

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA ARQUITECTURA Y DISEÑO



ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LACASA DE *Coriopsis gallica*
INMOVILIZADA EN NANOTUBOS DE CARBONO MODIFICADOS
CON NANOPARTÍCULAS DE RENIO PARA LA DETECCIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS

TESIS

PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

ERICK GUERRERO GONZÁLEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. JUNIO DEL 2017.

Resumen de la tesis que presenta **Erick Guerrero González** como requisito parcial para la obtención del título de Bioingeniero.

Estudio electroquímico de lacasa de *Coriopsis gallica* inmovilizada en nanotubos de carbono modificados con nanopartículas de renio para la detección de compuestos fenólicos

Resumen aprobado por:



Dr. Sergio A. Aguila Puentes
Director



Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez
Codirector



Dr. Rubén César Villarreal Sánchez
Sinodal



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Sinodal



Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Sinodal

La detección de compuestos de interés es una etapa clave en diferentes procesos de las industrias alimentarias, médicas y ambientales. Muchas de estas sustancias son derivados fenólicos que se encuentran en pequeñas cantidades, así que se requiere de métodos sensibles pero eficientes para su determinación. En el presente trabajo se realizó el análisis electroquímico de diversos materiales a base de nanotubos de carbono modificados por medio de técnicas como dopaje con nitrógeno y reducción química para el depósito de nanopartículas de renio. Los soportes obtenidos fueron usados para la inmovilización de lacasa de *Coriolopsis gallica* y su aplicación en la electrocatálisis de compuestos fenólicos. Los resultados mostraron una inmovilización enzimática exitosa con actividad electroquímica para la reacción redox de catecol, logrando hasta 0.2704 UI mg⁻¹ en nanotubos de carbono modificados. Las nanopartículas en los materiales se presentaron en forma de óxidos de renio, principalmente de tipo ReO₂, ReO₃ y Re₂O₇, con diámetros entre 2 – 10 nm y carga óxido metálica de 10.9 %. Por otro lado, el estudio voltamperométrico de catecol indicó la sinergia de los componentes en el nanobiomaterial o-CN_x-Re-Lac, aumentando la sensibilidad de detección por nanotubos modificados hasta 100 nmol L⁻¹. También, el análisis de la repetitividad y reproducibilidad del biosensor determinaron una certeza del 95.2 % en mediciones realizadas durante el periodo de estabilidad operacional establecido en 25 días.

Palabras clave: Nanotubos de carbono, lacasa, renio, electrocatálisis.

Abstract of the thesis presented by **Erick Guerrero González** as a partial requirement to obtain the Bachelor's degree in Bioengineering.

Electrochemical study of laccase from *Corioloopsis gallica* immobilized on modified carbon nanotubes with rhenium nanoparticles for phenolic compounds detection

Abstract approved by:



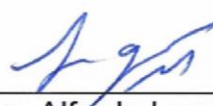
Dr. Sergio A. Aguila Puentes
Director



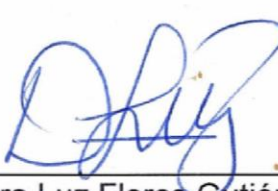
Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez
Codirector



Dr. Rubén César Villarreal Sánchez
Sinodal



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Sinodal



Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Sinodal

Detection of compounds of interest is a key stage in different processes in food, medical and environmental industries. Many of these substances are phenolic derivatives that are found in small amounts, so sensitive but efficient methods are required for their determination.

In the present work, we performed the electrochemical analysis of different materials based on carbon nanotubes through techniques as nitrogen doping and chemical reduction for rhenium nanoparticles deposition. The supports obtained were used for immobilization of laccase from *Coriolopsis gallica* and their application in electrocatalysis of phenolic compounds. The results showed a successful enzymatic immobilization with electrochemical activity for catechol redox reaction, achieving up to 0.2704 UI mg⁻¹ in modified carbon nanotubes. The nanoparticles in the material were in the form of rhenium oxides, mostly of ReO₂, ReO₃ and Re₂O₇ type, with diameters between 2 – 10 nm and metal oxide charge of 10.9 %.

Furthermore, the catechol voltammetric study indicated the components synergy in the nanobiomaterial o-CN_x-Re-Lac, increasing the detection sensitivity by modified nanotubes to 100 nmol L⁻¹. In addition, the biosensor repeatability and reproducibility analysis determined a certainty of 95.2 % in measurements made during the operational stability period established in 25 days.

Keywords: Carbon nanotubes, laccase, rhenium, electrocatalysis.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA ARQUITECTURA Y DISEÑO

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LACASA DE *Corioloipsis gallica*
INMOVILIZADA EN NANOTUBOS DE CARBONO MODIFICADOS
CON NANOPARTÍCULAS DE RENIO PARA LA DETECCIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS

TESIS

PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE

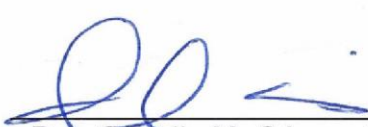
BIOINGENIERO

PRESENTA

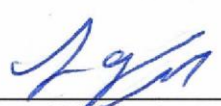
ERICK GUERRERO GONZÁLEZ

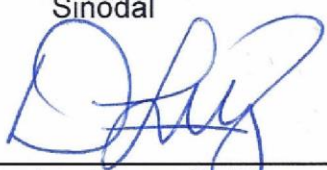
Aprobada por:



Dr. Sergio A. Aguila Puentes
Director

Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez
Codirector

Dr. Rubén César Villarreal Sánchez
Sinodal

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales
Sinodal

Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Sinodal

Dedicatoria

A mi familia, por su apoyo, sacrificio, consejos y enseñanzas que han formado la persona que soy ahora.

GRACIAS!!!

Agradecimientos

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM), especialmente a los departamentos de Bionanotecnología y Nanoestructuras, por la disponibilidad de instalaciones, equipo y financiamiento para el desarrollo de este trabajo a través del proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IB200613.

Al Dr. Sergio A. Águila, por su paciencia y confianza en el trabajo de jóvenes interesados en la ciencia, permitiendo la formación y autonomía profesional.

A la Dra. Claudia M. Gómez, quien se presentó como mi maestra, tutora y la persona que me redirigió al campo de la Bioingeniería.

Al Dr. Gabriel Alonso, por sus aportaciones en la síntesis de nanomateriales.

Al Dr. Mario Farías por su disposición en el análisis de resultados de XPS.

A la Dra. Zaira Bedolla, gracias por su confianza, explicaciones y buenas pláticas.

A la Dra. Katrin Quester, quien me apoyó más allá de las puertas del laboratorio.

Al recién Dr. Antonio Aliaga, por sus conocimientos y apoyo, gracias 'compa'.

A mis padres, José y Elizabeth, y a mi hermano Bryan, por estar conmigo durante todo este trayecto, dándome aliento y motivación para seguir adelante.

A Fabiola Y. Hernández, mi prima querida y orgullo, cuyas palabras y ejemplo han sido siempre mi inspiración y una razón para alcanzar mis metas.

A Mónica, por su paciencia y apoyo incondicional, enseñándome como resolver y tolerar las cosas, gracias por la felicidad que me has brindado M. C. Vásquez.

Para Ana Victoria, cuya compañía y personalidad me mantuvieron despierto y relajado incluso en los momentos más tediosos de mi trabajo.

A mis "hijas" Ceci y Magda, quienes me enseñaron a aprender enseñando.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Tablas.....	xii
Índice de Figuras	iii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biosensores.....	1
1.2 Enzimas.....	4
1.2.1 Lacasa.....	6
1.2.1.1 Estructura, clasificación y actividad.....	6
1.2.1.2 Aplicaciones	11
1.3 Nanomateriales y nanoestructuras	13
1.3.1 Nanotubos de carbono (NTCs).....	14
1.3.2 Nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (CN _x)	16
1.3.3 Renio	18
1.4 Compuestos fenólicos	22
1.5 Antecedentes.....	24
1.5.1 Nanotubos de carbono como soportes catalíticos.....	24
1.5.2 Síntesis de nanopartículas de renio (NPs Re).....	27
1.5.3 Inmovilización de lacasa.....	31
1.5.4 Nanotubos de carbono como soporte de NPs Re	35
1.5.5 Análisis y detección de compuestos.....	37
1.5.5.1 Detección de compuestos fenólicos (Catecol)	39
1.5.5.1.1 Sensores a base de carbono.....	40
1.5.5.1.2 Otros materiales.....	42
1.6 Justificación	45
1.7 Hipótesis.....	45
1.8 Objetivos.....	46
1.8.1 General.....	46
1.8.2 Particulares	46
METODOLOGÍA.....	47
2.1 Reactivos.....	47

2.2 Síntesis de nanotubos de carbono	48
2.3 Funcionalización y purificación de NTCs	49
2.4 Reducción <i>in situ</i> de NPs Re sobre NTCs	50
2.5 Técnicas de caracterización fisicoquímica y morfológica	50
2.6 Análisis electroquímicos	51
2.6.1 Preparación de electrodos GCE/NTC y GCE/NTC-Re	52
2.6.2 Voltamperometría cíclica (CV).....	53
2.7 Ensayos de caracterización bioquímica.....	54
2.7.1 Micro Bradford	54
2.7.2 Actividad enzimática.....	55
2.8 Inmovilización de lacasa en NTCs.....	55
RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
3.1 Síntesis de nanomateriales	57
3.2 Caracterización.....	58
3.2.1 SEM.....	58
3.2.2 STEM	60
3.2.3 TGA.....	63
3.2.4 XPS	65
3.2.4.1 Carbono	66
3.2.4.2 Nitrógeno.....	68
3.2.4.3 Renio.....	69
3.2.5 UV-Vis	73
3.2.6 CV	75
CONCLUSIONES	83
ANEXOS.....	84
REFERENCIAS	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Características importantes para el desarrollo de biosensores	1
Tabla II. Estrategias empleadas para la determinación convencional de ácidos fenólicos y flavonoides en fluidos biológicos, plantas, bebidas y alimentos.....	38
Tabla III. Sensores a base carbono para la detección de catecol	41
Tabla IV. Sensores empleados para la detección de catecol	43
Tabla V. Energías de enlace reportadas para distintos estados de oxidación de renio.....	70
Tabla VI. Porcentajes y energías de enlace de orbitales Re $4f_{7/2}$ -Re $4f_{7/2}$ en o-CN _x -Re.....	73
Tabla VII. Actividad enzimática de los diferentes tipos de electrodos	74
Tabla VIII. Respuesta electroquímica y desviación estándar (σ) de los materiales a diferentes concentraciones de catecol.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la configuración y componentes básicos de un biosensor	3
Figura 2. Organización de los dominios, secuencias y sitios activos de enzimas multicobre azules	7
Figura 3. Estructura globular de lacasa y conformación básica de su sitio activo	9
Figura 4. Aplicaciones tecnológicas de lacasa.....	12
Figura 5. Tipos de estructura de nanotubos de carbono.....	16
Figura 6. Estructura, conformación y aplicación de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (CN _x).....	18
Figura 7. Estructura y conformación de complejos rénicos.....	21
Figura 8. Morfología y propiedades electrocatalíticas del compuesto Ag/B-MWCNT	26
Figura 9. Síntesis por descomposición térmica y efecto de agentes estabilizantes para NPs Re	29
Figura 10. Efecto de la radiación y concentración de precursor durante la síntesis de NPs Re	30
Figura 11. Técnicas de inmovilización de lacasa sobre NTCs	33
Figura 12. Encapsulación de “clústeres” de renio en nanotubos de pared sencilla (SWCNT) a partir de óxido de renio.....	37
Figura 13. Electrocatálisis ultrasensible de catecol por nanohíbrido de óxido de hierro-polianilina (Fe ₃ O ₄ @PANI).....	42
Figura 14. Esquema del sistema para la síntesis de NTCs por medio de depósito químico de vapor asistido por aerosol (AA-CVD).....	49
Figura 15. Método de preparación de electrodos para análisis de voltamperometría cíclica	52
Figura 16. Celda electroquímica con configuración de tres electrodos	53
Figura 17. Método de inmovilización de lacasa por reacción de carbodiimida (EDC).....	56
Figura 18. Imágenes de CN _x por microscopia SEM	68
Figura 19. Espectrograma del análisis elemental de o-CN _x -Re por espectrometría de energía dispersiva (EDS) en SEM	60

Figura 20. Imágenes de micrografías TEM en campo claro de o-CN _x y o-CN _x -Re	61
Figura 21. Imágenes de micrografías TEM en campo oscuro de o-CN _x y o-CN _x -Re	62
Figura 22. Análisis termogravimétrico y curvas TGA y DTGA de nanotubos de carbono	65
Figura 23. Espectros XPS de C 1s y N 1s en o-CN _x -Re	67
Figura 24. Espectros XPS de Re 4f _{7/2} : Re 4f _{7/2} en o-CN _x -Re con respecto al tiempo	72
Figura 25. Voltamogramas CV de GCE/o-CN _x -Re a diferentes velocidades de barrido.....	77
Figura 26. Voltamogramas CV de los materiales tipo NTCs-Lac y comparación de la señal electroquímica	80
Figura 27. Estabilidad electroquímica de los biosensores	82
Figura 28. Curva de calibración de proteína BSA.	84
Figura 29. Micrografías SEM del efecto de la purificación de NTCs por medio del tratamiento con ácido nítrico	84
Figura 30. Espectrograma del análisis elemental de o-CN _x -Re por espectrometría de energía dispersiva de rayos X (EDS) en STEM	85
Figura 31. Espectro XPS de o-CN _x -Re	86
Figura 32. Curva de actividad enzimática de lacasa de <i>Coriolopsis gallica</i>	86
Figura 33. Voltamogramas CV de o-CN _x -Re a diferentes velocidades de barrido con carga de 10 µg de NTCs	87
Figura 34. Estabilidad electroquímica de los principales materiales a base de NTCs.....	87

INTRODUCCIÓN

1.1 Biosensores

En la actualidad, el uso de biosensores en procesos de diagnóstico, análisis, seguridad, calidad y control de las industrias alimenticias, médicas y ambientales es cada vez más frecuente debido a que presentan cualidades significativas sobre los métodos de detección convencional empleados, tales como: mayor sensibilidad y selectividad, alto nivel de reproducibilidad, confiabilidad, fácil preparación de la muestra y aplicación en análisis rápidos, directos y de tiempo real (Monošík et al., 2012).

Tabla I. Características importantes para el desarrollo de biosensores (Castro-Ortíz et al., 2007).

Característica	Descripción
Sensibilidad	Alta. El orden de detección se establece dependiendo de las necesidades y aplicación del biosensor.
Selectividad	Alta. El elemento de reconocimiento debe ser específico para el analito de interés o se recomienda realizar una caracterización de la interacción con otros compuestos.
Confiabilidad	Alta. Generar sistemas cuantitativos con buena reproducibilidad que no se vean afectados por la muestra o el medio.
Tiempo de vida útil	Prolongado. Dependerá de la estabilidad del dispositivo que es afectada por el método de aplicación y almacenamiento.
Costos	Benéfico. Considerando el mercado actual y los materiales a emplear para la elaboración, sin dejar de lado ninguna de las características aquí mencionadas.
Tratamiento de la muestra	Sencillo. Requerir de la mínima cantidad de pasos y reactivos para asegurar una correcta medición.
Tiempo de análisis	Rápido. Capaces de realizar mediciones dinámicas o en tiempo real.

Entre otras ventajas que presenta el uso de biosensores en la industria se encuentra el hecho de que generalmente suelen ser de bajo costo de producción, operación o mantenimiento, además de tener un menor tamaño, lo cual genera una buena relación costo-beneficio y facilita su portabilidad (Tabla I). Sin embargo, los principales retos en el área de los biosensores son: la reducción del límite de detección, la estabilidad a largo plazo y el aumento de la robustez al momento de llevar a cabo mediciones *in situ* (Scognamiglio et al., 2015).

Un biosensor, de acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), se define como un dispositivo capaz de utilizar reacciones bioquímicas específicas mediadas por un elemento de reconocimiento biológico, como enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, orgánulos, o células enteras, para detectar compuestos químicos a través de señales eléctricas, térmicas u ópticas (Romero-Arcos et al., 2015). Los componentes principales que conforman un biosensor son: el biorreceptor; cuya función es interactuar con el compuesto de interés presente en el medio y generar una señal, el transductor; que es una herramienta que se encarga de transformar la señal emitida en una señal fácilmente cuantificable, y el procesador, que cumple con el objetivo de procesar y presentar la señal en forma digital para su manejo y comprensión (Figura 1).

La clasificación de estos dispositivos es muy amplia y se encuentra determinada principalmente por el tipo de elemento de reconocimiento; ya sea catalítico o directo (células, enzimas o tejidos), o se trate de un elemento de afinidad o indirecto (anticuerpos, proteínas, receptores o ácidos nucleicos). También se

puede dividir por el tipo de transductor empleado; óptico, electroquímico, piezoeléctrico, magnético, calorimétrico, mecánico, los cuales han dado lugar a una gran variedad de configuraciones en el diseño de biosensores para generar diversas alternativas a las problemáticas de detección de compuestos (Castillo et al., 2004).

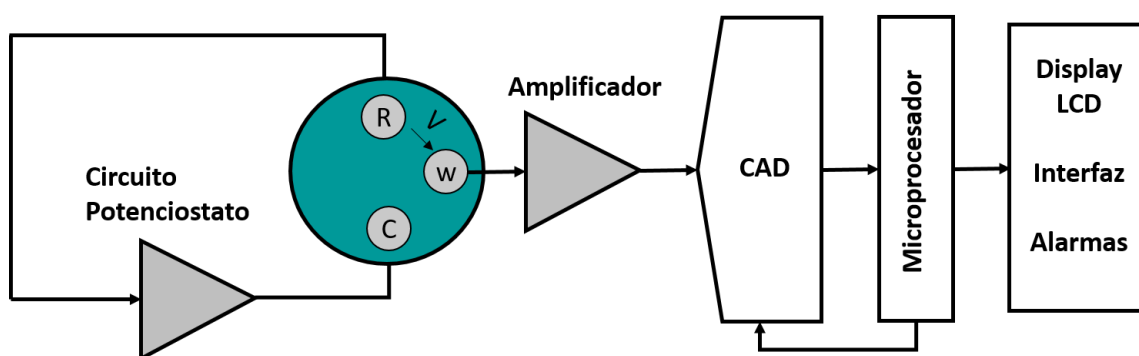


Figura 1. Representación de la configuración y componentes básicos de un biosensor. Se muestra un sistema potenciostático de tres electrodos: C, electrodo contador o contra-electrodo; R, electrodo de referencia; W, electrodo de trabajo que contiene el componente de reconocimiento biológico. La transformación analógica-digital está representada por un circuito amplificador CAD, mientras que la representación de los datos es realizada por un microprocesador y otros elementos.

El primer registro de un biosensor data de 1956, y fue unos años después cuando se publicó en el uso de glucosa oxidasa atrapada en un electrodo de oxígeno por medio de una membrana de diálisis para la detección de glucosa en muestras de sangre (Clark & Lyons 1962). Curiosamente, alrededor del 90 % de los biosensores comercializados actualmente están enfocados en la detección de glucosa. Hasta hace algunas décadas, en México existían muy pocas investigaciones asociadas al uso de biosensores, de las cuales, la mayoría se

encontraban enfocadas en áreas de salud y detección de compuestos puros por medio de enzimas y sistemas ópticos de detección (Castro-Ortíz et al., 2007). Hoy en día, existe un gran número de biosensores en proceso de investigación, desarrollo, e incluso patente, sin embargo, la comercialización aun no es sencilla. Por lo cual se requiere de la colaboración de ramas como la bioingeniería, nanotecnología y microelectrónica para la optimización de estos dispositivos.

1.2 Enzimas

Las enzimas, mejor conocidas como biocatalizadores, son moléculas biológicas con actividad catalítica capaces de transformar compuestos a través de distintos mecanismos de acción y bajo condiciones óptimas de pH, temperatura, presión, concentración de sales y sustratos, por esta razón, se han vuelto vitales para el metabolismo de los organismos. La mayoría son de naturaleza proteica, aunque también una pequeña parte está compuesta por ácidos ribonucleicos (ribozimas). La composición y conformación de estos biocatalizadores son las razones primordiales que les otorgan actividad y características únicas, y por lo cual regularmente poseen un alto grado de selectividad otorgado por la afinidad del sitio activo que funciona como zona de reconocimiento debido a su complementariedad geométrica con uno o varios sustratos (Nelson & Cox, 2008).

Estas biomoléculas son normalmente clasificadas dentro de seis grupos en función de su actividad catalítica específica, entre los cuales encontramos: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas; siendo

las primeras las más empleadas en la fabricación de biosensores debido a la transferencia de iones o electrones que generan y que puede fungir como una señal eléctrica fácilmente detectable en forma de corriente o potencial eléctrico. También existen registros del uso de las otras clases de enzimas para la construcción de biosensores usando un mecanismo de detección diferente (Thévenot et al., 1999). El uso de enzimas en sensores electroquímicos ha mostrado una importante evolución, sobre todo en los últimos años, que las ha convertido en una de las principales alternativas para el desarrollo de biosensores. Su aplicación en este tipo de dispositivos de afinidad suele mejorar significativamente los límites de detección y cuantificación de compuestos, utilizando las propiedades electrónicas de los procesos rédox que se llevan a cabo al momento de la interacción enzima-sustrato.

Dentro de los puntos críticos en el diseño de biosensores se encuentra, entre uno de los más importantes, la inmovilización del elemento de reconocimiento biológico, para esto es necesario que el soporte no afecte de manera antagónica la sensibilidad, selectividad o estabilidad del dispositivo. El uso de un método de inmovilización inapropiado puede influir en la orientación, movilidad, estructura y actividad catalítica del biocatalizador (Sassolas et al., 2012). Los métodos de inmovilización comúnmente usados en la construcción de biosensores están basados en adsorción física, enlaces covalentes, atrapamiento, encapsulación y el uso de entrecruzadores intermoleculares.

1.2.1 Lacasa

1.2.1.1 Estructura, clasificación y actividad

Lacasa (EC 1.10.3.2, *p*-difenoI:dioxígeno oxidorreductasa) es una enzima que fue descrita por primera vez en el árbol japonés de la laca (*Rhus verniciífera*) por H. Yoshida (Yoshida, 1883), sin embargo, también se encuentra presente de manera activa en hongos, plantas superiores, bacterias y algunos insectos, presentando secuencias genéticas conservadas en relación con su sitio activo (Figura 2), pero no fue sino hasta 1985 cuando se le caracterizó como una oxidasa metálica (Bertrand, 1985). Lacasa pertenece al grupo de las polifenol oxidasas y, debido a los átomos de cobre que se localizan en su centro catalítico, se le clasifica dentro de la familia de las oxidasas multicobre junto con otras enzimas como algunas tirosinasas y ferroxidasas (Xu, 1996).

El interés en la lacasa comenzó cuando se le relacionó con procesos de descomposición de la corteza de árboles por hongos de podredumbre blanca, como es el caso de *Coriulopsis gallica*. Aunque, hoy se sabe que también se encuentra involucrada en múltiples procesos biológicos dependiendo del origen, localización y conformación de la enzima, los cuales van desde la formación y degradación de lignina, estrés biótico, pigmentación de esporas fúngicas, esclerotización de la cutícula en insectos, regeneración de protoplastos, defensa de la pared celular en plantas, hasta factores de virulencia y patogenicidad en hongos y bacterias (Mayer & Staples, 2002). A lo largo del tiempo, se ha

encontrado una amplia variedad de lacasas intra y extracelulares, así como sus correspondientes isoenzimas (Chen et al., 2003).

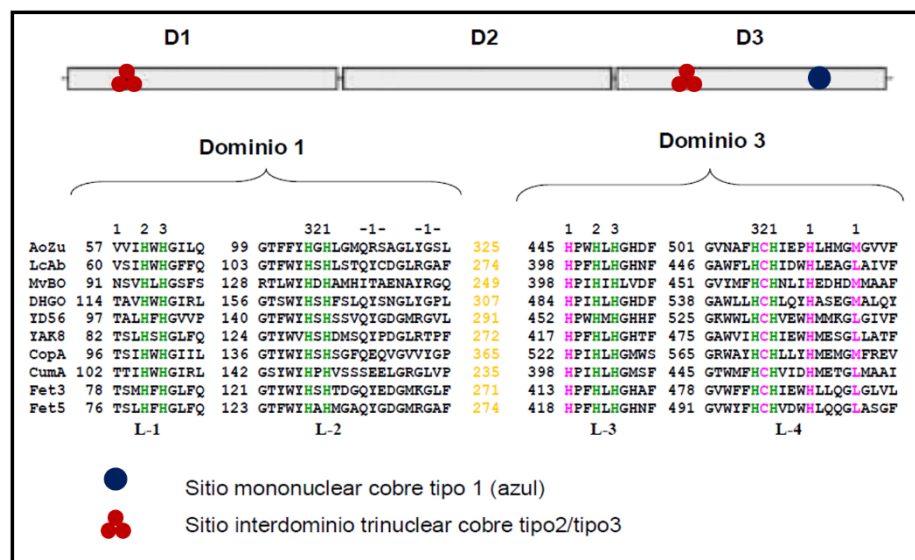


Figura 2. Organización de los dominios, secuencias y sitios activos de enzimas multicobre azules. Se muestran los alineamientos de secuencias de diversos organismos, enfocándose en la interacción con átomos de cobre en los dominios 1 y 3. Los sitios consenso de unión a cobre tipo 1, 2 y 3 se indican con sus respectivos números sobre las designaciones de las secuencias de L1 – L4. Los números en negro a la izquierda de las secuencias de L1 – L4 representan la posición de los residuos iniciales en la secuencia, mientras que el número en amarillo muestra el número de residuos entre el segundo y tercer fragmento. Residuos en violeta corresponden al cobre T1, y residuos en verde son del cobre T2/T3. La secuencia ID (SWISS-PROT) y el origen de las secuencias son: AoZu, ascorbato oxidasa de *Cucurbita pepo* var. *melo*pepo; LcAb, lacasa de *Agaricus bisporus*; MvBo, bilirrubina oxidasa de *Myrothecium verrucaria*; DHGO, dihidrogeodina oxidasa de *Aspergillus terreus*; YD56, YD56 de *Saccharomyces cerevisiae*; YAK8, YAK8 de *Schizosaccharomyces pombe*; CopA, CopA de *Pseudomonas syringae*; CumA; CumA de *Pseudomonas putida*; Fet3, reductasa férrica de *Saccharomyces cerevisiae*; Fet5, reductasa férrica de *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez Rincón, 2006).

Por lo general, esta proteína muestra secuencias con alrededor de 520 – 550 aminoácidos, con una conformación monomérica globular de tres dominios tipo

barril beta y cuatro átomos de cobre en el interior de la molécula (Figura 3) (Thurston, 1994). No obstante, algunas lacasas muestran una estructura homodimérica con dos subunidades idénticas. Lacasas fúngicas tienen una masa de alrededor de 60 – 70 kDa con un diámetro aproximado de 6 nm, su pH y temperatura presentan un óptimo de actividad en intervalos de 4 – 5 y 50 – 70 °C respectivamente (Baldrian, 2006). Muchas lacasas fúngicas son glicoproteínas con un contenido de azúcar de entre 15 – 80 % y se ha demostrado que la glicosilación puede proteger a la molécula de altas temperaturas, proteólisis, o la inactivación por radicales libres. Sin embargo, esta característica también es una limitante para su producción en otros organismos (Slomczynski et al., 1995).

Una de las principales cualidades por la que lacasa ha sido seleccionada para la transformación de compuestos de interés, es su capacidad inespecífica de oxidar gran variedad de sustratos como mono-, di-, orto-, para-, poli-, amino-, y metoxifenoles, anilinas, bencenotioles, aminas aromáticas y algunos compuestos organofosforados, con la simultánea reducción de oxígeno molecular a agua. Este proceso se encuentra controlado por la diferencia del potencial rédox entre los sustratos y el cobre externo T1 de la enzima (Ribeiro et al., 2014). Además, la lacasa también puede llegar a oxidar compuestos con características diferentes a las de sus sustratos habituales a partir de la formación de radicales que pueden actuar como mediadores rédox. Algunos ejemplos de estos mediadores son compuestos de bajo peso molecular como siringaldehído, vainillina y ácido *p*-cumárico. Los radicales pueden ser oxidados posteriormente

para lograr la formación de quinonas o sufrir diversas reacciones no enzimáticas (Hatakka et al., 1991).

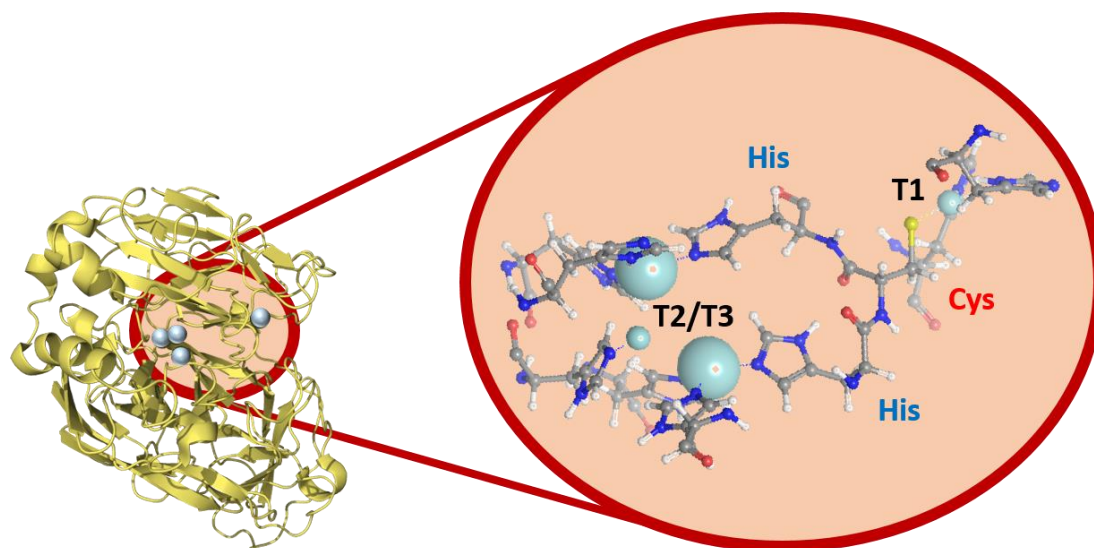


Figura 3. Estructura globular de lacasa y conformación básica de su sitio activo. Los cuatro átomos de cobre Cu^{2+} (azul celeste) señalan los sitios T2/T3 y el sitio T1, conectados a la vez por un tripeptido compuesto por dos residuos de histidina (His) y uno de cisteína (Cys) que funcionan como rutas para el flujo de electrones. Imagen generada con software académico Maestro (Schrodinger Inc.).

La inespecificidad del sustrato en la lacasa es atribuida principalmente a su sitio catalítico y a los mecanismos de acción del mismo. Como se mencionó anteriormente, el centro activo de la proteína se encuentra conformado por cuatro átomos de cobre, el cual es un elemento que desempeña un papel importante en reacciones biológicas de óxido-reducción y el transporte de oxígeno. Dentro de las lacasas existen tres tipos de átomos de cobre, llamados T1, T2 y T3, que

están diferenciados por sus propiedades espectroscópicas, magnéticas y electroquímicas (Claus, 2004).

Frecuentemente, los aminoácidos de los centros de unión al cobre se encuentran distribuidos en cuatro regiones altamente conservadas, denominadas L1, L2, L3 y L4, que pueden estar conformadas de 8 – 24 residuos (Figura 2) (Mittal et al., 2013). T1 es un sitio mononuclear con propiedades paramagnéticas que se encuentra localizado cerca del lugar de enlace del sustrato. Este átomo está coordinado por cuatro ligandos, siendo dos histidinas y una cisteína los ligandos conservados que forman un triángulo fuerte con el ion cobre, mientras que el cuarto ligando es más débil y distante, por lo que puede variar en residuos de metionina, leucina o fenilalanina, afectando el potencial de oxidación de T1 y, por lo tanto, la actividad enzimática de lacasa. El enlace cisteína-cobre es el responsable de la tonalidad azul típica de la molécula, con absorbancia a 600 nm y coeficiente de extinción molar (ϵ) de $5000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ (Morozova et al., 2007). La función de T1 es la oxidación del sustrato por aceptación y transferencia de los electrones extraídos. El sitio incoloro T2 también es mononuclear y presenta una geometría metálica trigonal con propiedades paramagnéticas. Además, se ha relacionado con la actividad redox de la enzima en la reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno y con la inhibición de la actividad enzimática provocada por la interrupción de la transferencia electrónica con haluros, azida, cianuro e hidróxidos. Por último, T3 es un sitio binuclear diamagnético debido al acoplamiento antiferromagnético del par de iones Cu(II) unidos por un puente de

ion hidroxilo. Cuenta con baja absorbancia en el espectro UV, cercana a 330 nm, y es responsable de la reducción de O₂ (Baldrian, 2006).

Mientras que T1 es un sitio independiente, los tres átomos de cobre restantes en lacasas tienden a formar un dominio trinuclear nombrado T2/T3, el cual dirige la reducción de oxígeno por la transferencia de cuatro electrones desde T1. Este sitio se encuentra estabilizado por ocho ligandos de histidina, cuatro de cada uno de los dominios y, a la vez, está conectado con T1 por un tripéptido conservado (His-Cys-His).

1.2.1.2 Aplicaciones

Debido a que se trata de proteínas muy versátiles y robustas, las lacasas han demostrado una estabilidad operacional a distintos rangos de temperatura, pH y concentración de solventes orgánicos. Estas propiedades han logrado la aplicación de la enzima en procesos comerciales para el blanqueamiento de la pulpa de papel, fabricación de celdas de combustible, tratamiento de aguas residuales, degradación de compuestos xenobióticos, síntesis orgánica de compuestos, estabilización de bebidas y el diseño de biosensores (Figura 4) (Liu et al., 2012). El mecanismo de acción de la lacasa para la polimerización de radicales fenólicos la ha convertido en una materia prima importante para la industria alimenticia, donde puede ser utilizada en la estabilización de bebidas, como jugos frutales, vino y cerveza, sin la producción de compuestos nocivos para el ser humano. De igual forma, la polimerización es una ventaja significativa

en la realización de procesos de biorremediación ambiental debido a la facilidad en la separación de los productos de reacción.

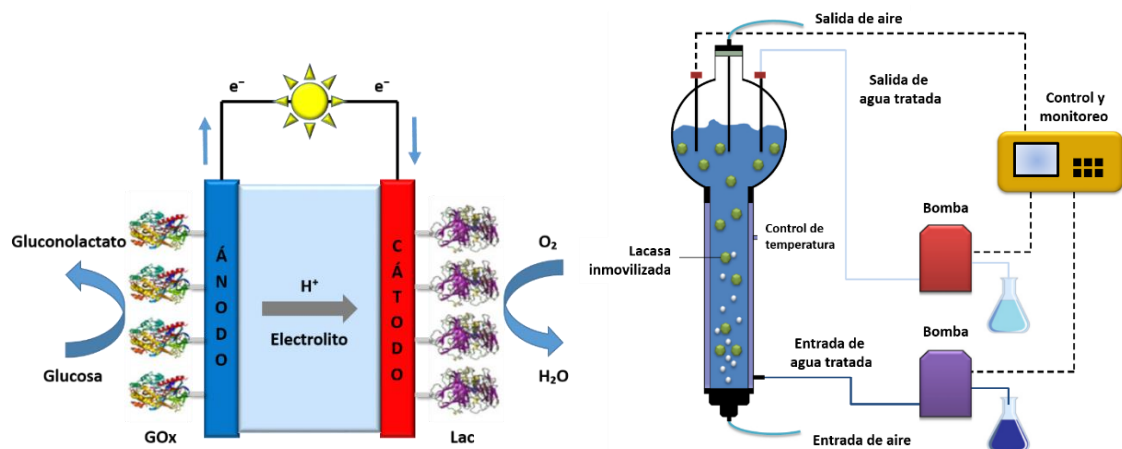


Figura 4. Aplicaciones tecnológicas de lacasa. A la izquierda, modelo de celda de biocombustible enzimática, con glucosa oxidasa (GOx) inmovilizada en el ánodo para la extracción de electrones, y lacasa soportada en el cátodo para la reducción de oxígeno. A la derecha, diseño de planta piloto para el tratamiento de agua residual en la industria textil, el biorreactor de flujo continuo cuenta con lacasa inmovilizada para la degradación del colorante y un sistema de monitoreo constante (Fernández-Fernández et al., 2013).

La aplicación directa de lacasa sobre suelos contaminados es un proceso que suele ser empleado por industrias generadoras de residuos contaminantes como una alternativa para la remoción de compuestos, tales como colorantes sintéticos, pesticidas, aceites, resinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y bifenilos policlorados (BPCs) (Claus, 2004). Además, el uso de esta enzima no se encuentra limitado a procesos de degradación y puede llevar a cabo la síntesis de compuestos naturales, tales son los casos de dímeros de penicilina, bisfenol A y diversas cefalosporinas (Uchida et al., 2001).

Las propiedades rédox de la lacasa la hacen un componente ideal para la producción de cátodos utilizados en celdas de biocombustible enzimáticas (CBE) junto a una gran diversidad de ánodos basados generalmente en peroxidasas, glucosa oxidasa, alcohol deshidrogenasa, entre otras. Las reacciones de oxidación en los ánodos producen electrones que son transportados al cátodo donde la lacasa cataliza la reducción de oxígeno. El flujo de los electrones de un electrodo a otro es utilizado como una fuente limpia y renovable de electricidad (Davis & Higson, 2007). Algunas empresas, entre las cuales se encuentran Novo Nordisk Co. y Novozyme, han logrado patentar productos o sistemas a base de lacasa para su aplicación a nivel industrial (Rodríguez-Couto & Toca-Herrera, 2006).

1.3 Nanomateriales y nanoestructuras

El estudio de los materiales a escala nanométrica es recientemente una de las ramas más activas dentro de la nanociencia debido al descubrimiento de importantes propiedades dependientes de la forma y tamaño de los mismos. Un nanomaterial puede definirse como aquel que posee al menos una de sus dimensiones dentro de un rango de 1 a 100 nm de longitud. Entre estos nanomateriales se incluyen diversas estructuras como: nanopartículas (NPs) esféricas, nanovarillas, nanotubos, nanocubos, nanoestrellas y muchas otras conformaciones, además, pueden estar compuestas de elementos de distinta naturaleza, incluyendo cristales, materiales porosos, a base de carbono, silicio,

metales u óxidos metálicos. Las principales diferencias que presentan los nanomateriales con respecto a los materiales en bulto son: aumento del área superficial, que le permite un mayor contacto con la sustancia de interés, y desarrollo de propiedades ópticas, eléctricas y electrocatalíticas para aplicaciones específicas (Jia et al., 2016).

El conjunto de nanomateriales funcionales ha traído beneficios en su aplicación para biosensores electroquímicos, principalmente los basados en carbono y metales, mejorando la interfaz bioelectroquímica por alongamiento del área electroquímicamente activa, aceleración de la transferencia de electrones y modificación de la inmovilización de biomoléculas (Guo & Wang, 2011).

1.3.1 Nanotubos de carbono (NTCs)

Dentro de algunas de las formas alotrópicas del carbono se encuentran el grafito, grafeno, diamante, fullereno y nanotubos de carbono, estos últimos han tenido gran relevancia en años recientes gracias al aprovechamiento de sus propiedades fisicoquímicas, electrónicas, catalíticas, mecánicas, entre otras. Actualmente, los NTCs desempeñan un papel importante para la nanotecnología en campos como la biología, química, electrónica, medicina y material científico (Luo et al., 2001). NTCs fueron reportados oficialmente en 1991 mientras se realizaba la síntesis de fullerenos a través del método de descarga por arco (Iijima, 1991). Su estructura se fundamenta en una o varias láminas de grafeno

enrolladas que adquieren una forma tubular y que se encuentran separadas por aproximadamente 0.36 nm entre sí.

Las propiedades y clasificación de los NTCs son otorgadas principalmente por la quiralidad y conformación de su estructura. De ahí, que suelen separarse en nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y, los poco comunes, nanotubos de carbono de pared doble (DWCNT), cuya síntesis homogénea se dificulta conforme disminuye el número de capas del nanotubo (Rubianes & Rivas, 2003). La estructura hexagonal de las paredes de los nanotubos, su diámetro y ángulo de enrollamiento, se encuentran altamente relacionados con la conductividad electrónica y pueden adquirir hasta tres tipos de configuraciones distintas: armchair, de carácter metálico conductor; quiral, que presenta un comportamiento semiconductor; y zigzag, en forma de conductor (Figura 5) (Bethune et al., 1993). NTCs de múltiples capas pueden obtener más de una estructura de enrollamiento en cada una de sus paredes modificando de esta manera sus características.

Posterior al informe de su síntesis, se han desarrollado incontables estrategias para la modificación del rendimiento de materiales basados en NTCs, incluyendo, pero no limitando, la aplicación de enlaces covalentes, interacciones hidrofóbicas, adsorción física, y tratamientos ácidos o térmicos. La mayoría de estos procedimientos están enfocados principalmente en la adición de grupos funcionales para mejorar la sensibilidad, solubilidad o actividad del compuesto.

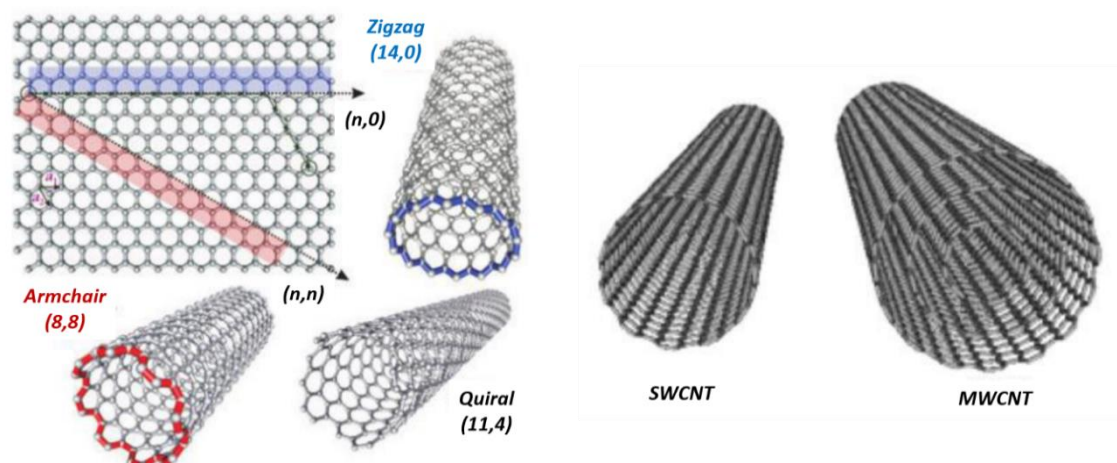


Figura 5. Tipos de estructura de nanotubos de carbono. Del lado derecho, representación esquemática de las configuraciones hexagonales que puede tener una lámina de grafeno al enrollarse para formar un nanotubo de pared sencilla (SWCNT) libre de defectos. SWCNT (n,m) determinaciones abiertas tipo: conductor metálico, armchair (8,8); semiconductor, quiral (11,4); y conductor, zigzag (14,0). Del lado izquierdo, conformaciones de pared sencilla (SWCNT) y pared múltiple (MWCNT) de nanotubos de carbono (Pérez-López & Merkoçi, 2011).

1.3.2 Nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (CN_x)

La incorporación de nitrógeno, boro, azufre o silicio dentro de la estructura de NTCs es una práctica que ha demostrado ser atractiva para la modificación de sus propiedades. El interés en el uso de CN_x se fundamenta en la mejora de las características electrónicas y catalíticas, que es atribuida a la adición de sitios nitrogenados. Por lo general, el nitrógeno en CN_x se encuentra mayormente distribuido en forma pirrólica, piridínica y tipo grafítica o sustitucional, siendo las últimas químicamente activas y responsables de la estructura tipo “bambú” típica en este tipo de nanotubos, además, se comprobó que pueden facilitar la donación de electrones en interacciones carbono-oxígeno por introducción de electrones extra en la red del material (Figura 6) (Glerup et al., 2003).

Por otra parte, los CN_x contienen una gran cantidad de sitios defectuosos en su superficie que suelen ser de gran utilidad para la inmovilización directa de nanoestructuras con un alto nivel de dispersión, evitando la necesidad de procesos de modificación anteriores al depósito (Xu, Jiang, et al., 2010). El dopaje de materiales permite la obtención de semiconductores orgánicos más eficientes con una excelente interacción entre el material biológico y el electrodo (Stoyanov et al., 2009).

En diversos trabajos, como el presentado por Zhu Chen y colaboradores, se ha logrado demostrar la importancia de la cantidad de grupos nitrogenados incorporados en CN_x demostrando sus efectos en la morfología, cristalinidad y actividad de dichos materiales (Chen et al., 2010). Sin embargo, la cantidad de nitrógeno que se puede adicionar en CN_x se encuentra limitada en relaciones atómicas de 1 : 33 – 1 : 10 (N : C) debido a la estabilidad por cambios en la estructura, donde la proporción de las especies nitrogenadas están vinculadas con el método de síntesis de los nanotubos.

Ciertamente, para la mayoría de los casos y aplicaciones, CN_x han resultado ser más eficientes que NTCs convencionales, exhibiendo un progreso en la sensibilidad, estabilidad y reproducibilidad, sobre todo en procesos electrocatalíticos. Por ejemplo, Tang y colaboradores revelaron que compuestos conformados por tan solo CN_x pueden tener un comportamiento metálico o semiconductor con actividad catalítica similar a la de soportes basados en nanoestructuras metálicas (Tang et al., 2009). Inclusive, se ha evidenciado que algunas nanopartículas metálicas solo presentan un efecto sinérgico sobre CN_x

(Zheng et al., 2014), comprobando la interacción entre grupos nitrogenados y metales de transición. Un caso de este tipo es el nitruro metálico FeN_4 (Figura 6A), cuyo sitio activo está involucrado en reacciones reactivas de oxígeno (RROs).

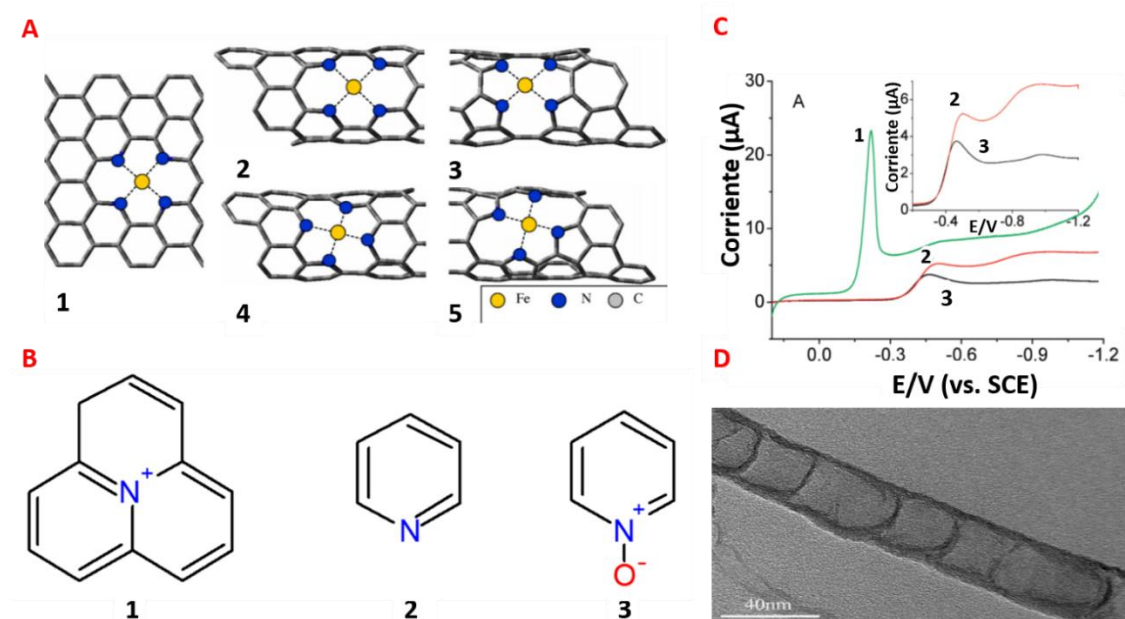


Figura 6. Estructura, conformación y aplicación de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (CN_x). (A) Sitios de sustitución para el complejo FeN_4 en láminas de grafeno (1), y CN_x en coordinación con grupos tipo piridina (2,4) y tipo pirrol (3,5). Las orientaciones se encuentran configuradas de manera axial (2,3) y helicoidal (4,5) (Stoyanov et al., 2009). (B) Especies de nitrógeno más frecuentes en CN_x : tipo grafito (1), tipo piridina (2) y nitrógeno oxidado (3) (Liu et al., 2010). (C) Voltamperometría de barrido lineal (SLV) para reacciones de reducción de oxígeno con CN_x/GCE (1), MWCNT (2), y GCE (3) en una solución 0.1 mol L^{-1} saturada con aire. (D) Micrografía TEM en campo claro de CN_x (Xu, Jiang, et al., 2010).

1.3.3 Renio

De todos los elementos químicos naturales que se encuentran presentes de manera estable en la corteza terrestre, el último en ser descubierto fue el renio.

La concentración de este elemento en la naturaleza es de apenas 0.4 mg ton^{-1} , razón por la cual es considerado un metal valioso. El renio es principalmente producido en forma de perrenato de amonio y ácido perrénico como subproducto durante la extracción y purificación de minerales de cobre y molibdeno. En la actualidad, el país de Chile es el mayor productor de sales de renio, con un 53 % de la producción mundial (Casas et al., 2012).

La aplicación de partículas coloidales o nanopartículas de metales preciosos, particularmente oro, platino, renio, paladio, rodio, plata y sus aleaciones, tiene gran relevancia en procesos catalíticos industriales (Mol, 1999). Los catalizadores a base de renio son resistentes a tratamientos con fósforo, azufre, monóxido de carbono y nitrógeno, previniendo el envenenamiento químico y manteniendo su actividad catalítica (Mucalo & Bullen, 2001). El renio y algunos de sus óxidos son capaces de catalizar un amplio rango de reacciones de oxidación y, en muchas ocasiones, son soportados en materiales a base de óxidos con mayor área superficial como alúmina y circonia (Blom & Kollonitsch, 1962). De igual forma, la selección del soporte es dependiente del tipo de catalizador de renio que será utilizado y su aplicación final. Algunos procesos, incluyendo la producción de diésel y gasolina, hidrogenación de benceno, síntesis de amoníaco y, recientemente, la aromatización de etano y metano, son realizados por catalizadores conformados por renio (Okal et al., 2004).

Dentro de la combinación única de propiedades fisicoquímicas del renio se encuentran: su alto punto de fusión (aproximado a $3157 \text{ }^{\circ}\text{C}$), bajo coeficiente de fricción y buena resistencia mecánica, que lo han llevado a ser considerado como

un material de óptimo rendimiento (Carlen & Bryskin, 1994). Estos argumentos han permitido su uso en el desarrollo y fabricación de dispositivos de tecnología avanzada en conjunto con elementos como tungsteno, níquel o platino. Su uso se destaca en celdas de combustible de óxido sólido (SOFCs), filamentos para espectrómetros de masas, baterías de estado sólido, recubrimientos, dispositivos electrónicos y aeroespaciales (Castriota et al., 2007). Además, isótopos rénicos como $^{188}\text{Re}/^{186}\text{Re}$ han sido probados en aplicaciones biomédicas y son candidatos para radioterapia con mínima toxicidad (Conzone et al., 1998).

El renio es conocido por los múltiples estados de oxidación en que se puede encontrar (0 , 1^+ , 2^+ , 3^+ , 4^+ , 5^+ , 6^+ y 7^+) y que le permiten facilidad de óxido-reducción y formación de diversos compuestos orgánicos e inorgánicos (Figura 7). La pequeña diferencia de entalpía entre los óxidos de renio provoca cambios de oxidación en su superficie y hace difícil la obtención homogénea de un óxido específico (Komiya et al., 1983). Los óxidos binarios, dióxido de renio (ReO_2), trióxido de renio (ReO_3) y heptaóxido de dirrenio (Re_2O_7), son los más estables aún a temperaturas de hasta $850\text{ }^\circ\text{C}$ en el caso del primero y de $400\text{ }^\circ\text{C}$ para el segundo. La creación de óxidos con Re(III) , Re(IV) , Re(V) , Re(VI) y Re(VII) es posible, sin embargo, Re(III) y Re(V) no son estables, como es el caso del trióxido de dirrenio (Re_2O_3) y el pentaóxido de dirrenio (Re_2O_5). De la misma manera Re(I) y Re(II) no son reconocidos como óxidos, ya que únicamente se han encontrado en mínimas cantidades en la interfase de otros óxidos, pero han sido reportados en complejos carbonilos o ligandos organometálicos (Shcheglov & Drobot, 2006). ReO , ReO_2 y Re_2O_7 son extensamente usados como catalizadores, mientras que

ReO_3 es atractivo por sus propiedades electrónicas como su alta conductividad electrónica (10^4 S cm^{-1}) similar a la del cobre (Cazzanelli et al., 2009).

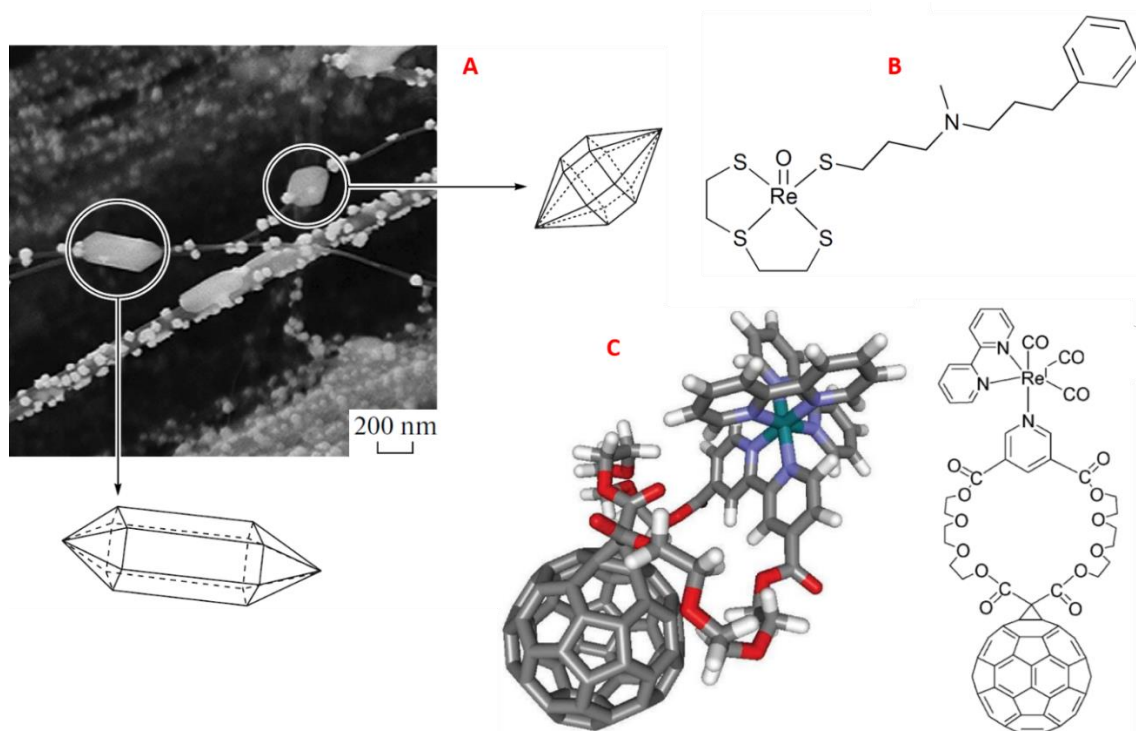


Figura 7. Estructura y conformación de complejos rénicos. (A) Nanopartículas de renio con formas de prisma y bipirámide hexagonal soportadas en NTCs (Kremlev et al., 2015). (B) Complejo de renio análogo a la ketanserina y utilizado como antagonista del receptor 5-HT para serotonina (Dilworth & Parrott, 1998). (C) Estructuras de referencia y geométrica de un complejo rénico basado en una construcción con fullereno (Possamai et al., 2006).

Está claro que el renio presenta alta afinidad con el oxígeno, inclusive en estado metálico, donde puede coordinarse con hasta tres aniones de oxígeno (Miniussi et al., 2012). No obstante, existen pocos estudios de la caracterización e interacción oxígeno-renio en partículas soportadas. Investigaciones previas propusieron la posible creación de interfaces metal/óxido metálico, con un

incremento del estado de oxidación de cada capa del compuesto desde el metal hasta el óxido mayor, muy similar al caso del hierro.

1.4 Compuestos fenólicos

La importancia de los compuestos fenólicos y sus derivados, naturales o sintéticos, está fundamentada en los papeles sistémicos y efectos ocasionados por dichas reacciones. Actualmente, han sido reconocidos poco más de ocho mil compuestos naturales que fueron categorizados como fenólicos, la gran mayoría de ellos son de origen vegetal y se pueden encontrar en forma de fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, taninos, estilbenos, ligninas, entre otros (Stalikas, 2007). La estructura base de este tipo de moléculas se encuentra conformada por un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo, siendo el fenol uno de los compuestos básicos de este grupo. Sin embargo, el número y la posición de estos grupos hidroxilo afecta la reactividad y estabilidad de la molécula. Además, ciertos derivados fenólicos pueden contener grupos funcionales metilos ($-\text{CH}_3$) y nitrosos ($-\text{NO}_2$) (Karim & Fakhruddin, 2012).

La distribución y funcionalidad biológica de los diferentes compuestos fenólicos es amplia y está relacionada con la protección y oxidación celular, pigmentación en plantas y frutos, así como la regulación de rutas metabólicas para la fotosíntesis y síntesis de proteínas. También, la protección solar en plantas puede ser mediada por fenoles con capacidad de absorción de radiación UV como los flavonoides (Stalikas, 2007).

Algunos fenoles son considerados componentes importantes en la dieta humana y presentan un consumo estimado de 25 mg a 1 g por día a través de frutas, vegetales, granos, especias, etc. (Clifford, 1999). Recientemente, están siendo promovidos como elementos benéficos para la salud debido a sus propiedades biológicas y farmacológicas que pueden generar efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antimutagénicos y anticarcinogénicos (Tanaka et al., 1993; Serrano et al., 1998).

Por otra parte, la necesidad de uso y producción industrial masiva de estos compuestos sintéticos es ocasionada por la actividad humana intensiva, con una producción global de 50 mil toneladas al año (Riedel et al., 1993), incluyendo fármacos, colorantes, antioxidantes, saborizantes, cosméticos y plaguicidas, se ha convertido en un grave problema ecológico (Guo et al., 2014). La acumulación y reactividad de productos plaguicidas y sus desechos, principalmente organohalogenados recalcitrantes, pueden generar efectos tóxicos, carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos en humanos y animales inclusive a bajas concentraciones. Una de las propiedades negativas mejor conocidas que ha sido vinculada a compuestos fenólicos, es su capacidad para precipitar proteínas, afectando el metabolismo de los lípidos y la biodisponibilidad de iones metálicos (Bravo, 1998).

Debido a estos motivos, y considerando la importancia biológica, médica, ambiental y toxicológica, se ha incrementado el interés en el análisis y detección de compuestos fenólicos y sus derivados, los cuales tienen el potencial para afectar la salud humana y el medio ambiente de manera significativa.

1.5 Antecedentes

1.5.1 Nanotubos de carbono como soportes catalíticos

El desarrollo de materiales híbridos conformados por NTCs y nanopartículas metálicas ha sido empleado en un amplio rango de aplicaciones, incluyendo la catálisis heterogénea, detección de sustancias de interés, celdas de combustible, conversión y almacenamiento de energía. El primer reporte relacionado con la síntesis y aplicación de un material de tipo NTCs/NPs data de 1994, cuando Planeix y compañía realizaron el depósito de nanopartículas de rutenio (NPs Ru) sobre la superficie de NTCs para la hidrogenación de cinamaldehído, obteniendo beneficios en cuanto a la selectividad del sustrato de hasta un 80 % comparada con soportes de alúmina o carbono sometidos a las mismas condiciones y distribuciones de NPs Ru similares, los cuales mostraron selectividades de 20 – 30 % y 40 % respectivamente (Planeix et al., 1994).

Actualmente existe una innumerable cantidad de trabajos relacionados con este tipo de materiales, con un incremento progresivo año tras año, que describen el soporte de diferentes NPs metálicas y sus óxidos en NTCs; entre los metales más comunes se encuentran: Au, Ag, Pt, Rh, Ru, Pd, Cu, Zn. La preparación de materiales basados en NTCs/NPs se puede realizar por medio de diversas estrategias, de las cuales se destacan la reducción química, depósito electroquímico, dispersión de NPs sobre NTCs funcionalizados, entre otras. La selección de la metodología de síntesis es dependiente de la naturaleza de los materiales y la aplicación final de compuesto (Wu et al., 2011).

La relación entre la actividad catalítica y la dispersión de NPs sobre materiales a base de NTCs ha sido motivo de estudio debido a los beneficios del área superficial del soporte. Esto es evidenciado en análisis como el realizado por Qilu Yao y colaboradores, donde compuestos a base de NTCs y nanopartículas de rodio (NPs Rh) fueron comparados con NPs Rh libres o soportadas en hidroxiapatita, alúmina, óxidos de titanio y silicio, y otros, exhibiendo la mayor frecuencia de recambio en la generación de H_2 a partir de la hidrólisis de borano de amoníaco (NH_3BH_3). Además, esta ganancia de actividad se vio acompañada de un menor requerimiento de energía para su activación y de la estabilidad operacional expresada en la conversión con eficiencia del 100 % y retención del 61 % de la actividad catalítica después de cinco ciclos de uso del material (Yao et al., 2015).

En investigaciones recientes, el encabezado por Yuanhang Cheng demostró el aporte sinérgico del dopaje de NTCs, así como de la incorporación de nanopartículas de plata (NPs Ag) para facilitar las reacciones RROs en un medio alcalino (Figura 8). Los soportes sintetizados estuvieron conformados por nanotubos de carbono de pared múltiple dopados con boro (B-MWCNT) con cargas de 20, 30 y hasta 50 % de NPs Ag. Ag/B-MWCNT reveló que la carga mínima de NPs Ag en el material contribuye a una mayor actividad másica, generando $-1544.13 \text{ mA cm}^{-2} \text{ mg}^{-1}$, mientras que la carga máxima disminuyó dicha actividad hasta $-786.4 \text{ mA cm}^{-2} \text{ mg}^{-1}$. Los resultados fueron atribuidos a la distribución de NPs Ag sobre la superficie de los nanotubos y su agregación al aumentar la carga metálica (Cheng et al., 2015).

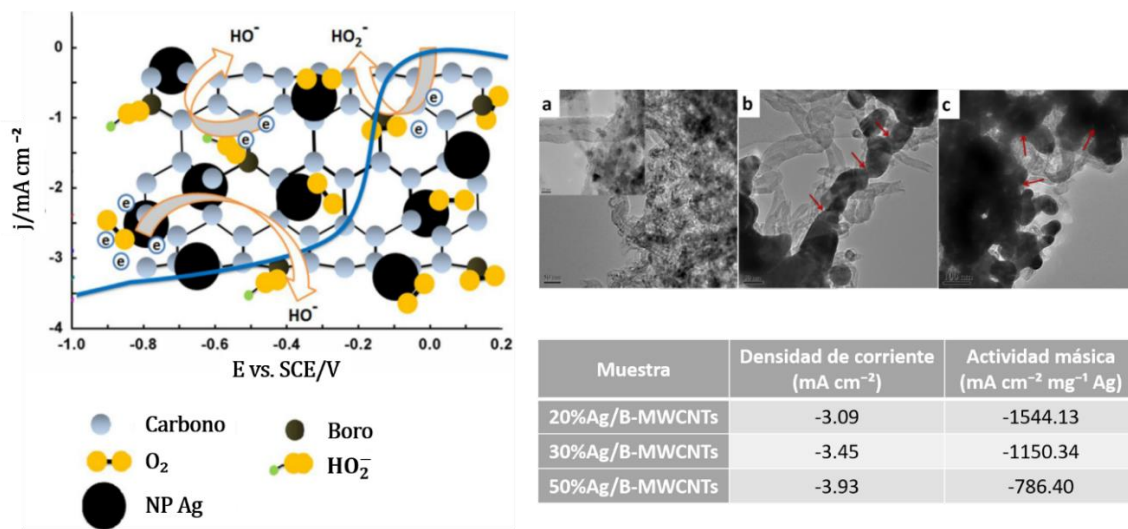


Figura 8. Morfología y propiedades electrocatalíticas del compuesto Ag/B-MWCNT. A la izquierda, ilustración esquemática de la conformación de Ag/B-MWCNT, catálisis de RROs y su relación en términos de densidad de corriente-potencial. En la parte superior derecha se muestra la morfología y aglomeración de NPs Ag en 20%Ag/B-MWCNTs (a), 30%Ag/B-MWCNTs (b), y 50%Ag/B-MWCNTs (c). En la parte inferior derecha se encuentran los resultados electroquímicos de los diferentes catalizadores durante mediciones de voltamperometría de barrido lineal (Cheng et al., 2015).

Sin duda alguna, la actividad y estabilidad de los materiales híbridos NTCs/NPs han sido características primordiales para su aplicación en múltiples condiciones. A este listado también se podría añadir la capacidad de separación o dirección que pueden adquirir NTCs por medio de la aplicación de campos magnéticos. Tal es el caso del proyecto presentado por Pérez-López y Merkoçi, donde se aprovecha el soporte de nanopartículas magnéticas (MNP) junto con NTCs y la enzima tirosinasa (Tyr) para la activación del compuesto MNP/NTC/Tyr en la catálisis y detección electroquímica de catecol. Una de las principales ventajas de este material es la fácil separación de los productos de reacción para su uso simultáneo (Pérez-López & Merkoçi, 2011).

1.5.2 Síntesis de nanopartículas de renio (NPs Re)

El interés en la síntesis controlada de compuestos rénicos, especialmente sus óxidos, se ha elevado desde hace varias décadas, aunque, en general existen muy pocos reportes de la preparación de nanopartículas de los elementos de transición del grupo VII (Mn, Tc y Re). Los diferentes óxidos de renio son candidatos potenciales para reacciones catalíticas de alta remuneración económica, así como para el desarrollo de dispositivos electrónicos de gran calidad. Por tales motivos, se han probado distintos métodos de síntesis con el fin de adquirir partículas de renio, de entre los cuales destacan: la reducción química, impregnación por calcinación bajo atmósfera de hidrógeno, radiación, descomposición térmica, reducción asistida por alcoholes, electrodeposición, entre otros (Ayvalı et al., 2014). Sin embargo, muchos de esos reportes presentan inconvenientes, principalmente en la dificultad de los procesos de síntesis, estabilidad y dispersión de las partículas, o falta de información de los estados de oxidación resultantes.

En el 2001, Mucalo y Bullen reportaron la reducción química del precursor hexaclorrenato de potasio (K_2ReCl_6) con hidracina en un medio acuoso. Las partículas obtenidas mostraron un tamaño dominante alrededor de 316 nm y fueron estabilizadas con goma arábiga. No obstante, la estabilidad de las partículas se vio afectada por la acelerada oxidación del metal a su estado Re(VII), conformado principalmente por iones perrenato (ReO_4^-) (Mucalo & Bullen, 2001). Uno de los principales trabajos en que se encuentra basado el presente proyecto es el publicado por Bedia y colaboradores, cuya investigación

describe la síntesis de NPs Re por el método de emulsiones coloidales en medio acuoso. En dicho análisis se utilizó borohidruro de sodio (NaBH_4) como agente reductor, polivinilpirrolidona (PVP) como agente protector y dos precursores de renio diferentes, perrenato de amonio (NH_4ReO_4) y K_2ReCl_6 , que no mostraron diferencia significativa entre ellos. Este trabajo también comprueba los efectos en la síntesis ocasionados por los siguientes factores: temperatura de reacción, cantidad de agente estabilizante, tiempo de adición de NaBH_4 y el uso de gases como hidrógeno y nitrógeno. Finalmente, una vez estandarizado el proceso, se logró una baja distribución del tamaño en las partículas de entre 0.7 – 1.4 nm (Bedia et al., 2015).

La síntesis de nanopartículas de ReO_3 con diámetros entre 8.5 – 32.5 nm se realizó por medio de la descomposición del complejo Re_2O_7 -dioxano bajo condiciones solvotermales a 200 °C en tolueno (Biswas & Rao, 2006). El estudio hecho por Ayvalı y compañía reportó la síntesis de NPs Re “ultra pequeñas” de 1.0 – 1.2 nm de diámetro a través de la reducción del complejo tetrapropil de dirrenio ($\text{Re}_2(\text{C}_3\text{H}_5)_4$) bajo condiciones moderadas con un flujo de hidrógeno a 3 bar y 120 °C (Figura 9). Estas nanopartículas fueron estabilizadas con el polímero PVP o el ligando hexadecilamina (HDA) mostrando un alto grado de distribución para ambos casos (Ayvalı et al., 2014).

Para inhibir la oxidación de NPs Re por oxígeno atmosférico durante su preparación, se han empleado procedimientos generalmente basados en el uso de medios no acuosos durante el proceso de síntesis. Algunos estudios con medios libres de agua para la síntesis de NPs Re, como el reportado por Zinn,

han sido patentados exitosamente. Zinn menciona el uso de un medio orgánico donde se disuelve cloruro de renio (V) como precursor, utilizando *n*-dodecilamina como estabilizante. El método se fundamenta en la reducción química por NaBH_4 en la cual se obtienen partículas con un amplio rango de tamaño (4 – 100 nm) (Zinn, 2010). Mientras tanto, Chong y Fan quienes han trabajado ampliamente con este tipo de nanopartículas, mostraron la producción y dispersión efectiva de nanocubos de ReO_3 por reducción de una solución de Re_2O_7 /metanol a 250 °C (Chong & Fan, 2013).

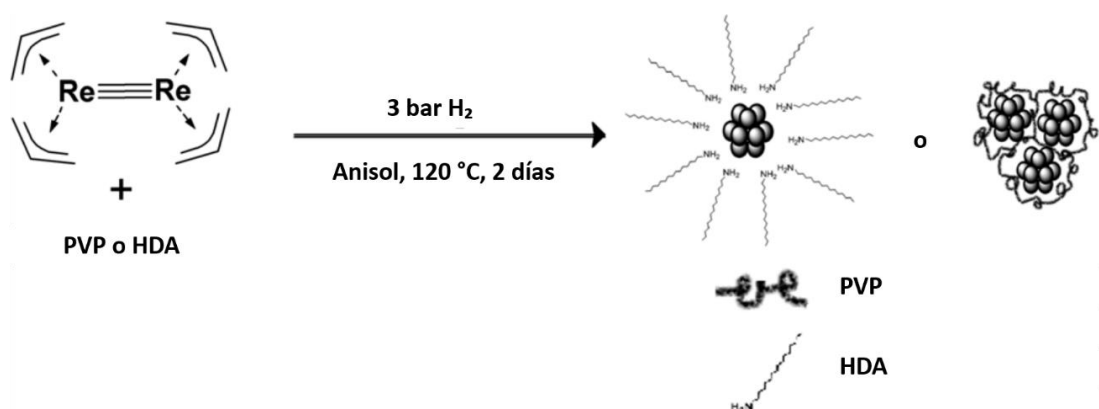


Figura 9. Síntesis por descomposición térmica y efecto de agentes estabilizantes para NPs Re. Proceso de síntesis de NPs Re a partir del complejo organometálico tetrapropil de dirrenio ($\text{Re}_2(\text{C}_3\text{H}_5)_4$) y su interacción con los agentes estabilizantes polivinilpirrolidona (PVP) y hexadecilamina (HDA) (Ayvalı et al., 2014).

El uso exitoso de tácticas basadas en radiación para la preparación de NPs Re también ha sido demostrado. De nuevo, Chong y colaboradores lograron obtener partículas uniformes de aproximadamente 40 nm de diámetro partiendo de la exposición de precursores rénicos, NH_4ReO_4 o dirreniodecacarbonilo

($\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$), a un pulso láser usando ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) como agente estabilizante (Chong et al., 2012). Por su parte, Rojas y Castano realizaron un proceso de reducción radiolítica sobre nanopartículas de ReO_4^- , obteniendo óxido de renio de conformación Re_xO_y con promedio de tamaño entre 10 – 55 nm por irradiación gamma de una mezcla de perrenato sódico en agua-isopropanol en dosis de 10 a 40 kGy (Figura 10) (Rojas & Castano, 2014).

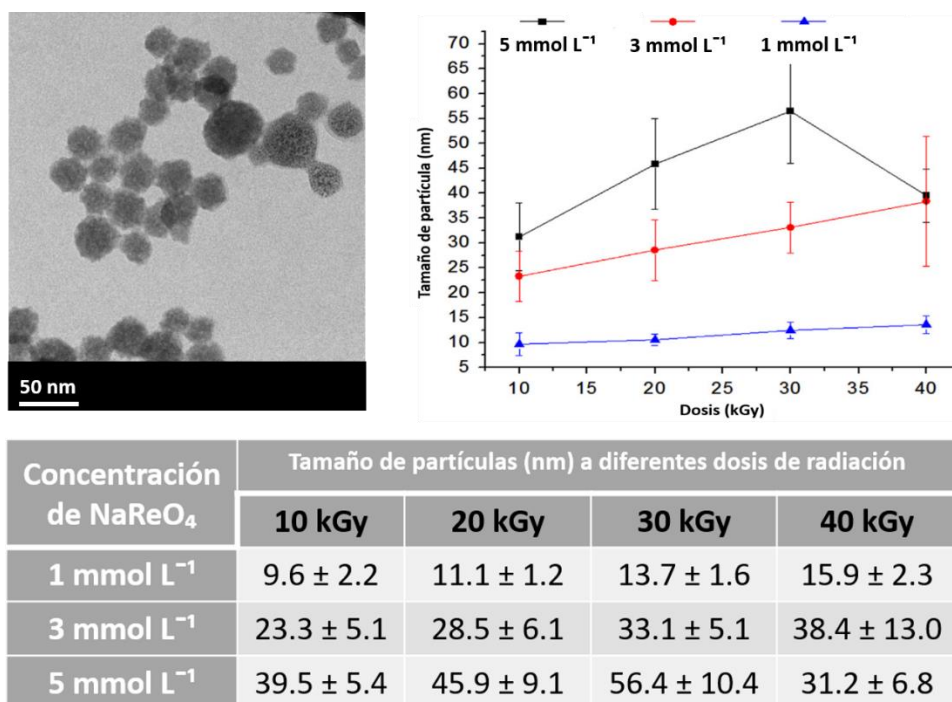


Figura 10. Efecto de la radiación y concentración de precursor durante la síntesis de NPs Re. En la parte superior izquierda se tiene una imagen por micrografía TEM en campo claro de NPs Re después de la síntesis por irradiación gamma a 40 kGy de una solución de perrenato de sodio (NaReO_4) a 3 mmol L⁻¹. Del lado superior derecho se observa la gráfica de correlación entre la dosis de radiación aplicada (10 – 40 kGy) a diferentes concentraciones de sustrato (1, 3 y 5 mmol L⁻¹) y el tamaño de las nanopartículas Re_xO_y obtenidas. En la parte inferior se tiene las mediciones del tamaño de partículas con sus respectivas desviaciones estándar (Rojas & Castano, 2014).

Muchos estudios han explorado la modificación en la morfología y microestructura de NPs Re a través del electrodeposición controlado por el potencial eléctrico, pH, o la composición de la solución de reacción. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar estos fenómenos y la optimización de sus condiciones ha logrado la reducción de ReO_4^- a renio metálico. Un ejemplo de esto es el caso de Hahn y su equipo, quienes realizaron el electrodeposición catódico de ReO_4^- a Re_2O_3 y ReO_3 que posteriormente se terminarían de reducir a potenciales de -0.3 y -0.7 V para formar ReO_2 y Re^0 (Hahn et al., 2007).

1.5.3 Inmovilización de lacasa

Como se mencionó anteriormente, la selección del soporte y el método de inmovilización de las biomoléculas, suelen ser puntos críticos durante la formación de nuevos bionanomateriales con aplicación directa en la industria, limitados principalmente por la modificación de la estabilidad operacional o altos costos de producción. Una inmovilización inapropiada podría resultar en alteraciones conformacionales de la enzima, cambios en la heterogeneidad sobre el soporte o pérdida de la actividad (Arroyo, 1998). Distintas proteínas se han inmovilizado sobre materiales a base de carbono, incluyendo carbón mesoporoso, nanotubos de carbono y grafeno, preferentemente por métodos de absorción o enlace covalente. Estos materiales son seleccionados por su alta área superficial, biocompatibilidad y/o capacidad de permitir la transferencia

electrónica a bajos potenciales eléctricos entre el sistema rédox de la biomolécula activa y la estructura del soporte (Davis et al., 2003).

Lacasa ha sido inmovilizada previamente por diversos métodos fundamentados en interacciones físicas o químicas, principalmente en materiales compuestos por carbono, vidrio, oro, plata, grafito y silicio. De entre los métodos de acoplamiento físico, basados en interacciones iónicas y fuerzas de atracción débiles, están incluidos: atrapamiento, encapsulación y absorción, donde por lo general se utilizan matrices poliméricas o materiales porosos. Comúnmente, estos métodos no ocasionan una alteración en la estructura proteica, pero suelen presentar limitaciones en la transferencia de masa. Mientras que la inmovilización química puede suceder por adsorción, enlaces covalentes o entrecruzamiento, siendo los primeros los que suelen otorgar un alto potencial comercial (Fernández-Fernández et al., 2013; Sheldon, 2007). Las principales ventajas de la inmovilización de la enzima se han representado en el incremento de la estabilidad térmica y su resistencia a condiciones extremas o agentes químicos. Además, lacasa inmovilizada puede ser fácilmente separada de los productos de reacción para ser empleada en procesos de ciclos múltiples.

La inmovilización de lacasa sobre NTCs se realiza principalmente por métodos de adsorción y enlace covalente con ayuda de entrecruzadores o activadores de grupos funcionales, donde los grupos químicos en el soporte son activados para reaccionar con grupos nucleofílicos de la proteína. Muchas proteínas se enlazan covalentemente utilizando la interacción de grupos amino primarios ($-NH_2$),

pertenecientes a residuos de lisina que se encuentran sobre su superficie, debido a su alta reactividad (Brady & Jordaan, 2009).

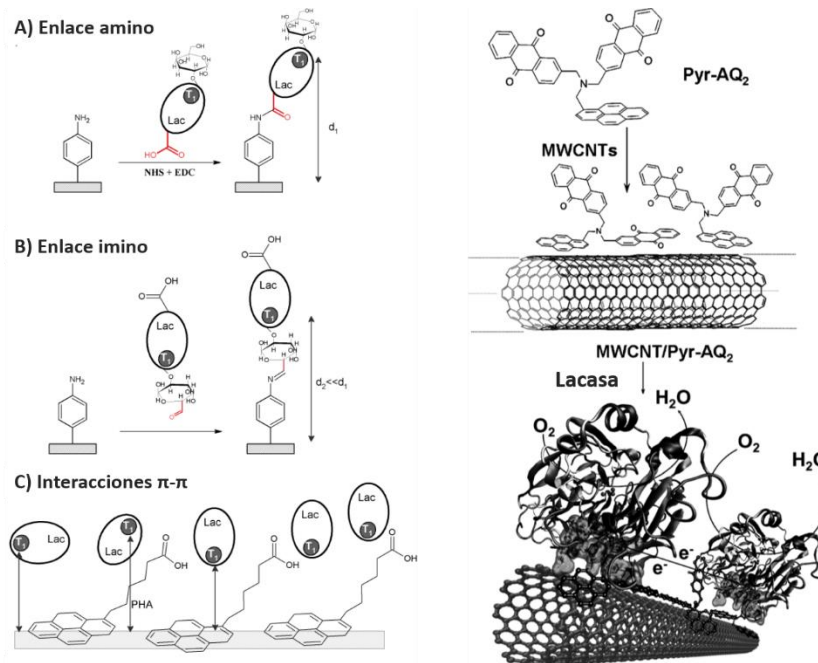


Figura 11. Técnicas de inmovilización de lacasa sobre NTCs. A la izquierda se representan los métodos de inmovilización por formación y activación de enlaces: tipo amino, haciendo uso de activadores como N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDAC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (A); imino, generados a partir de grupos aldehídos (B); e interacciones π - π , por solapamiento de compuestos pirénicos como ácido 1-pirenohexanoico (PHA) (C) (Jia et al., 2012). A la derecha, esquema de las interacciones π - π entre antraquinona y MWCNT para la inmovilización de lacasa por interacciones hidrofóbicas (Bourourou et al., 2013).

También, se puede realizar la adsorción de enzimas a través de la formación de películas delgadas sobre las proteínas soportadas para asegurar su atrapamiento. Xu y colaboradores lograron la preparación del compuesto híbrido Cu-OMC/Lac/CS generando un recubrimiento de quitosano (CS) sobre lacasa

adsorbida en un soporte basado en carbón mesoporoso (OMC). El resultado concluyó en la obtención de un material capaz de realizar la detección de catecol a concentraciones de hasta $0.67 \mu\text{mol L}^{-1}$, con desviación estándar de 2.01 % entre las mediciones realizadas durante 15 días, y un decremento de la corriente de respuesta del 1 % (Xu, Guo, et al., 2010). En el 2015, Tavares y su equipo realizaron la adsorción de lacasa en NTCs no modificados, demostrando un incremento en la actividad para la catálisis de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) a 50 °C comparada con la enzima libre. Además, la actividad del compuesto Lac/NTC se mantuvo constante durante los primeros 34 días con 67 % del valor inicial (Tavares et al., 2015).

M. Bourourou y compañía reportaron una estrategia sencilla para la inmovilización no covalente y orientada de lacasa de *Trametes versicolor* sobre NTCs no modificados, con el uso del derivado pirénico 1-[bis(2-antraquinona)aminometil]pireno, [pyr-(AQ)₂] (Figura 11). La adición de pyr-(AQ)₂ cuadruplicó el rendimiento de la densidad de corriente obtenida en la reducción electrónica directa de oxígeno, con un valor de 0.9 mA cm^{-2} . Bourourou explica que las interacciones hidrofóbicas supramoleculares pireno-MWCNT y antraquinona-lacasa son las responsables de mejorar la transferencia electrónica entre el nanocompuesto y el sitio T1 de la lacasa (Bourourou et al., 2013).

De igual forma, existen trabajos en los cuales se realiza la comparación de diferentes métodos de inmovilización de enzimas para comprobar su viabilidad en alguna aplicación de interés. Tal es el caso del escrito presentado por Jia y colaboradores, quienes probaron la inmovilización de lacasa de *Trametes hirsuta*

utilizando tres procesos diferentes. Las técnicas empleadas estuvieron fundamentadas en: la activación de grupos amino en la superficie del soporte para la posterior esterificación con grupos carboxílicos presentes en residuos aspárticos y glutámicos de lacasa (A), la creación de grupos imino ($RR'C=NR''$) aprovechando los grupos aldehído generados en los residuos glicosilados (B), y la funcionalización del soporte con ácido 1-pirenohexanoico (PHA) adsorbido por interacciones π - π para la modificación de la hidrofobicidad del material (C) (Figura 11). Los biocátodos desarrollados reflejaron las propiedades y desventajas de cada estrategia de inmovilización, siendo A y C materiales más robustos y resistentes, pero carentes del control de la orientación dirigida de la enzima. Mientras que B mostró buena actividad catalítica con una participación de la transferencia de electrones directa del 100 %, sin embargo, la actividad operacional del electrodo fue afectada considerablemente (Jia et al., 2012).

1.5.4 Nanotubos de carbono como soporte de NPs Re

Diferentes tipos de metales pueden afectar de manera única la estructura electrónica en la superficie de NTCs, por lo cual es necesario investigar su efecto en reacciones electroquímicas. La existencia de trabajos relacionados con la interacción de NPs Re y NTCs es escasa, y hasta el momento solo se ha tratado de procesos de síntesis sin alguna aplicación concreta del material. Costa y colaboradores demostraron la encapsulación exitosa de clústeres Re_xO_y en SWCNT y su reducción *in tubulo* partiendo de la mezcla en polvo de SWCNT y

el óxido volátil Re_2O_7 (Figura 12). La reducción se llevó a cabo bajo un tratamiento térmico a $200\text{ }^\circ\text{C}$ con un flujo de hidrógeno de 40 ml min^{-1} . Los resultados mostraron partículas con tamaño mínimo de 0.26 nm y máximo de 2.56 nm dentro de los nanotubos de carbono (Costa et al., 2005).

Dobrzańska-Danikiewicz y su grupo de investigación lograron la síntesis del nanocompuesto MWCNTs-Re por medio del depósito uniforme de NPs Re sobre las paredes oxidadas de NTCs con un rango de $10 - 20\text{ nm}$ de diámetro. La metodología se basó en la reducción térmica a alta temperatura ($800\text{ }^\circ\text{C}$) de precursores de renio en atmósfera de hidrógeno. Otros trabajos de este mismo equipo se enfocan en la modificación, análisis y optimización de las variables en el proceso de síntesis y, algunos más, en la comparación morfológica con catalizadores similares, como es el caso de MWCNT-Pt. Sin embargo, los estudios carecen de información acerca del estado de oxidación del Re y de ensayos para evaluar las propiedades físico y electroquímicas del material para una aplicación específica, las cuales quedan solamente como perspectivas (Dobrzańska-Danikiewicz, Wolany, et al., 2014; Dobrzańska-Danikiewicz, Łukowiec, et al., 2014).

En 2015, Kremlev y coautores desarrollaron la obtención del material MWCNT/Re inducida por depósito químico de vapor (CVD) del compuesto $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$, cuyo propósito principal se enfocó en el análisis de las propiedades del nuevo material. Una de las modificaciones más importantes realizadas en este trabajo fue la variación de la masa inicial del precursor, divergiendo en una relación de $1 : 1 - 1 : 6$ [MWCNT : $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$]. Los resultados demostraron la formación exitosa de

clústeres y nanopartículas en forma de bipirámides y prismas hexagonales en las paredes de MWCNT. También, se encontró una relación entre el tamaño de las nanopartículas y la cantidad másica de sus precursores, observándose estructuras más largas a mayores cantidades de $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$. NPs Re de 120 nm se formaron a relaciones de 1 : 6, mientras que en la relación 1 : 1 se sintetizaron partículas de 30 nm (Kremlev et al., 2015).

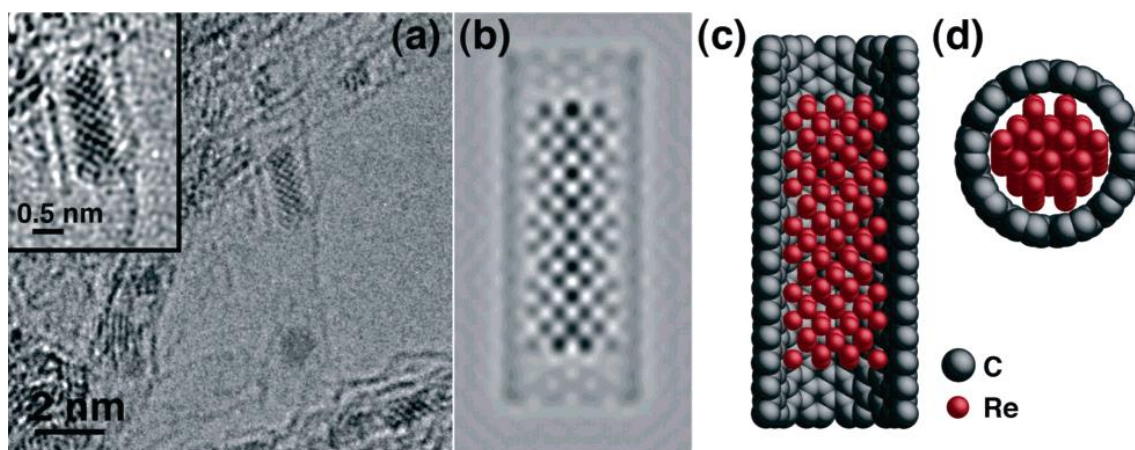


Figura 12. Encapsulación de renio en nanotubos de pared sencilla (SWCNT) a partir de óxido de renio. Imagen TEM de clúster de renio metálico en SWCNT con 1.5 nm de diámetro, en la parte superior izquierda se muestra un acercamiento claro de la estructura del clúster (a). Imagen de la simulación del compuesto a partir del modelo en c (b). Modelo de la encapsulación de renio en SWCNT con corte transversal (c) y vista desde arriba (d) (Costa et al., 2005).

1.5.5 Análisis y detección de compuestos

Los métodos clásicos que se encuentran disponibles para la detección de fenoles son: cromatografía líquida (LC), cromatografía de gases (GC), electroforesis de capilaridad, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), y algunas técnicas electroanalíticas como polarografía y voltamperometría cíclica. Las mediciones realizadas por este tipo de técnicas

suelen ser muy precisas, dando buenos resultados a relativamente bajas concentraciones del compuesto de interés. Sin embargo, los equipos son difíciles de transportar y regularmente se requiere de una laboriosa preparación de la muestra, lo que provoca la necesidad de cuidados especiales durante su manejo (Tabla II). Además, suelen tener resultados ambiguos cuando se trata de muestras con múltiples componentes (Karim & Fakhruddin, 2012).

Tabla II. Estrategias empleadas para la determinación convencional de ácidos fenólicos y flavonoides en fluidos biológicos, plantas, bebidas y alimentos (Stalikas, 2007).

Pre-tratamiento de la muestra	Método de extracción	Método de purificación	Instrumentos de análisis
• Filtración • Centrifugación • Secado al aire • Secado en frío	• Dispersión sónica • Microondas • Líquido-Líquido • Sólido-Líquido • Fluido supercrítico • Matriz de dispersión de fase sólida • Microextracción de fase sólida	• Cromatografía de columna • Cromatografía en contracorriente • Matriz de dispersión de fase sólida • Extracción de fase sólida	• Cromatografía líquida • Cromatografía de gases • Espectrometría de masas • Espectrofotometría UV • Resonancia magnética nuclear • Fluorescencia

A pesar de que técnicas como la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) y cromatografía de gases, inclusive acompañados de un espectrómetro de masas (MS), proporcionan resultados satisfactorios, la aplicación de biosensores en el análisis de compuestos fenólicos representa una alternativa con diversas ventajas. Por tal razón, y tomando en cuenta la necesidad de dispositivos

prácticos y confiables para la detección de compuestos de interés, se justifica el desarrollo y aplicación de métodos cuantitativos como los biosensores. Entre algunas de las principales sustancias que han podido ser analizadas de manera *in situ* por medio del uso de biosensores, se encuentran: metales pesados, bifenilos policlorados, organofosforados, fenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos y algunos plaguicidas (Castro-Ortíz et al., 2007). Por otro lado, sensores basados en NTCs lograron la detección de una gran variedad de moléculas biológicas como nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), ácido úrico, homocisteína, ácido ascórbico, dopamina, glucosa, ácido desoxirribonucleico (ADN), además de algunos compuestos sintéticos entre los cuales se encuentran el óxido nítrico, peróxido de hidrógeno, trinitrotolueno (TNT), y otros (Xu, Jiang, et al., 2010).

1.5.5.1 Detección de compuestos fenólicos (Catecol)

Diversos tipos de sensores han sido desarrollados a través de nano y biotecnología, confiando en las propiedades de nuevos materiales a escala nanométrica y la actividad específica de elementos de reconocimiento biológico. El modelo de los materiales o compuestos que pueden servir como soportes para la inmovilización de algún elemento biológico es muy amplio, y su diseño suele estar basado en las propiedades de dicho elemento y en las condiciones de aplicación a las cuales será sometido el dispositivo.

El uso de catecol como sustrato para el análisis de compuestos fenólicos es una estrategia frecuentemente utilizada, la cual se fundamenta en la estructura

sencilla de la molécula que está conformada solamente por un anillo aromático y dos grupos hidroxilo, además, su fácil manejo en la práctica lo vuelve una buena opción para ensayos electro-bioquímicos. Sin embargo, otros compuestos similares como catequinas, hidroquinonas, dopamina y ácido ascórbico son también empleados en este tipo de estudios.

1.5.5.1.1 Sensores a base de carbono

Las características electrónicas de materiales a base de carbono, en sus diferentes formas alotrópicas, son óptimas para el diseño de sensores electroquímicos usados en la detección de múltiples compuestos. Estos instrumentos aprovechan la transferencia electrónica en las reacciones tipo rédox, por lo cual suelen ser acompañados de enzimas oxidorreductasas y/o nanopartículas metálicas que promuevan su acción electrocatalítica.

Las modificaciones que se pueden realizar para mejorar las propiedades electrónicas de estructuras de carbono son varias, y van desde la adición de elementos como el nitrógeno y el boro a la conformación gráfica, hasta el depósito de nanopartículas metálicas y sus óxidos. Aunque, por si solos, compuestos como grafito y NTCs presentan actividad electroquímica frente a ciertos fenoles (Xu et al., 2004; Portaccio et al., 2010; Guo et al., 2014).

Materiales hechos de NTCs son excelentes soportes para partículas biológicas o metálicas, y su capacidad de detección es dependiente de la sinergia de los componentes. La complejidad del compuesto puede incluir polímeros, enzimas, nanopartículas metálicas, entrecruzadores, y demás (Pérez-López & Merkoçi,

2011), manteniendo niveles de detección del orden de $\mu\text{mol L}^{-1}$ o menores (Tabla III). Algunos de los fundamentos más importantes para este trabajo, están relacionados con el uso de óxidos metálicos como TiO_2 , CuO y ZnO en soportes a base de NTCs, lo cual es una prueba de la aportación electrónica que puede llegar a tener este tipo de nanoestructuras (Xu, Guo, et al., 2010; Jiang et al., 2014). Para el caso del compuesto MWCNT- TiO_2 -Tyr, su capacidad de detección de catecol se encuentra por encima de muchos otros sensores, con un nivel de $9.5 \times 10^{-8} \mu\text{mol L}^{-1}$ (Lee et al., 2007).

Tabla III. Sensores a base carbono para la detección de catecol.

Soporte	Elemento biológico	Transductor	Detección (mol L^{-1})	Referencia
In-ZnO/PI-CNT	N/A	Electroquímico	3.9×10^{-7}	(Jiang et al., 2014)
N-OMC	Lacasa	Electroquímico	3.1×10^{-7}	(Guo et al., 2014)
MWCNT-TiO_2	Tirosinasa	Electroquímico	9.5×10^{-8}	(Lee et al., 2007)
NFs carbono/cobre	Lacasa	Electroquímico	1.18×10^{-6}	(Fu et al., 2014)
Pasta grafito-tionina	Tirosinasa	Electroquímico	1.5×10^{-7}	(Portaccio et al., 2010)
Au/CNF/NPsAu	N/A	Electroquímico	3.6×10^{-7}	(Huo et al., 2011)
MWCNT	N/A	Electroquímico	1×10^{-5}	(Xu et al., 2004)
Cu-OMC/CS	Lacasa	Electroquímico	6.7×10^{-7}	(Xu, Guo, et al., 2010)
SPE/MNP/Tyr/MWCNT	Tirosinasa	Electroquímico	7.61×10^{-6}	(Pérez-López & Merkoçi, 2011)
MWCNT/CS	Lacasa	Electroquímico	6.6×10^{-6}	(Liu et al., 2006)

1.5.5.1.2 Otros materiales

Una de las alternativas para la inmovilización física de biomoléculas es la aplicación de polímeros orgánicos, debido a que pueden generar una red de mallas donde se encuentra atrapado el elemento biológico, permitiendo la difusión y catálisis de la molécula de interés a través del material. Generalmente, la capacidad de detección electroquímica de estos biosensores se encuentra en niveles de $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Tembe et al., 2007; Chen et al., 2013), no obstante, su combinación con nanopartículas de naturaleza metálica puede potenciar su nivel de detección (Kochana et al., 2008), proporcionando a la vez propiedades eléctricas o magnéticas que pueden ser de utilidad para la aplicación final (Figura 13) (Chandra et al., 2013).

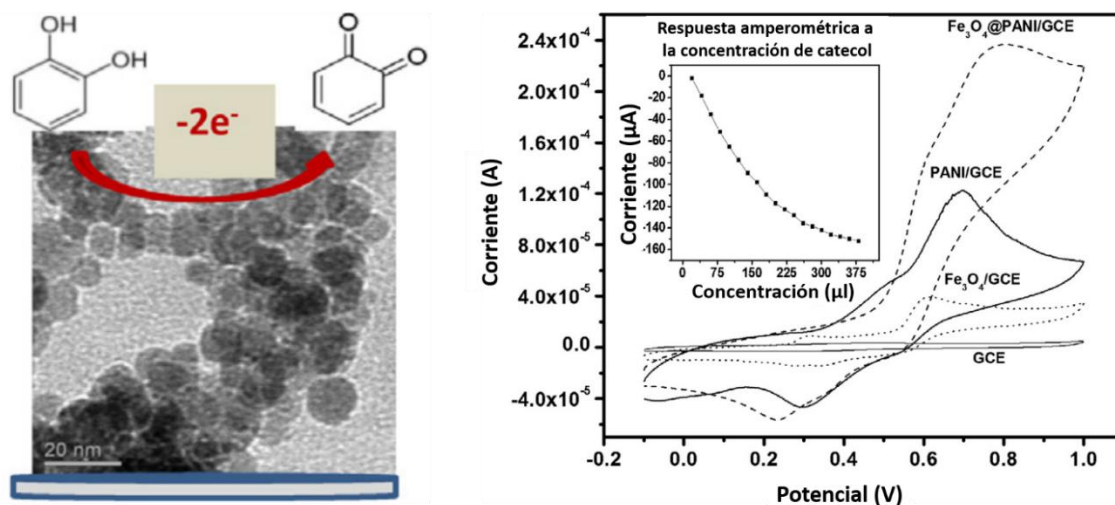


Figura 13. Electrocatalisis ultrasensible de catecol por nanohíbrido de óxido de hierro-polianilina ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PANI}$). A la derecha se observa una imagen en campo claro tomada por TEM del material $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PANI}$ y la representación de la oxidación de catecol a ortoquinona. A la derecha se tienen las señales de respuesta electroquímica por voltamperometría cíclica de GCE, GCE/ Fe_3O_4 , GCE/PANI, y GCE/ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PANI}$ obtenidas en una solución de catecol $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ con la curva de calibración a diferentes volúmenes de catecol (Chandra et al., 2013).

Los sensores a base polímeros no se encuentran limitados a técnicas electroquímicas, y pueden ser empleados en forma de películas delgadas junto a transductores ópticos. A pesar de la sencillez del sistema espectrométrico comparado con otro tipo de transductores, los límites de detección alcanzados por estos materiales aún están en órdenes de magnitud por debajo de mmol L^{-1} (Abdullah et al., 2007; Dykstra et al., 2009).

Tabla IV. Sensores empleados para la detección de catecol.

Soporte	Elemento biológico	Transductor	Detección (mol L^{-1})	Referencia
NPsFe₃O₄@PANI	N/A	Electroquímico	2×10^{-10}	(Chandra et al., 2013)
Au/GA	<i>P. putida</i>	Electroquímico	5.0×10^{-7}	(Timur et al., 2003)
Quitosano	N/A	Óptico	2×10^{-4}	(Dykstra et al., 2009)
Quitosano	Lacasa	Óptico	3.3×10^{-4}	(Abdullah et al., 2007)
Polianilina	Polifenol oxidasa	Electroquímico	1×10^{-6}	(Chen et al., 2013)
Gel de titanio	Lacasa / Tirosinasa	Electroquímico	1.3×10^{-7}	(Kochana et al., 2008)
Agarosa-goma guar	Tirosinasa	Electroquímico	6×10^{-6}	(Tembe et al., 2007)
Pt/GA	Lacasa	Electroquímico	9.5×10^{-8}	(Quan & Shin, 2004)
NRs Cu₂S	Hemoglobina	Electroquímico	5×10^{-7}	(Xu et al., 2012)

De manera simultánea, también ha sido posible emplear la inmovilización directa de elementos biológicos sobre electrodos fabricados con metales nobles (Quan & Shin, 2004) y el soporte de elementos no proteicos, como moléculas activas o células completas (Timur et al., 2003), para el análisis de compuestos como

catecol. Ambas estrategias presentan retos en cuanto a la estabilidad operacional, y su metodología de inmovilización es poco convencional, pero los resultados demostraron ser suficientemente satisfactorios para continuar con su desarrollo (Tabla IV).

1.6 Justificación

Actualmente existen diversos métodos convencionales para la detección de derivados fenólicos. Sin embargo, los biosensores diseñados con esta finalidad han demostrado ser dispositivos capaces de realizar un análisis rápido y con alta sensibilidad de detección. Por lo tanto, se propone la inmovilización de lacasa de *Corioloopsis gallica* en nanotubos de carbono modificados para la formación de nanobiocompuestos híbridos y su aplicación en la detección electroquímica de compuestos fenólicos.

1.7 Hipótesis

El depósito de nanopartículas metálicas y la inmovilización de lacasa de *Corioloopsis gallica* sobre nanotubos de carbono modificados generarán materiales nanoestructurados con facultades para promover la transferencia de electrones a partir de la electrocatálisis de derivados fenólicos, disminuyendo la pérdida de corriente y, por ende, mejorando el nivel de detección.

1.8 Objetivos

1.8.1 General

Sintetizar y caracterizar los materiales basados en nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas y lacasa de *Coriolopsis gallica* para la detección electroquímica de compuestos fenólicos.

1.8.2 Particulares

- Sintetizar nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) y nanotubos de carbono de pared múltiple dopados con nitrógeno (CN_x) por medio de la técnica de espray pirólisis.
- Depositar nanopartículas metálicas sobre los nanotubos de carbono usando el método de emulsiones coloidales.
- Inmovilizar lacasa de *Coriolopsis gallica* en los nanomateriales obtenidos.
- Caracterizar física y electroquímicamente los nanobiocompuestos híbridos.
- Determinar y cuantificar los límites de detección del biosensor.
- Medir la repetitividad y reproducibilidad de las mediciones electroquímicas.
- Determinar la estabilidad y tiempo de vida útil del biosensor.

METODOLOGÍA

2.1 Reactivos

Tolueno, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (99.9 %), ferroceno, $(\text{C}_5\text{H}_5)_2\text{Fe}$ (98 %), bencilamina, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$ (99 %), hexaclororrenato de potasio, K_2ReCl_6 (99.9 %), borohidruro de sodio, NaBH_4 (99 %), catecol, $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ (99 %), etanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (99.5 %), N-hidroxisuccinimida, $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$ (98 %), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\cdot\text{HCl}$ (99 %), ácido 4-morfolino etanosulfónico, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (99.5 %), y solución de nafión® 117 fueron adquiridos con Sigma Aldrich; albúmina de suero bovino liofilizada, 1.41 mg ml^{-1} , y solución Bradford, concentrado de colorante reactivo, se consiguieron con BIO-RAD Laboratories; fosfato de potasio monobásico, KH_2PO_4 (99.4 %), fosfato de potasio dibásico, K_2HPO_4 (99.6 %), y acetonitrilo, CH_3CN (99.98 %), fueron comprados con Fermont-Productos Químicos Monterrey S. A. de C. V.; ácido nítrico, HNO_3 (70 %), se consiguió con Faga Lab; y lacasa de *Coriolopsis gallica*, 7.78 mg ml^{-1} , fue proporcionada por CNyN-UNAM. Todos los reactivos fueron usados sin ninguna purificación adicional. Los experimentos se realizaron con agua desionizada, con una resistencia específica de $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ (25°C), la cual fue obtenida con un sistema de purificación de agua Direct-Q 5 UV.

2.2 Síntesis de nanotubos de carbono

La síntesis de nanotubos de carbono de pared múltiple, denominados a partir de esta sección simplemente como MWCNT, y nanotubos de carbono de pared múltiple dopados con nitrógeno (CN_x) se realizó por medio de la técnica de depósito químico de vapor asistida por aerosol (AA-CVD), o espray pirólisis (Alonso-Núñez et al., 2006). Para la producción de MWCNT se requirió de una mezcla compuesta por tolueno/ferroceno, mientras que, en el caso de CN_x se necesitó una solución de bencilamina/ferroceno. El crecimiento de los nanotubos de carbono se llevó a cabo directamente en un tubo de cuarzo, sin la aplicación de un sustrato. En ambos casos se utilizó una relación de 2.5 % en peso ($(\text{C}_5\text{H}_5)_2\text{Fe} : \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ o $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$). El hierro presente en el ferroceno funcionó como “semilla” y andamio para la elongación del nanotubo y, por su parte, el tolueno y la bencilamina fungieron como fuentes de carbono y carbono/nitrógeno respectivamente.

El sistema empleado para la síntesis es representado en la Figura 14, y se encuentra compuesto por un horno de tubo eléctrico Thermo Scientific TF55030A-1, purgado previamente con un flujo de argón de $0.1 - 0.2 \text{ L min}^{-1}$ mientras se calentaba a $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. La reacción se realizó a $925 \text{ }^\circ\text{C}$ con un flujo de argón de $4 - 5 \text{ L min}^{-1}$ durante 15 minutos. Una vez terminada la reacción el flujo de argón fue retirado y se dejó enfriar el sistema para la extracción del material.

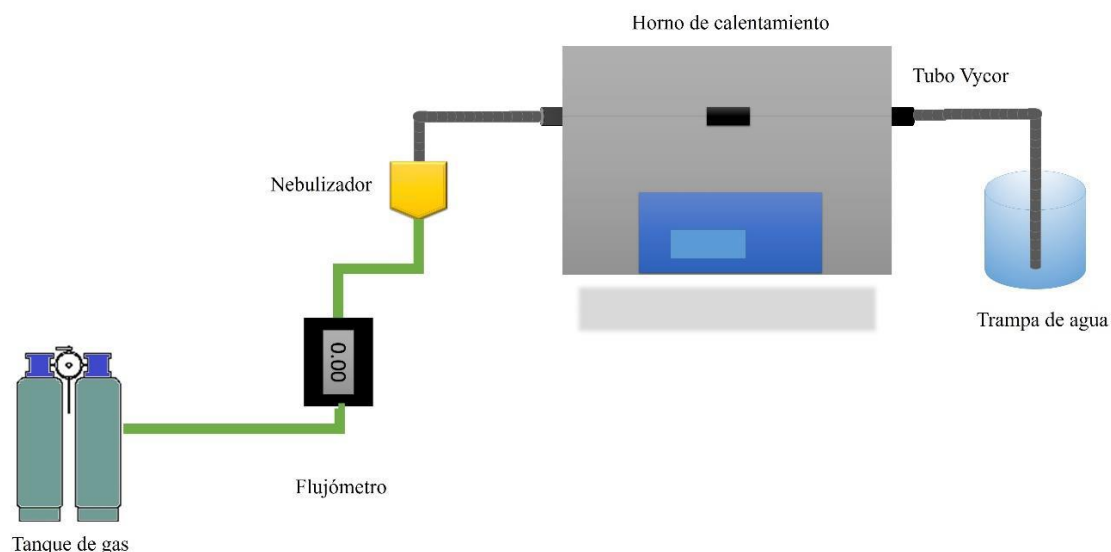


Figura 14. Esquema del sistema para la síntesis de NTCs por medio de depósito químico de vapor asistido por aerosol (AA-CVD) (Bonilla-Miranda, 2015).

2.3 Funcionalización y purificación de NTCs

Nanotubos de carbono oxidados, o-NTC y o-CN_x, fueron preparados usando ácido nítrico como agente oxidante. Inicialmente, se realizó una mezcla de 0.5 g de NTCs por cada mililitro de ácido nítrico y se dispersaron en un sonicador Fisher Scientific FS20 durante 1 h. La solución fue colocada en un sistema de reflujo a 120 °C en agitación vigorosa durante 4 h, usando glicerol como medio de calentamiento. El material fue filtrado y lavado con agua desionizada en un sistema de vacío con una membrana de nitrocelulosa Millipore con diámetro de poro de 0.22 micras, y se terminó de secar en un horno a 40 °C durante 24 h.

2.4 Reducción *in situ* de NPs Re sobre NTCs

Las NPs Re fueron depositadas directamente sobre la superficie de NTCs modificando el método de emulsiones coloidales realizado por Bedia y su equipo (Bedia et al., 2015). Primero, se dispersaron NTCs en agua desionizada y, después de 1 h, fueron agregados 10 ml de una solución de K_2ReCl_6 30 % molar (Re : C) a la mezcla y se dispersó durante 1 h más. Simultáneamente, se preparó una solución de $NaBH_4$ con una relación molar 10 : 1 ($NaBH_4$: Re) en 10 ml de agua desionizada fría (4 °C) y fue agregada lentamente a la mezcla mientras se mantenía en agitación constante. La reacción se dejó durante 4 h a temperatura ambiente y el material fue filtrado y lavado por el método descrito anteriormente.

2.5 Técnicas de caracterización fisicoquímica y morfológica

Un microscopio electrónico JEOL JEM-2100F, equipado con un detector de energía dispersiva de rayos X (EDS), fue utilizado para conocer el tamaño y morfología de las muestras por microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM). Los materiales se prepararon por dispersión en 2-propanol y se depositaron sobre rejillas de cobre. Para obtener imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) se requirió de un microscopio electrónico JEOL JSM-5300. Un análisis termogravimétrico (TGA) se llevó a cabo por degradación térmica en atmósfera oxidante de las muestras desde temperatura ambiente (18 – 26 °C) hasta 800 °C con una velocidad de calentamiento de 4 °C min⁻¹ bajo un flujo de 100 ml min⁻¹ de aire usando un equipo TA SDTQ600. Los datos fueron

analizados con el software Origin Pro 8. Las mediciones de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) fueron obtenidas con un analizador electrónico hemisférico SPECS-PHOIBOS-150 WAL y una fuente μ -FOCUS 500 X-Ray. Los resultados se trataron con el software Ltd Casa XPS, donde fueron sustraídas las bases de los espectros de C 1s, N 1s y Re $4f_{7/2}$ utilizando el método no lineal de Shirley. Todos los espectros se ajustaron a una energía de enlace de 284.3 eV para C 1s, la cual representa la estructura gráfica C - C en nanotubos de carbono. La deconvolución de los picos se realizó por medio de un ajuste con una función de circunvolución Gaussiana – Lorentziana (70 % – 30 %) y el ancho completo de los picos a media altura (fwhm) se estableció en 1.6, 1.7 y 1.9 para C 1s, N 1s y Re $4f_{7/2}$ respectivamente. Para los dobletes de renio en las señales, Re $4f_{7/2}$: Re $4f_{5/2}$, se tomaron en consideración la relación de área 1 : 0.75 y una separación de los picos de 2.43 eV según lo indicado en el manual (Moulder et al., 1995).

2.6 Análisis electroquímicos

Para analizar la contribución electroquímica de cada uno de los componentes en los materiales, se caracterizaron distintos compuestos a partir de nanotubos de carbono y sus variantes, tomando como base NTCs obtenidos después del proceso de síntesis (MWCNT y CN_x) y NTCs oxidados por medio de tratamiento ácido (o-MWCNT y o-CN_x), además del equivalente de cada material posterior al depósito de NPs Re y la inmovilización enzimática de lacasa de *Coriolopsis gallica*, creando diferentes compuestos de tipo NTCs-NPs Re-Lac.

2.6.1 Preparación de electrodos GCE/NTC y GCE/NTC-Re

La superficie de los electrodos de carbón vítreo (GCE), con 3 mm de diámetro, fue pulida sobre un paño Tex-Met® C con suspensiones de alúmina de 1.0, 0.3 y 0.05 micras secuencialmente. Después, fueron limpiados con agua y 2-propanol para retirar el material excedente.

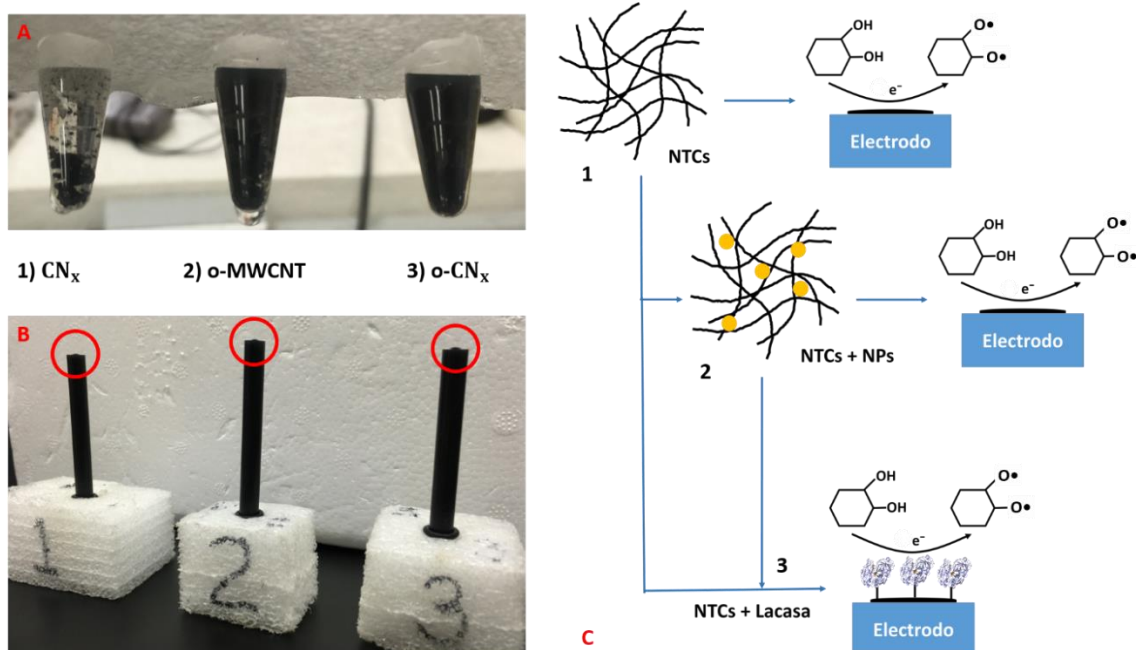


Figura 15. Método de preparación de electrodos para análisis de voltamperometría cíclica. Imágenes de la dispersión por ultrasonido (A) y depósito sobre área activa en GCE enmarcada en círculos color rojo de CN_x (1), o-MWCNT (2) y o-CN_x (3) (B). Representación esquemática de la preparación de los electrodos y mediciones electroquímicas en las diferentes etapas: NTCs no modificados (1), NTCs después del depósito de NPs Re (2), y NTCs después de la inmovilización de lacasa de *Coriolopsis gallica* (3) (C).

Las soluciones, o “tintas”, de los diferentes materiales a base de NTCs se prepararon por dispersión de 0.5 mg de material en una mezcla de 250 µl de amortiguador de fosfatos salino (PBS) y 150 µl de etanol (98 %) durante 1 h.

Posteriormente, se agregaron 2.5 μl de la tinta sobre la superficie del GCE pulido y se dejó secar a temperatura ambiente (Figura 15).

2.6.2 Voltamperometría cíclica (CV)

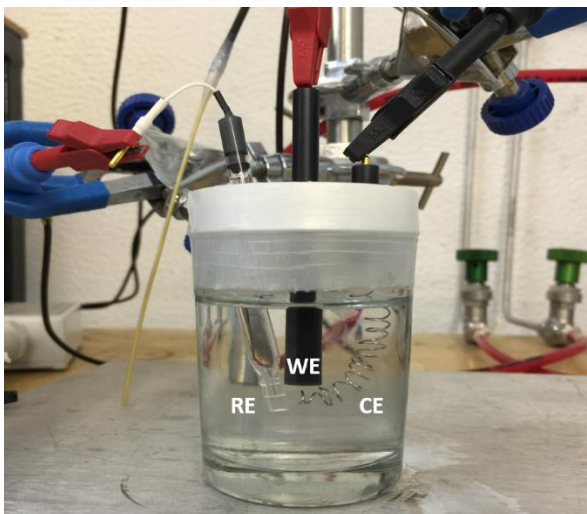


Figura 16. Celda electroquímica con configuración de tres electrodos. Imagen del sistema utilizado para las mediciones por voltamperometría cíclica, los electrodos utilizados fueron: alambre de platino como contra electrodo (CE), electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl, 3M NaCl, 0.209 V vs. NHE) como electrodo de referencia (RE), y electrodo de carbón vítreo (GCE) fue aplicado como electrodo de trabajo (WE). La solución electrolítica fue de 50 ml de amortiguador PBS 0.1 mol L⁻¹ a pH 7.0, variando las concentraciones de catecol de 1 mmol L⁻¹ – 100 nmol L⁻¹ en cada medición.

Todas las mediciones electroquímicas se realizaron con un potencióstato/galvanostato Autolab PGSTAT-302N utilizando una celda con configuración de tres electrodos a temperatura ambiente (16 – 28 °C). Un alambre de platino sirvió como contra electrodo (CE), un electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl, 3M NaCl, 0.209 V vs. NHE) fue usado como electrodo de

referencia (RE) y un electrodo de carbón vítreo fue aplicado como electrodo de trabajo (WE). El electrolito utilizado se conformaba de 50 ml de amortiguador PBS 0.1 mol L⁻¹ a pH 7.0 y diferentes concentraciones de catecol (1 mmol L⁻¹ – 100 nmol L⁻¹) (Figura 16).

Los parámetros de la medición se realizaron con respecto al sustrato utilizado, aplicando un voltaje superior (upper voltage) de 0.6 V y un voltaje inferior (lower voltage) de -0.2 V. La dirección del análisis fue de negativo a positivo durante un mínimo de 15 ciclos con una velocidad de barrido de 50 mV s⁻¹ (Portaccio et al., 2010).

2.7 Ensayos de caracterización bioquímica

2.7.1 Micro Bradford

Para este análisis se realizó una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína de referencia (Figura 28). Se generaron diferentes ensayos usando BSA (1 – 10 µg ml⁻¹) con 200 µl de solución de Bradford y aforando hasta 1 ml con amortiguador PBS 0.1 mol L⁻¹ a pH 7.0 en una celda de cuarzo. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reaccionar durante 5 min antes de ser medida en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-Vis) Lamda 25 Perkin Elmer a 595 nm. Para la lacasa se aplicó el mismo procedimiento, tomando en consideración los factores de dilución al momento de realizar los ensayos para así obtener valores de absorbancia menores a 1

(Bradford, 1976). Todas las mediciones se realizaron por triplicado ($n = 3$) y los resultados fueron tratados con el software Origin Pro 8.

2.7.2 Actividad enzimática

La actividad catalítica de lacasa fue determinada espectrofotométricamente aprovechando la oxidación de siringaldazina, ya que este sustrato cuenta con una reacción colorimétrica específica de lacasa. Cada ensayo se preparó con 100 μl de siringaldazina 500 mmol L^{-1} , usando diluciones de lacasa a concentraciones y volúmenes que permitieran la cuantificación de la actividad enzimática sin exceder la unidad de absorbancia, y se terminó por aforar con amortiguador PBS a 1 ml. La longitud de onda se ajustó para mediciones a 530 nm durante 2 min (Baldrian, 2006). Las curvas y resultados fueron obtenidos con el software Origin Pro 8.

2.8 Inmovilización de lacasa en NTCs

La inmovilización de lacasa se realizó directamente sobre la superficie del GCE con los distintos materiales a base de NTCs tratados. Por medio de una reacción de acoplamiento covalente, mediada por EDAC y NHS, se promovió la formación de grupos “salientes” a partir de la activación de grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) generados en los distintos NTCs para su posterior esterificación con grupos amino primarios ($-\text{NH}_2$) presentes en lisinas (LYS) de la proteína.

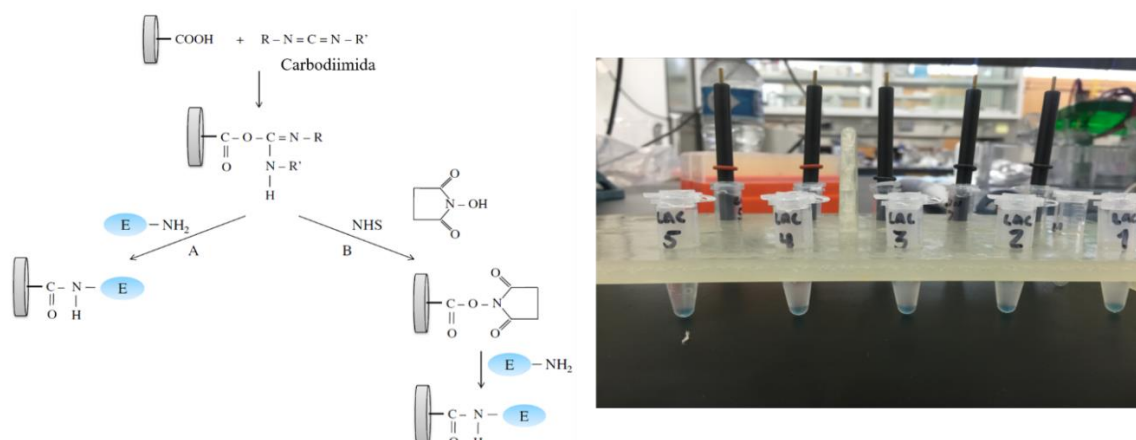


Figura 17. Método de inmovilización de lacasa por reacción de carbodiimida. A la izquierda se ilustra el esquema de inmovilización enzimática por medio de la interacción de los grupos -COOH en el soporte y grupos -NH₂ de la enzima (E). La interacción directa del complejo COOH-EDC-NH₂(E) se representa en la ruta A, y el uso de NHS como activador y formador de grupos salientes es mostrada en B (Sassolas et al., 2012). A la derecha se observa una imagen de la aplicación del método de inmovilización usando EDAC : NHS directamente sobre la superficie activa de GCE/NTCs.

Primeramente, soluciones frescas de EDAC 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y NHS 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ se prepararon con amortiguador morfolino etanosulfónico (MES) 0.1 mol L^{-1} , pH 5.0 a 4 °C. Por otro lado, los electrodos GCE/NTC y GCE/NTC-Re fueron elaborados como se describió anteriormente y, una vez estuvieron secos, se sumergieron en una mezcla de EDAC : NHS con proporción en volumen 2 : 1, dejándose reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, los electrodos fueron retirados de la solución y lavados con amortiguador PBS. Después, se colocaron en una solución de lacasa concentrada a 258.06 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en amortiguador MES durante 2 h más, siendo lavados y almacenados con amortiguador PBS a 4 °C para mediciones posteriores (Figura 17) (Coulet et al., 1974).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Síntesis de nanomateriales

La síntesis de NTCs por medio de la técnica de espray pirólisis, usando ferroceno como fuente de hierro, logró la obtención exitosa de ambos tipos de NTCs empleados en este trabajo, MWCNT y CN_x , con lotes de producción de hasta 260 mg de NTCs. Por su parte, el tratamiento con ácido nítrico demostró cambios en la hidrofobicidad de los materiales, así como su purificación y la remoción parcial de residuos de hierro.

Anteriormente, se ha discutido la efectividad de usar $NaBH_4$ para la reducción de iones ReO_4^- , generando una solución coloidal con coloración café oscuro vinculada a la formación de óxidos de renio, entre ellos ReO_2 . El depósito de NPs Re aplicando la reducción *in situ* sobre la superficie de NTCs en solución acuosa llevó a la formación no uniforme de nanopartículas y clústeres de renio con diámetros menores a 10 nm.

Las características morfológicas, físico y electroquímicas de los materiales obtenidos se analizaron como se describe a continuación. Se muestran los resultados más relevantes en esta sección y otros datos referidos en los anexos del trabajo.

3.2 Caracterización

3.2.1 SEM

Debido al método de síntesis careciente de sustrato, el proceso de crecimiento de NTCs comienza utilizando el hierro presente en el ferroceno como “semilla”, mismo que también sirve de andamio durante el proceso de elongación. Por medio de microscopia electrónica de barrido se logró observar la morfología de los NTCs obtenidos, los cuales crecen de manera adyacente generando la formación de paquetes o “escobillas” (Figura 18a) que hace difícil su manejo o modificación a partir de otros procesos.

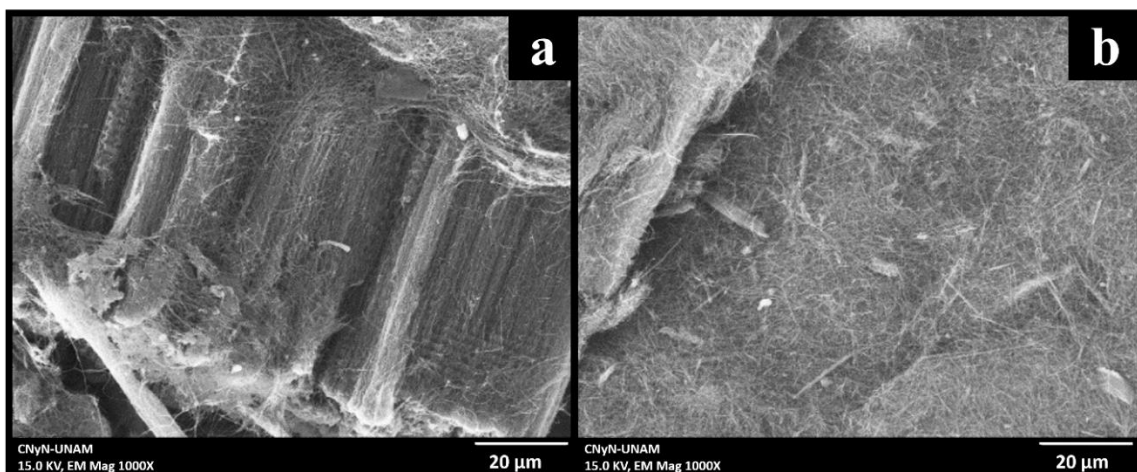


Figura 18. Imágenes de CN_x por microscopia SEM. Las imágenes fueron tomadas con una resolución de 1000X. CN_x extraídos después del proceso de síntesis empaquetados en forma de “escobillas” (a), o-CN_x posterior a la dispersión por sonicación y tratamiento oxidativo con HNO₃ (b).

Por este motivo, se requiere de la dispersión de los NTCs empaquetados en los materiales antes de ser sometidos a procesos donde se pretende aprovechar su

área superficial de manera uniforme, como la modificación o funcionalización homogénea de sus paredes con nanopartículas metálicas u otros componentes. El tratamiento con HNO_3 permite una mejor dispersión de NTCs en soluciones acuosas (Figura 18b) debido al daño estructural y funcionalización de las paredes con grupos oxidados, que lo convierten en un material menos hidrofóbico. Además, este tratamiento oxidativo también ayuda a la remoción de hierro y otras partículas presentes en el material (Figura 29).

El microscopio electrónico SEM también se encuentra equipado con un espectrómetro de energía dispersiva (EDS), que puede ser utilizado para corroborar la presencia de elementos químicos en las muestras por medio de un análisis elemental en masa. Esta técnica es de gran utilidad después de la remoción o incorporación inducida de un elemento en el material. Sin embargo, se trata de un análisis con sensibilidad limitada, de manera que la detección de elementos con poca incidencia en las muestras de NTCs fue casi imperceptible. Tal fue el caso del renio en la muestra o-CN_x-Re (Figura 19) que mostró un pico predominante correspondiente al carbono, el elemento más abundante del material, mientras que sólo se pudo determinar un pico característico de renio, esto probablemente debido a la baja concentración del metal en la muestra analizada. En el espectrograma también se obtuvieron picos provenientes de hierro, lo cual indica que el método de purificación a través del tratamiento oxidativo no es suficiente para eliminar el hierro residual en los NTCs después de la síntesis, principalmente en el interior de la estructura.

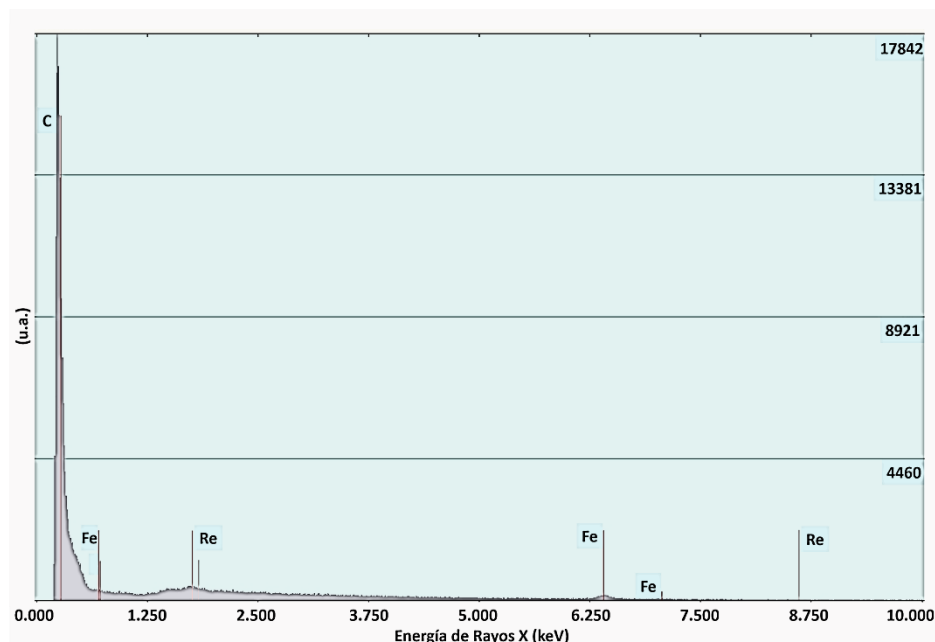


Figura 19. Espectrograma del análisis elemental de o-CN_x-Re por espectrometría de energía dispersiva (EDS) en SEM. Se muestra una señal predominante para el carbono (C) y picos de los elementos hierro (Fe) y renio (Re) que indican su presencia en el material o-CN_x-Re.

3.2.2 STEM

La síntesis a partir de AA-CVD dio como resultado NTCs de diferentes longitudes con diámetros menores a 100 nm (Figura 20a). La morfología de los materiales sintetizados con bencilamina, CN_x y derivados, pudo ser observada con mejor claridad gracias a la alta resolución del microscopio electrónico TEM. Estos nanotubos mostraron características particulares provocadas por el dopaje con nitrógeno, el cual ocasiona un desorden en su estructura que se expresa como dobleces en las paredes y modificaciones internas que le dan una forma descrita como estructura tipo “bambú” (Figura 20b).

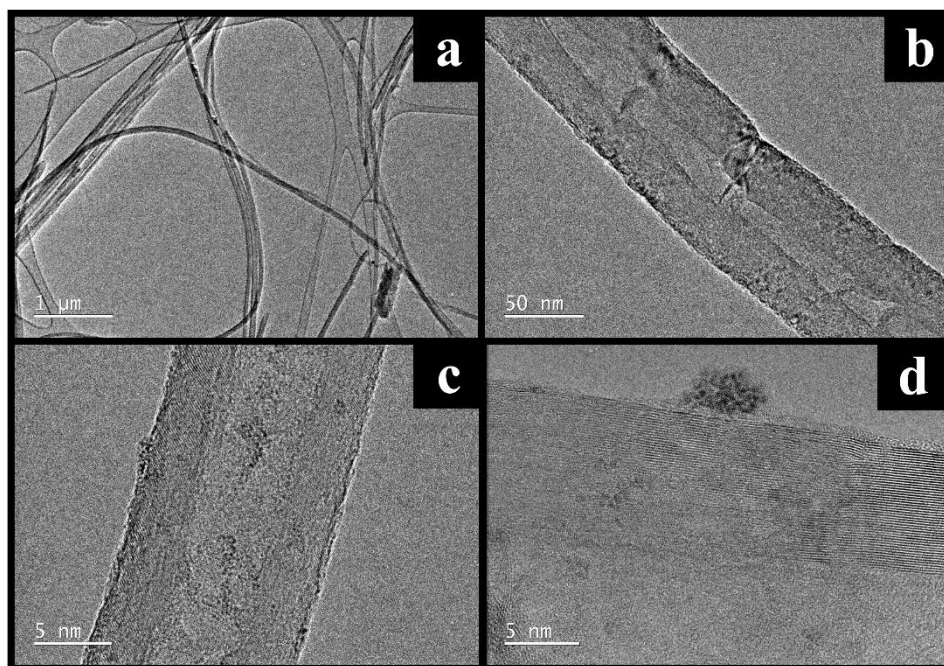


Figura 20. Imágenes de micrografías TEM en campo claro de o-CNT_x y o-CNT_x-Re. Red de nanotubos de carbono tipo o-CNT_x de diferentes longitudes y diámetros (a). Estructura interna tipo “bambú” y dobleces en las paredes característicos de o-CNT_x (b). Formación de clústeres de renio sobre las paredes de o-CNT_x-Re (c). Acercamiento a clúster de renio sobre la pared externa de o-CNT_x-Re (d).

Para analizar de una manera más detallada las nanopartículas metálicas presentes en los diferentes NTCs, también se practicaron análisis en campo oscuro (dark field) aprovechando la iluminación oblicua para mejorar el contraste de las muestras que no se visualizan correctamente con las técnicas de iluminación de campo claro. Los objetos no coloreados, como algunas nanopartículas metálicas, suelen tener índices de refracción cercanos a los objetos que los rodean. Por lo tanto, el uso de esta técnica fue de vital importancia para la detección de elementos metálicos en los materiales.

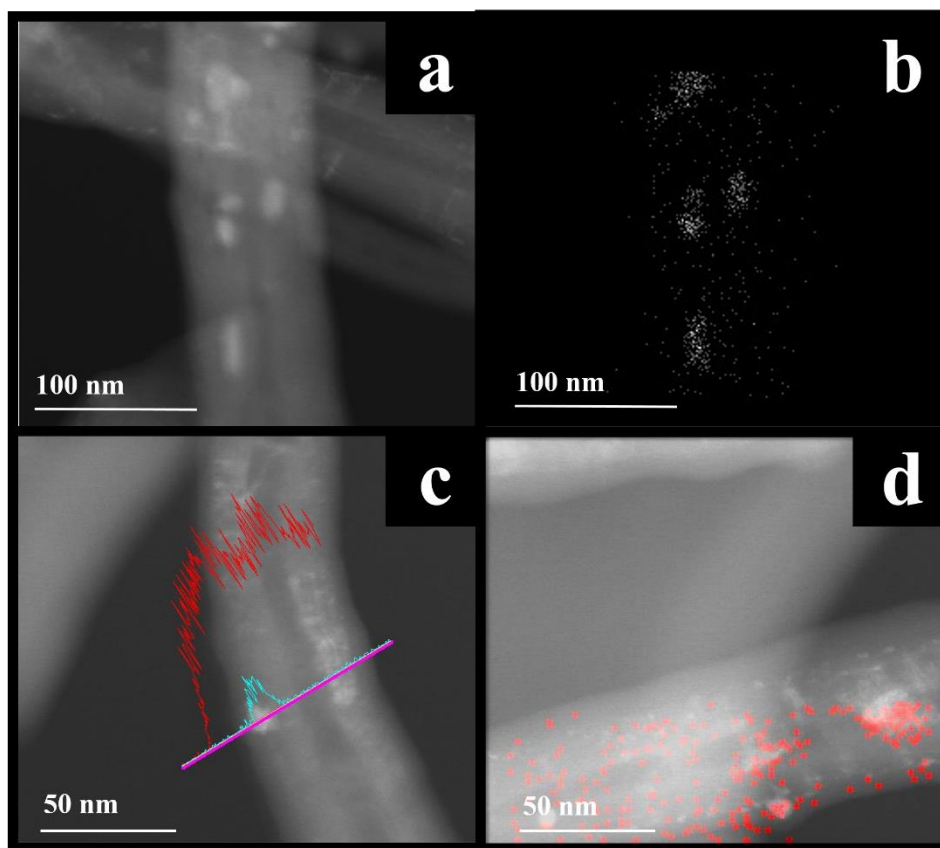


Figura 21. Imágenes de micrografías TEM en campo oscuro de o-CN_x y o-CN_x-Re. Nanotubo de carbono tipo CN_x con nanopartículas de naturaleza metálica (a). Corroboración por medio de mapeo elemental de la presencia de hierro (blanco) en a (b). Nanomaterial o-CN_x-Re analizado por barrido elemental lineal, se muestra carbono en color rojo y renio en azul (c). Mapeo elemental de renio (rojo) sobre la muestra o-CN_x-Re (d).

De igual manera, como se demostró por EDS-SEM (Figura 19), el análisis de espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS-STEM) reveló que el hierro aún se encuentra presente en los NTCs inclusive después de realizar los métodos de tratamiento y modificación descritos (Figura 30), siendo capaz de formar nanoestructuras de diferentes tamaños fácilmente detectables por microscopia de campo oscuro (Figura 21a). La confirmación de la naturaleza

férrica de dichas nanoestructuras fue llevada a cabo por medio de un mapeo elemental, herramienta disponible en el microscopio TEM (Figura 21b).

Por su parte, se demostró la composición y distribución de las NPs Re haciendo uso de herramientas como el análisis seccional (Figura 21c) y el mapeo elemental (Figura 21d) en o-CN_x-Re. Enseguida del proceso para el depósito de renio sobre la superficie de o-CN_x, la aparición de NPs Re con geometría pseudo esférica y diámetros de entre 2 – 10 nm fue evidente (Figuras 20c y 20d). Sin embargo, la distribución de NPs Re fue poco uniforme, haciendo difícil su localización y detección por técnicas como EDS. Una explicación a este suceso se encuentra reportada en el trabajo de Okal y colaboradores, donde se ratifica la volatilidad de algunos óxidos de renio a condiciones ambientales, tales como Re₂O₇, que puede afectar el tamaño de las partículas (Okal et al., 2004).

3.2.3 TGA

Las muestras fueron sometidas a un proceso de degradación térmica utilizando aire para crear una atmósfera oxidante y las condiciones de descomposición se seleccionaron según lo descrito en la literatura (Muñoz et al., 2015). Los resultados obtenidos revelaron que los materiales basados en NTCs son estables a temperaturas menores de 400 °C, mostrando pérdidas de peso poco significativas principalmente en los primeros 150 °C de calentamiento, atribuidas a la evaporación del agua absorbida. La descomposición de grupos carboxílicos y carbón amorfo sobre la superficie de los diferentes NTCs se presentó entre 150 – 400 °C (Li et al., 2004). Durante esta etapa, materiales como

o-CN_x y o-CN_x-Re perdieron alrededor de 1 - 2 % de peso neto, mientras que CN_x disminuyó su peso hasta en un 5.5 %, lo cual fue adjudicado a la remoción de carbono amorfo por medio del tratamiento con ácido nítrico que recibieron previamente las muestras a excepción de CN_x.

Todos los materiales derivados de CN_x se encuentran compuestos principalmente por unidades de carbono y tris-s-triazina, cuya oxidación por degradación térmica ocurrió entre 450 – 630 °C según lo esperado (Li et al. 2013). Sin embargo, el efecto del tratamiento oxidativo se vio reflejado en el decremento de la temperatura de descomposición causada por el daño en la estructura de dichos nanotubos. La derivada de las curvas del análisis termogravimétrico (DTGA) mostró que el material CN_x se degradó principalmente a 570 °C, a diferencia de las muestras oxidadas o-CN_x y o-CN_x-Re que fueron descompuestas a solo 530 °C (Figura 22b).

Las impurezas que se encuentran al final del proceso de degradación térmica están compuestas principalmente por óxidos metálicos generados debido a la exposición de los metales presentes en los NTCs a las condiciones del análisis. Los residuos en muestras de tipo CN_x resultaron en un rango de 3.2 – 4.4 % del peso total, este porcentaje decreció hasta 0.4 – 0.7 % en muestras de o-CN_x, demostrando indirectamente que el tratamiento con ácido nítrico removió gran parte del hierro soportado en los materiales y, en ambos casos, la coloración de los remanentes se mostró rojo-marrón similar al de algunos óxidos de hierro como el trióxido de dihierro (Fe₂O₃). El porcentaje residual encontrado en las muestras de tipo o-CN_x-Re incrementó a niveles de 8.2 – 10.9 %, sustentando la

incorporación exitosa de NPs Re sobre los nanotubos (Figura 22a). Además, el material sobrante en las muestras con renio se tornó en un color amarillo-marrón, similar al de determinadas sales y óxidos con base en este elemento.

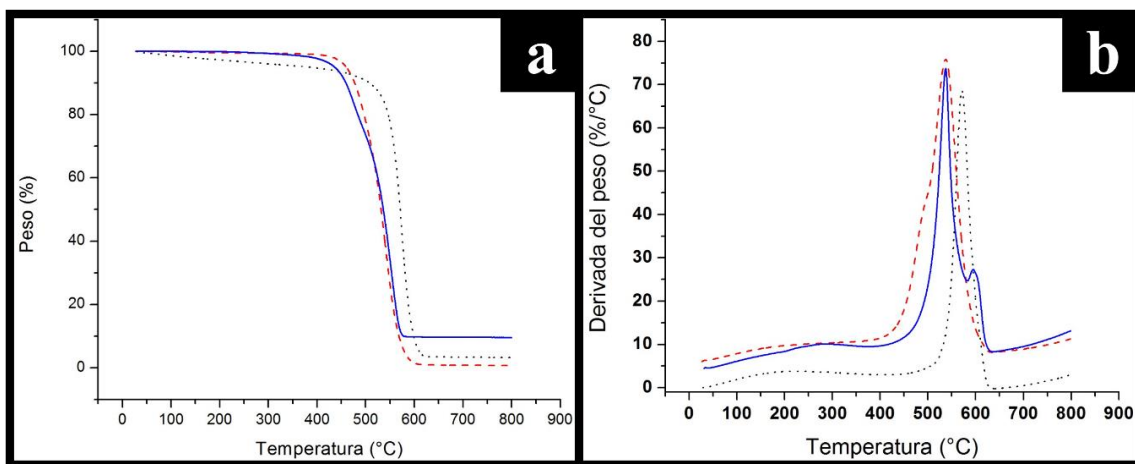


Figura 22. Análisis termogravimétrico y curvas TGA y DTGA de nanotubos de carbono. Se muestra la descomposición y cantidad de remanentes, en términos de porcentaje en peso, de CN_x (negro), o-CN_x (rojo) y o-CN_x-Re (azul) a partir de un tratamiento térmico con velocidad de calentamiento de 4 °C min⁻¹ hasta 800 °C (a). Derivada de las curvas TGA en (a), indicando el punto de descomposición máxima de las muestras CN_x (negro), o-CN_x (rojo) y o-CN_x-Re (azul) (b).

3.2.4 XPS

XPS es una técnica analítica superficial capaz de proveer información acerca de la naturaleza de los elementos químicos presentes en la muestra, así como la formación de enlaces, compuestos y grupos funcionales conformados por los mismos. En este trabajo se analizaron los espectros de los materiales realizados a partir de los diferentes NTCs, estando CN_x y o-CN_x-Re enfocados

para determinar los estados de elementos de importancia como carbono, nitrógeno y renio.

3.2.4.1 Carbono

La señal en el espectro C 1s de NTCs mostró hasta seis energías de enlace diferentes (Figura 23a), con un pico principal ubicado a 284.3 eV (C1), y que es atribuido a la energía del enlace sp^2 C—C característico de grafito pirolítico en NTCs. Anteriormente, ha sido reportado que el desplazamiento de este enlace se ve afectado por la cantidad de nitrógeno utilizado durante la síntesis de materiales como CN_x debido al desorden que se genera en la estructura tipo gráfica (Liu et al., 2010). Previo al ajuste de la señal, el pico C1 apareció alrededor de 284.78 – 284.88 eV.

Las señales que se encontraron a 285.55 ± 0.05 eV (C2) y 286.9 ± 0.1 eV (C3) correspondieron a dos tipos de enlace carbono-nitrógeno, la fase trigonal con una hibridación sp^2 C—N y la fase tetraedral con una hibridación sp^3 C—N respectivamente (Chen et al., 2010).

De acuerdo a trabajos previos, energías de enlace cercanas a $286.0 - 291.0 \pm 0.5$ eV pueden atribuirse a enlaces N- sp^3 , carbón amorfo y enlaces de tipo C—O (Hammer et al., 2000). En los materiales se identificaron picos a 290.1 ± 0.1 eV (C5) relacionados a la presencia de carbonatos en los NTCs (Datsyuk et al., 2008) y, señales correspondientes a las transiciones π - π de la línea de reorganización de carbono en compuestos aromáticos, fueron localizadas a

291.5 eV (C6) (Wang et al., 2015). El análisis de grupos carboxílicos en los materiales fue de suma importancia, ya que se encuentran directamente relacionados con la estabilización de ciertas nanopartículas metálicas y la inmovilización enzimática sobre la superficie de NTCs por esterificación de grupos $-NH_2$. Estos grupos funcionales se detectaron a 288.6 ± 0.05 eV (C4), en concentraciones de 4.99 % para o-CN_x y de 3.15 % en o-CN_x-Re, lo cual podría sugerir que la estabilización de NPs Re es asistida por enlaces coordinados de tipo COO – Re.

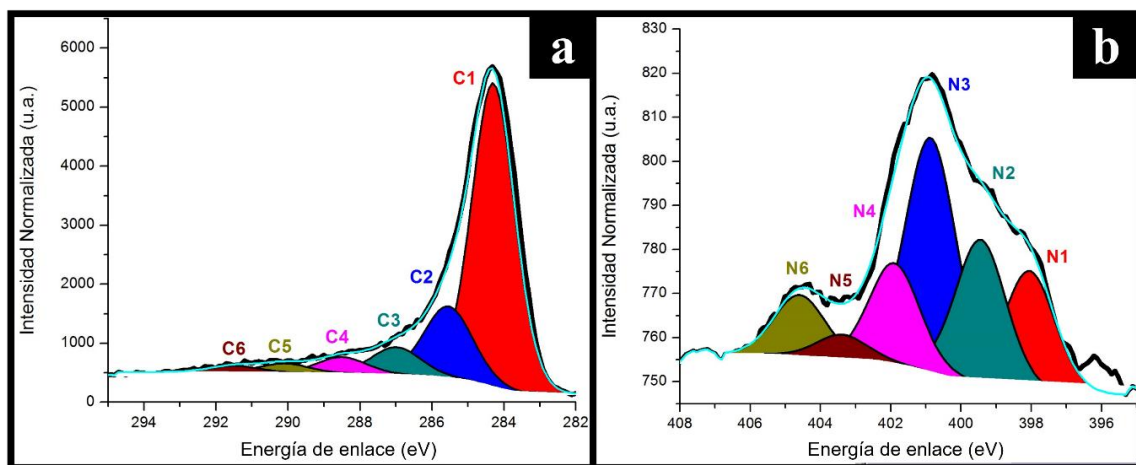


Figura 23. Espectros XPS de C 1s y N 1s en o-CN_x-Re. El espectro de C 1s fue ajustado a 284.3 eV para todas las muestras. Después de la deconvolución de la señal, se encontraron seis picos correspondientes a: enlace sp^2 C—C (C1), hibridación sp^2 C—N (C2), hibridación sp^3 C—N (C3), enlaces tipo COOH (C4), carbonatos (C5), y transiciones π - π (C6) (a). El espectro de N 1s, posterior al tratamiento de la señal, mostró hasta seis picos equivalentes a: nitrógeno piridínico (N1), nitrógeno pirrólico (N2), coordinación sp^2 N – C (N3), grupos piridona $N^+—O^-$ (N4), nitrógeno molecular intercalado (N5), y nitrógeno quimio-absorbido (N6) (b).

3.2.4.2 Nitrógeno

La deconvolución del espectro N 1s (Figura 23b) se logró determinar después del suavizado de la señal usando el método cuadrático Savitzky – Golay. El pico dominante N3 se localizó a 401.0 ± 0.5 eV y es vinculado a la fase trigonal del enlace nitrógeno-carbono en coordinación sp^2 , también conocido como grupo cuaternario o tipo gráfico del nitrógeno (Chen et al., 2010). La señal N2 es comúnmente atribuida a grupos de nitrógeno pirrónico y, para los materiales usados en este trabajo, se determinó a 399.44 ± 0.3 eV. Se ha observado que la formación de N2 y N3 se lleva a cabo preferente en materiales con bajo contenido de nitrógeno, y juntos constituyen más del 50 % de los grupos nitrogenados en la superficie de los NTCs. Nitrógeno piridínico (N1) muestra una energía de enlace de 398.1 ± 0.1 eV y corresponde a la fase tetraedral de nitrógeno enlazado a la hibridación sp^3 del carbono debido a la descomposición del enlace N—H del precursor (Jang et al., 2004). Esta configuración de nitrógeno contiene un par de electrones π y se encuentra enlazada solamente a dos átomos de carbono (C—N=C), además ha sido propuesta como un componente esencial en la generación de la estructura tipo “bambú” característica de CN_x (Ayala et al., 2010).

Alrededor de 402.15 ± 0.3 eV (N4) se ubicó el pico relacionado a nitrógeno oxidado ocasionado por grupos piridona $N^+—O^-$ (Xu et al., 2008) que pueden ser formados por la presencia de oxígeno durante el proceso de síntesis de NTCs o al momento del tratamiento oxidativo con ácido nítrico (Pels et al., 1995). De igual forma, fueron encontradas especies de nitrógeno no enlazadas covalentemente con la estructura gráfica de los materiales, los picos pertenecientes a nitrógeno

molecular encapsulado o intercalado durante el crecimiento de NTCs (N5) y compuestos de óxido de nitrógeno quimio-absorbido entre las capas gráficas (N6), se determinaron a 403.65 ± 0.35 eV y 405.1 ± 0.5 eV respectivamente.

En general, la información obtenida de los datos tratados en los espectros C 1s y N 1s solo describió las características superficiales típicas de MWCNT y CN_x, aunque este hecho no disminuye su relevancia. El conocimiento de los grupos funcionales y tipos de enlace presentes en un soporte es vital para el desarrollo de mejores materiales, en nuestro caso, la formación de grupos carboxílicos y piridínicos ayuda a la inmovilización y actividad catalítica del material.

3.2.4.3 Renio

Los espectros del doblete de orbitales Re $4f_{7/2}$: Re $4f_{5/2}$ (Figura 24) fueron los más destacados al proporcionar información clave para el entendimiento de algunos fenómenos durante la síntesis de NPs Re. Sin embargo, el análisis de estos datos fue complicado debido al amplio número de estados de oxidación en los cuales se puede encontrar el renio y la cercanía de las energías de enlace de los mismos, aproximada a 0.2 eV en un rango reducido de alrededor de 5 – 7 eV (Greiner et al., 2014). No obstante, después del ajuste adecuado de los resultados, se logró determinar de manera concisa la presencia de hasta tres óxidos de renio en o-CN_x-Re, ReO₂ (Re1), ReO₃ (Re3) y Re₂O₇ (Re2).

Actualmente, han sido descritas distintas energías de enlace pertenecientes a los estados de oxidación de renio (Tabla V) así como las problemáticas para la

obtención de nanopartículas estables en estados de oxidación menores a Re (VII), principalmente frente a condiciones oxidantes o ambientales en medios acuosos (Tysoe et al., 1988). También, se encontraron reportes que hacen referencia a la estabilidad termodinámica de óxidos de renio (Rouschias, 1974) siendo Re_2O_7 el más estable y, para algunos casos, Re (VII) en la forma de ReO_4^- ha mostrado una energía libre de Gibbs negativa de -249.7 kJ/mol, la cual es mayor en comparación a los demás óxidos como Re (IV) con -96.97 kJ/mol en ReO_2 (Vargas-Uscategui et al., 2013). Teniendo en cuenta estas declaraciones, se decidió estudiar el comportamiento de NPs Re en los NTCs a través del tiempo. Los resultados corroboraron lo descrito por trabajos previos, mostrando que las NPs Re tienden a cambiar gradualmente su estado de oxidación de menor a mayor, lo cual está relacionado con la estabilidad termodinámica que poseen los distintos óxidos rénicos.

Tabla V. Energías de enlace reportadas para distintos estados de oxidación de renio.

Estado de oxidación	R(0)	R(II)	R(IV)	R(VI)	R(VII)	R(VII)	Referencia
Especie	Metal	"ReO"	ReO_2	ReO_3	Re_2O_7	NH_4ReO_4	
Energía de enlace en Re $4f_{7/2}$ (eV)	-	-	42.15	43.3	45.43	-	Este trabajo
	40.5	41.5	42.6	43.5	45.7	47.4	(Falcone et al., 2015)
	40.35	41.45	42.2	43.1	45.5	-	(Greiner et al., 2014)
	40.7	-	42.5	44.5	46.2	46.9	(Cimino et al., 1980)
	39.7	-	42.5	44.9	46.7	-	(Tysoe et al., 1988)
	41.1	-	43.4	45.2	-	46.4	(Komiyama et al., 1983)

Posterior a la deconvolución de las señales de renio, se mostraron emisiones en el espectro correspondientes al par de orbitales $\text{Re } 4f_{7/2} : \text{Re } 4f_{5/2}$ a 42.15 : 44.58 eV, 43.32 : 45.75 eV y 45.43 : 47.86 eV en muestras con el menor tiempo transcurrido a la síntesis (Figura 24a), siendo asignados a los estados de oxidación Re (IV), Re (VI) y Re (VII) respectivamente, por lo cual se sugirió la presencia de los óxidos ReO_2 , ReO_3 y Re_2O_7 en el material (Okal et al., 2004). Materiales con mayor tiempo transcurrido después de la síntesis exhibieron pares de picos con energías de enlace en 42.2 : 44.63 eV y 45.17 : 47.6 eV (Figura 24b). Trióxido de renio no pudo ser detectado sobre la superficie de estos nanotubos, y el porcentaje de óxido de renio (IV) disminuyó significativamente con el paso del tiempo (Tabla VI). La explicación a esta situación fue dada debido al comportamiento oxidativo del renio, el cual diverge al presentado por algunos metales nobles (ej. Pt, Pd, Rh) que suelen ser químicamente más estables, y a las condiciones del método de síntesis y almacenamiento de los materiales con NPs Re.

Fue descartada la contribución de impurezas o remanentes del precursor K_2ReCl_6 al espectro de Re (IV) al no observarse picos característicos para K $2p_{3/2}$ y Cl $2p_{3/2}$ en las muestras (Figura 31), demostrando la efectividad de la remoción de las sales formadas por estos elementos a través del método de lavado de los materiales.

De igual forma, se ha determinado que el aumento del porcentaje de Re (VII) al transcurrir el tiempo es ocasionado por la estabilidad y el alto nivel higroscópico de Re_2O_7 , generando la reoxidación de renio en cualquier otro estado de

oxidación y la adsorción superficial de agua cuando se exponen al aire (Mucalo & Bullen, 2001). Greiner y colaboradores propusieron un modelo de la formación de capas de los distintos óxidos de renio a partir del estudio de algunos materiales por NAP-XPS *in situ* a diferentes energías cinéticas de enlace, concluyendo en que todos los compuestos rénicos generaron una cobertura superficial de heptóxido de renio. Para el caso de renio metálico (Re^0), esta capa se formó con un grosor de hasta 0.53 nm a una exposición de tan solo 50 °C (Greiner et al., 2014).

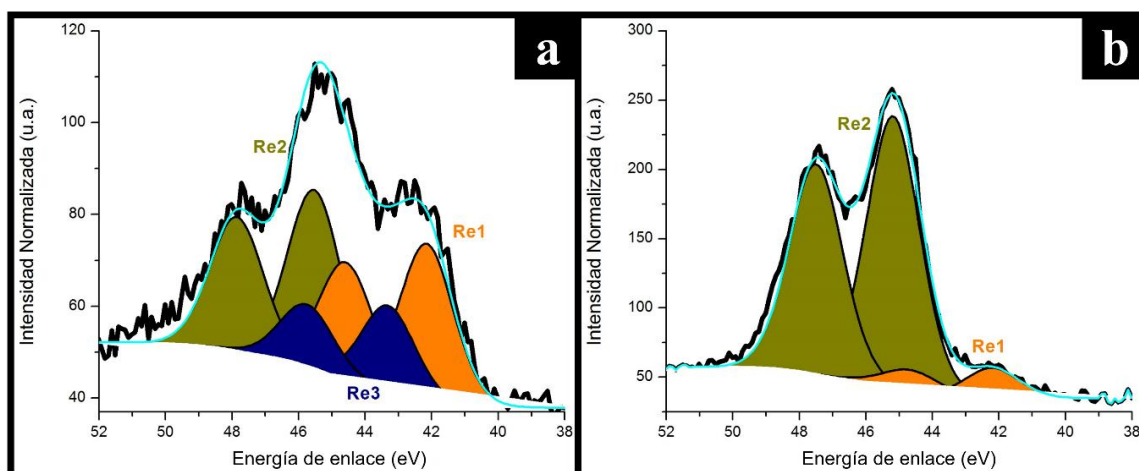


Figura 24. Espectros XPS de Re $4f_{7/2}$: Re $4f_{5/2}$ en o-CN_x-Re con respecto al tiempo. Se muestran los dobletes de las señales correspondientes a renio después de la deconvolución en o-CN_x-Re, con una relación de área 1 : 0.75 y separación de 2.43 eV. En la muestra analizada tres días posteriores a la síntesis (a) se observaron tres especies de renio asociadas a: ReO_2 (Re1), Re_2O_7 (Re2) y ReO_3 (Re3). Mientras que, transcurridas tres semanas de la síntesis (b), un análisis del mismo tipo de muestra reveló la presencia de solo: ReO_2 (Re1) y Re_2O_7 (Re2), con un incremento dominante del segundo óxido.

A pesar de las similitudes del comportamiento oxidativo de renio a macro y nanoescala, no se ha determinado concretamente el tiempo en el cual se lleva a

cabo este fenómeno, ya que es dependiente de factores como: el tamaño, distribución y método de síntesis de las partículas, al igual que de algunas condiciones ambientales como la concentración de oxígeno, humedad del aire y temperatura de exposición. Por dichas razones, algunos trabajos recurren a diversos métodos para la estabilización de NPs Re, consistiendo principalmente en el uso de agentes como PPV o gomas a base de polisacáridos (Mucalo & Bullen, 2001), atmósferas inertes para el almacenamiento del material e inclusive la reducción con H_2 a altas temperaturas. Sin embargo, en el presente proyecto se evitó el uso de cualquier agente físico o químico que pudiera modificar la estructura y por ende la difusión electrónica de los componentes del material.

Tabla VI. Porcentajes y energías de enlace de orbitales Re $4f_{7/2}$: Re $4f_{5/2}$ en o-CN_x-Re.

Óxido	3 días			3 semanas		
	B.E. Re $4f_{7/2}$	B.E. Re $4f_{5/2}$	C (%)	B.E. Re $4f_{7/2}$	B.E. Re $4f_{5/2}$	C (%)
Re(IV)	42.15 eV	44.58 eV	37.3	42.15 eV	44.58 eV	9.7
Re (VI)	43.32 eV	45.75 eV	19.97	ND	ND	ND
Re (VII)	45.43 eV	47.86 eV	42.68	45.17 eV	47.6 eV	90.21

3.2.5 UV-Vis

La caracterización bioquímica de la enzima se realizó por medio de técnicas colorimétricas, en conjunto con las ecuaciones de Lineweaver-Burk y Lambert-Beer.

Los resultados llevaron a la cuantificación de la enzima libre empleada en todos los experimentos del trabajo, determinando una concentración de 7.78 mg ml^{-1}

de lacasa a través de la regresión lineal en ensayos de micro-Bradford con una curva de calibración de BSA y un coeficiente de correlación de 0.98245. Además, se logró demostrar la actividad enzimática con un valor de 26.51 UI ml⁻¹ para siringaldazina 500 mmol L⁻¹, lo cual indica una actividad específica aproximada a 3.41 UI mg⁻¹ de lacasa (Figura 32).

Debido al método de preparación y análisis directo de los ensayos realizados para conocer las propiedades enzimáticas de lacasa inmovilizada en electrodos de tipo GCE/NTCs-Lac, técnicas de baja sensibilidad como micro-Bradford no proporcionaron resultados fiables para demostrar cuantitativamente la concentración de lacasa en los NTCs. Sin embargo, la actividad enzimática de los electrodos si pudo ser establecida a través del uso de siringaldazina como sustrato, donde materiales funcionalizados después del tratamiento oxidativo con ácido nítrico mostraron una actividad enzimática superior (Tabla VII).

Tabla VII. Actividad enzimática de los diferentes tipos de electrodos.

Material	Actividad enzimática (mUI)	Actividad enzimática másica (UI mg ⁻¹ _{NTCs})
GCE/CN _x -Lac	0.2584	0.0516
GCE/o-MWCNT-Lac	1.3523	0.2704
GCE/o-CN _x -Lac	0.9677	0.1935
GCE/o-CN _x -Re-Lac	0.9092	0.1818

Materiales con nanotubos oxidados corroboraron la efectividad de la metodología de inmovilización asistida con EDAC : NHS por esterificación de grupos -COOH y -NH₂, obteniendo mejores resultados en comparación a NTCs sin modificaciones. Por su parte, electrodos como GCE/o-CN_x-Lac mostraron una

actividad mayor en ausencia de NPs Re, considerando que la coordinación de este tipo de nanopartículas se puede llevar a cabo utilizando grupos -COOH libres y que la presencia de las mismas podrían ocasionar problemas de difusión del sustrato, la disminución de la actividad enzimática en este tipo de materiales fue un efecto esperado.

La diferencia, en términos de actividad enzimática, entre nanotubos oxidados compuestos principalmente de carbono y su contraparte con dopaje de nitrógeno, es atribuida a que los primeros cuentan con una mayor cantidad de grupos funcionales disponibles para la inmovilización enzimática. Este hecho, aunado a la uniformidad y menor número de sitios defectuosos en la estructura del soporte en MWCNT, puede aumentar la concentración de enzimas inmovilizadas de manera homogénea en la superficie de los NTCs, facilitando la catálisis y difusión del sustrato.

La actividad enzimática másica, expresada en unidades catalíticas de lacasa por miligramo de NTCs ($UI\ mg_{NTCs}^{-1}$), comprueba que GCE/o-MWCNT-Lac es el material mejor adaptado para la inmovilización de la enzima por el método descrito en este trabajo (Tabla VII).

3.2.6 CV

El estudio electroquímico por medio de voltamperometría cíclica demostró las propiedades electrocatalíticas de los materiales para la óxido-reducción de catecol. Primeramente, debido a las características electrónicas de los NTCs,

fueron descartadas las interferencias en la señal de los voltamogramas, ocasionadas por problemas de difusión electrónica o difusión de sustrato, a través de la optimización de la carga de material empleada en las mediciones. A partir de análisis electroquímicos CV a diferentes velocidades de barrido (Figura 25a), se mostró que cargas superiores a 5 μg de NTCs generan un desplazamiento de potencial proporcional a la velocidad de barrido en los picos anódico (ϕ) y catódico (ψ) característicos de la electrocatálisis de catecol (Figura 33), los cuales fueron determinados en condiciones óptimas a 0.2049 ± 0.0056 V y 0.1522 ± 0.0022 V respectivamente. Por su parte, las intensidades de corriente en los picos anódico y catódico mostraron un incremento lineal dependiente de la velocidad de barrido (Figura 25b), lo que corrobora el suceso de un proceso electroquímico reversible controlado por la difusión electrónica en la superficie del electrodo (Liu et al., 2006).

De los diferentes picos encontrados en los voltamogramas, la señal anódica de la reacción, localizada cerca de 200 mV en la mayoría de los materiales, fue seleccionada para los análisis posteriores por su alto grado de incidencia y mayor resolución e intensidad de corriente generada en comparación con la señal catódica. Electrodo con MWCNT, CN_x y sus derivados con NPs Re o lacasa inmovilizada mostraron una señal de respuesta electroquímica a concentraciones iguales o mayores a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol (Tabla VIII).

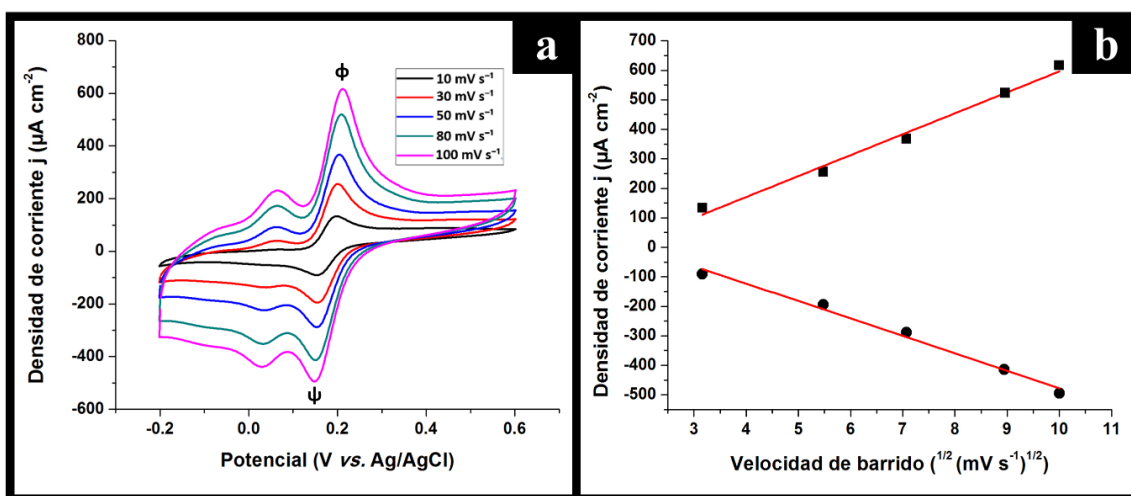


Figura 25. Voltamogramas CV de GCE/o-CN_x-Re a diferentes velocidades de barrido. Se muestran los voltamogramas correspondientes a GCE/o-CN_x-Re-Lac a velocidades de barrido de 10, 30, 50, 80, y 100 mV s⁻¹ en una solución amortiguadora PBS 50 mmol L⁻¹ a pH 7.0 con concentración de 1 mmol L⁻¹ de catecol. El pico anódico (φ) se localiza a 0.2049 ± 0.0056 V, mientras que el pico catódico (ψ) está ubicado en 0.1522 ± 0.0022 V (a). Correlación lineal de la intensidad de corriente generada con respecto a la velocidad de barrido, mostrando coeficientes de correlación de 0.9866 para el pico anódico (■) y 0.9846 en el pico catódico (●) (b).

De manera general, se notó que la incorporación de lacasa en los materiales provoca la disminución en la intensidad de corriente (Figura 26b), efecto posiblemente atribuido al redireccionamiento del flujo de electrones hacia la reducción de O₂, el cual es utilizado por la enzima como aceptor de electrones debido a su actividad catalítica natural. También, se ha comprobado que la incorporación de componentes biológicos puede modificar la intensidad de corriente por medio de la alteración de las rutas de transporte electrónico (Quan & Shin, 2004). Sin embargo, la sinergia de la proteína con los demás componentes en los materiales permitió un mejor nivel de detección a concentraciones de sustrato por debajo de 1 μmol L⁻¹, siendo más notorio en los

casos de CN_x y o-MWCNT. Además, esta misma relación en NTCs-Lac logró minimizar el índice de variación en la mayoría de las mediciones, sugiriendo un reconocimiento más específico de catecol al ser añadida la biomolécula en los nanomateriales.

Tabla VIII. Respuesta electroquímica y desviación estándar (σ) de los materiales a diferentes concentraciones de catecol.

Conc.	Ganancia de la respuesta de los materiales*									
	100 nmol L ⁻¹		1 μ mol L ⁻¹		10 μ mol L ⁻¹		100 μ mol L ⁻¹		1 mmol L ⁻¹	
Material	D.C.	σ	D.C.	σ	D.C.	σ	D.C.	σ	D.C.	σ
CN _x	ND		0.59	0.35	4.26	1.85	34.88	5.1	256.29	7.12
CN _x -Lac	0.08	0.02	0.93	0.15	2.86	0.24	20.93	4.0	145.25	4.19
o-MWCNT	ND		0.75	0.56	6.70	4.36	61.47	21.76	351.95	35.86
o-MWCNT-Lac	0.03	0.04	1.55	0.39	5.96	0.8	48.11	1.8	324.57	26.64
o-CN _x	ND		1.02	0.46	11.04	3.68	92.37	17.91	680.44	31.79
o-CN _x -Lac	0.01	0.03	0.97	0.31	5.79	2.9	49.78	15.1	273.43	32.66
o-CN _x -Re	ND		2.38	0.42	10.86	1.35	77.20	8.92	546.27	34.88
o-CN _x -Re-Lac	0.36	0.01	1.27	0.01	6.79	0.8	55.23	4.9	403.64	16.54

*Ganancia expresada tomando el análisis blanco de cada electrodo como base.

D. C. = Densidad de corriente en μ A cm⁻².

ND = Señal no detectable.

De manera simplificada, las señales electroquímicas demostraron que la contribución del dopaje con nitrógeno en materiales CN_x logra generar una mayor respuesta de corriente en comparación a compuestos de la clase de MWCNT. A su vez, el tratamiento con HNO₃ de los mismos nanotubos, hace que CN_x sea mejor electrocatalizador de catecol después de la oxidación química, aunque esta propiedad disminuye considerablemente al inmovilizar la lacasa sobre o-CN_x. Por tal razón, la incorporación de NPs Re mostró ser una alternativa para

contrarrestar la pérdida de corriente ocasionada por la enzima, promoviendo una densidad de corriente superior a los demás nanobiocompuestos (Figuras 26a y 26b).

A pesar de que se sugiere que el depósito de NPs Re, con el método reductor descrito en este trabajo, no manifestó ningún efecto positivo para la electrocatálisis de catecol por medio de voltamperometría cíclica a concentraciones mayores a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, cabe destacar que el nanobiomaterial o-CN_x-Re-Lac obtuvo la mejor señal de respuesta con la más alta ganancia de corriente de los materiales de tipo NTCs-Lac (Figura 26a). Asimismo, las propiedades electroquímicas del material le permitieron aumentar su nivel de detección, determinado en 100 nmol L^{-1} , siendo el único nanobiocompuesto en alcanzar dicha resolución. Los resultados demuestran la colaboración de NPs Re y lacasa de *Coriopsis gallica* para la detección de catecol por materiales a base de nanotubos de carbono oxidados y dopados con nitrógeno.

El comportamiento de las señales medidas a diferentes concentraciones de catecol fue analizado por triplicado ($n = 3$) para comprobar la reproducibilidad de las mediciones. Los menores márgenes de error fueron obtenidos por los materiales CN_x-Lac y o-CN_x-Re-Lac con valores de desviación debajo del 12 %. CN_x-Lac obtuvo una reproducibilidad del 97.1 % a altas concentraciones de catecol disuelto (1 mmol L^{-1}), mientras que, a bajas concentraciones del sustrato ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$ - 100 nmol L^{-1}), o-CN_x-Re-Lac fue el material más estable con coeficientes de variación del 2.8 %. En ambos casos, y como es planteado en la hipótesis de este trabajo, la presencia de nanopartículas metálicas de renio o

hierro y sus óxidos en los respectivos materiales puede contribuir positivamente a la conducción de electrones por materiales basados en NTCs, disminuyendo la pérdida de corriente y la consecuente variación de las mediciones.

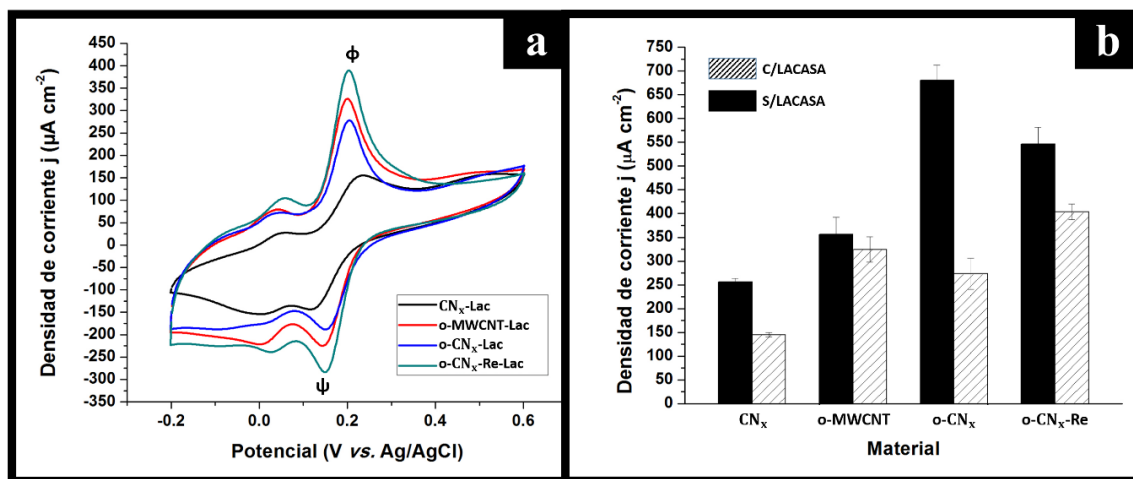


Figura 26. Voltamogramas CV de los materiales tipo NTCs-Lac y comparación de la señal electroquímica. En la imagen, se muestran los diferentes voltamogramas de los materiales $\text{CN}_x\text{-Lac}$, o-MWCNT-Lac , $\text{o-CN}_x\text{-Lac}$, y $\text{o-CN}_x\text{-Re-Lac}$ en una solución amortiguadora PBS 50 mmol L^{-1} a pH 7.0 con concentración de 1 mmol L^{-1} de catecol. Las mediciones se realizaron a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} , obteniendo picos anódicos (ϕ) y catódicos (ψ) para todos los compuestos (a). Gráfica representativa de la densidad de corriente obtenida en la superficie de los electrodos con y sin lacasa inmovilizada en las mismas condiciones que los voltamogramas en (a), señalando la desviación estándar correspondiente a cada material (b).

Considerando el cambio en la respuesta electroquímica de las mediciones con respecto al tiempo (Figura 27) los análisis de repetitividad en las muestras tipo NTCs-Lac mostraron un margen de error menor al 8 %. Mientras tanto, los electrodos elaborados solamente con los nanomateriales MWCNT o CN_x cuentan con una certeza no menor al 96 % (Figura 34).

La actividad electroquímica de los electrodos sin enzima fue estudiada durante un periodo de 45 días a diferentes intervalos de tiempo para determinar la estabilidad operacional y el tiempo de vida útil de los biosensores con configuraciones tipo NTCs-Lac (Figura 27). Debido al comportamiento de los diferentes nanobiocompuestos, los cuales mostraron un decrecimiento de la densidad de corriente considerable durante los primeros tres días de prueba, se estableció el análisis de la estabilidad electroquímica a partir de ese día en el periodo donde el decremento de la señal no fuese mayor al 5 %. Los materiales CN_x -Lac y o-MWCNT-Lac obtuvieron un periodo de estabilidad de solo 10 días con una disminución de corriente de 3.8 % y 5.0 %. El caso único de o- CN_x -Lac, presentó un periodo de estabilidad con márgenes de error idóneos que fueron encontrados solamente a partir del décimo día posterior de la síntesis, con una duración de 22 días y un índice de decremento de 2.3 %. Por último, el compuesto o- CN_x -Re-Lac demostró una pérdida de 4.8 % en las mediciones voltamperométricas con 25 días de estabilidad operacional, mismos en los cuales puede ser empleado de manera confiable para la detección de catecol.

Durante el tiempo estudiado, se observó que los materiales CN_x -Lac, o- CN_x -Lac y o-MWCNT-Lac perdieron alrededor del 20 % de su capacidad de detección, siendo CN_x -Lac el menor de ellos con una señal final aproximada de 76.9 %. Mientras tanto, el electrodo GCE/o- CN_x -Re-Lac conservó hasta el 84.5 % de la señal de respuesta electroquímica, mostrando que la contribución de NPs Re puede mejorar la estabilidad de la señal de respuesta del biosensor.

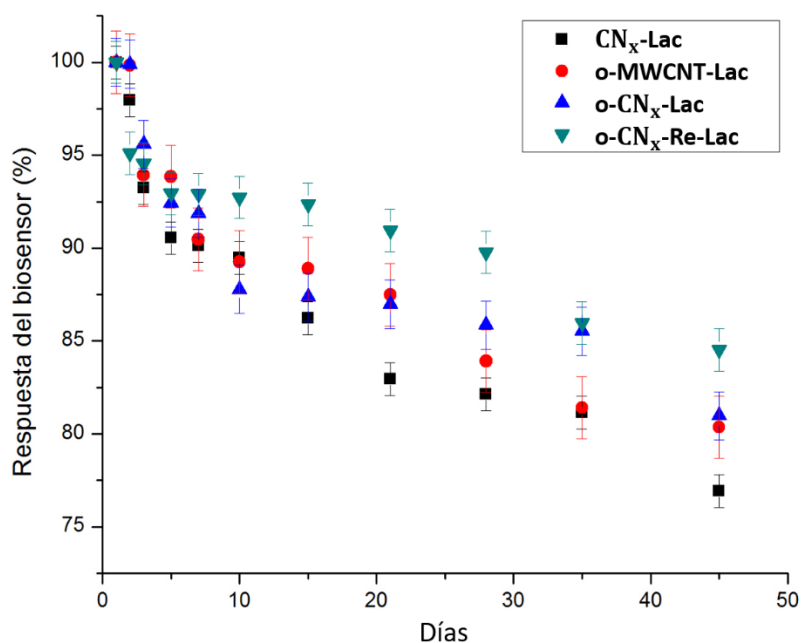


Figura 27. Estabilidad electroquímica de los biosensores. Se muestra la respuesta de la señal electroquímica de los biosensores de tipo NTCs-Lac durante los 45 días posteriores a la síntesis. Las barras de error indican la desviación estándar de tres mediciones hechas con el mismo electrodo.

Los resultados indican que los nanobiocompuestos pierden drásticamente hasta un 6.77 % de la actividad durante los primeros tres días de mediciones, con un posterior decremento gradual de la intensidad de corriente, sin embargo, la falta de lacasa en los nanomateriales provoca una mayor estabilidad operacional en los electrodos, con una pérdida no mayor al 3.42 % al menos durante los primeros 15 días de servicio del dispositivo.

CONCLUSIONES

La síntesis y funcionalización de nanocompuestos a base de MWCNT y CN_x empleados en este trabajo mostraron tener características adecuadas para fungir como soportes de nanopartículas metálicas y enzimas, logrando obtener una carga de hasta el 10.9 % de óxidos de renio y 0.2704 UI mg⁻¹ de lacasa de *Coriolopsis gallica*.

El depósito de renio, inclusive en diferentes estados oxidados, contribuye de manera positiva a la estabilidad operacional y transferencia electrónica de los biosensores, principalmente en materiales basados en CN_x.

Por su parte, la enzima lacasa provoca una disminución en la densidad de corriente al momento de su incorporación a los nanomateriales. Sin embargo, puede generar sensores electrocatalíticos con menor margen de error durante las mediciones electroquímicas, aumentando la sensibilidad de los dispositivos y otorgando un nanobiomaterial con alta confiabilidad para la detección de compuestos fenólicos, y un tiempo de vida útil no menor a 25 días para el caso del material de estudio o-CN_x-Re-Lac.

En resumen, la capacidad de detección de lacasa en biosensores a base de NTCs puede mejorar su rendimiento debido a la compatibilidad y propiedades de conducción de los materiales, brindando buena reproducibilidad, repetividad y estabilidad operacional.

ANEXOS

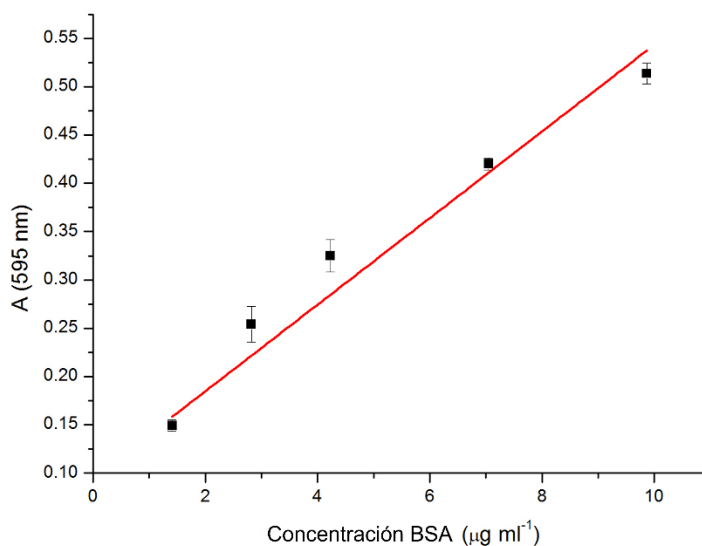


Figura 28. Curva de calibración de proteína BSA. Los ensayos espectrofotométricos fueron realizados por medio de la técnica de micro Bradford a diferentes concentraciones de proteína BSA ($1 - 10 \mu\text{g ml}^{-1}$) según lo indicado en procedimiento. Las lecturas de absorbancia (A) tomadas a 595 nm, mostraron una regresión lineal con coeficiente de correlación de 0.98245.

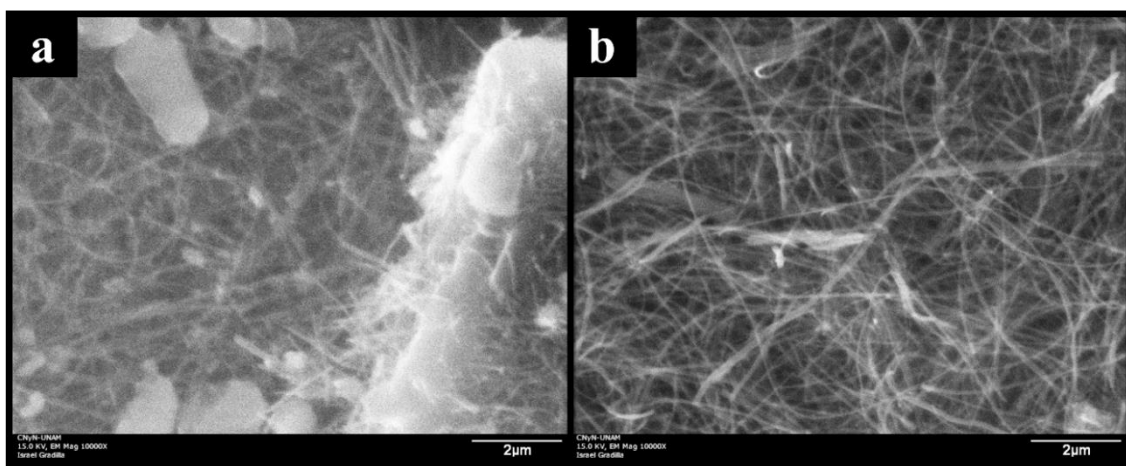


Figura 29. Micrografías SEM del efecto de la purificación de NTCs por medio del tratamiento con ácido nítrico. Se observan las imágenes de la dispersión y formación de partículas sobre CN_x , principalmente provenientes de los precursores utilizados en la síntesis de NTCs (a). Después del tratamiento oxidativo, la remoción de la mayoría de las impurezas sobre los nanotubos es evidente (b).

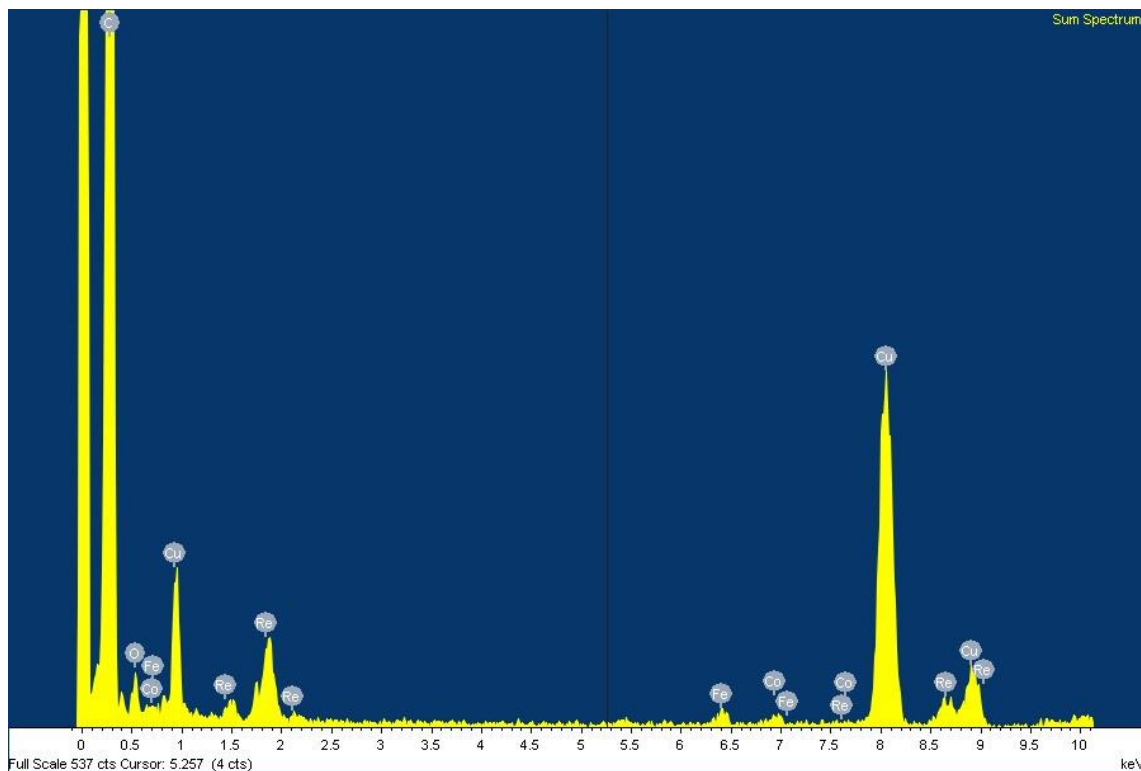


Figura 30. Espectrograma del análisis elemental de o-CN_x-Re por espectrometría de energía dispersiva de rayos X (EDS) en STEM. Se demuestran la presencia de señales correspondientes a los elementos esperados en la muestra, como: carbono (C), oxígeno (O), hierro (Fe), renio (Re), así como cobre (Cu) proveniente de las rejillas empleadas para la observación por microscopía TEM. La aparición de cobalto (Co) en proporciones traza es atribuida a la posible contaminación durante el proceso síntesis o preparación de la muestra.

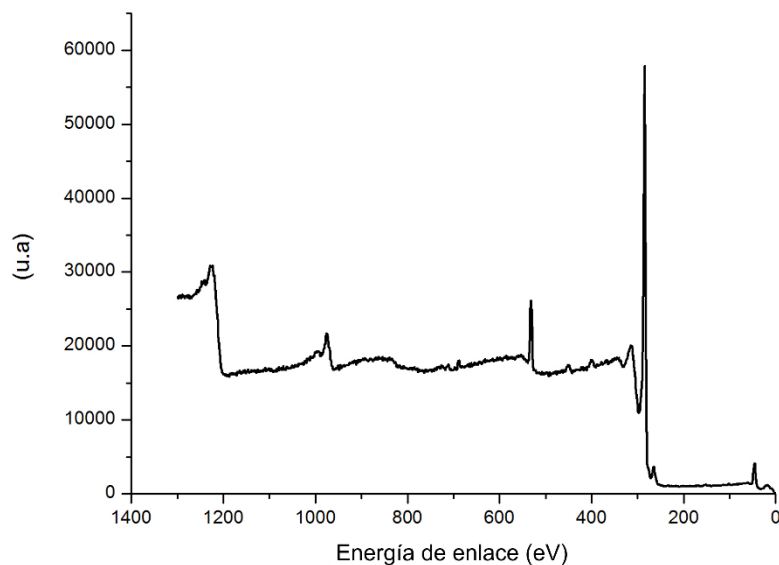


Figura 31. Espectro XPS de o-CN_x-Re. Señal y picos obtenidos del análisis superficial de la muestra o-CN_x posterior al depósito de renio.

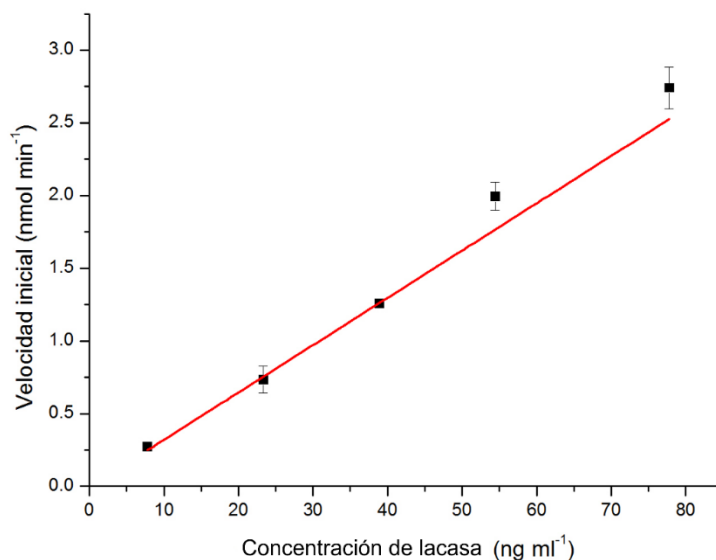


Figura 32. Curva de actividad enzimática de lacasa de *Corioloopsis gallica*. Se realizaron mediciones espectrofotométricas a 530 nm, modificando la concentración de enzima en cada uno de los ensayos bioquímicos con siringaldazina 500 mmol L⁻¹ y considerando un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 65000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Los resultados demostraron una regresión lineal con coeficiente de correlación de 0.9911 para las velocidades iniciales obtenidas.

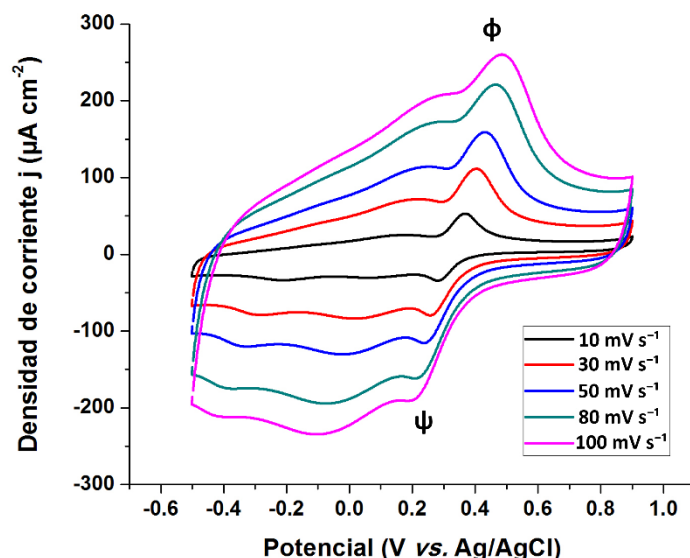


Figura 33. Voltamogramas CV de o-CN_x-Re a diferentes velocidades de barrido con carga de 10 μg de NTCs. Se observan los voltamogramas de GCE/o-CN_x-Re a velocidades de barrido de 10, 30, 50, 80, y 100 mV s⁻¹ en una solución amortiguadora PBS 50 mmol L⁻¹ a pH 7.0 con una concentración de catecol de 1 mmol L⁻¹. Ambos picos, anódico (φ) y catódico (ψ), muestran una modificación en la señal y desplazamiento de potencial ocasionados por la transferencia electrónica y difusión de masa.

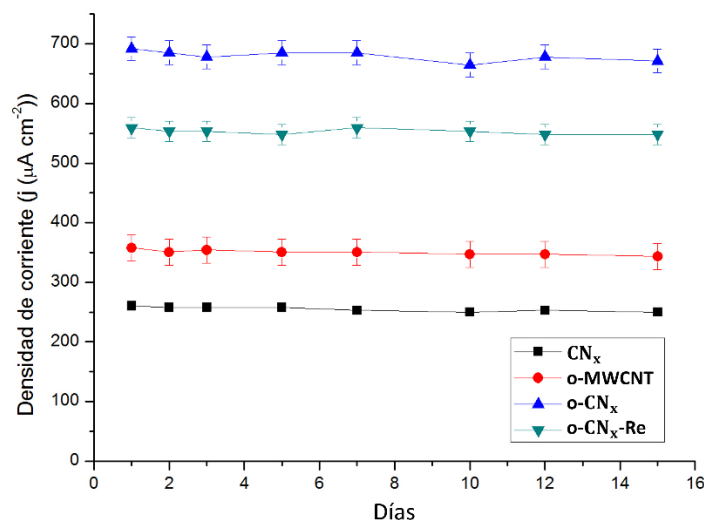


Figura 34. Estabilidad electroquímica de los principales materiales a base de NTCs. Respuesta electroquímica de los electrodos de tipo NTCs analizados durante los 15 días posteriores a la síntesis. Las barras de error indican la desviación estándar de tres mediciones realizadas con diferentes electrodos.

REFERENCIAS

- Abdullah, J., Ahmad, M., Heng, L. Y., Karuppiyah, N., and Sidek, H. (2007). "An optical biosensor based on immobilization of laccase and MBTH in stacked films for the detection of catechol." *Sensors* 7 (10): 2238–2250.
- Alonso-Nuñez, G., Valenzuela-Muñiz, A. M., Paraguay-Delgado, F., Aguilar, A., and Verde, Y. (2006). "New organometallic precursor catalysts applied to MWCNT synthesis by spray-pyrolysis." *Optical Materials* 29 (1): 134–139.
- Arroyo, M. (1998). "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones." *Ars Pharmaceutica* 39 (2): 23–39.
- Ayala, P., Arenal, R., Rummeli, M., Rubio, A., and Pichler, T. (2010). "The doping of carbon nanotubes with nitrogen and their potential applications." *Carbon* 48 (3): 575–586.
- Ayvalı, T., Lecante, P., Fazzini, P.-F., Gillet, A., Philippot, K., and Chaudret, B. (2014). "Facile synthesis of ultra-small rhenium nanoparticles." *Chemical Communications* 50 (74): 10809–10811.
- Baldrian, P. (2006). "Fungal laccases - occurrence and properties." *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215–245.
- Bedia, J., Calvo, L., Lemus, J., Quintanilla, A., Casas, J. A., Mohedano, A. F., Zazo, J. A., Rodriguez, J. J., and Gilarranz, M. A. (2015). "Colloidal and microemulsion synthesis of rhenium nanoparticles in aqueous medium." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 469: 202–210.
- Bethune, D. S., Klang, C. H., de Vries, M. S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., and Beyers, R. (1993). "Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls." *Nature* 363 (6430): 605–607.
- Bertrand, G. (1985). "Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase." *CR Academy of Sciences (Paris)* 120: 266–269.
- Biswas, K., and Rao, C. N. R. (2006). "Metallic ReO₃ nanoparticles." *The Journal of Physical Chemistry B* 110 (2): 842–845.
- Blom, R. H., Kollonitsch, V., and Kline, C. H. (1962). "Rhenium catalysts." *Industrial and Engineering Chemistry* 54 (4): 16–22.
- Bonilla-Miranda, C. (2015). "Deposición y caracterización de nanopartículas de renio en nanotubos de carbono multipared dopados con nitrógeno para la síntesis del compuesto Nx-MWCNT-Re." Universidad Tecnológica de Tulancingo.
- Bourourou, M., Elouarzaki, K., Lalaoui, N., Agnès, C., Le Goff, A., Holzinger, M.,

- Maaref, A., and Cosnier, S. (2013). "Supramolecular immobilization of laccase on carbon nanotube electrodes functionalized with (methylpyrenylaminomethyl)anthraquinone for direct electron reduction of oxygen." *Chemistry - A European Journal* 19 (28): 9371–9375.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* 72 (1–2): 248–254.
- Brady, D., and Jordaan, J. (2009). "Advances in enzyme immobilisation." *Biotechnology Letters* 31 (11): 1639–1650.
- Bravo, L. (1998). "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutrition Reviews* 56: 317–333.
- Carlen, Jan-C., and Bryskin, B. D. (1994). "Rhenium - A unique rare metal." *Materials and Manufacturing Processes* 9 (6): 1087–1104.
- Casas, J. M., Sepúlveda, E., Bravo, L., and Cifuentes, L. (2012). "Crystallization of sodium perrhenate from $\text{NaReO}_4\text{-H}_2\text{O-C}_2\text{H}_5\text{OH}$ solutions at 298K." *Hydrometallurgy* 113–114: 192–194.
- Castillo, J., Gáspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dorneanu, S. A., Ryabov, A. D., and Csöregi, E. (2004). "Biosensors for life quality: Design, development and applications." *Sensors and Actuators B* 102: 179–194.
- Castriota, M., Cazzanelli, E., Das, G., Kalendarev, R., Kuzmin, A., Marino, S., Mariotto, G., Purans, J., and Scaramuzza, N. (2007). "Proton presence and motion in rhenium-oxide films and their application to liquid-crystalline cells." *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 474 (1): 1–15.
- Castro-Ortíz, L. P., Luna Pabello, V. M., y Villalobos Pietrini, R. (2007). "Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México." *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23 (1): 35–45.
- Cazzanelli, E., Castriota, M., Marino, S., Scaramuzza, N., Purans, J., Kuzmin, A., Kalendarev, R., Mariotto, G., and Das, G. (2009). "Characterization of rhenium oxide films and their application to liquid crystal cells." *Journal of Applied Physics* 105: 114904.
- Chandra, S., Lang, H., and Bahadur, D. (2013). "Polyaniline-iron oxide nanohybrid film as multi-functional label-free electrochemical and biomagnetic sensor for catechol." *Analytica Chimica Acta* 795: 8–14.
- Chen, D. M., Bastias, B. A., Taylor, A. F. S., and Cairney, J. W. G. (2003). "Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*." *New Phytologist* 157: 547–554.

- Chen, H., Li, S., Wang, S., Tan, Y., and Kan, J. (2013). "Catechol biosensor based on polyphenol oxidase immobilized by combining electropolymerization and cross-linking process." *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 62 (12): 620–626.
- Chen, Z., Higgins, D., and Chen, Z. (2010). "Nitrogen doped carbon nanotubes and their impact on the oxygen reduction reaction in fuel cells." *Carbon* 48 (11): 3057–3065.
- Cheng, Y., Tian, Y., Tsang, Sai-W., and, Yan C. (2015). "Ag nanoparticles on boron doped multi-walled carbon nanotubes as a synergistic catalysts for oxygen reduction reaction in alkaline media." *Electrochimica Acta* 174: 919–924.
- Chong, Y. Y., Chow, W. Y., and Fan, W. Y. (2012). "Preparation of rhenium nanoparticles via pulsed-laser decomposition and catalytic studies." *Journal of Colloid and Interface Science* 369 (1): 164–169.
- Chong, Y. Y., and Fan, W. Y. (2013). "Facile synthesis of single crystalline rhenium (VI) trioxide nanocubes with high catalytic efficiency for photodegradation of methyl orange." *Journal of Colloid and Interface Science* 397: 18–23.
- Cimino, A., Gazzoli, D., and Valigi, M. (1980). "The effect of the reduction of NH_4ReO_4 dispersed on titanium dioxide on the anatase-rutile transformation." *Journal of the Less Common Metals* 75 (1): 85–88.
- Clark, L. C. Jr., and Lyons, C. (1962). "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery." *Annals of the New York Academy of Sciences* 102: 29–45.
- Claus, H. (2004). "Laccases : Structure, reactions, distribution." *Micron* 35: 93–96.
- Clifford, M. N. (1999). "Review chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 362–372.
- Conzone, S. D., Häfeli, U. O., Day, D. E., and Ehrhardt, G. J. (1998). "Preparation and properties of radioactive rhenium glass microspheres intended for *in vivo* radioembolization therapy." *Journal of Biomedical Materials Research* 42 (4): 617–625.
- Costa, Pedro M. F. J., Sloan, J., Rutherford, T., and Green, M. L. H. (2005). "Encapsulation of Re_xO_y clusters within single-walled carbon nanotubes and their *in tubulo* reduction and sintering to Re metal." *Chemistry of Materials* 17 (26): 6579–6582.
- Coulet, P. R., Julliard, J. H., and Gautheron, D. C. (1974). "A mild method of

- general use for covalent coupling of enzymes to chemically activated collagen films." *Biotechnology and Bioengineering* XVI: 1055–1068.
- Datsyuk, V., Kalyva, M., Papagelis, K., Parthenios, J., Tasis, D., Siokou, A., Kallitsis, I., and Galiotis, C. (2008). "Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes." *Carbon* 46 (6): 833–840.
- Davis, F., and Higson, S. P. J. (2007). "Biofuel cells — Recent advances and applications." *Biosensors and Bioelectronics* 22: 1224–1235.
- Davis, J. J., Coleman, K. S., Azamian, B. R., Bagshaw, C. B., and Green, M. L. H. (2003). "Chemical and biochemical sensing with modified single walled carbon nanotubes." *Chemistry - A European Journal* 9 (16): 3732–3739.
- Dilworth, J. R., and Parrott, S. J. (1998). "The biomedical chemistry of technetium and rhenium." *Chemical Society Reviews* 27: 43–55.
- Dobrzańska-Danikiewicz, A. D., Łukowiec, D., Wolany, W., and Cichocki, D. (2014). "MWCNTs-Pt versus MWCNTs-Re nanocomposites manufacturing method." *Archives of Materials Science and Engineering* 66 (1): 5–13.
- Dobrzańska-Danikiewicz, A. D., Wolany, W., Benke, G., and Rdzawski, Z. (2014). "The new MWCNTs-rhenium nanocomposite." *Physica Status Solidi (B) Basic Research* 251 (12): 2485–2490.
- Dykstra, P., Hao, J., Koev, S. T., Payne, G. F., Yu, L., and Ghodssi, R. (2009). "An optical MEMS sensor utilizing a chitosan film for catechol detection." *Sensors and Actuators, B: Chemical* 138 (1): 64–70.
- Falcone, D. D., Hack, J. H., Klyushin, A. Y., Knop-Gericke, A., Schlögl, R., and Davis, R. J. (2015). "Evidence for the bifunctional nature of Pt-Re catalysts for selective glycerol hydrogenolysis." *ACS Catalysis* 5 (10): 5679–5695.
- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á., and Moldes, D. (2013). "Recent developments and applications of immobilized laccase." *Biotechnology Advances* 31 (8): 1808–1825.
- Fu, J., Qiao, H., Li, D., Luo, L., Chen, K., and Wei, Q. (2014). "Laccase biosensor based on electrospun copper/carbon composite nanofibers for catechol detection." *Sensors (Basel, Switzerland)* 14 (2): 3543–3556.
- Glerup, M., Castignolles, M., Holzinger, M., Hug, G., Loiseau, A., and Bernier, P. (2003). "Synthesis of highly nitrogen-doped multi-walled carbon nanotubes." *Chemical Communications* 33 (20): 2542–2543.
- Greiner, M. T., Rocha, T. C. R., Johnson, B., Klyushin, A., Knop-Gericke, A., and Schlögl, R. (2014). "The oxidation of rhenium and identification of rhenium oxides during catalytic partial oxidation of ethylene: an *in-situ* XPS study." *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie* 228 (4–5): 521–541.

- Guo, M., Wang, H., Huang, D., Han, Z., Li, Q., Wang, X., and Chen, J. (2014). "Amperometric catechol biosensor based on laccase immobilized on nitrogen-doped ordered mesoporous carbon (N-OMC)/PVA matrix." *Science and Technology of Advanced Materials* 15 (3): 035005.
- Guo, S., and Wang, E. (2011). "Noble metal nanomaterials: Controllable synthesis and application in fuel cells and analytical sensors." *Nano Today* 6: 240–264.
- Hahn, B. P., May, R. A., and Stevenson, K. J. (2007). "Electrochemical deposition and characterization of mixed-valent rhenium oxide films prepared from a perrhenate solution." *Langmuir* 23 (21): 10837–10845.
- Hammer, P., Victoria, N. M., and Alvarez, F. (2000). "Effects of increasing nitrogen concentration on the structure of carbon nitride films deposited by ion beam assisted deposition." *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 18 (5): 2277–2287.
- Hatakka, A. I., Lundell, T. K., Tervilä, A. L. M., and Brunow, G. (1991). "Metabolism of non-phenolic β -O-4 lignin model compounds by the white-rot fungus *Phlebia radiata*." *Applied Microbiology Biotechnology* 36: 270–277.
- Huo, Z., Zhou, Y., Liu, Q., He, X., Liang, Y., and Xu, M. (2011). "Sensitive simultaneous determination of catechol and hydroquinone using a gold electrode modified with carbon nanofibers and gold nanoparticles." *Microchimica Acta* 173 (1–2): 119–125.
- Iijima, S. 1991. "Helical microtubules of graphitic carbon." *Nature* 354 (6348): 56–58.
- Jang, J. W., Lee C. E., Lyu, S. C., Lee, T. J., and Lee, C. J. (2004). "Structural study of nitrogen-doping effects in bamboo-shaped multiwalled carbon nanotubes." *Applied Physics Letters* 84 (15): 2877–2879.
- Jia, W., Beyl, Y., Schuhmann, W., Stoica, L., Gutiérrez-Sánchez, C., Pita, M., and De Lacey, A. L. (2012). "Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods." *Electrochimica Acta* 82: 218–223.
- Jia, X., Dong, S., and Wang, E. (2016). "Engineering the bioelectrochemical interface using functional nanomaterials and microchip technique toward sensitive and portable electrochemical biosensors." *Biosensors and Bioelectronics* 76: 80–90.
- Jiang, Y., Jia, L., Yu, S., and Wang, C. (2014). "An In-ZnO nanosheet-modified carbon nanotube-polyimide film sensor for catechol detection." *Journal of Materials Chemistry A* 2 : 6656–6662.

- Karim, F., and Fakhruddin, A. N. M. (2012). "Recent advances in the development of biosensor for phenol: A review." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 11 (3): 261–274.
- Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., and Bieroń, M. (2008). "Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds." *Microchemical Journal* 89 (2): 171–174.
- Komiyama, M., Ogino, Y., Akai, Y., and Goto, M. (1983). "X-ray photoelectron spectroscopic studies of unsupported and supported rhenium using argon-ion bombardment." *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* 79 (12): 1719–1728.
- Kremlev, K. V., Obiedkov, A. M., Ketkov, S. Yu., Kaverin, B. S., Semenov, N. M., Domrachev, G. A., Gusev, S. A., Tatarskiy, D. A., and Yunin, P. A. (2015). "New hybrid material based on multiwalled carbon nanotubes decorated with rhenium nanoparticles." *Journal of Surface Investigation* 9 (4): 694–698.
- Lee, You-Jin, Lyu, Young-Ku, Han, N. C. and Lee, Won-Yong. (2007). "Amperometric tyrosinase biosensor based on carbon nanotube-titania-nafion composite film." *Electroanalysis* 19 (10): 1048–1054.
- Li, X., Kong, L., Yang, J., Gao, M., Hu, T., Wu, X., and Li, M. (2013). "Synthesis and characterization of nitrogen-doped carbon nanotubes by pyrolysis of melamine." *Applied Physics A: Materials Science and Processing* 113 (3): 735–739.
- Li, Y., Zhang, X., Luo, J., Huang, W., Cheng, J., Luo, Z., Li, T., Liu, F., Xu, G., Ke, X., Li, L., Geise, H. J. (2004). "Purification of CVD synthesized single-wall carbon nanotubes by different acid oxidation treatments." *Nanotechnology* 15 (11): 1645–1649.
- Liu, H., Zhang, Y., Li, R., Sun, X., Désilets, S., Abou-Rachid, H., Jaidann, M., and Lussier, Louis-Simon. (2010). "Structural and morphological control of aligned nitrogen-doped carbon nanotubes." *Carbon* 48 (5): 1498–1507.
- Liu, Ying, Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B., and Dong, S. (2006). "Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite." *Biosensors and Bioelectronics* 21 (12): 2195–2201.
- Liu, Yuanyuan, Zeng, Z., Zeng, G., Tang, L., Pang, Y., Li, Z., Liu, C., Lei, X., Wu, M., Ren, P., Liu, Z., Chen, M., Xie, G. (2012). "Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds." *Bioresource Technology* 115: 21–26.
- Luo, H., Shi, Z., Li, N., Gu, Z., and Zhuang, Q. (2001). "Investigation of the Electrochemical and Electrocatalytic Behavior of Single-Wall Carbon Nanotube Film on a Glassy Carbon Electrode." *Analytical Chemistry* 73 (5):

915–920.

- Mayer, A. M., and Staples, R. C. (2002). "Laccase: new functions for an old enzyme" *Phytochemistry* 60: 551–565.
- Miniussi, E., Hernández, E. R., Pozzo, M., Baraldi, A., Vesselli, E., Comelli, G., Lizzit, S., and Alfé, D. (2012). "Non-local effects on oxygen-induced surface core level shifts of Re(0001)." *Journal of Physical Chemistry C* 116 (44): 23297–23307.
- Mittal, A. K., Chisti, Y., and Banerjee, C. U. (2013). "Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts." *Biotechnology Advances* 31 (2): 346–356.
- Mol, J. C. (1999). "Olefin metathesis over supported rhenium oxide catalysts." *Catalysis Today* 51 (2): 289–299.
- Monošík, R., Stredánský, M., and Šturdík, E. (2012). "Biosensors - classification, characterization and new trends." *Acta Chimica Slovaca* 5 (1): 109–120.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., and Yaropolov, A. I. (2007). "'Blue' Laccases." *Biochemistry (Moscow)* 72 (10): 1136–1150.
- Moulder, J. F., Stickle, W. F., Sobol, P. E., and Bomben, K. D. (1995). *Handbook Of X-ray Photoelectron Spectroscopy. A reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data*. Edited by Jill Chastain and Roger C. King. Eden Prairie, MN: Physical Electronics, Inc.
- Mucalo, M. R., and Bullen, C. R. (2001). "Rhenium-based hydrosols: Preparation and properties." *Journal of Colloid and Interface Science* 239 (1): 71–77.
- Muñoz, J., Céspedes, F., and Baeza, M. (2015). "Modified multiwalled carbon nanotube/epoxy amperometric nanocomposite sensors with CuO nanoparticles for electrocatalytic detection of free chlorine." *Microchemical Journal* 122: 189–196.
- Nelson, D. L., and Cox, Michael M. (2008) *Lehninger. Principles Of Biochemistry*. 5th Edition. Edited by Katherine Ahr, NY: W. H. Freeman and Company.
- Okal, J., Tylus, W., and Kępiński, L. (2004). "XPS study of oxidation of rhenium metal on γ -Al₂O₃ support." *Journal of Catalysis* 225 (2): 498–509.
- Pels, J. R., Kapteijn, F., Moulijn, J. A., Zhu, Q., and Thomas, K. M. (1995). "Evolution of nitrogen functionalities in carbonaceous materials during pyrolysis." *Carbon* 33 (11): 1641–1653.
- Pérez-López, B., and Merkoçi, A. (2011). "Magnetic nanoparticles modified with carbon nanotubes for electrocatalytic magnetoswitchable biosensing applications." *Advanced Functional Materials* 21 (2): 255–260.

- Planeix, J. M., Coustel, N., Coq, B., Brotons, V., Kumbhar, P. S., Dutartre, R., Geneste, P., Bernier, P., and Ajayan, P. M. (1994). "Application of carbon nanotubes as supports in heterogeneous catalysis." *Journal of the American Chemical Society* 116 (17): 7935–7936.
- Portaccio, M., Di Tuoro, D., Arduini, F., Lepore, M., Mita, D. G., Diano, N., Mita, L., and Moscone, D. (2010). "A thionine-modified carbon paste amperometric biosensor for catechol and bisphenol A determination." *Biosensors and Bioelectronics* 25 (9): 2003–2008.
- Possamai, G., Menna, E., Maggini, M., Carano, M., Marcaccio, M., Paolucci, F., Guldi, D. M., and Swartz, A. (2006). "Rhenium(I) and ruthenium(II) complexes with a crown-linked methanofullerene ligand: synthesis, electrochemistry and photophysical characterization." *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 5 (12): 1154–1164.
- Quan, D., and Shin, W. 2004. "Amperometric detection of catechol and catecholamines by immobilized laccase from DeniLite." *Electroanalysis* 16 (19): 1576–1582.
- Ribeiro, F. W. P., Barroso, M. F., Morais, S., Viswanathan, S., de Lima-Neto, P., Correia, A. N., Oliveira, M. B. P. P., and Delerue-Matos, C. (2014). "Simple laccase-based biosensor for formetanate hydrochloride quantification in fruits." *Bioelectrochemistry* 95: 7–14.
- Riedel, K., Hensel, J., Rothe, S., Neumann, B., and Scheller, F. (1993). "Microbial sensors for determination of aromatics and their chloroderivatives. Part II: Determination of chlorinated phenols using a *Rhodococcus*-containing biosensor." *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 556–559.
- Rodríguez Couto, S., and Toca Herrera, J. L. (2006). "Industrial and biotechnological applications of laccases: A review." *Biotechnology Advances* 24: 500–513.
- Rodríguez Rincón, F. (2006). "Análisis molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavidio-alba*: Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales." Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- Rojas, J. V., and Castano, C. H. (2014). "Synthesis of rhenium oxide nanoparticles (Re_xO_y) by gamma irradiation." *Radiation Physics and Chemistry* 99: 1–5.
- Romero-Arcos, M., Garnica-Romo, M. G., Martinez-Flores, H. E., Vázquez-Marrufo, G., Ramírez-Bon, R., González-Hernández, J., and Barbosa-Cánovas, G. V. (2015). "Enzyme immobilization by amperometric biosensors with TiO_2 nanoparticles used to detect phenol compounds." *Food Engineering Reviews* 8 (2): 235–250.
- Rouschias, G. (1974). "Recent advances in the chemistry of rhenium." *Chemical*

Reviews 74 (5): 531–566.

- Rubianes, M. D., and Rivas, G. A. (2003). "Carbon nanotubes paste electrode." *Electrochemistry Communications* 5: 689–694.
- Sassolas, A., Blum, L. J., and Leca-Bouvier, B. D. (2012). "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors." *Biotechnology Advances* 30 (3): 489–511.
- Scognamiglio, V., Antonacci, A., Lambrea, M. D., Litescu, S. C., and Rea, G. (2015). "Synthetic biology and biomimetic chemistry as converging technologies fostering a new generation of smart biosensors." *Biosensors and Bioelectronics* 74: 1076–1086.
- Serrano, A., Palacios, C., Roy, G., Cespón, C., Villar, M. L., Nocito, M., and González-Porqué, P. (1998). "Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 350 (1): 49–54.
- Shcheglov, P. A., and Drobot, D. V. (2006). "Heterogeneous equilibria in the rhenium-oxygen system." *Russian Journal of Physical Chemistry* 80 (11): 1819–1825.
- Sheldon, R. A. 2007. "Enzyme immobilization: The quest for optimum performance." *Advanced Synthesis and Catalysis* 349 (8–9): 1289–1307.
- Slomczynski, D., Nakas, J. P., and Tanenbaum, S. W. (1995). "Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34." *Applied Environmental Microbiology* 61 (3): 907–912.
- Stalikas, C. D. (2007). "Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids." *Journal of Separation Science* 30 (18): 3268–3295.
- Stoyanov, S. R., Titov, A. V., and Král, P. (2009). "Transition metal and nitrogen doped carbon nanostructures." *Coordination Chemistry Reviews* 253 (23–24): 2852–2871.
- Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N., and Mori, H. (1993). "Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats." *Cancer Research* 53 (12): 2775–2779.
- Tang, Y., Allen, B. L., Kauffman, D. R., and Star, A. (2009). "Electrocatalytic activity of nitrogen-doped carbon nanotube cups." *Journal of the American Chemical Society* 131 (37): 13200–13201.
- Tavares, A. P. M., Silva, C. G., Dražić, G., Silva, A. M. T., Loureiro, J. M., and Faria, J. L. (2015). "Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies." *Journal of Colloid and Interface Science* 454: 52–60.

- Tembe, S., Inamdar, S., Haram, S., Karve, M., and D'Souza, S. F. (2007). "Electrochemical biosensor for catechol using agarose-guar gum entrapped tyrosinase." *Journal of Biotechnology* 128 (1): 80–85.
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., and Wilson, G. S. (1999). "Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification." *Pure and Applied Chemistry* 71 (12): 2333–2348.
- Thurston, C. F. (1994). "The structure and function of fungal laccases." *Microbiology* 140: 19–26.
- Timur, S., Pazarlioğlu, N., Pilloton, R., and Telefoncu, A. (2003). "Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on *Pseudomonas putida*." *Talanta* 61 (2): 87–93.
- Tysoe, W. T., Zaera, F., and Somorjai, G. A. (1988). "An XPS study of the oxidation and reduction of the rhenium-platinum system under atmospheric conditions." *Surface Science* 200 (1): 1–14.
- Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M., and Uwajima, T. (2001). "Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287: 355–58.
- Vargas-Uscategui, A., Mosquera, E., and Cifuentes, L. (2013). "Analysis of the electrodeposition process of rhenium and rhenium oxides in alkaline aqueous electrolyte." *Electrochimica Acta* 109: 283–90.
- Wang, Y., Rong, Z., Wang, Y., and Qu, J. (2015). "Ruthenium nanoparticles loaded on multiwalled carbon nanotubes for liquid-phase hydrogenation of fine chemicals: An exploration of confinement effect." *Journal of Catalysis* 329: 95–106.
- Wu, B., Kuang, Y., Zhang, X., and Chen, J. (2011). "Noble metal nanoparticles/carbon nanotubes nanohybrids: Synthesis and applications." *Nano Today* 6 (1): 75–90.
- Xu, F. (1996). "Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition." *Biochemistry* 35 (23): 7608–7614.
- Xu, F., Minniti, M., Barone, P., Sindona, A., Bonanno, A., and Oliva, A. (2008). "Nitrogen doping of single walled carbon nanotubes by low energy N_2^+ ion implantation." *Carbon* 46 (11): 1489–1496.
- Xu, M., Cui, L., Han, R., and Ai, S. (2012). "Amperometric biosensor based on hemoglobin immobilized on Cu_2S nanorods/nafion nanocomposite film for the determination of polyphenols." *Journal of Solid State Electrochemistry* 16 (7): 2547–2554.

- Xu, X., Guo, M., Lu, P., and Wang, R. (2010). "Development of amperometric laccase biosensor through immobilizing enzyme in copper-containing ordered mesoporous carbon (Cu-OMC)/chitosan matrix." *Materials Science and Engineering C* 30 (5): 722–729.
- Xu, X., Jiang, S., Hu, Z., and Liu, S. (2010). "Nitrogen-doped carbon nanotubes: High electrocatalytic activity toward the oxidation of hydrogen peroxide and its application for biosensing." *ACS Nano*. 4 (7): 4292–4298.
- Xu, Z., Chen, X., Qu, X., and Dong, S. (2004). "Electrocatalytic oxidation of catechol at multi-walled carbon nanotubes modified electrode." *Electroanalysis* 16 (8): 684–687.
- Yao, Q., Lu, Z. H., Jia, Y., Chen, X., and Liu, X. (2015). "In situ facile synthesis of Rh nanoparticles supported on carbon nanotubes as highly active catalysts for H₂ generation from NH₃BH₃ hydrolysis." *International Journal of Hydrogen Energy* 40 (5): 2207–2215.
- Yoshida, H. (1883). "Chemistry of lacquer (Urushi) Part I." *Journal of the Chemical Society* 43: 472–486.
- Zheng, X., Deng, J., Wang, N., Deng, D., Zhang, W. H., Bao, X., and Li, C. (2014). "Podlike N-doped carbon nanotubes encapsulating FeNi alloy nanoparticles: High-performance counter electrode materials for dye-sensitized solar cells." *Angewandte Chemie - International Edition* 53 (27): 7023–7027.
- Zinn, A. A. (2010). Patent No.: US 7,736,414 B1.