

**Síntesis y caracterización de nanomateriales
híbridos de carbono con propiedades de
reconocimiento molecular: Nuevas
plataformas electroanalíticas para la
detección de marcadores de relevancia clínica,
forense y ambiental**

TESIS DOCTORAL

Antonella Evelin Montemerlo

Departamento de Físicoquímica. Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Nacional de Córdoba

INFIQC-CONICET

CÓRDOBA - ARGENTINA

2021



I N F I Q C

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Instituto de Investigaciones en Fisico-Química de Córdoba, en el Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba; bajo la dirección de la Dra. María Dolores Rubianes y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Dra. María Dolores Rubianes

COMISIÓN EVALUADORA

Dr. Gustavo A. Rivas

Dra. Marisa Martinelli

Dra. Cecilia Sanchez

Dra. María Alicia Zon
(Evaluador externo)

ÍNDICE

Resumen y palabras clave	VIII
Abreviaturas	XII
Capítulo I: Introducción general	1
I-1. Sensores.....	3
I-1.1. Clasificación de sensores según el tipo de transducción.....	4
I-1.1.1. Sensores electroquímicos.....	6
I-2. Estrategias de amplificación de señales electroquímicas.....	7
I-2.1. Modificación de sustratos sólidos.....	8
I-3. Nanohíbridos	10
I-3.1. Nanoestructuras de carbono.....	12
I-3.1.1. Nanotubos de carbono.....	14
I-3.1.2. Grafeno y derivados de grafeno.....	16
I-3.1.3. Puntos cuánticos de carbono.....	20
I-3.1.4. Funcionalización de nanoestructuras de carbono.....	22
I-3.2. Monómeros y polímeros.....	24
I-4. Bibliografía	26
Capítulo II: Materiales y métodos.....	35
II-1. Técnicas electroquímicas.....	37
II-1.1. Voltamperometría cíclica.....	37
II-1.2. Amperometría.....	40
II-1.3. Voltamperometría hidrodinámica	42
II-1.4. Técnicas de preconcentración (<i>stripping</i>).....	43
II-1.5. Espectroscopia de impedancia electroquímica	44
II-1.5.1. Circuitos equivalentes	46
II-1.6. Equipamiento	48
II-1.6.1. Celdas y electrodos	48
II-2. Microscopía electrónica de barrido.....	50

II-3. Técnicas espectroscópicas.....	51
II-3.1.Espectroscopia de absorción Ultra-Violeta.....	51
II-3.2.Espectroscopia Infrarroja	52
II-3.3.Espectroscopia RAMAN.....	53
II-3.4.Dispersión dinámica de la luz.....	54
II-3.5.Equipamiento.....	54
II-4. Análisis termogravimétrico.....	54
II-5. Bibliografía.....	56

Capítulo III: CNT-PEI Síntesis,caracterización y aplicaciones analíticas. Sensor para la cuantificación de la recaptación de dopamina en Sistema Nervioso Central..... 59

III-1.Introducción.....	61
III-2.Sección experimental.....	63
III-2.1.Síntesis y caracterización de CNT-PEI.....	63
III-2.2.Cuantificación de dopamina en Sistema Nervioso Central.....	64
III-3.Resultados y discusión.....	65
III-3.1.Caracterización espectroscópica y microscópica de CNT-PEI.....	65
III-3.2.Caracterización electroquímica de CNT-PEI	67
III-3.3.Parámetros analíticos del sensor.....	69
III-4.Aplicaciones analíticas	70
III-4.1.Evaluación de la recaptación de dopamina en Sistema Nervioso Central	74
III-4.1.1.Estrategia de cuantificación de la recaptación de dopamina.....	74
III-4.1.2.Pretratamiento del tejido de Sistema Nervioso Central.....	75
III-4.2.Evaluación del efecto de la utilización de candesartan en la recaptación de dopamina en tejido estriado de Sistema Nervioso Central.....	76
III-4.3.Evaluación de la falta de expresión de la proteína p35 en la función dopaminérgica de Sistema Nervios Central.....	80
III-5.Conclusiones parciales.....	82

Capítulo IV: RGrO-Poli-L-Dopa Síntesis y caracterización.....	89
IV-1.Introducción.....	91
IV-2.Sección experimental.....	95
IV.2.1.Síntesis de RGrO-Poli-catecolamina.....	95
IV.2.2.Caracterización de RGrO-Poli-catecolamina.....	96
IV.2.2.1.Caracterización electroquímica.....	96
IV.2.2.2.Caracterización estructural y morfológica.....	97
IV-3.Resultados y discusión.....	97
IV.3.1.Optimización de la cantidad y la identidad de la catecolamina empleada en la síntesis.....	97
IV.3.2.Caracterización por voltamperometría hidrodinámica.....	99
IV.3.3.Optimización del tiempo de sonicado.....	100
IV.3.4.Caracterización espectroscópica.....	102
IV.3.4.1.Caracterización por espectroscopia infrarroja.....	102
IV.3.4.2.Caracterización por espectroscopia UV visible.....	103
IV.3.4.3.Caracterización por espectroscopia Raman.....	106
IV.3.4.4.Caracterización por microscopia electrónica de barrido y dispersión dinámica de la luz.....	109
IV-4.Conclusiones parciales.....	111
IV-5.Bibliografía.....	113
Capítulo V: RGrO-Poli-L-Dopa Aplicaciones analíticas. Sensor para la detección de peróxido de hidrógeno en muestras de cosméticos y de Pb y Sb en muestras forenses.....	119
V-1.Cuantificación de peróxido de hidrógeno.....	121
V-1.1.Introducción.....	121
V-1.2.Sección experimental.....	124
V-1.3.Resultados y discusión.....	125
V-1.3.1.Parámetros analíticos de GCE/RGrO-Poli-L-Dopa para la cuantificación de peróxido de hidrógeno.....	125
V-1.3.2.Análisis de muestra real.....	126

V-2. Cuantificación de Plomo y Antimonio.....	127
V-2.1.Introducción.....	127
V-2.2.Sección experimental.....	133
V-2.2.1.Metodología de detección de plomo y antimonio.....	133
V-2.2.2.Obtención y pretratamiento de muestras reales	135
V-2.3.Resultados y discusión.....	136
V-2.3.1.Comportamiento electroquímico de Plomo sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa.....	136
V-2.3.2.Optimización de los parámetros experimentales para la detección simultánea de plomo y antimonio	138
V-2.3.2.1.Estudio del tiempo de preconcentración.....	138
V-2.3.2.2.Estudio del tiempo y potencial de reducción.....	140
V-2.3.2.3.Estudio del medio de reducción.....	144
V-2.3.2.4.Parámetros óptimos para la detección simultánea de plomo y antimonio	146
V-2.3.3.Parámetros analíticos de GCE/RGrO-Poli-L-Dopa para la cuantificación simultánea de plomo y antimonio	148
V-2.3.4.Cuantificación de plomo y antimonio en muestras reales.....	153
V-2.3.4.1.Muestras tomadas de manos.....	153
V-2.3.4.2.Muestras de disparos en prendas.....	155
V-3. Conclusiones Parciales.....	161
V-4. Bibliografía.....	163
Capítulo VI: GEQE-CQDots Síntesis y caracterización.....	171
VI-1.Introducción	173
VI-2.Sección experimental.....	179
VI.2.1.Síntesis de GEQE.....	179
VI.2.2.Síntesis de CQDots.....	180
VI.2.3.Síntesis del nanohíbrido GEQE-CQDots.....	183
VI.2.4.Caracterización de las nanoestructuras.....	183
VI.2.4.1.Caracterización electroquímica.....	183

VI.2.4.2.Caracterización morfológica y espectroscópica.....	183
VI-3.Resultados y discusión	184
VI.3.1.Caracterización de GEQE.....	184
VI.3.1.1.Evaluación de la estructura de GEQE mediante Raman.....	184
VI.3.1.2.Evaluación de la estabilidad térmica de GEQE	188
VI.3.1.3.Evaluación de la respuesta electroquímica de GEQE.....	189
VI.3.2.Caracterización de CQDots.....	193
VI.3.2.1.Propiedades ópticas de CQDots, análisis UV-Visible.....	193
VI.3.2.2.Análisis de la estructura química de las partículas sintetizadas mediante FT-IR	194
VI.3.2.3.Análisis del tamaño de CQDots por dispersión dinámica de la luz...196	
VI.3.2.4. Propiedades electroquímicas de CQDots sintetizadas.....	196
VI.3.3.Caracterización electroquímica del híbrido GEQE-CQDots	199
VI-4.Conclusiones parciales.....	201
VI-5.Bibliografía	203

Capítulo VII: GEQE-CQDots Aplicaciones analíticas. Sensor para la detección de glifosato

209	209
VII-1.Introducción.....	211
VII-2.Sección experimental.....	216
VII-2.1.Metodología de detección de glifosato	216
VII-3.Resultados y discusión.....	217
VII-3.1.Evaluación de la respuesta electroquímica de glifosato	217
VII-3.2.Cuantificación indirecta de glifosato.....	218
VII-3.3.Optimización de los parámetros de síntesis de GEQE-CQDots y detección de glifosato	220
VII-3.3.1.Optimización del tiempo de sonicado	221
VII-3.3.2.Optimización de la cantidad de CQDots.....	222
VII-3.3.3.Optimización del tiempo de interacción con glifosato	223
VII-3.4.Dependencia de la concentración de glifosato con la resistencia a la transferencia de carga.....	225

VII-3.5.Cuantificación de glifosato en una muestra de agua.....	227
VII-3.6.Cuantificación de glifosato en una formulación de producto fitosanitario	228
VII-4.Conclusiones parciales	229
VII-5.Bibliografía	230
Capítulo VIII: Conclusiones generales.....	237
VIII-1.Conclusiones generales	239

Resumen y palabras clave

El principal desafío de la **Química Analítica** en la actualidad se centra en el diseño y preparación de nuevas plataformas sensoras altamente sensibles, reproducibles, robustas, miniaturizables, portables y capaces de cuantificar de forma rápida, selectiva y simultánea diversos analitos en escenarios antes impensados. En ese sentido, este trabajo de Tesis se centra en el desarrollo **pionero** de sistemas electro-analíticos basados en el diseño racional de diferentes soportes electródicos nanosestructurados que permitan la cuantificación sensible y selectiva de analitos de relevancia clínica, forense y medioambiental facilitando la toma de decisiones inmediata con la información obtenida.

Para ello, se estudió la síntesis criteriosa de diversos tipos de nanomateriales híbridos a partir de **nanoestructuras de carbono y polímeros**. Los nuevos materiales se inmovilizaron sobre sustratos de carbono vítreo (GCE) con el objetivo de construir plataformas analíticas para el desarrollo de sensores electroquímicos tendientes a la cuantificación de analitos de relevancia en áreas de candente actualidad, como lo son las **enfermedades neurodegenerativas**, la determinación forense de **residuos de disparo de armas de fuego** y la detección de **herbicidas** polémicos y ampliamente utilizados con implicancias no solo en la salud sino que también a nivel medioambiental.

El **CAPÍTULO 1** presenta una introducción general acerca de las propiedades y metodologías de síntesis de novedosos **nanomateriales híbridos** tendientes al diseño de **sensores electroquímicos**. Se describen las diferentes estrategias y metodologías empleadas para la incorporación de los nanomateriales sobre sustratos conductores que permitirán la posterior detección altamente sensible y selectiva de los analitos de interés. El **CAPÍTULO 2** discute los fundamentos y las técnicas más representativas empleadas para el desarrollo del presente trabajo de Tesis y las metodologías utilizadas para la obtención de los resultados.

En el **CAPÍTULO 3** se presenta la síntesis, mediante funcionalización no covalente, y caracterización de un híbrido 1D compuesto por **nanotubos de carbono** (CNT) con un bio-polímero como polietilenimina (PEI). Se discuten las propiedades electroquímicas del nanométrico resultante, luego de su

inmovilización sobre GCE, y la caracterización tanto espectroscópica como microscópica de CNT-PEI las cuales permiten comprender sus propiedades y alcances. Se propone el empleo del sensor GCE/CNT-PEI para la cuantificación de manera sencilla, con bajos límites de detección y en presencia de muestras de cerebro de animales de laboratorio, con diversas patologías neurodegenerativas, con resultados sumamente promisorios para dilucidar los cambios en la **recaptación de dopamina** (DA) en sistema nervioso central (SNC). Cabe destacar que el trabajo interdisciplinario en esta área de investigación es lo que posibilitó la utilización de GCE/CNT-PEI para estudios clínicos y farmacológicos que permitieron validar estudios tendientes a ser utilizados como herramienta para el tratamiento de diversos trastornos del SNC.

El **CAPÍTULO 4** presenta el desarrollo de un nuevo nanomaterial híbrido 2D resultante de la reducción de **óxido de grafeno** (RGrO) *in situ*, mediante la formación de polímeros melánicos a partir monómeros como L-Dopa (Poly-L-Dopa) por ultrasonido. Se analiza el efecto de las condiciones de síntesis sobre la respuesta electroquímica de la plataforma y se presenta la caracterización espectroscópica y microscópica del material resultante. En el **CAPÍTULO 5** se propone el uso de RGrO-Poly-L-Dopa para la construcción de una plataforma sensora para la detección de peróxido de hidrógeno en muestras de interés fármaco-bromatológico. Por otra parte, se discute la optimización de los parámetros experimentales (tiempo de preconcentración, potencial de reducción, tiempo de reducción y composición del medio reductor) para la aplicación del sensor en la cuantificación simultánea y sin interferencia de **plomo** y **antimonio** en el orden de ppb. Se exponen los resultados obtenidos para la cuantificación novedosa y de bajo costo de estos metales en muestras forenses. Se propone una forma sencilla de obtención y procesado de muestras de residuos de disparo de diferentes armas de fuego, con distintos cartuchos y variando la distancia de deflagración, todas ellas obtenidas en polígono forense por peritos criminalistas. Es de suma importancia destacar que estos resultados permiten incursionar, por primera vez, en un campo muy poco explorado y de gran actualidad, como lo es la **balística-forense**.

El **CAPÍTULO 6** plantea la síntesis mediante metodologías electroquímicas, *top down* y *botton up*, de dos materiales de naturaleza carbonácea: **grafeno electroquímicamente expandido** (GEQE) y **Carbon Quantum Dots** (CQDots). Se estudian de manera crítica las condiciones de síntesis óptimas para la obtención de ambos nanomateriales y se correlacionan con las respuestas electroquímicas observadas. Se describe la obtención de un novedoso nanomaterial híbrido, formado a partir de estas nanoestructuras 2D y 0D sintetizadas, que combina las propiedades electroquímicas renovadas y superiores de los nanomateriales individuales. En el **CAPÍTULO 7** se presenta el empleo del nanohíbrido, inmovilizado sobre GCE, para el desarrollo de un sensor tendiente a la detección indirecta de **glifosato** (Gly) con un amplio intervalo lineal, lo que posibilita el empleo del mismo para la cuantificación del analito de interés en muestras de origen muy diverso, tales como muestras de agua, así como también en muestras de formulaciones de productos fitosanitarios, dando como resultado un sensor apto para el control de calidad medioambiental o industrial de respuesta rápida y de bajo costo.

Finalmente, el **CAPÍTULO 8** expone las conclusiones generales del presente trabajo de Tesis Doctoral.

Palabras clave: sensor electroquímico, nanohíbrido, nanomateriales de carbono, nanotubos de carbono, óxido de grafeno, grafeno electroquímicamente expandido, *Carbon Quantum Dots*, monómero, polímero, dopamina, plomo, antimonio, glifosato, enfermedades neurodegenerativas, balística forense, control medioambiental.

Abreviaturas

AA: Ácido ascórbico

Arg: Arginina

AT1: Receptor de angiotensina II tipo 1

C_{dc}: Capacidad de la doble capa

CNT: Nanotubos de carbono

CQDots: Carbon Quantum Dots

DA: Dopamina

DLS: Dispersión dinámica de la luz

D_R: Coeficiente de difusión de la especie R

DWCNT: Nanotubos de carbono de pared doble

E°: Potencial estándar

E^o: Potencial formal

E_c: Potencial de corte

E_f: Potencial final

E_i: Potencial inicial

EIE: Espectroscopia de impedancia electroquímica

E_{pa}: Potencial de pico anódico

E_{pc}: Potencial de pico catódico

F: Constante de Faraday

FT-IR: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

GCE: Electrodo de carbono vítreo

GEQE: Grafeno electroquímicamente expandido

Gly: Glifosato

GrO: Óxido de grafeno

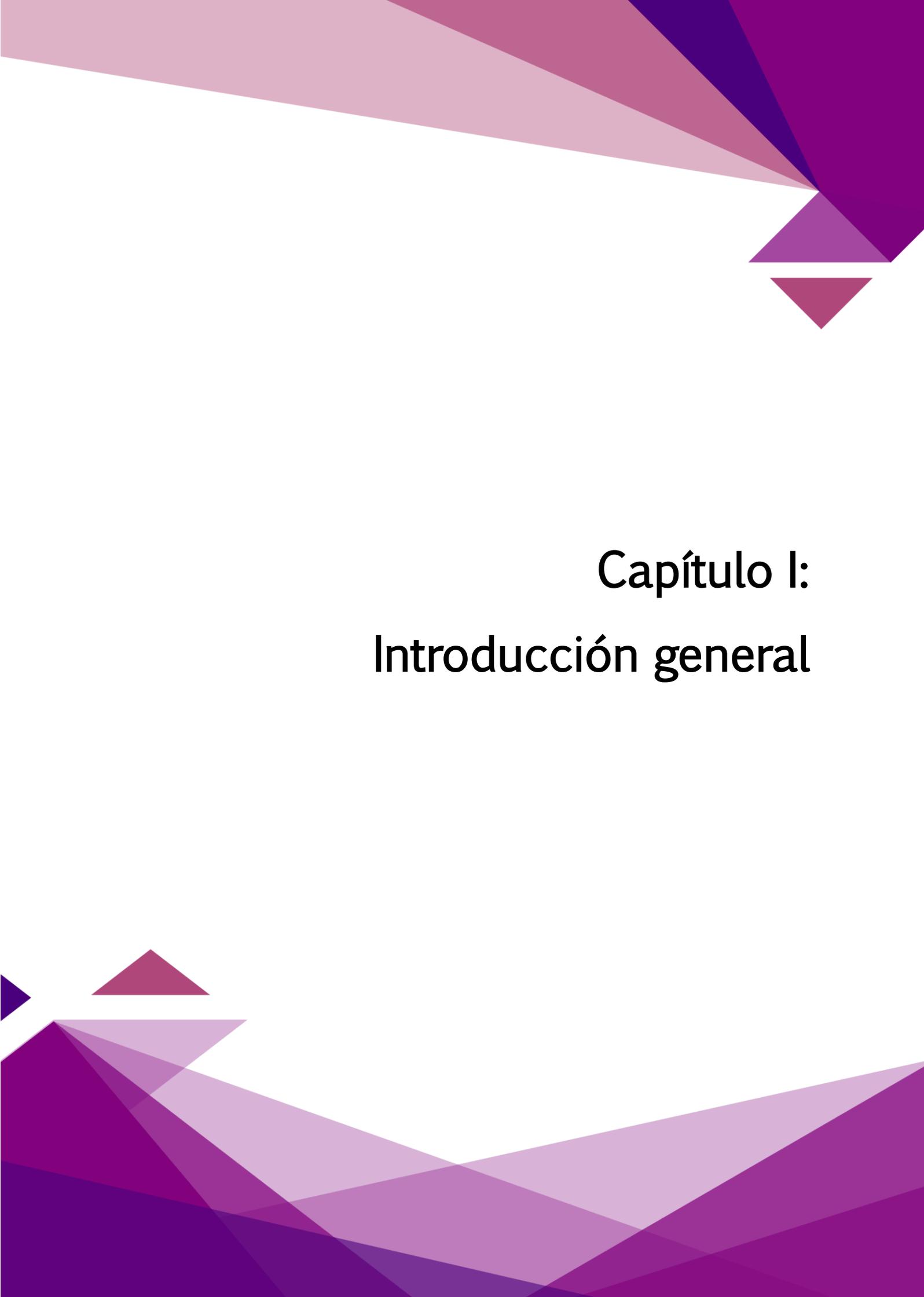
I_{ee}: Corriente de estado estacionario

I_{pa}: Corriente de pico anódico

I_{pc}: Corriente de pico catódico

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

L-Arg: L-arginina
LOD: Límite de detección
LOQ: Límite de cuantificación
MWCNT: Nanotubos de carbono de paredes múltiples
o.c.p: Potencial de circuito abierto
O: Especie oxidada
PEI: Polietilenimina
Poli-DA: Polidopamina
QDots: Quantum Dots
R: Especia reducida
RGrO: Óxido de grafeno reducido
R_s: Resistencia de la solución
R_{tc}: Resistencia a la transferencia de carga
SD: Desviación estándar
SEM: microscopía electrónica de barrido
SNC: Sistema nervioso central
SWCNT: Nanotubos de carbono de pared simple
TDHA: trastorno por déficit de atención con hiperactividad
TGA: Análisis termogravimétrico
v: Velocidad de barrido de potencial
VC: voltamperometría cíclica
Z: impedancia
Z': impedancia real
Z'': impedancia imaginaria
Z_w: impedancia de Warburg
ΔE_p: Diferencia de potencial de pico
Δi: Diferencia de corriente
φ: Ángulo de fase
ω: Frecuencia angular



Capítulo I: Introducción general

Los sensores forman parte de nuestra vida cotidiana y se encuentran presentes en un sinnúmero de dispositivos que utilizamos a diario. Por ejemplo, algunos teléfonos inteligentes contienen más de una docena de ellos, que indican la posición del instrumento, el brillo del entorno, la presencia de un usuario y muchos otros hechos.

En un sentido amplio, los sensores representan una clase de dispositivos capaces de detectar entidades químicas específicas o monitorear cambios en el ambiente circundante al traducir un evento (señal de entrada) en una señal medible (señal de salida). La importancia de esta área se subraya por la variedad de sensores que se aplican en múltiples facetas de la ciencia, la medicina, la tecnología y la ingeniería [1]. De hecho, a lo largo de los años se han desarrollado una innumerable cantidad de sensores capaces de monitorear y medir eventos tan diversos como cambios de presión, temperatura y humedad, así como también el monitoreo de compuestos tóxicos presentes en el medio ambiente o dispositivos para el control y seguimiento de pacientes con diabetes, entre muchos otros.

I-1. Sensores

De manera general los sensores pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de evento o señal de entrada en sensores físicos y químicos. Los primeros son dispositivos capaces de proporcionar señales medibles, a partir del monitoreo de diferentes eventos físicos, como por ejemplo, magnetismo [2], deformación de un cuerpo [3], presión [4], entre otros. Por otra parte, en 1991, la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) estableció la definición de sensor químico como un dispositivo que transforma la información química, desde la concentración de un componente de muestra específico hasta el análisis de la composición total, en una señal analíticamente útil [5]. Es decir, que es un dispositivo analítico capaz de detectar determinadas especies químicas de manera continua y reversible, el cual consta de un transductor acoplado a una fase de reconocimiento químicamente selectiva [6]. En 1999, la IUPAC determinó que: “Los sensores químicos generalmente contienen dos componentes básicos conectados en serie: un sistema de reconocimiento químico (capa de reconocimiento) y un

transductor fisicoquímico" [7]. El receptor se encuentra en contacto directo con la muestra y responde selectivamente a una sustancia en particular o a un grupo de sustancias. El transductor debe ser capaz de transformar las señales químicas producidas como consecuencia del evento de reconocimiento en una señal medible y, además, proporcionar información semicuantitativa o cuantitativa de los cambios de las propiedades del receptor, causadas por la interacción con los componentes de la muestra analizada [8]. La figura I-1 muestra el diagrama de bloque básico de funcionamiento de un sensor.

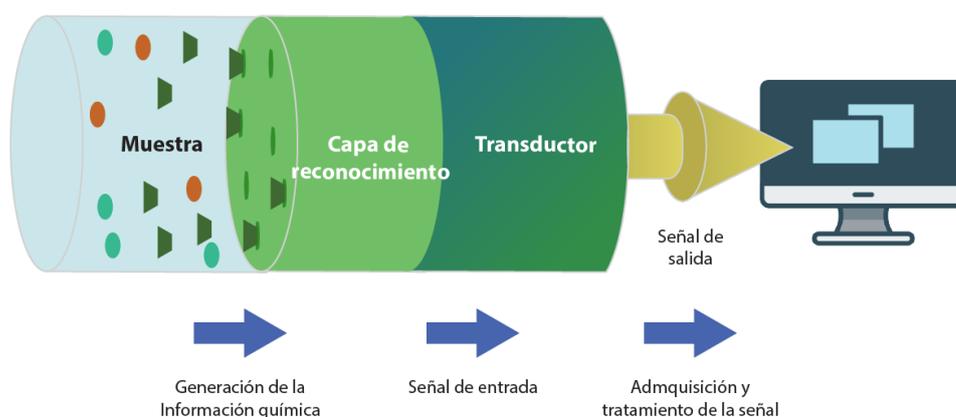


Figura I-1. Esquema de bloques de los componentes básicos de un sensor químico.

I-1.1. Clasificación de sensores según el tipo de transducción

Considerando el origen de la información química que se genera en el sensor y las características del transductor que lo conforma, es posible establecer una clasificación de los sensores químicos en ópticos, acústicos y electroquímicos. Siendo estos tres grupos los que han sido desarrollados más ampliamente en los últimos años.

- * Ópticos: este tipo de sensores se basan en la detección de un haz de luz u otras ondas electromagnéticas durante la interacción con las especies químicas [9]. Es decir que traducen o transducen en una señal óptica los cambios producidos por la interacción del analito con el receptor, en un parámetro analíticamente medible. Los principios físicos y arreglos desarrollados en el área de los sensores ópticos son numerosos, como son por lo tanto los distintos métodos de detección de señal, por ejemplo detectores de fluorescencia, absorbancia,

luminiscencia, resonancia de plasmón superficial (SPR) [10-13], entre otras. Si bien poseen la ventaja de determinar de manera directa el analito de interés en tiempo real y poseen una alta especificidad y sensibilidad, suelen operar con equipos de gran tamaño que poseen sistemas ópticos muy delicados, por lo que no es factible la miniaturización de estos sistemas.

- * *Acústicos*: Este tipo de sensores se fundamentan en microgravimetría, es decir, la medición de cambios de masa que ocurren producto de la interacción de las especies químicas con el sensor. Su diseño consta de un material piezoeléctrico sometido a oscilación. La respuesta de estos dispositivos se relaciona con cambios en la frecuencia de resonancia o frecuencia base, que dependen de las variaciones de masa de la especie química a detectar presente en la fase detectora (o de reconocimiento) del sensor. La frecuencia de resonancia depende principalmente del espesor del cristal piezoeléctrico, del recubrimiento de la fase detectora y de las propiedades visco-elásticas del cristal [14]. La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM; *Quartz Crystal Microbalance*) y los sensores de onda acústica superficial (SAW; *Surface Acoustic Wave*) son algunas técnicas empleadas para el desarrollo de este tipo de sensores [15,16]. Si bien se utilizan equipos relativamente económicos y poseen una alta sensibilidad, como se mencionó con anterioridad, estos sensores son incapaces de separar la contribución de señal que se da por parte del analito de interés, de la señal proveniente del solvente empleado en el análisis.
- * *Electroquímicos*: esta subclase de sensores es una de las más importantes de los últimos tiempos debido a su versatilidad, en cuanto a las infinitas posibilidades de modificar la superficie de los electrodos, de manera tal de conferirle al sensor alta sensibilidad y selectividad. Por otra parte, los equipos utilizados son más económicos que los empleados para el desarrollo de otro tipo de sensores y en la actualidad se fabrican de tamaños relativamente pequeños con autonomía eléctrica, lo que posibilita la miniaturización de los instrumentos y el transporte de los mismos, estas características los hace sumamente promisorios para el análisis de muestra reales en el

campo, de manera sencilla y con tiempos de respuesta relativamente cortos [17,18]. El principio básico del funcionamiento de estos sensores se centra en la medición de los cambios eléctricos que se producen, en general, a partir de reacciones en las que se involucra la transferencia de electrones, es decir reacciones de óxido-reducción, en donde la respuesta analítica se correlaciona directamente con la concentración, con el consumo o producción del analito de interés.

I-1.1.1. Sensores electroquímicos

Los sensores electroquímicos pueden ser subdivididos en potenciométricos, conductimétricos, voltamétricos e impedimétricos de acuerdo a la naturaleza de la variable que se utiliza para realizar la detección del analito de interés.

Los sensores *potenciométricos*, obtienen la información útil a partir de la diferencia de potencial que se origina entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia por la variación de la concentración de la especie de interés. Cuando el electrodo indicador es un electrodo de membrana, que son los más comunes, el potencial se establece por la diferencia de concentración del analito de interés a un lado y otro de la membrana que separa a los dos electrodos, este tipo de sensores son bastante selectivos. Los ejemplos más comunes de este tipo sensores son los electrodos selectivos para diversos iones como flúor, sodio, protones y litio entre otros [19].

Por otra parte, los sensores *conductimétricos* están relacionados con la medición de la conductividad a una serie de frecuencias. Detectan cambios en la conductividad eléctrica de una capa o la mayor parte de un material, ocasionados por la presencia del compuesto de interés, como consecuencia, la concentración de la especie analizada se puede relacionar con los cambios observados [20].

Los sensores *voltamétricos* basan su funcionamiento en la medición de la relación corriente-potencial. De manera general, se puede mencionar que se realiza una lectura de la corriente obtenida por la presencia de la especie electroactiva de interés luego de aplicar un dado potencial [21]. Un caso

especial de este tipo de sensores son los *amperométricos*, en los cuales el potencial aplicado se mantiene constante. Los sensores *amperométricos* cuantifican los cambios en la corriente cuando se produce la óxido-reducción de una especie electroactiva al aplicar un potencial constante. Para este tipo de sensores, a menudo, es necesario modificar la superficie de los electrodos de manera de conferirle una mayor especificidad al mismo, ya que para un dado potencial aplicado pueden existir múltiples especies que se oxiden o se reduzcan y contribuyan a la respuesta en corriente obtenida [22,23]. El empleo de diversas moléculas biológicas que interactúan específicamente con un analito, es una buena alternativa para soslayar este tipo de inconvenientes.

Finalmente, los sensores *impedimétricos*, son aquellos que se encuentran en auge y generaron un gran interés en los últimos años, debido a su alta sensibilidad. Los mismos responden a cambios en la resistencia eléctrica, debido a los sucesos que ocurren en la superficie de los electrodos. Es decir que, la resistencia a la transferencia de carga de una dada sonda redox cambia de acuerdo al estado superficial del electrodo de interés [24].

I-2. Estrategias de amplificación de señales electroquímicas

Los sensores electroquímicos encontraron una amplia aplicación en diferentes campos de investigación, por ejemplo, análisis ambientales, alimentarios y clínicos, debido a las ventajas que ofrece la determinación rápida, ultrasensible y selectiva de diversos analitos [25,26].

En los sensores electroquímicos, la reacción redox heterogénea que tiene lugar en la superficie del electrodo implica la transferencia de electrones entre una molécula de interés y la superficie del electrodo. Por lo tanto, la reacción electroanalítica en esta región interfacial depende significativamente del electrodo de trabajo utilizado. La conductividad eléctrica, la reactividad hacia el analito, la estabilidad química, la ventana útil de potencial en un dado electrolito soporte y el costo, son los factores más importantes que deben considerarse a la hora de seleccionar el electrodo [27]. Por lo tanto, el desarrollo del sensor o un electrodo de trabajo que tenga una mayor sensibilidad hacia el analito objetivo es un área de investigación desafiante. A

lo largo de los años, se han empleado varios tipos de electrodos de trabajo y estos incluyen electrodos de carbono, oro, platino y mercurio [28]. Por otro parte, se ha implementado una amplia gama de materiales nanoestructurados a fin de modificar los electrodos antes mencionados para ser utilizados como capa de detección o reconocimiento para el desarrollo de sensores electroquímicos, incluidos metales nanoestructurados [29], varios tipos de alótopos de carbono [30,31], compuestos de materiales nanoestructurados metálicos [32] y diversos tipos de semiconductores [33]. De esta manera, la obtención de electrodos altamente sensibles, estables y reproducibles, depende en gran medida de la inmovilización de los materiales activos para formar una película delgada en la superficie del electrodo [28].

I-2.1. Modificación de sustratos sólidos

La formación de una película delgada de materiales activos sobre un sustrato sólido puede llevarse a cabo mediante diversas metodologías:

- * *Deposición electroquímica*: tiene la ventaja de ser una metodología sencilla y por otra parte no se requiere estrictamente de agentes de dispersión, ni tensioactivos, la película se forma por inmovilización del compuesto de interés en la superficie del electrodo mediante diferentes técnicas electroquímicas, a través de un barrido de potencial o la aplicación de un potencial constante [28,34].
- * *Autoensamblado de polielectrolitos*: Uno de los métodos más comunes de modificación de electrodos consiste en el ensamblado de polielectrolitos sobre el sustrato por interacciones fundamentalmente electrostáticas. La capacidad de manipular el espesor y la composición de una multicapa y la posibilidad de incorporar, en multicapas, diferentes materiales con cargas opuestas, hace que este método sea fácil, simple y económico para producir diferentes capas de reconocimiento. Sin embargo, existen algunas limitaciones relacionadas con la densidad de carga necesaria para la formación de una multicapa y la ruptura de la estructura formada debido a la presencia de iones o a cambios de pH, entre otros [35,36].

- * *Drop-coating y dip-coating*: La formación de capas delgadas por deposición de una gota sobre el electrodo o por inmersión del sustrato sólido en la solución de interés es otra estrategia de modificación de los electrodos. La metodología de recubrimiento por gota o *drop-coating* ha atraído mucho la atención debido a su simplicidad, poco gasto de material y rápida preparación. Sin embargo, deben tenerse en cuenta algunos inconvenientes, como la dificultad en lograr uniformidad, un escaso control del espesor de capa y las limitaciones en el área de cobertura, ya que esto se correlaciona con el comportamiento electroquímico de la capa preparada. Los electrodos también pueden ser modificados por inmersión o *dip-coating*, esta metodología presenta la ventaja de formar películas muy uniformes y compactas, pero son procedimientos más largos y deben optimizarse muchas variables a fin de obtener una película satisfactoria [35].
- * *Unión covalente*: se basa en la generación de grupos funcionales en el sustrato para efectuar la unión covalente con diferentes moléculas. La ventaja más importante que presenta esta metodología frente a las demás es la estabilidad otorgada por la unión química [37].
- * *Interacción por afinidad*: es un método simple que consiste en el uso de diferentes interacciones que ocurren entre las moléculas biológicas, por ejemplo la interacción entre biotina-avidina o dos hebras de ADN complementarias. La desventaja de este método es la relativamente baja estabilidad a largo plazo que posee [38].
- * *Incorporación en compósitos*: un material compuesto disperso, es una mezcla de un material conductor en una fase no conductora que hace las veces de aglutinante o dispersante. El líquido aglutinante debe ser inerte, no electroactivo, insoluble en la solución analizada, escasamente volátil y debe estar libre de impurezas. Los más utilizados son: aceite de parafina, de silicona, nujol, bromoformo, bromonaftaleno, entre otros [39].

I-3. Nanohíbridos

Recientemente, las estructuras híbridas se han usado ampliamente en el campo del medio ambiente, la salud, la energía y los sensores demostrando propiedades excepcionales y multifuncionalidades que mejoran sustancialmente las propiedades de los nanomateriales individuales que los conforman [40].

La síntesis de un nanohíbrido, implica la incorporación de dos componentes diferentes o similares, en una escala nanométrica, creando una sola entidad con propiedades mejoradas o completamente nuevas. Estos abarcan las ilimitadas combinaciones posibles de las distintas propiedades de los componentes orgánicos, inorgánicos o incluso bioactivos en un solo material. En consecuencia, ofrecen la oportunidad de crear una gran cantidad de materiales novedosos con estructuras y funciones bien definidas [41]. Las propiedades únicas de los nanohíbridos brindan muchas ventajas en diferentes campos como biomateriales, materiales ópticos, materiales electrónicos, revestimiento, almacenamiento de energía, catálisis y detección [42,43].

En general, los nanomateriales se pueden diseñar y sintetizar de manera racional para lograr las propiedades deseadas, debido a la integración de múltiples funciones en una sola nanoestructura. Las nanoestructuras híbridas no sólo poseen las propiedades inherentes de los nanomateriales, sino que también integran las características de las especies tanto orgánicas como inorgánicas que las constituyen. En definitiva, la combinación a nanoescala puede lograr obtener materiales con propiedades novedosas debido al efecto sinérgico [44].

De manera general, se pueden clasificar a los nanohíbridos en cuatro grandes grupos de acuerdo a los materiales de partida empleados para su síntesis (figura I-2):

- *Híbridos Metal-Metal*: en la que ambos constituyentes son metales u óxidos de metales [45].
- *Híbridos Carbono-Metal*: en general se trata de híbridos en los cuales las nanopartículas metálicas se encuentran soportadas en una matriz de carbono [46].

- Híbridos Carbono-Carbono: tal como el nombre lo sugiere provienen de la mezcla de dos estructuras carbonáceas diferentes, es decir dos alótopos de carbono [47].
- Híbridos Carbono-Molécula orgánica: Surgen de la mezcla de una nanoestructura de carbono con diversas moléculas orgánicas, tales como polímeros, proteínas, aminoácidos, ADN, entre otros [44].

Generalmente, la funcionalización de la superficie de nanopartículas con especies orgánicas es el método más ampliamente aplicado para construir nanohíbridos. Las nanopartículas suelen presentar propiedades ópticas, eléctricas o magnéticas particulares que pueden ajustarse con precisión controlando sus estructuras y composiciones [48]. Por otra parte, las especies orgánicas, de naturaleza muy diversa, aportan múltiples características, tales como biocompatibilidad, carga particular, hidrofiliidad, entre otras, pudiendo manipularse fácilmente para diversos fines.

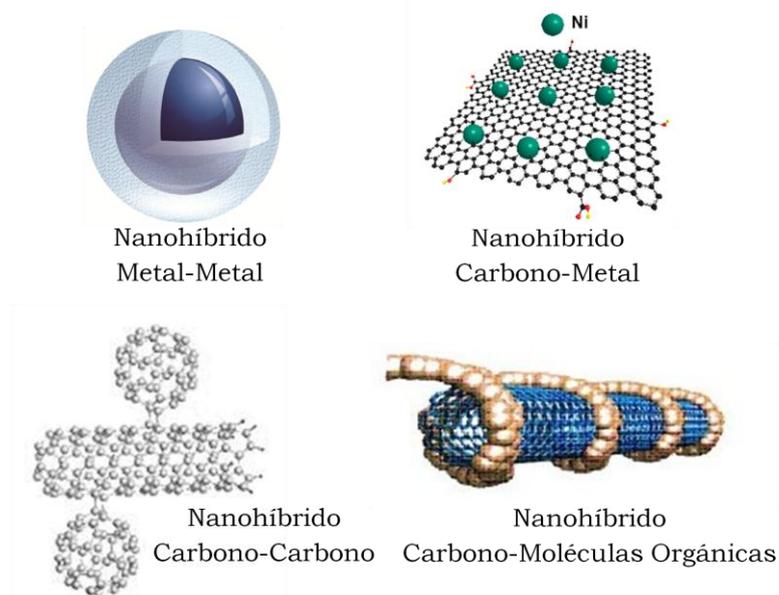


Figura I-2. Clasificación de nanohíbridos de acuerdo a los constituyentes.

La abundancia natural del carbono, su particular estructura electrónica, así como también el creciente interés en generar metodologías de síntesis para nanomateriales de carbono sencillas y económicas, hacen que los

mismos sean los mejores contendientes para generar híbridos con propiedades adecuadas para el empleo en el desarrollo de sensores electroquímicos. Por su parte, los polímeros se utilizan comúnmente para mejorar la hidrofiliidad de este tipo de nanomateriales [49], haciendo del nanohíbrido resultante un compuesto fácil de manipular a fin de formar películas delgadas y homogéneas sobre la superficie de los sustratos sólidos empleados como electrodos de trabajo en los sensores electroquímicos.

I-3.1. Nanoestructuras de carbono

Los materiales a base de carbono tienen las ventajas de bajo costo, fácil preparación y múltiples formas. La preparación de materiales de carbono, la optimización de estructuras y la modificación de sus propiedades han recibido una considerable atención [50]. Es conocido que las propiedades excepcionales del carbono se relacionan con el hecho de que es el único elemento capaz de generar enlaces consigo mismo con tres tipos diferentes de hibridación: sp , sp^2 y sp^3 , lo que da origen a estructuras con muy diferentes propiedades y características morfológicas. Por otra parte, las propiedades del material resultante también dependen, en gran medida, de sus dimensiones [51]. En general, los nanomateriales pueden ser clasificados en cuatro grandes grupos teniendo en cuenta cuántas de sus dimensiones poseen escala nanoscópica y cómo están confinados los electrones en ellos, tal como se presenta en la **tabla I-1**. Los nanomateriales también pueden ser clasificados de acuerdo a su forma en: cilindros, láminas, esferas, cubos; de acuerdo a su origen, en naturales y antropogénicos; o de acuerdo a su composición química en aquellos formados por metales, óxidos de metales, carbono, entre otros.

Tabla I-1. Clasificación de nanoestructuras de acuerdo a sus dimensiones y confinamiento de electrones.

Estructura	Definición	Ejemplos de nanomaterial
0D	Las tres dimensiones (x,y,z) <100 nm, los electrones se encuentran confinados en las tres dimensiones	Fullerenos, nanocristales, CQDots
1D	Dos dimensiones <100 nm, los electrones están confinados en dos dimensiones.	Nanotubos, nanofibras, nanovarillas
2D	Sólo poseen una dimensión <100 nm, los electrones se encuentran confinados en una sola dimensión.	Nanoláminas, nanocintas
3D	No poseen ninguna dimensión <100 nm, los electrones no están confinados y pueden moverse libremente	Policristales, matrices nanoestructuradas

Algunos ejemplos de nanomateriales de carbono 0D son los fullerenos y más recientemente descubiertos, los puntos cuánticos de carbono. Dentro de los materiales 1D, se pueden mencionar los nanotubos de carbono tanto de pared simple como de pared múltiple. El grafeno es el exponente más estudiado dentro de los materiales 2D, mientras que el apilamiento de múltiples láminas de grafeno conforman un material 3D. En la **figura I-3** se resumen ejemplos de nanomateriales de carbono, agrupados de acuerdo a la clasificación descrita anteriormente. En particular, los ejemplos mencionados, son los típicos nanomateriales basados en carbono empleados en el desarrollo de sensores electroquímicos ya que son conductores, debido a que tienen rutas eléctricas interconectadas [52].

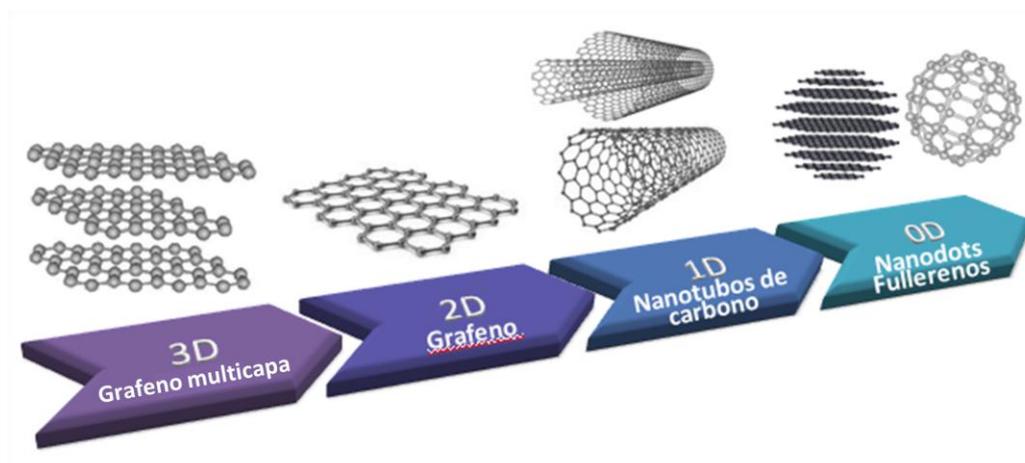


Figura I-3. Clasificación de nanoestructuras de carbono de acuerdo a sus dimensiones.

I-3.1.1. Nanotubos de carbono

Desde su descubrimiento por lijima [53], los nanotubos de carbono (CNT) han ganado un notable interés en la investigación debido a sus asombrosas propiedades mecánicas y su amplia gama de aplicaciones en diversos sectores, como el aeroespacial, automovilístico, biomédico, defensa, energía, entre otros.

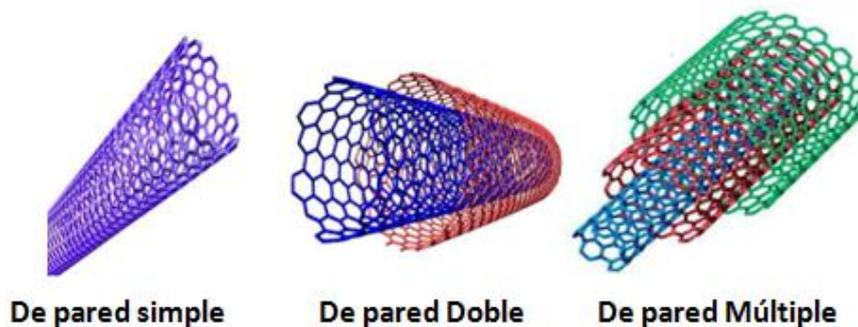


Figura I-4. Clasificación de nanotubos de carbono de acuerdo a su estructura. Tomado y modificado de referencia [54].

Los CNT son un alótropo de carbono, clasificados como materiales 1D, con un diámetro de tamaño nanométrico y una longitud de tamaño micrométrico. Un CNT típico tiene un sistema hexagonal de átomos de carbono enrollado sobre sí mismo que forma un tubo y tiene propiedades excepcionales debido a su estructura simétrica. Basándose en el número de tubos concéntricos, los CNT se clasifican en tres tipos, tal como se muestra en la **figura I-4:** **a)** nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT): se pueden imaginar como una lámina de grafito de un solo átomo de espesor (grafeno enrollado en un cilindro) **b)** nanotubos de carbono de doble pared (DWCNT): nanoestructuras coaxiales compuestas precisamente por dos SWCNT, con uno enrollado en otro y **c)** nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) con más de 2 tubos concéntricos enrollados [54].

Entre los otros nanomateriales de carbono, los CNT han fascinado a los investigadores debido a sus excepcionales formas geométricas y sus asombrosas propiedades. Tanto la exploración experimental como la teórica han revelado que los CNT (tanto de pared simple como de paredes múltiples) tienen propiedades mecánicas extraordinarias, alta relación superficie/volumen,

excelentes flexibilidad, buena conductividad térmica y eléctrica, alto punto de fusión, baja densidad, gran superficie, excelente almacenamiento de hidrógeno, propiedades biológicas notables, gran resistencia a la corrosión y propiedades ópticas únicas [55]. Además, los CNT tienen propiedades electrónicas asombrosas y pueden ser metálicos o semiconductores, dependiendo de su estructura (diámetro y helicidad) [56]. Debido a las propiedades excepcionales mencionadas anteriormente, los CNT han despertado un interés increíble en los investigadores y se han considerado materiales muy promisorios en nanoelectrónica, dispositivos de almacenamiento de energía, materiales compuestos, industria de la medicina, aplicaciones de nano-sensores, aplicaciones biológicas, materiales inteligentes, sistemas de purificación de agua y aire y en una gran diversidad de campos [57-59].

Los CNT no se producen de forma natural y, por lo tanto, se pueden preparar en laboratorios utilizando diversas metodologías experimentales. Los trabajos de investigación intensiva en la síntesis de CNT de alta calidad aumentaron rápidamente desde la primera preparación por Iijima en 1991 y 1993 de MWCNT y SWCNT utilizando como técnica de síntesis la descarga arco [53]. Las técnicas más empleadas para la síntesis de nanotubos de carbono se basan en descarga de arco, ablación con láser y la deposición química de vapor, como los enfoques más prometedores para la síntesis de CNT [60-62].

Propiedades electrónicas de CNT

Los CNT están conformados casi completamente por enlaces entre átomos de carbono, pudiendo tener diferentes quiralidades (figura I-5) y diámetros. Dependiendo de la orientación del eje del tubo respecto al entramado hexagonal y según la base de los índices quirales (n,m), los CNT pueden ser de tipo *arm-chair*, que presentan $n=m$; *zig-zag*, en los que $m=0$ y quirales, que presentan $n \neq m$. De esta manera, los CNT pueden ser de diferentes tipos y tener distintos intervalos de banda de conducción. Es decir que los nanotubos de carbono pueden ser metálicos o semiconductores, según su quiralidad [63].

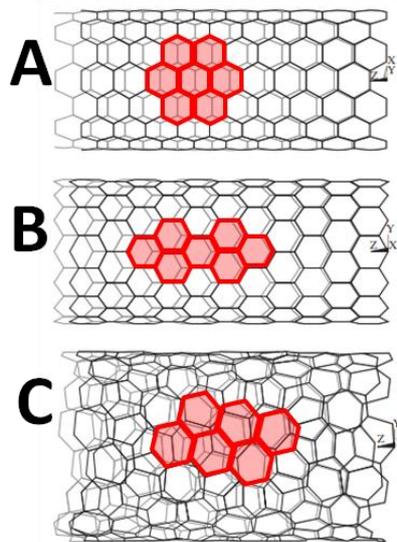


Figura I-5. Clasificación de nanotubos de carbono de acuerdo a su configuración. (A) *arm-chair*, (B) *zig-zag* y (C) *quiral*. Tomado y modificado de referencia [64].

De acuerdo a reportes bibliográficos, los nanotubos de tipo *arm-chair* poseen comportamiento metálico, por lo que conducen la electricidad mejor que el cobre y los electrones pueden viajar a lo largo de este tubo como una partícula cuántica coherente de una manera similar a la de un fotón en una fibra óptica. Los tubos con configuración *zig-zag*, tiene una pequeña banda prohibida de unos pocos meV y, por lo tanto, son semiconductores metálicos. Por último, los tubos con configuración *quiral* son los que poseen las bandas prohibidas de mayor tamaño y los mismos son clasificados como semiconductores. Estadísticamente, un tercio de los CNT son metálicos, incluidos los tubos semimetálicos, y dos tercios son semiconductores. Dado que las propiedades electrónicas de los SWNT dependen de la configuración estructural de los nanotubos, controlar su quiralidad es fundamental para las aplicaciones relacionadas [65].

I-3.1.2. Grafeno y derivados de grafeno

Hace décadas, la idea de una lámina molecular bidimensional de un solo átomo de espesor habría parecido un sueño imposible. En 2004, apareció

el primer artículo sobre un material asombroso, pero la historia comenzó el año anterior cuando Geim y Novoselov aplicaron cinta adhesiva a un bloque de grafito, produciendo así el material que les valió el Premio Nobel de Física en 2010 [66]. Este material es más fuerte que el diamante, más conductor que el cobre y un millón de veces más delgado que el papel. Este sorprendente material, el “grafeno”, consiste únicamente en átomos de carbono unidos en una lámina de una sola capa con una disposición hexagonal. El grafeno es un alótropo monocapa de átomos de carbono con hibridación sp^2 con una longitud de enlace de 0,142 nm. Como se muestra en la **figura I-6**, esta estructura molecular puede adoptar varias morfologías y se puede considerar el precursor de otros alótropos de carbono, ya que puede generar fullerenos, nanotubos de carbono, grafeno de una o de unas pocas capas de espesor y grafito [67]. En la estructura del grafito, los átomos de carbono están unidos entre sí con fuertes enlaces covalentes sp^2 , que junto con enlaces débiles de Van der Waals mantienen unidas las hojas, lo que hace que el grafito sea un material blando en contraposición al diamante muy duro con todos los enlaces covalentes sp^3 .

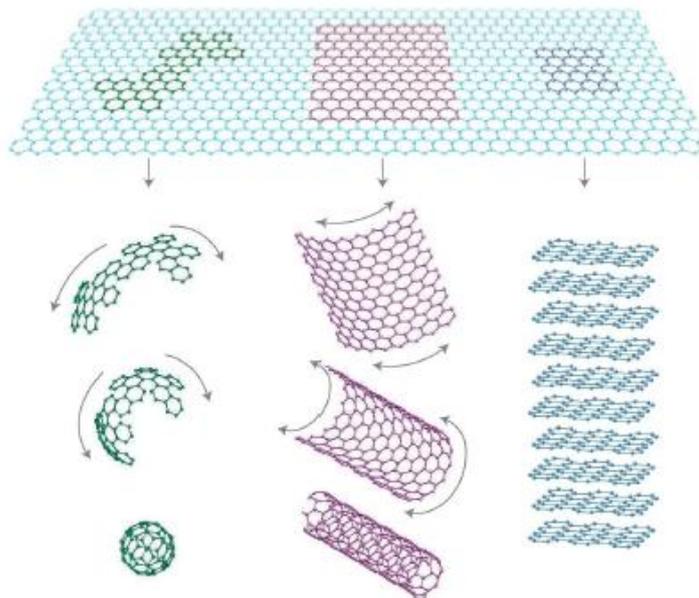


Figura I-6. Grafeno como precursor de otros alótropos de carbono.
Tomado de referencia [67].

El grafeno posee propiedades impresionantes debido a su estructura química y geometría únicas. Algunas de estas propiedades son: flexibilidad intrínseca, excelente transparencia óptica, gran conductividad eléctrica y térmica, alta movilidad de carga, capacidad de transporte de electrones, gran superficie específica, importante actividad electroquímica con alta estabilidad química, excelente capacidad y capacitancia específica, relación superficie/volumen ultra alta, una resistencia intrínseca a la fractura, todo combinado con una buena biocompatibilidad [68,69]. Estas características hacen que el grafeno sea una opción adecuada para muchas aplicaciones diferentes en nanocompuestos, investigación energética, física cuántica, catálisis, nanoelectrónica, biomateriales y nanomedicina, incluidas las plataformas de administración de fármacos para el cultivo celular y la ingeniería de tejidos, bioimágenes, biodetección y administración de agentes contra el cáncer, terapia génica y aplicaciones antibacterianas.

Cuando se compara el grafeno con sus homólogos en forma de rollo, los nanotubos de carbono (CNT), cabe mencionar que el grafeno tiene menor toxicidad y mayor biocompatibilidad, métodos más simples de producción y modificación, menor costo y ausencia de contaminantes metálicos tóxicos [70].

Informar el grosor preciso para varios formatos de grafeno ha sido un desafío. Se han aplicado varias técnicas de caracterización y medición, por ejemplo, microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), ultracentrifugación en gradiente de densidad, para alcanzar números precisos y luego relacionarlos con las propiedades del grafeno, es decir, relación entre el espesor de la capa y las propiedades eléctricas [71].

Los nanomateriales basados en grafeno se pueden clasificar de acuerdo con el número de capas apiladas en estructuras de una única capa, bi/doble capa y pocas capas (entre 2 y 10). Por otra parte, cuando el grafeno se encuentra oxidado, la estructura se puede dividir en dos clases, óxido de grafeno (GrO) y grafeno parcialmente reducido (RGrO) [72,73]. En 1957 Hummers [74], fue el primero en proponer una metodología sencilla para obtener óxido de grafito, el cual puede ser reducido por diferentes metodologías para obtener RGrO, tal como se presenta en la **figura I-7**.

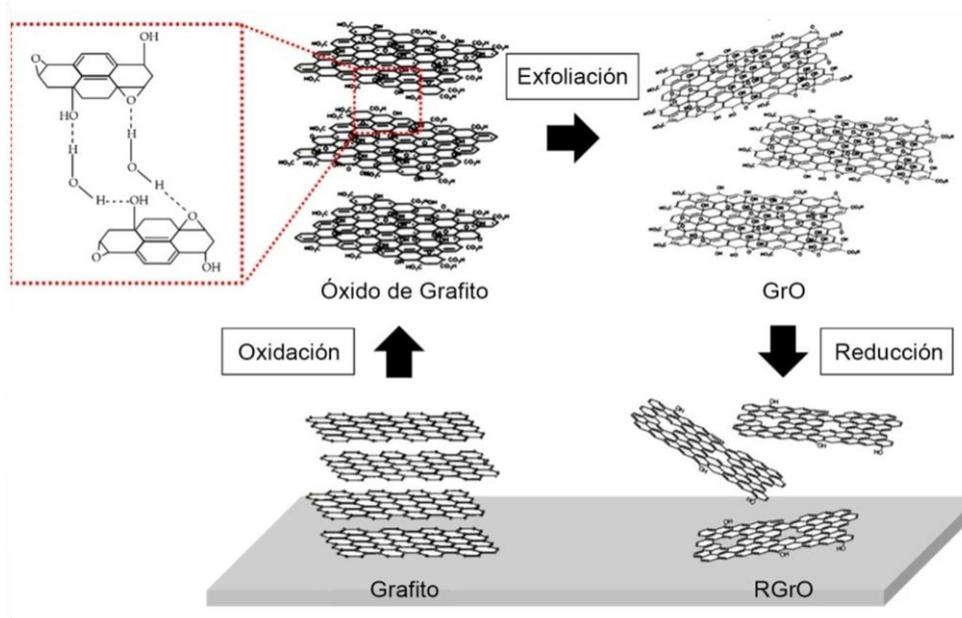


Figura I-7. Metodología de obtención de óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido. Tomado de referencia [72].

Aunque se sabe que GrO es una hoja infinitamente delgada (espesor de escala atómica) de grafito oxidado, actualmente no existe un modelo exacto de su estructura química, y este tema ha provocado una gran discusión y se han sugerido varios modelos estructurales, como los modelos de Hofmann, Ruess, Scholz-Boehm, NakajimaMatsuo, Dekany y Lerf-Klinowski. En la actualidad, la configuración más aceptable es el modelo de Lerf-Klinowski [75]. Este modelo estructural de óxido de grafeno propuesto incluye regiones que contienen anillos aromáticos no oxidados y regiones con anillos de seis miembros oxidados que perdieron la aromaticidad, además de grupos hidroxilo y epóxido en el plano de lámina, mientras que los bordes contienen tanto grupos químicos -OH como -COOH. Además, se demostró, mediante la exploración de diferentes fuentes de grafito y la variación de los métodos sintéticos, que la proporción y la densidad de los grupos funcionales que contienen oxígeno pueden variar sustancialmente [76].

Propiedades electrónicas del grafeno

En comparación con sus otras propiedades excepcionales, las propiedades eléctricas del grafeno han atraído más atención. El grafeno se puede clasificar como un semiconductor intrínseco, con una disposición

distintiva del nivel de energía de Fermi con un espectro similar a Dirac, tal como se muestra en la **figura I-8.A**.

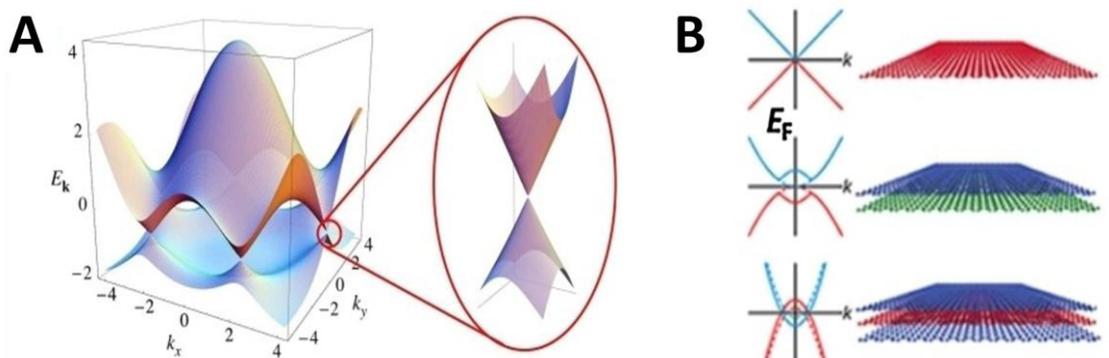


Figura I-8. (A) Distribución de los niveles de energía de la lámina de grafeno, ampliación de la zona cercana a los puntos de Dirac. (B) Distribución de los niveles de energía de láminas de grafeno apiladas. Tomados de referencia [77,78].

La superposición de bandas del grafeno de doble capa posee un espectro parabólico de 1,6 meV, que es muy pequeño e insignificante. Por lo tanto, puede verse como un material similar al metal. Con respecto a las estructuras de bandas del grafeno con tres o más capas, **figura I-8.B** puede notarse que a medida que aumentan el número de capas existe una superposición de las bandas de conducción y valencia [78]. De esta manera, la ruta sintética empleada para la fabricación de grafeno va a determinar en gran medida las propiedades electrónicas del material resultante. A lo largo de los años se han utilizado numerosas metodologías para la obtención de grafeno, entre ellas crecimiento epitaxial, deposición química de vapor, exfoliación mecánica, exfoliación química, exfoliación electroquímica, descarga de arco, entre otras [79]. Cada una de ellas presenta ventajas y desventajas que es necesario evaluar a fin de que el material resultante presente las propiedades requeridas para su futura aplicación.

I-3.1.3. Puntos cuánticos de carbono

Desde el descubrimiento accidental de Xu y colaboradores en el proceso de purificación electroforética de nanotubos de carbono de pared simple en 2004 [80], los puntos cuánticos de carbono (CQDots) se han

convertido en una estrella emergente de los nanomateriales de carbono debido a las ventajas de sus fascinantes propiedades fisicoquímicas y sus distintas morfologías externas [81,82]. Beneficiándose de diversos métodos de síntesis y abundantes materias primas, los nanodots de carbono presentan grandes diferencias en tamaño, estructura y propiedades fisicoquímicas [83].

Esta nueva clase de materiales basados en carbono de dimensión cero tiene propiedades de fluorescencia y tamaños menores a 10 nm de diámetro. Combinan las propiedades ópticas de los puntos cuánticos con las propiedades electrónicas de los materiales de carbono y, por lo tanto, exhiben ventajas únicas [84].

Los Carbon Quantum Dots han recibido una gran atención en los campos de la electrónica, la óptica, la fotoelectroquímica, la catálisis y la biología. Después de una década de rápido desarrollo, ha surgido un gran número de publicaciones en el campo de CQDots. Sin embargo, todavía hay muchos debates en curso y una comprensión no unificada de los CQDots sobre su síntesis, propiedades ópticas y aplicaciones, donde muchas cuestiones básicas críticas siguen sin estar claras [85]. De manera general, los CQDots pueden ser sintetizados mediante enfoques *top-down* o *bottom-up*. Los primeros se basan en la ruptura de estructuras de mayor tamaño tales como grafito o nanotubos de carbono utilizando metodologías como descarga de arco, ablación láser u oxidación química. Mientras que los enfoques *bottom-up* utilizan precursores orgánicos tales como monómeros, ácidos grasos o aminoácidos, para la formación de nanodots de carbono asistida por microondas, reacción solvotermal o descomposición térmica. De acuerdo a lo expuesto, las propiedades que presenten los CQDots resultantes son altamente dependientes tanto del precursor como de la metodología empleada para su síntesis.

De forma general, los CQDots pueden considerarse como una nanoestructura especial de “núcleo-capa” con un núcleo de carbono de menos de 10 nm y una capa de grupo funcional. Los grupos funcionales superficiales en los CQDots son favorables para la solubilidad en agua y funcionalización adicional para diversas aplicaciones [86,87]. Sin embargo, debido a su compleja química sintética, la estructura química detallada de los CQDots aún

no está clara, especialmente los defectos superficiales, los átomos de dopaje o los grupos funcionales unidos covalentemente. Una de las mayores ventajas de los CQDots es que unen los materiales de carbono tradicionales y las moléculas orgánicas. El núcleo de tipo carbono y la superficie de tipo orgánico juntos determinan la naturaleza de los CQDots, que combinan las propiedades de los materiales de carbono con pequeñas moléculas orgánicas, lo que proporciona una gran flexibilidad en la manipulación de la estructura y las propiedades fisicoquímicas resultantes [88].

Se puede ver que los CQDots con un núcleo cristalino y una superficie funcionalizada se consideran una subunidad multifuncional prometedora para el diseño y construcción de varios compuestos híbridos y catalizadores modelo. Aunque, sigue siendo necesario optimizar aún más la síntesis de los nanodots de carbono, regular los tipos y el número de grupos funcionales de superficie [89]. De esta manera, el estudio de las metodologías de síntesis de CQDots es de vital importancia, ya que el método empleado modula las propiedades resultantes que posee el material sintetizado.

I-3.1.4. Funcionalización de nanoestructuras de carbono

El hecho de que los nanomateriales de carbono deriven de uno de los elementos de mayor abundancia en la corteza terrestre hace que su fuente sea casi ilimitada. Las ventajas de su empleo en sensores electroquímicos radica en sus notorias propiedades tales como la mejora en la transferencia de carga entre el transductor y el analito, biocompatibilidad y capacidad de inmovilización de diversas moléculas, aumento del área superficial expuesta del transductor electroquímico, disminución de los sobrepotenciales de oxidación y reducción de una gran variedad de analitos y facilidad de ser funcionalizados y derivatizados. Este último punto es de vital importancia, ya que las nanoestructuras de carbono prístinas, por su naturaleza, tienden a formar agregados. La elevada superficie específica del grafeno y derivados promueve la agregación espontánea e irreversible. Como resultado de ello, se obtiene nuevamente un material similar al grafito de partida [90]. En el caso de los CNT, debido a fuerzas de van der Waals entre las superficies de carbono sp^2 de los nanotubos, éstos tienden a formar agregados que son muy difíciles de

separar [91]. De esta manera se requieren metodologías de funcionalización adecuadas que garanticen mantener las propiedades electrónicas de los diversos materiales de carbono.

Las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas pueden modificarse sometiéndolas a funcionalización, uniendo algunas moléculas en su superficie [92] y de manera general, las metodologías de funcionalización se pueden clasificar en dos grandes grupos, covalentes y no covalentes (figura I-9).

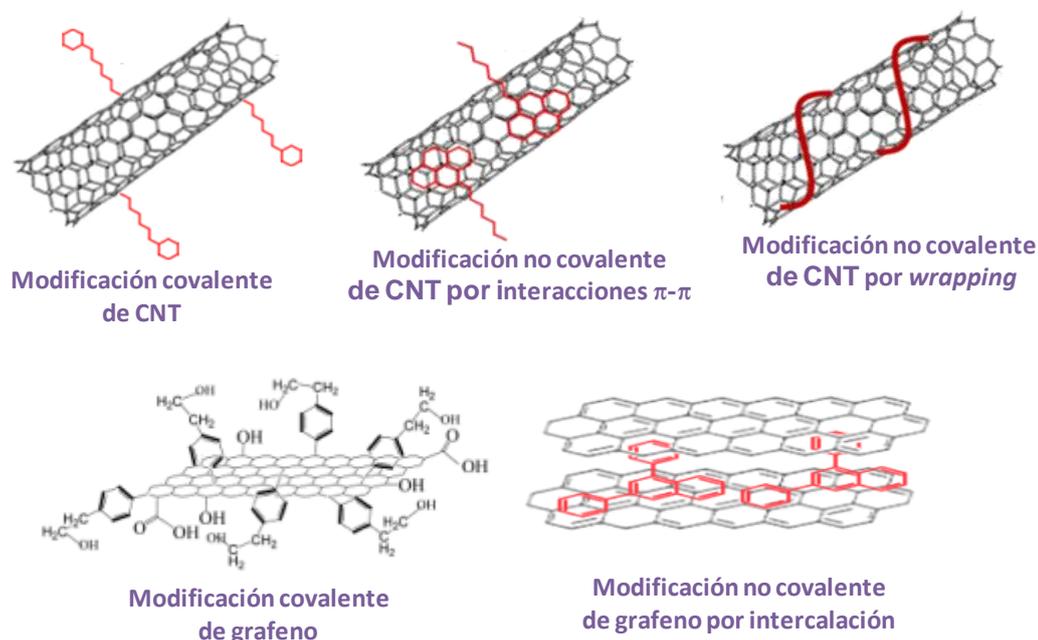


Figura I-9. Estrategias de modificación de estructuras de carbono.

En la funcionalización covalente, los diversos grupos funcionales químicos, como los grupos carboxilo, oxidrilo y amina, se unen a la superficie mediante la formación de enlaces. Si bien la funcionalización covalente presenta una gran estabilidad, influye en las propiedades intrínsecas de las nanoestructuras de carbono, ya que el cambio en la superficie por unión covalente puede hacer que la hibridación de los carbonos cambie de sp^2 a sp^3 . Como consecuencia de ello, la resistencia mecánica y las propiedades eléctricas podrían verse obstaculizadas debido a la disminución de la capacidad de conjugación. [93]

La funcionalización no covalente ha sido significativa para enlazar las biomoléculas, polímeros, proteínas, entre otras, ya que no afecta las propiedades intrínsecas de los materiales. Como consecuencia de ello, las propiedades mecánicas y eléctricas no se ven afectadas. De esta manera, la funcionalización no covalente es el resultado de interacciones tales como interacciones electrostáticas, interacciones π - π , entre las nanoestructuras y el agente funcionalizante [94].

La funcionalización no covalente mediante el empleo de monómeros y polímeros ha sido empleado en numerosas ocasiones a lo largo de los años [95,96], ya que, su propiedades y estructuras pueden ser moduladas con facilidad. Por otra parte, debido a la extensa diversidad de estructuras y grupos funcionales que poseen los monómeros y polímeros, las posibles interacciones con las estructuras de carbono pueden ser de diferente naturaleza. Tal como puede verse en la **figura I-9**, una de las metodologías no covalentes para funcionalizar CNT con un dado polímero es mediante enrollamiento o efecto *wrapping*, mediante interacciones π - π si el monómero o polímero utilizado posee anillos aromáticos o por intercalación entre las láminas, si se trata de funcionalizar grafeno. En cualquier caso, todas las metodologías deberían ser capaces de permitir la exitosa dispersión de los nanomateriales de carbono para impedir su agregación, dando como resultado un nuevo nanomaterial híbrido con propiedades renovadas.

I-3.2. Monómeros y polímeros

Los polímeros orgánicos son compuestos prometedores para muchas aplicaciones esenciales debido a sus propiedades físicas y químicas ajustables, flexibilidad mecánica, dopaje, buena biocompatibilidad y producción escalable, entre otras [97].

Numerosos campos de aplicación han explotado las características únicas y diversas de los polímeros, por ejemplo, la estabilidad y propiedades mecánica y química, el control sobre el equilibrio hidrofílico/hidrofóbico que puede ajustar la solubilidad de polímeros en disolventes orgánicos y soluciones acuosas, la capacidad de formar películas estables y controladas que

promueve el uso de polímeros en procesos de recubrimiento, las propiedades de adherencia, que le dan la capacidad de unir diferentes componentes y materiales y finalmente, el control de los grupos funcionales en la estructura que otorga una mejor solubilidad en solventes acuosos [98]. Por otra parte, la flexibilidad en las metodologías de síntesis permite modular las propiedades y controlar la relación estructura/propiedad del polímero resultante. Si bien existen numerosas estrategias para la obtención de polímeros (polimerización por adición, por condensación, por crecimiento en etapas, etc.) y las rutas sintéticas para su obtención son numerosas, la polimerización de monómeros mediada por efecto ultrasónico o por metodologías electroquímicas presentan la ventaja de ser sumamente sencillas y económicas.

Además, algunos polímeros también presentan propiedades eléctricas únicas que los impulsan como la opción ideal para dispositivos electrónicos con fuerte conductividad eléctrica, excelente conducción de iones, versatilidad y estabilidad. Hasta ahora, han surgido muchos polímeros naturales o sintéticos para dispositivos electrónicos, como baterías, sensores, capas activas y electrodos, que dotan a la electrónica de flexibilidad y biodegradabilidad junto con el bajo costo de síntesis, manteniendo el alto rendimiento [99]. Por otra parte, los polímeros poseen abundantes grupos funcionales, permiten una dispersión constante o una alta solubilidad en líquidos comunes, incluso en agua, para formar, por ejemplo, tintas electrónicas procesables en solución. Este carácter los habilita como uno de los candidatos ideales para fabricar dispositivos electrónicos con métodos de fabricación a baja temperatura [100].

En la actualidad, la ingeniería molecular se está convirtiendo en una de las herramientas más eficaces para superar las limitaciones inherentes y mejorar sus características únicas mediante determinadas modificaciones físicas o químicas, lo que proporciona direcciones innovadoras para el desarrollo de nuevos dispositivos electrónicos multifuncionales. [101]

I-4. Bibliografía

- [1] C. Guo, A. C. Sedgwick, T. Hirao, and J. L. Sessler, "Supramolecular fluorescent sensors: An historical overview and update," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 427, p. 213560, 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2020.213560.
- [2] Y. Khan *et al.*, "Recent breakthroughs in two-dimensional van der Waals magnetic materials and emerging applications," *Nano Today*, vol. 34, p. 100902, 2020, doi: 10.1016/j.nantod.2020.100902.
- [3] L. Tang, S. Wu, J. Qu, L. Gong, and J. Tang, "A review of conductive hydrogel used in flexible strain sensor," *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 18, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3390/ma13183947.
- [4] R. Matsuda *et al.*, "Highly stretchable sensing array for independent detection of pressure and strain exploiting structural and resistive control," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-69689-2.
- [5] A. Hulanicki, S. Glab, and F. Ingman, "Chemical sensors definitions and classification," *Pure Appl. Chem.*, vol. 63, no. 9, pp. 1247–1250, 1991, doi: 10.1351/pac199163091247.
- [6] C. K. Ho, M. T. Itamura, M. Kelley, and R. C. Hughes, "Review of Chemical Sensors for In-Situ Monitoring of Volatile Contaminants," *Contract*, vol. 2001, no. 3, p. 34, 2001, doi: 10.2172/780299.
- [7] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, "Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 1–2, pp. 121–131, 2001, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
- [8] P. Gründler, "Chemical sensors," *ChemTexts*, vol. 3, no. 4, 2017, doi: 10.1007/s40828-017-0052-x.
- [9] M. C. Yappert, "A Tutorial on Fiber-Optic Chemical Sensors," *Chem. Educ.*, vol. 1, no. 6, pp. 1–10, 1997, doi: 10.1007/s00897-996-0007-6.
- [10] M. P. Shirani, B. Rezaei, A. A. Ensafi, and M. Ramezani, "Development of an eco-friendly fluorescence nanosensor based on molecularly imprinted polymer on silica-carbon quantum dot for the rapid indoxacarb detection," *Food Chem.*, vol. 339, no. 6, p. 127920, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127920.
- [11] S. D. Wang, L. X. Xie, Y. F. Zhao, and Y. N. Wang, "A dual luminescent sensor coordination polymer for simultaneous determination of ascorbic acid and tryptophan," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 242, p. 118750, 2020, doi: 10.1016/j.saa.2020.118750.
- [12] J. Song, P. C. Huang, Y. Q. Wan, and F. Y. Wu, "Colorimetric detection of thiocyanate based on anti-aggregation of gold nanoparticles in the presence of cetyltrimethyl ammonium bromide," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 222, no. 10, pp. 790–796, 2016, doi: 10.1016/j.snb.2015.09.006.
- [13] T. N. Ly and S. Park, "High Performance Detection of Alzheimer's Disease Biomarkers Based on Localized Surface Plasmon Resonance," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 91, pp. 182–190, 2020, doi: 10.1016/j.jiec.2020.07.051.

- [14] R. P. Buck, E. Lindner, W. Kutner, and G. Inzelt, "Piezoelectric chemical sensors," *Pure Appl. Chem.*, vol. 76, no. 6, p. 1139, 2004, [Online]. Available: <http://www.iupac.org/publications/pac/76/6/1139/>.
- [15] L. Tang *et al.*, "Sensitive and renewable quartz crystal microbalance humidity sensor based on nitrocellulose nanocrystals," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 327, no. 6, p. 128944, 2021, doi: 10.1016/j.snb.2020.128944.
- [16] C. Chen and J. Jin, "Surface Acoustic Wave Vapor Sensor with Graphene Interdigital Transducer for TNT Detection," *Sens. Imaging*, vol. 21, no. 1, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1007/s11220-020-00287-2.
- [17] R. Darabi and M. Shabani-Nooshabadi, "NiFe₂O₄-rGO/ionic liquid modified carbon paste electrode: An amplified electrochemical sensitive sensor for determination of Sunset Yellow in the presence of Tartrazine and Allura Red," *Food Chem.*, vol. 339, no. 4, p. 127841, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127841.
- [18] H. Karimi-Maleh *et al.*, "A novel electrochemical epinine sensor using amplified CuO nanoparticles and a: N -hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate electrode," *New J. Chem.*, vol. 43, no. 5, pp. 2362–2367, 2019, doi: 10.1039/c8nj05581e.
- [19] Y. Lyu *et al.*, "Solid-contact ion-selective electrodes: Response mechanisms, transducer materials and wearable sensors," *Membranes (Basel)*, vol. 10, no. 6, pp. 1–24, 2020, doi: 10.3390/membranes10060128.
- [20] M. Torres-Luque, J. F. Osma, M. Sánchez-Silva, E. Bastidas-Arteaga, and F. Schoefs, "Chlordetect: Commercial calcium aluminate based conductimetric sensor for chloride presence detection," *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 9, 2017, doi: 10.3390/s17092099.
- [21] N. R. Stradiotto, H. Yamanaka, and M. V. B. Zanoni, "Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 14, no. 2, pp. 159–173, 2003, doi: 10.1590/S0103-50532003000200003.
- [22] R. Li, X. Deng, and L. Xia, "Non-enzymatic sensor for determination of glucose based on PtNi nanoparticles decorated graphene," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-73567-2.
- [23] B. L. Zhang, X. Jin, L. H. Sun, and X. D. Guo, "Needle-shaped glucose sensor based on polypyrrole doped with glucose oxidase," *Microchem. J.*, vol. 158, no. 5, p. 105217, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105217.
- [24] M. R. Batistuti, P. R. Bueno, and M. Mulato, "The importance of the assembling of DNA strands on the performance of electrochemical genosensors," *Microchem. J.*, vol. 159, no. 5, p. 105358, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105358.
- [25] V. S. Bhat, S. S., and G. Hegde, "Review—Biomass Derived Carbon Materials for Electrochemical Sensors," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 167, no. 3, p. 37526, 2020, doi: 10.1149/2.0262003jes.
- [26] D. Spanu, G. Binda, C. Dossi, and D. Monticelli, "Biochar as an alternative sustainable platform for sensing applications: A review," *Microchem. J.*, vol. 159, no. 6, p. 105506, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105506.

- [27] A. Zabihollahpoor, M. Rahimnejad, G. Najafpour-Darzi, and A. A. moghadamnia, "Recent advances in electroanalytical methods for the therapeutic monitoring of antiepileptic drugs: A comprehensive review," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 188, p. 113394, 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2020.113394.
- [28] J. Lalmalsawmi, D. Tiwari, and D. J. Kim, "Role of nanocomposite materials in the development of electrochemical sensors for arsenic: Past, present and future," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 877, p. 114630, 2020, doi: 10.1016/j.jelechem.2020.114630.
- [29] D. Antuña-Jiménez, M. B. González-García, D. Hernández-Santos, and P. Fanjul-Bolado, "Screen-printed electrodes modified with metal nanoparticles for small molecule sensing," *Biosensors*, vol. 10, no. 2, pp. 1–22, 2020, doi: 10.3390/bios10020009.
- [30] N. A. Zambianco *et al.*, "Determination of tadalafil in pharmaceutical samples by vertically oriented multi-walled carbon nanotube electrochemical sensing device," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 877, p. 114501, 2020, doi: 10.1016/j.jelechem.2020.114501.
- [31] B. Patella *et al.*, "Electrochemical sensor based on rGO/Au nanoparticles for monitoring H₂O₂ released by human macrophages," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 327, no. 4, p. 128901, 2021, doi: 10.1016/j.snb.2020.128901.
- [32] L. Le Li *et al.*, "Amplified oxygen reduction signal at a Pt-Sn-modified TiO₂ nanocomposite on an electrochemical aptasensor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 142, no. 5, p. 111525, 2019, doi: 10.1016/j.bios.2019.111525.
- [33] A. Padmanaban *et al.*, "Hexagonal phase Pt-doped cobalt telluride magnetic semiconductor nanoflakes for electrochemical sensing of dopamine," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 877, p. 114658, 2020, doi: 10.1016/j.jelechem.2020.114658.
- [34] W. Zhang, X. Chen, X. Wang, S. Zhu, S. Wang, and Q. Wang, "Pulsed electrodeposition of nanostructured polythiophene film for high-performance electrochromic devices," *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 219, no. 4, p. 110775, 2021, doi: 10.1016/j.solmat.2020.110775.
- [35] I. Š. Ronevi, D. Krivi, M. Buljac, N. Vladislavi, and M. Buzuk, *Polyelectrolytes assembly: A powerful tool for electrochemical sensing application*, vol. 20, no. 11, 2020.
- [36] X. Yang *et al.*, "Synergistic effects of layer-by-layer films for highly selective and sensitive electrochemical detection of trans-resveratrol," *Food Chem.*, vol. 338, no. 5, p. 127851, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127851.
- [37] B. Cardenas-Benitez, I. Djordjevic, S. Hosseini, M. J. Madou, S. O. Martinez-Chapa "Review—Covalent Functionalization of Carbon Nanomaterials for Biosensor Applications: An Update," *Journal of electrochemical society*, vol. 165, no. 3, pp. 103-117, 2018, doi: 10.1149/2.0381803jes
- [38] P. Gallay, M. D. Rubianes, F. A. Gutierrez, G. A. Rivas, "Avidin and Glucose Oxidase-non-covalently Functionalized Multi-walled Carbon Nanotubes: A New Analytical Tool for Building a Biezymatic Glucose Biosensor," *Electroanalysis*, vol. 31, no. 10, pp. 1-8, 2019, doi: 10.1002/elan.201900202
- [39] R. N. Adams, "Carbon paste electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 30, no. 9, p. 1576, 1958,

doi: 10.1021/ac60141a600

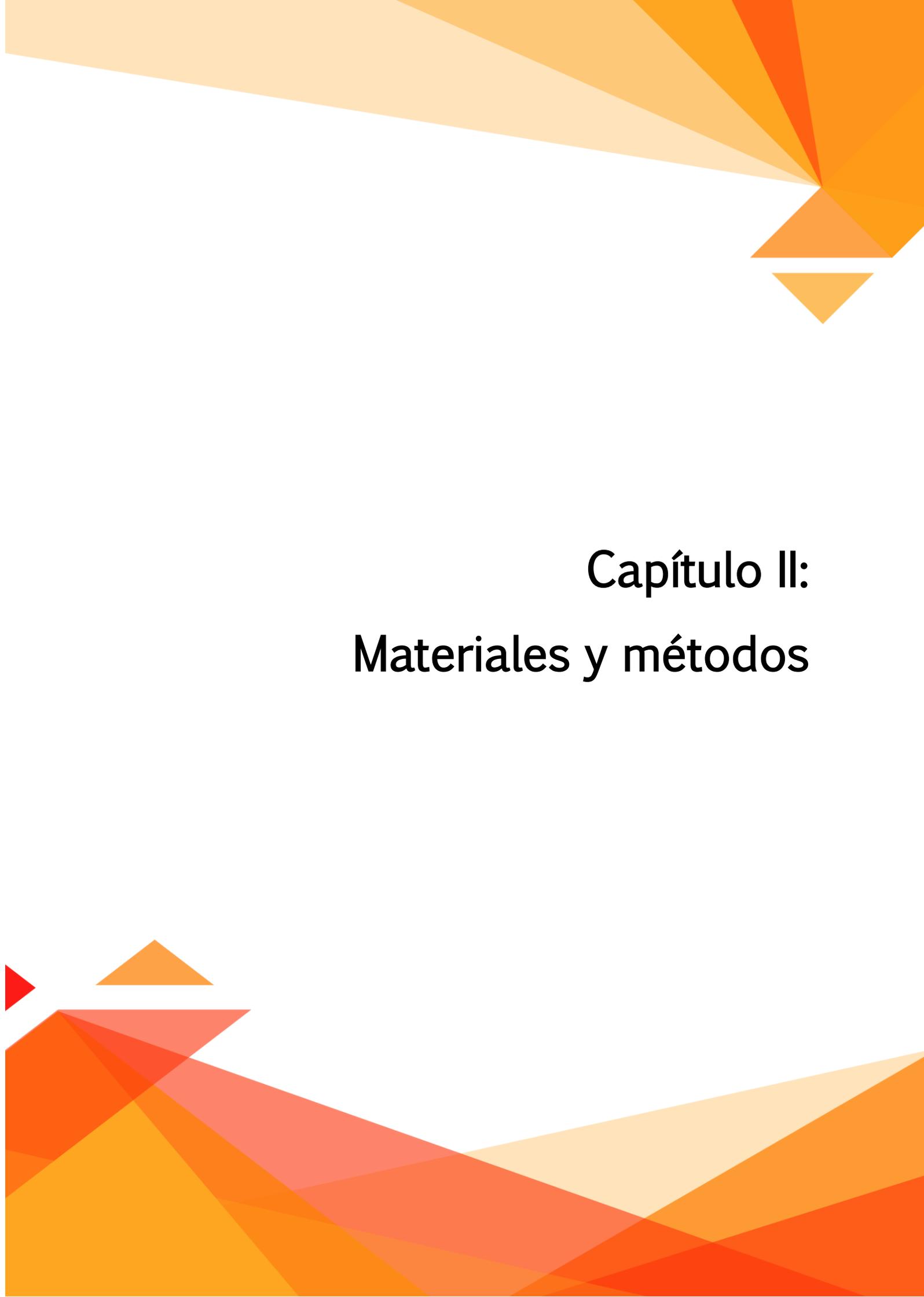
- [40] Y. Fu *et al.*, “Hybrid architectures based on noble metals and carbon-based dots nanomaterials: A review of recent progress in synthesis and applications,” *Chem. Eng. J.*, vol. 399, no. 5, p. 125743, 2020, doi: 10.1016/j.cej.2020.125743.
- [41] M. N. I. Amir, A. Halilu, N. M. Julkapli, and A. Ma’amor, “Gold-graphene oxide nanohybrids: A review on their chemical catalysis,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 83, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1016/j.jiec.2019.11.029.
- [42] D. M. Davies *et al.*, “Combined economic and technological evaluation of battery energy storage for grid applications,” *Nat. Energy*, vol. 4, no. 1, pp. 42–50, 2019, doi: 10.1038/s41560-018-0290-1.
- [43] A. Halilu, T. H. Ali, P. Sudarsanam, and S. K. Bhargava, “Synthesis of Fuel Grade Molecules from Hydroprocessing of Biomass-Derived Compounds Catalyzed by Magnetic,” vol. 11, no. 524, pp. 1–11, 2019, doi: 10.3390/sym11040524.
- [44] C. Liang, X. Zhang, Z. Wang, W. Wang, M. Yang, and X. Dong, “Organic/inorganic nanohybrids rejuvenate photodynamic cancer therapy,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 8, no. 22, pp. 4748–4763, 2020, doi: 10.1039/d0tb00098a.
- [45] F. Amiripour, S. Ghasemi, and S. N. Azizi, “A novel non-enzymatic glucose sensor based on gold-nickel bimetallic nanoparticles doped aluminosilicate framework prepared from agro-waste material,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 537, no. 9, p. 147827, 2021, doi: 10.1016/j.apsusc.2020.147827.
- [46] A. A. Avan and H. Filik, “Simultaneous electrochemical sensing of dihydroxybenzene isomers at multi-walled carbon nanotubes aerogel/gold nanoparticles modified graphene screen-printed electrode,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 878, 2020, doi: 10.1016/j.jelechem.2020.114682.
- [47] P. N. D. Duoc *et al.*, “A novel electrochemical sensor based on double-walled carbon nanotubes and graphene hybrid thin film for arsenic(V) detection,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 400, no. 6, p. 123185, 2020, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123185.
- [48] N. Zhao *et al.*, “Versatile Types of Organic/Inorganic Nanohybrids: From Strategic Design to Biomedical Applications,” *Chem. Rev.*, 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00401.
- [49] N. K. Pandey *et al.*, “A facile method for the synthesis of copper-cysteamine nanoparticles and study of ROS production for cancer treatment,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 7, no. 42, pp. 6630–6642, 2019, doi: 10.1039/c9tb01566c.
- [50] H. Cheng, J. G. Shapter, Y. Li, and G. Gao, “Recent progress of advanced anode materials of lithium-ion batteries,” *J. Energy Chem.*, vol. 57, pp. 451–468, 2021, doi: 10.1016/j.jechem.2020.08.056.
- [51] M. Vedhanayagam, B. U. Nair, and K. J. Sreeram, “Dimension effect: Dendrimer functionalized carbon based nanomaterial mediated collagen scaffold for wound healing application,” *Materialia*, vol. 7, no. 5, p. 100354, 2019, doi: 10.1016/j.mtla.2019.100354.

- [52] C. W. Chiu *et al.*, “Controlling the structures, flexibility, conductivity stability of three-dimensional conductive networks of silver nanoparticles/carbon-based nanomaterials with nanodispersion and their application in wearable electronic sensors,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 5, 2020, doi: 10.3390/nano10051009.
- [53] S. Iijima, “Helical microtubules of graphitic carbon,” *Nature*, vol. 354, pp. 56–58, 1991.
- [54] I. Ijaz, E. Gilani, A. Nazir, and A. Bukhari, “Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles,” *Green Chem. Lett. Rev.*, vol. 13, no. 3, pp. 59–81, 2020, doi: 10.1080/17518253.2020.1802517.
- [55] S. K. Soni, B. Thomas, and V. R. Kar, “A Comprehensive Review on CNTs and CNT-Reinforced Composites: Syntheses, Characteristics and Applications,” *Mater. Today Commun.*, vol. 25, no. 6, p. 101546, 2020, doi: 10.1016/j.mtcomm.2020.101546.
- [56] R. Saito, M. Fujita, G. Dresselhaus, and M. S. Dresselhaus, “Electronic structure of chiral graphene tubules,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 60, no. 18, pp. 2204–2206, 1992, doi: 10.1063/1.107080.
- [57] F. V. Ferreira, W. Franceschi, B. R. C. Menezes, A. F. Biagioni, A. R. Coutinho, and L. S. Cividanes, *Synthesis, characterization, and applications of carbon nanotubes*. Elsevier Inc., 2018.
- [58] Z. Z. Chowdhury *et al.*, “A review on electrochemically modified carbon nanotubes (CNTs) membrane for desalination and purification of water,” *Mater. Res. Express*, vol. 5, no. 10, 2018, doi: 10.1088/2053-1591/aada65.
- [59] M. Endo, M. S. Strano, and P. M. Ajayan, “Potential applications of carbon nanotubes,” *Top. Appl. Phys.*, vol. 111, pp. 13–62, 2008, doi: 10.1007/978-3-540-72865-8_2.
- [60] D. L. Sun, R. Y. Hong, F. Wang, J. Y. Liu, and M. Rajesh Kumar, “Synthesis and modification of carbon nanomaterials via AC arc and dielectric barrier discharge plasma,” *Chem. Eng. J.*, vol. 283, pp. 9–20, 2016, doi: 10.1016/j.cej.2015.07.023.
- [61] R. Yuge, S. Bandow, M. Yudasaka, K. Toyama, S. Iijima, and T. Manako, “Boron- and nitrogen-doped single-walled carbon nanohorns with graphite-like thin sheets prepared by CO₂ laser ablation method,” *Carbon N. Y.*, vol. 111, pp. 675–680, 2017, doi: 10.1016/j.carbon.2016.10.049.
- [62] Z. Yang, Q. Zhang, G. Luo, J. Q. Huang, M. Q. Zhao, and F. Wei, “Coupled process of plastics pyrolysis and chemical vapor deposition for controllable synthesis of vertically aligned carbon nanotube arrays,” *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 100, no. 2, pp. 533–540, 2010, doi: 10.1007/s00339-010-5868-9.
- [63] S. Jiang, P. X. Hou, C. Liu, and H. M. Cheng, “High-performance single-wall carbon nanotube transparent conductive films,” *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 35, no. 11, pp. 2447–2462, 2019, doi: 10.1016/j.jmst.2019.07.011.
- [64] A. F. Ávila and G. S. R. Lacerda, “Molecular mechanics applied to single-walled carbon nanotubes,” *Mater. Res.*, vol. 11, no. 3, pp. 325–333, 2008, doi: 10.1590/S1516-14392008000300016.

- [65] M. J. Kim, J. H. Kang, and M. Park, "Chirality-controlled growth of single-walled carbon nanotubes via nanotube cloning," *Macromol. Res.*, vol. 22, no. 9, pp. 917–925, 2014, doi: 10.1007/s13233-014-2150-6.
- [66] E. Gerstner, "Nobel Prize 2010: Andre Geim & Konstantin Novoselov," *Nat. Phys.*, vol. 6, no. 11, pp. 836–836, 2010, doi: 10.1038/nphys1836.
- [67] A. K. Geim and K. S. Novoselov, "The rise of graphene," *Nanosci. Technol. A Collect. Rev. from Nat. Journals*, pp. 11–19, 2009, doi: 10.1142/9789814287005_0002.
- [68] Y. Wang and S. Hu, "Applications of carbon nanotubes and graphene for electrochemical sensing of environmental pollutants," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 16, no. 8, pp. 7852–7872, 2016, doi: 10.1166/jnn.2016.12762.
- [69] M. Thangamuthu, K. Y. Hsieh, P. V. Kumar, and G. Y. Chen, "Graphene- and graphene oxide-based nanocomposite platforms for electrochemical biosensing applications," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 12, 2019, doi: 10.3390/ijms20122975.
- [70] M. Karimi, P. Sahandi Zangabad, S. Baghaee-Ravari, M. Ghazadeh, H. Mirshekari, and M. R. Hamblin, "Smart Nanostructures for Cargo Delivery: Uncaging and Activating by Light," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, no. 13, pp. 4584–4610, 2017, doi: 10.1021/jacs.6b08313.
- [71] S. Li, M. Liu, and X. Qiu, "Scanning Probe Microscopy of Topological Structure Induced Electronic States of Graphene," *Small Methods*, vol. 4, no. 3, 2020, doi: 10.1002/smt.201900683.
- [72] P. Suvarnaphaet and S. Pechprasarn, "Graphene-based materials for biosensors: A review," *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 10, 2017, doi: 10.3390/s17102161.
- [73] S. K. Krishnan, E. Singh, P. Singh, M. Meyyappan, and H. S. Nalwa, "A review on graphene-based nanocomposites for electrochemical and fluorescent biosensors," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 16, pp. 8778–8781, 2019, doi: 10.1039/c8ra09577a.
- [74] W. S. Hummers and R. E. Offeman, "Preparation of Graphitic Oxide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, no. 6, p. 1339, 1958, doi: 10.1021/ja01539a017.
- [75] A. Lerf, H. He, M. Forster, and J. Klinowski, "Structure of graphite oxide revisited," *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, no. 23, pp. 4477–4482, 1998, doi: 10.1021/jp9731821.
- [76] D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski, and R. S. Ruoff, "The chemistry of graphene oxide," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 1, pp. 228–240, 2010, doi: 10.1039/b917103g.
- [77] A. H. Castro Neto, F. Guinea, N. M. R. Peres, K. S. Novoselov, and A. K. Geim, "The electronic properties of graphene," *Rev. Mod. Phys.*, vol. 81, no. 1, pp. 109–162, 2009, doi: 10.1103/RevModPhys.81.109.
- [78] A. A. Green and M. C. Hersam, "Emerging methods for producing monodisperse graphene dispersions," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 1, no. 2, pp. 544–549, 2010, doi: 10.1021/jz900235f.
- [79] F. Farjadian *et al.*, "Recent Developments in Graphene and Graphene Oxide: Properties, Synthesis, and Modifications: A Review," *ChemistrySelect*, vol. 5, no. 33, pp. 10200–10219, 2020, doi: 10.1002/slct.202002501.

- [80] X. Xu *et al.*, “Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 40, pp. 12736–12737, 2004, doi: 10.1021/ja040082h.
- [81] S. Miao, K. Liang, J. Zhu, B. Yang, D. Zhao, and B. Kong, “Hetero-atom-doped carbon dots: Doping strategies, properties and applications,” *Nano Today*, vol. 33, p. 100879, 2020, doi: 10.1016/j.nantod.2020.100879.
- [82] C. Xia, S. Zhu, T. Feng, M. Yang, and B. Yang, “Evolution and Synthesis of Carbon Dots: From Carbon Dots to Carbonized Polymer Dots,” *Adv. Sci.*, vol. 6, no. 23, 2019, doi: 10.1002/advs.201901316.
- [83] C. L. Shen, Q. Lou, K. K. Liu, L. Dong, and C. X. Shan, “Chemiluminescent carbon dots: Synthesis, properties, and applications,” *Nano Today*, vol. 35, p. 100954, 2020, doi: 10.1016/j.nantod.2020.100954.
- [84] Y. Ru *et al.*, “Recent advances in chiral carbonized polymer dots: From synthesis and properties to applications,” *Nano Today*, vol. 34, 2020, doi: 10.1016/j.nantod.2020.100953.
- [85] B. Yao, H. Huang, Y. Liu, and Z. Kang, “Carbon Dots: A Small Conundrum,” *Trends Chem.*, vol. 1, no. 2, pp. 235–246, 2019, doi: 10.1016/j.trechm.2019.02.003.
- [86] R. Shi *et al.*, “Hydroxyl-Group-Dominated Graphite Dots Reshape Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for Small Biomolecular Analysis and Imaging,” *ACS Nano*, vol. 11, no. 9, pp. 9500–9513, 2017, doi: 10.1021/acsnano.7b05328.
- [87] L. Li and T. Dong, “Photoluminescence tuning in carbon dots: Surface passivation or/and functionalization, heteroatom doping,” *J. Mater. Chem. C*, vol. 6, no. 30, pp. 7944–7970, 2018, doi: 10.1039/c7tc05878k.
- [88] N. Martin and G. Bodwell, “Advanced Molecular Nanocarbons: Fertile Ground for Discovery, Creation, and Invention,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 52, no. 10, pp. 2757–2759, 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.9b00501.
- [89] Y. Liu, H. Huang, W. Cao, B. Mao, Y. Liu, and Z. Kang, “Advances in carbon dots: From the perspective of traditional quantum dots,” *Mater. Chem. Front.*, vol. 4, no. 6, pp. 1586–1613, 2020, doi: 10.1039/d0qm00090f.
- [90] M. R. Nobile, M. Raimondo, C. Naddeo, and L. Guadagno, “Rheological and morphological properties of non-covalently functionalized graphene-based structural epoxy resins with intrinsic electrical conductivity and thermal stability,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 7, pp. 1–23, 2020, doi: 10.3390/nano10071310.
- [91] M. Atif, I. Afzaal, H. Naseer, M. Abrar, and R. Bongiovanni, “Review—Surface Modification of Carbon Nanotubes: A Tool to Control Electrochemical Performance,” *ECS J. Solid State Sci. Technol.*, vol. 9, no. 4, p. 41009, 2020, doi: 10.1149/2162-8777/ab8929.
- [92] A. Hirsch and O. Vostrowsky, “Functionalization of carbon nanotubes,” *Top. Curr. Chem.*, vol. 245, pp. 193–237, 2005, doi: 10.1007/b98169.
- [93] Z. Abousalman-Rezvani, P. Eskandari, H. Roghani-Mamaqani, and M. Salami-Kalajahi,

- “Functionalization of carbon nanotubes by combination of controlled radical polymerization and ‘grafting to’ method,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 278, p. 102126, 2020, doi: 10.1016/j.cis.2020.102126.
- [94] Y. Zhou, Y. Fang, and R. P. Ramasamy, “Non-covalent functionalization of carbon nanotubes for electrochemical biosensor development,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 2, 2019, doi: 10.3390/s19020392.
- [95] W. Al-Graiti, J. Foroughi, Y. Liu, and J. Chen, “Hybrid Graphene/Conducting Polymer Strip Sensors for Sensitive and Selective Electrochemical Detection of Serotonin,” *ACS Omega*, vol. 4, no. 26, pp. 22169–22177, 2019, doi: 10.1021/acsomega.9b03456.
- [96] P. Bhardwaj, S. Singh, P. R. Kharangarh, and A. N. Grace, “Surfactant decorated polypyrrole-carbon materials composites electrodes for supercapacitor,” *Diam. Relat. Mater.*, vol. 108, no. 7, p. 107989, 2020, doi: 10.1016/j.diamond.2020.107989.
- [97] X. X. Wang, G. F. Yu, J. Zhang, M. Yu, S. Ramakrishna, and Y. Z. Long, “Conductive polymer ultrafine fibers via electrospinning: Preparation, physical properties and applications,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 115, no. 405, p. 100704, 2021, doi: 10.1016/j.pmatsci.2020.100704.
- [98] M. Romero, M. A. Macchione, F. Mattea, and M. Strumia, “The role of polymers in analytical medical applications. A review,” *Microchem. J.*, vol. 159, no. 8, p. 105366, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105366.
- [99] H. Liu *et al.*, “Paper: A promising material for human-friendly functional wearable electronics,” *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 112, pp. 1–22, 2017, doi: 10.1016/j.mser.2017.01.001.
- [100] X. Li *et al.*, “Electronic biopolymers: From molecular engineering to functional devices,” *Chem. Eng. J.*, vol. 397, no. 5, p. 125499, 2020, doi: 10.1016/j.cej.2020.125499.
- [101] Z. Ma, W. Shi, K. Yan, L. Pan, and G. Yu, “Doping engineering of conductive polymer hydrogels and their application in advanced sensor technologies,” *Chem. Sci.*, vol. 10, no. 25, pp. 6232–6244, 2019, doi: 10.1039/c9sc02033k.



Capítulo II: Materiales y métodos

II-1. Técnicas electroquímicas

II-1.1. Voltamperometría Cíclica

Una de las primeras técnicas electroquímicas utilizadas a la hora de obtener información cualitativa o semicuantitativa de un sistema desconocido es la voltamperometría cíclica (VC). Esta técnica es muy útil ya que puede aportar información tanto termodinámica como cinética de los procesos de transferencia de carga, que ayudan en la comprensión de las reacciones redox bajo estudio.

VC es una técnica potenciodinámica [1], la cual está basada en la aplicación de un programa triangular de potencial en función del tiempo, tal como se muestra en la **figura II-1.A**. Esta perturbación de potencial consiste en aplicar un barrido lineal de potencial a una dada velocidad (v), desde un potencial inicial (E_i), hasta un dado potencial de corte (E_c), en el cual el barrido se invierte hasta un dado potencial final (E_f), que puede o no coincidir con el potencial inicial. Estas perturbaciones se denominan ciclos de potencial y, dependiendo del objetivo del experimento puede realizarse tantas veces consecutivas como uno desee. Cuando se grafica la respuesta en corriente obtenida en función del potencial aplicado se obtiene un voltamperograma cíclico, como el que se muestra de manera ilustrativa en el **figura II-1.B**.

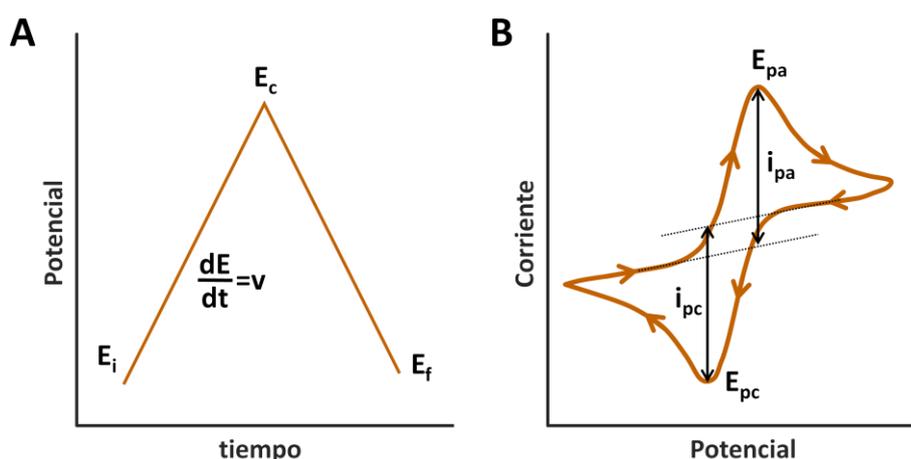


Figura II-1. (A) Programa de potencial aplicado en voltamperometría cíclica. (B) Voltamperograma cíclico resultante.

El voltamperograma esquematizado en la **figura II-1.B** representa un único ciclo para una reacción redox reversible en solución ($R_{(ac)} \rightleftharpoons O_{(ac)} + ne^-$), teniendo en cuenta una difusión lineal semi-infinita. Para un sistema en el que se realiza un barrido de potencial hacia valores positivos (oxidación) y que en un comienzo sólo contiene la especie reducida R, a un potencial E_i , menor al potencial estándar (E°) de la sonda redox, la corriente observada es debida al cargado de las doble capa eléctrica y comúnmente se denomina corriente capacitiva. A medida que avanza el barrido de potencial y el mismo se acerca a E° , comienza el proceso de oxidación de R para generar la especie oxidada O, la cual se denomina corriente de oxidación. Conforme aumenta el potencial, aumenta el consumo de R en la superficie del electrodo, por lo que debe difundir una mayor cantidad de dicha especie desde el seno de la solución, produciendo un incremento en el gradiente y por ende en la corriente de oxidación y un aumento de la capa difusional. Cuando el potencial alcanza un valor tal que el gradiente de concentración es máximo, se alcanza el valor máximo de corriente, que se define como pico de corriente anódico (i_{pa}), el potencial al cual aparece dicho pico se denomina potencial de pico anódico (E_{pa}). Al continuar aumentando el potencial con el consecuente consumo de R en la superficie del electrodo, la corriente cae. La ecuación de Nernst (**ecuación II-1**) describe la relación entre el potencial y la concentración de las especies R y O en la superficie del electrodo.

$$E = E^\circ + \frac{2,303RT}{nF} \log \left[\frac{C_o(0,t)}{C_R(0,t)} \right] \quad \text{Ecuación II-1}$$

Donde E es el potencial del electrodo, E° el potencial formal de la cupla redox, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, n es el número de electrones intercambiados en la reacción, F es la constante de Faraday, $C_o(0,t)$ y $C_R(0,t)$ son las concentraciones de la especie oxidada y reducida en la superficie a un dado tiempo t, respectivamente.

En la **ecuación II-2**, se presenta la expresión para calcular la corriente. Puede notarse que la corriente es proporcional al número de electrones (n) intercambiados en el proceso, al área geométrica (A) del electrodo, al coeficiente de difusión (D_R) de la especie y al gradiente de concentración de la especie reducida R (C_R) en la superficie del electrodo ($x=0$) [3]. Nótese que

cuando la concentración de R disminuye a cero en la superficie del electrodo la corriente obtenida es máxima [4].

$$I(t) = nFAD_R \left[\frac{\partial C_R(x,t)}{\partial t} \right]_{x=0} \quad \text{Ecuación II-2}$$

Una vez que el potencial aplicado alcanza el potencial de corte (E_c), el barrido se invierte y ocurre el proceso inverso, en el cual la especie O generada en el paso anterior se reduce para regenerar R. Al igual que para el proceso de oxidación descrito anteriormente, a un dado potencial, potencial de pico catódico (E_{pc}), se obtiene un pico de corriente catódico (i_{pc}) donde la velocidad de reducción de la especie O es máxima.

De esta manera, a partir de un voltamperograma, pueden obtenerse diferentes parámetros que describen al sistema bajo estudio, tales como i_{pc} , i_{pa} , E_{pc} , E_{pa} , además de la relación entre las corrientes (i_{pa}/i_{pc}) de pico y la diferencia entre los potenciales de pico ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$), los que permiten caracterizar el proceso redox que ocurre en reversible, cuasi-reversible e irreversible de acuerdo a los criterios propuestos en 1964 por Nicholson y Shain [5]. De forma general, se puede mencionar que la reversibilidad electroquímica de los sistemas redox está determinada por la relación entre las velocidades de los procesos de transferencia de carga y masa [6].

En las reacciones reversibles las concentraciones de las especies O y R pueden ser descritas por la ecuación de Nernst, ya que la velocidad de transferencia de carga es rápida y, por otro lado, deben cumplir con ciertos criterios, como que el valor de potencial de pico (E_p) debe ser independiente de la velocidad, la relación i_{pa}/i_{pc} se aproxima al valor unitario y la diferencia de potencial (ΔE_p) se aproxima a $0,059 \text{ V}/n$. Finalmente, como se mencionó con anterioridad, el hecho de que la corriente está regida por un proceso difusional, hace que la corriente varíe linealmente con la raíz de la velocidad ($v^{1/2}$), como lo indica la ecuación de Randles-Sevcik (**ecuación II-3**) [2,4].

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \left[\frac{\partial C_R(x,t)}{\partial t} \right]_{x=0} \quad \text{Ecuación II-3}$$

En el extremo opuesto, para las reacciones irreversibles, la transferencia de electrones no es tan rápida y los procesos redox se rigen fundamentalmente por transferencia de masa. Dichos sistemas se identifican

porque E_p dependen de la velocidad de barrido de potencial, la ausencia de procesos faradaicos en el proceso inverso, entre otros criterios de diagnóstico [6].

Los sistemas que presentan comportamientos intermedios son denominados cuasi-reversibles y están controlados tanto por el transporte de carga como por el transporte de masa, de manera que dependiendo de la velocidad de barrido de potencial podría evidenciarse un comportamiento más o menos reversible. En los voltamperogramas obtenidos pueden observarse tanto el pico de oxidación como de reducción, pero con ΔE_p mayores que $0,059 \text{ V/n}$ [2,7].

La voltamperometría de barrido lineal (VL) es una variante de la voltamperometría cíclica, en la cual el barrido de potencial se realiza en un único sentido (figura II-2.A y II-2.B) y sólo se estudia el proceso de oxidación o el de reducción de un sistema [4].

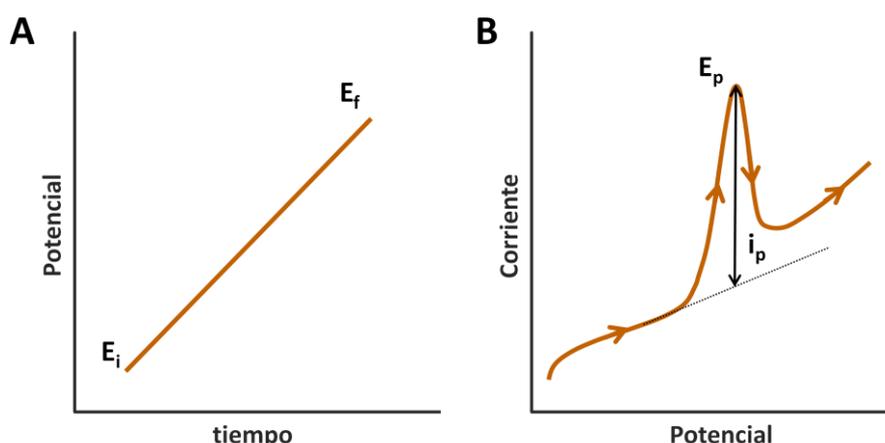


Figura II-2. (A) Programa de potencial aplicado en voltamperometría lineal. (B) Voltamperograma lineal resultante.

II-1.2. Amperometría

En las técnicas amperométricas la obtención de la señal analítica consiste en la medición de la corriente que se origina luego del agregado del analito como consecuencia de aplicar un escalón de potencial al electrodo de trabajo bajo condiciones de convección forzada (figura II-3.A). La agitación constante garantiza la llegada continua del analito a la superficie del electrodo

desde el seno de la solución y como consecuencia de ello, cuando se produce la oxidación o reducción del analito se genera una señal de corriente constante denominada corriente de estado estacionario (i_{ee}). En esta técnica, en la superficie del electrodo se establece una capa difusional (δ) cuyo espesor es constante, no cambia en el tiempo [6] y depende de la velocidad de agitación y de la viscosidad de la solución. La corriente del estado estacionario puede ser calculada según la siguiente ecuación:

$$i_{ee} = \frac{nFAC_R D_R}{\delta} \quad \text{Ecuación II-4}$$

Donde n es el número de electrones intercambiados, F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo, D_R y C_R son el coeficiente de difusión y la concentración de la especie reducida en el seno de la solución, respectivamente y δ es el espesor de la capa difusional.

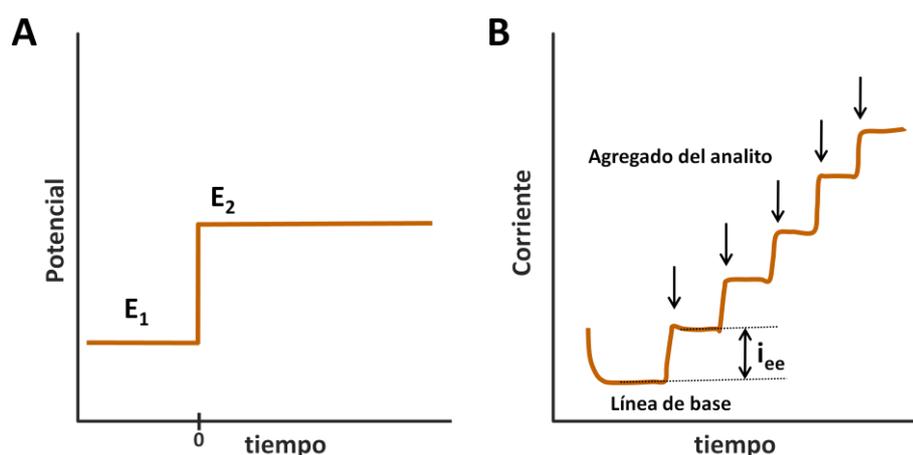


Figura II-3. (A) Programa de potencial aplicado en amperometría. (B) Respuesta en corriente obtenida por amperometría.

Como se mencionó anteriormente, la perturbación de potencial consiste en un escalón de potencial desde un valor donde no se produce la reacción electroquímica (E_1), en general se parte de potencial de circuito abierto, hasta un valor de potencial (E_2) donde la especie de interés se reduce o se oxida, dando origen a una corriente que es registrada en función del tiempo. Desde el punto de vista analítico, la corriente generada está relacionada directamente con la concentración del analito en el seno de la solución y puede ser aplicada para la cuantificación del mismo [6]. Es decir, que el agregado de la

muestra a la celda produce un aumento de la especie electroactiva en la superficie del electrodo y el consecuente aumento de i_{ee} . Si el analito es agregado en alícuotas sucesivas, esperando que se alcance el estado estacionario entre agregados, se genera lo que comúnmente denominamos amperograma, tal como se esquematiza en la **figura II-3.B**. Los amperogramas permiten conocer la sensibilidad con la que el analito de interés es detectado a partir de la construcción de curvas de calibrado [2].

II-1.3. Voltamperometría Hidrodinámica

Esta técnica consiste en determinar la corriente del estado estacionario producida por la adición del analito, que se oxida o se reduce en la superficie del electrodo, en condiciones de convección forzada, aplicando diferentes potenciales punto por punto en experimentos independientes [3]. En función de los valores obtenidos se realizan gráficos de corriente versus potencial, como el que se muestra en la **figura II-4**.

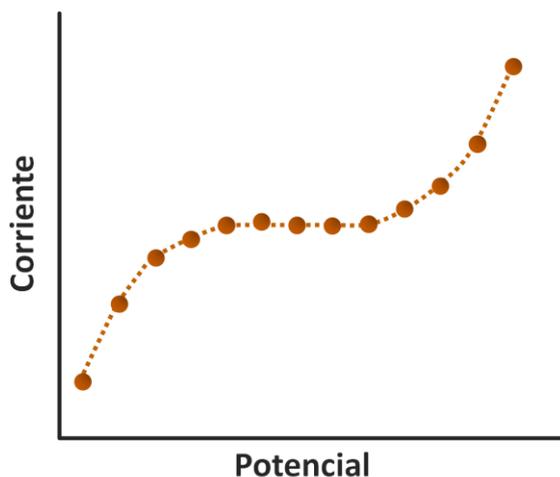


Figura II-4. *Voltamperograma hidrodinámico obtenido registrando las corrientes en función de los diferentes potenciales aplicados.*

Mediante esta técnica se puede conocer en detalle el comportamiento electroquímico de la especie de interés sobre un dado electrodo, ya que se trata de una técnica más sensible que la voltamperometría cíclica, debido a que se alcanzan valores superiores de corriente máxima. Por otra parte, es

una técnica muy útil que permite seleccionar el potencial de trabajo más adecuado para futuros estudios amperométricos por ejemplo.

II-1.4. Técnicas de preconcentración (*stripping*)

A fin de mejorar la sensibilidad y los límites de detección en las cuantificaciones electroquímicas se han diseñado diversas estrategias. Esto puede lograrse gracias a una etapa previa a la detección propiamente dicha, como lo es la preconcentración del analito en la superficie del electrodo, posterior enjuague y cambio de medio para luego realizar el análisis electroquímico. Estas metodologías de pre-concentración o *stripping* son consideradas las técnicas más poderosas ya que permiten alcanzar límites de detección sumamente bajos para la cuantificación de diversos analitos [8-10].

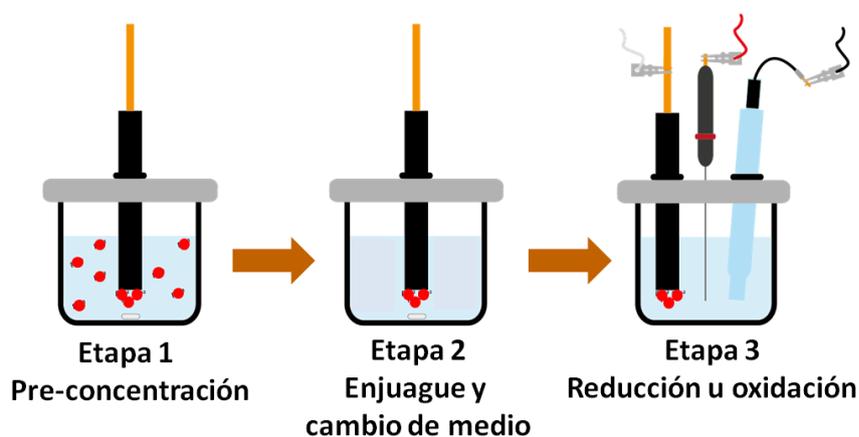


Figura II-5. Esquema de las etapas de la técnica de stripping.

De manera general y tal como se ilustra en la **figura II-5**, el *stripping* consiste en tres pasos [11]. Una primera etapa que consiste en la preconcentración de la especie en la superficie del electrodo durante un tiempo determinado. Este paso puede realizarse con control de la corriente o el potencial aplicado o a potencial de circuito abierto (o.c.p.). En todos los casos la acumulación se realiza en soluciones con agitación o convección forzada, garantizándose de esta forma el transporte de masa convectivo [2]. En una segunda etapa, se realiza el enjuague del electrodo modificado en una

solución adecuada. Finalmente, en la última etapa se produce la reducción u oxidación de la especie acumulada en la superficie del electrodo. La ventaja más significativa de esta técnica, es que el cambio de medio que se da de la etapa 1 a la etapa 3, evita posibles interferencias de otros compuestos que puedan estar presentes en la matriz de la muestra que se desea analizar. Por lo tanto, esta metodología no solo mejora la sensibilidad hacia un dado analito, sino que además es capaz de eliminar el efecto matriz de muestras complejas, es decir mejorar la selectividad.

II-1.5. Espectroscopia de impedancia electroquímica

Dentro de las técnicas electroquímicas, la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) es una poderosa herramienta ampliamente utilizada en la actualidad para la caracterización superficial de electrodos funcionalizados y el estudio de eventos de reconocimiento [12]. A diferencia de las técnicas discutidas con anterioridad, en donde la perturbación de potencial conduce al sistema a un estado alejado del equilibrio, EIE se basa en aplicar una perturbación de potencial o corriente periódica de pequeña amplitud, de manera que la respuesta observada se corresponde con un sistema en estado estacionario.

Esta técnica puede ser empleada exitosamente para caracterizar las propiedades eléctricas de materiales e interfaces [4,6,13] determinando la impedancia (Z) que presenta un dado sistema electroquímico a diferentes frecuencias. De esta manera, se puede decir que la impedancia eléctrica es una medida de la oposición de un circuito al paso de una corriente eléctrica sinusoidal alterna [3,14].

Generalmente, la perturbación aplicada es un potencial sinusoidal de muy pequeña amplitud (unos pocos mV), con una determinada frecuencia angular (ω), la cual puede expresarse matemáticamente según la ecuación II-5. Donde $E(t)$ es el valor instantáneo del potencial, E_{ac} es la amplitud máxima de potencial y ω es la frecuencia angular. Como consecuencia, la respuesta en corriente ($i(t)$) asociada a la perturbación es también una onda sinusoidal de la misma frecuencia pero desfasada por un ángulo ϕ . Este desplazamiento en

la fase depende de las resistencias y capacidades relativas que son características del sistema electroquímico en estudio [15]. La corriente puede ser calculada de acuerdo a la **ecuación II-6**. Donde i_{ac} es la amplitud de corriente correspondiente al estado estacionario.

$$E(t) = E_{ac} \text{sen}(\omega t) \quad \text{Ecuación II-5}$$

$$i(t) = i_{ac} \text{sen}(\omega t + \varphi) \quad \text{Ecuación II-6}$$

En la **figura II-6** se representa tanto la perturbación de potencial como la respuesta sinusoidal de corriente obtenida.

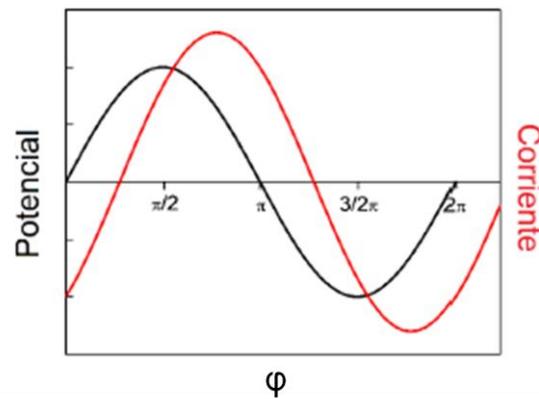


Figura II-6. Perturbación de potencial sinusoidal aplicado en EIE y su consecuente respuesta sinusoidal en corriente desfasada en un dado ángulo.

El cociente entre las dos señales periódicas $(i(\omega)/E(\omega))$ se denomina impedancia (Z). La impedancia también puede ser expresada como un número complejo de acuerdo a la **ecuación II-7**, donde Z° es la magnitud, φ es el ángulo de fase y j es el número imaginario $\sqrt{-1}$.

$$Z = Z^\circ [\cos(\varphi) + j \text{sen}(\varphi)] = Z' + jZ'' \quad \text{Ecuación II-7}$$

La componente real Z' , está asociada con el comportamiento resistivo y la componente imaginaria Z'' con el capacitivo [16]. La representación en el plano complejo (Z'' vs. Z') se conoce como diagrama de Nyquist. En esta gráfica cada punto corresponde a una frecuencia diferente [13]. La interpretación de los resultados puede realizarse mediante la resolución de las ecuaciones diferenciales que predicen el comportamiento del sistema. Esta metodología es relativamente poco utilizada debido a su complejidad y al hecho de que es necesario conocer las condiciones iniciales y las

características del sistema, e identificar los procesos que ocurren para la resolución de las ecuaciones. La metodología comúnmente utilizada implica la combinación de elementos de circuitos eléctricos, llamados circuitos equivalentes, que ajustan la respuesta de impedancia con el dato experimental mediante el empleo de diversos componentes eléctricos que representan al sistema en estudio [14,17].

II-1.5.1. Circuitos equivalentes

Como se mencionó anteriormente una de las maneras más utilizadas para representar la impedancia es el diagrama de Nyquist (**figura II-7**), el cual habitualmente consta de un perfil de semicírculo seguido de una línea recta. Los procesos limitados por transferencia electrónica están representados por la porción que corresponde al semicírculo (altas frecuencias), mientras que aquellos limitados por la difusión se representan en la región lineal (bajas frecuencias) del diagrama [4]. De esta manera, se puede resumir que los sistemas que presenten una cinética de transferencia electrónica rápida, solo presentan la región lineal en el diagrama, a diferencia de aquellos en los que la cinética es muy lenta, que se caracterizan por presentar un gran semicírculo en todo el intervalo de frecuencia estudiado [2].

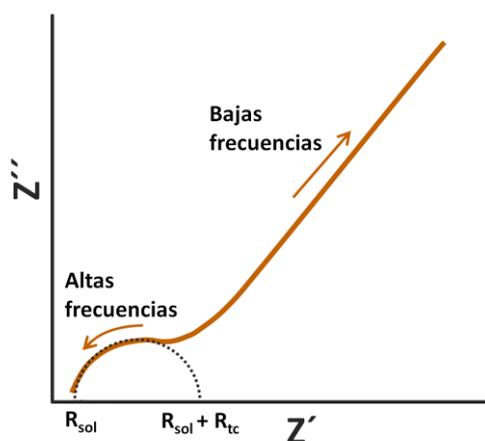


Figura II-7. Representación de los datos de impedancia electroquímica mediante diagrama de Nyquist.

Por otra parte, los diagramas de Nyquist, son de suma utilidad para determinar diferentes parámetros, como la resistencia óhmica de la solución

(R_s), la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) y la capacidad de la doble capa eléctrica (C_{dc}), la cual puede ser calculada a partir del valor de la frecuencia en el máximo del semicírculo.

Los procesos físicos que ocurren en una celda electroquímica pueden ser modelados por medio de diferentes componentes de circuito eléctrico, tal como se mencionó anteriormente. De manera que, los datos experimentales obtenidos a partir de EIE, pueden ser ajustados con curvas teóricas a través de circuitos eléctricos equivalentes, lo que permite obtener parámetros eléctricos que caracterizan al sistema. Unos de los circuitos eléctricos más conocidos y empleado para el modelado de los fenómenos que ocurren en la interfaz es el circuito de Randles [7,16] (figura II-8.A). Este circuito se utiliza cuando se puede diferenciar el proceso de transferencia de carga y el de masa en el intervalo de frecuencias analizado. En él se representa la capacidad de la doble capa (C_{dc}) y la resistencia óhmica de la solución (R_s) en paralelo con una resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) y la impedancia de Warburg (Z_w), que da cuenta del proceso difusional de los iones desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo.

Cuando un dado proceso se encuentra limitado por el transporte de carga, son otros los circuitos capaces de describir los acontecimientos físicos que ocurren en la interface, por ejemplo, un circuito de tipo R(RC) [17] modela el comportamiento del sistema mencionado (figura II-8.B). En este caso, el diagrama de Nyquist solo presenta la porción correspondiente al semicírculo y el circuito posee sólo componentes asociados a la resistencia de la solución, la capacidad de la doble capa y la resistencia a la transferencia de carga.

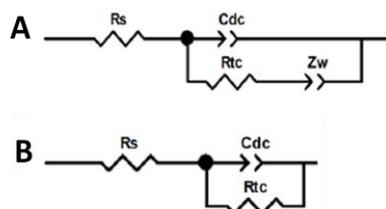


Figura II-8. Circuitos equivalentes empleados para modelar los datos experimentales. (A) Circuito de Randles y (B) circuito R(RC).

II-1.6. Equipamiento

Tanto las mediciones voltamperométricas como amperométricas fueron llevadas a cabo con potenciostatos TEQ_02 y TEQ_04. Los espectros de impedancia fueron adquiridos mediante un módulo FRA32M acoplado a un potenciostato Autolab 128N. Todos los equipos utilizados se encuentran conectados a una computadora para el control y registro de los resultados obtenidos. El análisis de los datos voltamperométricos y amperométricos fue realizado con el software OriginPro 8, mientras que los datos de impedancia fueron ajustados y modelados con el software ZView2.

II-1.6.1. Celdas y electrodos

Para el desarrollo de esta Tesis se utilizó una celda electroquímica convencional de tres electrodos, como se muestra en la **figura II-9**, la cual está conformada de un electrodo de referencia, en este caso de Ag/AgCl/KCl 3M (BAS), un electrodo auxiliar o contraelectrodo, que consiste en un alambre de platino y un electrodo de trabajo de carbono vítreo (GCE). Los mismos son sumergidos en una celda de vidrio de volumen variable dependiendo del experimento a realizar, que consta de una tapa de Teflon® con tres orificios por los cuales se insertan los electrodos. Para el caso de experimentos realizados bajo convección forzada, se empleó un agitador BAS para proveer el transporte de masa de manera controlada.

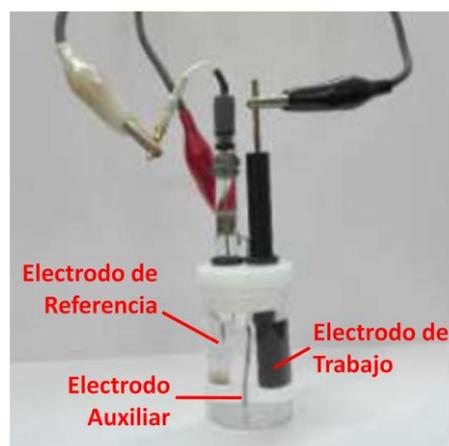


Figura II-9. Imagen real de una celda electroquímica convencional de tres electrodos.

Es importante destacar que el electrodo de trabajo es el transductor eléctrico de una celda electroquímica que responde al proceso redox bajo estudio, el mismo puede ser de diversa naturaleza [18]. A la hora de la elección del electrodo de trabajo a utilizar, es necesario tener en cuenta algunos parámetros tales como la respuesta del analito de interés, la ventana de potencial que se desea analizar, el costo, la toxicidad, entre otros [2]. El carbono vítreo es uno de los materiales más utilizados como material de electrodo dentro del área electroquímica. De hecho, en 1965 Zittel y colaboradores encontraron que GCE presenta propiedades sobresalientes para ser empleado como electrodo de trabajo debido a que es impermeable a los gases, posee una gran resistencia química y sobre todo se clasifica como un conductor eléctrico. Por otra parte, posee la gran ventaja de poder ser empleado para explorar una gran ventana de potencial, comprendida entre -0,8 y 1,2 V versus un electrodo de calomel saturado [19]. Además, se trata de un material de bajo costo que posee una electroactividad destacada para un gran número de analitos y puede acondicionarse con facilidad mediante pulido mecánico.

El carbono vítreo es una variante del grafito y se sintetiza mediante la carbonización lenta y controlada de diferentes polímeros orgánicos bajo una atmósfera de gas inerte a una temperatura cercana a los 3000 K, donde se escinden los heteroátomos. El resultado de este procedimiento es una estructura basada en átomos de carbono con hibridación sp^2 que dan origen a zonas gráficas en forma de cintas que se entrelazan [20-22]. Por otro lado, cuando un dado material es utilizado para la fabricación de electrodos sólidos, es importante tener presente que la metodología de síntesis influye directamente con la respuesta electroquímica que puede proporcionar el electrodo [23].

En este trabajo de Tesis se emplearon electrodos de carbono vítreo marca CHInstruments modelo CHI104 de 3mm de diámetro, sometidos a un pretratamiento antes de ser utilizados, debido a que en contacto con el aire forman una delgada capa de óxido en la superficie, lo que ocasiona que incremente la corriente capacitiva de los mismos. Se utilizó un pulido mecánico [24,25] mediante el empleo de alúminas (Al_2O_3) de diferentes tamaños (1 μm , 0,3 μm y 0,05 μm), durante 1 min con cada una hasta obtener

“apariencia espejo”. Finalmente, el electrodo fue enjuagado con abundante agua milliQ y se realizaron 10 ciclos voltamperométricos en *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40 de manera de eliminar los posibles restos de alúmina en la superficie y como metodología de control del estado superficial de los electrodos.

II-2. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una poderosa herramienta que proporciona información sobre la morfología y topografía de la superficie de una muestra, mediante el barrido de la superficie con un haz de electrones acelerados por aplicación de alto voltaje. Por otra parte, si el equipo cuenta con un detector para el análisis de rayos X (SEM-EDX) puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa sobre la composición elemental de las diversas áreas de la superficie. Para el análisis por SEM es requisito excluyente trabajar en condiciones de vacío para que la trayectoria de los electrones no sea desviada por la presencia de átomos o moléculas que no pertenezcan a la muestra de interés. Cuando el haz de electrones interactúa con la muestra se producen diversas formas de radiación, sin embargo hay dos realmente fundamentales en microscopía de barrido: los electrones secundarios (ES) y los electrones retro dispersados (ER) (figura II-10) [26].

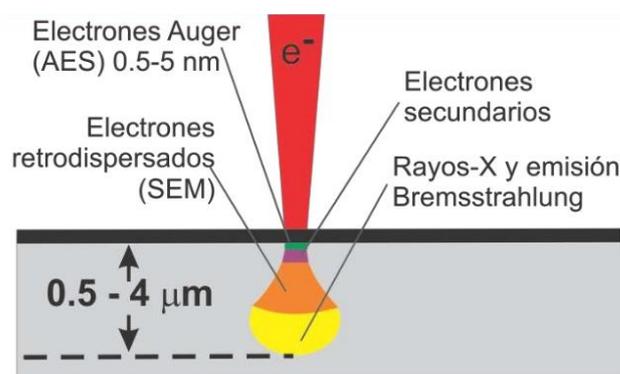


Figura II-10. Representación esquemática de la interacción del haz incidente de electrones con la muestra y las correspondientes emisiones generadas en SEM.

Las primeras, ES, se emplean para obtener la imagen de la superficie de la muestra, dichos electrones poseen baja energía (de menos de 50 eV) y son el resultado de la emisión por parte de los átomos más cercanos a la superficie, por ello, proporcionan una imagen de la morfología superficial de la muestra. Los segundos, ER, poseen mayor energía que los mencionados anteriormente y por lo tanto aportan información acerca de regiones más profundas de la muestra, por lo que son sensibles a la composición de la misma. La intensidad de la señal de ER, para una energía determinada del haz, depende del número atómico (Z) del átomo con el que interacciona, siendo mayor para Z mayores. Este hecho permite distinguir áreas de diferente composición química [26,27].

Las micrografías SEM mostradas en este trabajo fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido FE-SEM Sigam de Carl Zeiss.

II-3. Técnicas espectroscópicas

De manera general se puede mencionar que las técnicas espectroscópicas se basan en el estudio de emisión o absorción de la radiación electromagnética debida a la interacción de la materia con la energía. Según la energía utilizada para el análisis, la espectroscopia puede dividirse en diferentes técnicas. En este trabajo de Tesis, estas metodologías fueron empleadas para obtener información cualitativa a fin de poder caracterizar y dilucidar las estructuras de los diferentes nanomateriales sintetizados.

II-3.1. Espectroscopia de absorción Ultra-Violeta

Una de las técnicas empleadas con mayor frecuencia en el análisis químico debido a su sencillez es la espectroscopia de absorción Ultra-Violeta. La absorción de radiación UV-visible por parte de una molécula genera cambios en la configuración electrónica de la capa de valencia. Las transiciones de los electrones ocurren entre los diferentes niveles energéticos de ciertos átomos de la molécula. Los enlaces y grupos funcionales que

presentan absorción en el intervalo UV-Visible del espectro electromagnético reciben el nombre de cromóforos. Esta técnica es muy útil ya que permite obtener información de tipo cualitativa a partir del espectro [28].

Los espectros de los materiales de carbono, en el intervalo de longitudes de onda del UV-visible, suelen presentar bandas características asociadas a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ y son las que se analizan en el marco de este trabajo de Tesis para caracterizar las nanoestructuras de carbono que fueron sintetizadas.

II-3.2. Espectroscopia Infrarroja

Una de las técnicas más utilizada para la caracterización de materiales en el ámbito de la investigación es la espectroscopia infrarroja (IR). Desde sus orígenes en 1940 hasta la actualidad, se realizaron increíbles avances en los equipamientos utilizados para el análisis de infrarrojo, esto determinó el gran interés que despertó esta técnica en la comunidad científica para la caracterización de materiales. Los espectrofotómetros con transformada de Fourier (FT-IR) mejoraron de manera significativa la calidad de los espectros y de los datos obtenidos, reduciendo de manera significativa el tiempo de análisis.

La técnica de IR se basa en el análisis de la vibración de los átomos de una molécula. Una condición necesaria para el análisis por medio de IR es que el momento dipolar de la molécula cambie durante la vibración. Cuando la radiación infrarroja interacciona con la muestra, parte de la misma es absorbida y se genera lo que normalmente se conoce como espectro IR. La energía absorbida por la muestra se encuentra directamente relacionada con los diferentes modos vibracionales de los enlaces que conforman las moléculas, dichos modos vibracionales pueden ser agrupados en bandas o grupos de frecuencias que se atribuyen a ciertos grupos funcionales presentes en la estructura. De esta manera cada grupo funcional puede ser asociado a una determinada región de frecuencias del espectro IR, lo que permite obtener información cualitativa de la estructura de las muestras bajo estudio. Esta técnica fue de suma importancia en el desarrollo de este trabajo de Tesis, ya

que fue posible poner de manifiesto la presencia de determinados enlaces y grupos funcionales que dan cuenta de la formación de los nanohíbridos sintetizados.

II-3.3. Espectroscopia RAMAN

El efecto Raman fue descubierto en 1928 por los físicos C. V. Raman y K. S. Krishnan [29]. Dicho efecto se origina a partir de la polarización electrónica de las moléculas debida a la luz UV, visible o infrarrojo cercano [30]. Cuando una molécula es irradiada por luz monocromática, pueden ocurrir diversos procesos: la dispersión Rayleigh y la dispersión Raman. El primero ocurre cuando un fotón colisiona elásticamente con las moléculas, siendo las radiaciones incidente y dispersada, de la misma frecuencia. El segundo y menos frecuente, ocurre si la frecuencia de la radiación incidente difiere de la dispersada (colisión inelástica). Si la molécula se encuentra en el estado fundamental y, después de interactuar con la radiación, llega a un estado vibracional virtual excitado inestable, la energía del fotón dispersado es menor a la del incidente (Raman Stokes). Si por el contrario, la molécula se encuentra en un estado excitado puede ocurrir que la energía del fotón dispersado sea mayor a la del incidente (Raman anti-Stokes).

Un espectro Raman representa la colección de todas las dispersiones Raman, la determinación se inicia a una determinada frecuencia, la cual coincide con la frecuencia de la luz incidente y se mide en número de ondas (cm^{-1}). Una de las ventajas que presenta esta técnica es que se realiza directamente sobre la muestra a analizar y que no conlleva ninguna alteración o destrucción de la misma. Materiales de tipo orgánico u inorgánico en cualquier estado de agregación y almacenados en diferentes contenedores transparentes a la radiación (ej.: vidrio, plástico, entre otros) pueden ser analizados por medio de espectroscopia Raman [31].

II-3.4. Dispersión dinámica de la luz

El análisis de la dispersión dinámica de la luz (DLS), es una técnica no destructiva que se utiliza generalmente para determinar el diámetro de partículas de orden inferior a los micrómetros en dispersión coloidal. El movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse con diferentes intensidades. Basándose en el análisis de estas fluctuaciones temporales de la dispersión del haz de luz producido por las partículas en solución y correlacionando dichas fluctuaciones de intensidad con la velocidad del movimiento de las partículas es posible calcular el radio hidrodinámico de las mismas.

II-3.5. Equipamiento

La caracterización UV-Vis se llevó a cabo con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 utilizando una cubeta de cuarzo de 1mm. Los espectros de IR se realizaron con un espectrofotómetro Shimadzu Nicolet 5-5XC, y las muestras fueron inmovilizadas sobre una pastilla de seleniuro de cinc (ZnSe). Por otro lado, se utilizó un espectrómetro HORIBA Jobin Yvon (modelo HR 800 UV) con un láser color verde a 532 nm para la obtención de los espectros Raman. La caracterización por DLS de las estructuras sintetizadas se realizó utilizando un espectrofotómetro Delsa Nano 2.2 con una celda de cuarzo de 1 cm a temperatura ambiente. Todos los equipos fueron conectados a una computadora para el control y registro de los resultados. Para el análisis de los datos se utilizó el software OriginPro 8.

II-4. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se enmarca dentro de los métodos térmicos utilizados en investigación, que ha tomado relevancia en los últimos años debido a que cuenta con una amplia variedad de aplicaciones en diversas áreas. La técnica consiste en medir la cantidad o porcentaje de variación en el peso de un material o muestra en función de un programa de aumento de temperatura en una atmósfera controlada, por ejemplo de argón.

Debido a que los cambios de masa se cuantifican en condiciones controladas, se puede realizar un sinfín de análisis, tales como el estudio de procesos como de desorción, descomposición, oxidación, reducción, entre otros. A su vez, TGA puede ser utilizada en el estudio de la pérdida de productos gaseosos o volátiles como consecuencia de las reacciones descritas anteriormente. Esto último es particularmente útil para evaluar los grupos oxigenados presentes en las estructuras de carbono [32,33].

II-5. Bibliografía

- [1] R. Gil, C. G. Amorim, A. N. Araújo, and M. C. B. S. M. Montenegro, *Process analysis / electroanalytical techniques*, 3rd ed., no. 10. Elsevier Inc., 2019.
- [2] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2006, ISBN: 9780471678793.
- [3] A.J. Bard and L.R. Faulkner, *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*, 1993, doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [4] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, 1993, ISBN: 9780198553885.
- [5] S.I. Nicholson Richard, *Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems*, *Anal. Chem.* vol. 36, pp 706–723, 1964, doi:10.1177/096673690401300103.
- [6] H.H. Girault, *Analytical and Physical Electrochemistry*, EFPL Press, Lausana, 2004.
- [7] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2001, ISBN: 9780471043720.
- [8] C. Kalinke, A. P. Zanicoski-Moscardi, P. R. de Oliveira, A. S. Mangrich, L. H. Marcolino-Junior, and M. F. Bergamini, “Simple and low-cost sensor based on activated biochar for the stripping voltammetric detection of caffeic acid,” *Microchem. J.*, vol. 159, no. 8, p. 105380, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105380.
- [9] H. Incebay, L. Aktepe, and Z. Leblebici, “An electrochemical sensor based on green tea extract for detection of Cd(II) ions by differential pulse anodic stripping voltammetry,” *Surfaces and Interfaces*, vol. 21, no. 9, p. 100726, 2020, doi: 10.1016/j.surfin.2020.100726.
- [10] M. Majidian, J. B. Raoof, S. R. Hosseini, R. Ojani, J. Barek, and J. Fischer, “Novel Type of Carbon Nanotube Paste Electrode Modified by Sb₂O₃ for Square Wave Anodic Stripping Voltammetric Determination of Cd²⁺ and Pb²⁺,” *Electroanalysis*, vol. 32, no. 10, pp. 2260–2265, 2020, doi: 10.1002/elan.202060137.
- [11] G. Henze, *Analytical Voltammetry and Polarography*, in: *Handb. Anal. Tech.*, Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 785–825, 2001.
- [12] F. Lisdat, D. Schäfer, The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing, *Anal. Bioanal. Chem.* vol. 391, pp. 1555–1567, 2008 doi:10.1007/s00216-008-1970-7.
- [13] H.M. Villullas, E.A. Ticianelli, V.A. Macagno, E.R. González, *Electroquímica fundamentos y aplicaciones en un enfoque interdisciplinario*, 2000, ISBN: 9503302587.
- [14] J.R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, Second Edition, Wiley-Interscience, 2005, doi:10.1016/j.snb.2007.02.003
- [15] J. Muñoz, R. Montes, M. Baeza, Trends in electrochemical impedance spectroscopy involving nanocomposite transducers: Characterization, architecture

- surface and bio-sensing, *TrAC - Trends Anal. Chem.* vol. 97, pp 201– 215, 2017, doi:10.1016/j.trac.2017.08.012.
- [16] S. Krause, *Impedance Methods*, in: A.J. Bard, M. Stratmann, P.R. Unwin (Eds.), *Encycl. Electrochem. Vol. 3, Instrum. Electroanal. Chem.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.
- [17] M.E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- [18] F. Scholz, *Electroanalytical Methods*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, doi:10.1007/978-3-642-02915-8_4.
- [19] H.E. Zittel, F.J. Miller, *A Glassy-Carbon Electrode for Voltammetry*, *Anal. Chem.* vol. 37, pp 200–203, 1965, doi:10.1021/ac60221a006.
- [20] R.L. McCreery, *Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry*, *Chem. Rev.* vol. 108, pp. 2646–2687, 2008, doi:10.1021/cr068076m.
- [21] G.M. Jenkins, K. Kawamura, *Structure of glassy carbon*, *Nature.* vol. 231, pp. 175–176, 1971, doi:10.1038/231175a0.
- [22] P.N. Bartlett, R.C. Alkire, J. Lipkowski, *Electrochemistry of Carbon Electrodes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015.
- [23] A. Dekanski, J. Stevanović, R. Stevanović, B.Ž. Nikolić, V.M. Jovanović, *Glassy carbon electrodes*, *Carbon N. Y.* vol. 39, pp. 1195–1205, 2001, doi:10.1016/S0008-6223(00)00228-1.
- [24] Y. Yi, G. Weinberg, M. Prenzel, M. Greiner, S. Heumann, S. Becker, R. Schlögl, *Electrochemical corrosion of a glassy carbon electrode*, *Catal. Today.* vol. 295, pp. 32–40, 2017, doi:10.1016/j.cattod.2017.07.013.
- [25] L. Cao, M. Skyllas-Kazacos, D.-W. Wang, *Effects of Surface Pretreatment of Glassy Carbon on the Electrochemical Behavior of V(IV)/V(V) Redox Reaction*, *J. Electrochem. Soc.* vol. 163, pp. A1164–A1174, 2016, doi:10.1149/2.0261607jes.
- [26] C.E. Lyman, J.I. Goldstein, A.D. Romig, P. Echlin, D.C. Joy, D.E. Newbury, D.B. Williams, J.T. Armstrong, C.E. Fiori, E. Lifshin, K.-R. Peters, *Scanning Electron Microscopy, X-Ray Microanalysis, and Analytical Electron Microscopy*, Plenum Press, 1990.
- [27] V. Sorrivias de Lozano, A. Morales, M.J. Yañez, *Principios y práctica de la microscopía electrónica*, 1ra. Edición, Argentina, 2014.
- [28] D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill Higher Education, 2000.
- [29] Levine, I. N. *Molecular Spectroscopy*. Wiley-Interscience, 1975, ISBN: 0471531286 9780471531289
- [30] Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- [31] G. E. Smith; Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, JOHN WILEY & SONS, INC., 2005.

- [32] J. Zhang, C. Xiong, Y. Li, H. Tang, X. Meng, and W. Zhu, "The critical contribution of oxidation debris on the acidic properties of graphene oxide in an aqueous solution," *J. Hazard. Mater.*, vol. 402, no. 5, p. 123552, 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123552.
- [33] Y. Zhou *et al.*, "Construction of graphite oxide modified black phosphorus through covalent linkage: An efficient strategy for smoke toxicity and fire hazard suppression of epoxy resin," *J. Hazard. Mater.*, vol. 399, no. 5, p. 123015, 2020, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123015.



Capítulo III:
CNT-PEI

Síntesis, caracterización
y aplicaciones analíticas

*Sensor para la detección de la recaptación de
dopamina en Sistema Nervioso Central*



III-1. Introducción

Tal como fue descrito en el **capítulo I**, desde su descubrimiento, los nanotubos de carbono (CNT) han atraído gran interés en su investigación debido a la excelente conductividad eléctrica, resistencia mecánica, estabilidad química, entre otras propiedades que presentan. Se han realizado esfuerzos significativos para la aplicación de CNT en sensores electroquímicos debido a su excelente biocompatibilidad y capacidad de transferencia de electrones [1]. Los CNT se han empleado intensamente para el desarrollo de sensores electroquímicos y se han aplicado para la detección de una gran variedad de biomoléculas [2-4]. Sin embargo, a pesar de sus formidables propiedades, el uso de CNT para el desarrollo de sensores electroquímicos presenta el gran problema de su insolubilidad en solventes comunes debido a las fuerzas de van der Waals y las interacciones π - π que producen el agregado de las nanoestructuras. Por lo tanto, se han propuesto varias estrategias para la inmovilización de CNT en transductores electroquímicos, mediante la modificación tanto covalente como no covalente [4-6]. Entre ellas, la funcionalización no covalente se ha utilizado ampliamente debido a que no perturba la estructura electrónica única de los nanotubos de carbono. A lo largo de los años diversos polímeros [7-9] han permitido la exitosa dispersión de CNT principalmente por efecto *wrapping* o enrollamiento sobre la nanoestructura [10] tal como muestra la **figura III-1**, a fin de producir cambios superficiales que promuevan una mayor hidrofiliidad.

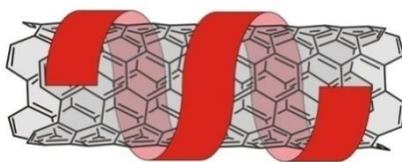


Figura III-1. *Funcionalización no covalente de CNT por efecto wrapping con polímeros.*

Dentro de la gran variedad de polímeros existentes, la polietilenimina (PEI) es un polímero rico en grupos amino y posee una alta solubilidad en

agua [11,12]. Por tal motivo, ya sea lineal o ramificada (figura III-2), se ha usado ampliamente para modificar la superficie de diversos nanomateriales [13]. La gran cantidad de grupos amino que presenta en su estructura le confieren al material híbrido resultante una mayor solubilidad debido a la carga superficial aportada por el polímero y a la posibilidad de construir estructuras supramoleculares autoensambladas por interacciones electrostáticas [14].

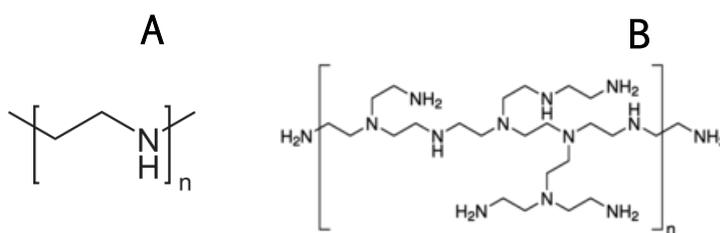


Figura III-2. Estructura de PEI (A) lineal y (B) ramificada.

En el año 2008 se reportó el empleo exitoso del nanohíbrido, formado a partir de CNT y PEI, para la cuantificación de dopamina (DA) en presencia de interferentes comúnmente encontrados en el sistema nervioso central (SNC), tales como serotonina y ácido ascórbico [15]. Por lo tanto, CNT-PEI se considera un compuesto que podría resultar útil para la cuantificación de los cambios de la recaptación de DA en SNC.

En este capítulo se presenta una metodología de síntesis sencilla para la fabricación del nanohíbrido CNT-PEI, su posterior caracterización por FT-IR, SEM y electroquímica. Mediante experimentos amperométricos, se verificó que los límites de detección del sensor sean los adecuados para la cuantificación de los cambios en la recaptación de DA en SNC. Por último, la plataforma desarrollada fue utilizada para poner en evidencia los cambios en la recaptación *in vitro* del neurotransmisor en el núcleo estriado del SNC de animales de laboratorio. Este análisis se planteó en el marco de un trabajo cooperativo con el grupo de la Dra. Claudia Bregonzio, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas y el grupo de la Dra. Gabriela Paglini, del Instituto Mercedes y Martín Ferreyra, quienes buscaban

evidencias químicas de los estudios conductuales de los animales evaluados en sus respectivos laboratorios.

III-2. Sección experimental

III-2.1. Síntesis y caracterización de CNT-PEI

Para la síntesis del nanohíbrido se utilizaron nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) tipo *hollow* (NanoLab) de (30 ± 15) nm de diámetro y 1-5 μm de largo y una solución de polietilenimina (PEI) 50% P/V con peso molecular promedio 750000 (Sigma Aldrich). En un tubo eppendorf se pesó 1,0 mg de CNT y se le adicionó 1,00 mL de solución de PEI 1,0 mg/mL preparada en H_2O . La mezcla resultante fue sometida a acción ultrasónica mediante el empleo de una sonda (Sonics Materials vibra-cell) con una potencia del 50%. Es sabido que el tratamiento ultrasónico es el método más versátil y directo para la funcionalización de la superficie de nanomateriales de carbono con polímeros y otros materiales inorgánicos [4]. A fin de eliminar el material no funcionalizado, la dispersión obtenida fue centrifugada durante 5 min a 3000 rpm utilizando una centrifuga marca Orto Alresa, y el sobrenadante se utilizó para la posterior modificación de los electrodos.

Luego de acondicionar los electrodos de carbono vítreo (GCE), tal como se mencionó en el **capítulo II**, se depositaron 20 μL de la dispersión de CNT-PEI preparada sobre la superficie de los mismos y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta evaporación del solvente. Para la caracterización electroquímica de la plataforma obtenida se utilizó clorhidrato de dopamina (Sigma Aldrich) disuelta en *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40 preparado a partir de fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4) y fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) Biopack. Se utilizó una celda convencional de tres electrodos, la cual fue descrita en la **sección II-1.6.1**, y se utilizaron electrodos de carbono vítreo modificados con el nanohíbrido sintetizado, tal como fue descrito anteriormente, como electrodo de trabajo.

Para la caracterización espectroscópica por FT-IR y SEM se utilizó una pastilla de seleniuro de zinc y discos de carbono vítreo, respectivamente, sobre los cuales se depositó un dado volumen de la dispersión y se evaporó el solvente.

III-2.2. Cuantificación de dopamina en Sistema Nervioso Central

A fin de mantener vivo el tejido obtenido luego de sacrificar los animales, el mismo fue homogeneizado en *buffer* Krebs pH 7,40, el cual se compone de 124 mM NaCl, 3,00 mM de KCl, 1,24 mM de KH_2PO_4 , 2,50 mM de ClCa_2 , 1,30 mM de MgSO_4 , 26,00 mM NaHCO_3 y 10,00 mM de glucosa. Las muestras fueron burbujeadas con gas carbógeno constantemente y mantenidas a bajas temperaturas en baño de hielo hasta el momento de la medición.

Se emplearon alícuotas de las muestras de núcleo estriado de SNC, las cuales fueron introducidas sin modificación adicional en la celda electroquímica. Las medidas amperométricas para la evaluación de la recaptación de DA en SNC se llevaron a cabo utilizando *buffer* Krebs como electrolito soporte saturado con gas carbógeno a 37 °C. Se empleó una celda de vidrio convencional con recirculación exterior, como la que se muestra en la **figura III-3**, para mantener la temperatura a lo largo de todo el experimento fue empleado un baño termostatzado marca Thermo Scientific.



Figura III-3. Celda de vidrio con recirculación externa empleada para la cuantificación de los cambios en la recaptación de DA en muestras de SNC de animales de laboratorio.

III-3. Resultados y discusión

III-3.1. Caracterización espectroscópica y microscópica de CNT-PEI

La espectroscopia IR es una poderosa técnica a la hora de evaluar los grupos funcionales de cada componente presentes en una muestra. A fin de elucidar si la funcionalización no covalente de CNT con PEI fue exitosa se tomaron espectros infrarrojo de las diferentes muestras, los cuales se muestran en la **figura III-4**. El espectro de CNT (—) presenta una banda características alrededor de los 1648 cm^{-1} que da cuenta de la vibración del doble enlace C=C [16] presente en las láminas gráficas sp^2 que conforman el nanotubo de carbono.

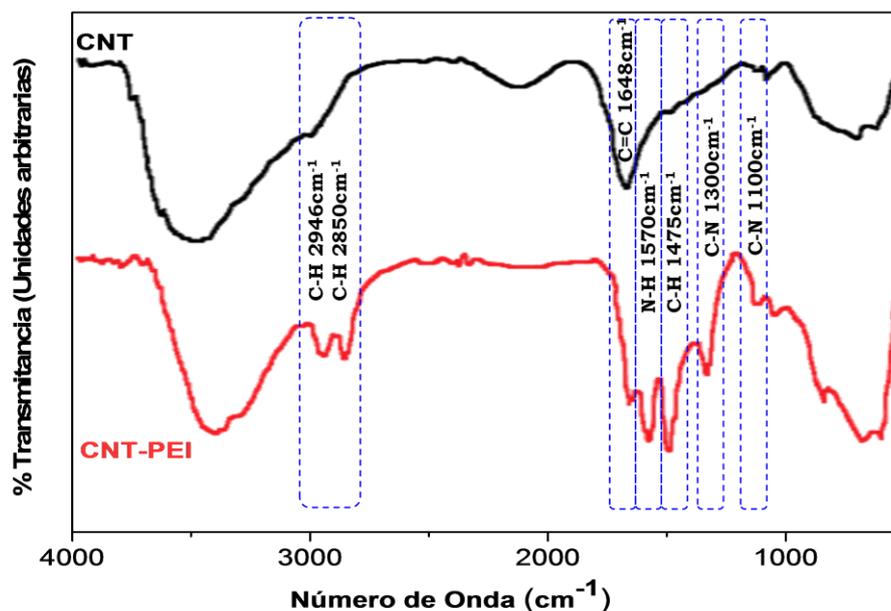


Figura III-4. Espectros FT-IR de CNT (—) y CNT-PEI (—).

Por otra parte, una vez sintetizado el nanohíbrido (—), el espectro obtenido exhibe nuevos picos, además de la banda asociada a la presencia de los nanotubos a los 1684 cm^{-1} . Se puede evidenciar la aparición de tres bandas, a 2946 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} [16-17], que se asocian a la vibración de tensión del enlace C-H y una banda a los 1475 cm^{-1} relacionada con la vibración de flexión de dicho enlace [18-19]. Estas tres bandas dan cuenta de la presencia de las cadenas alifáticas de la polietilenimina (**figura III-2**).

También se manifiesta una banda a 1570 cm^{-1} vinculada a la vibración de flexión del enlace N-H presente en el polímero que envuelve a las nanoestructuras de carbono, estos grupos son hidrofílicos y son los responsables de posibilitar la dispersión de los CNT en medios acuosos. Por otro lado, la vibración del estiramiento del enlace C-N se asocian con bandas que aparecen a 1300 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} [19], lo que nuevamente da cuenta de la exitosa funcionalización de CNT por parte del polímero.

Adicionalmente, se realizó una caracterización por microscopía electrónica de barrido. En la **figura III-5.A** y **III-5.B** se presentan las micrografías obtenidas para un disco de carbono vítreo sin modificar y un disco sobre el cual se inmovilizó un dado volumen de la dispersión CNT-PEI.

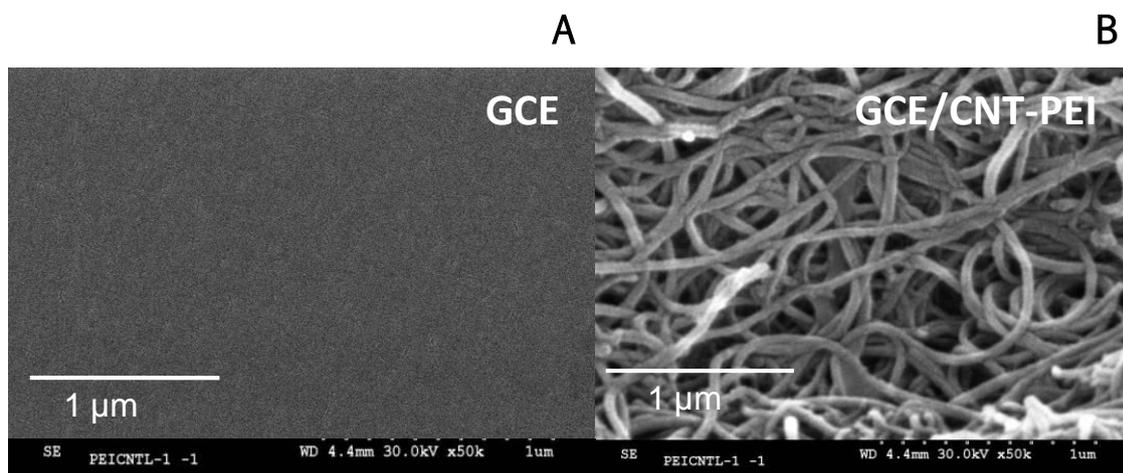


Figura III-5. Micrografías SEM de **(A)** GCE y **(B)** GCE/CNT-PEI. Magnificación 50000 X.

La micrografía de GCE muestra una imagen limpia producto del acondicionamiento de los discos de carbono vítreo. Por el contrario, en la **figura III-5.B** se evidencia la presencia del nanohíbrido que recubre de manera homogénea la totalidad de la superficie de los discos, revelando que los nanotubos se encuentran bien dispersos sin formar agregados, gracias a la exfoliación proporcionada por el ultrasonido y el *wrapping* del polímero.

III-3.2. Caracterización electroquímica de CNT-PEI

Se realizaron experimentos por voltamperometría cíclica para soluciones de DA $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre GCE pulido y modificados con el nanohíbrido sintetizado. En la **figura III-6** se muestran los voltamperogramas obtenidos.

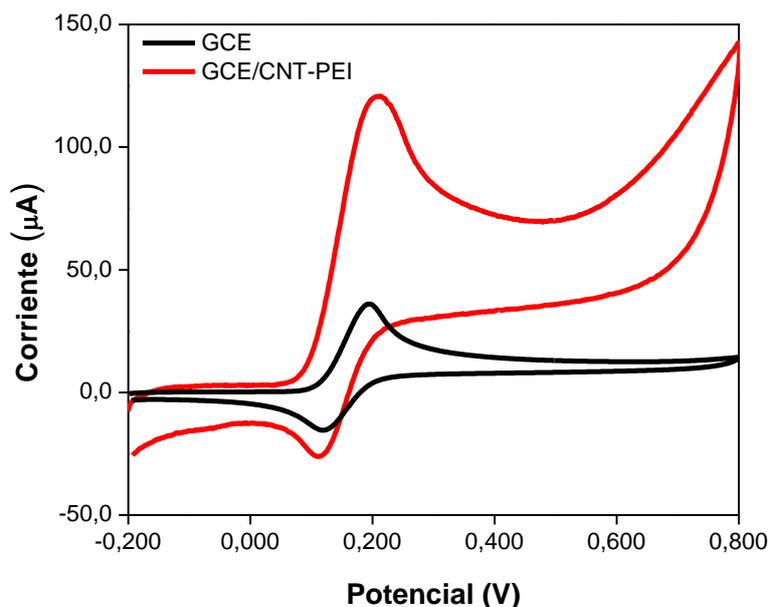


Figura III-6. Voltamperogramas cíclicos para una solución de DA $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre GCE (—) y GCE/CNT-PEI (—). Velocidad de barrido 0,100 V/s.

Se observa un marcado incremento de las corrientes asociadas a la oxido-reducción de DA cuando GCE es modificado con CNT-PEI respecto de GCE pulido. Este incremento de corriente se relaciona directamente con el aumento del área electroactiva por la presencia de la nanoestructura de carbono en la superficie de los electrodos. Por otra parte, cuando se analizan los potenciales requeridos para producir la oxidación de DA sobre ambas superficies, se observan valores de 0,235 V y 0,218 V para GCE y GCE/CNT-PEI respectivamente. Es importante resaltar el corrimiento a menores sobrepotenciales de oxidación cuando el nanohíbrido se encuentra inmovilizado sobre los electrodos, lo que implica un menor requerimiento energético para que se produzca el proceso de transferencia electrónica. Aún cuando el analito de interés y PEI poseen carga positiva al pH de trabajo, los

sobrepotenciales observados para la descarga de DA sobre GCE/CNT-PEI son menores, lo que da cuenta del excelente efecto electrocatalítico de CNT hacia la oxidación del neurotransmisor y de un marcado efecto sinérgico debido a la presencia del híbrido.

La mejor respuesta de la plataforma también fue evaluada mediante experimentos amperométricos, aplicando potenciales de 0,220 V y realizando un agregado de $5,0 \times 10^{-7}$ M de DA, tal como muestra la **figura III-7**.

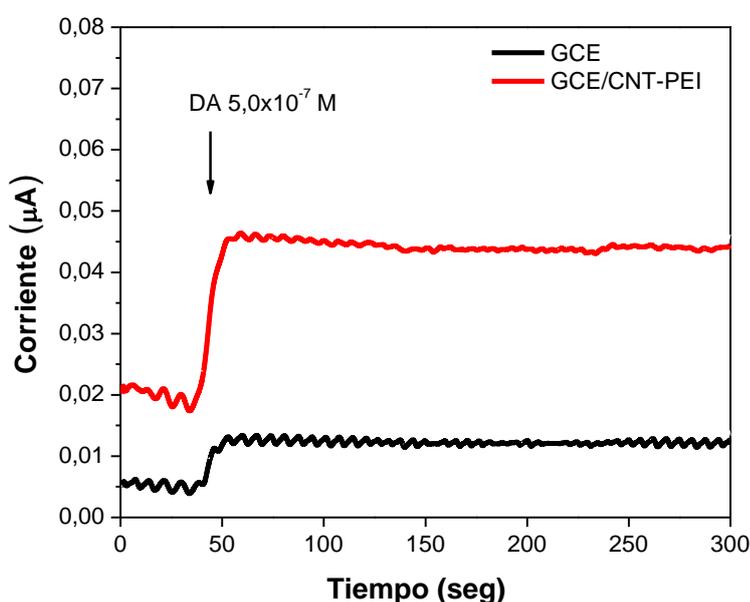


Figura III-7. Registro amperométrico para un agregado de DA $5,0 \times 10^{-7}$ M sobre GCE (—) y GCE/CNT-PEI (—). Potencial aplicado: 0,220 V.

Un análisis detallado de la respuesta amperométrica de la **figura III-7** muestra que para la plataforma GCE/CNT-PEI se obtienen corrientes 3,2 veces mayores que para GCE pulido, lo que nuevamente corrobora las mejoras en la sensibilidad dada por la presencia del nanohíbrido en la plataforma.

Por otra parte, es importante mencionar que DA, dada su estructura aromática suele adsorberse con facilidad en la superficie de los electrodos produciendo el envenenamiento y pasivación de los mismos. Tal como puede observarse en la **figura III-7**, luego del agregado del neurotransmisor, a medida que transcurre el tiempo la corriente sobre GCE/CNT-PEI se mantiene

constante, indicando que DA no se adsorbe en la superficie produciendo su pasivación. Este hecho puede ser explicado si se toma en cuenta que PEI (pKa= 8,60) es un polímero con múltiples cargas positivas capaces de producir una repulsión electrostática hacia DA (pKa= 8,93), cargada positivamente al pH de trabajo, impidiendo su adsorción en la superficie.

III-3.3. Parámetros analíticos del sensor

Mediante experimentos amperométricos se realizaron curvas de calibrado, a fin de verificar que el sensor desarrollado presente límites de detección aptos para la cuantificación de DA a nivel submicromolar ($5,0 \times 10^{-7}$ M), que son los valores normales encontrados en SNC [20,21].

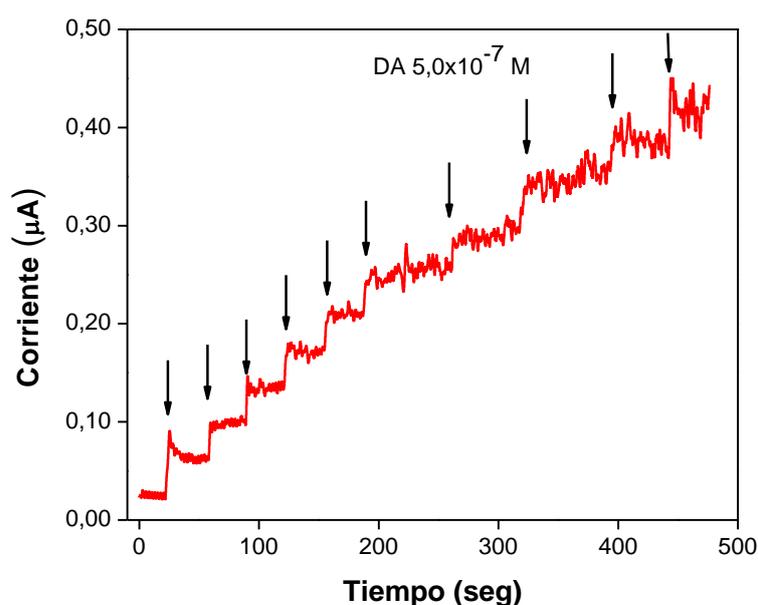


Figura III-8. Registro amperométrico para agregados sucesivos de DA $5,0 \times 10^{-7}$ M sobre GCE/CNT-PEI. Potencial aplicado: 0,220 V.

En la **figura III-8** se presenta un amperograma para agregados sucesivos de dopamina $5,0 \times 10^{-7}$ M sobre GCE/CNT-PEI, este experimento fue realizado por triplicado y los registros se utilizaron para la construcción de la curva de calibración correspondiente. De acuerdo a los parámetros analíticos obtenidos, los cuales se muestran en la **tabla III-1**, se puede observar una excelente

correlación lineal entre la concentración y la corriente obtenida, y por otro lado los bajos límites de detección exhibidos ($1,1 \times 10^{-7}$ M), que dan cuenta de la factibilidad de emplear la plataforma para cuantificar los cambios que se dan en la recaptación de dopamina en SNC.

Tabla III-1. *Parámetros analíticos para la cuantificación de dopamina.*

<i>r</i>	0,995
<i>Sensibilidad</i> ($\mu A/M$)	$(75 \pm 1) \times 10^8$
<i>LOD</i> (M)	$1,1 \times 10^{-7}$
<i>LOQ</i> (M)	$3,2 \times 10^{-7}$
<i>SD</i>	0,01
<i>Rango lineal</i> (M)	Desde $3,2 \times 10^{-7}$ Hasta $5,0 \times 10^{-6}$

III-4. Aplicaciones analíticas

El neurotransmisor Dopamina, fue inicialmente identificado como un precursor de la síntesis de adrenalina y noradrenalina a partir de L-tirosina. Sin embargo, los trabajos de Carlson y colaboradores [22,23] en la segunda mitad de la década de 1950, demostraron que DA no era sólo un intermediario metabólico en la síntesis de las catecolaminas sino que podía funcionar como un neurotransmisor por sí mismo.

En la actualidad, es sabido que DA es uno de los neurotransmisores moduladores más importantes en el cerebro de los mamíferos. Tiene varias funciones fisiológicas en el sistema nervioso central [24], incluida la modulación del movimiento voluntario, la recompensa, la regulación del sueño, la alimentación, el afecto, la atención, la función cognitiva y el olfato [25,26]. Todos estos procesos implican la puesta en marcha de un gran número de circuitos y núcleos neuronales, y la participación de una amplia gama de receptores celulares, vías de señalización y del funcionamiento de múltiples moléculas relacionadas con la normal transmisión sináptica. Para cumplir con todas estas funciones, hay once poblaciones de neuronas dopaminérgicas distribuidas en el SNC [24]. Consecuentemente, no es raro esperar que una

función dopaminérgica anormal esté implicada en diversas enfermedades y trastornos [27] como la enfermedad de Parkinson [28], enfermedad de Alzheimer [29], esquizofrenia [30], adicción [31], trastorno bipolar [32] y trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) [33]. Por lo tanto, una comprensión detallada de la neurotransmisión dopaminérgica puede proporcionar acceso a nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades [34].

La biosíntesis de DA parte de tirosina, en la cual el paso determinante de la velocidad de la síntesis es su conversión a L-DOPA por la tirosina hidroxilasa. A continuación, la L-DOPA se convierte rápidamente en DA mediante la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos y la misma es concentrada en vesículas por acción del transportador vesicular de monoamina en el terminal presináptico [35]. Posteriormente, la liberación sináptica de las reservas vesiculares da como resultado una alta concentración local de DA en el espacio extracelular que se elimina a través de la recaptación por el transportador correspondiente asociado a la membrana plasmática [36], el cual regula tanto la duración, como la intensidad de la transmisión sináptica. Por lo tanto, el transportador de membrana y el transportador vesicular de monoamina actúan en consonancia para mover el transmisor de manera eficiente por toda la neurona.

Es importante destacar que, se ha asociado una anormal plasticidad en los mecanismos de recompensa mediados por DA, han sido fuertemente asociados a procesos de adicción y abuso de drogas, además, es conocido que todas las drogas de abuso aumentan de manera directa o indirecta la liberación de DA [35,37,38]. Por tal motivo, experimentos con drogas de abuso son ampliamente utilizados como modelo para el estudio de diversas patologías asociadas a la neurotransmisión dopaminérgica.

Los psicoestimulantes actúan al inhibir la remoción de dopamina del espacio sináptico, produciendo un incremento de ésta en la cavidad sináptica (figura III-9). A su vez, el transportador de DA es el responsable de reciclar el neurotransmisor que reingresa a la célula y puede producir acumulación de la

catecolamina en el citosol neuronal que desencadena el estrés oxidativo y la neurotoxicidad, lo que sugiere que la compartimentalización adecuada de la dopamina es crítica para el correcto funcionamiento neuronal y el riesgo de padecer diversas enfermedades [36].

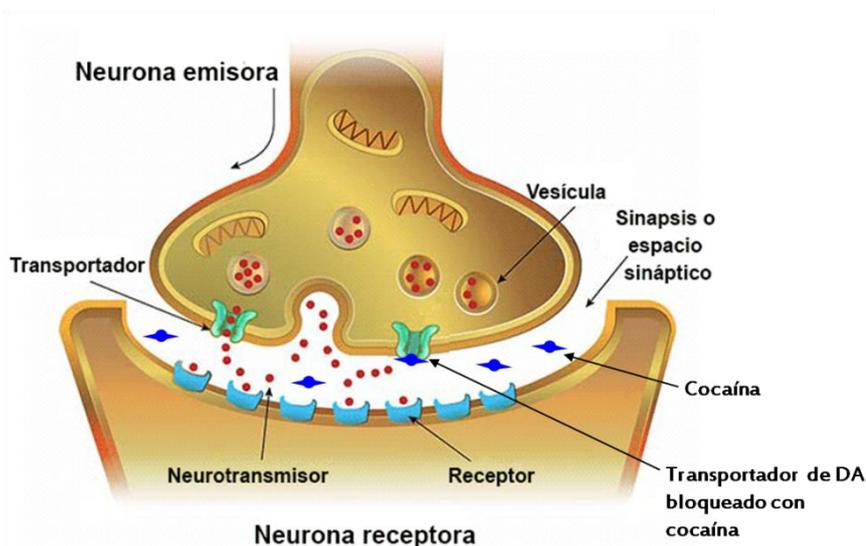


Figura III-9. *Proceso de transducción sináptica. Liberación de DA al espacio extracelular y recaptación de la misma impedida por bloqueo del transportador con psicoestimulantes.*

Por otra parte, un creciente número de estudios ha aclarado la participación del sistema angiotensínico en diversas enfermedades neuropsiquiátricas, incluidas las enfermedades de Alzheimer y Parkinson [39,40]. Por ejemplo, losartán, un fármaco bloqueador del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1), es capaz de prevenir y revertir los efectos cerebrovasculares, neuropatológicos y cognitivos en un modelo de enfermedad de Alzheimer [41]. Tales efectos también se han demostrado en modelos animales con adicción utilizando candesartán, un químico inhibidor de AT1 [42]. En consecuencia, los agentes bloqueadores del receptor de angiotensina, fármacos ampliamente utilizados para tratar trastornos cardiovasculares y metabólicos, son excelentes candidatos para su reutilización en el tratamiento de trastornos cerebrales [39].

Como se mencionó con anterioridad, la desregulación de la señalización de DA está asociada con trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos y numerosas proteínas están involucradas en el correcto funcionamiento del sistema dopaminérgico. Cdk5 es una proteína muy importante para el funcionamiento del sistema nervioso central debido a la gran cantidad de funciones y procesos en los que interviene. En estado monomérico no presenta actividad catalítica y requiere de la unión de un cofactor regulador (p35) para su activación [43,44]. Múltiples evidencias indican que Cdk5 participa en la exocitosis y endocitosis de vesículas sinápticas [45]. Además, Cdk5 es un importante regulador de la función dopaminérgica en neuronas presinápticas, donde participa en la liberación y síntesis de DA [46] y por otro lado, juega un rol fundamental en la señalización del neurotransmisor en las neuronas postsinápticas regulando la función de los receptores.

Investigadores de áreas como la neurobiología y neurofarmacología han medido la liberación y la absorción de DA en neuronas dopaminérgicas desde la década de 1960. Sin embargo, los estudios se han realizado en gran medida en cursos de tiempo mucho más largos que el del funcionamiento fisiológico de una célula nerviosa que es de milisegundos [47]. Además, las técnicas empleadas son engorrosas de realizar, utilizan DA marcada radiactivamente y están limitadas a largos tiempos de estudio.

En 1976, Adams y colaboradores [48] sugirieron la oxidación de monoaminas como reacción modelo para la detección de los principales neurotransmisores. Desde entonces, las catecolaminas fácilmente electrooxidables, como la dopamina y la noradrenalina, se han medido ampliamente con diversos métodos electroanalíticos tanto *in vivo* [49] como *in vitro* [50]. Para medir los neurotransmisores en los sistemas biológicos, los electrodos deben ser sensibles, selectivos, de rápida respuesta y biocompatibles. En ese aspecto, la modificación de la superficie del electrodo puede proporcionar oportunidades para cumplir con los requisitos mencionados anteriormente. Por lo tanto, se ha hecho un gran esfuerzo para modificar los

electrodos en términos de materiales y formas para la medición eficiente de neurotransmisores [51].

III-4.1. Evaluación de la recaptación de DA en SNC

III-4.1.1. Estrategia de cuantificación de la recaptación de DA

En la **figura III-10** se presenta la respuesta amperométrica sobre GCE/CNT-PEI, de DA $5,0 \times 10^{-7}$ M, en ausencia (**A**) y presencia (**B**) del tejido obtenido del núcleo estriado de animales control de laboratorio. Tal como puede observarse, al cabo de 300 segundos el Δi se mantiene constante en ausencia del tejido (**figura III-10.A**) mientras que en presencia de tejido $\Delta i_{\text{inicial}} > \Delta i_{\text{final}}$ (**figura III-10.B**) como consecuencia de la recaptación de DA por parte de los receptores presentes en el tejido de SNC.

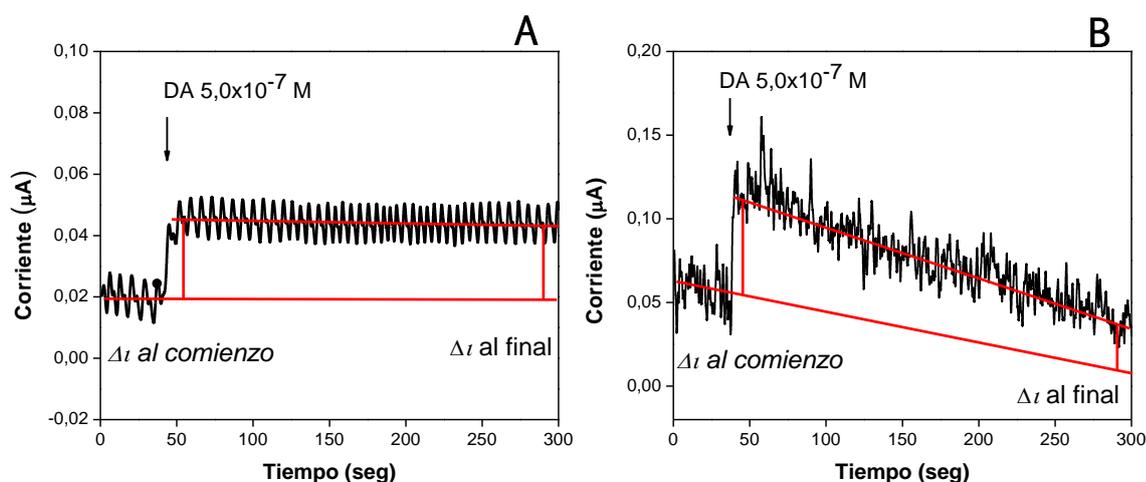


Figura III-10. Amperograma para un agregado de DA $5,0 \times 10^{-7}$ M sobre GCE/CNT-PEI en (A) ausencia y (B) presencia de tejido estriado de SNC de animales control. Potencial aplicado: 0,220 V.

Tal como fue mencionado con anterioridad, la presencia del nanohíbrido CNT-PEI sobre GCE evita la pasivación superficial, consecuentemente, el valor de la corriente obtenida a 0,220 V luego del agregado de DA a la celda electroquímica se mantiene constante durante el tiempo de análisis. En función de este hecho y a los fines analíticos, los cambios en la recaptación de DA,

en el medio de análisis, que se traducen en el cambio de la corriente inicial ($\Delta i_{inicial}$) respecto de la medida luego de 300 segundos del agregado de DA $5,0 \times 10^{-7}$ M a la celda (Δi_{final}), se tomaron como indicador para conocer los porcentajes de su recaptación.

Para fines analíticos, los cambios producidos por la recaptación de dopamina del medio, se cuantificaron como el porcentaje de caída de la respuesta en corriente según la ecuación:

$$\% \text{ de caída de la respuesta} = \left(\frac{\Delta i_{inicial} - \Delta i_{final}}{\Delta i_{inicial}} \right) 100\% \quad \text{Ecuación III-1}$$

III-4.1.2. Pretratamiento del tejido de SNC

Como fue mencionado en la **sección III-2.2**, es crucial mantener el tejido viable para evaluar la recaptación del neurotransmisor por parte del mismo y por otra parte, es importante tratar de exponer la mayor cantidad de receptores celulares al seno de la solución, de manera de recaptar la mayor cantidad de dopamina posible. Para lograr ambos cometidos, se evaluaron tres metodologías de pretratamiento de las muestras utilizando tejido de animales sanos y sin ningún tratamiento previo.

En la **figura III-11** se presentan los amperogramas obtenidos para agregados de DA $5,0 \times 10^{-7}$ M en ausencia de tejido (**—**), y en presencia de tejido pretratado con tres metodologías diferentes: cortando el tejido en pequeñas porciones mediante el empleo de un bisturí (**figura III-11.A**), mortereando el tejido para homogeneizarlo (**figura III-11.B**) y sonicando el tejido (**figura III-11.C**).

Mediante el estudio de los resultados obtenidos utilizando la **ecuación III-1**, se obtuvieron porcentajes de caída en la respuesta de DA del $(23 \pm 1) \%$, $(31 \pm 2) \%$ y $(2,1 \pm 0,7) \%$ cuando el tejido fue cortado, mortereado u homogeneizado y sonicado, respectivamente. Estos resultados indican que el proceso de sonicado produce, probablemente, la muerte del tejido y en consecuencia la pérdida de actividad de los receptores debido a que la

recaptación observada es muy pequeña. Por otro lado, los mayores porcentajes de recaptación de DA obtenida cuando el tejido es mortereado, en comparación con los observados cuando es cortado, pueden explicarse, si se considera que al morterear el tejido queda una mayor cantidad de receptores expuestos al seno de la solución. De esta manera, dicho pretratamiento es seleccionado para evaluar los posibles cambios en la recaptación de DA de animales con diferentes patologías.

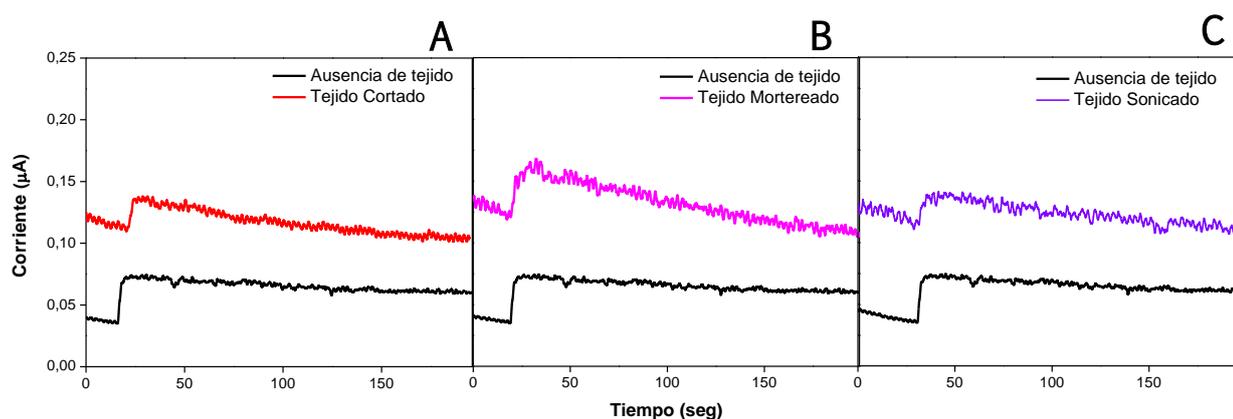


Figura III-11. Amperogramas para agregados de DA $5,0 \times 10^{-7} M$ en ausencia de tejido (—), en presencia de tres tipos de pretratamiento (A) cortado (—), (B) mortereado u homogeneizado (—) y (C) sonicado (—). Potencial aplicado: 0,220V

III-4.2. Evaluación del efecto de la utilización de candesartan en la recaptación de dopamina en tejido estriado de SNC

Es conocido que el desarrollo de nuevos fármacos conlleva un largo camino hasta la aprobación por parte de los organismos competentes [52].

Como se mencionó con anterioridad, ciertos fármacos ampliamente aceptados y con seguridad clínica probada, para el tratamiento de otras patologías y han demostrado ser promisorios en el tratamiento de determinados trastornos cerebrales [41,42].

Las enfermedades cardiovasculares y, la hipertensión en particular, son las principales causas que ponen en riesgos la vida en todo el mundo y la mejora en su tratamiento será beneficiosa para la salud humana. El

candesartan es un medicamento ejemplo de ello y es ampliamente utilizado para tratar estas afecciones. El mismo actúa sobre el sistema angiotensínico al bloquear la hormona angiotensina II que ejerce efectos perjudiciales en estados cardiovasculares patológicos [53].

Los receptores de angiotensina y DA se encuentran próximos en las neuronas. Informes anteriores sugieren que una disminución en la actividad dopaminérgica puede inducir una regulación positiva compensatoria de la función angiotensínica y viceversa. Por lo tanto, la inhibición de esta última función podría ser una estrategia neuroprotectora efectiva contra el déficit dopaminérgico en diversos desórdenes cerebrales y podría conferir una mejoría clínica, especialmente de síntomas y cognición [40]. En ese sentido, Bregonzio y col. [42,54-56] desde hace años investigan las implicancias del bloqueo de los receptores AT1, mediante el empleo de candesartan, en el sistema dopaminérgico y su relación con diversas patologías neuronales, utilizando anfetaminas como modelo experimental.

A fin de evaluar cómo cambia la recaptación de DA en núcleo estriado, se trabajó con cuatro grupos de animales de laboratorio: a) sin tratamiento previo, b) tratados con candesartan, c) tratados con anfetaminas y posteriormente con solución salina o placebo y d) tratados con anfetamina y posteriormente con candesartan, de acuerdo al esquema que se muestra en la **figura III-12**.

En una primera instancia, se evaluó la recaptación de DA en animales sin pretratamiento previo. Se repitieron los ensayos en 5 animales diferentes, cada uno de ellos por triplicado y se obtuvieron porcentajes de caída de la señal promedio en este grupo de individuos del $(27 \pm 1) \%$, tal como se representa en la **figura III-13** con el grupo de experimentos en negro (●).

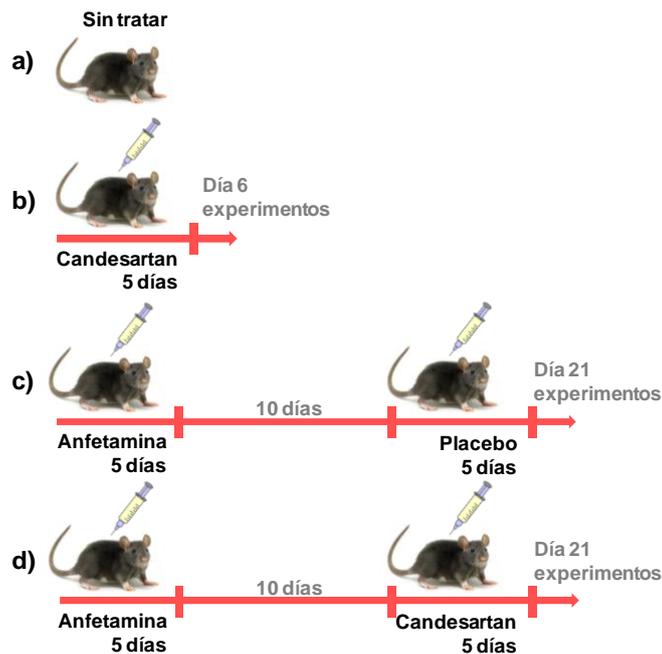


Figura III-12. Grupos de animales analizados: a) sin tratamiento previo, b) tratados con el candesartan, c) tratados con anfetaminas y posteriormente con solución salina y d) tratados con anfetamina y posteriormente con candesartan.

Cuando los animales fueron tratados con el fármaco durante los 5 días previos a la realización de los experimentos (b), se observó una mayor recaptación de DA presente en la celda por parte del tejido, lo que se traduce en un mayor porcentaje de caída en la señal amperométrica de DA (35 ± 2) %, tal como exhibe en el grupo de datos (●) de la **figura III-13**. De esta manera, se puede corroborar que, como se mencionó con anterioridad, al disminuir la función angiotensínica, candesartan induce un aumento de la función dopaminérgica. De manera de evaluar el efectivo bloqueo de los transportadores de dopamina producido por los psicoestimulantes, en la celda electroquímica conteniendo el tejido nervioso se adicionó una dada concentración de anfetamina, se dejó interaccionar con el tejido y se procedió posteriormente con el experimento electroquímico. Los resultados (●) demuestran menores porcentajes de decaimiento de la señal, siendo el promedio de ($15,9 \pm 0,4$) %, lo que sugiere el bloqueo efectivo del transportador de dopamina por parte de la droga de abuso empleada, puesta en contacto *in vitro* con el tejido.

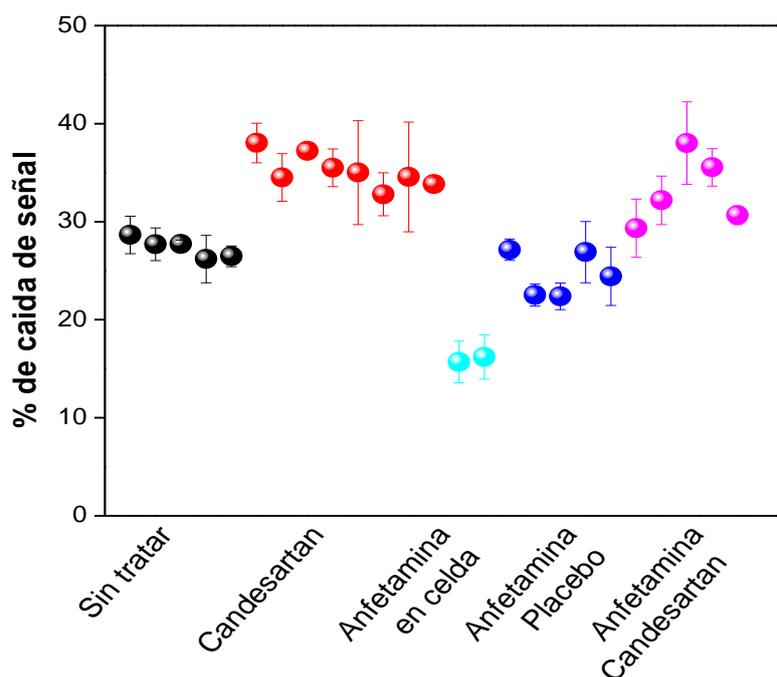


Figura III-13. Porcentaje de caída de la respuesta debida a la recaptación de DA por parte del tejido de animales: sin tratar (●), tratados con el candesartan (●), sin tratar con agregado de anfetamina en celda (●), tratados con anfetaminas y posteriormente con solución salina (●) y tratados con anfetamina y posteriormente con candesartan (●). Datos obtenidos a partir de experimentos amperométricos realizados a 0,220V calculados a partir de la **ecuación III-1**. Esquema experimental como el descrito en la **figura III-12**.

Una vez corroborado el bloqueo del transportador de DA por parte de las anfetaminas, se evaluaron los tejidos de animales tratados según el esquema c) de la **figura III-12**. Se obtuvieron porcentajes de recaptación de $(24 \pm 2) \%$ (grupo de animales (●) en la gráfica). Los valores encontrados son en promedio inferiores a los hallados para animales sin tratamiento alguno, lo que evidencia el bloqueo de los transportadores cuando se administra la droga *in vivo* y posteriormente se administra solución salina como placebo.

La recaptación de dopamina, aumenta de manera considerable cuando a los ratones tratados con anfetaminas, se les administra posteriormente candesartan ((●) **figura III-13**), obteniéndose valores promedio de recaptación de $(33 \pm 3) \%$. Estos resultados ponen de manifiesto que el fármaco candesartan, normalmente empleado para tratar afecciones cardíacas, puede revertir el efecto producido por la administración de anfetaminas. Por otra parte, extrapolando estos resultados, cabe destacar que, el fármaco propuesto

podría ser potencialmente empleado para el tratamiento de los síntomas de ciertas afecciones neuronales, tales como la esquizofrenia o mal de Parkinson.

III-4.3. Evaluación de la falta de expresión de la proteína p35 en la función dopaminérgica de SNC

De acuerdo a lo expuesto con anterioridad, se cree que la falta de expresión de ciertas proteínas, como p35, desencadenan un desbalance del funcionamiento del sistema de neurotransmisión dopaminérgica. Diversos reportes bibliográficos indican que Cdk5, proteína que requiere ser activada por p35, funciona como un modulador esencial de transmisión sináptica [45]. De hecho, el complejo de señalización Cdk5/p35 participa en múltiples procesos durante el desarrollo típico del cerebro, incluida la migración neuronal y la formación de axones y dendritas, así como también en el aprendizaje asociativo y la memoria en roedores adultos [44]. Por otra parte, se cree que la incorrecta activación del complejo Cdk5 se encuentra íntimamente relacionada con la posibilidad de producir, en estadíos tempranos del desarrollo, patogénesis de trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH). Paglini y col. [43,44,57] han estudiado a lo largo de los años, por diversas metodologías y ensayos conductuales, los efectos de la falta de expresión de p35 en diversas patologías neurológicas y psiquiátricas. Más recientemente, se interesaron en evaluar si la falta de dicha proteína se relaciona con la presencia de una menor cantidad de transportadores de dopamina en neuronas dopaminérgicas y su relación con el desarrollo de patologías tipo TDAH.

A tal fin, en este trabajo de Tesis, se realizaron estudios amperométricos para evaluar cómo se ve afectada la recaptación de DA de dos grupos de animales: sin modificación genética, en primera instancia, y por otro lado animales modificados genéticamente que no expresan p35 y consecuentemente no producen la activación de Cdk5. Se evaluaron cuatro animales de cada grupo y cada uno de ellos se ensayó por duplicado. En la

figura III-14 se muestra la caída porcentual de la respuesta en corriente para ambos grupos de animales, obtenidos con la ecuación III-1.

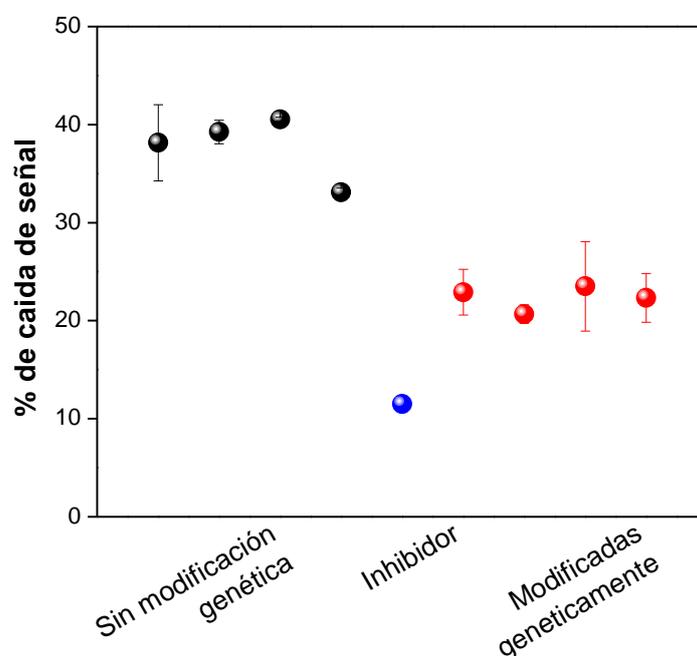


Figura III-14. Porcentaje de caída de la respuesta debida a la recaptación de DA por parte del tejido de animales: sin modificación genética (●), con agregado de inhibidor en celda (●) y modificados genéticamente (●). Datos obtenidos a partir de experimentos amperométricos realizados a 0,220V calculados a partir de la ecuación III-1.

Para el grupo de animales sin modificación genética (●) se obtuvieron porcentajes de recaptación de DA de $(38 \pm 2) \%$. A fin de poner de manifiesto la presencia del transportador y el funcionamiento del mismo, se realizaron ensayos incubando en la celda durante un dado tiempo el tejido de animales no modificados con un inhibidor capaz de bloquear los transportadores de dopamina (●) y se obtuvieron, tal como se esperaba, menores porcentajes promedio de recaptación de dopamina $((11,5 \pm 0,8) \%)$ debido al bloqueo del transportador.

Por último, cuando se analizaron los tejidos de animales modificados de manera tal de no expresar p35 (●), se obtuvieron menores porcentajes promedio de decaimiento de la señal analítica, $(22 \pm 1) \%$, es decir una

menor recaptación del neurotransmisor, en comparación a lo observado para animales que no fueron modificados genéticamente. Este hecho pone de manifiesto que efectivamente p35 y la posterior activación de Cdk5, se relaciona directamente con la cantidad de transportadores presentes en la superficie de las neuronas dopaminérgicas y que además, la metodología electroquímica utilizada es sumamente apta para la detección propuesta.

III-5. Conclusiones parciales

En este capítulo se presentó la síntesis de un nanomaterial híbrido a partir de dos componentes obtenidos comercialmente, nanotubos de carbono de pared múltiple y polietilenimina de alto peso molecular.

Mediante caracterización por FT-IR y SEM se verificó la exitosa funcionalización no covalente de las nanoestructuras de carbono por parte del polímero, lo que resulta en una dispersión homogénea de las mismas. Una posterior caracterización por voltamperometría cíclica corroboró el excelente efecto electrocatalítico de la plataforma GCE/CNT-PEI hacia la oxidación del neurotransmisor DA.

La cuantificación de DA a niveles submicromolares fue posible gracias a la excelente exfoliación de CNT por parte de PEI que permitió la obtención de dispersiones coloidales estables, las cuales inmovilizadas sobre GCE generaron un gran incremento del área electroactiva.

Además, experimentos amperométricos para agregados de DA, descartaron el posible envenenamiento de la superficie de los electrodos, debido a la carga superficial positiva que presenta el nanohíbrido por la presencia del polímero, impidiendo su adsorción en la superficie. De esta manera, GCE/CNT-PEI representa una plataforma útil para la cuantificación de los cambios en la recaptación de DA en niveles submicromolares sin efecto de pasivación de la superficie.

El sensor desarrollado fue capaz de discriminar exitosamente cambios en la recaptación de DA en muestras reales de núcleo estriado de Sistema Nervioso Central de animales de laboratorio. La plataforma propuesta permitió evaluar los cambios en la recaptación de DA en los diferentes grupos de animales, así como también el efecto inhibitorio del fármaco candesartan en el procesos de neurotransmisión dopaminérgica. Otro aspecto de gran interés, es que fue posible evaluar la relación estrecha entre la falta de expresión de ciertas proteínas con los procesos recaptación de DA. Estos resultados representan un significativo aporte para la mejor comprensión del sistema dopaminérgico y sus implicancias en el desarrollo de ciertas patología cerebrales, mediante la utilización de una metodología *in vitro*, sencilla, rápida y económica.

III-6. Bibliografía

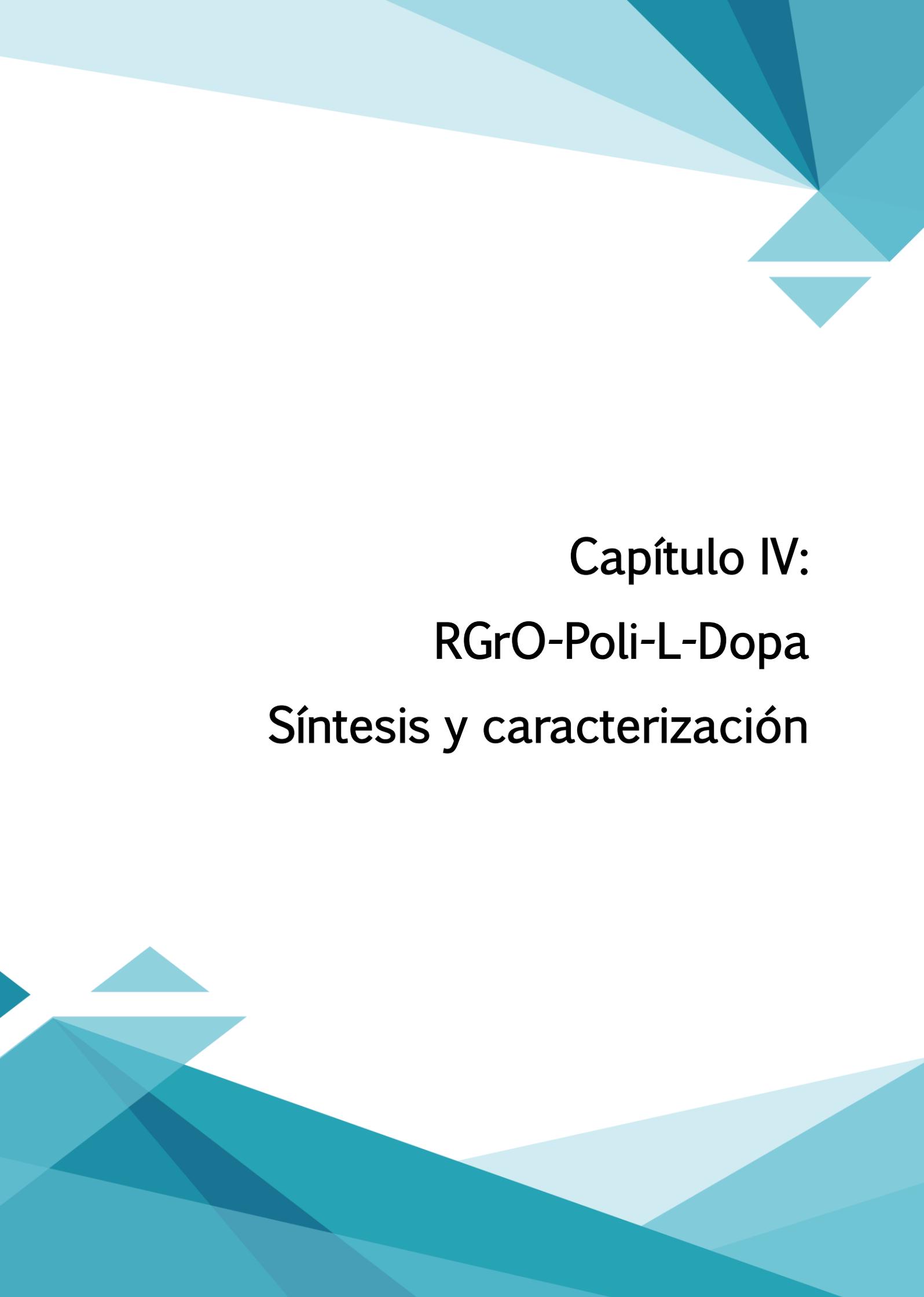
- [1] H. Jeong and S. Jeon, "Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid by nafion and single-walled carbon nanotube film modified on carbon fiber microelectrode," *Sensors*, vol. 8, no. 11, pp. 6924–6935, 2008, doi: 10.3390/s8116924.
- [2] G. A. Rivas *et al.*, "Carbon nanotubes-based electrochemical (bio)sensors for biomarkers," *Appl. Mater. Today*, vol. 9, pp. 566–588, 2017, doi: 10.1016/j.apmt.2017.10.005.
- [3] J. N. Tiwari, V. Vij, K. C. Kemp, and K. S. Kim, "Engineered carbon-nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules," *ACS Nano*, vol. 10, no. 1, pp. 46–80, 2016, doi: 10.1021/acsnano.5b05690.
- [4] S. Velmurugan, S. Palanisamy, T. C-K Yang, M. Gochoo, and S. W. Chen, "Ultrasonic assisted functionalization of MWCNT and synergistic electrocatalytic effect of nano-hydroxyapatite incorporated MWCNT-chitosan scaffolds for sensing of nitrofurantoin," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 62, no. 11, p. 104863, 2020, doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.104863.
- [5] A. Kashyap, N. P. Singh, S. Arora, V. Singh, and V. K. Gupta, "Effect of amino-functionalization of MWCNTs on the mechanical and thermal properties of MWCNTs/epoxy composites," *Bull. Mater. Sci.*, vol. 43, no. 1, 2020, doi: 10.1007/s12034-019-2012-0.
- [6] P. A. Gallay, M. D. Rubianes, F. A. Gutierrez, and G. A. Rivas, "Avidin and Glucose Oxidase-non-covalently Functionalized Multi-walled Carbon Nanotubes: A New Analytical Tool for Building a Bionzymatic Glucose Biosensor," *Electroanalysis*, vol. 31, no. 10, pp. 1888–1894, 2019, doi: 10.1002/elan.201900202.
- [7] S. A. Bekmezci, S. Soylemez, G. Yilmaz, Y. A. Udum, Y. Yagci, and L. Toppare, "A new ethanol biosensor based on polyfluorene-g-poly(ethylene glycol) and multiwalled carbon nanotubes," *Eur. Polym. J.*, vol. 122, no. 7, p. 109300, 2020, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109300.
- [8] N. Baig, M. Sajid, and T. A. Saleh, "Recent trends in nanomaterial-modified electrodes for electroanalytical applications," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 111, pp. 47–61, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2018.11.044.
- [9] D. Meng, J. Fan, J. Ma, S. W. Du, and J. Geng, "The preparation and functional applications of carbon nanomaterial/conjugated polymer composites," *Compos. Commun.*, vol. 12, no. 11, pp. 64–73, 2019, doi: 10.1016/j.coco.2018.12.009.
- [10] E. N. Primo *et al.*, "Comparative study of the electrochemical behavior and analytical applications of (bio)sensing platforms based on the use of multi-walled carbon nanotubes dispersed in different polymers," *Anal. Chim. Acta*, vol. 805, pp. 19–35, 2013, doi: 10.1016/j.aca.2013.10.039.
- [11] X. Huang, M. Liu, X. Liu, Q. Liu, and X. Chen, "Polyethyleneimine Functionalized Multi-walled Carbon Nanotubes-Based Solid Phase Extraction for Selective Screening of Carboxylic Acid Compounds in Natural Products," *Chromatographia*, vol. 82, no. 7, pp. 1017–1027, 2019, doi: 10.1007/s10337-019-03737-6.

- [12] W. I. Riberi, L. V. Tarditto, M. A. Zon, F. J. Arévalo, and H. Fernández, "Development of an electrochemical immunosensor to determine zearalenone in maize using carbon screen printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes/polyethyleneimine dispersions," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 254, pp. 1271–1277, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2017.07.113.
- [13] L. Ma, L. Bai, M. Zhao, J. Zhou, Y. Chen, and Z. Mu, "An electrochemical aptasensor for highly sensitive detection of zearalenone based on PEI-MoS₂-MWCNTs nanocomposite for signal enhancement," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1060, pp. 71–78, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.02.012.
- [14] M. D. Rubianes and G. A. Rivas, "Dispersion of multi-wall carbon nanotubes in polyethylenimine: A new alternative for preparing electrochemical sensors," *Electrochem. commun.*, vol. 9, no. 3, pp. 480–484, 2007, doi: 10.1016/j.elecom.2006.08.057.
- [15] M. C. Rodríguez, M. D. Rubianes, and G. A. Rivas, "Highly selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and serotonin at glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 11, pp. 6003–6009, 2008, doi: 10.1166/jnn.2008.466.
- [16] X. Huang, M. Liu, X. Liu, Q. Liu and X. Chen, "Polyethyleneimine Functionalized Multi-walled Carbon Nanotubes-Based Solid Phase Extraction for Selective Screening of Carboxylic Acid Compounds in Natural Products," *Chromatographia*, vol. 82, pp. 1017–1027, 2019, doi: 10.1007/s10337-019-03737-6
- [17] A. H. Nia, A. Amini, S. Taghavi, H. Eshghi, K. Abnous, and M. Ramezani, "A facile Friedel-Crafts acylation for the synthesis of polyethyleneimine-grafted multi-walled carbon nanotubes as efficient gene delivery vectors," *Int. J. Pharm.*, vol. 502, no. 1–2, pp. 125–137, 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.034.
- [18] Y. Kuwahara, Y. Fujie, and H. Yamashita, "Poly(ethyleneimine)-tethered Ir Complex Catalyst Immobilized in Titanate Nanotubes for Hydrogenation of CO₂ to Formic Acid," *ChemCatChem*, vol. 9, no. 11, pp. 1906–1914, 2017, doi: 10.1002/cctc.201700508.
- [19] Z. Derikvandi, A. R. Abbasi, M. Roushani, Z. Derikvand, and A. Azadbakht, "Design of ultrasensitive bisphenol A–aptamer based on platinum nanoparticles loading to polyethyleneimine-functionalized carbon nanotubes," *Anal. Biochem.*, vol. 512, pp. 47–57, 2016, doi: 10.1016/j.ab.2016.06.007.
- [20] E. V. Mosharov *et al.*, "Interplay between Cytosolic Dopamine, Calcium, and α -Synuclein Causes Selective Death of Substantia Nigra Neurons," *Neuron*, vol. 62, no. 2, pp. 218–229, 2009, doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.033.
- [21] E. V. Mosharov *et al.*, " α -Synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 36, pp. 9304–9311, 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0519-06.2006.
- [22] A. Carlsson, M. Lindqvist and T. Magnusson, "3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists" *Nature*, vol. 180, pp. 1200, 1957.
- [23] A. Carlsson, M. Lindqvist, T. Magnusson and B. Waldeck, "On the Presence of 3-

- Hydroxytyramine in Brain” *Science*, vol. 127, pp. 471, 1958.
- [24] T. Fischer, P. Scheffler, and C. Lohr, “Dopamine-induced calcium signaling in olfactory bulb astrocytes,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-57462-4.
- [25] M. D. Iordanova, “Dopamine Signaling Is Critical for Supporting Cue-Driven Behavioral Control,” *Neuroscience*, vol. 412, pp. 257–258, 2019, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.05.002.
- [26] E. S. Bromberg-Martin, M. Matsumoto, and O. Hikosaka, “Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting,” *Neuron*, vol. 68, no. 5, pp. 815–834, 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.022.
- [27] N. Asad *et al.*, “Photoactivatable Dopamine and Sulpiride to Explore the Function of Dopaminergic Neurons and Circuits,” *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 11, no. 6, pp. 939–951, 2020, doi: 10.1021/acscchemneuro.9b00675.
- [28] D. J. Surmeier, S. M. Graves, and W. Shen, “Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson’s disease,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 29, pp. 109–117, 2014, doi: 10.1016/j.conb.2014.07.008.
- [29] A. Martorana and G. Koch, “Is dopamine involved in Alzheimer’s disease?,” *Front. Aging Neurosci.*, vol. 6, no. 9, pp. 1–6, 2014, doi: 10.3389/fnagi.2014.00252.
- [30] N. Chuhma, S. Mingote, A. Kalmbach, L. Yetnikoff, and S. Rayport, “Heterogeneity in Dopamine Neuron Synaptic Actions Across the Striatum and Its Relevance for Schizophrenia,” *Biol. Psychiatry*, vol. 81, no. 1, pp. 43–51, 2017, doi: 10.1016/j.biopsych.2016.07.002.
- [31] E. J. Nestler and C. Lüscher, “The Molecular Basis of Drug Addiction: Linking Epigenetic to Synaptic and Circuit Mechanisms,” *Neuron*, vol. 102, no. 1, pp. 48–59, 2019, doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.016.
- [32] D. A. Cousins, K. Butts, and A. H. Young, “The role of dopamine in bipolar disorder,” *Bipolar Disord.*, vol. 11, no. 8, pp. 787–806, 2009, doi: 10.1111/j.1399-5618.2009.00760.x.
- [33] F. A. Krapacher *et al.*, “Mice lacking p35 display hyperactivity and paradoxical response to psychostimulants,” *J. Neurochem.*, vol. 114, no. 1, pp. 203–214, 2010, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06748.x.
- [34] M. Gienger, H. Hübner, S. Löber, B. König, and P. Gmeiner, “Structure-based development of caged dopamine D2/D3 receptor antagonists,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-57770-9.
- [35] K. Ohira, “Dopamine as a growth differentiation factor in the mammalian brain,” *Neural Regen. Res.*, vol. 15, no. 3, pp. 390–393, 2020, doi: 10.4103/1673-5374.266052.
- [36] K. M. Lohr, S. T. Masoud, A. Salahpour, and G. W. Miller, “Membrane transporters as mediators of synaptic dopamine dynamics: implications for disease,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 45, no. 1, pp. 20–33, 2017, doi: 10.1111/ejn.13357.
- [37] D. Sulzer, “How Addictive Drugs Disrupt Presynaptic Dopamine

- Neurotransmission,” *Neuron*, vol. 69, no. 4, pp. 628–649, 2011, doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.010.
- [38] A. del P. Escobar, J. P. Casanova, M. E. Andrés, and J. A. Fuentealba, “Crosstalk Between Kappa Opioid and Dopamine Systems in Compulsive Behaviors,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, no. 2, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00057.
- [39] J. M. Saavedra, “Beneficial effects of Angiotensin II receptor blockers in brain disorders,” *Pharmacol. Res.*, vol. 125, pp. 91–103, 2017, doi: 10.1016/j.phrs.2017.06.017.
- [40] S. J. J. Oh and X. Fan, “The Possible Role of the Angiotensin System in the Pathophysiology of Schizophrenia: Implications for Pharmacotherapy,” *CNS Drugs*, vol. 33, no. 6, pp. 539–547, 2019, doi: 10.1007/s40263-019-00632-4.
- [41] B. Ongali *et al.*, “Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan prevents and rescues cerebrovascular, neuropathological and cognitive deficits in an Alzheimer’s disease model,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 68, pp. 126–136, 2014, doi: 10.1016/j.nbd.2014.04.018.
- [42] N. A. Marchese, V. B. Occhieppo, O. M. Basmadjian, B. S. Casarsa, G. Baiardi, and C. Bregonzio, “Angiotensin II modulates amphetamine-induced glial and brain vascular responses, and attention deficit via angiotensin type 1 receptor: Evidence from brain regional sensitivity to amphetamine,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 51, no. 4, pp. 1026–1041, 2020, doi: 10.1111/ejn.14605.
- [43] F. A. Krapacher *et al.*, “Mice lacking p35 display hyperactivity and paradoxical response to psychostimulants,” *J. Neurochem.*, vol. 114, no. 1, pp. 203–214, 2010, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06748.x.
- [44] S. Ferreras *et al.*, “Cdk5 is essential for amphetamine to increase dendritic spine density in hippocampal pyramidal neurons,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 11, no. 11, pp. 1–14, 2017, doi: 10.3389/fncel.2017.00372.
- [45] Z. H. Cheung, A. K. Y. Fu, and N. Y. Ip, “Synaptic Roles of Cdk5: Implications in Higher Cognitive Functions and Neurodegenerative Diseases,” *Neuron*, vol. 50, no. 1, pp. 13–18, 2006, doi: 10.1016/j.neuron.2006.02.024.
- [46] K. Chergui, P. Svenningsson, and P. Greengard, “Cyclin-dependent kinase 5 regulates dopaminergic and glutamatergic transmission in the striatum,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 7, pp. 2191–2196, 2004, doi: 10.1073/pnas.0308652100.
- [47] J. O. Schenk, T. A. Patterson, and J. S. McElvain, “Rotating disk voltammetric measurements in neurobiology and neuropharmacology,” *Trends Anal. Chem.*, vol. 9, no. 10, pp. 325–330, 1990, doi: 10.1016/0165-9936(90)85066-G.
- [48] R. N. Adams “Probing Brain Chemistry with Electroanalytical,” *Analytical Chemistry*, vol. 48, no. 14, pp. 1126–1138, 1976
- [49] J. M. Ehrich, P. E. M. Phillips, and C. Chavkin, “Kappa opioid receptor activation potentiates the cocaine-induced increase in evoked dopamine release recorded in vivo in the mouse nucleus accumbens,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 39, no. 13, pp. 3036–3048, 2014, doi: 10.1038/npp.2014.157.

- [50] S. M. Meiergerd and J. O. Schenk, "Kinetic Evaluation of the Commonality Between the Site(s) of Action of Cocaine and Some Other Structurally Similar and Dissimilar Inhibitors of the Striatal Transporter for Dopamine," *J. Neurochem.*, vol. 63, no. 5, pp. 1683-1692, 2002, doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.63051683.x.
- [51] J. Jeon, I. Hwang, and T. D. Chung, "Electrochemical detection of neurotransmitters: Toward synapse-based neural interfaces," *Biomed. Eng. Lett.*, vol. 6, no. 3, pp. 123-133, 2016, doi: 10.1007/s13534-016-0230-6.
- [52] Q. Liang *et al.*, "Immobilized angiotensin II type I receptor: A powerful method of high throughput screening for antihypertensive compound identification through binding interaction analysis," *J. Chromatogr. A*, p. 461003, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461003.
- [53] S. Kiriakidi, C. Chatzigiannis, C. Papaemmanouil, A. G. Tzakos, and T. Mavromoustakos, "Exploring the role of the membrane bilayer in the recognition of candesartan by its GPCR AT1 receptor," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1862, no. 3, p. 183142, 2020, doi: 10.1016/j.bbamem.2019.183142.
- [54] N. A. Marchese, E. A. De LaVillarmois, O. M. Basmadjian, M. F. Perez, G. Baiardi, and C. Bregonzio, "Brain Angiotensin II AT1 receptors are involved in the acute and long-term amphetamine-induced neurocognitive alterations," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 233, no. 5, pp. 795-807, 2016, doi: 10.1007/s00213-015-4153-1.
- [55] O. M. Basmadjian, V. B. Occchieppo, N. A. Marchese, G. Baiardi, C. Bregonzio, "Brain Angiotensin II Involvement in Chronic Mental Disorders," *Protein & Peptide Letters*, vol. 24, no. 9, pp. 817-826, 2016, doi: 10.2174/0929866524666170728144801
- [56] N. A. Marchese *et al.*, "Angiotensin II AT1 receptors mediate neuronal sensitization and sustained blood pressure response induced by a single injection of amphetamine," *Neuroscience*, vol. 340, pp. 521-529, 2017, doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.006.
- [57] E. A. Bignante, G. Paglini, and V. A. Molina, "Previous stress exposure enhances both anxiety-like behaviour and p35 levels in the basolateral amygdala complex: Modulation by midazolam," *Eur. Neuropsychopharmacol.*, vol. 20, no. 6, pp. 388-397, 2010, doi: 10.1016/j.euroneuro.2010.02.007.



Capítulo IV:
RGrO-Poli-L-Dopa
Síntesis y caracterización

IV-1. Introducción

El grafeno es uno de los nanoalótropos más interesantes de carbono, constituido por monocapas de carbono en dos dimensiones con enlaces híbridos sp^2 , cuyas propiedades eléctricas, ópticas, químicas, térmicas y mecánicas únicas no se manifiestan en ningún otro material [1,2].

El grafeno prístino es un material hidrofóbico, insoluble en los solventes comúnmente utilizados debido a que las láminas de grafeno tienden apilarse a través de interacciones $\pi - \pi$ [3]. Para satisfacer los requisitos en aplicaciones prácticas, tales como la biocompatibilidad e hidrofiliidad, entre otras, esta nanoestructura de carbono a menudo tiene que modificarse químicamente [4,5]. Para abordar este problema, se han desarrollado varios métodos químicos de forma tal de modificar las características superficiales y la estructura electrónica de las láminas de grafeno [6].

La modificación química del grafeno, tanto covalente como no covalente, es un enfoque eficaz para modificar la estructura y las propiedades del mismo [4,7]. Al unir selectivamente diversas moléculas o grupos funcionales en su superficie se pueden generar dispersiones coloidales en medios acuosos [8] y, a su misma vez, se pueden modular las propiedades ópticas, químicas y mecánicas de los materiales resultantes [9,10].

Dentro de las estrategias de funcionalización para producir materiales con mayor hidrofiliidad, la oxidación de grafito es una de las más importantes. El método de Hummers [11], seguido de exfoliación es una de las metodologías más empleadas para producir óxido de grafeno (GrO) a gran escala. Debido a la existencia de grupos oxigenados, GrO es un material más hidrofílico y puede dispersarse fácilmente en medios acuosos. Por otra parte, GrO también puede ser funcionalizado a través de reacciones químicas que involucran los grupos que contienen oxígeno. La estructura exacta de dicho material es difícil de definir con precisión, aunque el modelo de estructura más ampliamente aceptado para GrO ha sido propuesto por Lerf y Klinowski (figura IV-1) [12], en la cual los grupos epóxidos y oxidrilos se encuentran en

el plano basal de la lámina y los grupos carboxilo forman parte de los defectos de borde del grafeno.

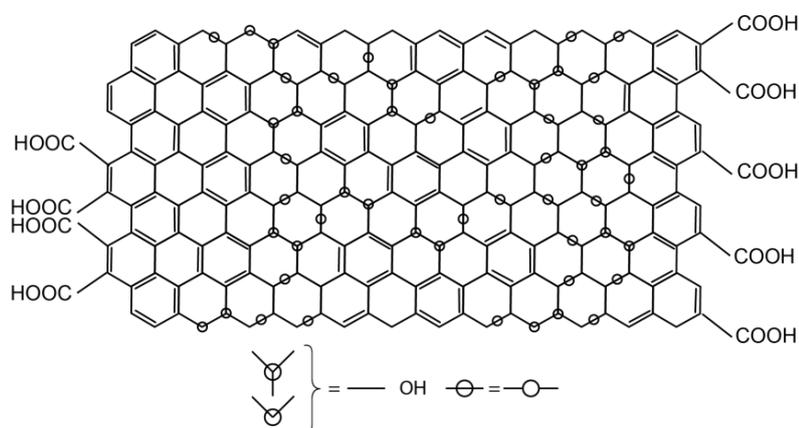


Figura IV-1. Estructura de óxido de grafeno propuesta por Lerf y Klinowski. Tomado de referencia [12].

El interés que generó este nanomaterial en los últimos años radica en que el mismo puede reducirse parcialmente a grafeno de manera tal de restaurar su conductividad [13,14] para ser posteriormente empleado en la construcción de celdas solares [15], supercapacitores [16], baterías [17], sensores electroquímicos [18,19], entre otros.

Los diferentes métodos de reducción tienen un efecto notable sobre la conductividad del óxido de grafeno reducido (RGrO) resultante [20]. Los agentes reductores de alta eficiencia más utilizados en la reducción química, generalmente, incluyen hidrazina y sus derivados [21], borohidruro de sodio [22], ácido yodhídrico (HI) [23], entre otros. La desventaja del uso de estos agentes reductores radica en que no sólo contaminan el medio ambiente, sino que también pueden dañar su estructura y consecuentemente, alterar las propiedades de la lámina de grafeno [24]. Por lo tanto, la sustitución de estos compuestos con reductores verdes, tales como ácido ascórbico [25], quitosano [21] y diversos azúcares [26] ha ganado un interés creciente en los últimos años.

La funcionalización no covalente del grafeno generalmente implica interacción de diversas especies con las láminas a través de apilamiento π - π , atracción hidrofóbica, puente hidrógeno o interacciones electrostáticas [26,28].

En general, los compuestos conjugados que tienen anillos poliaromáticos y grupos funcionales se unen a la red sp^2 de láminas de grafeno mediante apilamiento $\pi-\pi$, y los restos funcionales estabilizan las láminas sp^2 en el solvente y proporcionan nuevas funcionalidades al grafeno. También pueden obtenerse dispersiones estables de láminas de grafeno en diversos disolventes mediante funcionalización no covalente con polímeros. La inmovilización de biomoléculas en láminas de grafeno a través de la funcionalización no covalente también ha suscitado un gran interés [29,30]. De esta manera, la combinación de la gran superficie específica, las excelentes propiedades y la biocompatibilidad del grafeno con biomoléculas, tales como enzimas, proteínas y otros biopolímeros [31,32], amplían las posibles aplicaciones de las estructuras híbridas resultantes.

A diferencia de la funcionalización covalente, la funcionalización no covalente del grafeno mantiene la estructura y las propiedades del mismo, ya que no produce daños estructurales en las láminas gráficas [6].

Desde que Ruoff [33] reportó por primera vez los compuestos conductores de grafeno-poliestireno en 2006, se han empleado muchos otros compósitos de grafeno-polímero. Al combinarse con grafeno, no solo se pueden mejorar efectivamente las propiedades de la matriz polimérica, sino que también se pueden dotar de nuevas propiedades, tales como conductividad, barrera difusional, transferencia de calor, entre otras [24]. La factibilidad de la combinación de grafeno con diversas matrices poliméricas, hace que el mismo sea considerado el nanomaterial más importante en muchas áreas de aplicación para los próximos 20 años [34].

En este sentido, el empleo de polímeros generados a partir de dopamina, Poli-dopamina (Poli-DA), como material de recubrimiento superficial de grafeno se informó por primera vez en 2007 y, desde entonces ha sido de gran interés como herramienta para modificar superficies debido a sus notables propiedades adhesivas [35].

En tal aspecto, catecolaminas como la dopamina y la noradrenalina se han estudiado como "imitadores minimalistas" de la adhesión que poseen ciertos mejillones marinos a la superficie de diversos sustratos y se descubrió que tienen la capacidad de modificar prácticamente cualquier superficie [36].

Por ejemplo, mediante la polimerización oxidativa de dopamina se logró modificar una amplia variedad de superficies y, por otra parte, la presencia de Poli-DA resultó útil para anclar diversas moléculas [37]. En la **figura IV-2** puede observarse el esquema de generación oxidativa de polímeros melánicos a partir de L-tirosina, este proceso comienza con dos etapas de oxidación donde tirosina se oxida a L-Dopa que luego se oxida a dopaquinona. A continuación, la molécula se cicla para generar leucodapacromo, el cual se oxida a dopacromo y en etapas posteriores de decarboxilación y oxidación da como resultado la formación de melanina.

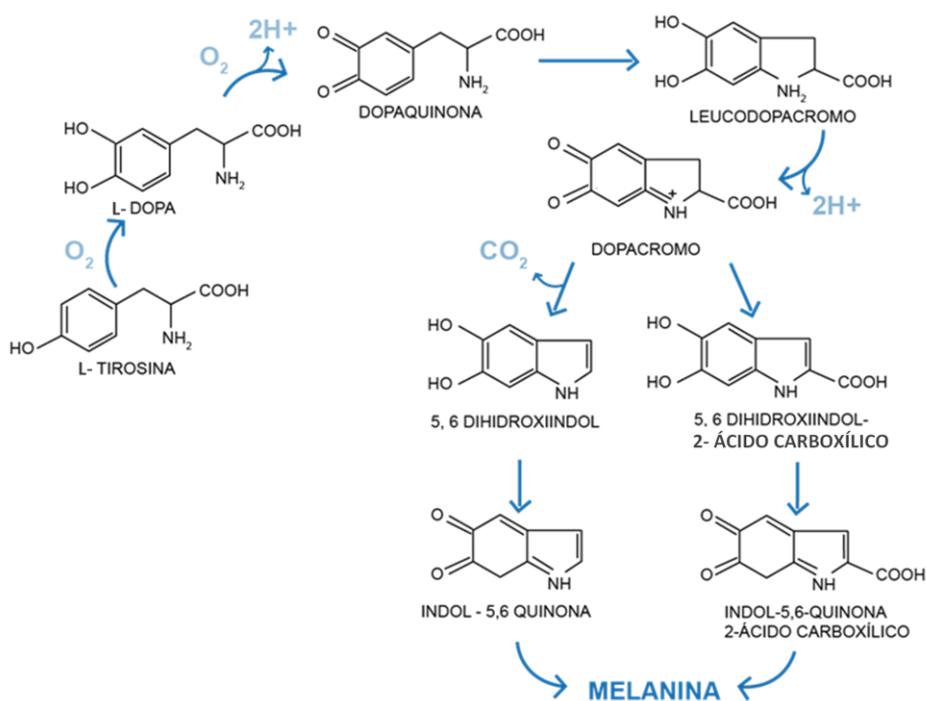


Figura IV-2. Esquema de polimerización oxidativa de catecolaminas.

Además de estudiar la modificación de superficies con Poli-dopamina y Poli-norepinefrina, el estudio de las interacciones entre polímeros melánicos con diferentes sustratos, se ha implementado a lo largo de los años en

innumerables ocasiones con diversos fines, incluidos la funcionalización de la superficie de nanopartículas de óxido de hierro para *delivery* de drogas [38], lograr la mejora en la adhesión de células [39], formación de cápsulas poliméricas [40], recubrimiento de metales para evitar la corrosión [41], sensores electroquímicos [42], entre otras. A pesar del uso generalizado, la funcionalización de la superficie de nanomateriales de carbono como el grafeno o el óxido de grafeno sigue sin ser ampliamente explorado [43]. Algunos estudios demostraron que la reducción química de GrO funcionalizado con catecolaminas produce materiales que exhiben excelentes propiedades eléctricas y mecánicas [44,45].

En este capítulo se reporta por primera vez el empleo de la polimerización oxidativa en medio básico de catecolaminas, tales como dopamina y L-Dopa, para producir la reducción *in situ* de GrO mediada por efecto ultrasónico, a fin de generar un nuevo nanomaterial híbrido, RGrO-Poli-catecolamina, homogéneamente disperso en medio acuoso con propiedades superiores a la de los materiales individuales.

IV-2. Sección experimental

Para la realización de este trabajo de Tesis se utilizó una dispersión de óxido de grafeno comercial 4,0 mg/mL provisto por Graphenea, dopamina (DA) y L-Dopa procedentes de Sigma Aldrich. *Buffer* Tris, fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4) y fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) marca Biopack. Como marcador redox se utilizó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% marca J.T.Baker. Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura provista por un sistema Millipore-MilliQ.

IV.2.1. Síntesis de RGrO-Poli-catecolamina

Para la síntesis del nanohíbrido se mezclaron soluciones de concentraciones crecientes de DA o L-Dopa preparadas en *buffer* Tris pH 8,60,

de manera de favorecer el proceso de polimerización [46], con 250 μL de dispersión de óxido de grafeno comercial y se llevó a un volumen final de 1,00 mL con agua milliQ de manera tal que la concentración resultante de este último sea 1,0 mg/mL. La mezcla obtenida fue sometida a efecto ultrasónico, utilizando una sonda ultrasónica marca Sonics Materials vibra-cell a una potencia del 50%, con el fin de favorecer la intercalación del monómero entre las láminas de óxido de grafeno y simultáneamente lograr la polimerización de la catecolamina proceso que genera la reducción y restitución de la estructura sp^2 del nanomaterial (figura IV-3), de manera de obtener en el mismo una mejora en el carácter conductor y que este sea apto para ser empleado en el desarrollo de sensores electroquímicos.

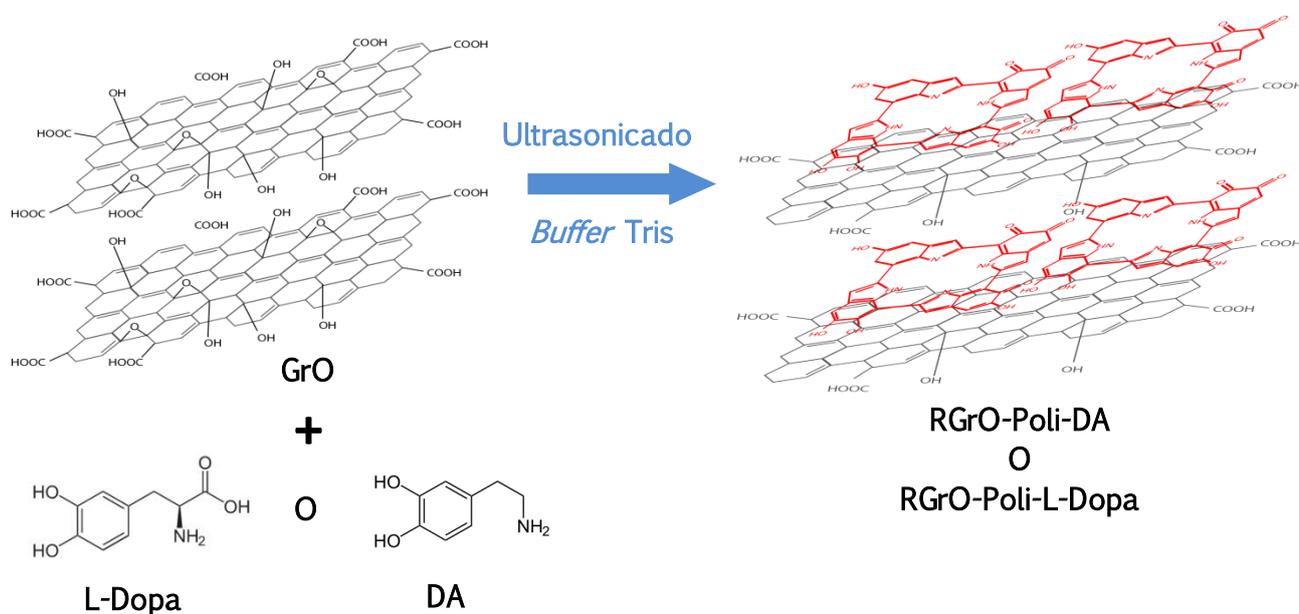


Figura IV-3. Esquema de síntesis de RGrO-Poli-DA o RGrO-Poli-L-Dopa dependiendo de la catecolamina empleada.

IV.2.2. Caracterización de RGrO-Poli-catecolamina

IV.2.2.1. Caracterización electroquímica

Para la caracterización electroquímica del nanohíbrido sintetizado se inmovilizaron 20 μL de las dispersiones bajo estudio sobre electrodos de carbono vítreo (GCE), pulidos según la metodología explicada en el capítulo II y se llevaron a sequedad utilizando una estufa de cultivo a 50 $^{\circ}\text{C}$. Las

mediciones se realizaron en una celda electroquímica convencional de tres electrodos, utilizando un alambre de platino y un electrodo de Ag/AgCl (3M) como contraelectrodo y electrodo de referencia respectivamente, y carbono vítreo modificado con las respectivas dispersiones como electrodo de trabajo.

IV.2.2.2. Caracterización estructural y morfológica

Para la caracterización estructural y morfológica las dispersiones obtenidas fueron inmovilizadas sobre discos de carbono vítreo, una pastilla de seleniuro de zinc y vidrio portaobjetos para el análisis por SEM, FT-IR y Raman, respectivamente. Las caracterizaciones por UV-Visible y DLS se llevaron a cabo con cubetas de cuarzo de 1 mm y 1 cm de paso óptico, respectivamente. Las distintas fracciones obtenidas luego de centrifugar las dispersiones de RGrO-Poli-catecolamina a 16000 rpm durante 10 min, fueron analizadas mediante espectroscopia UV-Visible de manera tal de poder evidenciar la reducción de GrO y la formación del polímero.

IV-3. Resultados y discusión

IV.3.1. Optimización de la cantidad y la identidad de la catecolamina empleada en la síntesis

Con el fin de seleccionar el monómero de partida óptimo para sintetizar el nanohíbrido, se realizaron experimentos amperométricos a $-0,100$ V utilizando como sonda redox peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre GCE modificados con las dispersiones sintetizadas a partir de diferentes catecolaminas, DA y L-Dopa, y con distintas proporciones de las mismas. Se construyeron curvas de calibrado y mediante el análisis de las sensibilidades obtenidas se definió la cantidad óptima de catecolamina a emplear en la síntesis del nanohíbrido. Cuando se comparan las sensibilidades obtenidas de las curvas de calibrado para la reducción de H_2O_2 (**figura IV-4.A**), se puede mencionar que en general las mejores respuestas se observan cuando L-Dopa

es utilizado como monómero de partida para la síntesis del nanohíbrido. A diferencia de dopamina, L-Dopa presenta un grupo carboxílico en su cadena lateral que produce cierta repulsión electrostática en el proceso de polimerización [47,48], lo que sugiere que los polímeros sintetizados con dopamina son más densos y compactos. Polidopamina probablemente genera una barrera difusional a H_2O_2 que impide el proceso de óxido-reducción [49], por lo que la llegada del analito a la superficie se ve afectada en mayor medida cuando el electrodo es modificado con RGrO-Poli-DA y, consecuentemente, las respuestas obtenidas para dichas plataformas son menores a las observadas cuando el electrodo es modificado con RGrO-Poli-L-Dopa. En la **figura IV-4.B** se muestra de manera ilustrativa un registro amperométrico sobre un electrodo de carbono vítreo modificado con RGrO-Poli-L-Dopa, aplicando un potencial de $-0,100$ V para agregados sucesivos de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3}$ M.

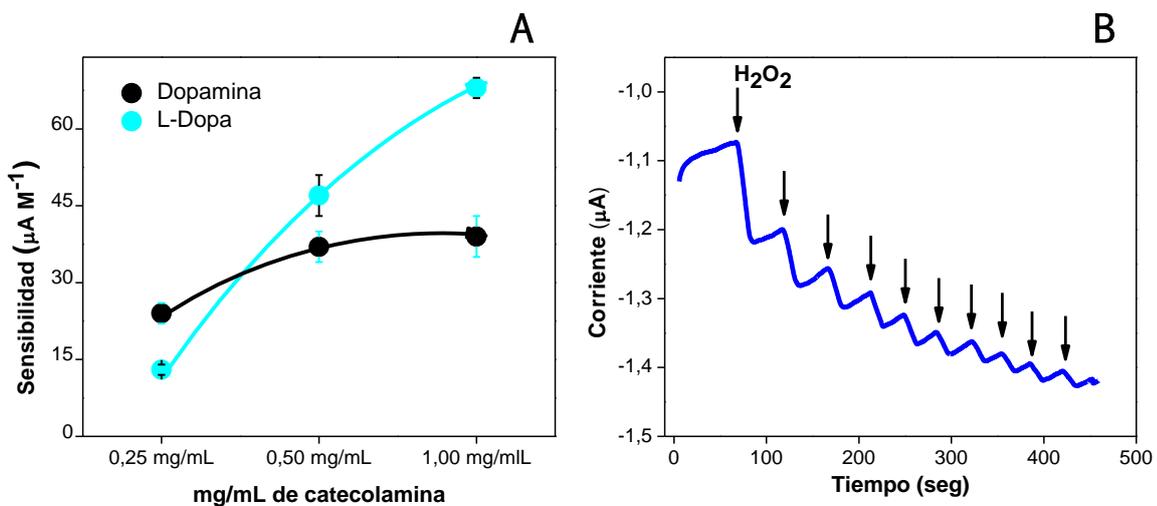


Figura IV-4. (A) Sensibilidades para H_2O_2 calculadas a partir de curvas de calibración obtenidas a de registros amperométricos a $-0,100$ V sobre GCE/RGrO-Poli-Dopamina (—●—) y GCE/RGrO-Poli-L-Dopa (—●—). (B) Registro amperométrico para agregados sucesivos de H_2O_2 1×10^{-3} M sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa.

Por último, se puede mencionar que un aumento en la proporción de monómero utilizada en el proceso de síntesis, para ambos casos, se traduce en un incremento en las corrientes de reducción y consecuentemente en la sensibilidad asociada a dicho proceso. Este efecto demuestra una mejora en cuanto a la restitución de la estructura conjugada del material carbonáceo, así

como también en el proceso de dispersión de la nanoestructura de carbono en la matriz polimérica. Puede notarse que, para el caso del empleo de dopamina en la síntesis, la respuesta electroquímica no cambia de manera significativa cuando la cantidad del monómero aumenta hasta 1,00 mg/mL, esto sugiere que utilizar mayores proporciones de DA puede convertirse en una barrera para el proceso de descarga del analito en la superficie del electrodo y por tal motivo mayores proporciones de L-Dopa no fueron estudiadas.

De esta manera, se determinaron como parámetros óptimos para la síntesis del nuevo nanomaterial híbrido la utilización del monómero L-Dopa con una concentración de 1,00 mg/mL.

IV.3.2. Caracterización por voltamperometría hidrodinámica

En la **figura IV-5.A** se muestran los voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos para H_2O_2 sobre electrodos de carbono vítreo sin modificar (—●—), modificados con dispersiones de GrO comercial (—●—) y con el RGrO-Poli-L-Dopa (—●—).

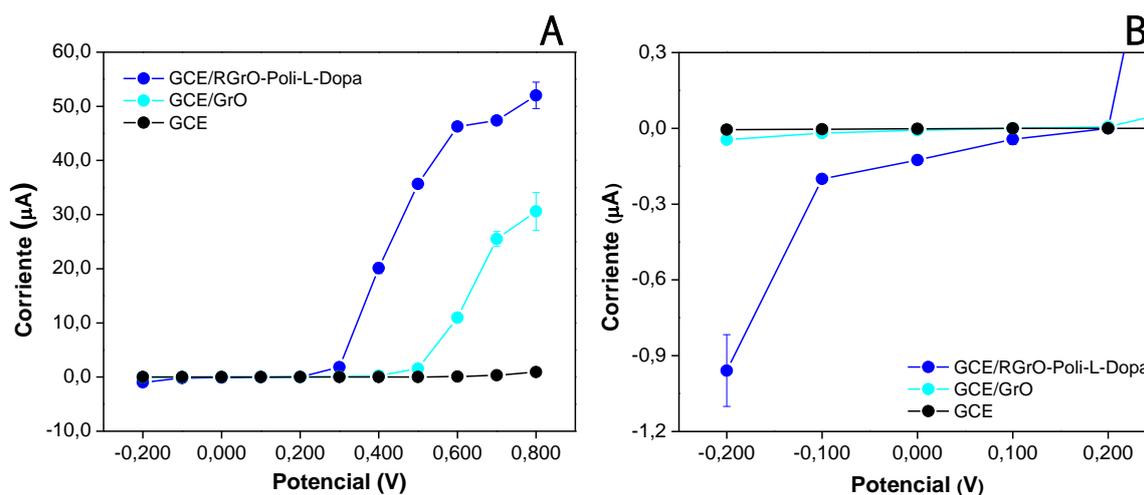


Figura IV-5. (A) Voltamperogramas hidrodinámicos para H_2O_2 $5,0 \times 10^{-2}$ M sobre GCE sin modificar (—●—), y modificado con GrO (—●—) y RGrO-Poli-L-Dopa (—●—). (B) Ampliación de la zona de reducción.

Cuando los electrodos de trabajo se modifican con GrO comercial puede notarse un incremento en las corrientes asociadas a los procesos de oxido reducción de H_2O_2 respecto de GCE pulido. Si bien dicho material es poco conductor, el mencionado incremento estaría relacionado con un aumento del área electroactiva expuesta a la solución.

Por otro lado, puede observarse que GCE/RGrO-Poli-L-Dopa proporciona una notable disminución de los sobrepotenciales, tanto para la oxidación como para la reducción de H_2O_2 , comenzando dichos procesos a 300 mV y 100 mV, respectivamente. Además, se evidencia un significativo aumento de las corrientes asociadas a estos procesos. Estos hallazgos dan cuenta, por un lado, de la eficiente funcionalización de las nanoestructuras de carbono, que cambia las características superficiales de las láminas de RGrO evitando que se produzca la agregación, proporcionando una mejor dispersión de las mismas y el consecuente aumento de área superficial expuesta. Por otra parte, se pone de manifiesto la exitosa reducción del GrO mediada por la formación del polímero por acción ultrasónica, debido a que el analito en cuestión se descarga preferentemente sobre la estructura sp^2 de la lámina gráfica [50,51]. De esta manera, se demuestran las mejoras en las propiedades electrocatalíticas del nuevo nanomaterial híbrido.

IV.3.3. Optimización del tiempo de sonicado

A fin de evaluar el tiempo óptimo de síntesis ultrasónica, la respuesta electroquímica hacia la reducción de H_2O_2 fue evaluada para dispersiones preparadas a partir de la mezcla de GrO y L-Dopa en proporciones óptimas sometidas a tiempos crecientes de sonicado. La **figura IV-6** muestra las sensibilidades encontradas a partir de las curvas de calibrado obtenidas por amperometría cuando la mezcla de GrO y L-Dopa es sometida a efecto ultrasónico durante: 0 min (—), 15 min (—), 30 min (—) y 60 min (—) y en la **tabla IV-1** se resumen los resultados obtenidos.

Sobre la base de los resultados expuestos se puede observar que al aumentar el tiempo de ultracavitación, las respuestas obtenidas se ven incrementadas, sobre todo a tiempos largos, donde se manifiestan sensibilidades 4 veces mayor cuando se sonica durante 30 min y 65 veces mayor para la síntesis llevada a cabo durante 60 min, en comparación al nanohíbrido obtenido sin sonicar. Esto se debe a que mientras mayor es el tiempo de ultracavitación al que se somete la mezcla, no sólo se favorece una mayor eficiencia en la exfoliación de las láminas de grafeno, sino que además se provee el tiempo suficiente para que se produzca la polimerización que desencadena la reducción y funcionalización del GrO, lo que posibilita la obtención de dispersiones más homogéneas y estables en el tiempo.

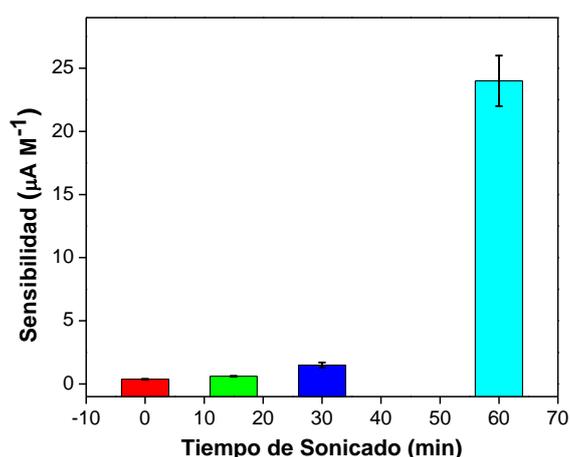


Tabla IV-1. Sensibilidades obtenidas para diferentes tiempos de sonicado.

Tiempo de sonicado (min)	Sensibilidad (µA/M)
0	(0,37 ± 0,03)
15	(0,61 ± 0,03)
30	(1,5 ± 0,2)
60	(24 ± 2)

Figura IV-6. Sensibilidades calculadas a partir de curvas de calibración de registros amperométricos para agregados sucesivos de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa para tiempos crecientes de sonicado durante la síntesis. Potencial aplicado: -0,100 V

Los resultados obtenidos sugieren que el incremento en el tiempo de sonicado se correlaciona directamente con la mejora en la señal obtenida y se determina como parámetro óptimo para la síntesis del nanohíbrido 60 min.

IV.3.4. Caracterización espectroscópica

IV.3.4.1. Caracterización por espectroscopia infrarroja

Para evaluar tanto la funcionalización del grafeno por parte del polímero, así como también la restitución de la red sp^2 de la lámina, es decir la naturaleza conductora del material, se realizaron estudios mediante FT-IR. La figura IV-7 muestra los espectros obtenidos para GrO comercial (—), GrO sonicado 60 min (—) y GrO sonicado 60 min en presencia de L-Dopa (—).

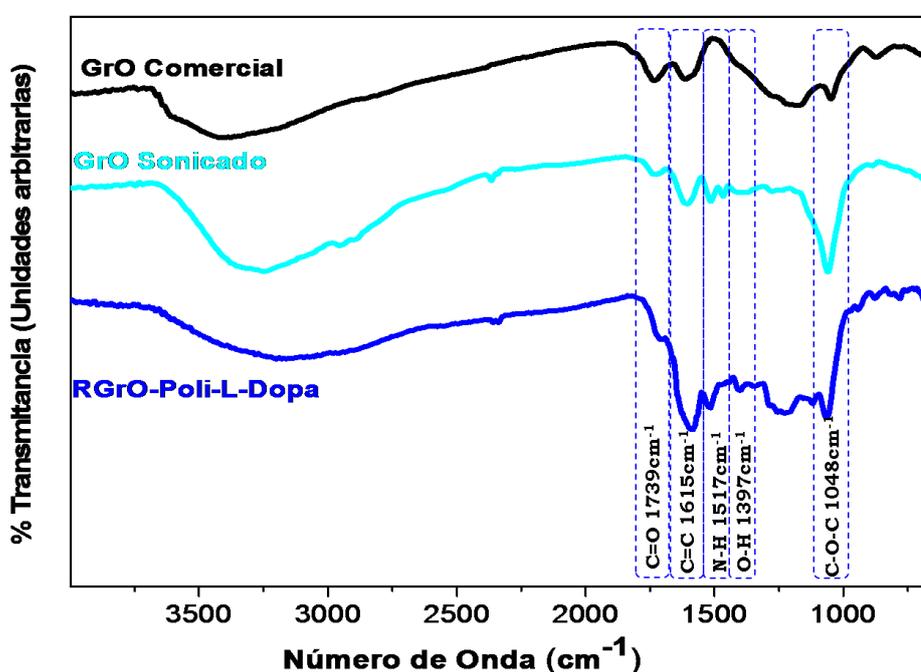


Figura IV-7. Espectros FT-IR de GrO comercial (—), GrO sonicado 60 min (—) y GrO sonicado 60 min en presencia de L-Dopa (—).

Tal como puede observarse, el espectro de GrO comercial (—) presenta las bandas características del doble enlace C=C a 1615 cm^{-1} y el estiramiento correspondiente al enlace C=O a 1739 cm^{-1} de los grupos carboxilos presentes en los bordes de la lámina [52]. Por otro lado, también presenta una banda característica del estiramiento del enlace C-O-C de los grupos epóxido a 1048 cm^{-1} presentes en el plano basal de la lámina. Cuando el óxido de grafeno es sometido a ultrasonido (—), se producen cambios en la intensidad relativa y frecuencia de las señales asociadas al estiramientos de los grupos carboxilo y

el estiramiento del doble enlace carbono-carbono, lo que indica que la ultracavitación promueve la remoción de los grupos oxigenados más lábiles y, consecuentemente, una reducción parcial de la lámina de GrO.

En los espectros IR de RGrO-Poli-L-Dopa (—) se percibe una marcada disminución de las intensidades relativas de las bandas asociadas al estiramiento tanto de los grupos carboxilo, como así también de los grupos epóxido confirmándose, de esta manera, la restitución parcial de la lámina gráfica con incremento de las regiones de Carbono sp^2 . Además, en el espectro de RGrO-Poli-L-Dopa se observa la aparición de las bandas correspondientes a la deformación del enlace N-H del grupo amino y a la flexión de grupo O-H fenólico a 1517 cm^{-1} y a 1397 cm^{-1} respectivamente, presentes solo en la estructura del polímero. La presencia de estas bandas, confirman la exitosa funcionalización del material de carbono por parte de la catecolamina empleada en la síntesis, en este caso L-Dopa [44,53].

IV.3.4.2. Caracterización por espectroscopia UV visible

A fin de evaluar el proceso de polimerización de L-Dopa y la reducción de la lámina de GrO se realizaron espectros UV-Visible de los componentes del nanohíbrido y de las distintas fracciones obtenidas por centrifugación de la dispersión. En la **figura IV-8** se observan los espectros para una solución de L-Dopa $1,0\text{ mg/mL}$ fresca (—), una solución de L-Dopa 1 mg/mL sometida a efecto ultrasónico durante 60 min (—) y una dispersión del nanohíbrido RGrO-Poli-L-Dopa (—). En los tres espectros se puede observar un pico característico a 280 nm correspondiente a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ del anillo aromático de la catecolamina.

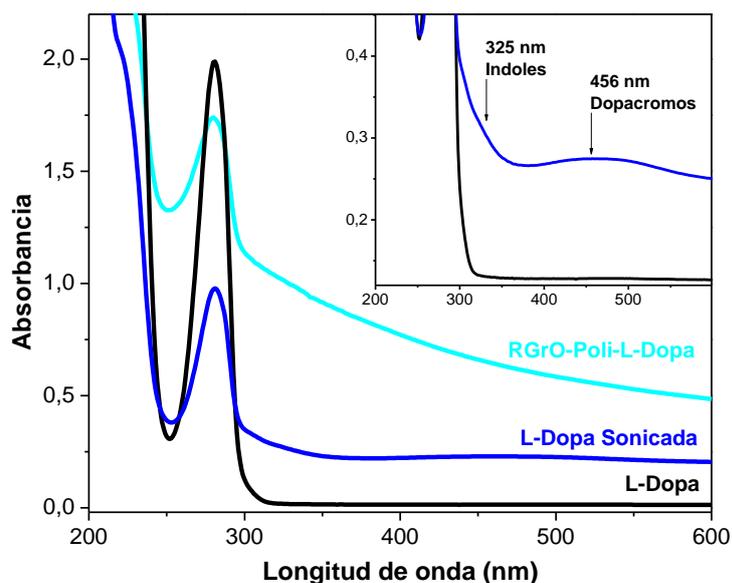


Figura IV-8. Espectros UV-Visible de L-Dopa (—), L-Dopa sonicada 60 min (—) y RGrO-Poli-L-Dopa sonicado 60 min (—). Inset: ampliación de la zona de las bandas asociadas a los intermediarios del proceso de polimerización.

A diferencia de los datos obtenidos para L-Dopa fresca, cuando la misma es sonicada, se evidencia en los espectros la aparición de dos pequeñas bandas a 325 nm y 456 nm (figura IV-8 inset) compatibles con los compuestos indólicos y dopacromos [54], que son intermediarios en el proceso de polimerización (figura IV-2). Las bandas asociadas a otros intermediarios como dopaquinona y leucodopacromo no fueron evidentes debido a la rápida tasa de transformación de los mismos para generar dopacromo que posee mayor estabilidad [37]. Es importante destacar que la presencia de estas bandas corrobora la premisa de que el efecto ultrasónico promueve la polimerización oxidativa de la catecolamina empleada en la síntesis de la nanoestructura. Por último, cabe aclarar que debido al *scattering* que producen las láminas de grafeno no fue posible aislar las señales de los intermediarios cuando se analizaron los sobrenadantes de las dispersiones de RGrO-Poli-L-Dopa centrifugadas.

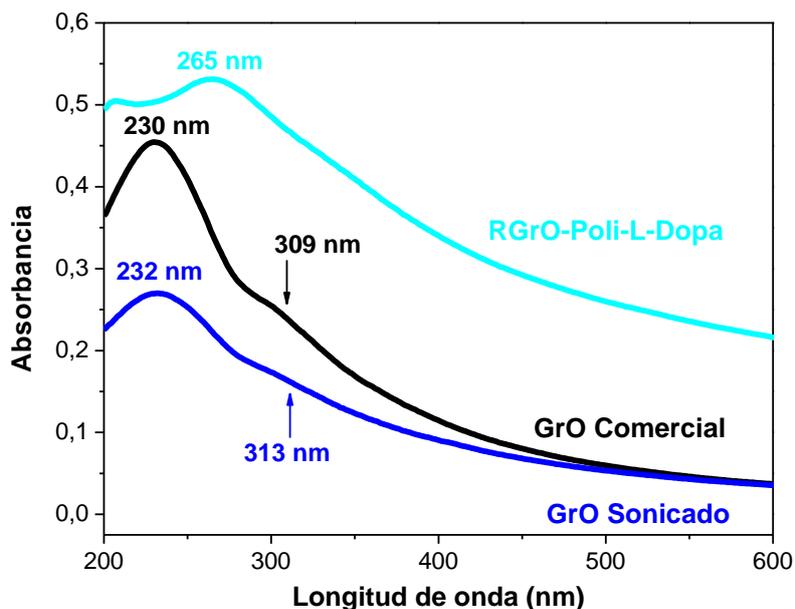


Figura IV-9. Espectros UV-Visible de GrO comercial (—), GrO comercial sonicado 60 min (—) y RGrO-Poli-L-Dopa resuspendido luego de centrifugar a 16000 rpm (—).

Por otra parte, en la **figura IV-9** se muestran los espectros obtenidos para GrO comercial 1,0 mg/mL (—), GrO comercial 1,0 mg/mL sometido a efecto ultrasónico durante 60 min (—) y una dispersión del sedimento de RGrO-Poli-L-Dopa resuspendido luego de ser centrifugado (—). En el caso del óxido de grafeno comercial se exhiben dos bandas a 230 nm y 309 nm, que se corresponden con las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del doble enlace C=C del anillo aromático y $n \rightarrow \pi^*$ del enlace C=O de los grupos carboxílicos respectivamente. Cuando GrO es sonicado dichas señales se desplazan a longitudes de onda mayores, esto nuevamente da cuenta de la remoción de los grupos oxigenados más lábiles promovido por la ultracavitación, tal como fue mencionado con anterioridad [55]. Para finalizar, cabe mencionar que la modificación no covalente de GrO con L-dopa mediada por ultrasonido, produce un notable corrimiento de la señal correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del enlace C=C a longitudes de onda mayores, lo que corrobora la restitución de la conjugación electrónica dentro de las láminas de grafeno [24,55,56]. Esto confirma la posibilidad de emplear catecolaminas para producir la exitosa restitución de la estructura sp^2 de la lámina gráfitica y consecuentemente del carácter conductor del material resultante.

IV.3.4.3. Caracterización por espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una poderosa herramienta que puede ser utilizada para determinar el daño estructural, los grupos funcionales y las modificaciones químicas introducidas durante el proceso de preparación o síntesis del nanohíbrido ya que la posición, el ancho e intensidad relativa de las bandas varían de acuerdo a la estructura del material carbonáceo [57]. En general, los espectros de grafeno y sus derivados presentan dos bandas características, una aproximadamente a los 1600 cm^{-1} (banda G) y otra alrededor de los 1350 cm^{-1} (banda D). La primera se asocia con los dominios sp^2 de la estructura de carbono, mientras que la segunda se relaciona con la presencia de desorden y defectos en la red grafitica por la presencia de carbono sp^3 , por lo tanto, la ausencia de esta segunda banda indica un grafeno prístino [58,59].

En la **figura IV-10** se presentan los espectros Raman obtenidos para GrO comercial (—), GrO comercial sometido a efecto ultrasónico 60 min (—) y una dispersión de RGrO-Poli-L-Dopa (—). En la **tabla IV-2** se presenta un análisis detallado de las posiciones de las bandas y los anchos de $\frac{1}{2}$ pico.

Es de esperar que a medida que se produce la restitución de la aromaticidad la relación entre las bandas D y G (I_D/I_G) disminuya. Se puede observar que el proceso de sonicado produce un aumento de dicho parámetro, esto sugiere un cambio en el tamaño promedio de los dominios sp^2 , y puede explicarse si se considera que existe una mayor cantidad de dominios grafiticos pero de menor tamaño que los que presenta GrO [60,61], producidos por la ruptura de las láminas por efecto del ultrasonido. En consecuencia, el desorden general de la muestra es mayor y la banda D aumenta su intensidad en mayor medida que el aumento que se produce en la banda G por restitución de la conjugación aromática y de esta manera la relación entre las mismas aumenta en lugar de disminuir.

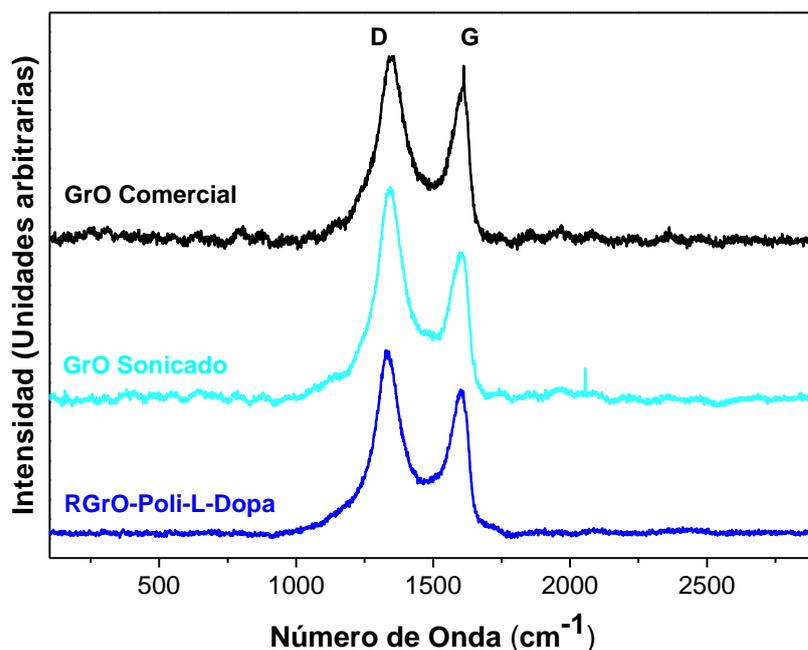


Figura IV-10. Espectros Raman de GrO comercial (—), GrO comercial sonicado 60 min (—) y RGrO-Poli-L-Dopa (—).

Cuando se comparan los espectros correspondientes a GrO sonicado y GrO-Poli-L-Dopa, se observa una marcada disminución en la relación de las bandas D y G. Este hecho da cuenta que a pesar del marcado aumento del desorden por la ruptura de las láminas que produce la ultracavitación, la presencia del monómero promueve efectivamente la reducción del óxido de grafeno.

Diversos estudios sugieren que el análisis de parámetros como la posición de las bandas aporta información acerca de la restitución de la lámina gráfica [62,62]. De esta manera, puede notarse que cuando se comparan las posiciones de las bandas del espectro obtenido para RGrO-Poli-L-Dopa y para GrO comercial tanto la banda D como la banda G se corren a números de onda menores. Este hecho corrobora la hipótesis de la reducción de GrO para producir un material con un mayor carácter conductor.

Tabla IV-2. Comparación de los parámetros de las bandas D y G de los espectros Raman obtenidos.

	<i>Banda</i>	I_D/I_G	<i>Posición de las bandas (cm⁻¹)</i>	<i>Ancho de ½ pico (cm⁻¹)</i>
<i>GrO Comercial</i>	<i>D</i>	1,19	1350	116
	<i>G</i>		1598	66
<i>GrO Sonicado</i>	<i>D</i>	1,41	1345	110
	<i>G</i>		1593	71
<i>RGrO-Poli-L-Dopa</i>	<i>D</i>	1,28	1336	117
	<i>G</i>		1594	68

Se sabe que el ancho de ½ pico de la banda G aumenta con el aumento del desorden. Diferentes reportes bibliográficos sugieren que el proceso de ultracavitación promueve la ruptura de las láminas de grafeno, generando una mayor densidad de defectos de borde y consecuentemente, se obtienen muestras con un mayor grado de desorden general [57,64,65]. El análisis del ancho de ½ pico de la banda G para las diferentes muestras en estudio revela que, efectivamente el proceso de sonicado, produce láminas gráficas de menor tamaño y por tal motivo los valores de ancho de ½ pico de la banda G son mayores para las muestras de GrO sonicado y RGrO-Poli-L-Dopa en comparación con GrO. Finalmente, al ancho de ½ pico de la banda G del nanohíbrido es menor que el encontrado para GrO sonicado, debido, por un lado, a la restitución de los dominios sp² y, por otro, a la funcionalización de las láminas por parte del polímero que generan una estructura de mayor orden.

IV.3.4.4. Caracterización por microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de la luz

A fin de conocer el grado de dispersión y la morfología de los diferentes materiales sintetizados, se inmovilizaron las diferentes muestras sobre discos de carbono vítreo y se tomaron micrografías SEM de las mismas tal como se muestra en la **figura IV-11**. En todos los casos se observa que las dispersiones cubren de manera homogénea la totalidad de la superficie del disco.

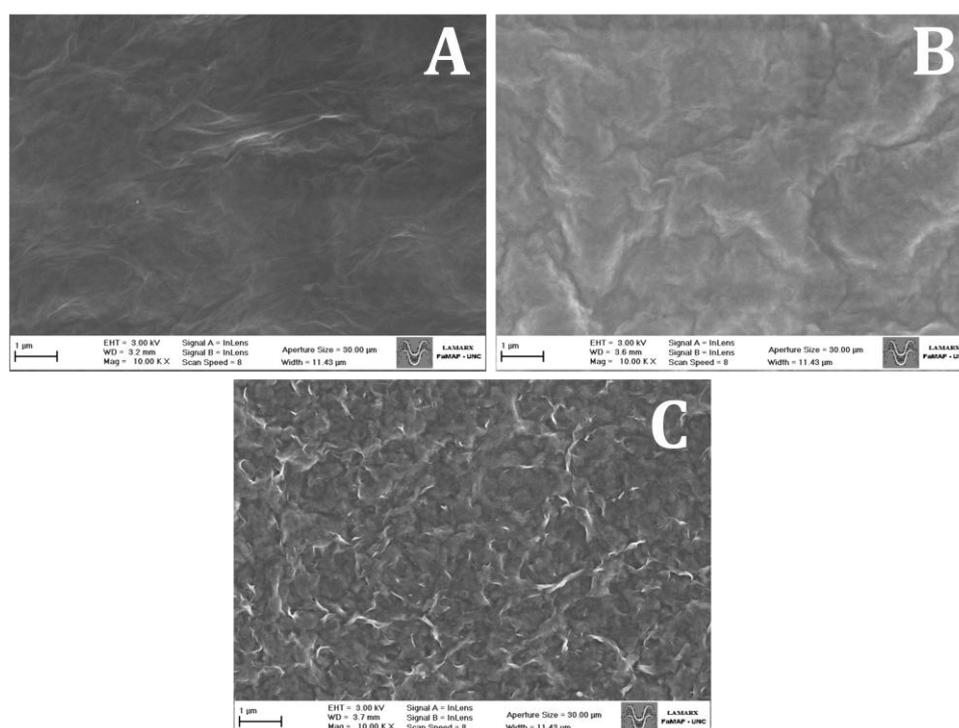


Figura IV-11. Micrografías SEM para (A) GrO comercial, (B) GrO comercial sonicado 60 min y (C) RGrO-Poli-L-Dopa.

La imagen de GrO (**figura IV-11.A**) es poco nítida debido al carácter poco conductor del material. Cuando el óxido de grafeno es sonicado (**figura IV-11.B**) se obtiene una micrografía con mayor nitidez asociada a una mayor densidad de defectos de borde presentes en las láminas debido a la ruptura de las mismas por el proceso de ultracavitación. Además, las zonas más brillantes dan cuenta de un material con carácter más conductor, lo que

verifica que el efecto ultrasónico promueve la remoción de ciertos grupos oxigenados. En ambos casos, se observan superficies rugosas propias de la naturaleza ondulada de las láminas de grafeno. Por último, la micrografía de RGrO-Poli-L-Dopa muestra estructuras de carbono más pequeñas en comparación con GrO sonicado y además se observa una granulación que es típica de estructuras de carbono funcionalizadas con el polímero generado.

Mediante DLS se midieron los radios hidrodinámicos de las nanoestructuras y nanohíbrido sintetizado. En la **tabla IV-3** se presentan los resultados obtenidos.

Tabla IV-3. *Radio hidrodinámicos de las diferentes nanoestructuras obtenidos por DLS.*

	<i>Radio Hidrodinámico (nm)</i>
<i>GrO</i>	$(6 \pm 2) \times 10^2$
<i>GrO Sonicado</i>	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^2$
<i>RGrO-L-Dopa</i>	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^2$

Tal como se esperaba, GrO presenta tamaños seis veces mayor en comparación al material sonicado en ausencia y en presencia del monómero catecólico, lo cual verifica, como se dijo anteriormente, y fue corroborado mediante las micrografías obtenidas por SEM, que la ultracavitación promueve la ruptura de las láminas de grafeno. Por otro lado, es importante resaltar que, si bien las micrografías son contundentes en cuanto al menor tamaño de lámina que presenta el híbrido RGrO-Poli-L-Dopa en comparación con GrO sonicado, los valores similares encontrados por DLS se deben a que en el radio obtenido para el nanohíbrido están contempladas tanto las láminas de grafeno, como así también el entorno circundante conformado por el polímero que las funcionaliza.

IV-4. Conclusiones parciales

En este capítulo se presentó por primera vez una metodología de síntesis verde, rápida y sencilla para producir óxido de grafeno reducido *in situ* mediante la polimerización oxidativa de L-Dopa mediada por efecto ultrasónico.

Mediante experimentos de voltamperometría hidrodinámica se corroboró que durante el proceso de formación del polímero se reduce parcialmente el óxido de grafeno y que a su vez es capaz de cambiar las características superficiales de las láminas evitando el apilamiento o agregación de estas, proceso mediado por interacciones de Van der Waals, para dar dispersiones homogéneas y estables en el tiempo.

Se determinó que el empleo de L-Dopa como monómero de partida permite obtener superficies más activas que DA. Por otro lado, una concentración de 1,0 mg/mL de la catecolamina seleccionada fue determinada como la proporción óptima para la síntesis del nanohíbridos. Finalmente, 60 min fue seleccionado como el tiempo óptimo de sonicado para obtener la mejor respuesta electroquímica.

Mediante espectroscopia UV-Visible fue posible poner de manifiesto el proceso de polimerización oxidativa de L-Dopa en medio básico desencadenado por la ultracavitación. El excelente grado de dispersión, la morfología y tamaño del nanohíbrido sintetizado fueron evaluados por experimentos SEM y DLS. La caracterización por FT-IR, UV-Visible y Raman permitió determinar de manera fehaciente la funcionalización y reducción simultánea de GrO, procesos mediados por la polimerización de la catecolamina. En estas condiciones, se generó un nuevo nanomaterial híbrido con propiedades renovadas, en cuanto a su carácter conductor y a los grupos funcionales presentes en la nanoestructura que posibilitan el futuro anclaje o interacción con diversos analitos.

La combinación del GrO y la catecolamina empleada dio como resultado un material con atractivas propiedades para el futuro empleo en la

construcción de plataformas supramoleculares aptas para ser empleadas en el desarrollo de sensores electroquímicos.

IV-5. Bibliografía

- [1] K. S. Novoselov, V. I. Fal'ko, L. Colombo, P. R. Gellert, M. G. Schwab, and K. Kim, "A roadmap for graphene," *Nature*, vol. 490, no. 7419, pp. 192–200, 2012, doi: 10.1038/nature11458.
- [2] J. M. Allen, T. C. Vincent, and K. B. Richard, "Honeycomb carbon: A Review of Graphene What is graphene," *Chem. Rev.*, vol. 110, pp. 132–145, 2010.
- [3] A. Fasolino, J. H. Los, and M. I. Katsnelson, "Intrinsic ripples in graphene," *Nat. Mater.*, vol. 6, no. 11, pp. 858–861, 2007, doi: 10.1038/nmat2011.
- [4] Y. Xu, H. Bai, G. Lu, C. Li, and G. Shi, "Flexible Graphene Films via the Filtration of Water-Soluble," *Jacs*, pp. 5856–5857, 2008, doi: 10.1021/ja800745y.
- [5] S. Eigler and A. Hirsch, "Chemistry with graphene and graphene oxide - Challenges for synthetic chemists," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 30, pp. 7720–7738, 2014, doi: 10.1002/anie.201402780.
- [6] X. Wang and G. Shi, "An introduction to the chemistry of graphene," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 43, pp. 28484–28504, 2015, doi: 10.1039/c5cp05212b.
- [7] M. Quintana, E. Vazquez, and M. Prato, "Organic functionalization of graphene in dispersions," *Acc. Chem. Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 138–148, 2013, doi: 10.1021/ar300138e.
- [8] J. Park and M. Yan, "Covalent Functionalization of Graphene with Reactive intermediates," *Acc. Chem. Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 181–189, 2013, doi: 10.1021/ar300172h.
- [9] L. Yan *et al.*, "Chemistry and physics of a single atomic layer: Strategies and challenges for functionalization of graphene and graphene-based materials," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 1, pp. 97–114, 2012, doi: 10.1039/c1cs15193b.
- [10] E. Bekyarova *et al.*, "Effect of Covalent Chemistry on the Electronic Structure and Properties of Carbon Nanotubes and Graphene," *Acc. Chem. Res.*, vol. 210, pp. 80–84, 2012, doi: 10.1021/ar300177q.
- [11] W. S. Hummers and R. E. Offeman, "Preparation of Graphitic Oxide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, no. 6, p. 1339, 1958, doi: 10.1021/ja01539a017.
- [12] A. Lerf, H. He, M. Forster, and J. Klinowski, "Structure of graphite oxide revisited," *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, no. 23, pp. 4477–4482, 1998, doi: 10.1021/jp9731821.
- [13] S. Immanuel and R. Sivasubramanian, "Fabrication of two-dimensional chemically reduced graphene oxide nanosheets for the electrochemical determination of epinephrine," *Bull. Mater. Sci.*, vol. 43, no. 1, 2020, doi: 10.1007/s12034-019-2034-7.
- [14] A. A. Alghyamah *et al.*, "Synthesis and characterization of graphene oxide, reduced graphene oxide and their nanocomposites with polyethylene oxide," *Curr. Appl. Phys.*, no. 2, 2020, doi: 10.1016/j.cap.2020.03.002.
- [15] V. D. Dao, "Bimetallic PtSe nanoparticles incorporating with reduced graphene

- oxide as efficient and durable electrode materials for liquid-junction photovoltaic devices,” *Mater. Today Energy*, vol. 16, p. 100384, 2020, doi: 10.1016/j.mtener.2020.100384.
- [16] Q. Meng *et al.*, “Siloxene-reduced graphene oxide composite hydrogel for supercapacitors,” *Chem. Eng. J.*, vol. 393, no. 2, p. 124684, 2020, doi: 10.1016/j.cej.2020.124684.
- [17] T. Wang *et al.*, “Simple synthesis of sandwich-like SnSe₂/rGO as high initial coulombic efficiency and high stability anode for sodium-ion batteries,” *J. Energy Chem.*, vol. 46, pp. 71–77, 2020, doi: 10.1016/j.jechem.2019.10.021.
- [18] K. Kimuam, N. Rodthongkum, N. Ngamrojanavanich, O. Chailapakul, and N. Ruecha, “Single step preparation of platinum nanoflowers/reduced graphene oxide electrode as a novel platform for diclofenac sensor,” *Microchem. J.*, vol. 155, no. 2, p. 104744, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.104744.
- [19] J. Pizarro, R. Segura, D. Tapia, S. Bollo, and P. Sierra-Rosales, “Electroanalytical Determination of Cd(II) and Pb(II) in Bivalve Mollusks using Electrochemically Reduced Graphene Oxide-based Electrode,” *Electroanalysis*, vol. 31, no. 11, pp. 2199–2205, 2019, doi: 10.1002/elan.201900061.
- [20] J. Chen, H. Li, L. Zhang, C. Du, T. Fang, and J. Hu, “Direct Reduction of Graphene Oxide/Nanofibrillated Cellulose Composite Film and its Electrical Conductivity Research,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-59918-z.
- [21] Y. Chen, Y. Wu, G. Dai, and Y. Ma, “Effect of functionalized graphene on mechanical properties and dielectric constant of bismaleimide composites,” *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, vol. 30, no. 6, pp. 6234–6241, 2019, doi: 10.1007/s10854-019-00926-9.
- [22] R. T. Zhang, J. J. Han, P. Liu, C. Y. Bao, and J. N. Cheng, “Synthesis of PANI/rGO composite as a cathode material for rechargeable lithium-polymer cells,” *Ionics (Kiel)*, vol. 24, no. 11, pp. 3367–3373, 2018, doi: 10.1007/s11581-018-2525-3.
- [23] A. Alazzam, “Solution-based, flexible, and transparent patterned reduced graphene oxide electrodes for lab-on-chip applications,” *Nanotechnology*, vol. 31, no. 7, pp. 0–14, 2019, doi: 10.1088/1361-6528/ab50ee
- [24] H. Cheng, J. Lin, Y. Su, D. Chen, X. Zheng, and H. Zhu, “Green synthesis of soluble graphene in organic solvent via simultaneous functionalization and reduction of graphene oxide with urushiol,” *Mater. Today Commun.*, vol. 23, no. 1, p. 100938, 2020, doi: 10.1016/j.mtcomm.2020.100938.
- [25] D. Ickecan, R. Zan, and S. Nezir, “Vitamin C Is a Ideal Substitute for Hydrazine in the Reduction of Graphene Oxide Suspensions,” *J. Phys. Chem.*, vol. 114, no. 14, pp. 6426–6432, 2010, doi: 10.1021/jp100603h.
- [26] C. Zhu, S. Guo, Y. Fang, and S. Dong, “Reducing sugar: New functional molecules for the green synthesis of graphene nanosheets,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 4, pp. 2429–2437, 2010, doi: 10.1021/nn1002387.
- [27] S. Liu, J. Tian, L. Wang, H. Li, Y. Zhang, and X. Sun, “Stable aqueous dispersion

- of graphene nanosheets: Noncovalent functionalization by a polymeric reducing agent and their subsequent decoration with Ag nanoparticles for enzymeless hydrogen peroxide detection,” *Macromolecules*, vol. 43, no. 23, pp. 10078–10083, 2010, doi: 10.1021/ma102230m.
- [28] X. Wang *et al.*, “Non-covalently functionalized graphene strengthened poly(vinyl alcohol),” *Mater. Des.*, vol. 139, pp. 372–379, 2018, doi: 10.1016/j.matdes.2017.11.023.
- [29] K. P. Aryal and H. K. Jeong, “Functionalization of β -cyclodextrin into ambient plasma modified carbon nanotube-thermally reduced graphite oxide for electrochemical sensing of uric acid,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 238, no. 3, p. 121899, 2019, doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.121899.
- [30] E. Wang, M. S. Desai, K. Heo, and S. W. Lee, “Graphene-based materials functionalized with elastin-like polypeptides,” *Langmuir*, vol. 30, no. 8, pp. 2223–2229, 2014, doi: 10.1021/la404333b.
- [31] A. Halder, M. Zhang, and Q. Chi, “Electroactive and biocompatible functionalization of graphene for the development of biosensing platforms,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 87, no. 6, pp. 764–771, 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.09.030.
- [32] J. Tao *et al.*, “One-step exfoliation and functionalization of graphene by hydrophobin for high performance water molecular sensing,” *Carbon N. Y.*, vol. 116, pp. 695–702, 2017, doi: 10.1016/j.carbon.2017.02.052.
- [33] S. Stankovich *et al.*, “Graphene-based composite materials,” *Nature*, vol. 442, no. 7100, pp. 282–286, 2006, doi: 10.1038/nature04969.
- [34] T. Huang *et al.*, “Modified Graphene/Polyimide Nanocomposites: Reinforcing and Tribological Effects,” *Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 11, pp. 4878–4891, 2013, doi: 10.1021/am400635x
- [35] P. Flouda, S. A. Shah, D. C. Lagoudas, M. J. Green, and J. L. Lutkenhaus, “Highly Multifunctional Dopamine-Functionalized Reduced Graphene Oxide Supercapacitors,” *Matter*, vol. 1, no. 6, pp. 1532–1546, 2019, doi: 10.1016/j.matt.2019.09.017.
- [36] H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, and P. B. Messerlith, “Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings,” *Science*, vol. 318, pp. 426–430, 2007, doi: 10.1126/science.1147241
- [37] G. M. Robinson, E. I. Iwuoha, and M. R. Smyth, “Characterisation of electrosynthetic L-dopa-melanin films by electrochemical and spectroelectrochemical techniques,” *Electrochim. Acta*, vol. 43, no. 23, pp. 3489–3496, 1998, doi: 10.1016/S0013-4686(98)00096-6.
- [38] R. Mrówczyński, J. Jurga-Stopa, R. Markiewicz, E. L. Coy, S. Jurga, and A. Woniak, “Assessment of polydopamine coated magnetic nanoparticles in doxorubicin delivery,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 7, pp. 5936–5943, 2016, doi: 10.1039/c5ra24222c.
- [39] J. P. Park, M. J. Choi, S. H. Kim, S. H. Lee, and H. Lee, “Preparation of sticky *Escherichia coli* through surface display of an adhesive catecholamine moiety,”

- Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 1, pp. 43–53, 2014, doi: 10.1128/AEM.02223-13.
- [40] J. Cui *et al.*, “Immobilization and intracellular delivery of an anticancer drug using mussel-inspired polydopamine capsules,” *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 8, pp. 2225–2228, 2012, doi: 10.1021/bm300835r.
- [41] N. Wei *et al.*, “Facile construction of a polydopamine-based hydrophobic surface for protection of metals against corrosion,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 19, pp. 11528–11536, 2017, doi: 10.1039/c7ra00267j.
- [42] R. Gonzáles, A. Sánchez, M. Chicarro, M. D. Rubianes, G. A. Rivas, “Dopamine and Glucose Sensors Based on Glassy Carbon Modified With Melanic Polymers,” *Electroanalysis*, vol. 16, pp. 1244–1253, 2004, doi: 10.1002/elan.200302939.
- [43] S. M. Kang, S. Park, D. Kim, S. Y. Park, R. S. Ruoff, and H. Lee, “Simultaneous reduction and surface functionalization of graphene oxide by mussel-inspired chemistry,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 21, no. 1, pp. 108–112, 2011, doi: 10.1002/adfm.201001692.
- [44] J. Y. Hong, X. Yu, B. M. Bak, C. Pang, and H. S. Park, “Bio-inspired functionalization and redox charge transfer of graphene oxide sponges for pseudocapacitive electrodes,” *Carbon N. Y.*, vol. 83, pp. 71–78, 2015, doi: 10.1016/j.carbon.2014.11.020.
- [45] G. Li *et al.*, “Polydopamine reinforced hemostasis of a graphene oxide sponge via enhanced platelet stimulation,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 174, no. 11, pp. 35–41, 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.10.074.
- [46] V. Ball, “Polydopamine films and particles with catalytic activity,” *Catalysis Today*, vol. 301, no. 3, pp. 196–203, 2018, doi: 10.1016/j.cattod.2017.01.031
- [47] J. H. Ryu, P. B. Messersmith, and H. Lee, “Polydopamine Surface Chemistry: A Decade of Discovery,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 9, pp. 7523–7540, 2018, doi: 10.1021/acsami.7b19865.
- [48] S. Li, H. Wang, M. Young, F. Xu, G. Cheng, and H. Cong, “Properties of Electropolymerized Dopamine and Its Analogues,” *Langmuir*, vol. 35, no. 5, pp. 1119–1125, 2019, doi: 10.1021/acs.langmuir.8b01444.
- [49] B. Limoges and C. Degrand, “Electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide by nitroxyl radicals,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 422, no. 1–2, pp. 7–12, 1997, doi: 10.1016/S0022-0728(96)05052-8.
- [50] M. Zhou, Y. Zhai, and S. Dong, “Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 14, pp. 5603–5613, 2009, doi: 10.1021/ac900136z.
- [51] M. Thangamuthu, K. Y. Hsieh, P. V. Kumar, and G. Y. Chen, “Graphene- and graphene oxide-based nanocomposite platforms for electrochemical biosensing applications,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 12, 2019, doi: 10.3390/ijms20122975.
- [52] N. Hu *et al.*, “The preparation and characterization of non-covalently functionalized graphene,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 12, no. 1, pp. 99–104,

- 2012, doi: 10.1166/jnn.2012.5139.
- [53] X. Qiu, C. K. Kundu, Z. Li, X. Li, and Z. Zhang, "Layer-by-layer-assembled flame-retardant coatings from polydopamine-induced in situ functionalized and reduced graphene oxide," *J. Mater. Sci.*, vol. 54, no. 21, pp. 13848–13862, 2019, doi: 10.1007/s10853-019-03879-w.
- [54] N. González-Diéguez, A. Colina, J. López-Palacios, and A. Heras, "Spectroelectrochemistry at screen-printed electrodes: Determination of dopamine," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 21, pp. 9146–9153, 2012, doi: 10.1021/ac3018444.
- [55] D. Li, M. B. Müller, S. Gilje, R. B. Kaner, and G. G. Wallace, "Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 3, no. 2, pp. 101–105, 2008, doi: 10.1038/nnano.2007.451.
- [56] Y. Yang et al., "Controllable reduction of graphene oxide by electron-beam irradiation," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 7, pp. 3597–3604, 2019, doi: 10.1039/c8ra06797j.
- [57] A. C. Ferrari and D. M. Basko, "Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 4, pp. 235–246, 2013, doi: 10.1038/nnano.2013.46.
- [58] S. S. Nanda, M. J. Kim, K. S. Yeom, S. S. A. An, H. Ju, and D. K. Yi, "Raman spectrum of graphene with its versatile future perspectives," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 80, pp. 125–131, 2016, doi: 10.1016/j.trac.2016.02.024.
- [59] A. Jorio and A. G. Souza Filho, "Raman Studies of Carbon Nanostructures," *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 357–382, 2016, doi: 10.1146/annurev-matsci-070115-032140.
- [60] S. Stankovich et al., "Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide," *Carbon N. Y.*, vol. 45, no. 7, pp. 1558–1565, 2007, doi: 10.1016/j.carbon.2007.02.034.
- [61] T. Wang et al., "Fabrication of architectural structured polydopamine-functionalized reduced graphene oxide/carbon nanotube/PEDOT:PSS nanocomposites as flexible transparent electrodes for OLEDs," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 500, no. 10, p. 143997, 2020, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.143997.
- [62] M. S. Amir Faiz, C. A. Che Azurahaman, S. A. Raba'ah, and M. Z. Ruzniza, "Low cost and green approach in the reduction of graphene oxide (GO) using palm oil leaves extract for potential in industrial applications," *Results Phys.*, vol. 16, no. 10, p. 102954, 2020, doi: 10.1016/j.rinp.2020.102954.
- [63] S. Qin, S. Qiu, M. Cui, Z. Dai, H. Zhao, and L. Wang, "Synthesis and properties of polyimide nanocomposite containing dopamine-modified graphene oxide," *High Perform. Polym.*, vol. 31, no. 3, pp. 331–340, 2019, doi: 10.1177/0954008318768857.
- [64] A. C. Ferrari, S. E. Rodil, J. Robertson, S. E. Rodil, and J. Robertson, "Interpretation of infrared and Raman spectra of amorphous carbon nitrides," *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 67, no. 15, pp. 1–20, 2003, doi:

10.1103/PhysRevB.67.155306.

- [65] M. V. Bracamonte, G. I. Lacconi, S. E. Urreta, and L. E. F. Foa Torres, “On the nature of defects in liquid-phase exfoliated graphene,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 28, pp. 15455–15459, 2014, doi: 10.1021/jp501930a.



Capítulo V: RGrO-Poli-L-Dopa Aplicaciones analíticas

*Sensor para la detección de peróxido de hidrógeno
en muestras de cosméticos y de Pb y Sb en
muestras forenses*

En este capítulo se presentan las características analíticas de un sensor electroquímico obtenido por modificación de carbono vítreo con RGrO-Poli-L-Dopa dirigido a la cuantificación de dos tipos de analitos, peróxido de hidrógeno en una muestra comercial de enjuague bucal y Pb y Sb presentes en los residuos inorgánicos de disparos de armas de fuego.

V-1. Cuantificación de peróxido de hidrógeno

V-1.1. Introducción

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una molécula muy sencilla cuya producción anual es de $2,2 \times 10^6$ toneladas en todo el mundo. Se ha utilizado ampliamente en la industria farmacéutica, clínica, minera, textil, del papel, en fabricación de alimentos y en diversas industrias químicas debido a su fuerte poder oxidante [1,2]. En los organismos vivos, es uno de los productos secundarios de reacciones bioquímicas que implican diferentes oxidasas y juega un papel esencial como molécula de señalización en la regulación de diversos procesos de transducción biológica, tales como activación inmune de las células, remodelación vascular, apoptosis, cierre de los estomas y crecimiento radicular [3,4]. H_2O_2 también se utiliza como antiséptico en concentraciones de 3% a 10% P/P. La Comisión Europea para la información sobre las sustancias e ingredientes cosméticos (CosIng) ha fijado la concentración aceptable de peróxido en los productos cosméticos entre 0,1 y 12% P/P dependiendo del producto final particular (es decir, cuidado del cabello, cuidado de la piel, endurecimiento de uñas o higiene bucal) [5].

Además, H_2O_2 juega un importante papel fisiológico como un marcador del estrés oxidativo y del envejecimiento celular. Por otra parte, es un agente de defensa en respuesta al ingreso de patógenos invasivos [6]. Debido a sus funciones vitales, H_2O_2 se ha convertido en un importante citotóxico químico relacionado con el daño severo de la salud humana. Bajo la influencia de factores de estrés ambiental o mutaciones genéticas, las mitocondrias desencadenan una producción desproporcionada de H_2O_2 que, a su vez, se

relaciona con la fabricación de varias clases de proteínas de señalización esenciales que afectan a la proliferación celular y así dan lugar a diferentes tipos de trastornos en el cuerpo, tales como Parkinson, enfermedad de Alzheimer, cáncer, diabetes, trastornos cardiovascular y neurodegenerativos [7-9].

La importancia del H_2O_2 en las vías bioquímicas ha atraído una gran cantidad de investigaciones, orientadas al desarrollo de sensores bioquímicos altamente sensibles y selectivos. Además, H_2O_2 es un subproducto de reacciones catalizadas por enzimas oxidasas que emplean O_2 como mediador natural, tales como glucosa oxidasa, lactato oxidasa, urato oxidasa y colesterol oxidasa, por lo tanto, medir su concentración como mediador puede eventualmente permitir determinar la concentración de glucosa, lactato, urato y colesterol en muestras biológicas [10]. De esta manera, conocer la concentración de H_2O_2 es de gran importancia práctica, tanto para propósitos biológicos, como industriales, y el desarrollo de sensores de bajo costo, simples, rápidos, sensibles y selectivos son imprescindibles [11]. Hasta ahora, se ha dedicado mucho esfuerzo a la determinación rápida y sensible de la concentración de H_2O_2 en base a diferentes principios de análisis [12] y en ese sentido, varios métodos analíticos se han utilizado para la detección del mismo, incluyendo titulaciones redox, fluorescencia [13,14], colorimetría [15], quimioluminiscencia [16,17], espectrofotometría [18] y electroquímica [19-21].

Sin embargo, cada uno de estos métodos presenta importantes inconvenientes. Por ejemplo, los reactivos más comunes para la titulación de H_2O_2 ($KMnO_4$ y $CeSO_4$), pueden oxidar la materia orgánica presente en la matriz de la muestra, lo que lleva a una sobreestimación de su concentración. Por otro lado, los métodos espectrofotométricos a menudo exhiben incompatibilidad con muestras que contienen partículas dispersas o especies disueltas que pueden absorber la luz en un amplio rango de longitud de onda [5]. Además, los métodos espectroscópicos requieren mucho tiempo y son costosos, y generalmente, poseen baja selectividad y sensibilidad [10].

La detección electroquímica muestra perspectivas prometedoras en la medición de H_2O_2 debido a su costo razonable, alta sensibilidad, alta selectividad, posibilidad de miniaturización, instrumentación simple y rápido tiempo de respuesta [22].

La detección electroquímica de H_2O_2 puede llevarse a cabo a través de dos enfoques, tal como muestra la **figura V-1**, sensores enzimáticos [23,24] y no enzimáticos [19-21]. Aunque los sensores electroquímicos enzimáticos tienen un rendimiento sobresaliente en términos de selectividad y sensibilidad, implican mayores costos de fabricación, menor vida útil debido a la falta de estabilidad enzimática a largo plazo y escasa reproducibilidad, lo que requiere precauciones operativas adicionales [9]. Además, la complejidad del proceso de inmovilización de las enzimas y la dependencia de la actividad enzimática a las condiciones ambientales, como temperatura, nivel de pH y humedad, entre otros, ha atraído más atención hacia el desarrollo de sensores no enzimáticos [10,25].

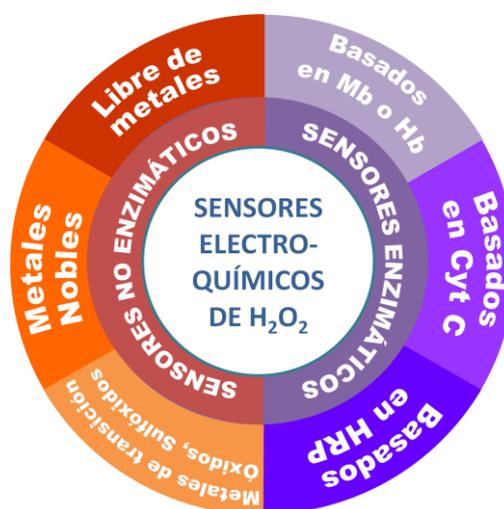


Figura V-1. Estrategias de cuantificación de H_2O_2 enzimático y no enzimático.
Mb: mioglobina. Hb: hemoglobina. Cyt C: citocromo c. HRP: peroxidasa de rábano picante.

Un nuevo concepto emergente, que representa una gran promesa es el desarrollo de sensores no enzimáticos de H_2O_2 , es aquel basado en nanomateriales híbridos, que ofrece una alta sensibilidad, protocolos de inmovilización simples y estabilidad mejorada [5]. La estructura y propiedades de los materiales de electrodos utilizados para la fabricación de sensores proveen a la plataforma resultante las características deseadas en cuanto a su robustez, estabilidad y sensibilidad, entre otras [11].

En esta sección se presentan los resultados obtenidos para la cuantificación sensible y selectiva de H_2O_2 en un enjuague bucal, utilizando un sensor no enzimático, construido a partir del nanohíbrido RGrO-Poli-L-Dopa inmovilizado sobre GCE.

V-1.2. Sección experimental

Para la cuantificación de peróxido de hidrógeno se utilizó una celda electroquímica convencional de tres electrodos, tal como fue descrita en el **capítulo II**, y electrodos de carbono vítreo, modificados con el nanohíbrido sintetizado a partir de GrO y L-Dopa tal como fue descrito en el **capítulo IV** como electrodo de trabajo.

Todas las medidas se realizaron en *buffer* fosfato preparado a partir de fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4) y fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) marca Biopack y ajustando el pH a 7,40 con NaOH 3M. Se empleó una dilución de H_2O_2 comercial al 30% marca J.T. Baker. Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura provista por un sistema Millipore-MilliQ.

La construcción de la curva de calibrado y la cuantificación de H_2O_2 en la muestra de enjuague bucal se llevó a cabo mediante experimentos amperométricos aplicando un potencial de -0,100 V. La muestra fue adicionada directamente en la celda sin pretratamiento alguno.

V-1.3. Resultados y discusión

V-1.3.1. Parámetros analíticos de GCE/RGrO-Poli-L-Dopa para la cuantificación de peróxido de hidrógeno

La cuantificación de H_2O_2 se realizó utilizando como sobrepotencial de trabajo $-0,100$ V, de esta manera se evita la interferencia de compuestos fácilmente oxidables que pueden estar presentes en la matriz de las muestras a analizar [26].

En la **figura V-2** se muestran los registros amperométricos **(A)** para agregados sucesivos de H_2O_2 y la curva de calibración **(B)** obtenida a partir de los mismos. Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado.

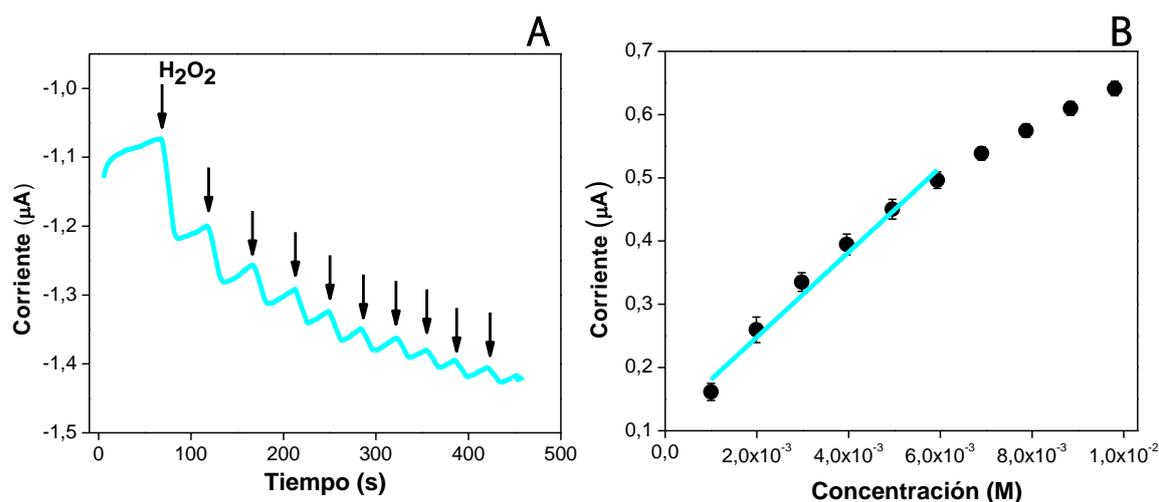


Figura V-2. (A) Registro amperométrico para agregados sucesivos de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3}$ M. (B) Curva de calibración construida a partir de los registros amperométricos. Potencial aplicado: $-0,100$ V

Se obtuvo una sensibilidad de (68 ± 2) $\mu A/M$, con límites de detección y cuantificación de $6,9 \times 10^{-5}$ M y $2,1 \times 10^{-4}$ M respectivamente, una correlación lineal (r) de 0,997, un rango lineal desde $2,1 \times 10^{-4}$ M hasta $6,0 \times 10^{-3}$ M y una desviación estándar de 3,0 %. Dichos parámetros hacen del sensor desarrollado un muy buen contendiente para la cuantificación de H_2O_2 en muestras reales.

V-1.3.2. Análisis de muestra real

La utilidad práctica del sensor es una prueba de suma importancia, con lo cual, la plataforma se desafió a la cuantificación de H_2O_2 en una muestra de enjuague bucal marca Colgate. Se realizaron mediciones por triplicado, para un agregado de 35 μ L de la muestra directamente en celda, tal como se dijo con anterioridad.

Tabla V-1. Comparación de la concentración informada por el fabricante y la obtenida con el sensor propuesto.



	Contenido de H_2O_2
Fabricante	1,5 g / 100 mL
GCE/RGrO-Poli-L-Dopa	(1,4 \pm 0,1) g / 100 mL

En la **tabla V-1** se observa que los resultados obtenidos se encuentran en muy buen acuerdo con lo informado por el fabricante. Es importante mencionar que el sensor propuesto en este trabajo presenta un desempeño excelente y que el mismo es capaz de cuantificar amperométricamente de manera exitosa H_2O_2 por adición directa sin interferencia de la matriz del enjuague bucal.

V-2. Cuantificación de Plomo y Antimonio

V-2.1. Introducción

El análisis forense es una rama importante de la química analítica moderna con muchas implicancias legales y sociales relevantes [27]. La ciencia forense concentra un amplio espectro de áreas que convergen para responder preguntas de interés para el sistema legal, y que están relacionadas con un dado hecho delictivo. Entre tales áreas pueden mencionarse las siguientes: entomología, toxicología, antropología, análisis de ADN, criminalística y todas tienen como objetivo analizar evidencias criminales [28].

Dentro de la criminalística, la identificación de residuos de disparos de armas de fuego tiene una gran importancia en la resolución de hechos delictivos y se relaciona especialmente con la medicina legal [29]. Los residuos de disparos de armas de fuego están asociados con el lugar, el momento de deflagración, el arma y el tipo de munición. El análisis de dichos residuos se realiza de forma rutinaria para resolver la mecánica del hecho y para ello, se intentan la diferenciación de las heridas de entrada y salida, la estimación de la distancia de disparo, el establecimiento del tipo de arma y munición utilizada, el seguimiento de la trayectoria del proyectil y la relación de un individuo con un incidente de disparo. Cumplir cualquiera de estas tareas contribuye a la reconstrucción del hecho delictivo [30].

Cuando se produce la detonación de un arma basada en cartuchos, se producen residuos gaseosos y sólidos que consisten en partículas orgánicas e inorgánicas de la munición que escapan por las aberturas del arma (**figura V-3**) [31]. Los compuestos orgánicos provienen principalmente de las mezclas propulsoras, es decir la pólvora, mientras que los residuos inorgánicos, como los nitratos, los nitritos y las partículas metálicas, se originan en la cápsula iniciadora o detonante, así como en la cubierta del proyectil o su núcleo y del propio cañón del arma (**figura V-4**) [32]. Una vez que estos residuos están en vuelo, se enfrían muy rápidamente dejando rastros particulares sobre las superficies con las que entran en contacto [33]. Se pueden depositar

directamente sobre el arma, la persona que realiza la descarga del arma de fuego y los transeúntes o viajar con el proyectil y alojarse en la víctima o el objetivo y otras superficies cercanas [32,34]. Estos residuos pueden ser identificados por su característica composición inorgánica elemental de plomo, antimonio y bario, mayoritariamente. El análisis de estos residuos proporciona evidencia importante en incidentes con armas de fuego, lo que hace que la calidad y rapidez de su análisis sea crucial [33].



Figura V-3. Representación esquemática de la nube de gases que se genera cuando se dispara un arma de fuego.

Las cantidades de residuos de disparos de armas de fuego se encuentran en el rango de los microgramos o submicrogramos, por lo que el método de análisis elegido debe ser sumamente sensible [35].

Históricamente, la primera prueba química documentada para residuos de disparos fue la prueba de parafina, también llamada prueba dérmica de nitrato, introducida por T. González en el Laboratorio de Policía de la Ciudad de México. La misma consistía en aplicar parafina fundida en la mano y, después de retirarla, rociarla con difenilamina en ácido sulfúrico concentrado para generar un producto de reacción azul. La prueba de parafina detecta nitratos y nitritos. Sin embargo, cayó en desuso debido a su poca confiabilidad ya que se descubrió que reaccionaba con nitratos y cloratos, lo que condujo a una tasa inaceptablemente alta de resultados falsos positivos [36]. Hoy en día el muestreo de rutina antes del análisis, consiste en el uso de trozos de aluminio de 1,3 cm de diámetro cubiertos con una cinta de

carbón adhesiva de doble cara para recolectar las muestras de las manos y la ropa de las personas sospechosas de estar involucradas en un incidente de disparo [37].

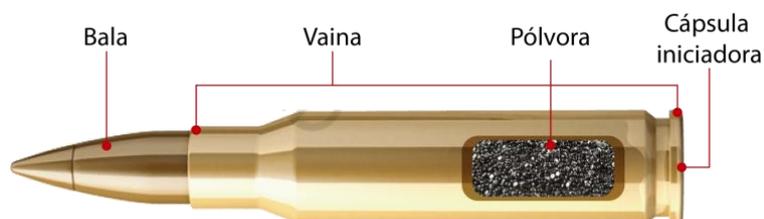


Figura V-4. Esquema general de los componentes de un cartucho de arma de fuego.

La cantidad de restos inorgánicos en las manos de los tiradores depende de varios factores como el tipo de arma y municiones utilizadas, la edad y el estado del arma, la higiene personal y los hábitos ocupacionales del sospechoso, la biometría y el tiempo transcurrido desde el disparo. La cuantificación de los elementos alojados en las manos de los tiradores depende tanto de la calidad del protocolo de muestreo como de la instrumentación analítica empleada [38].

En la actualidad, el alcance de los disparos se calcula rutinariamente comparando visualmente el patrón de residuos de polvo de los cartuchos en las prendas o en la piel de la víctima, con los patrones obtenidos de una serie de disparos de prueba a distancias conocidas, utilizando la misma arma y munición (**figura V-5**) [30]. Un método más confiable y preciso se basa en la determinación analítica de la cantidad de material expulsado de la boca del cañón del arma alrededor del orificio de entrada de la bala. Por lo general, cuanto mayor es la concentración elemental, menor es la distancia de disparo, (**figura V-5**) y es característica de cada marca de arma y munición. Los patrones de residuos de pólvora variarán significativamente, no sólo con la distancia sino también con el calibre u otras características de diferentes armas [29]. En consecuencia, la formación y dispersión de los restos metálicos no son accidentales y pueden servir para comprender mejor las posibles

diferencias en la cantidad y calidad de las partículas que se originan físicamente del mismo cartucho. Los mecanismos de formación y dispersión de los residuos, a pesar de ser dinámicos y complejos, son características repetibles de descarga de cierto tipo de cartucho [39,40], por lo que es factible determinar tanto la distancia como el cartucho empleado en un dado hecho delictivo.

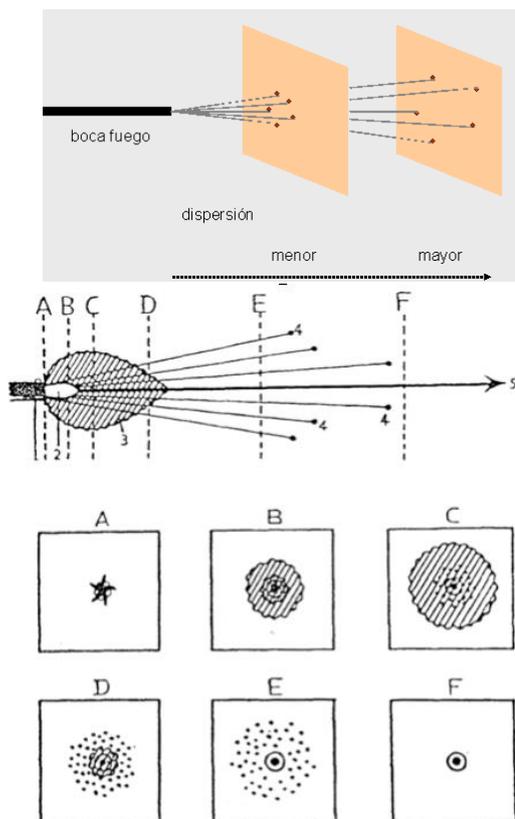


Figura V-5. Representación esquemática de los rastros que dejan los disparos de arma de fuego sobre una superficie para distancias crecientes A→F.

En 1959, Harrison y Gilroy fueron los primeros que determinaron metales (Pb, Sb, Ba y Cu) en los residuos de disparos [41]. Con los años, estos metales han sido detectados y cuantificados por muchas técnicas analíticas diferentes [42,43], que incluyen espectroscopia de absorción atómica con llama o espectrometría de absorción atómica, análisis de activación de neutrones, microscopía electrónica de barrido con espectroscopia dispersiva de

rayos X, análisis de componentes que emplea fluorescencia de rayos X, técnica de emisión de rayos X inducida por protones, entre otras. Dichas metodologías fueron utilizadas para la detección e identificación de residuos inorgánicos de disparos de armas de fuego en prendas de vestir de sospechosos y diferentes objetos [38,39].

Los resultados de un estudio reciente han demostrado que la microscopía electrónica de barrido con espectroscopia dispersiva de rayos X (SEM-EDX), es la metodología empleada actualmente por la policía para la detección de residuos característicos de disparos, puede ser útil para obtener información sobre las diferencias en los tamaños de las partículas, así como la composición elemental dependiendo de la distancia desde el extremo de un arma hasta el lugar de impacto. Por lo tanto, se estableció que SEM-EDX era la técnica ideal para analizar muestras y poder proporcionar datos de composición morfológica y elemental debido a su capacidad no destructiva [33,44,45]. Aunque se considera específico, el análisis de metales pesados con estas metodologías, ofrece una sensibilidad de diagnóstico moderada, requiere instrumentación costosa, largos tiempos de análisis y es muy exigente en términos de habilidades profesionales, mano de obra, mantenimiento y servicio [46,47].

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es una técnica alternativa viable y se han reportado estudios donde ICP-MS se ha utilizado para estimar la distancia de disparo a través del análisis de los residuos inorgánicos en diferentes objetivos después de un disparo [38,48]. Aún así dicha técnica requiere de personal altamente calificado y equipamiento sumamente costoso.

Las crecientes necesidades forenses y de seguridad, han generado grandes demandas de herramientas efectivas desplegadas en campo para detectar residuos de disparos de manera confiable, rápida y simple. La detección *in situ* de materiales residuales de la descarga de armas de fuego es particularmente importante para obtener información valiosa en diversas investigaciones forenses [46].

La detección electroquímica se ha utilizado durante décadas en áreas de química analítica, ciencias ambientales y ciencias de la salud, por mencionar algunas. Sin embargo, las aplicaciones forenses de la electroquímica son muy escasas, a pesar de que ofrecen ventajas únicas para el análisis químico de venenos, drogas y materiales explosivos. Estos métodos emergentes tienen el potencial de escalar la tecnología a dispositivos portables de mano, apuntar a una gran variedad de especies con límites de detección bajos y ofrecer simplicidad de operación [49].

Algunos de los elementos presentes en los rastros que quedan luego de la detonación de un arma, como el plomo [50-52] y el antimonio [53-55], se han detectado mediante sensores electroquímicos para control de calidad de muestras medioambientales. Los sensores electroquímicos pueden proporcionar respuestas rápidas y simples en diferentes muestras. También se pueden miniaturizar y se pueden utilizar en análisis de campo. En general, los análisis electroquímicos son más baratos que los espectroscópicos convencionales, como la espectrometría de absorción atómica y la espectrometría de masas [40].

La capacidad de generar rápidamente la detección simultánea de más de un metal en un solo experimento y la existencia de dispositivos electroquímicos compactos, de baja potencia y fáciles de usar, es particularmente atractiva para investigaciones descentralizadas en la escena del crimen [56]. A pesar de ello, desde las primeras investigaciones electroquímicas en el área forense-balística por el grupo de G. W. vanLoon en 1977 [57] y las más recientes pruebas realizadas por otros investigadores [49,56,58,59], sigue siendo una metodología pobremente explorada para la detección de residuos, tanto orgánicos como inorgánicos, en restos de disparos de armas de fuego.

En esta sección se describe la optimización de una plataforma sensora sencilla para la detección simultánea de plomo y antimonio en residuos de disparos de armas de fuego mediante *stripping* voltamperométrico. Debido a que RGrO-Poli-L-Dopa presenta numerosos grupos funcionales, capaces de

interaccionar con metales de manera tal de preconcentrarlos en la superficie del electrodo, la respuesta electroquímica de oxidación de Pb(II) y Sb(III) se vería notablemente incrementada. Luego de un minucioso estudio, el sensor fue empleado con éxito para la confirmación de disparo de arma de fuego por parte de un sospechoso y por otro lado, por primera vez se logró determinar la distancia a la cual se efectuó el disparo así como también el tipo de cartucho empleado en el mismo.

V-2.2. Sección experimental

Para la detección de restos inorgánicos de residuos de disparos de arma de fuego se utilizó una plataforma sensora construida a partir de RGrO-Poli-L-Dopa sintetizado como se explico en el **capítulo IV** inmovilizado sobre GCE previamente pulido y acondicionado.

Se utilizaron soluciones estándar de absorción atómica de plomo (II) (1000 ppm) marca Sigma-Aldrich y de antimonio (III) 1000 ppm marca Chem-Lab. Las diluciones de los estándares se realizaron en *buffer* acetato 0,10 M pH 5,00, preparado con acetato de sodio marca Biopack y ácido acético glaciar marca Cicarelli. Las mediciones voltamperométricas se realizaron en una mezcla 50/50 de *buffer* acetato y HCl 1,00 M (marca J.T.Baker).

V-2.2.1. Metodología de detección de plomo y antimonio

La cuantificación electroquímica de metales pesados presentes en residuos de disparos de armas de fuego, se llevó a cabo utilizando como metodología de detección el *stripping* voltamperométrico de adsorción, tal como se muestra en la **figura V-6**. El mismo consta de 4 etapas. En primera instancia, se preconcentran los metales bajo convección forzada, de manera de asegurar la llegada del analito a la superficie del electrodo. Dicha acumulación se realiza a potencial de circuito abierto (**figura V-6.A**), mediante la interacción de los metales durante un dado tiempo con grupos funcionales

de RGrO-Poli-L-Dopa capaces de quelar tanto al plomo como al antimonio. Una vez producida la acumulación, se realiza una etapa de enjuague y un cambio de medio (**figura V-6.B**) de los electrodos para eliminar la fracción no acomplejada del metal. Posteriormente, en la tercera etapa, se introduce el electrodo en una celda electroquímica convencional de tres electrodos, conteniendo una mezcla 50/50 de *buffer* acetato (0,10 M)/HCl (1,0 M) (**figura V-6.C**), de manera de producir la reducción de los metales por la aplicación de potencial durante un tiempo determinado. Por último, inmediatamente después de la reducción, en la cuarta etapa, se realiza la detección y la señal analítica es obtenida mediante la reoxidación de las especies preconcentradas utilizando un barrido voltamperométrico lineal (**figura V-6.D**).

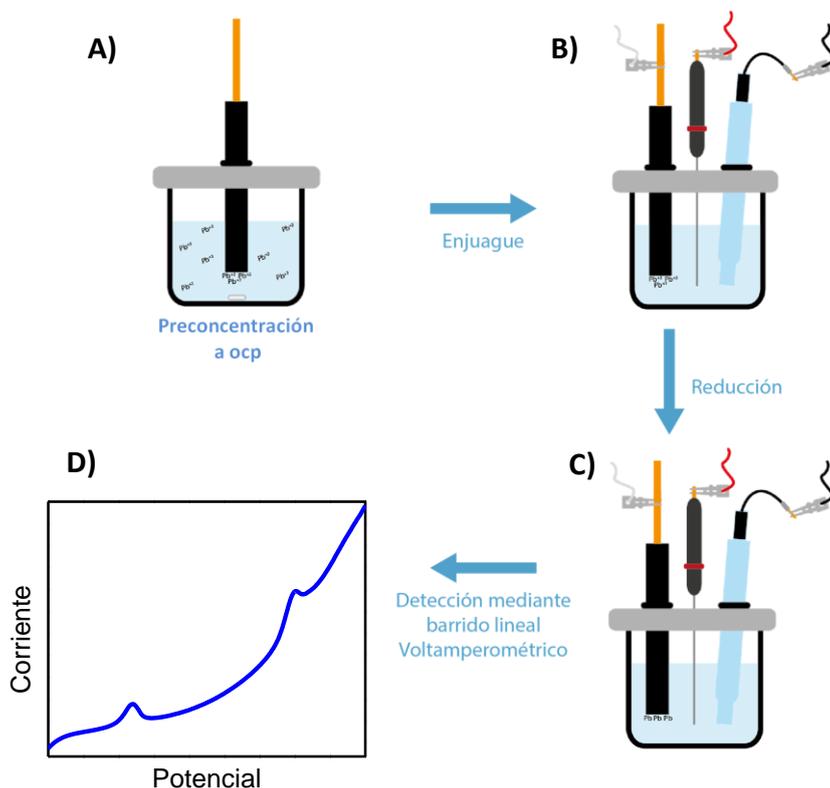


Figura V-6. Estrategia y metodología de detección de metales pesados en residuos de disparos de arma de fuego. **A)** Etapa de preconcentración, **B)** enjuague y cambio de medio, **C)** etapa de reducción del analito preconcentrado y **D)** detección mediante barrido lineal voltamperométrico.

V-2.2.2. Obtención y pretratamiento de muestras reales

Los disparos fueron realizados por peritos balísticos en un polígono forense. Las muestras de las manos del tirador se recolectaron frotando las zonas de sobre las cuales se depositan los residuos (**figura V-7.A**) mediante el empleo de hisopos. De la misma forma se obtuvieron, a modo de control, muestras en iguales condiciones de las manos de una persona que no accionó en ningún momento un arma de fuego y finalmente, los hisopos fueron almacenados en tubos *Eppendorf* cerrados herméticamente hasta el momento del análisis. Por otra parte, se obtuvieron muestras de prendas impactadas a diferentes distancias y con diferentes cartuchos. Se realizaron disparos por triplicado sobre la superficie de retazos de tela para cada distancia y para cada tipo de cartucho. Porciones de las prendas de 3 cm x 3 cm fueron cortadas de manera tal que el orificio de entrada del proyectil quedara en el centro, tal como muestra la **figura V-7B**, para su posterior análisis.

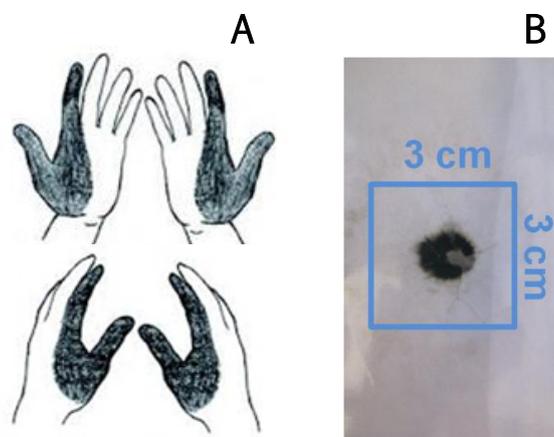


Figura V-7. (A) Zona de recolección de muestras en manos de sospechosos.
(B) Zona de recolección de muestra de telas y prendas.

Para la extracción de los metales, en ambos tipos de muestras, tanto los hisopos como las telas, fueron sumergidos en un vaso de precipitados conteniendo 3,00 mL de solución de HNO_3 1,00 M y sonicados durante 10 minutos en un baño ultrasónico. A continuación, se tomaron alícuotas de 500

μL de las soluciones obtenidas, las cuales fueron introducidas directamente en la celda electroquímica para realizar la detección mediante la metodología anteriormente descrita.

V-2.3. Resultados y discusión

V-2.3.1. Comportamiento electroquímico de Plomo sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa

Hasta hace relativamente pocos años la mayoría de los proyectiles eran fabricados mayoritariamente a base de plomo o una mezcla de plomo y antimonio. Por cuestiones de toxicidad en su manufactura y de dureza de los proyectiles, se comenzaron a emplear mayores proporciones de antimonio, que a la vez soslayaba las crecientes preocupaciones por la contaminación producida por plomo [32].

Se comenzó evaluando el comportamiento electroquímico de plomo sobre la plataforma sensora. Dado que el *stripping* voltamperométrico es una de las técnicas más empleadas actualmente en el área electroquímica, debido a la sustancial mejora de la sensibilidad, selectividad y límite de detección que pueden obtenerse gracias a la preconcentración de los analitos en la superficie de los electrodos, dicha metodología fue empleada para la cuantificación de plomo y antimonio. En la **figura V-8.A** se muestran los barridos voltamperométricos lineales obtenidos luego de la preconcentración de una solución de Pb (II) $1,0 \times 10^{-4}$ M a potencial de circuito abierto durante 3 minutos sobre diferentes superficies, GCE (—), GCE/GrO (—) y GCE/RGrO-Poli-L-Dopa (—). Cuando Pb (II) es puesto en contacto con un electrodo de carbono vítreo sin modificación alguna (—) no se observa ninguna señal analítica que dé cuenta de la reoxidación de plomo. Esto se relaciona con la incapacidad de esta superficie de acumular el metal, para posteriormente producir la reducción y la consecuente reoxidación que da origen a la aparición de la señal.

Cuando Pb (II) es preconcentrado sobre GCE/GrO y GCE/RGrO-Poli-L-Dopa, se observa un pico característico de la oxidación de plomo centrado en -0,470 V, con corrientes de 4,09 y 87,54 μA respectivamente.

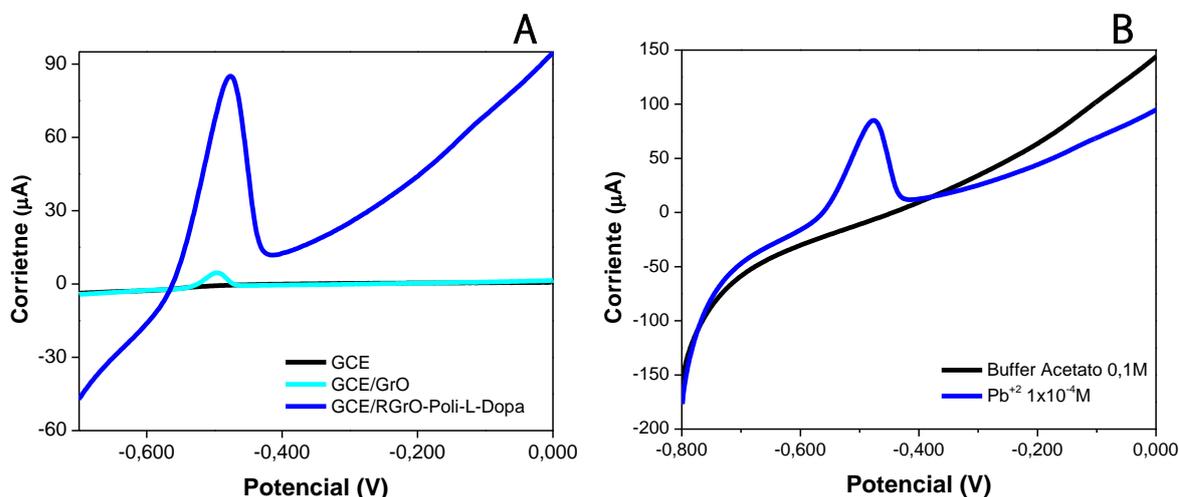


Figura V-8. (A) Voltamperogramas lineales de Pb(II) $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ luego de la acumulación sobre GCE (—), GCE/GrO (—) y GCE/RGrO-Poli-L-Dopa (—). **(B)** Voltamperograma lineal luego de la etapa de preconcentración en ausencia (—) y presencia (—) de Pb(II) $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. Velocidad de barrido 0,100 V/s

Esta exacerbación en un factor de 21 veces la señal analítica sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa, puede ser explicada si se analiza la estructura del nanohíbrido: en primer lugar se da por la mejora en la transferencia electrónica debido a la restitución de la estructura conjugada de la lámina gráfica sp^2 presente en RGrO, a diferencia de GrO comercial que presenta una mayor densidad de defectos que hacen del mismo un material menos conductor. Por otra parte, pero no menos importante, la mayor capacidad de quelar metales de RGrO-Poli-L-Dopa ya que presenta no sólo grupos carboxílicos remanentes de la nanoestructura de carbono luego del proceso de reducción, sino además los grupos amino que aporta el polímero, que poseen gran afinidad por el plomo y pueden preconcentrar por acomplejamiento, una mayor cantidad del analito en la superficie [60,61].

Adicionalmente, sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa se realizaron experimentos de acumulación en presencia y ausencia de Pb (II) $1,0 \times 10^{-4}$ M. Como puede verse en la **figura V-8.B**, cuando la acumulación se realiza en ausencia del analito, se obtiene un registro amperométrico limpio, sin señal que dé cuenta de algún proceso faradaico. Este hecho corrobora que la señal observada cuando el experimento se realiza en presencia de Pb (II) se puede relacionar directamente con la presencia y concentración del mismo.

V-2.3.2. Optimización de los parámetros experimentales para la detección simultánea de plomo y antimonio

Como fue mencionado anteriormente, el *stripping* voltamperométrico de adsorción, es una poderosa herramienta para la cuantificación de diversos analitos y consta de varios pasos y etapas. Dado la multiplicidad de variables del sistema, se realizó un análisis exhaustivo variando de a un parámetro a la vez, a fin de conseguir la señal analítica de mayor intensidad y reproducibilidad para ambos metales. Entre las variables a optimizar se encuentran: a) el tiempo de preconcentración de los analitos, b) el tiempo y el potencial aplicado para la reducción de los metales acumulados en la superficie del electrodo luego del enjuague y posterior cambio de medio y c) el medio en el cual se lleva a cabo dicha reducción y la inmediata obtención de la señal analítica por barrido voltamperométrico lineal. Finalmente, para el análisis simultáneo en un solo barrido de potencial de Pb (II) y Sb (III), es necesario encontrar una situación de compromiso para la cual, con los parámetros óptimos determinados se obtengan las señales más reproducibles y con las mayores sensibilidades para ambos analitos.

V-2.3.2.1. Estudio del tiempo de preconcentración

A fin de determinar el tiempo óptimo de preconcentración de plomo con GCE/RGrO-Poli-L-Dopa, se estudiaron las corrientes obtenidas a partir de

experimentos de barrido voltamperométrico lineal para 1,0, 2,0, 3,0 y 5,0 minutos a potencial de circuito abierto de interacción de la plataforma en *buffer* acetato 0,10 M de pH 5,00 conteniendo Pb (II) $1,0 \times 10^{-4}$ M. En la **figura V-9** se presentan los valores de corriente obtenidas aplicando un potencial de -0,700 V durante 3 minutos para su reducción. Tal como puede observarse, conforme aumenta el tiempo de preconcentración lo mismo ocurre con la señal obtenida, alcanzando su máximo valor con 3,0 min de acumulación, tiempo a partir del cual la señal decae ligeramente y disminuye la reproducibilidad, con lo cual se tomó como tiempo óptimo de preconcentración 3,0 min a potencial de circuito abierto.

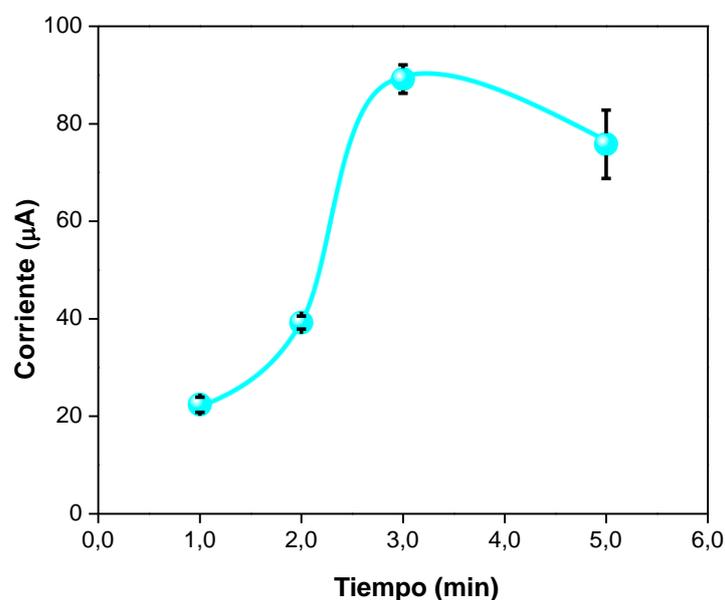


Figura V-9. Dependencia de la señal de oxidación de Pb (II) $1,0 \times 10^{-4}$ M con el tiempo de preconcentración sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. Potencial de reducción -0,700 V durante 3,0 minutos.

Se procedió de un modo similar para el caso de antimonio, evaluándose la dependencia de la corriente de oxidación de antimonio con el tiempo de acumulación mediante *stripping* voltamperométrico, empleando una solución de Sb (III) $1,0 \times 10^{-4}$ M y se tomaron arbitrariamente un tiempo de 3 minutos y un potencial de -0,400 V para la instancia de reducción. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura V-10**.

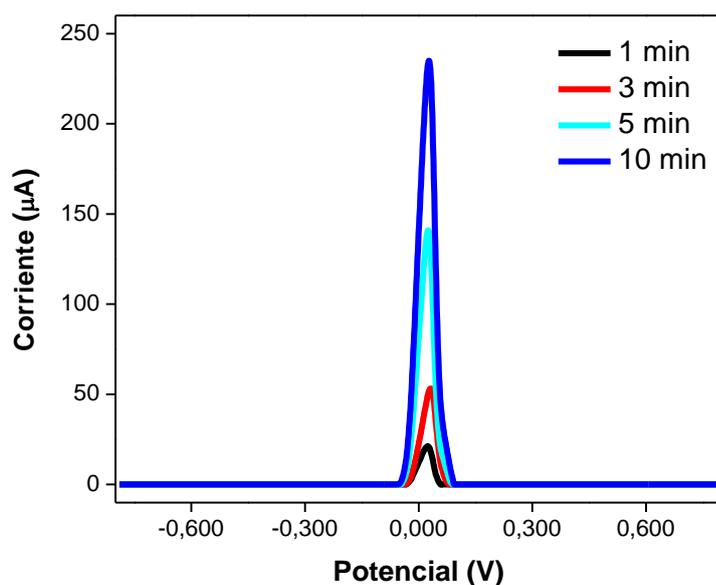


Figura V-10. Dependencia de la señal analítica de Sb (III) $1,0 \times 10^{-4}$ M con el tiempo de preconcentración: 1,0 min (—), 3,0 min (—), 5,0 min (—) y 10,0 min (—) sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. Potencial de reducción -0,400 V durante 3,0 minutos.

Puede notarse que la señal analítica obtenida aumenta conforme lo hace el tiempo de acumulación del metal. Si bien podría esperarse que dicha señal mejore a tiempos mayores a 10 minutos, este valor fue determinado como óptimo por cuestiones de practicidad y de tiempos de operación.

V-2.3.2.2. Estudio del tiempo y potencial de reducción

Tanto el estudio del tiempo como del potencial de reducción se llevó a cabo utilizando soluciones de Pb (II) y Sb (III) $1,0 \times 10^{-4}$ M preparadas en *buffer* acetato 0,10 M pH 5,00.

La **figura V-11** muestra los diferentes voltamperogramas con la línea de base corregida, donde se evidencia la dependencia de la intensidad de corriente obtenida para Pb (II) con el potencial de reducción aplicado. Se estudiaron potenciales de -0,500 V, -0,600 V, -0,700 V, -0,800 V y -0,900 V. Para dichos experimentos se mantuvieron constantes el tiempo de preconcentración, optimizado previamente, y el tiempo de reducción fue fijado

arbitrariamente en 3,0 minutos. Se observa que la corriente aumenta mientras más negativos son los potenciales de reducción y que para valores más negativos que -0,700 V no se observan cambios significativos en la señal obtenida, pero si se manifiesta una mayor dispersión de los datos obtenidos. De esta manera se concluye que -0,700 V es el potencial de reducción óptimo para la cuantificación de Pb (II) preconcentrado en la superficie del electrodo.

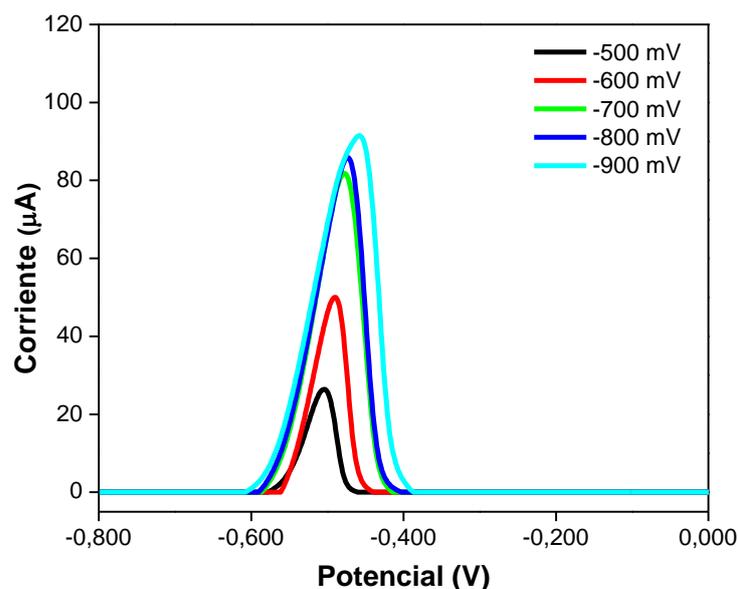


Figura V-11. Dependencia de la señal analítica de Pb (II) $1,0 \times 10^{-4}$ M con el potencial de reducción: -0,500 V (—), -0,600 V (—), -0,700 V (—), -0,800 V (—) y -0,900 V (—) sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. Tiempo de preconcentración 3,0 min y tiempo de reducción 3,0 min.

Por otro lado, se optimizó el tiempo durante el cual se aplica el potencial de reducción de -0,700 V, manteniendo constantes el tiempo de interacción y la concentración de Pb (II).

En la **figura V-12** se presenta la dependencia de la corriente de oxidación de Pb (II) con el tiempo utilizado en la reducción del analito previamente acumulado. Se observa que la respuesta obtenida es mayor cuanto mayor es el tiempo de reducción, hasta 3,0 minutos, tiempo para el cual la respuesta alcanza su máximo valor para luego mantenerse constante, lo que da cuenta que dicho tiempo es suficiente para producir la reducción del plomo previamente acumulado en la superficie del electrodo. Por

cuestiones de reproducibilidad y operacionales, en cuanto a menores tiempos para llevar a cabo el análisis, se determina como parámetro óptimo un tiempo de reducción de 3,0 minutos.

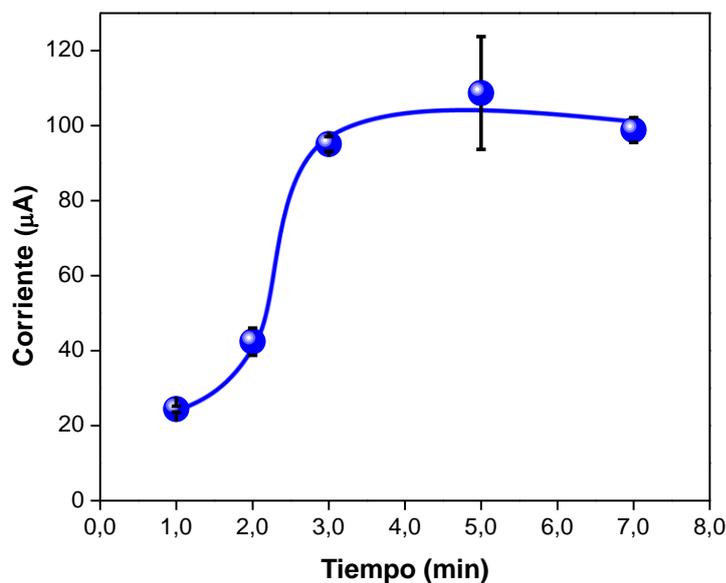


Figura V-12. Dependencia de la señal analítica de Pb (II) $1,0 \times 10^{-4}$ M con el tiempo de reducción sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. Tiempo de preconcentración 3,0 minutos y potencial de reducción -0,700 V.

Sobre la base de los experimentos, un análisis crítico de los valores de corriente para el proceso de reoxidación y de su reproducibilidad, así como del tiempo necesario para realizar el experimento las condiciones experimentales óptimas de detección de Pb (II) son las siguientes: tiempo de preconcentración a potencial de circuito abierto de 3,0 minutos, potencial de reducción -0,700 V y tiempo de reducción 3,0 minutos.

Por otro lado, se realizó un estudio para evaluar la dependencia de la señal de oxidación de antimonio con el tiempo y potencial de reducción, la cual fue evaluada por barrido voltamperométrico lineal luego de la acumulación a circuito abierto sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa en condiciones de convección forzada durante el tiempo optimizado con anterioridad.

Se estudiaron potenciales de reducción de -0,400 V; -0,500 V; -0,600 V y -0,700 V, manteniendo fijo el tiempo durante el que se aplicaron dichos

potenciales en 3,0 minutos. Tal como se observa en la **figura V-13** la corriente obtenida no varía de manera significativa para los potenciales estudiados, por lo que se seleccionó -0,700 V como potencial de reducción como parámetro óptimo para la cuantificación del analito, dado que es el mismo que se determinó para la detección de Pb (II), lo que permitiría su detección simultánea.

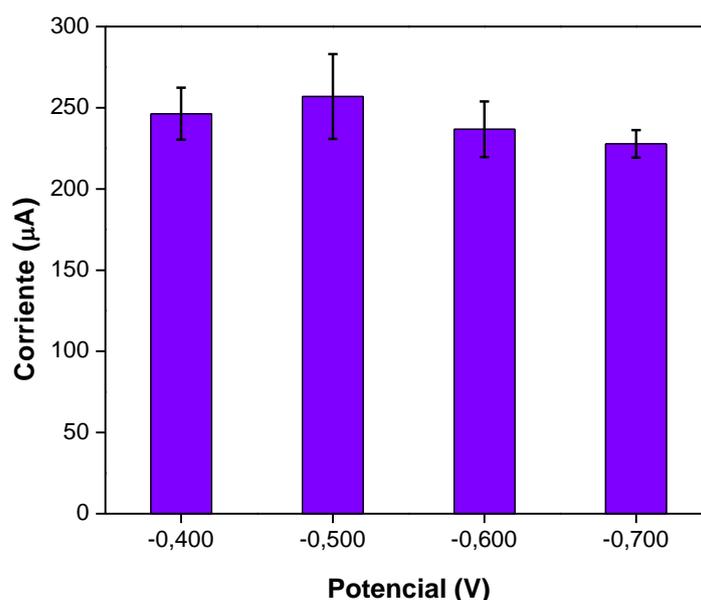


Figura V-13. Dependencia de la señal analítica de Sb (III) $1,0 \times 10^{-4}$ M con el potencial de reducción sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. Tiempo de preconcentración 10,0 minutos y tiempo de reducción 3,0 minutos.

Otro aspecto estudiado fue la dependencia de la corriente de oxidación de Sb (III) $1,0 \times 10^{-4}$ M con el tiempo de reducción empleado: 1,0 min, 3,0 min y 5,0 min, manteniendo constantes los parámetros anteriormente optimizados. En la **figura V-14** puede notarse que la señal asociada a la reoxidación de Sb (III) permanece invariante a medida que aumenta el tiempo de reducción, lo que sugiere que a tiempos cortos se logra reducir la totalidad del metal adsorbido en la superficie y por cuestiones de optimización de tiempos, 1,0 minuto es determinado como parámetro más adecuado para la cuantificación de antimonio.

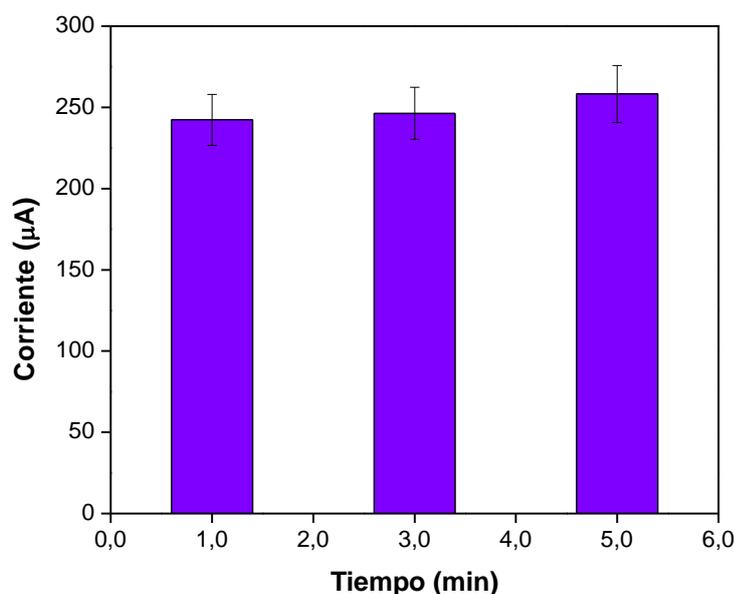


Figura V-14. Dependencia de la señal analítica de Sb (III) $1,0 \times 10^{-4}$ M con el tiempo de reducción sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. Tiempo de preconcentración 10,0 minutos y potencial de reducción -0,400 V.

V-2.3.2.3. Estudio del medio de reducción

A fin de cuantificar simultáneamente en una sola medida tanto plomo como antimonio, se realizaron estudios para evaluar el medio óptimo en el cual se realiza el paso de reducción sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa y la posterior obtención de señal por barrido voltamperométrico lineal. En la **figura V-15.A** y **V-15.B** se muestran los barridos lineales obtenidos para la acumulación de Pb (II) $1,0 \times 10^{-4}$ M y Sb (III) $1,0 \times 10^{-4}$ M, cuando la etapa de reducción es realizada en diferentes medios, *buffer* acetato 0,10 M pH 5,00 (—), HCl 1,00 M (—) y una mezcla de *buffer* acetato 0,10 M/HCl 1,00 M 50:50 (—). Se observa que cuando la reducción es llevada a cabo en *buffer* acetato la señal obtenida para Pb (II) (**figura V-15.A** trazo negro) es óptima, pero la señal de Sb (III) (**figura V-15.B** trazo negro) es nula. Soo Beng Khoo y col. [62] estudiaron la influencia del medio de reducción para la cuantificación de Sb (III) por *stripping* voltamperométrico y concluyeron que las condiciones óptimas para su detección es la utilización de soluciones ácidas, con presencia de cloruros que acomplejan los iones Sb (III) una vez que el metal es reoxidado

en la superficie del electrodo, facilitando de esta manera el proceso catódico y maximizando las señales analíticas asociadas a dicho proceso.

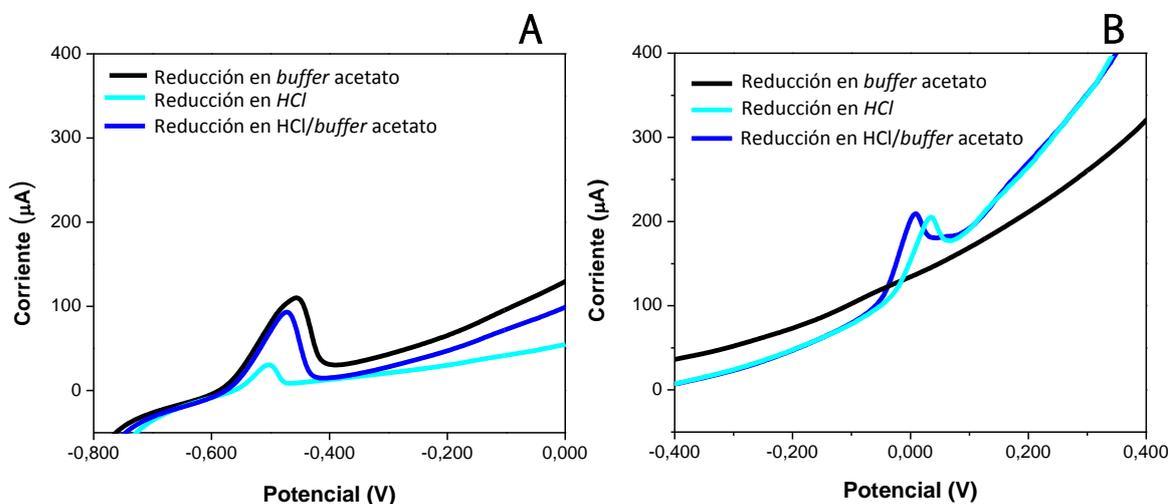


Figura V-15. Dependencia de la señal analítica de Pb(II) $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ (A) y Sb(III) $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ (B) con el medio en el que se realiza la reducción. Buffer acetato 0,10 M (—), HCl 1,00 M (—) y Buffer acetato 0,10 M/HCl 1,00 M 50/50 (—). Tiempo de preconcentración 3,0 min, potencial de reducción -0,700 V y tiempo de reducción 3,0 min.

De esta manera se ensayaron experimentos en los cuales se utilizó como medio de reducción HCl 1,00 M y se concluyó que si bien se obtiene una buena respuesta para antimonio, la señal asociada a la oxidación del plomo cae considerablemente. En consecuencia, buscando una situación de compromiso, las reducciones fueron llevadas a cabo en una mezcla 50:50 de *buffer* acetato 0,10 M pH 5,00 y HCl 1,00 M. Tal como se muestra en las gráficas de **figura V-15**, en dicho medio, se logró una buena respuesta de antimonio sin producir cambios significativos en la señal analítica de plomo, con lo cual dicha mezcla se escogió como medio óptimo para lograr la detección simultánea de ambos metales.

V-2.3.2.4. Parámetros óptimos para la detección simultánea de plomo y antimonio

En la **tabla V-2** se presenta un resumen de los parámetros óptimos para la detección individual tanto de plomo como de antimonio. A fin de poder cuantificar ambos metales de forma simultánea en un solo experimento y, de manera de no perder la sensibilidad en la detección de ambos analitos, se buscan parámetros en los cuales las señales para ambos metales sean de mayor intensidad y reproducibilidad sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. Tal como fue descrito en la **sección IV-2.3.2.3**, los futuros experimentos se realizaron utilizando como medio de reducción una mezcla 50:50 de *buffer* acetato 0,10 M y HCl 1,00 M.

Tabla V-2. *Resumen de parámetros óptimos para la detección de plomo y antimonio sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa.*

	Pb (II)	Sb (III)
Tiempo de acumulación	3 min	10 min
Potencial de reducción	-0,700 V	-0,700 V
Tiempo de reducción	3 min	1 min

Por otra parte, el tiempo de preconcentración de Pb (II) y Sb (III) se fijó en 10,0 minutos, ya que el antimonio requiere de mayores tiempos para acumularse en la superficie de los electrodos. También se pudo observar que para producir la reducción del plomo son necesarios potenciales más negativos, en tanto que la respuesta de antimonio no varía significativamente cuando los potenciales aplicados son mayores. Finalmente, en cuanto al tiempo durante el cual es aplicado dicho potencial, fue posible determinar que se requiere de tiempos más largos para reducir el plomo presente en la superficie de los electrodos, mientras que la señal correspondiente a la

reoxidación del antimonio es prácticamente independiente del tiempo de reducción aplicado. En consecuencia aplicar $-0,700$ V durante 3 minutos son los parámetros seleccionados como los más adecuados para cuantificar los analitos de manera simultánea en un solo experimento.

En la **figura V-16** se muestra un registro voltamperométrico, con la línea de base corregida, obtenido luego de la acumulación de una solución que contiene Pb (II) y Sb (III) $1,0 \times 10^{-6}$ M. En la misma se exhiben dos picos bien definidos a $-0,470$ V y $-0,018$ V para Pb (II) y Sb (III) respectivamente.

Se observa una excelente resolución de los dos procesos de oxidación de los metales que hace factible la futura cuantificación simultánea de ambos analitos en un mismo experimento.

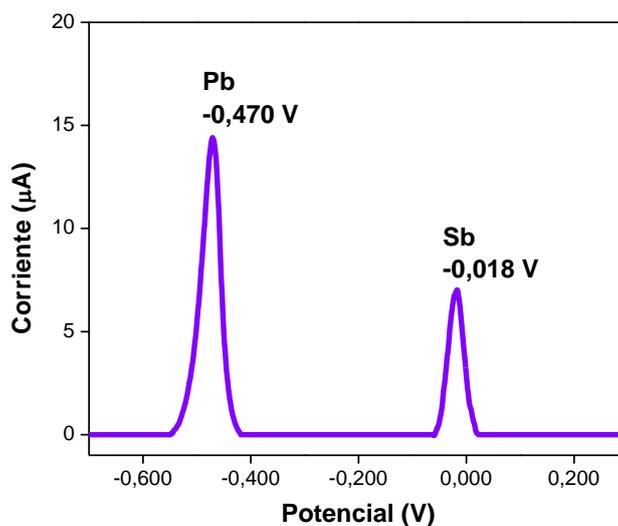


Figura V-16. Barrido voltamperométrico lineal obtenido luego de la acumulación en una solución de Pb (II) $1,0 \times 10^{-6}$ M y Sb (III) $1,0 \times 10^{-6}$ M sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. Condiciones de preconcentración: 10,0 min a o.c.p. Condiciones de reducción: $-0,700$ V durante 3,0 min.

V-2.3.3. Parámetros analíticos de GCE/RGrO-Poli-L-Dopa para la cuantificación simultánea de plomo y antimonio

Una vez optimizadas las condiciones para la detección simultánea de los analitos, se realizaron curvas de calibración para Pb (II) en presencia y ausencia de una determinada cantidad de Sb (III), y viceversa, es decir curvas de calibrado para antimonio en presencia y ausencia de una dada cantidad de plomo, de manera tal de evaluar la posible competencia de los metales por los sitios de adsorción en la superficie de los electrodos.

Las **figuras V-17.A y V-17.B** muestran la dependencia de las corrientes de oxidación con la concentración de Pb (II) en ausencia y presencia de una concentración fija de 0,20 ppm de Sb (III), respectivamente. Las **figuras V-17.C y V-17.D** presentan las curvas de calibrado correspondientes.

De acuerdo a los resultados expuestos, se puede mencionar que, por un lado, se observa una relación lineal entre la corriente de oxidación y la concentración de plomo, tanto en presencia como en ausencia de antimonio (**figuras V-17.C y V-17.D**). Por otro lado, es posible la cuantificación de ambos analitos de manera simultánea sin interferencia de uno con el otro, no solo debido a que las señales analíticas se encuentran separadas en potencial, como se mencionó con anterioridad, sino que además, la presencia de antimonio no afecta la respuesta en corriente obtenida para plomo hasta concentraciones elevadas, en este caso $\geq 1,00$ ppm, donde tanto las corrientes obtenidas para plomo y antimonio son menores a las esperadas, probablemente debido a la competencia entre ambos por los sitios de adsorción.

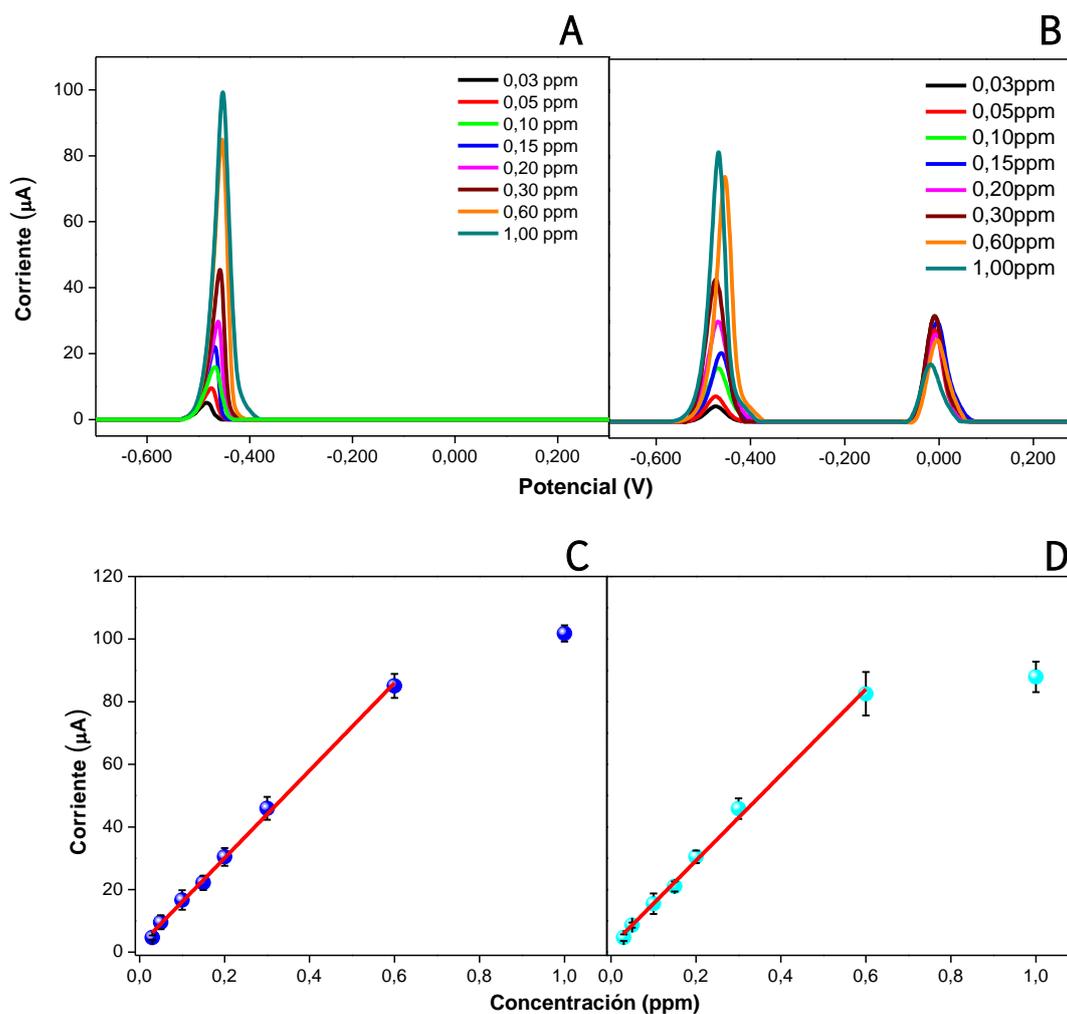


Figura V-17. Registros voltamperométricos para diferentes concentraciones de Pb (II) sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa en ausencia (A) y en presencia de Sb (III) 0,20ppm (B). (C) y (D) Curvas de calibración de Pb (II) en ausencia y presencia de Sb (III), respectivamente obtenidas a partir de A y B.

En la **tabla V-3** se presentan comparativamente los parámetros analíticos obtenidos de las curvas de calibración, en donde efectivamente se corrobora que la presencia de antimonio no interfiere en la cuantificación de plomo. Por otra parte, cabe señalar que el sensor propuesto presenta una muy buena correlación lineal, con un amplio rango de concentraciones, sensibilidad y límite de detección similares a los reportados en bibliografía para la detección de plomo por metodologías electroquímicas [52,63-65]. Además, es importante resaltar que el límite de detección establecido de 19 ppb, es

extremadamente prometedor para el futuro empleo del sensor en la cuantificación de plomo en residuos de disparos de arma de fuego.

Tabla V-3. *Parámetros analíticos para la cuantificación de plomo en presencia y ausencia de antimonio sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa*

	Pb (II)	Pb (II) + Sb (III)
r	0,997	0,995
Sensibilidad ($\mu\text{A/ppm}$)	(140 \pm 3)	(137 \pm 4)
LOD (ppb)	16	19
LOQ (ppb)	48	57
SD	0,02	0,03
Rango lineal (ppb)	Desde 16 hasta 600	Desde 19 hasta 600

Por otro lado, se realizaron estudios de la dependencia de la intensidad de la señal asociada a la oxidación de antimonio con la concentración del mismo, en ausencia y presencia de 0,20 ppm de Pb (II). En las **figuras V-18 A** y **V-18.B** se presentan los barridos voltamperométricos lineales obtenidos para diferentes concentraciones de Sb (III) en ausencia y presencia de Pb (II) respectivamente, sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. Las correspondientes curvas de calibración se presentan en las **figuras V-18.C** y **V-18.D**. Puede notarse una relación lineal entre la concentración del analito en estudio y la respuesta en corriente obtenida y, por otra parte, cabe señalar que la señal observada en ausencia y presencia de plomo no cambia, excepto a concentraciones elevadas, donde las respuestas obtenidas son ligeramente menores a las esperadas, probablemente por competencia de sitios durante la preconcentración.

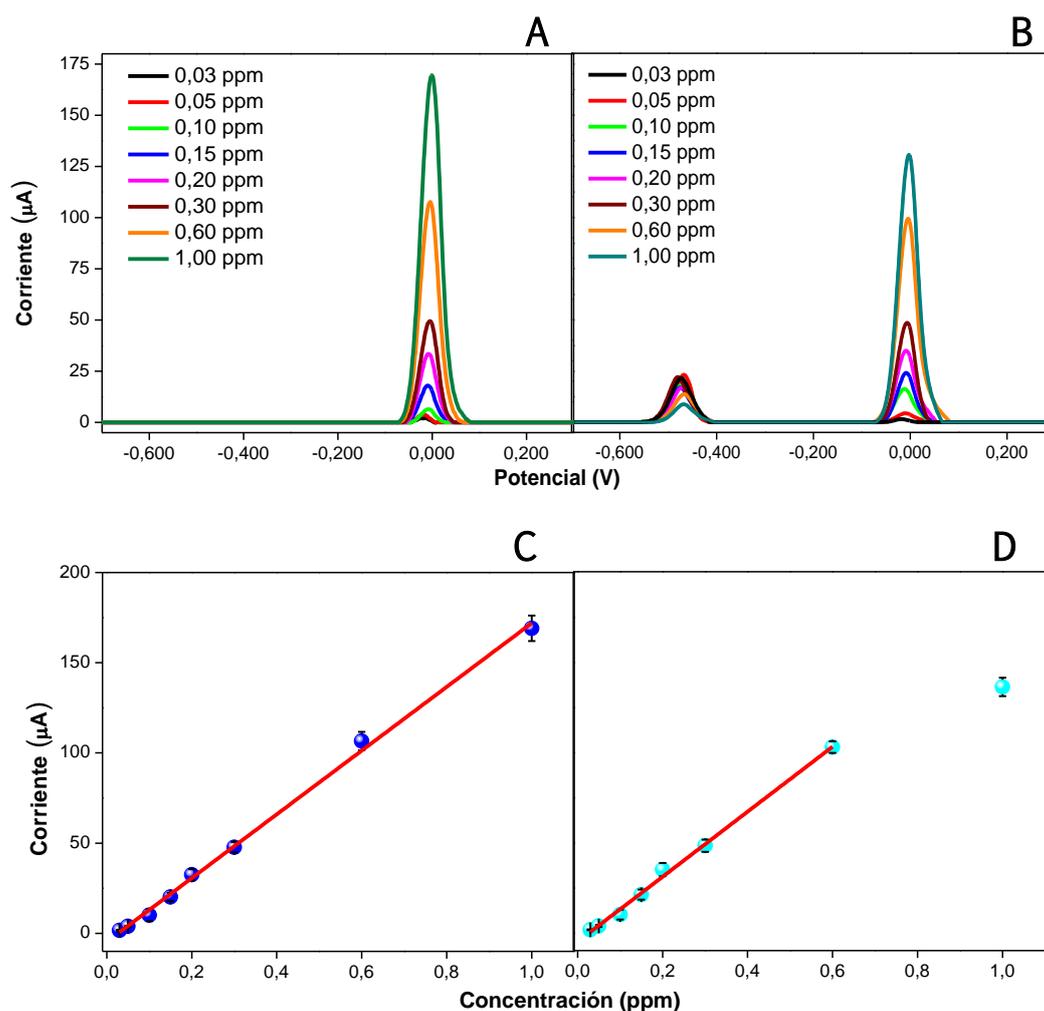


Figura V-18. Registros voltamperométricos para diferentes concentraciones de Sb (III) sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa en ausencia de Pb (II) (A) y en presencia de Pb (II) 0,20ppm (B). (C) y (D) Curvas de calibración de Sb (III) en ausencia y presencia de Pb (II), respectivamente obtenidas a partir de A y B.

Un análisis detallado de los parámetros analíticos se presentan en la **tabla V-4**, los datos obtenidos revelan que la presencia de plomo no interfiere en la cuantificación de antimonio, excepto cuando la concentración del mismo es elevada, como fue mencionado con anterioridad. Es importante destacar los excelentes parámetros analíticos de GCE/RGrO-Polo-L-Dopa, donde se destacan la excelente correlación lineal y los bajos límites de detección (23 ppb), nuevamente comparables a los reportados previamente en bibliografía, [54,66-68] lo que posibilitaría el empleo de la plataforma para la cuantificación de

antimonio de manera sensible y selectiva en muestras de residuos de disparos de arma de fuego.

Tabla V-4. *Parámetros analíticos para la cuantificación de antimonio en presencia y ausencia de plomo sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa*

	Sb (III)	Sb (III) + Pb (II)
r	0,997	0,995
Sensibilidad ($\mu\text{A/ppm}$)	(176 \pm 3)	(180 \pm 5)
LOD (ppb)	22	23
LOQ (ppb)	66	69
SD	0,02	0,03
Rango lineal (ppb)	Desde 22 hasta 1000	Desde 23 hasta 600

Es importante destacar que, diversos reportes bibliográficos [62,66] postulan que los grupos hidroxilos son los responsables de la acumulación de antimonio en la superficie de los electrodos. A partir de estudios centrados en la interacción de Sb (III) con polímeros generados a partir de moléculas ricas en grupos hidroxilos, tales como pirogalol, fenol, resorcinol, catecol entre otros, inmovilizados sobre electrodos de carbono vítreo, se concluyó que la mejora en la respuesta obtenida se encuentra íntimamente relacionada con la mayor cantidad de grupos oxigenados del tipo -OH presentes en los polímeros. En la plataforma propuesta, estos grupos son aportados no solo por el núcleo catecol del monómero empleado en la síntesis del nanohíbrido, sino también por la estructura de grafeno reducido parcialmente durante la polimerización de L-Dopa.

Por otro lado, tal como se indicó anteriormente, el plomo posee mayor afinidad por los grupos aminados [60,61], que son los responsables de que dicho analito pueda ser preconcentrado para su posterior reducción y detección electroquímica. De acuerdo con los resultados expuestos hasta el momento, es de suma importancia resaltar que la plataforma propuesta, GCE/RGrO-Poli-L-Dopa, posee características muy prometedoras para la

cuantificación de manera simultánea y en un solo barrido voltamperométrico de plomo y antimonio en residuos de disparos de arma de fuego en muestras reales, con una alta sensibilidad y sobre todo con una gran selectividad debida a la afinidad que poseen plomo y antimonio por sitios diferentes presentes en el nanohíbrido empleado para el desarrollo del sensor.

V-2.3.4. Cuantificación de plomo y antimonio en muestras reales

V-2.3.4.1. Muestras tomadas de manos

En la actualidad, en la ciudad de Córdoba, la toma de muestras de las manos de sospechosos involucrados en diversos hechos criminales, para el análisis de residuos de disparos de armas de fuego, se realiza con un *stubs* para SEM cubierto con una cinta de carbono doble faz (**figura V-19.A**) para su posterior análisis por SEM-EDX. Se han realizado numerosos esfuerzos y estudios para determinar la metodología más adecuada para la recolección de las muestras [69-71] y, aunque existen conclusiones encontradas referidas al tema, se puede remarcar que las metodologías que involucran el empleo de hisopos secos o cinta adhesiva se encuentran mejor posicionadas en cuanto a evitar la contaminación externa de las muestras. Por otro lado, cabe señalar que la metodología de recolección empleada también debe evaluarse de acuerdo al método de análisis que se empleará posteriormente para la detección.



Figura V-19. Toma de muestras de manos con (A) *stubs* y (B) hisopos.

En este trabajo de Tesis se propone una metodología de recolección rentable, simple y rápida, como es el empleo de hisopos (figura V-19.B), los cuales luego fueron procesados tal como fue descrito en la sección IV-2.2.2 para la posterior detección de residuos inorgánicos de plomo y antimonio por *stripping* voltamperométrico de adsorción. Las muestras fueron obtenidas en un polígono forense y provistas por el Jefe de la Sección Balística de Policía Judicial, Ministerio Público Fiscal de Córdoba, Perito Forense Raúl Galione.

En la figura V-20 se muestran los barridos voltamperométricos lineales obtenidos para las soluciones obtenidas luego de someter los hisopos al proceso de extracción de metales descrito con anterioridad, para muestreos de una persona que realizó disparos con un arma de fuego y de un individuo que no realizó ningún disparo.

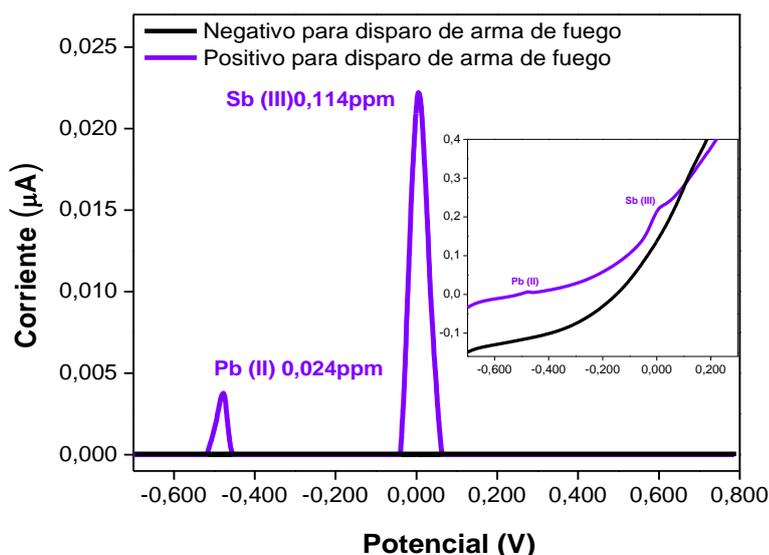


Figura V-20. Registros voltamperométricos sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa realizados luego de procesar los hisopados obtenidos de las manos de un individuo que realizó un disparo con arma de fuego (—) y de un individuo que no manipuló la misma (—). Inset: registros voltamperométricos sin procesar la línea de base.

Es importante remarcar que fue posible discriminar exitosamente un caso positivo de uno negativo para disparo de arma de fuego, utilizando una metodología de muestreo muy económica que puede ser empleada rápidamente en el lugar del hecho delictivo. Otro aspecto que merece ser

destacado es que, si bien algunos autores postulan que la toma de muestra con hisopos no es tan efectiva como la que emplea *stubs* con cinta de carbono [70], gracias a los bajos límites de detección que posee GCE/RGrO-Poli-L-Dopa para la cuantificación de plomo y antimonio, es factible diferenciar entre casos negativos y positivos al detectar no uno sino ambos metales de manera simultánea.

V-2.3.4.2. Muestras de disparos en prendas

Hoy en día, la estimación de la distancia de disparo de arma de fuego se realiza de acuerdo a la inspección visual de la escena donde se produjo el hecho. Si bien existen algunos reportes bibliográficos para la estimación de la distancia a la cual se realizó la descarga de un dado proyectil [29,48,72,73] los mismos fueron llevados a cabo con metodologías complejas tales como, difracción de rayos X, espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado y absorción atómica, entre otras.

Las armas de fuego suelen operar con municiones equipadas con proyectiles fabricados a base de plomo o mezcla de plomo/antimonio. En algunos casos, los proyectiles pueden tener un revestimiento delgado o grueso o una cubierta de otros metales, como cobre o latón, lo que se suele denominar encamisado. Hasta hace relativamente poco tiempo, la munición contenía predominantemente plomo, pero las preocupaciones ambientales han propulsado el desarrollo de proyectiles hechos de otros metales [32].

En esta sección se presenta por primera vez un examen exhaustivo de la cuantificación de residuos inorgánicos para elucidar las diferentes distancias de disparo, utilizando una metodología sencilla con posibilidad de miniaturización y análisis en el lugar del hecho. También, se presenta un análisis comparativo de las cantidades relativas de ambos metales para la identificación de los diferentes cartuchos empleados en la detonación.

Tal como se mencionó con anterioridad, en la actualidad se intenta abandonar el empleo de plomo en la manufactura de los cartuchos y el

mismo es reemplazado por otros metales como el antimonio que le confieren a los proyectiles una mayor dureza [32]. En este trabajo de Tesis se analizaron diferentes distancias de disparos realizadas con dos tipos de cartuchos: calibre '22 largo LR sin encamisado (**figura V-21.A**) y 9 mm con encamisado (**figura V-21.B**). La principal diferencia entre ambos es que el primero carece de revestimiento exterior (encamisado) y en su manufactura se emplea una mayor proporción de plomo, mientras que el segundo posee un recubrimiento externo de latón y en su fabricación se emplea una mayor cantidad de antimonio.

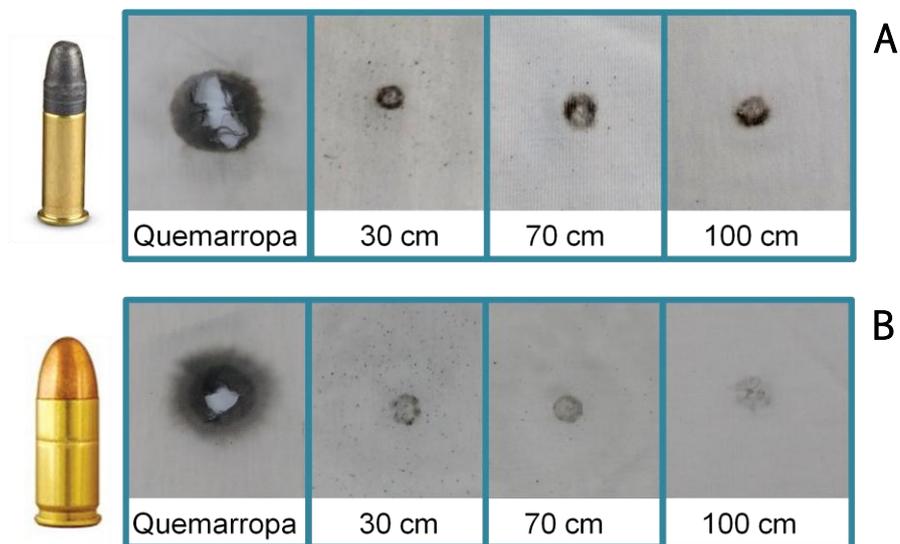


Figura 21. Muestras de prendas impactadas a diferentes distancias con cartuchos calibre 22 largo LR sin encamisado (**A**) y calibre 9 mm con encamisado (**B**).

Se efectuaron disparos sobre prendas para distancias de 100 cm, 70 cm, 30 cm y a quemarropa utilizando los dos tipos de cartuchos. Por cuestiones de equipamiento de laboratorio forense, sólo fue posible realizar el análisis hasta distancias de 100 cm. Las muestras fueron provistas por el Perito Forense Raúl Galione.

En la **figura V-21.A** y **V-21.B** se muestran las porciones de prendas analizadas, sobre las cuales se realizaron los disparos a diferentes distancias con los dos tipos de cartuchos. Puede observarse que, para ambos calibres, a

medida que la distancia de descarga se hace mayor, la huella o tatuaje que queda en la prenda se hace menos evidente, es decir que se espera hallar menores cantidades de residuos. La extracción de los residuos inorgánicos de las prendas fue llevada a cabo mediante la metodología descrita en la sección IV-2.2.2.

En la figura V-22.A y V-22.B se muestran los resultados obtenidos mediante *stripping* voltamperométrico sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa, luego de realizar la etapa de preconcentración de las soluciones de extracción de las muestras para las diferentes distancias empleando los dos tipos de proyectiles.

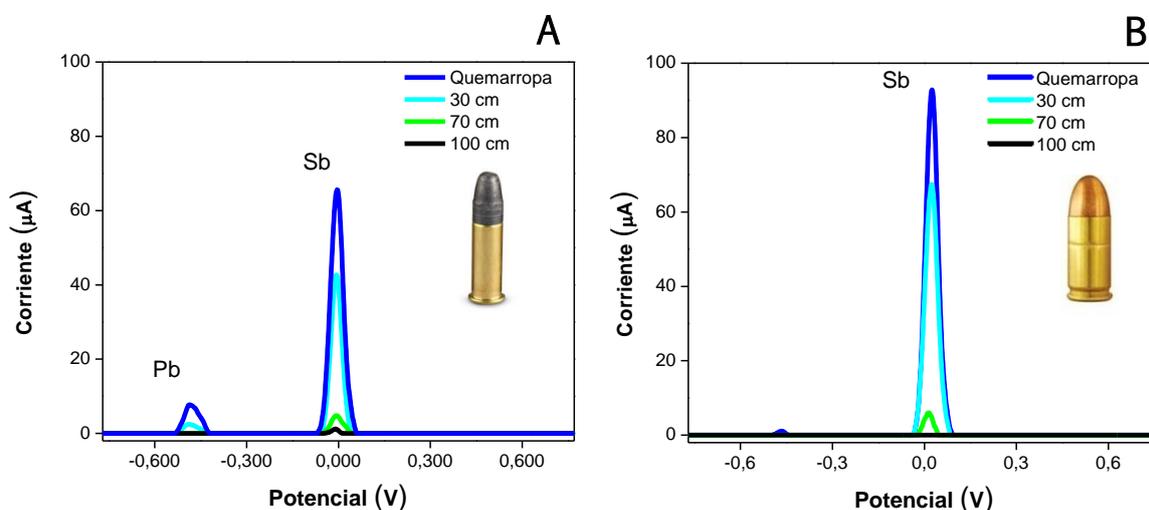


Figura V-22. Barrido voltamperométrico lineal para disparo realizado a 100 cm (—), 70 cm (—), 30 cm (—) y a quemarropa (—) con cartucho calibre 22 largo LR (A) y calibre 9 mm (B) sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa.

De manera general, se puede mencionar que, para los disparos realizados con el cartucho de 9 mm, el cual posee encamisado, se encontraron mayores cantidades de antimonio en comparación a los hallados para el proyectil de calibre 22, pero menores cantidades de plomo, metal que solo pudo ser determinado a distancias muy cortas cuando se trata de la bala 9 mm con recubrimiento de latón. Estos resultados se encuentran en concordancia con el hecho de que este proyectil es fabricado con mayores cantidades de antimonio a expensas de la disminución de la proporción de plomo. De esta manera, se puede afirmar que el sensor desarrollado posee

potenciales características para ser empleado en la determinación de la identidad del cartucho empleado en un dado evento.

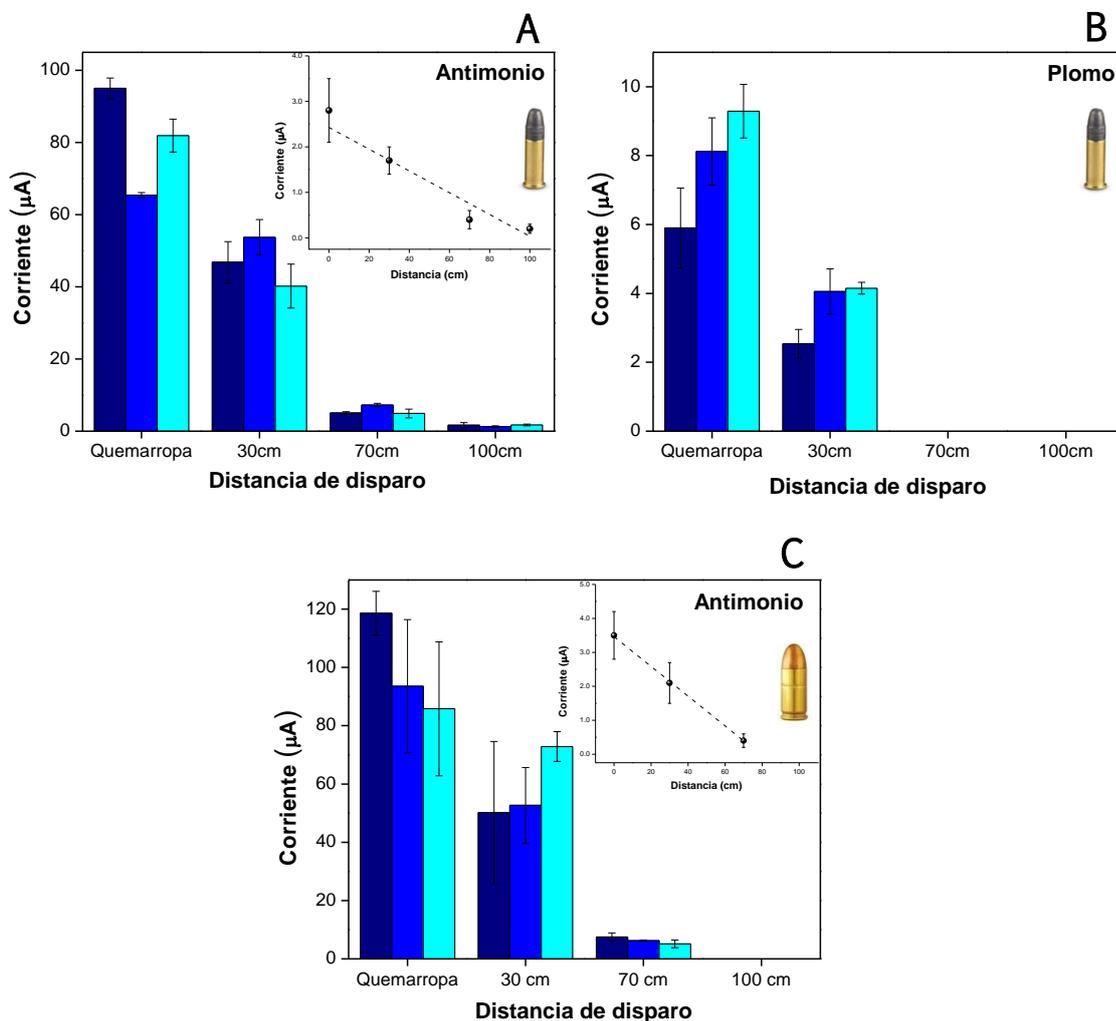


Figura V-23. Variación de la corriente de oxidación de (A) antimonio y (B) plomo para las diferentes distancias de disparo utilizando un cartucho 22 largo LR y (C) relación entre la corriente de oxidación de antimonio para las diferentes distancias de disparo utilizando un cartucho 9mm sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa.

Un análisis detallado de los restos de plomo y antimonio hallados para las diferentes distancias de descarga del arma de fuego, revela una relación lineal entre las corrientes asociadas a los procesos de oxidación de los metales y la distancias de disparo estudiadas para ambos tipos de cartucho, tal como se exhibe en la **figura V-23**, se exponen los resultados encontrados para medidas por triplicado de cada una de las distancias analizadas.

De acuerdo a los resultados presentados se puede afirmar que la plataforma GCE/RGrO-Poli-L-Dopa, es útil no solo para determinar la identidad del cartucho empleado, sino que además, permite determinar la distancia a la cual fue realizado el disparo.

Tabla V-5. *Cantidades de plomo y antimonio halladas en prendas para disparos efectuados con cartucho calibre 22 largo LR a diferentes distancias obtenidas por stripping voltamperométrico sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa.*

Distancia	Sb (ppm) en prenda	Pb (ppm) en prenda
Quemarropa	2,8 ± 0,7	0,34 ± 0,07
30 cm	1,7 ± 0,3	0,16 ± 0,02
70 cm	0,4 ± 0,2	----
100 cm	0,2 ± 0,1	----

En las **tablas V-5 y V-6** se presentan las cantidades de residuos inorgánicos encontradas en prendas para ambos calibres. Tal como se esperaba, los restos hallados son menores a medida que la distancia de disparo aumenta. Esto corrobora el hecho de poder determinar de manera fehaciente la distancia de descarga del arma utilizando la plataforma GCE/RGrO-Poli-L-dopa, mediante una metodología no sólo sencilla en cuanto al pretratamiento de la muestra, sino que también en la obtención de la señal analítica.

Tabla V-6. *Cantidades de plomo y antimonio halladas en prendas para disparos efectuados con cartucho calibre 9 mm a diferentes distancias obtenidas por stripping voltamperométrico sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa.*

Distancia	Sb (ppm) en prenda
Quemarropa	3,5 ± 0,7
30 cm	2,1 ± 0,6
70 cm	0,4 ± 0,2
100 cm	----

La plataforma también fue empleada para determinar e identificar Pb (II) y Sb (III) en un tercer tipo de proyectil. El empleo del mismo tipo de cartucho se ha visto en reiteradas ocasiones en los últimos años en hechos delictivos en la ciudad de Córdoba. Se trata de una munición 9 mm recubierta por un delgado enchapado de cobre y su particularidad radica en el hecho de la alta proporción de plomo que se utiliza en su manufactura, lo que hace del mismo un proyectil extremadamente blando que, al ser disparado se desintegra casi por completo, haciendo especialmente difícil la investigación microscópica para establecer la identidad del arma empleada en la mecánica del hecho delictivo.

En la **figura V-24** se presentan los barridos voltamperométricos lineales obtenidos a partir del análisis de una prenda sobre la que se efectuó un disparo con un cartucho 9mm de manufactura económica realizado a 25 cm de distancia.

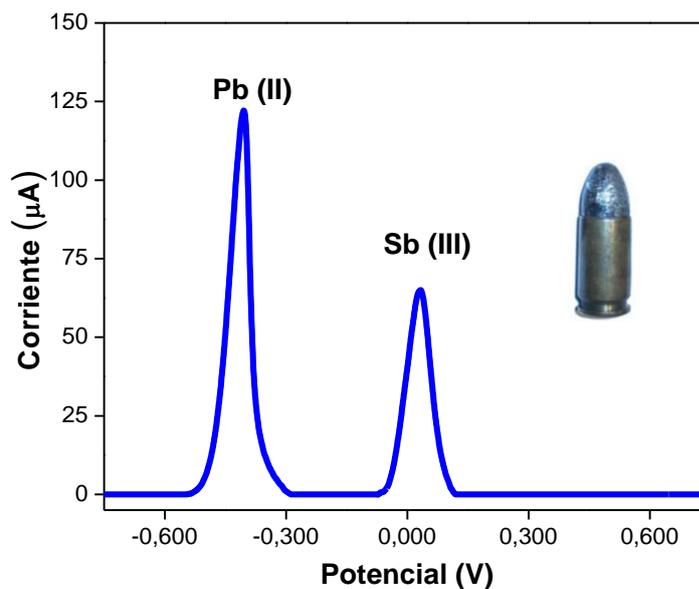


Figura V-24. Barrido voltamperométrico lineal obtenidos para muestras de prendas sobre las que se efectuó un disparo con un cartucho calibre 9mm de manufactura económica sobre GCE/RGrO-Poli-L-Dopa.

El análisis por duplicado de la muestra revela que, efectivamente el cartucho es fabricado con una mayor proporción de plomo en relación con la cantidad de antimonio empleada. Por otro lado, si se compara con los

resultados obtenidos para los cartuchos estudiados con anterioridad se puede mencionar que en la manufactura de este proyectil se emplean mayores cantidades de ambos metales. Y nuevamente se puede concluir que el nanohíbrido utilizado en la construcción de la plataforma sensora es sumamente eficiente para discriminar la identidad del proyectil utilizado en un dado hecho delictivo.

V-3. Conclusiones Parciales

Se presentaron dos aplicaciones analíticas para la plataforma desarrollada GCE/RGrO-Poli-L-Dopa. La cuantificación de analitos como H_2O_2 , plomo y antimonio fue posible debido a que, por una parte, la reducción de las láminas de grafeno proporciona una superficie con propiedades electrocatalíticas mejoradas y, por otro lado, la funcionalización por parte del polímero cambia las propiedades superficiales de las láminas, dando como resultado una estructura menos hidrofóbica que puede dispersarse con facilidad y además aporta grupos funcionales capaces de interactuar con los diversos analitos.

Se observó que la combinación de GrO y la estructura de la catecolamina empleada para la síntesis del nanohíbrido dieron como resultados un material que presenta atractivas posibilidades de ser empleado para la cuantificación de peróxido de hidrógeno. GCE/RGrO-Poli-L-Dopa presentó una excelente reproducibilidad, con límites de detección que posibilitan el empleo de la plataforma para la cuantificación amperométrica de H_2O_2 en una muestra compleja, tal como un enjuague bucal, por adición directa en la celda electroquímica.

Por otro lado, se puede resaltar que la reducción *in situ* de GrO comercial mediante la autopolimerización de L-Dopa mediada por ultrasonido, dieron como resultado una plataforma con características analíticas sumamente prometedoras para la cuantificación simultánea, sensible y selectiva de plomo y antimonio.

El sensor propuesto fue empleado con éxito para cuantificar Pb (II) y Sb (III) de manera rápida, sencilla y simultánea en residuos de disparos y por primera vez se reportó un análisis exhaustivo para determinar la distancia a la cual se realizó un determinado disparo. También fue posible determinar de manera exitosa el tipo de cartucho empleado en una detonación, a través de las cantidades relativas de plomo y antimonio encontradas. Además se puso a punto una metodología para determinar mediante un simple hisopado la presencia de restos de disparo en las manos de un sospechoso de accionar un arma de fuego.

De este modo, el sensor desarrollado demuestra atractivas posibilidades de aplicación en el campo de investigación Forense-Balística para la determinación de la identidad y distancia del disparo de armas de fuego por parte de un sospechoso.

Este tipo de estudios resultan pioneros en el campo de la criminalística, aportando una herramienta sumamente valiosa para la resolución de casos complejos de delitos que involucran armas de fuego. Además, abre las puertas no solo para el diseño de dispositivos para realizar determinaciones en el mismo lugar del hecho delictivo sino que también, permite la proyección para la detección de otro tipo de analitos de interés forense.

V-4. Bibliografía

- [1] C. R. Holkar, A. J. Jadhav, D. V. Pinjari, N. M. Mahamuni, and A. B. Pandit, "A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches," *J. Environ. Manage.*, vol. 182, pp. 351–366, 2016, doi: 10.1016/j.jenvman.2016.07.090.
- [2] L. Zhang, M. Chen, Y. Jiang, M. Chen, Y. Ding, and Q. Liu, "A facile preparation of montmorillonite-supported copper sulfide nanocomposites and their application in the detection of H₂O₂," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 239, pp. 28–35, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2016.07.168.
- [3] M. Malinouski, Y. Zhou, V. V. Belousov, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev, "Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0014564.
- [4] M. Giorgio, M. Trinei, E. Migliaccio, and P. G. Pelicci, "Hydrogen peroxide: A metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 9, pp. 722–728, 2007, doi: 10.1038/nrm2240.
- [5] M. V. Bracamonte *et al.*, "H₂O₂ sensing enhancement by mutual integration of single walled carbon nanohorns with metal oxide catalysts: The CeO₂ case," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 239, pp. 923–932, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2016.08.112.
- [6] A. R. Lippert, G. C. Van De Bittner, and C. J. Chang, "Boronate oxidation as a bioorthogonal reaction approach for studying the chemistry of hydrogen peroxide in living systems," *Acc. Chem. Res.*, vol. 44, no. 9, pp. 793–804, 2011, doi: 10.1021/ar200126t.
- [7] D. Koppenhöfer *et al.*, "Neurodegeneration through oxidative stress: Monitoring hydrogen peroxide induced apoptosis in primary cells from the subventricular zone of BALB/c mice using field-effect transistors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 67, pp. 490–496, 2015, doi: 10.1016/j.bios.2014.09.012.
- [8] C. C. Winterbourn, "Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 4, no. 5, pp. 278–286, 2008, doi: 10.1038/nchembio.85.
- [9] L. Venosta, M. V. Bracamonte, M. C. Rodríguez, S. E. Jacobo, and P. G. Bercoff, "Comparative studies of hybrid functional materials based on different carbon structures decorated with nano-magnetite. Suitable application as platforms for enzyme-free electrochemical sensing of hydrogen peroxide," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 248, pp. 460–469, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2017.03.159.
- [10] H. Shamkhalichenar and J.-W. Choi, "Review—Non-Enzymatic Hydrogen Peroxide Electrochemical Sensors Based on Reduced Graphene Oxide," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 167, no. 3, p. 37531, 2020, doi: 10.1149/1945-7111/ab644a.
- [11] R. Zhang and W. Chen, "Recent advances in graphene-based nanomaterials for fabricating electrochemical hydrogen peroxide sensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 89, pp. 249–268, 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.01.080.
- [12] M. Eguílaz *et al.*, "Recent advances in the development of electrochemical

- hydrogen peroxide carbon nanotube-based (bio)sensors,” *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 14, pp. 157–165, 2019, doi: 10.1016/j.coelec.2019.02.007.
- [13] X. Huang *et al.*, “Silver nanoparticles decorated and tetraphenylethene probe doped silica nanoparticles: A colorimetric and fluorometric sensor for sensitive and selective detection and intracellular imaging of hydrogen peroxide,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 121, no. 8, pp. 236–242, 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.09.023.
- [14] G. Zhu, D. Huang, L. Liu, Y. Yi, Y. Wu, and Y. Huang, “One-Step Green Preparation of N-Doped Silicon Quantum Dots for the on-off Fluorescent Determination of Hydrogen Peroxide,” *Anal. Lett.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–16, 2020, doi: 10.1080/00032719.2020.1720222.
- [15] C. Gao, M. K. Hossain, L. Li, M. A. Wahab, J. Xiong, and W. Li, “A colorimetric and fluorescence turn-on probe for the highly selective detection of hydrogen peroxide in aqueous solution,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 368, no. 4, pp. 97–103, 2019, doi: 10.1016/j.jphotochem.2018.09.020.
- [16] D. Yu, P. Wang, Y. Zhao, and A. Fan, “Iodophenol blue-enhanced luminol chemiluminescence and its application to hydrogen peroxide and glucose detection,” *Talanta*, vol. 146, pp. 655–661, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2015.06.059.
- [17] Y. Su, H. Song, and Y. Lv, “Recent advances in chemiluminescence for reactive oxygen species sensing and imaging analysis,” *Microchem. J.*, vol. 146, no. 7, pp. 83–97, 2019, doi: 10.1016/j.microc.2018.12.056.
- [18] H. A. Khorami, J. F. Botero-Cadavid, P. Wild, and N. Djilali, “Spectroscopic detection of Hydrogen peroxide with an optical fiber probe using chemically deposited Prussian blue,” *Electrochim. Acta*, vol. 115, pp. 416–424, 2014, doi: 10.1016/j.electacta.2013.10.186.
- [19] H. Azak, “Electrochemical hydrogen peroxide nanosensor using a reduced graphene oxide-poly(6-(4H-dithieno[3,2-b:2,3'-d]pyrrol-4-yl)hexan-1-amine) hybrid-modified electrode,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 137, no. 14, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1002/app.48538.
- [20] A. Koyappayil, S. Berchmans, and M. H. Lee, “Dual enzyme-like properties of silver nanoparticles decorated Ag₂WO₄ nanorods and its application for H₂O₂ and glucose sensing,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 189, no. 1, p. 110840, 2020, doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.110840.
- [21] W. Sun, X. Cai, Z. Wang, H. Zhao, and M. Lan, “A novel modification method via in-situ reduction of AuAg bimetallic nanoparticles by polydopamine on carbon fiber microelectrode for H₂O₂ detection,” *Microchem. J.*, vol. 154, p. 104595, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.104595.
- [22] R. P. Tortorich, H. Shamkhalichenar, and J. W. Choi, “Inkjet-printed and paper-based electrochemical sensors,” *Appl. Sci.*, vol. 8, no. 2, 2018, doi: 10.3390/app8020288.
- [23] M. Eguílaz, C. J. Venegas, A. Gutiérrez, G. A. Rivas, and S. Bollo, “Carbon nanotubes non-covalently functionalized with cytochrome c: A new bioanalytical platform for building bienzymatic biosensors,” *Microchem. J.*, vol. 128, pp. 161–

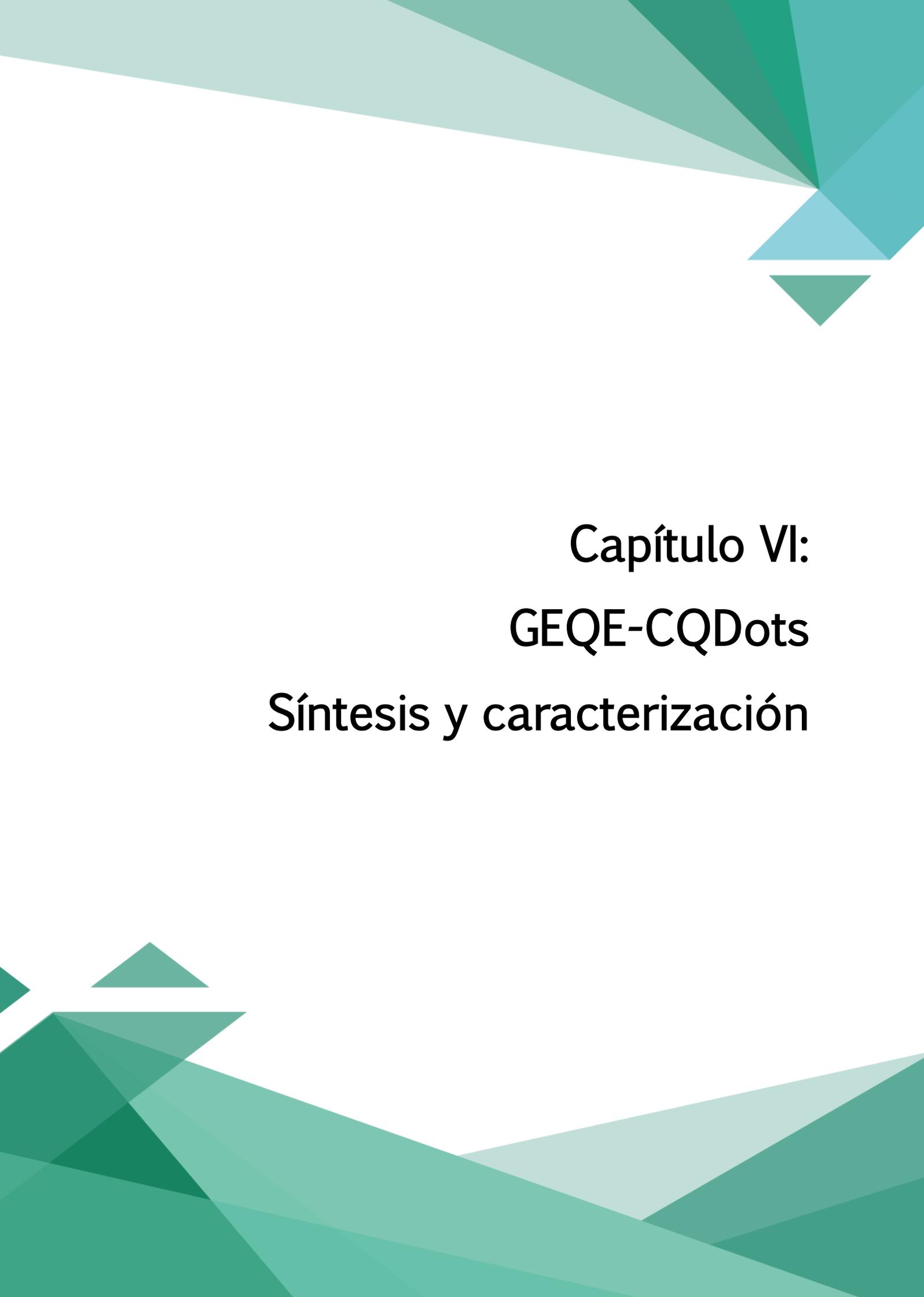
- 165, 2016, doi: 10.1016/j.microc.2016.04.018.
- [24] P. A. Gallay, M. D. Rubianes, F. A. Gutierrez, and G. A. Rivas, "Avidin and Glucose Oxidase-non-covalently Functionalized Multi-walled Carbon Nanotubes: A New Analytical Tool for Building a Bionzymatic Glucose Biosensor," *Electroanalysis*, vol. 31, no. 10, pp. 1888–1894, 2019, doi: 10.1002/elan.201900202.
- [25] X. Chen, G. Wu, Z. Cai, M. Oyama, and X. Chen, "Advances in enzyme-free electrochemical sensors for hydrogen peroxide, glucose, and uric acid," *Microchim. Acta*, vol. 181, no. 7–8, pp. 689–705, 2014, doi: 10.1007/s00604-013-1098-0.
- [26] F. A. Gutierrez *et al.*, "Analytical applications of Cu@PtPd/C nanoparticles for the quantification of hydrogen peroxide," *Microchem. J.*, vol. 141, no. 2017, pp. 240–246, 2018, doi: 10.1016/j.microc.2018.05.019.
- [27] P. Yáñez-Sedeño, L. Agüí, R. Villalonga, and J. M. Pingarrón, "Biosensors in forensic analysis. A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 823, pp. 1–19, 2014, doi: 10.1016/j.aca.2014.03.011.
- [28] V. Singh, M. C. Kamthania, and N. Mishra, "Biosensor Developments: Application in crime detection," *Artic. Int. J. Eng. Tech. Res.*, pp. 163–166, 2014, [Online]. Available: www.eshancollege.com.
- [29] R. Gagliano-Candela, A. P. Colucci, and S. Napoli, "Determination of firing distance. Lead analysis on the target by atomic absorption spectroscopy (AAS)," *J. Forensic Sci.*, vol. 53, no. 2, pp. 321–324, 2008, doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00668.x.
- [30] Z. Brozek-Mucha, "Distribution and properties of gunshot residue originating from a Luger 9 mm ammunition in the vicinity of the shooting gun," *Forensic Sci. Int.*, vol. 183, no. 1–3, pp. 33–44, 2009, doi: 10.1016/j.forsciint.2008.10.010.
- [31] O. Dalby, D. Butler, and J. W. Birkett, "Analysis of gunshot residue and associated materials - A review," *J. Forensic Sci.*, vol. 55, no. 4, pp. 924–943, 2010, doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01370.x.
- [32] J. Hallett, M. Stolk, M. Cook, and K. P. Kirkbride, "Examination of gunshot residue arising from shotgun cartridges containing steel, bismuth or tungsten pellets," *Forensic Sci. Int.*, vol. 306, p. 110096, 2020, doi: 10.1016/j.forsciint.2019.110096.
- [33] V. Spathis, "Impact-disrupted gunshot residue: A sub-micron analysis using a novel collection protocol," *Def. Technol.*, vol. 13, no. 2, pp. 143–149, 2017, doi: 10.1016/j.dt.2017.03.007.
- [34] L. Gandy, K. Najjar, M. Terry, and C. Bridge, "A novel protocol for the combined detection of organic, inorganic gunshot residue," *Forensic Chem.*, vol. 8, no. 12, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1016/j.forc.2017.12.009.
- [35] N. K. Konanur and G. W. VanLoon, "Determination of Lead and Antimony in Firearm Discharge residues on hands by anodic stripping voltammetry," *Talanta*, vol. 24, pp. 184–187, 1977.
- [36] D. Werner, A. L. Gassner, J. Marti, S. Christen, P. Wyss, and C. Weyermann,

- “Comparison of three collection methods for the sodium rhodizonate detection of gunshot residues on hands,” *Sci. Justice*, vol. 60, no. 1, pp. 63–71, 2020, doi: 10.1016/j.scijus.2019.09.004.
- [37] S. Charles, N. Geusens, E. Vergalito, and B. Nys, “Interpol review of gunshot residue 2016–2019,” *Forensic Sci. Int. Synerg.*, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1016/j.fsisyn.2020.01.011.
- [38] J. E. S. Sarkis, O. N. Neto, S. Viebig, and S. F. Durrant, “Measurements of gunshot residues by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry—Further studies with pistols,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 172, no. 1, pp. 63–66, 2007, doi: 10.1016/j.forsciint.2006.12.007.
- [39] E. Turillazzi *et al.*, “Analytical and quantitative concentration of gunshot residues (Pb, Sb, Ba) to estimate entrance hole and shooting-distance using confocal laser microscopy and inductively coupled plasma atomic emission spectrometer analysis: An experimental study,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 231, no. 1–3, pp. 142–149, 2013, doi: 10.1016/j.forsciint.2013.04.006.
- [40] M. O. Salles, M. Bertotti, and T. R. L. C. Paixão, “Use of a gold microelectrode for discrimination of gunshot residues,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 166–167, pp. 848–852, 2012, doi: 10.1016/j.snb.2012.02.097.
- [41] H.C. Harrison and R. Gilroy, “Detection of gunshot residues on the hands by trace element analysis” *J. Forensic Sci.*, no. 4, pp. 184–199, 1977, doi: 10.1520/JFS10591J.
- [42] C. A. Woolever, D. E. Starkey, and H. D. Dewald, “Differential pulse anodic stripping voltammetry of lead and antimony in gunshot residues,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 102, no. 1, pp. 45–50, 1999, doi: 10.1016/S0379-0738(99)00036-5.
- [43] C. A. Woolever and H. D. Dewald, “Differential pulse anodic stripping voltammetry of barium and lead in gunshot residues,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 117, no. 3, pp. 185–190, 2001, doi: 10.1016/S0379-0738(00)00402-3.
- [44] K. Promsuwan, P. Kanatharana, P. Thavarungkul, and W. Limbut, “Nitrite amperometric sensor for gunshot residue screening,” *Electrochim. Acta*, vol. 331, p. 135309, 2020, doi: 10.1016/j.electacta.2019.135309.
- [45] Z. Brozek-Mucha, “On the prevalence of gunshot residue in selected populations - An empirical study performed with SEM-EDX analysis,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 237, pp. 46–52, 2014, doi: 10.1016/j.forsciint.2014.01.020.
- [46] E. Bernal Morales and A. L. Revilla Vázquez, “Simultaneous determination of inorganic and organic gunshot residues by capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1061, no. 2, pp. 225–233, 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2004.10.083.
- [47] R. C. Briner, S. Chouchoiy, R. W. Webster, and R. E. Popham, “Anodic stripping voltammetric determination of antimony in gunshot residue,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 172, no. C, pp. 31–37, 1985, doi: 10.1016/S0003-2670(00)82590-8.
- [48] A. Santos, T. Magalhães, D. N. Vieira, A. A. Almeida, and A. V. Sousa, “Firing distance estimation through the analysis of the gunshot residue deposit pattern

- around the bullet entrance hole by inductively coupled plasma-mass spectrometry: An experimental study,” *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, vol. 28, no. 1, pp. 24–30, 2007, doi: 10.1097/01.paf.0000233631.40170.d4.
- [49] T. Trejos, C. Vander Pyl, K. Menking-Hoggatt, A. L. Alvarado, and L. E. Arroyo, “Fast identification of inorganic and organic gunshot residues by LIBS and electrochemical methods,” *Forensic Chem.*, vol. 8, pp. 146–156, 2018, doi: 10.1016/j.forc.2018.02.006.
- [50] A. A. Kava, C. Beardsley, J. Hofstetter, and C. S. Henry, “Disposable glassy carbon stencil printed electrodes for trace detection of cadmium and lead,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1103, pp. 58–66, 2020, doi: 10.1016/j.aca.2019.12.047.
- [51] M. L. Ramírez *et al.*, “Cysteine functionalized bio-nanomaterial for the affinity sensing of Pb(II) as an indicator of environmental damage,” *Microchem. J.*, vol. 141, no. 1, pp. 271–278, 2018, doi: 10.1016/j.microc.2018.05.007.
- [52] A. U. Alam, M. M. R. Howlader, N. X. Hu, and M. J. Deen, “Electrochemical sensing of lead in drinking water using B-cyclodextrin-modified MWCNTs,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 296, no. 2, p. 126632, 2019, doi: 10.1016/j.snb.2019.126632.
- [53] U. Karabiberoglu and Z. Dursun, “Over-Oxidized Poly (Phenol Red) Film Modified Glassy Carbon Electrode for Anodic Stripping Voltammetric Determination of Ultra-Trace Antimony (III),” *Electroanalysis*, vol. 29, no. 4, pp. 1069–1080, 2017, doi: 10.1002/elan.201600629.
- [54] A. V. Kollopoulos, J. P. Metters, and C. E. Banks, “Screen printed graphite electrochemical sensors for the voltammetric determination of antimony(iii),” *Anal. Methods*, vol. 5, no. 14, pp. 3490–3496, 2013, doi: 10.1039/c3ay40683k.
- [55] Y. Guo *et al.*, “Multiwall carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode for square-wave stripping voltammetric determination of aqueous antimony (III) ion,” *Adv. Mater. Res.*, vol. 518–523, pp. 1571–1575, 2012, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.518-523.1571.
- [56] M. Vuki, K. K. Shiu, M. Galik, A. M. O’Mahony, and J. Wang, “Simultaneous electrochemical measurement of metal and organic propellant constituents of gunshot residues,” *Analyst*, vol. 137, no. 14, pp. 3265–3270, 2012, doi: 10.1039/c2an35379b.
- [57] A. M. O’Mahony and J. Wang, “Electrochemical detection of gunshot residue for forensic analysis: A review,” *Electroanalysis*, vol. 25, no. 6, pp. 1341–1358, 2013, doi: 10.1002/elan.201300054.
- [58] J. A. Rodriguez, I. S. Ibarra, C. A. Galan-Vidal, M. Vega, and E. Barrado, “Multicommutated anodic stripping voltammetry at tubular bismuth film electrode for lead determination in gunshot residues,” *Electroanalysis*, vol. 21, no. 3–5, pp. 452–458, 2009, doi: 10.1002/elan.200804420.
- [59] S. Erden, Z. Durmus, and E. Kiliç, “Simultaneous Determination of Antimony and Lead in Gunshot Residue by Cathodic Adsorptive Stripping Voltammetric Methods,” *Electroanalysis*, vol. 23, no. 8, pp. 1967–1974, 2011, doi: 10.1002/elan.201000612.

- [60] T. Xu, H. Dai, and Y. Jin, "Electrochemical sensing of lead(II) by differential pulse voltammetry using conductive polypyrrole nanoparticles," *Microchim. Acta*, vol. 187, no. 1, 2020, doi: 10.1007/s00604-019-4027-z.
- [61] J. Zou, D. Mao, Arramel, N. Li, and J. Jiang, "Reliable and selective lead-ion sensor of sulfur-doped graphitic carbon nitride nanoflakes," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 506, no. 11, p. 144672, 2020, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.144672.
- [62] S. Beng Khoo and J. Zhu, "Poly(pyrogallol) film on glassy carbon electrode for selective preconcentration and stripping voltammetric determination of Sb(III)," *Anal. Chim. Acta*, vol. 373, no. 1, pp. 15–27, 1998, doi: 10.1016/S0003-2670(98)00386-9.
- [63] N. Alvarez, C. E. Rahm, F. Torres-Canas, P. Gupta, and P. Poulin, "Inkjet Printed Multi-Walled Carbon Nanotube Sensor for the Detection of Lead in Drinking Water," *Electroanalysis*, 2020, doi: 10.1002/elan.202000040.
- [64] M. Y. Pudza, Z. Z. Abidin, S. Abdul-Rashid, F. M. Yasin, A. S. M. Noor, and J. Abdullah, "Selective and simultaneous detection of cadmium, lead and copper by tapioca-derived carbon dot-modified electrode," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2020, doi: 10.1007/s11356-020-07695-7.
- [65] W. Liu, "Preparation of a zinc oxide-reduced graphene oxide nanocomposite for the determination of cadmium(II), Lead(II), copper(II), and mercury(II) in water," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 12, no. 6, pp. 5392–5403, 2017, doi: 10.20964/2017.06.06.
- [66] L. K. Shpigun and V. K. Lunina, "Electrochemical Sensors for the Stripping Voltammetric Determination of Antimony(III)," *J. Anal. Chem.*, vol. 58, no. 10, pp. 983–989, 2003, doi: 10.1023/A:1026192020035.
- [67] R. Liu, Y. J. Tan, T. Zhong, and C. Lei, "Determination of Antimony(III) by Differential Pulse Voltammetry Using a Gold Nanoparticle-Ionic Liquid-Graphene-Modified Selenium-Doped Carbon Paste Electrode," *Anal. Lett.*, vol. 51, no. 15, pp. 2351–2361, 2018, doi: 10.1080/00032719.2018.1424174.
- [68] R. Liu *et al.*, "A graphene/ionic liquid modified selenium-doped carbon paste electrode for determination of copper and antimony," *Anal. Methods*, vol. 8, no. 5, pp. 1120–1126, 2016, doi: 10.1039/c5ay02945g.
- [69] D. Merli *et al.*, "Comparison of Different Swabs for Sampling Inorganic Gunshot Residue from Gunshot Wounds: Applicability and Reliability for the Determination of Firing Distance," *J. Forensic Sci.*, vol. 64, no. 2, pp. 558–564, 2019, doi: 10.1111/1556-4029.13870.
- [70] L. Reid, K. Chana, J. W. Bond, M. J. Almond, and S. Black, "Stubs versus swabs? A comparison of gunshot residue collection techniques," *J. Forensic Sci.*, vol. 55, no. 3, pp. 753–756, 2010, doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01332.x.
- [71] G. Vanini *et al.*, "Analysis of gunshot residues produced by .38 caliber handguns using inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP OES)," *Microchem. J.*, vol. 115, pp. 106–112, 2014, doi: 10.1016/j.microc.2014.03.003.
- [72] K. L. Miranda, F. E. Ortega-Ojeda, C. García-Ruíz, and P. S. Martínez, "Shooting

- distance estimation based on gunshot residues analyzed by XRD and multivariate analysis,” *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 193, no. 7, 2019, doi: 10.1016/j.chemolab.2019.103831.
- [73] C. Vander Pyl, O. Ovide, M. Ho, B. Yuksel, and T. Trejos, “Spectrochemical mapping using laser induced breakdown spectroscopy as a more objective approach to shooting distance determination,” *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 152, no. 11, pp. 93–101, 2019, doi: 10.1016/j.sab.2018.12.010.



Capítulo VI:
GEQE-CQDots
Síntesis y caracterización

VI-1. Introducción

Los materiales de carbono son generalmente baratos, se encuentran fácilmente disponibles y tienen buena estabilidad química y adaptabilidad ambiental [1]. Las características fascinantes de los nanomateriales de carbono han llamado la atención de los científicos desde su descubrimiento revolucionario [2], tal como fue mencionado en capítulos anteriores.

Por su parte, en los últimos años, los materiales de grafeno han recibido un enorme interés de los investigadores debido a sus extraordinarias propiedades mecánicas, ópticas, electrónicas y electroquímicas [3,4]. La síntesis química de grafeno es una de las vías para obtener un material con características menos hidrofóbicas y ha recibido un gran interés en la comunidad química desde el aislamiento del grafeno por el método de la cinta adhesiva [5].

El desafío actual es identificar un método de alto rendimiento que permita exfoliar el grafito de manera eficiente y lograr obtener láminas de grafeno dispersables en solución sin daños colaterales de las mismas. Como se mencionó en capítulos anteriores, la exfoliación ácida de grafito basada en el protocolo desarrollado por Hummers y Offeman produce escamas de óxido de grafeno (GrO) dispersable en solución [6]. Sin embargo, la naturaleza aislante del GrO dificulta su aplicación directa como material para la construcción de dispositivos electrónicos. Consecuentemente, es deseable encontrar un método de alto rendimiento que pueda exfoliar directamente el grafito en láminas de grafeno [7,8].

Actualmente, la demanda mundial de grafeno está aumentando debido a su potencial en catálisis, así como a otras aplicaciones, a saber, adsorción, pilas de combustible, sensores y baterías [9].

De esta manera, el método de preparación del grafeno es el foco de la investigación ya que determina las propiedades del producto resultante. Los métodos de preparación de grafeno comúnmente utilizados implican deposición química de vapor [10], exfoliación micromecánica [5], exfoliación química [11], entre otras, pero es difícil obtener un producto de alta calidad debido a que poseen en general numerosos defectos no controlables producidos en el

proceso de preparación [12]. Cada uno de estos métodos posee ventajas y desventajas que luego dictan la aplicabilidad del grafeno obtenido para una aplicación específica [13].

Alternativamente, la exfoliación electroquímica se ha convertido en un método potencialmente escalable debido a su fácil operación, respecto al medio ambiente, rentabilidad y productos fácilmente controlables y de buena calidad [14]. La técnica de exfoliación electroquímica es muy simple y rápida y puede adaptarse para lograr diversos grados de oxidación del material resultante mediante el control de las condiciones experimentales y electrolitos empleados [15,16]. Esto es particularmente atractivo para muchas aplicaciones que requieren un grado mínimo de funciones oxigenadas en las láminas de grafeno, normalmente, para mantener una alta conductividad térmica y eléctrica [17].

Durante el proceso de exfoliación electroquímica de grafito, se aplica un dado potencial al electrodo de grafito, donde una corriente eléctrica impulsa la migración de iones o moléculas cargadas a los espacios existentes entre las capas intermedias de grafito. Luego, el grafito experimenta una expansión estructural y posteriormente se exfolia en capas de grafeno [18,19], dando como producto los denominados grafenos electroquímicamente expandidos (GEQE) (Ver **figura VI-1**). La exfoliación impulsada por electroquímica se puede realizar durante la oxidación anódica o la reducción catódica [20].

Los electrolitos utilizados en la exfoliación electroquímica se pueden dividir en dos grandes categorías: soluciones acuosas y electrolitos a base de líquidos iónicos [22]. Entre estos, se ha encontrado que las sales inorgánicas producen grafeno con mayor tamaño lateral y menor cantidad de grupos funcionales oxigenados en comparación con otros tipos de electrolitos [9]. Por otro lado, es importante resaltar que la calidad del grafeno se ve fuertemente afectada por el potencial aplicado, así como por el electrolito empleado. Cuando el grafito se exfolia en condiciones anódicas, se puede aplicar un potencial de hasta +10 o +20 V en presencia de iones de intercalación negativos como SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- , entre otros. El uso de altos potenciales facilita la generación de grupos de oxígeno en el grafeno exfoliado, así como el daño estructural. Por esta razón, la aplicación de potenciales catódicos en presencia

de iones de intercalación positivos no fue ampliamente estudiada para la síntesis de GEQE ya que se obtienen demasiadas funcionalidades de oxígeno y se obtiene grafeno de menor calidad [23].

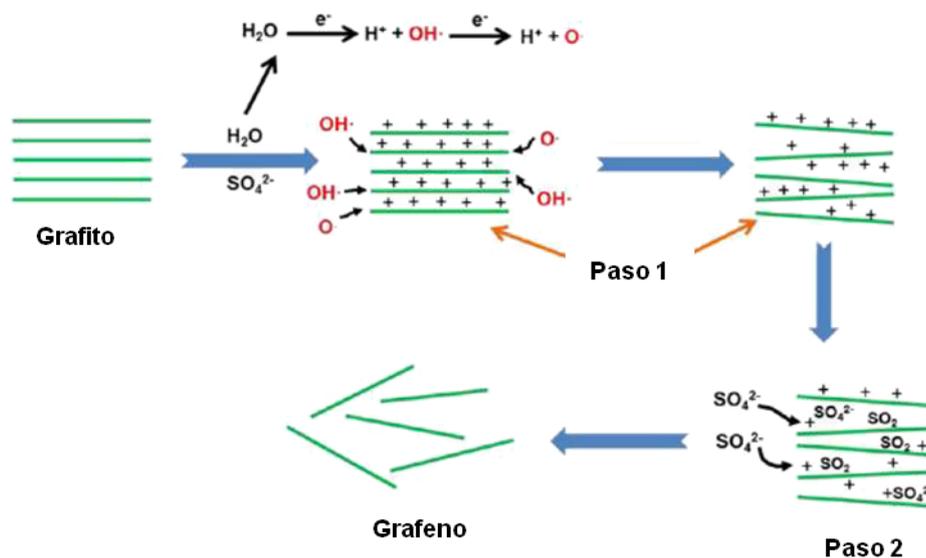


Figura VI-1. Proceso de intercalación de iones para la síntesis de GEQE. Tomado de referencia [21]

El primer informe sobre la exfoliación electroquímica de grafito en Na_2SO_4 fue en 1997, donde el producto se describió como una solución coloidal [24]. Numerosos estudios en los que se emplearon diferentes tipos de sales inorgánicas que contienen iones sulfato, demostraron que dicho ion puede exfoliar eficientemente el grafito en grafeno con una alta relación carbono/oxígeno (C/O) de aproximadamente 17,2 [9].

El grafeno que se produce por vía electroquímica (GEQE) no es capaz de interactuar fuertemente con diferentes agentes funcionalizantes como los polímeros, debido a la baja densidad de grupos funcionales. Además, la estructura relativamente prístina de GEQE muestra fuertes interacciones de van der Waals, en comparación con el óxido de grafeno, lo que restringe la obtención de una dispersión estable de las estructuras obtenidas. Por lo tanto, superar esta dificultad sigue siendo un gran desafío para mejorar la aplicación práctica de los grafenos electroquímicamente expandidos [25].

A pesar de su difícil dispersión en medio acuoso, es importante remarcar que GEQE muestra mejores propiedades eléctricas y mecánicas que GrO debido a que posee pocos grupos oxigenados y defectos en la superficie de las láminas gráficas [26]. Estas características hacen que GEQE sea más adecuado para construir híbridos a base de grafeno que posean mejores propiedades electrocatalíticas que los híbridos a base de óxido de grafeno [8].

Es innegable que los nanomateriales son los responsables de los logros en los avances en nanotecnología y debido a ello en las últimas dos décadas, se han sintetizado una gran variedad de nuevos nanomateriales tales como los Quantum Dots (QDots) [27]. Los efectos cuánticos proporcionan características únicas a estos nanomateriales cuando el tamaño se reduce al rango nanométrico, propiedades que no se pueden predecir a nivel macro o microscópico. Como resultado, estos nanomateriales mejoraron las capacidades del investigador para centrarse en la detección de una variedad de compuestos con propiedades que no podrían haber sido posibles con otros materiales convencionales. La evolución de las propiedades físicas, químicas y electrónicas únicas en la nanoescala constituye la esencia de las diversas aplicaciones de la nanotecnología [28].

Los QDots, gracias a sus marcados efectos de borde, alta área superficial, mejor solubilidad en disolventes acuosos y no acuosos, confinamiento cuántico, fácil dopaje y funcionalización, y una mayor viabilidad para combinar con otros nanomateriales [29] han mostrado contribuciones notables en varios campos como en biodetección y obtención de bioimágenes [30], energía fotovoltaica [31], diodos emisores de luz, pilas de combustible [32], supercapacitores y baterías de iones secundarios [33].

En particular, los puntos cuánticos de carbono, *nanodots* de carbono o *Carbon Quantum Dots* (CQDots), requieren un menor costo de síntesis y presentan menos dificultades técnicas durante su preparación [34]. Además, los métodos de síntesis de CQDots son más respetuosos con el medio ambiente en comparación con otras variedades de QDots como los nanodots semiconductores, que utilizan metales pesados altamente tóxicos en su proceso de producción [35].

Los puntos cuánticos de carbono fueron descubiertos por Xu y colaboradores en 2004 [36]. A pesar de su excelente desempeño, aún existe un escaso número de publicaciones en el ámbito de los sensores electroquímicos [35]. Fueron descritos como partículas de forma casi esférica con un tamaño menor de 10 nm [37]. Su pequeño tamaño es tal que, normalmente, tienen dimensiones de 10 a 50 átomos y de 100 a 100000 forman el volumen total de la partícula [38]. Los CQDots poseen una red cristalina de una o unas pocas capas de grafeno apiladas con carbonos sp^2/sp^3 , tal como se esquematiza en la figura VI-2. [39]

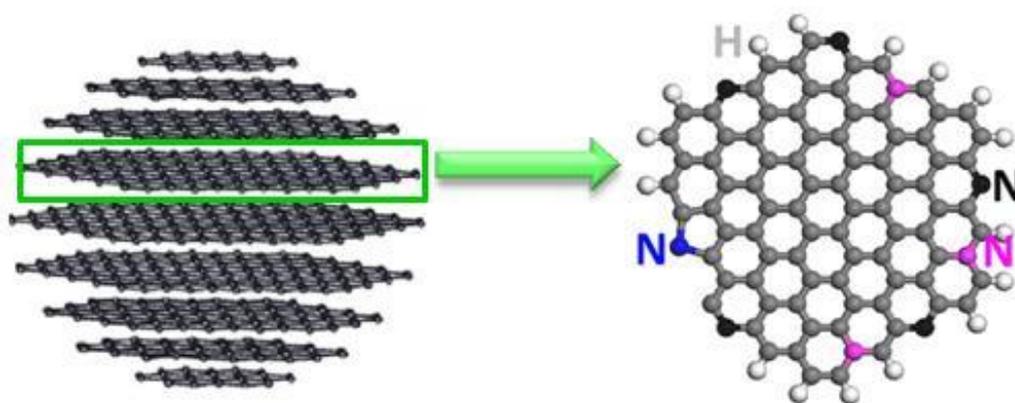


Figura VI-2. Modelo de CQDots esférico formado por capas de grafeno dopado con átomos de nitrógeno.

Los CQDots han despertado una atención creciente debido a su alta solubilidad en medios acuosos, baja toxicidad, estabilidad fotoluminiscente y mejor biocompatibilidad que otros nanomateriales [27]. Por otro lado, sus propiedades electrónicas privilegiadas como donantes y aceptores de electrones los han dotado de luminiscencia electroquímica y quimioluminiscencia, lo que los convierte en materiales promisorios en los campos de catálisis y sensores [40]. Además, los CQDots, debido a su adecuada biocompatibilidad, son materiales muy aptos para aplicaciones biológicas tales como sondas para bioimagen, administración de fármacos y biosensores [41,42]. Los CQDots exhiben atributos asombrosos para la detección electroquímica debido a sus notables características electrónicas, gran área superficial, disponibilidad de abundantes sitios de borde para funcionalización, gran biocompatibilidad, bajo costo y versatilidad, así como su capacidad para ser modificado con otros materiales nanoestructurados [43].

Desde su descubrimiento y hasta la actualidad se han desarrollado numerosos informes sobre la preparación de nanodots a través de varios enfoques. Por lo general, los métodos de síntesis de CQDots se pueden dividir en dos categorías *top down* y *bottom up* [44]. La ruta de arriba hacia abajo, utiliza como sustratos diferentes tipos de materiales de carbono como carbón, biomasa carbonizada, grafito, nanotubos, etc mediante técnicas físicas o químicas para alcanzar partículas de tamaño nanoscópico. Por otro lado, el enfoque ascendente, utiliza pequeños precursores moleculares adecuados que mediante reacciones hidrotermales, pirólisis o combustión generan los CQDots deseados [35,39]. De manera general, las metodologías *top down* generan puntos cuánticos de carbono amorfos, debido a la falta de control sobre las condiciones de síntesis, a diferencia de las metodologías *bottom up* que genera estructuras con mayor grado de cristalinidad, producto del control en las diferentes rutas sintéticas.

Las rutas de síntesis influyen en gran medida en las características y propiedades finales de los puntos cuánticos de carbono. Por ejemplo, si no hay un grupo hidroxilo o carboxilo en la superficie de los nanodots, ya no serán solubles en agua. De manera similar, el dopado con otros elementos como heteroátomos de nitrógeno o fósforo, puede mejorar la solubilidad y la conductividad eléctrica [45]. De manera general, se puede mencionar que los átomos y restos dopados se encuentran en los bordes de las láminas de grafeno que forman la partícula [35], tal como se puede apreciar en el modelo de la **figura VI-2**. Además, los grupos funcionales superficiales (OH, NH₂, etc.) de los CQDots también podrían proporcionar sitios de anclaje más favorables y sitios activos para la preparación de materiales de múltiples componentes o nanohíbridos [46]. Más importante aún, los CQDots dopados con heteroátomos (N, S, P, etc.) con multicomponentes también podrían promover las propiedades electrocatalíticas de los compuestos al aumentar la transferencia de electrones a través de interacciones internas [47]. Además, las fuertes interacciones de la interfaz dentro de los nanocompuestos multicomponentes podrían promover aún más la transferencia de electrones intermoleculares, lo que significaría mejorar el rendimiento electrocatalítico [48].

Por lo tanto, es necesario conocer las técnicas de síntesis y sus efectos en los nanodots para poder seleccionar el método apropiado para fabricar el nanomaterial que satisfaga las necesidades para su aplicación final.

En este capítulo se describe la síntesis y caracterización de dos nuevos nanomateriales de carbono, GEQE y CQDots, de manera verde, económica y sencilla, mediante el empleo de metodologías electroquímicas. Por último, se presenta la síntesis y caracterización electroquímica de un nuevo nanomaterial híbrido formado por la mezcla de las dos nanoestructuras de carbono sintetizadas.

VI-2. Sección experimental

Para la síntesis de GEQE se utilizaron barras de grafito comerciales marca Maped. Sulfato de sodio (Na_2SO_4) marca Biopack, ácido sulfúrico (H_2SO_4) marca Anedra, ácido nítrico (HNO_3), hidróxido de sodio (NaOH), sacarosa, fructuosa y glucosa marca J.T.Baker. etanol y propanol, ambos de grado analítico marca J.T.Baker. L-Arginina marca Sigma-Aldrich.

Para la caracterización electroquímica de las nanoestructuras se emplearon diferentes marcadores redox: ácido ascórbico (AA) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% marca J.T.Baker, dopamina (DA), hidroquinona y benzoquinona marca Sigma-Aldrich, ferricianuro y ferrocianuro de potasio marca Biopack. Todos los reactivos empleados son de grado analítico y se utilizaron sin purificación adicional. Las soluciones fueron preparadas en *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40, (fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4) y fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) marca Biopack) utilizando agua ultrapura provista por un sistema Millipore-MilliQ.

VI.2.1. Síntesis de GEQE

Para la síntesis de grafeno electroquímicamente expandido se emplearon soluciones conteniendo diferentes compuestos capaces de producir la exfoliación del grafito a través de sus iones, a saber: H_2SO_4 0,50 M, Na_2SO_4 0,50 M, mezclas 1:1 $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{NaOH}$ 0,50 M y $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ 0,50 M. Se utilizó

una celda electroquímica de dos electrodos. Un electrodo de platino, de gran área superficial, que cumple las funciones de electrodo de referencia y contraelectrodo simultáneamente y como electrodo de trabajo barras de grafito comercial, las cuales sirvieron como sustrato para la formación de la nanoestructura, tal como se muestra en la **figura VI-3**.

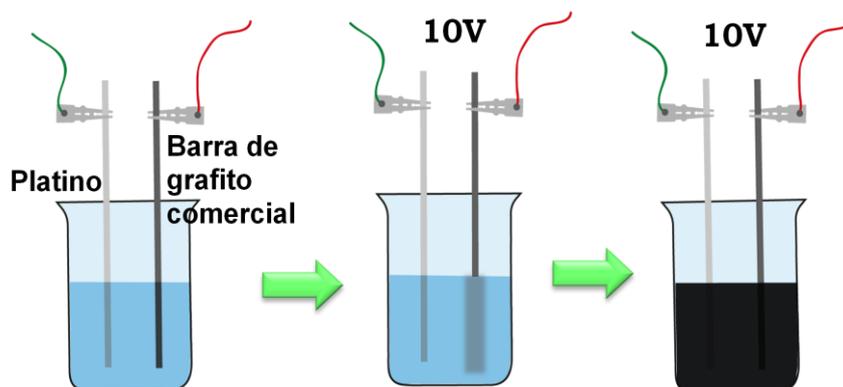


Figura VI-3. Esquema del arreglo experimental empleado para la síntesis de GEQE mediante exfoliación electroquímica.

La intercalación de los iones fue impulsada por la acción de un potencial de +10 V, el cual fue sostenido un dado tiempo hasta producir el consumo total de la barra de grafito.

Una vez obtenida una solución coloidal de color negro, la misma fue filtrada y sometida a un proceso de enjuague exhaustivo. Cuando el agua empleada en el lavado llegó a pH neutro, se colectó el sólido negro obtenido en un molino de bolas para secar el producto de síntesis. El resultado final fue un polvo negro, fácilmente manipulable con el cual se prepararon posteriormente las dispersiones que se inmovilizaron sobre la superficie de los electrodos.

VI.2.2. Síntesis de CQDots

Se emplearon diferentes metodologías *bottom up* de síntesis para la obtención de CQDots.

Cabe señalar que los productos obtenidos mediante las dos metodologías propuestas poseen un alto grado de funciones oxigenadas que hacen de las mismas un material poco conductor y con pobres características para ser empleadas en el ámbito electroquímico.

También se sintetizaron CQDots siguiendo el protocolo propuesto por Liu, Xu y colaboradores [52], que se muestra en la **figura VI-4**, con algunas modificaciones. El protocolo se basa en la formación de CQDots mediante la aplicación de altos sobrepotenciales en soluciones ligeramente ácidas (H_2SO_4 $1,0 \times 10^{-5}$ M) de diferentes aminoácidos, en el caso de este trabajo de Tesis se utilizó una solución de L-arginina (Arg) 20 mg/mL. Se utilizó una configuración de celda de dos electrodos, con dos alambres de platino de gran área superficial y se aplicó un potencial de +9 V durante 1 h para sintetizar las nanopartículas. El mecanismo de formación de CQDots propuesto en una primera instancia produce la oxidación de los aminoácidos, los que posteriormente polimerizan y luego, mediante un proceso de carbonización dan origen al nanomaterial. Nuevamente, la presencia de la nanoestructura se evidencia por el cambio de color de la solución (**figura VI-5**). De esta manera se logró sintetizar CQDots en condiciones ligeramente ácidas con buenos rendimientos y con la posibilidad de ser utilizados sin purificación adicional.

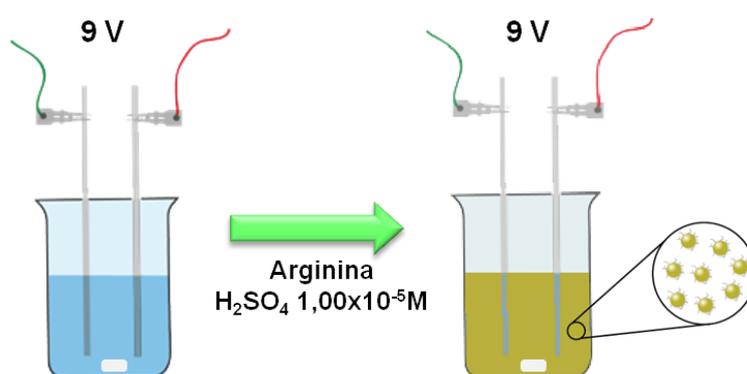


Figura VI-5. Esquema del arreglo experimental para la síntesis de CQDots a partir de aminoácidos en medio ligeramente ácido (H_2SO_4 $1,0 \times 10^{-5}$ M).

Es importante resaltar que el método propuesto tiene la ventaja de poder modificar ciertas variables de síntesis, tales como el medio de reacción

y el potencial aplicado, de manera de modular las características finales del material resultante.

VI.2.3. Síntesis del nanohíbrido GEQE-CQDots

La síntesis del nanohíbrido se realizó a través de la mezcla de GEQE y CQDots, sintetizados en condiciones óptimas, suficiente agua para completar 1,00 mL de dispersión y posterior sonicado durante un determinado tiempo. Se utilizó una sonda ultrasónica marca Sonics Materials vibra-cell con una potencia del 50%, a fin de producir la intercalación de los CQDots entre las láminas de grafeno, de manera tal de funcionalizar dicha nanoestructura y producir una dispersión con mayor reactividad y estabilidad.

VI.2.4. Caracterización de las nanoestructuras

VI.2.4.1. Caracterización electroquímica

Las propiedades electrocatalíticas de los diferentes materiales obtenidos fueron evaluadas depositando 20 μ L de las dispersiones conteniendo las nanoestructuras en estudio sobre GCE, mediante experimentos voltamperométricos, amperométricos y de espectroscopia de impedancia electroquímica, utilizando una celda convencional de tres electrodos, la cual fue descrita en el **capítulo II**.

VI.2.4.2. Caracterización morfológica y espectroscópica

A fin de evaluar la morfología y grupos funcionales de las estructuras sintetizadas, se realizaron diversos ensayos inmovilizando las diferentes dispersiones en una pastilla de seleniuro de zinc o portaobjetos de vidrio para el análisis por FT-IR y Raman, respectivamente. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 mm y 1 cm de paso óptico para realizar las caracterizaciones por UV-Visible y la evaluación del tamaño de partícula por DLS, respectivamente. Para realizar el análisis termogravimétrico de las muestras se utilizaron recipientes de aluminio.

VI-3. Resultados y discusión

VI.3.1. Caracterización de GEQE

VI.3.1.1. Evaluación de la estructura de GEQE mediante Raman

Como se mencionó en capítulos anteriores, la espectroscopia Raman es una herramienta muy útil a la hora de elucidar las características estructurales de los materiales de carbono, en cuanto a la presencia de defectos y de grupos oxigenados que rompan con la conjugación aromática o estructura sp^2 . Además, de las bandas D y G, descritas en el **capítulo IV**, en algunas ocasiones, dependiendo de la longitud de onda con la que se irradia la muestra, se puede observar una tercera banda centrada alrededor de los 2700 cm^{-1} , llamada 2D que es un sobretono de la banda D y se relaciona con el ordenamiento de estructuras en multicapas.

En la **figura VI-6** se presentan los espectros obtenidos para óxido de grafeno (GrO) (—), el precursor de las síntesis (grafito comercial) (—) y los materiales resultantes de la exfoliación de las barras de grafito en los diferentes medios estudiados: GEQE(H_2SO_4) (—), GEQE(H_2SO_4/HNO_3) (—), GEQE(Na_2SO_4) (—) y GEQE($Na_2SO_4/NaOH$) (—).

Es bien conocido que el grafito está constituido por láminas de carbono apiladas con un alto grado de ordenamiento, por lo que el espectro obtenido de dicha estructura presenta una banda G aguda y bien definida, acompañada de pequeña señal relacionada con la banda D, que puede ser explicada si se tiene en cuenta el proceso de sonicado empleado para la formación de la dispersión de grafito en agua. En el extremo opuesto se encuentra el óxido de grafeno comercial, donde la banda D y G poseen intensidades similares y sumamente ensanchadas, lo que da cuenta de una estructura con una gran densidad de defectos y pobre densidad de dominios sp^2 . Todas las estructuras sintetizadas se encuentran en una situación intermedia y presentan bandas alrededor de los 1350 cm^{-1} , propias del proceso de síntesis que induce la ruptura de las láminas de grafeno e introduce defectos oxigenados en la estructura debido al medio empleado, el cual posee capacidad oxidante, y al proceso de ultracavitación proporcionado por el ultrasonido.

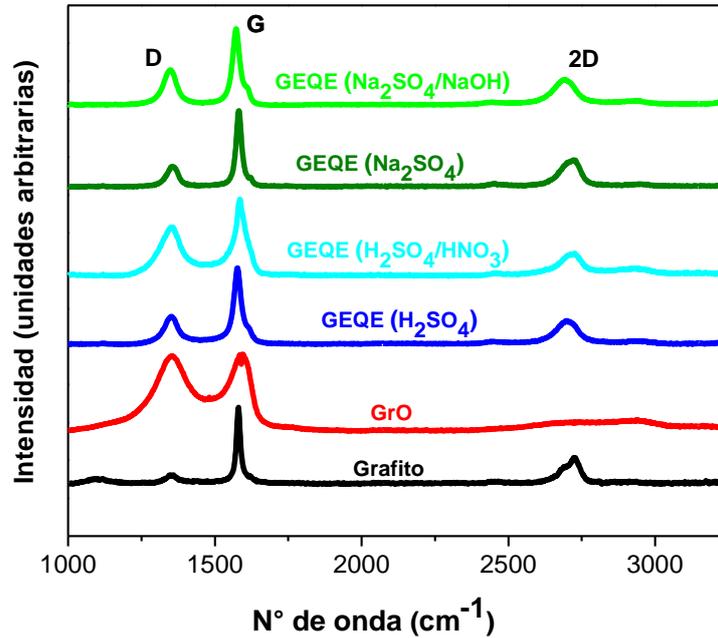


Figura VI-6. Espectros Raman obtenidos para grafito comercial (—), óxido de grafeno (—), $GEQE(H_2SO_4)$ (—), $GEQE(H_2SO_4/HNO_3)$ (—), $GEQE(Na_2SO_4)$ (—) y $GEQE(Na_2SO_4/NaOH)$ (—).

En la figura VI-7 se presentan las relaciones entre las intensidades de las bandas D y G. Puede notarse que GrO, la estructura con el mayor grado de defectos, presenta una relación I_D/I_G cercana a 1, en el extremo opuesto se encuentra la estructura más conservada, el grafito, con una relación en las intensidades de las bandas de 0,0997. De manera general, una relación más grande indica un mayor número de defectos [53]. Dentro de los nanomateriales sintetizados, los producidos utilizando medios tales como H_2SO_4 y Na_2SO_4 , son los que presentan láminas de grafeno más prístinas con una menor cantidad de defectos, por lo tanto una menor relación I_D/I_G , esto daría indicios de que dichos nanomateriales serían los más prometedores para el futuro empleo en el desarrollo de sensores electroquímicos.

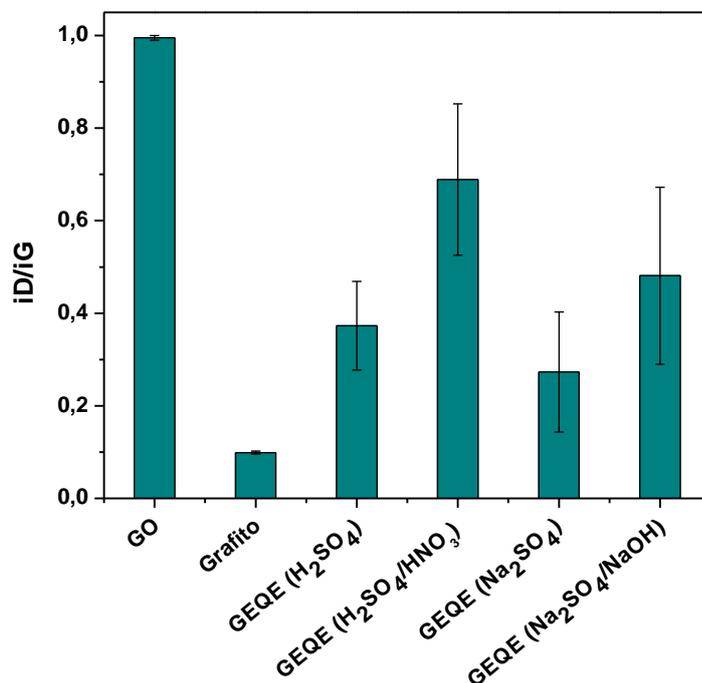


Figura VI-7. Relación de bandas D y G (ID/IG) obtenidas mediante experimentos Raman como los de la **figura VI-6** para óxido de grafeno, grafito y los nanomateriales sintetizados en diferentes medios.

Un análisis detallado de las bandas presentes en los diferentes espectros Raman obtenidos se presenta en la **tabla VI-1**. En comparación con el espectro de grafito, se observa que los productos de síntesis presentan ligeros corrimientos en la posición de la banda G hacia números de onda mayores, lo que corrobora que el proceso de síntesis introduce defectos en la nanoestructura. Como fue mencionado en el **capítulo IV**, el ancho de $\frac{1}{2}$ pico de las bandas D y G, aumentan con el aumento del desorden. Este parámetro no sufre grandes modificaciones cuando la síntesis se lleva a cabo utilizando H₂SO₄ y Na₂SO₄ lo que indicaría que en dichos medios se generan estructuras más ordenadas con menor grado de defectos.

La posición de la banda 2D se correlaciona con el número de láminas de grafeno presentes en el nanomaterial. Dicha banda se corre a número de onda menor cuando el número de capas es menor [54]. De esta manera, se puede inferir que la síntesis llevada a cabo en H₂SO₄ y en la mezcla de Na₂SO₄/NaOH, produce una mejor exfoliación del grafito, dando como resultado materiales de dimensiones menores. Datos bibliográficos indican que

en el grafeno de capa simple, se observa que la banda 2D es un solo pico simétrico con un ancho de $\frac{1}{2}$ pico de $\sim 30 \text{ cm}^{-1}$ [55]. Cuando el número de láminas aumenta, dicha banda se ensancha y se desdobra en nuevas bandas perdiendo la simetría que la caracteriza, de esta manera se concluye que todas las estructuras sintetizadas poseen múltiples capas y confirma el exitoso proceso de exfoliación electroquímica, ya que dicho parámetro disminuye cuando se lo compara con el valor obtenido para el grafito que es el precursor de las síntesis.

Tabla VI-1. Comparación de los parámetros de las bandas D, G y 2D de los espectros Raman obtenidos para las distintas muestras de GEQE sintetizadas

	Banda	I_D/I_G	Posición (cm^{-1})	Ancho de $\frac{1}{2}$ pico (cm^{-1})
Grafito	D	0,099	1352	43
	G		1579	17
	2D		---	2725
GEQE (H_2SO_4)	D	0,373	1351	54
	G		1579	31
	2D		---	2699
GEQE ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$)	D	0,689	1350	90
	G		1586	52
	2D		---	2712
GEQE (Na_2SO_4)	D	0,273	1355	43
	G		1581	22
	2D		---	2712
GEQE ($\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{NaOH}$)	D	0,481	1347	49
	G		1581	31
	2D		---	2690

A pesar de la gran cantidad de información que brinda la espectroscopia Raman, es importante resaltar que la técnica no es capaz de dilucidar la naturaleza de los defectos que rompen con la conjugación π , los cuales pueden clasificarse en dos grupos: defectos oxigenados (epóxidos, carboxílicos, hidroxilos, cetonas, etc.) o defectos por vacancia, lo que sugiere la presencia de huecos en las láminas, tal como se puede apreciar en la **figura VI-8**. Consecuentemente, es necesario utilizar otras técnicas a fin de conocer más acerca del tipo de defectos presentes en los nanomateriales sintetizados.

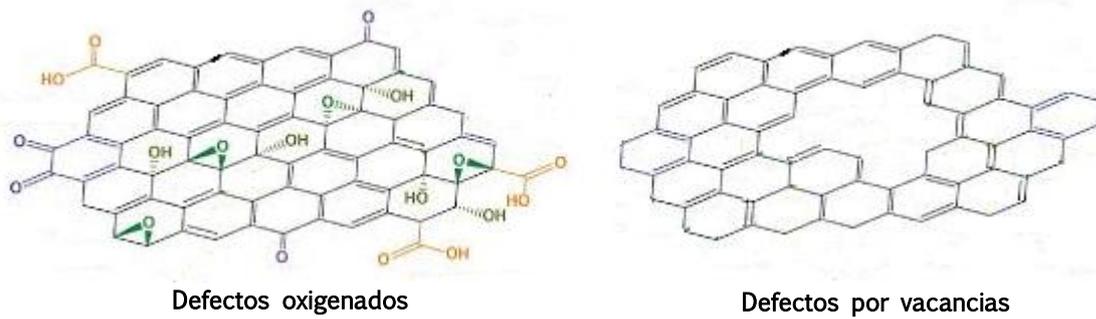


Figura VI-8. Naturaleza de los defectos presentes en las estructuras de las láminas gráficas.

VI.3.1.2. Evaluación de la estabilidad térmica de GEQE

A fin de obtener más información acerca del tipo de defectos presentes en las estructuras se realizó un análisis termogravimétrico de las muestras, el cual se muestra en la **figura VI-9.A**. Puede notarse que, junto con el grafito, las síntesis realizadas utilizando como medio de exfoliación Na_2SO_4 y la mezcla $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{NaOH}$ son las más estables térmicamente, presumiblemente debido a que no son medios fuertemente oxidantes y en consecuencia no introducen una gran cantidad de defectos oxigenados en la estructura. De esta manera, es factible pensar que estas estructuras presentan en su mayoría defectos por vacancias en lugar de defectos oxigenados.

En las **figuras VI-9.B** y **VI-9.C** se representan los porcentajes de pérdida de masa de cada muestra para diferentes intervalos de temperatura. El porcentaje de disminución de masa que se produce antes de los $150\text{ }^\circ\text{C}$, es el resultado de la pérdida de humedad retenida en las estructuras de carbono [56]. Sobrepasada esta temperatura, la pérdida de masa se debe a la escisión de los grupos carboxílicos, en forma de dióxido de carbono, que son los grupos oxigenados más lábiles [57,58] y se encuentran en los bordes de las láminas gráficas, tal como se mostró en la **figura VI-8**. Por último, la pérdida de masa a temperaturas por encima de los $300\text{ }^\circ\text{C}$ se debe a la pérdida de los grupos oxigenados que existen en el plano basal de las láminas de grafeno, tales como hidroxilos y epóxidos. De acuerdo a lo expuesto, se puede decir, de manera general, que la metodología de síntesis no introduce una cantidad significativa de defectos oxigenados en el plano basal de las estructuras de carbono obtenidas, en tanto que las estructuras sintetizadas en

medios tales como H_2SO_4 y la mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ poseen una mayor cantidad de defectos de borde o grupos carboxílicos, los cuales no afectan de manera significativa la conductividad del material resultante ya que no rompen la estructura aromática.

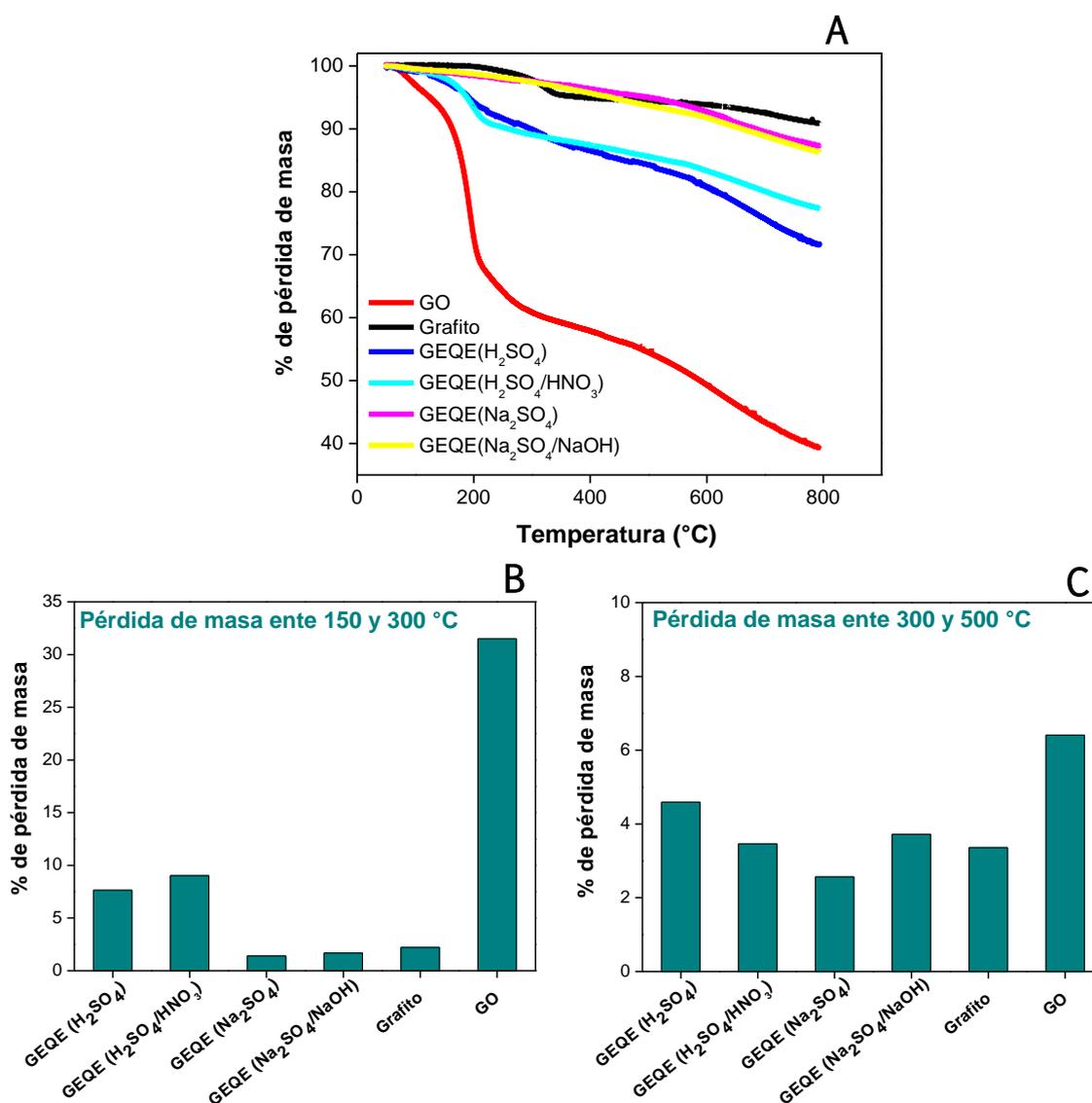


Figura VI-9. (A) Experimentos termogravimétricos obtenidos para las diferentes muestras sintetizadas, (B) % de pérdida de masa en el intervalo de temperatura 150-300 °C y (C) % de pérdida de masa en el intervalo de temperatura 300-500 °C.

VI.3.1.3. Evaluación de la respuesta electroquímica de GEQE

Se emplearon diferentes técnicas electroquímicas y analitos modelo para evaluar las bondades electroquímicas de GEQE sintetizado en diferentes medios.

Zen y colaboradores [59], determinaron que el mecanismo por el cual se produce la descarga de analitos como AA se ve facilitada cuando en la superficie de las estructuras de carbono existen grupos oxigenados del tipo carboxílicos (**figura VI-10.B**), los cuales interaccionan con ácido ascórbico (AA) mediante la formación de enlace puente hidrógeno y lo acercan a la superficie, facilitando de esta manera la transferencia electrónica. Los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica utilizando una solución de AA $1,0 \times 10^{-3}$ M se resumen en la **figura VI-10.A**. En dicha figura se puede notar que los menores sobrepotenciales para la oxidación de AA y las corrientes más altas para dicho proceso se obtienen cuando los electrodos son modificados con GEQE (H_2SO_4) y GEQE (Na_2SO_4), este hecho puede explicarse teniendo en cuenta que el analito en cuestión se descarga preferentemente sobre la estructura sp^2 de las láminas gráficas.

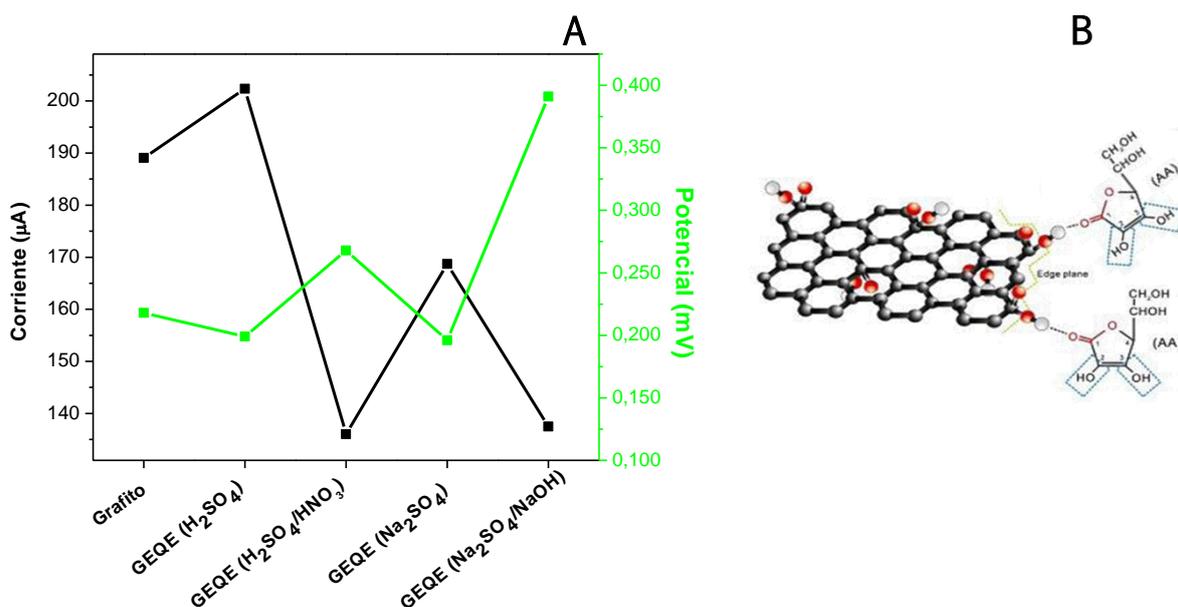


Figura VI-10. (A) Corriente y potencial de pico para la oxidación de AA obtenido por voltamperometría cíclica sobre GCE/GEQEs y (B) mecanismo de descarga de AA sobre las láminas gráficas (tomada de referencia [59]).

Este resultado es congruente con los obtenidos tanto, por espectroscopia Raman como por TGA, donde se determinó que GEQE sintetizado en ácido sulfúrico como agente intercalador posee la estructura sp^2

más conservada y la mayor cantidad de grupos oxigenados de borde. Si bien GEQE sintetizado en la mezcla de ácidos ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$) también presenta un gran número de grupos carboxílicos, se determinó por espectroscopia Raman como una de las estructuras con mayor grado de defectos. Estos experimentos electroquímicos sugieren que la síntesis en dicho medio promueve la formación de huecos en la lámina de grafeno que rompen con la conjugación aromática y consecuentemente con la conductividad eléctrica.

Se realizaron experimentos amperométricos a $-0,100$ V para agregados sucesivos de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3}$ M, con la finalidad de poner de manifiesto posibles defectos en el plano basal de las láminas gráficas sintetizadas. A modo de resumen, se presentan en la **figura VI-11** las sensibilidades obtenidas para dichos experimentos.

Algunos estudios sugieren que el paso determinante de la velocidad para el proceso de reducción de H_2O_2 es la ruptura del enlace O-O, dicho proceso se ve favorecido o estabilizado por la interacción con estructuras de carbono más conservadas [60], es decir que H_2O_2 , preferentemente se descarga sobre la estructura sp^2 de las láminas de grafeno. Consecuentemente, se puede concluir que GEQE sintetizado en H_2SO_4 es la nanoestructura de carbono con la configuración aromática más conservada, ya que exhibe las mayores sensibilidades hacia la reducción del analito empleado para el análisis. Por otro lado, se pudo corroborar que la exfoliación llevada a cabo en la mezcla de H_2SO_4 y HNO_3 promueve la formación de defectos por vacancia en la estructura carbonácea, hecho que se refleja en la baja sensibilidad obtenida para peróxido de hidrógeno.

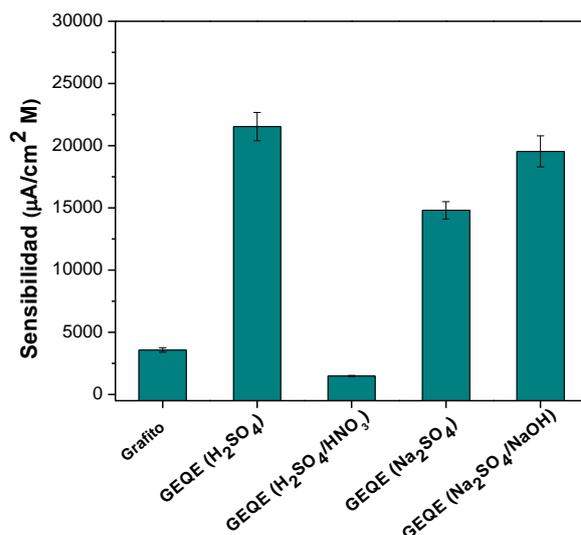


Figura VI-11. Sensibilidades obtenidas para agregados sucesivos de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3} M$ a $-0,100 V$ sobre GCE modificado con las diferentes nanoestructuras sintetizadas.

Por último, se realizó un análisis mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) utilizando como sonda redox la cupla hidroquinona-benzoquinona, la cual proporciona evidencias del bloqueo superficial de los electrodos. Los datos obtenidos fueron ajustados empleando un circuito de Randles, que fue descrito en el **capítulo II** y se muestra en el *inset* de la **figura VI-12**, la cual resume las resistencias a la transferencia de carga obtenidas para cada uno de los materiales sintetizados.

Puede notarse, que todas las nanoestructuras sintetizadas, exhiben resistencias a la transferencia de carga inferiores a las que presenta el precursor utilizado para generar los diferentes GEQE, siendo ligeramente menor para el nanomaterial sintetizado por exfoliación en H_2SO_4 , posiblemente debido a que dicha estructura es la que presenta la menor densidad de defectos, con su configuración π más conservada y a que la naturaleza aromática del analito en cuestión interactúa favorablemente con las láminas gráficas, favoreciendo la transferencia de carga.

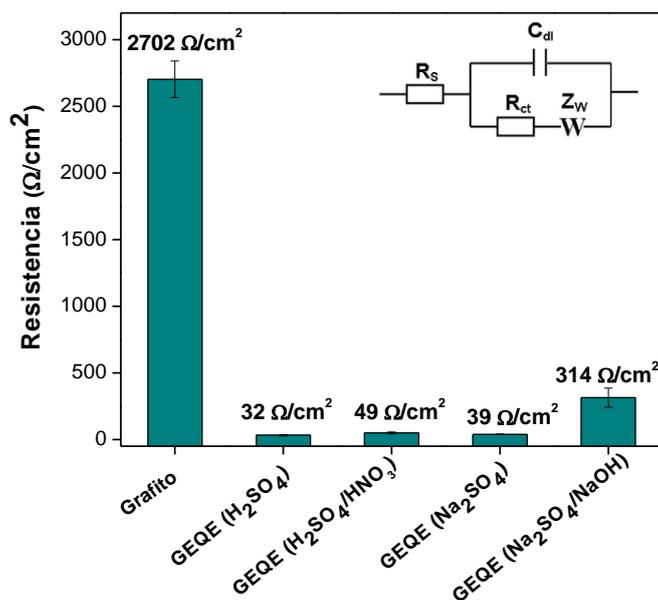


Figura VI-12. Resistencia a la transferencia de carga para la cupla hidroquinona-benzoquinona para las diferentes estructuras sintetizadas. Obtenidas mediante EIS aplicando un potencial de 0,050 V.

De acuerdo a todo lo expuesto, la síntesis de GEQE realizada utilizando H_2SO_4 como medio de exfoliación se determinó como el material más promisorio para ser empleado en el desarrollo de sensores electroquímicos y consecuentemente es el que se empleará para la generación de nuevos nanomateriales híbridos en un futuro.

VI.3.2. Caracterización de CQDots

VI.3.2.1. Propiedades ópticas de CQDots, análisis UV-Visible

La primera evidencia de la formación de los CQDots es el cambio de color de la solución, tal como fue mencionado en la **sección VI-2.2**. Se realizaron estudios por espectroscopia UV-Visible para poner de manifiesto las transiciones electrónicas que dan cuenta de la formación de enlaces C=C que conforman la estructura de las nanopartículas de carbono. En la **figura VI-13** se muestran comparativamente los espectros obtenidos para una solución de L-arginina (L-Arg), precursor de la síntesis y el producto obtenido.

El espectro de L-Arg no presenta bandas asociadas a transiciones electrónicas en el UV-Visible en el intervalo de longitudes de onda analizadas.

En contraposición, en el espectro de los CQDots aparecen dos bandas de absorción en la región ultravioleta, a los 304 nm, relacionada con las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$, asociada al doble enlace C=C de la estructura aromática de la nanopartícula y a los 368 nm, que se asocia con las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ de los grupos C=O y C=N presentes en la estructura debido a los grupos funcionales que posee el aminoácido utilizado en la síntesis.

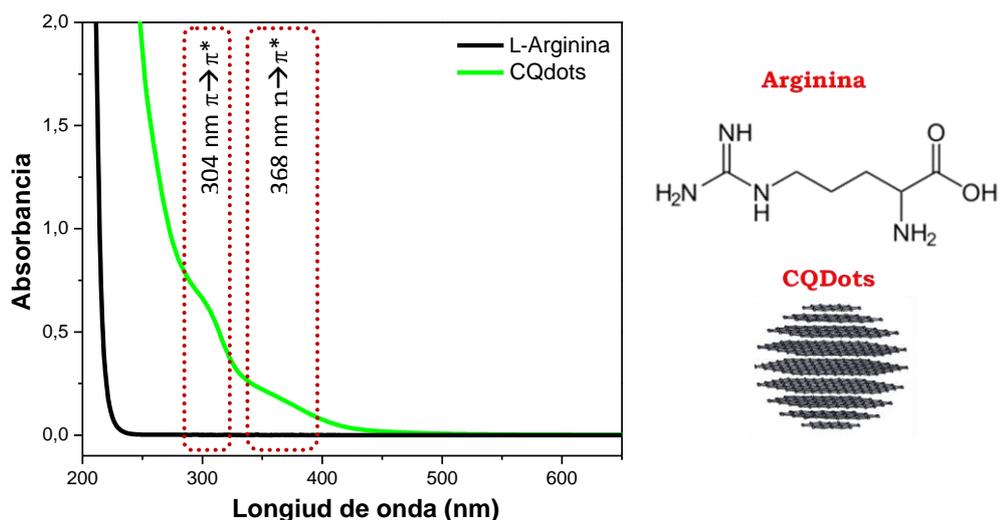


Figura VI-13. Espectros UV-Visible para una solución de L-arginina (—) y para la solución resultante de la síntesis (—).

En general, los materiales carbonáceos con estructuras aromáticas conservadas presentan las bandas correspondientes a los enlaces C=C y C=O alrededor de los 250-280 nm y 320-340 nm respectivamente. Numerosos autores reportaron que el dopaje de las láminas de grafeno con átomos de nitrógeno producen un corrimiento de las bandas de absorción a longitudes de onda mayores y también disminuyen notablemente la intensidad de las mismas, ya que los grupos amino podrían comportarse como auxocromos [61,62].

VI.3.2.2. Análisis de la estructura química de las partículas sintetizadas mediante FT-IR

La formación de los enlaces que conforman la nueva estructura de carbono sintetizada se analizó mediante espectroscopia infrarroja y los resultados obtenidos se muestran en la figura VI-14. El espectro de arginina

presenta bandas características asociadas a los grupos funcionales que posee su estructura química. Las bandas alrededor de 3338 cm^{-1} y 3150 cm^{-1} corresponden a la vibración de estiramiento de los enlaces O-H y N-H respectivamente [63]. Entre 2948 cm^{-1} y 2874 cm^{-1} aparece la vibración de los enlaces C-H correspondientes a las cadenas alifáticas [64]. La banda correspondiente al estiramiento del enlace C-N se encuentra a 1401 cm^{-1} [62]. Finalmente, el espectro de L-arginina presenta una banda a 1653 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace N-H [65].

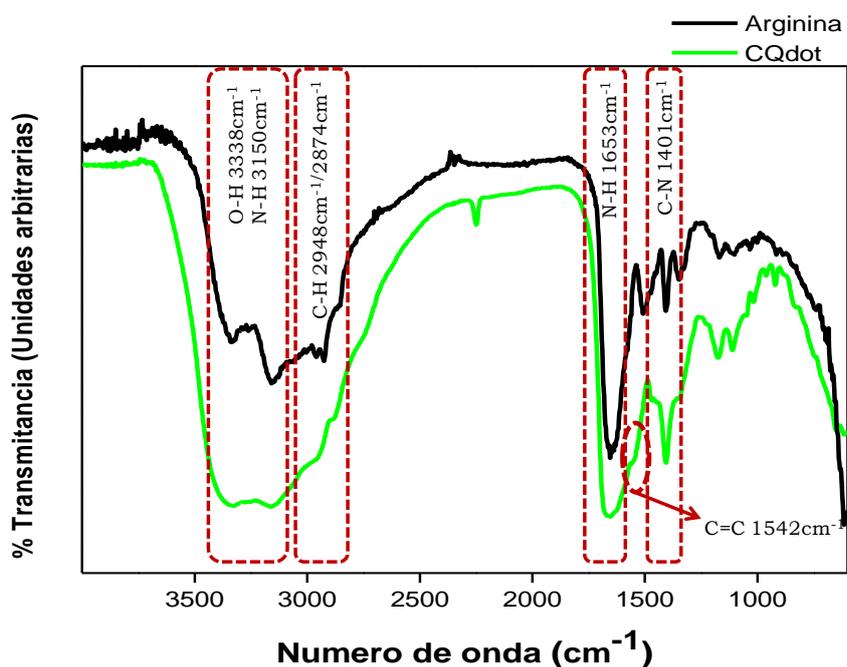


Figura VI-14. Espectros FT-IR de L-Arginina (—) y CQdots (—).

El espectro de las CQDot presenta las mismas bandas mencionadas con anterioridad para el espectro del precursor, pero las intensidades relativas de las bandas difieren significativamente. Por ejemplo, se puede observar cómo la intensidad relativa de la vibración de las cadenas alifáticas disminuye en comparación con la banda vibracional de los enlaces O-H y N-H, lo que daría indicios de la formación de la estructura aromática y la reducción de las cadenas alifáticas. La evidencia más contundente de la formación de los CQDots, es la aparición de una nueva banda a 1542 cm^{-1} , consistente con el estiramiento del doble enlace C=C [65,66] que sólo está presente en las nanopartículas sintetizadas.

VI.3.2.3. Análisis del tamaño de CQDots por DLS

El radio hidrodinámico de las partículas sintetizadas se determinó mediante DLS. El histograma obtenido con la distribución de los diámetros de las partículas sintetizadas se muestra en la **figura VI-15**. En el mismo puede observarse una población con tamaño promedio de (4 ± 1) nm, estos resultados corroboran la formación de los nanodots a partir de la polimerización y posterior carbonización de L-Arg. Tal como fue mencionado en la introducción, este tipo de materiales a escala nanométrica deberían exhibir propiedades diferentes a la de los materiales de dimensiones micro y macroscópicas. Las características electroquímicas de las mismas se presentan en la siguiente sección.

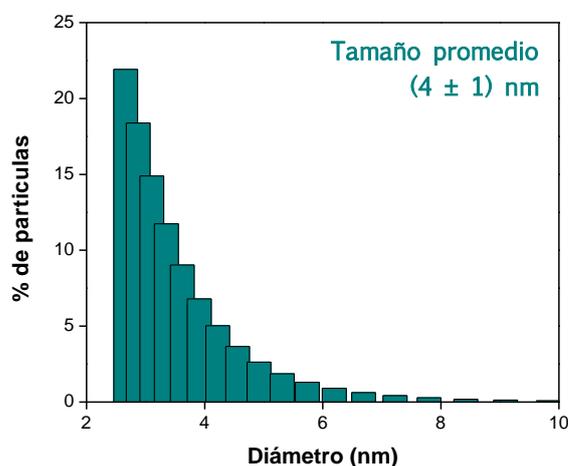


Figura VI-15. Histograma de distribución de tamaño de los CQDots sintetizadas obtenidos mediante experimentos DLS

VI.3.2.4. Propiedades electroquímicas de CQDots sintetizadas

A fin de conocer las propiedades electroquímicas de las partículas sintetizadas, se realizaron voltamperogramas cíclicos sobre electrodos de carbono vítreo modificados con los CQDots para una variedad de analitos de diferente naturaleza y con distintas cargas.

Los voltamperogramas obtenidos para soluciones de $K_3[Fe(CN)_6]$ - $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ M, AA $1,0 \times 10^{-3}$ M, DA $1,0 \times 10^{-3}$ M, H_2O_2 $5,0 \times 10^{-2}$ M e hidroquinona-benzoquinona $1,0 \times 10^{-3}$ M, preparadas en *buffer* fosfato pH 7,40

sobre electrodos de carbono vítreo (—) y sobre GCE modificado con CQDots (—) se presentan en la figura VI-16.

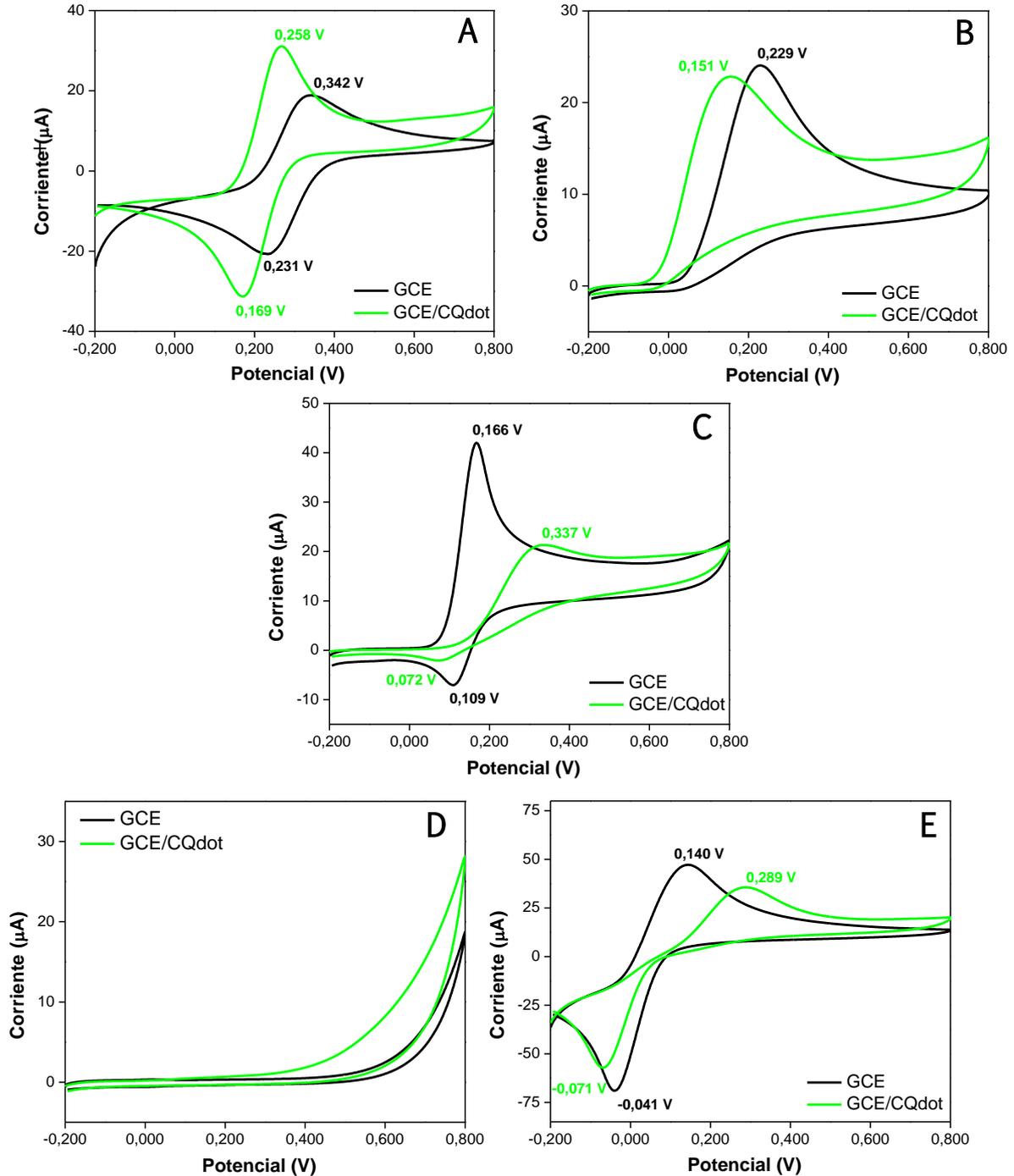


Figura VI-16. Voltamperogramas cíclicos sobre GCE (—) y GCE/CQDots (—) para soluciones de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3} M$ (A), AA $1,0 \times 10^{-3} M$ (B), DA $1,0 \times 10^{-3} M$ (C), H_2O_2 $5,0 \times 10^{-2} M$ (D) e hidroquinona-benzoquinona $1,0 \times 10^{-3} M$ (E). Velocidad de barrido $0,100 V/s$.

El comportamiento observado para todas las cuplas analizadas puede explicarse sobre la base del análisis de la carga superficial que aporta CQDots a la superficie electródica modificada. Es de suponer que debido a su composición CQDots presentan densidad de carga positiva, debido a los grupos amino provistos por el aminoácido precursor de la síntesis.

Tanto AA (pKa 4,10) como ferri-ferrocianuro de potasio, (**figuras VI-16.A y VI-16.B**) poseen carga negativa al pH de trabajo y puede notarse que, en ambos casos, los potenciales requeridos para producir la oxido-reducción de los mismos son notablemente menores sobre GCE/CQDots que sobre GCE. Esto da cuenta de la carga positiva que presentan los CQDots sintetizados debido a los grupos aminados superficiales propios del precursor empleado para la síntesis, consecuentemente la interacción electrostática que se produce por poseer cargas opuestas facilita la descarga y la transferencia electrónica.

Los experimentos realizados utilizando un analito con carga positiva al pH de trabajo, tal como dopamina (pKa 8,93) presentaron un comportamiento totalmente opuesto, es decir que los potenciales requeridos para producir la oxido-reducción de la catecolamina fueron mayores (Ver **figura VI-16.C**), este hecho confirma que los nanodots de carbono sintetizados poseen carga superficial positiva, lo que produce una repulsión electrostática con analitos como la DA que dificulta la transferencia electrónica, haciendo que los sobrepotenciales requeridos para la óxido-reducción sean mayores, consecuentemente la sonda redox presenta un comportamiento más irreversible.

En el caso de analitos neutros al pH de trabajo, tales como H_2O_2 $5,0 \times 10^{-2}$ M e hidroquinona-benzoquinona $1,0 \times 10^{-3}$ M los cuales se muestran en las **figura VI-16.D y VI-16E**, el comportamiento electroquímico observado es muy diverso, debido a que el mismo se encuentra íntimamente relacionado con la forma en la que se produce la descarga ya que no existen interacciones electrostáticas como en los casos anteriores. Puede notarse que la oxidación de peróxido de hidrógeno se ve favorecida por la presencia de las nanopartículas en la superficie de los electrodos, posiblemente, debido a que las láminas gráficas que componen los CQDots facilitan el proceso de oxido-reducción de dicho analito ya que, como fue mencionado con

anterioridad, el H_2O_2 se descarga preferentemente sobre la estructura sp^2 [60]. Por el contrario, para que se produzca la óxido-reducción de la sonda redox hidroquinona-benzoquinona se requieren mayores sobrepotenciales en comparación a los encontrados para GCE. De manera general, este tipo de analitos se utiliza como marcador para evaluar el bloqueo superficial de los electrodos, con lo cual se puede mencionar que la presencia de CQDots dificulta la interacción de la sonda redox con la superficie y consecuentemente los sobrepotenciales requeridos son mayores a los obtenidos para la superficie de GCE sin modificar [67].

VI.3.3. Caracterización electroquímica del híbrido GEQE-CQDots

El híbrido generado por la mezcla de GEQE obtenido en óptimas condiciones y las CQDots fue caracterizado mediante experimentos voltamperométricos para analitos de diversa naturaleza. En la **figura VI-17** se presentan comparativamente los voltamperogramas obtenidos para electrodos de carbono vítreo modificados con GEQE (—), CQDots (—) y el híbrido GEQE-CQDots (—), para soluciones de DA $1,0 \times 10^{-3} \text{M}$ (A) y AA $1,0 \times 10^{-3} \text{M}$ (B) respectivamente.

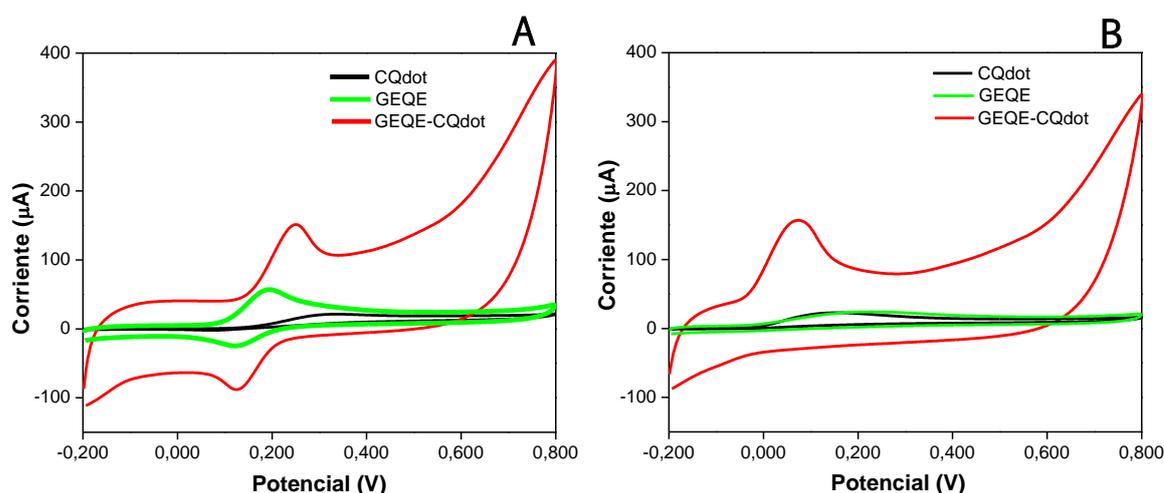


Figura VI-17. Voltamperogramas cíclicos sobre GCE/CQDots (—), GCE/GEQE (—) y GCE/GEQE-CQDots (—) para soluciones de DA $1,0 \times 10^{-3} \text{M}$ (A) y AA $1,0 \times 10^{-3} \text{M}$ (B). Velocidad de barrido $0,100 \text{ V/s}$.

Para el caso de DA, puede notarse un marcado efecto electrocatalítico para la óxido-reducción del analito sobre GCE/GEQE-CQDots en comparación con la respuesta obtenida para GCE/CQDots, lo que da cuenta de que el híbrido es capaz de revertir el efecto de repulsión de cargas entre CQDots y DA, como se vio en la **sección VI-3.2.4**. Por otra parte, GCE/GEQE-CQDots también demuestra propiedades electrocatalíticas mejoradas para la descarga de AA, tal como fue presentado en la **sección VI-3.1.3** y **sección VI-3.2.4**, ambos componentes del híbrido mejoran la respuesta electroquímica para la oxidación de dicho analito.

Tabla VI-2. *Parámetros voltamperométricos de AA $1,0 \times 10^{-3} M$ y DA $1,0 \times 10^{-3} M$ sobre las diferentes plataformas.*

Plataforma	AA		DA			
	E_{pa} (mV)	i_{pa} (μA)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	i_{pa} (μA)	i_{pc} (μA)
GCE	224	23	166	109	42	14
GCE/CQDots	151	22	337	72	21	6
GCE/GEQE	237	18	192	121	48	28
GCE/GEQE-CQDots	79	122	251	126	115	79

Otro aspecto importante de destacar es que, las corrientes de óxido-reducción de ambos analitos sobre GCE/GEQE-CQDots son sustancialmente mayores que las observadas cuando los electrodos son modificados con los componentes que lo conforman de manera individual, lo que da cuenta de un gran aumento del área superficial de los electrodos (**tabla VI-2**). Existe un marcado efecto sinérgico de GEQE-CQDots, que puede ser explicado si se tiene en cuenta que el proceso de ultrasonido utilizado para la síntesis del híbrido promueve la intercalación de los nanodots entre las láminas gráficas de GEQE lo que produce una mayor exfoliación de las mismas, dando como resultado una mayor área superficial expuesta a la solución y consecuentemente, una mayor respuesta en corriente cuando los electrodos son modificados con GEQE-CQDots.

VI-4. Conclusiones parciales

En este capítulo se presentaron protocolos electroquímicos sumamente sencillos, verdes y económicos para la fabricación de dos nuevos nanomateriales de carbono. Una metodología *top down* fue empleada para la síntesis de grafeno electroquímicamente expandido, mientras que los *Carbon Quantum Dots* se sintetizaron mediante una metodología *bottom up* utilizando L-arginina como precursor. En ambos casos, la formación de las nanoestructuras fue promovida por la aplicación de altos sobrepotenciales.

Los diversos GEQE sintetizados fueron caracterizados mediante experimentos Raman y TGA, y se logró corroborar la cantidad y la naturaleza de los defectos presentes en las estructuras, siendo GEQE (H_2SO_4) el que presentó láminas gráficas más conservadas con la mayor cantidad de grupos oxigenados en los bordes de las mismas, los cuales no afectan de manera significativa la conductividad eléctrica y pueden ser empleados para mejorar la respuesta de diferentes analitos sobre GCE.

Las bondades electroquímicas de los distintos GEQE se determinaron por voltamperometría cíclica, amperometría y espectroscopia de impedancia electroquímica utilizando diferentes analitos. En todos los casos, GEQE (H_2SO_4) presentó los menores sobrepotenciales de óxido-reducción, las mejores repuestas en corriente y las menores resistencias a la transferencia de carga, con lo cual se concluyó que GEQE sintetizado en H_2SO_4 0,50 M es el que presentó las características más promisorias para ser empleada en el desarrollo de nuevas plataformas sensoras.

Se estudiaron diversas metodologías electroquímicas para la síntesis de CQDots y la formación de la estructura se puso de manifiesto de manera fehaciente mediante UV-Visible y FT-IR. Mediante experimentos DLS se determinó un tamaño de partículas homogéneo, lo que da cuenta de una metodología de síntesis muy controlada.

Experimentos voltamperométricos para analitos neutros, cargados negativa y positivamente, verificaron la presencia de grupos nitrogenados remanentes en la superficie de los CQDots, propios del precursor empleado en la síntesis, que dotan a los mismos de carga superficial positiva.

Los puntos cuánticos sintetizados poseen atractivas posibilidades para ser empleados en el desarrollo de nuevos nanomateriales híbridos que posibiliten y mejoren la detección de diversos analitos.

La mezcla de las dos nanoestructuras de carbono sintetizadas mediante efecto ultrasónico generó un nuevo nanomaterial híbrido con propiedades renovadas. Por un lado, GEQE posee una estructura sp^2 bastante conservada capaz de mejorar el comportamiento electroquímico de la plataforma resultante y, por otra parte, CQDots mejoran la dispersabilidad de GEQE, dando como resultado un material menos hidrofóbico que presenta un marcado efecto sinérgico para la óxido-reducción de diferentes analitos.

La combinación de GEQE y CQDots dio como resultado un material que posee características sumamente promisorias para el futuro empleo en la construcción de nuevos sensores electroquímicos.

VI-5. Bibliografía

- [1] Z. Li, D. Guo, Y. Liu, H. Wang, and L. Wang, “Recent advances and challenges in biomass-derived porous carbon nanomaterials for supercapacitors,” *Chem. Eng. J.*, vol. 397, no. 10, p. 125418, 2020, doi: 10.1016/j.cej.2020.125418.
- [2] M. Singh, S. Singh, S. P. Singh, and S. S. Patel, “Recent advancement of carbon nanomaterials engrained molecular imprinted polymer for environmental matrix,” *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 27, p. e00092, 2020, doi: 10.1016/j.teac.2020.e00092.
- [3] X. Liu, T. H. Metcalf, J. T. Robinson, B. H. Houston, and F. Scarpa, “Shear modulus of monolayer graphene prepared by chemical vapor deposition,” *Nano Lett.*, vol. 12, no. 2, pp. 1013–1017, 2012, doi: 10.1021/nl204196v.
- [4] A. Ambrosi, C. K. Chua, A. Bonanni, and M. Pumera, “Electrochemistry of graphene and related materials,” *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 14, pp. 7150–7188, 2014, doi: 10.1021/cr500023c.
- [5] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva and A. A. Firsov, “Electric field effect in Atomically thin carbon films” *Science*, vol. 306, pp. 666–669, 2004, doi: 10.1126/science.1102896.
- [6] W. S. Hummers and R. E. Offeman, “Preparation of Graphitic Oxide,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, no. 6, p. 1339, 1958, doi: 10.1021/ja01539a017.
- [7] J. Wang, K. K. Manga, Q. Bao, and K. P. Loh, “High-Yield Synthesis of Few-Layer Graphene Flakes through Electrolyte,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, pp. 8888–8891, 2011, doi: dx.doi.org/10.1021/ja203725d.
- [8] J. Zhang, L. Nan, W. Yue, and X. Chen, “Enhanced methanol electro-oxidation activity of electrochemically exfoliated graphene-Pt through polyaniline modification,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 858, p. 113821, 2020, doi: 10.1016/j.jelechem.2020.113821.
- [9] F. Sharif *et al.*, “Synthesis of a high-temperature stable electrochemically exfoliated graphene,” *Carbon N. Y.*, vol. 157, no. 3, pp. 681–692, 2020, doi: 10.1016/j.carbon.2019.10.042.
- [10] A. Ambrosi and M. Pumera, “The CVD graphene transfer procedure introduces metallic impurities which alter the graphene electrochemical properties,” *Nanoscale*, vol. 6, no. 1, pp. 472–476, 2014, doi: 10.1039/c3nr05230c.
- [11] D. Li, M. B. Müller, S. Gilje, R. B. Kaner, and G. G. Wallace, “Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 3, no. 2, pp. 101–105, 2008, doi: 10.1038/nnano.2007.451.
- [12] X. Zhao *et al.*, “Electrochemical exfoliation of graphene as an anode material for ultra-long cycle lithium ion batteries,” *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 139, no. 10, p. 109301, 2020, doi: 10.1016/j.jpcs.2019.109301.
- [13] G. Wang, B. Wang, J. Park, Y. Wang, B. Sun, and J. Yao, “Highly efficient and large-scale synthesis of graphene by electrolytic exfoliation,” *Carbon N. Y.*, vol. 47, no. 14, pp. 3242–3246, 2009, doi: 10.1016/j.carbon.2009.07.040.

- [14] Y. Zhang and Y. Xu, "Simultaneous Electrochemical Dual-Electrode Exfoliation of Graphite toward Scalable Production of High-Quality Graphene," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 29, no. 37, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1002/adfm.201902171.
- [15] M. Coros *et al.*, "Simple and cost-effective synthesis of graphene by electrochemical exfoliation of graphite rods," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 4, pp. 2651–2661, 2016, doi: 10.1039/c5ra19277c.
- [16] J. M. Munuera, J. I. Paredes, S. Villar-Rodil, M. Ayán-Varela, A. Martínez-Alonso, and J. M. D. Tascón, "Electrolytic exfoliation of graphite in water with multifunctional electrolytes: En route towards high quality, oxide-free graphene flakes," *Nanoscale*, vol. 8, no. 5, pp. 2982–2998, 2016, doi: 10.1039/c5nr06882g.
- [17] E. Teran-Salgado, D. Bahena-Urbe, P. A. Márquez-Aguilar, J. L. Reyes-Rodríguez, R. Cruz-Silva, and O. Solorza-Feria, "Platinum nanoparticles supported on electrochemically oxidized and exfoliated graphite for the oxygen reduction reaction," *Electrochim. Acta*, vol. 298, pp. 172–185, 2019, doi: 10.1016/j.electacta.2018.12.057.
- [18] C. T. J. Low, F. C. Walsh, M. H. Chakrabarti, M. A. Hashim, and M. A. Hussain, "Electrochemical approaches to the production of graphene flakes and their potential applications," *Carbon N. Y.*, vol. 54, pp. 1–21, 2013, doi: 10.1016/j.carbon.2012.11.030.
- [19] D. E. Glass, V. Galvan, and S. Prakash, "A One-Pot Synthesis of Platinum Nanoparticles on Electrochemically Exfoliated Graphite," *ChemistrySelect*, vol. 4, no. 16, pp. 4767–4770, 2019, doi: 10.1002/slct.201803647.
- [20] S. Yang, M. R. Lohe, K. Müllen, and X. Feng, "New-Generation Graphene from Electrochemical Approaches: Production and Applications," *Adv. Mater.*, vol. 28, no. 29, pp. 6213–6221, 2016, doi: 10.1002/adma.201505326.
- [21] K. Parvez *et al.*, "Electrochemically exfoliated graphene as solution-processable, highly conductive electrodes for organic electronics," *ACS Nano*, vol. 7, no. 4, pp. 3598–3606, 2013, doi: 10.1021/nn400576v.
- [22] X. Mao, L. Zhu, H. Liu, H. Chen, P. Ju, and W. Li, "Synthesis of graphene via electrochemical exfoliation in different electrolytes for direct electrodeposition of a Cu/graphene composite coating," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 61, pp. 35524–35531, 2019, doi: 10.1039/c9ra06541e.
- [23] A. Ambrosi and M. Pumera, "Electrochemically Exfoliated Graphene and Graphene Oxide for Energy Storage and Electrochemistry Applications," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 22, no. 1, pp. 153–159, 2016, doi: 10.1002/chem.201503110.
- [24] A. Kozawa, K. Fujita, A. Sato, and D. Brodd, "Recent new additives for electric vehicle lead-acid batteries for extending the cycle life and capacity," *Proc. Annu. Batter. Conf. Appl. Adv.*, pp. 277–282, 1997, doi: 10.1109/bcaa.1997.574117.
- [25] W. Cai *et al.*, "Mussel-inspired functionalization of electrochemically exfoliated graphene: Based on self-polymerization of dopamine and its suppression effect on the fire hazards and smoke toxicity of thermoplastic polyurethane," *J. Hazard. Mater.*, vol. 352, no. 2, pp. 57–69, 2018, doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.03.021.

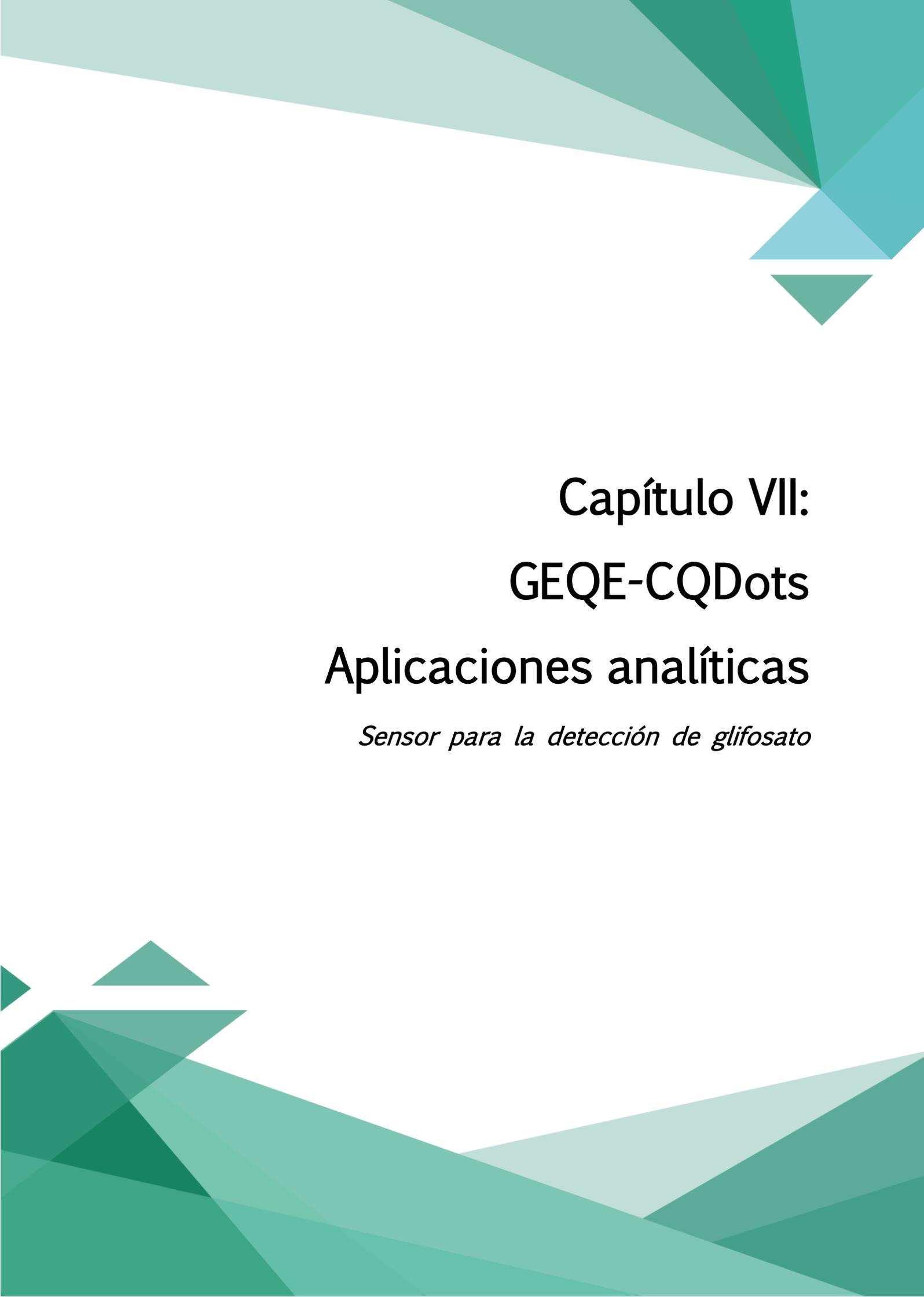
- [26] X. Yuan, J. Li, C. Zhang, and W. Yue, "Fabrication of Pt₃Ni catalysts on polypyrrole-modified electrochemically exfoliated graphene with exceptional electrocatalytic performance for methanol and ethanol oxidation," *Electrochim. Acta*, vol. 340, p. 135969, 2020, doi: 10.1016/j.electacta.2020.135969.
- [27] Z. G. Khan and P. O. Patil, "A comprehensive review on carbon dots and graphene quantum dots based fluorescent sensor for biothiols," *Microchem. J.*, vol. 157, no. 5, p. 105011, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105011.
- [28] S. Sreejith *et al.*, "Graphene-based Materials in Biosensing, bioimaging and therapeutics," *Graphene based Mater. Heal. Environ.*, pp. 35–61, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-45639-3_2
- [29] X. Wang, G. Sun, N. Li, and P. Chen, "Quantum dots derived from two-dimensional materials and their applications for catalysis and energy," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, no. 8, pp. 2239–2262, 2016, doi: 10.1039/c5cs00811e.
- [30] G. Wang *et al.*, "Green preparation of lattice phosphorus doped graphene quantum dots with tunable emission wavelength for bio-imaging," *Mater. Lett.*, vol. 242, pp. 156–159, 2019, doi: 10.1016/j.matlet.2019.01.139.
- [31] A. K. Alves, A. C. S. Frantz, and F. A. Berutti, "Microwave-assisted oleothermal synthesis of graphene-TiO₂ quantum dots for photoelectrochemical oxygen evolution reaction," *FlatChem*, vol. 12, no. 10, pp. 26–34, 2018, doi: 10.1016/j.flatc.2018.12.001.
- [32] V. Parthiban, S. K. Panda, and A. K. Sahu, "Highly fluorescent carbon quantum dots-Nafion as proton selective hybrid membrane for direct methanol fuel cells," *Electrochim. Acta*, vol. 292, pp. 855–864, 2018, doi: 10.1016/j.electacta.2018.09.193.
- [33] G. J. Sim *et al.*, "Superior initial coulombic efficiency through graphene quantum dot decorated on MoS₂," *FlatChem*, vol. 9, no. 1, pp. 8–14, 2018, doi: 10.1016/j.flatc.2018.04.001.
- [34] H. Qi *et al.*, "Biomass-derived nitrogen-doped carbon quantum dots: highly selective fluorescent probe for detecting Fe³⁺ ions and tetracyclines," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 539, pp. 332–341, 2019, doi: 10.1016/j.jcis.2018.12.047.
- [35] M. Shaker, R. Riahifar, and Y. Li, "A review on the superb contribution of carbon and graphene quantum dots to electrochemical capacitors' performance: Synthesis and application," *FlatChem*, vol. 22, no. 5, p. 100171, 2020, doi: 10.1016/j.flatc.2020.100171.
- [36] X. Xu *et al.*, "Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 40, pp. 12736–12737, 2004, doi: 10.1021/ja040082h.
- [37] X. T. Zheng, A. Ananthanarayanan, K. Q. Luo, and P. Chen, "Glowing graphene quantum dots and carbon dots: Properties, syntheses, and biological applications," *Small*, vol. 11, no. 14, pp. 1620–1636, 2015, doi: 10.1002/sml.201402648.
- [38] C. J. Murphy, "Optical sensing with quantum dots," *Anal. Chem.*, vol. 74., no. 19,

pp. 520A–526A, 2002, doi: 10.1021/ac022124v

- [39] S. Iravani and R. S. Varma, “Green synthesis, biomedical and biotechnological applications of carbon and graphene quantum dots. A review,” *Environ. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 3, pp. 703–727, 2020, doi: 10.1007/s10311-020-00984-0.
- [40] Y. Wang and A. Hu, “Carbon quantum dots: Synthesis, properties and applications,” *J. Mater. Chem. C*, vol. 2, no. 34, pp. 6921–6939, 2014, doi: 10.1039/c4tc00988f.
- [41] Y. Wang, M. Myers, and J. A. Staser, “Electrochemical UV Sensor Using Carbon Quantum Dot/Graphene Semiconductor,” *J. Electrochem. Soc.*, vol. 165, no. 4, pp. H3001–H3007, 2018, doi: 10.1149/2.0011804jes.
- [42] L. Ian Xu *et al.*, “Perylenetetra-carboxylic acid and carbon quantum dots assembled synergistic electrochemiluminescence nanomaterial for ultra-sensitive carcinoembryonic antigen detection,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 103, no. 10, pp. 6–11, 2018, doi: 10.1016/j.bios.2017.10.035.
- [43] S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, and J. M. Pingarrón, “Carbon dots and graphene quantum dots in electrochemical biosensing,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 4, pp. 1–18, 2019, doi: 10.3390/nano9040634.
- [44] A. Sharma and J. Das, “Small molecules derived carbon dots: Synthesis and applications in sensing, catalysis, imaging, and biomedicine,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 17, no. 1, pp. 1–24, 2019, doi: 10.1186/s12951-019-0525-8.
- [45] V. D. Dao *et al.*, “Facile synthesis of carbon dot-Au nanoraspberries and their application as high-performance counter electrodes in quantum dot-sensitized solar cells,” *Carbon N. Y.*, vol. 96, pp. 139–144, 2016, doi: 10.1016/j.carbon.2015.09.023.
- [46] H. Huang *et al.*, “Facile preparation of nitrogen and Fe_x codoped porous carbon with high catalytic activity under alkaline condition,” *Colloids Interface Sci. Commun.*, vol. 37, no. 5, p. 100291, 2020, doi: 10.1016/j.colcom.2020.100291.
- [47] L. Tian, Z. Li, P. Wang, X. Zhai, X. Wang, and T. Li, “Carbon quantum dots for advanced electrocatalysis,” *J. Energy Chem.*, vol. 55, pp. 279–294, 2021, doi: 10.1016/j.jechem.2020.06.057.
- [48] X. Wang, Y. Feng, P. Dong, and J. Huang, “A Mini Review on Carbon Quantum Dots: Preparation, Properties, and Electrocatalytic Application,” *Front. Chem.*, vol. 7, no. 10, pp. 1–9, 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00671.
- [49] V. M. Naik *et al.*, “Quick and low cost synthesis of sulphur doped carbon dots by simple acidic carbonization of sucrose for the detection of Fe³⁺ ions in highly acidic environment,” *Diam. Relat. Mater.*, vol. 88, no. 7, pp. 262–268, 2018, doi: 10.1016/j.diamond.2018.07.018.
- [50] P. Miao, Y. Tang, K. Han, and B. Wang, “Facile synthesis of carbon nanodots from ethanol and their application in ferric(III) ion assay,” *J. Mater. Chem. A*, vol. 3, no. 29, pp. 15068–15073, 2015, doi: 10.1039/c5ta03278d.

- [51] T. C. Canevari, M. Nakamura, F. H. Cincotto, F. M. De Melo, and H. E. Toma, "High performance electrochemical sensors for dopamine and epinephrine using nanocrystalline carbon quantum dots obtained under controlled chronoamperometric conditions," *Electrochim. Acta*, vol. 209, pp. 464–470, 2016, doi: 10.1016/j.electacta.2016.05.108.
- [52] F. Niu, Y. Xu, J. Liu, Z. Song, M. Liu, and J. Liu, "Controllable electrochemical/electroanalytical approach to generate nitrogen-doped carbon quantum dots from varied amino acids: pinpointing the utmost quantum yield and the versatile photoluminescent and electrochemiluminescent applications," *Electrochim. Acta*, vol. 236, pp. 239–251, 2017, doi: 10.1016/j.electacta.2017.03.085.
- [53] J. Lee, S. Noh, N. D. Pham, and J. H. Shim, "Top-down synthesis of S-doped graphene nanosheets by electrochemical exfoliation of graphite: Metal-free bifunctional catalysts for oxygen reduction and evolution reactions," *Electrochim. Acta*, vol. 313, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1016/j.electacta.2019.05.015.
- [54] M. Qiu, D. Wang, L. Zhang, M. Li, M. Liu, and S. Fu, "Electrochemical exfoliation of water-dispersible graphene from graphite towards reinforcing the mechanical and flame-retardant properties of poly (vinyl alcohol) composites," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 254, no. 11, p. 123430, 2020, doi: 10.1016/j.matchemphys.2020.123430.
- [55] M. Wall, "The Raman Spectroscopy of Graphene and the Determination of Layer Thickness," *Thermo Sci.*, p. 5, 2011, nota de aplicación.
- [56] J. Kim *et al.*, "Enhanced activity and durability of Pt nanoparticles supported on reduced graphene oxide for oxygen reduction catalysts of proton exchange membrane fuel cells," *Catal. Today*, vol. 352, no. 10, pp. 10–17, 2020, doi: 10.1016/j.cattod.2019.11.016.
- [57] R. Chuah, S. C. B. Gopinath, P. Anbu, M. N. Salimi, A. R. W. Yaakub, and T. Lakshmipriya, "Synthesis and characterization of reduced graphene oxide using the aqueous extract of *Eclipta prostrata*," *3 Biotech*, vol. 10, no. 8, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1007/s13205-020-02365-4.
- [58] P. Bhawal, S. Ganguly, T. K. Chaki, and N. C. Das, "Synthesis and characterization of graphene oxide filled ethylene methyl acrylate hybrid nanocomposites," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 25, pp. 20781–20790, 2016, doi: 10.1039/c5ra24914g.
- [59] J. L. Chang, K. H. Chang, C. C. Hu, W. L. Cheng, and J. M. Zen, "Improved voltammetric peak separation and sensitivity of uric acid and ascorbic acid at nanoplatelets of graphitic oxide," *Electrochem. commun.*, vol. 12, no. 4, pp. 596–599, 2010, doi: 10.1016/j.elecom.2010.02.008.
- [60] G. L. Luque, M. I. Rojas, G. A. Rivas, E. P. M. Leiva, "The origin of the catalysis of hydrogen peroxide reduction by functionalized graphene surfaces: A density functional theory study," *Electrochimica Acta*, vol. 50, pp. 523–530, 2010, doi:10.1016/j.electacta.2010.09.016.
- [61] P. Wu, W. Li, Q. Wu, Y. Liu, and S. Liu, "Hydrothermal synthesis of nitrogen-doped carbon quantum dots from microcrystalline cellulose for the detection of Fe³⁺

- ions in an acidic environment,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 70, pp. 44144–44153, 2017, doi: 10.1039/c7ra08400e.
- [62] G. S. Jamila, S. Sajjad, S. A. K. Leghari, and M. Long, “Nitrogen doped carbon quantum dots and GO modified WO₃ nanosheets combination as an effective visible photo catalyst,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 382, no. 9, p. 121087, 2020, doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121087.
- [63] Z. Guo *et al.*, “A facile synthesis of high-efficient N,S co-doped carbon dots for temperature sensing application,” *Dye. Pigment.*, vol. 173, no. 10, p. 107952, 2020, doi: 10.1016/j.dyepig.2019.107952.
- [64] J. Deng *et al.*, “Electrochemical synthesis of carbon nanodots directly from alcohols,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 20, no. 17, pp. 4993–4999, 2014, doi: 10.1002/chem.201304869.
- [65] K. Dehvari, K. Y. Liu, P. J. Tseng, G. Gedda, W. M. Girma, and J. Y. Chang, “Sonochemical-assisted green synthesis of nitrogen-doped carbon dots from crab shell as targeted nanoprobe for cell imaging,” *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 95, pp. 495–503, 2019, doi: 10.1016/j.jtice.2018.08.037.
- [66] W. Liu, H. Jia, J. Zhang, J. Tang, J. Wang, and D. Fang, “Preparation of nitrogen-doped carbon quantum dots (NCQDs) and application for non-enzymatic detection of glucose,” *Microchem. J.*, vol. 158, no. 1, p. 105187, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105187.
- [67] R. L. McCreedy, “Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry,” *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 7 pp. 2646–2687, 2008, doi: 10.1021/cr068076m.



Capítulo VII: GEQE-CQDots Aplicaciones analíticas

Sensor para la detección de glifosato

VII-1. Introducción

En las prácticas modernas de producción de cultivos, los herbicidas han sido una herramienta revolucionaria para el manejo de malezas. Su uso en todo el mundo ha aumentado exponencialmente porque proporcionan una forma fácil, eficiente y rentable de controlar las malezas en comparación con los métodos alternativos que han reemplazado. Además, su naturaleza no invasiva para los cultivos y su acción de amplio espectro para todas las variedades de malezas, ayuda a aumentar el valor de la producción total de cultivos [1,2].

Cada año, se producen millones de toneladas de plaguicidas para fines agrícolas [3]. Debido a esta alta demanda, existe un riesgo toxicológico que impacta fuertemente en la salud humana [4] y en los ecosistemas [5]. Los plaguicidas pueden ser clasificados de diversas maneras: según su estructura química (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, entre otros), según el riesgo toxicológico asociado (extremadamente alto, moderadamente o levemente peligroso) o según la persistencia (permanente, persistente, moderadamente persistente y no persistente). La clasificación más común es quizás, según el uso o tipo de plaga objetivo (insecticidas, herbicidas y fungicidas) [4,6]. Los plaguicidas se aplican principalmente mediante pulverización directa sobre las plantas o el suelo. Por lo tanto, también pueden llegar a otros compartimentos ambientales, como la atmósfera, la superficie y las masas de agua [7], ya sea por escorrentía superficial o al agua subterránea por lixiviación a través del suelo. Las lluvias intensas o los procesos de riego extensivos pueden agravar aún más la lixiviación de contaminantes al agua subterránea [8,9], donde pueden ser absorbidos por la biota acuática y terrestre (Figura VII-1) [10-12].

Actualmente, es muy complicado reducir el uso de plaguicidas y la implementación de estrategias de mitigación [13]. La determinación rápida y el seguimiento continuo, tanto de los plaguicidas como de sus metabolitos, es un punto de suma importancia para garantizar el respeto de los límites legales, para asegurar la salud de la población que está en contacto con alimentos contaminados y de los propios agricultores [14].

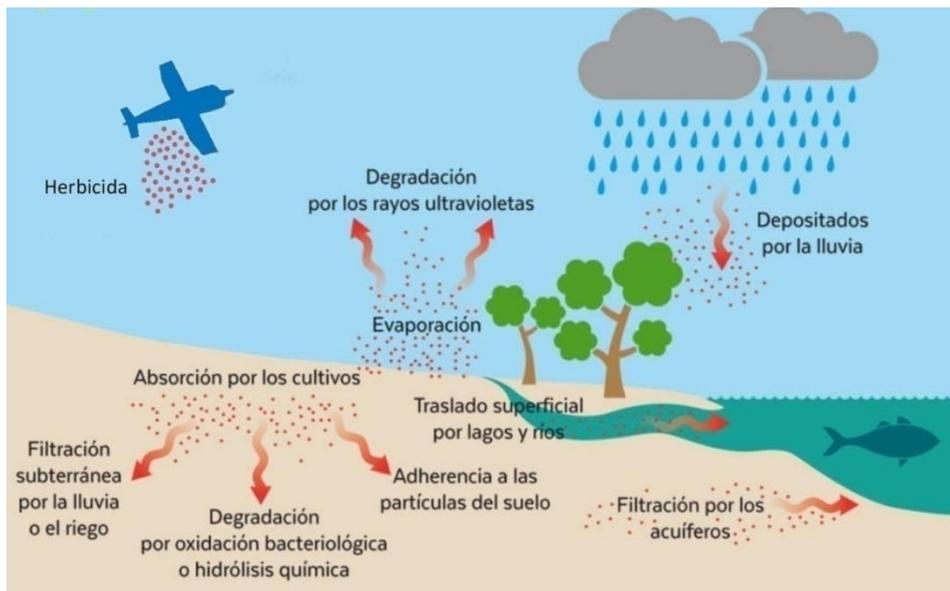


Figura VII-1. *Distribución y movilidad de plaguicidas en el ambiente.*

El glifosato (Gly) o N-(fosfometil)glicina, (**Figura VII-2**) pertenece al grupo de las glicinas sustituidas, que constituyen el ingrediente activo de varios herbicidas organofosforados [15]. Gly es un herbicida no selectivo ampliamente utilizado en todo el mundo para controlar las malezas [16]. El glifosato detiene la biosíntesis de aminoácidos en las plantas mediante la inhibición de las enzimas 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa o 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa, en la vía del shikimato, que es un precursor de los aminoácidos aromáticos, en última instancia hormonas, vitaminas y otros metabolitos importantes para las plantas [17]. Durante muchos años, se ha creído que el glifosato es seguro para organismos no objetivo, si se tiene en cuenta el período de seguridad porque por un lado, las células animales carecen de la vía del shikimato, y por otra parte, debería degradarse rápidamente, aproximadamente en dos semanas, en el ecosistema. Sin embargo, la vía del shikimato está presente en muchos microbios, lo que complica el reconocimiento de los riesgos asociados en los agroecosistemas y por otro lado, se ha informado que el glifosato y sus productos de degradación, persisten en los ecosistemas incluso durante años [18]. El glifosato además de utilizarse en entornos agrícolas, es empleado en silvicultura, entornos urbanos y huertos familiares, y durante las últimas décadas, se han convertido en uno de los herbicidas más utilizados a nivel

mundial [19,20] y también es uno de los agroquímicos más controvertidos [21].

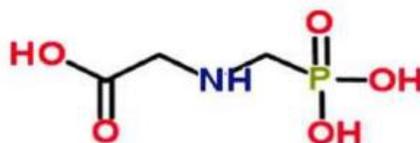


Figura VII-2. Estructura química de glifosato.

El glifosato, con nombre comercial común: “Roundup”, tiene las ventajas de bajo costo, alta eficiencia y amplio espectro [22]. En la agricultura industrial moderna, el éxito comercial de este herbicida se ha mejorado drásticamente con la introducción de cultivos transgénicos [23]. La adopción de cultivos tolerantes al glifosato ha sido muy rápida y el uso global de glifosato se ha multiplicado por 15 desde 1996 [24]. Además, durante más de una década, con la aparición generalizada de un número masivo de “super” malezas resistentes a Gly por su uso intensivo, la concentración y frecuencia de su aplicación ha ido en aumento [25]. Como resultado, el uso mundial de Roundup por volumen continúa aumentando a un ritmo constante [2]. Como consecuencia, sus residuos o metabolitos se han encontrado en el 45% de la capa superior del suelo recolectada en once países y seis sistemas de cultivo [26].

El uso creciente y generalizado de Gly, ha generado una gran preocupación por el impacto de la contaminación medioambiental en la salud humana y animal. La exposición a Gly de humanos y animales puede ocurrir a través de varias vías, como alimentos y agua potable, contacto con la piel o por inhalación [27]. Los mamíferos metabolizan solo una pequeña cantidad de Gly, mientras que la mayor parte se excreta sin modificar por la orina, en la que se han detectado residuos de Gly tanto en humanos, como en animales tales como ratas, vacas, conejos, perros y gatos [27-29]. El posible riesgo asociado con la exposición a Gly para la salud humana y animal, es objeto de un intenso debate público por su posible acción cancerígena, además de los posibles efectos adversos sobre los sistemas nervioso, digestivo, endócrino y reproductivo [30,31]. Sin embargo, los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* son contradictorios y varios autores concluyeron que Gly es seguro a

niveles por debajo de los límites reglamentarios permisibles [32,33]. Por otro lado, numerosos estudios señalan que los herbicidas a base de glifosato son disruptores endócrinos. Se ha informado que inhiben la actividad de la aromatasas y la transcripción en células humanas a niveles tan bajos como 10 ppm, muy por debajo del nivel sin efectos adversos informado de 50 ppm [34,35]. Gly puede inducir una intoxicación aguda y causar daño hepático, renal y cardiovascular, lo que puede poner en peligro la vida de los seres humanos. Aún en concentraciones mínimas, el glifosato tiene toxicidad a largo plazo y efectos crónicos adversos [36]. También, se reportó que puede interactuar activamente con otros compuestos orgánicos, provocando una contaminación persistente en alimentos y cereales [37,38]. En consecuencia, diferentes autoridades reguladoras debaten acaloradamente los efectos de Gly en nuestros ecosistemas. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IRCA) en 2015, ha clasificado al glifosato como “probablemente cancerígeno para los seres humanos”, lo que ha generado serios problemas de seguridad [39]. Por lo tanto, la determinación del comportamiento ambiental de glifosato en el medio ambiente tiene implicaciones científicas, políticas y económicas a nivel mundial [40,41] y a fin de evitar riesgos para la salud, es fundamental desarrollar una técnica de detección de glifosato rápida y conveniente.

El método oficial de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos para detectar glifosato en el agua, implica el uso de cromatografía líquida acoplada a detectores de fluorescencia [7]. Aunque la cromatografía es una técnica muy eficiente, es muy costosa, requiere mucho tiempo y solo proporciona datos del momento en que se realizó el muestreo. Las fuentes de agua son entornos muy dinámicos y las columnas de contaminación pueden moverse de un lugar a otro a velocidades relativamente rápidas, especialmente en aguas superficiales. Esto hace que las técnicas de muestreo actuales sean ineficaces y el agua potencialmente peligrosa pueda llegar a los consumidores. Las mediciones continuas y automáticas *in situ* pueden dar una respuesta a este problema y pueden proporcionar una imagen más completa de la situación real en el campo [9].

Se han informado numerosas metodologías analíticas para la determinación de Gly, como cromatografía, electroforesis capilar y

espectrometría [42,43]. Estos métodos a menudo requieren varios pasos de preparación de muestras, incluidos los procedimientos de extracción y limpieza. Además, requiere personal altamente calificado y en algunos casos generan una gran cantidad de residuos que contienen solventes orgánicos, lo que hace que el procedimiento sea más complicado y costoso [15]. Por lo tanto, es crucial la disponibilidad de un método para detectar Gly que contemple estas dificultades.

En los últimos años, debido a características relevantes como la simplicidad, sensibilidad y selectividad, costo relativamente bajo, fácil operación, potencial de miniaturización y automatización para fines de detección rápida y en el lugar del muestreo, los sensores electroquímicos se han convertido en métodos analíticos muy interesantes. Además de estas ventajas, el advenimiento de la nanotecnología, ha contribuido al desarrollo de sensores electroquímicos con muy interesantes características analíticas [15,44,45].

El principal desafío en la detección electroquímica de glifosato es su escasa electroactividad en una ventana de potencial accesible utilizando electrodos y medios convencionales [46]. Debido a esto, es difícil realizar la detección electroquímica de Gly sin modificación de los electrodos [47]. En este sentido, a lo largo de los años, se han evaluado y aplicado diferentes métodos para lograr este objetivo, como la inmovilización de anticuerpos o enzimas, que tienen cierta afinidad hacia el plaguicida objetivo en la superficie del electrodo [48]. El empleo de polímeros de impresión molecular (MIP) es una de las técnicas que también se está explorando intensamente [49]. Otro enfoque que ha estado ganando atención es la inmovilización de microorganismos en las superficies de los electrodos y el monitoreo de la interacción entre estos organismos cuando entran en contacto con el analito objetivo [50]. En otros casos, el empleo de nanomateriales con la carga opuesta del analito objetivo permite la interacción con la superficie del electrodo, lo que podría mejorar el rendimiento. Se ha informado la detección de glifosato utilizando electrodos desnudos y modificados con oro [36,51], cobre [52], mercurio [53], platino [54] y carbono [46,55,56].

En este capítulo se describe por primera vez la implementación de un nanohíbrido conformado por dos nanoestructuras de carbono, GEQE y CQDots, para la construcción de un sensor electroquímico tendiente a la cuantificación indirecta de residuos de glifosato en distintas matrices, para el control de calidad de productos fitosanitarios y para el monitoreo medioambiental de aguas.

VII-2. Sección experimental

Para la realización de este trabajo se utilizó fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4), fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4), ferricianuro de potasio marca Biopack. Ferrocianuro de potasio marca Anedra, H_2O_2 al 30% marca J.T.Baker y glifosato marca Sigma Aldrich. Todos los reactivos empleados son de grado analítico y se utilizaron sin purificación adicional.

Las medidas electroquímicas fueron llevadas a cabo en una celda convencional de tres electrodos, tal como fue descrita en el **capítulo II**, utilizando como electrodos de trabajo GCE, modificados mediante *drop coating* con el nanohíbrido GEQE-CQDots.

Tanto las medidas de optimización de la plataforma como las medidas de cuantificación de glifosato se realizaron en *buffer* fosfato pH 7,40 preparado con agua ultrapura provista por un sistema Millipore-MilliQ, evaluando la respuesta electroquímica de sondas redox tales como ferricianuro-ferrocianuro de potasio y peróxido de hidrógeno. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

La cuantificación de Gly en muestras de agua y en formulaciones de producto fue llevada a cabo por interacción de la muestra con la plataforma GCE/GEQE-CQDots sin necesidad de una purificación adicional.

VII-2.1. Metodología de detección de glifosato

El glifosato fue cuantificado por espectroscopia de impedancia electroquímica mediante una metodología indirecta, tal como muestra la **Figura VII-3**.

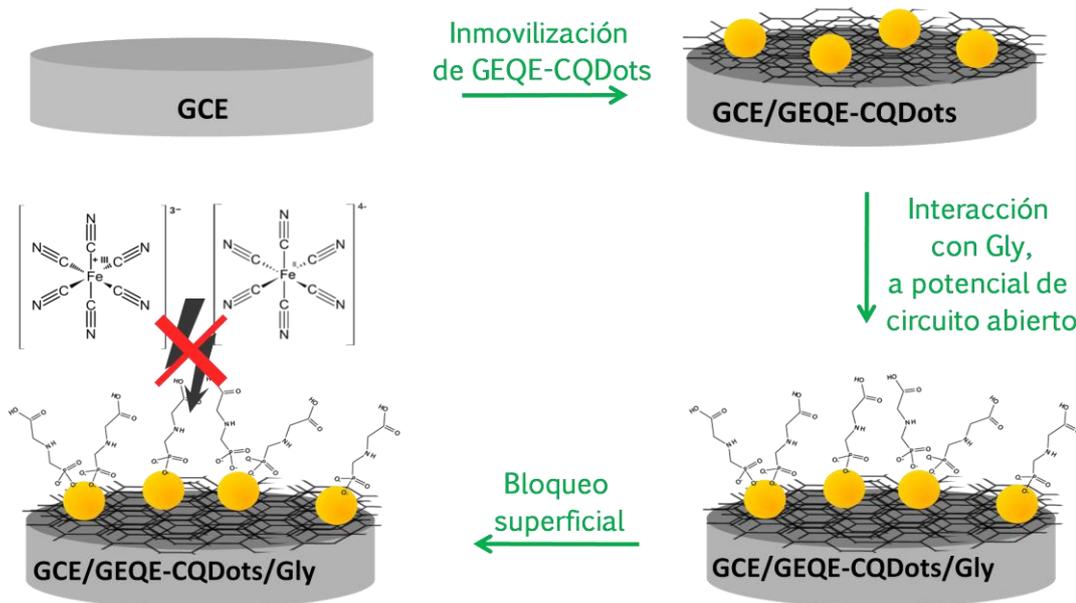


Figura VII-3. Metodología propuesta para la detección indirecta de glifosato.

Se evaluó el comportamiento electroquímico de sondas redox tales como ferricianuro-ferrocianuro de potasio y peróxido de hidrógeno sobre la superficie de los electrodos de carbono vítreo modificados con el nanohíbrido GEQE-CQDots. Se comparó la respuesta de las sondas redox sobre GCE modificado con GEQE/CQDots y sobre GCE modificado con el nanohíbrido luego de la interacción con glifosato, de manera de producir la adsorción del mismo en la superficie mediante fuerzas electrostáticas. Finalmente, se evaluó el cambio en el comportamiento electroquímico de las cuplas redox mencionadas, dado por el bloqueo superficial debido a la presencia del glifosato en la superficie de GCE/GEQE-CQDots/Gly.

VII-3. Resultados y discusión

VII-3.1. Evaluación de la respuesta electroquímica de glifosato

Se realizaron experimentos voltamperométricos a fin de evaluar el comportamiento redox de Gly sobre electrodos de carbono vítreo modificados solo con CQDots, tal como se muestra en la Figura VII-4.

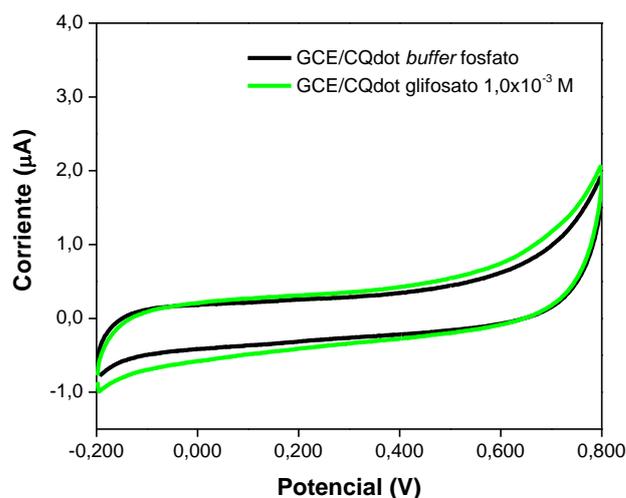


Figura VII-4. Voltamperogramas cíclicos sobre GCE/CQDots en buffer fosfato (—) y en una solución de buffer fosfato conteniendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ de glifosato (—). Velocidad de barrido $0,100 \text{ V/s}$.

Tal como fue mencionado anteriormente, el mayor desafío que se enfrenta a la hora de cuantificar glifosato mediante técnicas electroquímicas es su pobre electroactividad, de hecho no fue posible determinar procesos de óxido-reducción de Gly en la ventana de potencial analizado para la plataforma en estudio, tal como exhiben los voltamperogramas de la **figura VII-4**. Consecuentemente, se propuso una metodología indirecta para la cuantificación del plaguicida, la cual se basa en el cambio que se produce en la descarga de diferentes sondas redox por la presencia de glifosato en la superficie de los electrodos, la que fue descrita en la **sección VII-2.1**.

VII-3.2. Cuantificación indirecta de glifosato

La cuantificación de Gly (pK_{a1} 2,0, pK_{a2} 2,6, pK_{a3} 5,6 y pK_{a4} 10,6) de manera indirecta fue posible debido a que, al valor del pH de trabajo (7,40), el herbicida posee múltiples cargas negativas capaces de interaccionar de manera electrostática con los nanodots de carbono presentes en la superficie de los electrodos, los cuales poseen carga positiva, tal como fue demostrado en el **capítulo VI**. De hecho, la interacción entre Gly y puntos cuánticos de carbono fue documentada por otros autores [57-60]. De esta manera, la acumulación de glifosato en la superficie produce cambios en la descarga de la cupla redox ferri-ferrocianuro de potasio, tal como se exhibe en la **Figura VII-5**.

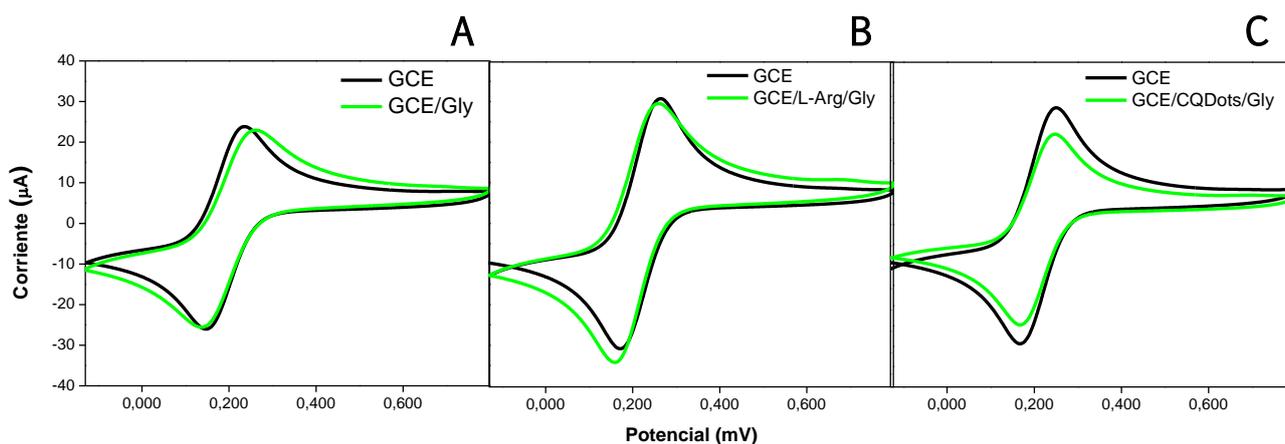


Figura VII-5. Voltamperogramas cíclicos sin interacción (—) y previa interacción con glifosato (—) de ferricianuro-ferrocianuro de potasio $2,0 \times 10^{-3}$ M sobre (A) GCE, (B) GCE/L-Arg y (C) GCE/CQDots. Velocidad de barrido 0,100 V/s. Condiciones de interacción: acumulación a o.c.p. durante 5,0 minutos de Gly $1,0 \times 10^{-4}$ M.

Puede notarse que la respuesta electroquímica obtenida para la descarga de la cupla redox ferricianuro-ferrocianuro de potasio $2,0 \times 10^{-3}$ M no cambia sobre un electrodo de carbono vítreo sin modificar en comparación con GCE puesto en contacto con una solución de Gly $1,0 \times 10^{-4}$ M previo a la medida, **Figura VII-5.A**, lo que sugiere que el glifosato no tiene sitios de interacción con la superficie y en consecuencia, no puede preconcentrarse. Cuando los electrodos son modificados con L-Arginina (pK_{a1} 2,2, pK_{a2} 9,8), precursor de la síntesis de los CQDots **Figura VII-5.B**, tampoco se observan cambios en la respuesta electroquímica de la sonda redox, indicando nuevamente interacción nula entre Gly y GCE/L-Arginina. Finalmente, se puede mencionar que la adsorción de glifosato sobre GCE/CQDots estaría dada fundamentalmente por las interacciones electrostáticas con los CQDots presentes en la superficie del electrodo, como puede notarse en la **Figura VII-5.C**, donde tanto la corriente de oxidación como la de reducción del marcador redox disminuyen, aunque no significativamente, en presencia de Gly adsorbido en la superficie del electrodo debido al mayor bloqueo superficial.

Con el objetivo de mejorar la señal de óxido-reducción de la sonda redox por bloqueo superficial debido a la presencia de glifosato, se evaluó mediante experimentos voltamperométricos la respuesta electroquímica de ferricianuro-ferrocianuro de potasio para electrodos modificados con el híbrido GEQE-CQDots. La **Figura VII-6.A** y **VII-6.B** muestran comparativamente los

voltamperogramas de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $2,0 \times 10^{-3}$ M obtenidos para GCE/CQDots y para GCE/GEQE-CQDots en presencia y ausencia de Gly $1,0 \times 10^{-4}$ M. Puede notarse que la presencia de GEQE en el híbrido sintetizado, proporciona un gran aumento del área superficial expuesta a la solución, lo que se traduce en mayores corrientes asociadas a los procesos de óxido-reducción y a su vez, se observan mayores decaimientos en las correspondientes señales del marcador redox cuando Gly se encuentra presente en la interfaz, debido al aumento de los sitios de adsorción.

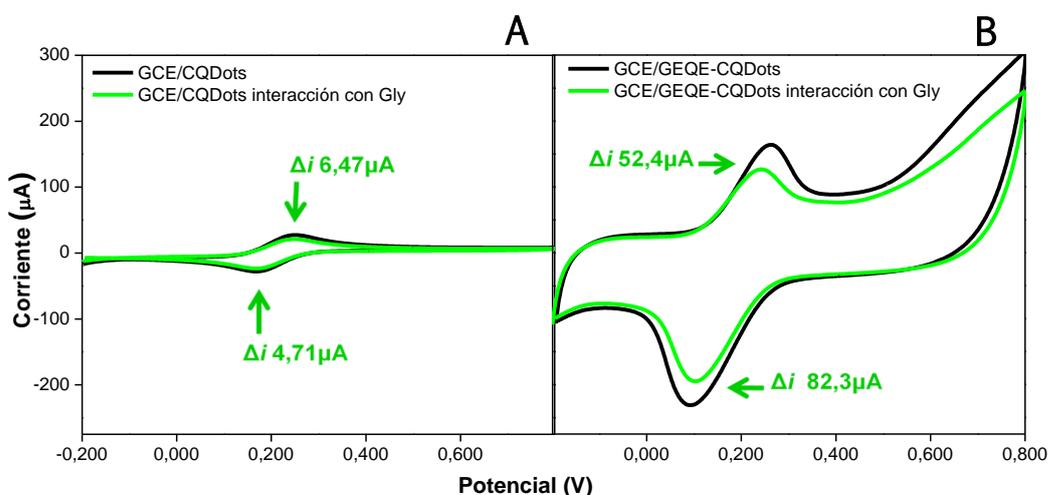


Figura VII-6. Voltamperogramas cíclicos sin interacción (—) y previa interacción con glifosato (—) de ferricianuro-ferrocianuro de potasio $2,0 \times 10^{-3}$ M sobre (A) GCE/CQDots y (B) GCE/GEQE-CQDots. Velocidad de barrido $0,100$ V/s. Condiciones de interacción: acumulación a o.c.p. durante 5 minutos de Gly $1,0 \times 10^{-4}$ M.

VII-3.3. Optimización de los parámetros de síntesis de GEQE-CQDots y detección de glifosato

De manera de obtener la mejor respuesta analítica posible para la detección de Gly y de acuerdo a la metodología de síntesis del nanohíbrido descrita en el capítulo VI, se realizaron experimentos voltamperométricos y de espectroscopia de impedancia electroquímica a fin de optimizar los parámetros experimentales de síntesis de GEQE-CQDots, como el tiempo de sonicado empleado para generar la dispersión, así como también la proporción de CQDots/GEQE empleada. También se optimizó el tiempo de interacción entre la plataforma sintetizada por la inmovilización del híbrido sobre GCE y el

glifosato. En las secciones siguientes se presentan los resultados obtenidos para dichas optimizaciones.

VII-3.3.1. Optimización del tiempo de sonicado

Mediante experimentos voltamperométricos se evaluó el cambio en el comportamiento redox de la sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ sobre GCE/GEQE-CQDots para diferentes tiempos de sonicado empleado durante la síntesis del nanohíbrido.

En las Figuras VII-7, se resumen los valores de corrientes obtenidos mediante experimentos de voltamperometría cíclica para la descarga de ferri-ferrocianuro $2,0 \times 10^{-3}$ M, en ausencia y presencia de glifosato $1,0 \times 10^{-4}$ M en la superficie de GCE/GEQE-CQDots. Dichos experimentos se realizaron manteniendo constante la cantidad de CQDots en el nanohíbrido, la concentración glifosato y el tiempo de interacción con el mismo.

De manera general, se observa que las mayores diferencias de corriente (Δi) para la descarga de la cupla redox, en presencia y ausencia de glifosato, se obtienen cuando la mezcla de GEQE y CQDots es sometida a efecto ultrasónico durante 10,0 min. A tiempos mayores, Δi en ausencia y presencia de Gly es más pequeña, probablemente debido a que el efecto ultrasónico promueve cambios en los sitios de interacción con Gly, haciendo que la cantidad adsorbida en la superficie de GCE/GEQE-CQDots sea menor. En consecuencia, 10,0 minutos fueron seleccionados como el tiempo óptimo de sonicado para la síntesis del nanohíbrido y es el empleado en los experimentos siguientes.

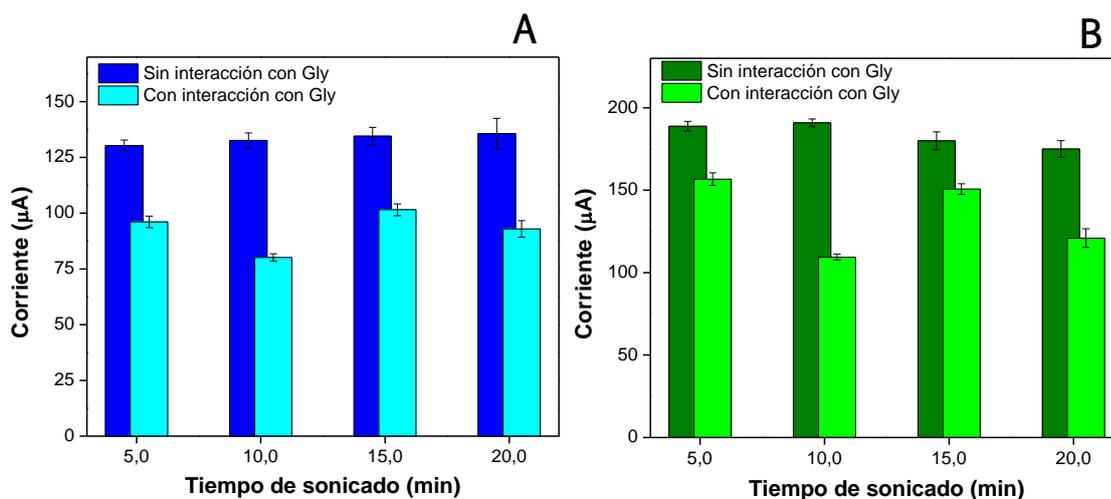


Figura VII-7. Cambios en las corrientes (A) de pico anódico y (B) de pico catódico para la descarga de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $2,0 \times 10^{-3}$ M pre y post interacción de GCE/GEQE-CQDots con glifosato obtenidos mediante experimentos voltamperométricos. Velocidad de barrido 0,100 V/s. Condiciones de interacción: acumulación a o.c.p. durante 5,0 minutos de Gly $1,0 \times 10^{-4}$ M.

VII-3.3.2. Optimización de la cantidad de CQDots

Como fue demostrado con anterioridad, los puntos cuánticos de carbono son los responsables de la adsorción de Gly en la superficie de los electrodos, con lo cual la optimización de la concentración de CQDots empleada en la síntesis es crucial para maximizar la respuesta obtenida en la cuantificación del herbicida. En la **Figura VII-8**, se resumen las corrientes anódicas y catódicas obtenidas por voltamperometría cíclica para la respuesta electroquímica de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $2,0 \times 10^{-3}$ M cuando GCE/GEQE-CQDots interacciona con una solución de glifosato $1,0 \times 10^{-4}$ M durante 5,0 minutos.

Los resultados obtenidos demuestran que cuanto mayor es la cantidad de *nanodots* empleada en la síntesis, el bloqueo superficial es mayor, es decir que la diferencia de corriente para la descarga de la sonda redox, en ausencia y presencia de Gly en la superficie de los electrodos, se ve incrementada. Estos resultados concuerdan con el hecho de que el glifosato interacciona exclusivamente con los puntos cuánticos de carbono. Para concentraciones mayores que 10,0 mg/mL, las dispersiones pierden adherencia con GCE y la plataforma es muy inestable, de esta manera dicho valor es fijado como la concentración óptima para los estudios posteriores.

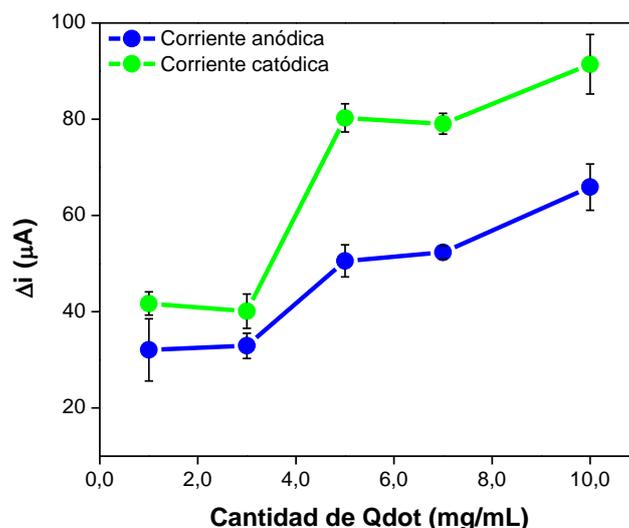


Figura VII-8. Resumen de Δi para el pico anódico (—) y para el pico catódico (—) obtenidos mediante experimentos voltamperométricos para la descarga de la sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $2,0 \times 10^{-3}$ M pre y post interacción de GCE/GEQE-CQDots con glifosato. Velocidad de barrido 0,100 V/s. Condiciones de interacción: acumulación a o.c.p. durante 5,0 minutos de Gly $1,0 \times 10^{-4}$ M.

VII-3.3.3. Optimización del tiempo de interacción con glifosato

En la búsqueda de incrementar el cambio en la señal analítica debido al bloqueo superficial que se da por la presencia del glifosato, se empleó, en lugar de voltamperometría cíclica, espectroscopia de impedancia electroquímica, dado que es más sensible a los cambios de reactividad superficial. Por otro lado, se evaluó la transferencia electrónica de H_2O_2 , que a diferencia de la sonda redox utilizada con anterioridad (ferricianuro-ferrocianuro de potasio) es un analito neutro que no presenta interacciones electrostáticas con la GEQE-CQDots. Además, la descarga de H_2O_2 es más sensible al estado superficial de los electrodos, con lo cual se espera que los cambios en la señal analítica debida al bloqueo dado por la presencia de Gly en la interfaz se vea afectada en mayor medida. De esta manera, H_2O_2 es empleado para los estudios posteriores.

Se estudió el tiempo óptimo de interacción entre GCE/GEQE-CQDots y el glifosato mediante EIE, evaluando resistencia a la transferencia de carga de H_2O_2 $5,0 \times 10^{-2}$ M. La **Figura VII-9.A** muestra los diagramas de Nyquist obtenidos, en los cuales los puntos representan datos experimentales y las

líneas el ajuste de los mismos mediante un circuito de Randles modificado como el que se muestra a continuación.

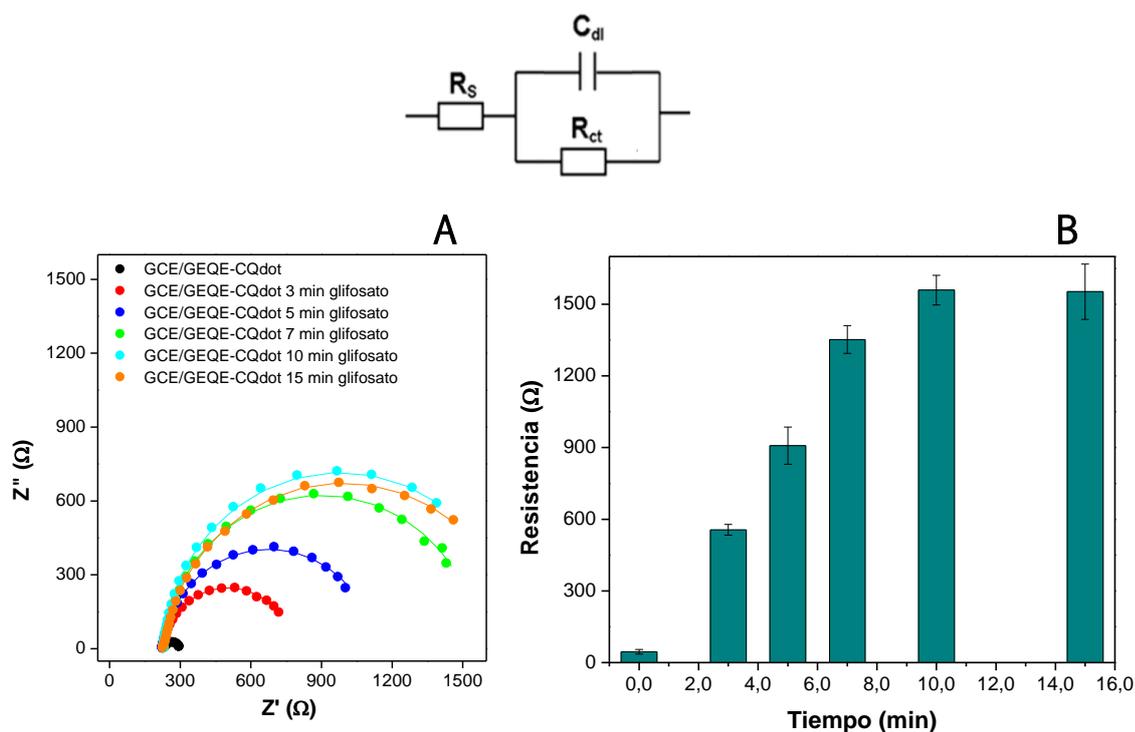


Figura VII-9. (A) Diagramas de Nyquist y (B) resistencias a la transferencia de carga halladas para la descarga de H_2O_2 $5,0 \times 10^{-2}$ M sobre GCE/GEQE-CQdots post interacción con glifosato $1,0 \times 10^{-4}$ M durante diferentes tiempos. Potencial aplicado $-0,100$ V.

En la **Figura VII-9.B** se presentan las resistencias a la transferencia de carga obtenidas a partir de experimentos de EIE para la descarga de H_2O_2 $5,0 \times 10^{-2}$ M sobre GCE/GEQE-CQdots para tiempos crecientes de interacción de la plataforma con glifosato. A medida que aumenta el tiempo de interacción de Gly con la plataforma, se observa un incremento en la resistencia a la transferencia de carga de H_2O_2 , lo que indica un mayor bloqueo superficial y por ende una mayor cantidad de Gly acumulada en la superficie. Por otra parte, puede notarse que la respuesta obtenida para tiempos mayores de 10,0 minutos no varía de manera significativa, lo que da cuenta que a dicho tiempo ocurre una saturación de los sitios de interacción de Gly. Por cuestiones operativas y de reproducibilidad se seleccionó 10,0 min como tiempo óptimo de interacción.

A modo de resumen se presentan en la **Tabla VII-1** los parámetros optimizados para la cuantificación indirecta de glifosato. Por otro lado, cabe

mencionar que tanto la curva de calibrado, como la cuantificación de glifosato en muestras reales, se lleva a cabo obteniendo la señal analítica mediante experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica evaluando la respuesta de H_2O_2 , ya que permitió obtener los cambios más significativos y por tanto, las respuestas más sensibles.

Tabla VII-1. Resumen de parámetros óptimos para la detección indirecta de glifosato sobre GCE/GEQE-CQDots

	<i>Condición óptima</i>
<i>Tiempo de sonicado</i>	<i>10 min</i>
<i>Concentración de CQDots</i>	<i>10 mg/mL</i>
<i>Tiempo de interacción con Glifosato</i>	<i>10 min</i>

VII-3.4. Dependencia de la concentración de glifosato con la resistencia a la transferencia de carga

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la cuantificación de glifosato se procedió a evaluar la dependencia de la respuesta analítica obtenida en función de la concentración del plaguicida. La **Figura VII-10.A** muestra los espectros de impedancia para H_2O_2 $5,0 \times 10^{-2}$ M obtenidos luego de la interacción de GCE/GEQE-CQDots con soluciones de concentración creciente de glifosato. La curva de calibrado correspondiente se presenta en la **Figura VII-10.B**.

Se observa claramente que la resistencia a la transferencia de carga aumenta a medida que aumenta la concentración de Gly que interactúa con GCE/GEQE-CQDots.

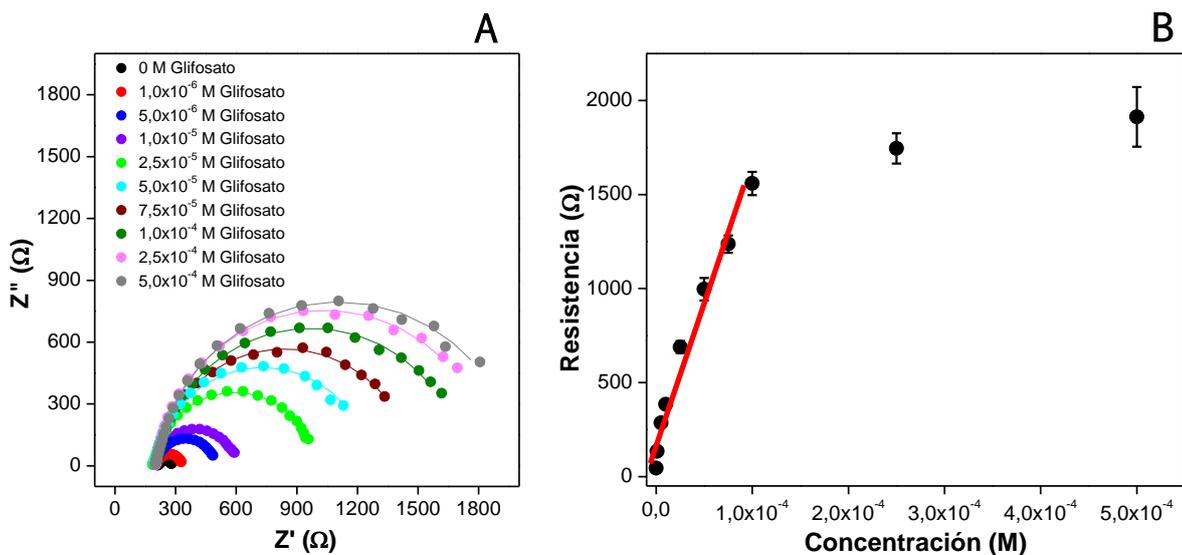


Figura VII-10. (A) Diagrama de Nyquist obtenidos para la descarga de H_2O_2 post interacción de GCE/GEQE-CQDots con concentraciones crecientes de glifosato y **(B)** curva de calibración obtenida a partir de los diagramas de Nyquist. Potencial aplicado $-0,100V$ Condiciones de interacción: acumulación a o.c.p. durante 10,0 minutos de Gly.

Los parámetros analíticos del sensor desarrollado se enumeran en la **tabla VII-2**. Es importante resaltar que existe una correlación lineal satisfactoria de los datos con una desviación estándar pequeña. Por otra parte, a pesar de que las normativas y leyes de límites máximos de glifosato permitidos en agua y alimentos difiere de un país a otro [15,57,61] el límite de detección de $6,2 \times 10^{-7}$ M (105 ppb) del sensor, se encuentra muy por debajo de lo que establecen los estándares de calidad y la ley argentina para los límites de glifosato en agua para consumo humano que es de 280 $\mu g/L$ (280 ppb) [62]. De esta manera, se puede concluir que la plataforma posee atractivas características para ser empleada tanto para el control de calidad de agua para consumo humano, así como también para control de calidad medioambiental ó control de calidad de productos fitosanitarios, debido al amplio rango lineal que presenta el sensor desarrollado.

Tabla VII-2. Parámetros analíticos del sensor desarrollado

r	0,95
Sensibilidad (Ω/M)	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-7}$
LOD (M)	$6,2 \times 10^{-7}$
LOQ (M)	$1,8 \times 10^{-6}$
SD	0,09
Rango lineal (M)	Desde $1,8 \times 10^{-6}$ hasta $1,0 \times 10^{-4}$

VII-3.5. Cuantificación de glifosato en una muestra de agua

La plataforma desarrollada fue desafiada a la cuantificación de glifosato en una muestra de agua. Se realizó un análisis de recuperación para una muestra de agua conteniendo $3,5 \times 10^{-6}$ M de glifosato por triplicado, los diagramas de Nyquist para la descarga de H_2O_2 $5,0 \times 10^{-2}$ M obtenidos se muestran en la **Figura VII-11**.

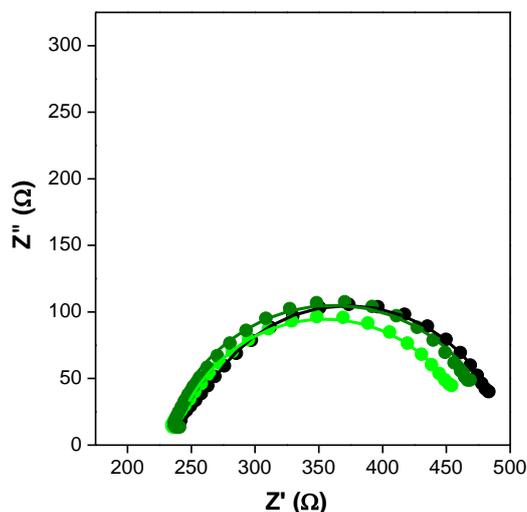


Tabla VII-3. Resultados obtenidos para el ensayo de recuperación en agua

Resistencia promedio	$(234 \pm 2) \Omega$
Concentración (M)	$(3,7 \pm 0,9) \times 10^{-6}$
Recuperación	106 %

Figura VII-11. Diagramas de Nyquist para H_2O_2 obtenido para una muestra de agua con adición de $3,5 \times 10^{-6}$ M de glifosato. Potencial aplicado $-0,100V$ Condiciones de interacción: acumulación a o.c.p. durante 10,0 minutos de Gly.

En la **tabla VII-3** se resumen los valores de resistencia promedio de H_2O_2 , el correspondiente valor de concentración de glifosato y el porcentaje

de recuperación hallado. Estos resultados se encuentran en muy buen acuerdo con la concentración de glifosato adicionada en la muestra y dan cuenta de la exitosa capacidad del sensor para cuantificar glifosato en muestra de agua de una manera sencilla, económica, rápida y sobre todo, sin la necesidad de derivatizar el Gly y sin pretratamiento de la muestra.

VII-3.6. Cuantificación de glifosato en una formulación de producto fitosanitario

El sensor fue empleado también para la cuantificación de glifosato en un formulado de producto fitosanitario de marca comercial Roundup, el cual informa en su etiqueta una concentración de principio activo de 54% P/V. La formulación fue analizada sin más tratamiento que una dilución de la muestra, de manera tal que la concentración esperada se encuentre dentro del rango lineal de la curva de calibrado. Se realizó un análisis por duplicado de una muestra diluida y los resultados obtenidos se presentan en la **Figura VII-12**.

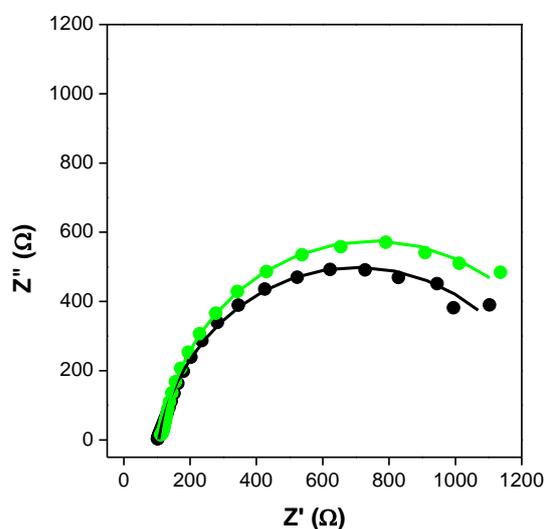


Tabla VII-4. Resultados obtenidos para el ensayo de recuperación en formulado de producto fitosanitario

<i>Resistencia promedio</i>	$(1230 \pm 50) \Omega$
<i>Concentración calculada (M)</i>	$(6,9 \pm 0,3) \times 10^{-5}$
<i>Concentración calculada (% P/V)</i>	(59 ± 2)
<i>Concentración informada por el fabricante (% P/V)</i>	54
<i>Error</i>	9,3 %

Figura VII-12. Diagramas de Nyquist para H_2O_2 obtenido para una muestra de formulación de producto fitosanitario. Potencial aplicado $-0,100V$ Condiciones de interacción: acumulación a o.c.p. durante 10,0 minutos de Gly.

La **tabla VII-4** enumera los resultados obtenidos para la cuantificación del herbicida en un producto comercial, puede notarse que a pesar de tratarse de una muestra compleja con diversos aditivos y coadyuvantes, los resultados obtenidos se encuentran en muy buen acuerdo con lo informado por el fabricante. Estos resultados reflejan la posibilidad de emplear el sensor propuesto para el control de calidad de productos fitosanitarios, con una metodología sencilla y de bajo costo para la industria.

VII-4. Conclusiones parciales

En el presente capítulo se describió una metodología indirecta, sencilla y económica para la cuantificación de glifosato, sin necesidad de pretratar la muestra para el análisis, utilizando un electrodo de carbono vítreo modificado con el híbrido GEQE-CQDots.

Mediante experimentos voltamperométricos, se corroboró la variación del comportamiento electroquímico de la cupla ferricianuro-ferrocianuro de potasio por la presencia de glifosato en la superficie. Se optimizaron los parámetros de síntesis del nanohíbrido de manera de obtener las mejores respuestas electroquímicas. Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) proporcionó respuestas altamente sensibles para la cuantificación indirecta de Gly, mediante el empleo de H_2O_2 como marcador redox.

El híbrido generado a partir de GEQE y CQDots presentó atractivas propiedades para ser empleado en el análisis de Glifosato de manera indirecta y altamente sensible, permitiendo alcanzar límites de detección lo suficientemente bajos y un amplio intervalo lineal, lo que posibilita el uso del sensor desarrollado para el control de calidad alimenticio, medioambiental y de productos comerciales.

GCE/GEQE-CQDots fue empleado exitosamente para cuantificar Glifosato de manera rápida y sencilla en muestras de agua de consumo humano y formulaciones de productos con excelentes resultados, lo que proporciona una opción muy promisorio para el futuro empleo de la plataforma, en el control de calidad de productos de consumo humano, así como también de productos fitosanitarios con costos bajos de operación.

VII-5. Bibliografía

- [1] Z. R. Jarrell, M. U. Ahammad, and A. P. Benson, “Glyphosate-based herbicide formulations and reproductive toxicity in animals,” *Vet. Anim. Sci.*, vol. 10, no. 6, p. 100126, 2020, doi: 10.1016/j.vas.2020.100126.
- [2] R. H. Coupe and P. D. Capel, “Trends in pesticide use on soybean, corn and cotton since the introduction of major genetically modified crops in the United States,” *Pest Management Science*, vol. 72, no. 5, pp. 1013–1022, 2016, doi: 10.1002/ps.4082.
- [3] V. Storck, D. G. Karpouzas, and F. Martin-Laurent, “Towards a better pesticide policy for the European Union,” *Sci. Total Environ.*, vol. 575, pp. 1027–1033, 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.167.
- [4] K. H. Kim, E. Kabir, and S. A. Jahan, “Exposure to pesticides and the associated human health effects,” *Sci. Total Environ.*, vol. 575, pp. 525–535, 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.009.
- [5] M. M. Steingrimsdóttir, A. Petersen, and P. Fantke, “A screening framework for pesticide substitution in agriculture,” *J. Clean. Prod.*, vol. 192, pp. 306–315, 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.04.266.
- [6] D. Capoferri, F. Della Pelle, M. Del Carlo, and D. Compagnone, “Affinity sensing strategies for the detection of pesticides in food,” *Foods*, vol. 7, no. 9, 2018, doi: 10.3390/foods7090148.
- [7] E. C. Reynoso, E. Torres, F. Bettazzi, and I. Palchetti, “Trends and perspectives in immunosensors for determination of currently-used pesticides: The case of glyphosate, organophosphates, and neonicotinoids,” *Biosensors*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.3390/bios9010020.
- [8] A. M. Dietrich *et al.*, “Partitioning, aqueous solubility, and dipole moment data for cis- and trans-(4-methylcyclohexyl)methanol, principal contaminants of the West Virginia chemical spill,” *Environ. Sci. Technol. Lett.*, vol. 2, no. 4, pp. 123–127, 2015, doi: 10.1021/acs.estlett.5b00061.
- [9] J. S. Noori, J. Mortensen, and A. Geto, “Recent development on the electrochemical detection of selected pesticides: A focused review,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 8, 2020, doi: 10.3390/s20082221.
- [10] E. Koivisto *et al.*, “The prevalence and correlates of anticoagulant rodenticide exposure in non-target predators and scavengers in Finland,” *Sci. Total Environ.*, vol. 642, pp. 701–707, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.063.
- [11] M. Barghi *et al.*, “Accumulation and exposure assessment of persistent chlorinated and fluorinated contaminants in Korean birds,” *Sci. Total Environ.*, vol. 645, pp. 220–228, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.040.
- [12] F. Ernst *et al.*, “Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems,” *Sci. Total Environ.*, vol. 631–632, pp. 169–179, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.320.
- [13] R. M. Abdelhameed, M. El-Zawahry, and H. E. Emam, “Efficient removal of

- organophosphorus pesticides from wastewater using polyethylenimine-modified fabrics,” *Polymer (Guildf)*, vol. 155, no. 9, pp. 225–234, 2018, doi: 10.1016/j.polymer.2018.09.030.
- [14] M. Carrère, F. DeMaria, and S. Drogué, “Maximum residual levels of pesticides and public health: best friends or faux amis?,” *Agric. Econ. (United Kingdom)*, vol. 49, no. 1, pp. 111–118, 2018, doi: 10.1111/agec.12399.
- [15] M. Regiart, M. A. Fernández-Baldo, P. Navarro, S. V. Pereira, J. Raba, and G. A. Messina, “Nanostructured electrode using CMK-8/CuNPs platform for herbicide detection in environmental samples,” *Microchem. J.*, vol. 157, no. 2, p. 105014, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105014.
- [16] M. Spinaci, C. Nerozzi, C. lo Tamanini, D. Bucci, and G. Galeati, “Glyphosate and its formulation Roundup impair pig oocyte maturation,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-68813-6.
- [17] D. Feng, A. Soric, and O. Boutin, “Treatment technologies and degradation pathways of glyphosate: A critical review,” *Sci. Total Environ.*, vol. 742, p. 140559, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140559.
- [18] A. Muola *et al.*, “Risk in the circular food economy: Glyphosate-based herbicide residues in manure fertilizers decrease crop yield,” *Sci. Total Environ.*, vol. 750, p. 141422, 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141422.
- [19] J. P. Myers *et al.*, “Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement,” *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source*, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1186/s12940-016-0117-0.
- [20] F. Maggi, D. la Cecilia, F. H. M. Tang, and A. McBratney, “The global environmental hazard of glyphosate use,” *Sci. Total Environ.*, vol. 717, p. 137167, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137167.
- [21] S. Ruuskanen, M. J. Rainio, M. Uusitalo, K. Saikkonen, and M. Helander, “Effects of parental exposure to glyphosate-based herbicides on embryonic development and oxidative status: a long-term experiment in a bird model,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–7, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-63365-1.
- [22] M. Sun, H. Li, and D. P. Jaisi, “Degradation of glyphosate and bioavailability of phosphorus derived from glyphosate in a soil-water system,” *Water Res.*, vol. 163, p. 114840, 2019, doi: 10.1016/j.watres.2019.07.007.
- [23] J. Fernandez-Cornejo, R. Nehring, C. Osteen, S. Wechsler, A. Martin, and A. Vialou, “Pesticide use in U.S. agriculture: 21 selected crops, 1960-2008,” *Agric. Pestic. Usage Trends Anal. Data Sources*, pp. 1–102, 2011, doi: 10.2139/ssrn.2502986.
- [24] C. M. Benbrook, “Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally,” *Environ. Sci. Eur.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–15, 2016, doi: 10.1186/s12302-016-0070-0.
- [25] D. Comont *et al.*, “Evolutionary epidemiology predicts the emergence of glyphosate resistance in a major agricultural weed,” *New Phytol.*, vol. 223, no. 3,

pp. 1584–1594, 2019, doi: 10.1111/nph.15800.

- [26] V. Silva *et al.*, “Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union,” *Sci. Total Environ.*, vol. 621, pp. 1352–1359, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.093.
- [27] C. Gillezeau *et al.*, “The evidence of human exposure to glyphosate: a review” *Enviromental Health*, vol. 18, no. 2, pp. 1–14, 2019. doi: 10.1186/s12940-018-0435-5
- [28] S. Panzacchi *et al.*, “The Ramazzini Institute 13-week study on glyphosate-based herbicides at human-equivalent dose in Sprague Dawley rats: Study design and first in-life endpoints evaluation,” *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source*, vol. 17, no. 1, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1186/s12940-018-0393-y.
- [29] R. Karthikraj and K. Kannan, “Widespread occurrence of glyphosate in urine from pet dogs and cats in New York State, USA,” *Sci. Total Environ.*, vol. 659, pp. 790–795, 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.454.
- [30] C. Nerozzi, S. Recuero, G. Galeati, D. Bucci, M. Spinaci, and M. Yeste, “Effects of Roundup and its main component, glyphosate, upon mammalian sperm function and survival,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-67538-w.
- [31] S. Qiu, H. Fu, R. Zhou, Z. Yang, G. Bai, and B. Shi, “Toxic effects of glyphosate on intestinal morphology, antioxidant capacity and barrier function in weaned piglets,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 187, no. 10, p. 109846, 2020, doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109846.
- [32] R. Mesnage and M. N. Antoniou, “Facts and Fallacies in the Debate on Glyphosate Toxicity,” *Front. Public Heal.*, vol. 5, no. 11, pp. 1–7, 2017, doi: 10.3389/fpubh.2017.00316.
- [33] S. T. Soukup *et al.*, “Glyphosate and AMPA levels in human urine samples and their correlation with food consumption: results of the cross-sectional KarMeN study in Germany,” *Arch. Toxicol.*, vol. 94, no. 5, pp. 1575–1584, 2020, doi: 10.1007/s00204-020-02704-7.
- [34] N. Defarge, J. Spiroux de Vendômois, and G. E. Séralini, “Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides,” *Toxicol. Reports*, vol. 5, no. 12, pp. 156–163, 2018, doi: 10.1016/j.toxrep.2017.12.025.
- [35] J. Nardi, P. B. Moras, C. Koeppe, E. Dallegrove, M. B. Leal, and L. G. Rossato-Grando, “Prepubertal subchronic exposure to soy milk and glyphosate leads to endocrine disruption,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 100, pp. 247–252, 2017, doi: 10.1016/j.fct.2016.12.030.
- [36] J. S. Noori, M. Dimaki, J. Mortensen, and W. E. Svendsen, “Detection of glyphosate in drinking water: A fast and direct detection method without sample pretreatment,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 9, 2018, doi: 10.3390/s18092961.
- [37] J. Xu, S. Smith, G. Smith, W. Wang, and Y. Li, “Glyphosate contamination in grains and foods: An overview,” *Food Control*, vol. 106, no. 3, 2019, doi:

- 10.1016/j.foodcont.2019.106710.
- [38] S. H. Bai and S. M. Ogbourne, "Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 23, no. 19, pp. 18988–19001, 2016, doi: 10.1007/s11356-016-7425-3.
- [39] A. H. C. Van Bruggen *et al.*, "Environmental and health effects of the herbicide glyphosate," *Sci. Total Environ.*, vol. 616–617, pp. 255–268, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.309.
- [40] L. Lupi *et al.*, "Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina.," *Chemosphere*, vol. 225, pp. 906–914, 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.090.
- [41] F. Guo *et al.*, "Glyphosate adsorption onto kaolinite and kaolinite-humic acid composites: Experimental and molecular dynamics studies," *Chemosphere*, vol. 263, p. 127979, 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127979.
- [42] R. E. De Góes, M. Muller, and J. L. Fabris, "Spectroscopic detection of glyphosate in water assisted by laser-ablated silver nanoparticles," *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 5, 2017, doi: 10.3390/s17050954.
- [43] D. Moreno-González, R. Rodríguez-Ramírez, M. del Olmo-Iruela, and A. M. García-Campaña, "Validation of a new method based on salting-out assisted liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS for the determination of betalactam antibiotics in infant dairy products," *Talanta*, vol. 167, no. 12, pp. 493–498, 2017, doi: 10.1016/j.talanta.2017.02.045.
- [44] T. C. Canevari, M. V. Rossi, and A. D. P. Alexiou, "Development of an electrochemical sensor of endocrine disruptor bisphenol A by reduced graphene oxide for incorporation of spherical carbon nanoparticles," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 832, no. 10, pp. 24–30, 2019, doi: 10.1016/j.jelechem.2018.10.044.
- [45] S. V. F. Castro, R. M. Cardoso, M. H. P. Santana, E. M. Richter, and R. A. A. Munoz, "Graphite sheet as a novel material for the collection and electrochemical sensing of explosive residues," *Talanta*, vol. 203, no. 5, pp. 106–111, 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.05.048.
- [46] S. L. Cahuantzi-Muñoz *et al.*, "Electrochemical Biosensor for Sensitive Quantification of Glyphosate in Maize Kernels," *Electroanalysis*, vol. 31, no. 5, pp. 927–935, 2019, doi: 10.1002/elan.201800759.
- [47] C. Zhang, X. Liang, Y. Lu, H. Li, and X. Xu, "Performance of CuAl-LDH/Gr Nanocomposite-Based Electrochemical Sensor with Regard to Trace Glyphosate Detection in Water" *Sensors*, vol. 20, no. 15, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/s20154146
- [48] J. J. Wang, W. H. Liu, D. Chen, Y. Xu, and L. Y. Zhang, "A micro-machined thin film electro-acoustic biosensor for detection of pesticide residuals," *J. Zhejiang Univ. Sci. C*, vol. 15, no. 5, pp. 383–389, 2014, doi: 10.1631/jzus.C1300289.
- [49] T. S. Anirudhan and S. Alexander, "Design and fabrication of molecularly imprinted polymer-based potentiometric sensor from the surface modified multiwalled carbon nanotube for the determination of lindane (γ -

- hexachlorocyclohexane), an organochlorine pesticide,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 64, pp. 586–593, 2015, doi: 10.1016/j.bios.2014.09.074.
- [50] M. L. López Rodríguez, C. Benimeli, R. E. Madrid, and C. E. Giacomelli, “A simple *Streptomyces* spore-based impedimetric biosensor to detect lindane pesticide,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 207, no. Part A, pp. 447–454, 2015, doi: 10.1016/j.snb.2014.10.030.
- [51] Z. Mazouz *et al.*, “Design of Novel Electrochemical Sensors for the Selective Detection of Glyphosate,” *Proceedings*, vol. 1, no. 4, p. 483, 2017, doi: 10.3390/proceedings1040483.
- [52] Y. Cao, L. Wang, C. Shen, C. Wang, X. Hu, and G. Wang, “An electrochemical sensor on the hierarchically porous Cu-BTC MOF platform for glyphosate determination,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 283, no. 11, pp. 487–494, 2019, doi: 10.1016/j.snb.2018.12.064.
- [53] R. F. Teófilo, E. L. Reis, C. Reis, G. A. Silva, and L. T. Kubota, “Experimental Design Employed to Square Wave Voltammetry Response Optimization for the Glyphosate Determination,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 15, no. 6, pp. 865–871, 2004, doi: 10.1590/S0103-50532004000600013
- [54] A. Khenifi *et al.*, “Glyphosate and glufosinate detection at electrogenerated NiAl-LDH thin films,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 654, no. 2, pp. 97–102, 2009, doi: 10.1016/j.aca.2009.09.023.
- [55] P. C. Oliveira, E. M. Maximiano, P. A. Oliveira, J. S. Camargo, A. R. Fiorucci, and G. J. Arruda, “Direct electrochemical detection of glyphosate at carbon paste electrode and its determination in samples of milk, orange juice, and agricultural formulation,” *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, vol. 53, no. 12, pp. 817–823, 2018, doi: 10.1080/03601234.2018.1505081.
- [56] M. del C. Aguirre, S. E. Urreta, and C. G. Gomez, “A Cu²⁺-Cu/glassy carbon system for glyphosate determination,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 284, no. 8, pp. 675–683, 2019, doi: 10.1016/j.snb.2018.12.124.
- [57] M. K. Bera and S. Mohapatra, “Ultrasensitive detection of glyphosate through effective photoelectron transfer between CdTe and chitosan derived carbon dot,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 596, no. 1, p. 124710, 2020, doi: 10.1016/j.colsurfa.2020.124710.
- [58] F. A. Tafreshi, Z. Fatahi, S. F. Ghasemi, A. Taherian, and N. Esfandiari, “Ultrasensitive fluorescent detection of pesticides in real sample by using green carbon dots,” *PLoS One*, vol. 15, no. 3, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0230646.
- [59] S. A. Nsibande and P. B. C. Forbes, “Fluorescence detection of pesticides using quantum dot materials – A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 945, pp. 9–22, 2016, doi: 10.1016/j.aca.2016.10.002.
- [60] L. Wang *et al.*, “Facile, green and clean one-step synthesis of carbon dots from wool: Application as a sensor for glyphosate detection based on the inner filter effect,” *Talanta*, vol. 160, pp. 268–275, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2016.07.020.

- [61] M. B. Gholivand, A. Akbari, and L. Norouzi, "Development of a novel hollow fiber-pencil graphite modified electrochemical sensor for the ultra-trace analysis of glyphosate," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 272, no. 5, pp. 415-424, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.05.170.
- [62] E. C. Reynoso, R. D. Peña, D. Reyes, Y. Chavarin-pineda, I. Palchetti, and E. Torres, "Determination of Glyphosate in Water from a Rural Locality in México and Its Implications for the Population Based on Water Consumption and Use Habits." *J. Environ. Res. Public Health*, vol. 17, no. 19, pp. 1-16, 2020, doi: 10.3390/ijerph17197102.



Capítulo VIII: Conclusiones generales

VIII-1. Conclusiones generales

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se sintetizaron, estudiaron y optimizaron nuevos nanomateriales híbridos de diferente naturaleza y complejidad, tales como CNT-PEI, RGrO-Poli-L-Dopa y GEQE-CQDots, las nanoestructuras resultantes fueron empleadas en el desarrollo de sensores electroquímicos tendientes a la cuantificación de analitos de interés *clínico*, como la dopamina que se encuentra íntimamente relacionada con procesos de neurotransmisión; *forense*, como el plomo y el antimonio, que pueden estar presentes en sospechosos, víctimas y en las superficies colindantes luego de la ejecución de un arma de fuego; y *medioambiental*, como el glifosato, el herbicida más utilizado y de mayor controversia en la actualidad.

Se abordó el estudio minucioso de la síntesis de tres nanohíbridos de diversa naturaleza y en orden creciente de complejidad:

- CNT-PEI: sintetizado a partir de la modificación no covalente de un material de carbono 1D (CNT) y polietilenimina, ambos componentes obtenidos de manera comercial.
- RGrO-Poli-L-Dopa: sintetizado a partir de un material de carbono 2D (GrO) de origen comercialmente y poli-L-Dopa, generada *in situ* en el proceso de síntesis del híbrido a partir del monómero L-Dopa.
- GEQE-CQDots: sintetizado a partir de dos materiales de carbono, GEQE (2D) y CQDots (0D), obtenidos por vías *top down* y *bottom up*, respectivamente mediante metodologías electroquímicas llevadas a cabo en el laboratorio.

En **capítulo 3** de este trabajo de Tesis se presentó la síntesis y caracterización de un nanohíbrido formado a partir de nanotubos de carbono de pared múltiple y polietilenimina. Mediante experimentos de espectroscopia IR y microscopía electrónica de barrido, se verificó la funcionalización no covalente de los nanotubos de carbono por parte del polímero y la obtención de una dispersión homogénea de la nanoestructura resultante. La inmovilización del nanohíbrido sobre electrodos de carbono vítreo dio como resultado una plataforma con excelentes propiedades electrocatalíticas y alta estabilidad hacia la oxidación del neurotransmisor DA. GCE/CNT-PEI fue

empleado exitosamente para la cuantificación de DA en niveles submicromolares en muestra de cerebro de animales de laboratorio sin efecto matriz y sin pasivación del electrodo, a merced de las excelentes propiedades que exhibe CNT dispersos homogéneamente en PEI y a la carga superficial aportada por el polímero. De esta manera fue posible estudiar como se ve afectado el proceso de recaptación de dopamina en SNC de animales de laboratorio con diversas patologías de manera sencilla, rápida y económica. Por otro lado, enfatizar el valioso aporte de los resultados obtenidos, para la comprensión del proceso de neurotransmisión dopaminérgica en sistema nervioso central.

En el **capítulo 4** se presentó la síntesis de un nuevo nanohíbrido formado a partir de la reducción *in situ* de óxido de grafeno durante la formación de un polímero melánico a partir de L-Dopa. La caracterización espectroscópica y microscópica del material resultante, confirmó la formación del polímero y la reducción simultánea de las láminas de grafeno, que dan origen al nanohíbrido RGrO-Poli-L-Dopa. El cual, presentó excelentes propiedades para la óxido-reducción de diferentes analitos, confirmadas mediante diversos experimentos electroquímicos. En el **capítulo 5** se presentaron los resultados obtenidos mediante el empleo de la plataforma GCE/RGrO-Poli-L-Dopa para la cuantificación de H₂O₂ en una muestra de enjuague bucal por un lado y por otra parte, por primera vez, se realizó un análisis detallado de las concentraciones de plomo y antimonio de restos de disparos de armas de fuego, mediante metodologías electroquímicas, sobre la superficie de telas colocadas a diferentes distancias del lugar de salida del proyectil y con diferentes tipos de cartuchos y obtenidas a través del hisopado de las manos de un sospechoso de accionar el arma. Estos estudios permiten establecer una importante correlación, que debido a las limitaciones que presenta, no sería posible de realizar con las técnicas convencionales que se emplean en la actualidad.

En el **capítulo 6**, se presentan nuevas metodologías para la síntesis de nanomateriales de carbono, GEQE y CQDots, y la posterior formación de un nuevo nanohíbrido a partir dichas estructuras. Las diferentes técnicas de caracterización utilizadas permitieron conocer la conformación estructural de los materiales sintetizados en cuanto a la naturaleza de los grupos funcionales

presentes (oxigenados o nitrogenados) ya que estos son, en gran parte responsables, del comportamiento electroquímico observado. En el **capítulo 7**, se presenta la exitosa cuantificación de Gly a niveles de ppb, mediante el empleo de GEQE-CQDots inmovilizado sobre electrodos de carbono vítreo. La plataforma sensora desarrollada fue capaz de cuantificar Gly de manera indirecta, tanto en muestras simples, como el agua, así como también en matrices complejas como una formulación de producto fitosanitario.

En términos generales, a lo largo de este trabajo de Tesis, se sintetizaron y caracterizaron diversos híbridos formados a partir de polímeros y de diferentes nanoestructuras de carbono y los resultados obtenidos permiten concluir que la elección correcta de los componentes, las metodologías y los parámetros de síntesis aseguran la obtención de materiales híbridos con propiedades que superan a la de los materiales individuales, mostrando en todos los casos un marcado efecto sinérgico de las características electrocatalíticas para la detección de los analitos de interés.

Por otro lado, cabe señalar que la optimización de las proporciones relativas de cada uno de los componentes del híbrido garantiza la obtención de las mejores respuestas electroanalíticas. Los polímeros permiten una eficiente dispersión de los nanomateriales, le confieren a las estructuras de carbono propiedades particulares dependiendo de su naturaleza y posibilitan la inmovilización de la dispersión sobre los sustratos sólidos. Además, el diseño y selección de los diferentes componentes del híbrido permite definir y controlar las aplicaciones finales de la plataforma sensora resultante, otorgando a los electrodos resultantes diversas propiedades de reconocimiento que permiten la cuantificación altamente sensible y selectiva de los diferentes analitos.

Los resultados presentados permiten concluir que una crítica selección de los materiales que conforman el nanohíbrido, que combina nanomateriales de carbono con biopolímeros de diferente naturaleza y del esquema de transducción, posibilita el desarrollo de sensores altamente sensibles y selectivos para la cuantificación de analitos de interés clínico, forense y medioambiental.

Este trabajo de Tesis resulta pionero en la aplicación de técnicas electroquímicas para la cuantificación de analitos de suma importancia en la

actualidad, permitiendo dar respuesta a problemas reales relacionados tanto a la química clínica y farmacológica, como así también sienta las bases en el área forense, aportando herramientas para resolver actos criminales. Por otra parte, contribuye con nuevas metodologías para el control medioambiental permitiendo no solo la detección, sino que también la cuantificación de herbicidas polémicos ampliamente utilizados en la actualidad.