

**Instituto Tecnológico de Costa Rica**

**Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales**

“Caracterización electroquímica y microscópica del sistema Poli (3,4-etilendioxitiofeno)-Nanopartículas de Oro para la aplicación en la fabricación de biosensores”

**Práctica Dirigida para optar por el título de Ingeniero en Materiales  
con el grado académico de Bachiller**

**Realizado por: Alex Fernando Alvarado Hidalgo**

**Profesor Guía: Ing. Ronald Jiménez Salas, MEt**

**Profesor Lector: Ing. Luis Cordero Arias, PhD**

**Cartago, diciembre 2017**

Escuela Acreditada por el Canadian Engineering Accreditation Board (CEAB)



## **Resumen**

Esta investigación es realizada en función de evaluar el comportamiento electroquímico de electrodos de oro modificados con Poli (3,4-etilendioxitiofeno)-Nanopartículas de Oro (PEDOT-NPAu). El estudio y evaluación de la electroquímica de los electrodos modificados se realizó mediante ensayos de Voltametría Cíclica y Espectroscopía Electroquímica de Impedancia; sumado a esto, Microscopía Electrónica de Transmisión fue utilizada como método de análisis microscópico para la superficie modificada del electrodo. La magnitud de la impedancia medida para el electrodo modificado fue menor que la mostrada por el electrodo de oro en todo el rango de análisis (1 Hz - 1 MHz); además, la sensibilidad del electrodo modificado demuestra ser mayor que la de oro, al mostrar rangos de corriente más altos en los análisis de Voltametría Cíclica. Finalmente se demuestra la aplicabilidad de los electrodos modificados a la detección electroquímica de pesticidas en medios acuosos, esto mediante la medición de la actividad enzimática entre la Acetilcolinesterasa y Acetilcolina en presencia de un pesticida que se caracteriza por inhibir o retrasar la reacción enzimática, midiendo diferencias de hasta 5  $\mu\text{A}$  en la corriente asociada a la reacción.

## **Abstract**

This research is performed to evaluate the electrochemical behavior of a Poly (3,4-Ethilenedioxythiophene)-Gold Nanoparticles modified Gold electrode (PEDOT-NPAu). The evaluation was performed by using Cyclic Voltammetry and Electrochemical Impedance Spectroscopy measurements, as well as Transmission Electron Microscopy for the microscopic analysis of the modified electrode surface. It was measured a lower impedance magnitude for the modified electrode than the only-gold electrode in the whole evaluated frequency range (1 Hz – 1 MHz); besides, by using Cyclic Voltammetry it was confirmed that the modified electrode has an increased sensibility in comparison with the only-gold electrode. Finally, the applicability of the chemical modification with PEDOT-NPAu in pesticide detection is shown by using an enzymatic reaction between Acetylcholinesterase and Acetylthiocholine with and without a pesticide who acts as an enzymatic inhibitor, it was measured a falling of 5  $\mu\text{A}$  in the current associated with the reaction.

## ACTA DE ENTREGA DEL INFORME FINAL DE LA PRÁCTICA DIRIGIDA

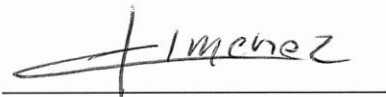
Se certifica que se ha recibido el Informe Final de la Práctica Dirigida, realizada por el estudiante Alex Fernando Alvarado Hidalgo, carné 2013105489, la cual se titula: "Caracterización electroquímica y microscópica del sistema Poli (3,4-etilendioxitiofeno)-Nanopartículas de Oro para la aplicación en la fabricación de biosensores", y que se realizó en el II Semestre de 2017.

La Práctica Dirigida es un requisito académico del Programa de Bachiller en Ingeniería en Materiales de la Escuela de en Ciencia e Ingeniería de los Materiales del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

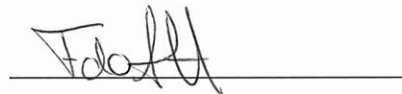
Este documento ha sido declarado:

Públicos

Confidenciales



Ing. Ronald Jiménez Salas, MEd  
Profesor Guía



Alex Fernando Alvarado Hidalgo  
Estudiante



Ing. Luis Cordero Arias, PhD  
Profesor Lector



Ing. Galina Pridybailo Chekán, MSc  
Director Escuela de Ciencia e  
Ingeniería de los Materiales

Cartago, 1 de Diciembre de 2017

## **Agradecimientos**

Al profesor Dr. rer. nat. Ricardo Starbird Pérez, por haberme permitido colaborar en el proyecto NES por tanto tiempo y porque en ese tiempo me ha brindado el apoyo y la guía necesaria para involucrarme en diferentes trabajos de investigación, incluyendo este trabajo de tesis. A todos los compañeros involucrados en este gran proyecto de investigación, cuyas labores en conjunto nos han permitido alcanzar diversos objetivos en el camino.

Un agradecimiento especial al profesor Luis Alvarado Marchena por su colaboración y guía durante los análisis de microscopía electrónica de transmisión, así como a los demás colaboradores del Laboratorio Institucional de Microscopía del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Al profesor Ing. Ronald Jiménez Salas, MEt, por su orientación en el transcurso de este trabajo para alcanzar los objetivos establecidos.

Finalmente, agradezco profundamente a Dios por todas las personas que ha puesto en mi camino y que, a su manera, han contribuido en la realización de trabajo, gracias a esas amistades que me han acompañado en tiempos difíciles y en tiempos de felicidad, esos que me ayudaron a no olvidarme de quien soy y por qué estoy aquí.

## Dedicatoria

*A mis padres, por enseñarme el valor de las cosas,  
porque cuando las cosas cuestan valen más.*

*“It's the questions we can't answer that teach us the most. They teach us how to think. If you give a man an answer, all he gains is a little fact. But give him a question and he'll look for his own answers.”*

*Patrick Rothfuss*

## Tabla de Contenido

Resumen .....	ii
Abstract.....	ii
Agradecimientos.....	iv
Dedicatoria.....	v
Tabla de Contenido.....	vii
Índice de Tablas.....	ix
Índice de Figuras .....	x
1. Introducción.....	1
1.1. Descripción del Problema.....	2
1.2. Justificación .....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos Específicos .....	3
1.4. Alcances y Limitaciones del Proyecto.....	4
2. Marco Teórico .....	5
2.1. Modificación Química de Electrodo.....	5
2.1.1. Electrodo Modificado con Materiales Poliméricos .....	5
2.1.2. Modificación de Electrodo con Materiales Nanoestructurados .....	10
2.1.3. Técnicas de Modificación Química de Electrodo.....	11
2.2. Caracterización de Electrodo Químicamente Modificados.....	15
2.2.1. Voltametría cíclica (VC) .....	15
2.2.2. Microscopía Electrónica de Transmisión .....	16
2.2.3. Otras técnicas de caracterización.....	17
2.3. Biosensores Enzimáticos .....	18
3. Metodología.....	19
3.1. Materiales.....	19
3.1.1. Nanopartículas de Oro (NPAu) .....	19
3.1.2. Otros reactivos.....	19
3.2. Electropolimerización de EDOT-NPAu .....	19
3.3. Caracterización de los Electrodo Modificados.....	20

3.3.1.	Voltametría Cíclica (VC).....	20
3.3.2.	Espectroscopía Electroquímica de Impedancia (EEI) .....	21
3.3.3.	Microscopía Electrónica de Transmisión .....	21
4.	Resultados y Análisis .....	26
4.1.	Electropolimerización EDOT-NPAu .....	26
4.2.	Espectroscopía Electroquímica de Impedancia .....	27
4.3.	Voltametría Cíclica .....	28
4.3.1.	Medición en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	28
4.3.2.	Actividad Enzimática e Inhibición AChE-Clorpirifós .....	30
4.4.	Microscopía Electrónica de Transmisión.....	33
5.	Conclusiones.....	36
6.	Recomendaciones .....	36
7.	Bibliografía.....	37



## **Índice de Tablas**

Tabla 1. Componentes y volúmenes necesarios para la preparación de la resina Spurr. ....	22
--	----

## Índice de Figuras

Figura 1. Polímeros utilizados para la modificación de electrodos.....	6
Figura 2. Comportamiento del sistema (A) antes de alcanzar la CMC y (B) sobre la CMC. ....	9
Figura 3. Ciclovoltagrama de Fluoreno (0.010 M), en una solución 0.20 M de tetrafluoroborato tetrabutilamonio en acetonitrilo, en un electrodo de Platino. Utilizando un cambio de potencial de 100 mV/s. ....	12
Figura 4. Técnicas Galvanostáticas (a) Cronopotenciometría a corriente constante, (b) Cronopotenciometría con un incremento lineal de corriente. ....	14
Figura 5. Ciclovoltagrama de un electrodo modificado con una película de PEDOT con Nanopartículas de Oro, en KCl(ac) 0.2 M, con un barrido de 200 mV/s, utilizando Ag/AgCl como electrodo de referencia. ....	16
Figura 6. Erlenmeyer en la campana de vacío conectada a la bomba rotatoria.....	23
Figura 7. Moldes con resina y con el electrodo polimerizado con PEDOT-NPAu.....	24
Figura 8. Desbaste del bloque de resina con una muestra embebida (verde).....	24
Figura 9. A) Aproximación del taco de resina al filo de la cuchilla de corte, en este caso se muestra una cuchilla de vidrio. B) Relación entre el color del corte y el espesor del mismo.....	25
Figura 10. Potenciometría cíclica correspondiente a la polimerización de EDOT-NPAu en electrodos de oro.....	26
Figura 11. Electrodo con puntos de PEDOT-NPAu (Izquierda) y con puntos de Oro (sin polimerizar) (Derecha).....	27
Figura 12. Magnitud de impedancia obtenida a partir de EEI para el electrodo de Oro (■) y para el electrodo modificado con PEDOT-NPAu (●).....	28
Figura 13. Ciclovoltagrama obtenido en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 N) para el electrodo de oro limpio. ....	29
Figura 14. Ciclovoltagrama correspondiente a la medición del electrodo modificado con PEDOT-NPAu en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 N) .....	29
Figura 15. Ciclovoltagramas correspondientes a la reacción AChE-ATCh con electrodo modificado con PEDOT-NPAu a (■) 0 minutos de reacción, (■) 5 minutos y (■) 10 minutos. ....	31
Figura 16. Ciclovoltagramas correspondientes a la reacción AChE-ATCh con electrodo de oro limpio a (■) 0 minutos de reacción, (■) 5 minutos y (■) 10 minutos. ....	31
Figura 17. Actividad enzimática medida como corriente a 0.7 V en electrodos modificados PEDOT-NPAu. (●) Sin Inhibidor, (▲) 14.9 μM de Inhibidor.....	33
Figura 18. Nanopartícula de Oro ubicada en la superficie de la matriz polimérica. ....	34
Figura 19. La zona más oscura muestra la lámina de aproximadamente 75 nm de espesor, mientras que la zona translúcida corresponde a la matriz de PEDOT electrodepositada. ....	35

# 1. Introducción

El desarrollo de técnicas de modificación de electrodos ha permitido la manipulación de las interacciones que ocurren en la superficie de estos con el ambiente de trabajo en el cual se desempeñan. Mediante la adición de materiales de distintas naturalezas se han logrado obtener electrodos de diversas características y con mayor sensibilidad de detección que los electrodos comunes de metales puros como el oro y el platino.

Materiales como el PEDOT, que es un polímero conductor y las nanopartículas de Oro (NPAu), han cobrado importancia en la fabricación de Electrodos Químicamente Modificados (EQM), logrando obtenerse mediante técnicas de electropolimerización; es precisamente la combinación de propiedades de un polímero conductor con un material nanoestructurado lo que permite la obtención de electrodos de alta sensibilidad y aplicables a sistemas de detección de pesticidas, esto mediante métodos de voltametría cíclica durante reacciones enzimáticas, de ahí que este tipo de biosensor se conozca como biosensor enzimático.

La aplicación de electrodos químicamente modificados a la detección de pesticidas en soluciones acuosas permite obtener respuestas en vivo, con alto nivel de confianza y a costos muy bajos, esto al comparar con métodos de Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC), Cromatografías de Gases (GC) y otros que conllevan el uso de equipo de alto costo, personal con alto nivel de entrenamiento y no permiten una respuesta rápida; sino que ocupan que la muestra siga un procesamiento previo y un estudio exhaustivo de los resultados que se obtienen.

De ahí la importancia de desarrollar nuevas modificaciones a electrodos, explotando las propiedades físicas y químicas de los materiales en pro de un bien común, como en este caso es una respuesta rápida y clara sobre la presencia de pesticidas en aguas de nuestro país, sumado a esto se encuentra la importancia de aplicar y demostrar la eficacia de técnicas de caracterización electroquímicas y microscópicas, como la voltametría cíclica, espectroscopía electroquímica de impedancia y la microscopía de transmisión.

## **1.1. Descripción del Problema**

Costa Rica destaca a nivel internacional como un país cuya economía se basa principalmente en turismo y en su actividad agrícola y pecuaria; sin embargo, la infiltración de pesticidas hacia ríos y otros acuíferos costarricenses genera alta exposición a estos tóxicos para diferentes especies presentes en el medio ambiente. Ante esta problemática los biosensores surgen como una alternativa tecnológica y de bajo costo para la detección y cuantificación de pesticidas en el recurso hídrico costarricense, abarcando desde lagunas hasta cuencas de ríos propensos a la contaminación con pesticidas organofosforados como los Clorpirifós. La modificación química de la superficie de los electrodos utilizados para los biosensores resulta muy importante, ya que en función de esta modificación se obtendrán diferentes comportamientos electroquímicos, mejorando desde la sensibilidad hasta la selectividad de dichos biosensores, de ahí la importancia de investigar la configuración PEDOT-NPAu como una alternativa de fabricación.

## **1.2. Justificación**

Este trabajo está enfocado en estudiar el comportamiento electroquímico y las características microscópicas del sistema Poli (3,4-etilendioxitiofeno) – Nanopartículas de Oro, PEDOT-NPAu, para su potencial aplicación en la fabricación de biosensores de bajo costo. La modificación química de electrodos ofrece una posibilidad muy importante para variar la respuesta que tienen estos ante diferentes ambientes de trabajo, logrando mejorar la sensibilidad ante los estímulos que estos ambientes ofrecen y que componen la señal analítica que se requiere analizar en cualquier investigación. La modificación de electrodos de oro con una deposición de un polímero conductor (PEDOT) ofrece toda una nueva posibilidad en la fabricación de biosensores al utilizar Nanopartículas de Oro (NPAu) en dicha matriz, ya que combina las propiedades tanto del polímero como del material nanoestructurado, resultando así en un material compuesto que se propone como una alternativa en cuanto a la fabricación de biosensores para diversas aplicaciones. Esta tecnología busca desplazar a otras técnicas de detección como lo son diferentes tipos de cromatografía y espectroscopías que requieren equipo de elevado costo y personal con un alto nivel de preparación técnica, esto mediante

la detección en vivo, con bajo nivel de preparación de muestras y con ensayos realizables por personal sin un alto nivel técnico.

Con este propósito se propone estudiar el sistema PEDOT-NPAu sobre electrodos de oro, el estudio se realizará con dos técnicas base, Voltametría Cíclica y Microscopía Electrónica de Transmisión, con lo que se pretende entender el comportamiento y respuesta electroquímica del electrodo, así como su morfología y así proponer esta modificación como una posibilidad de fabricación para biosensores, los cuales pueden ser empleados en la detección de pesticidas en medio acuoso, aplicación de vital importancia en Costa Rica debido a la industrialización que ha vivido la industria agrícola nacional.

## **1.3. Objetivos**

### *1.3.1. Objetivo General*

- Evaluar electroquímica y microscópicamente el sistema Poli (3,4-etilendioxitiofeno)-Nanopartículas de Oro (PEDOT-NPAu) para su potencial aplicación en biosensores.

### *1.3.2. Objetivos Específicos*

- Modificar químicamente electrodos de oro con PEDOT-NPAu.
- Caracterizar los electrodos modificados con PEDOT-NPAu mediante Voltametría Cíclica y Microscopía Electrónica de Transmisión.
- Evaluar el sistema PEDOT-NPAu para su potencial aplicación como Biosensor.

## **1.4. Alcances y Limitaciones del Proyecto**

El proyecto, busca modificar la superficie de un electrodo de oro con un polímero conductor (PEDOT) y Nanopartículas de Oro (NPAu), con la intención de conocer bien el sistema en busca de su implementación para la fabricación de biosensores. Para esto se realizarán análisis mediante técnicas de Voltametría Cíclica (VC) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Se realizará, además, análisis de VC a electrodos sin PEDOT-NPAu, estos poseen una superficie de oro expuesta, la cual entra en contacto con la solución electrolítica de la celda, esto con el objetivo de comparar los resultados entre los dos sistemas. La técnica de MET se emplea principalmente para obtener una evidencia completamente visual sobre la disposición de las nanopartículas en el sistema, así como su geometría y tamaño. El proyecto está limitado a una concentración de NPAu suspendidas en una solución, como trabajo futuro se podría considerar utilizar soluciones con concentraciones mayores o menores para analizar cómo se ven afectados los resultados, además se limita exclusivamente al uso de PEDOT como matriz polimérica utilizada. Variar la concentración de NPAu podría afectar, además, la visualización de las mismas por medio de MET.

## 2. Marco Teórico

### 2.1. Modificación Química de Electroodos

Los electrodos son dispositivos altamente empleados en los análisis e investigaciones que giran alrededor de la electroquímica. Un electrodo puede ser algo tan básico como un material conductor inmerso en una solución electrolítica; sin embargo, un término que se adecúa mejor a la electroquímica es el de un conductor electrónico en contacto con un conductor iónico [1].

La fabricación de electrodos ha evolucionado con los años, dando paso al empleo de métodos químicos para modificar la superficie activa de los electrodos de trabajo. Originalmente el uso de electrodos estaba muy restringido a variables como la solución de trabajo, el material del electrodo y el potencial que se le aplicaba al mismo; sin embargo la modificación química de electrodos ha cobrado un interés creciente en años recientes, esto debido a que se ha perfilado como una ruta promisoría en vista de manipular la interacción que tienen los electrodos con el ambiente en el cual estos trabajarán [2], de esta forma se ha ido migrando de los electrodos a los Electroodos Químicamente Modificados (EQM).

El término “Electrodo Químicamente Modificado” se diferencia del electrodo común en el hecho de que el primero suele ser una capa delgada, que puede ir desde una monocapa hasta una multicapa de algunos micrómetros de espesor, de un químico que se ha enlazado o ha sido depositado sobre la superficie de trabajo del electrodo, esto para proveer al electrodo con propiedades específicas que hubiesen sido imposibles de obtener en un electrodo convencional [3,4]. Algunas propiedades de los electrodos que se han logrado mejorar mediante la modificación química son la selectividad, sensibilidad, estabilidad química y la habilidad de este de ser utilizado en rangos más amplios de potencial eléctrico [4].

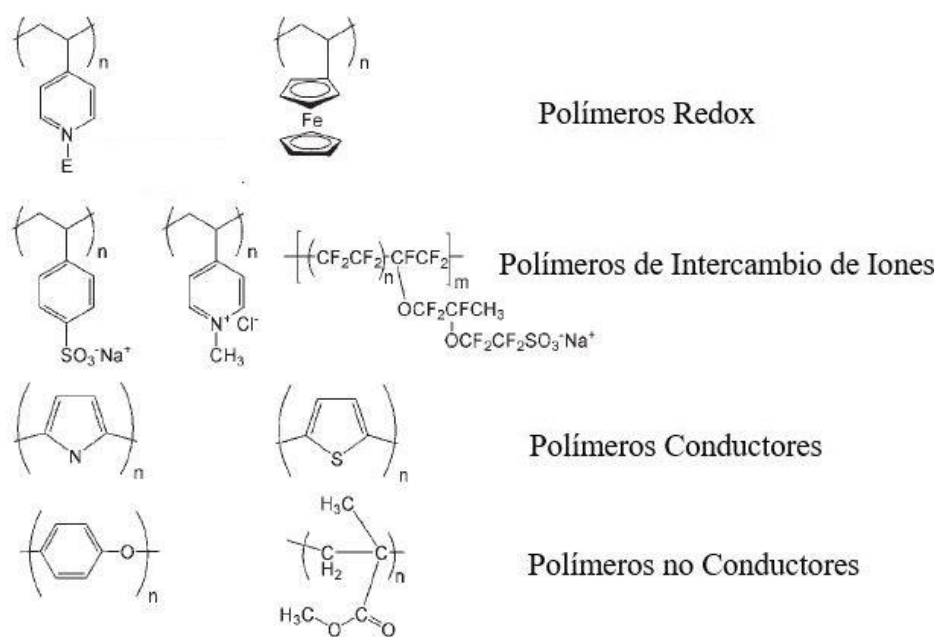
#### 2.1.1. *Electrodos Modificados con Materiales Poliméricos*

Utilizar materiales poliméricos en la modificación de la superficie de un electrodo tiene una ventaja principal, esta es que posee un número muy grande de sitios activos en la superficie del mismo, esto incrementa la utilidad del electrodo en el diseño de sensores, principalmente

en aquellos involucrados en el estudio de reacciones donde existen fenómenos de transporte de cargas o intercambio de electrones [4].

Otra ventaja presentada al utilizar polímeros como agente modificante en el electrodo es que estos pueden ser completamente insolubles en la solución en la cual serán utilizados, de esta manera, la pérdida de material no será un problema [5]. Los materiales poliméricos suelen presentar buena estabilidad, evitando así problemas de degradación y finalmente, los polímeros pueden incorporar diferentes funcionalidades químicas electro activas, esto dependiendo de la manera en la que son sintetizados, ofreciendo gran versatilidad en cuanto a la aplicación deseada.

Los materiales poliméricos con los que se ha estudiado la modificación química de electrodos han sido clasificados según los fenómenos que toman parte en su comportamiento electroquímico, de esta manera, se tienen cuatro clases; Redox, Intercambio de Iones, Polímeros Conductores y Polímeros No Conductores. La Figura 1 muestra ejemplos de esta clasificación.



**Figura 1.** Polímeros utilizados para la modificación de electrodos [4].



Dos de las categorías mostradas en la Figura 1 son las correspondientes a los Polímeros Redox y a los Polímeros de Intercambio Iones. Los polímeros Redox son especiales por que contienen moléculas activas ante sistemas Redox, estas poseen sitios activos en los que existe la capacidad de intercambiar electrones con otros sitios cercanos, esto mediante mecanismos de Oxidación-Reducción. Los sitios que se encuentran cercanos a la interfaz polímero-solución son los responsables del intercambio de electrones entre el electrodo y la solución electrolítica de la celda, sin embargo, la señal analítica requerida será producto del traslado exitoso de electrones desde la interfaz solución-polímero hasta la interfaz entre el polímero y el substrato del electrodo, habiendo así un fenómeno de traspaso de electrones entre los sitios Redox cercanos a ambas interfaces [4].

Por su parte, los Polímeros de Intercambio de Iones, se diferencian de los Polímeros Redox en el sentido de que los primeros sufren la difusión de las moléculas electro activas, resultando así en una capa polimérica capaz de transportar electrones [4].

#### *2.1.1.1. Polímeros Conductores*

La principal característica estructural de los polímeros conductores es la presencia de enlaces conjugados del tipo  $\pi$ , los cuales facilitan a conducción de electrones a través de bandas electrónicas deslocalizadas [4]. Esta deslocalización se puede analizar como el movimiento que sufre un sitio catiónico, producido a partir de la oxidación, a lo largo de una cadena polimérica; esta es la principal diferencia con un polímero Redox, en donde un sitio catiónico estará estático en una zona específica de la molécula polimérica [5].

Uno de los usos más comunes para electrodos modificados con polímeros conductores es la elaboración de electrodos para sensores, tanto así que se considera a los polímeros conductores como los primeros materiales en utilizarse con el propósito de incrementar la selectividad y la sensibilidad de los electrodos [6]. Debido a la gran sensibilidad que puede adquirirse empleando polímeros conductores han sido utilizados en sensores para el análisis de diferentes sistemas moleculares, especies orgánicas y biológicas como ADN, reacciones enzimáticas, entre otros [4].

Algunos ejemplos de polímeros conductores utilizados en la modificación química de electrodos son los derivados del Politiofeno, Polipirrol y de la Polianilina [7].

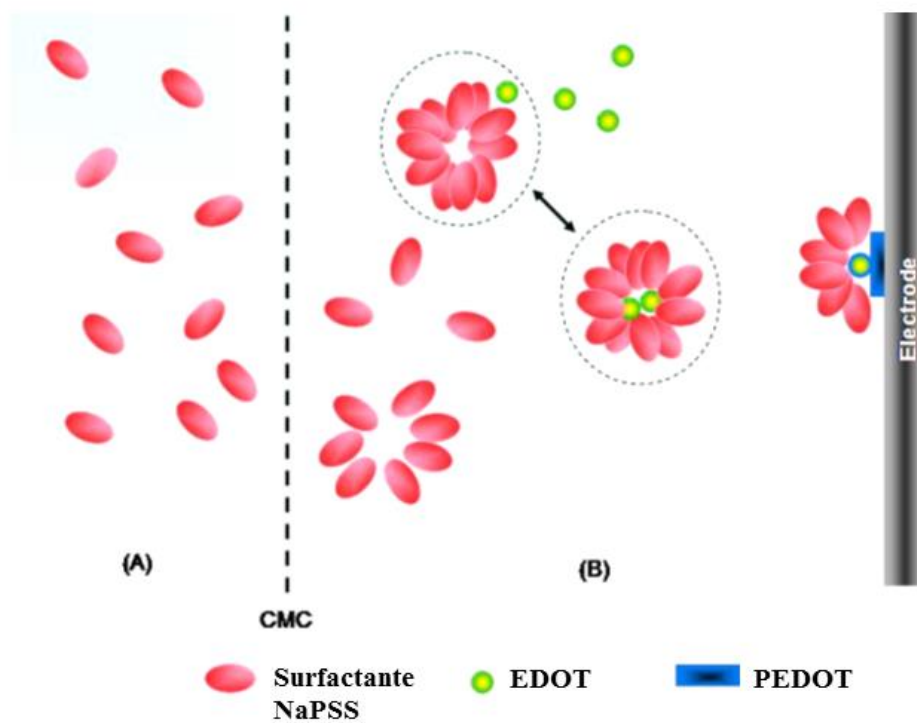
#### 2.1.1.2. *Poli (3,4-etilendioxitiofeno)*

El Poli (3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) es un polímero conductor con aplicaciones muy amplias en áreas como la bioelectrónica, ya que combina propiedades como la conductividad eléctrica, estabilidad y la biocompatibilidad [8], incluso algunos resultados reportan que los electrodos modificados con PEDOT presentan una menor impedancia ( $Z$ ) y mayor capacidad de inyección de carga ( $Q$ ) que los electrodos a base de un metal puro, postulándose así como un fuerte candidato a sustituir materiales como el iridio y el óxido de iridio ( $\text{IrOx}$ ) en la fabricación de dispositivos para la estimulación neuronal [9-11]. Otros estudios relevantes a la fabricación de biosensores con películas de PEDOT concluyen que este material se mantiene estable incluso después de cientos de análisis de voltametría cíclica, incluso analizando el efecto que pueden tener diferentes electrolitos y solventes en la conductividad, el cual se determinó que es despreciable [10].

Para la polimerización de PEDOT se recomienda utilizar agua como solvente [12]; sin embargo, el 3,4 Etilendioxitiofeno (EDOT) presenta muy baja solubilidad en agua, haciendo necesario la elaboración de un sistema miscelar para lograr una dispersión homogénea del monómero. Es con este motivo que la preparación de dispersiones de EDOT e incluso de materiales como nanopartículas metálicas involucra el uso de un surfactante.

Los surfactantes tienen la capacidad de orientarse a sí mismos de forma que se colocan las zonas apolares en una dirección y las zonas polares de la molécula en la dirección opuesta, formando así una interfase dentro del solvente [13, 14]. La Concentración Micelar Crítica (CMC) es la concentración de surfactante sobre la cual se empezarán a formar las micelas [13], estas suelen tener forma esférica e involucran dos factores competitivos, el primero de ellos es la transferencia de las cadenas de hidrocarburos hacia el centro de la esfera, en donde se formará una fase apolar similar al aceite y el segundo factor que compite es la repulsión entre las zonas polares de la molécula de surfactante conforme estas se acercan unas a otras. Adicionar más surfactante sobre la CMC únicamente incrementará la cantidad de micelas presentes, no aumentará de ninguna forma el tamaño de las que ya se encuentran en el

sistema. La Figura 2 muestra un esquema donde se tiene el surfactante, que una vez superada la CMC empezará a formar micelas que atrapan al monómero (EDOT) por su comportamiento apolar y posteriormente se “adhieren” a la superficie del electrodo, en el proceso de polimerización.



**Figura 2.** Comportamiento del sistema (A) antes de alcanzar la CMC y (B) sobre la CMC [12].

### 2.1.1.3. *Polímeros No Conductores*

Este tipo de polímero no se ve envuelto en las reacciones que involucran la transferencia de electrones, así que su función principal es pasivar la superficie del electrodo, ya sea total o parcialmente [4]. Depositiones de polímeros no conductores han sido utilizados para el atrapamiento de enzimas y otras biomoléculas en sensores, logrando mejorar la sensibilidad de estos de una manera importante [15]. Este tipo de aplicaciones han dado lugar a las

técnicas donde se atrapan moléculas en la matriz polimérica con la intención de, posteriormente, removerlas y obtener una matriz con espacios vacíos, o vacancias con una estructura complementaria a la molécula que fue atrapada [4], la técnica es conocida como Deposición de Polímeros de Impresión Molecular, Molecularly Imprinted Polymer Films, en inglés.

### *2.1.2. Modificación de Electroodos con Materiales Nanoestructurados*

#### *2.1.2.1. Nanopartículas Metálicas*

La modificación química de electrodos utilizando nanopartículas metálicas ha permitido incremento en el área de la superficie electroactiva de los mismos, aumentando así en gran medida su sensibilidad [1]. Muchas nanopartículas metálicas poseen la habilidad de catalizar reacciones electroquímicas, esto tomando ciertos analitos como objetivo, eliminando así la interferencia que puede ocurrir producto de otros componentes electroactivos presentes en el sistema [1, 16].

Esta capacidad mencionada de catalizar reacciones electroquímicas ha llevado a una muy amplia gama de aplicaciones para las nanopartículas, esta área es la de los biosensores, en donde nanopartículas de oro, platino y paladio han sido utilizadas gracias a su alta resistencia a las reacciones oxidativas y a que presentan buena biocompatibilidad. Entre las funciones que las nanopartículas metálicas cumplen al utilizarse en biosensores se encuentran:

- Inmovilización de biomoléculas
- Catálisis de reacciones
- Mejorar la transferencia de electrones
- Identificación de biomoléculas

Las Nanopartículas de Oro (NPAu) exhiben alta conductividad eléctrica, muy buena afinidad y biocompatibilidad hacia biomoléculas, haciendo de las NPAu uno de los materiales más utilizados para la modificación de electrodos electroquímicos [16, 17].

### 2.1.2.2. *Nanotubos de Carbono (NTC)*

Estos son básicamente moléculas de Carbono con una estructura cilíndrica, donde sus paredes están formadas por láminas de átomos de carbono con hibridación  $sp^2$ . Los NTC suelen tener diámetros entre 0.5-50 nm y longitudes de varios micrómetros [17].

Una de las ventajas que ofrecen los electrodos modificados con NTC es un área expuesta muy alta con muy buena conductividad. El empleo de estos electrodos modificados ha llevado a la fabricación de biosensores de alto desempeño para bioindicadores de cáncer, estas son sustancias biológicas que funcionan como indicador ante la presencia de cierta enfermedad o padecimiento.

### 2.1.3. *Técnicas de Modificación Química de Electrodos*

Según las propiedades deseadas y el objetivo de la fabricación de los electrodos, se debe escoger el método con el que estos serán modificados. Existen diferentes metodologías según la forma en la que se dará el acoplamiento entre el sustrato y el recubrimiento o modificación por realizarse [4]. Típicamente se emplean metales conductores como el oro (Au), plata (Ag) y el platino (Pt) como sustratos, estos presentan facilidades en cuanto a la limpieza de superficie y reproducibilidad de los experimentos, factores que son clave y que pueden ser difíciles de adquirir utilizando electrodos de carbono (C) o con electrodos de metales semiconductores, los cuales son utilizados con menor frecuencia [4].

#### 2.1.3.1. *Spin Coating*

La técnica de Spin Coating es muy común en la industria microelectrónica debido al empleo de materiales foto-resistivos, es decir, materiales sensitivos ante la luz natural, estos se usan en procesos de fotolitografía, proceso muy importante en la industria microelectrónica [18]. Por medio de Spin Coating se pueden obtener películas que varían desde 200 nm hasta 1  $\mu\text{m}$  de espesor. El proceso incluye depositar la solución donde se encuentra el polímero sobre el sustrato, el cual debe ser completamente plano; seguidamente, se acelera el sustrato a una

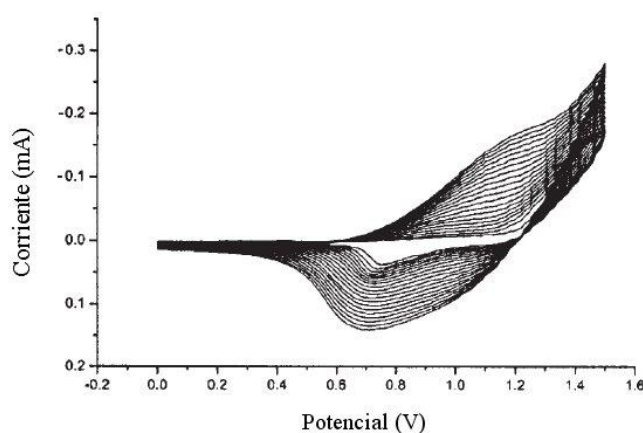
tasa de rotación específica, permitiendo así la acción de una fuerza centrífuga que remueve el exceso de solución por los bordes del sustrato.

Conforme avanza el proceso en el tiempo el espesor de la película disminuya hasta llegar un espesor de equilibrio o hasta que el incremento en viscosidad la haga pasar a un estado semi-sólido, este cambio de estado es debido a la evaporación del solvente [18].

### 2.1.3.2. Electropolimerización

Electropolimerización o Polimerización Electroquímica se refiere a la aplicación de métodos electroquímicos en un cátodo o ánodo durante una reacción de polimerización [7], una definición más simple es el desarrollo de una reacción electroquímica en la superficie del electrodo (sustrato), en la cual se da la inmovilización de la película polimérica [4].

Según el tipo de pulso o estímulo utilizado se han definido los tres métodos de electropolimerización: 1) Corriente Constante (Galvanostático), 2) Potencial Constante (Potenciostático) y 3) Métodos Cíclicos [7, 19]. La Figura 3 muestra los ciclovoltogramas correspondientes a la electropolimerización de fluoreno, realizada con un método cíclico, en donde los picos de corriente para cada curva indican la deposición de una capa adicional del polímero.



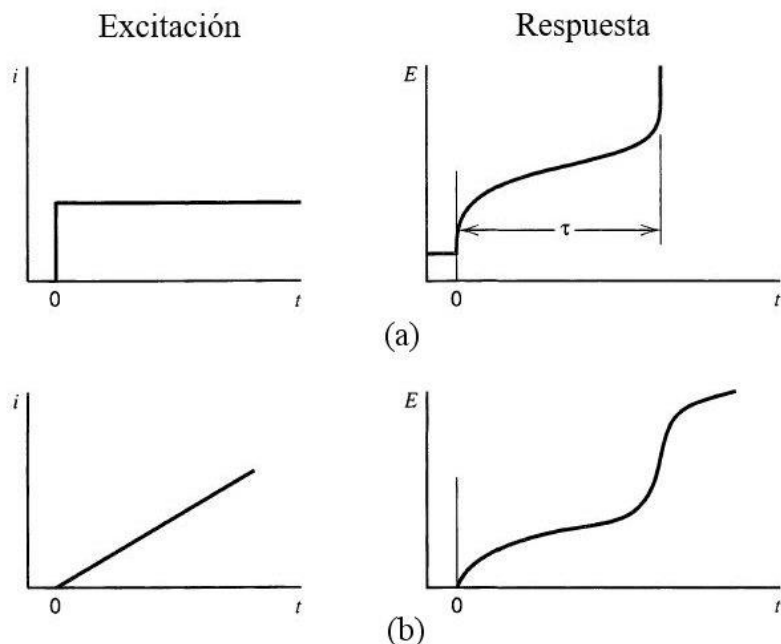
**Figura 3.** Ciclovoltograma de fluoreno (0.010 M), en una solución 0.20 M de tetrafluoroborato tetrabutilamonio en acetonitrilo, en un electrodo de platino. Utilizando un cambio de potencial de 100 mV/s [4].

La electropolimerización ofrece diferentes ventajas, entre ellas cabe resaltar que se tiene control sobre el espesor de la película depositada, ofreciendo la posibilidad de obtener resultados reproducibles, además, es importante el hecho de que se está dando la reacción del monómero directamente sobre la superficie del electrodo. Mediante el uso de potenciales programados se puede además dopar la película polimérica para cambiar sus cualidades de transporte de carga [4].

#### *2.1.3.2.1. Métodos Galvanostáticos*

Los métodos galvanostáticos son aquellos en donde se controla la corriente aplicada y el potencial eléctrico varía como una función del tiempo, para la aplicación de esta corriente constante suele ser utilizada una fuente de Corriente Directa (DC) [6, 20]. La instrumentación requerida para estas deposiciones es más sencilla que la que se necesita para deposiciones potenciostáticas, ya que no se requiere ningún tipo de retroalimentación por parte del electrodo de referencia.

La Polimerización galvanostática permite que la reacción ocurra a una tasa constante, permitiendo así controlar el espesor de la capa depositada y estimar la masa de polímero depositado en el electrodo [7]. Estos métodos muestran como respuestas curvas de la variación del potencial en función del tiempo, a estas mediciones se les conoce como cronopotenciometría. La Figura 4 muestra la respuesta obtenida a partir del estímulo correspondiente al pulso de corriente aplicado.



**Figura 4.** Técnicas Galvanostáticas (a) Cronopotenciometría a corriente constante, (b) Cronopotenciometría con un incremento lineal de corriente [7].

#### 2.1.3.2.2. Métodos Potenciostáticos

Un método de electrodeposición potenciostático es aquel en el que el potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia se mantiene constante, esto se logra utilizando un potenciostato [20], además, se debe medir la densidad de corriente catódica durante la electrodeposición para monitorear el proceso. La respuesta obtenida para los métodos potenciostáticos es una curva donde se muestre la variación de la corriente en función del tiempo, a esta medición se le conoce como Cronoamperometría.

#### 2.1.3.2.3. Métodos Cíclicos

Estos métodos permiten estudiar un comportamiento completo de los sistemas electroquímicos mediante la aplicación de barridos potencial, es decir, hay una variación lineal en el potencial eléctrico mientras se recopilan datos sobre la corriente medida en



función del tiempo o de dicho potencial [6]. Las tasas de cambio de potencial suelen variarse entre los 10 mV/s hasta incluso los 1000 V/s.

## **2.2. Caracterización de Electroodos Químicamente Modificados**

### *2.2.1. Voltametría cíclica (VC)*

Las técnicas voltamétricas involucran una perturbación en la condición inicial de cero corriente de una celda electroquímica variando el potencial al que está sujeto el electrodo de trabajo, midiendo a su vez la corriente generada como una función del tiempo [21]. Los barridos de potencial se hacen a una tasa de cambio  $v$  constante y con unidades que involucran potencial y el tiempo (V/s), el valor de  $v$  permite que se pueda graficar la corriente en función del tiempo o en función del potencial eléctrico aplicado según la Ecuación 1 [5].

$$V = v \times t$$

**Ecuación 1**

Donde:

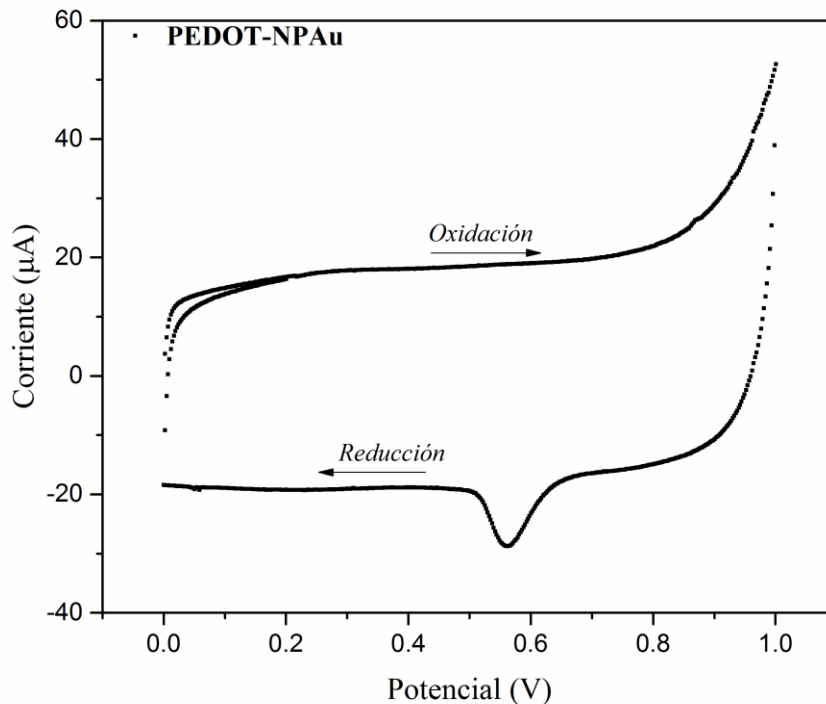
V: Potencial Eléctrico

v: Tasa de Cambio del Potencial Eléctrico

t: Tiempo

La corriente que mide la VC es la que ocurre entre un contra-electrodo (contador) y el electrodo de trabajo, los barridos negativos y positivos permiten el estudio de sistemas reversibles e irreversibles [12]. Los picos que se muestran en un ciclovoltagrama se pueden asociar, según el sistema que se estudie, con la oxidación electroquímica de sustancias orgánicas, así como cambios en la concentración de algún componente producto de una reacción química. Sumado al electrodo de trabajo y al contra-electrodo se debe utilizar un electrodo de referencia, el cual se debe mantener estable en el rango de potencial utilizado, es en base a este electrodo que el equipo medirá el potencial durante el barrido.

En la Figura 5 se muestra el ciclovoltagrama producto del análisis de un electrodo modificado con 3,4-Polietilendioxitiofeno y Nanopartículas de Oro (PEDOT-NPAu).



**Figura 5.** Ciclovoltagrama de un electrodo modificado con una película de PEDOT con Nanopartículas de Oro, en KCl(ac) 0.2 M, con un barrido de 200 mV/s, utilizando Ag/AgCl como electrodo de referencia.

Fuente: Elaboración propia.

### 2.2.2. Microscopía Electrónica de Transmisión

La Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) permite formar imágenes blanco y negro de una muestra a partir de las interacciones entre un haz condensado de electrones y la misma [22], estas interacciones son del tipo elástico cuando se dan entre los electrones del haz y el núcleo del material de la muestra, además, poseen un cambio muy pequeño en la energía de los electrones; por otra parte, las interacciones inelásticas se producen entre los electrones del haz y los pertenecientes a los átomos de la muestra, estas interacciones involucran un cambio importante en la energía de los electrones. Es una técnica ampliamente utilizada para realizar caracterización de la morfología de materiales nanoestructurados, como las

nanopartículas y los nanotubos de carbono [4], esto debido principalmente al que permite alcanzar ampliaciones hasta la escala atómica.

Tras la interacción que existe entre el haz de electrones incidente y los átomos de la muestra se puede analizar la superficie y con el contraste de la imagen se pueden tener información acerca de la masa atómica relativa de las especies que se encuentran en el material de la muestra. El equipo utiliza una diferencia de potencial que se encuentra entre 100 kV y 200 kV, entre más alto el potencial mayor será la penetración en la muestra, permitiendo así caracterizar muestras más gruesas; sin embargo, en general el grosor de la muestra no debe pasar de unos pocos nanómetros [22].

Algunas de las especificaciones generales de los equipos de MET involucran el empleo un filamento que por medio de emisión termiónica desprende electrones, los cuales se ven acelerados hacia la muestra debido a la diferencia de potencial. El equipo utiliza lentes electromagnéticas para evitar la divergencia del haz de electrones, además, se emplea alto vacío, evitando así que los electrones del haz se dispersen debido al choque con moléculas suspendidas en el aire a lo largo de la columna [23].

### *2.2.3. Otras técnicas de caracterización*

#### *2.2.3.1. Espectroscopía Electroquímica de Impedancia (EEI)*

Esta técnica mide la impedancia en un rango específico de frecuencia, analizando la respuesta eléctrica lineal de un material en un sistema brinda importante información acerca de sus propiedades electroquímicas y se puede utilizar para generar un circuito eléctrico equivalente [12]. Diferentes autores han utilizado la Espectroscopía Electroquímica de Impedancia con la intención de caracterizar la interfaz de electrodos en una solución y para interpretar los comportamientos electroquímicos que ocurren en las interfases de diferentes materiales [24]

Polímeros conductores como el PEDOT han sido estudiados y se les ha propuesto un circuito equivalente en el que se considera la resistencia y capacitancia de diferentes elementos en las interfaces metal/PEDOT/solución, a bajas frecuencias el comportamiento es capacitivo

debido a una doble capa que se forma en la interfaz, mientras a altas frecuencias hay un dominio de la resistencia de la solución [12].

### **2.3. Biosensores Enzimáticos**

Una aplicación de los Electrodo Químicamente Modificados al área de los biosensores es el desarrollo de biosensores enzimáticos, estos están basados en mediciones directas de inhibición enzimática o mediciones indirectas de compuestos que se producen como parte de una reacción entre una enzima y un substrato [25]. Enzimas colinesterasas (ChE) son utilizadas ampliamente en la detección de pesticidas, ya que los pesticidas organofosforados y carbamatos son los principales inhibidores de su actividad enzimática. La principal ventaja del uso de biosensores enzimáticos es la respuesta tan rápida que se obtiene, además de que suelen ser muy selectivos y son de bajo costo, esto ha provocado un desarrollo en el área de biosensores para la detección de pesticidas, ya que otros métodos como la Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) requieren equipos muy caros y personal entrenado para llevar a cabo las mediciones [26].

La reacción entre la Acetilcolinesterasa (AChE) y la Acetilcolina Clorhidro (ATCh) produce Tiocolina (TCh) debido al hidrólisis de AChE. Es precisamente la producción de TCh la que permite caracterizar la actividad enzimática por Voltametría Cíclica, ya que el incremento en la concentración de TCh involucra un aumento en la corriente asociada a un pico que se encuentra cercano a los 0.7 V, de esta forma, midiendo el incremento en la corriente podemos tener una idea de la actividad enzimática de la reacción [27].

### **3. Metodología**

Esta metodología describe los materiales empleados, así como los métodos de síntesis y de estudio utilizados durante o después de la modificación química de los electrodos de oro. De la misma manera se detallan algunos conceptos propios de la preparación o la caracterización de los electrodos.

#### **3.1. Materiales**

##### *3.1.1. Nanopartículas de Oro (NPAu)*

El método de síntesis, o preparación de las Nanopartículas de Oro (NPAu) que se utiliza ya ha sido reportado por otros autores [28]. Este procedimiento indica la preparación de una dispersión de fosfolípidos en medio acuoso, de esta dispersión se tomó 1 ml y se le agregaron 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  2 mM, luego se colocó la dispersión en un baño a 25°C con agitación constante. Las nanopartículas resultantes se centrifugaron durante 1 hora a 4400 rpm dos veces, para finalmente separar la fracción precipitada y redispersada en agua desionizada. Finalmente se sometió el precipitado a un proceso de sedimentación en presencia de Dodecilsulfato de Sodio (SDS), esta sedimentación sirve para purificar las nanopartículas y radica en las fuerzas de atracción entre partículas en presencia de arreglos miscelares [29].

##### *3.1.2. Otros reactivos*

La enzima Acetilcolinesterasa, el sustrato Acetilcolina, Cloruro de Potasio y Tris HCl fueron adquiridos por parte de Sigma Aldrich, así como el 3,4 Etilendioxitiofeno (EDOT), monómero requerido para la polimerización.

#### **3.2. Electropolimerización de EDOT-NPAu**

Para el proceso de electropolimerización se utilizó 1 ml de una dispersión EDOT-NPAu y se llevó a un volumen total de 20 ml con  $\text{KCl}_{(\text{ac})}$  (0.2 M). El método utilizado es el de potenciometría cíclica en un equipo Autolab PGSTAT 302N, fijando una densidad de

corriente de  $0.5 \text{ mA/cm}^2$  en un área expuesta de  $0.0113 \text{ cm}^2$  y con una densidad de carga de  $240 \text{ mC/cm}^2$ , además estableciendo un límite de  $1.4 \text{ V}$ . Las ecuaciones 2 y 3 muestran la determinación de la corriente y el tiempo necesario para la polimerización.

$$I = S \times A = 0.5 \frac{\text{mA}}{\text{cm}^2} \times 0.0113 \text{ cm}^2 = 5.65 \mu\text{A} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

S: Densidad de corriente

A: Área expuesta

I: Corriente

$$t = \frac{\rho}{S} = \frac{240 \text{ mC/cm}^2}{0.5 \text{ mA/cm}^2} = 480 \text{ s} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

$\rho$ : Densidad de carga

S: Densidad de corriente

t: Tiempo de aplicación de corriente

### **3.3. Caracterización de los Electrodo Modificados**

#### *3.3.1. Voltametría Cíclica (VC)*

Voltametría Cíclica es el método utilizado para comprobar la actividad electroquímica de las nanopartículas en el sistema PEDOT-NPAu. Para esto se realizaron mediciones en el rango de  $(0-1.4) \text{ V}$  en una solución  $(1 \text{ N})$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Una potencial aplicación del sistema PEDOT-NPAu fue analizada mediante una reacción enzimática, entre Acetilcolinesterasa (AChE) y el sustrato Acetilcolina Clorhidro (ATCh) a una concentración de  $1500 \mu\text{M}$ . Este análisis se realizó en dos etapas, la primera fue utilizada como referencia y contó con la presencia únicamente de la enzima y del sustrato, utilizando  $\text{KCl } 0.2 \text{ M}$  como electrolito. Posteriormente la segunda etapa fue llevada a cabo

en presencia de un inhibidor enzimático de la AChE, este inhibidor es un pesticida organofosforado conocido como Clorpirifós, nombre IUPAC: [O, O-dietil-O-(3, 5, 6-trichloro-2-pyridil) fosforotioato], en concentración 14.9  $\mu\text{M}$ . El equipo utilizado para las mediciones de VC es un Autolab PGSTAT 302N, con una celda de tres electrodos. Ag/AgCl en  $\text{KCl}_{(\text{ac})}$  (3M) fue utilizado como electrodo de referencia y como contra electrodo se utilizó una lámina de platino. Además, el rango de estudio se encuentra entre 0-1 V con un barrido de 0.2 V/s.

### *3.3.2. Espectroscopía Electroquímica de Impedancia (EEI)*

Esta es una técnica que complementando los análisis de voltametría cíclica, ayudará a analizar la actividad y presencia de las nanopartículas de oro en el electrodo. Este análisis se realizó en un equipo Autolab PGSTAT 302N con amplitudes de excitación de 50 mV desde 0.1 Hz hasta 1 MHz en una solución de ferrocianuro de potasio,  $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ , a una concentración de 5 mM, siendo este electrolito utilizado gracias a su comportamiento de sistema Redox de referencia [4], el cual se logra mantener estable a lo largo de las mediciones electroquímicas en concentraciones que varían entre 0.5-10.0 mM.

### *3.3.3. Microscopía Electrónica de Transmisión*

El análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) se llevó a cabo utilizando un equipo Jeol, modelo JEM 2100 (Activo 59978) sobre las muestras de los electrodos modificados. Estas muestras fueron embebidas en una resina de baja viscosidad Spurr y posteriormente se le realizaron cortes de 50-70 nm de espesor. Cada una de estas secciones cortadas se recolectaron en rejillas metálicas para la observación en MET. Los pasos necesarios para la preparación de las muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión se detallan a continuación.

### 3.3.3.1. Preparación de resina Spurr

Se preparó una resina de baja viscosidad (60 cps aproximadamente), utilizando los componentes y volúmenes mostrados en la Tabla 1 para bloques de media dureza. Todos estos componentes son parte del Low-Viscosity Kit (Código de producto: 18300-4221) de Ted Pella®.

**Tabla 1.** Componentes y volúmenes necesarios para la preparación de la resina Spurr.

Orden	Reactivo	Volumen (ml)
1°	ERL-1206	10
2°	ERL-736	6
3°	NSA	26
4°	S-1	0.50

Fuente. TED PELLA INC. Low Viscosity Kit, 2008.

La medición de cada volumen se realiza por el método de adición en una probeta de 50 ml y se deben agregar los componentes en el orden que indica la primera columna de la Tabla 1. Una vez se han agregado los tres primeros componentes se procede a trasvasar a un Erlenmeyer de 125 ml en el que se agrega el componente S-1 utilizando una micropipeta de 100 µl, en una cámara de extracción de gases marca LABCONCO (Activo 71440), el uso de la cámara de extracción es de vital importancia, ya que el componente es neurotóxico.

Una vez se tiene toda la mezcla de componentes en el Erlenmeyer se envuelve el recipiente con papel aluminio, ya que la mezcla es fotosensible, y se procede a agitar hasta que no haya separación evidente de fases, para esto se agrega una pastilla magnética y se coloca el recipiente sobre una plantilla con agitación magnética Thermoline.

La agitación inducirá la formación de burbujas en la mezcla, para eliminarlas se coloca el Erlenmeyer en una campana de vacío como la mostrada en la Figura 6, conectada a una bomba rotatoria marca GAST (Activo 57441) durante 30 minutos a 0.55 bar.



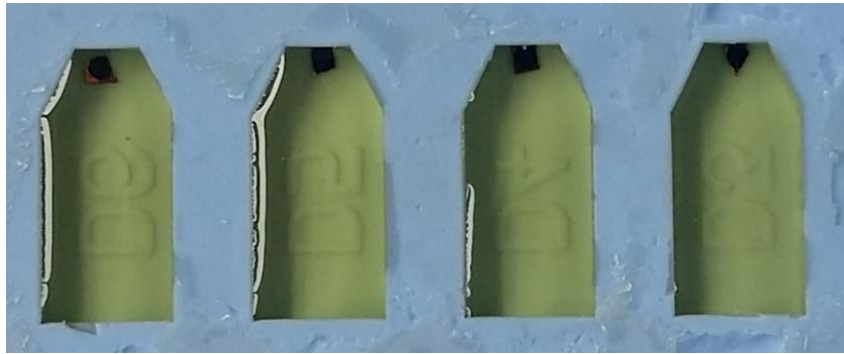


**Figura 6.** Erlenmeyer en la campana de vacío conectada a la bomba rotatoria.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez está preparada la mezcla de componentes sin burbujas se procede a cortar las secciones de interés del electrodo, estas son aquellos puntos polimerizados con PEDOT-NPAu.

Una vez se tienen los puntos recortados se procede a llenar parcialmente los moldes para resina, luego se colocan los puntos del electrodo recortados previamente para finalmente llenar de resina los moldes (PELCO®). En la Figura 7 se muestran los moldes llenos y con los puntos de electrodo colocados. El último paso en la preparación de los tacos de resina para realizar cortes en ultramicrotomo es colocar los moldes con resina en una estufa a 70°C aproximadamente durante 72 horas para que esta resina polimerice, para este paso se utilizó una estufa marca Digisystem (Activo 69657).

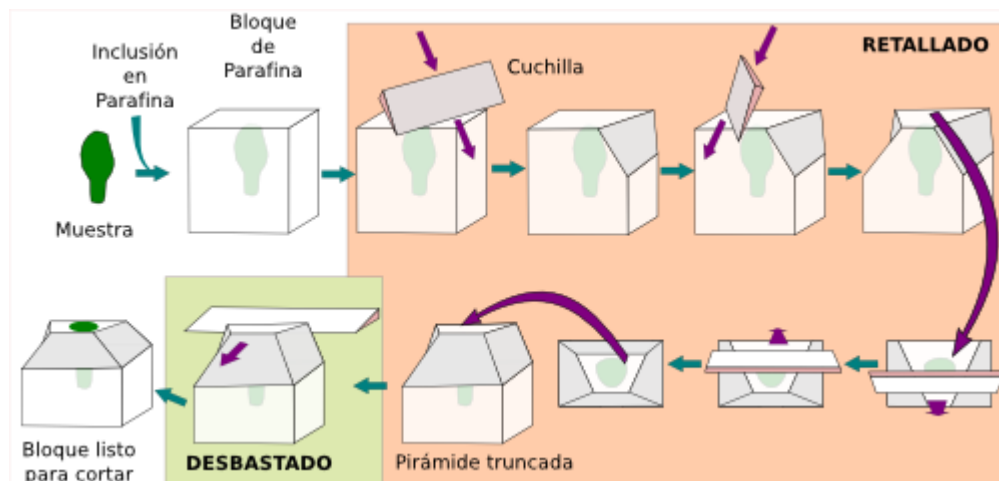


**Figura 7.** Moldes con resina y con el electrodo polimerizado con PEDOT-NPAu.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.3.3.2. Preparación de cortes ultrafinos

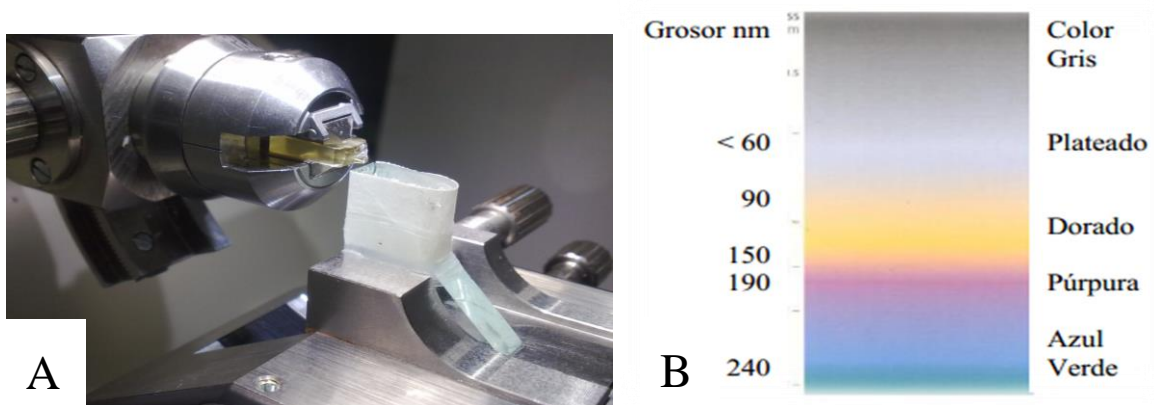
Para completar la preparación de las muestras para TEM se requiere realizar cortes ultrafinos, para esto se emplea un Ultramicrotomo Leica EM UC7 (Activo 59978) y cuchillas de diamante Diatome MT12871 de 35°. Previo a utilizar el ultramicrotomo se debe realizar un desbaste con cuchillas o con una hoja muy afilada, esto permitirá que el taco de resina con la muestra embebida adquiera una forma de pirámide truncada en la parte donde está la muestra, y de esta manera se puede empezar a realizar cortes finos con el equipo [30]. De otra manera el equipo invertiría mucho tiempo cortando secciones que no son de interés para el análisis. La Figura 8 muestra el desbaste grueso necesario para realizar los cortes ultrafinos.



**Figura 8.** Desbaste del bloque de resina con una muestra embebida (verde) [30].

Una vez se ha desbastado el bloque de resina se procede a realizar los cortes con el ultramicrotomo. La unidad de control del software del equipo permite establecer una velocidad de avance, la cual se establece como 0.6 mm/s y un ancho de ventana de 60 nm, este valor determina el espesor de los cortes obtenidos.

La Figura 9.A. muestra la colocación del taco de resina con la muestra embebida y su aproximación a la cuchilla de corte, además se puede comparar el color de los cortes con un esquema, el cual se muestra en la Figura 9.B., en donde muestra el grosor aproximado de los cortes en función del color que muestran ante la luz. Este esquema es útil para asegurar que el equipo está cortando en el rango de espesor que fue determinado, además brinda una idea de si la muestra no fue colocada paralela al filo de la cuchilla antes de empezar a cortar.

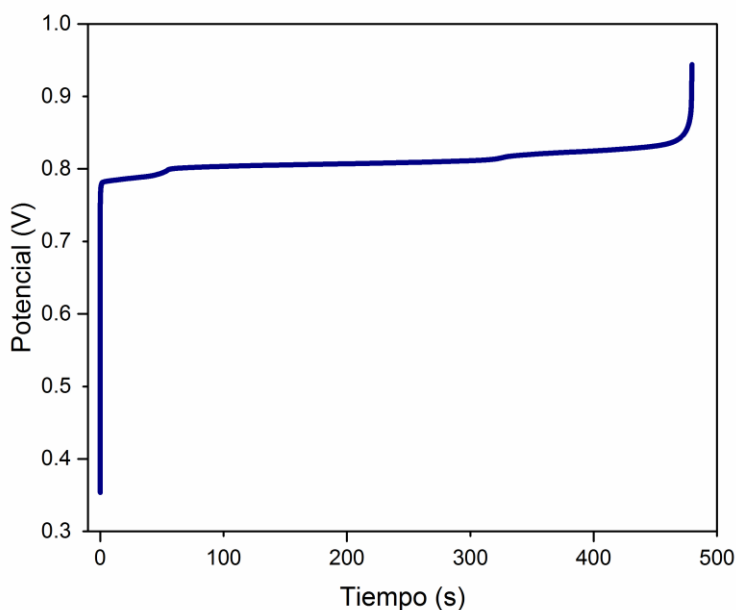


**Figura 9.** A) Aproximación del taco de resina al filo de la cuchilla de corte, en este caso se muestra una cuchilla de vidrio. B) Relación entre el color del corte y el espesor del mismo.

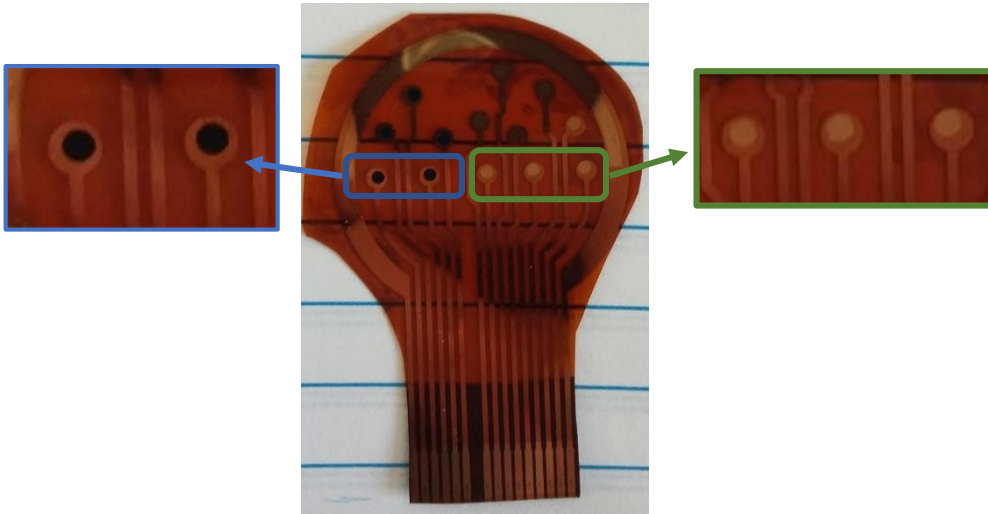
## 4. Resultados y Análisis

### 4.1. Electropolimerización EDOT-NPAu

La Figura 10 permite observar el gráfico de Potencial en función del tiempo para el método de polimerización utilizado. Como fue mencionado en la sección 3.2 de este documento el equipo aplicó una corriente de  $5.65 \mu\text{A}$  por un periodo que no debe exceder los 480 s, esto sin sobrepasar el límite de potencial que se estableció en 1.4 V. Observando el gráfico en la Figura 10 se puede concluir que el proceso se llevó a cabo de forma correcta, ya que no se excede el tiempo de aplicación de corriente y el potencial límite no fue alcanzado. La Figura 11 muestra la apariencia física del electrodo antes y después de la polimerización, este último se diferencia por una capa oscura de un color verdoso que es característica del EDOT polimerizado.



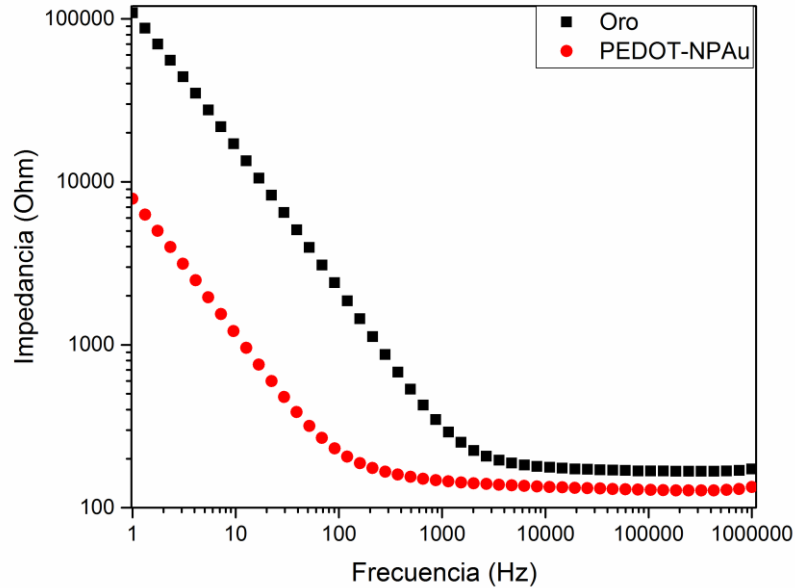
**Figura 10.** Potenciometría cíclica correspondiente a la polimerización de EDOT-NPAu en electrodos de oro.



**Figura 11.** Electrodo con puntos de PEDOT-NPAu (Izquierda) y con puntos de oro (sin polimerizar) (Derecha).

## 4.2. Espectroscopía Electroquímica de Impedancia

Por medio de la técnica de EEI se obtienen las gráficas mostradas en la Figura 12, en donde se muestra la magnitud de la impedancia en función de la frecuencia de análisis tanto para el electrodo de oro como para el electrodo que se ha modificado su superficie con PEDOT-NPAu. La modificación química al electrodo con PEDOT-NPAu provoca una disminución en la impedancia con respecto al electrodo de oro a lo largo de todo el análisis, esto tiene algunas implicaciones para su empleo en biosensores, como por ejemplo una mayor relación señal/ruido, provocando una mejoría importante en las mediciones realizadas gracias a este aumento en la sensibilidad del electrodo [9, 31]. Además, la gráfica muestra un comportamiento capacitivo que a partir de 1 kHz pasa a ser resistivo en el electrodo modificado, esto se puede observar tomando en cuenta que la impedancia característica de un resistor no posee un ángulo de fase, es decir, es independiente de la frecuencia de análisis, mientras que la impedancia obtenida a partir de un capacitor muestra una relación directa con la frecuencia de análisis, con un ángulo de fase de  $90^\circ$  [24].



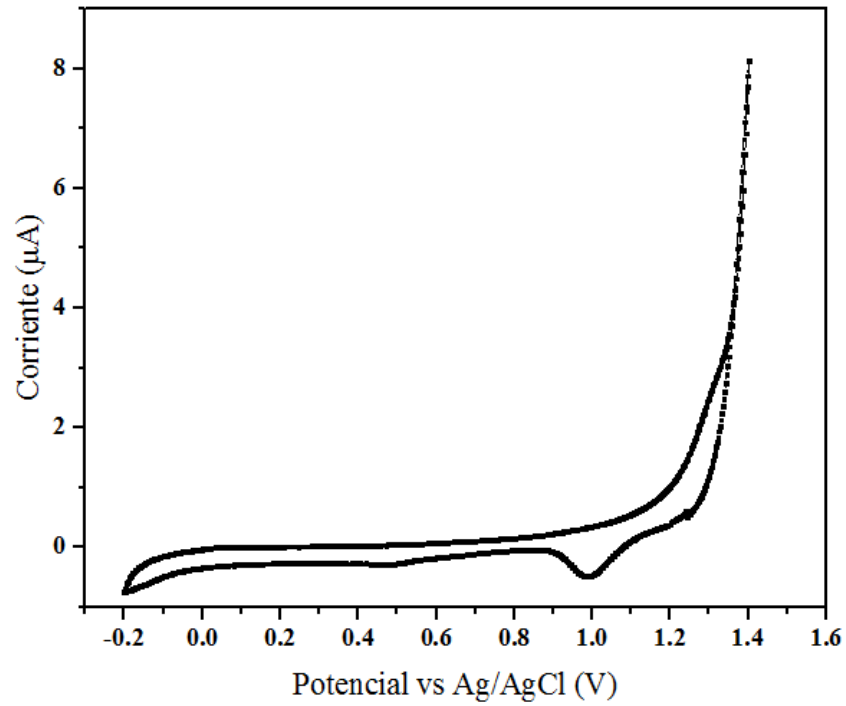
**Figura 12.** Magnitud de impedancia obtenida a partir de EEI para el electrodo de Oro (■) y para el electrodo modificado con PEDOT-NPAu (●).

## 4.3. Voltametría Cíclica

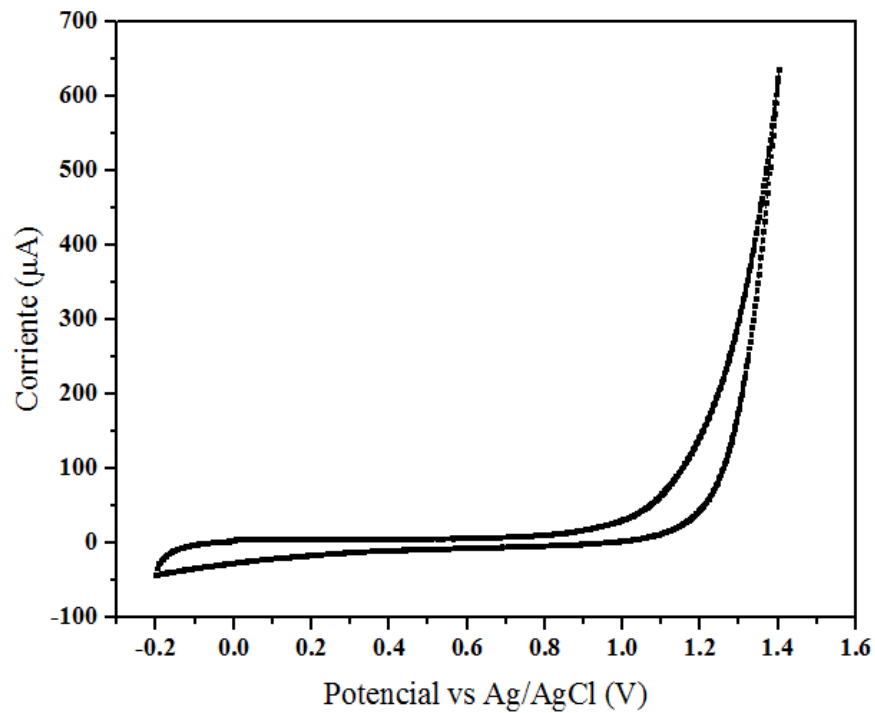
### 4.3.1. Medición en $H_2SO_4$

La Figura 13 muestra el ciclovoltagrama obtenido para el electrodo de oro limpio en ácido sulfúrico, en donde se puede observar el inicio de un pico de oxidación cercano a 1.3 V y uno de reducción a 1.0 V; esto se puede relacionar directamente con la oxidación y posterior reducción del oro de la superficie [32]; un resultado similar se esperaba en el electrodo modificado con PEDOT-NPAu; sin embargo el ciclovoltagrama mostrado en la Figura 14 no muestra picos de oxidación o reducción característicos de material de las nanopartículas.

Es por este motivo que no se puede concluir acerca de la actividad de las nanopartículas utilizando esta medición, para esto se recomienda hacer más análisis con electrodos polimerizados con una mayor cantidad de nanopartículas dispersas; ya que las bandas de oxidación y reducción pueden estar ocultas debido a la histéresis y por el rango de corriente tan alto que se alcanza al medir en potenciales más altos de 1 V.



**Figura 13.** Ciclovoltagrama obtenido en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 N) para el electrodo de oro limpio.

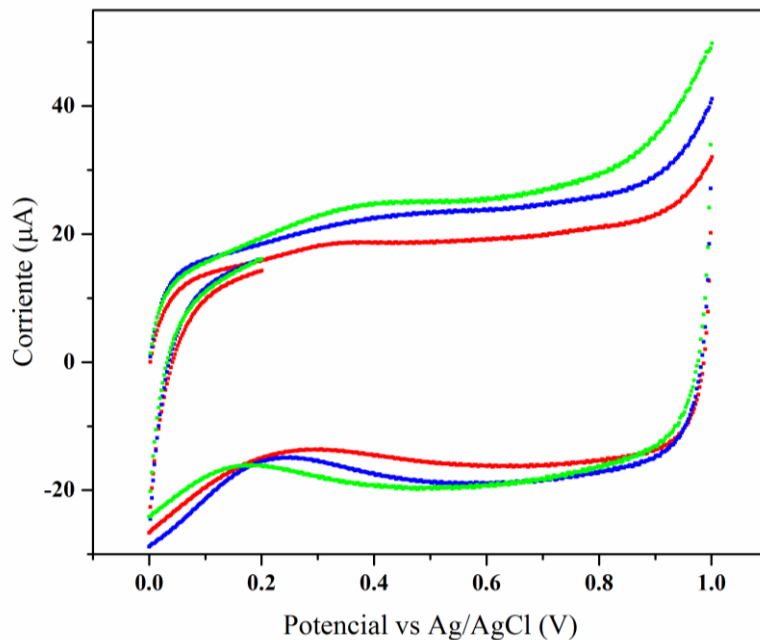


**Figura 14.** Ciclovoltagrama correspondiente a la medición del electrodo modificado con PEDOT-NPAu en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 N)

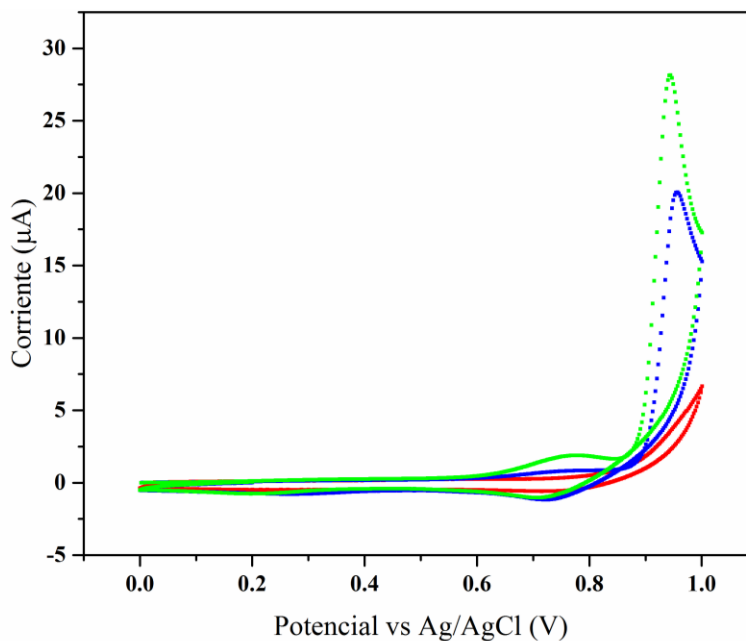
#### 4.3.2. *Actividad Enzimática e Inhibición AChE-Clorpirifós*

El ensayo de voltametría cíclica en presencia de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y el sustrato acetiltiocolina clorhidro (ATCh) se realiza con la intención de estudiar la posible aplicación de los electrodos modificados con PEDOT-NPAu en la fabricación de biosensores del tipo enzimático. La Figura 15 muestra ciclovoltagramas para la reacción enzimática medidos en diferentes tiempos de reacción con el electrodo modificado con PEDOT-NPAu, en esta figura se puede observar comportamiento que fue mencionado en la sección 2.3 de este documento, en donde la corriente cercana a los 0.7 V se incrementa conforme aumenta el tiempo de medición, lo cual se relaciona directamente con el aumento en la concentración de tiocolina (TCh) en el medio donde la reacción se lleva a cabo. Además, gracias a la sensibilidad del electrodo modificado se pueden obtener rangos de corriente mayores que los que se obtienen al medir con electrodos de oro limpio, en la Figura 15 se puede notar que el rango de corriente de medición varía entre los 10 y 50  $\mu\text{A}$ , mientras que para las mediciones en oro, mostradas en la Figura 16, las corrientes oscilan entre 0 y 2  $\mu\text{A}$  con la excepción de la señal que se muestra entre 0.9 y 1 V que se relaciona con la oxidación de los grupos tioles (SH) en el sistema [32, 33], este es la única parte del ciclovoltagrama que supera los 2  $\mu\text{A}$ , y como se puede apreciar su corriente asociada también aumenta en el tiempo de reacción, resultado esperado dado que se está incrementando la cantidad de tioles en el sistema producto de la reacción entre AChE y ATCh.





**Figura 15.** Ciclovoltogramas correspondientes a la reacción AChE-ATCh con electrodo modificado con PEDOT-NPAu a (■) 0 minutos de reacción, (■) 5 minutos y (■) 10 minutos.



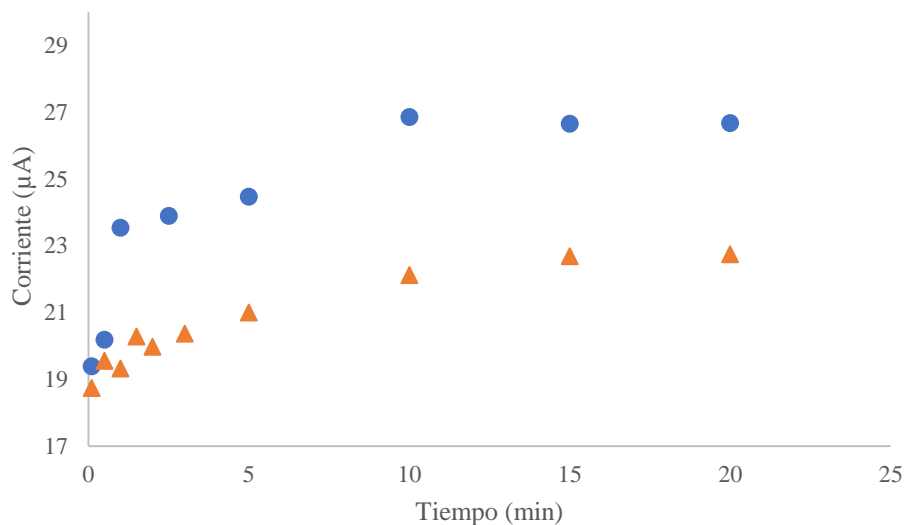
**Figura 16.** Ciclovoltogramas correspondientes a la reacción AChE-ATCh con electrodo de oro limpio a (■) 0 minutos de reacción, (■) 5 minutos y (■) 10 minutos.

El incremento mostrado en el rango de corrientes medidas se relaciona directamente con la sensibilidad que le brinda al electrodo adicionar nanopartículas de oro en una matriz polimérica conductora, debido a su alta conductividad, excelente capacidad de transferencia de carga y a la selectividad que presentan a la hora de trabajar con señales biológicas [17, 34]. A esto se puede sumar que tanto el PEDOT como las NPAu causan un incremento en la superficie electroquímicamente activa importante con respecto al electrodo de oro limpio, esta característica es provocada por la porosidad y rugosidad de la superficie del PEDOT, llevando a sistemas con una impedancia electrodo-electrolito menor que la que presenta el electrodo de oro [35], resultado que ya fue detallado en la sección 4.2 de este documento.

La Figura 17 muestra las curvas de la actividad enzimática de la AChE con el sustrato ATCh, esto en ausencia del pesticida Clorpirifós y una segunda curva con una concentración de 14.9  $\mu\text{M}$  de pesticida. El comportamiento observado indica un incremento importante en la corriente asociada a la producción de TCh al principio de la reacción; sin embargo, una vez alcanzados los 10 minutos de reacción se alcanza una corriente máxima y se estabiliza la curva.

El electrodo modificado muestra la sensibilidad necesaria para medir la reducción en la corriente que se produce como efecto de añadir un inhibidor enzimático a la reacción, la cual oscila entre valores cercanos a los 10  $\mu\text{A}$  entre la curva sin inhibidor y la curva que tiene una concentración de 14.9  $\mu\text{M}$  de Inhibidor. Esto justifica otros trabajos relacionados con la detección de pesticidas por medio de biosensores enzimáticos modificados con polímeros conductores [33], pero con la salvedad de que en este trabajo se está sumando la alta sensibilidad y demás características ya mencionadas de las nanopartículas de oro.

El empleo de biosensores, que utilizan sistemas como el de PEDOT-NPAu, para la detección de pesticidas como los clorpirifós cobra gran importancia tanto por la versatilidad y facilidad del método como por el interés social que hay detrás del monitoreo de sustancias peligrosas, este pesticida es el más utilizado mundialmente en el apartado de pesticidas organofosforados, y Costa Rica es precisamente uno de los mayores importadores de estos productos a nivel mundial [36-38], este tipo de circunstancias son algunas de las que provocan el gran interés en el desarrollo de tecnologías como los biosensores.



**Figura 17.** Actividad enzimática medida como corriente a 0.7 V en electrodos modificados PEDOT-NPAu. (●) Sin Inhibidor, (▲) 14.9 µM de Inhibidor.

#### 4.4. Microscopía Electrónica de Transmisión

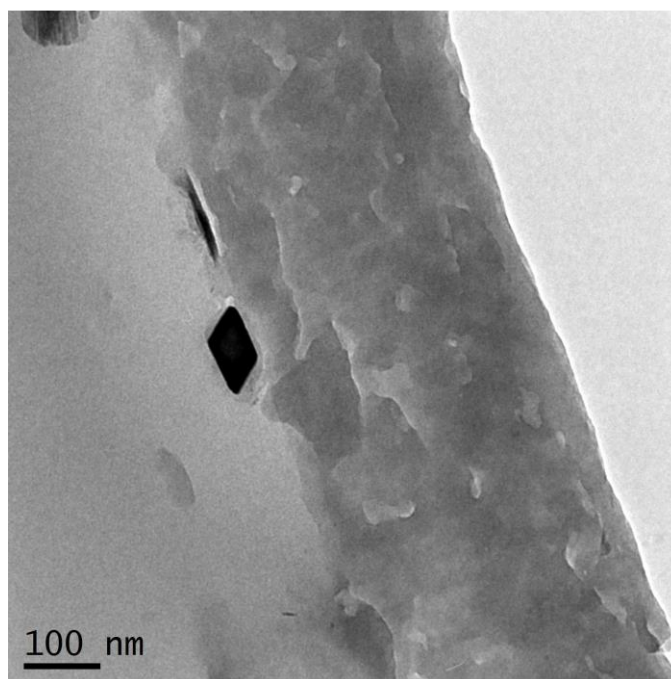
La caracterización microscópica del sistema PEDOT-NPAu brindó los resultados que se observan en las Figuras 18, 19. En donde se pueden apreciar diferentes situaciones que se presentaron. En la Figura 18 se observa una nanopartícula de oro aparentemente colocada sobre la superficie de la matriz de PEDOT, la misma posee la forma de rombo y dimensiones que se esperaban por el método de síntesis utilizado [28], obteniendo lados entre los 50 y 100 nm de longitud; sin embargo, un detalle importante es que no se observa la película de oro, la cual se muestra perfectamente en la Figura 19.

Factores en la preparación de los cortes ultrafinos pueden haber provocado que la lámina de oro no se observe en la Figura 18, ya que esta lámina es de aproximadamente 75 nm y la película de PEDOT electrodepositada, como se puede observar en las figuras mencionadas, posee un espesor mayor a 200 nm, de esta forma, pudo haberse dado la situación en la que el corte únicamente incluyera la matriz de PEDOT con las nanopartículas ya sea inmersas o adsorbidas en su superficie.

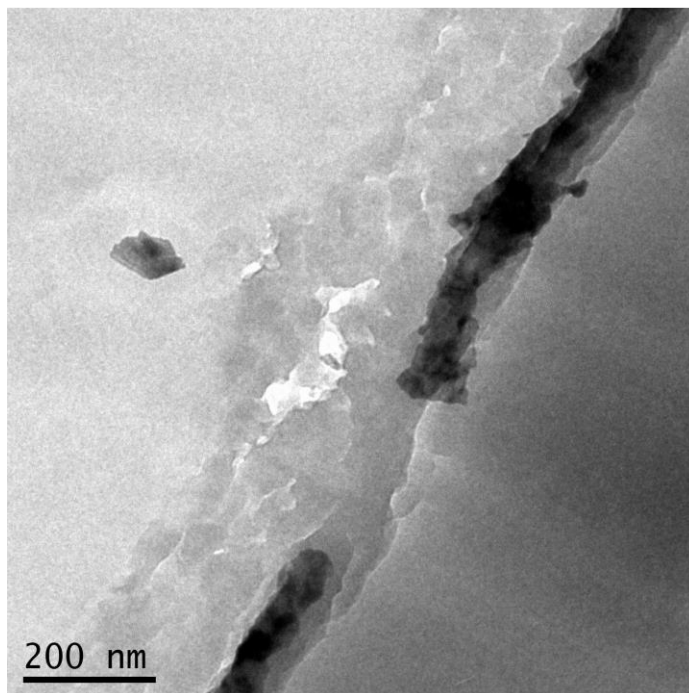
Otra situación que se pudo haber presentado y que provocaría que la lámina de oro no se observe en la Figura 18 es que durante la preparación de los cortes se producen vibraciones,

estas pueden provocar que el corte se “quiebre” en un punto. En este caso el corte pudo haberse quebrado, dejando la lámina de oro fuera de la sección transversal cortada. Para evitar este tipo de discontinuidades en el corte ultrafino se recomienda trabajar con resinas de menor dureza, recordando que la utilizada en este trabajo tiene una dureza media de acuerdo con lo especificado en la ficha técnica del producto [39]

La Figura 19 es un caso en el que se muestra que el corte provocó un desgarre en la lámina de oro, llevando una parte de la lámina a colocarse directamente sobre la resina de trabajo y provocando la ilusión de que esta fuese una nanopartícula; sin embargo, por la forma y por el contraste que provoca al paso del haz de electrones se puede concluir que no es una nanopartícula metálica. La NPAu encontrada en la Figura 18 posee un contraste totalmente oscuro y constante en toda su superficie, mientras que el objeto mostrado en la Figura 16 posee zonas más oscuras que otras, lo cual indica que es parte de la lámina de oro que no tiene un espesor constante en toda su extensión.



**Figura 18.** Nanopartícula de oro ubicada en la superficie de la matriz polimérica.



**Figura 19.** La zona más oscura muestra la lámina de aproximadamente 75 nm de espesor, mientras que la zona translúcida corresponde a la matriz de PEDOT electrodepositada.

A pesar de no observarse las nanopartículas, la Figura 18 muestra muy claramente la disposición en la que se fabrica el electrodo, el cual consta de una capa de oro, depositada por medio de deposición física de vapor (PVD) con unos 75 nm de espesor sobre una lámina polimérica de Poliimida, seguida de una capa de PEDOT electrodepositada con un espesor mayor a 200 nm en la que se deberían encontrar las nanopartículas, ya sea sobre esta, o inmersas en dicha matriz.

Tal como se indica en la sección 3.2 correspondiente a la electropolimerización de PEDOT con NPAu dispersas en la solución, se utilizó 1 ml de la dispersión, esto se llevó posteriormente a 20 ml por medio de KCl (0.2 M), de ahí que la concentración de NPAu en el sistema es baja, esto puede haber provocado que existan cortes en los que no se observan las NPAu; sin embargo las NPAu encontradas coinciden perfectamente con lo que la síntesis indica, aunque hacen falta más análisis para concluir si su disposición general es ubicarse en la superficie del PEDOT o inmersos en el mismo.

## **5. Conclusiones**

La electropolimerización sobre el electrodo de oro de la dispersión EDOT-NPAu se realizó correctamente utilizando una corriente de 5.65  $\mu\text{A}$  durante 480 segundos sin sobrepasar el potencial límite de 1.4 V; el recubrimiento tiene un aspecto oscuro y tiene un espesor cercano a los 200 nm, de acuerdo con las micrografías obtenidas por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión.

La modificación química con PEDOT-NPAu mostró menor impedancia en todo el espectro de análisis de Espectroscopía Electroquímica de Impedancia (1 Hz-1 MHz), que el electrodo de oro limpio sin modificación.

Los ensayos electroquímicos de voltametría cíclica en presencia de AChE y ATCh permiten observar la aplicación del sistema PEDOT-NPAu a la detección de un producto de reacción enzimática, como lo es la Tiocolina; además, agregando un inhibidor enzimático, como los clorpirifós, el sistema es capaz de detectar el cambio en la corriente asociada a la oxidación del grupo tiol de la TCh, mostrando sensibilidad ante cambios de hasta 5  $\mu\text{A}$  entre las muestras con y sin inhibidor.

Utilizando Microscopía Electrónica de Transmisión se pudo observar la presencia de una de las nanopartículas depositadas mediante la electropolimerización de la dispersión de monómero y nanopartículas de oro, esta se observa en la superficie del PEDOT y posee forma de rombo con lados de dimensiones entre los 50 y 100 nm. Además, se obtuvieron micrografías en donde no se observa la presencia de la lámina de oro sobre la cual se electropolimerizó, esto se puede atribuir a la fractura del corte ultrafino debido a la vibración que se produce durante el proceso de cortes en el ultramicrotomo.

## **6. Recomendaciones**

Para evitar vibraciones en el proceso de corte se recomienda utilizar una formulación de resina de baja dureza, esto modificando los volúmenes utilizados en la Tabla 1 de acuerdo con lo recomendado en la ficha técnica del producto.

## 7. Bibliografía

- [1] F. Scholz, *Electroanalytical Methods*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
- [2] R. Alkire, *Chemically modified electrodes*. Weinheim: Wiley-VCH Verl., 2010.
- [3] R. Durst, A. Baumner, R. Murray, R. Buck and C. Andrieux, "Chemically modified electrodes: Recommended terminology and definitions (IUPAC recommendations 1997)", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 12, no. 12, p. iii, 1997.
- [4] C. Zoski, *Handbook of electrochemistry*. Amsterdam [u.a.]: Elsevier, 2007.
- [5] P. Kissinger and W. Heineman, *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996.
- [6] L. Gorton and L. Gorton, *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*. Burlington: Elsevier Science, 2005.
- [7] A. Bard and L. Faulkner, *Electrochemical methods and applications*. New York: Wiley-Interscience, 2000.
- [8] D. Mantione, I. del Agua, A. Sanchez-Sanchez and D. Mecerreyes, "Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) Derivatives: Innovative Conductive Polymers for Bioelectronics", *Polymers*, vol. 9, no. 8, p. 354, 2017.
- [9] S. Wilks, "Poly (3,4-ethylene dioxythiophene) (PEDOT) as a micro-neural interface material for electrostimulation", *Frontiers in Neuroengineering*, vol. 2, 2009.
- [10] X. Cui and D. Zhou, "Poly (3,4-Ethylenedioxythiophene) for Chronic Neural Stimulation", *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, vol. 15, no. 4, pp. 502-508, 2007.
- [11] J. Yang and D. Martin, "Impedance spectroscopy and nanoindentation of conducting poly(3,4-ethylenedioxythiophene) coatings on microfabricated neural prosthetic devices", *Journal of Materials Research*, vol. 21, no. 05, pp. 1124-1132, 2006.
- [12] R. Starbird Perez, *Study of organic materials to improve the electrical properties of the neural stimulation electrodes*. München: Verl. Dr. Hut, 2013.
- [13] D. Evans and H. Wennerström, *The colloidal domain*. New York: Wiley-VCH, 1999.

- [14] J. Kunjappu and M. Rosen, *Surfactants and interfacial phenomena*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2013.
- [15] E. Schab-Balcerzak, *Electropolymerization*. Rijeka, Croatia: InTech, 2011.
- [16] M. Pumera, *Nanomaterials for Electrochemical Sensing and Biosensing*. Singapore: Pan Stanford Publishing, 2016.
- [17] B. Wang, U. Akiba and J. Anzai, "Recent Progress in Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors for Cancer Biomarkers: A Review", *Molecules*, vol. 22, no. 7, p. 1048, 2017.
- [18] D. Hall, P. Underhill and J. Torkelson, "Spin coating of thin and ultrathin polymer films", *Polymer Engineering & Science*, vol. 38, no. 12, pp. 2039-2045, 1998.
- [19] G. Stevenson, "The Controlled Release of Dexamethasone from Polyterthiophene-Based Conducting Polymers", Doctor of Philosophy, University of Wollongong, 2010.
- [20] M. Vázquez, *Magnetic nano- and microwires*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, 2015.
- [21] P. Zanello, *Inorganic electrochemistry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003.
- [22] B. Fahlman, *Materials chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011.
- [23] Y. Leng, *Materials characterization*. Weinheim: J. Wiley, 2013.
- [24] S. Shuab Khan, M. Aijaz Rizvi and S. Urooj, "Equivalent circuit modelling using electrochemical impedance spectroscopy for different materials of SOFC", International Conference on Computing for Sustainable Global Development, 2016.
- [25] A. Sassolas, B. Prieto-Simón and J. Marty, "Biosensors for Pesticide Detection: New Trends", *American Journal of Analytical Chemistry*, vol. 03, no. 03, pp. 210-232, 2012.
- [26] N. Chauhan and C. Pundir, "An amperometric biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes modified gold electrode for measurement of organophosphorus insecticides", *Analytica Chimica Acta*, vol. 701, no. 1, pp. 66-74, 2011.



- [27] T. Liu, H. Su, X. Qu, P. Ju, L. Cui and S. Ai, "Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide-gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides", *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 160, no. 1, pp. 1255-1261, 2011.
- [28] J. Soto, "Síntesis de Nanopartículas Anisotrópicas de Oro Utilizando Vesículas Liposomales Modificadas con Quitosano con Potencial Aplicación Biomédica". Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, 2015.
- [29] L. Scarabelli, M. Coronado-Puchau, J. Giner-Casares, J. Langer and L. Liz-Marzán, "Monodisperse Gold Nanotriangles: Size Control, Large-Scale Self-Assembly, and Performance in Surface-Enhanced Raman Scattering", 2017.
- [30] "Inicio. Atlas de Histología Vegetal y Animal", Mmegias.webs.uvigo.es, 2017. [Online]. Available: <https://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>. [Accessed: 15- Oct- 2017].
- [31] A. Bonanni, M. Pumera and Y. Miyahara, "Influence of gold nanoparticle size (2–50 nm) upon its electrochemical behavior: an electrochemical impedance spectroscopic and voltammetric study", *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, no. 11, p. 4980, 2011.
- [32] J. Koryta and J. Pradáč, "Electrode Processes of the Sulfhydryl-Disulfide System. II Cystine at a Gold Electrode", *Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, vol. 17, p. 177-183, 1968.
- [33] T. Sikora, G. Istamboulie, E. Jubete, E. Ochoteco, J. Marty and T. Noguer, "Highly Sensitive Detection of Organophosphate Insecticides Using Biosensors Based on Genetically Engineered Acetylcholinesterase and Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)", *Journal of Sensors*, vol. 2011, pp. 1-7, 2011.
- [34] E. Hutter and D. Maysinger, "Gold-nanoparticle-based biosensors for detection of enzyme activity", *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 34, no. 9, pp. 497-507, 2013.
- [35] M. Meza-Cuevas, *Stimulation of Neurons by Electrical Means*. Hamburg: Verlag Berlin, 2015.

- [36] M. Arias-Andrés, R. Rämö, F. Mena Torres, R. Ugalde, L. Grandas, C. Ruepert, L. Castillo, P. Van den Brink and J. Gunnarsson, "Lower tier toxicity risk assessment of agriculture pesticides detected on the Río Madre de Dios watershed, Costa Rica", *Environmental Science and Pollution Research*, 2016.
- [37] J. S. Van Dyk and B. Pletschke, "Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment," *Chemosphere*, vol. 82, no. 3, pp. 291–307, 2011.
- [38] X. Wu, Y. Yu, M. Li, Y. Long, H. Fang and S. Li, "Prediction of Bioavailability of Chlorpyrifos Residues in Soil to Earthworms", *Journal of soil science and plant nutrition*, vol. 11, no. 1, pp. 44-57, 2011.
- [39] Ted Pella. INC, "Low Viscosity Kit, product number: 18300-4221". 2008.