



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO
EN ELECTROQUIMICA, S.C.



**“DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
ELECTRODOS DE GRAFITO MODIFICADOS CON
MATERIALES COMPOSITOS PARA LA DETECCIÓN
DE DOPAMINA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO”**

TESIS PRESENTADA POR:

**I.Q. GEORGINA MARÍA ELENA ARMENDÁRIZ
VIDALES**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN ELECTROQUÍMICA

ABRIL, 2012.

Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica

REALIZADO POR:

I.Q. Georgina María Elena Armendáriz Vidales

DIRIGIDA POR:

Dra. Erika Bustos Bustos

SINODALES

Presidente

Dr. Luis Arturo Godínez Mora – Tovar.

Firma

Secretario

Dr. Juan Manríquez Rocha.

Firma

Vocal

Dra. Erika Bustos Bustos.

Firma

Vocal

Dr. José Luis Hernández López.

Firma

.

RESUMEN

La dopamina es una catecolamina que juega un papel muy importante en distintos procesos biológicos, farmacológicos y físicos, por lo que la biosíntesis ineficiente de la misma en el cuerpo humano, puede causar distintos trastornos neurodegenerativos, entre los que destaca la enfermedad de Parkinson.

Por tal motivo, es importante contar con técnicas de diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, como la determinación electroquímica, mediante la cual se puede detectar y cuantificar *in vivo* la concentración de estos neurotransmisores.

Es así como en este proyecto de tesis se diseñó, construyó y caracterizó un electrodo de puntilla de grafito modificado con dendrímeros PAMAM G4.0 - 64OH (**G – PAMAM**) y nanopartículas de Pt encapsuladas en éstos (**G – DENs – Pt**). Cada composito fue inmovilizado electroquímicamente en el electrodo de grafito y caracterizado por distintas técnicas electroquímicas y espectroscópicas. Posteriormente estos electrodos modificados fueron empleados en la construcción de curvas de calibración amperométricas a partir de la corriente faradaica de oxidación de dopamina en líquido cefalorraquídeo sintético, resultando con mayor sensibilidad y menores límites de detección y cuantificación el **G – PAMAM**. Una vez que se redujeron las dimensiones del sistema, el detector fue acoplado a un dispositivo electrónico para efectuar determinaciones electroquímicas de DA, con lo cual se suprimió la utilización de un potencióstato.

Por lo tanto, este detector portátil y miniaturizado presenta una técnica alternativa para la determinación y cuantificación de dopamina en seres vivos, con el objetivo de construir sensores electroquímicos que faciliten el trabajo rutinario de extracción y preparación de muestras en seres humanos.

ABSTRACT

Dopamine is a catecholamine that plays an important role in several biological, pharmacological and physical processes. Hence, an inefficient biosynthesis of this neurotransmitter by the human body may cause different neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease.

For this reason, it is important to have accurate diagnostic techniques of neurodegenerative diseases, like electrochemical detection, by measuring the neurotransmitters, such as Dopamine, *in vivo*.

In this project, graphite leads modified with PAMAM Dendrimers G4.0 – 64OH (**G – PAMAM**) and encapsulated Pt Nanoparticles within (**G – DENs – Pt**) were designed, constructed and characterized. Each composite was electrochemically immobilized on the previously pretreated graphite, characterized by several electrochemical and spectroscopic techniques and used for the construction of amperometric calibration plots that measured the current density of the oxidation reaction of Dopamine in Cerebrospinal Fluid. The results showed that the electrode with the best sensibility and lower detection and quantification limits was **G – PAMAM**. Therefore, this electrode was selected for further measurements of Dopamine *in vivo*.

Consequently, this miniaturized and portable sensor represents an accessible technique for the determination and quantification of Dopamine in living species, leading to a further construction of electrochemical sensors that will enable easier procedures of extraction and preparation of samples in human beings.



Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), bajo la dirección de la Dra. Erika Bustos Bustos.

Agradecimientos

Primero quiero darle gracias a Dios por haberme permitido culminar mis estudios de Maestría.

Gracias a CONACYT por proveer los recursos financieros necesarios para el desarrollo de este trabajo.

De mi segunda casa, CIDETEQ, agradezco a quienes participaron en el desarrollo de este trabajo de investigación, Dra. Erika Bustos y Dr. Juan Manríquez.

Gracias a la generación 2010 '¡Torundas!' (Ana, Ara, Chuz, Flavio, Gaby, Locks, Mayra y Pablo), a mis amigos y a mis numerosos 'hermanos' del laboratorio. Especialmente quiero mencionar a mis ponderadísimas 'Panchas' (Ale, Glo, Gladis y Sarahí) porque contribuyeron a mi sin-quehacer científico y por supuesto, a mis queridísimas 'Pipetas' (Diana, Almita y comadre Irmis) pues este trabajo no hubiera sido el mismo sin ustedes. Estoy muy agradecida con los doctores Carlos Frontana y Luis Ortíz, pues sus enseñanzas, consejos y amenos comentarios hicieron que estos dos años fueran muy enriquecedores.

Gracias a mi familia por apoyarme incondicionalmente, en especial a mi mamá y mi papá porque aún a distancia están siempre conmigo.

Y a ti, Raúl Flores, gracias por todo tu amor y apoyo.

Índice general

Índice de figuras.....	VI
Índice de tablas	XIV
Índice de siglas.....	XVI
1. Introducción	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 Dopamina (DA).	3
2.1.1 Métodos analíticos de detección y cuantificación de dopamina en ratas.	6
2.1.2 Sensores electroquímicos de DA.....	9
2.1.3 Electroquímica de la dopamina.....	9
2.1.4 Interferentes en la detección electroquímica de DA.....	10
2.2 Electroodos de Carbón.....	12
2.2.1 Grafito.....	14
2.3 Electroodos modificados.	23
2.3.1 Electroodos modificados con dendrímeros.	23
2.3.2 Electroodos modificados con nanopartículas de platino encapsuladas en dendrímeros PAMAM.	27
3. Antecedentes.....	30
4. Justificación	36

5. Hipótesis general.	38
6. Objetivos	38
6.1. Objetivo general	38
6.2. Objetivos particulares	38
7. Metodología general.	39
8. Desarrollo experimental.	41
8.1. Electrodo de Grafito.	41
8.1.1. Selección del sustrato.....	41
8.1.2. Prefuncionalización del electrodo de grafito.....	42
8.1.3. Caracterización del electrodo.....	42
8.2. Modificación del electrodo de grafito con dendrímeros PAMAM G4.0 64OH.	
44	
8.2.1. Procedimiento de depósito de dendrímeros PAMAM G4-64OH.	44
8.2.2. Caracterización electroquímica del electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM.	44
8.2.3. Simplificación a un sistema de 2 electrodos.	45
8.3. Modificación del electrodo de grafito con el compuesto DENs-Pt	46
8.3.1. Síntesis del compuesto DENs-Pt.	46
8.3.2. Depósito de DENs-Pt sobre electrodos de grafito.....	48
8.3.3. Cuantificación de DA en LCS empleando los electrodos G- DENs - Pt.	48
8.4. Acoplamiento del sistema electroquímico al dispositivo electrónico.	48
8.4.1. Construcción de las curvas de calibración de DA en LCS con el dispositivo electrónico.	48
8.4.2. Pruebas de determinación electroquímica de DA en Murino in vivo.	49
8.5. Análisis de la selectividad del electrodo.	50
8.5.1. Pruebas preliminares de selectividad en líquido cefalorraquídeo real.	50
8.5.2. Análisis de la selectividad de los electrodos en disoluciones sintéticas.....	50

9. Discusión de resultados.....	51
9.1. Electrodo de grafito.....	51
9.1.1. Caracterización y selección del sustrato de grafito.	51
9.1.2. Prefuncionalización del electrodo de grafito.....	54
9.2. Electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM G4.0 - 64OH....	59
9.2.2. Caracterización electroquímica del electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM.	63
9.2.3. Respuesta voltamperométrica de una molécula sonda.	64
9.2.4. Caracterización electroquímica del electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM en presencia de Dopamina y líquido cefalorraquídeo sintético. 67	
9.2.5. Determinación electroquímica de dopamina empleando el electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM en líquido cefalorraquídeo.	72
9.3. Modificación del electrodo de grafito con el compuesto DENs-Pt	76
9.3.1. Síntesis del compuesto DENs-Pt.	76
9.3.2. Caracterización de las DENs-Pt.....	77
9.3.3. Depósito de las DENs-Pt sobre el electrodo de grafito y cuantificación de DA en LCS.....	83
9.4. Acoplamiento del sistema electroquímico al dispositivo electrónico.	86
9.4.1. Construcción de las curvas de calibración de DA en LCS con el dispositivo electrónico.	86
9.5. Análisis de la selectividad del electrodo.....	87
9.5.1. Pruebas preliminares de selectividad en líquido cefalorraquídeo real.	87
9.5.2. Análisis de la selectividad de los electrodos en disoluciones sintéticas.....	93
10. Conclusiones generales.	99
11. Anexos	101
Anexo I. Reactivos e instrumentación.....	101
Anexo II. Espectroscopia de impedancia electroquímica.....	104

Anexo III. Dispositivo electrónico.....	109
Anexo IV. Espectroscopia de fotoelectrones emitida por Rayos-X.....	112
Anexo V. Cálculo de los límites de detección y cuantificación.....	114
Anexo VI. Parámetros de intensidad de corriente empleados en la construcción de curvas de calibración.	115
12. Referencias bibliográficas.....	122

Índice de Figuras

Figura 1 Representación esquemática de la sección de la parte media del cerebro donde es visible una porción de la sustancia negra (a) , así como la estructura química de la molécula de DA (b)	3
Figura 2 Biosíntesis de dopamina.	4
Figura 3 (a) Representación de una neurona dopaminérgica y sus constituyentes, así como (b) la representación a detalle de cómo dos neuronas vecinas se conectan a través de las terminales neuronales, lugar en donde se sintetiza y libera la dopamina ..	5
Figura 4 Representación de los niveles de dopamina de dos neuronas: (a) una normal y (b) en una neurona de un enfermo de Parkinson	6
Figura 5 Procedimiento de extracción de la muestra por microdiálisis (a) usando una cánula guía (b) . Posteriormente, la muestra se separa (c) y se cuantifica por cromatografía de líquidos de alta resolución (d)	7
Figura 6 Aparato de estereotaxia empleado en la implantación de una sonda cerebral	7
Figura 7 Mecanismo de reacción E-Q de dopamina en medio acuoso.	10
Figura 8 Estructura química desarrollada del ácido ascórbico (AA)	11
Figura 9 Comparación entre la estructura cristalina del diamante (sp^3) y grafito (sp^2), así como la representación de sus orbitales y orbitales correspondientes.....	13
Figura 10 Estructura cristalina del grafito. La celda unitaria es hexagonal, conteniendo cuatro átomos de carbono por celda	14
Figura 11 Representación esquemática de la estructura del grafito. L_a y L_c denota las longitudes a lo larga del plano (eje a) y fuera del plano (eje c).	15
Figura 12 Modos vibracionales del grafito	18

Figura 13 Rangos aproximados de La y Lc para varios materiales carbonosos de hibridación sp^2 . Donde: a-c es carbono amorfo y HOPG es el grafito pirolítico altamente ordenado.....	20
Figura 14 Comparación entre los espectros RAMAN de (a) grafito pirolítico, (b) grafito comercial y (c) carbón activado, obtenidos con un láser de Argón de 488 nm, así como la curva de calibración construida a partir de las intensidades Raman I_D/I_G vs datos obtenidos por DRX (d)	21
Figura 15 (a) Imagen representativa de los grupos funcionales contenidos en materiales carbonosos y (b) espectros XPS comparativos de su material antes y después de la funcionalización con ácido nítrico.	22
Figura 16 (a) Representación de un la estructura desarrollada tipo Pauling de un dendrímero PAMAM Generación 5, así como (b) las partes que conforman a un dendrímero.....	24
Figura 17 Representación de las rutas divergente y convergente para la síntesis de un dendrímero.....	25
Figura 18 Dendrímero PAMAM generación 2.0.....	26
Figura 19 Gráfico representativo de los centros metálicos en moléculas dendríticas, ocupando posiciones como (a) ramas, (b) bloques, (c) grupos terminales y (d) cavidades hidrofóbicas.....	27
Figura 20 Representación esquemática de un dendrímero PAMAM G4.0 con grupos terminales OH (a) empleado para la síntesis de nanopartículas de Pt dentro del templete formado por las terminaciones hidroxiladas (b) , y posterior depósito a una superficie electródica (c)	29
Figura 21 Diagrama del sistema de microdiálisis acoplado al dispositivo electroquímico para la detección de DA.	33
Figura 22 (A) Vista de un microelectrodo de carbón. (B) Estructura microscópica de la punta. La fibra de carbón proviene del soporte de cristal aislante y termina en una punta cónica afilada. La longitud de ésta es de 25 μm	33

Figura 23 (a) Convertidor de corriente a voltaje empleado, así como (b) el dibujo esquemático del sistema adjunto al cráneo del ratón y los componentes móviles del sistema.....	34
Figura 24 Imagen fotográfica de las distintas marcas comerciales de puntillas de grafito evaluadas técnicamente para la detección electroquímica de DA en LCS.	41
Figura 25 Representación de los grupos funcionales presentes sobre la puntilla de grafito, antes y después del anodizado para la prefuncionalización de los soportes de electrodo.	42
Figura 26 Representación del procedimiento de depósito de dendrímeros PAMAM G4.0 – 64OH sobre un electrodo de grafito.....	44
Figura 27 Representación esquemática de la simplificación a un sistema de 2 electrodos, compuesto por un electrodo de grafito y un alambre de Ag recubierto por AgCl.	45
Figura 28 Representación esquemática de la metodología utilizada para la síntesis de DENs-Pt: (a) Formación de complejos ión Pt-dendrímero, (b) reducción química de iones Pt^{2+} a Pt^0 y (c) diálisis para purificar las DENs formadas	47
Figura 29 Representación esquemática del cerebro de una rata (a) , así como el corte transversal del mismo (b) , resaltando la ubicación del estriado y la distribución de los electrodos.....	49
Figura 30 Voltamperograma cíclico de un electrodo de grafito en H_2SO_4 0.5M, con una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1}	55
Figura 31 Cronoamperograma resultante del pretratamiento al electrodo de grafito, mediante la aplicación de 600 mV.....	56
Figura 32 Espectros XPS del electrodo de Grafito, G.	56
Figura 33 Espectros XPS de un electrodo G (a) y G-PF (b) , así como la deconvolución de sus respectivas señales.	58

Figura 34 Espectro Raman en 3D obtenido a partir del mapeo de la superficie, así como los gráficos de superficie de los electrodos G (a) , GPF (b) y GPAMAM (c)	60
Figura 35 (a) Espectros Raman de los electrodos G, GPF y GPAMAM, así como (b) un gráfico de las intensidades I_D/I_G determinadas a partir de dichos espectros.....	61
Figura 36 Gráficos de Nyquist de los experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica, usando: G, G-PF y G-PAMAM. Espectros obtenidos aplicando el potencial de equilibrio de $K_3Fe(CN)_6 K_4Fe(CN)_6$ 1 mM en KCl 0.1 M con frecuencias de 0.1 Hz a 100 kHz con 10 mV de amplitud.	63
Figura 37 (a) Comparación entre los VC (100 mVs^{-1}) en presencia de $[Ru(NH_3)_6Cl_2]$ 1mM empleando los 3 electrodos. (b) VC rrealizados a distintas velocidades de barrido con el electrodo G.	65
Figura 38 Gráficas de i_c vs $v^{1/2}$ empleando los electrodos G, G-PF y G-PAMAM, a partir de los VC en presencia de la molécula sonda.	66
Figura 39 Mecanismo de depósito de dendrimeros PAMAM G4 – 64OH sobre una superficie de grafito prefuncionalizada, en donde los grupos anhídrido ftálico superficiales se enlazan covalentemente a las terminaciones hidroxiladas del dendrímero.....	67
Figura 40 Voltamperogramas cíclicos de electrodos prefuncionalizados y modificados con dendrímeros, aplicando distintos potenciales.....	68
Figura 41 Gráfico de la carga del pico de oxidación de DA ($10 \mu\text{M}$) utilizando electrodos modificados con dendrímeros PAMAM a distintos tiempos de depósito	69
Figura 42 Voltamperogramas cíclicos empleando electrodos G, G – PF y G – PAMAM en DA $10 \mu\text{M}$ y LCS, 20 mVs^{-1}	70
Figura 43 (a) Cronoamperogramas obtenidos aplicando potenciales constantes (50 a 400mV) durante 30 segundos, en una disolución $10 \mu\text{M}$ DA en LCS, así como (b) la gráfica del potencial aplicado vs.la corriente muestreada a 25 segundos, determinada a partir de los cronoamperogramas de (a).	71

Figura 44 Voltamperogramas cíclicos ($v = 20\text{mVs}^{-1}$) efectuados en LCS con concentraciones de 0 a $20\ \mu\text{M}$ de DA con un electrodo G, empleando sistemas (a) de 3 electrodos y (b) 2 electrodos.....	72
Figura 45 Curvas de calibración de DA en LCS empleando sistemas de 2 y 3 electrodos (2e y 3e, respectivamente), obtenidas mediante VC.	73
Figura 46 CA obtenidos después de la adición sucesiva de una disolución stock de DA, en donde se destaca que a 30 segundos se alcanza la corriente límite de difusión de DA.	74
Figura 47 Representación de la atracción entre los grupos superficiales hidrofílicos del dendrímero PAMAM en superficie y moléculas de DA.....	75
Figura 48 Curvas de calibración por CA construidas con G, G – PF y G – PAMAM, empleando un sistema de 2 electrodos.....	76
Figura 49 Imagen fotográfica de las disoluciones de DENs-Pt sintetizadas por microondas a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a) , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b) , $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (c) y $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (d) , así como sintetizadas por reducción química (e)	77
Figura 50 Espectros UV-Visible de disoluciones de Pt^{2+} , complejo dendrímero-platino y DENs-Pt sintetizadas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$	78
Figura 51 Espectros UV-Vis de las disoluciones concentradas de DENs-Pt sintetizadas a distintas temperaturas.....	79
Figura 52 Curvas de concentración vs. absorbancia de cada una de las disoluciones de DENs-Pt sintetizadas y de la disolución de Pt^{2+} precursora.....	80
Figura 53 Micrografías TEM (A-E) de las disoluciones de DENs-Pt sintetizadas químicamente (A) , por microondas a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (B) , $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (C) , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D) y $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (E) , así como el patrón de difracción de electrones de las nanopartículas de platino.	82
Figura 54 Esquema representativo de la metodología de la modificación del electrodo de grafito con DENs-Pt: (a) prefuncionalización del electrodo en una disolución H_2SO_4 $0.5\ \text{M}$ mediante la aplicación de un potencial constante de $600\ \text{mV}$ durante 5 minutos.	

(b) Modificación del G con DENs-Pt en una disolución que contenía una concentración NaF 0.1 M por 60 minutos, aplicando un potencial de 600 mV.	83
Figura 55 VC de DA 10 μ M en LCS con un electrodo de carbón vítreo y de grafito modificados con una disolución DENs-Pt. ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$)	85
Figura 56 Curvas de calibración construidas con las mediciones obtenidas con (a) un potencióstato comercial y (b) el dispositivo electrónico construido.	86
Figura 57 Imagen fotográfica de las pruebas realizadas <i>in vivo</i> en donde se destaca la disposición de los electrodos.	87
Figura 58 Voltamperometrías cíclicas de los distintos electrodos en LCH a 20 mVs^{-1} . 88	
Figura 59 Reacción de disociación del AA a iones ascorbato (AA) ⁻	88
Figura 60 Diagrama de distribución de especies del ácido ascórbico.	89
Figura 61 Diagrama de distribución de especies de DA.	90
Figura 62 Voltamperogramas cíclicos empleando G-PAMAM en LCH solamente, así como con adiciones de DA y AA ($v = 20 \text{ mVs}^{-1}$) en un sistema de dos electrodos.	91
Figura 63 Mecanismo de electro-oxidación de DA y AA [91, 92].	92
Figura 64 Representación esquemática parcial del mecanismo de reacción de DA en presencia de AA a pH=7.2, en donde se destaca la reacción electroquímica (a) , así como la reacción química posterior (b) debida a la presencia de iones ascorbato (recuadro rojo) que conlleva a la regeneración de DA y la producción de ácido deshidroascórbico.	93
Figura 65 Voltamperogramas cíclicos de distintas concentraciones de DA y AA en LCS, empleando el electrodo G-PAMAM.	94
Figura 66 Voltamperogramas cíclicos de DA y AA en una disolución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2 empleando el electrodo de G – PAMAM a 20 mV s^{-1}	95

Figura 67 Representación esquemática parcial del mecanismo de reacción de DA en presencia de AA a pH=2, en donde ocurre la reacción de electro-oxidación del AA (a) y DA (b) a dos potenciales distintos.....	96
Figura 68 Voltamperogramas cíclicos de DA y AA en una disolución amortiguadora de fosfatos con pH 2 y 7.2, así como una concentración de DA y AA de 20µM. $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$	96
Figura 69 Voltamperogramas cíclicos de DA y AA en una disolución amortiguadora de fosfatos pH = 2, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$	97
Figura 70 Representación esquemática de las alternativas que se sugieren para mejorar la selectividad del electrodo: (a) diseñar un electrodo con interfase ácida para llevar a cabo los experimentos a pH neutro, o bien, (b) llevar a cabo los experimentos <i>ex - situ</i> modificando el pH de la muestra biológica de pH 7.2 a 2.....	98
Figura 71 (a) Potenciostato Basi- Epsilon y (b) Potenciostato Bas-Zahner.....	102
Figura 72 Reactor por micro-ondas CEM Discover.....	102
Figura 73 Micro-espectrómetro RAMAN empleado en la caracterización de los electrodos.....	103
Figura 74 Representación del circuito de Randles, en donde R_{Ω} es la Resistencia de la disolución, R_{CT} , la resistencia a la transferencia de Carga, Z_W , la impedancia de Warburg y C_d es la capacitancia de la doble capa. I_f e I_c representan la corriente capacitiva y faradaica, respectivamente.....	105
Figura 75 Representación del diagrama de Bode de un electrodo de grafito en solución NaF 0.9N (a) , así como el circuito de Randles modificado (b) asociado a éste: (1) resistencia de la solución, (2) capacitancia de la doble capa, C_1 , (3) resistencia a la transferencia de carga, (4) capacitancia debida a la estructura porosa del grafito, C_2 , así como (c) la representación esquemática de cómo los iones fluoruro pueden alojarse entre las hojas de grafeno que componen la estructura del grafito.....	106
Figura 76 Representación del electrodo cilíndrico de grafito.....	107

Figura 77 Resultados de la determinación del área real del electrodo A por EIS a distintas áreas geométricas, así como la gráfica para la obtención de la rugosidad del electrodo.	108
Figura 78 Diagrama representativo de la celda electroquímica conformada por un sistema de 2 electrodos (a) , acoplada al dispositivo electrónico (b)	109
Figura 79 Dispositivo electrónico construido (a) y un diagrama de los botones de las funciones con las que éste cuenta (b)	111
Figura 80 Pantalla de (a) encendido del dispositivo, (b) aplicación del potencial y cuantificación de la corriente muestreada y (c) de impresión de la concentración de DA.	111
Figura 81 Representación gráfica de la transición entre el nivel energético basal y el promovido, tras hacer incidir fotoelectrones emitidos por Rayos – X.....	112
Figura 82 Representación esquemática de un espectrómetro XPS durante el análisis de una muestra.	113

Índice de Tablas

Tabla 1 Métodos analíticos para la detección de DA en diferentes matrices, así como sus límites de detección correspondientes.....	8
Tabla 2 Distintas formas alotrópicas del carbón, así como la distancia intraplano promedio de un microcristal (L_a) de cada uno de estos materiales.....	19
Tabla 3 Determinación electroquímica (DEQ) de DA <i>in vitro</i>	30
Tabla 4 Determinación electroquímica (DEQ) de DA <i>in vivo</i>	32
Tabla 5 Composición de los electrodos de grafito, de acuerdo a los experimentos de ICP.....	51
Tabla 6 Intensidades de los picos D y G de los electrodos de grafito comparados, y su relación I_D/I_G correspondiente.	52
Tabla 7 Parámetros determinados de las curvas de calibración por cronoamperometría con adiciones sucesivas de estándar de dopamina 10mM con agitación constante.....	53
Tabla 8 Resultados de la deconvolución de los espectros XPS de los electrodos G y GPF.....	59
Tabla 9 Intensidades I_D e I_G y relación de éstas (I_D/I_G) determinadas a partir de los espectros Raman de los electrodos G, GPF y GPAMAM, así como la distancia intraplano, L_a , de la estructura cristalina del grafito.....	62
Tabla 10 Resistencia a la transferencia de carga (R_T), fracción de recubrimiento superficial aparente (θ) y de área activa ($1-\theta$) de los diferentes electrodos modificados, los cuales fueron caracterizados en KCl 0.1 M conteniendo $K_3Fe(CN)_6$ $K_4Fe(CN)_6$ 1 mM en atmósfera de N_2	64
Tabla 11 Carga del pico de Oxidación de DA en LCS de la figura 42, empleando los distintos electrodos,.....	70

Tabla 12 Parámetros determinados a partir de las curvas de calibración amperométricas de DA en LCS, comparando el empleo de sistemas de 2 (2-e) y 3 (3-e) electrodos con G, G – PF y G – PAMAM.	73
Tabla 13 Parámetros obtenidos a partir de las curvas de calibración amperométricas con los distintos electrodos.	76
Tabla 14 Coeficientes de extinción molar de cada una de las disoluciones sintetizadas, así como de la disolución de platino precursora.	80
Tabla 15 Parámetros obtenidos a partir de las curvas de calibración amperométricas construidas con los electrodos modificados con las disoluciones de G-DENs-Pt, así como la comparación de éstos con el electrodo G-PAMAM.	84

Índice de siglas

Ag	Área geométrica.
Ar	Área real.
AA	Ácido ascórbico.
C	Concentración.
CA	Cronoamperometría.
CV	Carbón vítreo.
D	Coefficiente de Difusión.
DA	Dopamina.
DAF	Disolución amortiguadora de fosfatos.
DAQ	Dopaminoquinona.
DE	Difracción de electrones.
DENs-Pt	Nanopartículas de platino encapsuladas en dendrímeros PAMAM.
DEQ	Detección electroquímica.
EIE	Espectroscopia de impedancia electroquímica.
G	Electrodo de grafito.
G – PF	Electrodo de grafito prefuncionalizado.
G – PAMAM	Electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM G4.0 – 64 OH.
G – DENs-Pt	Electrodo de grafito modificado con nanopartículas de platino encapsulados en dendrímeros PAMAM G4.0-64 OH.
ICP - MS	Espectroscopia de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo.
i	Intensidad de corriente.
j	Densidad de corriente.
LDAC	Leucodopaminocromo.
LC	Límite de cuantificación.
LCS	Líquido cefalorraquídeo sintético.
LCH	Líquido cefalorraquídeo humano.
LD	Límite de detección.
TEM	Microscopía de transmisión electrónica.
VC	Voltamperometría cíclica.
XPS	Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X.

1. Introducción.

Existe una gran variedad de compuestos químicos llamados neurotransmisores que son liberados por las neuronas. Entre estos compuestos se tienen a las catecolaminas, serotonina y sus metabolitos, los cuales son fácilmente oxidables y a la concentración en que se encuentran en el líquido extracelular permiten su detección electroquímica. Del grupo de las catecolaminas, destaca la dopamina (DA), la cual es un neurotransmisor que juega un papel fisiológico muy importante como mensajero químico a nivel neuronal.

En este sentido, la enfermedad de Parkinson es producto de un desorden degenerativo crónico y progresivo a nivel cerebral, cuyos síntomas incluyen postura rígida, temblor de reposo, lentitud del movimiento voluntario; en esta enfermedad la principal anomalía bioquímica es la deficiencia de DA en el cuerpo estriado del cerebro.

Para entender la patología y tratamiento de esta enfermedad y otras que se producen como consecuencia de la variación de la concentración de DA en ciertas regiones del cerebro, se requieren nuevos métodos para la detección y cuantificación de este neurotransmisor.

Por lo antes mencionado, el comportamiento electroquímico de la DA reviste mucho interés. La DA se oxida fácilmente en un intervalo de potencial donde el medio electrolítico no se descompone. Sin embargo la determinación electroquímica de la DA es complicada debido a la interferencia de varias sustancias presentes en el medio donde ésta se oxida. El ácido ascórbico (AA) es una de esas sustancias que se encuentran presente en grandes concentraciones y se oxida a potenciales cercanos al propio potencial de oxidación de la DA.

Para incrementar la selectividad en la detección de DA se han desarrollado distintos métodos relacionados con el pretratamiento y modificación de la superficie del electrodo utilizado como detector electroquímico.

Por tal motivo, en este trabajo se presenta la modificación de electrodos de puntillas de grafito con dendrímeros PAMAM G4.0- 64OH y nanopartículas de Platino encapsuladas en éstos, con el fin de incrementar la sensibilidad en la detección de dopamina.

En la primera sección se presenta una revisión bibliográfica acerca del sustrato electródico y su modificación con materiales compósitos. De la misma manera, se presenta una descripción sobre la dopamina, su caracterización electroquímica y los métodos comúnmente empleados en su detección y cuantificación.

Posteriormente, se detallan algunos trabajos que anteceden a este desarrollo experimental, enfatizando en la miniaturización de los electrodos para su posterior acoplamiento a dispositivos electrónicos en experimentos *in vivo* en rata (murino).

Asimismo, en la metodología experimental se describe el diseño, construcción y caracterización de los electrodos de grafito modificados, así como las pruebas de selectividad que se llevaron a cabo para dar un panorama del comportamiento electroquímico de la dopamina en muestras reales. Enseguida, se explica cómo se llevaron a cabo pruebas de detección y cuantificación de DA empleando un dispositivo electrónico construido en CIDETEQ.

Finalmente, en el texto se discuten y analizan los resultados obtenidos tanto por técnicas electroquímicas como espectrofotométricas y espectroscópicas; concluyendo con algunas perspectivas a futuro que complementarían el trabajo descrito en este documento.

2. Marco Teórico.

2.1 Dopamina (DA).

La dopamina es una catecolamina que juega un papel muy importante en distintos procesos biológicos, farmacológicos y físicos (Figura 1b). Este neurotransmisor es producido por las neuronas dopaminérgicas en muchas partes del sistema nervioso, especialmente en la *sustancia negra* (Figura 1a). Las neuronas contienen dos tipos de proyecciones unidas al cuerpo de la célula, dendritas y un axón. Es así como la DA puede liberarse en las terminales de un axón, y es recibida por los dendritas de las neuronas vecinas [1-2].

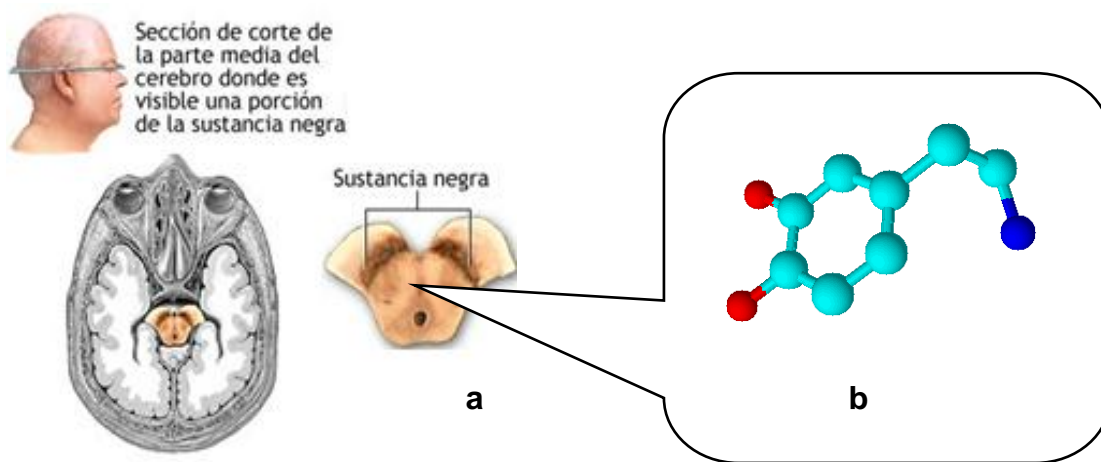


Figura 1 Representación esquemática de la sección de la parte media del cerebro donde es visible una porción de la sustancia negra (a), así como la estructura química de la molécula de DA (b) [2].

La biosíntesis de la dopamina es un proceso relativamente simple (Figura 2). La Tirosina, un aminoácido que comúnmente se encuentra en frutas, se convierte a L-Dopa por la enzima Tirosina Hidroxilasa (Figura 2, reacción a) Posteriormente, la L-Dopa se convierte a DA (Figura 2, reacción b) [4].

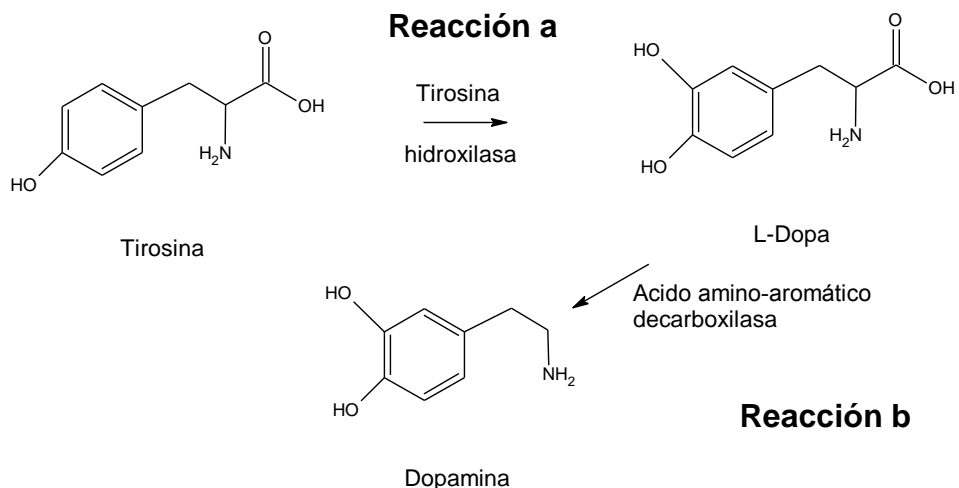


Figura 2 Biosíntesis de dopamina [4].

La distribución de estas neuronas en el sistema nervioso central se halla limitada básicamente a cuatro vías neuronales, siendo la principal, la *nigroestriada*. [1,4]. Es decir, a partir de la sustancia negra se proyectan axones que proporcionan una densa inervación al núcleo caudado y al putamen del cuerpo estriado, siendo en éste último en donde se concentra aproximadamente el 80% de toda la DA que se encuentra en el cerebro [4].

En la figura 3 se representan **(a)** las neuronas dopaminérgicas y las partes que lo constituyen, así como **(b)** las terminales de las neuronas, en donde se biosintetiza de acuerdo al mecanismo de la figura 2, y finalmente se libera a neuronas vecinas [1, 5].

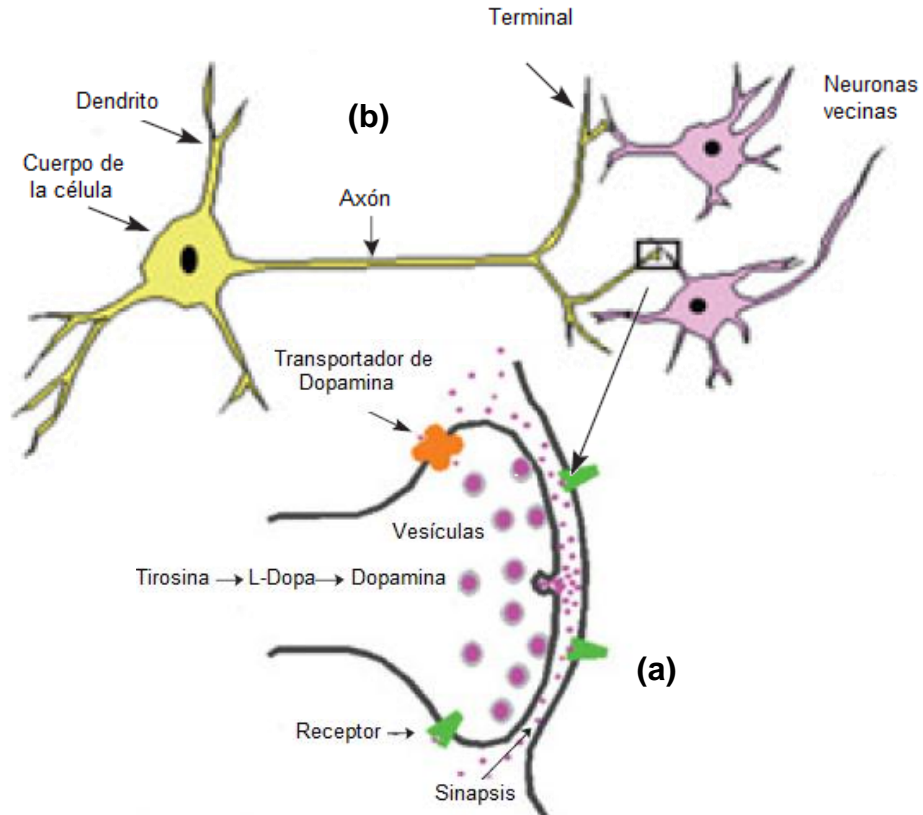


Figura 3 (a) Representación de una neurona dopaminérgica y sus constituyentes, así como **(b)** la representación a detalle de cómo dos neuronas vecinas se conectan a través de las terminales neuronales, lugar en donde se sintetiza y libera la dopamina. Adaptado de la referencia [5].

La concentración basal de dopamina en el cerebro es de $0.1\mu\text{M}$ [121]. Sin embargo, la biosíntesis insuficiente de dopamina en las neuronas dopaminérgicas puede causar distintos trastornos neurodegenerativos, entre los que destaca la enfermedad de Parkinson. Este padecimiento se debe a la pérdida lenta, progresiva e irreversible de dichas neuronas, ocasionando que no sea suministrada suficiente dopamina a los receptores localizados en las neuronas vecinas, provocando, entre otros síntomas, problemas musculares y de movimiento, en la cual una persona pierde la habilidad para ejecutar movimientos finos y controlados. En la figura 4 – **(a)** se esquematiza cómo en una neurona sana, la liberación y recepción de dopamina ocurre de manera normal; a diferencia de **(b)**, en una neurona enferma de Parkinson.

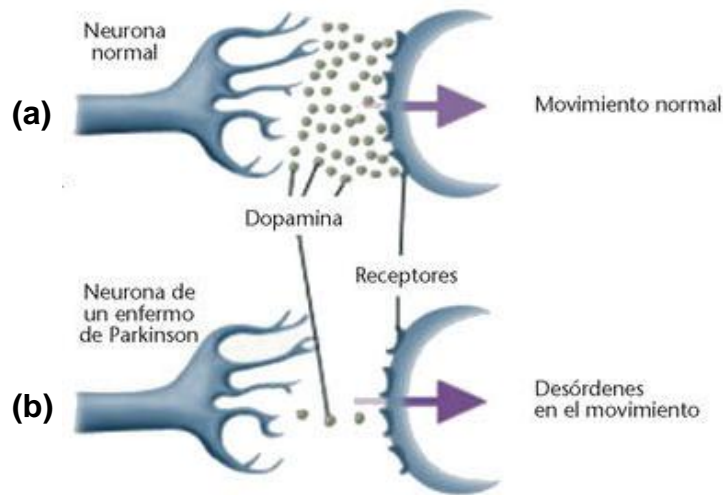


Figura 4 Representación de los niveles de dopamina de dos neuronas: (a) una normal y (b) en una neurona de un enfermo de Parkinson. Adaptado de la referencia [104].

2.1.1 Métodos analíticos de detección y cuantificación de dopamina en ratas.

Para el análisis de la dopamina en tejidos y fluidos biológicos se utilizan una serie de técnicas fluorimétricas [5,8], radioenzimáticas [7], cromatográficas (de gases [8-10] y líquidos [9-10] y de inmunoensayo [8]. Sin embargo, estas metodologías requieren que la muestra sea extraída por microdiálisis con el fin de realizar mediciones extracelulares de DA.

La microdiálisis cerebral (Figura 5) es un método que utiliza un sistema cerrado, en el cual un tubo fino con una membrana de diálisis en uno de sus extremos se inserta en una región determinada del encéfalo, produciéndose una transferencia pasiva de sustancias, las cuales cruzan la membrana de diálisis en virtud de un gradiente de concentración establecido entre un líquido de perfusión y el medio extracelular.

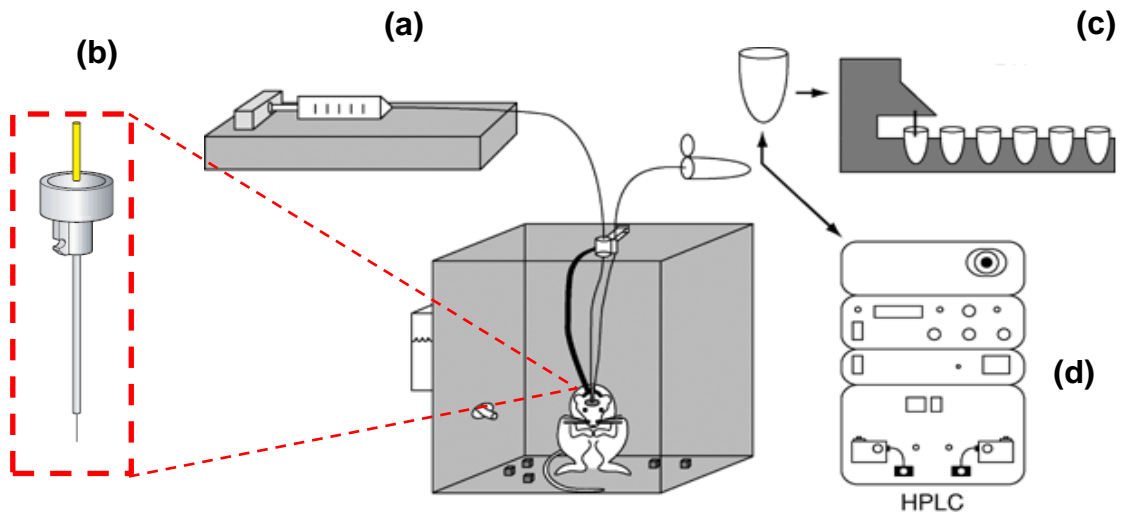


Figura 5 Procedimiento de extracción de la muestra por microdiálisis (a) usando una cánula guía (b). Posteriormente, la muestra se separa (c) y se cuantifica por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC= *High Performance Liquid Chromatography*, (d) Figura adaptada de referencia [11].

Esta técnica permite estimar con exactitud la liberación de neurotransmisores y sus metabolitos, así como estudiar los cambios inducidos en ellos por drogas, los cuales pueden perfundirse a través de la sonda de diálisis o ser administradas por vía sistémica con el animal vivo, consciente y en libre movimiento [5, 6,11].

La implantación de una sonda en un área cerebral se realiza con la ayuda de un aparato de estereotaxia, que es un dispositivo mecánico que inmoviliza totalmente la cabeza de un animal anestesiado, permitiendo alcanzar con gran precisión cualquier punto del cerebro (Figura 6) [11].



Figura 6 Aparato de estereotaxia empleado en la implantación de una sonda cerebral. Imagen tomada de referencia [11].

Después de un período de estabilización desde el momento en que se introduce la sonda de microdiálisis, las muestras se recogen y se analizan empleando algún método analítico. En la tabla 1 se mencionan algunos de éstos métodos para la detección y cuantificación de DA en fluidos y tejidos biológicos, comúnmente reportados en la literatura, así como sus límites de detección.

Tabla 1 Métodos analíticos para la detección de DA en diferentes matrices, así como sus límites de detección correspondientes.

Método	Matriz	Límite de detección	Referencia
Inmunoensayo enzimático	(a) Plasma / (b) Orina	(a) 0.83 ng mL ⁻¹ (b) 28 pg mL ⁻¹	[8]
Radioinmunoensayo	(a) Plasma / (b) Orina	(a, b) 30 pg/mL	[7]
Cromatografía de líquidos – Fluorescencia	Orina	5.2 – 100 fM	[12]
Electroforesis capilar – Detección electroquímica	Estriado de rata	0.1 μM	[13]
Quimioluminiscencia	Tejido cerebral, cultivos celulares	N/D	[14]
Cromatografía de líquidos de alta resolución – Detección electroquímica	(a) Orina, (b) Estriado de rata	(a) 150 nM (b) 2.5 nM	[8]
Microdiálisis – Detección electroquímica <i>in vivo</i> .	Estriado de rata	0.5 nM	[16]
Cromatografía de gases - Espectrometría de masas	Plasma / Orina	5 pM	[9]

2.1.2 Sensores electroquímicos de DA.

Debido a que los análisis clínicos se efectúan en un laboratorio especializado, hoy en día es necesario que la medición de analitos biológicos sea llevada a cabo por el propio paciente fuera de un laboratorio u hospital. En la actualidad, uno de los retos más importantes en esta materia es el desarrollo de técnicas para efectuar estos análisis de forma rápida e *in situ*. Estos métodos deben ser sensibles, precisos y capaces de realizar la determinación en muestras biológicas reales.

Históricamente, la utilización de sensores electroquímicos para determinar la concentración de sustancias y otros parámetros de interés biológico ha representado un área de rápida expansión desde 1962, cuando Clark y Lyons inventaron el primer biosensor electroquímico, conocido como “electrodo enzimático”, usando glucosa oxidasa en un electrodo amperométrico para la cuantificación de oxígeno disuelto.

Desde entonces, los sensores electroquímicos han representado una muy buena alternativa debido a su alta sensibilidad y selectividad, portabilidad, rápida respuesta y bajo costo. Por otra parte, es importante destacar que los sensores electroquímicos pueden miniaturizarse y colocarse específicamente en un organismo para análisis *in vivo*.

Los sensores electroquímicos se basan en mediciones potenciométricas, amperométricas o conductimétricas [17]; cada una de éstas cuenta con un diseño específico de celda electroquímica. Al considerar que la DA es una molécula electroactiva, su oxidación puede cuantificarse empleando técnicas electroquímicas.

2.1.3 Electroquímica de la dopamina.

La electroquímica de una especie redox implica la transferencia de carga de una fase sólida (electrodo) a otra (muestra sólida o líquida). Durante este proceso se pueden llevar a cabo cambios químicos en los electrodos que pueden ser modulados via el potencial interfacial y servir como la base del proceso de detección.

La señal de respuesta en un sensor electroquímico de DA es, de manera más precisa, proporcional a la corriente faradaica de oxidación electroquímica de DA. La oxidación

electroquímica de DA en disolución acuosa ocurre vía un mecanismo EQ (Electroquímico – Químico) [17-20]. La DA se oxida a dopaminoquinona (DAQ) con la transferencia de dos electrones, posteriormente una reacción de adición 1-4 ocurre formando un producto de ciclización llamado leucodopaminocromo (LDAC) (Figura 7).

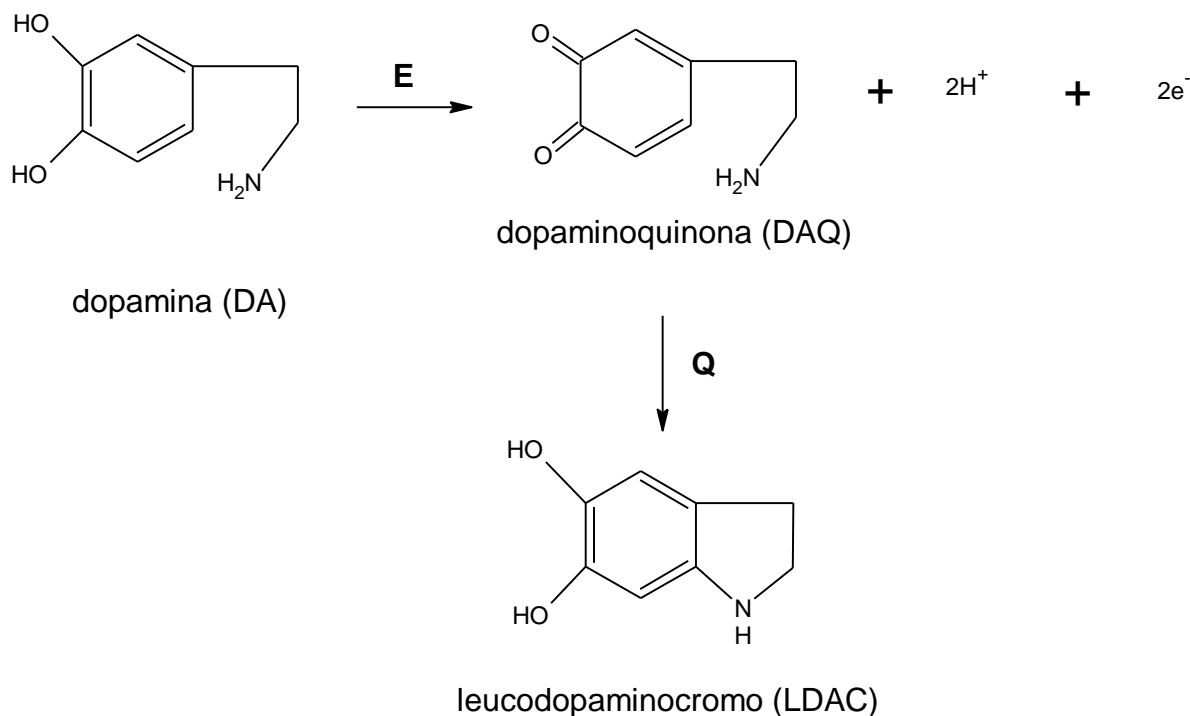


Figura 7 Mecanismo de reacción E-Q de dopamina en medio acuoso [20].

Es importante destacar que a pH básico, las cadenas abiertas de las quinonas son protonadas, desfavoreciendo la reacción química. Por el contrario, a pH ácido una cantidad suficiente de quinona deprotonada está disponible, generando LDAC [17-20].

2.1.4 Interferentes en la detección electroquímica de DA.

La capacidad para determinar DA en presencia de otras especies encontradas en el organismo ha sido un gran reto a vencer en la Electroanalítica. La mayoría de estos compuestos son electroactivos y poseen la habilidad de oxidarse en el mismo potencial de la DA o valores muy cercanos, enmascarando la detección de DA.

Además, estos compuestos se presentan normalmente en concentraciones mayores a la de la misma DA en el organismo. Algunos de estos compuestos electroactivos son: Ácido Ascórbico (AA), Epinefrina (EP), Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC), 5-

Hidroxitriptamina (serotonina o 5-HT) y Ácido Úrico (AU). Las especies electroinactivas, tales como el Glutamato (Glu) o el Ácido Aspártico (ASP) también resultan problemáticas ya que éstas pueden adherirse a la superficie, provocando que el sensor falle.

Por lo tanto es necesario tomar en consideración que si se desea determinar DA de una manera precisa, el sensor debe ser selectivo para la detección de DA en presencia de otras especies, especialmente AA y su principal metabolito, el DOPAC.

El efecto de dichas especies en la determinación de DA fue reportado por primera vez por Kissinger y colaboradores [90]. Ellos notaron que los picos voltamperométricos que obtuvieron se debían a un gran número de compuestos diferentes que se oxidaban a potenciales similares, ya que el AA, no la DA, era el principal contribuyente a la corriente cuantificada.

De manera específica, el ácido ascórbico (Figura 8), es un azúcar ácido con propiedades antioxidantes. Este compuesto coexiste con la DA en la mayoría de los sistemas biológicos, en concentraciones que son cientos de veces mayores que la de DA. Este compuesto es electroactivo y se oxida fácilmente en un rango de potenciales de -100 a 400 mV vs ECS en la mayoría de los electrodos sólidos. Además, los productos de la oxidación de AA generalmente obstruyen la superficie electródica, causando un decremento de las corrientes de pico.

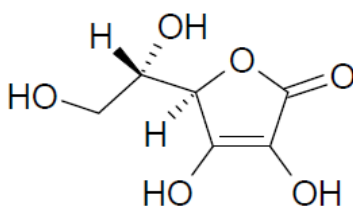


Figura 8 Estructura química desarrollada del ácido ascórbico (AA).

Asimismo, el AA reacciona con el producto de oxidación de la DA (dopamino-quinona, DOQ). Esta reacción conduce a la oxidación de AA y la regeneración de DA. La regeneración catalítica de DA hace que ésta permanezca disponible para oxidaciones electroquímicas posteriores, y por tanto, complicando los análisis.

En la literatura se encuentra reportado el uso de distintos materiales como soportes electródicos en la detección de dopamina (por ejemplo, el oro [20], diamante [94],

mercurio [99] entre otros); sin embargo, los electrodos más comunes han sido el carbón y sus distintas formas alótropas, de entre las que destacan la pasta de carbón [95 - 96], el carbón vítreo [37, 41, 42, 49, 52, 93, 97], la fibra de carbón [45, 55] y el grafito [51, 53]. Asimismo, para estos electrodos se han desarrollado procedimientos de pretratamiento y modificación de sus superficies con el fin de mejorar la sensibilidad y selectividad del electrodo [98], en donde la arquitectura de cada uno de éstos fue diseñada con el objetivo de discernir entre la reacción de oxidación de DA y la de sus interferentes.

2.2 Electrodo de Carbón.

Los electrodos de carbón han sido de gran interés en distintas aplicaciones electroquímicas ya que presentan distintas formas alótropas, las cuales proporcionan diferentes propiedades que lo hacen un material electroquímico único [21-24], como:

1. El carbón tiene una amplia gama de propiedades electrónicas anisotrópicas, desde el carácter metálico del grafito desordenado o carbón vítreo, hasta el comportamiento semi-metálico observado en el grafito altamente ordenado. Además una forma del carbón difiere de otra, dando lugar a diferencias en cuanto a capacitancia, adsorción y cinética de transferencia electrónica.
2. Las superficies de carbón adsorben una gran cantidad de materiales, ya sea vía una fisisorción no específica, o bien, vía una quimiadsorción específica para determinados grupos funcionales superficiales.
3. A diferencia de los metales, el carbón exhibe una superficie químicamente compleja; es decir, presenta una gama de grupos superficiales. Aunque la superficie de los electrodos de carbón se oxida al aplicar un potencial, la formación de óxidos es generalmente irreversible.
4. Los electrodos de carbón son capaces de formar enlaces covalentes con distintos materiales comúnmente empleados para modificar superficies, convirtiéndolo en un sustrato sumamente interesante para la fabricación de electrodos modificados.
5. Aunque las superficies del carbón pueden oxidarse electroquímicamente, estas reacciones son lentas comparadas con las de los metales; además, el carbón es relativamente inerte en procesos electroquímicos. Estas dos características

hacen que el carbón y sus distintas formas tengan un gran número de aplicaciones.

En resumen, el carbón tiene propiedades electrónicas similares a un metal o semi-metal, pero con una química superficial que se deriva de la presencia de distintos grupos orgánicos.

El carbono es polimórfico ya que existe en tres diferentes formas: diamante, grafito y fullerenos. La principal diferencia entre el diamante y el grafito es que la unión entre átomos de carbono involucra una hibridación sp^3 (tetraédrica) para el diamante, mientras que en el grafito es sp^2 (trigonal) (Figura 9) [25]. Por lo tanto, el diamante tiene una estructura cristalina tridimensional, mientras que el grafito consiste en un apilamiento de láminas paralelas de anillos hexagonales, llamadas grafenos, unidas entre sí por interacciones de tipo Van der Waals débiles producidas por un orbital π deslocalizado.

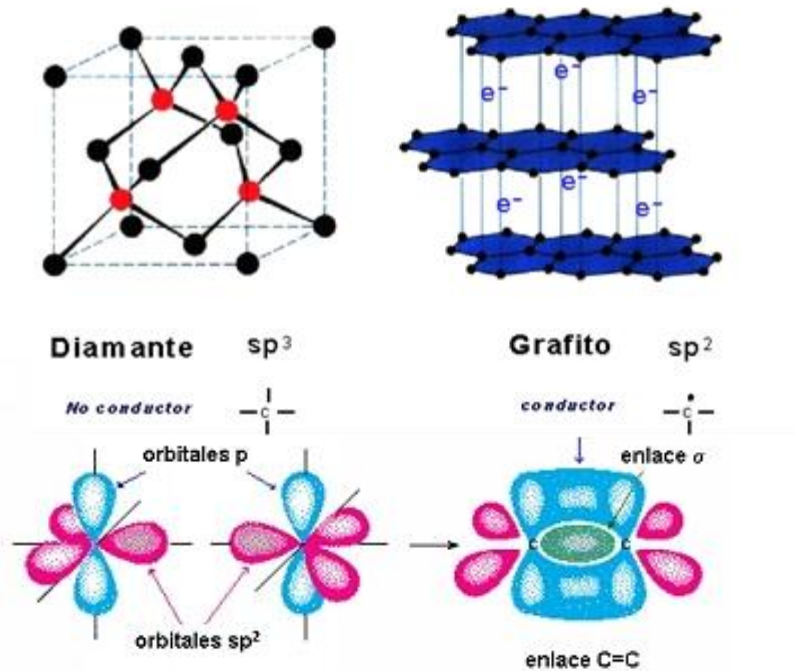


Figura 9 Comparación entre la estructura cristalina del diamante (sp^3) y grafito (sp^2), así como la representación de sus orbitales y orbitales correspondientes. Imagen adaptada de la referencia [103].

2.2.1 Grafito.

El grafito es un material anisotrópico, por lo que de manera intraplano presenta buena conductividad térmica y eléctrica debido a los enlaces covalentes C-C, mientras que entre las capas de grafeno su comportamiento es contrario. La conductividad eléctrica es una de las principales características que permiten que el grafito sea un material empleado como soporte electródico. Como resultado de esta anisotropía, las capas de grafeno pueden deslizarse una respecto a otra, permitiéndole su empleo como lubricante o como material comúnmente utilizado en escritura [22-25].

2.2.1.1 Estructura del grafito.

El grafito tiene una estructura en la que los átomos están distribuidos de manera hexagonal en cada capa y la secuencia de apilamiento de las láminas es ABAB. Esto da como resultado una celda unitaria hexagonal con dimensiones: $c=6.71 \text{ \AA}$ y $a = 2.76 \text{ \AA}$. Existen cuatro átomos por cada celda, denominados A, A', B y B'. (Figura 10). Los átomos A y B están en el mismo plano y los átomos A' y B' están localizados en un plano que se desplaza por la mitad de la distancia interplanar en el eje c (3.354 \AA), misma que representa el doble de la distancia entre A y B (1.421 \AA), indicando que la interacción entre láminas es débil [58, 59].

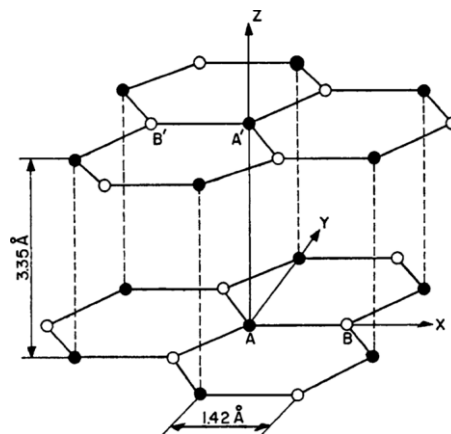


Figura 10 Estructura cristalina del grafito. La celda unitaria es hexagonal, conteniendo cuatro átomos de carbono por celda [59].

La distancia intraplana promedio de los microcristales a lo largo del eje a, se denomina L_a (Figura 11). Ésta se determina por difracción de rayos X y en grafito es de menos de 10 \AA . En cambio, L_c se refiere a la distancia en el eje perpendicular a las láminas de grafito en las que la secuencia de apilamiento de las láminas es ABAB. En materiales desordenados, como el negro de carbón, L_c puede ser de menor a 10 \AA , mientras que en grafito pirolítico es de cerca de 1000 \AA [21, 23, 24, 58, 59].

2.2.1.2 Estructura de la superficie del electrodo de grafito.

Las superficies de los materiales de carbón son reactivas debido a la presencia de valencias disponibles, las cuales son propensas a quimiadsorber una gran cantidad de moléculas, particularmente, aquellas que contienen oxígeno. Numerosos grupos superficiales que contienen oxígeno e hidrógeno han sido identificados en los bordes de la estructura del grafito. Una representación esquemática se presenta en la figura 11.

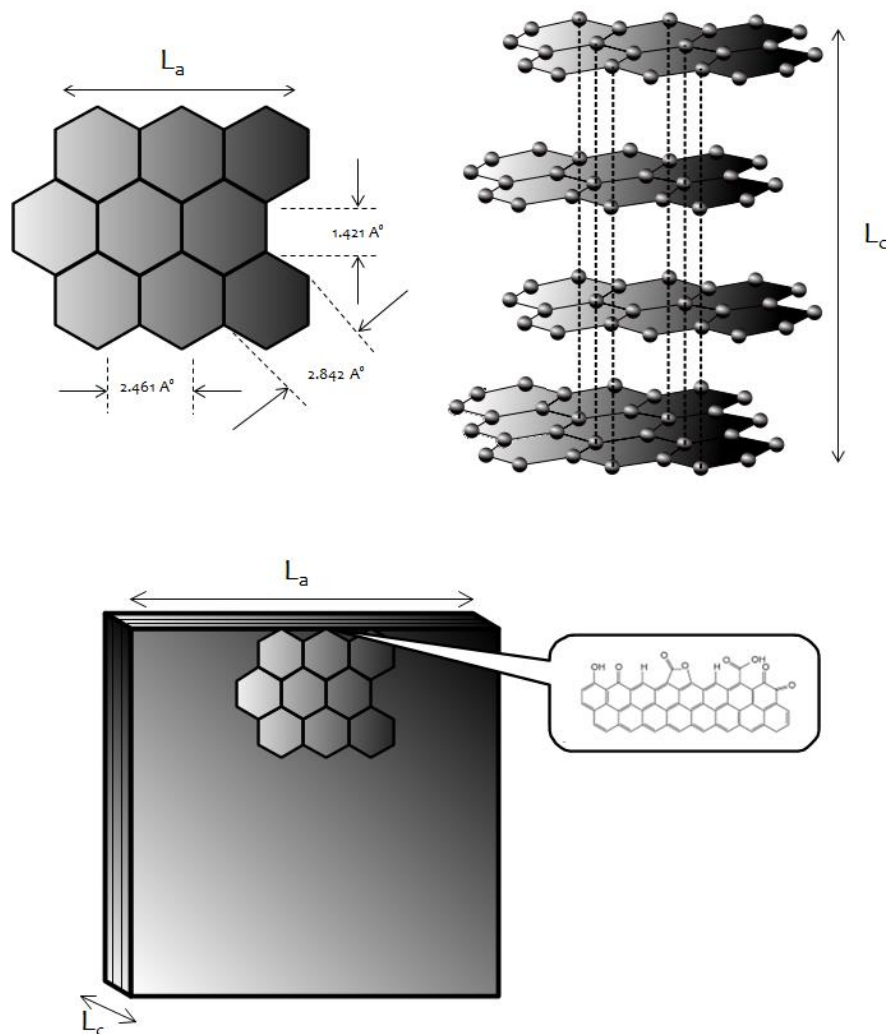


Figura 11 Representación esquemática de la estructura del grafito. L_a y L_c denota las longitudes a lo largo del plano (eje a) y fuera del plano (eje c). Adaptado de la referencia [23].

En contraste, el carácter hidrofóbico del grafito restringe la posibilidad de modificar su superficie. Entonces, si se efectúan procedimientos para pre-tratar el soporte electródico de grafito previo a la construcción de un EQM, se favorece la formación de los grupos superficiales mencionados anteriormente [60-64].

Se conocen diversos métodos para producir óxidos superficiales en el carbón. Estos compuestos carbono-oxígeno se forman en los carbonos por oxidación en fase gaseosa empleando diversos agentes oxidantes (O_2 , N_2O , CO_2 , H_2O , entre otros) y por oxidación química en disolución ($KMnO_4$, HNO_3 , $KClO_3$, H_2SO_4 u otros). Después de la oxidación, las superficies gráficas adquieren propiedades hidrofílicas, mejorando la afinidad con disolventes polares (como el agua) y aumentando la reactividad de la superficie. Asimismo, estos grupos funcionales pueden funcionar como sitios de anclaje para la inmovilización de partículas metálicas o moléculas más grandes [24, 60-64].

En diversas investigaciones se proponen tres tipos de óxidos superficiales (ácidos, básicos y neutros). Los ácidos se forman cuando el carbón se trata con oxígeno a temperaturas cercanas a su punto de ignición o mediante la reacción con una disolución oxidante a temperatura ambiente. Los óxidos superficiales básicos se forman cuando la superficie con todos los compuestos superficiales se calienta al vacío en una atmósfera inerte, para después ponerse en contacto con oxígeno sólo después de haberse enfriado a bajas temperaturas. Los neutros son formados por la adsorción irreversible de oxígeno en valencias insaturadas de carbono. [24].

Ahora bien, el carácter electroquímico de los electrodos de carbono se relaciona frecuentemente con la reacción redox que involucra a los grupos quinona-hidroquinona. Los voltamperogramas obtenidos por Blurton para grafito de baja porosidad en disolución 1N de H_2SO_4 revelan la presencia de múltiples picos redox [65]. Los picos anódicos en rangos de potencial de 0.59 a 0.91V, 0.97 a 1.15V, y 1.35 a 1.45V se asocian a los picos catódicos en rangos de 0.47 a 0.79V, 0.83 a 1.01V y 0.25V, respectivamente. Los picos anódicos se asocian con estructuras tipo hidroquinona en la superficie del grafito, bajo diferentes condiciones; mientras que los picos catódicos se asocian con la reducción de compuestos del tipo quinona.

En estudios posteriores, Kinoshita y Bett [66], Beck [67], Epstein [68], Mamantov [69] y Tarasevich [70] observaron un solo pico redox en sus voltamperogramas, mientras que

Blurton observó múltiples picos redox. Los experimentos de Mamantov [73] indican que la oxidación electroquímica a 1.5V por 1.5min en disolución 1M de H₂SO₄, así como la oxidación química con una disolución oxidante de Ce(IV) en H₂SO₄ 1M producen películas de diferentes óxidos en electrodos de grafito.

En el grupo de *Sensores Electroquímicos* de CIDETEQ ya se ha reportado la respuesta electroquímica de carbón vítreo en H₂SO₄ 0.5M obtenida a distintas ventanas de potencial; tres límites de potencial definen la formación de hidroquinona, anhídrido ftálico y ácido carboxílico a 0.6V, 1.6V y 2.2V vs Ag/AgCl NaCl 3M, respectivamente [71, 72].

Dado que el conocimiento del material empleado como sustrato es fundamental para diseñar adecuadamente el electrodo que detecte y cuantifique al analito (en nuestro caso, DA) es importante efectuar una rigurosa caracterización de la superficie. En este sentido, se han empleado distintas técnicas, en su mayoría espectroscópicas, entre las que destacan espectroscopia Raman, de Infrarrojo con transformada de Fourier, de fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS, por sus siglas en inglés, *X-ray Photoelectron Spectroscopy*), entre otras.

2.2.1.3 *Espectro Raman del Grafito.*

La espectroscopia Raman es una técnica ampliamente utilizada para la caracterización de estructuras del carbono, ya que es muy sensible a la diferenciación entre el carbono sp² y el sp³ [23, 59,60, 74, 75].

De acuerdo a la simetría D_{6h}^4 de un microcristal de grafito finito, son posibles cuatro modos vibracionales [23, 59, 75] (Figura 12):

$$2B_{2g} + 2E_{2g} + A_{2u} + E_{1u}$$

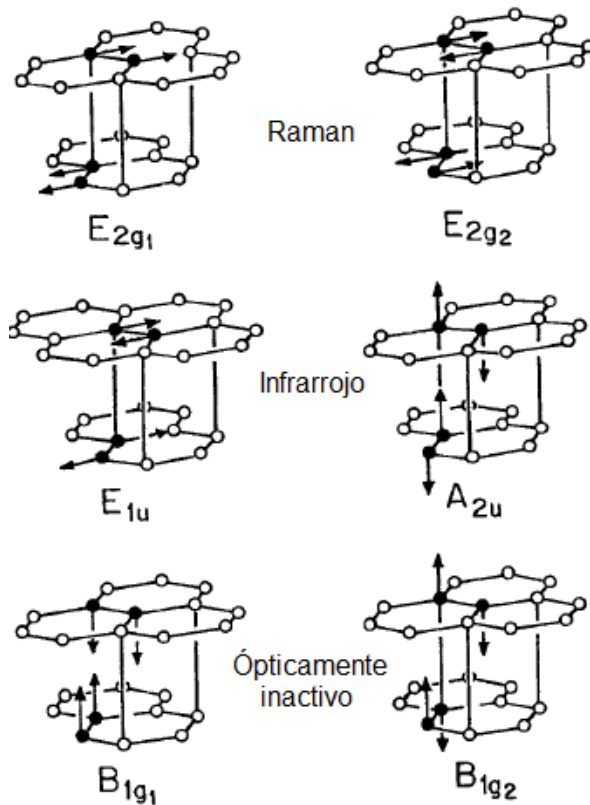


Figura 12 Modos vibracionales del grafito [23, 59, 75].







De estos modos vibracionales, representados en la figura 12, solo dos E_{2g} son sensibles a la técnica de Raman. En este sentido, numerosos estudios han indicado la presencia de dos picos, uno cerca de 1360 cm^{-1} y otro cercano a 1580 cm^{-1} , denominados **D** y **G**, respectivamente. La banda **G** es asignada a uno de los modos vibracionales E_{2g} , únicamente posibles en el grafito sp^2 , mientras que el otro modo aparece a un menor número de onda (42 cm^{-1}) y es difícil de observar [23]. Por otra parte, la banda **D** no corresponde a ningún modo vibracional del grafito, sino a la pérdida de simetría del microcristal como ocurre en los bordes de las hojas de grafeno [75].

De manera particular, tanto la posición como la intensidad de la banda **D** dependen tanto del tamaño del cristal como de la longitud de onda del láser de excitación. Con un láser de longitud de onda menor, las bandas **D** se recorren a mayores valores de número de onda y decremantan en intensidad. Entonces, para materiales que

contengan tanto grafito como diamante, se deben utilizar longitudes de onda menores para distinguir entre los picos a 1332 cm^{-1} (del grafito) y la banda **D** a 1350 cm^{-1} . De acuerdo a lo reportado en literatura, cuando se utilizan láseres con longitudes de onda de 785 nm a 488nm, el pico **D** se recorre de 1313 a 1376 nm^{-1} , respectivamente; mientras que el pico **G** permanece constante [75].

La intensidad de la banda **D** incrementa de manera experimental, cuando se pasa de un grafito pirolítico a una forma más desorganizada, como lo es el negro de carbón (Tabla 2, Figura 13). Este incremento se debe: (1) al incremento en la cantidad 'desorganizada' de carbón en la muestra y (2) el decremento en el tamaño del cristal [75, 23, 24].

Tabla 2 Distintas formas alotrópicas del carbón, así como la distancia intraplanar promedio de un microcristal (L_a) de cada uno de estos materiales [23,24].

Material	L_a (Å)	Esquema	Material	L_a (Å)	Esquema
HOPG	> 10 000		Fibra de carbón	>100	
Grafito pirolítico	1000		Carbón Vítreo	20 – 55	
Grafito hexagonal	300		Negro de carbón	20	

*HOPG = Grafito pirolítico altamente ordenado, por sus siglas en inglés, *Highly Oriented Pyrolytic Graphite*.

En la figura 13 se presentan el rango de longitudes inter e intraplanares para distintos materiales carbonosos. Es interesante observar que mientras estructuras con alto grado de desorden, como el negro de carbón cuenta con distancias inferiores, de hasta 4 órdenes de magnitud respecto a los demás materiales de carbón [23].

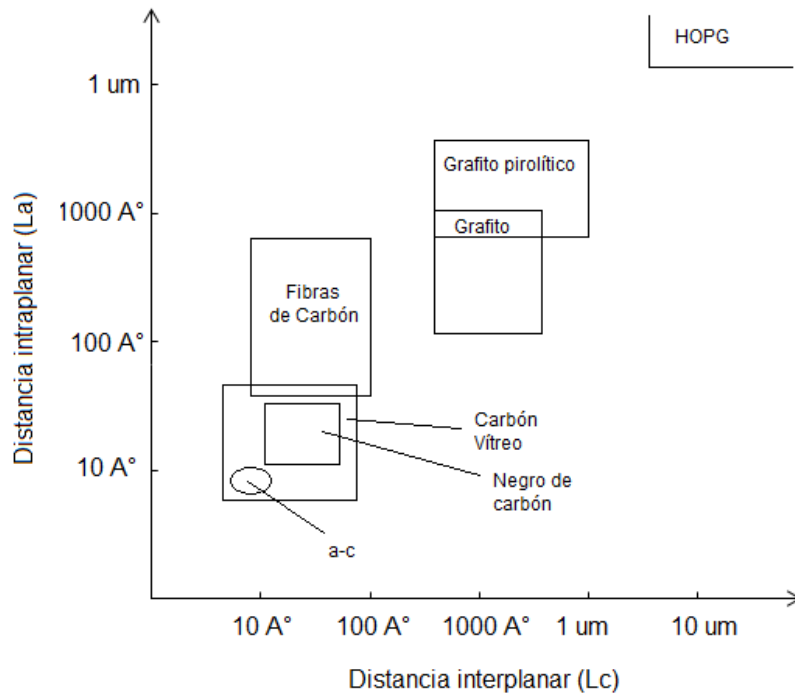


Figura 13 Rangos aproximados de L_a y L_c para varios materiales carbonosos de hibridación sp^2 . Donde: a-c es carbono amorfo y HOPG es el grafito pirolítico altamente ordenado [23].

En la figura siguiente se presentan los espectros Raman típicos de distintos materiales y la gráfica de las razones de las intensidades I_D y I_G , es decir, I_D / I_G versus $1 / L_a$, donde el tamaño del cristal, L_a , se obtiene por difracción de Rayos X (Figura14). La relación lineal muestra que la intensidad Raman es proporcional al porcentaje de 'fronteras' o 'bordes' en la muestra [59].

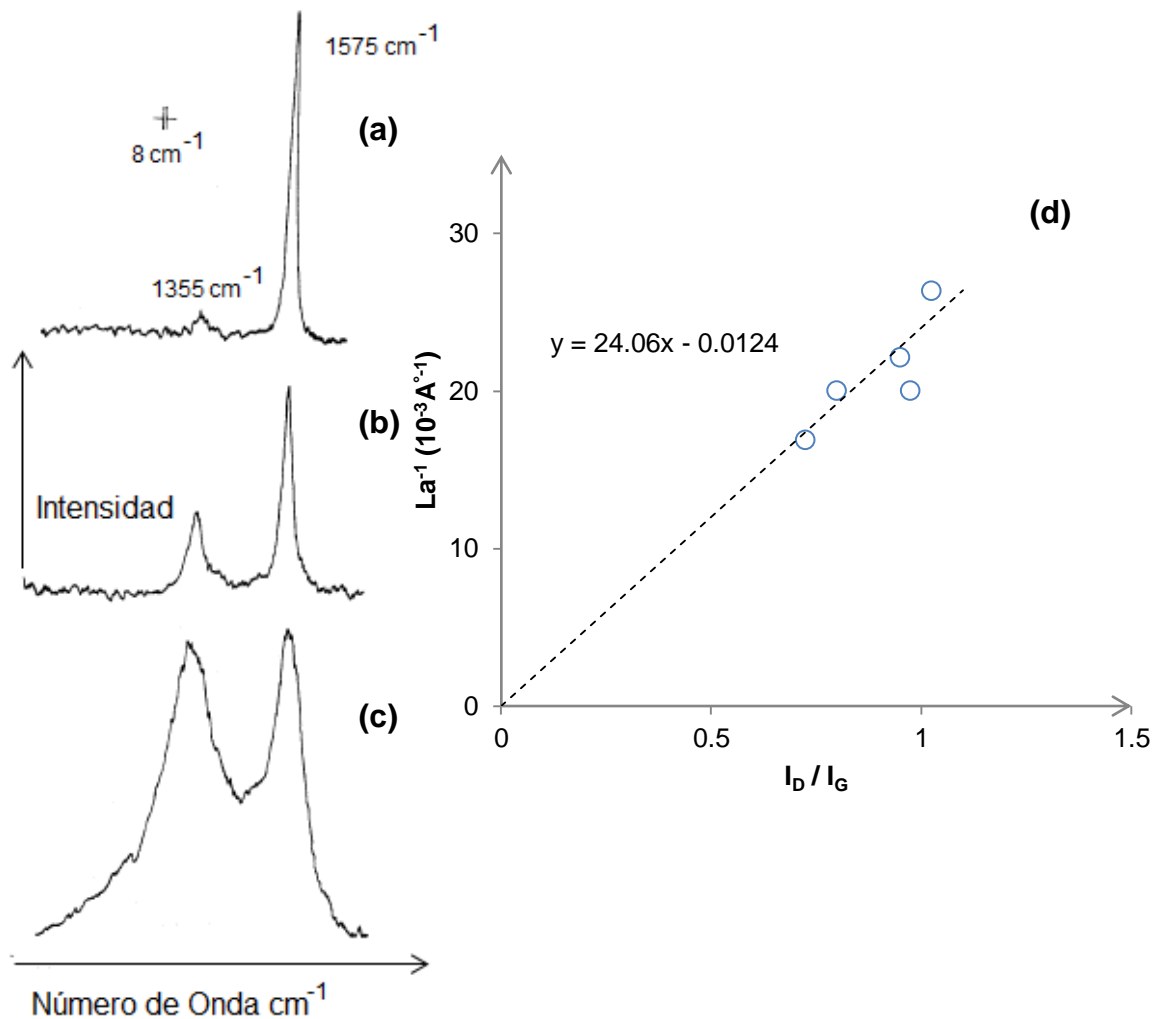


Figura 14 Comparación entre los espectros RAMAN de **(a)** grafito pirolítico, **(b)** grafito comercial y **(c)** carbón activado, obtenidos con un láser de Argón de 488 nm, así como la curva de calibración construida a partir de las intensidades Raman I_D/I_G vs datos obtenidos por DRX **(d)** [59].

2.2.1.4 Espectro de fotoelectrones emitidos por rayos-X.

Okpalugo y colaboradores han mostrado que un análisis por XPS es una herramienta excelente para la caracterización de las superficies carbonosas y han identificado los grupos oxigenados que los caracterizan [76]. Por otra parte, el grupo de Lakshminarayanan determinó el porcentaje relativo de grupos funcionales a partir del espectro XPS a los que se hicieron distintos pretratamientos [77].

A continuación se presenta una imagen representativa de los grupos funcionales encontrados por Kundu en láminas de grafeno que conforman nanotubos de carbón multipared funcionalizados mediante distintos tratamientos (Figura 15 a); así como espectros XPS comparativos de su material antes y después de la funcionalización con ácido nítrico (Figura 15 b) [60]. Después de la deconvolución de espectros XP se

asocia, de acuerdo a lo reportado en literatura, cada pico a distintas especies como fenoles y éteres (de acuerdo a la energía de enlace C-O), cetonas y quinonas (C=O), carboxilos, anhídridos carboxílicos y ésteres (-COO), etc.

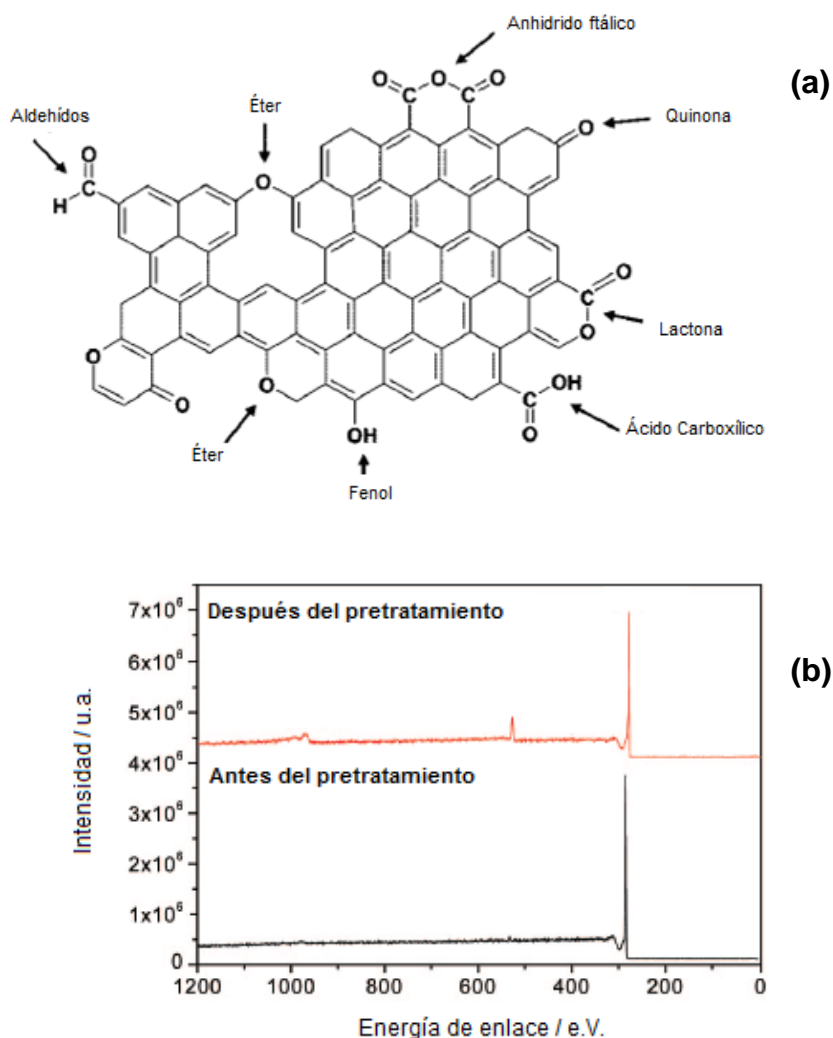


Figura 15 (a) Imagen representativa de los grupos funcionales contenidos en materiales carbonosos y (b) espectros XPS comparativos de su material antes y después de la funcionalización con ácido nítrico [60].

Debido a la naturaleza estructural y la composición de la superficie de los materiales carbonosos que hasta ahora se han discutido, se destaca que cuando el carbón y sus distintas formas son utilizados como material electrodo y se exponen a compuestos orgánicos, éstos tienden a presentar fenómenos de adsorción.

Estos fenómenos originan problemas de sensibilidad, selectividad y reproducibilidad [26], como en el caso de la detección electroquímica de DA con electrodos de carbón,

en donde le procedimiento se dificulta puesto que este neurotransmisor co-existe con numerosos compuestos en muestras biológicas. De ahí que es recomendable modificar física o químicamente los electrodos de carbón con películas orgánicas que favorezcan la determinación efectiva del analito vía la eliminación o disminución de efectos adsorptivos negativos.

2.3 Electroodos modificados.

De acuerdo a la Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), “*la característica que distingue a un Electrodo Químicamente Modificado (EQM) es que una película delgada de un determinado compuesto químico se une o enlaza con la superficie electródica, con el objetivo de dotar al electrodo con sus propiedades químicas, electroquímicas, ópticas, eléctricas, de transporte o cualquier otra que se desee; se busca además que la película sea diseñada de una manera ordenada y químicamente racional*” [27].

De esta manera, los EQMs se elaboran mediante quimiadsorción (cuando las moléculas de las especies modificadoras se adsorben fuertemente a la superficie mediante la formación de enlaces químicos), recubrimientos con películas poliméricas (orgánicas), polinucleares (inorgánicas) o mixtas (compositos, híbridos orgánico-inorgánicos), o simplemente mezclando el modificador con el material de la matriz electródica [27-29].

En este sentido, los EQMs recubiertos con películas poliméricas son los sistemas más populares, debido principalmente a que son altamente estables y pueden prepararse de manera relativamente sencilla; situación que se hace posible empleando polímeros conductores o no conductores, de cadena corta o de cadena larga, lineales o ramificados, entre estos últimos encontramos a los dendrímeros [26].

2.3.1 Electroodos modificados con dendrímeros.

Desde que fueron sintetizados, en la década de los 80s, los dendrímeros han sido ampliamente estudiados debido a que su estructura y propiedades resultan únicas y fascinantes.

Los dendrímeros son polímeros globulares, compuestos por ramificaciones que crecen desde un núcleo. Este término se origina del vocablo griego “dendron”, que significa ‘árbol’. Los dendrímeros fueron introducidos por primera vez en 1980 por Donald Tomalia y colaboradores [30]. Al mismo tiempo, Newkome y su grupo, reportaron la síntesis de macromoléculas muy similares en 1985 [31]. Ellos las llamaron “arbores”, del latín ‘arbor’ que también significa ‘árbol’ [32].

La estructura típica de un dendrímero muestra tres regiones distintas: un núcleo central a partir del cual emergen radialmente ramificaciones, mismas que están compuestas por unidades repetidas, dando lugar a las distintas generaciones; además, grupos funcionales terminales localizados al exterior de la macromolécula (Figura 16) [30-35].

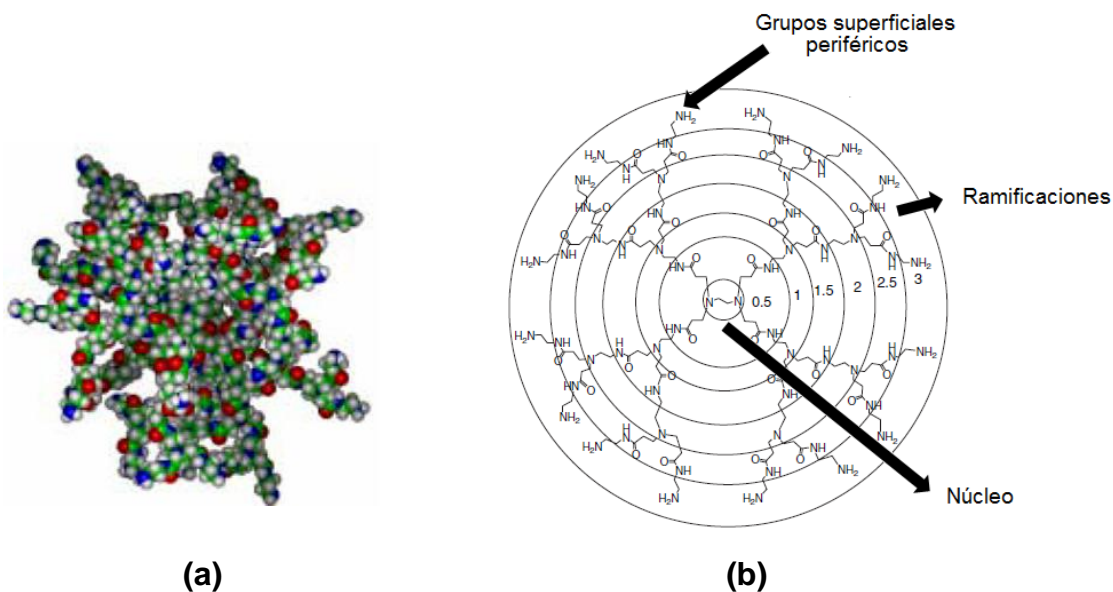


Figura 16 (a) Representación de un la estructura desarrollada tipo Pauling de un dendrímero PAMAM Generación 5, así como (b) las partes que conforman a un dendrímero. [33]

En el mercado existen varios tipos de dendrímeros, como los poli (propilenimina) o PPI, poli (amidoamina) o PAMAM, poli (benciléter) o POBET; diferenciándose entre sí por sus distintos métodos de síntesis y composición [34].

Los dendrímeros se producen a partir de un átomo o molécula central (como el nitrógeno, carbón u otros elementos) por una secuencia iterativa de reacciones en la que cada iteración adicional da lugar a una nueva “generación”, multiplicándose el número de sitios activos. Uno de los aspectos más atractivos de estos procesos de

síntesis es que resulta relativamente sencillo controlar el tamaño, composición y reactividad química del dendrímero.

Ahora bien, no todas las moléculas regularmente ramificadas son dendrímeros, porque las propiedades del estado dendrítico, como pueden ser: aislamiento y encapsulación del núcleo, baja viscosidad intrínseca en solución; solo se alcanza cuando se logra globularidad a una cierta generación, o umbral de tamaño. Por lo tanto, muchos dendrones de baja generación, o “moléculas cascada” de *Vögtle*, son muy pequeñas como para exhibir las propiedades de los dendrímeros, pero son usados frecuentemente como “ramas” oligoméricas en su construcción. [35]

Es así como el desarrollo y refinamiento de herramientas sintéticas, permitió a los científicos sintetizar éstas estructuras macromoleculares. En general, se han usado dos metodologías de síntesis en la preparación de los dendrímeros (Figura 17): (a) el método divergente; en el cual el crecimiento comienza en el núcleo y procede radialmente hacia el exterior, y (b) el método convergente, en el cual el crecimiento comienza en la periferia, hacia el interior del dendrímero.

La elección del método sintético usualmente se justifica por la característica deseada para la molécula blanco, la química disponible, y los dendrones específicos usados en la construcción de la estructura dendrítica.

En general, el método convergente provee un mejor control de la estructura (Figura 17), en parte, como resultado de su potencial para mejorar la purificación en pasos intermedios del crecimiento. También el método convergente posee una habilidad innata de introducir funcionalidades diferenciadas en los puntos focales y la periferia del dendrímero.

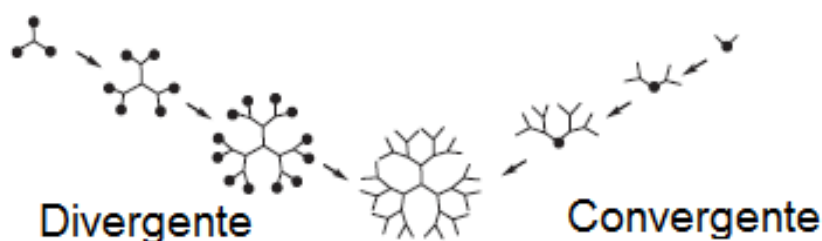


Figura 17 Representación de las rutas divergente y convergente para la síntesis de un dendrímero.

En contraste, es más difícil de mantener la pureza y uniformidad estructural en el método divergente, porque el número de pasos es proporcional el número de defectos y éste se multiplica con la generación. Sin embargo, el proceso es más adecuado no solo para la síntesis a grandes escalas, sino también para la preparación de dendrímeros de altas generaciones [34-35].

Los dendrímeros PAMAM (Figura 18) son sintetizados por la ruta divergente, empleando como núcleos amoníaco o etilendiamina. Éstos compuestos son construidos usando una secuencia reiterativa consistente en (a) una doble adición de Michael de metil acrilato a un grupo amino seguido de (b) una amidación del intermediario carbometoxi resultante con un exceso de etilendiamina [35]. De esta manera, siguiendo estas reacciones se obtienen productos de hasta generación 10, con pesos moleculares de hasta 930 mil [33, 35].

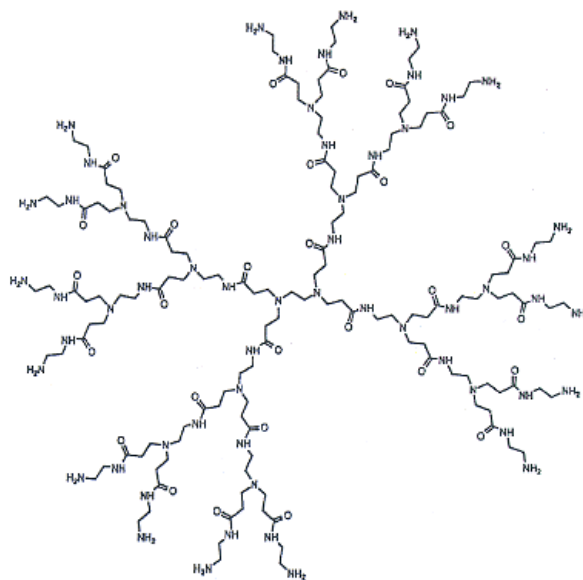


Figura 18 Dendrímero PAMAM generación 2.0.

Una característica interesante de los dendrímeros es el núcleo espacialmente aislado. Las ramificaciones emanan desde el núcleo proveyendo cavidades en el interior que pueden ser explotadas en la encapsulación de moléculas huésped [36].

2.3.2 Electrodo modificado con nanopartículas de platino encapsuladas en dendrímeros PAMAM.

Los dendrímeros PAMAM han despertado gran interés debido a sus potenciales aplicaciones en medicina, nanotecnología y catálisis. Dentro de estas macromoléculas es posible incorporar iones metálicos, para ser empleados como conectores, ramificaciones o grupos terminales, dando lugar a los llamados “metalodendrímeros”. Además, estos grupos metálicos pueden localizarse en un sitio en específico dentro de la estructura dendrítica, o fuera de él (Figura 19) [35].

Históricamente, la incorporación de iones metálicos dentro de dendrímeros inició con los experimentos de Balzani y Newkome en los años 90s, cuando lograron sintetizar centros metálicos ramificados. Actualmente, los metales también son empleados como conectores de bloques (incluyendo tanto el centro como la conexión del monómero), grupos terminales y estructuras de inclusión dentro de sus cavidades hidrofóbicas (los centros metálicos se incorporan después de la síntesis del dendrímero) (Figura 19). Además, se ha demostrado que en estas cavidades hidrofóbicas se pueden encapsular moléculas huésped [31, 32, 82].

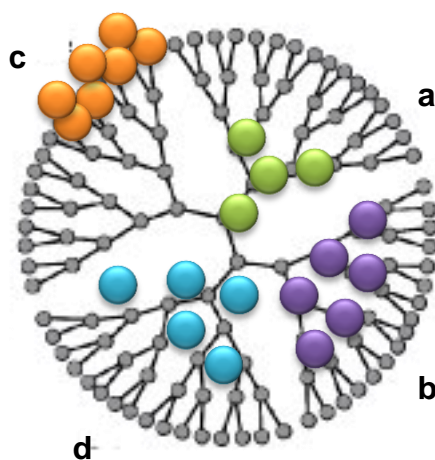


Figura 19 Gráfico representativo de los centros metálicos en moléculas dendríticas, ocupando posiciones como (a) ramas, (b) bloques, (c) grupos terminales y (d) cavidades hidrofóbicas.

Los dendrímeros con terminal aminada o carboxilada pueden directamente enlazar iones como: Na^+ , K^+ , Cs^+ , Rb^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Gd^{3+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Ag^+ , Mn^{2+} , Pd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{3+} , Ru^{2+} , Ru^{3+} , Pt^{2+} y Ni^{2+} en su periferia, vía la coordinación de aminas primarias o grupos carboxílicos. Sin embargo, también el interior de los dendrímeros contiene aminas terciarias y secundarias, las cuales funcionan como ligandos para muchos metales como el Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} [26].

Zhao y Crooks encontraron que iones de metales de transición, incluyendo Cu^{2+} , Ag^+ , Pt^{2+} , Pd^{2+} , Ru^{3+} y Ni^{2+} se distribuyen en el interior del dendrímero, en donde son fuertemente complejados por sus grupos funcionales. Una vez mezclados el precursor metálico y el dendrímero, se provoca la reducción de los iones en su interior, para finalmente obtener nanopartículas metálicas encapsuladas dentro de las cavidades del dendrímero. Por lo tanto éste funciona como 'templete' y estabilizador, controlando el tamaño y evitando la aglomeración y pasivación de las nanopartículas metálicas [83].

De manera convencional, la reducción de los iones metálicos, una vez que éstos se han complejado con el dendrímero, se lleva a cabo por la adición de un agente reductor, como NaBH_4 , con el fin de reducir el metal a valencia cero (Figura 20) [36, 82, 83].

Recientemente se ha reportado un método sencillo para preparar nanopartículas metálicas basado en la utilización de micro-ondas [86-89]. La principal ventaja de éste método es que no es necesaria la adición de un agente reductor, logrando disminuir considerablemente el tiempo de síntesis [86]. En la literatura han sido pocos los artículos que detallan el procedimiento para la síntesis asistida por micro-ondas de nanopartículas encapsuladas en dendrímeros PAMAM. Sin embargo, en el grupo de investigación de *Electroquímica Ambiental* en CIDETEQ ya se han desarrollado metodologías para la síntesis y la caracterización de las DENs [15].

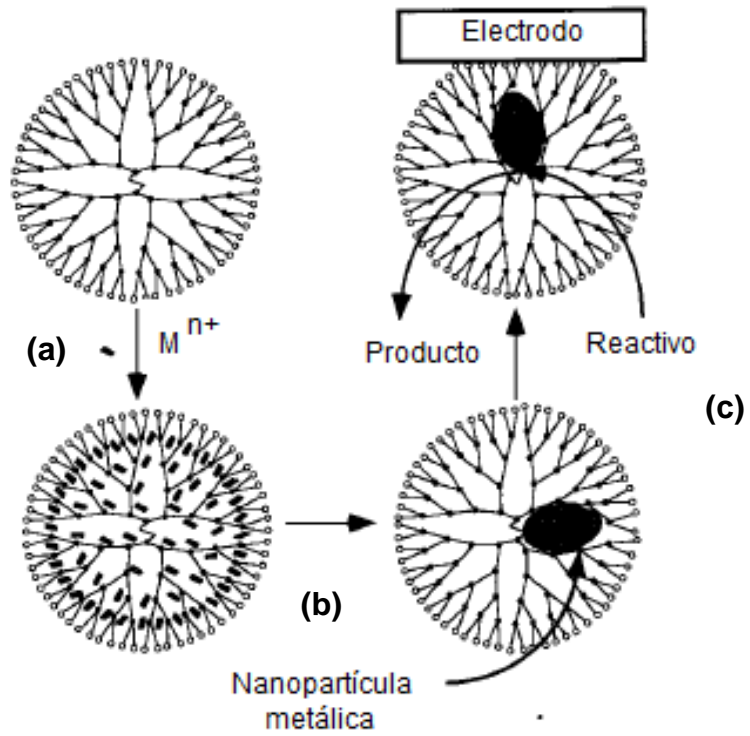


Figura 20 Representación esquemática de un dendrímero PAMAM G4.0 con grupos terminales OH **(a)** empleado para la síntesis de nanopartículas de Pt dentro del templete formado por las terminaciones hidroxiladas **(b)**, y posterior depósito a una superficie electrodica **(c)** [83].

3. Antecedentes.

Se han reportado numerosos trabajos en donde se construyen distintos electrodos para la medición y cuantificación de dopamina, tales como los que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Determinación electroquímica (DEQ) de DA *in vitro*. (LD= Límite de detección. DAF= Disolución amortiguadora de fosfatos, LCS= Líquido cefalorraquídeo sintético, ECV= Electrodo de carbón vítreo, CMAO= Carbón mesoporoso altamente ordenado, PAAB= Polianilina con ácido bórico, NCMP= Nanotubos de carbón multipared, CGAR= Cromatografía de líquidos de alta resolución, DDB= Diamante dopado con boro, DENs= Nanopartículas metálicas encapsuladas en dendrímeros PAMAM, PC= Pasta de carbón, VC= Voltamperometría cíclica, VCAV= Voltamperometría cíclica a altas velocidades de barrido, VDP= Voltamperometría diferencial de pulsos, VOC= Voltamperometría de onda cuadrada, A= Amperometría).

Medio	Electrodo	DEQ	LD	Ref.
DAF	ECV + D-PAMAM	VC	4.7 μ M	[37]
	EPC + TiO ₂ nanoparticulado	VDP	0.31 nM	[38]
	ECV + CMAO	A	4.1 nM	[39]
	ECV + Pd nanoparticulado	VDP	8 μ M	[40]
	ECV funcionalizado	VC	N/D	[41]
	ECV + Ác. aspártico	VDP	1.2 μ M	[42]
	ECV + PAAB	VDP	N/D	[43]
	ECV + NCMP + β -ciclodextrinas	VDP	0.12 μ M	[44]
	ECV + nafion	A	11 nM	[45]
	ECV + 5-hidroxitritofano	VDP	0.31 μ M	[46]

Tabla 3. Determinación electroquímica de DA *in vivo* y su correspondiente límite de detección (LD) (Continuación...)

Medio	Electrodo	DEQ	LD	Ref.
DAF	CLAR con ECV + NCMP	VDP	2.5 nM	[8]
	DDB + polímeros	VOC	N/D	[48]
	Grafeno + polímeros	VOC	0.3 μ M	[49]
	PC + prusiatos	A	4.5 μ M	[50]
	Grafito + polipirrol	VDP	0.74 μ M	[51]
Orina	CLAR con ECV + DENs	A	0.15 μ M	[52]
LCS	Grafito + poliuretano	VOC	0.64 nM	[53]

De la tabla anterior se destaca que los electrodos de carbón y sus distintas formas alótropas son los más reportados en literatura; además, en determinaciones *in vitro*, estos electrodos son comúnmente modificados con el objetivo de mejorar su sensibilidad y selectividad ante la reacción de oxidación de DA. Asimismo, dado que la concentración de DA en estriado de rata es de 94 nM [8], sólo el electrodo de grafito modificado con poliuretano alcanzaría a detectar la DA en cerebro de rata (LD = 0.64 nM); la ventaja de emplear este polímero es que proporciona grupos superficiales que le confieren la posibilidad de atraer a los aniones ascorbato, lo cual le confiere selectividad en la determinación de dopamina aún en presencia de interferentes como glucosa, NaHCO₃, NaCl o KCl [53].

Por otra parte, en la determinación *in vivo* de DA se utilizan también electrodos de fibra o pasta de carbón fijados dentro de un capilar de vidrio. Las dimensiones de dichos electrodos de trabajo son reducidas, dada la necesidad de contar con electrodos que sólo se localicen en cierta región del cerebro de una rata (Tabla 4). Sin embargo, el

electrodo de referencia se encuentra separado del electrodo de trabajo, representando así, una incisión quirúrgica extra.

Tabla 4 Determinación electroquímica (DEQ) de DA *in vivo*. (FC= Fibra de carbón, PC= Pasta de carbón, CLAR= Cromatografía de líquido de alta resolución, ECV= Electrodo de carbón vítreo, NCMP= Nanotubos de carbón multipared, VC= Voltamperometría cíclica, VCAV= Voltamperometría cíclica a altas velocidades de barrido, VDP= Voltamperometría diferencial de pulsos, A= Amperometría).

Medio	Electrodo	DEQ	Ref.
Estríado de Rata (<i>in vivo</i>)	FC (largo= 100 μm , diámetro = 5 μm)	VCAV	[5]
	PC dentro de un capilar de vidrio (diámetro =100 μm)	VC	[54]
	FC dentro de un capilar de vidrio (diámetro= 75 μm)	VC	[45]
	FC (diámetro= 7 μm)	A / VCAV	[55]
	CLAR con ECV + NCMP	VDP	[8]

En la tercera columna de la tabla 4 se observa que las técnicas voltamperométricas son las que se emplean en la cuantificación de DA en cerebro de rata *in vivo*. Cabe destacar que aunque no se describen en estos reportes, previamente se efectuó la construcción de las curvas de calibración en disolución amortiguadora de fosfatos a pH 7. Además, no se hace explicación alguna de la selectividad de los electrodos, sino únicamente se hace énfasis en la construcción y aplicación de los mismos.

Es así como retomando los trabajos descritos en la literatura, a continuación se realizará la descripción de algunos de estos arreglos. En la figura 21 se presenta una celda electroquímica acoplada a un dispositivo de microdiálisis para la determinación *ex situ* de dopamina en ratas que pueden moverse en un espacio delimitado [16]. En este trabajo se emplea un electrodo de fibra de carbón modificado con nanotubos de carbón recubiertos por una película polimérica, reportando resultados satisfactorios.

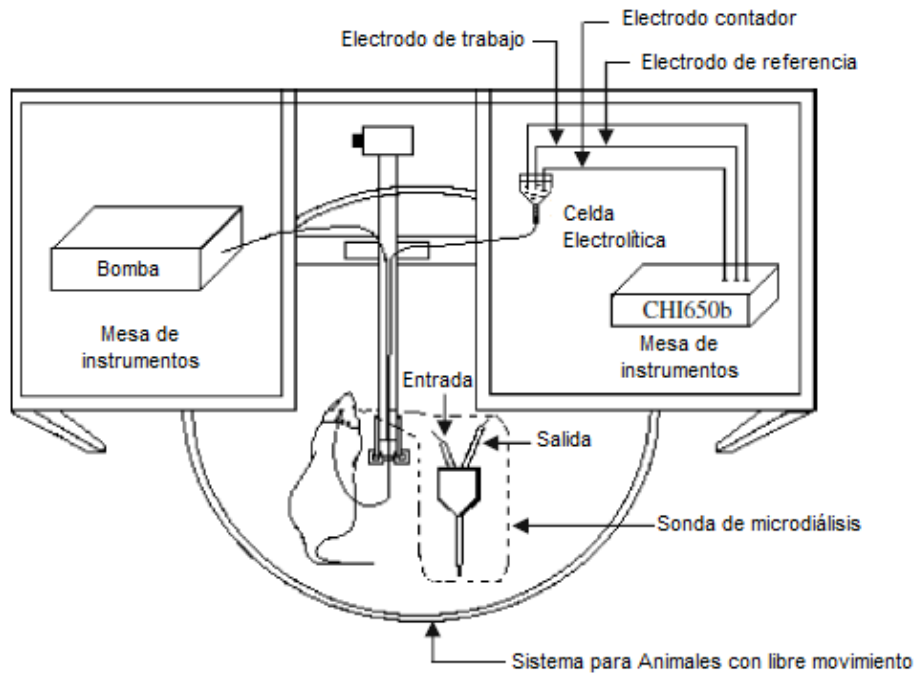


Figura 21 Diagrama del sistema de microdiálisis acoplado al dispositivo electroquímico para la detección de DA [16].

Por otro lado, Budai y colaboradores reportaron el uso de microelectrodos de fibra de carbón (longitud expuesta= 25- 300 μm) colocada en la corteza visual de ratas Wistar para la liberación de dopamina ante una estimulación visual, mediante técnicas amperométricas (Figura 22) [55].

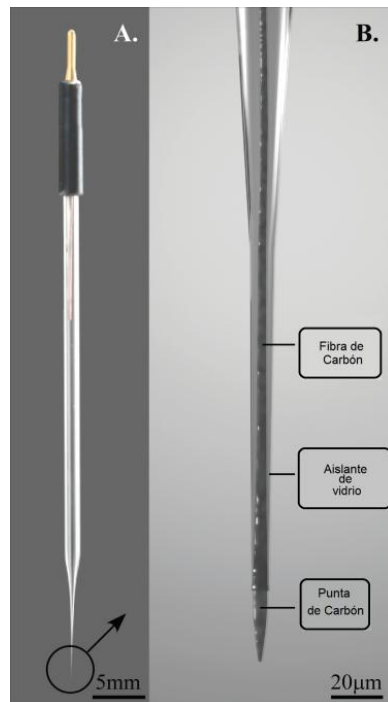


Figura 22 (A) Vista de un microelectrodo de carbón. (B) Estructura microscópica de la punta. La fibra de carbón proviene del soporte de cristal aislante y termina en una punta cónica afilada. La longitud de ésta es de 25 μm [55].

No obstante, en estos dos últimos trabajos no se hace mención acerca de la disposición del electrodo de referencia y contra-electrodo; es decir, en mediciones *in vivo*, estos se colocan por separado, en distintas regiones del cerebro. Además, en estos estudios se emplean potenciostatos, dificultando su aplicación en sensores portátiles.

En este sentido, uno de los trabajos más descriptivos es el de Yavich y Tiihonen [45]. En éste se diseña un dispositivo electrónico portátil para la cuantificación de la liberación de dopamina evocada. Como se muestra en la figura 23, se trata de un dispositivo sencillo, que consta de un convertidor de corriente a voltaje (y su amplificador operacional OPA), mismo que se conecta a los electrodos de manera directa a la rata. Tanto el electrodo contador como el de referencia se colocan durante la anestesia, mientras que el electrodo de trabajo puede cambiarse continuamente.

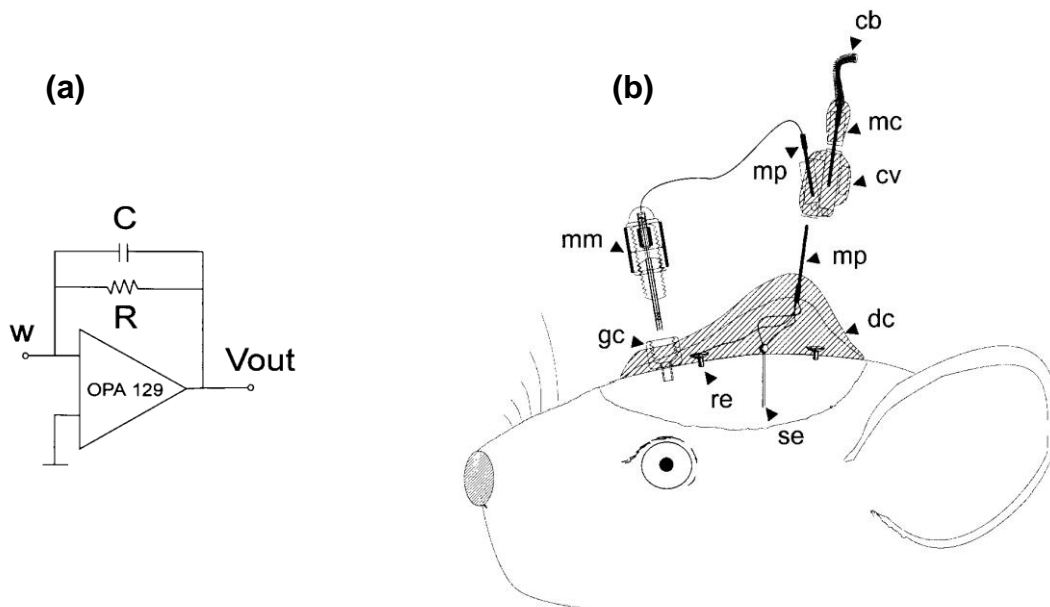


Figura 23 (a) Convertidor de corriente a voltaje empleado, así como (b) el dibujo esquemático del sistema adjunto al cráneo del ratón y los componentes móviles del sistema. Abreviaciones: mm, Micromanipulador; cv, convertidor de corriente a voltaje; mc, conector Microtech; cb, cable; mp, pin macho; gc, cánula guía; re, electrodo de referencia; se, electrodo de trabajo; dc, dos capas de cemento dental. [45]

Por los trabajos anteriormente mencionados surge la necesidad de diseñar electrodos para la detección *in vivo* de dopamina que sean poco invasivos, condición que se logra al contar con una sola incisión en el estriado por donde puedan introducirse los electrodos necesarios para la determinación.

Por otra parte, en el laboratorio de *Electroquímica Ambiental* de CIDETEQ ha aprovechado tanto las características estructurales de los dendrímeros PAMAM, así como las propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas metálicas para la detección de DA en fluidos biológicos como orina. En este sentido, se construyeron electrodos de carbón vítreo modificados con nanopartículas metálicas encapsuladas en dendrímeros PAMAM G4.0 - 64 OH, con lo cual se eliminaron los efectos de matriz y se alcanzaron límites de detección de 0.15 μM [15, 52].

De igual manera, se han construido electrodos de minas de grafito para detectar otros contaminantes orgánicos como ácidos organohalogenados y compuestos aromáticos policíclicos, alcanzando límites de detección de hasta 0.75mM y 52mM respectivamente, y comprobando que la respuesta electroquímica en estos materiales es reproducible [47, 56].

4. Justificación.

Con base en lo antes expuesto, los dispositivos electroquímicos portátiles representarán un aporte significativo a la ciencia médica, debido a que contribuirán en el estudio de los desórdenes ocasionados por el exceso o disminución de neurotransmisores, como la dopamina, en el cuerpo humano.

Para la construcción del sensor es importante una buena selección del material empleado como electrodo. En este sentido, el carbón y sus formas alótropas son usados frecuentemente debido a sus propiedades químicas, físicas y electroquímicas. Entre éstos, las puntillas de grafito son superiores en cuanto a sus propiedades, además de que son poco costosas y accesibles [57].

Sin embargo, cuando el grafito es expuesto a compuestos orgánicos, éstos tienden a presentar fenómenos de adsorción, lo cual origina problemas de sensibilidad, selectividad y reproducibilidad. De ahí que los electrodos de carbón sean modificados con materiales poliméricos para que se favorezca la determinación efectiva del analito [22,113-117]. Los dendrímeros de poli-amidoamina (PAMAM), han sido utilizados recientemente en la detección de DA en muestras biológicas reales [15,52].

Los dendrímeros PAMAM son polímeros altamente ramificados que crecen a partir de un núcleo, dando lugar a la presencia de cavidades internas capaces de pre-concentrar compuestos orgánicos e inorgánicos de tamaño apropiado, así como el confinamiento de material nanométrico. Este material confinado puede favorecer las reacciones catalíticas para el incremento de la detección de moléculas con importancia biológica, como la dopamina [32].

Una vez construidos los electrodos modificados es importante acoplar un dispositivo electrónico capaz de sensar la concentración de DA en el cerebro, que aproximadamente es de 94 nM en su nivel basal, y poder cuantificar las variaciones de ésta ante distintos estímulos. En este sentido, es importante que el electrodo auxiliar y/o electrodo de referencia se ubiquen junto al electrodo de trabajo, con el objetivo de no tener una disminución de señal debida a la separación de éstos en el tejido cerebral. Asimismo, el dispositivo portátil construido debe ser sencillo de utilizar, para que

cualquier usuario sea capaz de operarlo e interpretar el resultado directamente de una pantalla digital.

5. Hipótesis general.

La hipótesis a comprobar en este trabajo de investigación es:

El electrodo de grafito modificado organizadamente con materiales compositos de dendrímeros y nanopartículas de platino encapsuladas en éstos podría emplearse en la construcción de un dispositivo electrónico portátil para la determinación de dopamina en líquido cefalorraquídeo *in vivo*.

6. Objetivos.

6.1. Objetivo general

Diseñar, construir y caracterizar electrodos de grafito modificados con materiales compositos de dendrímeros y nanopartículas de platino encapsuladas en éstos para detectar electroquímicamente dopamina en líquido cefalorraquídeo con un límite de detección menor a 94 nM.

6.2. Objetivos particulares

1. Diseñar y construir electrodos modificados con dendrímeros PAMAM G4.0 – 64OH y/o nanopartículas de platino para la detección de dopamina en líquido cefalorraquídeo.
2. Caracterizar los electrodos modificados construidos para la determinación de dopamina en líquido cefalorraquídeo.
3. Evaluar la detección electroquímica de dopamina en líquido cefalorraquídeo con los electrodos modificados.
4. Detectar y cuantificar la DA en líquido cefalorraquídeo sintético e *in vivo* acoplado un dispositivo electrónico.

7. Metodología General.

De manera general, la metodología consta de 5 etapas:

En la primera se trabajó en el diseño de los electrodos para la detección y cuantificación de dopamina. Los soportes de los electrodos de trabajo seleccionados fueron minas de grafito, mismos que fueron posteriormente modificados con materiales compositos a base de dendrímeros PAMAM G4.0 – 64OH con y sin nanopartículas de Pt.

La segunda etapa consistió en comparar diferentes marcas comerciales de minas de grafito para emplearlas como soporte de electrodo. En la selección del soporte de electrodo, los parámetros que se consideraron fueron: la sensibilidad y la densidad de corriente ante adiciones sucesivas de dopamina en líquido cefalorraquídeo (LC), así como la evaluación de los límites de detección y cuantificación obtenidos a partir de estos experimentos amperométricos. Posteriormente, se llevó a cabo la construcción de los electrodos modificados con los dendrímeros PAMAM G4.0 – 64 OH con y sin nanopartículas de Pt empleando el mejor soporte de grafito seleccionado anteriormente, para lo cual se verificó que el procedimiento de prefuncionalización fuera adecuado al material para una mejor modificación.

Una vez realizada la modificación de los electrodos, se desarrolló la tercera etapa del proyecto, en donde los electrodos desnudos y modificados previamente seleccionados fueron caracterizados química y físicamente mediante: técnicas espectroscópicas como espectroscopia Raman, espectroscopia de impedancia electroquímica, entre otras. Además, en esta etapa se estudió la reacción de oxidación de dopamina en líquido cefalorraquídeo (LC) en presencia de las minas de carbón desnudas y modificadas, y una vez obtenidos los resultados se analizó el mecanismo de reacción electroquímico.

La cuarta etapa consistió en acoplar a un dispositivo electrónico aquel electrodo con la mayor sensibilidad y menores límites de detección y cuantificación ante la determinación de DA en LC, con el fin de realizar algunas determinaciones electroquímicas preliminares *in vivo*, para el posterior acoplamiento del sensor electrónico y electroquímico en un dispositivo portátil con potencial uso en el estudio de enfermedades neurodegenerativas.

En la última etapa del proyecto, se verificó que la mina de carbón modificada con dendrímeros PAMAM G4.0-64 OH fuera selectiva a dopamina, para lo cual se realizaron experimentos en líquido cefalorraquídeo humano (LCH). Con base en los resultados obtenidos con las muestras reales, resultó necesario el desarrollar la determinación electroquímica de la DA en disoluciones amortiguadoras de fosfatos a pH ácido y neutro, en las que se adicionaron distintas concentraciones de ácido ascórbico, quien es el principal interferente en la reacción de oxidación de Dopamina.

8. Desarrollo Experimental.

8.1. Electrodo de Grafito.

8.1.1. Selección del sustrato.

Para el soporte del electrodo, se compararon distintas marcas de puntillas en lo que refiere a su desempeño y sensibilidad como electrodos de trabajo, en la detección de dopamina en líquido cefalorraquídeo sintético (Figura 24). Para la selección del soporte de electrodo, los parámetros que se considerarán son: costo, sensibilidad, límites de detección y cuantificación.

Es así como se evaluaron 10 distintas marcas de puntillas de grafito comerciales, denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I y J (Figura 24). Por medio de cronoamperometría se midió la corriente límite obtenida al realizar adiciones sucesivas de estándar de dopamina, en régimen hidrodinámico. De esta manera, al cuantificar la corriente alcanzada 30 segundos después de cada adición, se realizó una curva de calibración con 10 adiciones sucesivas de estándar de DA en LCS (líquido cefalorraquídeo sintético), concluyéndose cada experimento en un tiempo total de 10 minutos. A partir de los resultados obtenidos, se obtuvieron la sensibilidad, así como el límite de detección y cuantificación de cada electrodo (Anexo V).



Figura 24 Imagen fotográfica de las distintas marcas comerciales de puntillas de grafito evaluadas técnicamente para la detección electroquímica de DA en LCS.

8.1.2. Prefuncionalización del electrodo de grafito

Previo a la modificación del sustrato de grafito, se consideró valorar la prefuncionalización para organizar los grupos funcionales interfaciales, previo al anclaje de otros materiales compuestos. Para realizar dicha experiencia, se empleó una celda de tres electrodos y se aplicaron potenciales de 0.6, 1.6 y 2.2 vs. Ag/AgCl 3M NaCl por 5 min al electrodo de grafito seleccionado como sustrato (longitud de 5mm y diámetro de 0.5mm) en H_2SO_4 0.5M con agitación constante a 24°C , esto con el fin de favorecer alguno de los grupos funcionales mencionados en el marco teórico [22, 52], los cuales son esenciales para la posterior modificación del sustrato [52] (Figura 25). Después del pretratamiento, cada electrodo fue enjuagado con agua desionizada.

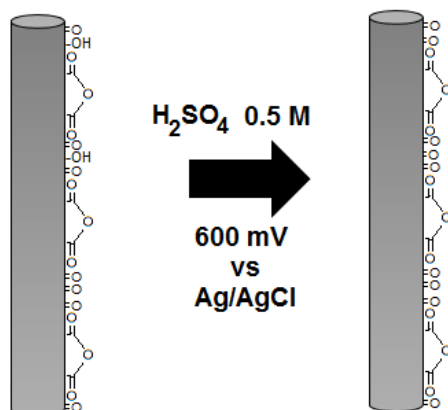


Figura 25 Representación de los grupos funcionales presentes sobre la puntilla de grafito, antes y después del anodizado para la prefuncionalización de los soportes de electrodo.

8.1.3. Caracterización del electrodo.

Se realizó un análisis de la superficie de los electrodos mediante técnicas espectroscópicas como Raman, fotoelectrones por Rayos X y emisión por plasma. Del mismo modo se realizaron experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica con el fin de obtener el área real de cada uno de los electrodos de grafito que se evaluaron.

8.1.3.1. *Espectroscopia de impedancia electroquímica.*

Se realizaron experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE), con el fin de determinar el área real de cada uno de los 10 electrodos. De esta manera, con un sistema de 3 electrodos y teniendo como electrolito soporte una disolución de NaF 0.9N [23], se obtuvieron los espectros correspondientes.

Posteriormente, cada espectro de EIE obtenido fue simulado computacionalmente, con el fin de deconvolucionar cada uno de los elementos del circuito equivalente y poder determinar el área real de cada uno de los electrodos. Posteriormente, los factores de rugosidad fueron calculados y las curvas de calibración previamente obtenidas fueron normalizadas en densidad de corriente. El electrodo que presentó menores límites de detección y cuantificación fue seleccionado, caracterizado y comparado con los nueve restantes (Anexo II – b).

8.1.3.2. *Espectroscopia de Plasma acoplado inductivamente (ICP).*

Por otra parte, se determinó la composición de los distintos electrodos por ICP. Las mediciones fueron realizadas en el laboratorio de análisis químico de CIDETEQ, acreditado por la norma ISO 9001:2000 (IMNC-RSGC 432 vigencia 2012.12.:3).

8.1.3.3. *Espectroscopia Raman.*

Para la caracterización de la superficie, se obtuvieron espectros RAMAN del electrodo seleccionado con el fin de detectar las vibraciones D y G, características de los materiales de carbón [23, 59, 60, 74, 75]. A partir de los espectros obtenidos al efectuar un mapeo de la superficie a distintos electrodos, se cuantificaron las intensidades de dichas bandas y se calculó su respectiva relación I_D/I_G . Al mismo tiempo, se obtuvieron imágenes con el microscopio del equipo con un lente de aumento de 10x. El equipo utilizado fue un micro-espectroscopio Raman marca Thermo Scientific.

8.1.3.4. *Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X.*

Se obtuvieron los espectros XP del electrodo de grafito desnudo, **G**, y prefuncionalizado, **G-PF**, con el fin de verificar que al pre-funcionalizar bajo las

condiciones establecidas en la metodología se modificara la estructura superficial del electrodo. Para las mediciones por XPS, se utilizó un espectroscopio marca Thermo con una fuente monocromática de aluminio y se realizó la deconvolución de los datos mediante el software AAnalyzer ® versión 1.09.

8.2. Modificación del electrodo de grafito con dendrímeros PAMAM G4.0 64OH.

8.2.1. Procedimiento de depósito de dendrímeros PAMAM G4-64OH.

Empleando una celda tres electrodos, se aplicaron 0.6, 1.6 y 2.2 V vs. Ag/AgCl 3M NaCl durante distintos tiempos (desde 15 a 60 min) al electrodo de grafito recién anodizado en presencia de NaF 0.1M y dendrímeros PAMAM G4.0 - 64OH 20 μ M, según lo reportado en trabajos previos [52]. Nuevamente, al final de la modificación los electrodos fueron enjuagados con agua (Figura 26).

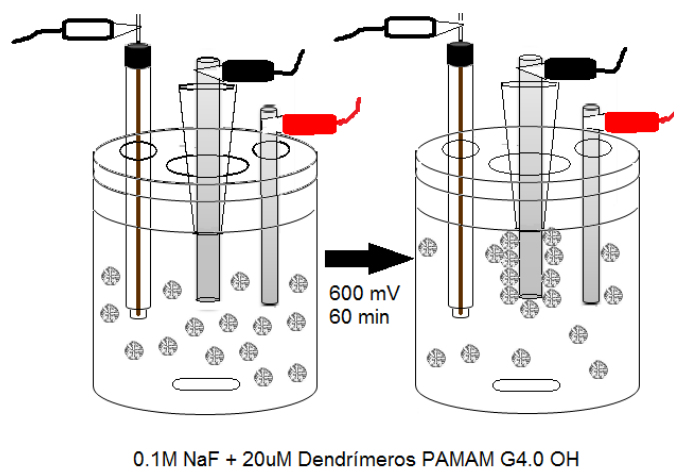


Figura 26 Representación del procedimiento de depósito de dendrímeros PAMAM G4.0 – 64OH sobre un electrodo de grafito.

8.2.2. Caracterización electroquímica del electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM.

Se obtuvieron espectros de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE), de cada electrodo modificado, en una disolución equimolar $K_3[Fe(CN)_6]$ | $K_4[Fe(CN)_6]$ en KCl 0.1 M como electrolito soporte. Estos experimentos se realizaron con el fin de estimar la fracción efectiva del recubrimiento superficial del dendrímero (Anexo II – a).

Para cada experimento, se aplicó el potencial de equilibrio de la molécula sonda, con una amplitud de 10 mV y un intervalo de frecuencia de 0.1 Hz a 100 kHz.

Posteriormente, empleando la técnica de voltamperometría cíclica se estudió el comportamiento de una molécula sonda, por lo que se efectuaron barridos a distintas velocidades, de 5 a 100 mV s^{-1} empleando los tres distintos electrodos: **G**, **G-PF** y **G-PAMAM** en una disolución de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ 1mM en KCl 0.1M.

8.2.3. Simplificación a un sistema de 2 electrodos.

Tomando en cuenta que la simplificación a un sistema de dos electrodos contribuye a la miniaturización, se optó por sustituir tanto el electrodo de trabajo como el de referencia por un alambre de plata recubierto con cloruro de plata (Figura 27).

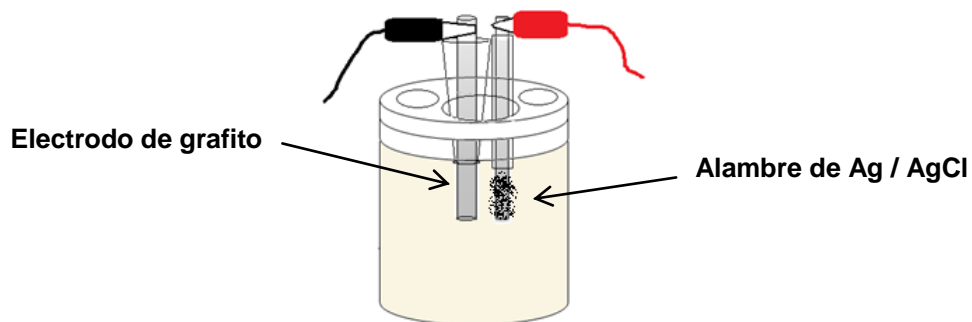


Figura 27 Representación esquemática de la simplificación a un sistema de 2 electrodos, compuesto por un electrodo de grafito y un alambre de Ag recubierto por AgCl.

Esto es posible debido a que el líquido cefalorraquídeo contiene una alta concentración de NaCl, comportándose como un electrodo idealmente no polarizable. El procedimiento para recubrir un electrodo de plata (alambre de 0.5 cm de longitud) con AgCl consistía en aplicar una corriente de $500\mu\text{A}$ en HCl 0.1 M durante dos minutos, para posteriormente enjuagar el electrodo con agua destilada. Los electrodos de Ag se preparaban antes de cada experimento sobre un alambre limpio y recién lijado.

Con el fin de verificar que la respuesta electroquímica de DA en estos dos sistemas fueran similares, se realizaron curvas de calibración por voltamperometría cíclica (VC) y cronoamperometría (CA). Una vez construidas dichas curvas, se determinaron los límites de detección y cuantificación, por lo que se demostró, a partir de éstos, que la

modificación del electrodo de grafito con dendrímero PAMAM lo hacía mucho más sensible a la reacción de oxidación de DA en LCS.

8.3. Modificación del electrodo de grafito con el compuesto DENs-Pt

8.3.1. Síntesis del compuesto DENs-Pt.

Con base en lo reportado en literatura, se sintetizaron nanopartículas de platino (DENs-Pt) en una secuencia de tres pasos: (1) se prepararon los complejos ion metálico – dendrímero, (2) se redujeron los iones encapsulados a su valencia cero y (3) se realizó una diálisis con el objetivo de purificar las DENs-Pt [15, 52].

Para la síntesis se emplearon dendrímeros PAMAM G4-OH, suspendidos en agua y adquiridos de Dendritech, Inc. (Midland, MI). Primeramente, se preparó una disolución 800 μM de PtNH_3Cl_4 , misma que posteriormente se mezcló con una disolución 20 μM de dendrímeros PAMAM G4.0 – 64 OH (40 átomos de Pt por dendrímero). Esta concentración de precursor se eligió al considerar que los dendrímeros PAMAM G4-OH tienen un total de 62 sitios en donde puede llevarse a cabo la coordinación de iones metálicos [85]. Dicha disolución permaneció en agitación constante por 65 horas, con el objetivo de que los iones metálicos se complejaran con las aminas internas de los dendrímeros (Figura 28-a).

Posteriormente, se sintetizaron las soluciones de dendrímeros que encapsulaban nanopartículas (DENs) por dos diferentes procedimientos: reducción química y microondas (Figura 28-b) [15, 26, 52]. En el caso de la reducción química, se adicionó disolución de NaBH_4 8mM [84] (10 veces la concentración de la sal) y permaneció en agitación constante por 12 horas. Para la reducción por microondas, se colocaron 5 mL de la disolución Pt^{+2} – dendrímero en un tubo de reacción, para posteriormente aplicarle 200 mW por 15 minutos en el reactor por microondas marca CEM [15], realizando dicho procedimiento a 4 distintas temperaturas: 40, 60, 80 y 100°C.

Por último, las soluciones de DENs se colocaron en una membrana de celulosa para diálisis (Spectrum Laboratories), en donde permanecieron durante 72 horas más, con el fin de eliminar alguna impureza existente en la disolución de DENs, así como los iones que no participaron en la formación de la nanopartícula metálica (Figura 28-c) [26, 52].

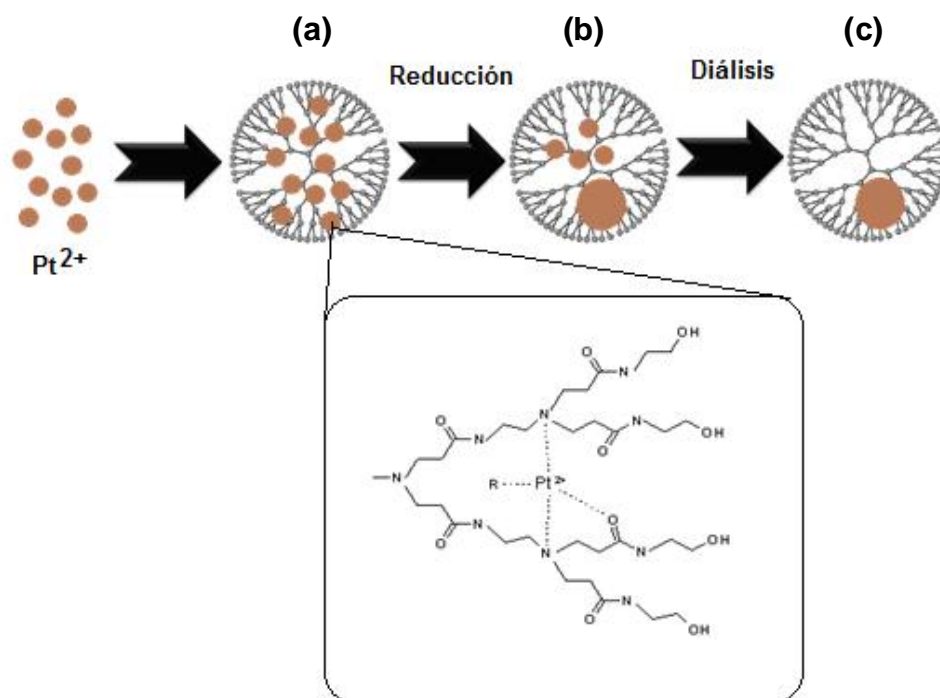


Figura 28 Representación esquemática de la metodología utilizada para la síntesis de DENs-Pt: **(a)** Formación de complejos ión Pt-dendrímico, **(b)** reducción química de iones Pt²⁺ a Pt⁰ y **(c)** diálisis para purificar las DENs formadas. Imagen adaptada de las referencias [15, 82].

Las disoluciones de DENs-Pt reducidas por ambos métodos fueron caracterizadas por espectrofotometría de UV-Visible, microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés, *Transmission Electronic Microscopy*) y Difracción de electrones (DE).

Los espectros de UV - Vis se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro UV - Visible modelo USB4000-UV-VIS marca Ocean Optics. A partir de éstos fue posible monitorear el curso de la reacción de síntesis de las DENs, así como la determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ) de cada una de las soluciones sintetizadas.

Para el análisis por TEM y DE se utilizó un microscopio de transmisión electrónica marca TITAN, operado a un voltaje de aceleración de 300 kV. Una vez obtenidas las imágenes, se determinó el tamaño de las partículas, así como su orientación cristalográfica.

8.3.2. Depósito de DENs-Pt sobre electrodos de grafito.

Para la construcción del electrodo de grafito modificado con nanopartículas de platino encapsuladas en dendrímeros PAMAM G4-64OH (electrodo **G – DENs - Pt**) se siguió la misma metodología empleada para la construcción del electrodo **G - PAMAM**; es decir, una vez sintetizada la disolución, se le adicionó el NaF suficiente para tener una concentración 0.1M en la celda.

8.3.3. Cuantificación de DA en LCS empleando los electrodos G- DENs - Pt.

Una vez contruidos los electrodos **G – DENs – Pt**, estos inmediatamente se enjuagaron en agua destilada y se utilizaron para la construcción de curvas de calibración de DA en LCS, a través de las cuales se cuantificó la corriente límite obtenida a partir de la imposición de 300 mV vs. Ag/AgCl 3M NaCl durante un tiempo total de 2 minutos. Asimismo, a partir de las curvas de calibración construidas se determinaron la sensibilidad, así como los límites de detección y cuantificación de dicho electrodo. A partir de las distintas modificaciones al electrodo, se seleccionó la que presentó mayor sensibilidad y límites de detección y cuantificación más bajos.

8.4. Acoplamiento del sistema electroquímico al dispositivo electrónico.

8.4.1. Construcción de las curvas de calibración de DA en LCS con el dispositivo electrónico.

Se preparó una disolución stock de DA en DAF y utilizando el sistema de 2 electrodos se tomó registro de la intensidad de corriente y de la concentración al adicionar alícuotas de la disolución stock de DA en DAF, en donde los valores de corriente se desplegaban en la pantalla de cristal líquido, perteneciente a un dispositivo electrónico portátil diseñado en CIDETEQ (Anexo III) y los cuales correspondían a la cantidad de DA que se oxidaba al aplicar un voltaje de 300 mV.

A partir de estas mediciones, se construyeron curvas de calibración y se comparó el desempeño del dispositivo electrónico con un potenciostato.

8.4.2. Pruebas de determinación electroquímica de DA en Murino *in vivo*.

Una vez verificado a nivel laboratorio el detector electroquímico de G – portátil para determinar dopamina en cerebro de rata mediante el ajuste de todas las variables experimentales, se realizaron las pruebas *in – vivo*.

Para el logro de dicha actividad participaron los doctores Paul Carrillo Mora, Irma Daniela Silva Adaya, Abel Santamaría del Ángel y Emma Ortiz Islas del Laboratorio de Aminoácidos Excitadores ubicado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS, en coordinación con la doctora Tessy María López Goerne del Laboratorio de Nanotecnología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS, y la Universidad Autónoma Metropolitana.

Durante este experimento, se introdujo una cánula de microdiálisis en el estriado de dos ratas Wistar mediante intervención quirúrgica (Figura 29), de manera que ésta funcionara como el canal por donde pasaría el electrodo modificado, mientras que el electrodo de plata recubierto por AgCl fue fijado en el estriado. Una vez transcurridos ocho días, tiempo necesario para que la rata se recupere de la cirugía anterior, se realizaron las mediciones.

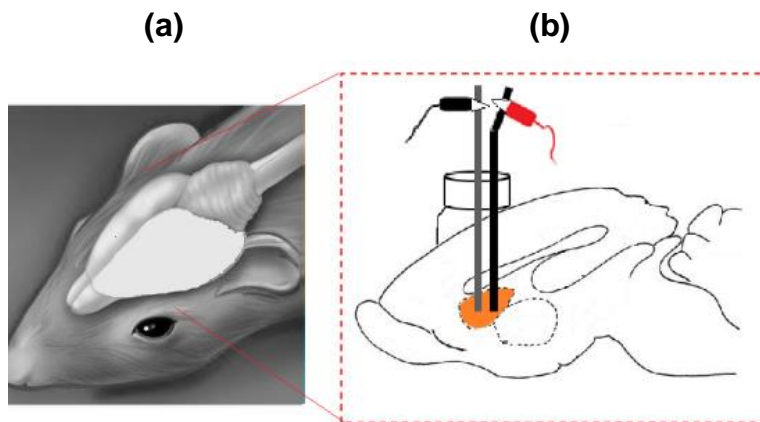


Figura 29 Representación esquemática del cerebro de una rata (a), así como el corte transversal del mismo (b), resaltando la ubicación del estriado y la distribución de los electrodos.

8.5. Análisis de la selectividad del electrodo.

8.5.1. Pruebas preliminares de selectividad en líquido cefalorraquídeo real.

Se empleó Voltamperometría Cíclica para conocer la ventana de potencial del líquido cefalorraquídeo humano (LCH) empleando como electrodo de trabajo los diferentes electrodos en estudio: G, G – PF y G – PAMAM. Una vez que se registraron las ventanas de potencial, se realizaron adiciones consecutivas de DA y AA al LCH para saber sus respectivos potenciales de oxidación, y verificar su competencia a la transferencia electrónica en el mismo potencial termodinámico bajo las mismas condiciones experimentales.

8.5.2. Análisis de la selectividad de los electrodos en disoluciones sintéticas.

Con el fin de verificar la selectividad de la detección electroquímica de DA sobre el G, G – PF y G – PAMAM se realizaron adiciones consecutivas de DA y AA en líquido cefalorraquídeo sintético, así como en una disolución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 y 2.0 ($i=0.1$). Además, con cada una de las diferentes concentraciones en la celda electroquímica de tres electrodos se efectuaron diferentes barridos de potencial a distintas velocidades de barrido, con el fin de verificar la difusión de la DA y AA hacia la superficie de cada electrodo en estudio.

9. Discusión de Resultados.

9.1. Electrodo de grafito.

9.1.1. Caracterización y selección del sustrato de grafito.

Para llevar a cabo la caracterización de los distintos electrodos de grafito se consideró realizar análisis por ICP de cada uno de ellos (Tabla 5). Estos resultados proporcionaron la composición elemental de los distintos electrodos, a partir de los cuales se determinó que todos poseen Fe, Na, K, Ca y Mg y algunos presentan Ni, V, W y Li.

Tabla 5 Composición de los electrodos de grafito, de acuerdo a los experimentos de ICP.

Elemento (% Peso)	Electrodo									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Fe	0.041	0.052	0.168	0.05	0.027	0.0472	0.0089	0.011	0.095	0.075
Na	0.043	0.023	0.026	0.244	0.04	0.036	0.041	0.21	0.053	0.046
K	0.049	0.0262	0.087	0.068	0.046	0.039	0.036	0.033	0.043	0.035
Ca	0.041	0.031	0.112	0.088	0.045	0.053	0.04	0.032	0.201	0.106
Mg	0.018	0.0043	0.069	0.045	0.011	0.01	0.011	0.0079	0.173	0.056
Ni	-	-	-	0.0027	-	-	-	-	-	0.0015
V	-	-	0.0025	-	-	-	-	-	-	-
W	-	-	-	-	0.0068	-	0.0076	0.0065	0.0068	0.0053
Li	-	-	-	-	0.016	0.012	0.0094	0.015	-	-

Por lo anterior, surgió la necesidad de emplear otra técnica de análisis como la espectroscopia Raman con la cual se obtuvieron las intensidades Raman correspondientes a la banda (D) y la (G), respectivamente, así como las relaciones entre ambas (I_D/I_G) y las distancias intraplanares (L_a) del grafito cristalino (Tabla 6).

Tabla 6. Intensidades de los picos D y G de los electrodos de grafito comparados, y su relación I_D/I_G correspondiente.

Electrodo	Intensidad Raman / cps		Relación I_D/I_G	La / Å°
	I_D	I_G		
A	24.50	22.51	1.09	38.15
B	32.01	39.3	0.81	51.34
C	45.42	49.85	0.91	45.70
D	40.62	38.7	1.05	39.60
E	33.44	32.64	1.03	40.37
F	31.13	30.94	1.01	41.17
G	31.9	39.28	0.81	51.34
H	37.38	39.52	0.95	43.77
I	45.62	46.21	0.99	42.00
J	39.11	41.43	0.94	44.24

A partir de la tabla anterior se concluye que todos los electrodos comparados tienen estructuras cristalinas de distancias intraplanares cortas (~ 50 Å°), mucho menores a las esperadas en materiales gráfiticos (Tabla 2).

Posteriormente se realizaron las curvas de calibración amperométricas empleando los distintos electrodos. En la tabla 7 se comparan la ecuación de la curva de calibración, sensibilidad, límites de detección (LD) y de cuantificación (LC). Es importante resaltar que aunque las sensibilidades eran del mismo orden de magnitud, el menor límite de cuantificación se logró con el electrodo **A** (Anexo VI).

Tabla 7 Parámetros determinados de las curvas de calibración por cronoamperometría con adiciones sucesivas de estándar de dopamina 10mM con agitación constante. Ecuación de la recta, LD= Límite de Detección, LC= Límite de Cuantificación, sensibilidad y área real del electrodo determinada por EIS. (Anexo VI)

Electrodo	Área real (cm ²)	Ecuación (j/mAcm ⁻² , [Dopamina]/ppm)	r ²	LD (ppb)	LC (ppb)	Sensibilidad (uAcm ⁻² mol ⁻¹)
A	1.28	j = 0.35 [Dopamina] + 0.06	0.9992	1.73 ± 0.15	5.75 ± 0.5051	0.35
B	1.33	j = 0.26 [Dopamina] + 0.05	0.9997	47.18 ± 4.75	157.28 ± 15.83	0.26
C	2.56	j =0.16 [Dopamina] + 0.02	0.9996	47.44 ± 16.42	158.12 ± 54.73	0.16
D	0.90	j =0.48 [Dopamina] + 0.01	0.9996	2.046 ± 0.08	6.82 ± 0.24	0.48
E	0.91	j =0.42 [Dopamina] + 0.03	0.9995	18.37 ± 0.50	61.22 ± 1.64	0.42
F	0.93	j =0.48 [Dopamina] + 0.02	0.9991	1.98 ± 0.08	6.60 ± 0.27	0.48
G	0.51	j =0.79 [Dopamina] - 0.01	0.9988	8.48 ± 2.39	28.25 ± 7.97	0.79
H	0.64	j =0.61 [Dopamina] + 0.09	0.9978	10.44 ± 1.71	34.81 ± 5.71	0.61
I	7.92	j =0.04 [Dopamina] + 0.03	0.9988	19.46 ± 2.36	64.85 ± 7.85	0.04
J	11.60	j =0.03 [Dopamina] + 0.13	0.9938	1021.09 ± 122.53	3403.63 ± 408.44	0.31

En la segunda columna de la tabla 7 se presenta el área real de cada uno de los electrodos de grafito en estudio, las cuales fueron determinadas a partir de los experimentos llevados a cabo mediante EIS (Anexo II-b). Con estas áreas se normalizaron todas las corrientes obtenidas a partir de las curvas de calibración.

De los resultados previos, se seleccionó al electrodo **A** como el sustrato a utilizar en el detector, ya que aunque su sensibilidad es ligeramente menor a los electrodos D, E, F, G y H, el límite de cuantificación es mucho menor al resto. Se presume que debido a que posee la relación I_D/I_G más alta y por ende, mayor cantidad de defectos en su microestructura, es el electrodo más sensible. Lo anterior se explica en el hecho de que los grupos superficiales presentes en los bordes de la microestructura son los responsables de la alta reactividad del grafito [75].

Con el fin de corroborar que la rugosidad del electrodo fuera proporcional a su área geométrica, se efectuaron nuevos experimentos de EIS a distintas longitudes de electrodo expuesto, en un rango de 2 a 8 mm (Anexo II - b), concluyendo que el factor de rugosidad del electrodo **A** es de 19.582, con una desviación estándar de 0.9897, con lo cual se concluye que la rugosidad del electrodo seleccionado es independiente de su área geométrica. Este hecho indica que independientemente del área geométrica del electrodo ($2\text{mm} < A_g < 8\text{mm}$), los límites de detección y cuantificación serán los mismos (1.73 y 5.75 ppb, respectivamente).

Por lo anterior, al seleccionar el electrodo **A** como el mejor sustrato para detectar dopamina en líquido cefalorraquídeo sintético, a partir de este momento se decidió cambiar la nomenclatura del electrodo **A** por electrodo **G**.

9.1.2. Prefuncionalización del electrodo de grafito.

En el carbón y superficies similares, tres potenciales de pico definen la formación de hidroquinona, anhídrido ftálico y ácido carboxílico, los cuales son 0.6, 1.6 y 2.2 V vs. Ag/AgCl 3M NaCl, respectivamente en H_2SO_4 0.5M [22, 52]. Para conocer si se podían evidenciar alguno de estos grupos superficiales, se obtuvo un voltamperograma cíclico del electrodo **G** en una disolución de H_2SO_4 0.5M (Figura 30). De esta manera, en el voltamperograma cíclico mostrado en la figura 30 se puede observar que a 600mV en disolución H_2SO_4 0.5M se presenta la reacción de reducción de hidroquinona, y en el

sentido inverso de oxidación la quinona, presentándose el conocido par quinona - hidroquinona, y al llevarlo a mayores sobrepotenciales de oxidación ya no se observó respuesta electroquímica alguna.

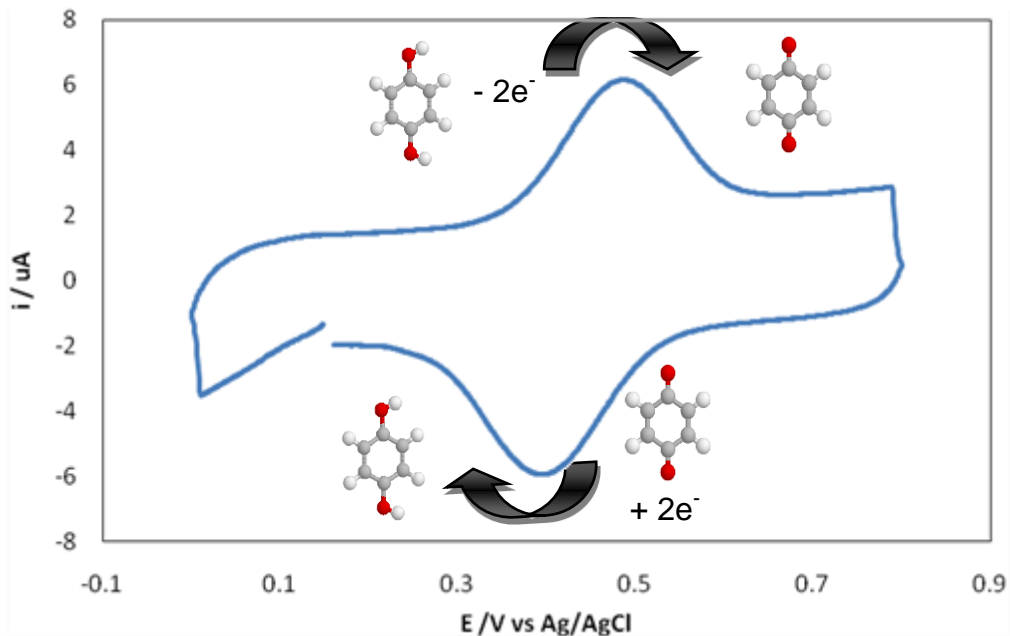


Figura 30 Voltamperograma cíclico de un electrodo de grafito en H_2SO_4 0.5M, con una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} .

Enseguida se realizaron cronoamperometrías aplicando de manera constante y bajo agitación 0.6, 1.6 y 2.2 V vs Ag/AgCl, hasta llegar a la corriente límite. Cabe destacar que al aplicar 1.6 y 2.2 V vs Ag/AgCl se destruía el material de grafito al generarse oxígeno sobre la superficie del electrodo debido a la electrólisis del agua. De esta manera, se decidió aplicar 0.6 V vs Ag/AgCl para la prefuncionalización del material gráfico, como se muestra en el cronoamperograma de la figura 31.

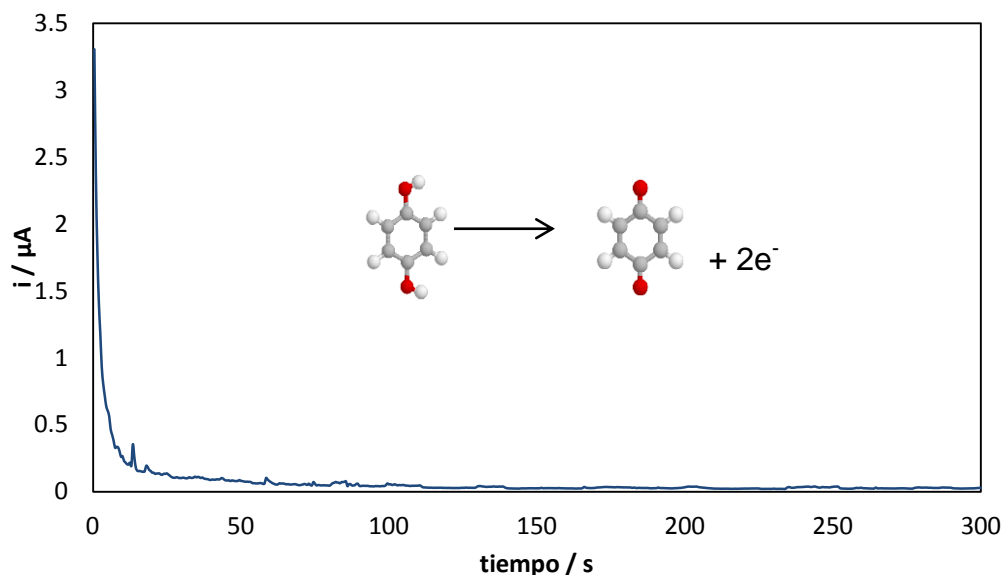


Figura 31 Cronoamperograma resultante del pretratamiento al electrodo de grafito, mediante la aplicación de 0.6 V vs Ag/AgCl

Una vez prefuncionalizado el electrodo de grafito, se decidió verificar que la superficie electródica del sustrato **G** sufriera una modificación mediante espectroscopia XPS. A continuación se muestra el espectro XPS del sustrato, en donde se destaca cada una de las señales características del C 1s, Ca 2p, O 1s (Figura 32) y en el mismo espectro se observa la señal del In 3d característica del porta-muestra.

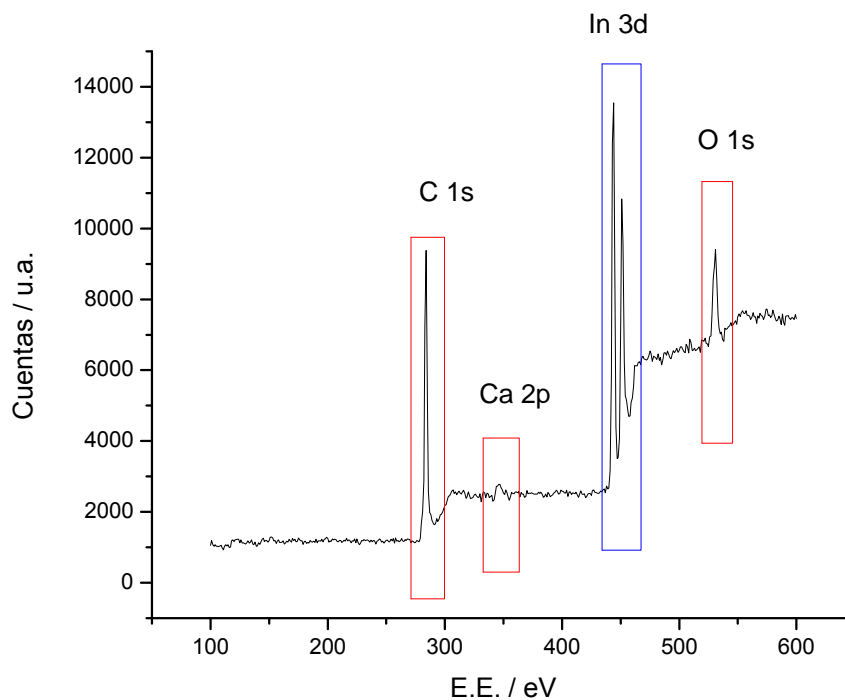


Figura 32 Espectros XPS del electrodo de Grafito, **G**.

Al deconvolucionar y comparar la señal correspondiente al C 1s para el sustrato de grafito **G** (Figura 32- a), y para el electrodo pre-funcionalizado, **G-PF** (Figura 32- b), se observa que el espectro cambia drásticamente al efectuar el tratamiento.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, el espectro de grafito se puede deconvolucionar en distintas señales, de acuerdo a su energía de enlace: de 284.5 - 284.9 eV se detecta la correspondiente al carbono grafitico; por otra parte, la señal del carbono unido con oxígeno mediante un enlace sencillo, como en el caso de los fenoles, cercano a los 285 eV; los grupos tipo quinona, con dobles enlaces carbono - oxígeno se identifican a energías cercanas a los 286.7 eV, mientras que cerca de los 287.6 eV, se identificó el enlace carbono – oxígeno debido a la presencia de ácidos carboxílicos, anhídridos y ésteres [60, 74, 75, 112].

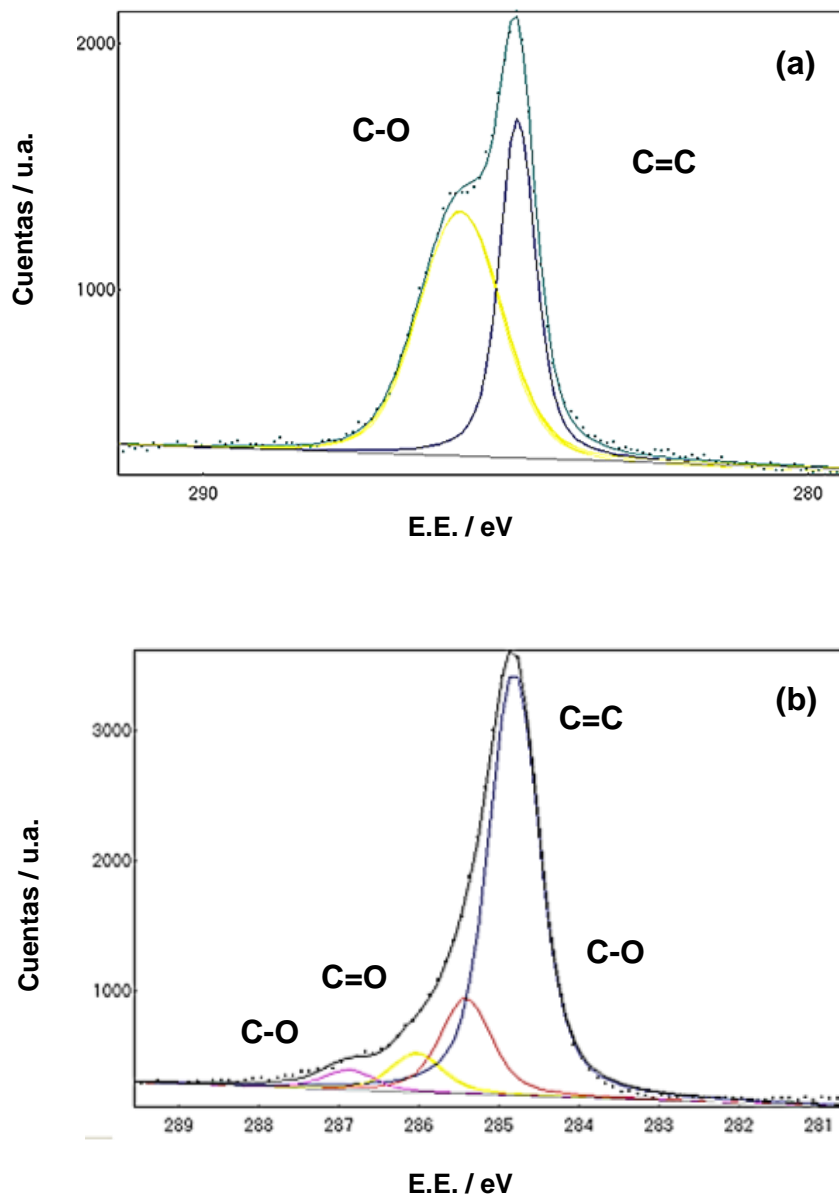


Figura 33 Espectros XPS de un electrodo **G (a)** y **G-PF (b)**, así como la deconvolución de sus respectivas señales.

En este sentido, al deconvolucionar los espectros fue posible la determinación del área de cada banda, como se muestra en la tabla 8:

Tabla 8 Resultados de la deconvolución de los espectros XPS de los electrodos **G** y **GPF**.

Electrodo	Energía de enlace / eV	Asignación	Área / u.a.	Electrodo	Energía de enlace / eV	Asignación	Área / u.a.
G	284.8	C=C	1259.3	G-PF	284.8	C=C	3017.52
	285.8	C-O	1876.3		285.4	C-O	717.84
	286.7	C=O	0		286.7	C=O	297.83
	287.6	C-O	0		287.6	C-O	150.34

De las señales asignadas a cada energía de enlace, es importante destacar que en el electrodo **G** se tenía una gran cantidad de grupos funcionales hidroxilo, misma que disminuye considerablemente al efectuarse el pretratamiento al electrodo. Por otra parte, la banda correspondiente a átomos de carbono del tipo carbonílico y carboxílico a 286.7 eV y 287.6, son detectadas solamente en el electrodo **G-PF**. De estos resultados podemos entonces concluir que al pre-funcionalizar el electrodo en ácido sulfúrico se favorece la presencia de grupos del tipo quinona, en una mayor proporción, destacando también la presencia de otros grupos, como ácidos carboxílicos o anhídridos de estos ácidos.

9.2. Electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM G4.0 - 64OH.

Debido a la conveniencia de modificar con dendrímeros las superficies de electrodos de grafito, confiriéndoles una propiedad de pre-concentración de dopamina para su consecuente detección electroquímica. Se realizaron las modificaciones correspondientes y se caracterizó la superficie del electrodo.

9.2.1. Caracterización por espectroscopia Raman del electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM.

De esta manera, en la figura 38 se muestra el gráfico en 3D de los mapeos realizados a los electrodos **G**, **G-PF** y **G-PAMAM**. Además se presenta el espectro promedio de cada uno de los mapeos, en donde se observan las dos señales D (1300 cm^{-1}) y G (1580 cm^{-1}), reportadas para los materiales carbonosos (figura 34-a).

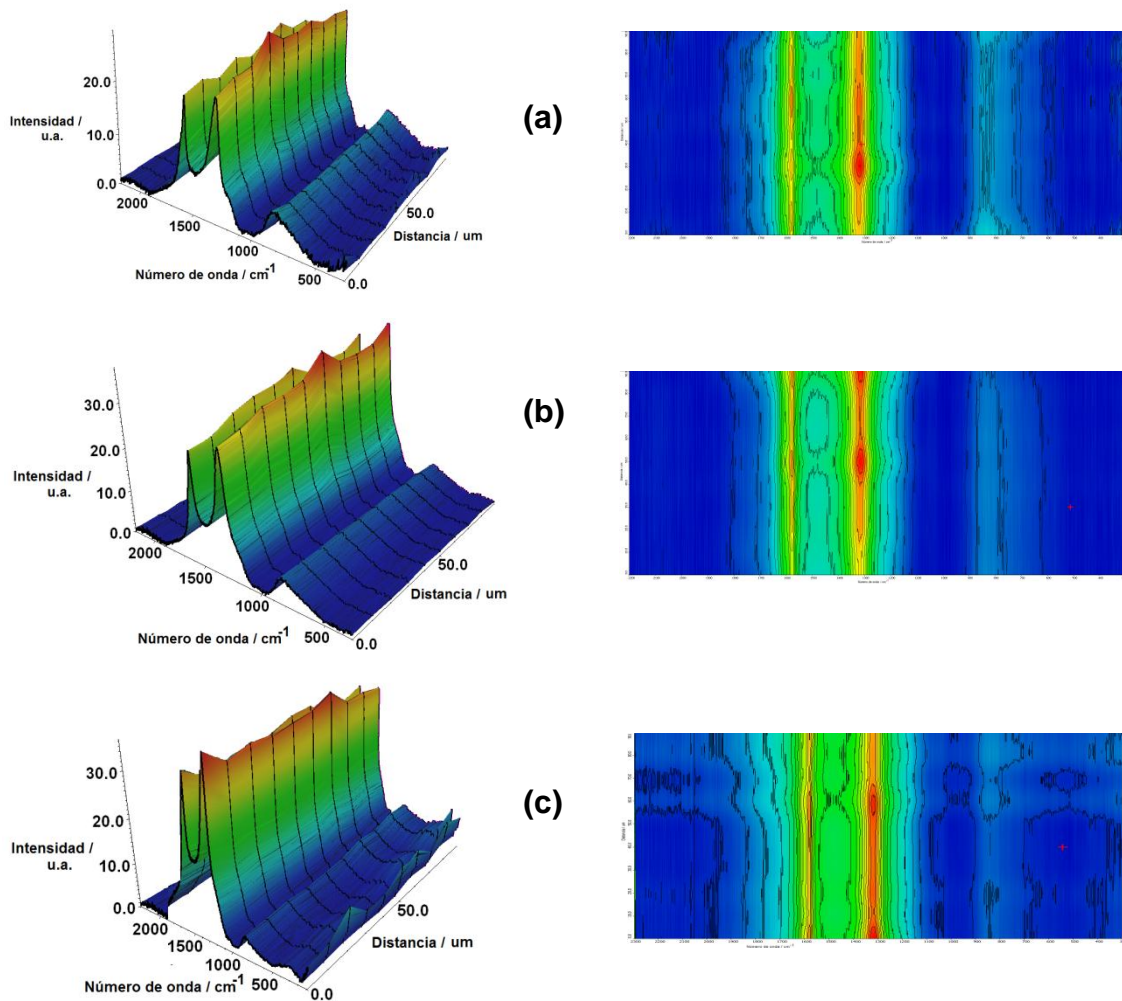


Figura 34 Espectro Raman en 3D obtenido a partir del mapeo de la superficie, así como los gráficas de superficie (el color es indicativo de la intensidad Raman a lo largo de la superficie mapeada) de los electrodos **G** (a), **GPF** (b) y **GPAMAM** (c).

A partir de estos espectros, se determinó la relación de intensidades I_D/I_G (figura 35-b, Tabla 9) para cada uno de los electrodos.

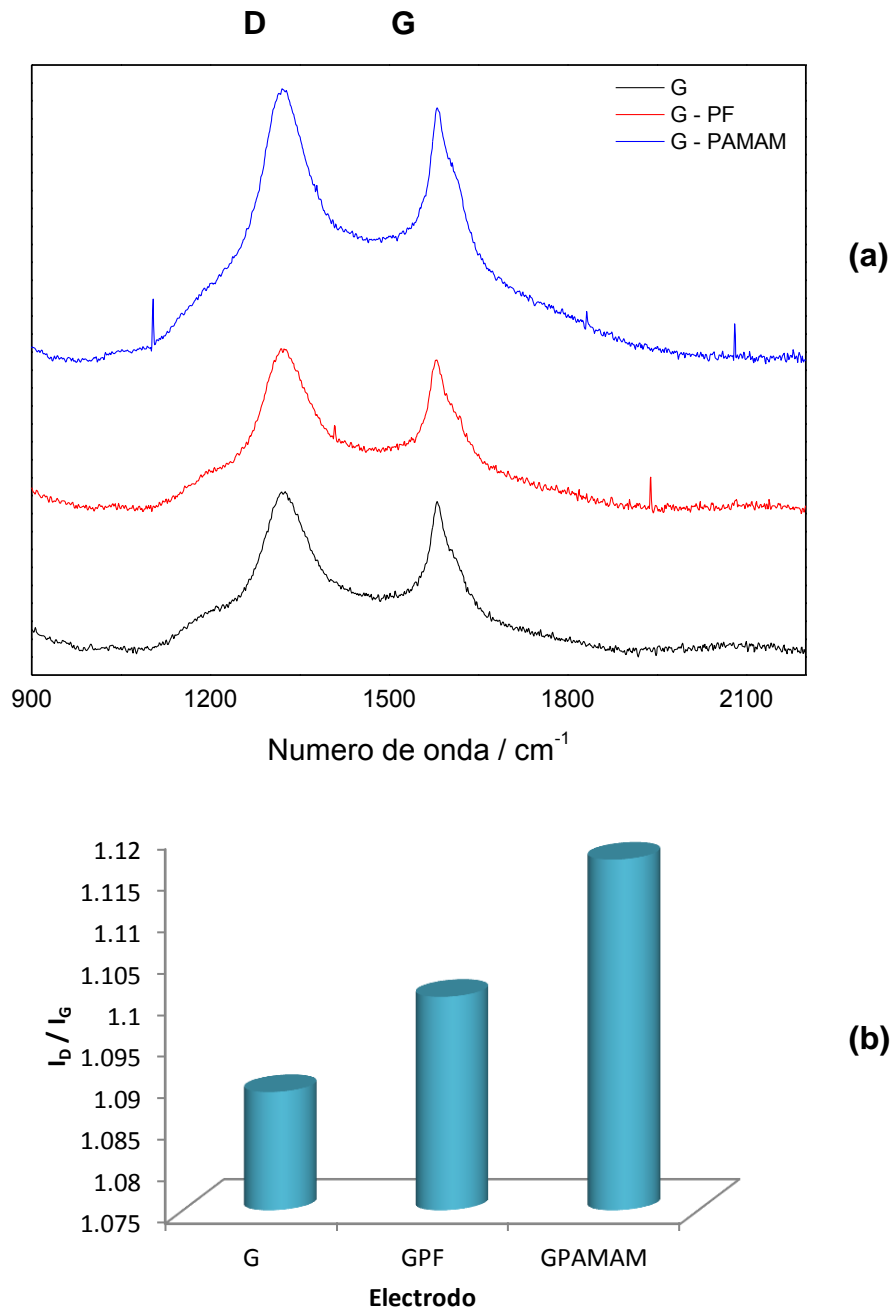


Figura 35 (a) Espectros Raman de los electrodos **G**, **GPF** y **GPAMAM**, así como **(b)** un gráfico de las intensidades I_D/I_G determinadas a partir de dichos espectros.

Tabla 9 Intensidades I_D e I_G y relación de éstas (I_D/I_G) determinadas a partir de los espectros Raman de los electrodos **G**, **GPF** y **GPAMAM**, así como la distancia intraplano, L_a , de la estructura cristalina del grafito.

Electrodo	I_D	I_G	I_D/I_G	$L_a / \text{Å}$
G	24.50	22.51	1.09	38.15
GPF	25.33	23.00	1.10	37.80
GPAMAM	41.21	36.89	1.12	37.13

A partir de la variación de la intensidad de las señales I_D del electrodo de grafito desnudo (**G**) y el modificado (**G – PAMAM**) se puede aseverar que se está modificando la estructura superficial del electrodo al depositar en él dendrímeros PAMAM, es decir, que la cantidad de defectos en la estructura cristalina esperada en el grafito aumenta (de 24.50 a 41.21) al depositarse este polímero con los grupos superficiales del grafito. Por otra parte, el incremento en la intensidad de la banda G (de 22.51 a 36.89) podría deberse al aumento de carbono sp^2 debido a las ramificaciones del propio dendrímero.

Adicionalmente, en la en la tercera columna de la tabla 9 se presenta la relación entre intensidades (I_D/I_G) de cada electrodo, misma que se relaciona con la cristalinidad de la microestructura de grafito (apartado 2.2.1.3). Sin embargo, con estos resultados se observa que no existe una variación considerable de la relación I_D/I_G , ya que es 1.09 para el electrodo **G** y 1.12 para el electrodo **G – PAMAM**, por lo que se calculó la distancia intraplano de la microestructura (L_a) a partir de la ecuación presentada en la figura 14. Al realizar el comparativo de L_a para el **G**, **G - PF** y **G – PAMAM**, se confirma que no existe prácticamente una diferencia debida al cambio de estructura del carbón al modificarse con dendrímeros, pues los valores fueron de 38.15, 37.80 y 37.13, respectivamente.

Además, la relación I_D/I_G obtenida para los materiales en estudio es comparable con la reportada por Liu ($I_D/I_G = 1.4$) para electrodos de fibras de carbón que han sido empleadas satisfactoriamente en la detección simultánea de DA, AU y AA [102].

9.2.2. Caracterización electroquímica del electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM.

Los espectros de impedancia (empleando el par $K_3[Fe(CN)_6] | K_4[Fe(CN)_6]$) obtenidos se presentan en la figura siguiente (Figura 36). Se observa una mayor resistencia a la transferencia de carga en el electrodo **G-PAMAM** que en el electrodo sin modificar **G** por el incremento del semicírculo capacitivo en altas frecuencias, lo que indica un mayor bloqueo superficial para la transferencia de carga de la molécula sonda por parte de los dendrímeros PAMAM en el caso del electrodo modificado **G – PAMAM** [26].

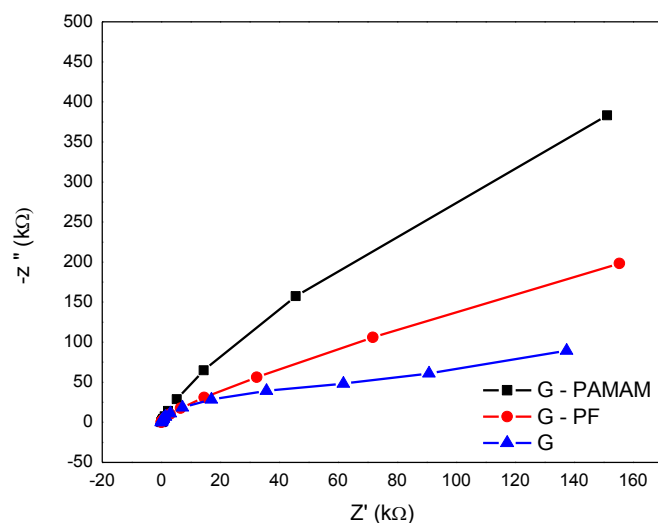


Figura 36 Gráficos de Nyquist de los experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica, usando: **G**, **G-PF** y **G-PAMAM**. Espectros obtenidos aplicando el potencial de equilibrio de $K_3Fe(CN)_6 | K_4Fe(CN)_6$ 1 mM en KCl 0.1 M con frecuencias de 0.1 Hz a 100 kHz con 10 mV de amplitud.

En los distintos espectros se observa una línea de 45° que es característica de la difusión de Warburg, la cual domina en un gran rango de frecuencias (10 Hz – 0.1 Hz), mientras que a altas frecuencias (>10 Hz), se presenta un pequeño semicírculo. El dominio de la impedancia de Warburg indica que la reacción redox es controlada por difusión sobre un gran rango de frecuencias [26].

Por otra parte, en el electrodo modificado con dendrímeros se incrementa la resistencia a la transferencia de carga, R_{CT} , lo cual se observó al incrementar la impedancia imaginaria en la región cercana a los 30kΩ, probablemente debido al bloqueo

superficial de los dendrímeros sobre el grafito y, por lo tanto (Figura 36), se aumenta el radio del semicírculo a altas frecuencias en comparación al grafito desnudo, mientras que la impedancia de Warburg disminuye.

Los resultados anteriores fueron ajustados a un circuito de Randles modificado (Anexo II - a). A partir de este ajuste se obtuvo el valor de la resistencia a la transferencia de carga para cada uno de los electrodos modificados y, posteriormente con este valor, se calculó la fracción de recubrimiento superficial aparente (θ) y de área activa ($1-\theta$) como se muestra en la tabla 10, de donde se destaca que un 18% del electrodo G-PF es recubierto por dendrímero en el electrodo G-PAMAM, quedando un 82% del electrodo de grafito completamente accesible a la molécula redox.

Tabla 10 Resistencia a la transferencia de carga (R_T), fracción de recubrimiento superficial aparente (θ) y de área activa ($1-\theta$) de los diferentes electrodos modificados, los cuales fueron caracterizados en KCl 0.1 M conteniendo $K_3Fe(CN)_6$ | $K_4Fe(CN)_6$ 1 mM en atmósfera de N_2 .

Electrodo	$R_{TC} / \Omega cm^2$	θ	(1- θ)
G – PF	117.59	0	1
G - PAMAM	142.65	0.18	0.82

9.2.3. Respuesta voltamperométrica de una molécula sonda.

A continuación se muestran los voltamperogramas cíclicos correspondientes a la reacción redox de $Ru^{+2}(NH_3)_6$ | $Ru^{+3}(NH_3)_6$ en la molécula $Ru(NH_3)_6Cl_2$ para los electrodos **G**, **G-PF** y **G-PAMAM** a 100 mV s^{-1} (Figura 37 a). Es evidente que en el voltamperograma del electrodo G-PAMAM los picos voltamperométricos de la oxidación y reducción de la molécula sonda se vuelven más anchos reflejando, de manera indirecta, que el electrodo fue modificado. La forma de los picos puede deberse al aumento en la R_{TC} cuando el electrodo se modifica con dendrímeros, así como a la pre-concentración de la molécula en la interfase, propiedad característica de los dendrímeros.

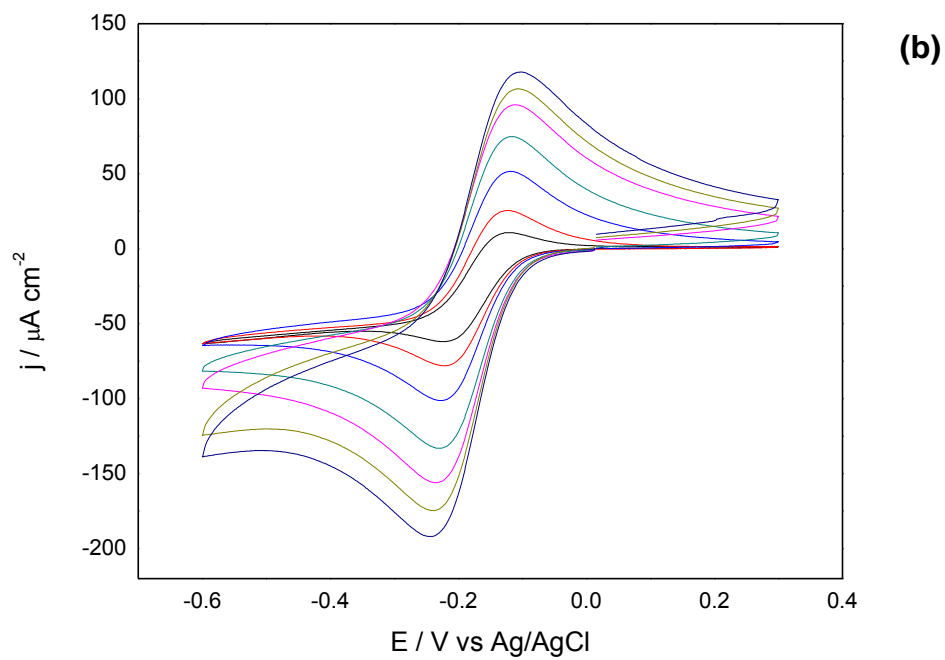
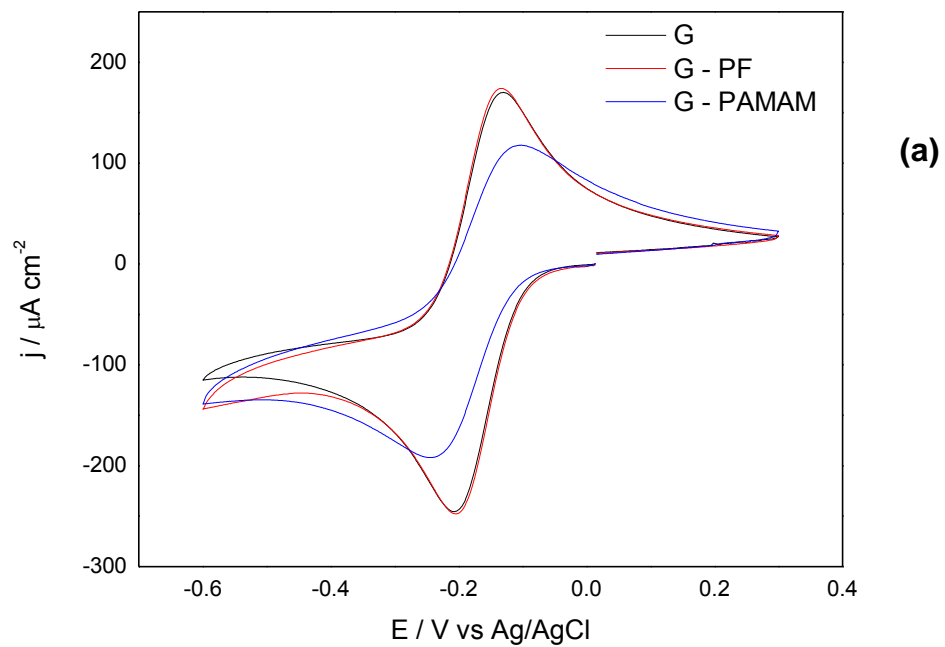


Figura 37 (a) Comparación entre los VC (100 mVs^{-1}) en presencia de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2]$ 1mM empleando los 3 electrodos. (b) VC realizados a distintas velocidades de barrido con el electrodo G.

En la figura 37 b se muestran los VC realizados a distintas velocidades de barrido empleando la molécula sonda, en este caso para el electrodo de grafito. De la misma manera, se realizaron las mismas pruebas para el electrodo de G – PF y G – PAMAM, por lo que se graficó para cada electrodo su correspondiente i_c vs v , y de esta manera se comprobó que al ser la corriente de reducción de la molécula sonda directamente proporcional a la velocidad de barrido, el proceso electroquímico está controlado por difusión en todos los casos (Figura 38), sin embargo la pendiente de la recta correspondiente al electrodo modificado con dendrímeros es menor, lo que refleja que la difusión de la molécula sonda es más lenta al estar presente el dendrímero en la interfase.

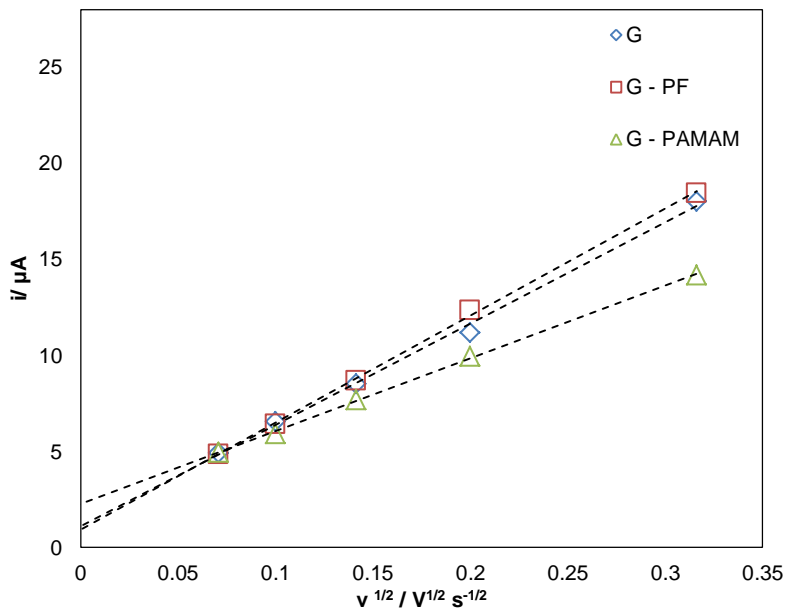


Figura 38 Gráficas de i_c vs $v^{1/2}$ empleando los electrodos **G**, **G-PF** y **G-PAMAM**, a partir de los VC en presencia de la molécula sonda.

De acuerdo a reportes previos del grupo de trabajo, se ha obtenido hasta un 96% de recubrimiento superficial de dendrímeros PAMAM sobre electrodos de carbón vítreo al prefuncionalizar a un potencial donde predominantemente se generan anhídridos ftálicos superficiales, por lo que se sugiere que es a través de estos compuestos por donde se fija covalentemente el dendrímero al electrodo [15, 52].

Asimismo Crooks y colaboradores [118] proponen que debido a los átomos de oxígeno de los anhídridos ftálicos y de los grupos hidroxilo terminales del dendrímero tienen valencias insaturadas, se forma un enlace tipo éster (Figura 39).

De esta manera al prefuncionalizar el electrodo de grafito (0.6 V vs Ag/AgCl) se favorece la presencia de grupos quinona en la superficie del electrodo, de tal forma que estos grupos funcionan como espaciadores para el depósito del dendrímero sobre el electrodo de grafito a través de la unión covalente por la formación de un enlace tipo éster entre los átomos de oxígeno terminales y los anhídridos ftálicos del grafito (Figura 39). En consecuencia, se alcanza un recubrimiento superficial tan solo del 18%, lo cual se corrobora con los resultados obtenidos mediante espectroscopia Raman y XPS.

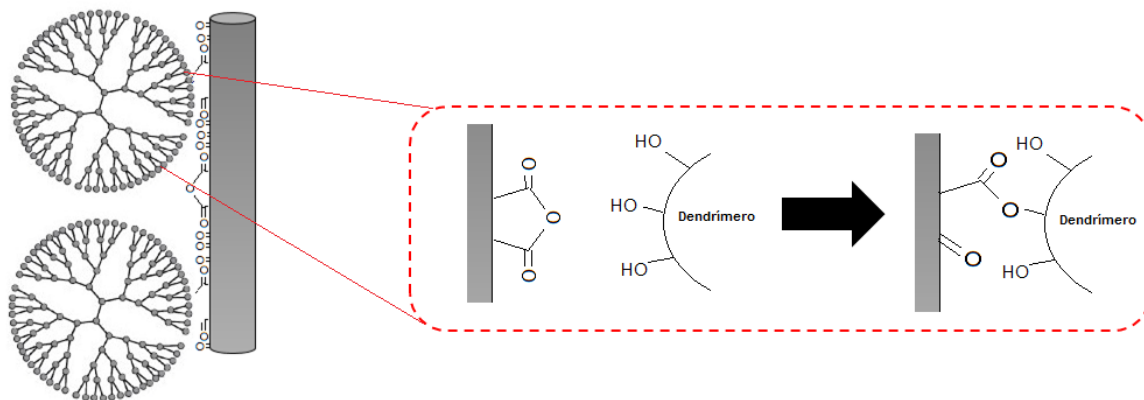


Figura 39 Mecanismo de depósito de dendrímeros PAMAM G4 – 64OH sobre una superficie de grafito prefucionalizada, en donde los grupos anhídrido ftálico superficiales se enlazan covalentemente a las terminaciones hidroxiladas del dendrímero.

9.2.4. Caracterización electroquímica del electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM en presencia de Dopamina y líquido cefalorraquídeo sintético.

Para llevar a cabo el depósito de dendrímeros PAMAM G4.0 –64OH es necesario un pretratamiento a la superficie, tal y como se mencionó en secciones precedentes. Aún y cuando la metodología de prefucionalización y de depósito ha sido reportada por el grupo de *Electroquímica Ambiental* en CIDETEQ [16, 52], se verificaron los diferentes potenciales necesarios (0.6, 1.6 y 2.2 V vs Ag/AgCl) para favorecer la presencia de quinonas, anhídridos ftálicos y ácidos carboxílicos, respectivamente.

Es así como al probar los diferentes potenciales antes mencionados para la prefucionalización del grafito, al aplicar un potencial de 2.2 V el electrodo empezó a destruirse físicamente, por lo que ya no se prosiguió con experimentos a este potencial.

En la figura 40 se presenta la señal voltamperométrica de DA ($10 \mu\text{M}$) en LCS empleando 3 distintos electrodos que fueron prefuncionalizados y modificados a 600 y 1600 mV vs Ag/AgCl, en donde 600- 600 mV representa al electrodo que fue prefuncionalizado y modificado a 600mV; 600 – 1600 mV es el electrodo que fue prefuncionalizado a 600 mV pero modificado a un potencial de 1600 mV y por último, 1600-1600 mV es el electrodo que fue prefuncionalizado y modificado a un potencial de 1600 mV. Como puede observarse en esta figura, al aumentar el potencial de depósito se incrementa la corriente capacitiva y decrementa la corriente faradaica propia de la electro-oxidación de DA.

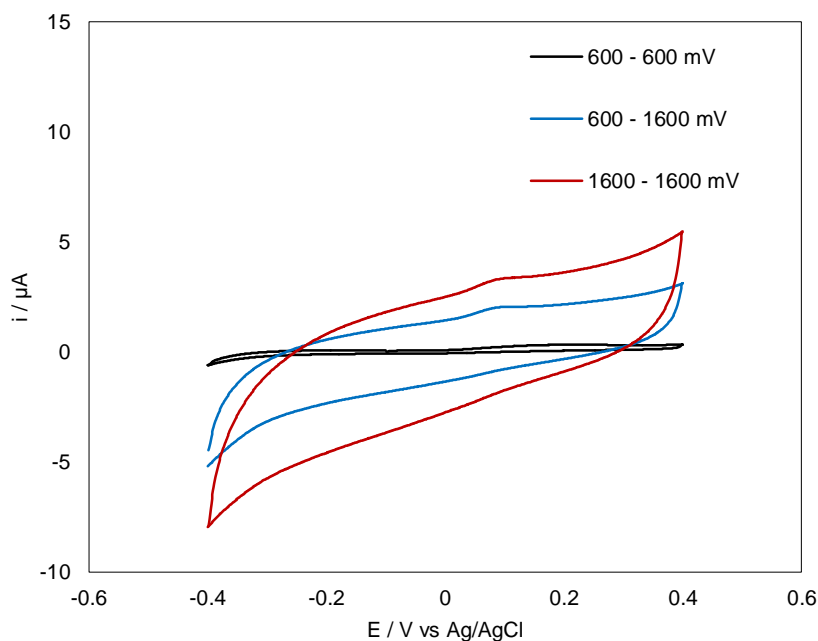


Figura 40 Voltamperogramas cíclicos de electrodos prefuncionalizados y modificados con dendrímeros, aplicando distintos potenciales.

A partir de estos experimentos se aseguró que el mejor potencial de depósito es el de 600 mV vs. Ag/AgCl empleando los electrodos de grafito seleccionados en H_2SO_4 0.5 M.

Ahora bien, una vez determinados los potenciales a los cuales se iban a llevar a cabo las modificaciones al electrodo, fue de nuestro interés saber si el tiempo de depósito de 60 minutos, previamente reportado por el grupo de trabajo [16, 52], podría verse disminuido sin influir en una correcta modificación del electrodo.

Con este propósito se llevaron a cabo modificaciones a un potencial constante de 600 mV con agitación constante, durante 15, 30, 45 y 60 minutos. Una vez obtenidos los experimentos, se gráfico la carga del pico de oxidación de DA 10 μM en LCS de cada uno de los electrodos versus el tiempo de modificación (Figura 41). De esta manera, se observó que el tiempo de depósito puede ser de al menos 30 minutos, ya que a partir de este tiempo se alcanza la mayor modificación de la superficie con dendrímeros PAMAM al mantenerse constante la carga ($Q = 1.1256 \mu\text{C}$) del pico de oxidación de DA.

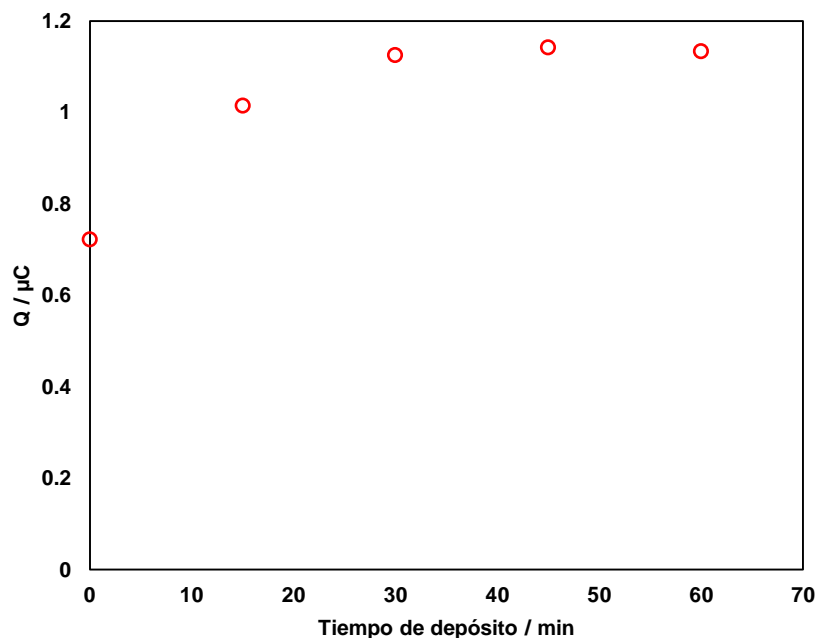


Figura 41 Gráfico de la carga del pico de oxidación de DA (10 μM) utilizando electrodos modificados con dendrímeros PAMAM a distintos tiempos de depósito.

Por otra parte, en los voltamperogramas cíclicos de la DA en LCS del electrodo **G**, **G – PF**, **G – PAMAM** (Figura 42 y Tabla 11), en donde se observó que aún y cuando la corriente faradaica muestreada con el electrodo desnudo (**G**), es mayor ($i = 0.44 \mu\text{A}$), la carga asociada al pico de oxidación de DA es de la mitad de la del electrodo modificado **G-PAMAM** ($Q_G = 0.59 \mu\text{C}$ y $Q_{G-PAMAM} = 1.38 \mu\text{C}$). Además, en el VC de este último electrodo es notorio cómo la difusión de la DA es más lenta, manifestándose en un pico de oxidación mucho más ancho, lo cual se observó con el incremento de carga; este comportamiento es similar al previamente descrito cuando la molécula sonda está presente. Asimismo, es importante comentar que el VC correspondiente al electrodo **G** presentó señales que lucen como ruido a 0.4 V atribuidas al material, las cuales eran

reproducibles. En cuanto al electrodo prefuncionalizado (**G-PF**), la corriente de oxidación de DA fue similar a la del electrodo **G-PAMAM**, presumiblemente por la presencia de los grupos funcionales en la superficie.

Asimismo, el potencial de oxidación de DA en LCS observado con el electrodo **G-PAMAM** se desplazó hacia potenciales más positivos ($E_{pG} = 50 \text{ mV}$ y $E_{pG-PAMAM} = 100\text{mV}$), por lo que se requiere una mayor energía para llevar a cabo la reacción de oxidación de Dopamina empleando el electrodo **G-PAMAM**, debido al recubrimiento de dendrímero sobre la superficie del electrodo.

Tabla 11 Carga del pico de Oxidación de DA en LCS de la figura 42, empleando los distintos electrodos,

Electrodo	Q / μC
G	0.59
G PF	0.64
G PAMAM	1.38

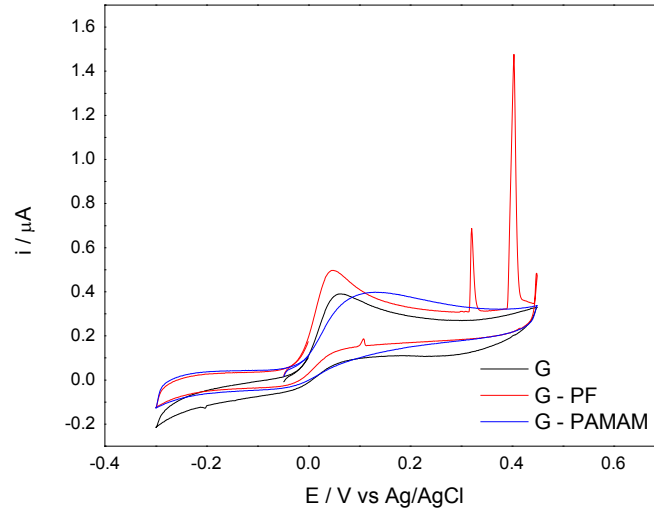


Figura 42 Voltamperogramas cíclicos empleando electrodos **G**, **G – PF** y **G – PAMAM** en DA $10 \mu\text{M}$ y LCS, 20 mVs^{-1} .

A partir de los cronoamperogramas obtenidos a distintos potenciales, se tomó registro de la intensidad de corriente límite a un tiempo en donde se aseguraba la corriente difusional, y se graficó el potencial aplicado contra la intensidad de corriente (Figura 43). De esta manera se observó que existe un máximo de corriente a partir de 300 mV, por lo que se determinó que este era el potencial en donde se alcanzó la corriente límite de oxidación de DA en LCS.

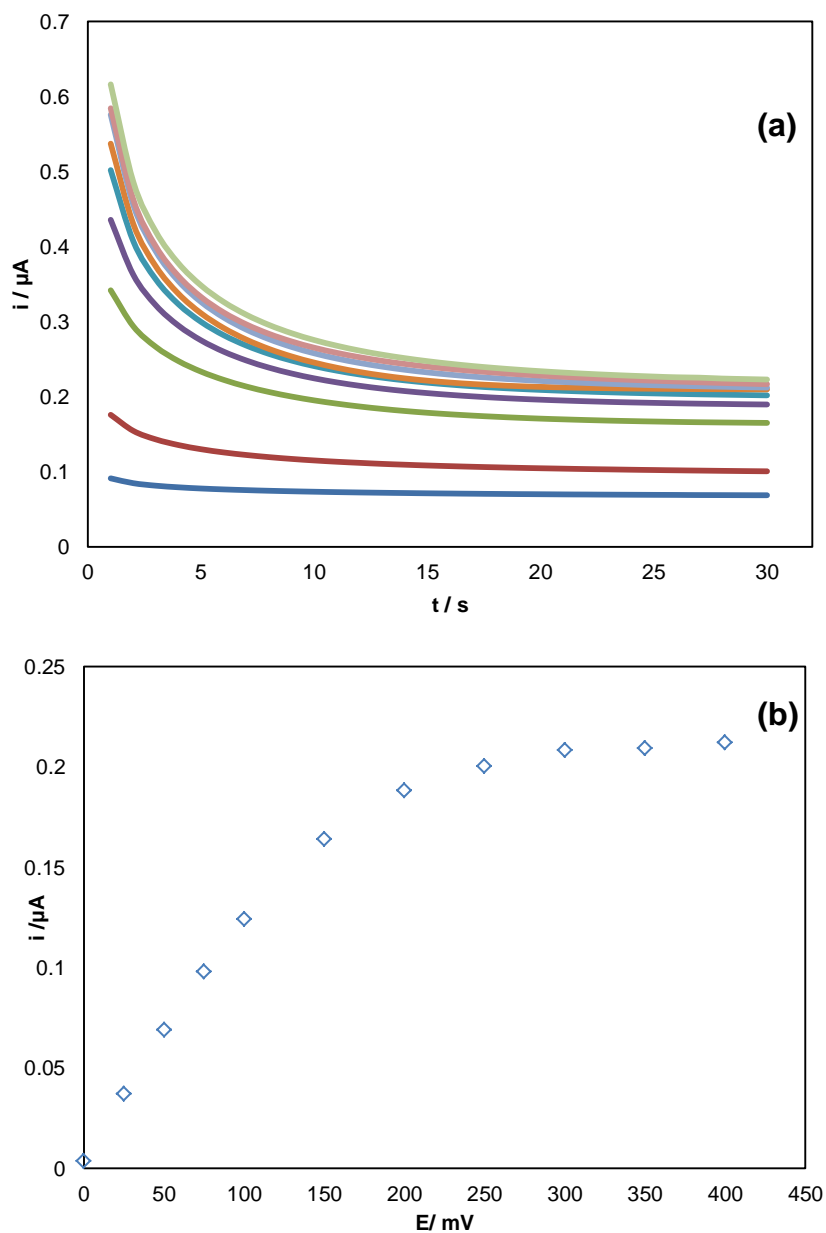


Figura 43 (a) Cronoamperogramas obtenidos aplicando potenciales constantes (50 a 400mV) durante 30 segundos, en una disolución 10 μM DA en LCS, así como (b) la gráfica del potencial aplicado vs.la corriente muestreada a 25 segundos, determinada a partir de los cronoamperogramas de (a).

9.2.5. Determinación electroquímica de dopamina empleando el electrodo de grafito modificado con dendrímeros PAMAM en líquido cefalorrquídeo.

Con el fin de corroborar que la respuesta en un sistema de 2 y 3 electrodos era similar, se realizaron experimentos por VC. Enseguida se presentan los voltamperogramas cíclicos obtenidos con el electrodo **G** empleando una celda de 2 y 3 electrodos, con concentraciones de 0 a 20 μM en celda de DA en LCS. (Figura 44).

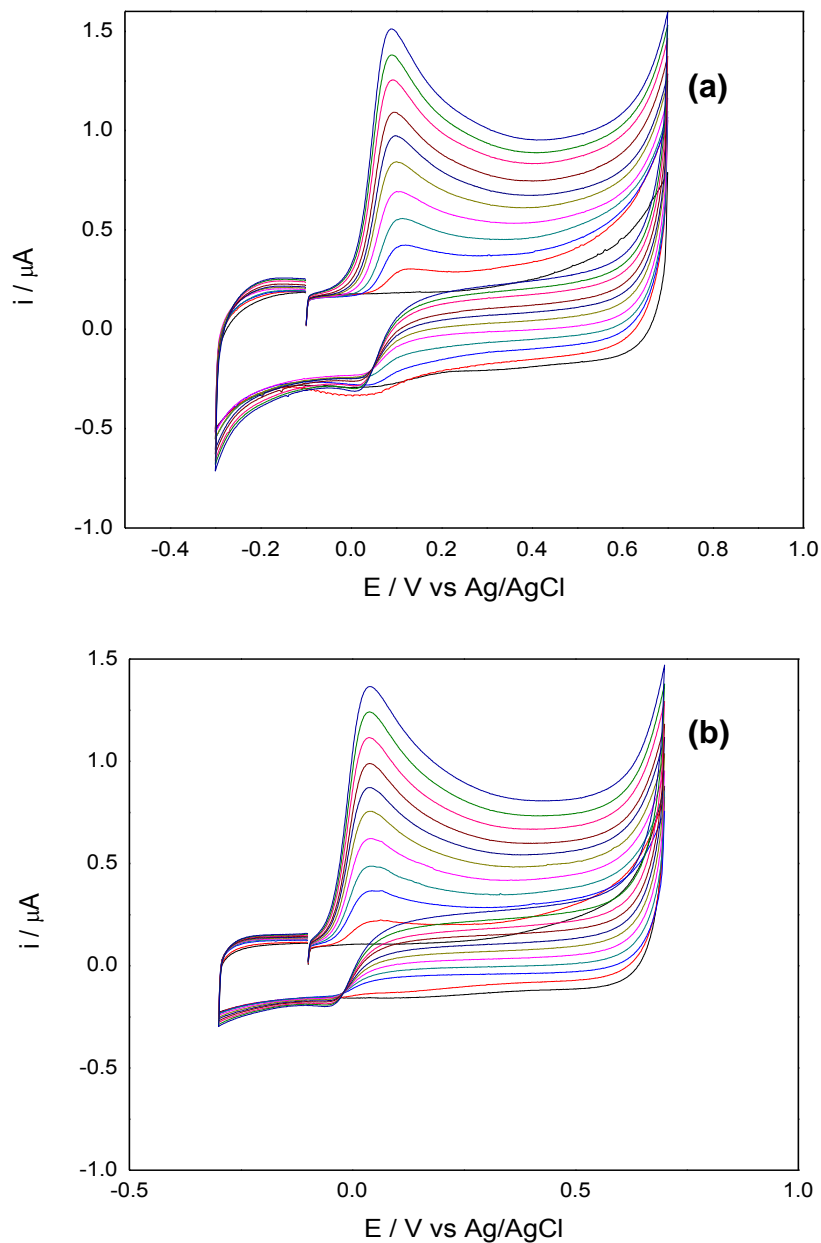


Figura 44 Voltamperogramas cíclicos ($v = 20\text{mVs}^{-1}$) efectuados en LCS con concentraciones de 0 a 20 μM de DA con un electrodo **G**, empleando sistemas **(a)** de 3 electrodos y **(b)** 2 electrodos.

En los voltamperogramas cíclicos (VC) obtenidos (Figura 45) se observa que el potencial de oxidación de DA ocurre a potenciales menores (~ 50 mV vs. Ag / AgCl) en ambas disposiciones de celda. Sin embargo, al realizar las curvas de calibración (Anexo VI) por VC de DA en LCS a 24 °C con cada electrodo en cada uno de los sistemas no se observó una variación importante en cuanto a su sensibilidad, límites de detección y cuantificación (Figura 46, Tabla 12). Estos resultados nos dieron indicio de que era posible la miniaturización del detector electroquímico con dos electrodos para medir DA en LC *in vivo*.

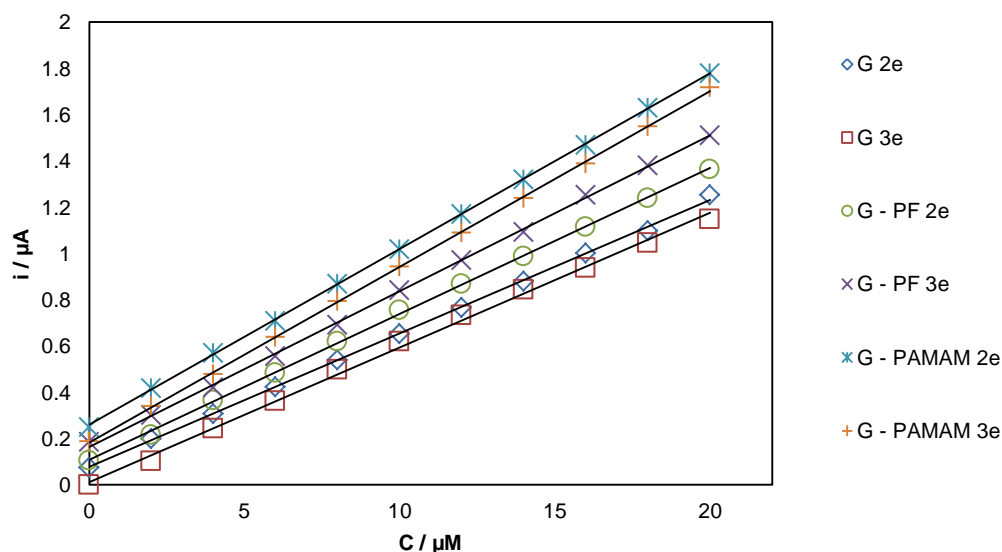


Figura 45 Curvas de calibración de DA en LCS empleando sistemas de 2 y 3 electrodos (2e y 3e, respectivamente), obtenidas mediante VC.

Tabla 12 Parámetros determinados a partir de las curvas de calibración amperométricas de DA en LCS, comparando el empleo de sistemas de 2 (2-e) y 3 (3-e) electrodos con G, G – PF y G – PAMAM (Anexo VI).

Electrodo	Sistema	Sensibilidad / $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	L.D. / μM	L.C. / μM	Ecuación ($i / \mu\text{A}; C / \mu\text{M}$)	r^2
G	2 - e	0.058	0.030	0.100	$i = 0.057 [C] + 0.0127$	0.9994
	3 - e	0.057	0.030	0.102	$i = 0.058 [C] + 0.0772$	0.9974
G - PF	2 - e	0.063	0.028	0.092	$i = 0.063 [C] + 0.1076$	0.9996
	3 - e	0.067	0.022	0.074	$i = 0.067[C] + 0.1654$	0.9994
G - PAMAM	2 - e	0.076	0.010	0.034	$i = 0.058 [C] + 0.2595$	0.9999
	3 - e	0.076	0.008	0.028	$i = 0.058[C] + 0.1839$	0.9998

Por otra parte, debido a que el sensor electrónico que se pretendía acoplar a los electrodos es de naturaleza amperométrica, se construyeron curvas de calibración aplicando un potencial constante de 300 mV, ya que, tal y como se detalló en secciones anteriores, es necesario alcanzar la corriente límite de oxidación de DA en LCS.

De esta manera, en la figura 46 se muestra una serie de cronoamperogramas obtenidos para la oxidación de concentraciones sucesivas de DA en LCS, usando el sistema de 2 electrodos. En estos gráficos puede observarse que una perturbación de potencial por 30 segundos, fue suficiente para llevar a cabo la medición de la corriente faradaica por tener el sistema en estado cuasi-estacionario (independiente del tiempo).

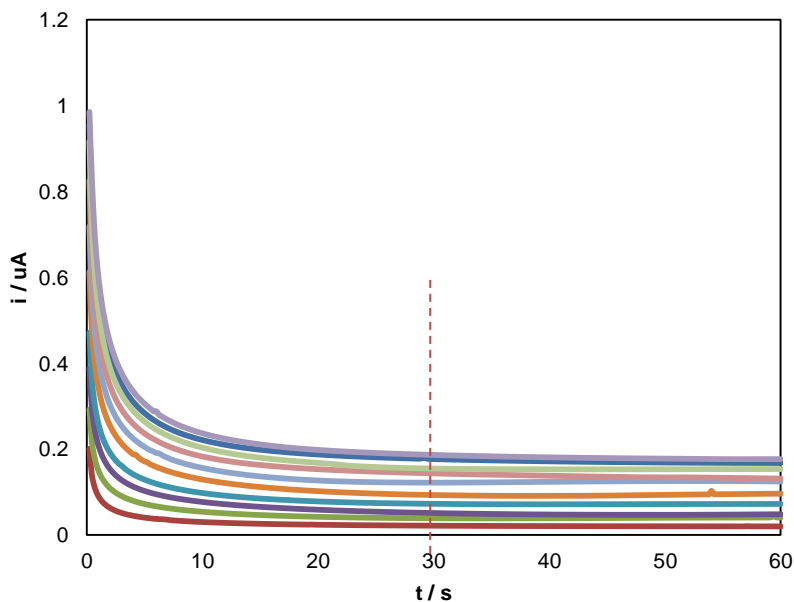


Figura 46 CA obtenidos después de la adición sucesiva de una disolución stock de DA, en donde se destaca que a 30 segundos se alcanza la corriente límite de difusión de DA.

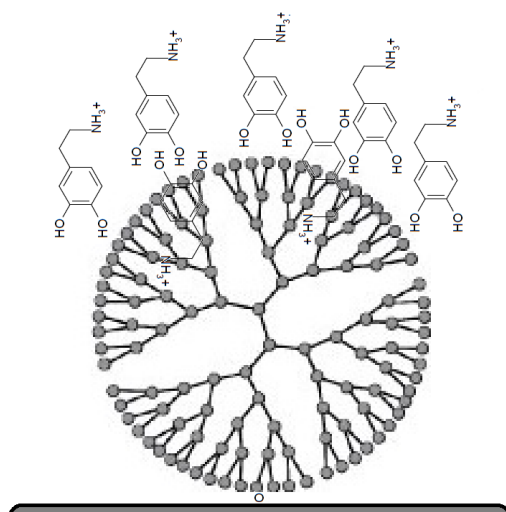


Figura 47 Representación de la atracción entre los grupos superficiales hidrofílicos del dendrímero PAMAM en superficie y moléculas de DA.

Con los diferentes CA se construyeron las curvas de calibración de DA en LCS empleando los electrodos **G**, **G-PF** y **G-PAMAM** (Figura 48), con las cuales se obtuvieron la sensibilidad, L.D. y L.C. (Anexo V) de cada una las determinaciones (Tabla 13), donde se resalta que el límite de detección y cuantificación disminuye 46 veces al modificar el electrodo de grafito con el dendrímero PAMAM, debido a que el ruido es mayor en el electrodo desnudo.

Por otra parte, la forma de la señal de oxidación de DA en el electrodo G-PAMAM del voltamperograma cíclico de la figura 42 y el aumento en la sensibilidad del electrodo G-PAMAM hace evidente cómo estos preconcentran el analito (Anexo VI).

Lo anterior se explica tomando en cuenta la estructura del dendrímero PAMAM G4.0 - 64 OH, el cual presenta cavidades hidrofóbicas y grupos terminales hidrofílicos. Esta hidrofiliidad podría ser responsable de que la molécula de DA rodee al dendrímero, e incluso quedar dentro de sus cavidades, preconcentrándose cerca del electrodo (Figura 47). Este comportamiento ya ha sido reportado recientemente en electrodos con la misma modificación, construidos para la detección de metanol [78].

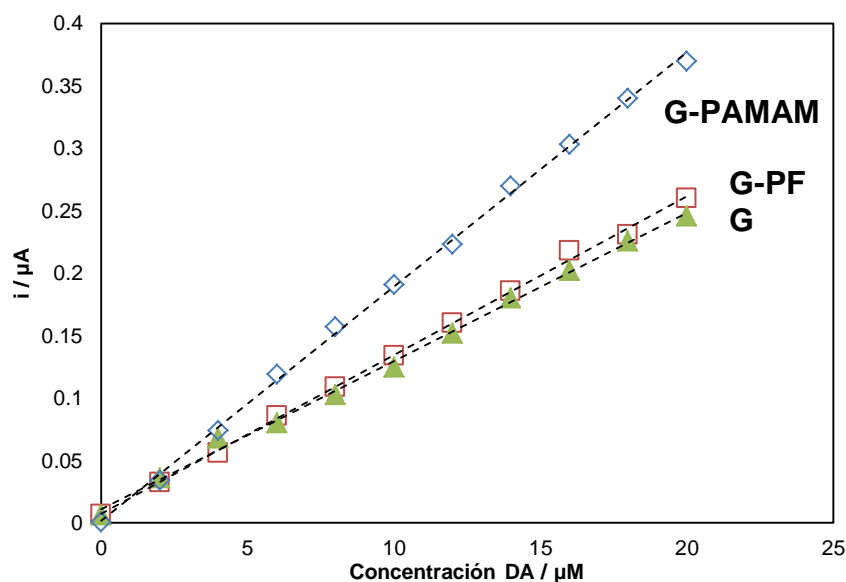


Figura 48 Curvas de calibración por CA construidas con **G**, **G – PF** y **G – PAMAM**, empleando un sistema de 2 electrodos.

Tabla 13 Parámetros obtenidos a partir de las curvas de calibración amperométricas con los distintos electrodos.

Electrodo	Sensibilidad /	L.D. /	L.C. /	Ecuación (i / μA; C/ μM)	r ²
	μA μM ⁻¹				
G	0.0091	306.25	1020.84	i = 0.0091 [C] + 0.208	0.987
G - PF	0.0101	37.5	124.99	i = 0.0101 [C] + 0.115	0.995
G - PAMAM	0.0187	6.67	22.24	i = 0.0187[C] + 0.001	0.997

9.3. Modificación del electrodo de grafito con el compuesto DENs-Pt

9.3.1. Síntesis del compuesto DENs-Pt.

Con el fin de sintetizar las DENs-Pt, además de la síntesis química de las DENs - Pt, se consideró la síntesis por micro-ondas, la cual se realizó a cuatro distintas temperaturas con el objetivo de verificar cuál era la que proporcionaría un tamaño de nanopartícula más uniforme.

De esta manera, se observó que las soluciones sintetizadas por micro-ondas, conforme aumentaba la temperatura de síntesis adquirirían un color miel cada vez más intenso (Figura 49 a - d), incluso de mayor intensidad que la obtenida por simple reducción

química con NaBH_4 (Figura 49 e). Esta observación indicaba de manera indirecta, la síntesis de nanopartículas como se ha reportado en la literatura [16, 52].

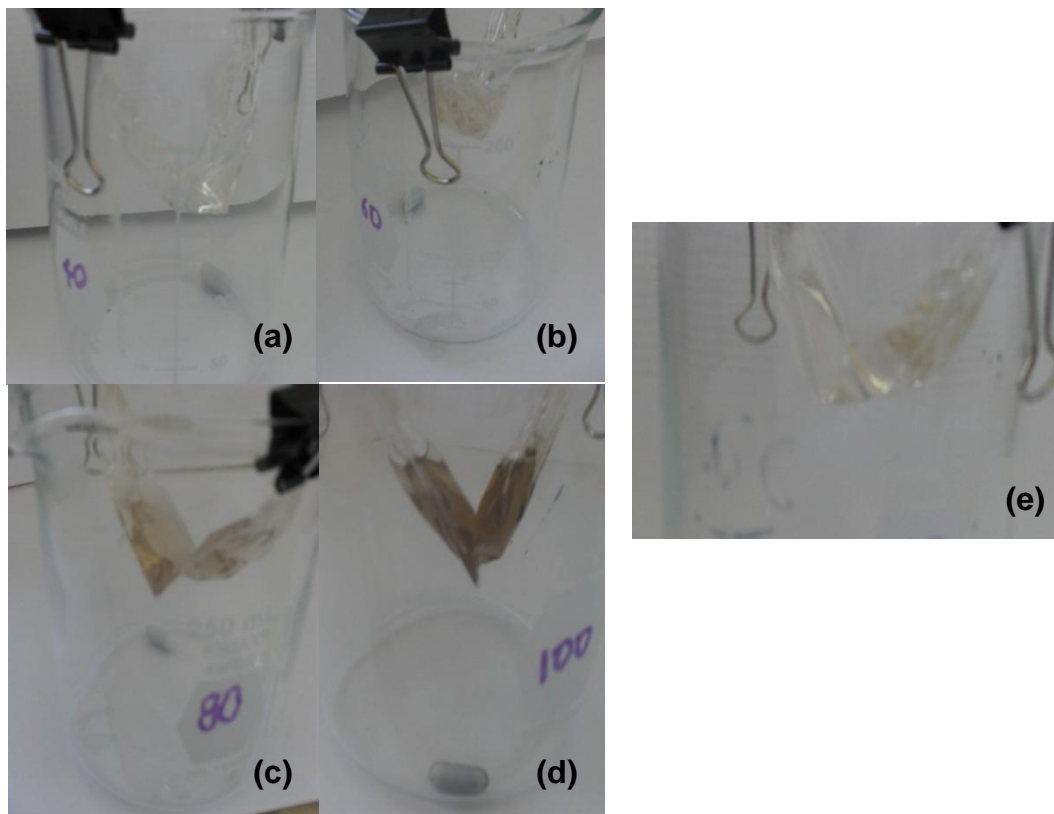


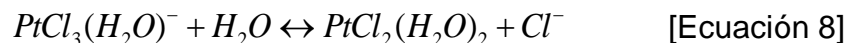
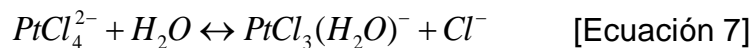
Figura 49 Imagen fotográfica de las disoluciones de DENs-Pt sintetizadas por micro-ondas a 40 (a), 60 (b), 80 (c) y 100°C (d), así como sintetizadas por reducción química (e).

9.3.2. Caracterización de las DENs-Pt.

Luego de sintetizar las DENs-Pt, estas fueron caracterizadas por espectrofotometría UV-Visible: disoluciones de Pt^{2+} , Dendrúmero – Pt^{2+} y DENs-Pt (Figura 50).

De acuerdo a lo reportado en la literatura, el pico cercano a los 230 nm corresponde a la transferencia de carga metal - ligando del PtCl_4^{2-} (LMCT, por sus siglas en inglés) [15, 52, 93]. En presencia del dendrúmero PAMAM, la banda se recorre a cerca de 240nm. Esta señal es debida a la transición electrónica $n - \pi^*$, la cual es característica de la interacción entre los electrones libres de las aminas terciarias del dendrúmero y los iones metálicos [15, 52, 93].

Se ha sugerido que la formación del complejo entre los grupos internos del dendrímero y el Pt^{+2} ocurre vía desplazamiento de agua de los acuo-complejos formados con la sal precursora, en medio acuoso [83]:



Después de la reducción de los iones metálicos, independientemente del método de reducción de éstos, el espectro cambio significativamente, pues existe una banda de mucho mayor absorbancia alrededor de 250 nm (Figura 50) debida a la presencia de las nanopartículas cero - valentes que fueron reducidas. Esta señal corresponde a la transición electrónica $d-d^*$ propia del complejo metal – ligando y denominado pico plasmón [15, 26, 52].

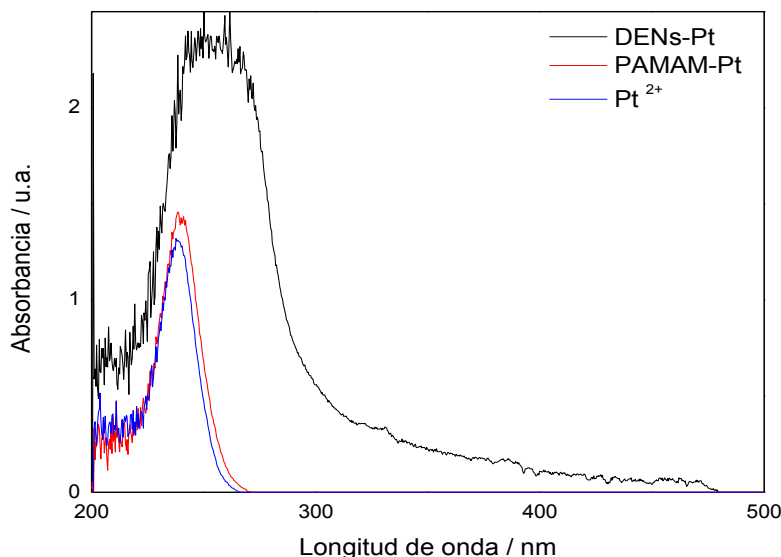


Figura 50 Espectros UV-Visible de disoluciones de Pt^{2+} , complejo dendrímero-platino y DENSs-Pt sintetizadas a 60°C.

Además, de acuerdo a la literatura, el pico plasmón se presenta cuando se tienen nanopartículas con un diámetro entre 1 nm y 10 nm (tamaño intermedio entre moléculas pequeñas y metales másicos). Las propiedades físicas resultantes de estos materiales no son ni de metales másicos ni de compuestos moleculares, y dependen

en gran medida del tamaño de partícula, distancia inter-particular, naturaleza de la corteza orgánica protectora, forma de las nanopartículas, así como de las propiedades del medio en que se encuentran (específicamente la constante dieléctrica) [26].

Es así como los espectros correspondientes a las disoluciones concentradas de DENs-Pt sintetizadas por micro-ondas se presentan en la figura 51. En éstos se puede observar que conforme aumenta la temperatura de síntesis, las bandas de absorción se van haciendo más anchas, alcanzando un máximo a 100°C.

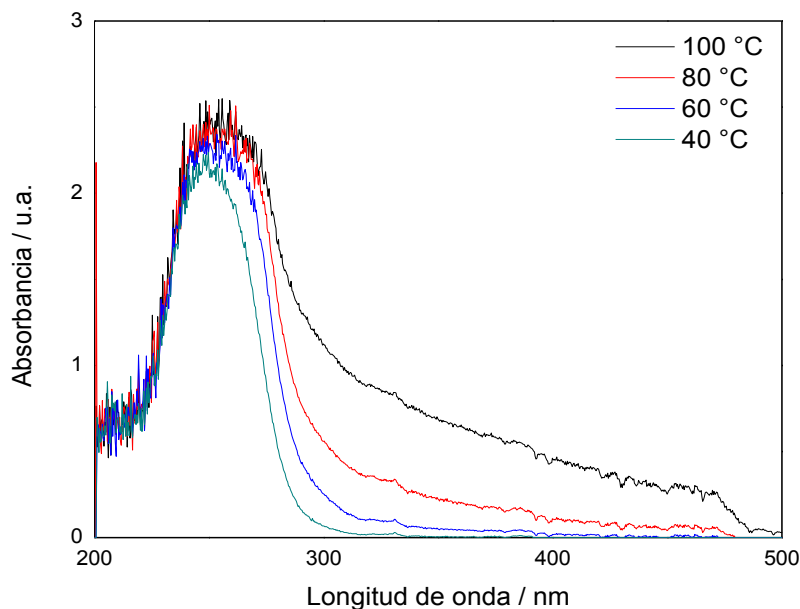


Figura 51 Espectros UV-Vis de las disoluciones concentradas de DENs-Pt sintetizadas a distintas temperaturas.

Posteriormente, se hicieron diluciones de cada una de las disoluciones de DENs-Pt, con el fin de determinar los coeficientes de extinción molar (ϵ), a partir de la gráfica de concentración vs. absorbancia (Figura 52). En la tabla 14 se puede corroborar la presencia de las DENs-Pt, al ser el ϵ mayor que en una disolución de Pt^{+2} como se ha mostrado en la literatura [82]. Asimismo, estos coeficientes son similares a lo reportado por el grupo de investigación, cuyos valores de 5863, 7868 y 10446 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corresponden a disoluciones sintetizadas de DENs-Ir, Pt y Rh, respectivamente.

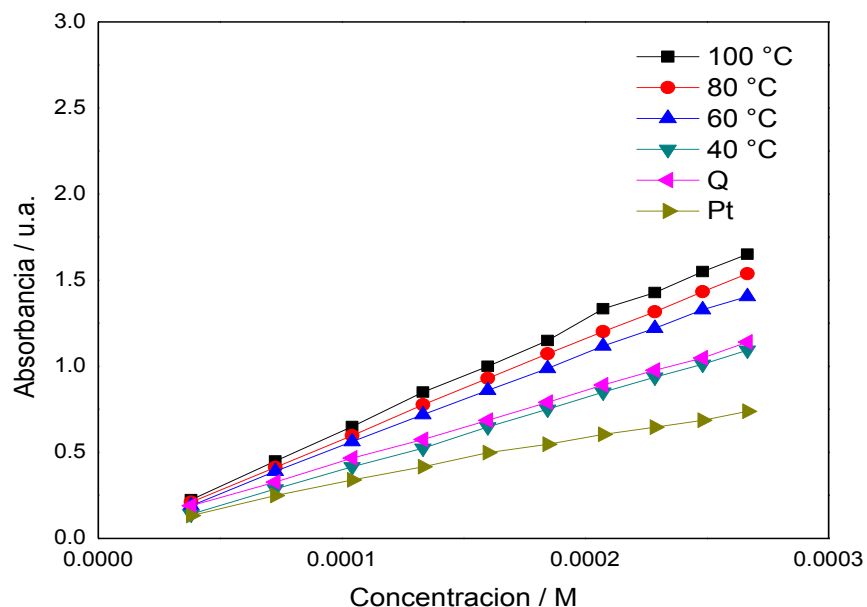


Figura 52 Curvas de concentración vs. absorbancia de cada una de las disoluciones de DENs-Pt sintetizadas y de la disolución de Pt^{2+} precursora.

Tabla 14 Coeficientes de extinción molar de cada una de las disoluciones sintetizadas, así como de la disolución de platino precursora.

Disolución	Longitud de Onda / nm	Coeficiente de extinción molar / $M^{-1}cm^{-1}$
DENs-Pt a 100°C	260	6276.97
DENs-Pt a 80°C		5807.37
DENs-Pt a 60°C		5335.07
DENs-Pt a 40°C		4168.61
DENs-Pt Química		4142.39
Pt^{+2}	230	2580.44

Por otra parte, se realizó un estudio por TEM y DE con el objetivo de determinar el tamaño y la orientación cristalográfica de las nanopartículas así como la dispersión de éstas en la disolución. Las imágenes por TEM revelan que las nanopartículas tienen un diámetro de 1 a 2 nm (Figura 53).

Cabe señalar que con base en estos resultados no se encontraron nanopartículas de Pt en la disolución de DENs-Pt sintetizada a 40°C (Figura 53 E), de ahí la apariencia difusa de la imagen TEM. Esta ausencia probablemente se deba a que es muy reducido el número de éstas en la disolución, o bien, la temperatura no fue suficiente para formar nanopartículas por micro-ondas.

De igual manera, en la imagen correspondiente a la disolución de DENs-Pt sintetizada por reducción química (Figura 53 A), se observaron clústeres de nanopartículas a causa de la aglomeración de partículas de platino fuera de los dendrímeros. Además, se observó que con el paso del tiempo, estas disoluciones formaban precipitados. Este comportamiento ya ha sido reportado en trabajos anteriores [15].

De manera general, en las microscopías de las disoluciones de DENs-Pt que se llevaron a cabo a temperaturas de síntesis altas (>60°C) presentaron una mejor dispersión (Figura 53 B – D). Esto sugiere, tanto la efectividad de los dendrímeros como nanoreactores para la preparación de nanopartículas, como su papel en la estabilización de éstas para evitar la agregación de las unidades metálicas [15] bajo estas condiciones de trabajo.

Además, la presencia de las DENs-Pt se evidenció con los experimentos de DE (Figura 53 – E), en donde los patrones de difracción de electrones mostraron el plano de un cristal de Pt⁰ con una orientación cristalográfica [1, 1, 1] [15].

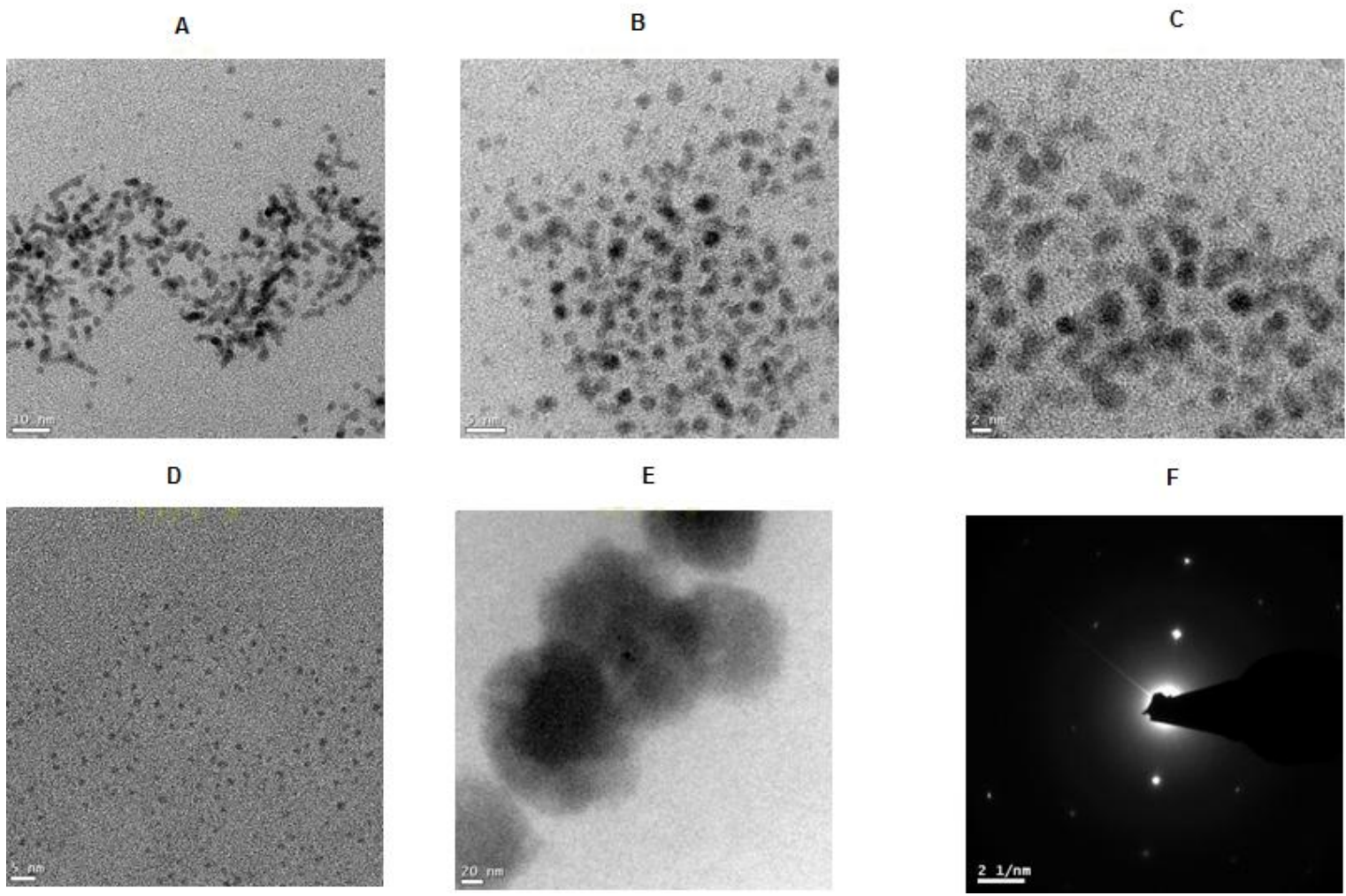


Figura 53 Micrografías TEM (A-E) de las disoluciones de DENs-Pt sintetizadas químicamente (A), por micro-ondas a 100°C (B), 80°C (C), 60°C (D) y 40°C (E), así como el patrón de difracción de electrones de las nanopartículas de platino.

9.3.3. Depósito de las DENs-Pt sobre el electrodo de grafito y cuantificación de DA en LCS.

Se llevó a cabo el procedimiento de modificación descrito en la sección anterior para depositar las DENs-Pt sobre el electrodo de grafito. De esta manera, previa a la modificación del grafito con DENs-Pt, el electrodo fue prefuncionalizado (Figura 54).

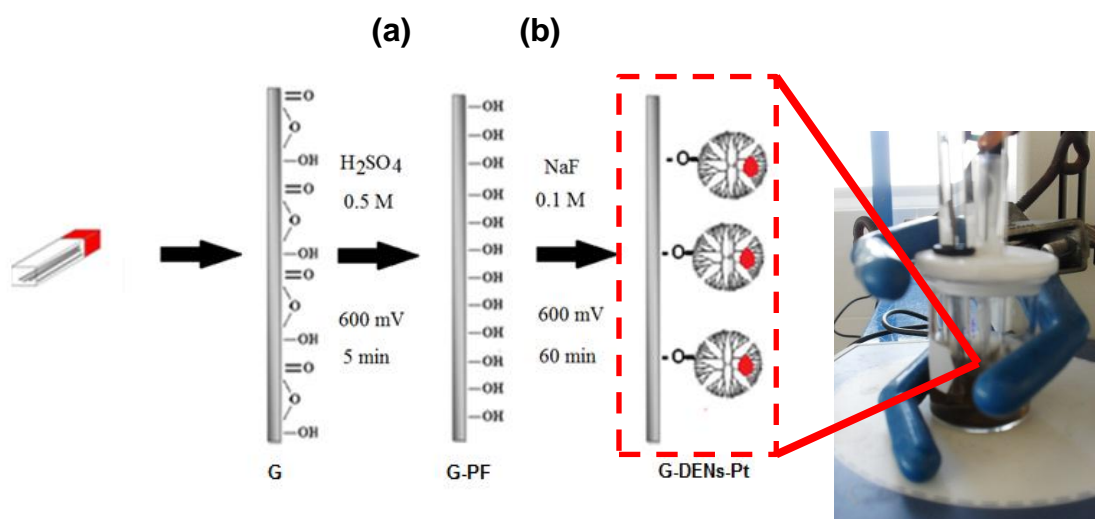


Figura 54 Esquema representativo de la metodología de la modificación del electrodo de grafito con DENs-Pt: **(a)** prefuncionalización del electrodo en una disolución H_2SO_4 0.5 M mediante la aplicación de un potencial constante de 600 mV durante 5 minutos. **(b)** Modificación del G con DENs-Pt en una disolución que contenía una concentración NaF 0.1 M por 60 minutos, aplicando un potencial de 600 mV.

Ya construido el electrodo **G-DENs-Pt**, este fue utilizado para la construcción de las curvas de calibración amperométricas de DA en LCS (Anexo VI). En la tabla 15 se presenta una comparación de la sensibilidad, así como los límites de detección y cuantificación que se alcanzaron con cada uno de los electrodos en estudio, en donde se destaca en general, que la mayor sensibilidad y los menores límites de detección y cuantificación de la DA en LCS ocurrieron en presencia del electrodo de **G – PAMAM**, que con los electrodos de **G – DENs – Pt** a las diferentes temperaturas de síntesis del compuesto DENs – Pt.

Tabla 15 Parámetros obtenidos a partir de las curvas de calibración amperométricas construidas con los electrodos modificados con las disoluciones de G-DENSs-Pt, así como la comparación de éstos con el electrodo G-PAMAM.

Electrodo	Sensibilidad / $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	L.D. / nM	L.C. / nM	Ecuación ($i / \mu\text{A}; C/\mu\text{M}$)	r^2
G - PAMAM	0.019	6.67	22.24	$i = 0.0187[C] + 0.001$	0.997
G-DENSs-Pt @100	0.017	32.74	109.15	$i = 0.017[C] + 0.007$	0.996
G-DENSs-Pt @80	0.019	20.50	68.25	$i = 0.019[C] + 0.0041$	0.998
G-DENSs-Pt @60	0.016	27.64	92.14	$i = 0.016[C] + 0.0013$	0.998
G-DENSs-Pt @40	0.014	31.00	103.32	$i = 0.014[C] + 0.0046$	0.997
G-DENSs-Pt Q	0.012	25.00	83.33	$i = 0.012 [C] + 0.0004$	0.9996

De esta manera se destaca el hecho que no se logró aumentar la sensibilidad en la determinación de la DA en LCS con los electrodos de grafito modificados con nanopartículas metálicas encapsuladas en los dendrímeros PAMAM G4.0 – 64 OH, tal y como se planteó en la hipótesis de este proyecto por los reportes previos que se tiene en la literatura [15, 52].

Este resultado se atribuye al material electródico (grafito), ya que como se mostró anteriormente, siguiendo el procedimiento de modificación para un carbón vítreo reportado en la literatura [16, 52] se obtiene un recubrimiento de dendrímero 5 veces menor al reportado para el carbón vítreo, aunado al hecho de que el dendrímero se deposita en los bordes del grafito, como se demostró en la sección 9.2. En consecuencia, no se cuenta con material electrocatalítico (DENS – Pt) en superficie para que esto conlleve a un incremento de la densidad de corriente de oxidación de la DA en LCS.

Ahora bien, con el fin de comprobar que se trata del material electródico como se discutió anteriormente, se realizaron experimentos empleando ambos electrodos (Carbón Vítreo –CV- y Grafito –G-) modificados con una disolución recién sintetizada de DENS - Pt. Una vez modificados el CV y G, éstos se colocaron en una disolución 10 μM de DA en LCS y se efectuaron voltamperogramas cíclicos.

Es así como en la figura 55 se muestra que la señal de oxidación de DA en alrededor de 100 mV vs. Ag/AgCl en ambos materiales electródicos es considerablemente mayor

en el electrodo de **CV – DENs – Pt** que en el **G – DENs – Pt** (10 y 2.5 $\mu\text{A cm}^{-2}$ respectivamente), lo que refleja una mayor cantidad y distribución de las nanopartículas de Pt en el CV que en el G, que de acuerdo a lo reportado en literatura, se alcanza un recubrimiento aparente del 96% [15].

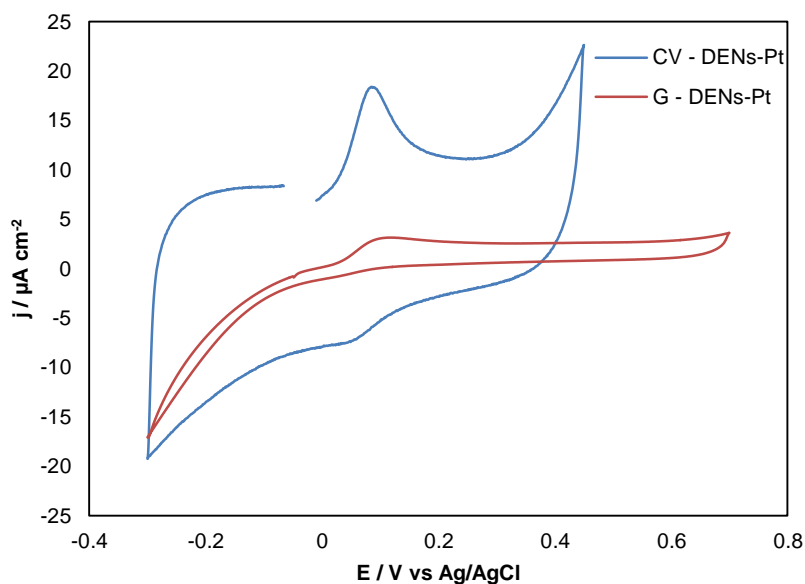


Figura 55 VC de DA 10 μM en LCS con un electrodo de carbón vítreo y de grafito modificados con una disolución DENs-Pt. ($\nu = 20 \text{ mVs}^{-1}$)

Una vez modificadas las puntillas con los composites **PAMAM – Pt**, se probó que la detección electroquímica de DA en líquido cefalorraquídeo sintético (LCS) tanto con los electrodos de **G – PAMAM** como con los **G – DENs – Pt** mostraban prácticamente la misma densidad de corriente, por lo que a partir de este momento el electrodo de **G – DENs – Pt** fue descartado como una buena alternativa para determinar DA en LCS, y se decidió que era mejor trabajar solo con el **G – PAMAM** pues resulta más económico y reduce el tiempo de modificación, que al emplear el Pt para realizar la determinación de DA en muestras reales de LC con el sistema de dos electrodos.

9.4. Acoplamiento del sistema electroquímico al dispositivo electrónico.

9.4.1. Construcción de las curvas de calibración de DA en LCS con el dispositivo electrónico.

Tomando en cuenta que la simplificación a un sistema de dos electrodos contribuye a la miniaturización del sistema, se optó por sustituir tanto el electrodo de trabajo como el de referencia por un alambre de plata recubierto por cloruro de plata. Esto es posible debido a que el líquido cefalorraquídeo contiene una alta concentración de NaCl, comportándose como un electrodo idealmente no polarizable.

De esta manera, en la figura 56 se presentan las curvas de calibración construidas a partir de las mediciones realizadas en el dispositivo electrónico y en el potenciostato comercial. Es importante destacar que al realizar adiciones sucesivas de DA, ambos tienen la misma sensibilidad (pendiente de la recta), aunque su ordenada al origen es distinta, debido al diseño propio del dispositivo, lo cual resultó despreciable ya que la ecuación de la curva se alimentó al algoritmo, por lo que en la pantalla solo se desplegó la concentración en celda cuantificados.

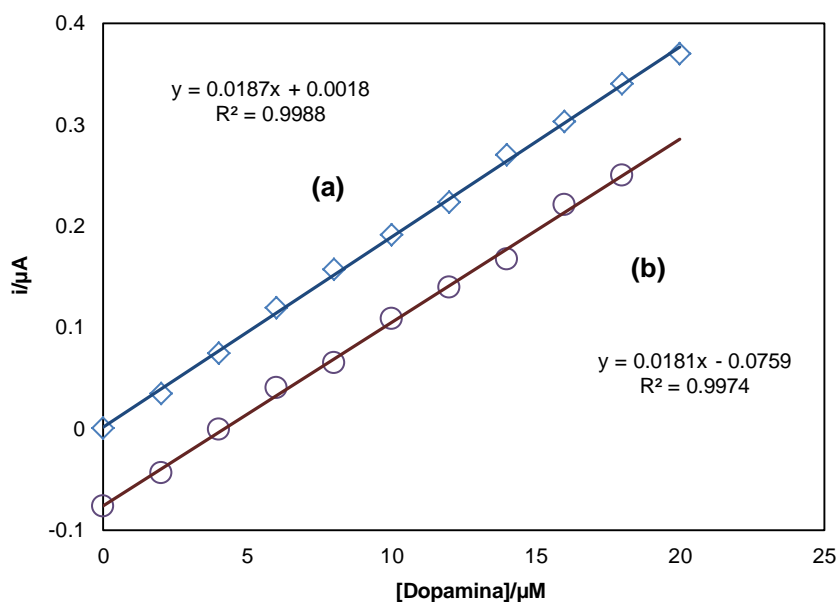


Figura 56 Curvas de calibración construidas con las mediciones obtenidas con (a) un potenciostato comercial y (b) el dispositivo electrónico construido.

En cuanto a las pruebas preliminares efectuadas en murino (Figura 57), los electrodos fueron conectados a la cánula guía empleando caimanes, como se presenta en la figura 57. Posteriormente, se midieron intensidades de corriente, mismas que eran reproducibles y correspondían a concentraciones del orden de μM , concentraciones esperadas según lo reportado en literatura [100].



Figura 57 Imagen fotográfica de las pruebas realizadas *in vivo* en donde se destaca la disposición de los electrodos.

Por lo que se puede concluir que el dispositivo funcionó satisfactoriamente; además, no se tuvieron dificultades operacionales que permitieran la realización del experimento atribuidas al dispositivo o a los electrodos.

Este resultado es relevante, ya que no existen en la literatura reportes sobre el uso de electrodos de grafito en la cuantificación de DA empleando un dispositivo portátil, el cual puede resultar viable para su uso como procedimiento de rutina ya que no se requiere extraer la muestra, además de su portabilidad y maniobrabilidad.

9.5. Análisis de la selectividad del electrodo.

9.5.1. Pruebas preliminares de selectividad en líquido cefalorraquídeo real.

En la figura 58 se presentan los voltamperogramas cíclicos efectuados a 20 mV s^{-1} en LCH, en donde no se observa ninguna señal electroquímica adicional al emplear el G, G – PF y G - PAMAM, sólo se observa un aumento en la corriente capacitiva del electrodo G - PAMAM debido a la presencia del dendrímero. Además, en la misma ventana de potencial con la que se trabajó en experimentos previos se observó la

descomposición del medio en el sentido de reducción, por lo que en pruebas posteriores se decidió trabajar en potenciales de -200 a 400 mV vs. Ag/AgCl.

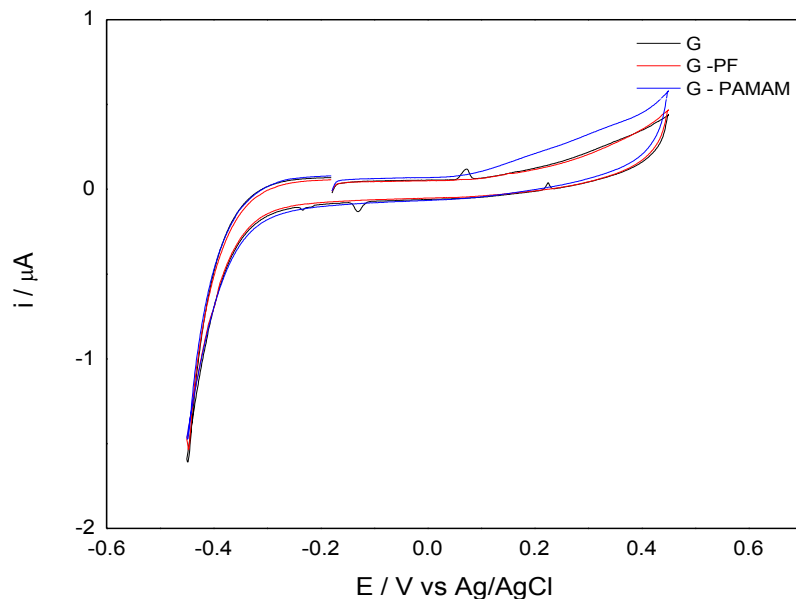


Figura 58 Voltamperometrías cíclicas de los distintos electrodos en LCH a 20 mVs^{-1} .

Antes de adicionar AA al LCH, primeramente se verificó la distribución de las especies de ácido ascórbico y dopamina presentes en el pH en el que se llevaron a cabo las determinaciones ($\text{pH} = 7.2$), por lo que tomando en cuenta la reacción de disociación del AA a los iones ascorbato (AA^- , Figura 59) y se verificó su presencia a este pH en el diagrama de predominio de especies construido mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach (Figura 60):

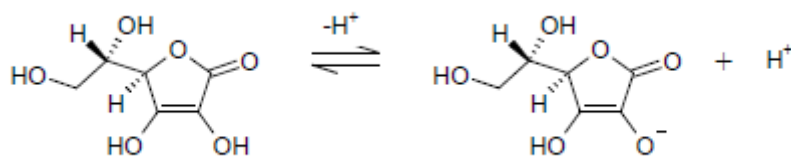


Figura 59 Reacción de disociación del AA a iones ascorbato (AA^-).

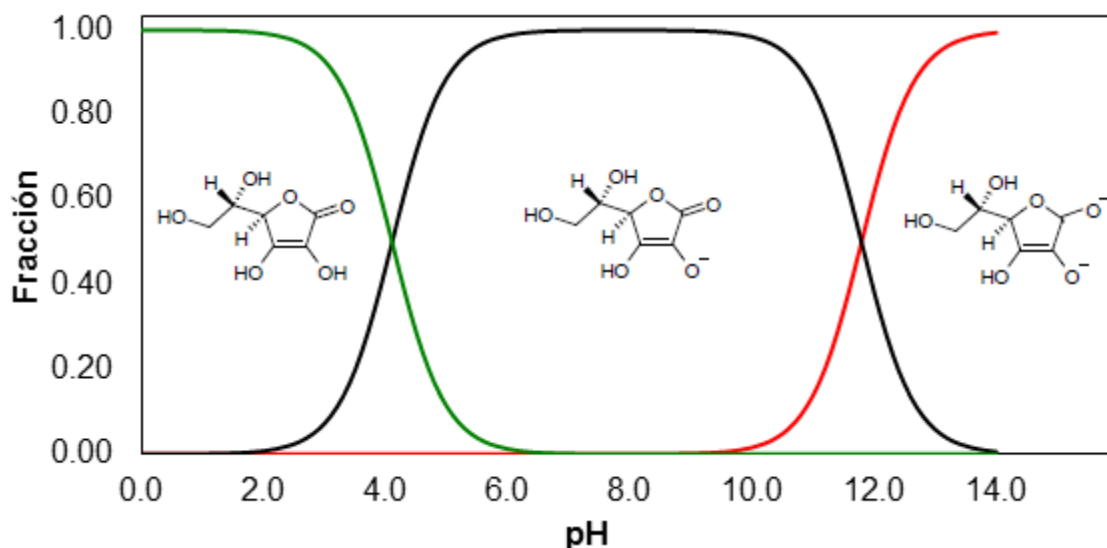
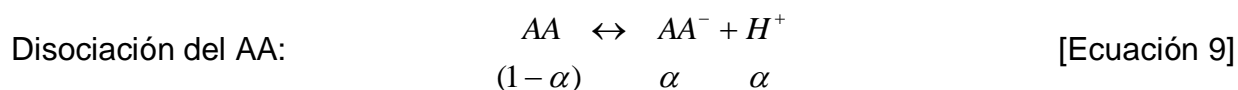


Figura 60 Diagrama de distribución de especies del ácido ascórbico.

Dicho diagrama fue construido considerando las siguientes ecuaciones:



Constante de equilibrio
$$K = \frac{[AA^-][H^+]}{[AA]} \quad \text{[Ecuación 10]}$$

Arreglando la ecuación 6:
$$\log K = \log[H^+] + \log \frac{[AA^-]}{[AA]} \quad \text{[Ecuación 11]}$$

Ecuación de Henderson-Hasselbach:
$$pH = pK_a + \log \frac{[AA^-]}{[AA]} \quad \text{[Ecuación 12]}$$

Reacomodando la ecuación 8:
$$pH - pK_a = \log \frac{[AA^-]}{[AA]} \quad \text{[Ecuación 13]}$$

Por lo que:
$$10^{pH - pK_a} = \log \frac{[AA^-]}{[AA]} \quad \text{[Ecuación 14]}$$

Substituyendo de la ecuación 5:

$$10^{pK_a - pH} = \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad \text{[Ecuación 15]}$$

Donde:

$$[AA^-] = \alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad \text{[Ecuación 16]}$$

Es así como, a partir del pKa de la primera reacción de disociación del ácido ascórbico ($pK_{a1} = 4.1$) [101], en el pH que se trabajó ($pH = 7.2$) se determinó que un 99.9% de ácido ascórbico se presenta como iones ascorbato en la disolución de acuerdo con el diagrama de la figura 60.

Por otra parte, a este mismo pH, de acuerdo al diagrama de distribución de especies de DA (Figura 61) y su primer pKa (9.05), se determinó que un 98% de las especies de DA, se encuentra como DA protonada.

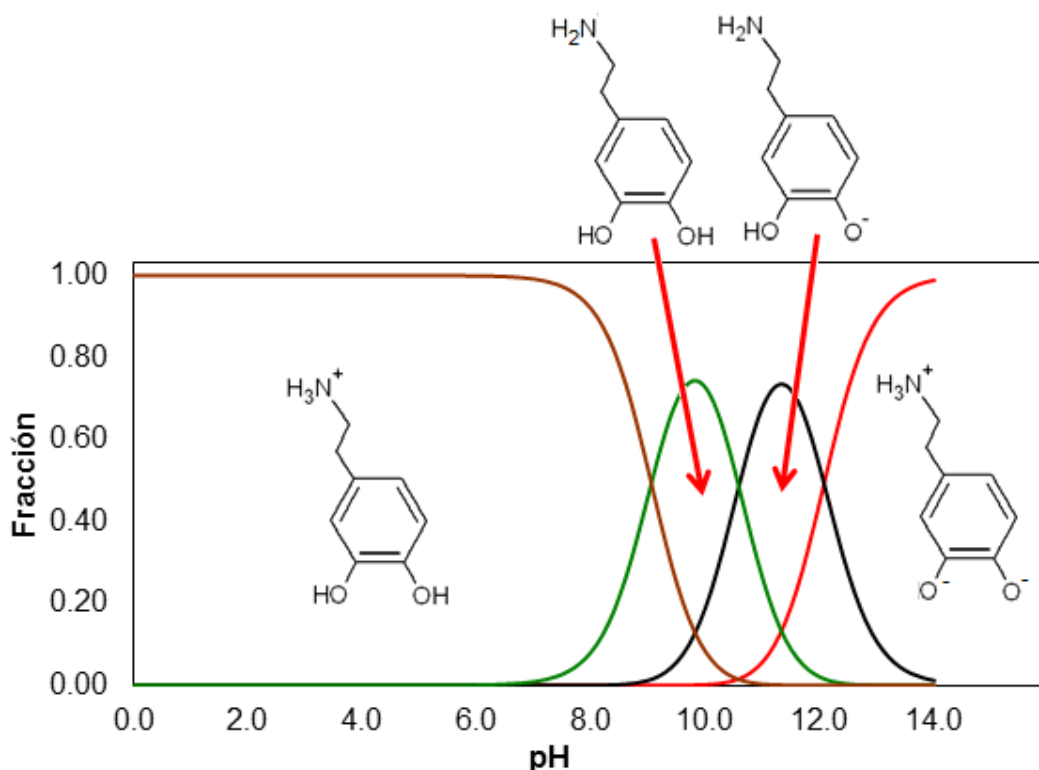


Figura 61 Diagrama de distribución de especies de DA.

La caracterización química de las especies en disolución que se describió anteriormente permitió describir los voltamperogramas cíclicos obtenidos al agregar DA y AA en LC. Es decir, cuando se tenía DA en la celda electroquímica en un sistema de

dos electrodos, se detectó la oxidación irreversible por la presencia de un solo pico a un potencial cercano a los 90 mV en los tres electrodos en estudio.

Sin embargo, cuando se adicionó una misma cantidad de AA al sistema, resultó imposible detectar los dos picos de oxidación asociados a los dos procesos electroquímicos por separado (Figura 62), es decir, no existió un reconocimiento selectivo de DA y AA, solo se mostró un desplazamiento de pico cerca del potencial de descomposición del medio (0.4 V vs. Ag/AgCl).

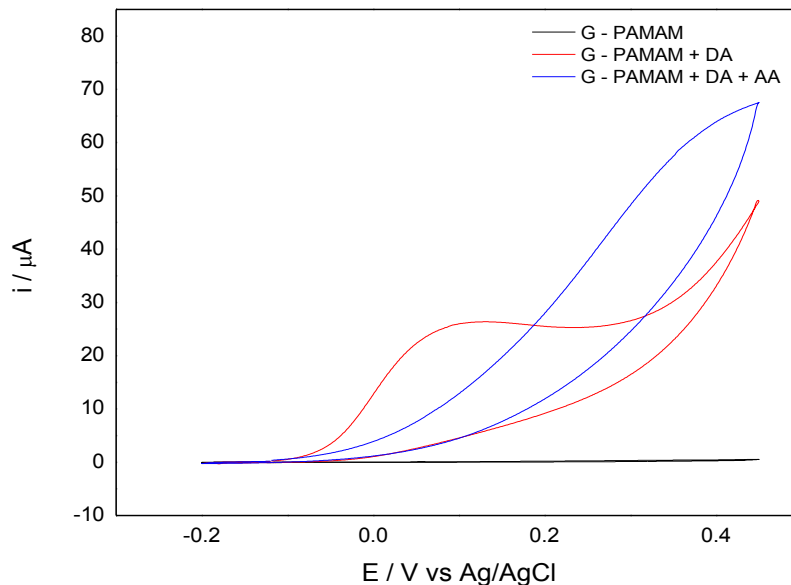


Figura 62 Voltamperogramas cíclicos empleando G-PAMAM en LCH solamente, así como con adiciones de DA y AA ($v=20 \text{ mVs}^{-1}$) en un sistema de dos electrodos.

Además, cuando se intentaron hacer otros experimentos con los mismos electrodos en estudio, estos se pasivaron, posiblemente por la acumulación de las moléculas en la interfase que no transfirieron carga al no generar un producto de reacción electroquímica.

El mecanismo de reacción que se lleva a cabo entre la DA y el AA a pH= 7 ha sido reportado previamente en la literatura [91, 92], en donde ocurre la oxidación electrocatalítica de DA, cuyo esquema de reacción se presenta en la figura 63. De esta manera, la electro-oxidación de DA en la presencia de AA resulta en la oxidación catalítica homogénea de AA. Primero, la dopamina oxidada electroquímicamente, dopaminoquinona, se reduce químicamente a DA por el ion ascorbato presente en la disolución.

Posteriormente la DA generada químicamente se re-oxida en la superficie del electrodo, lo que imposibilita la presencia de AA para su detección electroquímica bajo estas condiciones experimentales, y se presenta la pasivación del electrodo por el incremento en concentración de la DA interfacialmente, como se muestra en la figura 62.

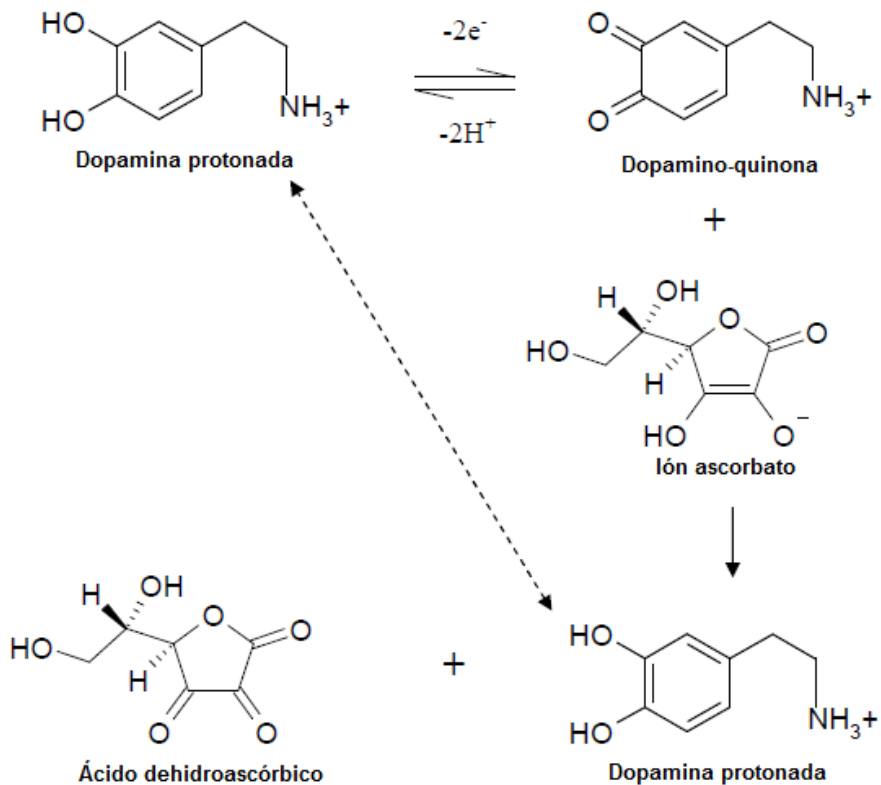


Figura 63 Mecanismo de electro-oxidación de DA y AA [91, 92].

Además, el pKa de los dendrímeros PAMAM G4.0 – 64OH se considera prácticamente igual al dendrímero PAMAM G4.0 – 64NH₂, con un pKa de las aminas primarias superficiales de 9.4 – 9.7, mientras que de las aminas terciarias internas de 7.5 [45], datos que sugieren que a pH 2 y pH 7.2 el dendrímero hidroxilado estaría neutro y no intervendría en la atracción o repulsión de los productos de reacción electroquímica homogénea, y no tiene efecto la carga del dendrímero en el mecanismo de la DA + AA.

En la figura 64 se presenta una propuesta del mecanismo electrocatalítico antes mencionado, en donde se esquematiza que después de llevarse a cabo la oxidación electroquímica de dopamina (a), debido a la presencia de los iones ascorbato (recuadro

rojo) ocurre una reacción catalítica en donde por una parte se regenera DA y por otra, se produce ácido deshidroascórbico (b).

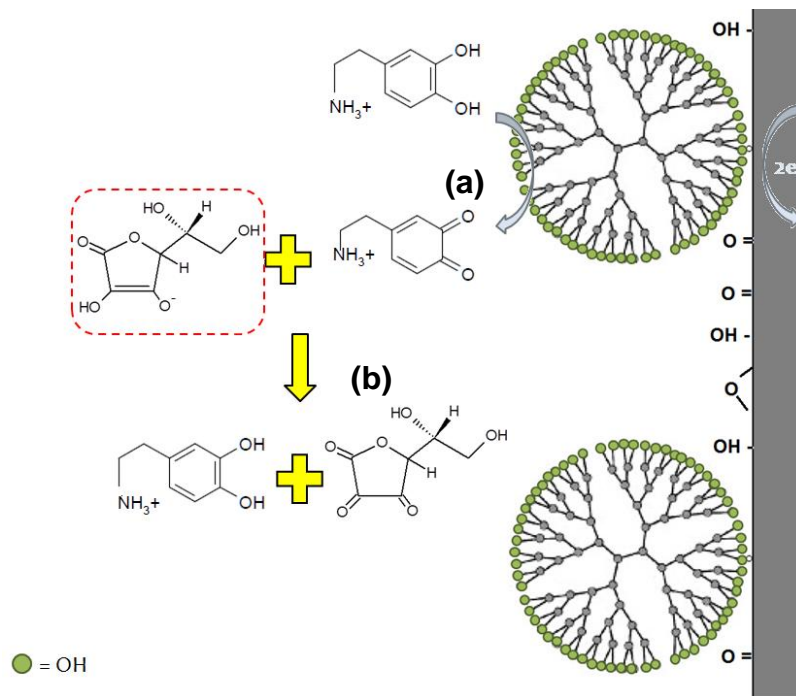


Figura 64 Representación esquemática parcial del mecanismo de reacción de DA en presencia de AA a pH=7.2, en donde se destaca la reacción electroquímica (a), así como la reacción química posterior (b) debida a la presencia de iones ascorbato (recuadro rojo) que conlleva a la regeneración de DA y la producción de ácido deshidroascórbico.

9.5.2. Análisis de la selectividad de los electrodos en disoluciones sintéticas.

Por los resultados antes presentados, se llevaron a cabo experimentos para verificar la selectividad del electrodo G-PAMAM en LCS (Figura 65). Al igual que en LCH, cuando se incrementó la concentración de AA en LCS, se incrementa la corriente de oxidación de DA que ocurre a 150 mV vs Ag/AgCl, y muestra un proceso cuasi-reversible por la presencia del pico de oxidación y otro que se generó de reducción, los cuales no presentaron una relación equivalente de corriente.

Sin embargo, estos resultados comprueban que al emplear LCH o LCS, el AA se descompone al ion ascorbato que no transfiere carga y genera más DA, como se mostró en el mecanismo de las figura 63 y 64.

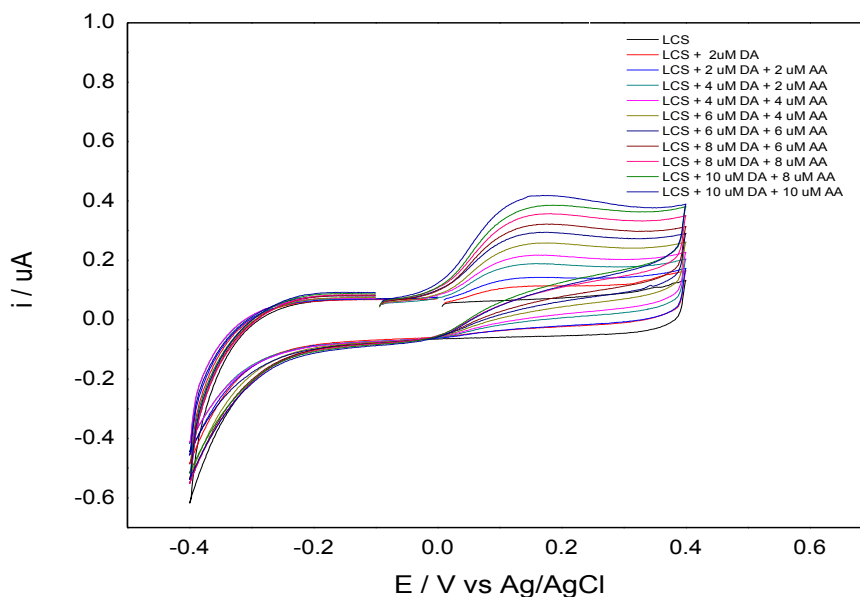


Figura 65 Voltamperogramas cíclicos de distintas concentraciones de DA y AA en LCS, empleando el electrodo G-PAMAM.

Posteriormente, con el fin de conocer si este comportamiento de la falta de selectividad de la DA empleando el electrodo de **G – PAMAM** era debido a la composición del LCS, se realizaron VC en presencia de una disolución amortiguadora de fosfatos (DAF) al mismo pH del LCS, pH = 7.2 (Figura 66).

Sin embargo, al igual que los experimentos anteriores con el LCS, la DAF tampoco ayudó a la selectividad de DA reflejando el mismo mecanismo electrocatalítico que en el LCH y LCS durante su determinación electroquímica empleando el electrodo de **G – PAMAM** (Figura 62 y 65, respectivamente), mostrando un proceso cuasi-reversible como lo mostró el LCS, con un pico de oxidación a 0.22 V vs. Ag/Cl y otro de reducción a 0.10 V vs. Ag/AgCl, siendo menores las corrientes de reducción respecto a las de oxidación, las cuales incrementaban conforme incrementaba la concentración de DA y AA.

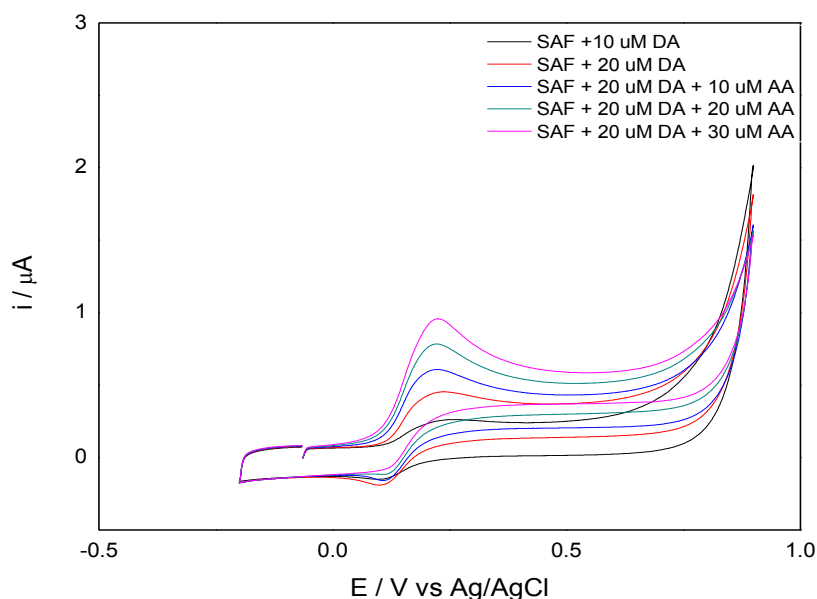


Figura 66 Voltamperogramas cíclicos de DA y AA en una disolución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2 empleando el electrodo de G – PAMAM a 20 mV s^{-1} .

Para verificar que el mecanismo electrocatalítico de oxidación de DA – AA se desacoplara al disminuir el pH de la disolución, y con esto, mejorar la selectividad del reconocimientos de la DA y AA sobre el dendrímero PAMAM G4.0 – 64OH en la superficie del grafito, se consideró comparar el comportamiento electroquímico con VC de estos sistemas en una solución amortiguadora de fosfatos con un pH ácido (pH = 2) y neutro (pH = 7.2), con las mismas concentraciones de DA y AA ($20 \mu\text{M DA} / 20 \mu\text{M AA}$, Figura 68).

De esta manera, se observó en la figura 68 que si existe una selectividad en la determinación de DA empleando la DAF pH = 2 y el electrodo de G – PAMAM, ya que es posible discernir entre la oxidación del AA y la de la DA, a 450 y 640 mV vs Ag/AgCl, respectivamente. Esto se debe a que a este pH predominantemente no existen iones ascorbato en la disolución como se mostró a pH 7.2 (Figura 60), que inhiban la presencia de la señal de AA y DA por separado.

Este mecanismo se presenta en la figura 67, en donde se propone que ambas reacciones de electro-oxidación ocurren a potenciales distintos, para posteriormente reaccionar químicamente, generando ácido dehidroascórbico dihidratado **(a)** y leucodopaminocromo **(b)**, de acuerdo a lo reportado en literatura [17-20, 109] (Figura 67).

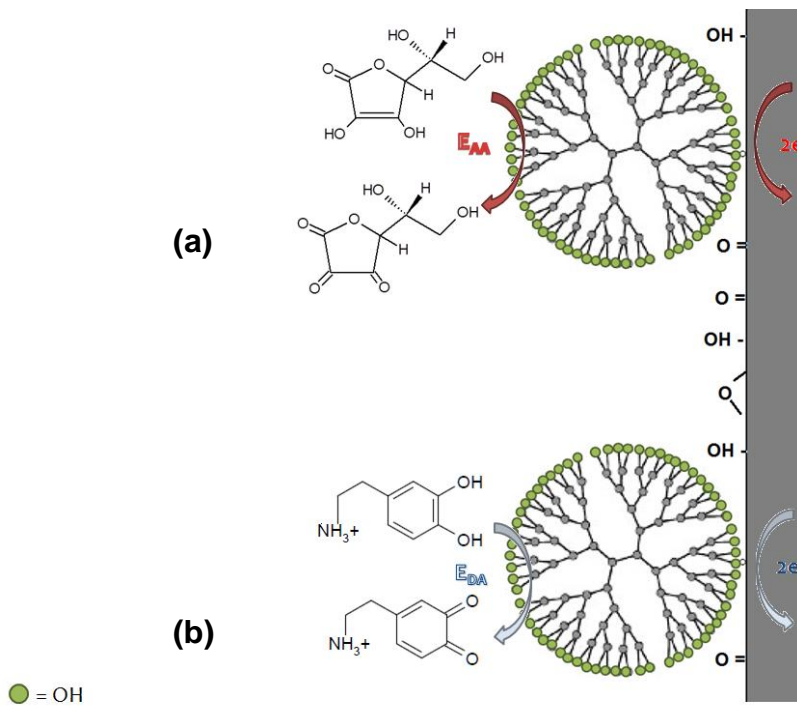


Figura 67 Representación esquemática parcial del mecanismo de reacción de DA en presencia de AA a pH=2, en donde ocurre la reacción de electro-oxidación del AA **(a)** y DA **(b)** a dos potenciales distintos.

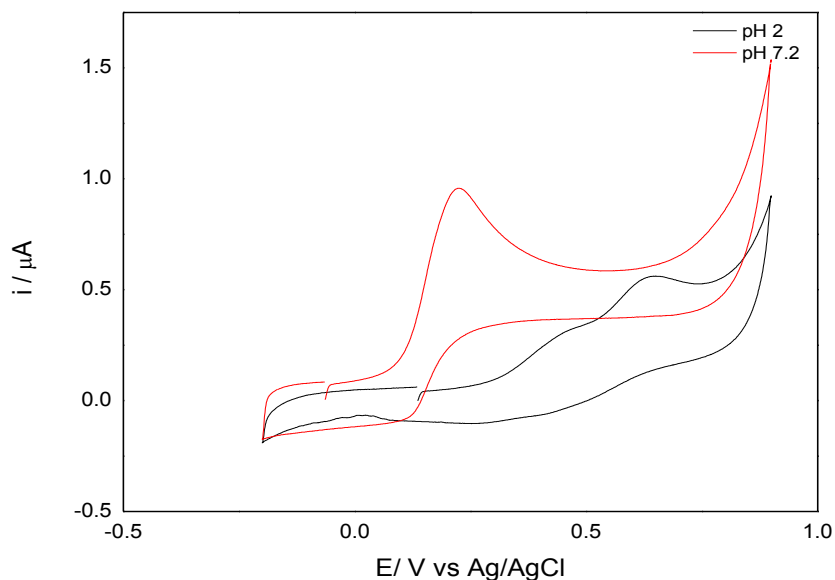


Figura 68 Voltamperogramas cíclicos de DA y AA en una disolución amortiguadora de fosfatos con pH 2 y 7.2, así como una concentración de DA y AA de 20 μ M. $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$.

Esta selectividad fue contundente al incrementar la concentración de DA y AA en la celda, e incrementar la corriente de cada sistema electroquímico al mismo tiempo a 0.45 y 0.64 V vs. Ag/AgCl para AA y DA respectivamente (Figura 69), mostrando un sistema cuasi-reversible para el AA e irreversible para la DA.

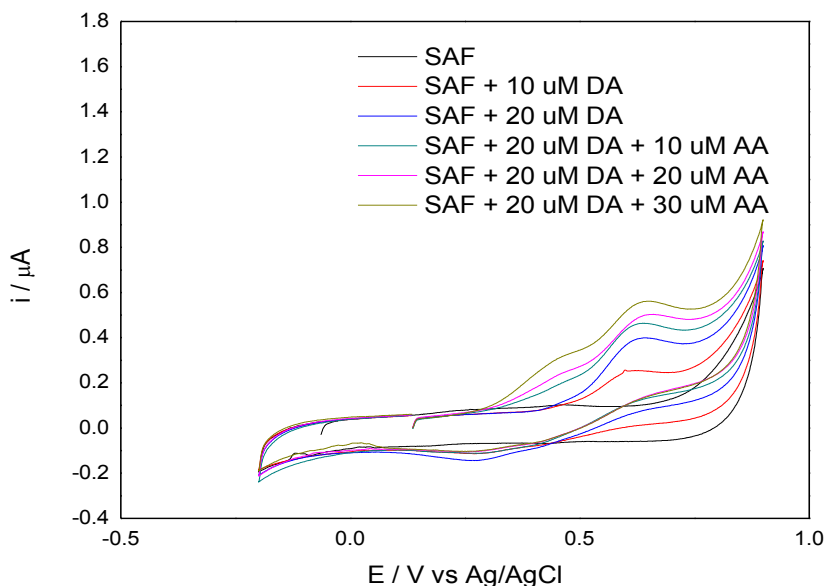


Figura 69 Voltamperogramas cíclicos de DA y AA en una disolución amortiguadora de fosfatos pH = 2, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Además, en la figura 69 se observa que el potencial de oxidación de DA se desplaza hacia potenciales más positivos en pH 2 (0.64 V vs Ag/AgCl) respecto a pH 7.2 (0.22 V vs Ag/AgCl), lo que se traduce en que se requiere de una mayor energía para poder llevar a cabo la transferencia electrónica en condiciones ácidas y presencia de AA.

Estos resultados sugieren que a pH neutro es necesario una interfase ácida en el electrodo para que se lleve a cabo la separación entre ambas señales, y por tanto, la selectividad del electrodo a la reacción de oxidación de DA, ya que al tener presente una interfase ácida, la presencia del ion ascorbato es mínima y se inhibe la reacción electrocatalítica que regenera la dopamina recién oxidada químicamente.

Por lo tanto, se sugiere que el dendrímero PAMAM G4.0 – 64OH sea reemplazado por un material que ofrezca, por un lado, una repulsión a los iones ascorbato presentes en la disolución a pH neutro, y al mismo tiempo, catalice la reacción de oxidación de DA (Figura 70 - a). La otra alternativa es realizar los experimentos *ex situ*, modificando el pH, de tal manera que el efecto de la electro-oxidación catalítica de la DA se minimice (Figura 70 - b).

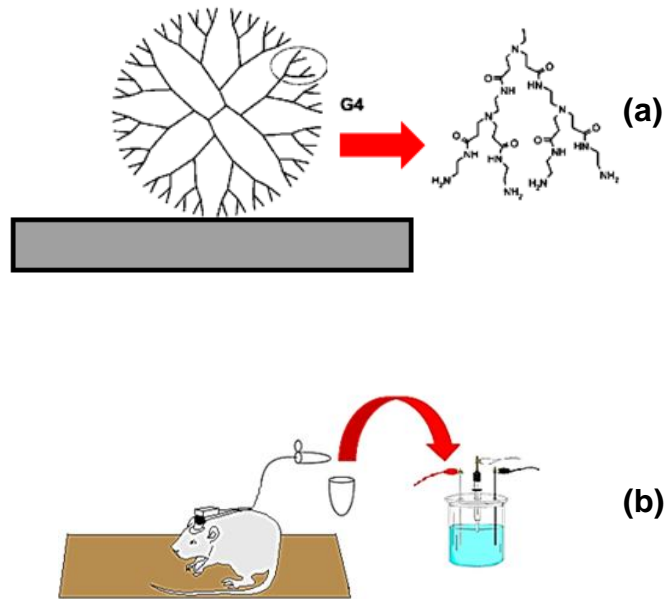


Figura 70 Representación esquemática de las alternativas que se sugieren para mejorar la selectividad del electrodo: (a) diseñar un electrodo con interfase ácida para llevar a cabo los experimentos a pH neutro, o bien, (b) llevar a cabo los experimentos *ex-situ* modificando el pH de la muestra biológica de pH 7.2 a 2.

10. Conclusiones generales.

Con este trabajo de tesis se comprobó que las puntillas de grafito pueden utilizarse como sustratos electródicos en la fabricación de sensores electroquímicos para la detección de Dopamina; además, la dimensión de este electrodo hace posible su inserción en el cerebro de una rata para el monitoreo de la concentración de este neurotransmisor *in vivo*.

De manera particular, en el primer apartado se seleccionó la puntilla de grafito a utilizar como electrodo de entre distintas marcas comerciales. Una vez efectuada la caracterización del electrodo desnudo por distintas técnicas se verificó la conveniencia de pre-tratar el sustrato con el objetivo de modificar su estructura superficial. Tras efectuar la prefuncionalización, fue posible detectar cambios estructurales que indican una mayor cantidad de grupos quinona en la superficie.

El procedimiento de modificación del electrodo pre-funcionalizado con dendrímeros PAMAM G4 con 64 grupos hidroxilo terminales se estableció y caracterizó, logrando un recubrimiento superficial aparente del 18%, lo cual se confirmó a partir de los resultados obtenidos por espectroscopia Raman y XPS. Con base en lo anterior, se propuso un mecanismo de unión covalente mediante un enlace tipo éster entre los átomos de oxígeno de los anhídridos ftálicos presente en la superficie y de los grupos hidroxilo terminales del dendrímero.

Por otra parte, se sintetizaron los compositos de dendrímeros PAMAM G4.0 – 64OH y nanopartículas de Pt vía reducción química y por micro-ondas, sin embargo, al modificar las puntillas de grafito pre-funcionalizadas no se observó el efecto electrocatalítico en la determinación electroquímica de DA en LC, quizás se deba al soporte electródico, ya que, a diferencia del grafito, la estructura del electrodo de carbón vítreo permite que exista un mejor recubrimiento superficial del electrodo, cuantificando una mayor densidad de corriente de oxidación de Dopamina. Sin embargo, en el grafito no sucedió lo mismo debido a que el depósito del dendrímero era a través de los bordes, lo que ocasionaba que no existiera efecto electrocatalítico. A partir de este periodo, se decidió que las modificaciones se harían solo con los Dendrímeros sin nanopartículas presentes.

De esta manera, con el electrodo de **G – PAMAM G4.0 – 64OH** se realizaron experimentos preliminares acoplándolo a un dispositivo electrónico construido en CIDETEQ, para la cuantificación de DA *in vivo*. Con este dispositivo miniaturizado se realizaron las curvas de calibración correspondientes de DA en LCS y LCH a nivel laboratorio, con el cual se obtuvo una sensibilidad de $0.018 \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$, un límite de detección y cuantificación de 6.67 y 22.24 nM, respectivamente. El dispositivo fue correctamente acoplado y la determinación de DA en LCH *in vivo* en un rata Wistar resultó satisfactoria, con lo que se demostró que era posible realizar dichas determinaciones, por lo que este dispositivo miniaturizado y portátil puede tener una aplicación potencial en determinaciones reales haciendo factible su uso como procedimiento de rutina.

Finalmente, se verificó la selectividad a la reacción de oxidación de Dopamina en presencia de ácido ascórbico en LCH y LCS (pH = 7.2), en donde se observó que no existía una selectividad, ya que solo se presentaba un pico de oxidación en presencia de DA y AA. Este mismo comportamiento se observó en una disolución amortiguadora de fosfatos al pH del líquido cefalorraquídeo (pH = 7.2). En cambio, al disminuir el pH a 2, se observó que la señal de oxidación de DA y AA se separaban por 200 mV, lo que nos permitió concluir que para lograr la selectividad del electrodo se requiere de un pH interfacial ácido, el cual puede ser proporcionado con la adición de un grupo funcional ácido en interfase, o bien, extrayendo el líquido cefalorraquídeo acidificándolo y midiendo la DA sin intervención de matriz.

Es así como en este proyecto se presentó una técnica alternativa sumamente atractiva para la determinación y cuantificación de Dopamina en seres vivos, con la finalidad de construir sensores electroquímicos que faciliten el trabajo rutinario para el seguimiento de enfermedades neurodegenerativas sin requerir la extracción de muestra, aunado a la facilidad del empleo de dicho dispositivo por su maniobrabilidad.

11. Anexos.

Anexo I. Reactivos e instrumentación

Reactivos.

- Ácido Clorhídrico, HCl (Sigma, 36.5 – 38 %).
- Ácido Sulfúrico, H₂SO₄ (JT Baker, 98.40%).
- Borohidruro de Sodio, NaBH₄ (Karal, 99.0%).
- Dendrimeros Starbust (PAMAM G4), 64 grupos hidroxilos (4% peso en H₂O) Marca Aldrich.
- *Disolución estándar de Dopamina:* Hidrocloruro de Dopamina (Sigma, 99.9%) 10mM disuelta en solución amortiguadora de Fosfatos (pH=7.2).
- *Disolución amortiguadora de Fosfatos.* KH₂PO₄ y Na₂HPO_r (JT Baker, 99.0%). El pH se ajustó agregando disolución acuosa de NaOH 0.5M. Todos Calidad J.T. Baker, con pureza de 99.0 %.
- Ferricianuro y Ferrocianuro de Potasio, K₄Fe(CN)₆ y K₃Fe(CN)₆ (JT Baker, 99.9 y 99.5%)
- Fluoruro de Sodio, NaF (JT Baker, 99.30%).
- *Líquido Cefalorraquídeo Sintético:* NaCl (JT Baker, 99.0%) 124mM, NaHCO₃ (Karal, 99.0%) 26mM, D-glucosa (JT Baker, 99.005%) 10mM, KCl (JT Baker, 99.6%) 5mM, MgSO₄*7H₂O (Karal, 98.0%) 2mM, NaH₂PO₄ (Reprofiquin, 98.0%) 1.09mM, CaCl₂*6H₂O (99.0%) 1.34mM.
- Membrana Spectra Por 4. Número de lote 3248818. Elaboracion: Agosto 2010. 12 – 14 mil Da. Spectrum Labs, Inc.
- Tetracloroplatinato de Amonio, (NH₃)₂PtCl₄, (Strem Chemicals, 99.0%).
- Dicloruro de Hexaminrutenio [Ru(NH₃)₆]Cl₂ (99% Pureza). Marca Strem Chemicals, grado analítico.
- Nitrógeno, N₂ grado 5 marca Praxair.
- Para la limpieza de los electrodos, se empleó disolución al 10% de HNO₃.

Instrumentación

Todos los experimentos electroquímicos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente, empleando un potenciostato Electrochemical Workstation, equipado con el Software BASi Epsilon de Bioanalytical Systems, Inc. Por otra parte, en los experimentos de Espectroscopia de impedancia electroquímica se empleó un Potenciostato Bas-Zahner (Figura 71).

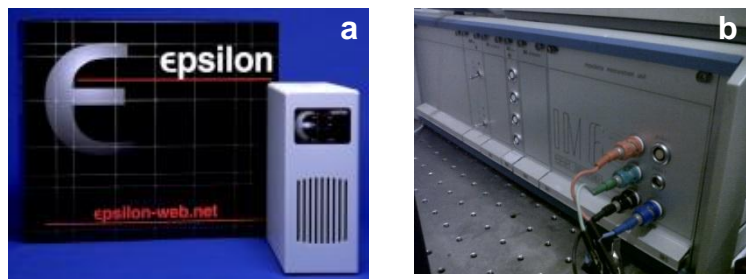


Figura 71 (a) Potenciostato Basi- Epsilon y (b) Potenciostato Bas-Zahner.

En la síntesis de Nanopartículas de Platino encapsuladas en Dendrímeros PAMAM fue empleado un sintetizador de Micro-ondas CEM Discover Labmate (Figura 72).



Figura 72 Reactor por micro-ondas CEM Discover.

El Micro-espectrómetro RAMAN marca Thermo (Figura 73) con una longitud de onda de 786 nm, fue utilizado para caracterizar los electrodos. Se tomaron 100 espectros Raman de cada muestra, mismos que fueron realizados aplicando una potencia de 10 mW con una apertura de 50 μm .



Figura 73 Micro-espectrómetro RAMAN empleado en la caracterización de los electrodos.

Anexo II. Espectroscopia de impedancia electroquímica

La espectroscopia de impedancia electroquímica es un método electroquímico que se basa en el uso de una señal de corriente alterna (CA) que es aplicada a un electrodo.

En el procedimiento experimental más comúnmente usado, se aplica una pequeña señal de potencial (E) a un electrodo y se mide su respuesta en corriente (i) a diferentes frecuencias. Así, el equipo electrónico procesa las mediciones de potencial – tiempo y corriente – tiempo, dando como resultado una serie de valores de impedancia correspondientes a cada frecuencia estudiada. Esta relación de valores de impedancia y frecuencia se denomina “espectro de impedancias”. El desarrollo matemático de la teoría que fundamenta la técnica de EIE permite describir la impedancia de un sistema en términos de una componente real y una componente imaginaria.

La clave principal en los experimentos de impedancia es la construcción de un circuito equivalente que simule el comportamiento eléctrico de la celda electroquímica, para lo cual se consideran distintas maneras en las que las cargas iónicas se involucran en el paso de la corriente.

Entre los electrodos, la solución se comporta como un conductor iónico con una resistencia R_s , conocida como resistencia óhmica de la disolución. En la interfase electrodo-disolución, algunos de los iones son empleados para ajustar la atmósfera iónica hasta alcanzar un balance de cargas entre las superficie del electrodo. Eléctricamente, esto es equivalente a la carga o descarga de un capacitor con capacitancia C_{DC} , conocida como capacitancia de la doble capa. Simultáneamente, las especies redox llevan a cabo transferencias electrónicas con los electrodos, lo que conlleva a corriente faradaica cuya magnitud refleja la velocidad de llegada de los reactivos y la velocidad del proceso de transferencia electrónica. Eléctricamente, lo anterior es equivalente a dos resistores en serie: uno para la cinética del proceso de transferencia electrónica, R_{TC} , conocido como resistencia a la transferencia de carga, y otra para la velocidad de transporte de masa, Z_w , conocido como Impedancia de Warburg. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el circuito equivalente más común, también denominado ‘Circuito de Randles’, se compone de cuatro componentes, tal y como se indica en la figura 74 [110 - 111].

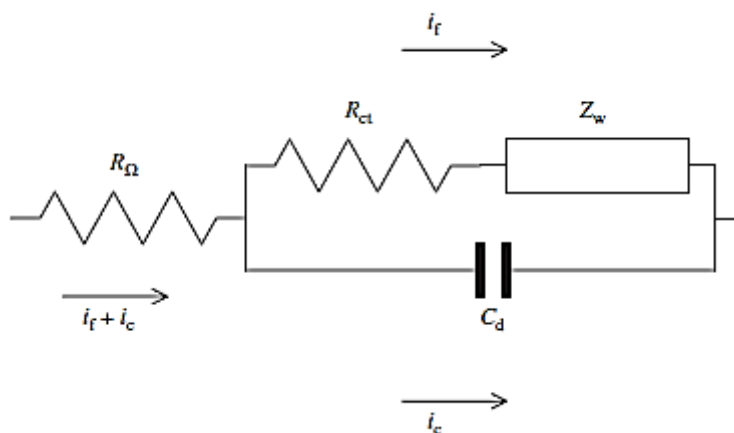


Figura 74 Representación del circuito de Randles, en donde R_{Ω} es la Resistencia de la disolución, R_{CT} , la resistencia a la transferencia de Carga, Z_w , la impedancia de Warburg y C_d es la capacitancia de la doble capa. i_f e i_c representan la corriente capacitiva y faradaica, respectivamente.

Anexo II- a Modelo de defecto.

El ‘modelo de defecto’ se construye mediante el ajuste de los datos experimentales obtenidos por EIE al modelo de Randles, con el fin de estimar la fracción efectiva del recubrimiento superficial de los agregados de dendrímtero a varias frecuencias. La estimación del recubrimiento superficial (θ) se determina por:

$$\theta = \frac{(R_T - R_T^0)}{R_T} \quad \text{[Ecuación 17]}$$

En donde R_T^0 y R_T son la resistencia a la transferencia de carga de la molécula redox sobre el electrodo desnudo y modificado, respectivamente. Esta ecuación parte de la premisa de suponer una superficie heterogénea compuesta de un área fraccional que bloquea completamente la transferencia electrónica mediante el recubrimiento superficial(θ) y una fracción de área que es completamente accesible a la molécula redox, $(1 - \theta)$ [26, 109].

Anexo II- b Determinación del área real y coeficiente de rugosidad del electrodo de grafito [21, 23 – 25].

Para determinar el área real de los electrodos se tomaron los espectros de EIS (Figura 75 – a) en una disolución de NaF 0.9 N. Posteriormente se realizó el ajuste de los datos experimentales a un circuito equivalente (Figura 75 – b) en el cual se consideró que el ion fluoruro tiene el diámetro necesario (0.136 nm) para quedar entre los planos de grafeno que componen el electrodo de grafito (Figura 75 – c). Es así como el circuito de Randles fue modificado suprimiendo el elemento de Warburg (al no efectuarse ninguna reacción electroquímica) y agregando una segunda capacitancia en serie, ya que una vez vencidas tanto la resistencia de la disolución, la resistencia a la transferencia de carga y el cargado de la doble capa (C_1), los iones fluoruro igualmente pueden fungir como un capacitor, C_2 (Figura 75 b- c).

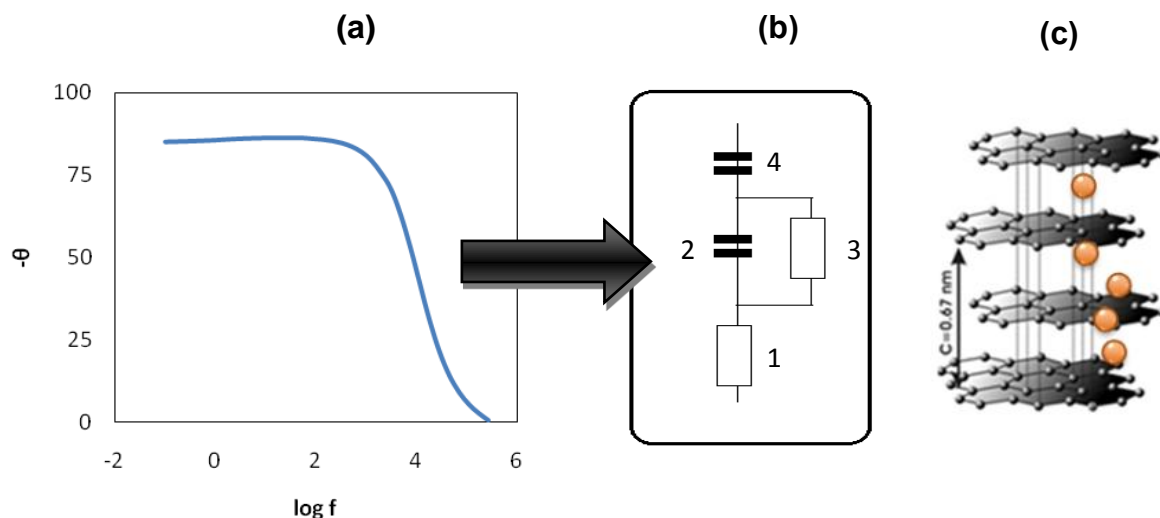


Figura 75 Representación del diagrama de Bode de un electrodo de grafito en solución NaF 0.9N (a) , así como el circuito de Randles modificado (b) asociado a éste: (1) resistencia de la solución, (2) capacitancia de la doble capa, C_1 , (3) resistencia a la transferencia de carga, (4) capacitancia debida a la estructura porosa del grafito, C_2 , así como (c) la representación esquemática de cómo los iones fluoruro pueden alojarse entre las hojas de grafeno que componen la estructura del grafito.

Posteriormente, una vez que se determinan las magnitudes de cada uno de los componentes a través de la simulación computacional, se suman las dos capacitancias que componen el circuito:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_1} + \frac{1}{C_2} \quad \text{[Ecuación 19]}$$

Enseguida se determina el área real del electrodo (A) a partir de la capacitancia específica del grafito reportada en literatura ($0.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) [21, 23, 24].

$$A_r = \frac{C}{0.6 \mu\text{Fcm}^{-2}} \quad \text{[Ecuación 20]}$$

Ahora bien, el cálculo del coeficiente de rugosidad se realizó tomando en cuenta el área real (A_r) y el área geométrica (A_g) del electrodo cilíndrico de grafito (Figura 76):

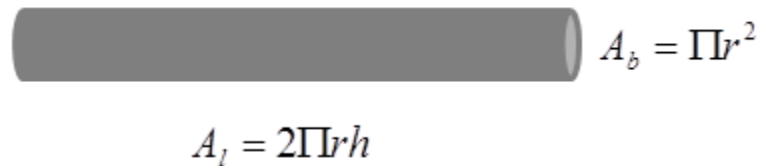


Figura 76 Representación del electrodo cilíndrico de grafito.

Por lo que para el cálculo del área geométrica del cilindro se utilizan las ecuaciones 21 y 22:

$$A_g = A_b + A_l \quad \text{[Ecuación 21]}$$

$$A_g = \Pi r^2 + 2\Pi r h \quad \text{[Ecuación 22]}$$

Entonces, el coeficiente de rugosidad (n) se determina mediante la ecuación:

$$A_r = nA_g \quad \text{[Ecuación 23]}$$

Finalmente se efectuaron experimentos de EIS en los que se emplearon electrodos de longitudes expuestas de electrodo de 2 a 8 mm. Una vez determinadas las áreas reales de cada uno de una gráfica A_r vs A_g nos proporcionó el coeficiente de rugosidad a partir de la pendiente de la recta (Figura 77). }

A_r promedio (cm^2)	A_g promedio (cm^2)
0.70	0.03
0.87	0.05
1.31	0.07
1.81	0.10
2.29	0.11
2.49	0.13

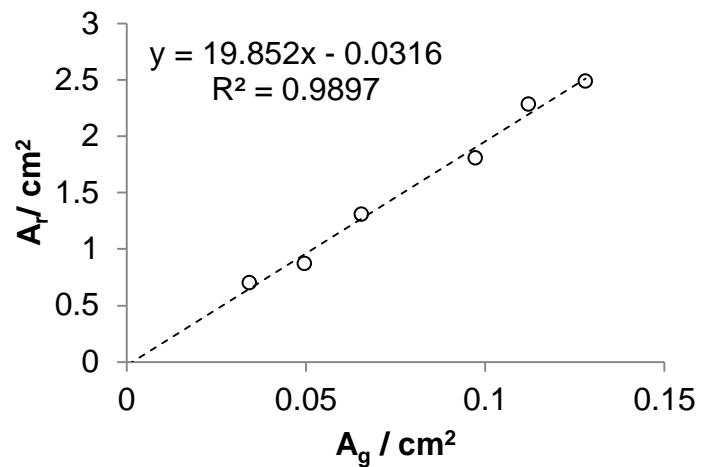


Figura 77 Resultados de la determinación del área real del electrodo A por EIS a distintas áreas geométricas, así como la gráfica para la obtención de la rugosidad del electrodo.

De manera que el electrodo de grafito presenta una rugosidad de 19.582, en un intervalo de área geométrica que va de 0.03 a 0.13 cm^2 .

Anexo III. Dispositivo electrónico.

La estudiante Alma Gálvez Mendoza del Instituto Tecnológico de Querétaro, bajo la asesoría del Mtro. Luis Alberto Ramírez de CIDETEQ, desarrolló un prototipo electrónico que pretende sustituir el uso de la computadora y el potencióstato para el procesamiento de datos, brindado directamente el nivel de concentración de dopamina, *in situ*, en tiempo real [105].

Construcción del dispositivo electrónico.

El dispositivo fue diseñado (Figura 78) en base al entendimiento del funcionamiento de un potencióstato, el cual se encarga de controlar la diferencia de potencial entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia a través de la inyección de corriente a un electrodo auxiliar.

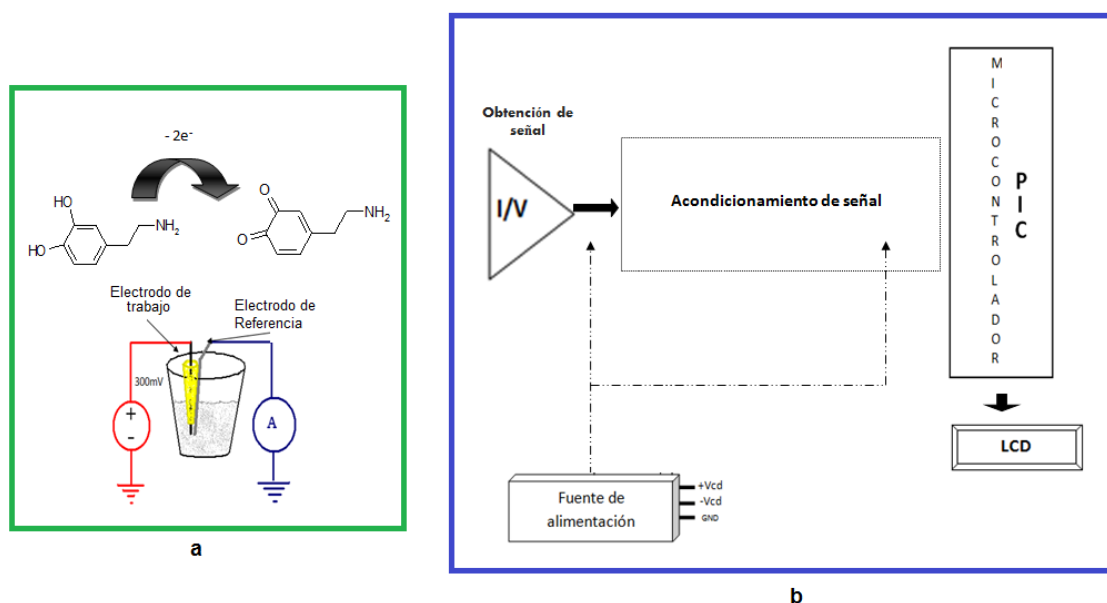


Figura 78 Diagrama representativo de la celda electroquímica conformada por un sistema de 2 electrodos (a), acoplada al dispositivo electrónico (b).

Para realizar la medición de corriente, se conectaron los electrodos a un convertidor de corriente a voltaje (Figura 78 - a) que permite hacer la lectura de la corriente por medio de un amplificador electrométrico (OPA128LM) el cual posee las características óptimas para realizar esta función por tener una corriente de polarización del orden de los femtoamperes.

Después de obtener la señal de tensión del convertidor, se procede a realizar una etapa de amplificación y linealización del sistema para proceder a la etapa de digitalización. La cual consiste en:

- *Amplificación.* En la etapa anterior el potencial correspondiente a corriente se lee como $V_o = -RI$, en donde V_o es Voltaje de salida, R resistencia e I es la corriente de entrada. Debido a lo anterior y a que el nivel de señal es bastante bajo, es necesario entonces cambiar la polaridad de la señal obtenida y amplificarla en magnitud para poder llegar a la etapa de linealización.
- *Linealización.* Con el objetivo de que la respuesta del equipo sea lineal para el registro de resultados por la parte de la digitalización.

Después de obtener los valores de tensión de la salida de la etapa de amplificación se procede a linealizar, generando una ecuación que describa los datos experimentales.

En esta etapa se hace uso del microcontrolador PIC16F877A, mismo que posee una serie de características y funcionalidades que lo hacen idóneo para la conversión analógico-digital de la señal de entrada, cuantificación y el procesamiento matemático, con el objetivo de dar el resultado medido. Las etapas de la digitalización son:

- 1) **Conversión analógica digital (CAD):** Se realiza la conversión analógica-digital con el módulo del microcontrolador, al terminar la conversión el resultado es almacenado como un número digital de 10 bits.
- 2) **Obtención del valor de concentración de la Dopamina:** Una vez terminada la conversión analógica - digital, el número de 10 bits resultante que se obtiene, se multiplica por otro número previamente definido al que se conoce como factor de calibración, el resultado de esta multiplicación es la medida de la concentración de Dopamina de la muestra.
- 3) **Visualización de la concentración de Dopamina en la LCD:** Conocido ya el valor de concentración de Dopamina, solo queda llevarlo a la pantalla de cristal líquido por medio de una subrutina establecida en el microcontrolador.

El dispositivo cuenta con cuatro botones: encendido / apagado, inicio, re-impresión del último resultado y de encendido / apagado de luz de la pantalla (Figura 79). Una vez conectados los dos electrodos, al presionar el botón de inicio se aplica un potencial constante de 300 mV durante dos minutos, y se despliega la pantalla de la figura 80 – c.

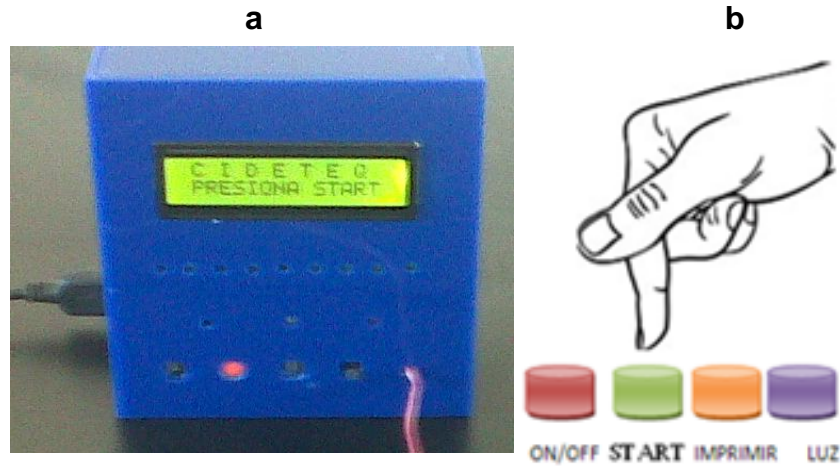


Figura 79 Dispositivo electrónico construido (a) y un diagrama de los botones de las funciones con las que éste cuenta (b).

Una vez transcurridos 30 segundos, se realizan 200 mediciones de corriente y se obtiene un valor promedio de la misma. Cuando finaliza el experimento, en un tiempo total de 2 minutos, se despliega en la pantalla la concentración de DA presente en la muestra (Figura 80 – c).

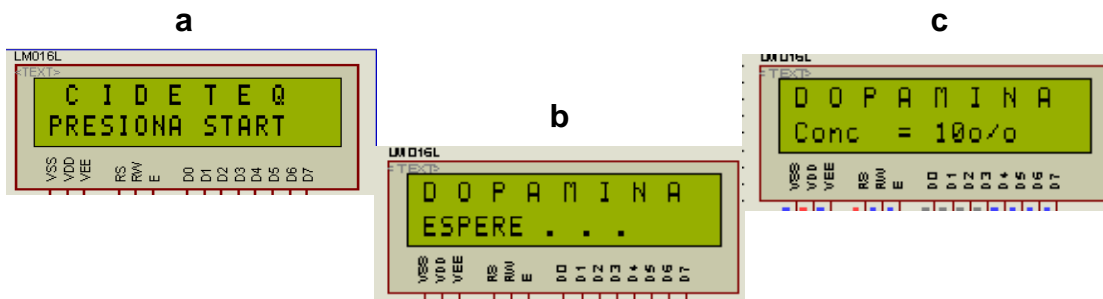


Figura 80 Pantalla de (a) encendido del dispositivo, (b) aplicación del potencial y cuantificación de la corriente muestreada y (c) de impresión de la concentración de DA.

Anexo IV. Espectroscopia de fotoelectrones emitida por Rayos-X.

La espectroscopia de fotoemisión (PES, por sus siglas en inglés, *Photo-Emission Spectroscopy*), es una técnica que mide la distribución de energía de electrones emitidos por átomos y moléculas de varias cargas y estados de energía [106]. Un material irradiado con luz ultravioleta (UPS, por sus siglas en inglés, *Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy*) o con rayos X (XPS, por sus siglas en inglés, *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) puede emitir electrones, llamados fotoelectrones, desde niveles atómicos de energía, con una energía cinética igual a la diferencia entre la energía del fotón ($h\nu_f$) y la energía de ionización, E_{ion} , que corresponde a la energía necesaria para desprender completamente un electrón de un nivel atómico de energía (Figura 81) [107]:

$$\text{Energía cinética (EC)} = h\nu_f - E_{ion} \quad [\text{Ecuación 24}]$$

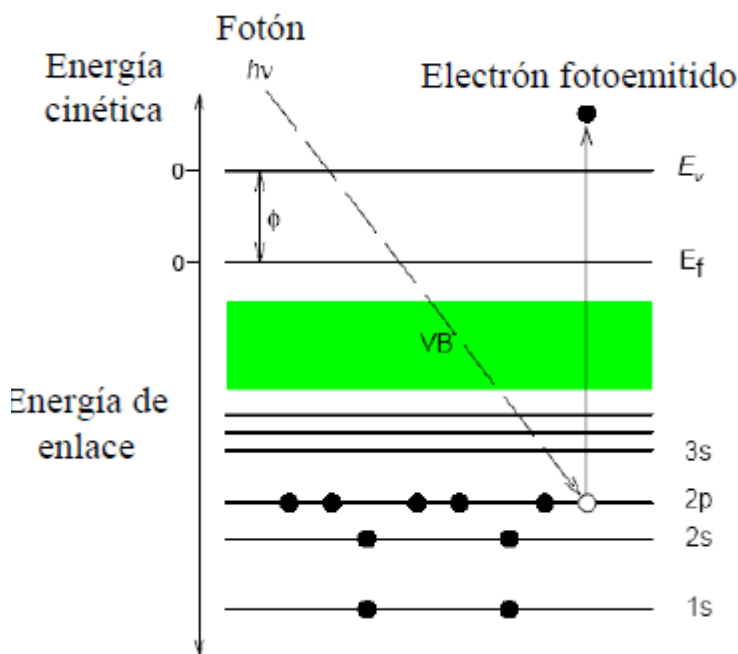


Figura 81 Representación gráfica de la transición entre el nivel energético basal y el promovido, tras hacer incidir fotoelectrones emitidos por Rayos – X. Adaptado de referencia [106].

En la figura 82 se muestra la representación de un espectrómetro fotoelectrónico, en donde se observa que los fotones de rayos X inciden sobre la muestra; posteriormente éstos pasan a través de un analizador de velocidad que permite, dentro de un intervalo muy estrecho de velocidades, que los electrones se muevan a lo largo de trayectorias que los conducen desde una ranura de entrada, y a la salida, impactan en el detector. A su vez, el detector mide el número de electrones emitidos, los registra y los representa como el flujo de electrones en función de la energía cinética, obteniendo de esta manera el espectro fotoelectrónico.

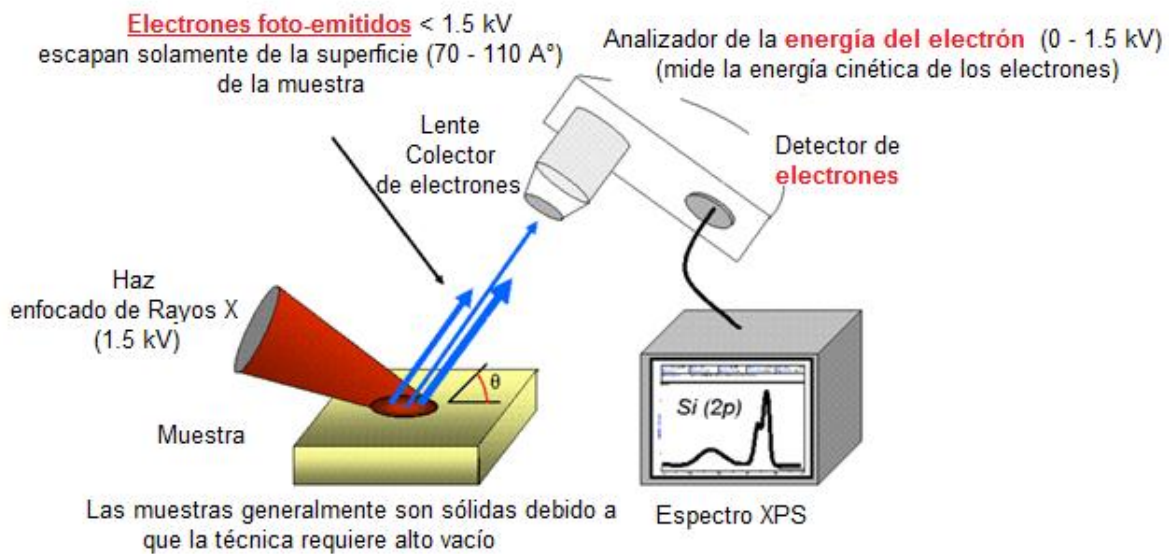


Figura 82 Representación esquemática de un espectrómetro XPS durante el análisis de una muestra.

Es importante mencionar que los Rayos-X que se emplean en esta técnica pueden penetrar pocas micras en una muestra sólida, sin embargo, los fotoelectrones que se emiten son sólo aquellos que pueden abandonar la muestra antes de perder toda su energía, por lo que provienen únicamente de las capas más externas, dando como resultado que el análisis por XPS sea esencialmente superficial.

Anexo V. Cálculo de los límites de detección y cuantificación.

Límite de detección [119-120].

De acuerdo a la IUPAC, se define como la cantidad más baja de especie de interés que una técnica analítica puede detectar, sin que la señal analítica se relacione con la concentración real del mismo. Y se calcula:

$$L.D. = \frac{3\sigma}{m} \quad \text{[Ecuación 25]}$$

Donde:

σ = Desviación estándar del ruido.

m = Pendiente obtenida de la curva de calibración correspondiente a ese analito.

Límite de cuantificación [119-120].

De acuerdo a la IUPAC, se refiere a la concentración más baja de analito que pueda ser medida cuantitativamente por una técnica analítica. En este caso la cantidad que se detecta debe ser una señal que se relacione con la concentración del analito. Y se calcula:

$$L.C. = \frac{10\sigma}{m} \quad \text{[Ecuación 26]}$$

Donde:

σ = Desviación estándar del ruido

m = Pendiente obtenida de la curva de calibración correspondiente a ese analito.

Anexo VI. Parámetros de intensidad de corriente empleados en la construcción de curvas de calibración.

Tabla 7

Electrodo A

C / ppm	i / μA	Desviación
0.7590	0.3549	0.0014
1.5180	0.5712	0.0011
2.2770	0.8358	0.0519
3.0361	1.0971	0.0920
3.7951	1.3813	0.1450
4.5541	1.6663	0.2212
5.3131	1.9440	0.2628
6.0721	2.1835	0.2811
6.8311	2.4354	0.2994

Electrodo C

C / ppm	i / μA	Desviación
0.7590	0.1476	0.0261
1.5180	0.2771	0.0400
2.2770	0.3924	0.0444
3.0361	0.5028	0.0637
3.7951	0.6249	0.0724
4.5541	0.7560	0.0866
5.3131	0.8747	0.1106
6.0721	1.0070	0.1223
6.8311	1.1262	0.1381
7.590	1.2575	0.1339

Electrodo B

C / ppm	i / μA	Desviación
0.7590	0.2399	0.0603
1.5180	0.4480	0.0977
2.2770	0.6510	0.1292
3.0361	0.8217	0.1346
3.7951	1.0094	0.1577
4.5541	1.1990	0.1835
5.3131	1.4084	0.1979
6.0721	1.6050	0.2037
6.8311	1.7951	0.2363
7.590	1.9966	0.2444

Electrodo D

C / ppm	i / μA	Desviación
0.7590	0.4047	0.0074
1.5180	0.7364	0.0067
2.2770	1.0638	0.0252
3.0361	1.4823	0.0247
3.7951	1.8636	0.0291
4.5541	2.2255	0.1021
5.3131	2.5556	0.0705
6.0721	2.9537	0.0613
6.8311	3.3257	0.0751
7.590	3.6601	0.1450

Electrodo E

C / ppm	i / μA	Desviación
0.7590	0.3560	0.0328
1.5180	0.6699	0.0275
2.2770	1.0029	0.0437
3.0361	1.2709	0.0180
3.7951	1.5676	0.0488
4.5541	1.9357	0.0908
5.3131	2.2581	0.0662
6.0721	2.5467	0.0727
6.8311	2.8543	0.0913
7.590	3.2050	0.1020

Electrodo G

C / ppm	i / μA	Desviación
0.7590	0.5823	0.0871
1.5180	1.1066	0.1340
2.2770	1.7669	0.2889
3.0361	2.4243	0.4533
3.7951	3.0753	0.6580
4.5541	3.6741	0.7763
5.3131	4.2299	0.8699
6.072	4.7746	0.9374
6.8311	5.4261	1.0028
7.5901	5.8891	1.0472

Electrodo F

C / ppm	i / μA	Desviación
0.7590	0.4120	0.0091
2.2770	1.1008	0.0451
3.0361	1.4530	0.0486
3.7951	1.8149	0.0602
5.3131	2.5011	0.1312
6.0721	2.8902	0.1613
6.8311	3.3374	0.1112
7.590	3.6534	0.1436

Electrodo H

C / ppm	i / μA	Desviación
0.7590	0.5080	0.1084
1.5180	0.9638	0.1726
2.2770	1.5698	0.0392
3.0361	2.0052	0.0918
3.7951	2.4401	0.0976
4.5541	2.8539	0.1516
5.3131	3.2912	0.2093
6.072	3.8212	0.2267
6.8311	5.4261	1.0028
7.5901	5.8891	1.0472

Electrodo I

C / ppm	i / μA	Desviación
0.7590	0.0642	0.0095
1.5180	0.0944	0.0009
2.2770	0.1249	0.0050
3.0361	0.1537	0.0131
3.7951	0.1845	0.0196
4.5541	0.2173	0.0211
5.3131	0.2483	0.0171
6.072	0.2868	0.0231
6.8311	0.3216	0.0292
7.5901	0.3481	0.0265

Electrodo J

C / ppm	i / μA	Desviación
0.7590	0.1559	0.0078
1.5180	0.1774	0.0080
2.2770	0.2006	0.0024
3.0361	0.2166	0.0043
3.7951	0.2388	0.0043
4.5541	0.2638	0.0528
5.3131	0.2909	0.0233
6.072	0.3218	0.0161
6.8311	0.3464	0.0139

Tabla 12.

Electrodo G - 3 e

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.1030	0.0052
2	0.2431	0.0109
4	0.3624	0.0199
6	0.4991	0.0299
8	0.6218	0.0311
10	0.7350	0.0294
12	0.8456	0.0592
14	0.9379	0.0469
16	1.0459	0.0565
18	1.1503	0.0518
20	1.2521	0.0751

Electrodo G - 2 e

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.0768	0.0038
2	0.1991	0.0100
4	0.3073	0.0154
6	0.4252	0.0213
8	0.5396	0.0270
10	0.6530	0.0327
12	0.7683	0.0384
14	0.8800	0.0440
16	1.0023	0.0501
18	1.0991	0.0550
20	1.2548	0.0627

Electrodo G PF - 3 e

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.1860	0.0093
2	0.3024	0.0166
4	0.4220	0.0190
6	0.5566	0.0390
8	0.6936	0.0069
10	0.8425	0.0169
12	0.9731	0.0487
14	1.0935	0.0328
16	1.2550	0.0665
18	1.3809	0.0829
20	1.5123	0.0302

Electrodo G PF - 2 e

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.1070	0.0054
2	0.2170	0.0050
4	0.3651	0.0150
6	0.4853	0.0119
8	0.6217	0.0137
10	0.7551	0.0211
12	0.8702	0.0435
14	0.9897	0.0396
16	1.1158	0.0558
18	1.2412	0.0559
20	1.3658	0.0546

Electrodo G PAMAM - 3 e

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.1070	0.0054
2	0.2170	0.0050
4	0.3651	0.0150
6	0.4853	0.0119
8	0.6217	0.0137
10	0.7551	0.0211
12	0.8702	0.0435
14	0.9897	0.0396
16	1.1158	0.0558
18	1.2412	0.0559
20	1.3658	0.0546

Electrodo G PAMAM - 2 e

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.19	0.0437
2	0.34	0.0170
4	0.48	0.0245
6	0.64	0.0147
8	0.80	0.0421
10	0.95	0.0406
12	1.09	0.0251
14	1.24	0.0620
16	1.39	0.0626
18	1.55	0.1008
20	1.72	0.0172

Tabla 13.

G

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.0062	0.0005
2	0.0244	0.0018
4	0.0426	0.0028
6	0.0608	0.0024
8	0.0790	0.0042
10	0.0972	0.0060
12	0.1154	0.0081
14	0.1336	0.0067
16	0.1518	0.0093
18	0.1700	0.0092
20	0.1882	0.0113

G - PAMAM

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.0007	0.0001
2	0.0342	0.0017
4	0.0741	0.0041
6	0.1190	0.0036
8	0.1570	0.0063
10	0.1910	0.0067
12	0.2230	0.0100
14	0.2700	0.0162
16	0.3030	0.0136
18	0.3400	0.0170
20	0.3700	0.0074

G - PF

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.0067	0.0003
2	0.0269	0.0009
4	0.0471	0.0025
6	0.0673	0.0031
8	0.0875	0.0044
10	0.1077	0.0065
12	0.1279	0.0029
14	0.1481	0.0086
16	0.1683	0.0135
18	0.1885	0.0057
20	0.2087	0.0071

Tabla 15.

G - DENs Pt 100°C

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.0007	0.00003
2	0.0347	0.0016
4	0.0687	0.0036
6	0.1027	0.0067
8	0.1367	0.0104
10	0.1707	0.0051
12	0.2047	0.0092
14	0.2387	0.0103
16	0.2727	0.0136
18	0.3067	0.0178
20	0.3407	0.0204

G - DENs Pt 60°C

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.0010	0.0001
2	0.0327	0.0017
4	0.0647	0.0022
6	0.0967	0.0027
8	0.1287	0.0024
10	0.1607	0.0051
12	0.1927	0.0098
14	0.2247	0.0083
16	0.2567	0.0077
18	0.2887	0.0121
20	0.3207	0.0064

G - DENs Pt 80°C

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.0008	0.00004
2	0.0387	0.0013
4	0.0767	0.0033
6	0.1147	0.0053
8	0.1527	0.0078
10	0.1907	0.0124
12	0.2287	0.0114
14	0.2667	0.0187
16	0.3047	0.0116
18	0.3427	0.0195
20	0.3807	0.0228

G - DENs Pt 40°C

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.0009	0.0001
2	0.0287	0.0019
4	0.0567	0.0040
6	0.0847	0.0073
8	0.1127	0.0051
10	0.1407	0.0070
12	0.1687	0.0094
14	0.1967	0.0118
16	0.2247	0.0137
18	0.2527	0.0157
20	0.2807	0.0225

G - DENs Pt Q

c / μM	i / μA	Desviación
0	0.0006	0.00003
2	0.0247	0.0013
4	0.0487	0.0022
6	0.0727	0.0042
8	0.0967	0.0054
10	0.1207	0.0041
12	0.1447	0.0074
14	0.1687	0.0083
16	0.1927	0.0100
18	0.2167	0.0085
20	0.2407	0.0123

12. Referencias bibliográficas.

- [1] Ezquerro, M. *Enfermería Global*, **14** (2008) 1-10.
- [2] Secretaría de Salud. *Programa de Acción en Salud Mental. Primera parte*, (2002) 43-51.
- [3] Stella, V. J. y Rajewski. R. A., *Pharmaceutical Research*, **14** (1997) 556.
- [4] Micheli, F. *Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados*. Editorial Médica Panamericana. México, (2006).
- [5] Venton, B.; Wightman, R. "Psychoanalytical electrochemistry: Dopamine and Behavior". *Analytical Chemistry*. (2003) 414-421.
- [6] Bito, L.; Davson, H.; Levin, E.; Murray, M. y Snider, N. *J. Neurochem.***13** (1966) 1057-1067.
- [7] Wassell J. *Clin Chem* **45** (1999) 2216-2223.
- [8] Lin, L.; Qiu, P.H.; Yang, L.Z.; Cao, X.N.; Jin, L.T. *Anal. Bioanal Chem.* **384** (2006).
- [9] Bergquist, J.; Sciubisz, A.; Kaczor, A. y Silberring, J. *J. Neurosci. Methods* **113** (2002) 1-13.
- [10] Peaston, R. y Weinkove, C. *Ann. Clin. Biochem.***41** (2004) 17-38.
- [11] Zapata, A.; Chefer, V. y Shippenberg, T. *Currents protocols in Neuroscience*. DOI: 10.1002/0471142301.ns0702s47. Publicado en Abril del 2009.
- [12] Nohta, Hitoshi; Yukizawa, T.; Ohkura, Y.; Yoshimura, M.; Ishida, J. y Yamaguchi, M. *Anal. Chim. Acta* **344** (1997) 233-240.
- [13] Jin, W.; Jin, L.T.; Shi, G.S.; Ye, Y.N. *Anal Chim. Acta* **382** (1999) 33-37.
- [14] Israel, M. y Tomasi, M. *J. Neurosci. Meth.* **91** (1999) 101-107.
- [15] García, M.G.; Armendáriz, G.M.E.; Godínez, L.A.; Torres, J.; Sepúlveda-Guzmán, S. y Bustos, E. *Electrochimica Acta* **56** (2011) 7712-7717.
- [16] Lin, L.; Cai, Y.P.; Lin, R.P.; Yu, Li.; Song, C.Y.; Gao, H.C. y Li, X.K. *Microchim Acta.* **172** (2011) 217-223.
- [17] Dale, N.; Hatz, S.; Faming, T. y Llaudet, E. *Trends in Biotechnology.* **23** (2005) 420-428.
- [18] Afkhami, A.; Nematollahi, D.; Khalafi, L. y Rafiee, M. *Int. J. Chem. Kinetics.* **37** (2005).
- [19] Luczak, T. *Electroanalysis* **20** (2008) 1639.

- [20] Li, Y.; Liu, M.; Xiang, C.; Xie, Q. y Yao, S.Z *Thin solid films* **497** (2006) 270.
- [21] McCreery, R.L.; Cline, K.K.; McDermott, C.A.; McDermott, M.T. *Colloids Surf* **93** (1994) 211.
- [22] Kinoshita, C. *Carbon: electrochemical and physicochemical properties*. Wiley. New York, (1998).
- [23] McCreery, R.L.. En: Bard, A.J., ed *Electroanalytical Chemistry*. Dekker. New York, (1991).
- [24] McCreery, R.L. En: Kissinger, W.R.; Heineman, W.R., eds. *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*. Dekker. New York, (1996).
- [25] Moore, A. en *Chemistry and Physics of carbon*. **17**. Dekker. New York, (1981).
- [26] Bustos, E. “*Diseño, construcción y caracterización de superficies modificadas organizadamente con dendrímeros PAMAM y compuesto electro y foto-activos*”. Tesis para obtener el grado de Doctorado en Electroquímica Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica. México, (2007).
- [27] Durst, R.A.; Baummer, A.J., Murray, R.W.; Buck, R.P. y Andrieux, C.P. *Pure Appl. Chem.* **69** (1997) 1317.
- [28] Bard, A.J.; Inzelt, G. y Sholz, F. *Electrochemical Dictionary*. Springer-Verlag. Alemania, (2008).
- [29] Edwards, G.A.; Bergren, A.J. y Porter, M.D. *Chemically modified electrodes* en *Handbook of Electrochemistry*. Zoski, C. ed. Holanda, (2007).
- [30] Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.R.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P.. *Polym. J.* **17** (1985)117–132.
- [31] Newkome, G.R.; Yao, Z.Q.; Baker, G.R.; Gupta,V.K. *J. Org. Chem.* **50** (1985) 2003-2006.
- [32] Klajnert, B.; Bryszewska, M. “Dendrimers: properties and applications”. *Acta Biochimica Polonica* **48** (2001) 199-208.
- [33] Holister, P.; Román, C.; Harper, T. *Dendrimers*, en *Technology white papers nr. 6*. Científica. 2003.
- [34] Kumar, P.; Meena, K. P.; Kumar, P.; Choudhary, C.; Thakur, D.S.; Bajpayee, P. *JITPS*. (ISSN:0975-8593) **6** (2010) 252-269.
- [35] G. R. Newkome, C. N. Moorefield y F. Vögtle, *Dendritic Molecules: Concepts, Synthesis, Perspectives*, VCH, Weinheim (1996).

- [36] Crooks, R.M.; Zhao, M.Q.; Sun, L.; Chechik, V.; Yeung, L.K. *Acc. Chem. Res.* **34** (2001) 181-190.
- [37] Chen, Q.P.; Ai, S.Y.; Qiang, M. *J. Appl. Electrochem.* **40** (2010) 1379-1385.
- [38] Mazloum-Ardakani, M.; Rajabi, H.; Beitollahi, H.; Mirijalili, B.B.F.; Akbari, A.; Taghavinia, N. *Int. J. Electrochem. Sci.* **5** (2010) 147-157.
- [39] Dong, J.P.; Hu, Y.Y.; Zhu, S.M.; Xu, J.Q.; Xu, Y.J.. *Anal Bioanal Chem.* **396** (2010) 1755-1762.
- [40] Thiagarajan, S.; Yang, R.F.; Chen, S.M. *Bioelectrochemistry.* **75** (2009) 163-169.
- [41] Thiagarajan, S; Tsai, T.H.; Chen, S.M. *Biosensors and bioelectronics.* **24** (2009) 27-2715.
- [42] Zhang, L.; Lin, X.Q. *Anal. Bioanal. Chem.* **382** (2005) 1669-1677.
- [43] Mathirarasu, J.; Senthilkumar, S.; Phani, K.L.N.; Yegnaraman, V. *J. App. Chem.* **35** (2005) 513-519.
- [44] Yin, T.J.; Wei, W.Z. y Zeng, J.X. *Anal. Bioanal. Chem.* **386** (2006) 2087-2094.
- [45] Yavich, L. y Tiihonen, J. *J. Neurosci. Meth.* **104** (2000) 53-63.
- [46] Li, Y.L.; Huang, X.; Chen, Y.L. y Wang, L. *Microchim acta* **164** (2009) 107-112.
- [47] Armendáriz, G.M.E. “*Diseño, construcción y caracterización de electrodos de puntas de grafito para la detección de compuestos iodados*”. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica y Universidad Veracruzana. México, 2010.
- [48] Roy, P.R.; Saha, M.S.; Okajima, T.; Park, S.G.; Fujishima, A.; Ohsaka, T. *Electroanalysis.* **16** (2004) 1777-1784.
- [49] Wang, Y.L.; Peng, W.; Lin, L.; Tang, M.; Gao, F.; Li, M.G. *Microchim Acta.* **174** (2011) 41-46.
- [50] Sabzi, R.E.; Zare, S.; Farhadi, K.; Tabrizvand, G. *J. Chinese Chem. Soc.* **52** (2005) 1079-1084.
- [51] Özcan, L.; Sahin, M.; Sahin, Y.. *Sensors* **8** (2008) 5792-5805.
- [52] Bustos, E.; García, M.G.; Díaz-Sánchez, B.R.; Juaristi, E.; Chapman, T.W.; Godínez, L.A. *Talanta.* **72** (2007) 1586-1592.
- [53] De Toledo, R.A.; Santos, M.C.; Cavalheiro, E.T.G.; Mazo, L.H. *Anal Bioanal Chem.* **381** (2005) 1161-1166.

- [54] Qiao, X.; Ding, H.; Wang, Z.F. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. **25** (2005) 107-108.
- [55] Budai, D.; Hernánde, I.; Mézáros, B.; Bali, Z.K.; Gulya, K. *Acta biologica Szegediensis* **54** (155-160).
- [56] Flores, R. “*Construcción de un sensor electroquímico para la detección de una pluma de contaminantes en suelo a nivel laboratorio*”. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Ambiental. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en electroquímica y Universidad de Guanajuato. México, 2011.
- [57] Aoki, K.; Okamoto, T.; Kaneko, H.; Nozaki, K.; Negishi, A. *J. Electroanal. Chem.* **263** (1989) 323-331.
- [58] Bernal, J.D. *Proc. Roy. Soc.* **A106** (1924) 749.
- [59] Chung, D.D.L. *J. Mat Sci.* **37** (2002) 1475-1489.
- [60] Kundu, S.; Wang, Y.M.; Wei, X.; Muhler, M. *J. Phys. Chem.* **112** (2008) 16869-16878.
- [61] Rodríguez-Reionso F. *Carbon* **36** (1998) 159-175.
- [62] Jansen, R.J.J. Delft University NL, PhD Thesis, 1994.
- [63] Boehm, H.P. *Adv Catal* **16** (1966) 179-264.
- [64] Ros, T.G.; Van Dilen, A.J.; Geus, J.W. y Koningsberger, D.C. *Chem Eur J.* **8** (2002) 1151-1162.
- [65] Blurton, K.F. “An *electrochemical* investigation of graphite surfaces”. *Electrochem Acta* **18** (1973) 869.
- [66] Kinoshita, K.; Bett, J.A.S. “Potentiodynamic analysis of surface oxides on *carbon blacks*”. *Carbon* **11** (1973) 403.
- [67] Beck, F. Artículo presentado en la 34° Reunión de la Sociedad Internacional de Electroquímica. Erlangen, Alemania. Septiembre 18-23, 1983; Resumen Extendido No.III.2.
- [68] Epstein, B.D.; Dalle-Molle, E.; Mattson, J.S. *Carbon* **9** (1971) 609.
- [69] Mamantov, G.; Freeman, D.B.; Miller, F.J.; Zittel, H.E. *J. Electroanal. Chem.* **9** (1965) 305.
- [70] Tarasevich, M.R.; Sabirov, F.Z.; Lentsner, B.I.; Knots, L.L. *Electrokhimiya* **7** (1971) 586.
- [71] Jovanovic, V.M.; Terzic, S.; Tripkovic, A.V.; Popovic, K.D.; Lovic, J.D. *Electrochem. Commun.* **6** (2004) 1254.

- [72] Maeda, H.; Katayama, K.; Matsui, R.; Yamauchi, Y.; Ohmori, H. *Anal. Sci.* **16** (2000) 293.
- [73] Valentini, F.; Amine, A.; Orlanducci, S.; Terranova, M.L., Palleschi, G. *Anal. Chem.* **75** (2003) 5413- 5421.
- [74] Mani, R.C.; Sunkara, M.K.; Baldwin, R.P.; Cullapalli, J.; Chaney, J.A.; Bhimarasetti, G.; Cowley, J.M.; Rao, A.M. y Rao, Rahul. *J. Electrochem. Soc.* **152** (2005) E154-159.
- [75] Tuinstra, F. y Koenig, J.L. *J. Chem. Phys.* **53** (1970) 1126-1130.
- [76] Okpalugo, T.I.; Papakonstantinou, P.; Murphy, H.; McLaughlin, J. y Brown, N.M.D. *Carbon* **45** (2005) 153.
- [77] Lakshminarayanan, P.V.; Toghiani, H. y Piuman, C.U. *Carbon* **42** (2004) 2433.
- [78] Ledesma, J. *Preparación y caraterización de membranas de intercambio iónico a partir del anclaje de dendrímeros PAMAM en una base polimérica de acetato de celulosa*. Tesis para obtener el grado de Maestría en electroquímica. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica. México, 2004.
- [79] Nicholson, R.S.; Shain, I. *Anal. Chem.* **36** (1964) 706-723.
- [80] Hawley, M.D.; Tatawawadi, S.V.; Pierkarski, S. y Adams, R.N. *J. Am. Chem. Soc.* **89** (1967) 447-450.
- [81] Laviron, E. *J. Electrochem. Soc.*, **101**, 19 (1979).
- [82] R. M. Crooks, B. I. Lemon III, L. Sun, L. K. Yeung y M. Zhao. *Dendrimer-Encapsulated Metals and Semiconductors: Synthesis, Characterization and Applications*, Ed. Springer (2001).
- [83] Zhao, M.Q. y Crooks, R.M. *Adv. Mater.* **11** (1999) 217-220.
- [84] Ye, H.C. y Crooks, R.M. *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 4930-4934.
- [85] Kumar, P.A: y Phil H.H. *Catal. Lett.* **136** (2010) 177-184.
- [86] Luo, Y.L.; Sun, X.P. *Material Letters.* **61** (2007) 1622-1624.
- [87] Kong, J.M.; Wong, C.V.; Gao, Z.Q. y Chen, X.T. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-metal chemistry* **38** (2008) 186-188.
- [88] Pal, A.; Shah, S. y Devi, S. *Mat. Chem. And Physics* **114** (2009) 530-532.
- [89] Sun, X.P. y Luo, Y.L. *Material Letters.* **59** (2005) 4048-4050.
- [90] Kissinger, P.T.; Hart, J.B. y Adams, R.N. *Brain Research* **55** (1973) 209.
- [91] Majewska, U.E.; Chmurski, K.; Biesiada, A.R.; Olszyina, A.R. y Bilewicz, R. *Electroanalysis* **18** (2006) 1463.

- [92] Zhang, L. y Jiang, X. *J. Electroanal. Chem.* **583** (2005) 292.
- [93] Salimi, A.; Abdi, K. y Khayatian, G.R. *Microchim Acta.* **144** (2004) 161-169.
- [94] Roy, P.R.; Saha, M.S.; Okajima, T.; Park, S.G.; Fujishima, A.; Ohsaka, T. *Electroanalysis.* **16** (2004) 1777-1784.
- [95] Mazloum-Ardakani, M.; Rajabi, H.; Beitollahi, H.; Mirijalili, B.B.F.; Akbari, A.; Taghavinia, N. *Int. J. Electrochem. Sci.* **5** (2010) 147-157.
- [96] Gilbert, O.; Chandra, U.; Kumara, B.E.; Panduranga, M.; Nagaraj, C.; Sherigara, B.S. *Int. J. Electrochem. Sci.* **3** (2008) 1186-1195.
- [97] Martínez-Huitle, C.A.; Cerro-López, M.; Quiroz, M.A. *Mat. Res.* **12** (2009) 375-384.
- [98] Giz, M. *J. Elect. Chem.* **465** (1999) 72-79.
- [99] Winter, E.; Codognoto, L.; Rath, S. *Analytical Letters* **40** (2007) 1197-1208.
- [100] Rocha, L. y Carapuca, H. *Bioelectrochemistry.* **69** (2006) 258-266.
- [101] Sánchez, A.; Corona, S.; Alarcón, G.; Rojas, A.; Ramírez, M.T. y Romero, M.A. *Spect. Acta* **59** (2003) 3193.
- [102] Liu, Y.; Huang, H.S.; Hou, H.Q. y You, T.Y. *Electrochem. Comm.* **10** (2008) 1431-1434.
- [103] Menéndez, A. "El carbón en la vida cotidiana". <http://www.oviedocorreo.es/personales/carbon/index.htm>. Instituto Nacional del Carbón, Oviedo España. Consultado el 10 de julio de 2010.
- [104] Stevenson, R. "Neurotransmitters and Synapses". <http://www.bio12.com/ch17/IBNervous/OpE7.htm>. Consultado el 5 de Julio de 2011.
- [105] Gálvez, A.; Armendáriz, G.M.E.; Meas, Y.; Godínez, L.A.; López, T.M.; Bustos, E.; Manríquez, J. y Ramírez, L.A. "Desarrollo de un control electrónico para un sensor electroquímico en la detección de Dopamina". Memorias del XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y 4th Meeting of The Mexican Section of the Electrochemical Society, Ciudad de México, 2011.
- [106] Van der Haide, P. "X-Ray Photoelectron Spectroscopy: An introduction to principles and practices". John Wiley and Sons. Estados Unidos, 2012.
- [107] Kolasinski, K. "Surface Science: Foundations of Catalysis and Nanoscience". Wiley. Inglaterra, 2008.

- [108] Tokuhisa, H.; Zhao, M.; Baker, L.A.; Phan, V.T.; Dermody, D.L.; García, M.E.; Peez, R.F.; Crooks, R.M. y Mayer, T.M. *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 4492.
- [109] Castro, S.S.L.; Balbo, V.R.; Barbeira, J.S. y Stradiotto, N.R. *Talanta* **55** (2001) 249.
- [110] Zoski, C.G. "*Handbook of Electrochemistry*". Elsevier. Estados Unidos, 2007.
- [111] Bard, A.J. y Faulkner, L.R. "*Electrochemical methods: Fundamentals and applications*". John Wiley and Sons. Estados Unidos, 2001.
- [112] Chang, J.L.; Chang, J.H.; Hu, C.C.; Cheng, W.L.; Zen, J.M. *Electrochem. Communications.* **12** (2010) 596-599.
- [113] Li, Y.X y Lin, X.Q. *Sensors Actuators B* **115** (2006) 134.
- [114] Chen, S.M. y Chzo, W.Y. *J. Electroanal. Chem.* **587** (2006) 226.
- [115] Jin, G.; Zhang, Y. y Cheng, W. *Sensors Actuators B* **107** (2005) 528.
- [116] Kumar, S.S.; Mathiyarasu, J.; Phani, K.L. *J. Electroanal. Chem.* **578** (2005) 95.
- [117] Vasantha, V.S. y Chen, S.M. *J. Electroanal. Chem.* **592** (2006) 77-87.
- [118] Zhao, M.Q.; Liu, Y.L.; Crooks, R.M. y Bergbreiter, D.E. *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 923-930.
- [119] Long, G.L; Winefordner, J.D. "'Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition.'" *Anal Chem.* **55** (1983) 713A.
- [120] Wilson, A.L. "The performance characteristics of analytical methods". *Talanta* **20** (1973) 725.
- [121] Iniouchine, M.Y.; Sibarov, D.A.; Volvonva, A.B.; Jiménez-Rivera, C.A.; Nozdrachev, A.D. *Doklady Biological Sciences* **419** (2008) 80 – 82.