tie Wang, Feng Zhao, Baifeng Liu, Shaojun Dong. Direct electrochemistry of microperoxidase 11 using carbon nanotube modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 578 (2005) pp. 121–127.
52. Franco Mazzei, Gabriele Favero, Marco Frasconi, Alessandra Tata. Electron-Transfer Kinetics of Microperoxidase-11 Covalently Immobilised onto the Surface of Multi-Walled Carbon Nanotubes by Reactive Landing of Mass-Selected Ions *Chem. Eur. J.* 2009, 15, pp. 7359 – 7367.

53. Everlyne A. Songa, Omotayo A. Arotiba, Joseph H.O. Owino, Nazeem Jahed, Priscilla G.L. Baker, Emmanuel I. Iwuoha. Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. *Bioelectrochemistry* 75 (2009) pp. 117-123.
54. Grasielli C. Oliveiraa, Sally K. Moccoelinia, Marilza Castilhoa, Ailton J. Terezoa, Juliana Possavatzb, Márcia R.L. Magalhãesb, Eliana F.G.C. Doresb. Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. *Talanta* 98 (2012) pp. 130-136.
55. Fernando Patolsky, Tobias Gabriel, Itamar Willner. Controlled electrocatalysis by microperoxidase-11 and Au-nanoparticle superstructures on conductive supports. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 479 (1999) pp. 69–73.
56. CIIT, Chemical Industry Institute of Toxicology (1984). Ninety-day inhalation toxicity study of hydrogen chloride gas in B6C3F1 mice, Sprague-Dawley and Fischer-344 rats. ToxiGenics unpublished report 420-1087, cited in OECD SIDS 2004
57. IPCS International Programme on Chemical Safety. Health and Safety Guide No. 35. <http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg035.htm>