



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Nanotubos de carbono modificados con polímeros
conductores para la detección de serotonina**

**Nanotubos de carbono modificados con polímeros
conductores para a detección de serotonina**

**Conductive polymer-modified carbon nanotubes for
serotonin detection**

Virginia Cendán Castillo

Curso: 2021 - 2022.

Convocatoria: Xullo

Director 1: Alejandro Criado Fernández
Director 2: Jaime Rodríguez González

Agradecimientos

A Jaime, por hacer posible la realización de este proyecto. A Álex, por guiarme en la elaboración de este trabajo, con dedicación plena y mucha paciencia. A Suso, por estar dispuesto a ayudar, siempre con optimismo. A Adrián, María y Sandra, por su apoyo y por alegrarnos los días de laboratorio, pero sobre todo por ayudarme tanto dentro como fuera del mundo de la química.

A mis amigos, por el cariño y paciencia durante mi paso por la universidad. Especialmente a mis amigos de la carrera, por todas las dificultades superadas con las que hemos ido creciendo juntos y, en definitiva, por haberos convertido en familia.

Y, por último, a mi familia, por su apoyo incondicional y por confiar siempre en mí.

Resumen

La serotonina es un neurotransmisor involucrado en una gran variedad de procesos biológicos como la regulación de la temperatura, los ciclos del sueño o la agregación plaquetaria. El aspecto más relevante desde el punto de vista clínico es el rol de este neurotransmisor en trastornos psicológicos en humanos. Actualmente, se cree que la depresión, los trastornos alimentarios y la ansiedad entre otros están asociados a una menor disponibilidad de serotonina en el cerebro. En cambio, una elevada concentración de este neurotransmisor causa el denominado síndrome de la serotonina, que puede llegar a ser mortal.

Por lo tanto, es vital desarrollar tecnologías sensibles, simples, selectivas y estables para detectar serotonina en fluidos biológicos y de esta forma aumentar la productividad de un tratamiento para las enfermedades mencionadas.

El desarrollo de biosensores para la detección de moléculas pequeñas ha recibido una atención notable en los últimos años. En particular, el uso de materiales bidimensionales como componente en este tipo de dispositivos ha permitido realizar detecciones altamente sensibles debido a sus extraordinarias propiedades. Entre estos materiales se encuentran derivados de grafeno o distintos materiales poliméricos, como por ejemplo los polímeros de impresión molecular.

En este proyecto se estudiará la combinación de distintos materiales bidimensionales basados en nanotubos de carbono y polipirrol como futuros componentes de biosensores para el reconocimiento selectivo del neurotransmisor serotonina en medios biológicos.

Palabras clave: Nanotubos de carbono, Sensor, Polímero conductor, Neurotransmisor, Polímero de impresión molecular.

Resumo

A serotonina é un neurotransmisor involucrado nunha gran variedade de procesos biolóxicos como a regulación da temperatura, os ciclos do soño ou a agregación plaquetaria. O aspecto máis relevante desde o punto de vista clínico é o rol deste neurotransmisor en trastornos psicolóxicos en humanos. Actualmente, crese que a depresión, os trastornos alimentarios e a ansiedade entre outros están asociados a unha menor dispoñibilidade de serotonina no cerebro. En cambio, unha elevada concentración deste neurotransmisor causa a denominada síndrome da serotonina, que pode chegar a ser mortal.

Por tanto, é vital desenvolver tecnoloxías sensibles, simples, selectivas e estables para detectar serotonina en fluídos biolóxicos e desta forma aumentar a produtividade dun tratamento para as enfermidades mencionadas.

O desenvolvemento de biosensores para a detección de moléculas pequenas recibiu unha atención notable nos últimos anos. En particular, o uso de materiais bidimensionais como compoñente neste tipo de dispositivos permitiu realizar deteccións altamente sensibles debido ás súas extraordinarias propiedades. Entre estes materiais atópanse derivados de grafeno ou distintos materiais poliméricos, por exemplo os polímeros de impresión molecular.

Neste proxecto estudarase a combinación de distintos materiais bidimensionais baseados en nanotubos de carbono e polipirrol como futuros compoñentes de biosensores para o recoñecemento selectivo do neurotransmisor serotonina en medios biolóxicos.

Palabras chave: Nanotubos de carbono, Sensor, Polímero conductor, Neurotransmisor, Polímero de impresión molecular.

Abstract

Serotonin is a neurotransmitter involved in a wide variety of biological processes such as temperature regulation, sleep cycles or platelet aggregation. The most clinically relevant aspect is the role of this neurotransmitter in psychological disorders in humans. Depression, eating disorders and anxiety, among others, are currently thought to be associated with reduced serotonin availability in the brain. In contrast, a high concentration of this neurotransmitter causes the so-called serotonin syndrome, which can be life-threatening.

It is therefore vital to develop sensitive, simple, selective and stable technologies to detect serotonin in biological fluids and thus increase the productivity of a treatment for the aforementioned diseases.

The development of biosensors for the detection of small molecules has received considerable attention in recent years. In particular, the use of two-dimensional materials as a component in such devices has enabled highly sensitive detections due to their extraordinary properties. These materials include graphene derivatives or different polymeric materials, such as molecular imprinted polymers.

This project will study the combination of different two-dimensional materials based on carbon nanotubes and polypyrrole as future components of biosensors for the selective recognition of the neurotransmitter serotonin in biological media.

Keywords: Carbon nanotubes, Sensor, Conductive polymer, Neurotransmitter, Molecularly imprinted polymer.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Neurotransmisores (Serotonina).....	1
1.2. Nanotubos de carbono	2
1.3. Polímeros conductores	4
1.4. Sensores químicos	5
1.4.1. Sensores basados en materiales basados en carbono.....	8
2. Objetivos.....	11
3. Discusión de resultados.....	12
3.1. Preparación del electrodo.....	13
3.1.1. Polimerización química.....	14
3.1.2. Polimerización electroquímica	25
3.2. Detección del neurotransmisor	31
4. Experimental.....	37
4.1. Reactivos.....	37
4.2. Instrumental.....	37
4.3. Cronograma.....	38
4.4. Procedimiento general para la modificación de nanotubos de carbono de pared múltiple con polipirrol mediante polimerización química en disolución. ³⁵	39
4.5. Modificación de los nanotubos de pared múltiple con polipirrol a través de polimerización química intramolecular con serotonina (MQ4) en disolución. ³⁹	39
4.6. Procedimiento general para la polimerización electroquímica de pirrol.....	40
4.7. Detección electroquímica de serotonina	41

5. Conclusiones	42
5. Conclusións	43
5. Conclusions	44
6. Bibliografía.....	45
7. Anexos	50
7.1. Anexo I: Estudio de la estabilidad de la DA en el medio de reacción	50
7.1.1. Espectrometría UV-Vis	50
7.1.2. HPLC.....	50
7.1.3. Espectrometría de masas por electrospray.....	52

1. Introducción

1.1. Neurotransmisores (Serotonina)

Los neurotransmisores son biomoléculas que transmiten información en forma de señales desde una neurona a otra neurona, célula muscular o glándula del organismo a través de la sinapsis que las separa.

Nuestro sistema nervioso es el encargado de procesar todo tipo de procesos mentales, desde la planificación de estrategias hasta la realización de movimientos involuntarios o la gestión emocional pasando por el uso del lenguaje.¹ Para realizar todas estas tareas, es esencial la coordinación de las neuronas y su adaptación a situaciones muy diversas. Así, la existencia de una gran variedad de neurotransmisores diferentes permite la adaptación del sistema nervioso a un entorno cambiante. Entre los neurotransmisores más importantes se encuentran los indicados en la Figura 1.

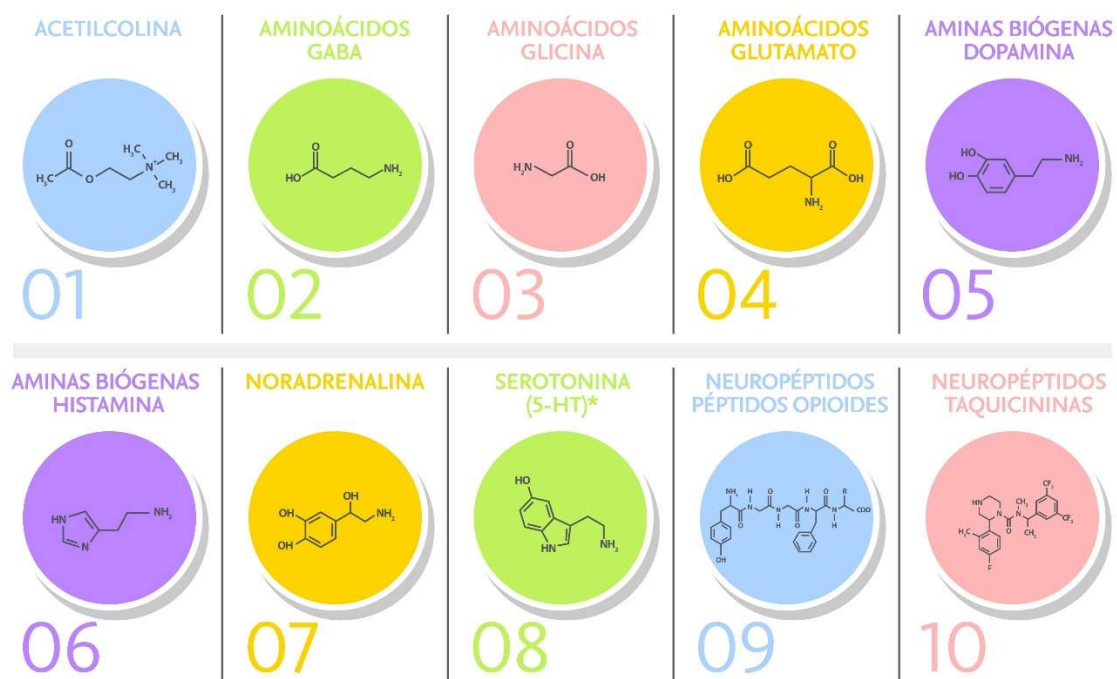


Figura 1. Estructura de diez de los neurotransmisores fundamentales presentes en el cuerpo humano.¹

Dentro de esta variedad de biomoléculas se encuentra la serotonina (SE), también conocida como 5-hidroxitriptamina.² Este neurotransmisor es una monoamina biogénica, similar a la epinefrina, norepinefrina, dopamina (DA) y a la histamina.

Este neurotransmisor se encuentra mayoritariamente en el tracto gastrointestinal, las plaquetas sanguíneas y el SNC humano.³ Entre el 90 y el 95% del total de la SE corporal del ser humano se localiza en el interior de las células enterocromafines, células encargadas de la síntesis de la SE y de su almacenamiento.

La SE está involucrada en una gran variedad de procesos biológicos.²⁻⁴ Entre ellos se encuentran la regulación de la temperatura, el apetito, los ciclos del sueño, la emesis y el comportamiento sexual, así como la regulación de otras respuestas emocionales. También participa en la nocicepción y el tono motor, además de mediar en la motilidad gastrointestinal, el tono vascular periférico y cerebral y la agregación plaquetaria. Además, este neurotransmisor es un precursor de la hormona melatonina, responsable de la regulación del ritmo circadiano y el equilibrio energético, entre otras funciones.

El aspecto más relevante desde el punto de vista clínico es el rol de este neurotransmisor en trastornos psicológicos en humanos.² Las aminas biógenas han sido fruto de diversas teorías acerca de su papel en la fisiopatología de los trastornos psicológicos. Actualmente, se cree que la depresión, la manía, la agresividad, los trastornos alimentarios y la ansiedad están asociados a una menor disponibilidad de SE en el cerebro. En cambio, una elevada concentración de este neurotransmisor causa el denominado síndrome de la SE, que puede llegar a ser mortal.

Los estudios destinados a la determinación de esta biomolécula para el mejor conocimiento de las patologías que genera requieren métodos analíticos fiables, rápidos y rentables para cuantificar de forma precisa y selectiva la SE en muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo, cerebro u otros tejidos. Este conocimiento es fundamental para avanzar en los tratamientos preventivos de las enfermedades neurodegenerativas, así como en la comprensión fundamental del funcionamiento del cerebro y del cuerpo humano en general.^{3,5,6}

1.2. Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*, CNTs) son alótropos de carbono descubiertos por S. Iijima en 1991.⁷ Conceptualmente, están constituidos por láminas de grafeno, es decir, monocapas de átomos de carbono enlazados mediante hibridación sp^2 estrechamente empaquetados en una red hexagonal bidimensional, formando tubos nanométricos.⁸

Estas láminas de grafeno pueden ser consideradas el elemento básico para la construcción de los materiales gráficos de todas las demás dimensionalidades (Figura 2).⁸ Si una lámina de grafeno se envuelve en 0 dimensiones, da lugar al fullereno, si se enrolla en 1 dimensión, genera un CNT y si se apilan varias láminas se obtiene el grafito.

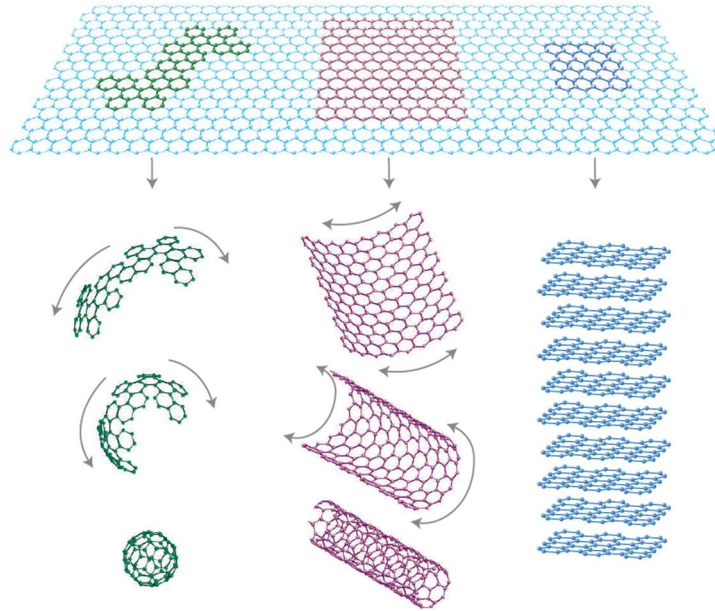


Figura 2. Esquema de la formación de estructuras alotrópicas del carbono a partir del grafeno.⁸

Los CNTs son tubos cilíndricos huecos que pueden estar formados por una capa de átomos de carbono, los denominados monocapa (*single-walled carbon nanotubes*, SWCNTs), o por varias, de pared múltiple (*multi-walled carbon nanotubes*, MWCNTs).

Los SWCNTs se caracterizan por presentar miles de nanómetros de longitud, así como aproximadamente un nanómetro de diámetro. Por otro lado, los MWCNTs pueden estar constituidos por cilindros concéntricos de distintos tamaños, o por una única lámina de grafeno enrollada sobre sí misma en múltiples ocasiones.

Las propiedades electrónicas de los CNTs dependen de su estructura. Los MWCNTs son conductores metálicos mientras que los SWCNTs pueden ser semiconductores o conductores metálicos, en función de la dirección en la que se envuelve el grafeno al formar el cilindro. Dependiendo de esta dirección, los SWCNTs formados pueden ser *armchair*, *zig-zag* o *quirales* (Figura 3).

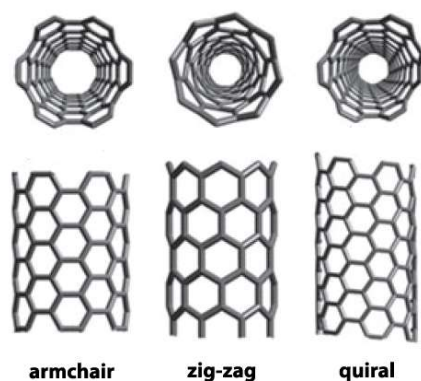


Figura 3. Representación de la estructura de los distintos tipos de SWCNTs.⁹

Los SWCNTs *armchair* presentan un comportamiento metálico, mientras que los *quirales* y *zig-zag* pueden ser semiconductores o presentar conductividad metálica.⁹

Los CNTs se utilizan en un amplio espectro de aplicaciones debido a sus excepcionales propiedades tanto físicas como químicas.¹⁰ Entre ellas se pueden nombrar la relación superficie/volumen extremadamente grande, su pequeño diámetro (de aproximadamente 1 nm en el caso de los SWCNTs y de entre 20 y 80 nm en los MWCNTs) con estructura hueca, unas propiedades ópticas y eléctricas extraordinarias y una resistencia muy elevada a la tracción. Por ello, su uso se extiende desde campos relacionados con la energía renovable o la electrónica hasta el sector biomédico y la administración de medicamentos.

Concretamente, en el campo de la nanomedicina y la nanobiotecnología, los CNTs han creado un puente entre las ciencias físicas y biológicas para el desarrollo de herramientas innovadoras con potencial en el sector sanitario. En gran parte esta versatilidad es debida a la facilidad de funcionalización química de la superficie de estos nanomateriales.¹⁰⁻¹²

1.3. Polímeros conductores

Un polímero es una macromolécula formada a partir de la unión mediante enlaces covalentes de uno o más monómeros, que constituyen su unidad básica. Dentro de este tipo de compuestos, se encuentran los polímeros conductores. Éstas son macromoléculas que cuentan con un sistema conjugado de enlaces π que permite la deslocalización de electrones a través de ellas, posibilitando la conducción de la electricidad. Actualmente, se conoce un gran número de monómeros diferentes que forman polímeros conductores, como por ejemplo el tiofeno, la anilina o el pirrol.

Los materiales poliméricos conductores están dotados de cualidades físicas y químicas con un gran potencial para la producción de dispositivos ligeros, flexibles y rentables a gran escala.^{13,14} Esto conlleva que estén presentes en campos muy diversos de la investigación, como la energía solar, las pilas de combustible o el suministro de fármacos ya que presentan características adecuadas para su aplicación en electrocatálisis o en el funcionamiento de distintos dispositivos electrónicos derivadas de su sistema de electrones conjugados.¹⁵

Su uso en el ámbito sanitario está en auge. De esta forma, se encuentran presentes en la investigación sobre la ingeniería de tejidos, la reparación de huesos, los biosensores o la administración de fármacos.¹⁶ Esto es debido a que los polímeros conductores combinan las ventajas de los polímeros convencionales (proceso de fabricación sencillo, bajo coste y amplia selección de estructuras moleculares) con unas propiedades eléctricas y ópticas similares a las de los metales y semiconductores inorgánicos. Además, la fácil modificación de su superficie, la biocompatibilidad y sus extensas áreas superficiales los convierte en materiales muy versátiles para su aplicación en medicina.^{14,17}

Dentro de la gran variedad de polímeros electroactivos, el polipirrol (*polypyrrole*, PPy) ha adquirido una gran importancia debido a su biocompatibilidad, su fácil y eficaz electrosíntesis a partir de soluciones acuosas, su estabilidad y su elevada conductividad eléctrica.^{17,18}

Un ejemplo actual de la utilidad de este polímero es el desarrollo de un sensor piezorresistivo de alta sensibilidad a partir de un aerogel de nanofibras reticuladas de polipirrol ultraligero.¹⁹ La flexibilidad de este sensor le otorga un gran potencial de aplicación en la monitorización del movimiento y la salud humana, entre otros campos.

No obstante, este polímero no está dotado de grupos funcionales que permitan su modificación posterior para una mejora de su rendimiento en aplicaciones biomédicas.¹⁷ Para dicha derivatización del polímero existen dos estrategias principales que se basan en la modificación de la estructura del monómero o la utilización de copolímeros.

1.4. Sensores químicos

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), un sensor químico es “un dispositivo que transforma la información química, desde la concentración de un componente específico de la muestra hasta el análisis de

la composición total, en una señal analíticamente útil. La información química, mencionada anteriormente, puede proceder de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado".²⁰

Los sensores químicos constan de dos elementos principales: el elemento de reconocimiento químico denominado receptor y un transductor físico-químico (Figura 4).²¹ El receptor transforma el evento de unión de la diana en una forma de energía que será medida por el transductor. En el caso de este tipo de sensores, el evento de unión implica especies químicas y la generación de una señal debida a un cambio en un parámetro físico-químico (ruptura o formación de un enlace, modificación del índice de refracción o intercambio de electrones, por ejemplo). A continuación, el transductor transforma la información química otorgada por el receptor en una señal analítica útil. Este proceso de transducción puede basarse en varios fenómenos físicos, como cambios térmicos u ópticos, en reacciones electroquímicas o en variaciones de masa.

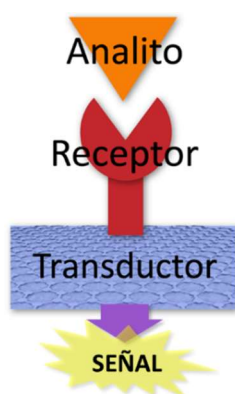


Figura 4. Esquema de los componentes de un sensor químico.

Los sensores se han utilizado en gran medida en campos como medicina, medioambiente, seguridad alimentaria y seguridad ambiental, entre otros.^{21,22} Su funcionamiento sencillo, respuesta rápida, alta sensibilidad y especificidad, así como su portabilidad, rendimiento de detección excepcional y análisis en tiempo real hacen que estos dispositivos sean esenciales en gran cantidad de ámbitos científicos y en la sociedad.²² Por ello, el estudio para mejorar sus cualidades se convierte en un aspecto de gran interés. Concretamente, el diseño del receptor es crucial para el desarrollo del sensor, debido a la necesidad de detectar el objetivo deseado con una selectividad y sensibilidad determinadas.²¹ En los últimos años, el empleo de nuevos materiales, como polímeros conductores o nanomateriales basados en carbono, ha permitido obtener resultados de vanguardia que allanan el camino hacia la nueva generación de sensores químicos.

En lo que respecta a la detección de SE, el cual es el tema central de este trabajo, habitualmente se emplea microdiálisis acoplada a cromatografía líquida de alto rendimiento o espectrometría de masas.²³ No obstante, la resolución espaciotemporal para revelar la dinámica en circuitos neuronales complejos es insuficiente. Como alternativa, se desarrollaron métodos de detección electroquímica dotados con una resolución temporal necesaria como para medir la dinámica rápida de los neurotransmisores.

Hoy en día está generándose un enfoque neurocientífico que intenta aprender sobre las redes neuronales *in vitro*. Para ello, se utilizan redes neuronales de cultivo bien definidas para investigar los circuitos neuronales básicos con la esperanza de obtener información sobre el procesamiento, el almacenamiento y la neurocomputación en el cerebro. En este ámbito se han desarrollado distintas técnicas, como es el caso de las nanopipetas de cuarzo con poros de 10 nm funcionalizadas con aptámeros, desarrolladas por Nakatsuka N. *et al.*²³ Estos sensores (Figura 5) reconocen reversiblemente la SE con alta especificidad y selectividad debido a sus nanoporos de estado sólido, que presentan la capacidad de ajustar su tamaño de apertura hasta unos pocos nanómetros. Además, presentan gran facilidad de fabricación y modificación de la superficie, así como de acoplamiento a las metodologías de sonda de barrido para interactuar con los sistemas biológicos. Estas características los sitúan como candidatos prometedores para la detección de moléculas de pequeño tamaño.

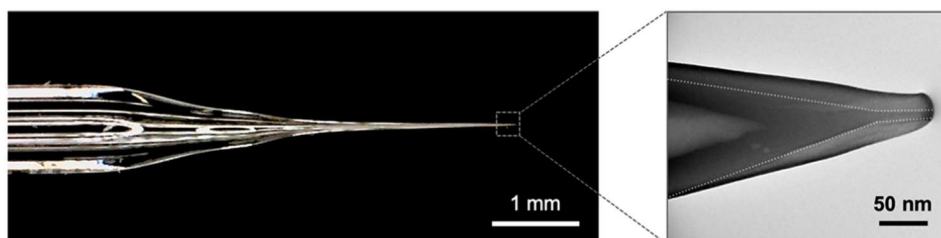


Figura 5. Imagen de microscopio óptico de una nanopipeta (izquierda) con una imagen ampliada de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (derecha) que demuestra la apertura aproximada del poro de unos 10 nm. La línea de puntos se ha trazado para facilitar la visualización de la pared interior en la punta de la nanopipeta.²³

No obstante, la comprensión de la función cerebral y de los trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos requiere también de tecnologías avanzadas para realizar mediciones acerca de las escalas espaciales y la dinámica temporal de la neurotransmisión química.⁶ En este campo, las sondas de registro neuronal implantables han surgido para la monitorización de la actividad cerebral. Un ejemplo de estas tecnologías son las neurosondas implantables con aptámeros y transistores de efecto campo desarrollados

por Nakatsuka N. *et al.* que permiten la monitorización de neurotransmisores para su estudio *in vivo*.

1.4.1. Sensores basados en materiales basados en carbono

Con el objetivo de mejorar la aplicabilidad y características de los sensores químicos, se han realizado numerosos estudios con materiales diversos como nanopartículas de oro y de plata, grafeno o nanofibras de carbono.^{24,25} Entre ellos, se ha descubierto que los CNTs presentan excelentes propiedades mecánicas, estabilidad química y propiedades eléctricas adecuadas para la fabricación de bio-ensamblajes supramoleculares y nanobiosensores. En particular, la introducción de CNTs para modificar la superficie de los electrodos demuestra una notable conductividad eléctrica, resistencia a la corrosión, estabilidad química y alta biocompatibilidad.

Entre otros, Wu B. *et al.* desarrollaron un sensor electroquímico sensible que utiliza nanopartículas de oro enlazadas covalentemente con MWCNTs, para mejorar la detección de SE.²⁶ También cabe destacar el descubrimiento de sensores de ácido desoxirribonucleico (ADN) en conjunto con SWCNT para SE con alta respuesta de fluorescencia en el infrarrojo cercano mediante aprendizaje automático.²⁷ Este enfoque permite identificar rápidamente las secuencias de ADN para un determinado analito de forma que acelera significativamente el desarrollo de tecnologías como es el caso de los biosensores.

Por otro lado, el uso de polímeros conductores es de especial interés dadas sus propiedades eléctricas y ópticas nombradas anteriormente.^{24,25} Estos son capaces de generar una respuesta sensible y rápida a analitos específicos debido a que su nivel de oxidación se ve afectado fácilmente por mecanismos tanto químicos como electroquímicos. Además, permiten la relación cuantitativa de esta respuesta con la concentración de los analitos, así como la impresión molecular.

En este campo, se introdujo el electrodo de grafito modificado con un derivado de PPy para la determinación de SE en muestras biológicas mediante voltamperometría que permitió su detección con una elevada sensibilidad (presenta un límite de detección de 0,0025 μM).²⁸ La selectividad del método es elevada ya que no se observó ningún cambio sustancial en la respuesta voltamperométrica de 1,0 μM SE en presencia de ácido ártico (1000 μM), ácido cítrico (1000 μM), cloruro de sodio (2000 μM), cloruro de potasio (2000 μM), glucosa (2000 μM) y urea (2000 μM). Se comprobó la selectividad

con estos compuestos ya que son comunes en las muestras de suero sanguíneo y de orina.

En particular, los sensores basados en polímeros de impresión molecular (*molecularly imprinted polymers*, MIPs) han creado un horizonte fascinante para las técnicas de modificación de la superficie.²² El método de impresión molecular se basa en una polimerización de un monómero funcional y reticulante alrededor de una molécula plantilla de forma que se obtienen los denominados polímeros de impresión molecular. Como se esquematiza en la Figura 6, inicialmente la molécula plantilla **1** y el monómero funcional forman el precomplejo **2**. Posteriormente, tiene lugar la polimerización alrededor del precomplejo **3**. Finalmente, al retirar la molécula plantilla **4**, permanecen las cavidades tridimensionales **5** que permiten el reconocimiento específico de esta molécula en posteriores ocasiones.

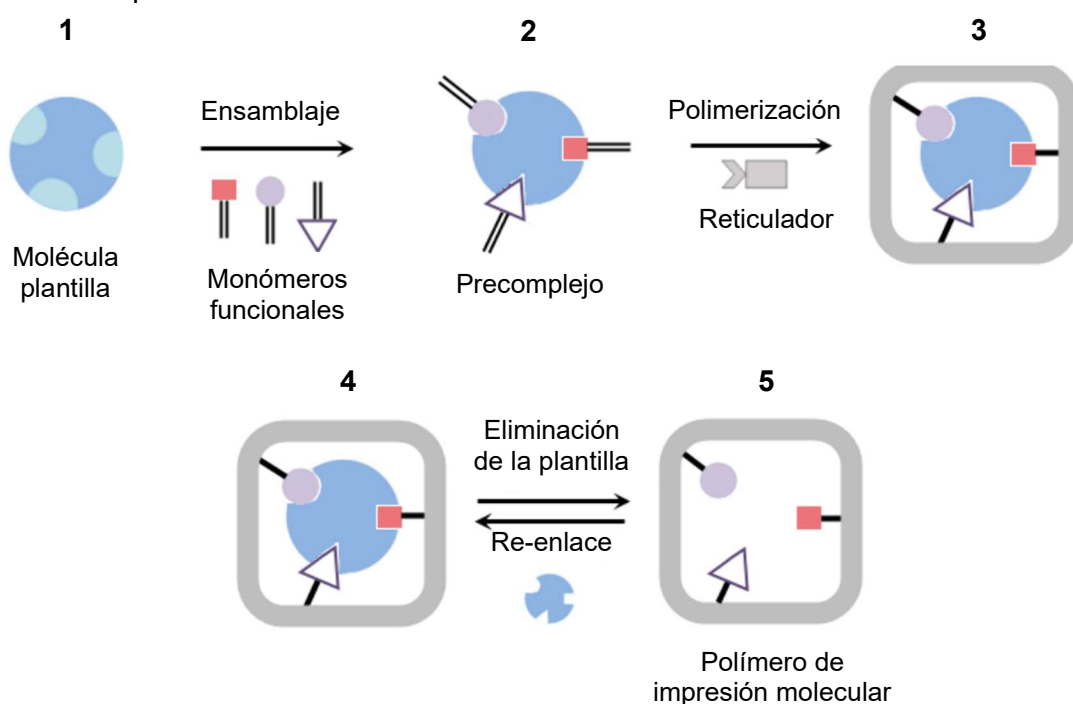


Figura 6. Esquema del principio de la preparación de polímeros de impresión molecular.²²

El principal reto en el análisis médico es el diagnóstico temprano de ciertas enfermedades que depende en muchas ocasiones de la determinación temprana de una biomolécula determinada que se encuentra en concentraciones bastante bajas en una matriz compleja. La detección basada en los MIPs es, por tanto, un método potencialmente válido debido a su especificidad, selectividad, estabilidad física y química, rentabilidad, facilidad de preparación y aplicabilidad para diversas biomoléculas. Los estudios realizados hasta el momento con esta técnica determinan que estos sensores son capaces de proporcionar un bajo límite de valores de

detección.^{22,29,30} Un ejemplo representativo es un transductor basado en un MIP sobre puntos cuánticos de grafeno y nanoplacas de nitruro de boro hexagonal para la detección de SE.³¹ El sensor electroquímico desarrollado dio lugar a una gran selectividad y con límites de detección de $2,0 \cdot 10^{-13}$ M. Además, la presencia de la matriz en las muestras de orina estudiadas no afecta al análisis selectivo de este neurotransmisor.

2. Objetivos

Continuando con la línea de investigación del grupo NanoSelf del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas de la UDC (CICA-UDC), este trabajo se centra en la preparación de electrodos basados en CNTs modificados con el polímero conductor PPy para la detección electroquímica de SE. Concretamente, los objetivos específicos de este Trabajo de Fin de Grado son los siguientes:

1. Estudio de la modificación de CNTs con PPy a través de dos metodologías de polimerización, química y electroquímica.
2. Estudio de la polimerización con impresión molecular en los sistemas optimizados.
3. Detección electroquímica de la SE, empleando los CNTs modificados con el polímero conductor.

3. Discusión de resultados

Se ha planteado como objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado la modificación de electrodos serigrafados mediante la combinación de nanomateriales de carbono y polímeros conductores para la detección electroquímica de SE. Inicialmente, se estudió la modificación química de CNTs con PPy mediante procesos químicos y electroquímicos. A continuación, se procedió a la detección de SE mediante electrodos modificados con CNTs/PPy. Por último, se abordó la utilización de impresión molecular de SE con los CNTs modificados con PPy, con el objetivo de aumentar un rendimiento en la detección de dicho neurotransmisor (Figura 7).

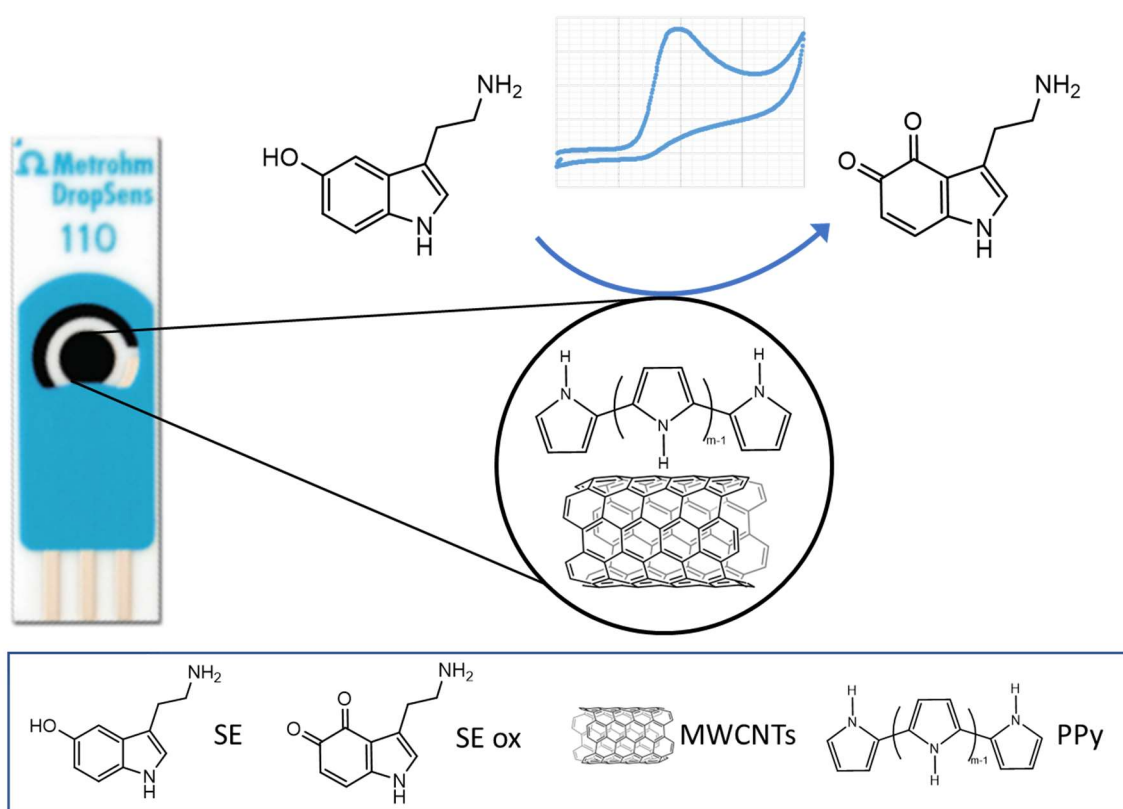


Figura 7. Esquema del proyecto.

Los electrodos metálicos (Au, Pt, etc.) y el electrodo de carbono vítreo (GCE) eran los más utilizados antes de la aparición de los nanomateriales y materiales poliméricos. Algunas desventajas de estos electrodos son su escasa sensibilidad y estabilidad, su baja reproducibilidad y sus grandes tiempos de respuesta. La combinación de los electrodos típicos con los CNTs puede mejorar estas desventajas debido a sus óptimas propiedades como electrodos.³² Por ejemplo, los CNTs han demostrado excelentes propiedades electrocatalíticas hacia especies electroactivas como los compuestos fenólicos, el triptófano, el peróxido de hidrógeno, la dopamina, el ácido ascórbico y el

ácido úrico, entre otros. Además, la funcionalización de los CNTs permite introducir nuevas propiedades deseadas, como la solubilidad o la biocompatibilidad,³³ mientras se mantiene un buen comportamiento electroquímico.³⁴ En particular, la combinación de la capacidad de los CNTs para comportarse como electrodos junto con su capacidad para ser funcionalizados, ha ampliado su uso en biosensores electroquímicos.

Concretamente, en este proyecto se introdujo el uso de MWCNTs teniendo en cuenta sus numerosas propiedades, como son su alta estabilidad, baja resistividad y alta relación superficie-volumen.³⁵ Entre sus propiedades más destacadas para el desarrollo de biosensores químicos ultrasensibles, selectivos y robustos, se encuentra la habilidad de transferir electrones a un ritmo rápido en la interfaz que le permite actuar como electrocatalizador.^{10,11,36} La electrocatálisis de este material depende en gran medida de los defectos en su estructura.¹⁰ Estos defectos pueden provocar una dispersión de la corriente que aumenta la velocidad de transferencia de electrones del CNT.

Además, los MWCNTs al estar formados por tubos concéntricos, permiten modificar químicamente la pared exterior, mientras que los tubos interiores permanecen intactos y, en consecuencia, conservan la conductividad.³⁷

Respecto al polímero conductor, se utilizó PPy, debido a su elevada conductividad y flexibilidad. Además, son fáciles de fabricar, siendo compatibles con técnicas de impresión, lo que facilita su producción a gran escala. Asimismo, la presencia del grupo amino en el anillo pirrólico puede contribuir a la mejora de la detección del neurotransmisor mediante enlaces específicos con la molécula objetivo.^{30,35}

Finalmente, se realizan también pruebas aplicando la técnica de impresión molecular, como un sistema de diseño y construcción de materiales con sitios receptores específicos para una alta atracción de la molécula objetivo. Los MIP presentan una estabilidad térmica, robustez física, bajo coste y facilidad de preparación que los sitúan como un método adecuado para el reconocimiento de biomoléculas.³⁵

3.1. Preparación del electrodo

Con el objetivo final de detectar el neurotransmisor SE con la mayor sensibilidad posible, se realizó la modificación de un electrodo serigrafiado de la compañía DROPSSENS con MWCNTs modificado con PPy (CNT/PPy). Previamente, dicha modificación se estudió mediante dos métodos de polimerización, la polimerización química en disolución y la electropolimerización sobre el electrodo de MWCNTs.

3.1.1. Polimerización química

Inicialmente, se procedió a la polimerización química del Py, estudiando distintas condiciones de reacción.

La reacción de polimerización del Py sobre los MWCNTs (Figura 8) tiene lugar mediante la oxidación del monómero.

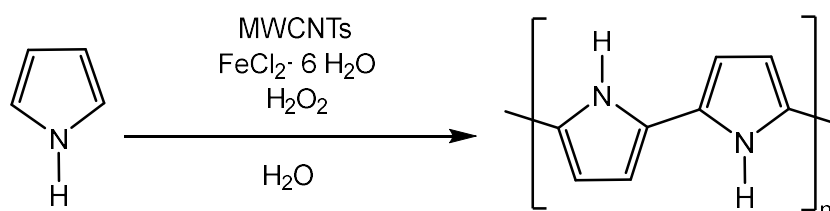
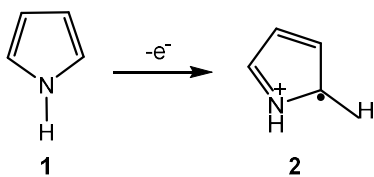


Figura 8. Esquema de la reacción de polimerización química del Py.¹⁸

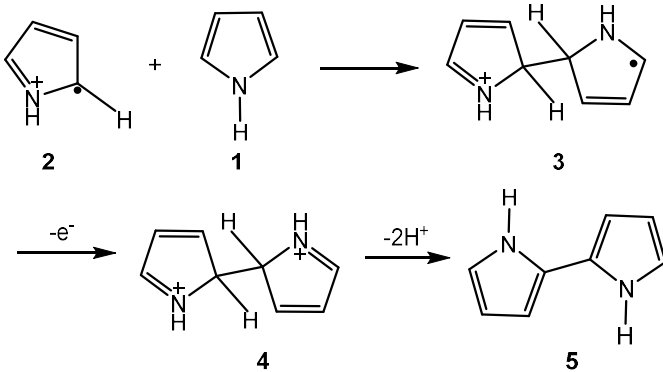
El crecimiento de la cadena de PPy se puede explicar a través de un mecanismo radicalario, como se muestra en la Figura 9.¹⁸

Dicha polimerización se divide en distintas etapas. En la iniciación se constituye el catión radical **2**, que reaccionará con el monómero neutro **1**, seguido de su oxidación y desprotonación para producir el dímero **5** en la propagación. En la reiniciación el dímero **5** se oxida inmediatamente y forma el catión radical dimérico **6** que atacará a otro monómero neutro **1** formando así el trímero **7** en la propagación. La repetición de este proceso da lugar al crecimiento de la cadena del PPy.¹⁸

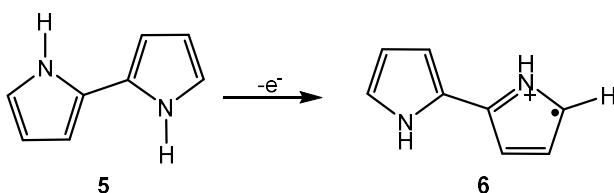
Iniciación



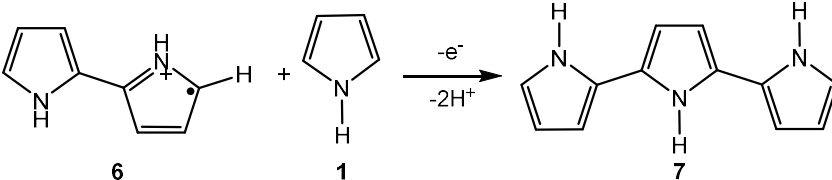
Propagación



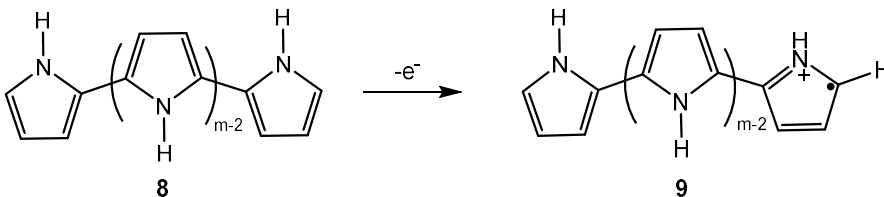
Re-iniciación



Propagación



Re-iniciación



Propagación

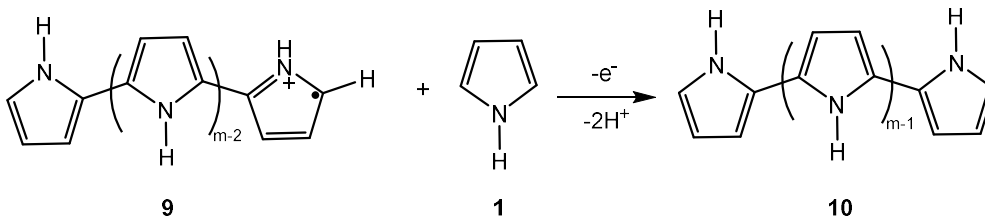


Figura 9. Esquema del mecanismo de la polimerización del Py.¹⁸

El objetivo de la introducción de los MWCNTs en la reacción es que esta polimerización tenga lugar sobre la superficie de este nanomaterial, como se representa en la Figura 10, para obtener una estrecha interacción entre ambos materiales.

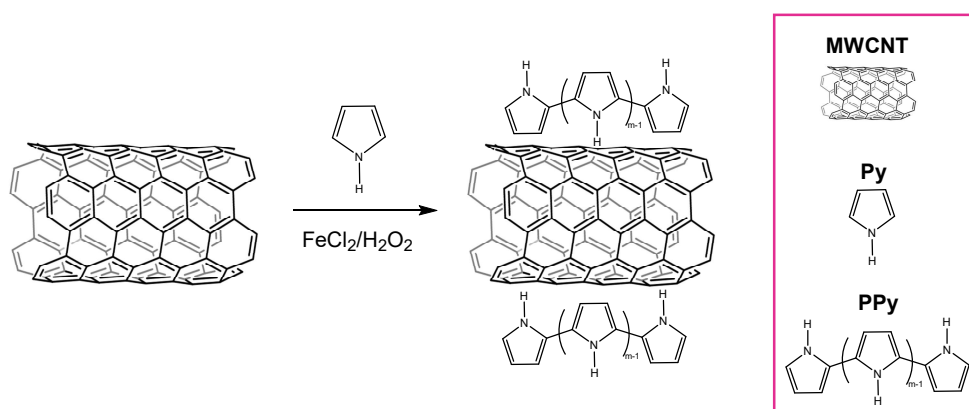


Figura 10. Esquema de polimerización del Py sobre los MWCNTs, adaptado de Qian *et al.*³⁵

Como se introdujo anteriormente, los polímeros electroconductores pueden sintetizarse por procedimientos químicos o electroquímicos. La principal diferencia entre ambos se encuentra en la química que hay detrás de la eliminación del protón del monómero para generar el catión radical, ya que en la reacción química el Py es oxidado por una especie química oxidante, mientras que en la electropolimerización el radical se forma al aplicarle el potencial de oxidación correspondiente.

Para la síntesis química se utilizó una polimerización *in situ* basada en el sistema de oxidación catalítico H_2O_2/Fe^{2+} . De esta forma se genera el radical hidroxilo ($\cdot OH$), un fuerte oxidante, a partir de la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) según la siguiente ecuación, acelerando así la polimerización:



La utilización del H_2O_2 para esta polimerización implica una oxidación controlada a través del número de equivalentes de Fe^{2+} .

3.1.1.1. Optimización de las condiciones de polimerización

Con el objetivo de modificar MWCNTs con PPy de forma óptima, se estudiaron distintas condiciones de reacción (Tabla 1). Se varió la cantidad de Py y sal de hierro ferroso (**Q1-Q5**).³⁵ Además, se realizó una muestra control en ausencia de CNTs (**Q6**), con el objetivo de estudiar la influencia de dichos nanotubos en la polimerización.

Tabla 1. Condiciones de las reacciones de polimerización química del Py.

Muestra	MWCNTs (mg)	Py (mmol)	FeCl ₂ ·6·H ₂ O (mmol)
Q1	10	0,14	4,26·10 ⁻³
Q2	10	0,29	8,52·10 ⁻³
Q3	10	0,72	2,13·10 ⁻²
Q4	10	1,44	4,26·10 ⁻²
Q5	10	2,88	8,52·10 ⁻²
Q6	0	1,44	4,26·10 ⁻²

Después de la purificación exhaustiva de cada una de las muestras utilizando distintas técnicas (diálisis, centrifugación y/o filtración), el material resultante se caracterizó mediante microscopía electrónica de transmisión (*transmission electron microscopy*, TEM) y análisis termogravimétrico (TGA).

Análisis termogravimétrico

En colaboración con el grupo *Carbon Bionanotechnology* del centro de investigación CIC biomaGUNE (San Sebastián), se llevó a cabo la caracterización de los materiales obtenidos mediante TGA. El TGA es una técnica de caracterización muy importante en la ciencia de los materiales. Se basa en el registro del peso de una muestra en función de una temperatura creciente, generalmente hasta 800-1000 °C para los materiales basados en carbono. Mediante este análisis, se puede obtener gran información sobre la estabilidad térmica o la presencia de grupos funcionales en estos materiales. En el caso concreto de los CNTs modificados con PPy, el TGA bajo una atmósfera inerte de N₂ permite evaluar la cantidad de polímero presente, ya que PPy y MWCNTs presentan distinta estabilidad térmica. Por lo tanto, comparando los perfiles TGA de las muestras **Q1-5** con la reacción de control **Q6** y los MWCNTs de partida a diferentes temperaturas, es posible evaluar la eficiencia de la polimerización (Figura 11). Los MWCNTs presentan una elevada estabilidad térmica en estas condiciones, con una pérdida de peso aproximada del 3% entre 100-600 °C. A partir de 600 °C se produce la degradación del CNT. Sin embargo, **Q6** presenta una pérdida de peso del 99% entre 100 y 600 °C, probablemente debido a la degradación completa del polímero.

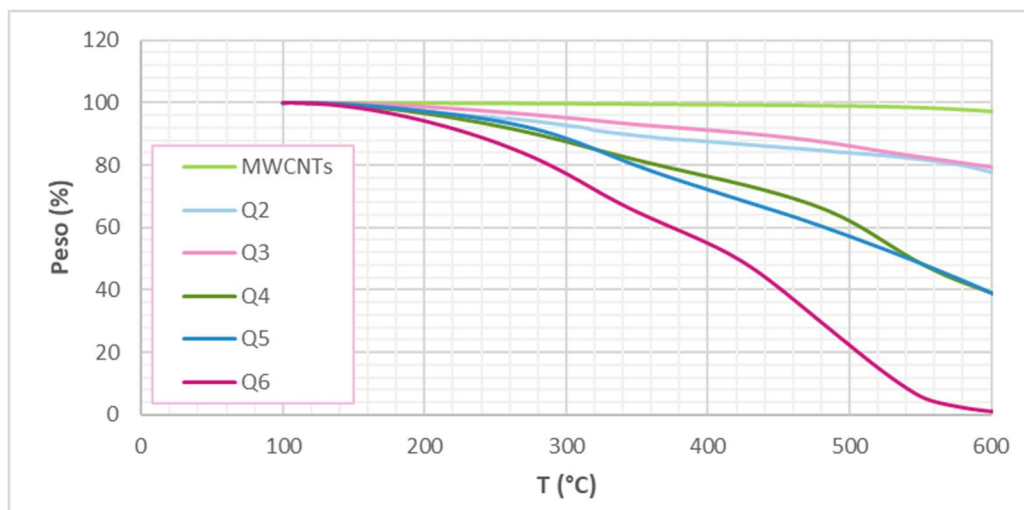


Figura 11. TGAs de los MWCNTs sin modificar y de Q2, Q3, Q4, Q5 y Q6 medidos en atmósfera de N₂.

Teniendo en cuenta las distintas estabildades de los MWCNTs y el PPy, se observa cómo **Q2** y **Q3**, presentan una pérdida de aproximadamente un 20% del peso total del producto debido mayoritariamente a la degradación del polímero (Tabla 2). Sin embargo, **Q4** y **Q5** presentan una mayor pérdida de peso (61%). Mediante este análisis podemos concluir el control existente en la cantidad de polímero introducido, que va desde 21% para **Q3** hasta 61% para **Q4** y **Q5**, a través de la concentración de monómero usada.

Tabla 2. Pérdidas de peso en tanto por ciento en las TGAs de MWCNTs, Q2, Q3, Q4, Q5 y Q6 a 600 °C en N₂.

Muestra	Pérdida de peso (%)
MWCNTs	3
Q2	22
Q3	21
Q4	61
Q5	61
Q6	99

Microscopía electrónica de transmisión

La TEM es una técnica de microscopía en la que la imagen se construye mediante un haz de electrones transmitido a través de la muestra. Esta sofisticada técnica es ampliamente utilizada en nanotecnología debido a la alta resolución que ofrece. Dado que un haz de electrones atraviesa la muestra, esta microscopía puede dar lugar a imágenes con una resolución nanométrica. En la caracterización de CNTs, el TEM proporciona información morfológica como el diámetro, la longitud y el número de

paredes de los CNT. Concretamente, mediante TEM se pueden evaluar los cambios morfológicos introducidos durante la polimerización en los MWCNTs, como por ejemplo el aumento en el diámetro derivado de un recubrimiento con PPy, la aparición de nuevas estructuras o el mayor entrecruzamiento entre CNTs. Para dicho estudio, se caracterizaron inicialmente los MWCNTs de partida (Figura 12). En la imagen TEM representativa mostrada en la Figura 12, se pueden observar las estructuras cilíndricas típicas de los MWCNTs de partida, constituidos por paredes múltiples (zona externa de mayor contraste) y un canal interno hueco (zona interna de menor contraste).

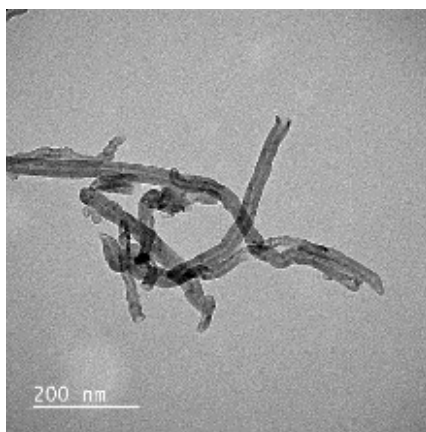


Figura 12. Imagen TEM de los MWCNTs de partida.

A continuación, se caracterizaron mediante TEM los MWCNTs modificados con PPy **Q1-5** y la muestra de control **Q6**. En la Figura 13 se presentan las imágenes más representativas de cada muestra. Para **Q1**, no se observan cambios en la morfología de los CNTs, probablemente debido a la baja cantidad de monómero empleado. Únicamente se observa un mayor entrecruzamiento entre CNTs, posiblemente fomentado por la formación del polímero, constituyendo unas microestructuras características (Figura 13A). Sin embargo, **Q2-4** muestran las paredes de los MWCNTs decorados con estructuras irregulares con un mayor contraste (indicados con flechas en la Figura 13B, C y D). Estas formaciones pueden corresponderse a PPy adsorbido sobre la superficie del CNT. De hecho, se observa un efecto de la concentración del monómero Py, siendo **Q4** la muestra con CNTs más decorados con estas estructuras poliméricas (Figura 13D). Sin embargo, en **Q5**, cuando la concentración de Py es de 0,27 M, se obtienen aglomerados de esferas poliméricas donde los CNTs no son apreciables (Figura 13E). La muestra control en ausencia de MWCNTs **Q6**, revela que este tipo de esferas se producen durante la polimerización de Py en ausencia de CNTs (Figura 13F).³⁸ Por tanto, se concluye que una concentración de Py de 0,27 M en estas condiciones da lugar a PPy en exceso imposibilitando la modificación de MWCNTs únicamente en su superficie.

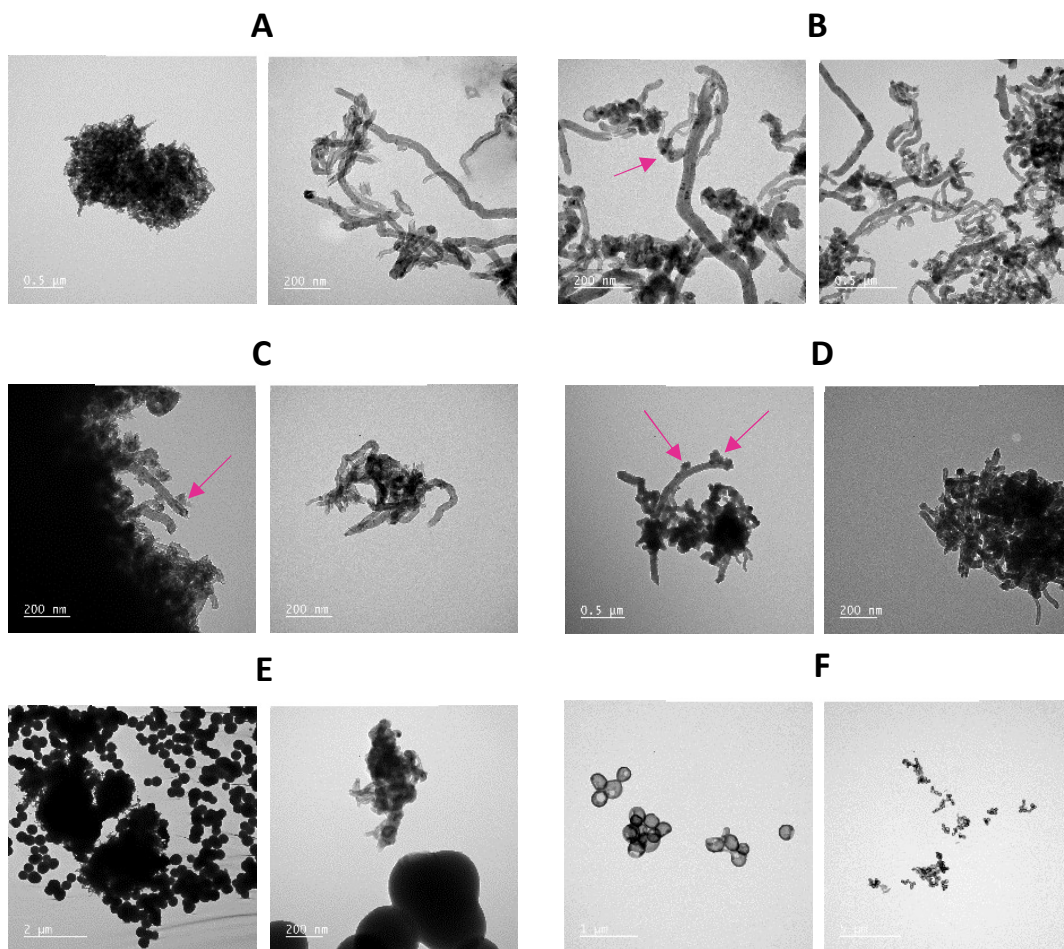


Figura 13. Imágenes TEM de (A) Q1, (B) Q2, (C) Q3, (D) Q4, (E) Q5 y (F) Q6.

Para una evaluación más precisa de la adsorción del polímero sobre los CNTs, se estimaron experimentalmente los diámetros de los CNTs para los MWCNTs de partida y **Q1-4**. Para ello, se analizaron las imágenes TEM correspondientes con el programa *ImageJ* (Tabla 3). Para este análisis se descartaron **Q5** y **Q6** al evidenciar mayoritariamente aglomerados poliméricos y al no poseer MWCNTs, respectivamente. El diámetro de los nanotubos de **Q4** es mayor que para el resto de las muestras ($43 \pm 6,8$ nm). Este incremento confirma cuantitativamente un mayor recubrimiento de las paredes de los nanotubos por PPy durante la polimerización para **Q4**. La diferencia entre **Q1-3** es menos notable.

Tabla 3. Medidas del diámetro de los MWCNTs dados por el fabricante y calculados mediante el programa *ImageJ*, midiendo 5 CNTs en cada muestra, para los MWCNTs utilizados y para las reacciones de polimerización Q1, Q2, Q3 y Q4.

	MWCNTs		Q1	Q2	Q3	Q4
	Fabricante	Experimental				
Diámetro (nm)	20-30	33	37	41	34	43
Desviación típica (nm)	-	5,4	3,6	6,5	8,0	6,8

Por tanto, las imágenes del TEM, así como las medidas del ancho de los MWCNTs sugieren que este procedimiento de polimerización químico permite controlar la modificación de los MWCNTs al utilizar $1,4 \cdot 10^{-2}$ - $14,4 \cdot 10^{-2}$ mmol de Py/mg de MWCNT. Cabe destacar que las condiciones utilizadas para **Q4** permitieron una mayor polimerización química del Py sobre las paredes de los MWCNTs, evitando la presencia del polímero en exceso.

3.1.1.2. Obtención del polímero de impresión molecular

El objetivo de este apartado es la obtención de un MIP a partir de MWCNTs, Py y el neurotransmisor que se desea detectar. En la Figura 14 se esquematiza el proceso de obtención del MIP para comprender su funcionamiento. En la imagen se detalla cómo la síntesis del polímero debe producirse en presencia de los MWCNTs y SE, de forma que el PPy formado se deposite sobre la superficie de las estructuras de carbono, conteniendo al neurotransmisor en su interior. Finalmente, se realizan lavados para extraer la SE del medio y poder así detectar su presencia con mayor exactitud posteriormente.

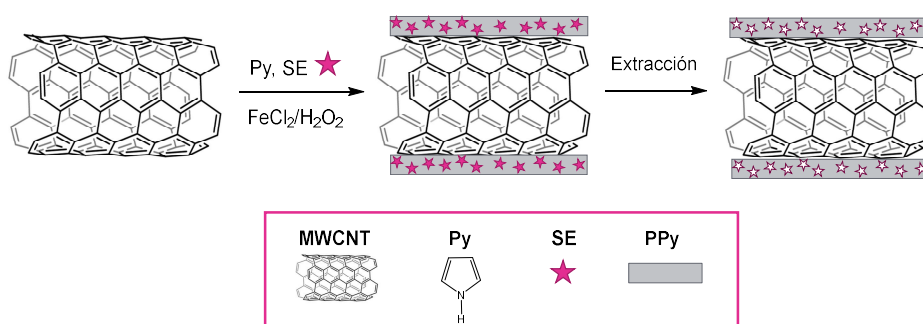


Figura 14. Esquema de la obtención del MIP, adaptado de Qian *et al.*³⁵

Para la síntesis del MIP, es necesario conocer la química del neurotransmisor empleado, SE. Se conoce que esta molécula presenta una elevada estabilidad.³¹ Asimismo, los posibles subproductos de SE que se podrían formar en las condiciones químicas de la

Microscopía electrónica de transmisión

Siguiendo las condiciones descritas en el apartado anterior, se obtienen imágenes del producto mediante TEM.

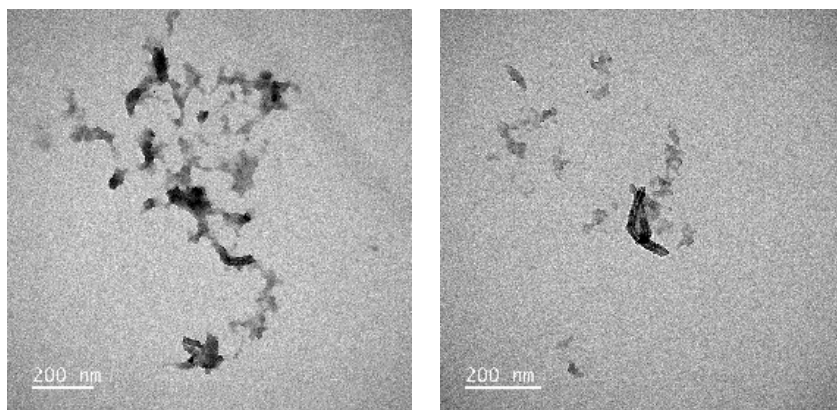


Figura 17. Imágenes TEM de MQ4.

En la Figura 17 se recogen las imágenes más representativas de la muestra. Se observan en ambos casos residuos derivados del proceso de polimerización. Sin embargo, los CNTs presentan un recubrimiento con mayor contraste que corresponde al polímero depositado en su superficie. Desafortunadamente, la purificación y caracterización de **MQ4** resultó ser más difícil de lo esperado. Por falta de tiempo esta polimerización no pudo ser optimizada.

Se exploró también el uso de MIPs para la detección de otros neurotransmisores como la DA. La aplicación de este método para la obtención de sensores para otros neurotransmisores, como la DA, no ha sido posible debido a su baja estabilidad en las condiciones de la reacción. Esto se comprobó experimentalmente llevando a cabo una reacción de control con las condiciones correspondientes a **Q4**, pero sin MWCNTs ni Py para verificar la estabilidad de la DA en el medio de reacción. La reacción se monitorizó mediante espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), cromatografía líquida de alta eficiencia (*high performance liquid chromatography*, HPLC) y espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) (Anexo I: Estudio de la estabilidad de la DA en el medio de reacción).

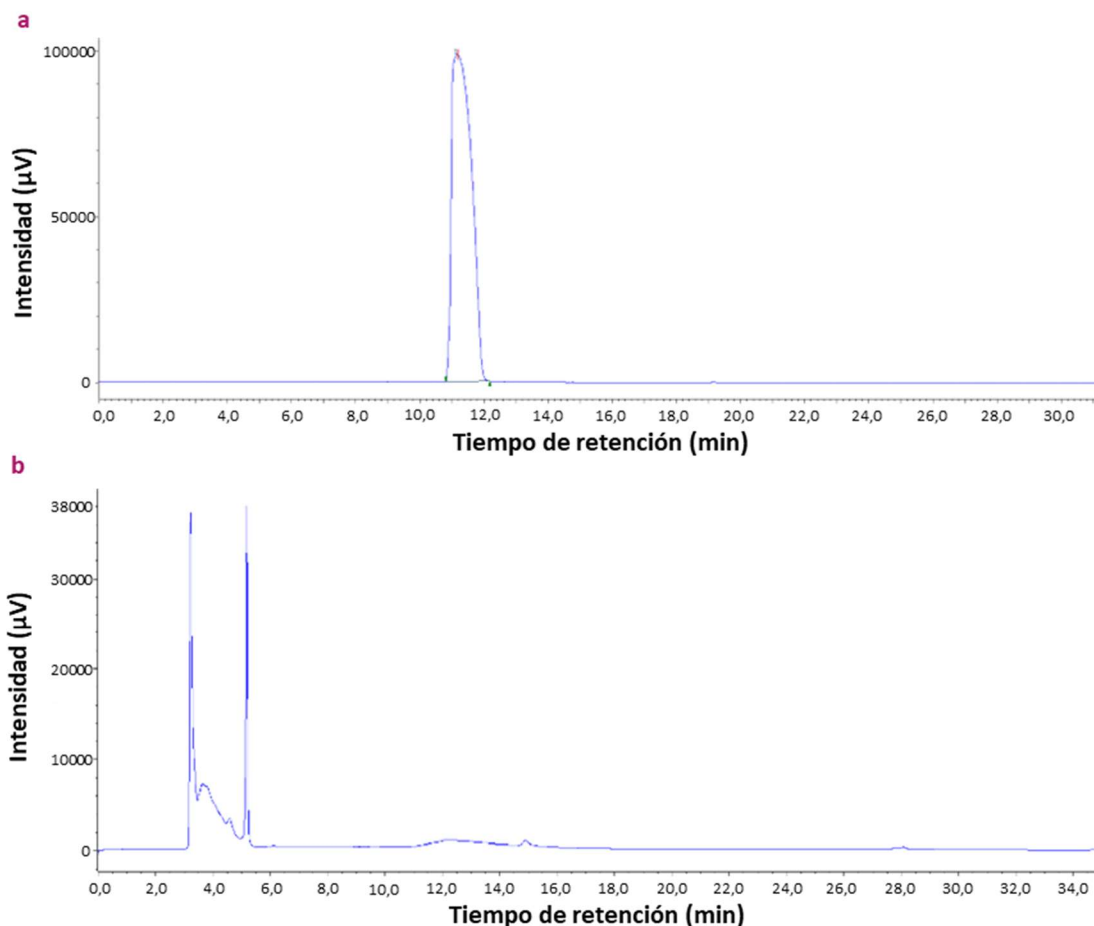


Figura 18. HPLC a 280 nm del hidrocloreuro de DA (a) y del producto de la reacción Q4 con DA (b).

La espectroscopía UV-Vis nos muestra dos espectros distintos para el reactivo de DA empleado y el producto de la reacción (Figura 29). A continuación, se emplea la HPLC que permite la separación de los componentes de una mezcla utilizando una fase estacionaria no polar y una fase móvil, que actúa de portadora de la muestra. En este caso, esta técnica permitió observar las diferencias entre el reactivo de DA utilizado y el producto de la reacción control realizada (Figura 18). La aparición de tres picos distintos en la reacción plantea la posibilidad de la degradación de este neurotransmisor. Para comprobar esta hipótesis, se analizan mediante MS las disoluciones correspondientes a cada pico observado en el HPLC, confirmando la presencia de distintas especies en el producto final de la reacción control (Figuras 32-34). Por tanto, se concluye que la DA no es compatible con las condiciones utilizadas para el MIP.

3.1.2. Polimerización electroquímica

El segundo método de obtención del PPy consiste en una polimerización electroquímica. Con el objetivo de conocer el efecto de cada material sobre la detección de SE, la electropolimerización se llevó a cabo en distintos electrodos, un electrodo sin modificar y un electrodo con MWCNTs depositados en su superficie.

Para realizar estas pruebas, se utilizaron los sistemas de electrodos serigrafiados de *Metrohm DropSens* (DR, Figura 19). Estos electrodos presentan grandes ventajas, como su eficiencia y su miniaturización, la cual permite trabajar con microvolúmenes de muestra y lo hace fácil de transportar.

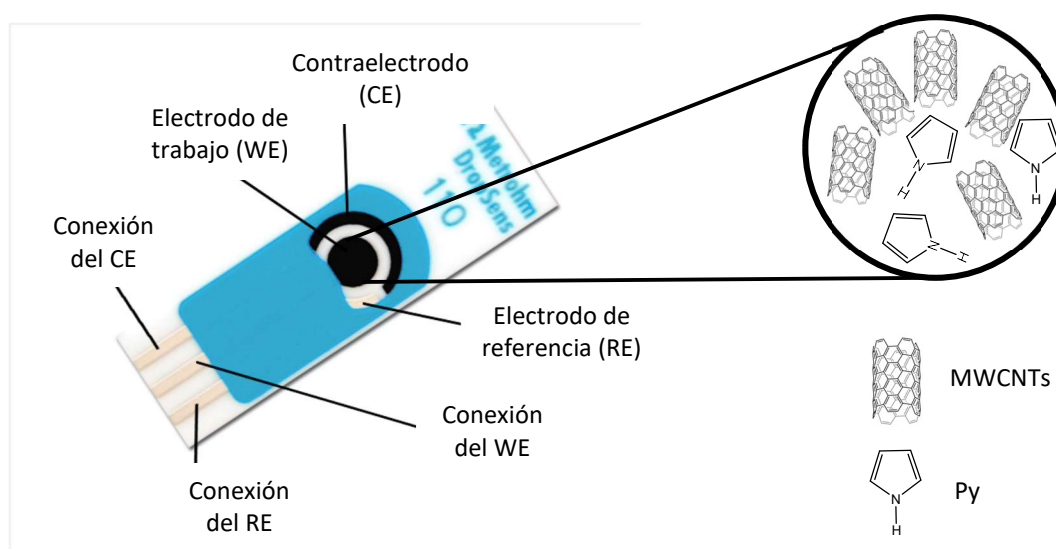


Figura 19. Esquema del electrodo serigrafiado.

Cabe destacar que la polimerización electroquímica tendrá lugar únicamente sobre el electrodo de trabajo (*working electrode*, WE).

La electropolimerización del Py implica inicialmente la formación de oligómeros seguida de etapas de nucleación y crecimiento, generando materiales poliméricos. Los detalles del mecanismo son importantes para la optimización de las condiciones de electropolimerización. Por ejemplo, es esencial conocer en qué rango de potencial se produce la carga y cuál es el nivel máximo de oxidación antes de que el material empiece a degradarse.¹⁴

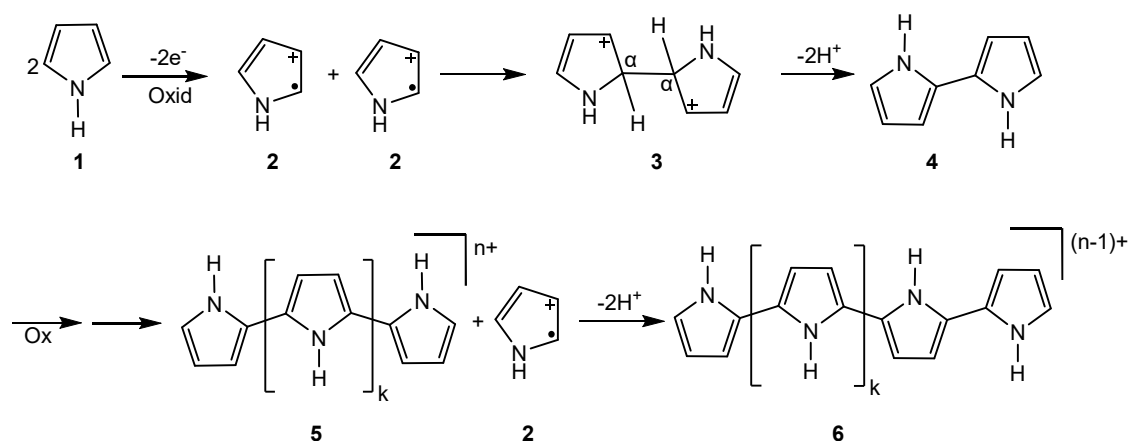


Figura 20. Esquema del mecanismo de electropolimerización anódica del pirrol.¹⁴

Como se observa en la Figura 20, la electropolimerización anódica de los monómeros de Py comienza con la dimerización en la posición α después de la oxidación en el electrodo. Mediante el acoplamiento de dos cationes radicales primarios **2**, se forma el dímero con carga positiva **3**. Dado que dos protones del dímero cargado positivamente distorsionan la conjugación, es probable que la rearomatización ocurra a través de la desprotonación, dando lugar a la especie neutra y energéticamente favorable **4**. Debido a su mayor conjugación, la oxidación del dímero es más fácil en comparación con el Py neutro, por tanto, se produce a un potencial más bajo. En los pasos siguientes se produce el acoplamiento de los cationes radicales del dímero (posteriormente, cationes radicales del oligómero **5**) y los cationes radicales primarios **2**, seguido de una liberación de protones y rearomatización. La oxidación, el acoplamiento y la rearomatización se repiten y conducen a la formación del PPy **6**.¹⁴

Es necesario mencionar que la eficiencia de la electropolimerización depende en gran medida de diversos parámetros experimentales como es el potencial de formación, la concentración del monómero y la escala de tiempo experimental.¹⁴

Conociendo este mecanismo, se realizaron pruebas de electropolimerización del monómero correspondiente sobre el electrodo mediante la voltametría cíclica (CV). Para ello se utilizaron variaciones del procedimiento descrito por Kan *et al.*³⁹

Con el objetivo de conocer la influencia de los CNTs en la electropolimerización, ésta se llevó a cabo utilizando distintas condiciones de reacción (Tabla 4).³⁹

Tabla 4. Distintas condiciones de reacción para la electropolimerización de Py.

Muestra	Concentración de monómero (mM)	WE
E1	26	Sin modificar
E2	52	Sin modificar
E3	1,15	Sin modificar
EC1	26	MWCNTs
EC2	52	MWCNTs
EC3	1,15	MWCNTs

Electropolimerización del Py sobre el electrodo sin modificar

Inicialmente, se realizan las polimerizaciones correspondientes a las concentraciones descritas para **E1** y **E2** (Tabla 4). En ambos casos, el monómero se disuelve en tampón fosfato salino (PBS), previamente preparado a un pH de 7.0 para su electropolimerización. El PBS actuará como electrolito permitiendo la adecuada conducción eléctrica. Además, es importante saber que este tampón es estable en la zona de trabajo de las CVs que se llevarán a cabo, tanto en la polimerización como en la posterior detección de la molécula objetivo.

Los rangos de potencial usados se establecen teniendo en cuenta que debe incluir el potencial de oxidación de la SE (0,38 V a pH 7).⁴⁰

En general, la electropolimerización mediante CV se realiza empleando varios ciclos (2-5) entre 0 y 1 V, produciéndose la formación del polímero sobre la superficie del electrodo. A continuación, se realizan 5 ciclos entre -0,8 y 1 V con el objetivo de acondicionar el nuevo electrodo modificado.

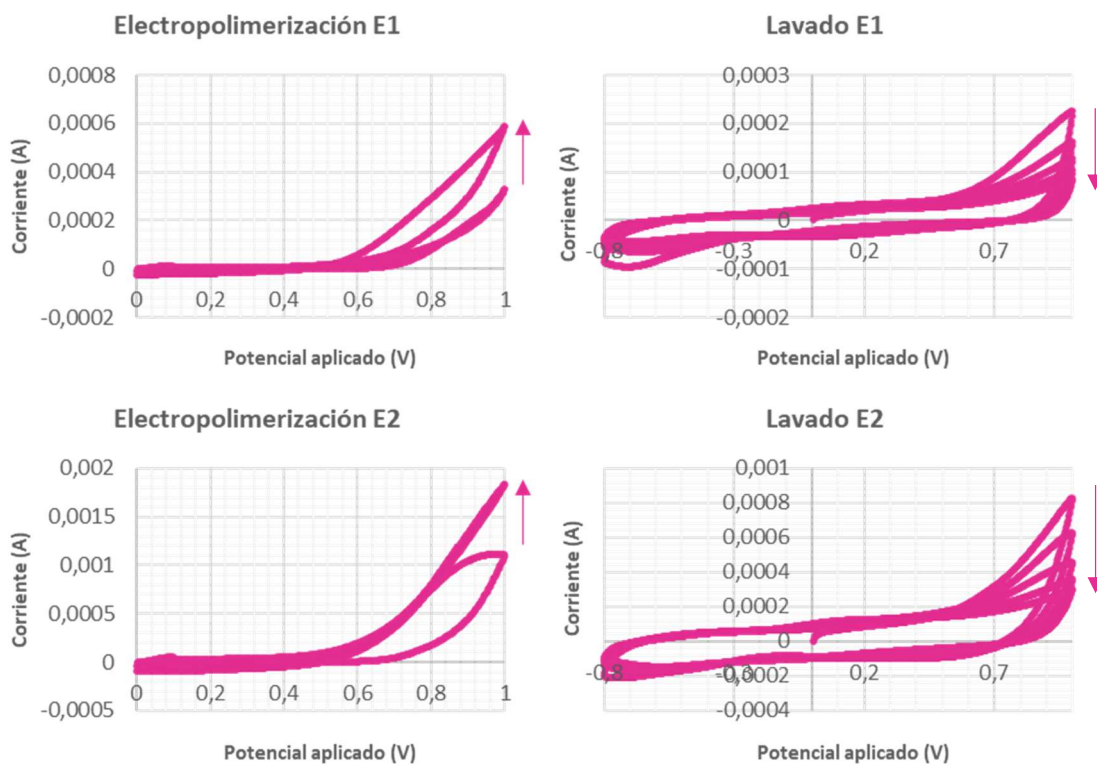


Figura 21. CVs de la polimerización y posterior lavado de E1 y E2.

En la Figura 21 se pueden ver las CVs obtenidas para la polimerización y el posterior acondicionamiento de **E1** y **E2**. En las gráficas de electropolimerización, se observa cómo la corriente aumenta al avanzar en los ciclos, confirmando la deposición del polímero electroactivo en el WE. Sin embargo, durante la etapa de acondicionamiento del electrodo, se observa una disminución de dicha corriente, probablemente debida a la eliminación de restos poliméricos no anclados sobre el WE. Una vez realizado dicho acondicionamiento, el electrodo presenta un comportamiento electroquímicamente estable.

Electropolimerización del Py sobre el electrodo con MWCNTs

Una vez depositados los MWCNTs sobre el WE, se polimeriza Py utilizando las condiciones citadas anteriormente (Tabla 4).

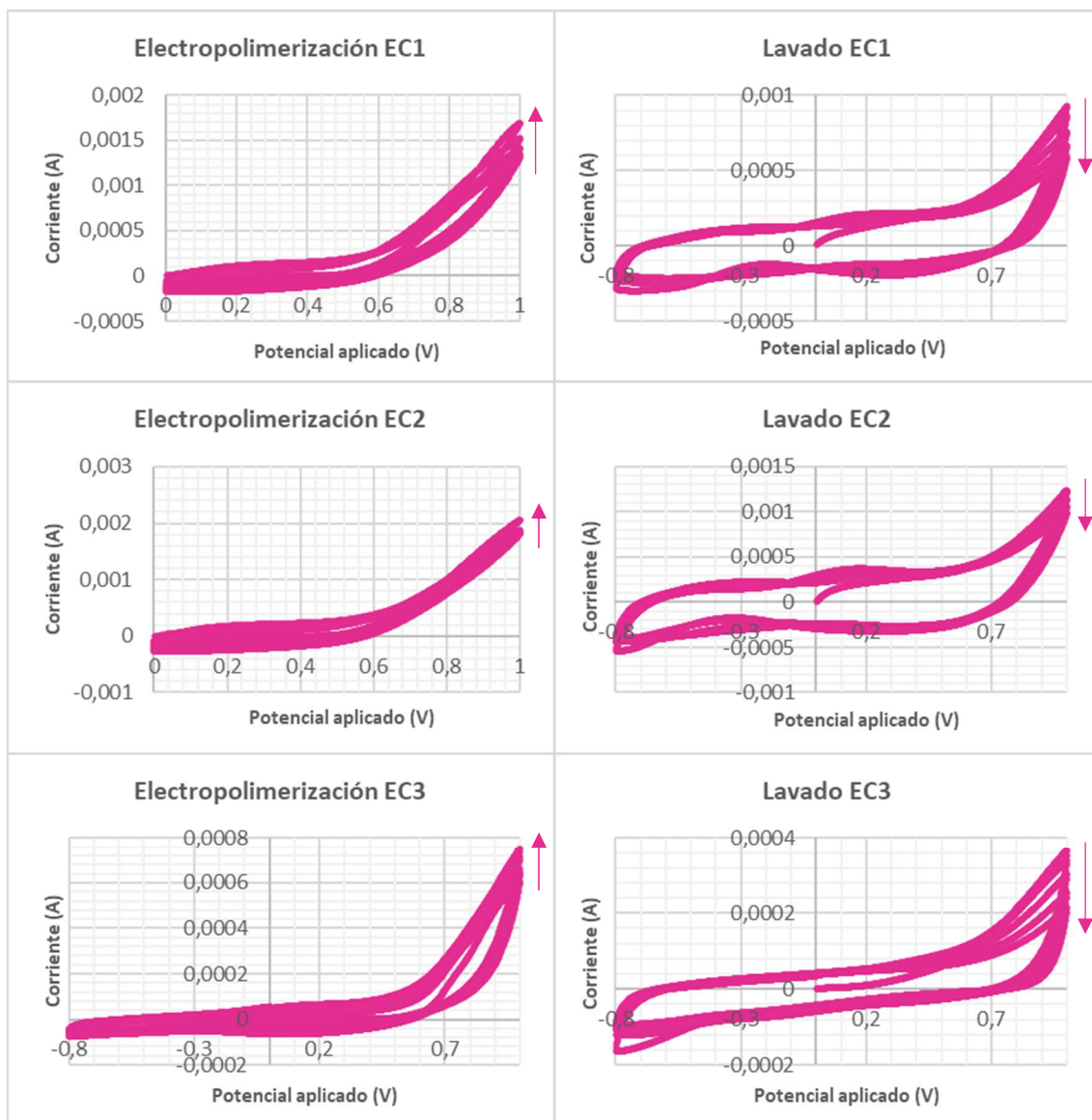


Figura 22. CVs de la polimerización y posterior lavado de EC1, EC2 y EC3.

En los voltamogramas de **EC1-3** (Figura 22), se repite la tendencia observada anteriormente, de nuevo se incrementa la corriente al avanzar en los ciclos. Esto implica que se está depositando el PPy sobre el electrodo modificado.

Cabe destacar que, a diferencia de las técnicas de caracterización usadas en el apartado anterior para evaluar la polimerización, como TGA o TEM, en este caso existe una gran limitación. Los CNTs modificados con PPy se encuentran adheridos a una superficie. Por este motivo, únicamente se pudo evaluar la polimerización mediante microscopía electrónica de barrido (*Scan Electron Mycroscopy*, SEM).

El SEM utiliza un haz focalizado de electrones de alta energía para generar una serie de señales en la superficie de las muestras sólidas. Las señales que se derivan de las

interacciones entre los electrones y la muestra revelan información sobre ésta, como la morfología externa (textura), la composición química y la estructura y orientación cristalinas de los materiales que la componen.

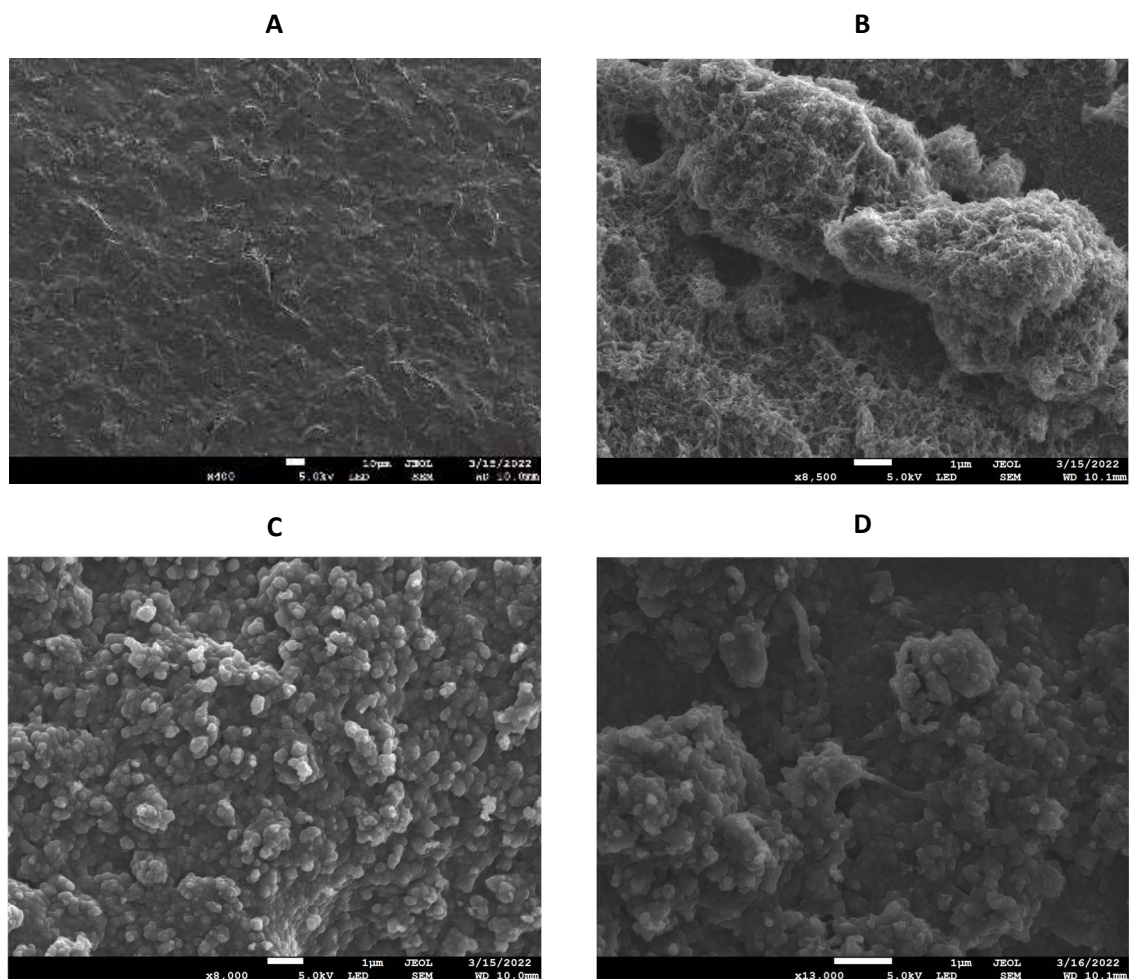


Figura 23. Imágenes del SEM de DR (barra de escala de 10 µm) (A), CD (barra de escala de 1 µm) (B), EC1 (barra de escala de 1 µm) (C) y EC3 (barra de escala de 1 µm) (D).

En concreto, las imágenes del SEM obtenidas para el WE de partida (**DR**), el WE modificado con MWCNTs (**CD**), **EC1** y **EC3** nos permiten comparar los cambios morfológicos introducidos mediante la electropolimerización (Figura 23). En las modificaciones con PPy sobre los MWCNTs, se percibe la presencia de los MWCNTs sobre el electrodo y sobre ellos, se observan esferas que podemos asignar a una naturaleza polimérica. La presencia de estas esferas es mayor en el caso de **EC1** (Figura 23C) que en **EC3** (Figura 23D), ya que esta última contaba con una menor concentración de monómero inicial. Como era de esperar, se obtiene una dependencia directa de la concentración de monómero con la cantidad de polímero depositado.

3.2. Detección del neurotransmisor

Una vez estudiada la polimerización de Py sobre MWCNTs, se procedió a detectar electroquímicamente SE. Los materiales obtenidos mediante electropolimerización permiten la detección del neurotransmisor de forma directa al encontrarse ya adsorbidos sobre el electrodo. No obstante, para los CNTs modificados mediante la polimerización química fue necesaria una preparación previa del sensor. Concretamente, **Q2**, **Q4**, y **MQ4** se depositaron sobre el WE mediante *drop-casting*, obteniéndose los electrodos **EQ2**, **EQ4** y **EMQ4**, respectivamente. La correcta deposición sobre el electrodo se comprobó mediante SEM (Figura 24).

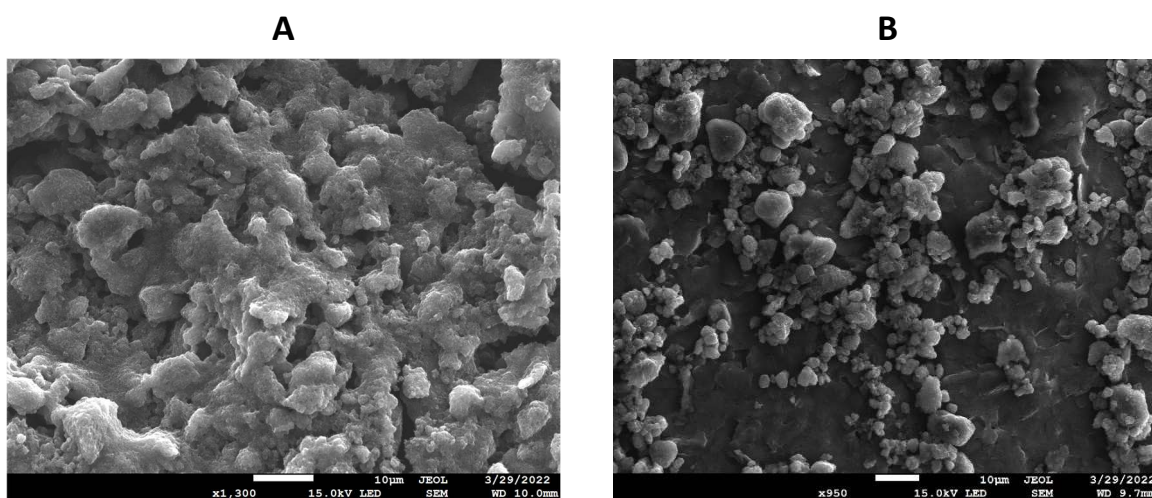


Figura 24. Imágenes SEM de EQ2 (A) y EQ4 (B), (barra de escala de 10 µm en ambas imágenes).

A modo de ejemplo, en las imágenes SEM más representativas para **EQ2** y **EQ4** (Figura 24) se observa un cambio de morfología respecto a **DR** (Figura 23A).

Una vez preparados los sistemas, se procedió a la detección electroquímica de SE mediante CV. Se utilizaron distintas concentraciones de SE para el estudio de los parámetros de detección de **DR**, **CD**, **EC3**, **EQ2**, **EQ4** y **EMQ4**.

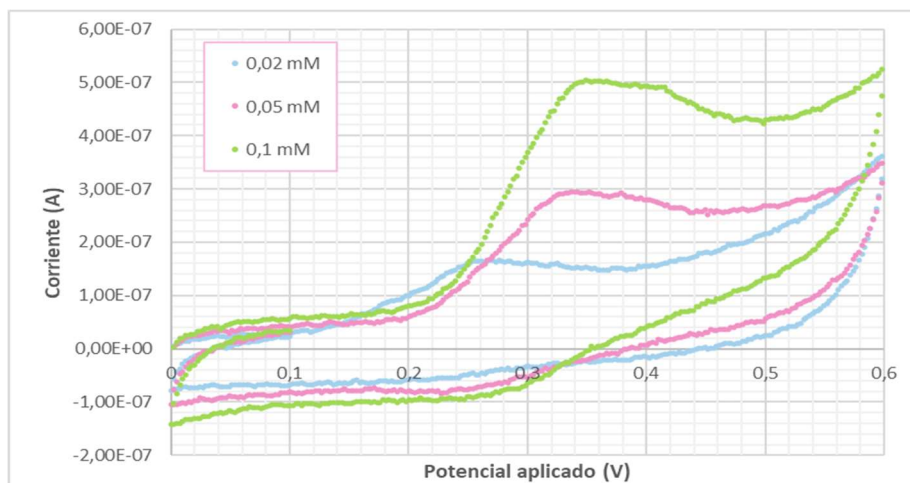


Figura 25. CVs de detección de distintas concentraciones de SE sobre DR.

Inicialmente, se empleó **DR**. Las CVs generadas mostraron una oxidación irreversible a 0,38 V aproximadamente, cuyo valor se corresponde con la oxidación de SE en medio acuoso a pH neutro (Figura 25).⁴⁰ Teniendo en cuenta el máximo de corriente de dichos picos, se obtuvo una dependencia lineal respecto a la concentración de SE presente en la muestra (Figura 26).

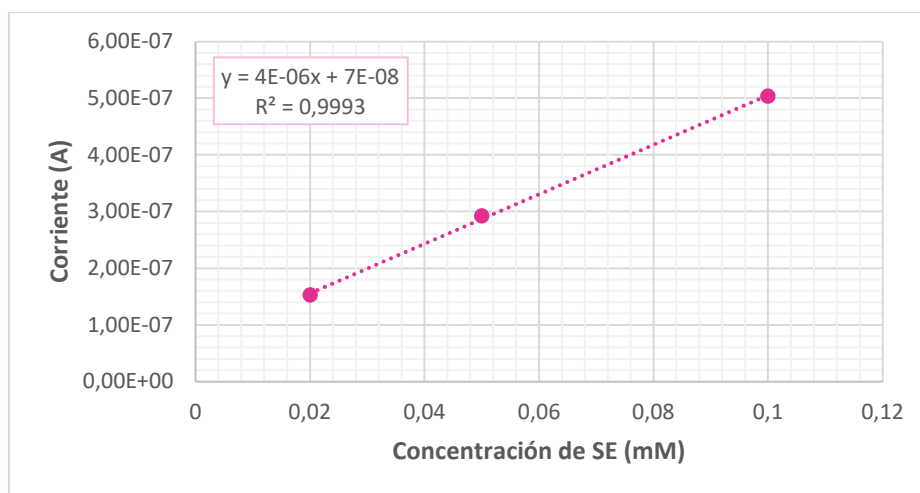


Figura 26. Regresión lineal de detección de SE sobre DR.

Siguiendo el mismo procedimiento, se realizó la detección de SE con el resto de sistemas con su WE modificado (Tabla 5). Para la detección se seleccionó de la electropolimerización del Py, **EC3** debido a que la proporción del monómero con respecto a los MWCNTs se corresponde con la polimerización química optimizada (**EQ4**). Con respecto a las polimerizaciones químicas del Py, se emplean las muestras **EQ4** y **EQ2** para comprobar la influencia de la cantidad de polímero sobre la superficie de los CNTs en la detección del neurotransmisor. Por último, se realizan medidas sobre **EMQ4** para el estudio del comportamiento de un MIP como sensor de SE.

Tabla 5. Datos obtenidos de las CVs de detección de SE para los distintos sensores estudiados.

Electrodo	Concentración SE (mM)	Corriente (A)	Potencial ox (V)
DR	0,02	$1,53 \cdot 10^{-7}$	0,35
	0,05	$2,92 \cdot 10^{-7}$	
	0,10	$5,04 \cdot 10^{-7}$	
CD	0,02	$7,19 \cdot 10^{-7}$	0,31
	0,05	$9,70 \cdot 10^{-7}$	
	0,10	$1,64 \cdot 10^{-6}$	
EC3	0,02	$1,67 \cdot 10^{-5}$	0,30
	0,05	$1,08 \cdot 10^{-5}$	
	0,10	$9,17 \cdot 10^{-6}$	
EQ2	0,10	$6,66 \cdot 10^{-5}$	0,39
	0,50	$1,47 \cdot 10^{-4}$	
	1,00	$1,90 \cdot 10^{-4}$	
EQ4	0,005	$1,06 \cdot 10^{-6}$	0,38
	0,02	$2,42 \cdot 10^{-6}$	
	0,05	$4,94 \cdot 10^{-6}$	
	0,07	$5,70 \cdot 10^{-6}$	
	0,10	$7,28 \cdot 10^{-6}$	
EMQ4	0,02	$2,21 \cdot 10^{-7}$	0,40
	0,05	$2,48 \cdot 10^{-7}$	
	0,07	$2,83 \cdot 10^{-7}$	
	0,10	$3,58 \cdot 10^{-7}$	

A partir de los datos de la Tabla 5, se determinó el rango lineal y la sensibilidad a la SE de cada sensor (Tabla 6). El valor de sensibilidad correspondiente se obtiene de la pendiente de la recta calculada mediante la regresión lineal para cada uno de los materiales empleados.

Tabla 6. Valores de rango lineal y sensibilidad en la detección de SE para cada uno de los nanomateriales estudiados.

Pruebas	Rango lineal (mM)	Sensibilidad (A/mM)
DR	0,02-0,1	$4,00 \cdot 10^{-6}$
CD	0,02-0,1	$1,00 \cdot 10^{-5}$
EC3	0,02-0,1	$-9,00 \cdot 10^{-5}$
EQ2	0,1-1,0	$1,00 \cdot 10^{-4}$
EQ4	0,005-0,1	$7,00 \cdot 10^{-5}$
EMQ4	0,02-0,1	$2,00 \cdot 10^{-6}$

Se elabora un compendio de todas las rectas calculadas con las detecciones hechas para poder compararlas (Figura 27).

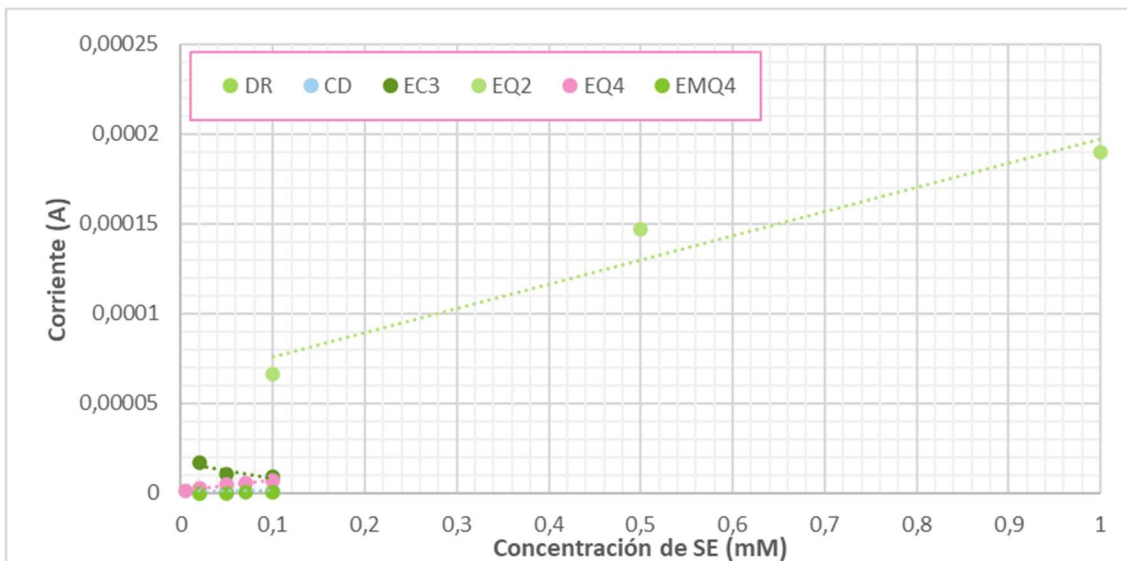


Figura 27. Comparación de rectas de regresión lineal de detección de SE.

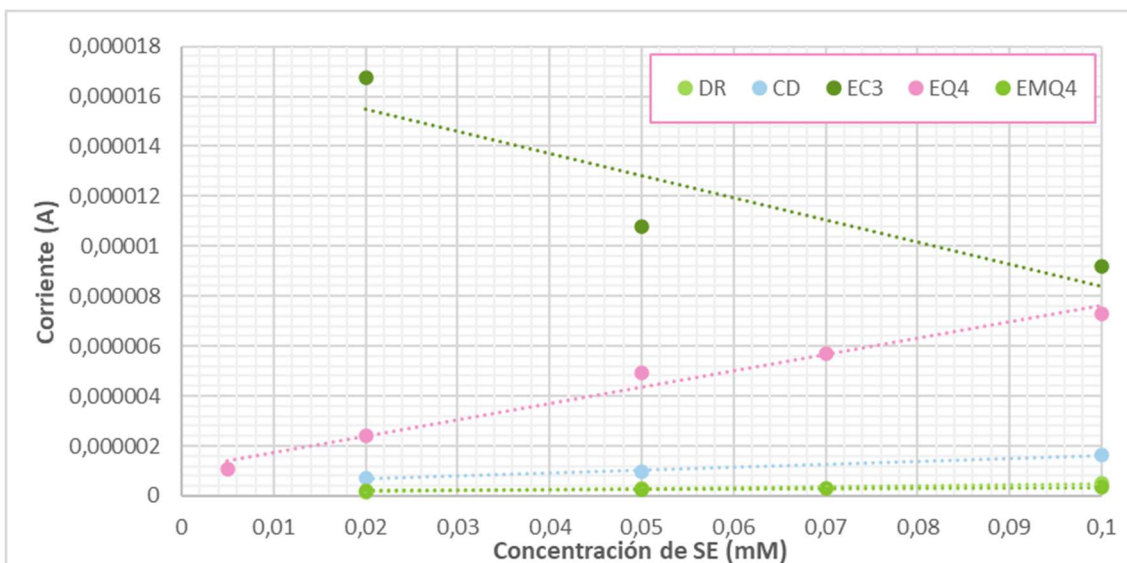


Figura 28. Comparación de rectas de regresión lineal de detección de SE a concentraciones bajas.

Centrándonos en los rangos de concentraciones más bajas (Figura 28), se observó cómo influyó la presencia de los distintos materiales en los sistemas estudiados. En el caso de **CD**, se obtuvo una ligera disminución del potencial de oxidación de la SE con respecto a **DR** (0,31 V en **CD** frente a 0,35 V en **DR**) así como una mayor sensibilidad (Tabla 6).

La presencia de nanoestructuras en una superficie conlleva un aumento de su área superficial y con ello una mayor área de interacción con el analito en cuestión. Por tanto, en el caso de **CD**, la presencia de los CNTs en su superficie generó un aumento de sensibilidad hacia la SE. Además, los CNTs presentan entre sus propiedades más destacadas para el desarrollo de biosensores químicos, la habilidad de transferir electrones a un ritmo mayor en la interfaz. Esto les permite actuar como electrocatalizador.^{10,11,36} Esta propiedad únicamente se ve reflejada en **EC3**.

Asimismo, los defectos estructurales de éstos inducen la perturbación local de los electrones y/o facilitan la formación de sitios activos, mejorando así el rendimiento electroquímico de los catalizadores.⁴¹

En concreto, este efecto se ve claramente reflejado en **EQ2** y **EQ4**, presentando las mejores sensibilidades hacia SE ($1,00 \cdot 10^{-4}$ y $7,00 \cdot 10^{-5}$, respectivamente). No obstante, este aumento de sensibilidad no se observa en el caso de **MQ4**. Esto podría ser debido a los problemas encontrados en la purificación de dicha muestra, como se mencionó anteriormente.

Por otro lado, **EQ2** presenta una mayor sensibilidad que **EQ4** ($1,00 \cdot 10^{-4}$ y $7,00 \cdot 10^{-5}$, respectivamente). No obstante, el rango lineal de **EQ4** alcanza concentraciones menores a las de **EQ2**.

Cabe destacar que **EC3** no presenta una correlación lineal ascendente. Posiblemente esto sea debido a la inestabilidad de los componentes adsorbidos sobre el WE.

La linealidad de los distintos sensores estudiados tiene lugar a concentraciones bastante elevadas de SE, si se tiene en cuenta que la concentración de SE en sangre está entre 500 y 1200 nM y sobre 295-687 nM en orina.²⁵

La presencia de la corriente capacitiva introducida por el PPy podría influir en la dificultad de la observación de señales a concentraciones menores. Esta corriente es debida a un cambio de potencial del electrodo y es el resultado de movimientos de cargas cerca de la interfaz entre el electrodo y la disolución electrolítica, sin ser a través de ella. No obstante, la corriente que interesa en estos experimentos se denomina corriente de Faraday, y ésta es debida a una reacción electroquímica en la que una o varias especies químicas cambian su naturaleza química.

Generalmente, no es posible separar la carga capacitiva de la faradaica. En numerosas ocasiones, bajo el supuesto de que la corriente capacitiva es muy pequeña e

independiente del proceso faradaico, se traza una línea base y se descuenta de la corriente total, que resulta de la suma de ambas corrientes nombradas. Sin embargo, este procedimiento puede conducir a graves errores en determinados estudios, como se ha comprobado para el caso de los polímeros conductores.⁴²

A partir de estas conclusiones, se podría orientar el estudio de cara al futuro en optimizar el espesor de polimerización sobre el electrodo, para evitar pasivarlo, pero permitiendo la producción de un biosensor selectivo mediante la utilización de un MIP. Asimismo, se podría comprobar la selectividad del sensor mediante la detección de SE comparada con otras biomoléculas que se encuentran presentes en los mismos medios biológicos que el neurotransmisor objetivo, como es el caso del ácido ascórbico o la DA.⁴³

4. Experimental

4.1. Reactivos

Los reactivos empleados son comerciales y no fueron sometidos a purificaciones adicionales. Los MWCNTs (20-30 nm de diámetro, 0,5-2 μm de longitud) fueron adquiridos de Nanoamor Inc, con una pureza mayor del 95%. El catalizador $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de Sigma Aldrich con una pureza del 97%. El $\text{DA} \cdot \text{HCl}$ de Sigma Aldrich, con una pureza superior al 98%. El $\text{SE} \cdot \text{HCl}$ de pureza 98% de Fluorochem. El Py fue adquirido a Sigma Aldrich con un 98% de pureza. El H_2O_2 35% (p/p) de Alfa Aesar. El PBS de Dako. El $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{F}_6\text{NP}$ (Tetrabutilamonio hexafluorofosfato (V)) de pureza 97%, fue adquirido de BLD Pharm.

4.2. Instrumental

Para el desarrollo de este proyecto se emplearon los aparatos indicados en este apartado. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron en un potencióstato/galvanostato Autolab AUT302N.V. Se utilizó el sistema serigrafiado de tres electrodos DRP110, Metrohm-Dropsens, constituido por un WE de carbono de 4 mm de diámetro, un CE también de carbono y un RE de plata situados sobre un sustrato cerámico de dimensiones 33x10x0,5 mm. Para seleccionar las características óptimas de polimerización se caracterizan las muestras mediante TGA bajo nitrógeno partiendo de 100 °C con una rampa de 10 °C/min hasta 650 °C tras una isoterma a 100 °C durante 20 min. Los TGAs fueron realizados por *Carbon Bionanotechnology group* con un sistema TA Instruments Discovery en el centro de investigación CIC biomaGUNE, en San Sebastián (España).

Las imágenes SEM se obtuvieron con un microscopio modelo JEOL JSM-6400 y las imágenes TEM mediante un microscopio JEOL JEM-1010, ambos localizados en el SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña). El espectrofotómetro UV-Vis empleado marca Thermo Scientific era el modelo GENESYS 50. Para realizar las cromatografías (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) se utiliza un aparato HPLC Jasco LC-Net II / ADC con detector UV-Vis. Los espectros de masas (*Mass Spectra*, MS) se obtienen mediante el espectrómetro de masas Amazon Speed ETD (Bruker) provisto de tecnología de ionización por electrospray-trampa de iones.

4.3. Cronograma

Mes	Octubre					Noviembre					Diciembre					Enero					Febrero					Marzo					Abril					Mayo					Junio					Julio									
Semana	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5					
Procedimientos experimentales																																																							
Análisis de los resultados																																																							
Revisión bibliográfica																																																							
Elaboración de la memoria																																																							

4.4. Procedimiento general para la modificación de nanotubos de carbono de pared múltiple con polipirrol mediante polimerización química en disolución.³⁵

En un balón de 25 mL, se dispersaron los MWCNTs (10 mg) en H₂O Milli-Q (10 mL) con la ayuda de sonicación en un baño de agua (~5 min). A continuación, se añadió Py y FeCl₂·6H₂O sobre la dispersión acuosa. Finalmente se adicionó H₂O₂ y la mezcla resultante se sometió a agitación durante 6 h. La suspensión resultante se dializó en H₂O Milli-Q (tubo de membrana porosa molecular de Spectra/Por de 3,5 kD de tamaño de poro), se centrifugó (1h a 10000 rpm) y lavó con H₂O Milli-Q, y/o se filtró (filtro de membrana MF-Millipore, de tamaño de poro de 0,45 µm) y lavó con H₂O Milli-Q, dependiendo del tipo de muestra. Finalmente, la suspensión resultante se liofilizó para dar lugar a los MWCNTs funcionalizados con PPy como un sólido negro. Mediante este procedimiento, se sintetizaron los MWCNTs funcionalizados **Q1-Q6**, cuyas condiciones de reacción se especifican en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de las distintas reacciones de síntesis química.

Muestra	MWCNTs (mg)	Py (mmol)	FeCl ₂ ·6H ₂ O (mmol)	Purificación	Producto (mg)
Q1	10	0,14	4,26·10 ⁻³	<ul style="list-style-type: none"> • Diálisis • Lavados y filtración 	5
Q2	10	0,29	8,52·10 ⁻³	<ul style="list-style-type: none"> • Diálisis • Lavados y filtración • Centrifugación 	1
Q3	10	0,72	2,13·10 ⁻²	<ul style="list-style-type: none"> • Diálisis • Centrifugación • Lavados y filtración 	45
Q4	10	1,44	4,26·10 ⁻²	<ul style="list-style-type: none"> • Diálisis • Centrifugación 	12
Q5	10	2,88	8,52·10 ⁻²	<ul style="list-style-type: none"> • Diálisis • Lavados y filtración 	189
Q6	-	1,44	4,26·10 ⁻²	<ul style="list-style-type: none"> • Diálisis • Centrifugación 	17

4.5. Modificación de los nanotubos de pared múltiple con polipirrol a través de polimerización química intramolecular con serotonina (MQ4) en disolución.³⁹

En un balón de 25 mL, se dispersaron los MWCNTs (10 mg) en H₂O Milli-Q (10 mL) con la ayuda de sonicación en un baño de agua (~5 min). A continuación, se añadió Py (0,1

mL, 1,44 mmol) y $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mg, $4,26 \cdot 10^{-2}$ mmol) sobre la dispersión acuosa. Finalmente se adicionó H_2O_2 (0,5 mL, 21,31 mmol) y la mezcla resultante se sometió a agitación durante 6 h. La suspensión resultante se dializó (utilizando un tubo de membrana porosa molecular de Spectra/Por de 3,5 kD de tamaño de poro) en H_2O Milli-Q (6x1L). Finalmente, la suspensión resultante se liofilizó para dar lugar a **MQ4** (295 mg) como un sólido negro.

4.6. Procedimiento general para la polimerización electroquímica de pirrol

Se depositaron aproximadamente 80 μL de la disolución de Py correspondiente (Tabla 8) en PBS (0,02 M Na_3PO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7.0) sobre el WE del sistema de tres electrodos DPR110 respectivo. La polimerización oxidativa anódica se llevó a cabo mediante CV, registrando en 2-5 ciclos la variación del potencial correspondiente al tipo de muestra a una velocidad de barrido de $100 \text{ m} \cdot \text{V s}^{-1}$ (Tabla 8). Una vez completada la polimerización, el sistema se sumergió en agua MilliQ durante 2 min. Mediante este procedimiento se prepararon los sistemas **E1-3** y **EC1-3**. Para las muestras **EC1-3**, previamente se depositaron los MWCNTs mediante *drop-casting* a partir de una suspensión acuosa de 0,4 mg/mL, dejando evaporar el agua durante un día.

Tabla 8. Condiciones de las distintas polimerizaciones electroquímicas del Py realizadas.

Muestra	Concentración de monómero (mM)	WE	Rango de potencial (V)
E1	26	Sin modificar	0,0-1,0
E2	52	Sin modificar	0,0-1,0
E3	1,15	Sin modificar	0,0-1,0
EC1	26	MWCNTs	0,0-1,0
EC2	52	MWCNTs	0,0-1,0
EC3	1,15	MWCNTs	-0,8-1,0

Para el acondicionamiento del sistema de electrodos siempre que se terminó de realizar una medida o una polimerización, se lavó el sistema sumergiéndolo varias veces en dos vasos de precipitados con agua Milli-Q sucesivamente.

4.7. Detección electroquímica de serotonina

Se añadió la disolución de SE (aproximadamente 80 μL) de concentración conocida en PBS (0,02 M Na_3PO_4 , 0,15 M NaCl , pH 7.0) sobre el WE del sistema de 3 electrodos DPR110 correspondiente. Para las muestras **EQ2**, **EQ4** y **MQ4**, se depositaron previamente las disoluciones de los materiales correspondientes obtenidos por polimerización química mediante *drop-casting*, dejando evaporar el agua durante un día.

A continuación, se realizó la CV en el rango de potencial indicado en la Tabla 9 para cada caso, a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} . El potencial de inicio de las CVs se fijó en 0 V y el potencial de parada en 0,01 V.

Para mediciones consecutivas, se lavó el electrodo sumergiéndolo varias veces en dos vasos de precipitados con agua Milli-Q sucesivamente. Posteriormente, se realizó una CV de 5 ciclos con PBS para acondicionar el electrodo para la siguiente concentración. Los parámetros de las CVs de acondicionamiento son similares a los realizados en cada medida de SE.

Tabla 9. Rangos de potencial empleados en las distintas detecciones de SE realizadas mediante CV.

Detecciones de SE	Rango de potencial (V)
DR	0-0,6
CD	0-0,6
EC3	0-0,6
EQ2	0-0,8
EQ4	0-0,8
MQ4	0-0,8

5. Conclusiones

En vista a los resultados obtenidos y considerando los objetivos enunciados en este proyecto, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha optimizado la polimerización química de Py sobre MWCNTs respecto a la cantidad de monómero. Esta optimización se ha comprobado mediante TGA, TEM y medidas estimadas del ancho de los MWCNTs mediante TEM.

Se ha estudiado la polimerización electroquímica de Py sobre un electrodo sin modificar, así como sobre un electrodo modificado con MWCNTs mediante CV. La caracterización mediante CV y SEM confirmaron la deposición del polímero sobre las distintas superficies, obteniéndose una dependencia directa de la concentración de monómero con la cantidad de polímero depositado.

2. Se ha realizado un estudio preliminar del MIP mediante polimerización química a partir de las condiciones optimizadas previamente para este tipo de polimerización.
3. Se ha detectado SE electroquímicamente utilizando distintos electrodos modificados. La introducción de nanomateriales en el sistema de electrodos, en este caso los MWCNTs y el PPy, permitieron un aumento de la sensibilidad del sensor gracias al aumento del área superficial del mismo.

Debido a la duración limitada del presente proyecto, no se ha podido optimizar en profundidad la síntesis del sensor de SE. No obstante, a partir de las conclusiones obtenidas se podría orientar este estudio de cara al futuro en optimizar el espesor de polimerización sobre el electrodo, para evitar pasivarlo, pero permitiendo la producción de un biosensor selectivo mediante la utilización de un MIP. Además, se podría comprobar la selectividad del sensor mediante la detección de SE comparada con otras biomoléculas que se encuentran presentes en los mismos medios biológicos.

5. Conclusións

En vista aos resultados obtidos e considerando os obxectivos enunciados neste proxecto, pódense extraer as seguintes conclusións:

1. Optimizouse a polimerización química de Py sobre MWCNTs respecto á cantidade de monómero. Esta optimización comprobouse mediante TGA, TEM e medidas estimadas do ancho dos MWCNTs mediante TEM.

Estudouse a polimerización electroquímica de Py sobre un eléctrodo sen modificar, así como sobre un eléctrodo modificado con MWCNTs mediante CV. A caracterización mediante CV e SEM confirmaron a deposición do polímero sobre as distintas superficies, obténdose unha dependencia directa da concentración de monómero coa cantidade de polímero depositado.

2. Realizouse un estudo preliminar do MIP mediante polimerización química a partir das condicións optimizadas previamente para este tipo de polimerización.
3. Detectouse SE electroquímicamente utilizando distintos eléctrodos modificados. A introdución de nanomateriales no sistema de eléctrodos, neste caso os MWCNTs e o PPy, permitiron un aumento da sensibilidade do sensor grazas ao aumento da área superficial do mesmo.

Debido á duración limitada do presente proxecto, non se puido optimizar en profundidade a síntese do sensor de SE. Con todo, a partir das conclusións obtidas poderíase orientar este estudo de fronte ao futuro en optimizar o espesor de polimerización sobre o eléctrodo, para evitar pasivalo, pero permitindo a produción dun biosensor selectivo mediante a utilización dun MIP. Ademais, poderíase comprobar a selectividade do sensor mediante a detección de comparar con outras biomoléculas que se atopan presentes nos mesmos medios biolóxicos.

5. Conclusions

In view of the results obtained and considering the objectives stated in this project, the following conclusions can be drawn:

1. The chemical polymerisation of Py on MWCNTs has been optimised with respect to the amount of monomer. This optimisation has been verified by TGA, TEM and estimated measurements of the width of the MWCNTs by TEM.

The electrochemical polymerisation of Py on an unmodified electrode as well as on an electrode modified with MWCNTs has been studied by CV. CV and SEM characterisation confirmed the polymer deposition on the different surfaces, obtaining a direct dependence of the monomer concentration on the amount of polymer deposited.

2. A preliminary study of MIP by chemical polymerisation has been carried out using the conditions previously optimised for this type of polymerisation.
3. SE has been detected electrochemically using different modified electrodes. The introduction of nanomaterials in the electrode system, in this case MWCNTs and PPy, allowed an increase in the sensitivity of the sensor by increasing the surface area of the sensor.

Due to the limited duration of the present project, the synthesis of the SE sensor could not be optimised in depth. However, based on the conclusions obtained, this study could be oriented towards optimising the thickness of the polymerisation on the electrode in the future, in order to avoid passivation, but allowing the production of a selective biosensor by using a MIP. Furthermore, the selectivity of the sensor could be tested by detecting SE compared to other biomolecules present in the same biological media.

6. Bibliografía

- (1) Brenner, G. M.; Stevens, C. W. *Farmacología Básica*, 5a. ed.; Elsevier España: Barcelona, 2019.
- (2) Mohammad-Zadeh, L. F.; Moses, L.; Gwaltney-Brant, S. M. Serotonin: A Review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2008**, *31* (3), 187–199.
- (3) Szeitz, A.; Bandiera, S. M. Analysis and Measurement of Serotonin. *Biomed. Chromatogr.* **2018**, *32* (1).
- (4) Corona-Avendao, S.; Romero-Romo, M. A.; Rojas-Hernández, A.; Ramírez-Silva, M. T. Study on the Stability of the Serotonin and on the Determination of Its Acidity Constants. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61* (4), 621–627.
- (5) Moraldo, C.; Vuille-dit-Bille, E.; Shkodra, B.; Kloter, T.; Nakatsuka, N. Aptamer-Modified Biosensors to Visualize Neurotransmitter Flux. *J. Neurosci. Methods* **2022**.
- (6) Zhao, C.; Cheung, K. M.; Huang, I.-W.; Yang, H.; Nakatsuka, N.; Liu, W.; Cao, Y.; Man, T.; Weiss, P. S.; Monbouquette, H. G.; Andrews, A. M. Implantable Aptamer-Field-Effect Transistor Neuroprobes for in Vivo Neurotransmitter Monitoring. *Sci. Adv.* **2021**; Vol. 7.
- (7) Iijima Sumio. Helical Microtubes of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.
- (8) Geim, A. K.; Novoselov, K. S. The Rise of Graphene. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 183–191.
- (9) Zhang, H.; Wu, B.; Hu, W.; Liu, Y. Separation and/or Selective Enrichment of Single-Walled Carbon Nanotubes Based on Their Electronic Properties. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (3), 1324–1336.
- (10) Kumar, S.; Rani, R.; Dilbaghi, N.; Tankeshwar, K.; Kim, K. H. Carbon Nanotubes: A Novel Material for Multifaceted Applications in Human Healthcare. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 158–196.
- (11) Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1105–1136.

- (12) Marchesan, S.; Kostarelos, K.; Bianco, A.; Prato, M. The Winding Road for Carbon Nanotubes in Nanomedicine. *Mater. Today* **2015**, *18*, 12–19.
- (13) Park, C. S.; Lee, C.; Kwon, O. S. Conducting Polymer Based Nanobiosensors. *Polymers* **2016**, *8*, 249-267.
- (14) Heinze, J.; Frontana-Uribe, B. A.; Ludwigs, S. Electrochemistry of Conducting Polymers-Persistent Models and New Concepts. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (8), 4724–4771.
- (15) Namsheer, K.; Rout, C. S. Conducting Polymers: A Comprehensive Review on Recent Advances in Synthesis, Properties and Applications. *RSC Adv.* **2021**, *11* (10), 5659–5697.
- (16) Nezakati, T.; Seifalian, A.; Tan, A.; Seifalian, A. M. Conductive Polymers: Opportunities and Challenges in Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (14), 6766–6843.
- (17) Roy, C. J.; Leprince, L.; de Boulard, A.; Landoulsi, J.; Callegari, V.; Jonas, A. M.; Demoustier-Champagne, S. Electrosynthesis of Pyrrole 3-Carboxylic Acid Copolymer Films and Nanotubes with Tunable Degree of Functionalization for Biomedical Applications. *Electrochim. Acta* **2011**; *56*, 3641–3648.
- (18) Tan, Y.; Ghandi, K. Kinetics and Mechanism of Pyrrole Chemical Polymerization. *Synth Met* **2013**, *175*, 183–191.
- (19) Qin, Z.; Lv, Y.; Fang, X.; Zhao, B.; Niu, F.; Min, L.; Pan, K. Ultralight Polypyrrole Crosslinked Nanofiber Aerogel for Highly Sensitive Piezoresistive Sensor. *Chem. Eng. J.* **2022**, 427.
- (20) Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. Chemical Sensors: Definitions and Classification. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63* (9), 1247–1250.
- (21) Leibl, N.; Haupt, K.; Gonzato, C.; Duma, L. Molecularly Imprinted Polymers for Chemical Sensing: A Tutorial Review. *Chemosensors* **2021**, *9* (6), 123-142.
- (22) Saylan, Y.; Akgönüllü, S.; Yavuz, H.; Ünal, S.; Denizli, A. Molecularly Imprinted Polymer Based Sensors for Medical Applications. *Sensors* **2019**, *19* (6), 1279-1298.

- (23) Vörös, J.; Momotenko, D.; Nakatsuka, N.; Faillétaz, A.; Eggemann, D.; Forró, C. Aptamer Conformational Change Enables Serotonin Biosensing with Nanopipettes. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (8), 4033–4041.
- (24) Yoon, H.; Jang, J. Conducting-Polymer Nanomaterials for High-Performance Sensor Applications: Issues and Challenges. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (10), 1567–1576.
- (25) Khoshnevisan, K.; Maleki, H.; Honarvarfard, E.; Baharifar, H.; Gholami, M.; Faridbod, F.; Larijani, B.; Faridi Majidi, R.; Khorramizadeh, M. R. Nanomaterial Based Electrochemical Sensing of the Biomarker Serotonin: A Comprehensive Review. *Microchim. Acta.* **2019**, *186* (1), 49-70.
- (26) Wu, B.; Yeasmin, S.; Liu, Y.; Cheng, L. J. Sensitive and Selective Electrochemical Sensor for Serotonin Detection Based on Ferrocene-Gold Nanoparticles Decorated Multiwall Carbon Nanotubes. *Sens. Actuators B Chem.* **2022**, *354*.
- (27) Kelich, P.; Jeong, S.; Navarro, N.; Adams, J.; Sun, X.; Zhao, H.; Landry, M. P.; Vuković, L. Discovery of DNA-Carbon Nanotube Sensors for Serotonin with Machine Learning and Near-Infrared Fluorescence Spectroscopy. *ACS Nano* **2022**, *16* (1), 736–745.
- (28) Özcan, A.; İlkbaş, S. Poly(Pyrrrole-3-Carboxylic Acid)-Modified Pencil Graphite Electrode for the Determination of Serotonin in Biological Samples by Adsorptive Stripping Voltammetry. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *215*, 518–524.
- (29) Zaidi, S. A. Development of Molecular Imprinted Polymers Based Strategies for the Determination of Dopamine. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *265*, 488–497.
- (30) Elugoke, S. E.; Adekunle, A. S.; Fayemi, O. E.; Akpan, E. D.; Mamba, B. B.; Sherif, E. M.; Ebenso, E. E. Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) Based Electrochemical Sensors for the Determination of Catecholamine Neurotransmitters – Review. *Electrochem. Sci. Adv.* **2021**, *1* (2).
- (31) Yola, M. L.; Atar, N. A Novel Detection Approach for Serotonin by Graphene Quantum Dots/Two-Dimensional (2D) Hexagonal Boron Nitride Nanosheets with Molecularly Imprinted Polymer. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *458*, 648–655.

- (32) Gupta, S.; Murthy, C. N.; Prabha, C. R. Recent Advances in Carbon Nanotube Based Electrochemical Biosensors. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *108*, 687–703.
- (33) Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. Functionalized Carbon Nanotubes in Drug Design and Discovery. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (1), 60–68.
- (34) Melle-Franco, M.; Marcaccio, M.; Paolucci, D.; Paolucci, F.; Georgakilas, V.; Guldi, D. M.; Prato, M.; Zerbetto, F. Cyclic Voltammetry and Bulk Electronic Properties of Soluble Carbon Nanotubes. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (6), 1646–1647.
- (35) Qian, T.; Yu, C.; Zhou, X.; Ma, P.; Wu, S.; Xu, L.; Shen, J. Ultrasensitive Dopamine Sensor Based on Novel Molecularly Imprinted Polypyrrole Coated Carbon Nanotubes. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 237–241.
- (36) Schroeder, V.; Savagatrup, S.; He, M.; Lin, S.; Swager, T. M. Carbon Nanotube Chemical Sensors. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 599–663.
- (37) Brozena, A. H.; Moskowitz, J.; Shao, B.; Deng, S.; Liao, H.; Gaskell, K. J.; Wang, Y. Outer Wall Selectively Oxidized, Water-Soluble Double-Walled Carbon Nanotubes. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (11), 3932–3938.
- (38) Dassanayake, A. C.; Jaroniec, M. Activated Polypyrrole-Derived Carbon Spheres for Superior CO₂ Uptake at Ambient Conditions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2018**, *549*, 147–154.
- (39) Kan, X.; Zhou, H.; Li, C.; Zhu, A.; Xing, Z.; Zhao, Z. Imprinted Electrochemical Sensor for Dopamine Recognition and Determination Based on a Carbon Nanotube/Polypyrrole Film. *Electrochim. Acta* **2012**, *63*, 69–75.
- (40) Fayemi, O. E.; Adekunle, A. S.; Ebenso, E. E. Electrochemical Determination of Serotonin in Urine Samples Based on Metal Oxide Nanoparticles/MWCNT on Modified Glassy Carbon Electrode. *Sens Biosensing Res* **2017**, *13*, 17–27.
- (41) He, Q.; Qiao, S.; Zhou, Y.; Vajtai, R.; Li, D.; Ajayan, P. M.; Ci, L.; Song, L. Carbon Nanotubes-Based Electrocatalysts: Structural Regulation, Support Effect, and Synchrotron-Based Characterization. *Adv. Funct. Mater.* **2022**, *32*.

- (42) Scotto, J.; Marmisollé, W. A.; Posadas, D. About the Capacitive Currents in Conducting Polymers: The Case of Polyaniline. *J Solid State Electrochem.* **2019**, *23*, 1947–1965.
- (43) Sharma, S.; Singh, N.; Tomar, V.; Chandra, R. A Review on Electrochemical Detection of Serotonin Based on Surface Modified Electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *107*, 76–93.

7. Anexos

7.1. Anexo I: Estudio de la estabilidad de la DA en el medio de reacción

7.1.1. Espectrometría UV-Vis

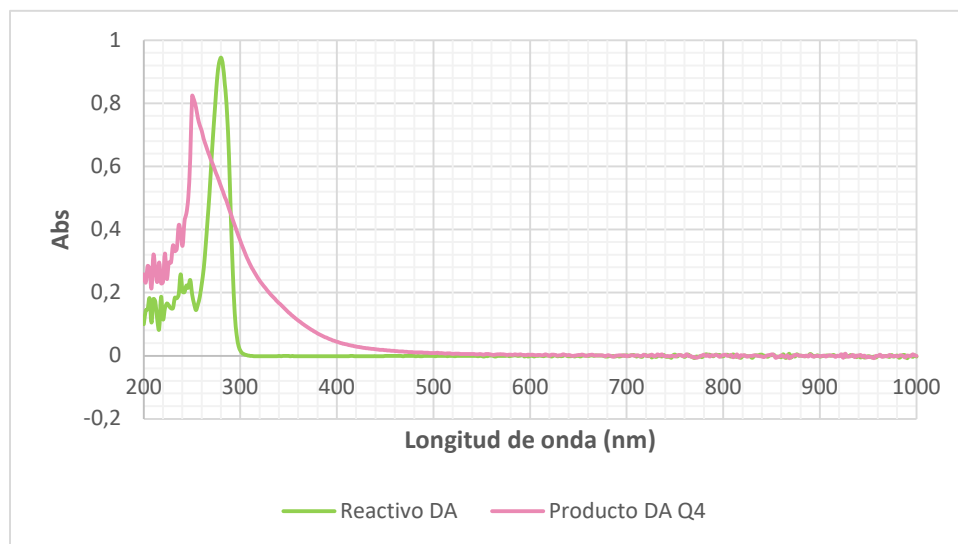


Figura 29. Comparación de los espectros UV-Vis del reactivo de DA empleado (hidrocloruro de DA) con el del producto resultante de la reacción Q4.

7.1.2. HPLC

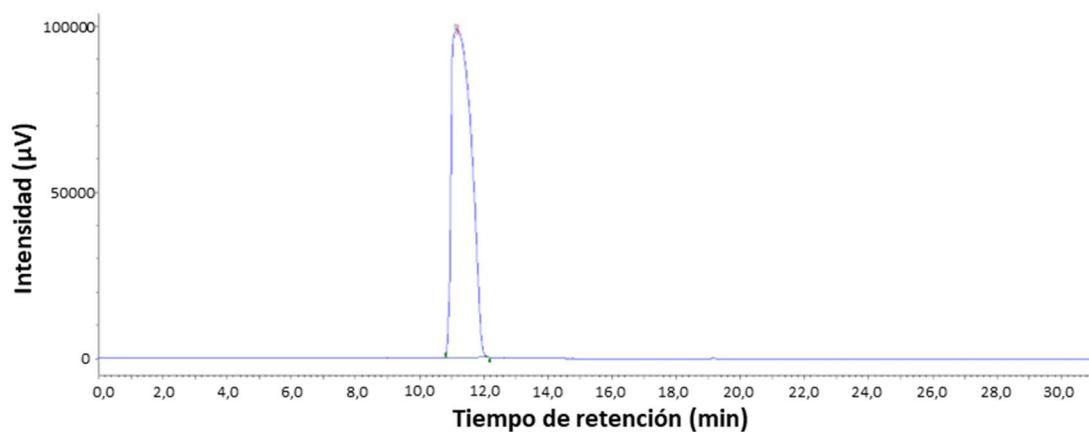


Figura 30. HPLC del hidrocloruro de DA a 280 nm.

Tabla 10. Datos del HPLC del hidrocloruro de DA a 280 nm.

Tiempo de retención	Área	Altura	Área%	Altura%
11,167	4233747	98515	100	100

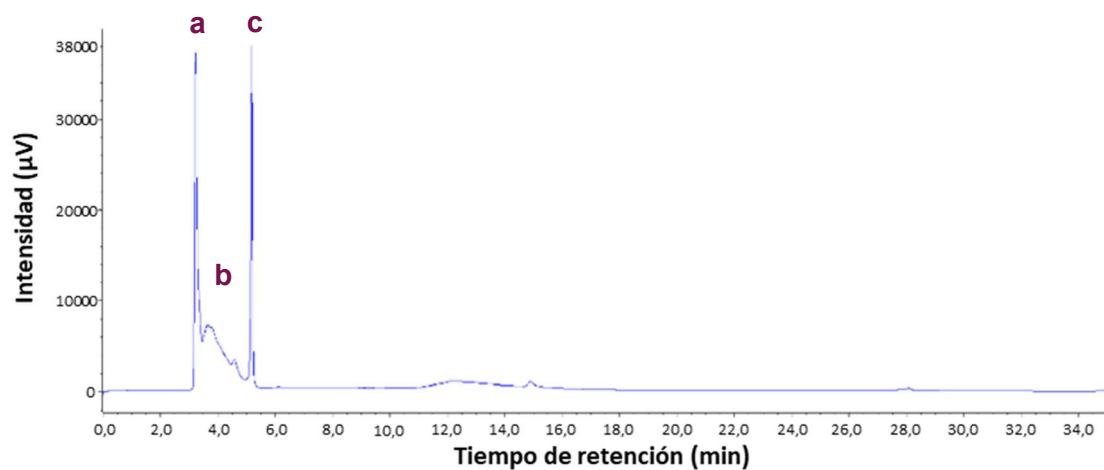


Figura 31. HPLC del producto de la reacción Q4 con DA a 280 nm.

Tabla 11. Datos del HPLC del producto de la reacción Q4 con DA a 280 nm.

Pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Área%	Altura%
a	3,150	134204	23527	51,485	60,030
b	5,125	23420	5252	8,984	13,400
c	11,85	103044	10414	39,531	26,571

7.1.3. Espectrometría de masas por electrospray

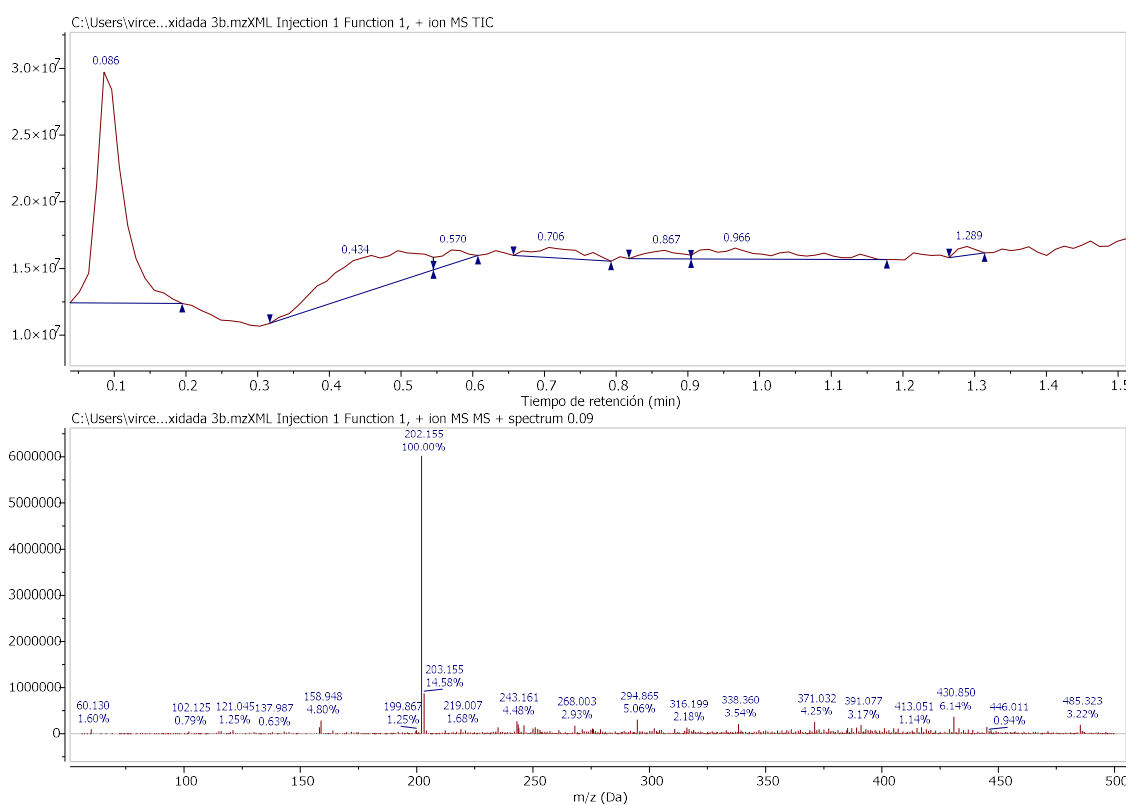


Figura 32. Espectro de masas correspondiente al pico a del HPLC del producto de Q4 con DA.

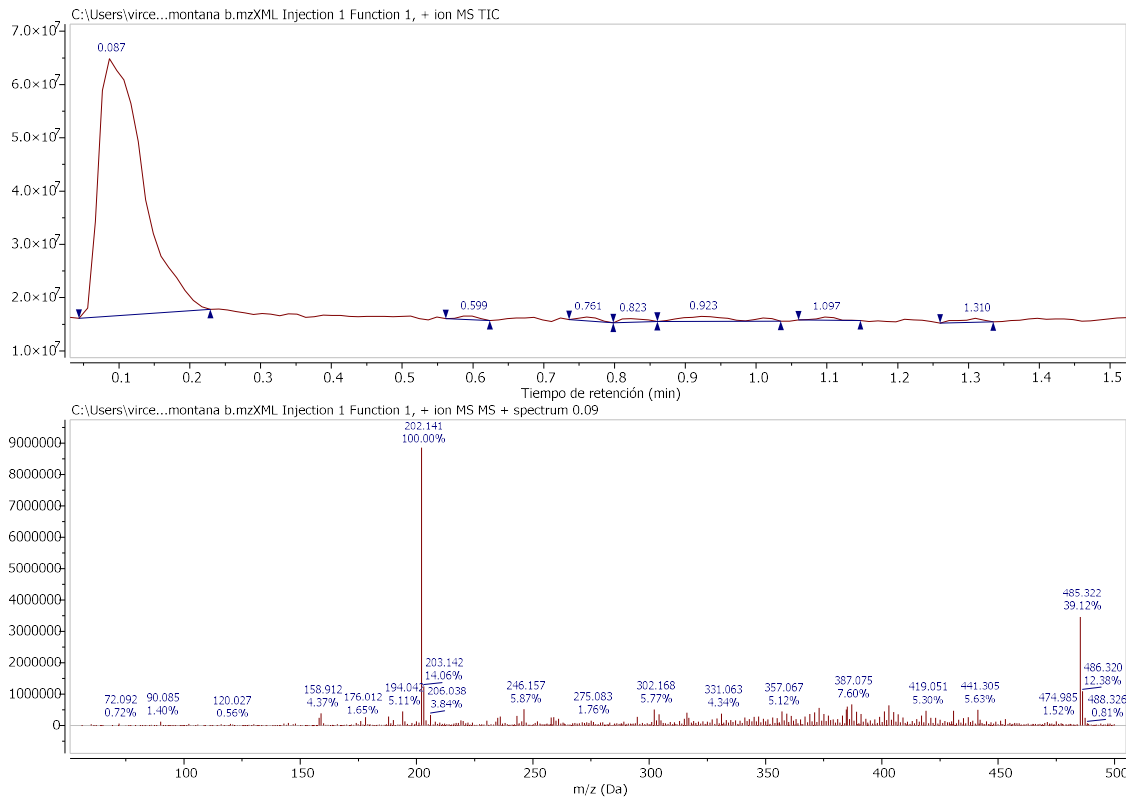


Figura 33. Espectro de masas correspondiente al pico b del HPLC del producto de Q4 con DA.

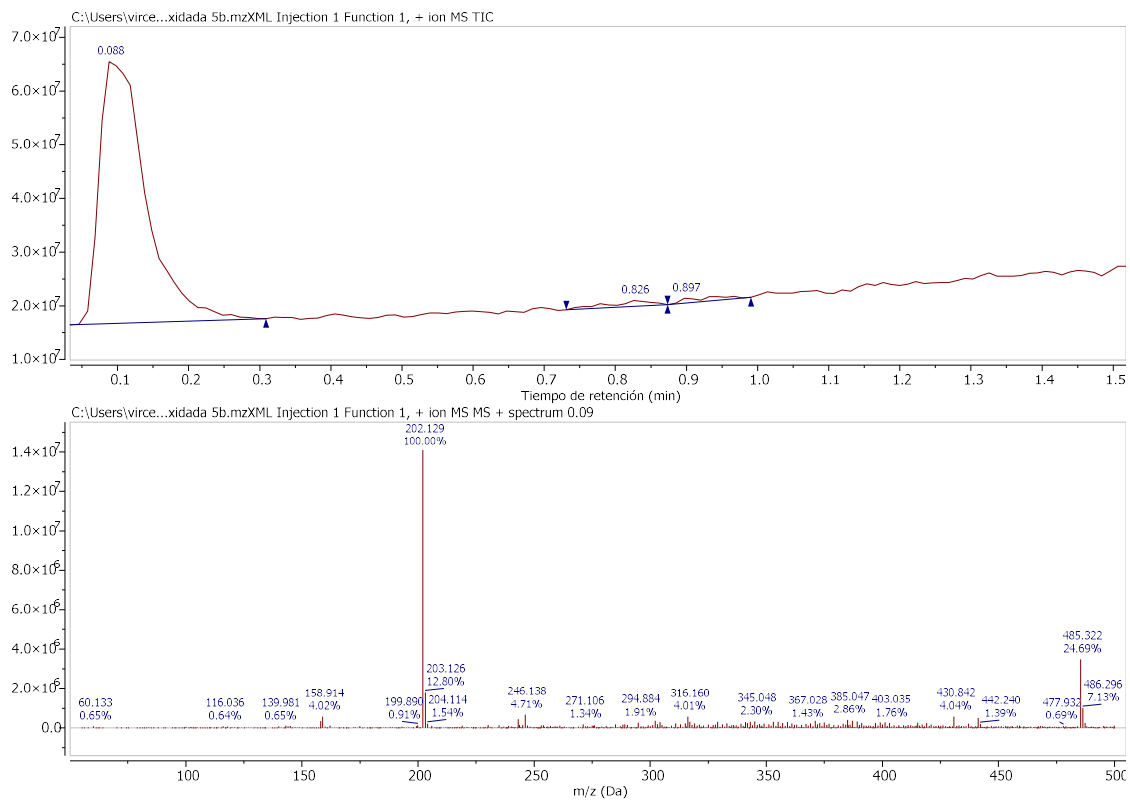


Figura 34. Espectro de masas correspondiente al pico c del HPLC del producto de Q4 con DA.