

**USO DE POLÍMEROS CONDUCTORES COMO SENSORES
ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN EL CONCEPTO DE
IMPRESIÓN MOLECULAR**

CESAR ALBERTO ARIZABALETA IBARBO

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA ACADÉMICO DE POSGRADO EN CIENCIAS – QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

**USO DE POLÍMEROS CONDUCTORES COMO SENSORES
ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN EL CONCEPTO DE
IMPRESIÓN MOLECULAR**

CESAR ALBERTO ARIZABALETA IBARBO

**Trabajo de investigación presentado para optar al título de Magíster en
ciencias química**

Director:

**Walter Torres Hernández, Ph.D
Departamento de Química**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA ACADÉMICO DE POSGRADO EN CIENCIAS – QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

AGRADECIMIENTOS

La memoria no siempre nos permite hacer justicia con aquellas personas que durante años nos han colaborado, por eso creo indispensable escribir sus nombres, para que nunca se olvide su participación en este trabajo que tantas veces me pareció una quimera. Sé que no será fácil acordarme de todos, pero aun a riesgo de olvidarme de alguien, me gustaría pagar mi enorme deuda de gratitud con todos aquellos que, de alguna u otra manera son los responsables de la consecución de este nuevo hito en mi vida. Por ello quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a:

Dios, por darme le valor suficiente para no desfallecer en los tantos momentos difíciles que tuve en el transcurso de este trabajo.

A **mi familia**, en especial a mi querida madre (Chepita) que con su ejemplo de superación y fuerza interior me demostró que todo se puede lograr cuando se desea de corazón las cosas; a mi querido padre Simón que siempre confió en mí y me ha brindado siempre su apoyo emocional y económico sin ninguna restricción o condicionamiento; a mis hermanos Edward; Diana y Sandra que siempre estuvieron pendientes de la evolución de este trabajo y en muchas ocasiones más interesados que yo; a mis sobrinos Kenia, Erick y Simón, de los cuales espero que sigan mi ejemplo (el bueno).

Al Doctor **Walter Torres Hernández**, por haberme dado la posibilidad de hacer parte de su grupo de investigación y por todos los aportes oportunos para la culminación de este trabajo.

Al Doctor **Fernando E. Larmat**, por todas las herramientas brindadas de forma desinteresada para que fuera posible alcanzar mi sueño.

A la **Universidad del valle** por la financiación de este trabajo en su etapa final, sin ese aporte económico no hubiera sido posible la culminación de los experimentos.

A todos los integrantes del **Grupo de Electroquímica de la Universidad del Valle**, por brindarme ese ambiente cálido y familiar propicio para realizar mis actividades académicas experimentales, con un agradecimiento especial para Allan Montenegro y Simón Grueso por todo el empeño puesto para terminar este proyecto.

A **Ecoquímica Lda, (Mary Cortes y Omar Velásquez)** por brindarme la posibilidad de formarme en la industria paralelamente con mi formación académica, gracias por todos esos permisos remunerados.

Al Doctor **William Lizcano y Enrique Vera**, por sus oportunas correcciones en este trabajo que sirvieron para enriquecerlo y hacerlo más agradable y comprensible a los lectores.

A **Lina Diosa**, porque con su sacrificio me ha demostrado que estoy predestinado para grandes cosas, por su atención especial y por siempre haber estado ahí cuando más necesite de alguien, principalmente en la etapa final de este proyecto cuando todo parecía perderse.

A **Danny Balanta y Simón Grueso, que** contribuyeron de manera fundamental en la buena presentación de este trabajo con aporte y sugerencias importantes.

A **Lorena López**, que desde la distancia siempre estuvo pendiente de mí y todo lo referente a este trabajo de investigación.

Son muchas las personas que he pasado por alto en este humilde y corto acto de gratitud, por eso para todos los que no mencione anteriormente (ellos saben quiénes son) y que de alguna manera contribuyeron a la clausura de este trabajo. **¡MUCHAS GRACIAS!**

“Cuando se nace pobre, ser estudioso es el mayor acto de rebeldía contra el sistema. El saber rompe las cadenas de la esclavitud”. Juan Carlos Arango Lasprilla

DEDICATORIA

A **Dios** por brindarme la energía fundamental para de una u otra manera materializar el sueño de terminar esta carrera.

A **Luciana**, la gran sacrificada en este proceso de consecución de una nueva meta, gracias a Dios nos queda toda una vida por compartir y disfrutar. Te amo mucho.

A **mi familia** por ser la fuente principal de lo que actualmente soy.

A la vida misma por haberme mostrado las dos caras de la moneda y siempre recordarme que solo cuando se cae en desgracia se aprovechan los momentos de felicidad.

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

MIPs	Polímeros molecularmente impresos
L-Try	L - tirosina
L-Trp	L- triptófano
μM	Micro molar
LOD	Limite de detección
Å	Angstrom
DC	Corriente directa
AC	Corriente alterna
μS	Micro siemens
C	Coulomb
Ag/AgCl	Electrodo de referencia de plata / cloruro de plata
Au/ (PPy+L-Trp)	Electrodo de oro modificado con una película de polipirrol e impresiones moleculares para reconocer L triptófano
Au/ (PPy+L-Tyr)	Electrodo de oro modificado con una película de polipirrol e impresiones moleculares para reconocer L tirosina
PPy	Polipirrol
PPyover	Polipirrol sobreoxidado
Py	Pirrol
Au/(PPyover)	Electrodo de oro modificado con un película de polipirrol sobreoxidado
Au/(PPyover+L-Tyr)	Electrodo de oro modificado con un película de polipirrol sobreoxidado e impresiones moleculares para reconocer L- tirosina
Pt	Platino
Au/(PPyover+L-Trp)	Electrodo de oro modificado con un película de polipirrol sobreoxidado e impresiones moleculares para reconocer

L –triptófano

Ep _a	Voltios del pico de corriente anódica
DPV	Voltametría diferencial de pulsos
SWV	Voltametría de onda cuadrada
CV	Voltametría Cíclica

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Esquema general de la formación de polímeros que contienen una impresión molecular (<i>molecularly imprinted polymers</i> , MIPs).	4
Figura 2. Números de artículos publicados sobre sensores químicos usando el concepto de impresión molecular, todos los artículos (rojo + azul) y sensores químicos con MIPs electropolimerizados (azul).	8
Figura 2. Ruta metabólica de L-tirosina.	18
Figura 3. Ruta metabólica de L-triptófano.	18
Figura 4. Oxidación electroquímica de los aminoácidos L-tirosina y L-triptófano.	19
Figura 5. Volta-amperograma típico de un electrodo de oro en NaCl 0.5 M, pH 6.0 (blanco). Velocidad de barrido: 25 mV/s.	29
Figura 6. Oxidación de L-tirosina 10.0 μM (en NaCl 0.1 M, pH 6.0) sobre electrodo de Au a 25 mV/s.	30
Figura 8. Respuesta voltamétrica del sensor a 25 mV/s en solución de L-Trp 10.0 μM en NaCl 0.1 M y pH 6.0. (a) Au/(PPyover+L+Trp), 7.0 (mg/L) de O_2 ; (b) Au/(PPyover+L+Trp), 1.3 (mg/L) de O_2 .	31
Figura 9. Respuesta voltamétrica del sensor a 25 mV/s en solución de L-Tyr 10.0 μM en NaCl 0.1 M y pH 6.0. (a) Au/(PPyover+L-Tyr), 7.0 (mg/L) de O_2 ; (b) Au/(PPyover+L-Tyr), 1.3 (mg/L) de O_2 .	32
Figura 10. Picos de corriente anódica durante experimentos de voltametría cíclica en soluciones de L-tirosina 10.0 μM (en NaCl 0.1 M, pH 6.0) en función del tiempo de sobreoxidación electroquímica de polipirrol. Velocidad de barrido: 25 mV/s. Electrodo (a) Au, (b) Au/PPyover, (c) Au(PPyover+L-Tyr).	33
Figura 11. Picos de corriente anódica durante experimentos de voltametría cíclica en soluciones de L-triptófano 10.0 μM (en NaCl 0.1 M, pH 6.0) en función del tiempo de sobreoxidación electroquímica de polipirrol. Velocidad de barrido: 25 mV/s. Electrodo (a) Au, (b) Au/PPyover, (c) Au(PPyover+L-Trp).	34
Figura 12. Altura de picos de corriente anódica durante experimentos de voltametría cíclica en soluciones de L-tirosina 10.0 μM (en NaCl 0.1 M, pH 6.0) en función del tiempo de sobreoxidación química de polipirrol. Velocidad de barrido: 25 mV/s; $E_{\text{pa}} = 0.43 \text{ V}$. Electrodo (a) Au, (b) Au/PPyover, (c) Au(PPyover+L-Tyr).	36
Figura 13. Altura de picos de corriente anódica durante experimentos de voltametría cíclica en soluciones de L-triptófano 10.0 μM (en NaCl 0.1 M, pH 6.0)	37

en función del tiempo de sobreoxidación química de polipirrol. Velocidad de barrido: 25 mV/s; $E_{pa} = 0.61$ V. Electrodo (a) Au, (b) Au/PPyover, (c) Au(PPyover+L-Trp).

Figura 14. Respuesta voltamétrica típica de sensores (a 25 mV/s) en solución de L-Tyr 10.0 μ M en NaCl 0.1 M y pH 6.0. Electrodo: (a) Au/, (b) Au/(PPyover), (c) Au/(PPyover+L+Tyr). 38

Figura 15. Respuesta voltamétrica típica de sensores (a 25 mV/s) en solución de L-Trp 10.0 μ M en NaCl 0.1 M y pH 6.0. Electrodo: (a) Au/, (b) Au/(PPyover), (c) Au/(PPyover+L+Trp). 39

Figura 16. Respuesta electroquímica de electrodos de (a) Au/, (b) Au/(PPyover) y (c) Au/PPyover+L-Tyr en soluciones de L-Tyr 10.0 μ M en NaCl 0.10 M (25 mV/s) en función del pH de la solución de electrosíntesis de PPy. 40

Figura 17. Respuesta electroquímica de electrodos de (a) Au/, (b) Au/(PPyover) y (c) Au/PPyover+L-Trp en soluciones de L-Trp 10.0 μ M en NaCl 0.10 M (25 mV/s) en función del pH de la solución de electrosíntesis de PPy. 41

Figura 18. Respuesta electroquímica de electrodos de (a) Au/, (b) Au/(PPyover) y (c) Au/PPyover+L-Tyr en soluciones de L-Tyr 10.0 μ M en NaCl 0.10 M (25 mV/s) en función de la concentración de Py en la solución de electrosíntesis de PPy. 42

Figura 19. Respuesta electroquímica de electrodos de (a) Au/, (b) Au/(PPyover) y (c) Au/PPyover+L-Trp en soluciones de L-Trp 10.0 μ M en NaCl 0.10 M (25 mV/s) en función de la concentración de Py en la solución de electrosíntesis de PPy. 43

Figura 20. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Tyr) en soluciones de L-Tyr 10.0 μ M + NaCl 0.10 M, pH 6.0 en función de la concentración de L-Tyr en la solución de polimerización de pirrol. 45

Figura 21. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Trp) en soluciones de Trp 10.0 μ M + NaCl 0.10 M, pH 6.0 en función de la concentración de Trp en la solución de polimerización de pirrol. 45

Figura 22. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Tyr) en función del tiempo de preequilibración en solución de L-Tyr 10.0 μ M en NaCl 0.10 M y pH 6.0 47

Figura 23. Picos de corriente voltamétrica anódica (a 25 mV/s) de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Trp) en función del tiempo de preequilibración en solución de L-Trp 10.0 μ M en NaCl 0.10 M y pH 6.0. 48

Figura 24. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Tyr) en función del espesor calculado de las películas poliméricas. Las soluciones de análisis contienen L-Tyr 10.0 μ M en NaCl 0.10 M y pH 6.0. Tiempo de preconcentración: 10 min. $E_{p_a} = 0.41$ V vs Ag/AgCl.	49
Figura 25. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Trp) en función del espesor calculado de las películas poliméricas. Las soluciones de análisis contienen L-Trp 10.0 μ M en NaCl 0.10 M y pH 6.0. Tiempo de preconcentración: 10 min. $E_{p_a} = 0.62$ V vs Ag/AgCl.	50
Figura 26. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s del sensor Au/(PPyover+L-Tyr) en función del tipo de almacenamiento (a) en solución de cloruro de sodio 0.1 M, pH 6.0 con moléculas plantillas 10.0 μ M, (b) en solución de NaCl 0.1 M, pH 6.0 y (c) almacenamiento al aire libre. Las soluciones de análisis contienen L-Tyr 10.0 μ M en NaCl 0.10 M y pH 6.0. Tiempo de preconcentración: 10 min. $E_{p_a} = 0.42$ V vs Ag/AgCl.	51
Figura 27. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s del sensor Au/(PPyover+L-Trp) en función del tipo de almacenamiento (a) en solución de cloruro de sodio 0.1 M, pH 6.0 con moléculas plantillas 10.0 μ M, (b) en solución de NaCl 0.1 M, pH 6.0 y (c) almacenamiento al aire libre. Las soluciones de análisis contienen L-Trp 10.0 μ M en NaCl 0.10 M y pH 6.0. Tiempo de preconcentración: 10 min. $E_{p_a} = 0.62$ V vs Ag/AgCl.	52
Figura 28. Curva de calibración del sensor de L-triptófano. Solución de L – Trp (0.1 - 100.0 μ M) en NaCl 0.1 M y pH 6.0; corrientes anódicas de pico a una velocidad de barrido de 25 mV/s. (a) electrodo de oro, (b) electrodo con polipirrol sobreoxidado y (c) electrodo modificado con polipirrol sobreoxidado e impresiones moleculares.	53
Figura 29. Curva de calibración del sensor de L-tirosina. Solución de L-Tyr (0.1 - 100.0 μ M) en NaCl 0.1 M y pH 6.0; corrientes anódicas de pico a una velocidad de barrido de 25 mV/s. (a) electrodo de oro, (b) electrodo con polipirrol sobreoxidado y (c) electrodo modificado con polipirrol sobreoxidado e impresiones moleculares.	54
Figura 30. Voltametría de barrido lineal para un electrodo de Au/(PPyover+L-Tyr) en soluciones de (a) D-Tyr 10.0 μ M y (b) L-Tyr 10.0 μ M, ambas en NaCl 0.1 M, pH 6.0. Velocidad de barrido = 25 mV/s.	56
Figura 31. Voltametría de barrido lineal para un electrodo de Au/(PPyover+L-Trp) en soluciones de (a) D-Trp 10.0 μ M y (b) L-Trp 10.0 μ M, ambas en NaCl 0.1 M, pH 6.0. Velocidad de barrido = 25 mV/s.	57
Figura 32. Estudio de la enantioselectividad del bisensor de L-tirosina y L-triptófano. (a) Solución de D-Tyr y D-Trp 10.0 μ M en NaCl 0.1 M y pH 6.0;	61

corrientes anódicas de pico a una velocidad de barrido de 25 mV/s. (b) Solución de L-Tyr y L-Trp 10.0 μ M en NaCl 0.1 M y pH 6.0; corrientes anódicas de pico a una velocidad de barrido de 25 mV/s.

Figura 33. Curva de calibración del bisensor. Solución de L-Tyr y L-trp (0.1 - 100.0 μ M) en NaCl 0.1 M y pH 6.0; corrientes anódicas de pico a una velocidad de barrido de 25 mV/s. 62

Figura 34. Comparación de resultados de la deteminación de L-Tyr libre en muestra de orina humana entre el método propuesto y un método clínico validado. 63

Figura 35. Comparación de resultados de la deteminación de L-Trp libre en muestra de orina humana entre el método propuesto y un método clínico validado. 64

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Características analíticas de sensores <i>in situ</i> preparados por electropolimerización para la detección de algunos analitos de interés farmacéutico y ambiental.	6
Tabla 2. Límites de detección de L-triptófano por técnicas convencionales.	55
Tabla 3. Límites de detección de L-tirosina por técnicas convencionales.	55
Tabla 4. Condiciones promedio para la síntesis de un bisensor para el reconocimiento enantioselectivo de tirosina y triptófano.	60
Tabla 5. Límites de detección y cuantificación del bisensor.	61
Tabla 6. Límites de confianza para la pendiente y el intercepto en análisis de muestras reales por dos técnicas diferentes.	64

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo general	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4 MARCO TEÓRICO	14
5 METODOLOGÍA	23
5.1 Instrumentación	23
5.1.1 Electroodos y celdas	23
5.2 Reactivos	23
5.3 Limpieza del sistema electroquímico	24
5.4 Experimentos de control	25
5.5 Procedimiento de síntesis y análisis	25
5.5.1 Síntesis electroquímica de los sensores impresos	25
5.5.2 Enantioselectividad y reconocimiento molecular de los sensores y el Multisensor	26
5.6 Determinación del rango lineal de los sensores y el Multisensor	27
5.7 Determinación de L-triptófano y L-tirosina libre en orina humana	27
6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	29
6.1 Procedimiento de control	29

6.2	Efecto del oxígeno disuelto en la síntesis de los sensores	31
6.3	Influencia en las condiciones de sobreoxidación del polipirrol	33
6.4	Reconocimiento molecular de los sensores	38
6.5	Dependencia del pH de síntesis en el reconocimiento molecular	40
6.6	Evaluación de la concentración de pirrol en la respuesta del sensor	42
6.7	Efecto en la respuesta electroquímica por la concentración de los analitos en el proceso de electropolimerización	44
6.8	Dependencia del tiempo de preconcentración	48
6.9	Dependencia de la respuesta voltamétrica con relación al espesor de la película	49
6.10	Estudio de la estabilidad de los sensores	51
6.11	Curva de calibración de los sensores para L-tirosina y L-triptófano	53
6.12	Estudio de la enantioselectividad de los sensores	56
7	SÍNTESIS DEL BISENSOR	60
8	DETERMINACIÓN DE L-TRIPTÓFANO Y L-TIROSINA LIBRE EN ORINA HUMANA	63
9	CONCLUSIONES	65
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMEN

En el presente trabajo se sintetizó y optimizó las condiciones electrosintéticas de sensores químicos individuales que consistían en electrodos de oro modificados electroquímicamente con una película de polipirrol en la cual se generaban unas cavidades moleculares (polímeros molecularmente impresos MIPs) capaces de reconocer de forma selectiva las moléculas L-tirosina y L-triptófano. Los sensores individuales demostraron un buen rango lineal así como concentraciones límites bajas 0.19 y 0.15 μM para L-Tyr y L-Trp respectivamente.

Durante la consecución de las mejores condiciones de síntesis se obtuvo información que permitió aportar al entendimiento de cómo es que se da el proceso de reconocimiento molecular y que factores se deben tener en cuenta al momento de fabricar un sensor electroquímico basado en el concepto de impresión molecular.

El promedio de las condiciones óptimas encontradas para los sensores individuales sirvieron de base para la fabricación de un multisensor con la capacidad de responder selectivamente a las dos moléculas estudiadas aun en presencia de sus respectivos enantiómeros. Además demostró una buena capacidad de respuesta cuantitativa frente a muestras reales (orina humana) en comparación con otros métodos analíticos reconocidos y validados.

Finalmente, con este trabajo doy las bases para posibles trabajos en nuestro grupo de investigación que permita desarrollar sensores para diversas moléculas de interés biológico y ambiental que además de ser cuantificadas permitan cada vez más comprender en su totalidad el fenómeno del reconocimiento molecular en sistemas electroquímicos artificiales.

ABSTRACT

In the present work, we synthesize and optimize the electro synthetic conditions required to create individual chemical sensors, they consist in electrochemically modified gold electrodes with a polypyrrole film that includes molecular cavities (molecular imprinted polymers, or MIPs) able to recognize different aminoacids, like L-tyrosine (L-Tyr) and L-thripthophan (L-Trp) in a selective way. Individual sensors by itself showed a good linear range and low limit of detection concentrations, being 0.19 and 0.15 μM for L-tyr and L-Trp respectively. For achieving the best conditions of the synthesis, we gather relevant information that allow to contribute for the understanding of how the molecular recognition process is given and what factors should be taken at the design of an electrochemical sensor based on the concept of molecular imprinting. The average of the optimal conditions for individual sensors formed, acted as a basis for the manufacture of multi-sensors able to respond selectively to both studied molecules even in the presence of their respective D enantiomers.

In addition, the built electrochemical sensors demonstrated a qualitative good response capacity to real samples like human urine compared to other analytical, validated and renamed methods.

Finally, this work gave us the basis for new researches in our group, related to develop sensors for different molecules of biological and environmental interest, that besides being quantified, allow to understanding the phenomenon of molecular recognition in artificial electrochemical systems.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes retos de las ciencias analíticas es el desarrollo de métodos que permitan determinaciones rápidas de analitos en concentraciones cada vez más pequeñas, con gran selectividad y si es posible, con resolución espacio-temporal. Entre estas características de desempeño, selectividad (entendida como la capacidad para detectar y medir una especie química de interés en diferentes matrices, en presencia de muchos otros componentes) es tal vez la más buscada en cualquier método. En general, la selectividad se logra a través de un fenómeno de reconocimiento molecular, es decir, el reconocimiento específico entre dos o más moléculas a través de interacciones electrostáticas y no covalentes, por ejemplo, puentes de hidrógeno, coordinación entre un metal y un ligando, interacciones hidrofóbicas, enlaces de van der Waals, enlaces de “halógeno (1). En sistemas biológicos, las enzimas, los anticuerpos, el ADN y el ARN son ejemplos típicos de reconocimiento molecular de sustratos únicos (2). Una variedad de moléculas sintéticas, por ejemplo, los éteres corona también tiene alta capacidad de reconocimiento molecular de cationes y son usados en forma comercial para la construcción de electrodos selectivos de sodio, potasio y otros.

Un concepto de interés comercial en reconocimiento molecular artificial es el de impresión molecular (3). La base del concepto de impresión molecular es el uso de una molécula objetivo (analito) como molde durante un proceso de polimerización. Para la obtención de estos polímeros se utiliza una solución de un monómero o mezclas de ellos con o sin grupos funcionales adicionales que permiten una mayor interacción entre el monómero en la etapa inicial de polimerización y la molécula plantilla generando un complejo de pre-polimerización como en el paso 1 de la Figura 1. Luego, el monómero polimeriza (electropolimerización en nuestro caso), resultando un polímero con sitios de reconocimiento que tienen ocluidos la molécula que actúa como plantilla (paso 2). Luego, la molécula analito es extraída (mediante una de varias metodologías) formando así, en la estructura del polímero, cavidades o impresiones, que son complementarias en forma y tamaño a la molécula plantilla (paso 3). Estas cavidades permiten un efecto de “memoria

molecular” asociado con el reconocimiento altamente selectivo de las moléculas molde.

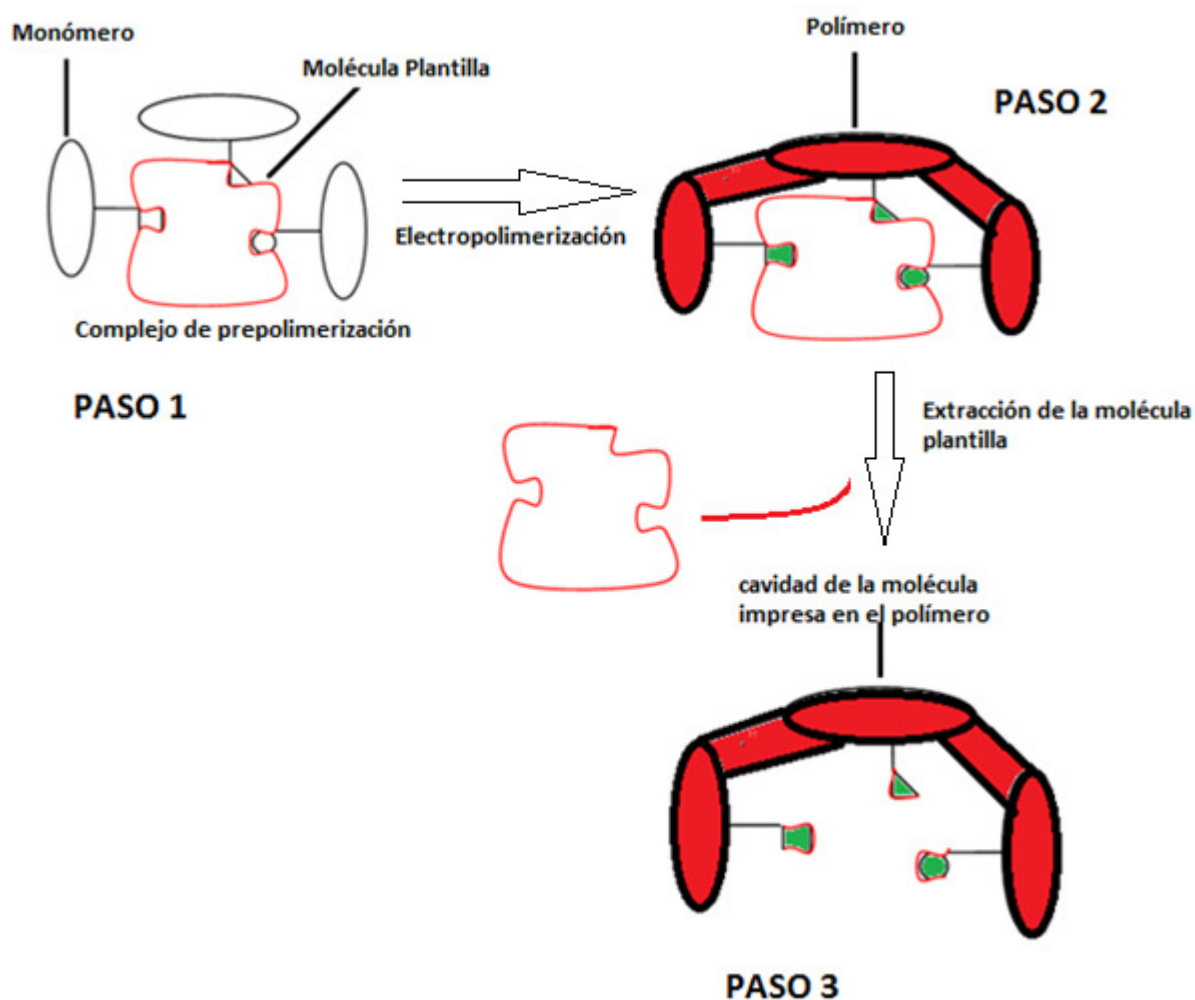


Figura 1. Esquema general de la formación de polímeros que contienen una impresión molecular (*molecularly imprinted polymers*, MIPs). Adaptación de la figura 4 referencia (4).

En general, la estructura relativamente robusta de los MIPs permite la aplicación de estos polímeros como sustitutos de enzimas y anticuerpos (los cuales son muy sensibles a cambios de pH y temperatura) en biosensores. De hecho, los MIPs sirven como sensores de especies químicas para las cuales no existe un sustrato natural de reconocimiento molecular (4) y encuentran aplicación como

adsorbentes en extracción en fase sólida (*solid phase extraction, SPE*), fases estacionarias en cromatografía (analítica y preparativa) y electroforesis capilar (5). Los MIPs han sido usados en catálisis heterogénea (6) y en la liberación controlada de fármacos (*drug release*) (7). El aumento considerable del número de publicaciones y de patentes emitidas (8,9) desde finales del siglo XX evidencia el gran potencial de aplicaciones de la tecnología MIPs.

La Tabla 1 muestra algunos analitos que pueden determinarse usando el concepto de MIPs sintetizados por vía electroquímica. Lo importante es encontrar el monómero funcional que interaccione en forma apropiada con la molécula molde (analito), las características específicas de los monómeros dependen de las técnicas electroquímicas de síntesis y medida que se utilicen teniendo mayor impacto en el funcionamiento del sensor las condiciones sintéticas (10).

Tabla 1. Características analíticas de sensores *in situ* preparados por electropolimerización para la detección de algunos analitos de interés farmacéutico y ambiental (10).

Polímero			
Analito	Método (electrodo)	LOD, - log M	Tiempo de vida, días
Polipirrol			
Paracetamol	DPV (PGE)	6.1	10
Sulfametoxazol	DPV (PGE)	6.4	15
Poli(Anilina + <i>o</i> -Feniletildiamina)			
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	DPV (GE)	6.67	15
Poli(<i>o</i> -aminofenol)			
Dopamina	DPV (Au, CV)	8.70	30
Poli(<i>o</i> -feniletildiamina)			
Fluoresceína	SWV (GE)	n/a	n/a
Rodamina, 2,4-D	SWV (GE)	n/a	n/a
Triclosan	Amperometrica (GCE)	7.09	n/a
Oxitetraciclina	DPV (Au)	9.19	30
Poliaminotiofenol			
Ácido Acetilsalicílico	DPV (Au)	9.52	10
Chlorpyrifos	CV (GCE)	6.48	n/a
Poli(<i>o</i> -aminotiofenol)			
MTMC	Amperométrica (Au)	7.89	90

Analito: 2,4-D: Ácido 2,4- diclorofenoxiacético; MTMC: *m*-tolil metilcarbamato. **Electrodo:** Au: electrodo de oro; PGE: electrodo de grafito pirolítico; GE: electrodo de grafito; GCE: electrodo de carbón vítreo. **Técnica eletroquímica:** DPV: voltimetría de pulso diferencial; CV: voltimetría cíclica; SWV: voltimetría de onda cuadrada **n/a:** no disponible.

En la tabla anterior se observa que los sensores que presentan los mejores límites de detección tienen como característica común la formación de puentes de hidrógeno como forma de interacción entre los monómeros y las moléculas plantilla.

Los aminoácidos son una de las familias de analitos determinados por MIPs. La importancia de los aminoácidos, ya sea libres o formando parte de las proteínas, es bien conocida. L-triptófano, por ejemplo, es un precursor de la serotonina, un neurotransmisor cerebral que ayuda a la relajación, controla el estado de ánimo, disminuye el apetito, aumenta el rendimiento corporal y mantiene el buen humor. El déficit de L-triptófano está relacionado con el síndrome carcinoide, trastornos del crecimiento, predisposición a enfermedades cardiacas y alteraciones del sistema nervioso que pueden llevar a la depresión o inducir estados violentos. También es precursor de la hormona melatonina cuyo déficit está implicado en el albinismo (11).

L-tirosina es otro precursor de neurotransmisores (dopamina, epinefrina y norepinefrina), de las hormonas tiroideas y de las melaninas. El metabolismo de tirosina produce ión fumarato, esencial en la producción de energía corporal por medio del ciclo de Krebs. Hay asociación entre la concentración de L-tirosina en sangre y el estado de ánimo, el porcentaje de grasa corporal, la agudeza mental, el rendimiento muscular y la capacidad de concentración; también participa en el normal funcionamiento de las glándulas suprarrenales, tiroides y pituitarias (12).

Aparentemente, debido a sus tamaños moleculares, tanto triptófano como tirosina permiten generar cavidades pequeñas en el polímero sin comprometer la estabilidad mecánica de éste, permitiendo una fácil salida y entrada de los aminoácidos de la macroestructura (13). Los volúmenes promedios de estos dos aminoácidos son 227.8 y 193.6 Å³, valores comparables con los mesoporos que se pueden generar en estos polímeros (14). La naturaleza redox de estos dos aminoácidos facilita el análisis electroquímico usando electrodos modificados con MIPs. Adicionalmente, los métodos electroquímicos permiten hacer análisis en sistemas biológicos tanto *in vitro* como *in vivo* con técnicas DC y AC, siendo esta última modalidad de gran interés en las medidas electroquímicas en sistemas vivos ya que los daños que puede causar en los tejidos y órganos son mínimos (15).

Los MIPs son fabricados por métodos químicos y electroquímicos. Los métodos de electrosíntesis tienen la ventaja que permiten generar películas poliméricas con control de las dimensiones y la morfología (16). La investigación en sensores electroquímicos basados en MIPs ha aumentado considerablemente (Figura 2) debido tal vez a la robustez de estos sensores y a la facilidad de integrar estos dispositivos con tecnologías de micro y nano fabricación (17).

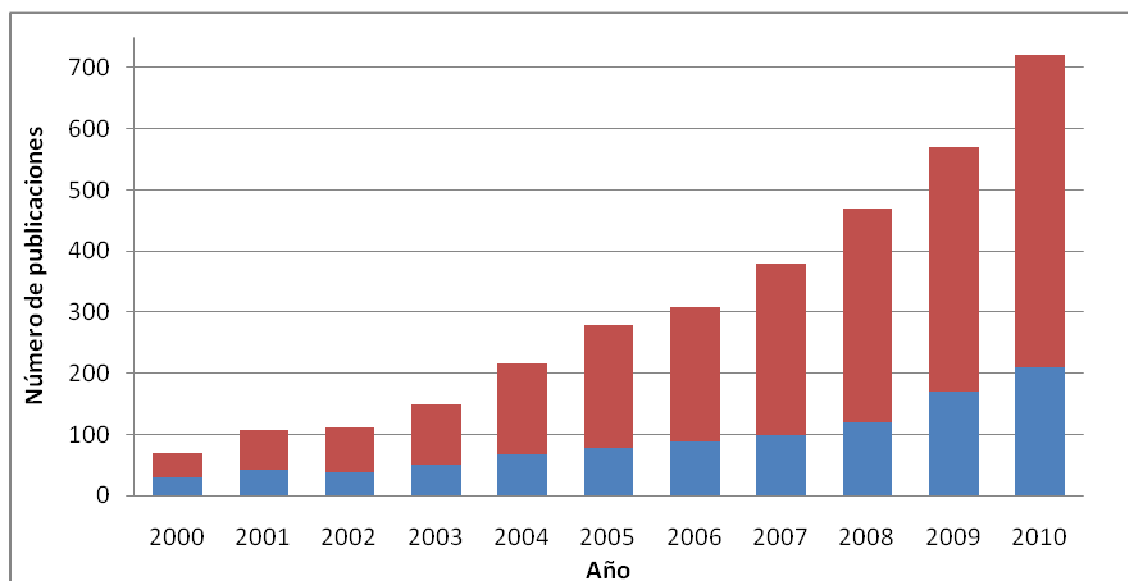


Figura 2. Números de artículos publicados sobre sensores químicos usando el concepto de impresión molecular, todos los artículos (rojo + azul) y sensores químicos con MIPs electropolimerizados (azul). Adaptación referencia (17).

Se observa un gran crecimiento en la fabricación de sensores químicos utilizando métodos de síntesis diferentes al electroquímico, debido a que estas técnicas permiten una mayor versatilidad en los sensores generados; además, existen aproximadamente seis técnicas diferentes para realizar polimerizaciones, la suma de todas ellas sobrepasan la polimerización electrosintética pero si se compararan las técnicas de polimerización químicas de forma individual, algunas de ellas no sobrepasarían el incremento porcentual que han tenidos los MIPs electropolimerizados.

En la actualidad el concepto MIPs ha sido usado con éxito para la determinación y separación de moléculas quirales como la oxitetraciclina de la tabla 1 en donde no fue necesario utilizar un monómero quiral para formar el polímero con las impresiones moleculares. Por ser los aminoácidos L los de interés biológico, en la actualidad, varios MIPs han sido propuestos para el reconocimiento y cuantificación de L-aminoácidos individuales con detección electroquímica (18). Sin embargo el fenómeno de reconocimiento quiral en MIPs no es bien entendido y es aún tema de discusión.

Lo expuesto aquí muestra que hay muchas oportunidades para investigar, a nivel molecular, el fenómeno detallado de formación de las plantillas. De otro lado, es de gran utilidad práctica producir multi-sensores, es decir, sistemas que puedan medir varias especies químicas en forma simultánea. La unión del concepto MIPs con el de matriz de sensores (*sensor arrays*) permitiría, por ejemplo, la construcción de dispositivos integrados (*biochips*) para identificar y cuantificar varios aminoácidos con resolución espacio-temporal en forma simultánea. En medicina, estos biochips serían de gran utilidad para el diagnóstico temprano y el tratamiento de enfermedades y condiciones asociadas con deficiencias de aminoácidos desde el sitio de atención al paciente (*Point Of Care Treatment*) sin tener que enviar muestras de fluidos biológicos a un laboratorio clínico convencional.

En el presente trabajo expongo la optimización de condiciones experimentales para producir sensores electroquímicos de aminoácidos individuales y un sensor “doble” para la determinación simultánea de L-triptófano y L-tirosina basados en la construcción de MIPs con el polímero conductor polipirrol.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar sensores y multisensores electroquímicos basados en el concepto de impresión de plantilla molecular sobre polímeros conductores para la determinación simultánea de los aminoácidos L-tirosina y L-triptófano.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir electroquímicamente sensores individuales modificados químicamente con polipirrol sensibles a L-tirosina, y L-triptófano respectivamente.
- Optimizar los parámetros de síntesis para obtener las mejores respuestas electroquímicas de los sensores.
- Evaluar la respuesta electroquímica (voltamétrica) de los sensores en la detección de los aminoácidos estudiados.
- Utilizar las mejores condiciones de electrosíntesis encontradas en los sensores individuales como punto de partida para la síntesis del bisensor.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo de la química analítica ha ido de la mano con desarrollos en micro y nano electrónica, los nuevos materiales, la computación y la bioingeniería aportando nuevas estrategias y metodologías ante la demanda de análisis (rápidos, selectivos, seguros y relativamente económicos) de especies presentes en bajas concentraciones, en medios o matrices complejas (19).

La conjunción de polímeros conductores con la metodología de impresión molecular ha permitido desarrollar sensores químicos para diferentes analitos de interés biológico, farmacéutico o ambiental. En muchos casos, estos campos requieren métodos analíticos selectivos, económicos y rápidos debido al gran número de muestras que se analizan y a la necesidad cada vez más marcada de resultados inmediatos (20).

Este trabajo se centra en el desarrollo de MIPs para aminoácidos, moléculas de interés biológico y farmacéutico. Las metodologías analíticas de aislamiento y detección de estas especies que existen son típicamente laboriosas (algunas poco amigables con el ambiente debido al gran volumen de reactivos utilizados), especializados o de alto costo (21). Dado que los isómeros L y D de los aminoácidos tienen actividad biológica muy diferente, métodos de análisis con resolución quiral son de gran interés en los análisis clínicos, farmacéuticos y de alimentos (22).

Hoy, la meta es producir métodos de análisis que permitan la cuantificación y detección de muchos aminoácidos y otras moléculas de interés biológico de manera específica, simultánea y rápida, y, en varios casos, con resolución espacial y temporal. Una de las estrategias para abordar este reto es la producción de multi-sensores químicos; cuyas características de desempeño (límites de detección, costo, facilidad de análisis, confiabilidad en las mediciones y rapidez) compitan o superen las de métodos analíticos convencionales (23).

Este trabajo hace parte de un proyecto orientado a desarrollar multisensores electroquímicos para aminoácidos basados en el concepto de polímeros con impresión molecular por varias razones. Primero, la respuesta de estos dispositivos es una señal eléctrica la cual es fácil de medir con gran sensibilidad y confiabilidad con instrumentación robusta y de bajo costo. Segundo, es posible controlar de manera rigurosa las dimensiones del material sensible en escalas que van desde los nanómetros hasta los micrómetros. Tercero, se puede construir multisensores en geometrías uni - bi - o tridimensionales cuyas múltiples señales pueden procesarse por métodos de análisis multivariable (quimiometría) (24). Cuarto, los métodos electroquímicos permiten análisis directos de especies químicas electroactivas o análisis indirectos de especies que modifican variables eléctricas de la superficie del sensor (impedancia). Es más, si la señal electroquímica de prueba es una señal AC (*corriente alterna*), el método no destruye el sistema de estudio, lo cual es muy deseable cuando los analitos de interés están en concentraciones traza o la matriz estudiada es un sistema vivo (25).

En la actualidad, existen varios tipos de sensores electroquímicos capaces de solucionar el problema de sensibilidad y selectividad de forma satisfactoria para muchos metabolitos (26). Sin embargo aquí utilizamos el concepto de MIPs porque es compatible con la construcción de “varios sensores en uno” (multi-sensor) para el análisis simultáneo o secuencial de diferentes especies en una mezcla compleja.

Los aminoácidos fueron escogidos como analitos de interés biológico y farmacéutico (sobre otros posibles), teniendo en cuenta que el análisis de aminoácidos en orina o plasma es una herramienta de valor inestimable para evaluar la adecuación y la asimilación de las proteínas en la dieta, así como los desequilibrios metabólicos subyacentes a muchas enfermedades crónicas (27). Un sistema multi-sensor electroquímico es compatible con tecnologías de fabricación de circuitos integrados (*biochips*). Un *biochip* para aminoácidos sería de gran interés como herramienta de diagnóstico temprano y tratamiento.

A pesar de todas las aplicaciones conocidas de MIPs en ciencias analíticas, los mecanismos que permiten reconocimiento molecular son aún tema de estudio. En este proyecto optimizaremos el desempeño de los sensores basados en estos materiales en función de las variables experimentales de electrosíntesis para contribuir a la discusión sobre las interacciones entre el analito “molde” y el monómero o los oligómeros durante la polimerización, las cuales determinan el reconocimiento molecular.

4. MARCO TEÓRICO

Un sensor es un dispositivo que transforma algún tipo de información física o química en una señal útil que puede ser procesada y que facilita información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos (28).

En la actualidad se tienen dos grandes categorías para estos dispositivos según el tipo de información que transforman (29):

- **Físicos:** Dispositivos que detectan cambios en parámetros físicos tales como temperatura, presión y flujo de masa.
- **Químicos:** Detectan cambios de pH, concentración, composición, estructura, grupos funcionales.

Actualmente, la mayor parte de sensores utilizados para el control de procesos industriales son físicos, pero la necesidad de obtener información química ha favorecido la investigación y la producción de sensores químicos en forma automatizada.

Un sensor consta de dos componentes básicos: un sistema de reconocimiento o receptor y un transductor. El receptor reconoce una señal física (por ejemplo, masa, cambio de presión, cambio de la intensidad de una señal lumínica, cambio de temperatura), química o bioquímica en el medio de análisis y el transductor la transforma en una señal eléctrica (30).

Desde los años 90s, los sensores electroquímicos ocupan un gran porcentaje de la literatura científica sobre sensores químicos (31). Esto se debe a que los dispositivos electroquímicos son robustos, su fabricación es relativamente simple, pueden detectar cantidades muy pequeñas de analitos y tienen tiempos de respuesta muy cortos (en la escala entre milisegundos y segundos). Así mismo,

los instrumentos necesarios para recoger y procesar la señal, tales como potenciómetros, potencióstatos y conductímetros, son relativamente económicos, de fácil mantenimiento, manejo, miniaturización y automatización. Estos dispositivos están clasificados en potenciométricos, amperométricos, volta-amperométricos, conductimétricos y de impedancia dependiendo del método electroquímico utilizado para obtener la información de la muestra.

Los sensores conductimétricos y potenciométricos son ampliamente conocidos y no serán discutidos aquí.

Un sensor amperométrico contiene una celda en contacto con un medio donde está el analito de interés. Este analito debe ser una especie electroactiva de modo que cuando el usuario aplica una diferencia de potencial eléctrico entre un electrodo de trabajo y uno de referencia, el analito es oxidado o reducido sobre el electrodo de trabajo, generando una corriente medible entre el electrodo de trabajo y un tercer electrodo denominado electrodo auxiliar. La corriente medida, i , es una función del tiempo del experimento, del potencial aplicado y la concentración del analito, $i = f(t, E, C)$.

Si el potencial del electrodo de trabajo varía en forma controlada y la corriente generada en el proceso de oxidación o reducción del analito en función del potencial aplicado, el método de análisis se llama volta-amperometría. A su vez, el potencial puede ser controlado de varias maneras, por ejemplo, haciendo un barrido lineal entre dos valores de potencial o cambiando el potencial en una secuencia de pulsos. Controlando las condiciones del experimento, la oxidación o reducción del analito genera picos (en algunos casos) o "*plateaus*" (en otros) de corriente los cuales son típicamente proporcionales a la concentración del analito (32).

Las reacciones electroquímicas de interés analítico ocurren sobre la superficie de un electrodo de trabajo. En muchos casos, esta superficie es de un metal inerte (Pt, Au), carbono vítreo (*glassy carbon electrode*, GCE), grafito (*graphite electrode*, GE), grafito pirolítico (*pyrolytic graphite electrode*, PGE) o un material semiconductor, por ejemplo óxido de indio estaño (*indium tin oxide electrode*, ITO). Sin embargo, cuando la cinética de la reacción redox de interés no es suficientemente rápida, es común modificar la superficie del electrodo con un material que permita catalizar la reacción redox (33). Así, el material modificador se elige de tal manera que mejore considerablemente la velocidad de la reacción redox o la selectividad hacia uno o más analitos. El material modificador del electrodo contiene un grupo electroactivo que puede mediar la transferencia electrónica entre el electrodo y el analito. Los polímeros conductores (*conductive polymers*) son usados con frecuencia como modificadores de superficies de electrodo (34).

Los polímeros conductores son materiales orgánicos conjugados que al oxidarse logran valores de conductividad electrónica entre 1 y más de 1000 S/cm (similar a algunos metales). En estos materiales, el transporte de carga es debido a defectos deslocalizados en la cadena. La estructura de bandas de estos materiales y los mecanismos de conducción han sido ampliamente estudiados (35).

Estos polímeros son de gran interés analítico por las diferentes aplicaciones que tienen en este campo, siendo una de ellas el concepto de impresión molecular introducido en los años 70s; sin embargo, este fenómeno se remonta a 1931, cuando el científico ruso M.V. Polyakov descubrió que el gel de sílica era capaz de reconocer determinados moléculas aromáticas que estaban presentes durante la fabricación y secado del mismo (36). En 1949, Linus Pauling y Frank Dickey mostraron que al condensar sílica en presencia de colorantes se formaban “bolsillos” que se ajustaban y retenían a la molécula “extranjera” por fuerzas intermoleculares. Desde entonces, se ha logrado alta selectividad en el reconocimiento de moléculas orgánicas sobre sustratos de sílica. (36)

Debido a la relativa facilidad y diferentes maneras con que se pueden generar impresiones moleculares con capacidad de reconocimiento en tamaño, forma y funcionalidad química sobre sustratos de sílica y que este mismo fenómeno de reconocimiento se puede extrapolar a la química de los polímeros (37) (en especial los conductores), se han utilizado diferentes monómeros; en los últimos años (*desde el año 2000*), en la síntesis de polímeros y copolímeros basados en el concepto de impresión molecular para la detección selectiva de analitos en muestras relativamente complejas y condiciones extremas (temperaturas altas, bajas o medios químicos agresivos) (38). La elevada estabilidad de este tipo de materiales permite aplicarlos para detectar o separar muchas especies químicas para las cuales no hay un receptor biológico natural o una metodología analítica altamente selectiva.

Los aminoácidos son de mucho interés analítico debido a la gran importancia biológica que exhiben (39). Generalmente el análisis de este tipo de compuestos se realiza por técnicas de separación (40), pero existen metodologías alternas que permiten determinar algunos de estos analitos por técnicas electroquímicas gracias al comportamiento electro activo que estas especies presentan.

De los aminoácidos existentes, los propuestos para este estudio tienen como características comunes el hecho de que son neutros de tipo aromático, pues presentan al menos un anillo bencénico en su estructura, además de poseer los distintivos grupos amonio y carboxilato en su forma de ion zwitterion, y la configuración estereoquímica tipo L, característica para los aminoácidos que se metabolizan en las células animales, a diferencia de los D aminoácidos, que se encuentran en las células bacterianas y cuyos mecanismos de oxidación ocurren por diferentes procesos(41).

Biológicamente, los aminoácidos L-tirosina y L-triptófano son transformados (secuencia de pasos oxidativos mediados enzimáticamente) a sus correspondientes metabolitos, de acuerdo a las figuras 2 y 3, respectivamente (42).

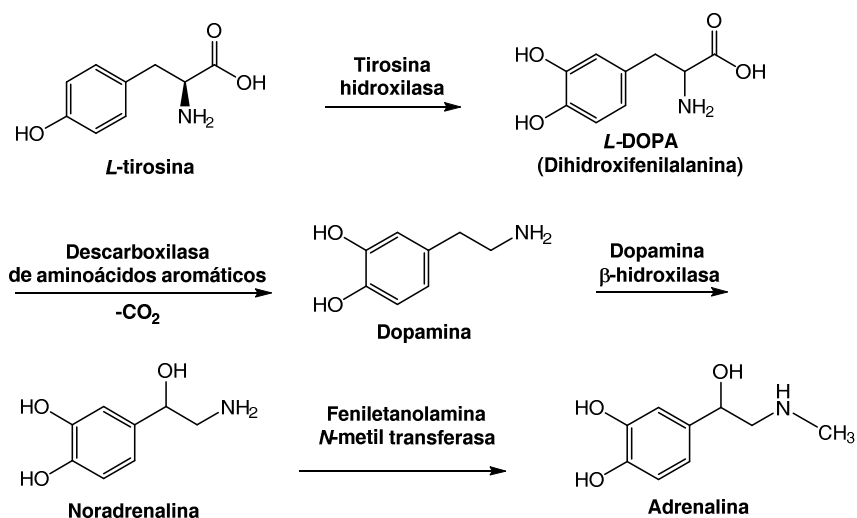


Figura 2. Ruta metabólica de L-tirosina

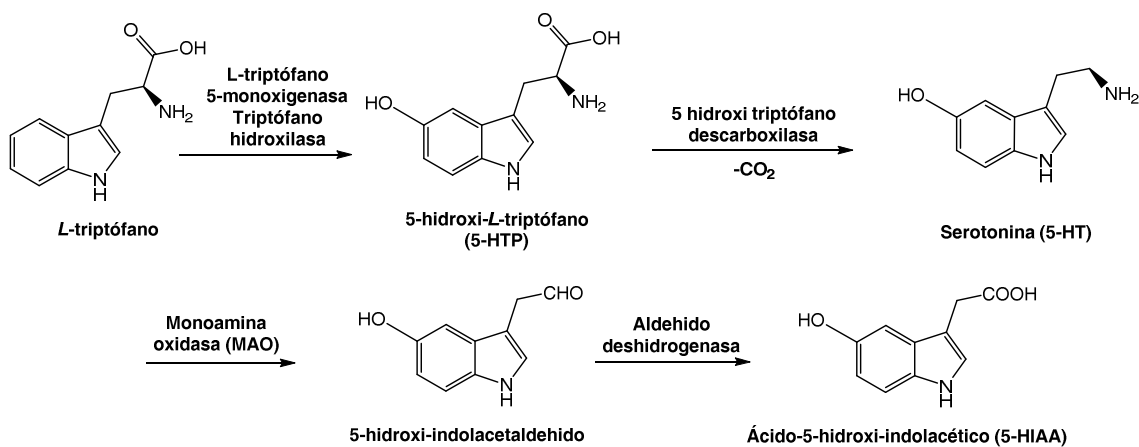


Figura 3. Ruta metabólica de L-triptófano

Es importante aclarar que el mecanismo de oxidación electroquímica es diferente al de la oxidación bioquímica. La oxidación electroquímica de triptófano y tirosina ocurre con pérdida de dos electrones y la salida de dos iones H_3O^+ , como lo muestra la Figura 4.

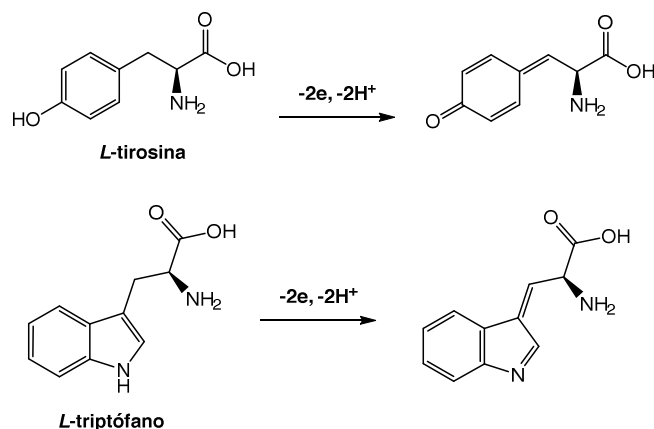


Figura 4. Oxidación electroquímica de los aminoácidos L-tirosina y L-triptófano. Adaptado de Suprun (43)

La cinética de electro-oxidación (más no el mecanismo) depende de la naturaleza de la superficie electródica y, por supuesto, del pH del medio (44). Una vez comprendidas las rutas de electro-oxidación de estos compuestos y sus principales dependencias, la barrera inmediata que se busca superar con la elaboración de sensores electroquímicos es la falta de selectividad de estos dispositivos para estos análisis en particular.

Por ejemplo, la elaboración de electrodos y sensores bioquímicos de carbón vítreo basados en compositas de nanopartículas de oro con carbono macroporoso para la determinación de tirosina y triptófano, de acuerdo a las investigaciones reportadas por Zeng y colaboradores (45). Presentaron estabilidad a largo plazo, reproducibilidad y selectividad una vez probados en muestras reales de suero sanguíneo en donde se detectaron concentraciones normales de estos dos aminoácidos.

No obstante el estudio planteado por Liu (46) indica que la selectividad de los electrodos basados en nanopartículas de oro no es exclusiva de los aminoácidos L-tirosina y L-triptófano, ya que los electrodos propuestos por ellos son capaces de determinar L-cisteína y L-tirosina, mediante una modificación del anterior sistema,

ya que Liu y colaboradores emplean electrodos de carbono vítreo recubiertos de una capa de negro de eriocromo T electropolimerizado, logrando buena resolución variando adecuadamente el pH del sistema de medida.

A pesar de lo dicho por los autores anteriormente nombrados (Zeng, Liu y colaboradores), la detección de L-cisteína, en los electrodos basados en nanopartículas de oro, e incluso los electrodos de carbono vítreo no son tan selectivos, pues interferentes como el ácido úrico, ácido ascórbico y la dopamina, (producto metabólico de la L-tirosina) podrían ser igualmente detectados, esto es debido a que son moléculas que al igual que los aminoácidos de interés presentan grupos susceptibles a oxidarse, por ejemplo en el caso del grupo hidroxilo (-OH), que se transforma en un grupo ceto (=O), según los trabajos de Ghoreishi (47) y Luo (48)

Otro material para elaborar sensores electroquímicos para el análisis de aminoácidos, de acuerdo a lo reportado por Li (49) es el carbono vítreo rodeado de capas de óxido de grafeno y paredes de nanotubos, para el análisis del aminoácido L-tirosina en fluidos humanos. Este sensor presenta selectividad, estabilidad y reproducibilidad debido a las propiedades electrocatalíticas del óxido de grafeno combinado con nanotubos, siendo un electrodo híbrido con aplicaciones en bioanálisis, pero aun presenta la desventaja de responder electroquímicamente a otros metabolitos como ácido úrico y ácido ascórbico.

Un sensor que ha podido superar la falta de una buena selectividad ha sido el reportado por Kanchana y colaboradores que consiste en electrodos de carbón vítreo basados en nanopartículas de Hierro, con la enzima tirosinasa soportada sobre hidroxiapatita (50) y es gracias al material biológico que presenta pocas interferencias en presencia de otras especies y buena reproducibilidad, sin

embargo debe operarse en un rango de pH bastante reducido (± 0.1 unidades) para obtener valores confiables.

Una alternativa verdaderamente prometedora para la superación de la falta de selectividad en la determinación de aminoácidos es la impresión molecular, principalmente con polímeros conductores que tienen una gama de propiedades intermedias entre metales y compuestos orgánicos que son aprovechables al momento de sintetizarlos. La identificación enantioselectiva de aminoácidos ha sido demostrada tanto con polímeros sintetizados por métodos químicos como por métodos electroquímicos. Por ejemplo la impresión molecular de ácido L-aspártico sobre polianilina permite la detección electroquímica del aminoácido L con enantioselectividad mayor al 90% (51). En este rango de pH, polianilina es buen conductor electrónico (52) y la especie predominante de ácido aspártico es un zwitterión ($\text{CO}_2\text{HCH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{CO}_2^-$, $\text{pK}_{a1} = 2.1$) (53). Ácido aspártico puede interaccionar con polianilina a través de varios puentes de hidrógeno y también a través de interacciones catión- π entre el grupo NH_3^+ del aminoácido y el anillo de anilina.

Otro autor que abordó el problema de la falta de enantioselectividad fue Kong y colaboradores, que realizaron la electrosíntesis de polipirrol con L-triptófano como molécula plantilla para generar el polímero conductor con impresiones moleculares, en este trabajo los autores consideraron necesario sobreoxidar electroquímicamente el polímero para expulsar la molécula molde y generarle estabilidad mecánica (entrecruzamiento) al polímero y así garantizar mejores cavidades capaces de hacer el reconocimiento molecular enantioselectivo. Los investigadores se centraron en el estudio de parámetros importantes como el potencial de electropolimerización, el potencial y tiempo de sobreoxidación y el espesor de las películas poliméricas obtenidas en cada experimento para así finalmente obtener el sensor con las mejores respuestas de enantioselectividad. Finalmente concluyeron que con las condiciones de trabajo halladas el sensor insertaba en sus cavidades 2 moléculas de L-triptófano por cada una de su

enantiómero y el polipirrol depositado sobre carbón vítreo genera un efecto electrocatalítico marcado ya que el potencial al cual se genera el pico de corriente anódica es más bajo que cuando se evalúa sobre carbón vítreo sin modificar (54).

Otro ejemplo claro de los beneficios de la tecnología MIPs en aporte de enantioselectividad en una determinación de aminoácidos es el estudio realizado por Prasad BB y colaboradores, donde lograron una buena separación y recuperación cuantitativa de D y L-triptófano en muestras acuosas con una fibra polimérica monolítica con huellas moleculares impresas que sirve tanto para la extracción en fase sólida como para microsensores de ultratrazas, con una alta selectividad en el rango de 0.15 a 30.00 ng.mL⁻¹ con un límite de detección de 0,0261 ng.mL⁻¹. El método propuesto por estos investigadores combina la fibra impresa molecularmente en fase microsólida para extracción y un sensor de fibra de polímeros monolíticos impresos basados en carbono tipo compositas, este sensor ha demostrado ser útil para el diagnóstico clínico de enfermedades relacionadas con el estrés causado por el agotamiento ocasionado por la falta aguda o la disminución de triptófano (55).

5. METODOLOGÍA

5.1 Instrumentación

Todos los experimentos electroquímicos fueron realizados en un Analizador electroquímico (bipotenciostato) CHI INSTRUMENTS 760B, con software propio.

Las mediciones de pH fueron realizadas con un pH-metro de precisión SCHOTT.

5.1.1 Electroodos y celdas

Las medidas electroquímicas fueron realizadas con los siguientes electrodos:

- Electrodo metálico de disco de oro (área experimental de trabajo 2.01 mm²).
- Electrodo de referencia: Ag/AgCl/KCl 3.0 M.
- Electrodo auxiliar o contra-electrodo: alambre de platino de 3 cm de largo y 0.8 cm² de área.
- Celda de vidrio (capacidad = 20 mL) con tapa de teflón.

5.2 Reactivos

- Pirrol (Aldrich 807492 98.0% de pureza).
- Hidróxido de sodio (Merck, 106498, 99.5% de pureza).
- Ácido clorhídrico (Merck 101834, 37.0% de pureza).
- Fosfato de sodio monobásico (Merck 1063436, 99.8% de pureza).
- L-triptófano (Chem Service 108375, 99% de pureza).
- L-tirosina (Chem Service 108378, 99% de pureza).
- D-triptófano (Chem Service 108376, 99% de pureza).
- D-tirosina (Chem Service 108379, 99% de pureza).

- Cloruro de sodio (Merck 106406, 99.7% de pureza).
- Nitrógeno de alta pureza (Criogás AP 4.5; 99.98%).
- Agua clase dos obtenida por destilación seguida por un proceso de deionización obteniendo una conductividad entre 0.04 y 0.06 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ y pH entre 5.5 y 7.5.

5.3 Limpieza del sistema electroquímico

El electrodo auxiliar se limpió exponiendo el alambre a la llama de un mechero durante 15 segundos, posteriormente se eliminaron los residuos orgánicos provenientes de la llama brillando el electrodo con una lija número 400, este procedimiento se realizaba una vez por día (56). El electrodo de trabajo de oro se limpió sometándolo primero a brillo mecánico contra una felpa con alúmina de 0.10 μm de tamaño de partícula durante 120 segundos, se lavó con agua tipo dos y se sometió a un tratamiento de limpieza electroquímico en una solución de H_2SO_4 0.1 M, ciclando el potencial en el rango (-1.0 a 1.5 V vs Ag/AgCl) hasta que el voltamograma correspondiera al estándar de oro en H_2SO_4 . Luego, el electrodo fue lavado con agua tipo dos en un baño ultrasonido por tres minutos a temperatura ambiente y finalmente, lavado con abundante agua, después de este proceso el electrodo se utilizó para los diferentes estudios electroquímicos (57).

Todas las medidas electroquímicas aquí expuestas fueron realizadas bajo las condiciones ambientales de la ciudad de Santiago de Cali (temperatura entre 296 y 300 K y presión atmosférica entre 100.90 y 100.98 kPa) (58). Todos los valores de potencial aquí mostrados fueron medidos contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl (3.0 M).

5.4 Experimentos de control

Las respuestas electroquímicas de los electrolitos soporte y de soluciones de L-Trp y L-Tyr fueron estudiadas para verificar la ausencia de interferencias. Así, el electrolito fue considerado “limpio” cuando un experimento de voltametría cíclica de una solución de NaCl 0.50 M fuera “plana” en la región entre (0.3 V y 0.90 V vs Ag/AgCl). Sobre un electrodo de disco de oro limpio (área 2.01 mm²), una solución de L-Trp 10 µM debe mostrar un solo pico de oxidación irreversible en voltametría cíclica (25.0 mV/s) entre 0.69 y 0.73 V con densidad de carga 0.020 C/cm². A su vez, una solución de L-Tyr 10 µM debe mostrar un solo pico entre 0.48 y 0.52 V con densidad de carga 0.015 C/cm².

5.5 Procedimientos de síntesis y análisis

5.5.1 Síntesis electroquímica de los sensores impresos

Los MIPs fueron preparados mediante electropolimerización de pirrol sobre el electrodo de oro en presencia de la molécula molde (analito) a potencial constante (+ 0.80 V Vs Ag/AgCl). La celda de un solo compartimento contenía pirrol 0.10 M, NaCl 0.50 M y la molécula objetivo (L-Trip o L-Tyr 1.0 µM), a pH controlado con temperatura y presión ambiente. La solución se mantenía libre de oxígeno mediante burbujeo de nitrógeno por cinco minutos y luego manteniendo una corriente de nitrógeno sobre la superficie de la solución durante todo el experimento. La densidad de carga de la polimerización fue variada entre 0.031 y 3.1 C/cm², suficiente para obtener películas poliméricas con espesor aproximado entre 0.10 y 10 µm respectivamente. El procedimiento anterior produjo electrodos superficialmente modificados con una película de polipirrol que tenía atrapada la molécula molde, Au/ (PPy+L-Trp) o Au/ (PPy+L-Tyr) dependiendo de la molécula utilizada. Las condiciones de síntesis anteriormente mencionadas son el resultado de la optimización del procedimiento. En la próxima sección se discute con mayor detalle el por qué de estos valores.

Los sensores formados fueron sometidos a un proceso de sobreoxidación para inducir de forma directa un entrecruzamiento de las cadenas poliméricas e indirectamente una disminución significativa de la conductividad electrónica del polímero, facilitando además la extracción de los analitos atrapados en el material polimérico mesoporoso, generando así un polímero con las cavidades complementarias, encargadas del proceso de reconocimiento molecular en análisis posteriores (59). El procedimiento de sobreoxidación consistió en someter los electrodos modificados (Au/(PPy+L-Trp) o Au/(PPy+L-Tyr)) a un potencial de +1.0 V en una solución de KOH 0.10 M por 20 s (60). Los sensores obtenidos una vez culminados este procedimiento se designan como (Au/(PPyover+L-Trp) o Au/(PPyover+L-Tyr))

5.5.2 Enantioselectividad y reconocimiento molecular de los sensores y el bisensor

Los electrodos Au/ (PPyover-L-Trp) o Au/ (PPyover-L-Tyr) fueron sumergidos en una solución acuosa de L-triptófano o L-tirosina 10.0 μ M respectivamente, en NaCl 0.1 M, pH controlado, por 10 min en condiciones de circuito abierto. Este proceso permite la difusión de los aminoácidos hacia las cavidades generadas en el sensor y facilita la evaluación de la capacidad de reconocimiento molecular. Esta capacidad de reconocimiento se evaluó observando la intensidad de los picos de corriente en experimentos de voltametría cíclica y de pulso diferencial. En otros experimentos, los sensores Au/(PPyover+L-Trp) o Au/(PPyover+L-Tyr) fueron sumergidos en soluciones del aminoácido D correspondiente para evaluar la enantioselectividad de los sensores. Todo este proceso se realizó con sensores de control los cuales consistían en electrodos modificados con polipirrol que posteriormente se sobreoxidaron pero que en ningún momento se le originaron impresiones moleculares.

La respuesta electroquímica de los sensores fue evaluada en función de los parámetros críticos de síntesis: concentración de pirrol y de analito, método de

electrosíntesis, método de sobreoxidación del polímero y condiciones de almacenamiento de los sensores. Usando las mejores condiciones de síntesis encontradas para los sensores de cada aminoácido, procedimos a sintetizar un bisensor con capacidad de reconocimiento molecular enantioselectivo a L-triptófano y L-tirosina.

5.6 Determinación del rango lineal de trabajo de los sensores y el bisensor

Los sensores individuales finalmente formados (Au/ (PPyover-L-Trp) o Au/ (PPyover-L-Tyr)) fueron sumergidos por 10 min en condiciones de circuito abierto en diferentes soluciones patrón que contenían NaCl 0.1 M pH 6.0 y concentraciones variables de L-Trp y L-Tyr respectivamente (entre 0,1 y 10 μ M). Con base en las concentraciones de los aminoácidos en las diferentes soluciones y las intensidades de los picos de corriente anódicos en los experimentos de voltametría se graficó las respectivas curvas de calibración.

Para el bisensor se realizó el mismo procedimiento que para los sensores individuales solo que las soluciones patrón contenían ambos aminoácidos.

5.7 Determinación de L-triptófano y L-tirosina libre en orina humana

Las muestras de orina se recolectaron durante 12 horas (desde las 8 de la noche hasta las ocho de la mañana) preservándola a 3°C hasta el momento de su análisis donde se lleva a temperatura ambiente, de esta solución se toman 5 mL y se llevan a 50 mL con una solución de NaCl 0.11 M y pH 6.0, de los 50 mL anteriores se adicionan 20 mL en la celda electroquímica y se deja en circuito abierto durante 10 min, pasado este tiempo se cierra el circuito y se analizan las muestras obteniendo las respectivas corrientes anódicas.

Se realizó una curva de calibración igual que en la sección anterior (5.6) para interpolar las corrientes obtenidas en la ecuación de la recta y calcular la concentración de aminoácidos libres.

Los aminoácidos libres en orina también se analizaron por cromatografía líquida utilizando un método basado en la AOAC 982.30 E (a,b,c) Chp. 45.3.05 de 2006.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Procedimiento de control

Las Figuras 6 y 7 muestran voltamogramas cíclicos característicos de L-tirosina y L-triptófano sobre Au. Este procedimiento se realizó antes de la síntesis de cualquier sensor. Los picos de oxidación irreversible ocurren a 0.51 V y 0.72 V para L-Tyr y L-Trp, respectivamente. La altura de los picos de oxidaciones es lineal en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en el rango entre 5 y 250 mV/s indicando que la velocidad del proceso de oxidación está controlada por la difusión de cada aminoácido a la superficie y que no hay adsorción significativa del aminoácido sobre la superficie del electrodo metálico. La corriente catódica cerca de los 0 voltios obedece a procesos de reducción de iones hidronio (61).

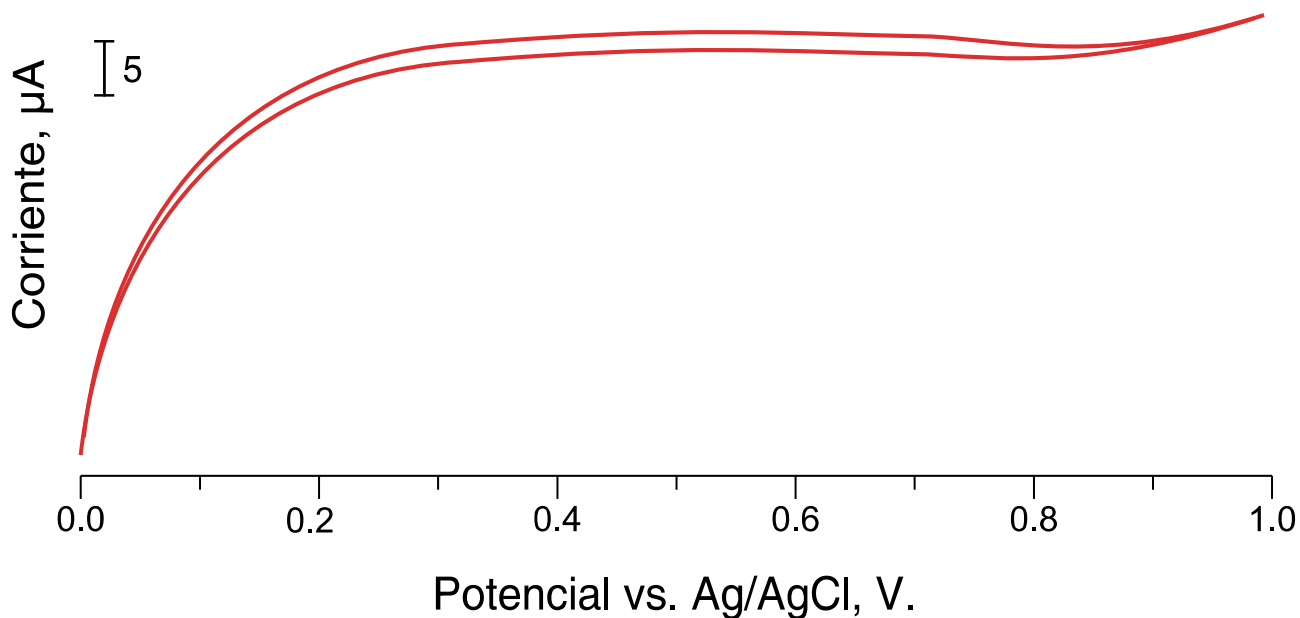


Figura 5. Volta-amperograma cíclicos típico de un electrodo de oro en NaCl 0.5 M, pH 6.0 (blanco). Velocidad de barrido: 25 mV/s.

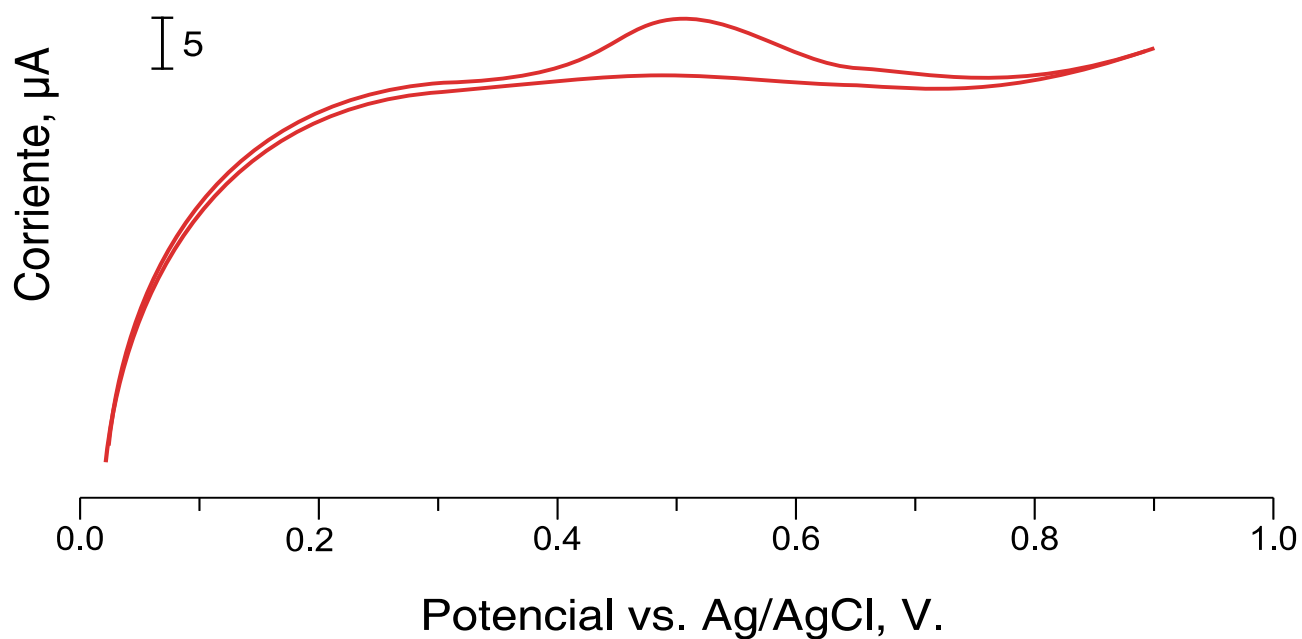


Figura 6. Electro-oxidación de L-tirosina 10.0 μM (en NaCl 0.1 M, pH 6.0) sobre electrodo de Au a 25 mV/s.

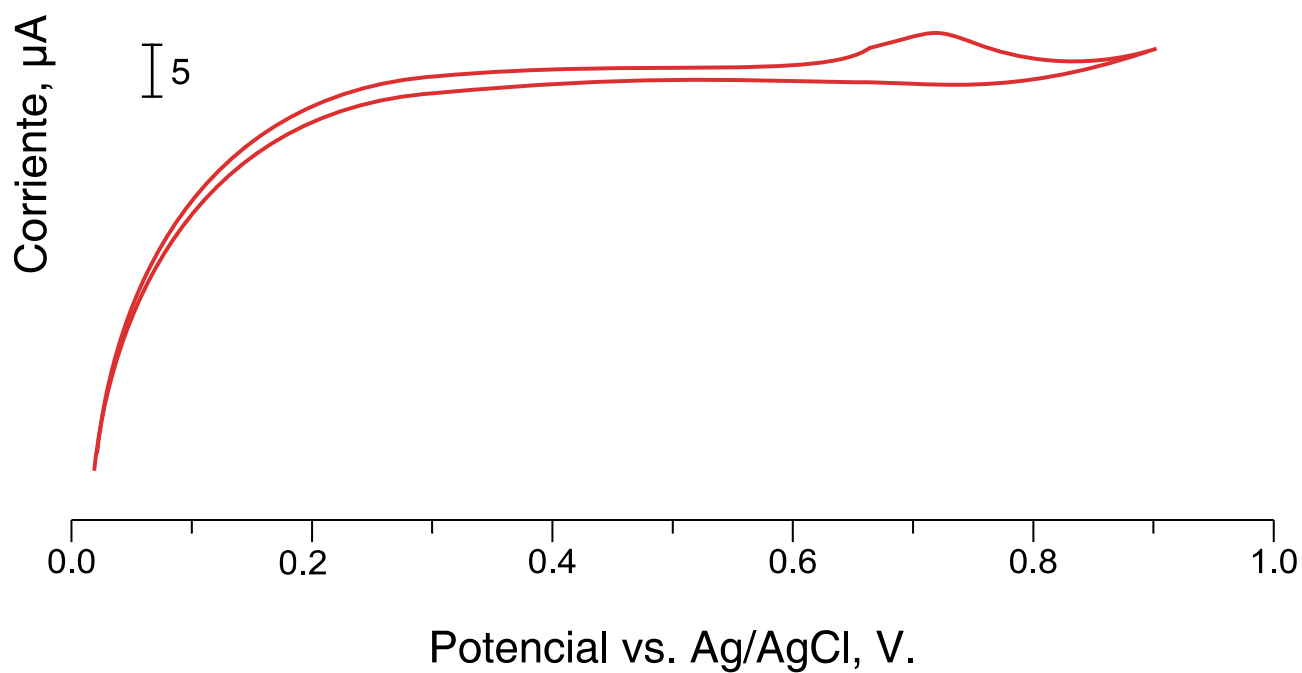


Figura 7. Electro-oxidación de L-triptófano 10.0 μM (en NaCl 0.1 M, pH 6.0) sobre electrodo de Au a 25 mV/s

6.2 Efecto del oxígeno disuelto en la síntesis de los sensores

El estudio de este parámetro se realizó debido a que la presencia de oxígeno en la solución puede favorecer la oxidación del monómero antes del proceso de polimerización, generando oligómeros que podrían interactuar en solución y no contribuir al proceso de electropolimerización en forma monomérica, sin embargo cabe la posibilidad que la polimerización de los oligómeros se dé a un potencial más bajo, que se traduce en condiciones de síntesis más suaves (62,63). Sin embargo la presencia del oxígeno en solución genera sobre la superficie del electrodo la aparición de “burbujas de gas” que no se observan en soluciones con bajo contenido de oxígeno y que se asocian con la adsorción de oxígeno molecular sobre esta superficie e impide el libre y efectivo desarrollo del comportamiento electroquímico de los aminoácidos como se observa en las figuras 8 y 9.

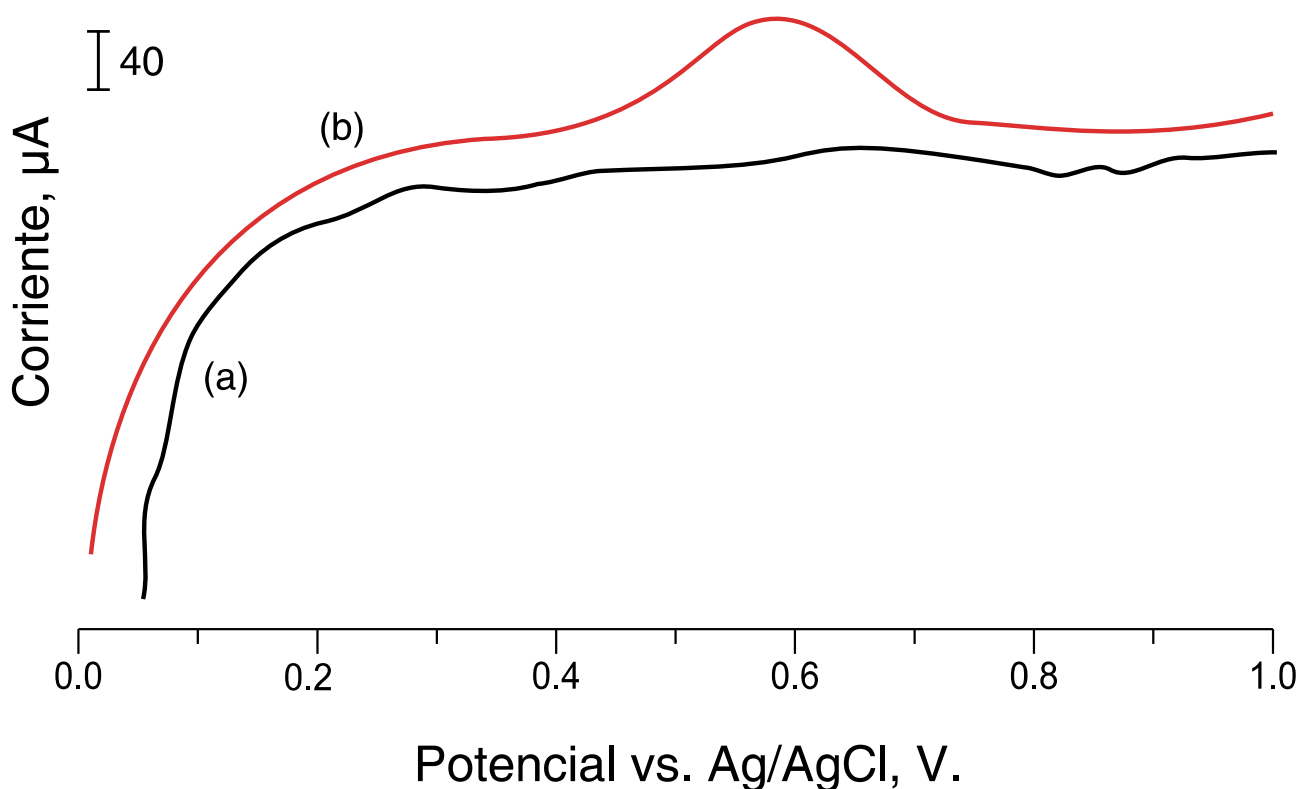


Figura 8. Respuesta voltamétrica (C.V) del sensor a 25 mV/s en solución de L-Trp 10.0 μM en NaCl 0.1 M y pH 6.0. (a) Au/(PPyover+L+Trp), 7.0 (mg/L) de O_2 ; (b) Au/(PPyover+L+Trp), 1.3 (mg/L) de O_2

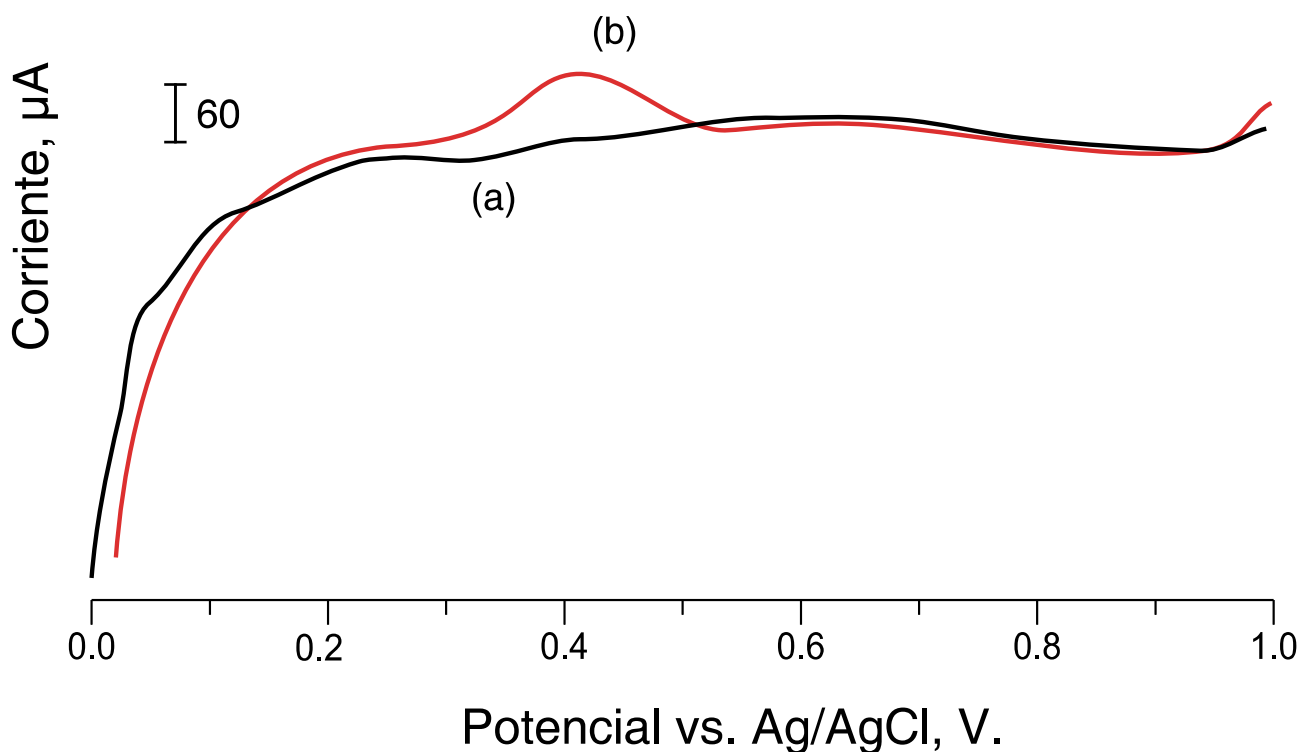


Figura 9. Respuesta voltamétrica (C.V) del sensor a 25 mV/s en solución de L-Tyr 10.0 μM en NaCl 0.1 M y pH 6.0. (a) Au/(PPyover+L-Tyr), 7.0 (mg/L) de O_2 ; (b) Au/(PPyover+L-Tyr), 1.3 (mg/L) de O_2

6.3 Influencia de las condiciones de sobreoxidación de PPy en la respuesta voltamétrica de L-Trp y L-Tyr sobre Au/(PPyover+L-Trp) y Au/(PPyover+L-Tyr)

Los sensores electroquímicos para L-Tyr y L-Trp fueron preparados mediante polimerización de pirrol en presencia de cada aminoácido (analito), seguido por sobreoxidación de la capa de PPy formada sobre el electrodo de Au. Supuestamente, la sobreoxidación cumple dos funciones. La primera es extraer las moléculas del aminoácido que quedan atrapadas durante la polimerización. La segunda es entrecruzar las cadenas de PPy y generar las cavidades complementarias del aminoácido que serán las responsables del reconocimiento molecular posterior. La sobreoxidación puede hacerse usando un método

electroquímico o uno químico. Además del entrecruzamiento, la sobreoxidación también induce la formación de enlaces covalentes C=O en el esqueleto polimérico (64,65).

6.3.1 Sobreoxidación electroquímica. Los electrodos de Au/(PPy + L-Trp) o Au/(PPy + L-Tyr) son sometidos a +1.0 V Vs Ag/AgCl en una solución alcalina (KOH 0.1 M). El tiempo del experimento es variable entre unos pocos segundos y 2 min. Los electrodos de Au/(PPyover + L-Trp) o Au/(PPyover + L-Tyr) eran luego lavados con agua tipo I por 5 s. Las Figuras 10 y 11 muestran la influencia del tiempo de sobreoxidación en la respuesta voltamétrica de los aminoácidos sobre los electrodos modificados resultantes, donde los picos de corriente anódica para los analitos L-tirosina y L-triptófano estaban centrados a 0.41 y 0.62 V Vs Ag/AgCl.

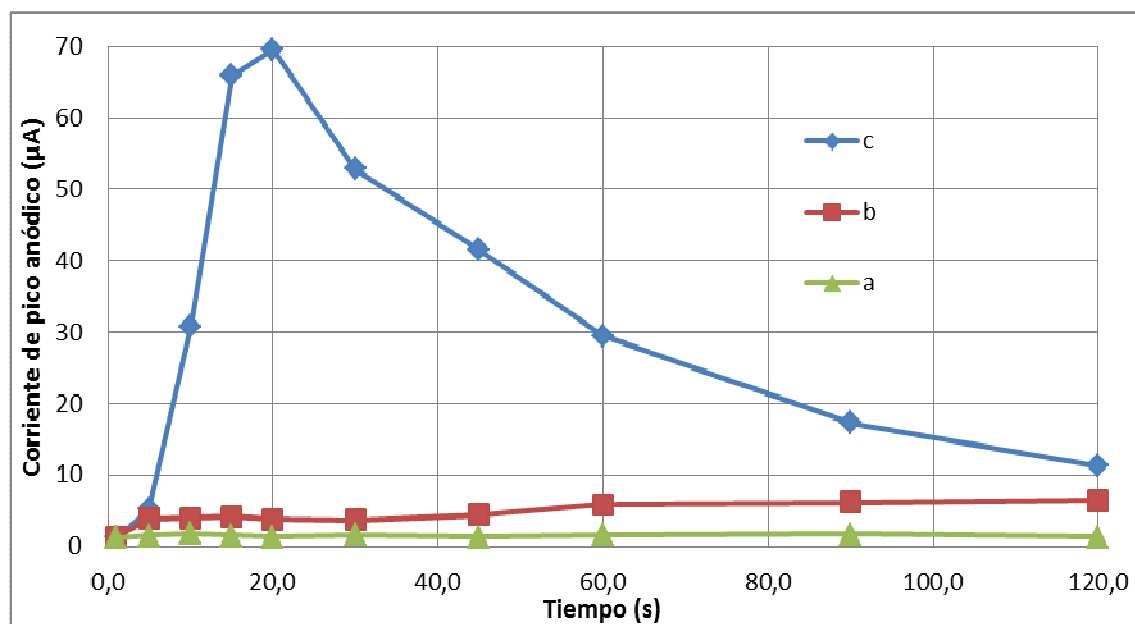


Figura 10. Picos de corriente anódica durante experimentos de voltametría cíclica en soluciones de L-tirosina 10.0 µM (en NaCl 0.1 M, pH 6.0) en función del tiempo de sobreoxidación electroquímica de polipirrol. Velocidad de barrido: 25 mV/s. Electrodos (a) Au, (b) Au/PPyover, (c) Au(PPyover+L-Tyr).

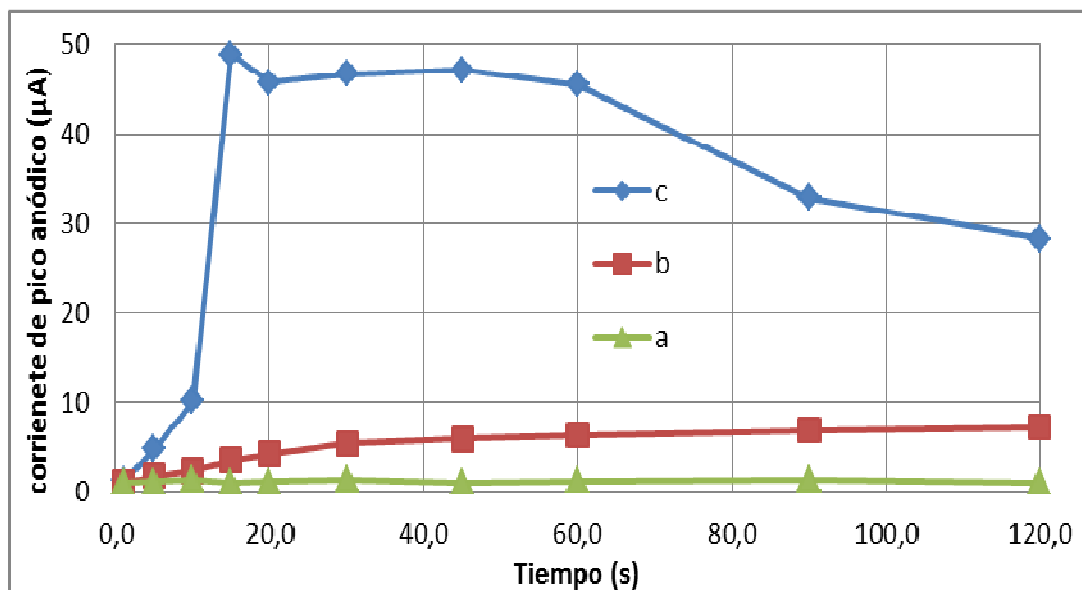


Figura 11. Picos de corriente anódica durante experimentos de voltametría cíclica en soluciones de L-triptófano 10.0 μM (en NaCl 0.1 M, pH 6.0) en función del tiempo de sobreoxidación electroquímica de polipirrol. Velocidad de barrido: 25 mV/s. Electrodo (a) Au, (b) Au/PPyover, (c) Au(PPyover+L-Trp).

Los picos de oxidación de L-Tyr y L-Trp muestran máximos de corriente cuando los tiempos de sobreoxidación son aproximadamente 20 y 15 s, respectivamente. En el caso de L-Tyr, bajo las condiciones de la figura 10, la máxima corriente obtenida sobre el electrodo de Au/(PPyover+L-Tyr) es 69.6 μA (53 veces mayor que la respuesta sobre Au). La altura del pico de oxidación de L-Tyr decae en forma sostenida (aparentemente, en forma exponencial) a medida que el tiempo de sobreoxidación aumenta.

En el caso de L-Trp (figura 11), la corriente sobre Au/PPyover+L-Trp) logra un máximo de 48.9 μA cuando el tiempo de sobreoxidación es 15 s (44 veces mayor que la respuesta sobre Au). Si el proceso de sobreoxidación dura entre 15 y 60 s, aproximadamente, la respuesta de L-Trp sobre el electrodo Au/(PPyover+L-Trp) es relativamente estable. La respuesta del sensor empieza a degradarse notablemente cuando el tiempo de sobreoxidación electroquímica es > 60 s.

Según la evidencia, aparentemente durante los primeros 15 o 20 s de sobreoxidación, los procesos que ocurren en la película de PPy en presencia de cada aminoácido permiten que la película adquiera la selectividad hacia los analitos atrapados, esto se debe a que durante el proceso de sobreoxidación además de entrecruzar el polímero (con la consecuente introducción de los enlaces C=O) se generan las cavidades que después son las responsables del reconocimiento molecular (66) ya que si éstas no se generaran en este paso, no se esperaría una respuesta de corriente diferente entre los electrodos Au/PPyover y los Au(PPyover+L-Trp), Au(PPyover+L-Tyr).

También se observa que las corrientes anódicas que se generan sobre la superficie de oro y de Au/PPyover difieren un poco, siendo mayor la del electrodo modificado, este comportamiento se magnifica un poco más después de los 60 segundos. Este fenómeno se puede atribuir a el viaje de los aminoácidos a través de los poros del polímero sobreoxidado hasta encontrar zonas en las cuales la conductividad eléctrica del polímero es suficiente para mediar el proceso de oxidación de los aminoácidos en el interior del polipirrol sobreoxidado. Un experimento que podría dilucidar lo que está ocurriendo sobre los electrodos de Au/PPyover sintetizados con diferentes tiempos de sobreoxidación, es graficar el cambio de la altura de pico de corriente anódica con relación al cambio de la velocidad de barrido, si se obtiene un comportamiento lineal indicaría la adsorción de los aminoácidos sobre el polímero cuando ocurre la oxidación. Por otro lado en el electrodo de oro este proceso de sobreoxidación genera una superficie con óxidos que imposibilitan la fácil oxidación de los analitos a los potenciales aplicados (67).

Es claro que el potencial (1.0 V vs Ag/AgCl) que se aplica para el proceso de sobreoxidación además de causar la aparición de grupos C=O y entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, causa la oxidación de los aminoácidos, solo que esta debe ser más lenta, menos favorable o poco significativa para el reconocimiento molecular del sensor y el fenómeno de entrecruzamiento es el que prevalece. Esto

se puede argumentar gracias a la evidencia experimental, porque el sensor (una vez sobreoxidado) responde a los aminoácidos que no han tenido algún tipo de oxidación previa.

6.3.2 Sobreoxidación química. En este procedimiento de sobreoxidación, los electrodos Au/(PPy-L-Trp); Au/(PPy-L-Tyr); Au y Au/(PPy) fueron sumergidos en una solución reguladora de fosfatos 50 mM a pH 9.0; a temperatura y presión ambiente con agitación constante entre 0 y 30 minutos (68). Las figuras 12 y 13 muestran la respuesta electroquímica de los sensores sometidos a sobreoxidación química.

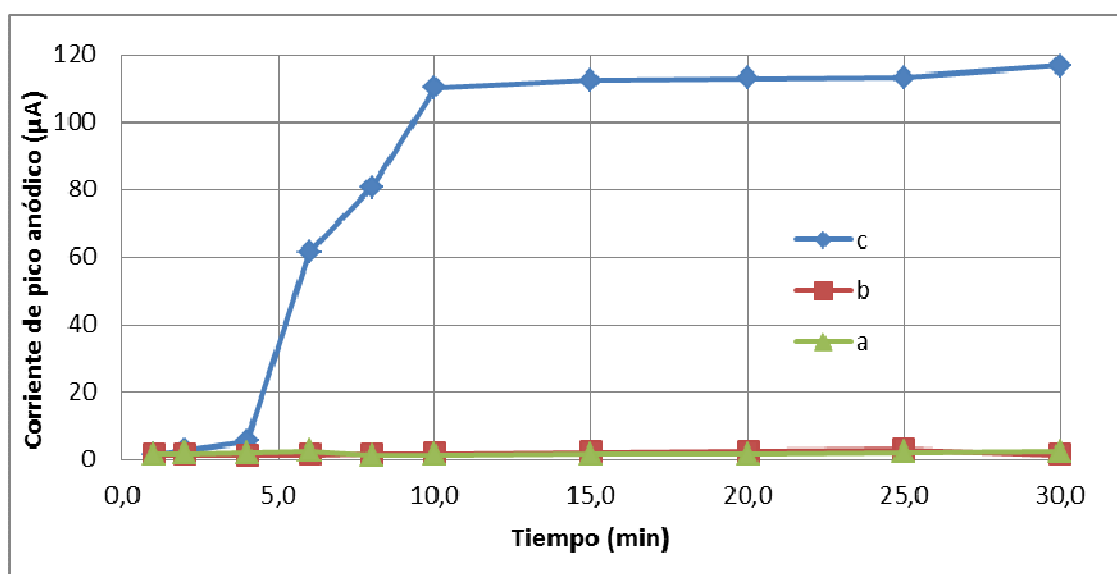


Figura 12. Altura de picos de corriente anódica durante experimentos de voltametría cíclica en soluciones de L-tirosina 10.0 μM (en NaCl 0.1 M, pH 6.0) en función del tiempo de sobreoxidación química de polipirrol. Velocidad de barrido: 25 mV/s; $E_{\text{pa}} = 0.43$ V. Electrodo (a) Au, (b) Au/PPyover, (c) Au(PPyover+L-Tyr).

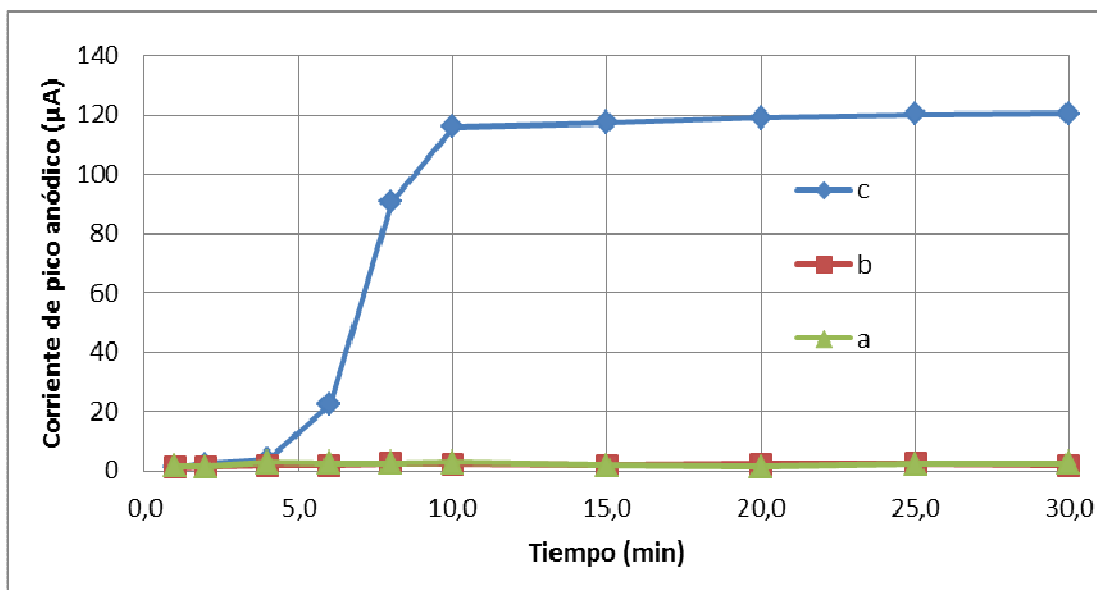


Figura 13. Altura de picos de corriente anódica durante experimentos de voltametría cíclica en soluciones de L-triptófano $10.0 \mu\text{M}$ (en $\text{NaCl } 0.1 \text{ M}$, $\text{pH } 6.0$) en función del tiempo de sobreoxidación química de polipirrol. Velocidad de barrido: 25 mV/s ; $E_{\text{pa}} = 0.61 \text{ V}$. Electrodo (a) Au, (b) Au/PPyover, (c) Au(PPyover+L-Trp).

Las Figuras 12 y 13 muestran que la sobreoxidación química de PPy es definitivamente más lenta que la oxidación electroquímica. Hay tres aspectos para resaltar. El primero es que la respuesta de los sensores resultantes aumenta en forma lineal con el tiempo de sobreoxidación entre 3 y 10 min, independientemente del aminoácido. Para tiempos más largos de tratamiento, la respuesta del sensor es prácticamente invariable respecto al tiempo de sobreoxidación. Esto es consistente con la afirmación de que el pH en el interior del polímero es menos básico que en el exterior (sede de la solución e interfase electrodo-solución), permitiendo que el aminoácido atrapado en el polímero se conserve en forma de zwitterión y sugiere que, mientras la sobreoxidación química empieza en la superficie de la película polimérica en contacto con la solución (controlada por difusión), la oxidación electroquímica ocurre desde el electrodo metálico hacia el exterior de la película. El segundo aspecto es que, aparentemente, dado que el número de sitios de reconocimiento molecular llega a ser mayor luego de la sobreoxidación química, ya que utiliza unas condiciones

más suaves que le permiten al polímero conservar más cavidades con capacidad de reconocimiento hacia los analitos. El tercer aspecto, no mostrado en las figuras 12 y 13, es que la larga exposición de los sensores en medio alcalino disminuyen la adherencia de las películas sobre la superficie de oro, disminuyendo el tiempo de vida útil del sensor en un 40% (69). Por esta razón, todos los resultados que se muestran a continuación fueron obtenidos con sensores tratados con el procedimiento de sobreoxidación electroquímica.

6.4 Reconocimiento molecular de los sensores

La actividad de los sensores de Au/(PPyover+L-Trp) y Au/(PPyover+L-Tyr) fue evaluada sumergiendo los electrodos modificados en una solución acuosa de NaCl 0.1 M a pH 6.0 que contenía L-triptófano o L-tirosina 10.0 μ M (según la cavidad generada en el polímero) por 10 min. Este proceso se realizó para garantizar un enriquecimiento del analito sobre la superficie del sensor. Pasado este tiempo, el sensor fue sometido a un barrido de potencial entre 0.0 y + 0.8 V vs Ag/AgCl a 25mV/s. Las respuestas electroquímicas obtenidas aparecen en las Figuras 14 y 15.

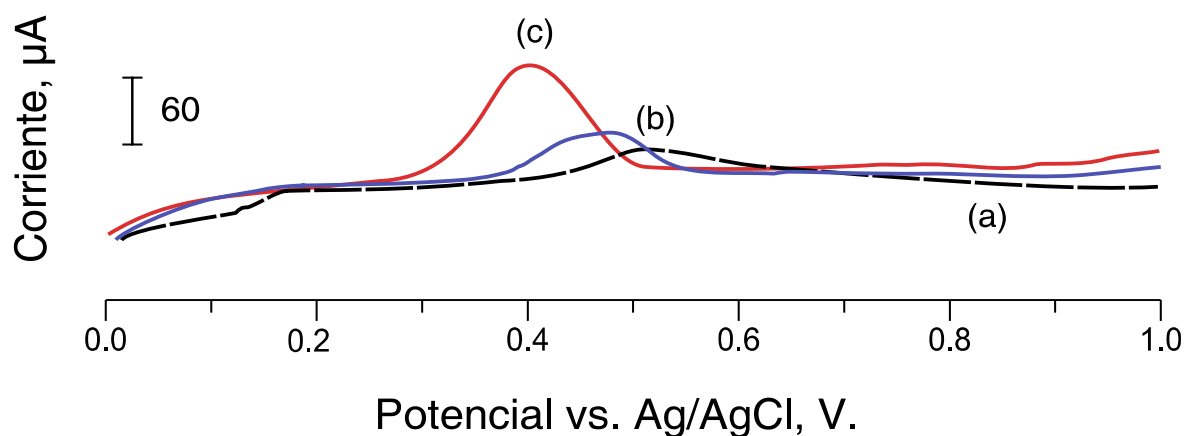


Figura 14. Respuesta voltamétrica (DPV) típica de sensores (a 25 mV/s) en solución de L-Tyr 10.0 μ M en NaCl 0.1 M y pH 6.0. Electrodo: (a) Au/, (b) Au/(PPyover), (c) Au/(PPyover+L-Tyr).

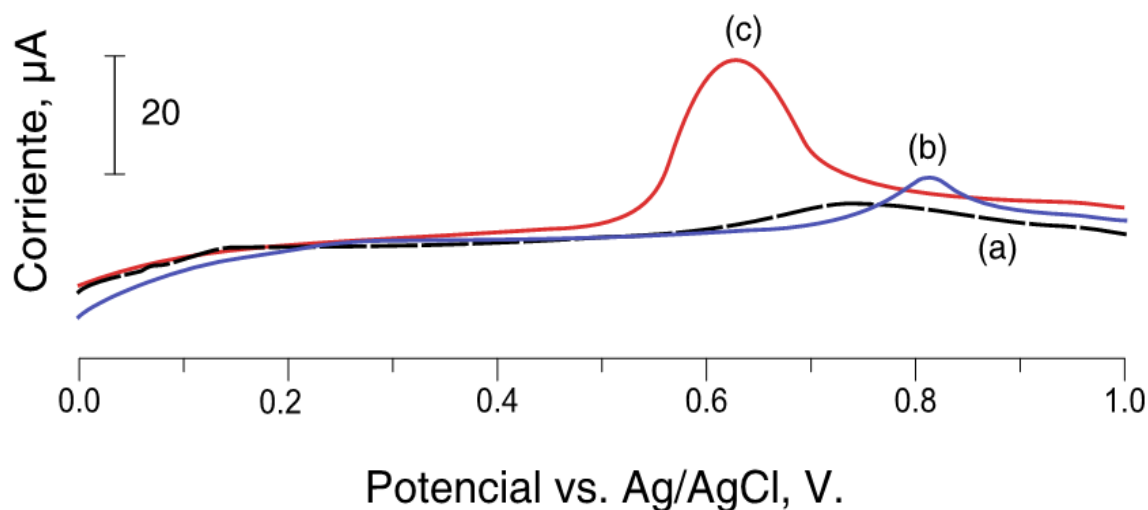


Figura 15. Respuesta voltamétrica típica (DPV) de sensores (a 25 mV/s) en solución de L-Trp 10.0 μ M en NaCl 0.1 M y pH 6.0. Electrodo: (a) Au/, (b) Au/(PPyover), (c) Au/(PPyover+L+Trp).

Las corrientes de pico anódico que se obtienen con cada sensor (curvas c en las figuras 14 y 15) demuestran una marcada preferencia de estos sensores hacia sus L-aminoácidos en comparación con el electrodo de oro y el sensor modificado con polipirrol sobreoxidado pero que no tiene impresiones moleculares (Au/(PPyover)), ya que las corrientes para los MIPs son seis veces mayores que en los que no hay impresiones y ocho veces más grande en comparación con el electrodo de oro. Otro aspecto importante es el considerable aumento de la corriente de oxidación y el corrimiento de los picos a menores potenciales que muestran las curvas (c) anteriormente nombradas, estos comportamientos claramente ilustran el fenómeno electrocatalítico de la superficie de los electrodos modificados con PPyover y las plantillas de los aminoácidos.

6.5 Dependencia del pH de síntesis en el reconocimiento molecular de los sensores

La dependencia de la respuesta de los sensores fue evaluada en función del pH de electrosíntesis. Así, la electrosíntesis fue efectuada en soluciones de 0.1 M pirrol + aminoácido 10 μ M + NaCl 0.5 M + buffer de fosfatos 0.01 M con pH regulado entre 3.0 y 12. Luego, estos sensores se sometieron al proceso de sobreoxidación electroquímica y la respuesta de los sensores fue evaluada al mismo pH de electrosíntesis por voltametría de cíclica (25 mV/s) y bajo las mismas condiciones electroquímicas de la sección 5.5.2. L-tirosina y L- triptófano producen señales a + 0.42 y + 0.62 V vs Ag/AgCl respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio se observan en las figuras 16 y 17.

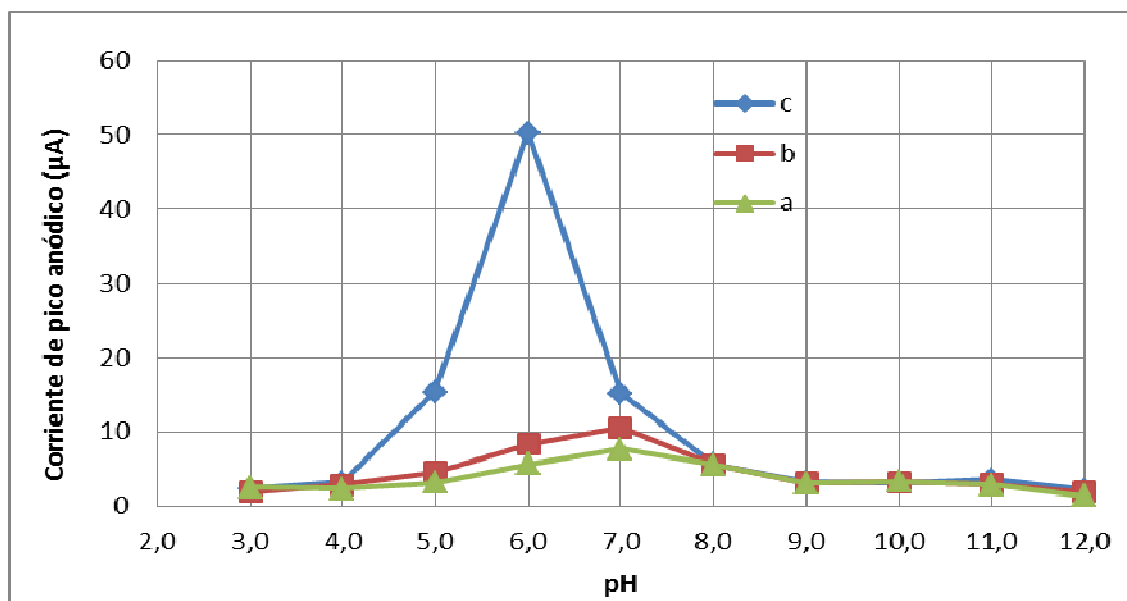


Figura 16. Respuesta electroquímica de electrodos de (a) Au/, (b) Au/(PPyover) y (c) Au/PPyover+L-Tyr en soluciones de L- Tyr 10.0 μ M en NaCl 0.10 M (25 mV/s) en función del pH de la solución de electrosíntesis de PPy.

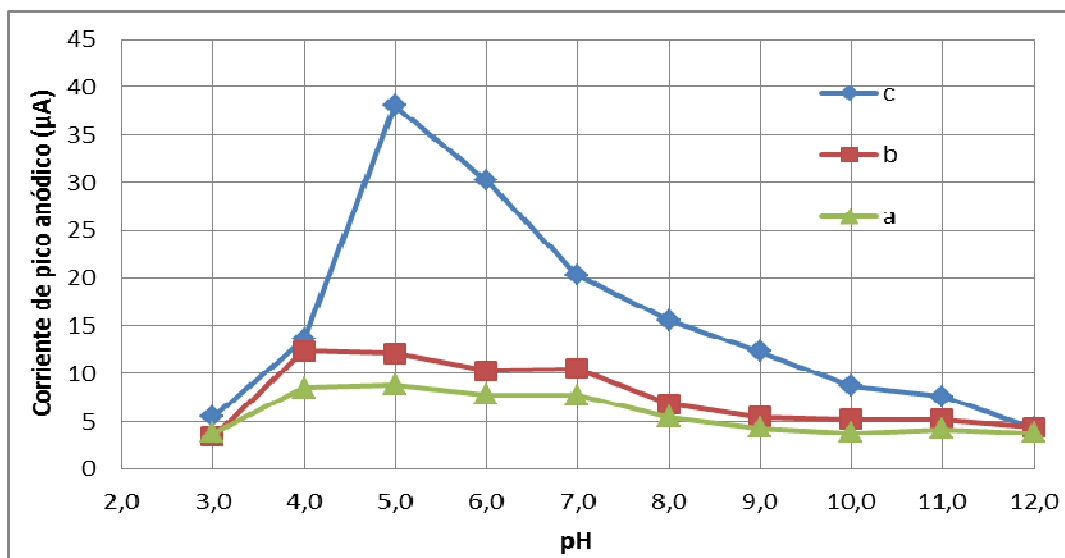


Figura 17. Respuesta electroquímica de electrodos de (a) Au/, (b) Au/(PPyover) y (c) Au/PPyover+L-Trp en soluciones de L-Trp 10.0 μM en NaCl 0.10 M (25 mV/s) en función del pH de la solución de electrosíntesis de PPy.

El pH de síntesis es uno de los parámetros mas importantes para la obtención de sensores altamente selectivos, el pH influye tanto en la formación del polímero como en las diferentes estructuras del aminoácido presentes en la solución. Las mejores repuestas de los sensores se obtuvieron cuando el pirrol fue polimerizado en un medio cuyo pH es aproximadamente igual al pI (punto isoeléctrico) de los aminoácidos atrapados en la red y la especie predominante de estos es neutra (zwitterión).

Teniendo en cuenta que los aminoácidos estan actuando como iones dopantes, las especies zwitterionicas tienen la ventaja de poseer cargas positivas (NH_4^+) y negativas (CO_2^-) dentro de la misma molécula, esto les permite interactuar con estos dos grupos durante el proceso de polimerización sobre los grupos βCO^- y NH^+ del polímero que se forman durante el proceso de polimerización y sobreoxidación (70), y tener dos de mínimo tres puntos de unión necesarios para un reconocimiento molecular básico. Las especies zwitterionicas de L-tirosina y L-triptófano se encuentran entre pH 2.2 - 9.2 y 2.5 - 9.4 respectivamente, teniendo como puntos isoeléctricos 5.65 y 5.88 para L-Tyr y L-Trp. Valores muy cercanos a

los datos experimentales y que refuerzan la necesidad de estos dos grupos funcionales en esta forma (amonio y carboxilato) como base para el reconocimiento, ya que la ausencia de ellos permitiría que otros iones presentes en la solución compensaran el exceso de carga positiva dentro del polímero y no se creara un sensor lo suficientemente selectivo.

6.6 Evaluación de la concentración del pirrol en la respuesta del sensor

La concentración de pirrol en la solución de polimerización también afecta la respuesta de los sensores resultantes. Los polímeros eran luego sometidos a sobreoxidación electroquímica como en la sección 6.3.1. Las Figuras 18 y 19 muestran las respuestas voltamétricas de sensores para L-Tyr y L-Trp preparados en soluciones de pirrol de concentración variable en el rango entre 0.05 y 1.0 M, en NaCl 0.5 M, pH 6.0, y L-Trp o L-Tyr 4.0 μM

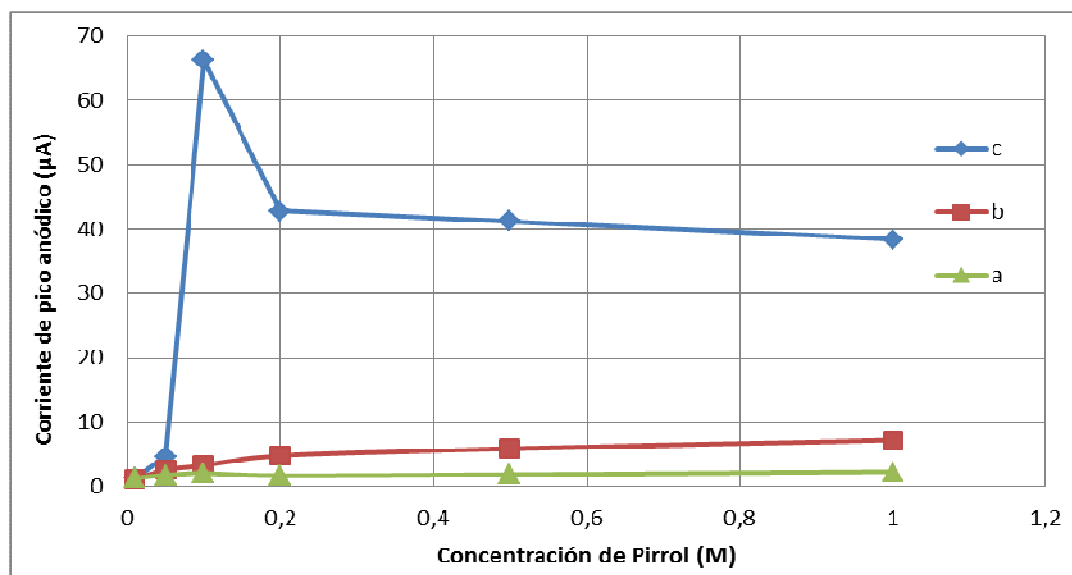


Figura 18. Respuesta electroquímica (CV) de electrodos de (a) Au/, (b) Au/(PPyover) y (c) Au/PPyover+L-Tyr en soluciones de L- Tyr 10.0 μM en NaCl 0.10 M (25 mV/s) en función de la concentración de Py en la solución de electrosíntesis de PPy.

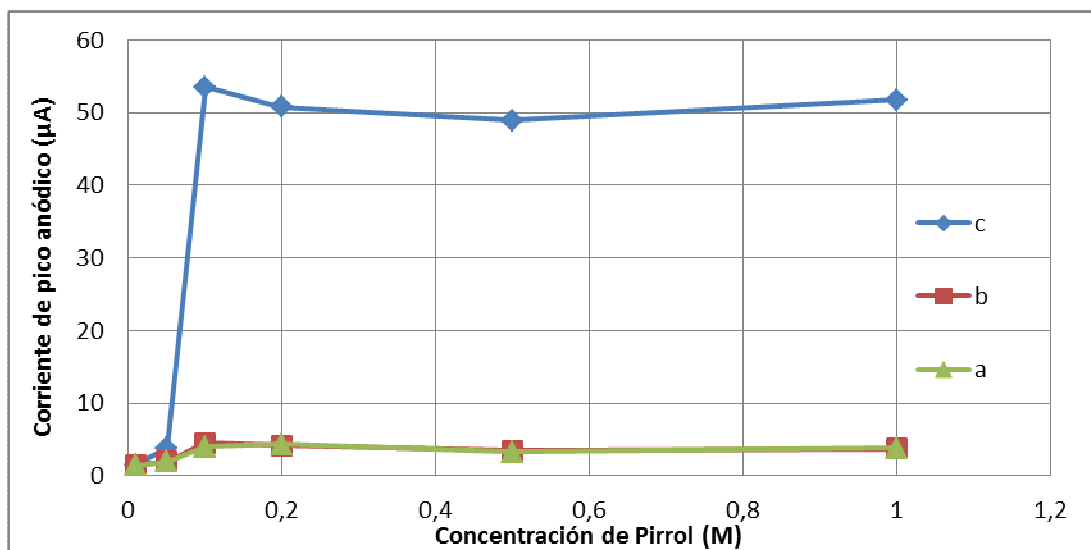


Figura 19. Respuesta electroquímica (CV) de electrodos de (a) Au/, (b) Au/(PPyover) y (c) Au/PPyover+L-Trp en soluciones de L- Trp 10.0 μ M en NaCl 0.10 M (25 mV/s) en función de la concentración de Py en la solución de electrosíntesis de PPy.

Se observa claramente en la figura 19 (curva c) que cuando la concentración de pirrol en la solución es mayor a 0.1 M, la corriente de pico anódica se vuelve independiente de la concentración del monómero, en la figura 18 (curva c) hay una zona donde la concentración del pirrol genera la mejor respuesta (corriente anódica máxima) y se encuentra en la zona de 0.1 M. Para explicar este comportamiento se debe tener en cuenta que durante el proceso de polimerización se tienen diferentes reacciones sobre la superficie del electrodo, la primera es la polimerización del radical catión, la segunda la oxidación del polipirrol y la tercera la sobreoxidación del polímero (71). Todos estos procesos ocurren a diferentes velocidades dependiendo de las condiciones experimentales, por ejemplo si la concentración del monómero es muy alta, la concentración de este cerca a la superficie del electrodo no va a disminuir de forma significativa una vez comienza la polimerización y podrá competir con los otros dos procesos (por transferencia de masa de forma difusional) favoreciéndose la polimerización del radical oxidado, según la evidencia experimental, este fenómeno se nota a partir de soluciones de concentración mayores a 0.1 M. Cuando las concentraciones de pirrol en solución

no son suficientes para suministrar monómeros desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo (los monómeros viajan hasta la superficie por difusión) a una velocidad conveniente para el proceso de electropolimerización que esta ocurriendo sobre el electrodo, en esta situación, la oxidación del polipirrol y la sobreoxidación del polímero ya formado son los procesos que tienen importancia ya que el potencial aplicado es constante durante todo el experimento.

Cuando el proceso de sobreoxidación se favorece durante la polimerización, el sensor pierde la posibilidad de seguir incorporando de forma efectiva los monómeros y se “interrumpe” el proceso normal de polimerización ya que en estos momentos las monocapas de polímero que estan sobre las superficies del electrodo comienzan a perder conductividad eléctrica haciendo mas difícil el proceso de polimerización (72).

6.7 Efecto en la respuesta electroquímica por la concentración de los analitos en el proceso de electropolimerización

La dependencia de la respuesta de los sensores fue evaluada en función de la concentración de los aminoácidos (L-tirosina y L-triptófano) en la solución de electrosíntesis. Así, la electrosíntesis fue efectuada en soluciones de 0.1 M pirrol + NaCl 0.5 M pH 6.0 y concentración variable de aminoácidos. Luego, estos sensores se sometieron al proceso de sobreoxidación electroquímica y la respuesta de los sensores fue evaluada al mismo pH de electrosíntesis por voltametría de cíclica (25 mV/s) y bajo las mismas condiciones electroquímicas de la sección 5.5.2. L-tirosina y L- triptófano producen señales a + 0.41 y + 0.63 V vs Ag/AgCl respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio se observan en las figuras 20 y 21.

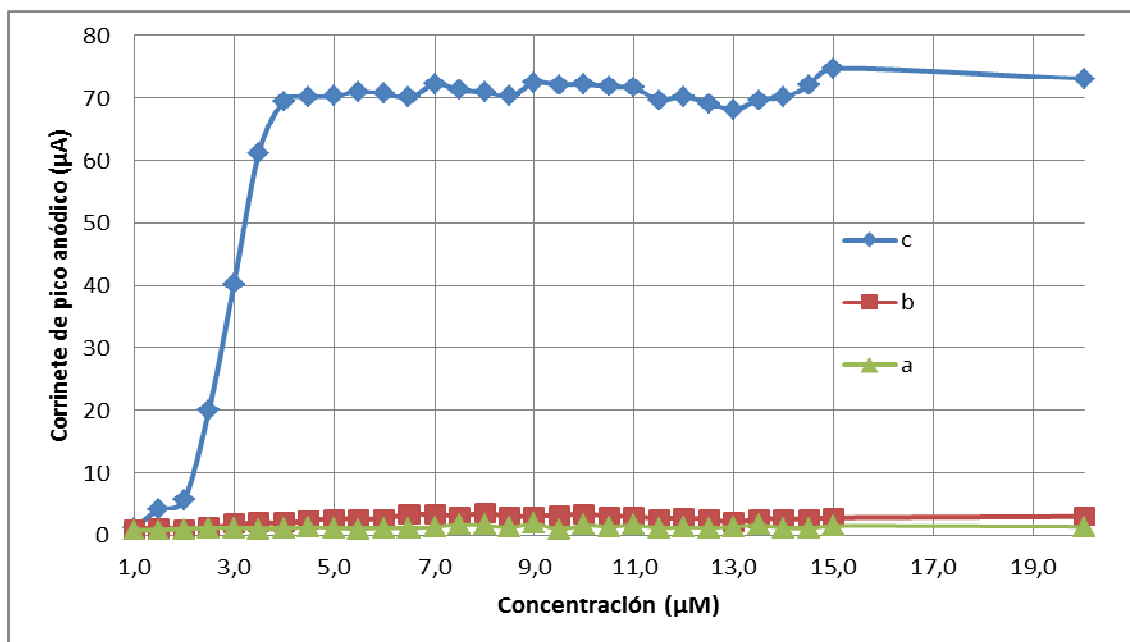


Figura 20. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Tyr) en soluciones de L-Tyr 10.0 μM + NaCl 0.10 M, pH 6.0 en función de la concentración de L-Tyr en la solución de polimerización de pirrol.

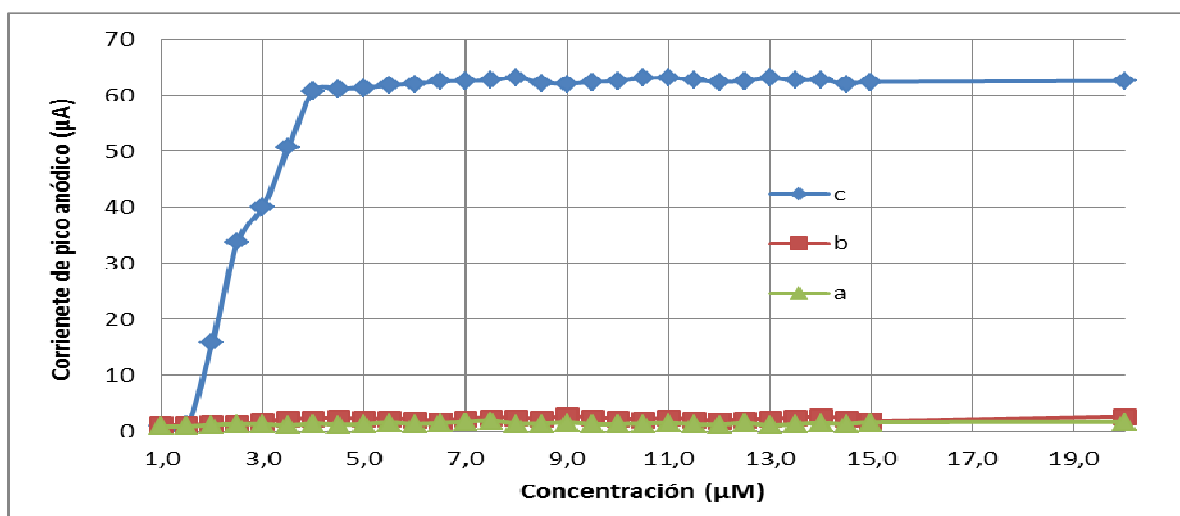


Figura 21. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Trp) en soluciones de Trp 10.0 μM + NaCl 0.10 M, pH 6.0 en función de la concentración de Trp en la solución de polimerización de pirrol.

Las curvas c en las figuras 20 y 21 muestran como las soluciones de síntesis después de una concentración de 4 μM de los aminoácidos los picos de corriente anódicos pierden dependencia de la concentración, generando una respuesta electroquímica similar 70 y 60 μA para los sensores de L-Tyr y el de L-Trp respectivamente. Se observa también que en soluciones con concentraciones menores de 3 μM , la corriente obtenida por el sistema no es significativa, este comportamiento sugiere que para que el sistema tenga actividad electroquímica se necesita un número mínimo de moléculas atrapadas en el polímero y que la transferencia de electrones desde el analito hasta la superficie de oro mediada por el polímero, requiere la acción concertada entre moléculas de analitos, también se puede pensar que en soluciones de concentraciones inferiores a 3 μM la cantidad de aminoácidos que alcanzan a oxidarse sobre la superficie de oro (según el mecanismo expuesto por Suprun (73) es significativa con relación a las que interactúan con el polímero para generar las cavidades del reconocimiento molecular, esto se ve reflejado en las bajas intensidades de corriente anódicas a estas concentraciones, para soluciones por encima de 3 μM los aminoácidos oxidados a este potencial no son tan significativos, tanto así que este fenómeno pasa a ser independiente de la concentración de los mismos.

Cabe resaltar que durante el proceso de polimerización se oxidan aminoácidos sobre la superficie del electrodo y sobre el polímero en formación y que lógicamente se deben formar cavidades moleculares capaces de reconocer estas especies oxidadas, pero las corrientes anódicas de posibles oxidaciones para estos compuestos deben estar a potenciales más altos, lo que impide ser vistos con los experimentos aquí realizados, además, en las soluciones de análisis no se tiene la especie oxidada de cada uno de los aminoácidos sino los aminoácidos libres.

6.8 Dependencia del tiempo de preconcentración en la enantioselectividad.

Las Figuras 22 y 23 muestran la dependencia de la respuesta voltamétrica de los sensores en función del tiempo de preconcentración (ó enriquecimiento), es decir, el tiempo de contacto entre el sensor y una solución analítica, en circuito abierto, inmediatamente antes de la medición electroanalítica.

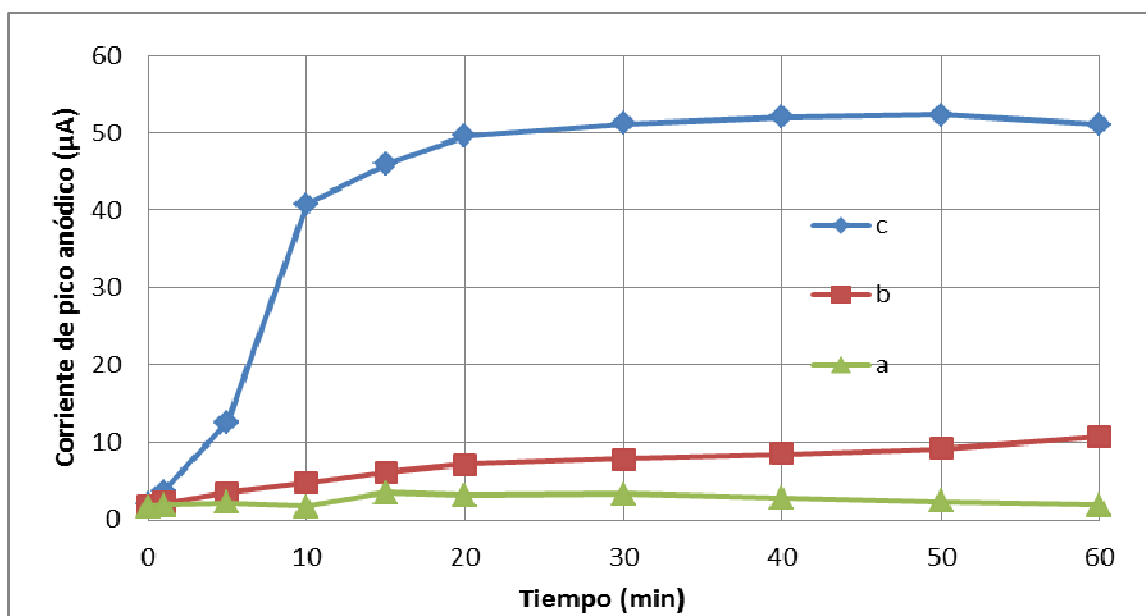


Figura 22. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Tyr) en función del tiempo de preequilibración en solución de L-Tyr 10.0 µM en NaCl 0.10 M y pH 6.0.

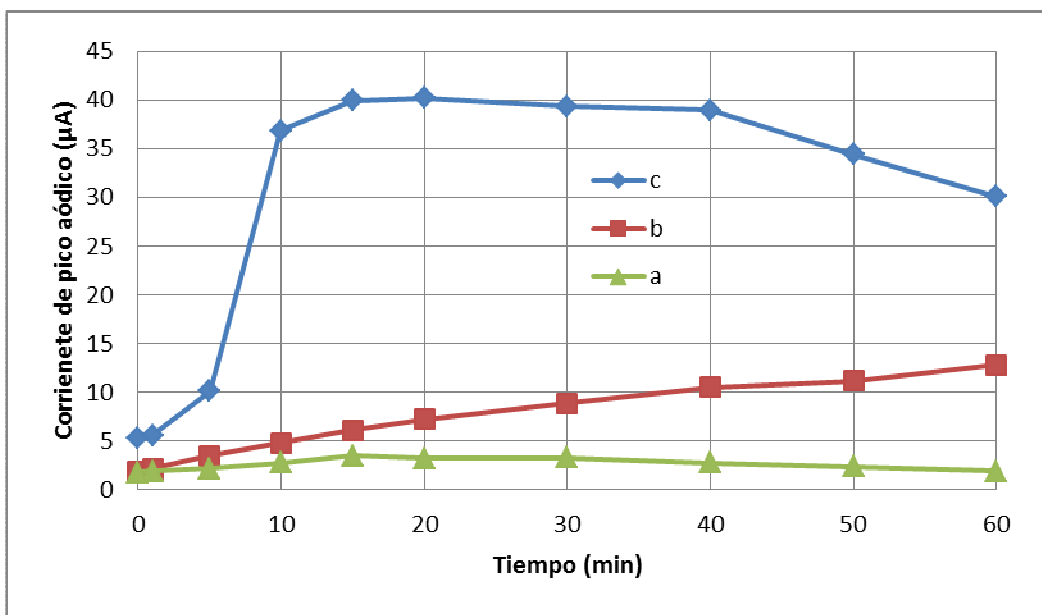


Figura 23. Picos de corriente voltamétrica anódica (a 25 mV/s) de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Trp) en función del tiempo de preequilibración en solución de L-Trp 10.0 μ M en NaCl 0.10 M y pH 6.0.

El tiempo de preconcentración depende de la velocidad de transporte de masa de las moléculas de analito hasta los sitios de adsorción selectiva (reconocimiento molecular) dentro del medio polimérico. La lenta respuesta (del orden de varios minutos) es consistente con una estructura mesoporosa de polipirrol con poros de dimensiones nanométricas. Para el sensor de L-Trp, la caída de corriente para tiempos de preconcentración superior a 40 min, puede estar relacionada con expansión del polímero ("swelling"), cuando éste se expande, los sitios de unión del polímero donde debe "encajar" los puntos de unión del aminoácidos se alejan e imposibilitan una interacción efectiva para la oxidación de la especie.

6.9 Dependencia de la respuesta voltamétrica con relación al espesor de la película

El espesor de polipirrol se calcula de forma aproximada controlando la cantidad de carga que pasa por la celda durante la electropolimerización. El cálculo supone que la película es uniforme y requiere conocer la densidad de la película de polipirrol (entre 0.9 y 1.2 g/mL), el área del electrodo subyacente y el número de electrones requeridos para la generación de PPy “oxidado” (2.25 e⁻/monómero). Las figuras 24 y 25 muestran la respuesta de corriente anódica por voltametría cíclica de sensores para L-Tyr y L-Trp en función del espesor calculado de las películas.

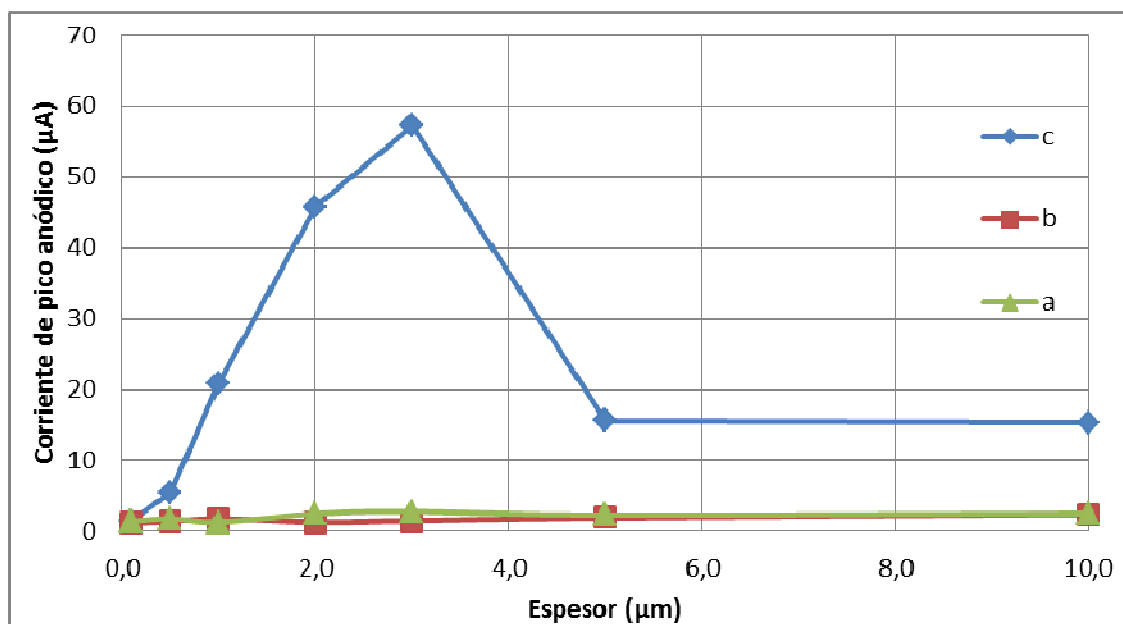


Figura 24. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Tyr) en función del espesor calculado de las películas poliméricas. Las soluciones de análisis contienen L-Tyr 10.0 µM en NaCl 0.10 M y pH 6.0. Tiempo de preconcentración: 10 min. $E_{p_a} = 0.41$ V vs Ag/AgCl.

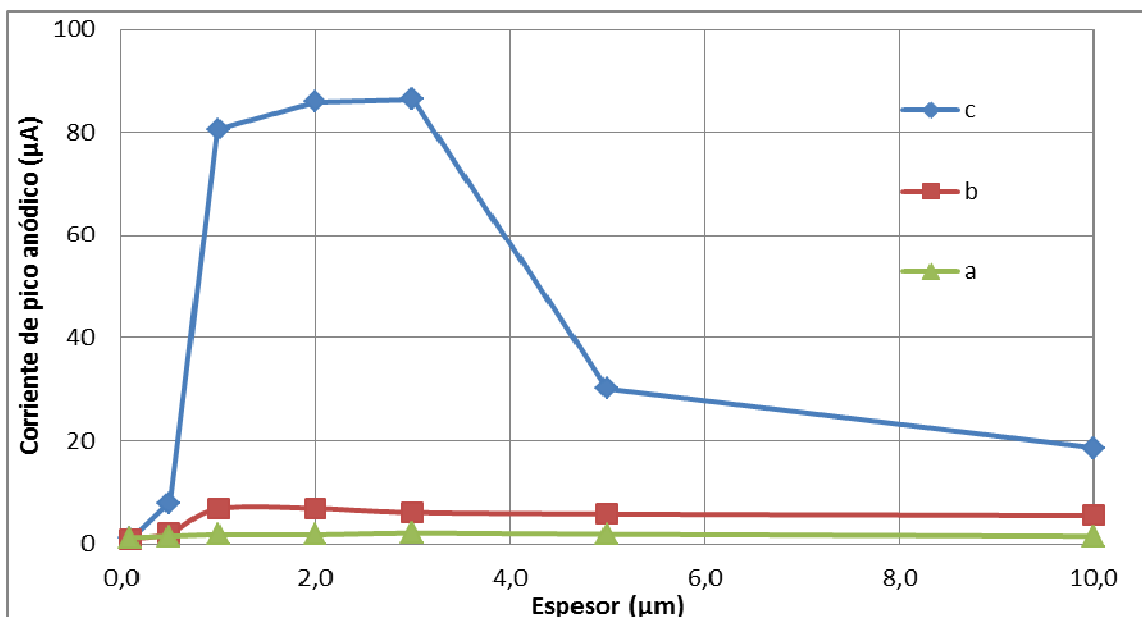


Figura 25. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s de (a) Au/, (b) Au/PPyover y (c) Au/(PPyover+L-Trp) en función del espesor calculado de las películas poliméricas. Las soluciones de análisis contienen L-Trp 10.0 µM en NaCl 0.10 M y pH 6.0. Tiempo de preconcentración: 10 min. $E_{p_a} = 0.62$ V vs Ag/AgCl.

La información que se obtiene del experimento realizado contribuye poco a la discusión sobre la influencia del espesor de la película en el reconocimiento molecular, ya que no es la manera más apropiada de medirlo porque no se puede garantizar que toda la carga que pasa por el sistema electroquímico se utiliza para la generación de polipirrol, además no se tienen en cuenta el consumo de carga en la generación de oligómeros que simplemente quedan en solución y no tienen ningún aporte en el espesor final del polímero, también hay un consumo por parte de moléculas de aminoácido que alcanzan a oxidarse durante el proceso de polimerización, además, no necesariamente el crecimiento del polímero será “totalmente homogéneo” sobre la superficie del electrodo. Por todos estos factores (no controlados ni calculados durante los experimentos) es muy difícil determinar el verdadero espesor de la película resultante y solo muestro valores teóricos.

Sin embargo está documentado que generalmente las películas gruesas o voluminosas de polímeros con plantillas moleculares exhiben cinéticas y

capacidades de unión (reconocimiento) bajas debido a que en estos materiales la mayoría de sitios de reconocimiento (puntos de unión) están ubicados en las secciones interiores del polímero impreso y usualmente estos sitios no son accesibles para la molécula objetivo (analito) en comparación con películas delgadas (décimas de nanómetros), además tendrán menor estabilidad mecánica aun utilizando agente entrecruzante durante el proceso de electropolimerización (74-76).

6.10 Estudio de la estabilidad de los sensores

Para estudiar efectos del tiempo de almacenamiento, los sensores fueron almacenados siguiendo uno de tres protocolos a temperatura ambiente: (a) en solución de cloruro de sodio 0.1 M, pH 6.0 con moléculas plantillas 10.0 μ M, (b) en solución de NaCl 0.1 M, pH 6.0 y (c) almacenamiento al aire libre. Antes de su uso, todos los electrodos se lavaron en agua desionizada. Las respuestas de corriente de los sensores aparecen en las figuras 26 y 27.

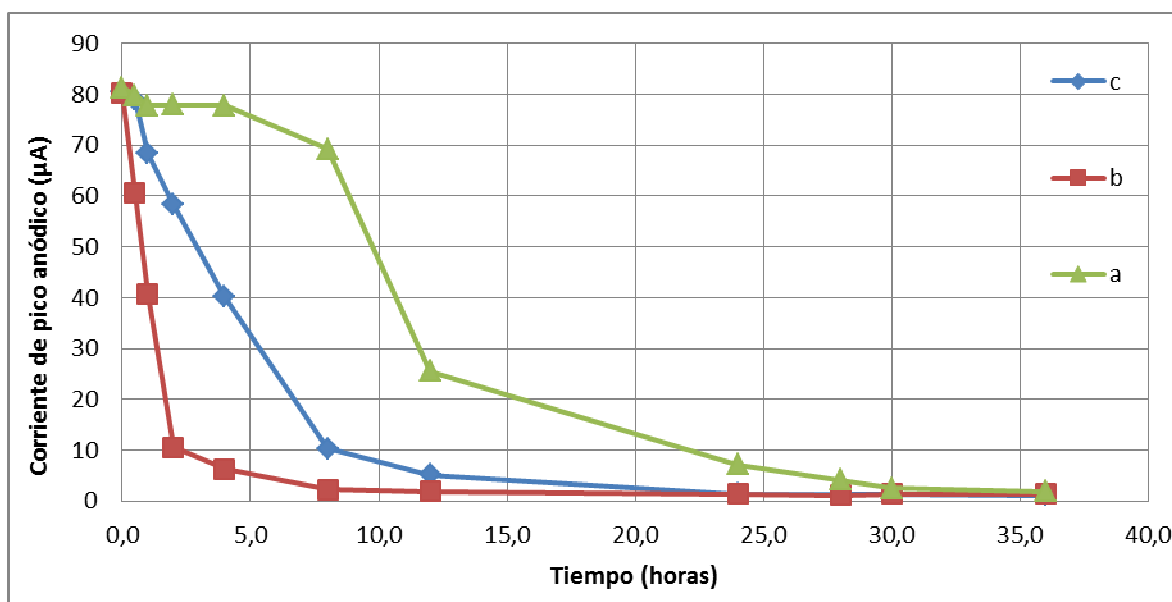


Figura 26. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s del sensor Au/(PPyover+L-Tyr) en función del tipo de almacenamiento (a) en solución de cloruro de sodio 0.1 M, pH 6.0 con moléculas plantillas 10.0 μ M, (b) en solución de NaCl 0.1 M, pH 6.0 y (c) almacenamiento al aire libre. Las soluciones de análisis contienen L-Tyr 10.0 μ M en NaCl 0.10 M y pH 6.0. Tiempo de preconcentración: 10 min. $E_{p_a} = 0.42$ V vs Ag/AgCl.

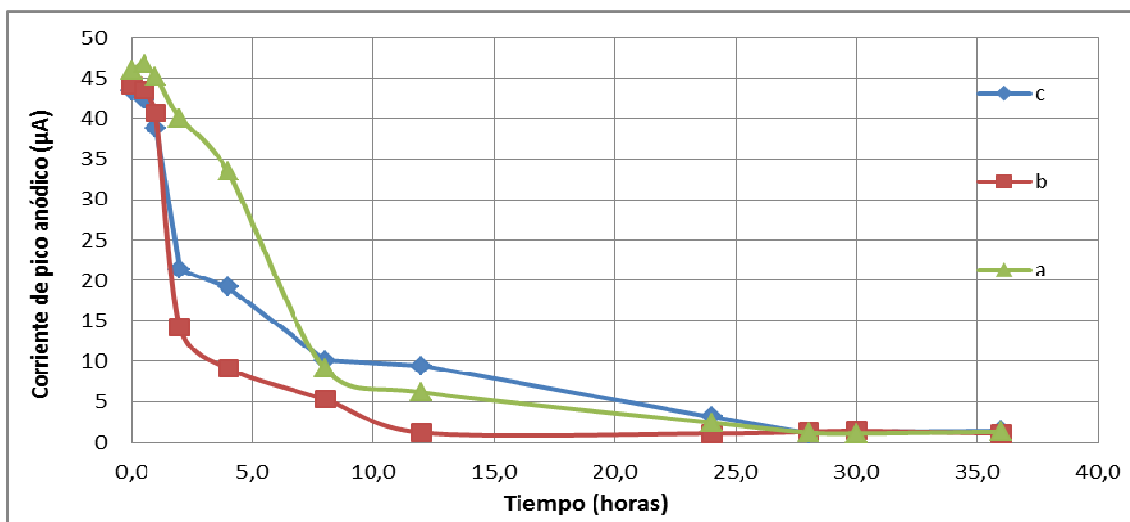


Figura 27. Picos de corriente voltamétrica anódica a 25 mV/s del sensor Au/(PPyover+L-Trp) en función del tipo de almacenamiento (a) en solución de cloruro de sodio 0.1 M, pH 6.0 con moléculas plantillas 10.0 µM, (b) en solución de NaCl 0.1 M, pH 6.0 y (c) almacenamiento al aire libre. Las soluciones de análisis contienen L-Trp 10.0 µM en NaCl 0.10 M y pH 6.0. Tiempo de preconcentración: 10 min. $E_{p_a} = 0.62$ V vs Ag/AgCl.

Para efectos prácticos, los tiempos de vida de todos los sensores son extremadamente cortos independientemente de las condiciones de almacenamiento. En las figuras 26 y 27 se observa que el método de almacenamiento menos efectivo es en una solución de NaCl 0.1 M, pH 6.0 (curva b), esto sugiere un cambio de volumen del polímero durante este tiempo que hacen que los sitios de unión dentro de las cavidades se alejen lo suficiente como para no generar un buen reconocimiento molecular. Las curvas c (almacenamiento al aire libre) en la figuras disminuyen su corriente de pico anódico debido a fenómenos de oxidación con el oxígeno presente en el aire, además que la película se “seca” y se convierte en una superficie quebradiza. El método de almacenamiento en una solución que contenía la molécula plantilla parece ser la mejor opción, esto evidencia que el entrecruzamiento del polímero no fue muy efectivo ya que fácilmente hay “deformación” de las cavidades y también pueden existir algunas cadenas reactivas del polímero que reaccionan con el aire y el agua.

6.11 Curvas de calibración de los sensores para L-tirosina y L-triptófano (individuales)

Para la evaluación del rango lineal se tomaron soluciones de concentraciones variables de cada analito respectivamente que oscilaban entre 0,10 y 100 μM en la solución de análisis, evaluando las zonas lineales y de mejor pendiente para realizar las medidas electroquímicas cuantitativas. Esta evaluación se efectuó utilizando las mejores condiciones encontradas de sobreoxidación, de concentración del monómero, del pH de electrosíntesis, de espesor de la película polimérica, entre otras. Las figuras 28 y 29 muestran los resultados de este estudio.

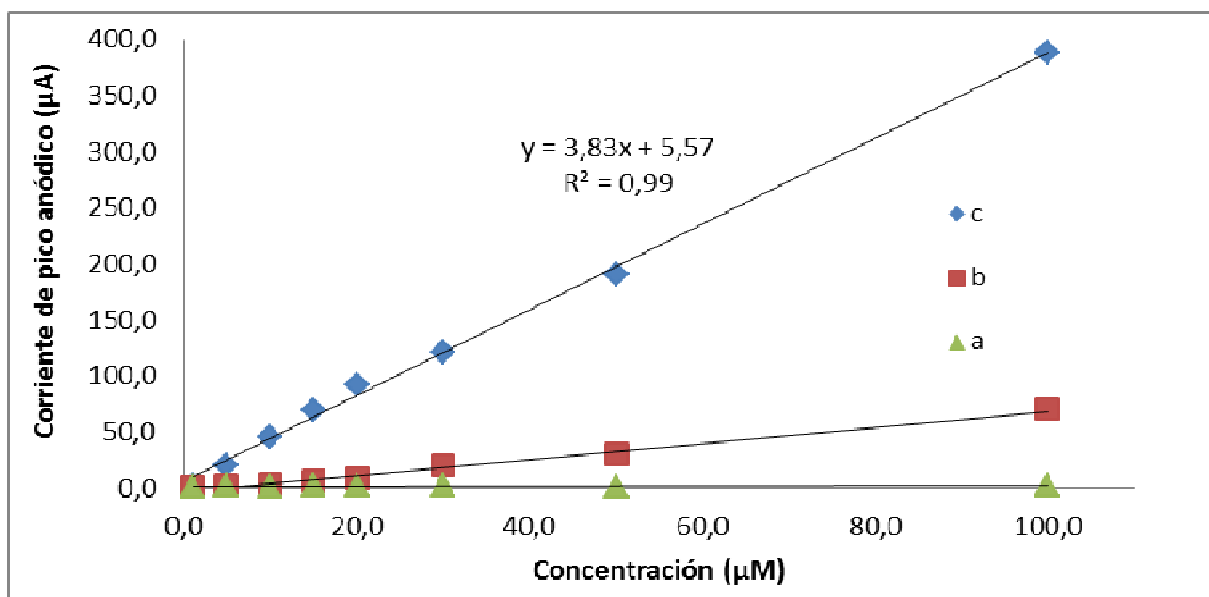


Figura 28. Curva de calibración del sensor de L-triptófano. Solución de L – Trp (0.1 - 100.0 μM) en NaCl 0.1 M y pH 6.0; corrientes anódicas de pico a una velocidad de barrido de 25 mV/s. (a) electrodo de oro, (b) electrodo con polipirrol sobreoxidado y (c) electrodo modificado con polipirrol sobreoxidado e impresiones moleculares.

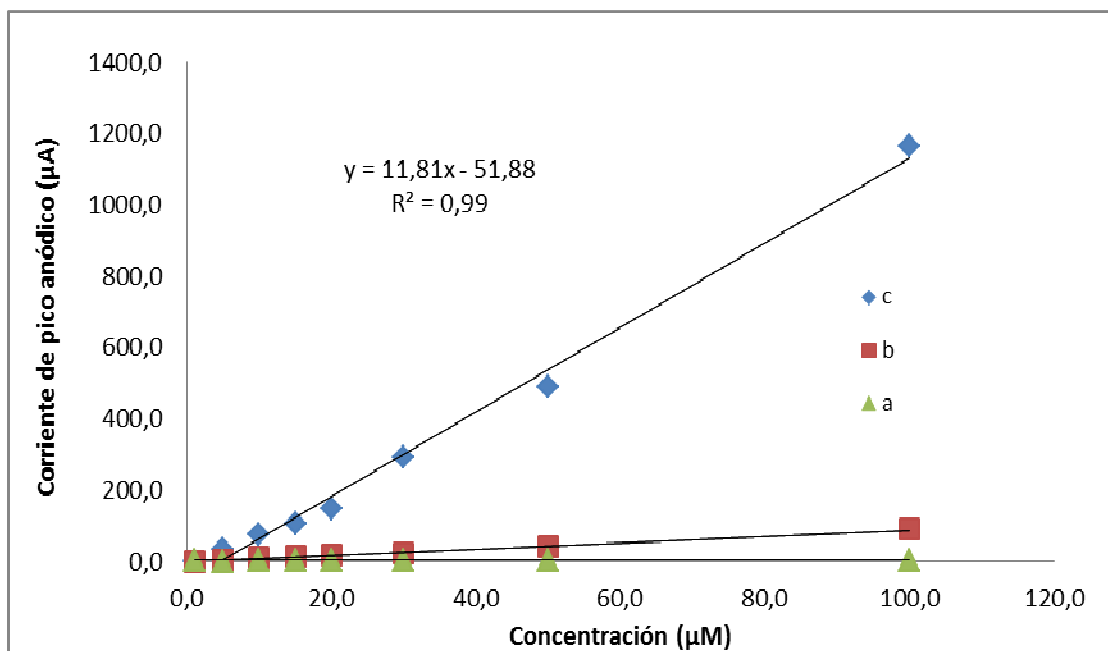


Figura 29. Curva de calibración del sensor de L-tirosina. Solución de L-Tyr (0.1 - 100.0 μM) en NaCl 0.1 M y pH 6.0; corrientes anódicas de pico a una velocidad de barrido de 25 mV/s. (a) electrodo de oro, (b) electrodo con polipirrol sobreoxidado y (c) electrodo modificado con polipirrol sobreoxidado e impresiones moleculares.

Con base en los datos obtenidos se calcula las concentraciones límites encontrando para los sensores de L-tirosina y L-triptófano, valores de 0.19 y 0.15 μM respectivamente. Valores comparables con los reportados por otros autores para la determinación de estos dos analitos en diferentes matrices y con diferentes técnicas de análisis. A continuación se muestran algunos valores de concentraciones límites obtenidos por otros investigadores.

Tabla 2. Límites de detección de L-triptófano por técnicas convencionales

Técnica	Electrodo/Modificación	LOD (μM)	Ref.
HPLC	Ninguna	0.053	(77)
HPLC	Ninguna	0.001	(78)
HPLC	Ninguna	0.134	(79)
DPV	GCE/Poly Ácido 4-Aminobenzoico	0.2	(80)
DPV	CPE/FCCa-TiO ₂	0.098	(81)
DPV	ITO/Nanopartículas de oro-MWNT	0.025	(82)
DPV	GCE/Nanopartículas de oro-CNT	0.01	(83)
DPV	GCE/Hemin	0.025	(84)
DPV	Grafito	0.05	(85)
DPV	GCE/Nafion-TiO ₂ -Grafeno	0.7	(86)

Tabla 3. Límites de detección de L-tirosina por técnicas convencionales

Técnica	Electrodo/Modificación	LOD (μM)	Ref.
HPLC	Ninguna	2.5	(87)
GC	Ninguna	0.03	(88)
DPV	GCE/ MWCNT/Ácido 4-Amino Bencensulfónico	0.08	(89)
CV	GCE/MWCNT	0.35	(90)
DPV	GCE/Nanopartículas de Oro	0.08	(91)
DPV	GCE/Butilcolina	0.4	(92)
SWV	GCE/MWCNT	0.4	(93)
DPV	BDD	1	(94)
DPV	CP/Zeolita	0.32	(95)
Columbimetría	Nique/Polipirrol MIP	5000	(96)
DPV	GCE/Líquido iónico/ Cu (II)	0.008	(97)
DPV	GCE/MIPPy/Cu(II)	0.004	(98)

6.12 Estudio de la enantioselectividad de los sensores

Los sensores de Au/(PPyover+L-Tyr) y Au/(PPyover+L-Trp) muestran alta enantioselectividad. Las figuras 30 y 31 muestran respuesta voltamétrica de los sensores para L-Tyr y L-Trp en soluciones de D-Tyr y D-Trp, respectivamente.

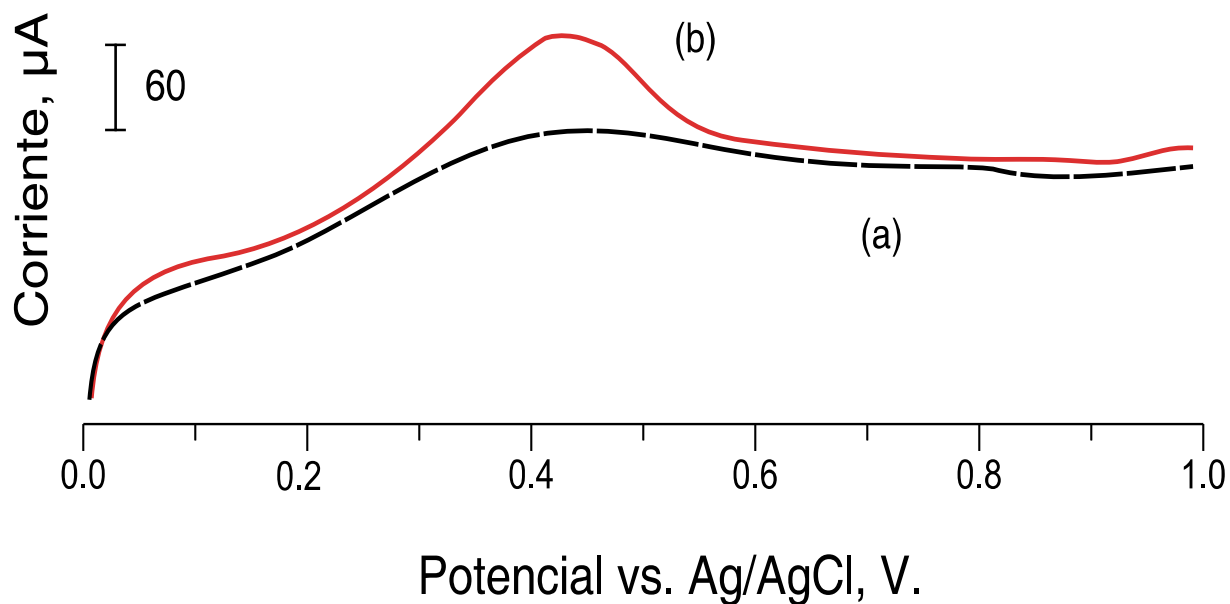


Figura 30. Voltametría de barrido lineal para un electrodo de Au/(PPyover+L-Tyr) en soluciones de (a) D-Tyr 10.0 µM y (b) L-Tyr 10.0 µM, ambas en NaCl 0.1 M, pH 6.0. Velocidad de barrido = 25 mV/s.

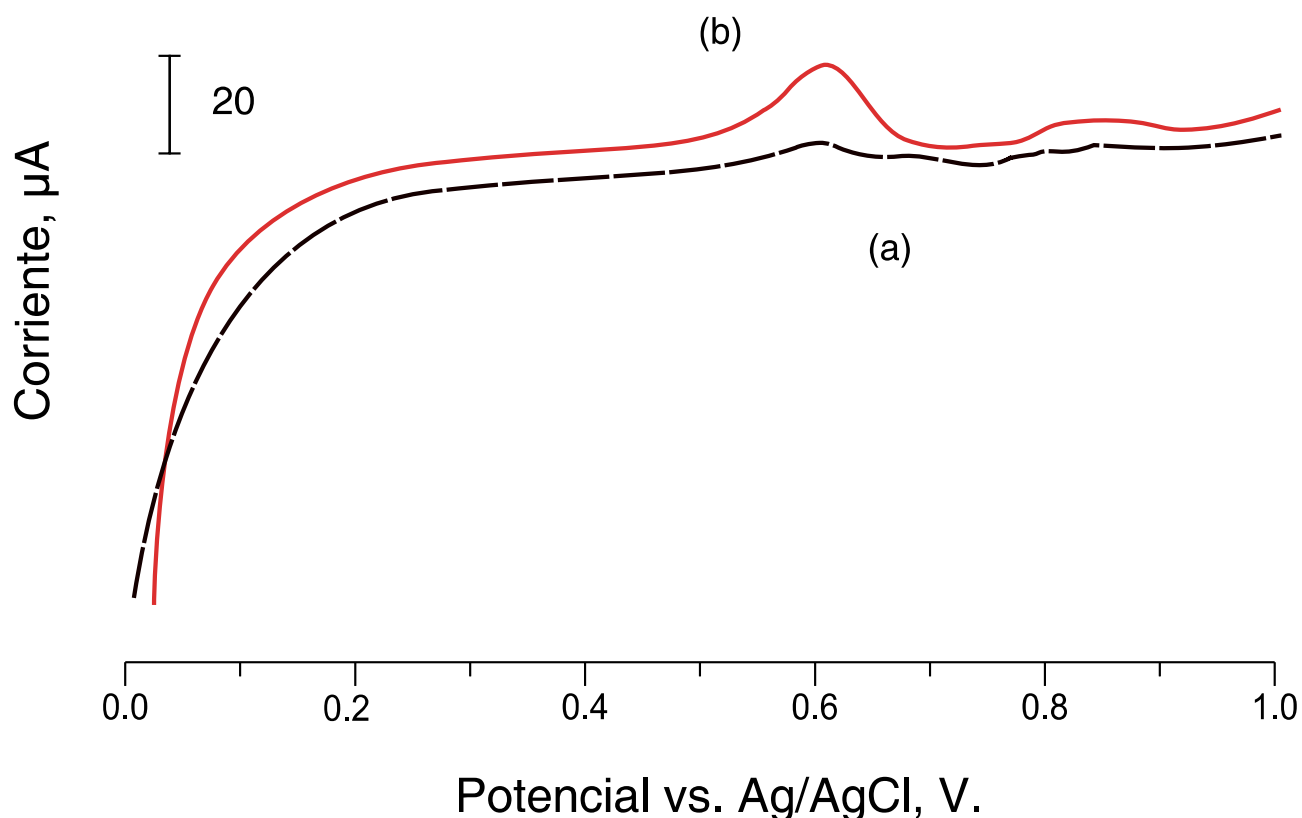


Figura 31. Voltametría de barrido lineal para un electrodo de Au/(PPyover+L-Trp) en soluciones de (a) D-Trp 10.0 μM y (b) L-Trp 10.0 μM , ambas en NaCl 0.1 M, pH 6.0. Velocidad de barrido = 25 mV/s.

Se observa claramente la selectividad de los sensores hacia cada uno de los L-aminoácidos para los cuales fueron desarrollados, obteniendo relaciones de corriente de pico anódico (corriente anódica del L-aminoácido/corriente anódica del D-aminoácido) de 31 ($62 \mu\text{A}/2 \mu\text{A}$) y 14 ($21 \mu\text{A}/1.5 \mu\text{A}$) para tirosina y para triptófano respectivamente.

Retomando todos estudios anteriores y realizando una síntesis podríamos resumir que los resultados obtenidos y la evidencia aportada por otros investigadores podemos aportar que cuando la polimerización ocurre a pH casi neutro, la especie que predomina del aminoácido atrapado en PPy oxidado es el zwitterión. El grupo carboxilato del aminoácido puede adsorberse sobre PPy oxidado, el cual tiene

cargas netas positivas. El grupo NH_3^+ del aminoácido debe ser repelido por las cadenas del polímero oxidado pero, el mecanismo sugerido para la sobreoxidación de PPy muestra que esta ocurre en dos pasos, involucrando principalmente los átomos de carbono beta de los anillos de pirrol. En un primer paso, los anillos de pirrol forman enlaces $\beta\text{C-OH}$ y $\beta\text{C-O}^-$. En esta primera etapa, el polímero aún tiene cargas positivas, muchas localizadas sobre el átomo de nitrógeno del anillo de pirrol. Si el medio de sobreoxidación contiene cloruros (como en el presente trabajo), entonces se pueden formar enlaces $\beta\text{C-Cl}$ y luego $\beta\text{C-OH}$ (99).

Los grupos βCO^- y NH^+ (presentes en la primera etapa de sobreoxidación de PPy) son sitios de interacción favorable para los grupos CO_2^- y NH_3^+ de la forma zwitterion del aminoácido atrapado en el polímero. Pero es razonable que esto ocurra solo si el pH del medio de sobreoxidación es menor que el $\text{pK}_{\text{a}2}$ del aminoácido (como sucede en este caso). Puesto que el pH del medio externo de sobreoxidación en este trabajo es cerca de 13, el comportamiento observado en las Figuras 7 y 8 tienen sentido si PPy se concibe como una estructura muy porosa con superficie externa e interna y una fracción significativa de las moléculas de aminoácido quedan atrapadas en forma de zwitterion en los poros internos de las partículas de PPy durante la polimerización. Entonces, para que se formen los “sitios complementarios en forma y tamaño”, que servirían luego para reconocer molecularmente a cada aminoácido, debe haber tres o más puntos de interacción entre una o varias cadenas de PPy y cada molécula de aminoácido. Debe haber entonces otro punto de interacción entre el polímero y la cadena lateral del aminoácido lo cual es posible porque es conocido que las cadenas individuales de PPy crecen en forma de hélice (99). El cruce entre cadenas (*crosslinking*) durante la polimerización y la primera etapa de sobreoxidación ayudarían a darle rigidez a los sitios de impresión molecular. Ahora, puesto que en este trabajo la sobreoxidación electroquímica ocurre a un potencial suficientemente alto como para sobreoxidar PPy y oxidar el aminoácido atrapado (1.0 V vs Ag/AgCl), tiene que ser que la cinética de sobreoxidación es mucho más rápida que la de oxidación del aminoácido. De otra forma, los “sitios de impresión

molecular” servirían para reconocer el producto de oxidación del aminoácido y no al aminoácido mismo.

El segundo paso de sobreoxidación de PPy involucra pérdida adicional de electrones acompañado por hidrólisis para formar enlaces $\beta\text{C}=\text{O}$, dañando la conjugación extendida, desprotonando los átomos de nitrógeno del polipirrol y posiblemente rompiendo algunas cadenas. Al final, dependiendo de la extensión de la sobreoxidación, la fracción de grupos $\beta\text{C}-\text{O}^-$ hacen del PPyover un intercambiador catiónico (99). Bajo estas condiciones, la fracción del aminoácido cargada negativamente es expulsada durante la sobreoxidación dejando la cavidad para el reconocimiento molecular.

7. Síntesis del Bisensor

Con el promedio de las mejores condiciones encontradas en cada una de las secciones anteriores se procedió a sintetizar un sensor en el que se generaron cavidades complementarias para el reconocimiento simultáneo de los dos analitos estudiados (generación de un bisensor). En la tabla 4 se muestran las condiciones de síntesis utilizadas y las figuras 32 y 33 muestran el promedio de las señales de reconocimiento molecular y de enantioselectividad obtenidos.

Tabla 4. Condiciones promedio para la síntesis de un bisensor para el reconocimiento enantioselectivo de tirosina y triptófano.

Electrolito de síntesis y análisis	NaCl	0.1 M
Electrodo	Oro	
Monómero	Pirrol	0.1 M
Contra electrodo	Platino	
Electrodo de Referencia	Ag/AgCl/KCl(3.0 M)	
Molécula molde 1	0.40 V	4.0 μ M
Molécula molde 2	0.65 V	4.0 μ M
Potencial de Polimerización	0.80 V	1.0 min
Potencial de Sobreoxidación	1.0 V	15.0 s
Tiempo de preconcentración	10 min	
pH de síntesis y análisis	6.0	
Temperatura	Ambiente	
Presión	Ambiente	

En estos resultados que muestran a continuación se observa que las señales son mayores para L-tirosina que para L-triptófano, lo que lleva a plantear que efectivamente en una misma solución las moléculas de tirosina viajan más rápido, forman un complejo de prepolimerización más estable y presenta una transferencia electrónica más efectiva que las moléculas de triptófano que tienden a oxidarse más fácil que el aminoácido no indólico.

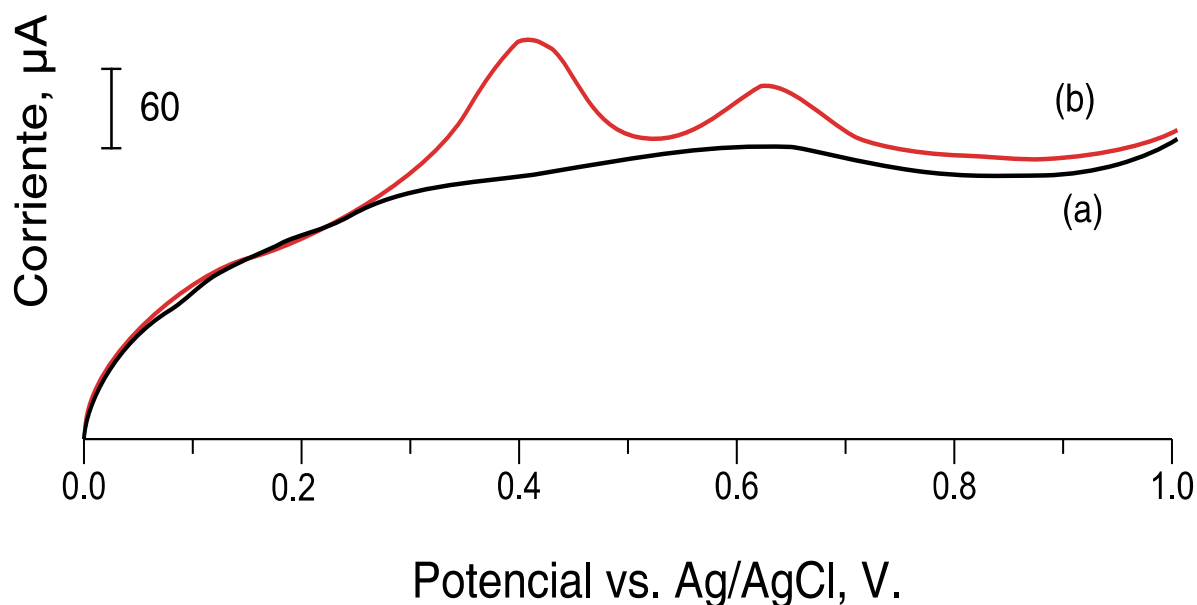


Figura 32. Voltamograma de la enantioselectividad del bisensor de L-tirosina y L-triptófano. (a) Solución de D-Tyr y D-Trp 10.0 μM en NaCl 0.1 M y pH 6.0; corrientes anódicas de pico a una velocidad de barrido de 25 mV/s. (b) Solución de L-Tyr y L-Trp 10.0 μM en NaCl 0.1 M y pH 6.0; corrientes anódicas de pico a una velocidad de barrido de 25 mV/s.

Para estudiar si al fabricar dos cavidades en el mismo sensor la linealidad que existe entre la concentración y la respuesta se modifica, se efectuó una curva de calibración y se calcularon las concentraciones límites a partir de esta (tabla 5) para tirosina y triptófano respectivamente así como las pendientes (sensibilidades) para cada uno. Estos límites de detección y cuantificación siguen siendo aceptables si tenemos en cuenta que son concentraciones más bajas que las reportadas en orina y sangre.

Tabla 5. Límites de detección y cuantificación del bisensor.

Analito	Límite de detección (μM)	Límite de cuantificación (μM)
L-tirosina	0.14	0.47
L-triptófano	0.19	0.63

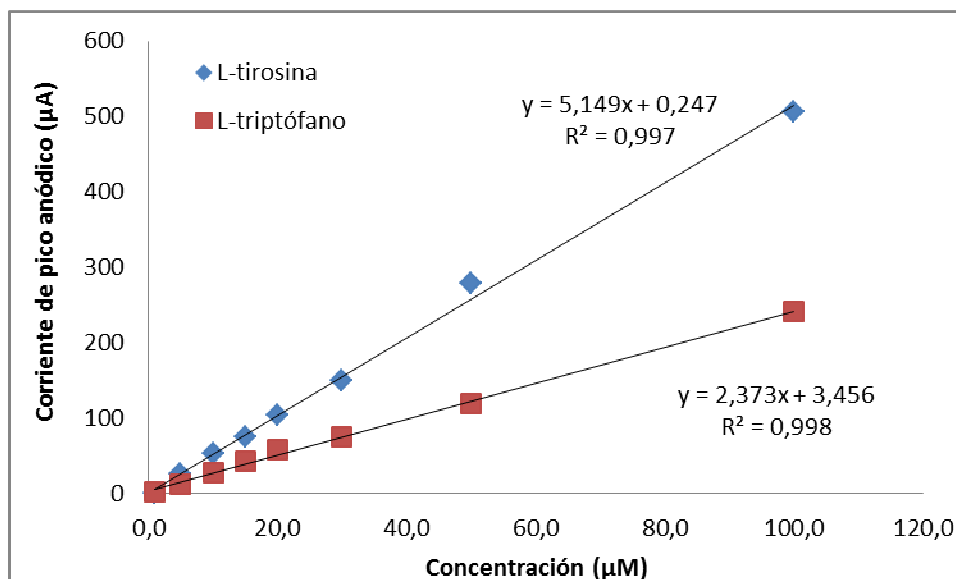


Figura 33. Curva de calibración del bisensor. Solución de L-Tyr y L-Trp (0.1 - 100.0 μM) en NaCl 0.1 M y pH 6.0; corrientes anódicas de pico a una velocidad de barrido de 25 mV/s.

Comparando los valores de las pendientes de los sensores individuales con los generadas por el bisensor, estas últimas tienen una caída proporcional del 56% y 39% para la tirosina y el triptófano respectivamente. Esto quiere decir que hay una pérdida de sensibilidad al sintetizar el bisensor y una prueba F realizada para las pendientes arrojan como resultado que difieren significativamente. La pérdida de sensibilidad se puede entender por el mismo fenómeno anterior, ahora sobre la misma superficie se van a formar dos cavidades para diferentes moléculas, esto genera que la cantidad de “sitios de unión” disponibles para cada analito disminuya y por consiguiente las corrientes de pico anódico, lo que se traduce en una disminución en la sensibilidad del bisensor.

8. Determinación de L-tirosina y L-triptófano libre en orina humana

Una vez obtenido el bisensor, se evaluó su capacidad de análisis cuantitativo en muestras reales (orina humana), los resultados obtenidos se compararon contra los arrojados por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia en un laboratorio clínico para las mismas muestras. Las figuras 34 y 35 muestran la correlación entre los resultados y una prueba estadística de significancia (prueba t) de comparación de dos métodos analíticos permitió concluir que no hay diferencia significativa entre los datos arrojados por las dos técnicas.

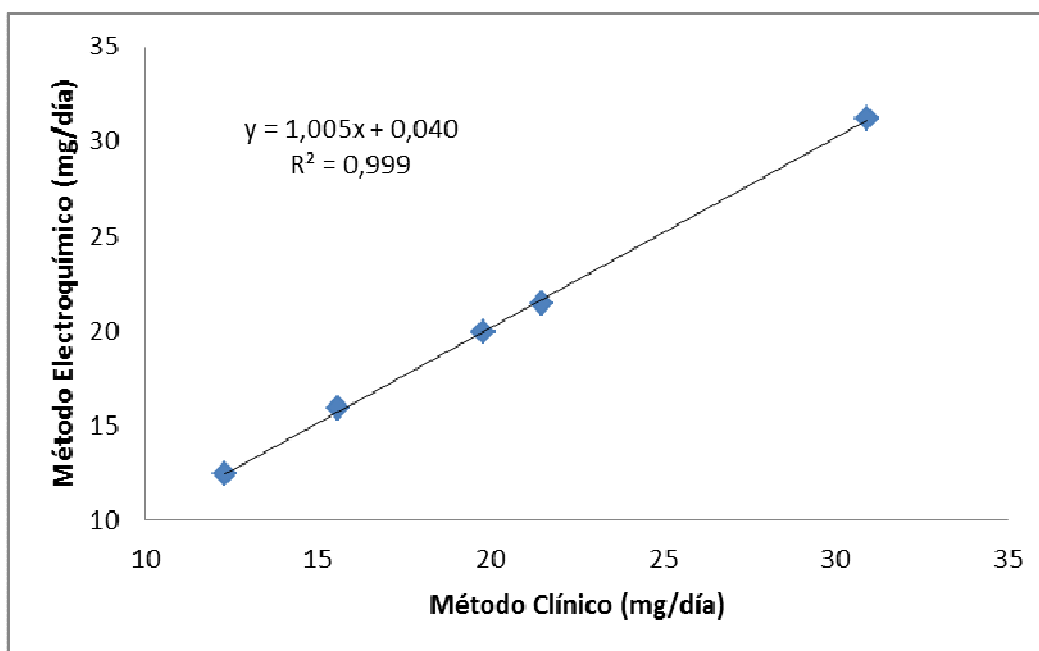


Figura 34. Comparación de resultados de la determinación de L-Tyr libre en muestra de orina humana entre el método electroanalítico propuesto y un método cromatográfico validado.

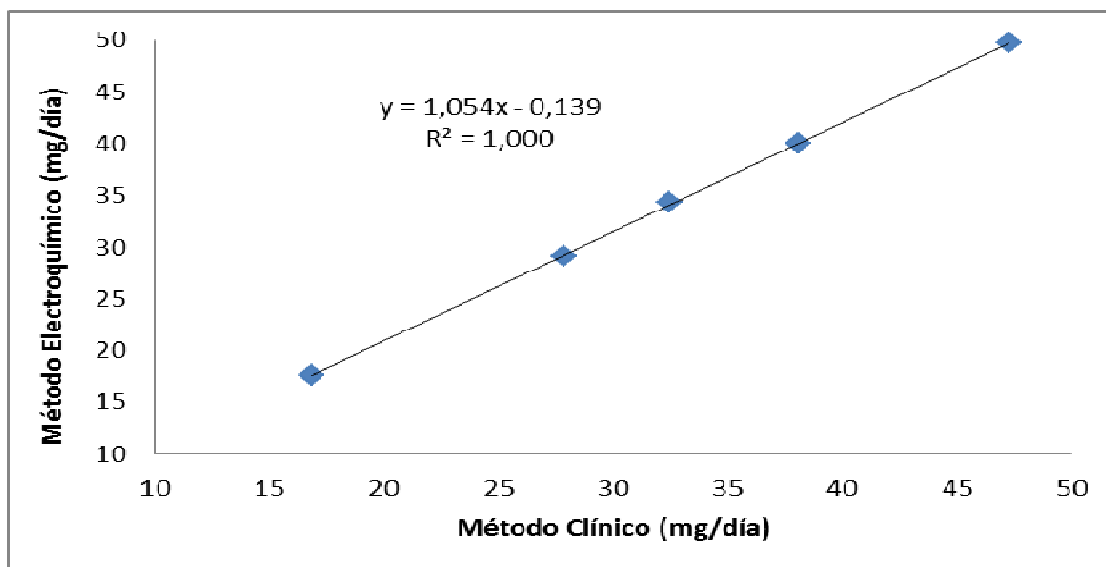


Figura 35. Comparación de resultados de la determinación de L-Trp libre en muestra de orina humana entre el método electroanalítico propuesto y un método cromatográfico validado.

Los datos obtenidos muestran que se tiene una buena correlación entre las concentraciones encontradas por los dos métodos ($R^2 > 0.995$ para ambos analitos) sin embargo una curva suave podría originar también valores de R^2 aceptables, por esta razón tiene mayor importancia además de una inspección visual de la curva, realizar un estudio estadístico con base en los límites de confianza para la pendiente y el intercepto, y si estos límites contienen a 1 y 0 se concluye que no hay diferencia significativa en los resultados encontrados por estos dos métodos, tal como sucede en esta ocasión (tabla 6).

Tabla 6. Límites de confianza para la pendiente y el intercepto en análisis de muestras reales por dos técnicas diferentes.

Parámetro estadístico	Pendiente	Intercepto
L-tirosina	1.005 ± 0.009	0.04 ± 0.11
L-triptófano	1.007 ± 0.013	0.002 ± 0.173

9. CONCLUSIONES

El fenómeno de reconocimiento molecular apoyado en polímeros conductores es un campo bastante prometedor para la industria alimenticia, farmacéutica, clínica y ambiental.

El pH de la solución de síntesis es quizás el parámetro más importante del presente estudio, ya que dependiendo de este valor se podría estar analizando una especie totalmente diferente.

El fenómeno de sobreoxidación llevado a cabo sobre el polipirrol no se da en un 100% dejando al polímero con capacidad conductora iónica y eléctrica para poder generar las señales de oxidación de los aminoácidos.

Para generar un reconocimiento molecular quirál no es necesario que el monómero presente quiralidad.

La síntesis de un bisensor es prometedora ya que se observa claramente como en un mismo electrodo se pueden generar ambas cavidades, sin embargo la presencia de los dos en el momento de la polimerización hacen que el sensor disminuya su sensibilidad.

Todos los sensores fabricados demostraron tener buenos límites de detección y cuantificación que permite su utilización en muestra con concentraciones relativamente bajas.

Se hace necesario la fabricación de otros sensores para las mismas especies con diferentes monómeros y en diferentes medios para obtener mayor información comparativa que permita dar un mayor aporte al campo de los MIPs.

La cadena lateral de los aminoácidos aquí estudiados juega un papel importante al momento de generar la cavidad quirál en el polímero.

Los análisis en muestras reales (orina humana) para la determinación de estas dos especies dejan al descubierto la verdadera posibilidad de realizar análisis clínicos con instrumentación básica sencilla.

La inclusión del polímero para la oxidación de los aminoácidos tiene un marcado efecto electrocatalítico ya que desplaza el valor del potencial de oxidación a valores más bajos y permite concluir que debe tener propiedades de conductor eléctrico para que a través de él se pueda dar el proceso de oxidación propio del aminoácido.

Este primer estudio en nuestro grupo de investigación deja las puertas abiertas a futuras investigaciones en esta área con el compromiso de aportar un poco más a la discusión mundial del reconocimiento molecular.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Guan, G.; Liu, B.; Wang, Z.; Zhang, Z. Imprinting of Molecular Recognition Sites on Nanostructures and Its Applications in Chemosensors. *Sensors* **2008**, *8*, 8291–8320.
- (2) Zhang, S.; Wright, G.; Yang, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 273–282.
- (3) Pap, T.; Horvath, V.; Horvai, G. Which molecularly imprinted polymer is better? *Anal. Chim. Acta* **2007**, *591*, 17–21.
- (4) Sharma, P. S.; Pietrzyk-le, A. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3177–3204.
- (5) Turiel, E.; Martin-esteban, A. Molecular imprinting technology in capillary electrochromatography. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 719–728.
- (6) Visnjeviski, A.; Schoma, R.; Yilmaz, E.; Bru, O. Catalysis of a Diels-Alder cycloaddition with differently fabricated molecularly imprinted polymers. *Catal. Commun.* **2005**, *6*, 601–606.
- (7) Hiratani, H.; Mizutani, Y.; Alvarez-Lorenzo, C. Controlling Drug Release from Imprinted Hydrogels by Modifying the Characteristics of the Imprinted Cavities. *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 728–733.
- (8) Turner, A.; Piletsky, S. Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 317–323.
- (9) Caro, E.; Marce, R. M.; Borull, F.; Cormack, P. a. G.; Sherrington, D. C. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 143–154.
- (10) Díaz-García, M. E.; Suárez-Rodríguez, J. L.; Badiab, R.; Al-Kindya, S. Molecularly Imprinted Polymers and Optical Sensing Applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2000**, *30*, 291–309.
- (11) Zhang, C. H. *Chinese Medical Encyclopedia*; Shanghai Science and Technology Press: Shanghai, 1987; p. 216.
- (12) Sava, A.; Barisone, I.; Di, D.; Fumagalli, G.; Sala, C. Modulation of nicotinic acetylcholine receptor turnover by tyrosine phosphorylation in rat myotubes. *Neurosci. Lett.* **2001**, *313*, 37–40.

- (13) Kumar, D.; Sharma, R. C. Advances in conductive polymers. *Eur. Polym. J.* **1998**, *34*, 1053–1060.
- (14) Zhang, C. H. *Chinese Medical Encyclopaedia*; Shanghai Science and Technology Press: Shanghai, **1987**; p. 216.
- (15) Rozlosnik, N. New directions in medical biosensors employing electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 637–645.
- (16) Inzelt, G. Preparation and characterization of polyaniline electrode modified with diamino-methylbenzoate. *Electroanal. Chem.* **1994**, *18*, 3955–3962.
- (17) Kumar, S. A.; Chen, S. Electroanalysis of NADH Using Conducting and Redox Active Polymer/Carbon Nanotubes Modified Electrodes-A Review. *Sensors* **2008**, *8*, 739–766.
- (18) Zeng, L.; Wang, H.; Bo, X.; Guo, L. Electrochemical sensor for amino acids based on gold nanoparticles/macroporous carbon composites modified glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2012**, *687*, 117–122.
- (19) Díaz-García, M. E.; Suárez-Rodríguez, J. L.; Badiab, R.; Al-Kindya, S. Molecularly imprinted Polymers and optical sensing applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2000**, *30*, 291–309.
- (20) Liang, H. J.; Ling, T. R.; Rick, J. F.; Chou, T. C. Molecularly imprinted electrochemical sensor able to enantioselectively recognize D and L-tyrosine. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *542*, 83–89.
- (21) Stefan, R.; Aboul-Enein, H. Numero 21. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1998**, *28*, 259–266.
- (22) Inzelt, G. Preparation and characterization of polyaniline electrode modified with diaminomethylbenzoate. *Electroanal. Chem.* **1994**, *18*, 3955–3962.
- (23) Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Toribio, M. L.; Diego, J. C.; Ruiz, A. Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1047*, 137–146.
- (24) Navarro-Villoslada, F.; San Vicente, B.; Moreno-bondi, C. Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers for bisphenol A. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504*, 149–162.
- (25) Rozlosnik, N. New directions in medical biosensors employing electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 637–645.

- (26) Díaz-García, M. E.; Suárez-Rodríguez, J. L.; Badiab, R.; Al-Kindya, S. Molecularly imprinted polymers and optical sensing applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2000**, *30*, 291–309.
- (27) Zhang, C. H. *Chinese medical encyclopedia*; Shangai Science and Technology Press: Shangai, **1987**; p. 216.
- (28) Ristić, L. *Sensor Technology and Devices*; Artech House Publishers, Ed.; University of Michigan: Michigan, USA, **1994**; p. 524.
- (29) Graber, N.; Lüdi, H.; Widmer, H. M. The use of chemical sensors in industry. *Sensors Actuators B Chem.* **1990**, *1*, 239–243.
- (30) Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G. S. *Biosensors: fundamentals and applications*; Oxford University Press: New York, **1987**; p. 770.
- (31) Janata, J. Centennial Retrospective on Chemical. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 150A–153A.
- (32) Thevenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Technical report Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 121–131.
- (33) Labuda, J. Principles and analytical use of electrocatalysis on chemically modified electrodes. *Chem. List.* **1992**, *86*, 167–177.
- (34) Rebouillat, S.; Lyons, E. G.; Flynn, A. Mediated electron transfer at conducting polymer ultramicroelectrodes. *Analyst* **2000**, *125*, 1611–1628.
- (35) Shirakawa, H.; Louis, E.; Macdiarmid, A.; Chiang, C.; Heeger, A. Synthesis of Electrically Conducting Organic Polymers: halogen derivatives of polyacetylene (CH)_x. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 578–580.
- (36) Yamakita, S.; Katada, N.; Niwa, M. Shape-Selective Adsorption of Substituted Benzaldehyde Isomers by a Molecular Sieving Silica Overlayer Prepared by the Chemical Vapor Deposition Method Using Organic Template on Tin Oxide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78*, 1425–1430.
- (37) Andersson, L.; Sellergren, B.; Mosbach, K. Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5211–5214.
- (38) Pichon, V.; Hauptb, K. Affinity Separations on Molecularly Imprinted Polymers with Special Emphasis on Solid-Phase Extraction. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2006**, *29*, 989–1023.

- (39) Zhang, C. *Chinese medical encyclopedia*; Shangai Science and Technology Press: Shangai, **1987**; p. 216.
- (40) Turiel, E.; Martin-esteban, A. Molecular Imprinting Technology in Capillary Electrochromatography. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 719–728.
- (41) Zeng, L.; Wang, H.; Bo, X.; Guo, L. Electrochemical Sensor for amino acids based on gold nanoparticles/macroporous carbon composites modified Glassy Carbon Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2012**, *687*, 117–122.
- (42) Avendaño, C. *Introducción a la química farmacéutica*; McGraw Hill: Madrid, **2001**; p. 1019.
- (43) Suprun, E. V.; Shumyantseva, V. V.; Archakov, A. I. Protein Electrochemistry : Application in Medicine . A Review. *Electrochim. Acta* **2014**, *In press*.
- (44) Xu, Q.; Sheng-Fu, W. Electrocatalytic Oxidation and Direct Determination of L-Tyrosine by Square Wave Voltammetry at Multi-Wall Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrodes. *Microchim. Acta* **2005**, *151*, 47–52.
- (45) Zeng, L.; Wang, H.; Bo, X.; Guo, L. Electrochemical sensor for amino acids based on gold nanoparticles macroporous carbon composites modified glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2012**, *687*, 117–122.
- (46) Liu, X.; Luo, L.; Ding, Y.; Kang, Z.; Ye, D. Bioelectrochemistry Simultaneous determination of L-cysteine and L-tyrosine using Au-nanoparticles / polyeriochrome black T film modifi ed glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry* **2012**, *86*, 38–45.
- (47) Ghoreishi, S. M.; Behpour, M.; Ghoreishi, F. S. Voltammetric determination of tryptophan in the presence of uric acid and dopamine using carbon paste electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. *Arab. J. Chem.* **2013**, *In press*.
- (48) Ba, X.; Luo, L.; Ding, Y.; Liu, X. Determination of L-tryptophan in the presence of ascorbic acid and dopamine using poly (sulfosalicylic acid) modified glassy carbon electrode. In *The 14th International Meeting on Chemical Sensors*; **2012**; pp. 843–846.
- (49) Li, J.; Kuang, D.; Feng, Y.; Zhang, F.; Xu, Z.; Liu, M.; Wang, D. Electrochemical tyrosine sensor based on a glassy carbon electrode modified with a nanohybrid made from graphene oxide and multiwalled carbon nanotubes. *Microchim. Acta* **2013**, *180*, 49–58.

- (50) Kanchana, P.; Lavanya, N.; Sekar, C. Development of amperometric L - tyrosine sensor based on Fe-doped hydroxyapatite nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *35*, 85–91.
- (51) Prasad, BB.; Srivasta, A.; Tiwari, MP. Molecularly imprinted polymer-matrix nanocomposite for enantioselective electrochemical sensing of d- and l- aspartic acid. *Mater Sic. Eng. C* **2013**, *33*, 4071-4080.
- (52) Kobayashi, T.; Yoneyama, H.; Tamura, H. Polyaniline film-coated electrodes as electrochromic display devices. *Electroanal. Chem.* **1984**, *161*, 419–423.
- (53) Zhang, C. H. *Chinese medical enciclopaedia*; Shangai Science and Technology Press: Shangai, **1987**; p. 216.
- (54) Schoma, R.; Yilmaz, E.; Visnjeviski, A. Catalysis of a Diels Alder cycloaddition with differently fabricated Molecularly imprinted Polymers. *Catal. Commun.* **2005**, *6*, 601–606.
- (55) Prasad, BB.; Tiwari, MP.; Sharma, PS. Enantioselective separation and electrochemical sensing of d- and l- triptophan at ultratrace level using molecularly imprinted micro-solid phase extraction fiber couple with complementary molecularly imprinted polymer-fiber sensor. *j. Chromatogr. C* **2011**, *879*, 364-370.
- (56) Kong, Y.; Zhao, W.; Yao, S.; Xu, J.; Wang, W.; Chen, Z. Molecularly imprinted polypyrrole prepared by electrodeposition for the selective recognition of tryptophan enantiomers. *J. Polimer Sc Apl.* **2010**, *115*, 1952-1957.
- (57) Özcan, L.; Sahin, M.; Sahin, Y. Electrochemical Preparation of a Molecularly Imprinted Polypyrrole-modified Pencil Graphite Electrode for Determination of Ascorbic Acid. *Sensors* **2008**, *8*, 5792–5805.
- (58) IDEAM, Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales.
- (59) Özcan, L.; Sahin, M.; Sahin, Y. Electrochemical-Preparation of a Molecularly imprinted polypyrrole modified-pencil graphite-electrode for determination of ascorbic-acid. *Sensors* **2008**, *8*, 5792–5805.
- (60) Kong, Y.; Zhao, W.; Yao, S.; Xu, J.; Wang, W.; Chen, Z. Molecularly imprinted polypyrrole prepared by electrodeposition for the selective recognition of tryptophan enantiomers. *J. Polimer Sc Apl.* **2010**, *115*, 1952-1957.
- (61) Sawyer, D. T.; Sobkowiak, A.; Roberts, J. L. *Electrochemistry for chemists*; 2nd ed.; John Wiley & Sons. Inc.: New York, **1995**; p. 528.

- (62) Ramanaviciene, A.; Ramanavicius, A.; Finkelsteinas, A. Basic Electrochemistry Meets Nanotechnology: Electrochemical Preparation of Artificial Receptors Based on Nanostructured Conducting Polymer, Polypyrrole. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 1212.
- (63) Guan, G.; Wang, S.; Zhou, H.; Zhang, K.; Liu, R.; Mei, Q.; Wang, S.; Zhang, Z. Molecularly imprinted polypyrrole nanonecklaces for detection of herbicide through molecular recognition-amplifying current response. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *702*, 239–246.
- (64) Özcan, L.; Sahin, M.; Sahin, Y. Electrochemical Preparation of a Molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode for determination of ascorbic acid. *Sensors* **2008**, *8*, 5792–5805.
- (65) Sawyer, D. T.; Sobkowiak, A.; Roberts, J. L. *Electrochemistry for chemists*; 2nd ed.; John Wiley & Sons. Inc.: New York, **1995**; p. 358 - 400.
- (66) Kong, Y.; Zhao, W.; Yao, S.; Xu, J.; Wang, W.; Chen, Z. Molecularly imprinted polypyrrole prepared by electrodeposition for the selective recognition of tryptophan enantiomers. *J. Polimer Sc Apl.* **2010**, *115*, 1952-1957.
- (67) Sawyer, D. T.; Sobkowiak, A.; Roberts, J. L. *Electrochemistry for chemists.*; 2nd ed.; John Wiley & Sons. Inc.: New York, **1995**; p. 528.
- (68) Özcan, L.; Sahin, M.; Sahin, Y. Electrochemical Preparation of a Molecularly-imprinted polypyrrole-modified-pencil graphite electrode for determination of ascorbic acid. *Sensors* **2008**, *8*, 5792–5805.
- (69) Imisides, M. D.; John, R.; Riley, P. J.; Wallace, G. G. The use of electropolymerization to produce new sensing surfaces: A review emphasizing electrode position of heteroaromatic compounds. *Electroanalysis* **1991**, *3*, 879–889.
- (70) Ge, H.; Qi, G.; Kang, E.-T.; Neoh, K. G. Study of overoxidized polypyrrole using X-ray photoelectron spectroscopy. *Polymer (Guildf)*. **1994**, *35*, 504–508.
- (71) Zhou, M. Electropolymerization of Pyrrole and Electrochemical Study of Polypyrrole . 2 . Influence of Acidity on the Formation of Polypyrrole and the Multipathway Mechanism. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8443–8450.
- (72) López-Palacios, J.; Muñoz, E.; Heras, A.; Cólina, A.; Ruiz, V. Study of polyaniline films degradation by thin-layer bidimensional spectroelectrochemistry. *Electrochim. Acta* **2006**, *52*, 234–239.

- (73) Suprun, E. V; Shumyantseva, V. V; Archakov, A. I. Protein Electrochemistry. Application in Medicine: A Review. *Electrochim. Acta* **2014**, *In press*.
- (74) Alizadeh, T. Application of electrochemical impedance spectroscopy and conventional rebinding experiments for the investigation of recognition characteristic of bulky and nano-sized imprinted polymers. *Mater. Chem. Phys.* **2012**, *135*, 1012–1023.
- (75) Kim, H.; Guiochon, G. Comparison of the Thermodynamic Properties of Particulate and Monolithic Columns of Molecularly Imprinted Copolymers. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 93–102.
- (76) Spurlock, L. D.; Jaramillo, A.; Praserttham, A.; Lewis, J.; Brajter-Toth, A. Selectivity and sensitivity of ultrathin purine-templated overoxidized polypyrrole film electrodes. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *336*, 37–46.
- (77) Zhang, X.; He, Y.; Ding, M. Simultaneous determination of tryptophan and kynurenine in plasma samples of children patients with Kawasaki disease by high-performance liquid chromatography with programmed wavelength ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 1678–1682.
- (78) Pi, L.; Tang, A.; Mo, X.; Luo, X.; Ao, X. More rapid and sensitive method for simultaneous determination of tryptophan and kynurenic acid by HPLC. *Clin. Biochem.* **2009**, *42*, 420–425.
- (79) Zhen, Q.; Xu, B.; Ma, L.; Tian, G.; Tang, X.; Ding, M. Simultaneous determination of tryptophan, kynurenine and 5-hydroxytryptamine by HPLC: Application in uremic patients undergoing hemodialysis. *Clin. Biochem.* **2011**, *44*, 226–230.
- (80) Huang, K.; Xu, C.; Xie, W.; Wang, W. Electrochemical behavior and voltammetric determination of tryptophan based on 4-aminobenzoic acid polymer film modified glassy carbon electrode. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2009**, *74*, 167–171.
- (81) Raoof, J.; Ojani, R.; Baghayeri, M. Chemical Simultaneous electrochemical determination of glutathione and tryptophan on a nano-TiO₂/ferrocene carboxylic acid modified carbon paste electrode. *Sensors Actuators B* **2009**, *143*, 261–269.
- (82) Goyal, R. N.; Bishnoi, S.; Chasta, H.; Aziz, A.; Oyama, M. Effect of surface modification of indium tin oxide by nanoparticles on the electrochemical determination of tryptophan. *Talanta* **2011**, *85*, 2626–2631.

- (83) Guo, Y.; Guo, S.; Fang, Y.; Dong, S. Gold nanoparticle / carbon nanotube hybrids as an enhanced material for sensitive amperometric determination of tryptophan. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 3927–3931.
- (84) Guo, C.; Zheng, Z.; Xiu, W. Electrochemical behavior of tryptophan and its derivatives at a glassy carbon electrode modified with hemin. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *452*, 245–254.
- (85) Özcan, A.; Yücel, S. A novel approach for the selective determination of tryptophan in blood serum in the presence of tyrosine based on the electrochemical reduction of oxidation product of tryptophan formed in situ on graphite electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 26–31.
- (86) Fan, Y.; Liu, J. H.; Lu, H. T.; Zhang, Q. Electrochemistry and voltammetric determination of L-tryptophan and L-tyrosine using a glassy carbon electrode modified with a Nafion/TiO₂-graphene composite film. *Microchim. Acta* **2011**, *173*, 241–247.
- (87) Letellier, S.; Garnier, J. P.; Spy, J.; Bousquet, B. Determination of the L-DOPA/L-tyrosine ratio in human plasma by high-performance liquid chromatography Usefulness as a marker in metastatic malignant melanoma. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1997**, *696*, 9–17.
- (88) Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Toribio, M. L.; Diego, J. C.; Ruiz, A. Rapid and sensitive-method for determining free-amino acids in honey by gas-chromatography with flame- ionization or mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1047*, 137–146.
- (89) Huang, K. J.; Luo, D. F.; Xie, W. Z.; Yu, Y. S. Sensitive voltammetric determination of tyrosine using multi-walled carbon nanotubes/4-aminobenzenesulfonic acid film-coated glassy carbon electrode. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, *61*, 176–181.
- (90) Xu, J.; Wang, Y.; Xian, Y.; Jin, L.; Tanaka, K. Preparation of multiwall carbon nanotubes film modified electrode and its application to simultaneous determination of oxidizable amino acids in ion chromatography. *Talanta* **2003**, *60*, 1123–1130.
- (91) Chen, Z.; Okamura, K.; Hanaki, M.; Nagaoka, T. Selective determination of tryptophan by using a carbon paste electrode modified with an overoxidized polypyrrole film. *Anal. Sci.* **2002**, *18*, 417–421.
- (92) Jin, G. P.; Lin, X. Q. The electrochemical behavior and amperometric determination of tyrosine and tryptophan at a glassy carbon electrode modified with butyrylcholine. *Electrochem. commun.* **2004**, *6*, 454–460.

- (93) Huang, K.; Niu, D.; Liu, X.; Wu, Z.; Fan, Y.; Chang, Y.; Wu, Y. Direct electrochemistry of catalase at amine-functionalized graphene / gold nanoparticles composite film for hydrogen peroxide sensor. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 2947–2953.
- (94) Zhao, G.; Qi, Y.; Tian, Y. Simultaneous and direct determination of tryptophan and tyrosine at boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 830–834.
- (95) Babaei, A.; Mirzakhani, S.; Khalilzadeh, B. A sensitive simultaneous determination of epinephrine and tyrosine using an iron(III) doped zeolite-modified carbon paste electrode. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1862–1869.
- (96) Prasad, B. B.; Madhuri, R.; Tiwari, M. P.; Sharma, P. S. Enantioselective recognition of d- and l-tryptophan by imprinted polymer-carbon composite fiber sensor. *Talanta* **2010**, *81*, 187–196.
- (97) Liu, L.; Zhao, F.; Xiao, F.; Zeng, B. Improved voltammetric response of L-tyrosine on multiwalled carbon nanotubes-ionic liquid composite coated glassy electrodes in the presence of cupric ion. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 2148–2152.
- (98) Saumya, V.; Prathish, K. P.; Rao, T. P. In situ copper oxide modified molecularly imprinted polypyrrole film based voltammetric sensor for selective recognition of tyrosine. *Talanta* **2011**, *85*, 1056–1062.
- (99) Ge, H.; Qi, G.; Kang, E.-T.; Neoh, K. G. Study of overoxidized polypyrrole using X-ray photoelectron spectroscopy. *Polymer (Guildf)*. **1994**, *35*, 504–508.