



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica
Carrera de Ciencias Biológicas

**Construcción de sensores electroquímicos
molecularmente impresos para la detección de
adenosina.**

Apecetche Manuela

Directora: Sacco J Natalia

Codirectora: Coria Oriundo Lucy L

junio 2024

**Laboratorio de Microbiología Ambiental y Nanotecnología.
Departamento de Química Biológica e IQUIBICEN.**

ÍNDICE

1 RESUMEN	3
2 INTRODUCCIÓN	5
2.1 Adenosina como marcador	5
2.2 Sensores químicos	6
2.2.1 Sensores electroquímicos	7
2.2.1.1 Técnica de impresión molecular	8
2.2.1.2 Polímeros conductores.....	9
3 OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	12
4 MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 Reactivos.....	13
4.2 Técnicas y métodos.....	13
4.2.1 Técnicas electroquímicas.....	13
4.2.1.1 Voltametría cíclica	13
4.2.1.2 Voltametría de pulso diferencial.....	15
4.2.2 Caracterización fisicoquímica.....	17
4.2.2.1 Microscopía electrónica de barrido	17
4.2.2.2 Microscopía de fuerza atómica	17
4.2.2.3 Espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada.....	17
4.3 FABRICACIÓN DE ELECTRODOS MODIFICADOS CON POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR	18
4.3.1 Síntesis de MIPs y NIPs.....	18
4.4 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS... 20	20
4.4.1 Caracterización electroquímica por CV	20
4.4.2 Caracterización microscópica.....	20
4.4.3 Caracterización espectroscópica.....	21
4.5 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS FRENTE A ADENOSINA.....	21
4.5.1 Cuantificación de adenosina	21
4.5.2 Prueba de selectividad	22
5 RESULTADOS.....	23
5.1 FABRICACIÓN DE ELECTRODOS MODIFICADOS CON POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR	23
5.1.1 Síntesis de MIPs y NIPs.....	23
5.2 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS... 26	26
5.2.1 Caracterización electroquímica por CV: medio ácido	26

5.3 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS FRENTE A ADENOSINA.....	29
5.3.1 Cuantificación de adenosina	29
5.4 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS....	34
5.4.1 Caracterización electroquímica por CV: medio neutro.....	34
5.4.2 Caracterización microscópica.....	36
5.4.2.1 AFM.....	36
5.4.2.2 SEM	38
5.4.3 Caracterización espectroscópica.....	40
5.5 ENSAYOS DE SELECTIVIDAD.....	41
5.5.1 Prueba de selectividad	41
6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	45

1 RESUMEN

La adenosina es un intermediario orgánico involucrado en diversas vías metabólicas, que se encuentra presente en distintos tejidos a nivel nanomolar. Sin embargo, en diversas patologías como cáncer, enfermedades autoinmunes y epilepsia, donde se presentan condiciones de isquemia, necrosis o inflamación aguda, se observa una sobreproducción de adenosina, pudiendo llegar a los 30 μM , tanto en plasma como orina. Por lo tanto, la adenosina se considera un biomarcador eficaz para la detección de diversas patologías.

El objetivo de esta tesis es la obtención de un sensor que permita la detección y cuantificación de adenosina, mediante técnicas de impresión molecular (MIT) utilizando técnicas electroquímicas, dada la simpleza del método y las ventajas respecto a su sensibilidad, selectividad y costo.

Con este fin, se fabricaron electrodos modificados con polímeros de impresión molecular basados en polianilina (PANI) mediante voltametría cíclica (CV) en presencia de adenosina como plantilla (MIPs), de manera de generar sitios de reconocimiento específicos para dicha molécula sobre la superficie del polímero. Se variaron parámetros electroquímicos durante el proceso, de forma de obtener distintos sistemas y evaluar las condiciones óptimas de síntesis para la obtención de un MIP que permita alcanzar mejores respuestas de corriente. Se evidenció la formación del polímero sobre la superficie del electrodo, por la presencia de picos correspondientes a los tres procesos de óxido reducción específicos del polímero, y se verificó la remoción de adenosina por voltametría de pulso diferencial (DPV). De esta manera, se determinaron las mejores condiciones de síntesis (50 mV/s y 50 ciclos) para la obtención del MIP. Luego, se estudió el medio más conveniente para el desarrollo del sensor. Para esto, se analizó la estabilidad del MIP en medio ácido y en medio neutro, mediante el estudio de la degradación del polímero durante el proceso de remoción, obteniéndose porcentajes de degradación de hasta 85 % en medio ácido y 25 % en medio neutro, consistentes con una degradación de PANI por hidrólisis.

Una vez determinadas las condiciones de síntesis y el medio a utilizar, se caracterizó el sistema. Mediante espectroscopía, se evidenció la generación de PANI sobre la superficie del electrodo. En la caracterización microscópica se determinó la rugosidad y la composición atómica de la superficie del MIP, coincidente con la presencia de sitios de reconocimiento específicos para adenosina, de igual manera que ocurrió en la caracterización electroquímica por CV donde se obtuvo un área electroactiva mayor en el caso del MIP respecto al NIP.

Finalmente, para estudiar la sensibilidad y selectividad del sistema, se analizó la respuesta del MIP frente a distintas concentraciones de adenosina. A partir de una curva de calibración obtenida de los ensayos de DPV, se encontró que el MIP cuenta con una sensibilidad mucho mayor respecto al NIP. Con este MIP se obtuvo un límite de detección de 0,54 μM y un rango lineal entre 5 y 100 μM , por lo que la sobreproducción de adenosina (30 μM) en condiciones patológicas puede ser detectada y cuantificada. La selectividad del sensor se estudió mediante la detección de adenosina en presencia de uridina, molécula que se encuentra tanto en plasma como orina, y se encontró que el sistema permite detectar adenosina por DPV, aun en presencia de una molécula muy similar estructuralmente.

Por lo tanto, los sensores electroquímicos basados en MIT sintetizados en este trabajo son eficientes en cuanto a sensibilidad y selectividad, para la detección y cuantificación de adenosina, y además, cuentan con ventajas sobre otras técnicas propuestas, debido a la simpleza del método y bajo costo del sistema.

1.1 ABSTRACT

Adenosine is an organic intermediary involved in several biochemical pathways, found in different tissues at nanomolar levels. However, in different pathologies such as cancer, autoimmune diseases, and epilepsy, where conditions of ischemia, necrosis, or acute inflammation occur, an overproduction of adenosine is observed, reaching up to 30 μM , both in plasma and urine. Therefore, adenosine is considered an effective biomarker for the detection of various pathologies.

The aim of this thesis is to obtain a sensor that allows the detection and quantification of adenosine, using molecular imprinting techniques (MIT) employing electrochemical methods, given the simplicity of the method and the advantages regarding sensitivity, selectivity and cost.

Therefore, electrodes modified with molecularly imprinted polymers based on polyaniline (PANI) were fabricated using cyclic voltammetry (CV) in the presence of adenosine as a template (MIPs), to generate specific recognition sites for this molecule on the polymer surface. Electrochemical parameters were varied during the process to obtain different systems and evaluate the optimal synthesis conditions to achieve better current responses. Polymer formation on the electrode surface was evidenced by the presence of peaks corresponding to the three specific redox processes of the polymer, and adenosine removal was verified by differential pulse voltammetry (DPV). In this way, the optimal synthesis conditions (50 mV/s and 50 cycles) for the obtention of MIP were determined. After that, the most suitable medium for sensor development was studied. The stability of the MIP in acidic and neutral media was analyzed by studying polymer degradation during the removal process, degradation percentages of up to 85% in an acidic medium and 25% in a neutral medium were obtained, consistent with PANI degradation by hydrolysis.

Once the synthesis and the medium to be used were determined, the system was characterized. Spectroscopic characterization revealed the generation of PANI on the electrode surface. Microscopic characterization yielded surface roughness and atomic composition of the MIP surface, consistent with the presence of specific recognition sites for adenosine, similar to what was observed in the electrochemical characterization by cyclic voltammetry (CV), where a larger electroactive area was obtained for the MIP compared to the NIP.

Finally, to study the sensitivity and selectivity of the system, the response of the MIP to several adenosine concentrations was studied. From a calibration curve obtained from DPV assays, it was found that the MIP has much higher sensitivity than the NIP. With this MIP, a detection limit of 0,54 μM and a linear range between 5 y 100 μM was obtained, so the overproduction of adenosine (30 μM) in pathological conditions can be detected and quantified. The sensor's selectivity was studied by detecting adenosine in the presence of uridine, a molecule present in both plasma and urine. It was found that the system indeed allows the detection of adenosine by DPV, even in the presence of a structurally very similar molecule.

Therefore, synthesized electrochemical sensors in this work, based on MIT, are efficient in terms of sensitivity and selectivity for the detection and quantification of adenosine. Additionally, they have advantages over other proposed techniques due to the simplicity of the method and low cost.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Adenosina como marcador

La adenosina es una purina ubicua formada por la unión de la adenina con un anillo de ribosa (Figura 1). Es generada endógenamente y participa en casi todos los aspectos de la fisiología celular, incluyendo actividad neuronal, función vascular, agregación plaquetaria y regulación de células de la sangre. Los efectos generados están mediados por la interacción de dicha molécula con receptores específicos que están expresados en varios tipos celulares y tejidos, lo que explica la diversidad de procesos en los que está involucrada [1–3].

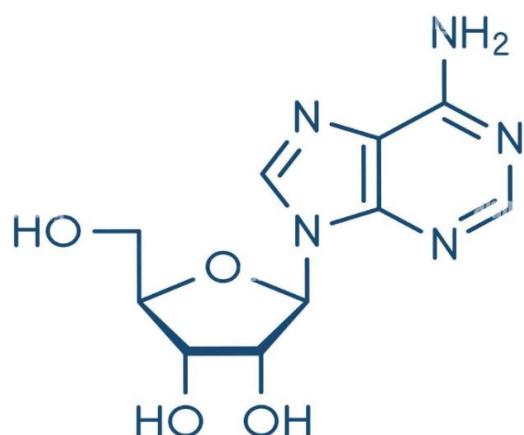


Figura 1: Estructura química de la adenosina.

La regulación de la concentración de adenosina, tanto dentro como fuera de la célula, es de gran importancia y esta mediada principalmente por la síntesis y degradación de adenosín trifosfato (ATP), aunque a su vez hay involucradas rutas metabólicas complejas [1,4–6]. Sin embargo, este proceso depende estrictamente del estado metabólico de la célula. La concentración extracelular de adenosina en condiciones fisiológicas normales suele estar en un rango de 20 a 300 nM, pero en condiciones de demanda metabólica y falta de oxígeno leves, puede llegar al orden micromolar [1–3]. Este hecho define a esta molécula como señal de estrés metabólico y por lo tanto, su incremento está mayormente asociado a efectos benéficos como son la vasodilatación e inflamación [7,8]. Sin embargo, luego de un daño celular grande que lleve a necrosis, isquemia e inflamación, los valores de adenosina extracelular pueden llegar hasta 30 μM, siendo estas condiciones consideradas patológicas [2,6]. Diversas enfermedades como epilepsia, patologías autoinmunes y cáncer, entre otras, demostraron generar sobreproducción de adenosina [1,2,9,10]. Es por esta razón que la adenosina es considerada un buen biomarcador para la detección de distintas patologías [10–12] y por lo tanto su determinación y cuantificación tiene gran importancia en el sector clínico.

En los últimos años, se han reportado diversas técnicas analíticas de detección para este analito tanto en plasma como en orina (dada su estabilidad y dificultad para metabolizarlo) [13]. Entre las técnicas más habituales se encuentran la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) [14,15] y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS-MS) [10,11]. Sin embargo, dichas técnicas requieren de instrumentos costosos y difíciles de transportar, pretratamientos de muestras largos y

tediosos, personal técnico altamente calificado, además de no contar con buena sensibilidad o estabilidad [16–18]. Por lo tanto, es de suma importancia el desarrollo de un método sencillo para la determinación de adenosina, que permita a su vez, obtener bajos límites de detección y alta selectividad.

2.2 Sensores químicos

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) define a un sensor químico como un dispositivo que transforma información química en una señal analítica útil. La información química puede originarse por una reacción química del analito, una propiedad física del sistema en estudio, como también un proceso bioquímico [19].

Un sensor químico cuenta con dos unidades funcionales básicas, el receptor y el transductor. El receptor transforma la información química de la muestra en una forma de energía que pueda ser medida por el transductor (etapa de reconocimiento). Este último transforma dicha energía en una señal analítica útil (etapa de amplificación de la señal) [19,20] (Figura 2).

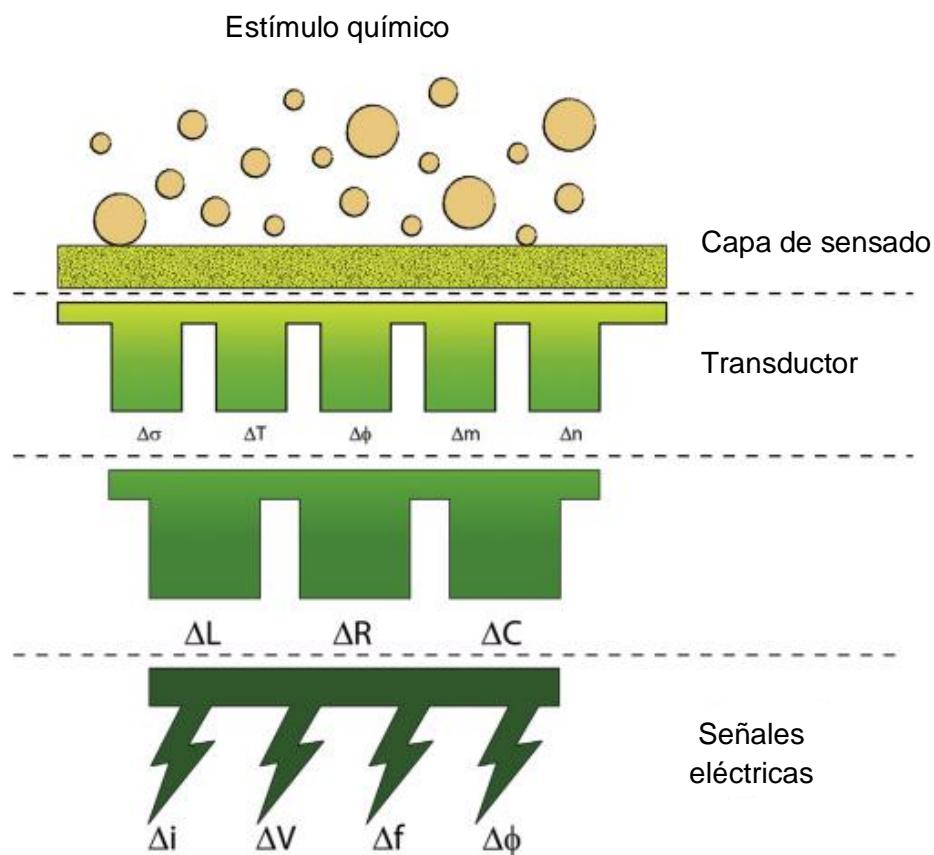


Figura 2: Estructura esquemática de un sensor químico. Adaptado de [20]

Algunos tipos de sensores requieren de condiciones bien definidas y pretratamiento previo de las muestras. Sin embargo, existen otros donde la señal del analito es independiente de otros componentes de la muestra y por lo tanto no se requieren pretratamientos, permitiendo el estudio de muestras complejas. Entre los sensores descriptos

se encuentran los ópticos, eléctricos, gravimétricos, magnéticos, termométricos y electroquímicos, que se diferencian por los principios de funcionamiento del transductor [19].

Un sensor ideal debería ser de bajo costo, portable, reutilizable y, por sobre todo, selectivo y sensible. La selectividad hace referencia a la habilidad del sensor para responder a un único analito. Por otro lado, la sensibilidad se relaciona con el límite de detección y remite a la mínima concentración de analito detectable por el sensor [21].

2.2.1 Sensores electroquímicos

Los sensores electroquímicos son dispositivos que convierten el efecto de la reacción redox sobre la superficie de un electrodo, en señales electrónicas legibles que muestran cambios en potencial, corriente o conductividad [22] (Figura 3).

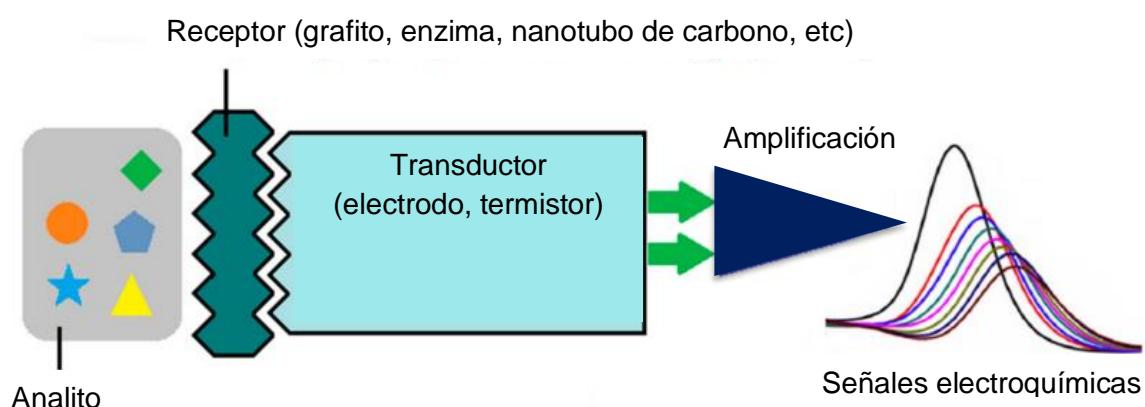


Figura 3: Diagrama esquemático de un sensor electroquímico. Adaptado de [23]

Se los puede clasificar en varias categorías, incluyendo amperometría, potenciometría, impedímetria, fotoelectroquímica y electroquimioluminiscencia, según la estrategia involucrada para traducir la señal [24]. Durante los últimos años, han sido requeridos para la investigación de especies biológicas, ambientales, industriales y farmacológicas, debido a la confiabilidad del sistema, alta sensibilidad y exactitud. Además, se destacan por su bajo costo y la simpleza del procedimiento. Por otro lado, este tipo de sensores pueden ser incorporados a dispositivos miniaturizados, robustos y fáciles de transportar [24].

El sensor electroquímico requiere de un electrodo de referencia, un contraelectrodo y un electrodo de trabajo. Este último, funciona como transductor y por tanto es el sitio físico donde ocurre la reacción redox. El potencial aplicado sobre dicho electrodo es controlado por un potenciómetro o galvanómetro. Por otro lado, el electrodo de referencia se mantiene a una distancia tal del sitio de reacción que permita mantener un potencial conocido y estable. Por último, el contraelectrodo establece una conexión con la solución electrolítica de manera que la corriente pueda ser aplicada en el electrodo de trabajo, siendo su propósito el de cerrar el circuito. Estos electrodos tienen que ser químicamente estables y conductores, es por eso que el platino, carbono y oro son los metales más utilizados, y su selección depende del analito a estudiar [25] (Figura 4). Los electrodos juegan un rol crucial en el funcionamiento del sensor electroquímico, considerando que las reacciones ocurren sobre el electrodo de

trabajo. Por lo tanto, su material y dimensiones influyen directamente en la eficiencia de detección.

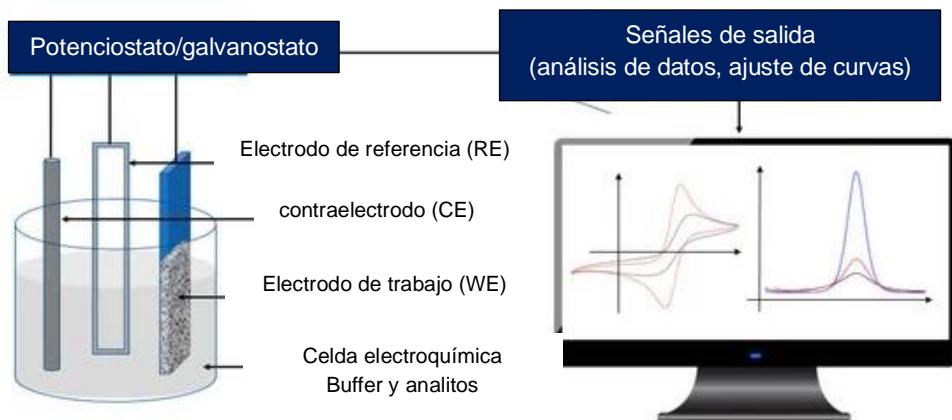


Figura 4: Sistema electroquímico de tres electrodos, controlado por un potenciómetro/galvanómetro conectado a una computadora. RE: electrodo referencia, CE: contraelectrodo, WE: electrodo de trabajo. Adaptado de [26].

Numerosos nanomateriales de diversas características como metales, polímeros conductores, óxidos metálicos y estructuras metal-orgánicas y basados en carbono, son incluidos en ensayos electroquímicos para optimizar el desempeño analítico. Además, se puede mejorar la sensibilidad, con el agregado de moléculas de reconocimiento como enzimas, anticuerpos y aptámeros sobre la superficie del electrodo, debido a su especificidad y efectividad para unirse a un analito en particular. Inclusive, modificando la superficie, la forma o la estructura del sensor, la sensibilidad del sistema puede ser optimizada incrementando la conductividad y área superficial [24].

Los sensores electroquímicos han ganado popularidad dadas las ventajas mencionadas en cuanto a costo, eficiencia y simpleza del sistema, incluyendo nuevas aplicaciones como la detección de una molécula única, análisis in vivo y diagnóstico, como también dispositivos vestibles [27,28].

2.2.1.1 Técnica de impresión molecular

La tecnología de impresión molecular (por sus siglas en inglés, MIT) es una técnica prometedora para el reconocimiento molecular, tanto de moléculas químicas como biológicas, que ofrece una vía alternativa a los métodos tradicionales de biorreconocimiento. El procedimiento funciona como un sistema tipo “cerradura y llave”, en términos de afinidad y especificidad, análogo a anticuerpos y enzimas en sistemas biológicos [29,30].

La técnica consiste en la polymerización de monómeros en presencia de una molécula como plantilla. Durante este proceso, el analito en cuestión queda inserto en la estructura polimérica, dadas las interacciones químicas entre polímero y plantilla. Esta última es removida posteriormente, de manera de originar sitios activos de reconocimiento específicos para la molécula plantilla, considerando que retienen la forma, el tamaño y las interacciones para unirse al analito, dado los grupos funcionales expuestos [31,32] (Figura 5).

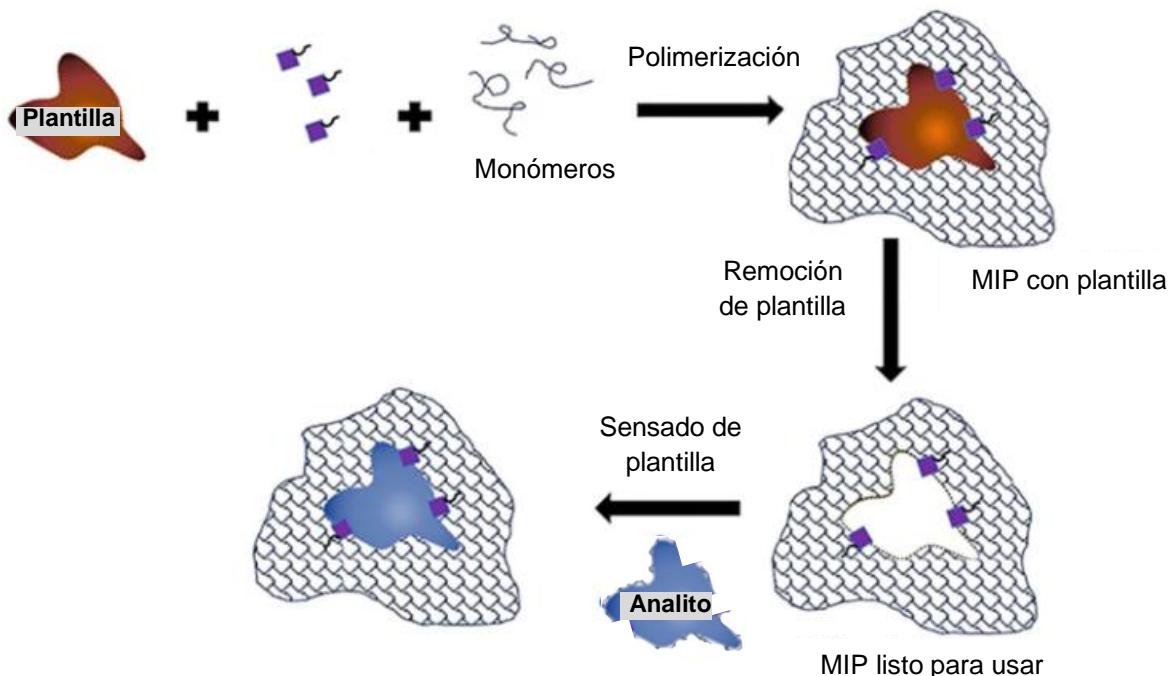


Figura 5: Esquema del proceso de síntesis de un MIP mediante MIT. Adaptado de [33].

El producto resultante de este proceso se conoce como polímeros de impresión molecular (MIPs) y pueden unir selectivamente analitos de interés, por ser utilizados como plantilla durante el proceso de formación del polímero. Estos sistemas combinan la alta afinidad y especificidad de los componentes naturales con la simpleza, robustez, bajo costo y estabilidad de los polímeros sintéticos [17,34,35]. Otra ventaja adicional respecto a los sistemas biológicos es la universalidad de aplicación. Los MIPs pueden generarse para casi cualquier molécula de interés, en contraste con los sistemas biológicos donde se debe tener en cuenta la especificidad natural de la enzima o anticuerpo, y muchas veces se ven limitados a macromoléculas [35,36]. Por otro lado, la formación de polímeros no impresos (por sus siglas en inglés, NIP) se generan a partir de la polymerización en ausencia de la molécula plantilla, y generalmente son utilizados como control para evaluar el desempeño de los MIPs.

Existen diversas técnicas de cuantificación, siendo la electroquímica una de las más sencillas, rápidas y de bajo costo. Uno de los métodos para generar un MIP, es en forma de películas sobre electrodos, mediante electropolymerización de monómeros. Además, las técnicas electroquímicas demuestran ser la técnica más beneficiosa en cuanto a la inmovilización del polímero en una ubicación precisa del electrodo, la deposición homogénea y la facilidad de controlar el grosor del polímero [35–37]. Mediante esta técnica se pueden analizar los cambios generados en la estructura del polímero cuando la molécula plantilla se incorpora en los sitios de reconocimiento. De esta manera, dependiendo del tipo de polímero, de la plantilla y de la interacción entre estos, es posible relacionar la concentración del analito en solución con la respuesta de corriente obtenida mediante una técnica electroanalítica [35].

2.2.1.2 Polímeros conductores

El objetivo de los monómeros funcionales es la generación de un complejo con la plantilla por medio de grupos funcionales, por lo tanto, es de suma importancia la selección de un monómero que permita la formación de un complejo donor-receptor entre polímero y

analito [36]. Entre los más utilizados en electroquímica se encuentran el pirrol, anilina, o-fenilendiamina, p-amino bencenotiol y 3,4-etilendioxitofeno, cuyos respectivos polímeros se caracterizan por su conductividad y capacidad de adsorción a distintas superficies [38]. Además, se destacan por sufrir cambios reversibles en cuanto a su conductividad (también en color y volumen si se utilizan otras técnicas distintas a la electroquímica) que los convierte en materiales aptos para sensar [39] (Figura 6).

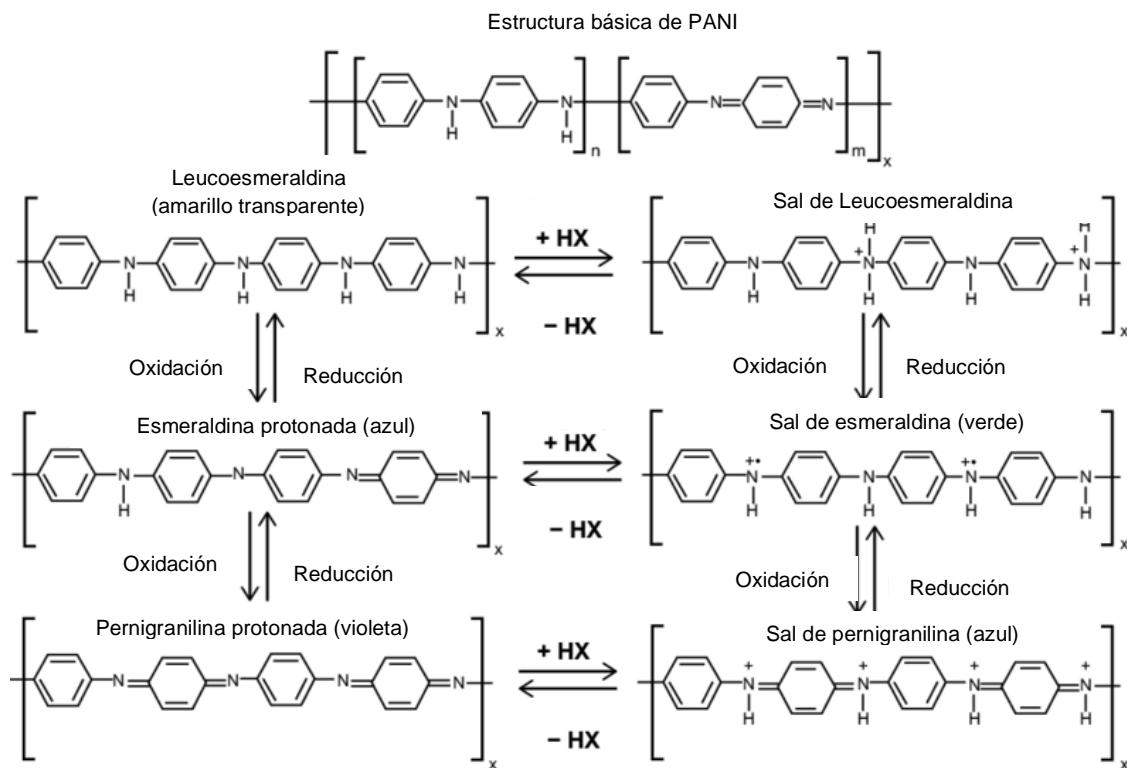


Figura 6: Estados redox y coloraciones de las distintas formas de PANI. Adaptado de [39].

Los polímeros conductores, están muy estudiados debido a sus propiedades excepcionales tanto eléctricas, como ópticas y mecánicas, y es por eso que tienen gran utilidad en el funcionamiento de dispositivos electrónicos y sensores. Cuentan con una alta flexibilidad y diversidad estructural, resistencia a la corrosión y baja densidad, además de ser muy simples de sintetizar a la vez que se puede controlar su forma y morfología, respecto a materiales inorgánicos equivalentes. Los átomos de carbono se encuentran enlazados por un conjunto alterno de enlaces simples y dobles, presentando así una conjugación extendida de los electrones π a lo largo de la cadena polimérica, responsable de su comportamiento óptico y eléctrico [40].

La polianilina (PANI) por su parte, cuenta con una buena combinación de conductividad y bajo costo de síntesis (Figura 7). Se conocen diversos métodos para formar el polímero, sin embargo, las técnicas electroquímicas son las más ampliamente usadas ya que permiten la deposición directa del polímero y el control del grosor, mediante la variación de los parámetros electroquímicos. En este tipo de síntesis ocurre una oxidación anódica del monómero precursor (anilina en este caso) en presencia de electrolitos adecuados, sobre la superficie de un material conductor inerte [41]. La técnica electroquímica más utilizada para estudiar procesos redox en polímeros conductores es la voltametría cíclica (CV). Esta técnica mide la corriente resultante al aplicar un potencial a una determinada velocidad de barrido. Durante la reacción redox, la reducción genera cargas negativas sobre la cadena polimérica

mientras que, la oxidación produce cargas positivas, proceso que permite el movimiento de iones dentro y fuera de la matriz del polímero.

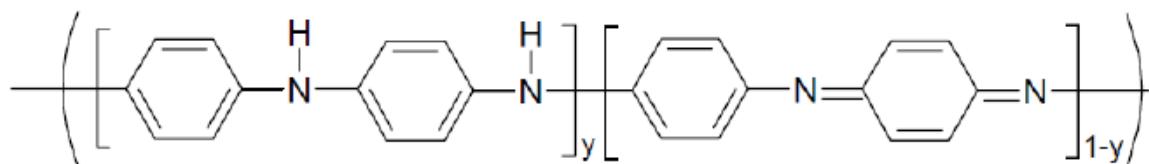


Figura 7: Estructura química de la unidad de repetición de PANI.

De esta manera, la PANI es considerada una plataforma ideal para el desarrollo de MIPs por su alta conductividad y su sencilla electropolimerización [42,43]. Además, su utilización se extendió por diversas áreas, como la detección de analitos asociados a patologías y antibióticos, como también contaminantes [17,42,44].

Teniendo en cuenta la simpleza del método y las ventajas respecto a su sensibilidad, selectividad y costo, se puede proponer el uso de MIPs basados en PANI como sensor electroquímico para la detección y cuantificación de adenosina. Además, se reportan varios trabajos donde se utiliza esta técnica en el ámbito clínico como método de diagnóstico o seguimiento de enfermedades, validando su efectividad [42,45].

3 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

En base a lo expuesto, la hipótesis de trabajo consiste en que los sensores molecularmente impresos basados en PANI permitirán la determinación selectiva y sensible de adenosina, mediante una técnica electroquímica sencilla reduciendo tiempos y costos.

El objetivo es el desarrollo de sensores electroquímicos molecularmente impresos como una nueva tecnología para determinar la presencia y cantidad de adenosina en muestras sintéticas.

Para abordar el objetivo propuesto se plantean los siguientes objetivos particulares:

Objetivo 1: Diseño o construcción de electrodos molecularmente impresos basados en PANI para la determinación de adenosina.

Objetivo 2: Estudio de la sensibilidad y selectividad de los sensores desarrollados.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

- Anilina comercial, Sigma-Aldrich. Grado analítico.
- Adenosina, Sigma-Aldrich (pureza ≥ 99.0 %). Grado analítico.
- H₂SO₄, Biopack. Grado analítico.
- KCl, Biopack. Grado analítico.
- Ferricianuro de potasio, Biopack. Grado analítico.
- Uridina, Sigma-Aldrich (pureza ≥ 99.0 %). Grado analítico.

En todos los casos, las soluciones fueron preparadas utilizando agua bidestilada.

4.2 Técnicas y métodos

4.2.1 Técnicas electroquímicas

En las técnicas electroquímicas se estudian los eventos que ocurren en la interfase electrodo/electrolito cuando se aplica un determinado potencial a través de esta. En este proceso ocurre una transferencia de electrones generando una oxidación o reducción de las especies electroactivas del electrolito o presentes sobre la superficie de un electrodo. El potencial aplicado se controla mediante el uso de un potenciómetro, el cual permite la variación de diversos parámetros electroquímicos según el estudio que se quiera realizar [46,47].

En este trabajo se utilizaron dos técnicas electroquímicas para caracterizar los sistemas, voltametría cíclica (CV) y voltametría de pulso diferencial (DPV).

4.2.1.1 Voltametría cíclica

La CV es una técnica electroquímica ampliamente usada en la investigación de los procesos de oxidación y reducción de especies redox del electrolito o presentes sobre la superficie de un electrodo. Suele utilizarse como técnica inicial en ensayos electroquímicos ya que da información sobre el proceso de electrodo en estudio. En una CV el potencial del electrodo de trabajo varía de forma lineal, a una velocidad de barrido constante hasta llegar a un potencial límite, y regresar de igual manera al potencial inicial, formando un ciclo. Durante el proceso se registra la corriente (*i*) del electrodo de trabajo, obteniéndose un gráfico de corriente en función del potencial aplicado (*E*) (curva voltamétrica) (Figura 8). Además, los límites de potencial definen las reacciones electródicas que pueden ocurrir, y la velocidad de barrido de potencial define la escala de tiempo en la que se evalúa el proceso electroquímico [25,47].

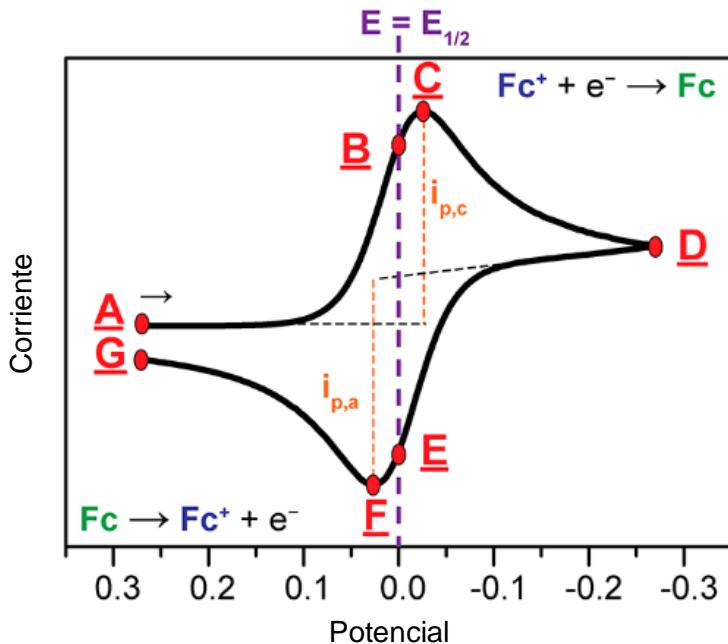


Figura 8: CV típica para un proceso reversible. F y C corresponden a los potenciales de pico catódico y anódico, respectivamente. $i_{p,c}$ y $i_{p,a}$ son las corrientes de pico catódico y anódico. Adaptado de [25].

En un proceso reversible, si el potencial se barre a través del intervalo correspondiente, se da la oxidación de la especie electroactiva sobre la superficie y por lo tanto la corriente anódica aumenta hasta que la concentración superficial llega a cero. Además, como la concentración superficial se mantiene en cero, y con el tiempo el flujo hacia la superficie disminuye, la densidad de corriente decrece, y por consiguiente la respuesta presenta un pico. Para el barrido de retorno, la corriente cambiará su signo y pasará de nuevo a través de un pico, en un proceso similar al descrito anteriormente.

En los procesos *quasi-reversibles*, la velocidad de transferencia de electrones es insuficiente para mantener las especies en equilibrio en la interfase electrodo/solución, por lo que, la forma de la voltametría cíclica es distinta. A baja velocidad de barrido el sistema se comporta reversiblemente ya que el cambio de potencial es lento y el sistema tiene tiempo como para que el material más próximo a la superficie del electrodo se equilibre según el potencial aplicado. Sin embargo, a medida que la velocidad de barrido se incrementa, la velocidad de transferencia electrónica no se equipara y las condiciones superficiales del sistema redox no alcanzan a equilibrarse. Esto se evidencia en un desplazamiento de los picos hacia potenciales más extremos (positivos en el caso de la oxidación y negativos para la reducción) haciendo mayor la separación entre picos.

Si el proceso es completamente irreversible, es decir, cuando la transferencia de electrones es a la superficie del electrodo es más lenta que el transporte de masa, se observa la ausencia de pico cuando se invierte el barrido de potencial. Además, en este caso, el potencial de pico, E_p , depende de la velocidad de barrido [25,47].

Cuando se tiene una especie adsorbida, las propiedades del voltágrafo están determinadas por el número de sitios sobre la superficie electródica donde se produce la adsorción. La principal diferencia entre especies adsorbidas en comparación con especies en solución es que los picos son simétricos y más agudos, y que las cargas asociadas con los procesos anódicos y catódicos son iguales. La simetría de los picos se debe a que solamente puede ser reducida la cantidad de reactante presente sobre la superficie del electrodo. La

corriente aumenta desde cero hasta la corriente de pico y cae nuevamente a cero después de alcanzar el potencial de pico, cuando el reactivo se consume en su totalidad. La densidad de corriente de pico es proporcional a la velocidad de barrido del potencial, la carga requerida para oxidar la capa adsorbida es independiente de la velocidad de barrido de potencial y, además, la separación entre picos de oxidación y reducción es 0 mV para una pareja con transferencia electrónica rápida, ya que la difusión no interviene en este proceso (Figura 9).

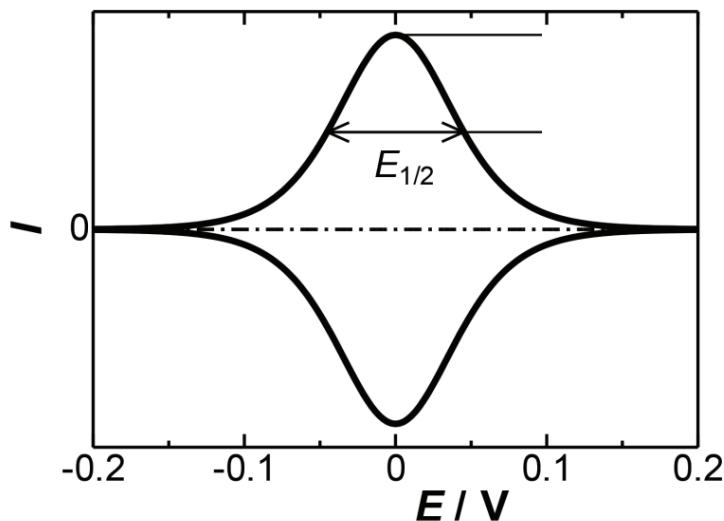


Figura 9: CV teórica para una especie adsorbida sobre el electrodo, comportamiento reversible. $E_{1/2}$ ancho de pico a mitad de altura. Adaptado de [46].

Por otra parte, en un sistema irreversible, el pico de ida no es simétrico y no se observa el pico para el proceso inverso. En el caso de un sistema *quasi-reversible*, se observa un pico de vuelta, pero los picos no son simétricos y no coinciden los potenciales de pico.

Cuando se tiene una especie electroactiva unida químicamente al electrodo, se le llama electrodo químicamente modificado. Este tipo de electrodos han sido ampliamente estudiados principalmente por su aplicación en procesos catalíticos, y las especies electroactivas se comportan como se mostró en la Figura 9. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los procesos superficiales pueden estar acoplados con procesos de difusión de otras especies desde la solución [46,48].

La reversibilidad química se utiliza para evaluar si la especie redox es estable tras la reducción y puede reoxidarse posteriormente. En los casos en el que la pareja redox actúa como marcador de otro fenómeno, como en el caso de los sensores, es necesario que el proceso redox sea reversible [25].

4.2.1.2 Voltametría de pulso diferencial

La DPV es una técnica electroquímica en la que el potencial aplicado aumenta en forma de pulsos, siguiendo una rampa de potencial de referencia (Figura 10). Se puede modificar la amplitud de cada pulso, como también la duración de retorno a la línea base, según el uso que quiera darse a la técnica.

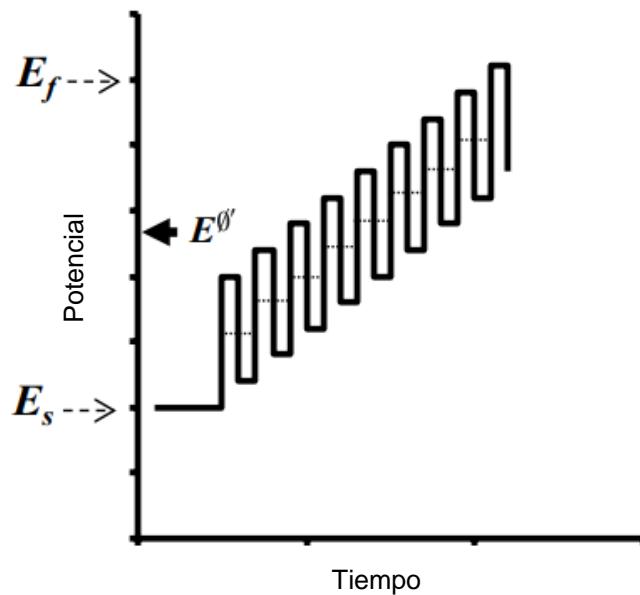


Figura 10: Dependencia del potencial en función del tiempo, en forma de pulsos. Adaptado de [47].

Durante el proceso, se registran dos valores de corriente, antes y después del pulso, es decir la corriente de doble capa y la corriente redox (Faradaica), respectivamente. Con estas dos corrientes es posible sustraer la corriente de doble capa de manera de incrementar la señal de la corriente redox. De esta forma, se pueden detectar corrientes bajas que en otras condiciones estarían enmascaradas por la doble capa, es decir que la sensibilidad es mayor respecto a otras técnicas electroquímicas. Es por esto que suele utilizarse en ensayos donde las concentraciones de analito a estudiar son muy bajas, por lo tanto, juega un rol importante en la generación de sensores.

Un gráfico típico de DPV muestra la corriente respuesta en función del potencial aplicado. Las curvas resultantes consisten en una serie de picos para una señal de corriente de doble capa casi nula (Figura 11).

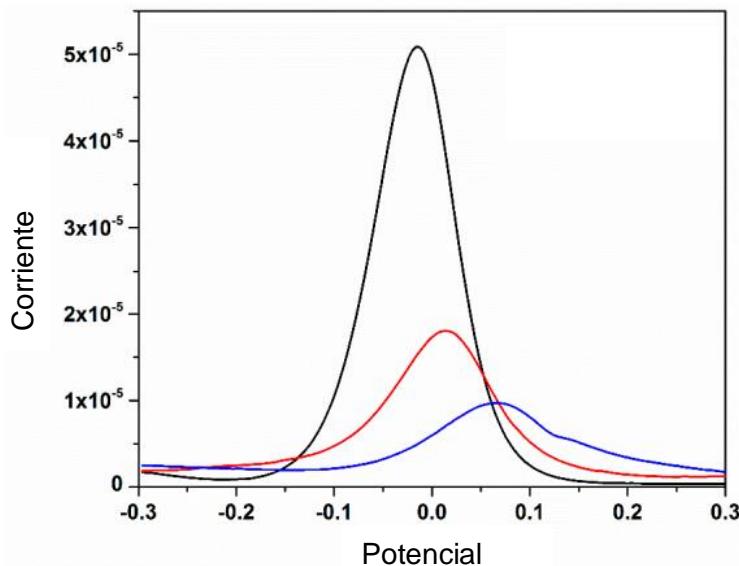


Figura 11: Voltagrama de DPV típico. Adaptado de [49].

Además, la corriente de pico refleja la cantidad de moléculas redox que están siendo oxidadas o reducidas. Por lo tanto, mediante la generación de una curva de calibración de las corrientes de pico a distintas concentraciones de analito, se puede realizar una cuantificación. A su vez, el potencial correspondiente al pico es de gran importancia, debido a que dicho valor es específico de ciertas especies químicas, por lo que se utiliza como método de identificación de la composición de muestras. Incluso, dependiendo del proceso redox en estudio, dicho potencial puede depender del pH del medio [50].

4.2.2 Caracterización fisicoquímica

4.2.2.1 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM), permite estudiar directamente la superficie de muestras sólidas mediante la generación de imágenes de alta resolución. Utiliza un haz de electrones enfocados con energía relativamente baja como una sonda de electrones que se escanea de forma regular sobre la muestra. La acción del haz de electrones estimula la emisión de electrones dispersados de alta energía y electrones secundarios de baja energía de la superficie de la muestra, de manera de generar una imagen.

Las principales condiciones operativas instrumentales que se pueden variar en SEM son: el voltaje de aceleración, la velocidad de exploración, el tamaño del punto/corriente del haz, el tamaño de la apertura, la distancia de trabajo y la inclinación. La elección del voltaje depende de la naturaleza del material de la muestra y del rango de aumento y la resolución de imagen requerida [51,52].

4.2.2.2 Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM), es una técnica de medida superficial que se basa en la interacción de una punta de escala nanométrica situada en el extremo de una palanca flexible con la superficie de la muestra manteniendo constante una pequeña fuerza de interacción. El barrido lo realiza un escáner piezo-eléctrico, y la interacción punta/muestra se monitoriza reflejando un láser en la parte trasera de la palanca, que se recoge en un detector fotodiodo. El fotodiodo está dividido en 4 segmentos, y las diferencias de voltaje entre los distintos segmentos determinan con precisión los cambios en la inclinación o amplitud de oscilación de la punta.

Esta técnica permite el análisis superficial de muestras con resolución nanométrica o incluso atómica. Como principal ventaja tiene la posibilidad de hacer medidas sin ningún tratamiento previo de la muestra a medir, y sin la necesidad de emplear vacío [53].

4.2.2.3 Espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada

La espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada (ATR-IR) es una técnica que se basa en la introducción de una radiación infrarroja sobre un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito.

Esta técnica, en comparación con otras espectroscopías, no requieren de preparación de las muestras y esta última puede ser de cualquier material, forma y tamaño [54].

4.3 FABRICACIÓN DE ELECTRODOS MODIFICADOS CON POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR

Se sintetizan distintos MIPs mediante CV utilizando adenosina como plantilla, la cual es removida una vez generado el polímero. Además, se procede a sintetizar NIPs siguiendo la misma metodología y condiciones que para sintetizar el MIP, pero en ausencia de adenosina, como control.

4.3.1 Síntesis de MIPs y NIPs

Para el desarrollo del ensayo se utiliza un sistema electroquímico de tres electrodos, formado por un electrodo de trabajo de grafito con un área geométrica de $0,093\text{ cm}^2$, un contraelectrodo del mismo material y un pseudoreferencia de Ag/AgCl (Figura 12).

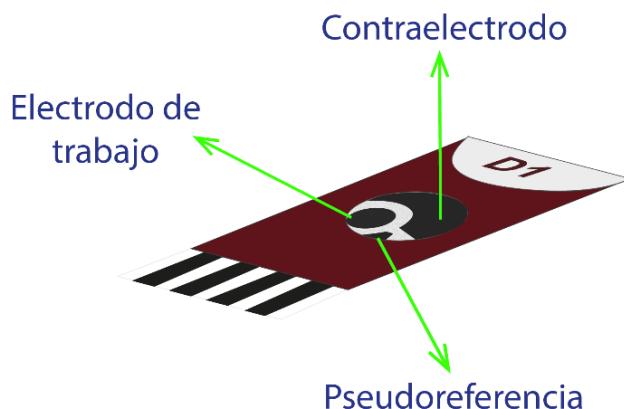


Figura 12: Electrodo serigrafiado de grafito utilizado para la electropolimerización de anilina, tanto para los MIPs como NIPs.

Este sistema se usa con conexiones eléctricas a cada electrodo tal que permite conectarlo a las terminales de un potenciómetro (Squidat Solo, Admiral Instruments) mediante el cual se varían los parámetros electroquímicos, según el ensayo a realizar. Durante cada medición, el sistema de tres electrodos se encuentra en contacto completo con la solución electrolito usada para cada síntesis o caracterización. Sin embargo, en dichos procesos el electrodo de trabajo es el único que sufre modificaciones sobre su superficie (Figura 13).

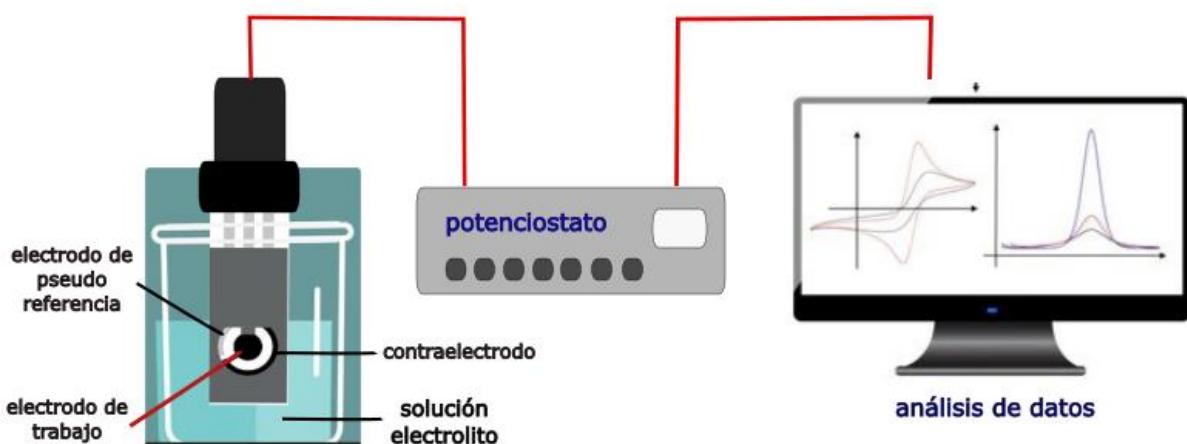


Figura 13: Sistema electroquímico de tres electrodos conectado a las terminales de un potenciómetro, asociado a una computadora.

Los MIPs y NIPs basados PANI fueron sintetizados mediante electropolimerización de anilina 10 mM, en medio ácido (H_2SO_4 0,5 M) sobre electrodos serigrafiados de grafito. En el caso de los MIPs, se utilizó además adenosina como plantilla en una concentración de 2,5 mM. Para esto, se usó CV realizando barridos de potencial entre -0,2 y 1 V a una determinada velocidad de barrido. En este caso, se utilizó un electrodo de referencia externo de Ag/AgCl y una cubeta en la cual se colocaron 5 ml del electrolito donde se sumergió el electrodo en su totalidad, como se representa en el esquema de la Figura 13.

Para evaluar las diferencias entre distintos sistemas, se estudió la síntesis de MIPs variando parámetros durante las CV, como la cantidad de ciclos (20, 50 y 100 ciclos) y la velocidad de barrido (50 y 100 mV/s), como se detalla en la Tabla 1, de manera de obtener un total de 12 sistemas distintos. Una vez elegido el MIP más eficiente para los objetivos del trabajo, se continuó con los ensayos de caracterización y evaluación de respuesta, únicamente con dicho MIP (MIP2, 50 ciclos y 50 mV/s).

Tabla 1: Parámetros utilizados para la síntesis de distintos NIPs y MIPs mediante voltametría cíclica.

	Velocidad de barrido (mV/s)	Ciclos	Concentración de anilina (mM)	Concentración de adenosina (mM)
NIP/MIP1	50	20	10	0/2,5
NIP/MIP2		50		
NIP/MIP3		100		
NIP/MIP4	100	20		
NIP/MIP5		50		
NIP/MIP6		100		

Para la generación de los sitios de reconocimiento específicos para adenosina sobre la superficie del polímero (MIPs), se realizó la remoción de dicha molécula mediante CV. Para

esto se realizaron barridos de potencial entre -0,2 y 0,9 V a una velocidad de 100 mV/s y se utilizaron como electrolito soluciones a distintos pH, medio ácido (H_2SO_4 0,5 M) o neutro (KCl 0,1 M).

Además, para verificar que la plantilla se estuviera removiendo, se analizó la solución electrolito luego de realizar el proceso de remoción, de manera de estudiar la presencia de adenosina en esa solución remanente. Se utilizó un electrodo de grafito sin modificar como electrodo de trabajo y se realizaron medidas de DPV entre 0 y 1,2 V, usando un electrodo de referencia externo Ag/AgCl. Para esto, se utilizó una altura de pulso de 0,01 V, un ancho de pulso de 0,01 s y un período de 0,2 s. Este proceso se repitió cada 10 ciclos de remoción hasta obtener una corriente de pico constante, es decir, cuando la cantidad de adenosina en la solución no cambia, indicando que no se está removiendo más adenosina.

4.4 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS

Se realiza una caracterización de la superficie de los electrodos modificados con los polímeros MIP y NIP, respecto al comportamiento redox, como también su rugosidad y morfología mediante técnicas electroquímicas y microscopía, respectivamente. Además, se estudia el efecto de la incorporación de adenosina en los distintos sistemas por técnicas espectroscópicas.

4.4.1 Caracterización electroquímica por CV

Con el fin de estudiar el comportamiento redox del polímero y poder determinar su área electroactiva, se realizó una caracterización por CV usando como electrolito una solución de ferricianuro 5 mM (en KCl 0,1 M). Para esto, se emplearon como electrodos de trabajo MIPs (removidos en medio ácido, H_2SO_4 0,5 M, o medio neutro, KCl 0,1 M) y NIPs como control, como también electrodos sin modificar. Además, Se realizaron distintas CVs con barridos entre -0,5 y 0,65 V a varias velocidades de barrido entre 5 y 250 mV/s. En el estudio en medio ácido se utilizó un electrodo de pseudoreferencia de Ag/AgCl y un contraelectrodo de grafito, ya que de esta manera se pueden usar volúmenes pequeños. Sin embargo, al estudiar el medio neutro se necesitó de un electrodo de referencia externo de Ag/AgCl, ya que a valores de pH más altos, los potenciales se desplazan hacia valores más bajos. No se recomienda el uso del pseudoreferencia del electrodo serigrafiado en estas situaciones ya que puede desprender algunas impurezas provenientes de las tintas utilizadas durante su fabricación.

4.4.2 Caracterización microscópica

Se estudió la superficie del polímero mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de barrido (SEM), para analizar la rugosidad y morfología, además de la composición atómica, respectivamente. En el primer caso, se sintetizaron MIPs, MIPs con adenosina incorporada (MIP+A) y un NIP, siguiendo el protocolo desarrollado con anterioridad (4.3.1 Síntesis de MIPs y NIPs), sobre una superficie de oro ultraplano utilizando un electrodo de referencia externo de Ag/AgCl y un alambre de platino como contraelectrodo. Para esto se usó un equipo de AFM Agilent 5500 y se estudiaron las muestras empleando el

modo de contacto, mediante la utilización de puntas aislantes Si PointProbe Plus PPP-CONT (radio de punta <10 nm, una constante de fuerza de 0,2 N/m y una frecuencia de resonancia de 13 kHz).

Por otro lado, para SEM se emplearon NIPs y MIPs (con remoción en medio neutro, KCl 0,1 M) sintetizados sobre una superficie de oro ultraplano, en las mismas condiciones que el caso anterior. A su vez, se utilizó un MIP sometido a la detección de una concentración de adenosina de 100 μ M, para estudiar las diferencias respecto a sistemas en ausencia de dicho analito. Para esto se usó un modelo de SEM Evo 10, Zeiss y se trataron las muestras con un voltaje de aceleración de 20,00 kV.

Además, por análisis de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS) acoplado a SEM, se estudió la composición química de las distintas superficies mediante la obtención del porcentaje de peso atómico de cada elemento involucrado.

4.4.3 Caracterización espectroscópica

De manera de analizar las interacciones existentes entre el polímero y la adenosina, se utilizó la técnica de espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada (ATR-IR). Para esto se empleó un NIP y un MIP con adenosina incorporada a la superficie del polímero. En ambos casos se utilizó el protocolo descripto con anterioridad para síntesis y remoción mediante CV (4.3.1 Síntesis de MIPs y NIPs). Para este procedimiento se usó un espectrómetro Thermo Nicolet 8700 con detector DTGS y un cristal de diamante, realizando 64 barridos por muestra de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

4.5 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS FRENTE A ADENOSINA

Se procede a estudiar la eficiencia del sistema (MIP) para la detección de adenosina, mediante la utilización de electrodos modificados como sensores de distintas concentraciones de adenosina. A partir de esto, se construye una curva de calibración de corriente de pico en función de la concentración de adenosina. Además, se evalúa la selectividad frente a adenosina de los sensores construidos.

4.5.1 Cuantificación de adenosina

Para la cuantificación de adenosina se emplearon dos medios a distintos pH, un medio ácido (H_2SO_4 0,5 M) y otro neutro (KCl 0,1 M), y se estudió un rango de concentraciones de adenosina entre 5 y 100 μ M. Se analizaron las muestras mediante DPV realizando barridos de potencial entre -0,3 a 0,9 V o -1,1 a 0,9 V, para medio ácido y medio neutro respectivamente, utilizando un electrodo de pseudoreferencia y considerando las mismas condiciones de DPV establecidas anteriormente (4.3.1 Síntesis de MIPs y NIPs). En el caso del estudio con MIP, se utilizó un electrodo nuevo para la medición de cada concentración, de forma de medir siempre con una superficie nueva. Además, entre cada medición se registró la corriente de pico correspondiente al blanco (medición del MIP o NIP en solución de H_2SO_4 0,5 M o KCl 0,1 M) de manera de relativizar los valores obtenidos para cada concentración.

4.5.2 Prueba de selectividad

Se realizó una prueba de cuantificación en presencia de uridina 100 μM , como también una solución compuesta por 100 μM o 50 μM de uridina en conjunto con 100 μM de adenosina en KCl 0,1 M. Para esto, se realizó DPV entre -0,65 a 0,35 V, para MIPs y NIPs, utilizando un electrodo de referencia externo de Ag/AgCl. Además, se consideraron las mismas condiciones establecidas anteriormente para DPV (4.3.1 Síntesis de MIPs y NIPs). Los MIPs estudiados fueron removidos en medio neutro (KCl 0,1 M).

Para la cuantificación de los resultados, se consideraron los cambios en la corriente de pico anódica alcanzados con cada sistema respecto al blanco, obtenido a partir de la medición de DPV en una solución de KCl 0,1 M.

5 RESULTADOS

5.1 FABRICACIÓN DE ELECTRODOS MODIFICADOS CON POLÍMERO DE IMPRESIÓN MOLECULAR

5.1.1 Síntesis de MIPs y NIPs

Se obtuvieron voltágrafos correspondientes a los 12 sistemas sintetizados, MIPs y NIPs, (Tabla 1) a partir de la técnica de CV, realizando barridos de potencial que promovieran la oxidación del monómero para formar el polímero (se muestran dos sistemas como ejemplo en las Figuras 14 y 15). A pesar de que no se muestran todos los espectros obtenidos por CV, en todos los casos se evidencia la formación de polímero (PANI) sobre la superficie del electrodo, por la presencia de picos correspondientes a los tres procesos de óxido reducción específicos del polímero observados a 0,2, 0,5 y 0,8 V vs Ag/AgCl, coincidente con datos bibliográficos [40,55]. Además, se observa que las corrientes asociadas a esos picos característicos de PANI, aumentan con el transcurso de los ciclos de CV (Figura 14 y 15), lo que correlaciona con una mayor cantidad de polímero formado sobre la superficie. Siguiendo la misma línea de razonamiento, los sistemas que fueron sintetizados por un mayor número de ciclos, alcanzaron valores de corriente más altos comparado con el resto de los sistemas (ver Figuras 14A y 14B; 15A y 15B)

Por otro lado, no se observan diferencias significativas entre los perfiles correspondientes a los MIPs y NIPs sintetizados en iguales condiciones de velocidad y cantidad de ciclos, ya que la cantidad de adenosina utilizada como plantilla es pequeña y por lo tanto, el pico correspondiente a su oxidación es imperceptible respecto a la señal de corriente del polímero (ver Figuras 14A y 15A; 14B y 15B).

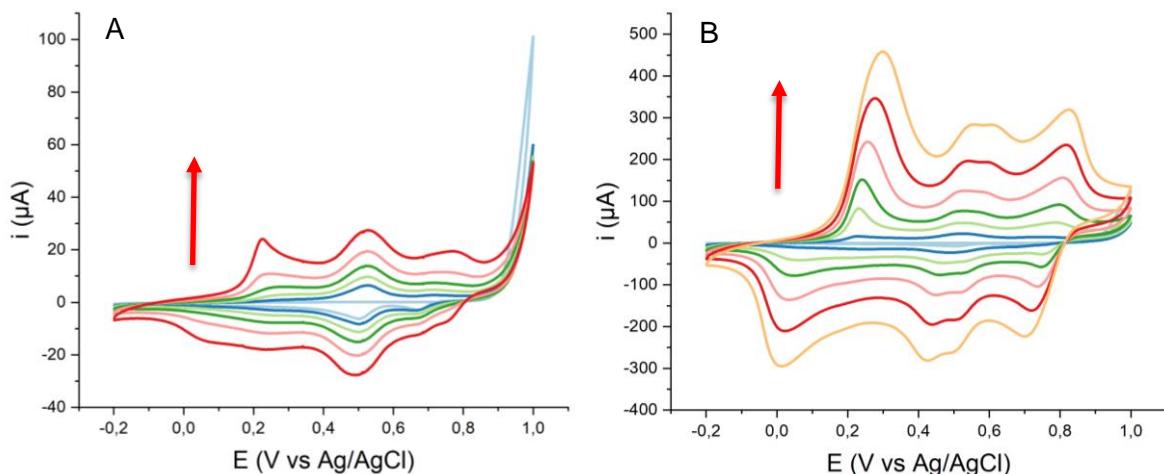


Figura 14: CV a 50 mV/s obtenidas durante la electropoliimerización de anilina en ausencia de adenosina por (A) 50 ciclos (NIP2) (B) 100 ciclos (NIP3). La flecha roja indica el incremento con el número de ciclos.

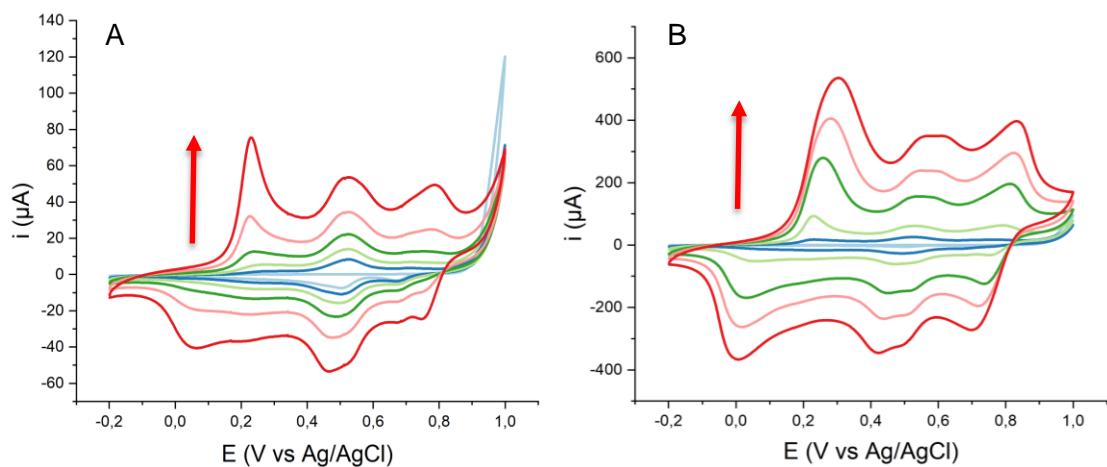


Figura 15: CV a 50 mV/s obtenidas durante la electropolimerización de anilina en presencia de adenosina por (A) 50 ciclos (MIP2) (B) 100 (MIP3). La flecha roja indica el incremento con el número de ciclos.

La remoción de la adenosina en el caso de los MIPs se realizó mediante CV ya que, durante ese proceso, el polímero se oxida y reduce generando cambios en su estructura que rompen las interacciones hidrofóbicas y puente de hidrógeno existentes entre el polímero y la adenosina. Se evidenció dicho proceso con el análisis de la solución electrolito realizado cada 10 ciclos de remoción, de manera de estudiar la presencia de adenosina en esa solución remanente, siguiendo el proceso que se muestra en el esquema de la Figura 16. Para esto se realiza DPV utilizando un electrodo de grafito sin modificar como electrodo de trabajo y se analiza el aumento en la señal de corriente correspondientes a la adenosina (Figura 17).

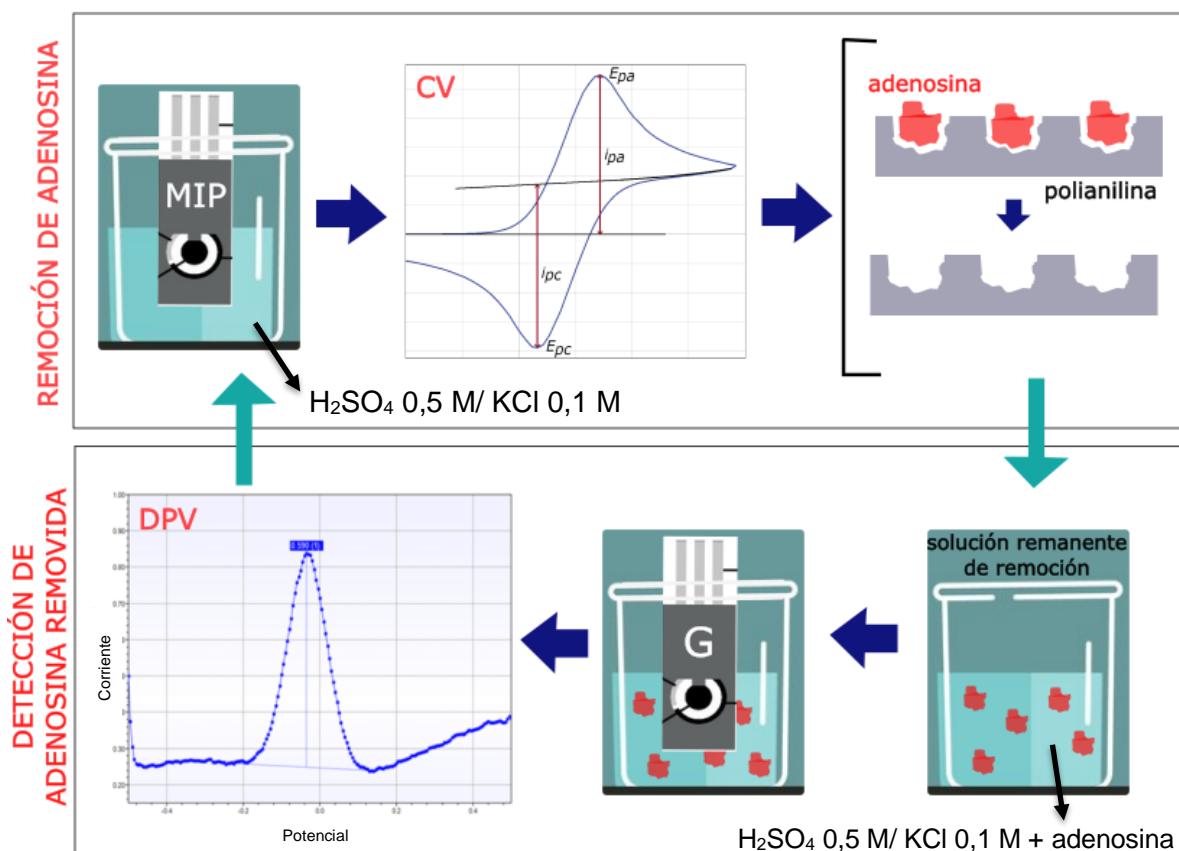


Figura 16: Esquema del proceso de 10 ciclos de remoción y estudio de la presencia de adenosina en la solución remanente.

Se observa que, después de cada 10 ciclos de remoción, la corriente de pico a 0,4 V aumenta (ver ejemplos de Figura 17) y es coincidente con los perfiles electroquímicos obtenidos al realizar DPV para distintas concentraciones de adenosina (Figura 18). Es decir, que la cantidad de adenosina en la solución remanente aumenta con cada ciclo de remoción, evidenciando la efectividad del proceso. Se observa un corrimiento del potencial de pico de 200 mV, lo cual se debe a que para las medidas mostradas en la Figura 18 se utilizó un pseudoreferencia, de forma de utilizar volúmenes pequeños.

Se confirma la remoción de adenosina considerando que la señal aumenta con los ciclos de remoción hasta estabilizarse en un valor máximo, es decir, hasta que la cantidad de adenosina remanente para dos tandas de remoción consecutivas se mantiene constante. A pesar de mostrar únicamente los resultados para dos sistemas, en todos los casos el proceso de máxima remoción de adenosina se alcanza luego de realizar 60 ciclos por CV. Sin embargo, los MIPs 1 y 4 (20 ciclos y 50 y 100 mV/s, respectivamente) no presentaron resultados consistentes dado que los cambios de corriente de pico asociados a la remoción de adenosina aumentaban y disminuían, sin seguir una tendencia respecto a la cantidad de ciclos de remoción, por lo que no se continuó con su estudio. Considerando que en ambos casos la cantidad de ciclos de CV durante la polimerización fue de un bajo número (20 ciclos), se podría pensar que dicho parámetro influye en los resultados, por resultar en un grosor de polímero pequeño que no permite retener suficiente adenosina en su estructura.

Se presentan los resultados obtenidos mediante la remoción en medio ácido (si bien los ensayos se realizaron también en medio neutro), dado que en estas condiciones los picos de corriente obtenidos mediante DPV son mayores como consecuencia de la mayor conductividad del polímero en dicho medio, presentando menor ruido, por lo que las diferencias obtenidas son más apreciables que lo que se obtendría en medio neutro. No obstante, se considera que en ambos medios utilizados (ácido y neutro) se llega hasta un plató de concentración de adenosina removida.

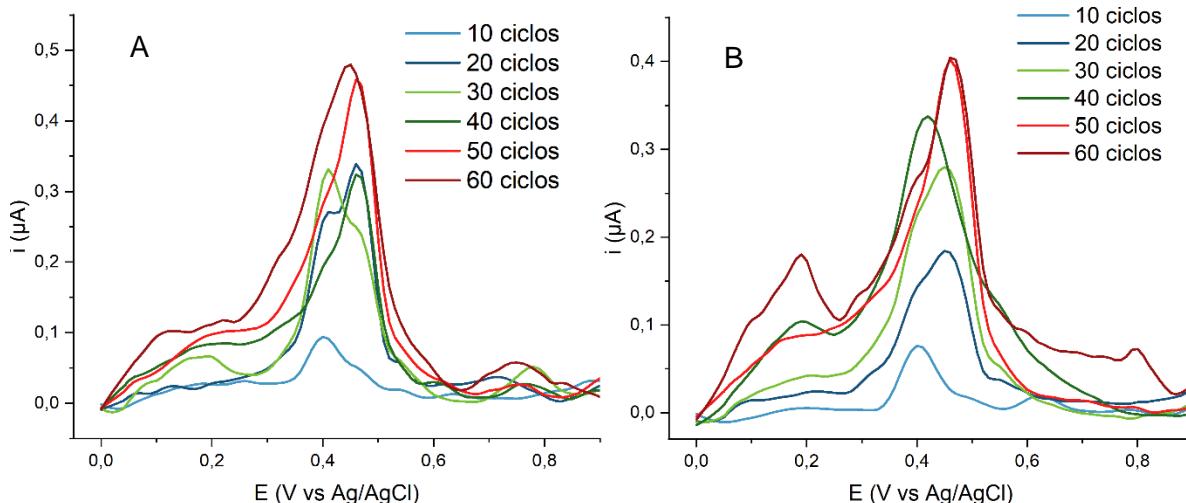


Figura 17: DPV para distintas tandas de remoción de adenosina en medio ácido (H_2SO_4 0,5 M), utilizando un electrodo de trabajo de grafito sin modificar (A) MIP3 (100 ciclos y 50mV/s) (B) MIP5 (50 ciclos y 100mV/s).

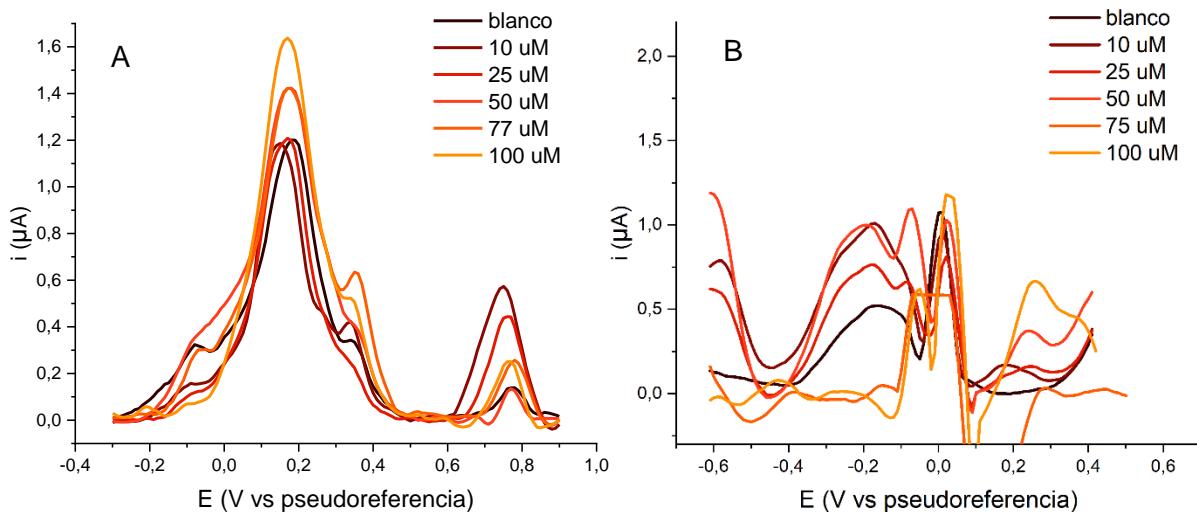


Figura 18: DPV para distintas concentraciones de adenosina (10 a 100 μM) sobre un electrodo desnudo, en medio (A) ácido (H_2SO_4 0,5 M) (B) neutro (KCl 0,1 M). En este último caso se espera un potencial de pico de -0,2 V por el medio utilizado, sin embargo no se observa con claridad, dada la presencia de ruido, sumado a la propia señal del electrodo desnudo que interfiere.

5.2 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS

5.2.1 Caracterización electroquímica por CV: medio ácido

Se presenta la caracterización electroquímica de los sistemas desarrollados, NIPs y MIPs removidos en medio ácido (H_2SO_4 0,5 M) en solución de ferricianuro 5 mM (KCl 0,1 M), considerando a su vez un electrodo de grafito (Figura 19).

De acuerdo a los resultados de la Tabla 2, se observa que, tanto para los MIPs como NIPs, las corrientes de pico promedio (i) fueron menores a las obtenidas con el electrodo desnudo. Esto sugiere que la rugosidad del polímero depositado con los sitios de reconocimiento no presenta un área de interacción mayor a la del grafito desnudo. Asimismo, la respuesta de NIP, también presenta el mismo comportamiento, sugiriendo que la película de polímero podría estar cubriendo los poros más pequeños del grafito desnudo, y de esa manera disminuyendo el área de interacción con el ferricianuro. Sin embargo, los valores de diferencia de potencial (ΔE) entre los picos de oxidación y reducción de MIPs y NIPs fueron menores respecto al electrodo de grafito desnudo, lo cual podría estar asociado a una mayor tendencia del ferricianuro a interaccionar con la película polimérica en lugar del grafito desnudo, mejorando la respuesta de reversibilidad por ser sus ΔE más próximos a 57 mV, valor teórico para ferri/ferro por ser un sistema reversible [25].

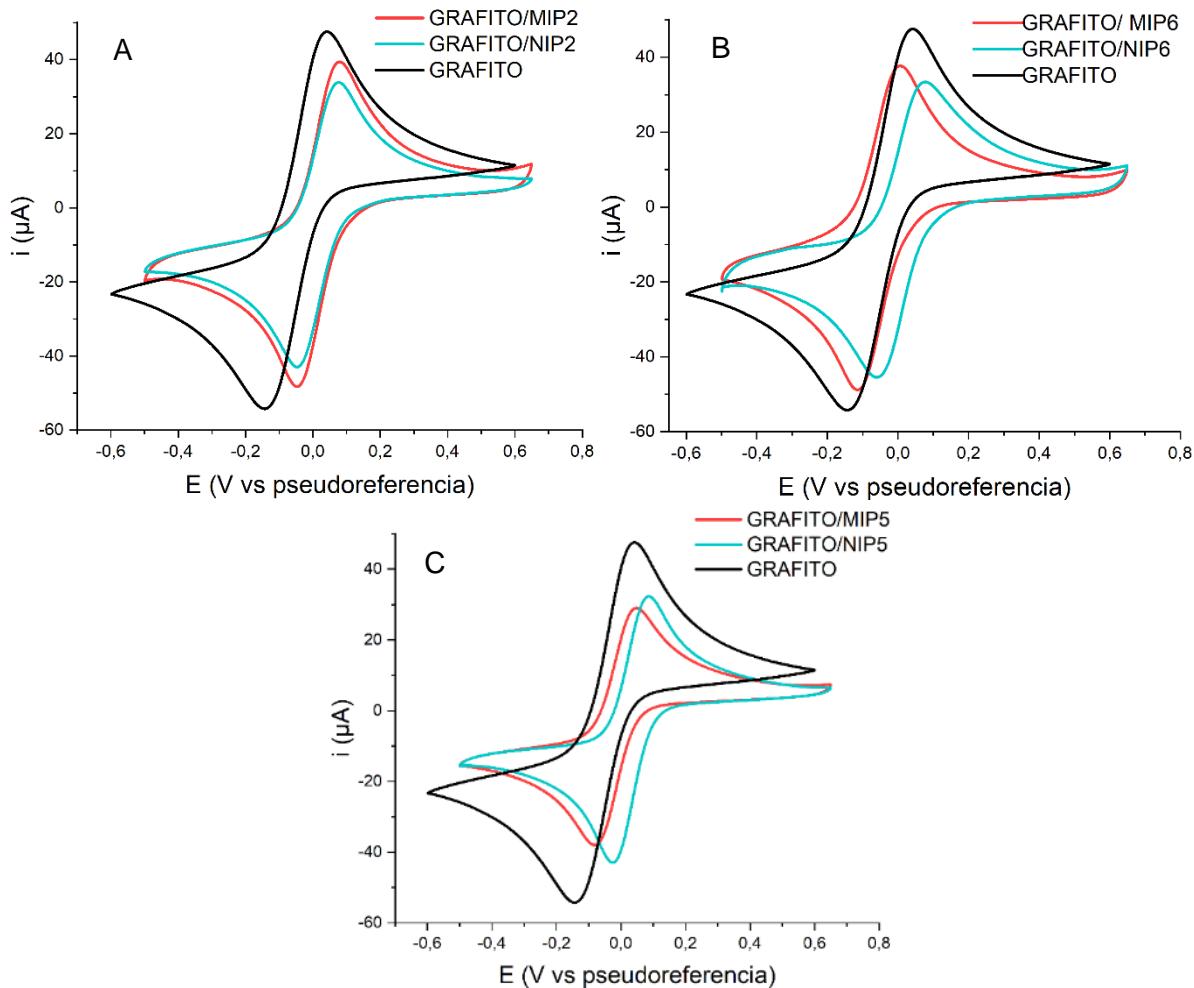


Figura 19: CV a 25 mV/s en solución de ferricianuro de potasio utilizando electrodos sin polimerizar y polimerizados con anilina, con o sin plantilla de adenosina (MIP y NIP, respectivamente), sometiendo a los MIPs a un proceso de remoción en medio ácido (H_2SO_4 0,5 M) (A) MIP y NIP 2 (B) MIP y NIP 6 (C) MIP y NIP 5.

Tabla 2: Valores de corriente de pico promedio y diferencia de potencial (ΔE) para MIPs y NIPs (2, 5 y 6), comparado con los resultados para grafito desnudo, mediante una caracterización electroquímica por CV.

	condiciones	i_a (μA)	i_c (μA)	i_a/i_c	$i_{promedio}$ (μA)	E_{pa} (V vs Ag/AgCl)	E_{pc} (V vs Ag/AgCl)	ΔE (mV)
MIP2	50 ciclos/ 50 mV/s	0,43	0,49	0,89	0,46	0,078	-0,046	125
NIP2		0,37	0,44	0,84	0,41	0,074	-0,047	122
MIP5	50 ciclos/ 100 mV/s	0,36	0,39	0,92	0,38	0,047	-0,082	129
NIP5		0,40	0,44	0,91	0,42	0,085	-0,025	110
MIP6	100 ciclos/ 100 mV/s	0,42	0,50	0,84	0,46	0,008	-0,11	122
NIP6		0,41	0,45	0,91	0,43	0,078	-0,061	138
grafito	-	0,57	0,57	1,01	0,57	0,042	-0,14	185

Por otro lado, se observa que la corriente de pico promedio de los MIPs 2 y 6 fue mayor a la de los NIPs, lo cual se espera para superficies que presentan mayor área superficial asociada con la presencia de los sitios de reconocimiento de adenosina generados durante la síntesis del MIP. Lo cual corrobora que efectivamente existe una mayor área superficial, en comparación con NIP, en donde puede adsorberse el par ferri/ferro y oxidarse/reducirse (Figura 19A y 19B). Sin embargo, el MIP 5 no presentó resultados concluyentes, siendo la corriente de pico promedio mayor para el NIP (Figura 19C). Este hecho podría explicarse por los parámetros utilizados en la síntesis, ya que, al aplicar una velocidad de barrido muy alta (100 mV/s), podría generar una polimerización no homogénea debido a la incorporación acelerada de monómeros para un bajo número de ciclos. Lo cual posiblemente impide la incorporación de adenosina en la superficie, y por lo tanto no se generan suficiente cantidad de sitios de reconocimiento que puedan aumentar el área superficial.

Considerando que con el MIP2 se verificó la polimerización y su posterior remoción en medio ácido, y que además, la caracterización electroquímica por CV mostró una corriente de pico promedio mayor para el MIP que para el NIP (coincidente con la presencia de sitios de reconocimiento), se decidió seguir adelante con la síntesis de MIPs y NIPs de acuerdo a este sistema (50 ciclos y 50 mV/s). Por otro lado, a pesar de que los resultados al utilizar el MIP 6 también fueron adecuados, se decidió descartarlo dado que la velocidad de barridos empleada para la polimerización fue muy alta (100 mV/s) y podría llevar a problemas en la estabilidad del proceso de síntesis, como se estima que ocurrió en el caso del MIP 5 (Figura 19C).

De manera de corroborar la razón de la diferencia de intensidad de corriente de pico promedio entre el MIP y el NIP 2, se calcularon las áreas electroactivas siguiendo la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 1). Esta describe como la corriente de pico i_p (A) aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido v (V/s), donde n es el número de electrones transferidos en el proceso redox, A es el área electroactiva (cm^2), D_0 es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en solución (ferricianuro) (cm^2/s), el cual tiene un valor teórico de $7,3 \times 10^{-6}$ [56], y C^0 es la concentración de analito (ferricianuro) (mol/cm^3).

$$i_p = 0,446nFAC^0 \left(\frac{nFvD_0}{RT} \right)^{1/2} \quad (1)$$

Para esto se realizaron CVs a distintas velocidades de barrido, se graficó la corriente de pico promedio versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, y a partir de una regresión lineal se obtuvo un área electroactiva de $0,045 \text{ cm}^2$ y $0,050 \text{ cm}^2$, para el NIP 2 y MIP 2 respectivamente (Figuras 20 y 21). Por lo tanto, se podría decir que la presencia de sitios de reconocimiento específicos para la adenosina lleva a un pequeño incremento (11%) en el área electroactiva. Esto, a su vez, facilita la interacción del ferricianuro con la superficie, alcanzando valores de corriente de pico promedio mayores.

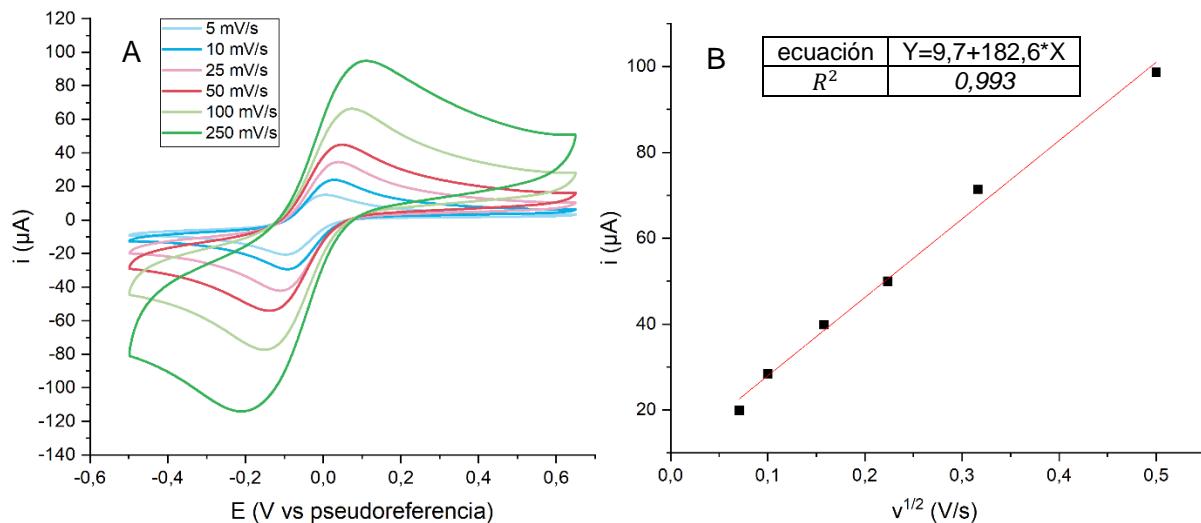


Figura 20: (A) CVs obtenidas a distintas velocidades de barrido, utilizando un MIP 2 como electrodo de trabajo (B) regresión lineal de la corriente de pico promedio en función de la raíz de la velocidad, obtenidas a partir de las CVs, utilizando el MIP 2.

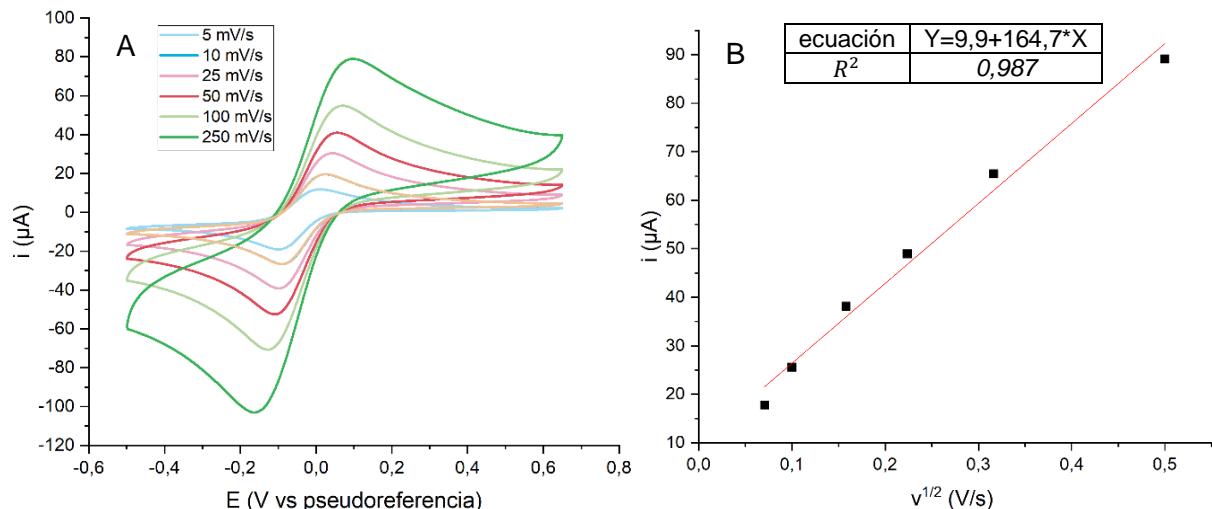


Figura 21: (A) CVs obtenidas a distintas velocidades de barrido, utilizando un NIP 2 como electrodo de trabajo (B) regresión lineal de la corriente de pico promedio en función de la raíz de la velocidad, obtenidas a partir de las CVs, utilizando el NIP 2.

5.3 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS FRENTE A ADENOSINA

5.3.1 Cuantificación de adenosina

Inicialmente se realizó la cuantificación de adenosina en medio ácido (H_2SO_4 0,5 M) ya que la PANI presenta mejor comportamiento redox en medios ácidos y su conductividad es mayor. Para esto se utilizaron MIPs como también NIPs como control, para la detección de distintas concentraciones de adenosina. Además, se usa grafito desnudo (sin modificar) a modo comparativo ya que es la superficie sobre la cual se realiza la electropolimerización. La presencia de dicho analito en MIPs y NIPs se evidencia por un aumento en la corriente de pico a 0,2 V correspondiente a los procesos redox propios del polímero, tal como se observa

al realizar una DPV del blanco, es decir en ausencia de adenosina (Figura 22, curva azul). Sin embargo, como se analizó previamente usando grafito desnudo (Figura 18), a este potencial también se observa la respuesta redox de la adenosina, por lo que, en principio, no se estaría pudiendo diferenciar entre ambas respuestas redox, y por ello se analiza la señal total, debido a la presencia de cierta concentración de adenosina en la solución.

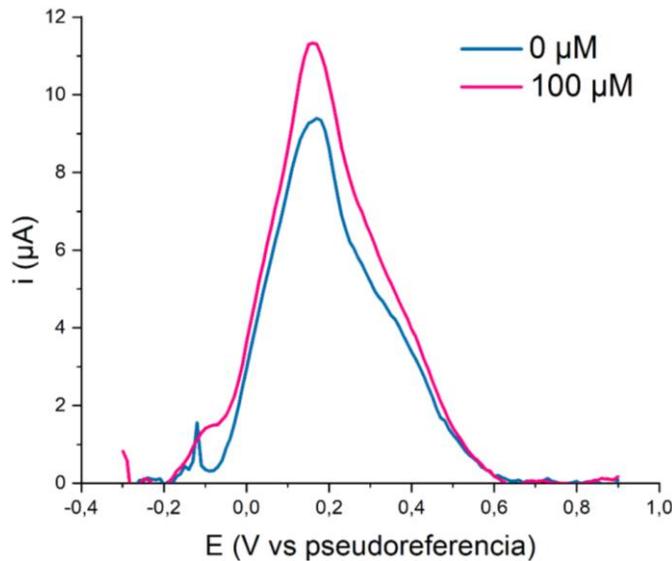


Figura 22: DPV para una solución de adenosina 100 μM en medio ácido (H_2SO_4 0,5 M) utilizando un MIP como electrodo de trabajo.

Luego se procedió al armado de una curva de calibración de corriente de pico promedio en función de la concentración de adenosina, tomando como corriente de pico final, la diferencia entre la corriente de pico medida y la corriente de pico del blanco ($i_p - i_0$). A partir de esto, se calculó la sensibilidad de los distintos sistemas, la cual se determina como el cambio de corriente obtenida por unidad de concentración (Figura 23). Se observa que, a medida que aumenta la concentración de adenosina, la corriente se incrementa, tanto para el MIP como para el NIP. Por otro lado, al utilizar un electrodo de grafito desnudo, las corrientes alcanzadas son muy bajas. Además, se puede observar una mayor sensibilidad para el MIP comparado con los otros sistemas estudiados, ya que al incorporarse el analito en los sitios de reconocimiento específicos, aumenta tanto la respuesta de corriente asociada al polímero como a la adenosina incorporada (ver Tabla Figura 23).

Por otro lado, a partir de la pendiente de la regresión final (S) y considerando su desvío estándar (S_y), se determinó el límite de detección (por sus siglas en inglés, LOD) del MIP (Ecuación 2) siendo de 0,15 μM (mínima concentración detectable) (ver Tabla Figura 23).

$$LOD = 3,3(S_y/S) \quad (2)$$

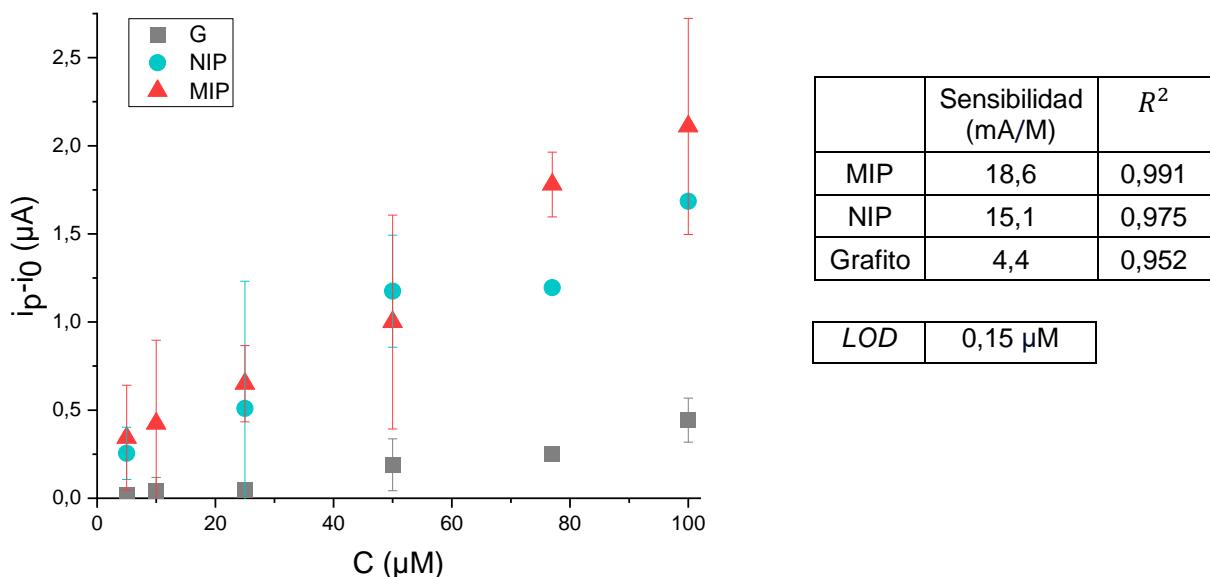


Figura 23: Curva de calibración a diferentes concentraciones de adenosina en medio ácido, usando MIP, NIP o grafito como electrodos de trabajo. A la derecha se identifica la sensibilidad de cada sistema, el R^2 del ajuste lineal de cada curva y el límite de detección correspondiente al MIP.

Sin embargo, se esperaba que las diferencias en la sensibilidad entre MIP y NIP fueran mayores, dada la presencia de sitios de reconocimiento específicos para la adenosina. Por dicha razón y conociendo que la PANI puede sufrir procesos de hidrólisis, se estudió la estabilidad del MIP en medio ácido y se la comparó con la correspondiente a medio neutro (KCl 0,1 M). Para esto se calculó el porcentaje de degradación luego de cada ciclo de medición, considerando que entre cada ciclo de detección se realizan 60 ciclos de remoción (para asegurar la mayor cantidad de sitios de reconocimiento libres de analito) que podrían estar afectando a la integridad del polímero. Se toman los valores de corriente de pico de los blancos obtenidos durante cada ciclo de medición y se relativizan al mayor valor de corriente, que coincide con el obtenido en el primer ciclo de medición, y se considera a este como el 0 % de degradación (teniendo en cuenta que el polímero sufre un daño mínimo para esa instancia).

En la Figura 24 se observa que, los valores de corriente de pico promedio caen con los ciclos de remoción, lo cual corroboraría que el polímero se degrada en este medio por hidrólisis. Este hecho, a su vez, disminuye la disponibilidad de sitios activos de reconocimiento lo que lleva a una menor corriente resultante. Sin embargo, el porcentaje de degradación es más abrupto en el medio ácido, siendo de un 85 % en el primer ciclo de remoción y llegando casi a un 100% en la última medición, en contraste con el medio neutro que en el primer ciclo de remoción no alcanza el 30% de degradación. Es decir que la pérdida de los sitios de reconocimiento en medio ácido, llevan a una baja sensibilidad, comparable a la obtenida con el polímero que no cuenta con esos sitios específicos para la adenosina (NIP) (ver Tabla de sensibilidad, Figura 23).

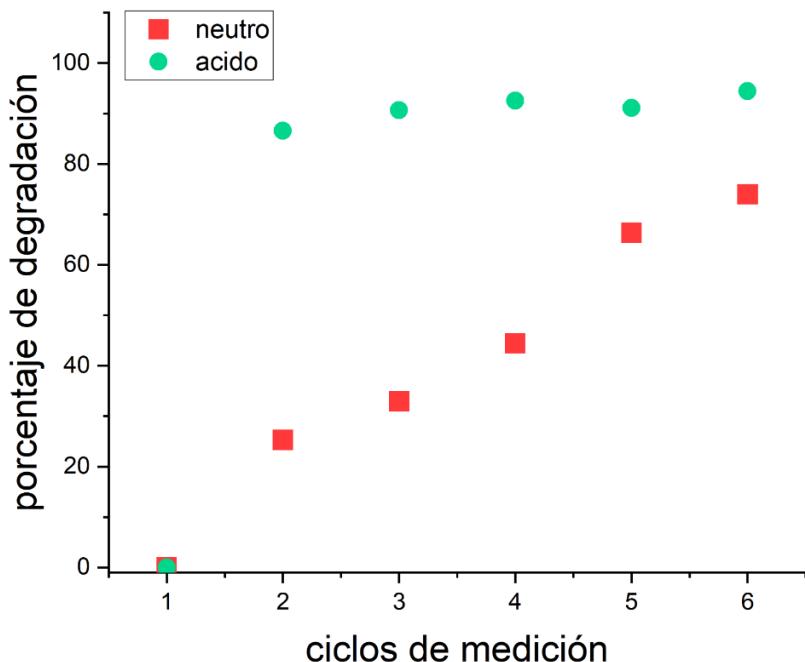


Figura 24: Porcentaje de degradación del polímero por cada ciclo de medición para MIPs en medio ácido y neutro.

Dada la mayor estabilidad de los MIPs en medio neutro, se decidió realizar el mismo procedimiento para la determinación de adenosina y construcción de una curva de calibración, en dicho medio, utilizando tanto MIPs como NIPs como control. Además, considerando que con cada ciclo de remoción el polímero sufre degradación, se utilizaron unidades independientes de MIPs para la medición de cada concentración estudiada, de manera de evitar una disminución significativa de la señal en cada medida realizada, debido a los procesos de remoción (Figuras 25 y 26).

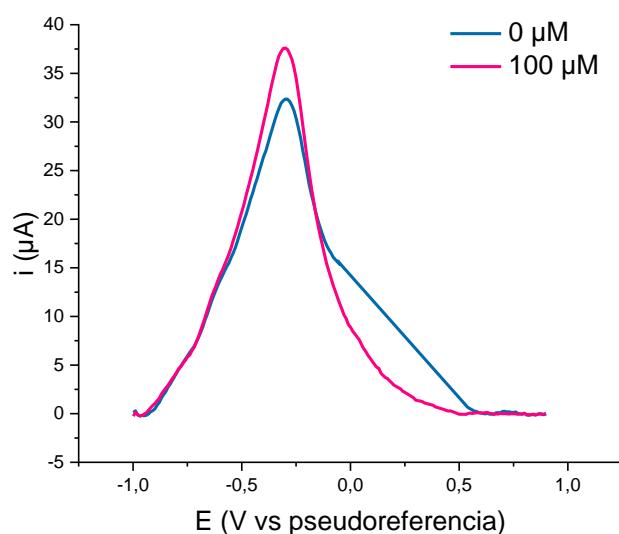


Figura 25: DPV para una solución de adenosina 100 μ M en medio neutro (KCl 0,1 M) utilizando un MIP como electrodo de trabajo.

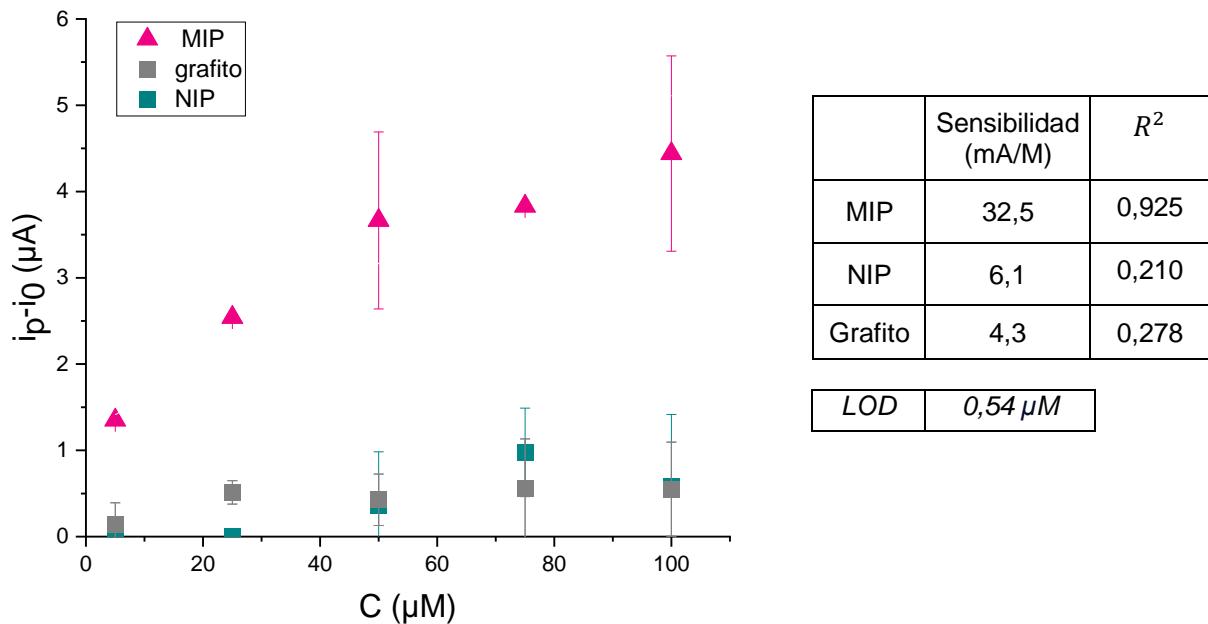


Figura 26: Curva de calibración a diferentes concentraciones de adenosina en medio neutro, usando MIP, NIP o grafito como electrodos de trabajo. A la derecha se identifica la sensibilidad de cada sistema, el R^2 del ajuste lineal de cada curva y el límite de detección correspondiente al MIP.

En este caso, se evidencia la presencia de adenosina por un aumento en la señal correspondiente al polímero para un potencial de -0,2 V (Figura 25). Este corrimiento en el potencial, respecto al ensayo en medio ácido (Figura 22), se debe a que dicho parámetro depende del pH del medio, siendo mayor cuanto más ácido es el medio (Figura 6).

En la Figura 26 se observa que el aumento de las corrientes correspondientes al polímero para un potencial de -0,2 V por cada concentración estudiada, es mucho mayor para el MIP comparado con el NIP, llegando a valores considerablemente más altos respecto a los obtenidos en medio ácido. Además, asociado a estas diferencias, se obtiene una sensibilidad para el MIP, 5 veces mayor a la alcanzada por el NIP, confirmando que la presencia de los sitios específicos para adenosina facilita su detección. Por otro lado, se destaca que los valores de corriente alcanzados al utilizar NIPs son muy similares a los obtenidos con el grafito sin modificar, por lo que se puede pensar que la presencia del polímero no mejora el proceso de transferencia electrónica hacia el electrodo. En cuanto a la sensibilidad del NIP, es interesante resaltar que en medio neutro disminuye respecto al medio ácido (15,1 y 6,1, para medio ácido y neutro, respectivamente), a pesar de no ser sometido a un proceso de remoción. Esto se debe a que la respuesta propia del polímero en medio neutro es baja. Sin embargo, la presencia de adenosina en los sitios de reconocimiento incrementa dicha respuesta, por lo que al utilizar un MIP se observa una gran diferencia en sensibilidad respecto al NIP. En contraposición, al estudiar el grafito desnudo en ambos medios, la sensibilidad fue muy similar, debido a que el grafito no se encuentra modificado, y los cambios en el pH no afectan su respuesta.

Además, se calculó el límite de detección para el MIP en este medio, obteniéndose un valor de $0,54 \mu\text{M}$ (ver Tabla de Figura 26). Dicha concentración es menor en el caso del sistema estudiado en medio ácido ($0,15 \mu\text{M}$), hecho esperable considerando que las corrientes alcanzadas a pHs bajos son más altas debido a que en ese medio el polímero presenta mayor conductividad y respuesta electroquímica. Sin embargo, la estabilidad y la sensibilidad del sistema juegan un rol de mayor relevancia para los objetivos de este proyecto.

5.4 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS

5.4.1 Caracterización electroquímica por CV: medio neutro

Considerando que los resultados en cuanto a sensibilidad de detección de adenosina fueron notablemente mejores al utilizar un medio neutro, dada la mayor estabilidad del polímero en dicho medio, se procedió a realizar la caracterización electroquímica en ferricianuro 5 mM (KCl 0,1 M) previamente descripta para el medio ácido, en medio neutro. Se utilizaron tres réplicas de MIPs, como también un NIP como control y grafito desnudo (sin modificar), obteniéndose los resultados de la Figura 27.

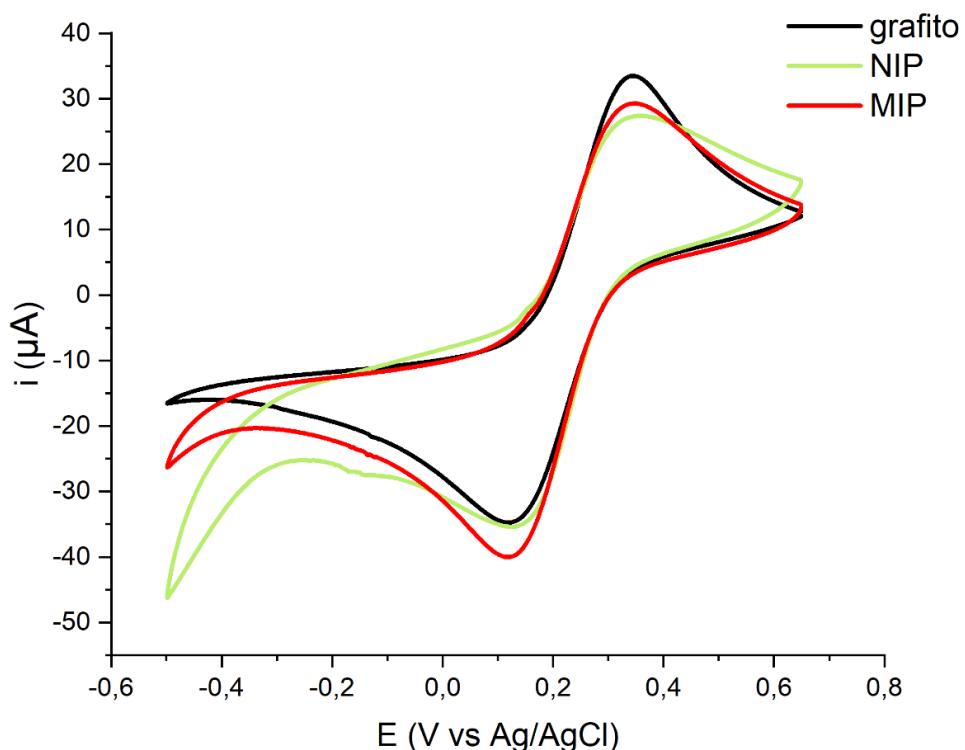


Figura 27: CV a 25 mV/s en solución de ferricianuro de potasio utilizando electrodo de grafito, NIP o MIP removido en medio neutro (KCl), como electrodo de trabajo.

De igual manera a lo observado en la caracterización en medio ácido, la corriente de pico promedio tanto del MIP como del NIP, fue menor a la alcanzada al utilizar un electrodo de grafito sin modificar. Por otro lado, al comparar MIP y NIP, se observa de manera semejante al caso anterior, que la corriente de pico promedio alcanzada por el MIP es mayor, dada la presencia de sitios de reconocimiento específicos que aumentan la superficie de contacto con el ferricianuro. Sin embargo, la diferencia de potencial obtenida con los tres sistemas fue similar (Tabla 3).

Tabla 3: Valores de corriente de pico promedio y diferencia de potencial (ΔE) para MIP y NIP, comparado con los resultados para grafito sin modificar, mediante una caracterización electroquímica por CV.

	i_a (μA)	i_c (μA)	i_a/i_c	$(i_a+i_c)/2$ (μA)	E_{pa} (V vs Ag/AgCl)	E_{pc} (V vs Ag/AgCl)	ΔE (mV)
MIP	29,40	34,01	0,86	31,71	0,35	0,098	252
NIP	27,45	34,51	0,80	30,99	0,36	0,13	230
grafito	40,76	34,98	1,17	37,87	0,35	0,12	230

Posteriormente se calculó el área electroactiva de cada sistema mediante un barrido de velocidades, de manera de estudiar la relación con los resultados anteriores (Figuras 28 a 30).

A partir de la regresión lineal desarrollada en cada caso, se obtuvo un área electroactiva de $0,030 \text{ cm}^2$, $0,023 \text{ cm}^2$, $0,037 \text{ cm}^2$, para MIP, NIP y grafito sin modificar, respectivamente. Por lo tanto, se corrobora que la presencia de sitios de reconocimiento específicos para la adenosina aumenta el área electroactiva en un 28 %, llevando a un incremento en la corriente de pico promedio, comparado con el NIP. Dicho incremento en el área electroactiva es mayor comparado con el obtenido en medio ácido, el cual alcanza el 11 % únicamente (ver Figuras 20 y 21). Además, se confirma que la presencia del polímero no genera un aumento en el área disponible para la interacción con ferricianuro, considerando que el área electroactiva del grafito es mayor a la obtenida para MIP y NIP, debido a su propia porosidad.

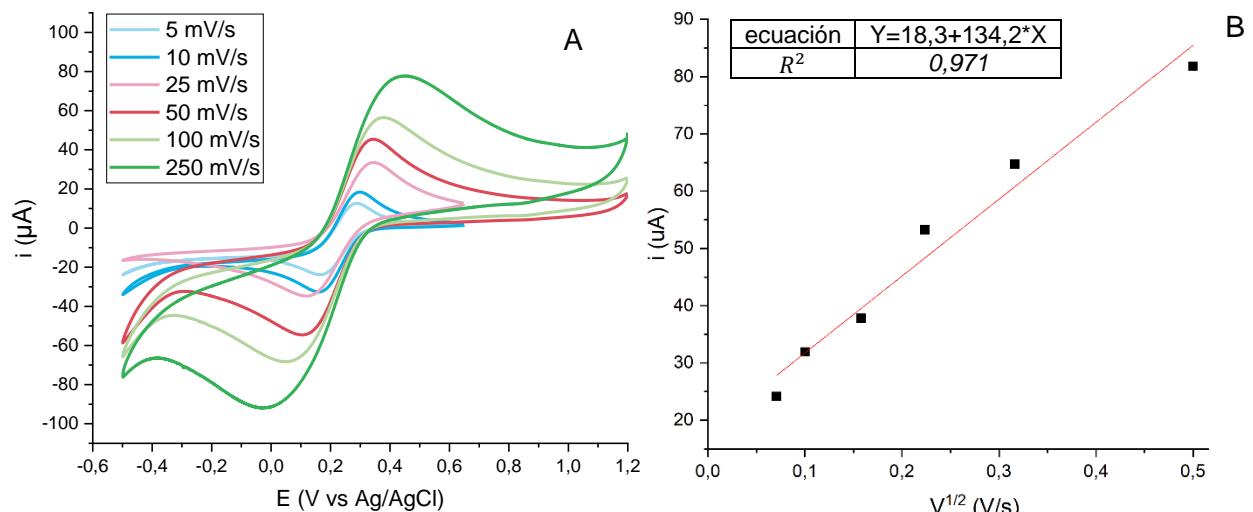


Figura 28: (A) CVs obtenidas a distintas velocidades de barrido, utilizando grafito como electrodo de trabajo y un electrodo de referencia externo de Ag/AgCl (B) regresión lineal de la corriente de pico promedio en función de la raíz de la velocidad, obtenidas a partir de las CVs, utilizando grafito.

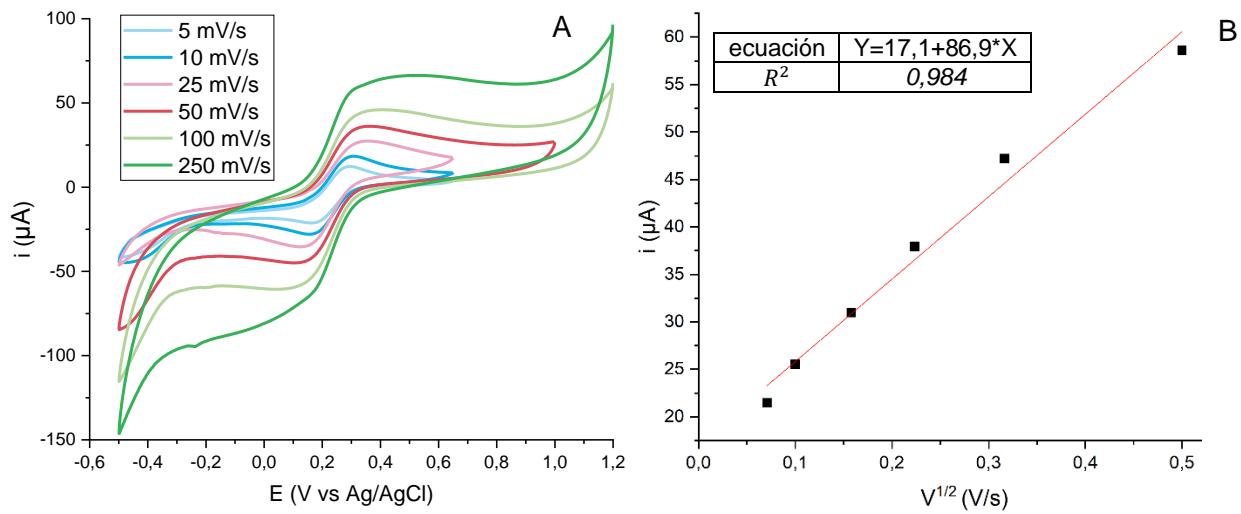


Figura 29: (A) CVs obtenidas a distintas velocidades de barrido, utilizando un NIP como electrodo de trabajo y un electrodo de referencia externo de Ag/AgCl (B) regresión lineal de la corriente de pico promedio en función de la raíz de la velocidad, obtenidas a partir de las CVs, utilizando un NIP.

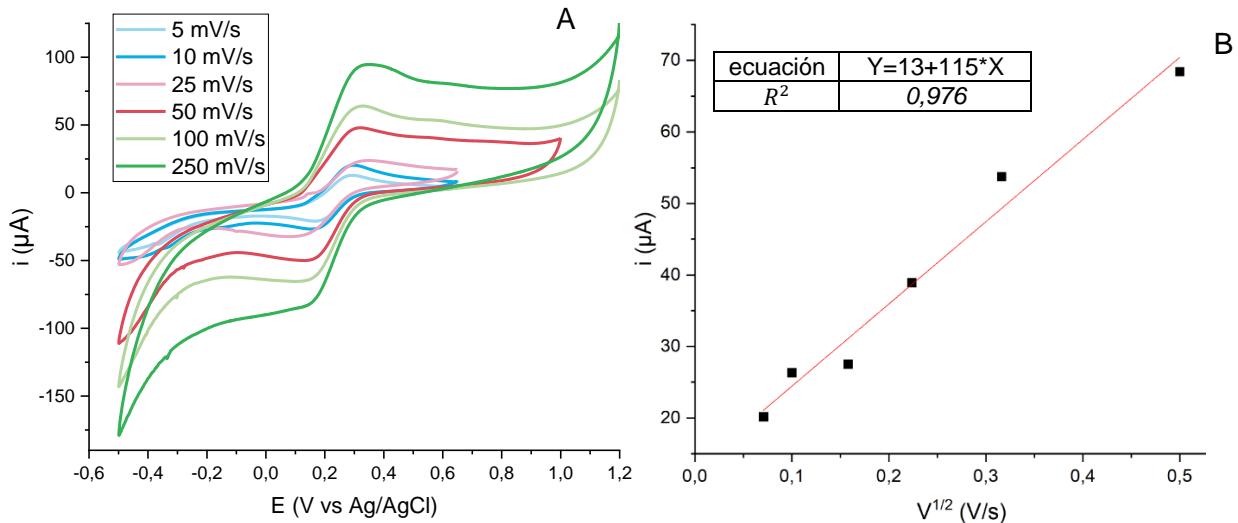


Figura 30: (A) CVs obtenidas a distintas velocidades de barrido, utilizando un MIP como electrodo de trabajo y un electrodo de referencia externo de Ag/AgCl (B) regresión lineal de la corriente de pico promedio en función de la raíz de la velocidad, obtenidas a partir de las CVs, utilizando un MIP.

5.4.2 Caracterización microscópica

5.4.2.1 AFM

De manera de estudiar la rugosidad del sistema, se realizó AFM para MIPs obtenidos mediante remoción en medio neutro (considerando que en este medio la degradación del polímero por hidrólisis es menor), MIPs con adenosina incorporada en la estructura del polímero (MIP+A) y un NIP como control. Por otro lado, es importante destacar que no era viable la realización de este ensayo para grafito desnudo, dado que se encuentra formando parte del electrodo serigrafiado y para este análisis se requiere una superficie ultraplana de soporte, como el oro (Figura 31).

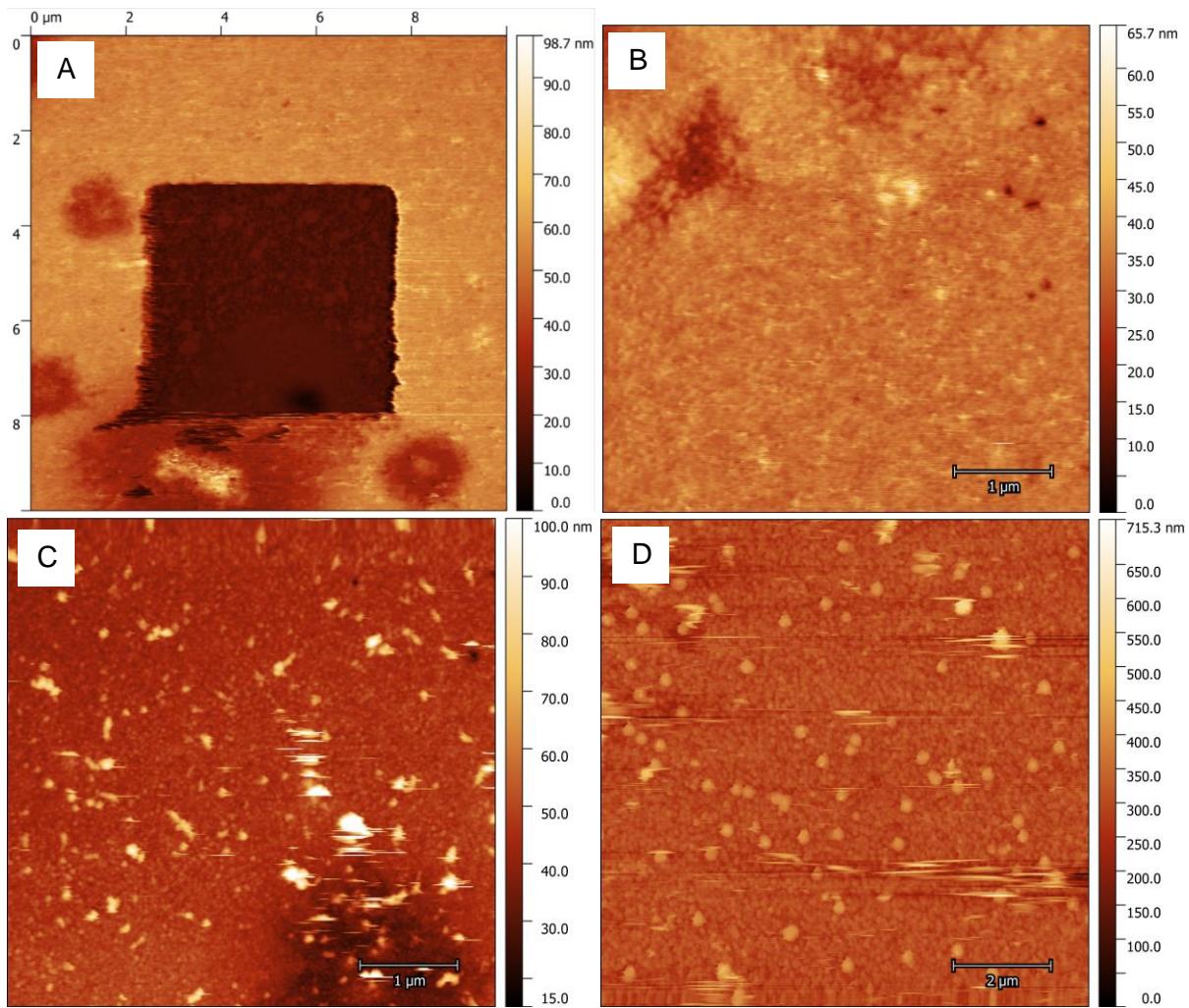


Figura 31: Imagen topográfica de AFM (A) superficie de un MIP luego de ser sometido a un proceso de ruptura del polímero que se evidencia con la presencia de un cuadrado con escala de altura 0. Morfología de la superficie de un (B) MIP+A (C) NIP y (D) MIP. La escala de colores corresponde a la altura desde la superficie de oro.

A partir de las medidas realizadas se pudo estimar el espesor de la película polimérica sintetizada, mediante la ruptura del polímero en una pequeña región de las muestras, de manera de alcanzar la superficie de oro (Figura 31A). Se obtuvieron espesores muy similares para los polímeros de los sistemas en estudio, siendo de 48 nm, 40 nm, y 44 nm, para MIP, MIP+A y NIP, respectivamente (Tabla 4). Es decir que, se comprueba que las diferencias observadas en cuanto a la eficiencia en la detección de adenosina son independientes de la cantidad de polímero depositado sobre el electrodo y que, la incorporación de la adenosina no afecta significativamente la cantidad de polímero depositado ni tampoco su espesor al realizarse la electropolimerización en presencia de este. Por otro lado, se determinó la rugosidad de los tres sistemas (Tabla 4) siendo similares para MIP+A (1,2 nm) y NIP (2,5 nm). Esto permite corroborar que al incorporarse la adenosina en la síntesis del MIP, no se modifica la morfología del polímero. Sin embargo, la rugosidad obtenida para el MIP en ausencia de adenosina, es decir la superficie con los sitios de reconocimiento de adenosina, es significativamente mayor, alcanzando un valor de 15,6 nm. Este hecho, es consistente con la presencia de sitios de reconocimiento específicos para dicho analito obtenidos luego de la remoción (Tabla 4). Además, es interesante destacar que al comparar MIP con MIP+A, la

rugosidad disminuye notoriamente debido a que los sitios de reconocimiento son ocupados por la adenosina.

Tabla 4: Valores de espesor y rugosidad correspondientes a NIP, MIP en presencia o ausencia de adenosina, obtenidos mediante AFM.

	Espesor (nm)	Rugosidad (nm)
NIP	44	2,5
MIP+A	40	1,2
MIP	48	15,6

5.4.2.2 SEM

Por otro lado, se estudió la morfología de los sistemas mediante SEM, empleando NIPs y MIPs en presencia (MIP+A) o ausencia de adenosina (MIP removido en medio neutro y expuesto a una solución de adenosina 100 μM). Además, se obtuvieron los porcentajes de peso atómico de los elementos asociados a la superficie de cada sistema, a partir de los espectros EDS (Figuras 32 a 34).

Se observa la presencia de un alto contenido de carbono y oxígeno en los tres sistemas estudiados, asociado a la deposición del polímero de anilina (ver Figura 7) sobre la superficie. Además, se evidencia un pico de mayor intensidad en los tres casos correspondiente al oro, dada la superficie utilizada para la experimentación (Figuras 32 a 34). Sin embargo, en el caso del MIP+A (Figura 33), se observa un porcentaje relevante de nitrógeno (10 %) asociado a la presencia de la adenosina que se encuentra formando parte del polímero, considerando que dicha molécula cuenta con 6 nitrógenos en su estructura (ver Figura 1). Esto estaría asociado a la incorporación de adenosina durante el proceso de detección de soluciones en presencia del analito, lo que podría deberse a la presencia de sitios de reconocimiento específicos para esta. A su vez, se corrobora que se remueve la mayor cantidad de adenosina posible por barridos de CV, teniendo en cuenta que el MIP sometido a 60 ciclos de remoción no cuenta con un porcentaje de nitrógeno detectable por esa técnica (Figura 34).

Por otro lado, se observa en determinados casos la presencia de cloro y potasio que podrían corresponder al medio utilizado para la remoción (KCl). Además, se alcanza a detectar la presencia de molibdeno proveniente del plástico sobre el cual se deposita la película de oro ultraplano (Figura 34).

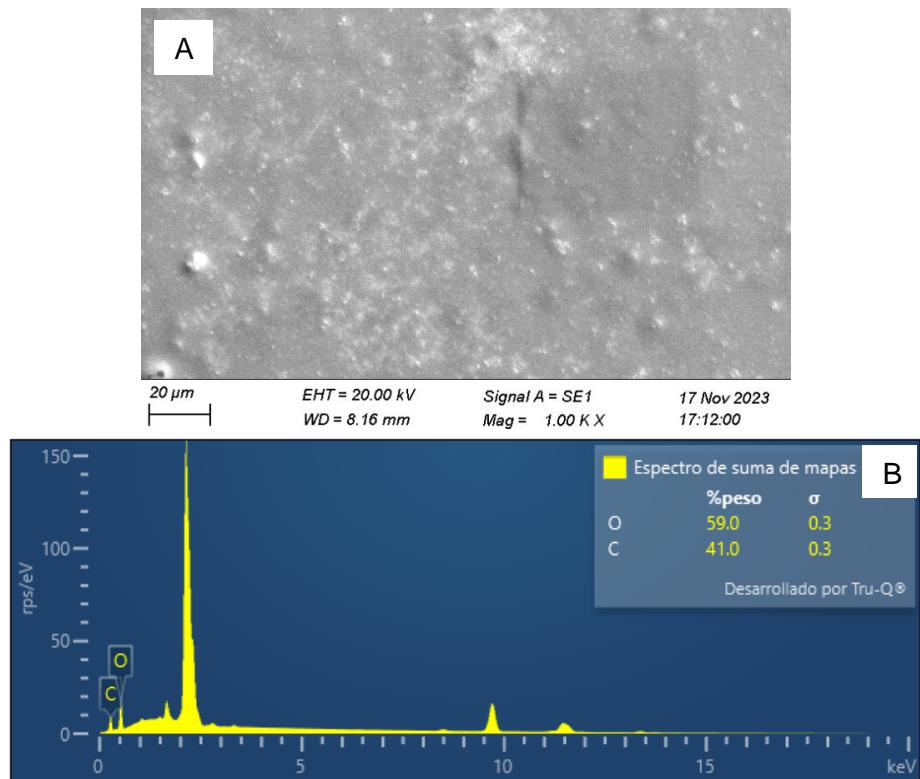


Figura 32: (A) Imagen obtenida por SEM de la superficie de un NIP electropolimerizado sobre oro (B) espectro EDS y porcentajes de peso atómico del análisis elemental.

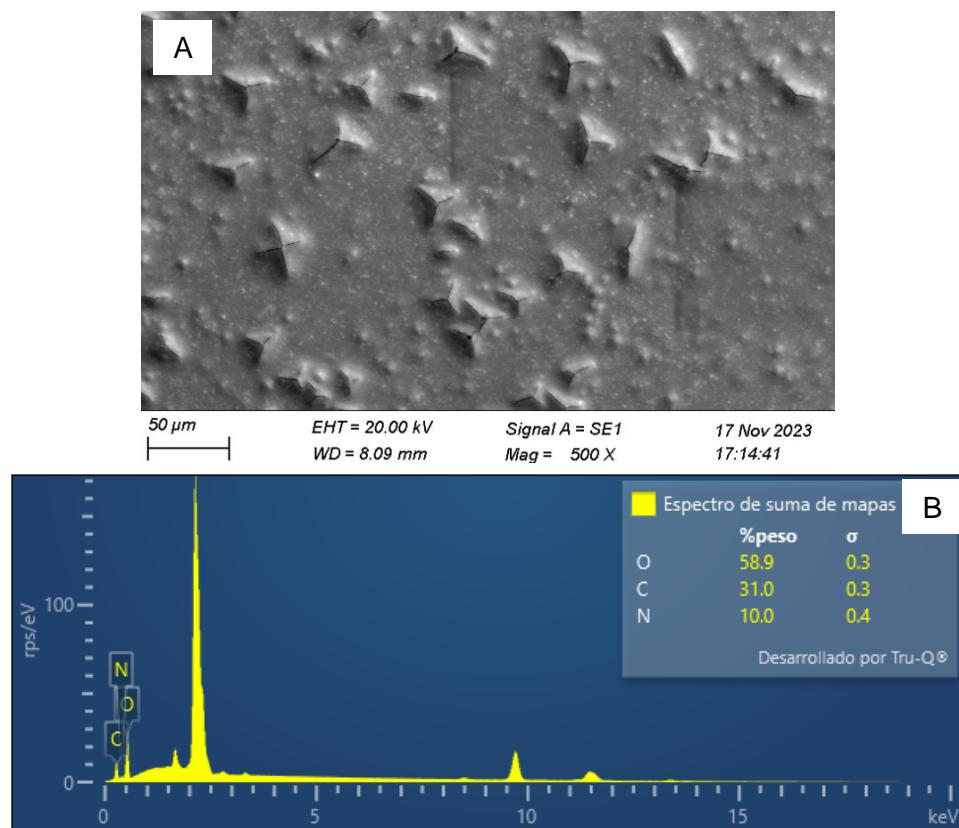


Figura 33: (A) Imagen obtenida por SEM de la superficie de un MIP+A electropolimerizado sobre oro (B) espectro EDS y porcentajes de peso atómico del análisis elemental.

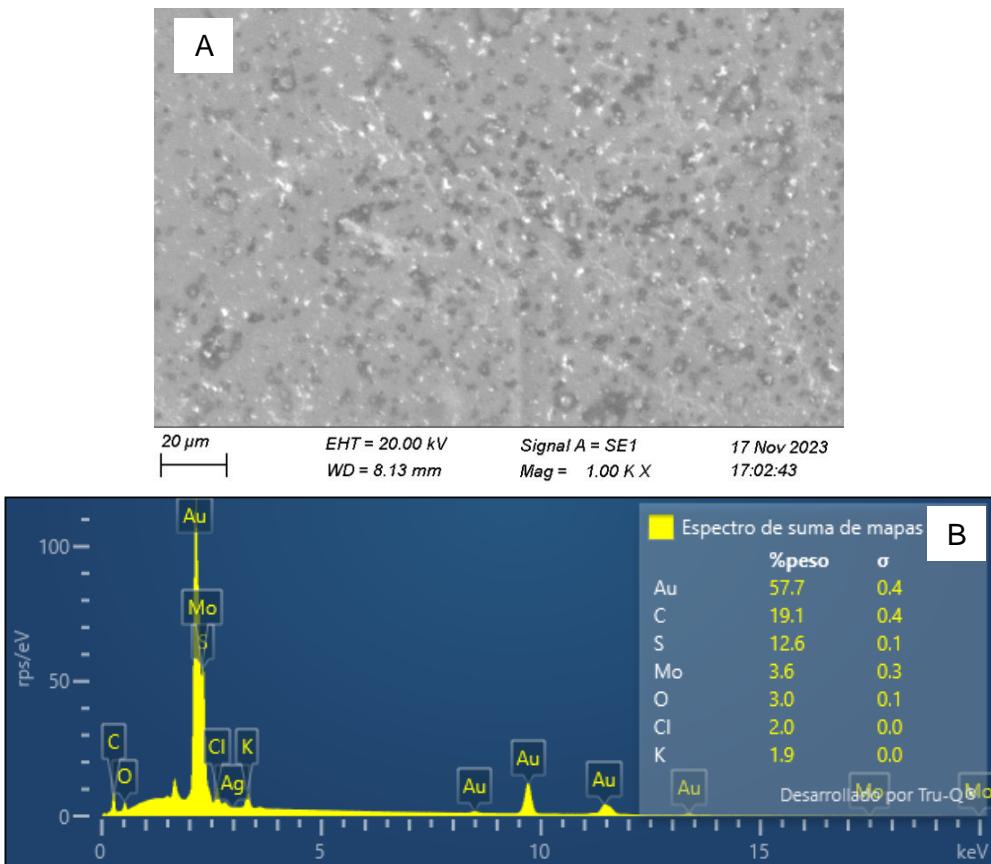


Figura 34: (A) Imagen obtenida por SEM de la superficie de un MIP electropolimerizado sobre oro (B) espectro EDS y porcentajes de peso atómico del análisis elemental.

5.4.3 Caracterización espectroscópica

De manera de analizar las interacciones existentes entre el polímero y la adenosina, se utiliza la técnica de ATR-IR. Para esto se emplea un NIP y un MIP con adenosina (MIP+A) sobre su superficie. Es importante destacar, que no se estudió un MIP sometido al proceso de remoción, ya que se esperaba que los resultados fueran muy similares al control (NIP) considerando que en ambos casos la adenosina está ausente.

En la Figura 35 se observa un pico pronunciado en 1178 cm^{-1} para los espectros correspondientes al NIP y al MIP+A, el cual se encuentra ausente en el grafito. Esta señal está asociada a la formación de oligómeros de anilina ya que se puede asociar a las vibraciones de enlaces C-H y C-N [57,58] hecho consistente con la presencia de PANI en la superficie del electrodo, para MIP y NIP. Por otro lado, para estos últimos, se observa una señal más débil en 2990 cm^{-1} , que podría estar relacionada con las vibraciones asociadas a enlaces N-H formando parte de anillo aromático, correspondientes a la estructura del polímero (ver Figura 7) [57,59]. Es decir que se corrobora la formación de PANI sobre la superficie del electrodo tanto para MIP como para NIP.

No obstante, se observa una diferencia en la intensidad de dichas señales para MIP y NIP, especialmente en uno de los picos en 1178 cm^{-1} , siendo mayor para este último. Esto podría estar relacionado con la presencia de adenosina incorporada a la superficie del polímero (MIP), considerando que previamente se corroboró que la cantidad de polímero depositado para MIP y NIP durante la electropolimerización es la misma (5.4.2.1 AFM). Los grupos OH de la adenosina (ver Figura 1) podrían estar interactuando por puente de

hidrógeno con los grupos N-H de la PANI modificando así la intensidad de los picos mencionados. Sin embargo, debido a la cantidad de PANI y a la cantidad de adenosina en la estructura del polímero no fue posible identificar señales propias de la molécula de adenosina.

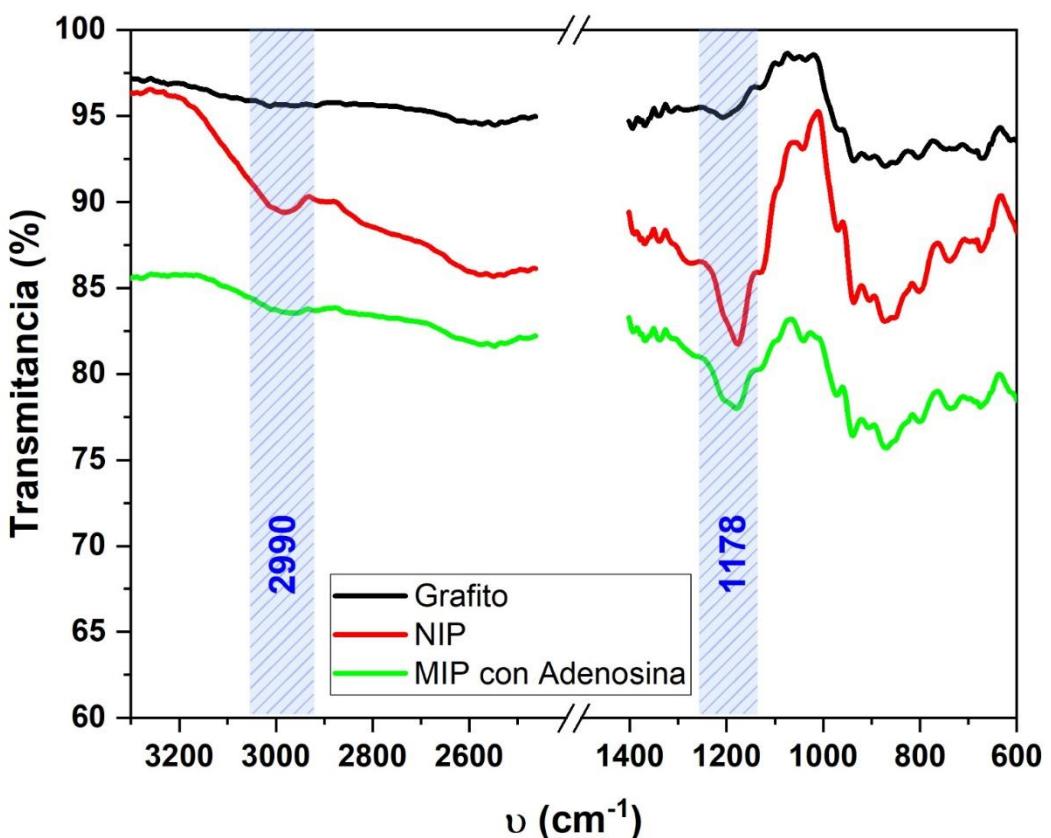


Figura 35: Espectro de ATR-IR de la superficie de un electrodo sin modificar (grafito), un NIP y un MIP con adenosina.

5.5 ENSAYOS DE SELECTIVIDAD

5.5.1 Prueba de selectividad

Para continuar con el estudio de la eficiencia del sensor desarrollado, se realiza una prueba de selectividad, mediante la cuantificación de adenosina en presencia de una molécula estructuralmente similar como la uridina (ver Figura 36). De la misma forma en que se construyó la curva de calibración, la adenosina se cuantifica a partir del estudio de los cambios en la corriente de pico anódica respecto al blanco (obtenido a partir de la medición de DPV en una solución de KCl 0,1 M) para un potencial de -0,2 V. Se estudian MIPs, como también NIPs, para soluciones en presencia de uridina como único analito, y mezclas de uridina y adenosina en distintas relaciones molares uridina:adenosina (1:1 y 1:2) (Figura 37A y 37B). Se resumen los resultados obtenidos para los cambios en la corriente de pico anódica en la Tabla 5.

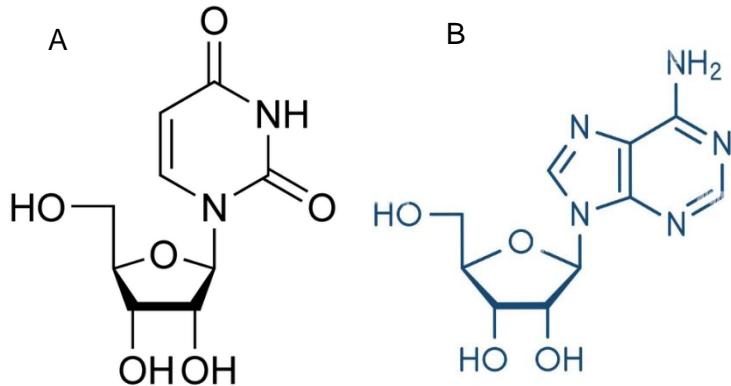


Figura 36: Estructura química de (A) la uridina en comparación con (B) adenosina.

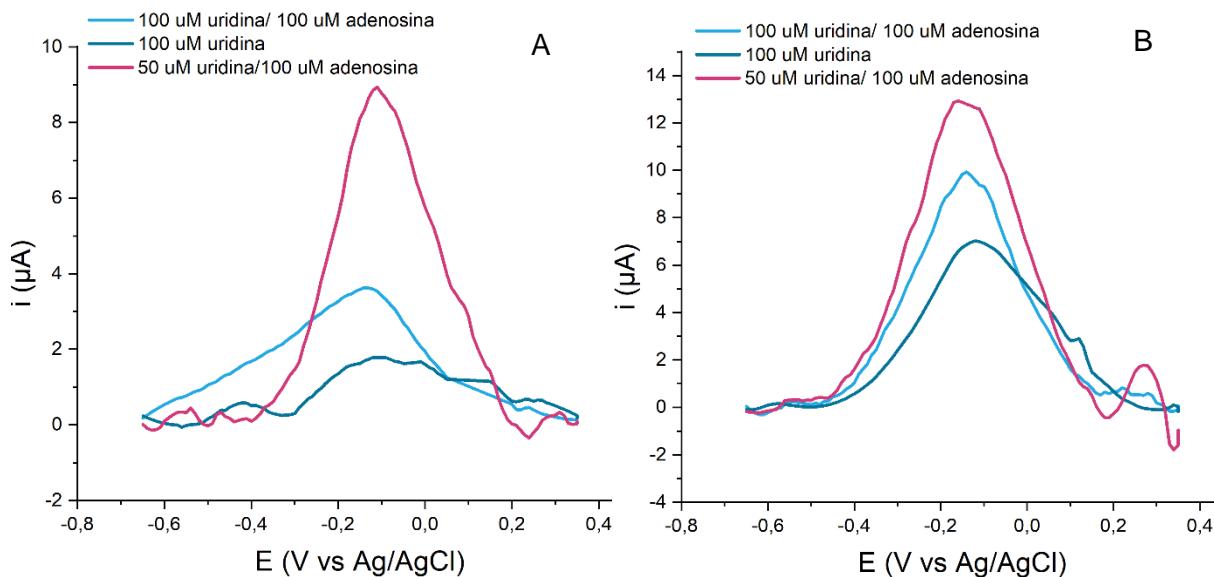


Figura 37: DPV para las distintas soluciones estudiadas: uridina 100 μM ; uridina 100 μM y adenosina 100 μM ; uridina 50 μM y adenosina 100 μM , en medio neutro (KCl 0,1 M). Utilizando (A) un MIP o (B) un NIP como electrodo de trabajo.

Tabla 5: Promedio de los cambios en la corriente de pico anódica obtenidos con cada sistema respecto al blanco, obtenido a partir de la medición de DPV en una solución de KCl 0,1M.

	100 μM uridina	100 μM uridina + 100 μM adenosina	50 μM uridina + 100 μM adenosina
NIP	$0,02 \pm 0,03 \mu\text{A}$	$0,4 \pm 0,3 \mu\text{A}$	$0,6 \pm 0,5 \mu\text{A}$
MIP	$0 \mu\text{A}$	$0,7 \pm 0,4 \mu\text{A}$	$3 \pm 0,2 \mu\text{A}$

Se observa que en presencia de una solución de uridina 100 μM , el cambio de corriente de pico respecto al blanco fue casi nulo tanto para MIP como NIP. Por otro lado, para las mezclas de uridina y adenosina, se evidencia un incremento en el cambio de corriente de pico, al utilizar un MIP, que podría deberse a la incorporación de adenosina a los sitios de reconocimiento, considerando que la uridina por sí sola no genera señal alguna. Sin embargo,

la señal alcanzada cuando la relación uridina y adenosina es de 1:1, no es equivalente a la que se obtiene en presencia de una solución de adenosina de igual concentración (100 μM) (ver Figura 26). Es decir, representa solamente el 17 % de la corriente de pico obtenida en ausencia de uridina. Además, las corrientes de pico de MIP y NIP son similares, lo que lleva a pensar que no existe selectividad para dichas condiciones.

Por el contrario, al disminuir la concentración de uridina de la solución (relación molar uridina:adenosina 1:2), el cambio de corriente de pico alcanzado al utilizar un MIP se acerca a lo esperado para una concentración de 100 μM , representando un 73% de la corriente de pico obtenida en ausencia de uridina. Sin embargo, la señal del NIP se mantiene dentro del mismo rango de corrientes.

Para dilucidar si las moléculas de uridina pueden tener un efecto sobre la señal correspondiente a la presencia de adenosina en la solución, de manera de atenuarla, se utilizaron MIPs sometidos a una solución de 100 μM de uridina y luego de un lavado con agua, se usaron para cuantificar adenosina en una solución de 100 μM .

Se obtuvo una señal de corriente de $0,07 \pm 0,1 \mu\text{A}$ para la cuantificación de 100 μM de adenosina, valor muy alejado del esperado para dicha concentración al utilizar un MIP. Este hecho, podría estar asociado a un impedimento estérico por parte de la uridina que podría tener un efecto sobre la detección de adenosina. Considerando que la molécula de uridina es de menor tamaño comparado con la adenosina [60,61], se podría pensar que dichas moléculas se incorporan a los sitios de reconocimiento específicos de manera de impedir la entrada de adenosina. Sin embargo, al incorporarse la uridina a esos sitios no se generan interacciones específicas con el polímero que permitan incrementar la señal de corriente, como se observa en los resultados en presencia de una solución de uridina como único analito (ver Tabla 5). Por lo tanto, podríamos tener adsorción superficial de la uridina o adsorción de uridina en el sitio de reconocimiento de la adenosina (Figura 38). Si es una adsorción solo en la superficie más externa del polímero, que bloquea el ingreso de adenosina a la superficie, estas moléculas de uridina deberían removese luego de un lavado. Por otro lado, en caso de que la uridina se adsorba en los sitios de reconocimiento, impidiendo que ingrese la adenosina, dado que existe una interacción con el polímero, luego de un lavado, aún podrían quedar retenidas, manteniendo el bloqueo de ingreso de adenosina. Es decir que los resultados obtenidos de corriente de pico ($0,07 \pm 0,1 \mu\text{M}$) sugieren entonces que la uridina se adsorbe inespecíficamente en los sitios de reconocimiento de la adenosina, bloqueando su ingreso.

Por otro lado, es importante destacar que los valores de corriente alcanzados en este caso son mucho menores a los obtenidos al estudiar la mezcla de 100 μM de uridina y 100 μM de adenosina (Tabla 5), debido a que en esta situación existe una competencia entre ambas moléculas para incorporarse a los sitios de reconocimiento y en el primer caso todos los sitios son ocupados por las moléculas de uridina antes de poder incorporarse la adenosina.

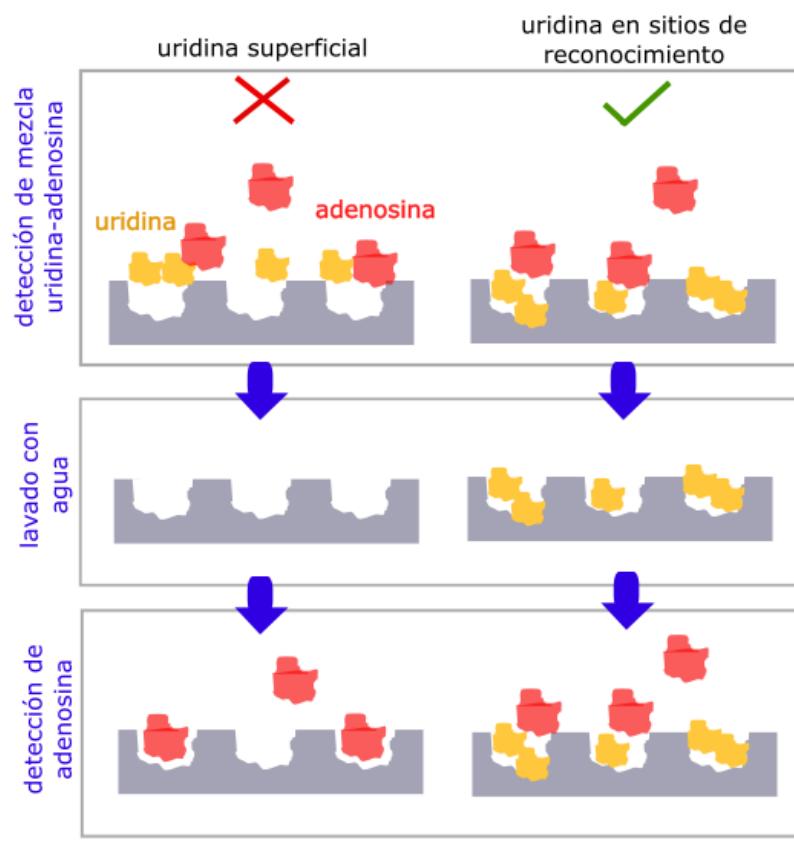


Figura 38: Esquema de las posibles formas de impedimento estérico generados por la incorporación de uridina al polímero.

6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se buscó el desarrollo y optimización de un sensor electroquímico eficiente para la detección de adenosina, mediante la técnica de impresión molecular.

Inicialmente, se comprobó de manera exitosa que la técnica de electropolimerización mediante CV permite la generación de PANI sobre el electrodo de trabajo. Este hecho se evidenció al observar los picos asociados a los tres procesos de óxido reducción característicos de dicho polímero, equivalentes a datos bibliográficos [40,55]. También, se verificó la remoción de adenosina de la superficie del MIP sintetizado a partir del estudio de los perfiles electroquímicos de las soluciones remanentes de remoción, la cual alcanzó un máximo en la mayoría de los casos. Además, mediante el estudio de distintos parámetros electroquímicos de síntesis, se logró encontrar las condiciones más eficientes para la obtención de un sistema que permita alcanzar las mejores respuestas de corriente. De esta manera, se ha podido determinar que un bajo número de ciclos de CV, como una alta velocidad de síntesis pueden conducir a una electropolimerización poco uniforme. Este hecho podría deberse a que, en el primer caso, la cantidad de ciclos no es conveniente para que se genere una deposición de polímero suficiente, obteniéndose una película de polímero delgada. Además, esto explicaría por qué al estudiar la remoción de adenosina en sistemas sintetizados en dichas condiciones, los resultados no fueron consistentes, dado que las señales correspondientes a la adenosina aumentaban y disminuían, sin seguir una tendencia respecto a la cantidad de ciclos de remoción. Es decir que una película delgada de polímero podría afectar a la incorporación de adenosina. Por otro lado, una alta velocidad de síntesis lleva a la incorporación acelerada de polímeros sobre la superficie del electrodo. Es por esto que, al realizar una caracterización electroquímica por CV de estos sistemas, el área electroactiva del MIP fue menor a la del NIP, evidenciando que la morfología de la película de polímero generada era poco conveniente para los objetivos del trabajo. Finalmente, se seleccionó el MIP cuya área electroactiva fuera mayor comparada con el NIP y mostrara a su vez una mejor respuesta al realizar CV en una solución de ferricianuro.

Luego de encontrar las condiciones óptimas para la síntesis del polímero, se estudió el medio más conveniente para el desarrollo del sensor. Para esto, se analizó la estabilidad del MIP en medio ácido como neutro, mediante el estudio de la degradación del polímero durante el proceso de remoción. Se encontró que el porcentaje de degradación del polímero durante dicho proceso es mucho mayor en medio ácido, siendo de 85 % y 25 % para medio ácido y neutro, respectivamente. Por lo tanto, se estableció al medio neutro como el más conveniente para el desarrollo del sensor, a pesar de no ser las condiciones óptimas de conductividad o respuesta redox de la PANI de por sí.

Teniendo las bases del sensor establecidas, se realizó una caracterización del sistema. Por medio de ATR-IR, se evidenció la generación de PANI sobre la superficie del electrodo, ya que se observaron señales características de la estructura química de dicho polímero, coincidentes con bibliografía [57–59]. Sumado a eso, se identificaron diferencias en la intensidad de las señales para MIP y NIP, que podrían asociarse a la presencia de adenosina incorporada sobre la superficie del polímero (MIP) dada la interacción que puede existir entre los grupos OH de la adenosina y los grupos N-H de la PANI, de los anillos aromáticos.

Mediante AFM se determinó la rugosidad del sistema, siendo mucho mayor en el caso del MIP respecto al MIP con adenosina y al NIP, lo que se asocia con la presencia de sitios de reconocimiento. Por otra parte, los espesores de dichos sistemas fueron muy similares,

corroborando que la cantidad de polímero depositada sobre el electrodo es similar en los tres casos. Por otro lado, se estudió la composición atómica del sistema por SEM y se obtuvo un alto contenido de nitrógeno en el caso del MIP con adenosina, verificando la incorporación de dicha molécula durante el proceso de detección del analito, debido a la presencia de sitios de reconocimiento específicos. Además, al realizar la remoción de la adenosina, dicho contenido de nitrógeno deja de observarse, lo que demuestra que se remueve la mayor cantidad de adenosina posible por barridos de CV.

Mediante la caracterización electroquímica por CV en ferricianuro (KCl 0,1 M) se obtuvo una corriente de pico promedio mayor en el caso del grafito, comparado con MIP y NIP. Este hecho es consistente con una mayor área superficial resultante de la propia porosidad del electrodo. Por otro lado, la corriente de pico alcanzada por MIP, asociada con una mayor área electroactiva, fueron mayores comparado con el NIP, coincidente con la presencia de los sitios de reconocimiento que aumentan la superficie de contacto. No obstante, se esperaba que las diferencias entre las áreas electroactivas fueran mayores, ya que la del MIP es solo un 22 % mayor a la del NIP. Considerando que, mediante las caracterizaciones restantes se corroboró la existencia de una alta cantidad de sitios de reconocimiento específicos para adenosina, se descarta la posibilidad de que la estrecha diferencia entre áreas electroactivas entre MIP y NIP este dada por la generación de un bajo número de sitios de reconocimiento en el MIP. Se plantea entonces que posiblemente no todos los sitios de reconocimiento se encontrarían disponibles para el fácil acceso del ión ferricianuro y que solo alcanzarían los ubicados de forma superficial

Finalmente, de forma de verificar la sensibilidad y selectividad del sistema, se estudió la respuesta del MIP frente a la adenosina. Mediante ensayos de DPV y generación de una curva de calibración se calculó la sensibilidad del sistema. Se corroboró que el MIP cuenta con una sensibilidad mucho mayor respecto al NIP y grafito, lo que podría deberse a la presencia de sitios de reconocimiento específicos para adenosina ya que, al incorporarse dicho analito la corriente se incrementa tanto por la respuesta redox del polímero como por la corriente asociada al proceso redox de la adenosina. Además, es interesante destacar que la corriente respuesta obtenida para NIP y grafito son muy similares, lo que podría atribuirse a que el área electroactiva del NIP no es mayor a la del grafito, dada la porosidad de este último. Por lo tanto, considerando que el área electroactiva del MIP también es menor a la del grafito, se verifica que la diferencia de corriente respuesta del MIP está dada por los sitios de reconocimiento y no por la cantidad de polímero adsorbido.

Se obtuvo un límite de detección del MIP de 0,54 μM . Comparando con otras técnicas utilizadas para la detección de adenosina, se puede ver que los resultados de sensibilidad son similares a los alcanzados por técnicas como HPLC, encontrándose dentro del mismo orden (1,5 μM). Sin embargo, la diferencia es notable al comparar con el LOD obtenido por cromatografía de interacción hidrofílica acoplada a espectrometría de masas (HILIC-MS-MS), considerando que en este caso llega al orden de nanomolar (Tabla 6). No obstante, como se mencionó previamente, dichas técnicas requieren de instrumentos costosos y difíciles de transportar, pretratamientos de muestras largos y tediosos, personal técnico altamente calificado, además de no contar con buena estabilidad [16–18]. Por otro lado, es importante resaltar el objetivo de este trabajo, el cual busca detectar y cuantificar situaciones en las que se tiene una sobreproducción de adenosina. En este caso se estudió la detección de adenosina como método diagnóstico, por lo que es indispensable analizar los niveles de dicha molécula en plasma y orina. La concentración de adenosina extracelular en condiciones fisiológicas normales está dentro del rango 20-300 nM, pudiendo alcanzar valores en el orden micromolar en condiciones de demanda metabólica o falta de oxígeno leves [1–3]. En orina,

la concentración normal es un poco mayor, alcanzando el rango de 2-7 μM [62]. Sin embargo, en condiciones patológicas como cáncer, epilepsia y patologías autoinmunes, caracterizadas por la generación de necrosis, isquemia e inflamación aguda, los valores de adenosina extracelular pueden alcanzar los 30 μM [6]. Por lo tanto, el LOD alcanzado por este sensor podría ser útil y suficiente para la detección de adenosina en plasma y orina, considerando que la finalidad de este es la diferenciación de situaciones de sobreproducción de adenosina respecto condiciones fisiológicas normales.

Tabla 6: Rendimiento de diversas técnicas para la detección de adenosina.

Técnica	Rango de detección	LOD	Referencia
HPLC	0,15-301 μM	1,5 μM	[14]
HILIC-MS/MS	0,1-500 nM	0,0025 nM	[11]
Aptámeros	0,1- 10^6 nM	0,1 nM	[5]
MIP	5-100 μM	0,54 μM	Esta tesis

Por otro lado, se estudió la selectividad del sensor mediante la detección de adenosina en presencia de uridina. Se corroboró que efectivamente el sistema permite detectar adenosina, aun en presencia de una molécula muy similar estructuralmente. Los resultados obtenidos para una relación 1:1 para uridina:adenosina no fueron óptimos, considerando que la señal de corriente alcanzada representa solamente el 17 % de la corriente de pico obtenida en ausencia de uridina. Sin embargo, si la relación de uridina y adenosina es de 1:2, la señal obtenida disminuye en un 28 % únicamente, respecto a la alcanzada en una solución de adenosina de igual concentración, lo que se considera una sensibilidad oportuna para los objetivos propuestos.

Además de la similitud estructural entre uridina y adenosina, podemos encontrar ambos compuestos tanto en plasma como orina por contar con funciones fisiológicas opuestas a la adenosina, como es la vasoconstricción [63]. A su vez, en plasma, la concentración de la uridina en condiciones fisiológicas normales suele ser mayor, respecto a otras purinas y pirimidinas. Dicha concentración está estrictamente regulada en un rango de 3 a 8 μM , por diversos mecanismos [64]. Por otro lado, en orina, puede alcanzar una concentración de 12 μM [65]. Es decir, que las concentraciones fisiológicas normales de adenosina son similares o menores a las de uridina. Sin embargo, en condiciones patológicas, la sobreproducción de adenosina es tal que la relación resultante entre uridina y adenosina permite la diferenciación eficiente de los metabolitos mediante el sensor propuesto, tanto en orina como plasma.

A modo de resumen, se pudo sintetizar de manera exitosa una película de PANI sobre un electrodo de trabajo, y además, se logró generar sitios de reconocimiento específicos para adenosina al remover dicha molécula, mediante técnicas electroquímicas, desarrollando así lo que llamamos MIP. Este hecho se reflejó en una rugosidad de la superficie 6 veces mayor respecto al control, como también en un área electroactiva un 22 % mayor comparado con el NIP. La generación de dichos sitios de reconocimiento resultó en una sensibilidad 5 veces mayor respecto al control y un LOD de 0,54 μM , útil y suficiente para distinguir situaciones de sobreproducción de adenosina, tanto en orina como en plasma. Además, se corroboró la selectividad del sistema en condiciones patológicas, obteniendo una señal que disminuye un 28 % únicamente, respecto a una solución de adenosina en ausencia de una molécula similar estructuralmente.

Por lo tanto, considerando la confirmación de una sensibilidad eficiente y adecuada para los objetivos del estudio, así como una selectividad confiable respecto a moléculas estructuralmente similares y coexistentes fisiológicamente con el analito en estudio, se puede concluir que el sensor desarrollado permite la detección de adenosina con alta sensibilidad y selectividad. Además, el sensor alcanza un rango lineal de detección que permitiría diferenciar condiciones patológicas. Asimismo, la simplicidad del método y el bajo costo del proceso, convierten a este tipo de polímeros de impresión molecular (MIP) en una opción conveniente y destacada en comparación con otras tecnologías existentes para la detección y cuantificación de adenosina. Inclusive, si bien en el desarrollo de la tesis se evaluaron muestras sintéticas, se podría continuar con la línea de estudio de manera de probar muestras reales (orina o plasma) y estudiar su competitividad .

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P.A. Borea, S. Gessi, S. Merighi, K. Varani, Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects?, *Trends Pharmacol Sci* 37 (2016) 419–434. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.02.006>.
- [2] P.A. Borea, S. Gessi, S. Merighi, F. Vincenzi, K. Varani, Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art, *Physiol Rev* 98 (2018) 1591–1625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>.-Adenosine.
- [3] Y. Roupioz, Functionalization of Gold Nanoparticles for a Color-Based Detection of Adenosine in a Bioassay, *J Chem Educ* 96 (2019) 1002–1007. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00044>.
- [4] P.A. Borea, S. Gessi, S. Merighi, F. Vincenzi, K. Varani, Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art, *Physiol Rev* 98 (2018) 1591–1625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>.-Adenosine.
- [5] D. Zhang, J. Ma, X. Meng, Z. Xu, J. Zhang, Y. Fang, Y. Guo, Electrochemical aptamer-based microsensor for real-time monitoring of adenosine in vivo, *Anal Chim Acta* 1076 (2019) 55–63. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2019.05.035>.
- [6] B.B. Fredholm, Adenosine - A physiological or pathophysiological agent?, *J Mol Med* 92 (2014) 201–206. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1101-6>.
- [7] K.A. Jacobson, M.L. Reitman, Adenosine-Related Mechanisms in Non-Adenosine Receptor Drugs, *Cells* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/cells9040956>.
- [8] P.A. Borea, S. Gessi, S. Merighi, F. Vincenzi, K. Varani, Pathological overproduction: the bad side of adenosine, *Br J Pharmacol* 174 (2017) 1945–1960. <https://doi.org/10.1111/bph.13763>.
- [9] K.A. Jacobson, M.L. Reitman, Adenosine-Related Mechanisms in Non-Adenosine Receptor Drugs, *Cells* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/cells9040956>.
- [10] M. Colella, I. Panfoli, M. Doglio, M. Cassanello, M. Bruschi, L.C. De Angelis, G. Candiano, A. Parodi, M. Malova, A. Petretto, G. Morana, D. Tortora, M. Severino, M. Maghnie, G. Buonocore, A. Rossi, O. Baud, L.A. Ramenghi, Adenosine Blood Level: A Biomarker of White Matter Damage in Very Low Birth Weight Infants, *Curr Pediatr Rev* 18 (2022) 153–163. <https://doi.org/10.2174/1573396318666220127155943>.
- [11] X. Zhang, Y. Hu, X. Hong, M. Wang, Z. Fang, X. Cao, K. Jiang, C. Guo, Determination of adenosine and its modifications in urine and plasma from breast cancer patients by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1209 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123428>.
- [12] International Society for Olfaction and Chemical Sensing, IEEE Sensors Council, Institute of Electrical and Electronics Engineers, ISOEN 2019 : 18th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose : 2019 symposium proceedings : ACROS Fukuoka, May 26-29, 2019, n.d.
- [13] International Society for Olfaction and Chemical Sensing, IEEE Sensors Council, Institute of Electrical and Electronics Engineers, ISOEN 2019 : 18th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose : 2019 symposium proceedings : ACROS Fukuoka, May 26-29, 2019, n.d.
- [14] Z.M. Qian, C.H. Li, Y.L. Song, M.X. Zhou, W.J. Li, Rapid Determination of Adenosine in Cordyceps by Online Extraction HPLC, *J Chromatogr Sci* 57 (2019) 381–384. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz007>.

- [15] T. Simard, R. Jung, A. Labinaz, M.A. Faraz, F.D. Ramirez, P. Di Santo, D. Perry-Nguyen, I. Pitcher, P. Motazedian, C. Gaudet, R. Rochman, J. Marbach, P. Boland, K. Sarathy, S. Alghofaili, J.J. Russo, E. Couture, S. Promislow, R.S. Beanlands, B. Hibbert, Evaluation of Plasma Adenosine as a Marker of Cardiovascular Risk: Analytical and Biological Considerations, *J Am Heart Assoc* 8 (2019). <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.012228>.
- [16] Q. Zhang, D. Berg, S.M. Mugo, Molecularly imprinted carbon based electrodes for tetrahydrocannabinol sensing, *Inorg Chem Commun* 107 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.107459>.
- [17] M.M. El-Beshlawy, F.M. Abdel-Haleem, A.H. Kamel, A. Barhoum, Screen-Printed Sensors Coated with Polyaniline/Molecularly Imprinted Polymer Membranes for the Potentiometric Determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicide in Wastewater and Agricultural Soil, *Chemosensors* 11 (2022) 3. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11010003>.
- [18] M.A. Tantawy, A.M. Yehia, H.T. Elbalkiny, All-solid-state chip utilizing molecular imprinted polymer for erythromycin detection in milk samples: Printed circuit board-based potentiometric system, *Microchimica Acta* 190 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05959-w>.
- [19] INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY ANALYTICAL CHEMISTRY DIVISION COMMISSION ON GENERAL ASPECTS OF ANALYTICAL CHEMISTRY"? CHEMICAL SENSORS DEFINITIONS AND CLASSIFICATION Prepared for publication by ADAM HULANICKI', STANISEAW GEAB and FOLKE INGMAN2, n.d.
- [20] F. Mandoj, S. Nardis, C. Di Natale, R. Paolesse, Porphyrinoid thin films for chemical sensing, in: *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, Elsevier, 2018: pp. 422–443. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11677-4>.
- [21] F. Damiri, H. Gaiji, I.I. Muhamad, N.A.M. Lazim, D. Kaur, M. Berrada, Design and fabrication of polymer nanocomposite sensors, *Polymeric Nanocomposite Materials for Sensor Applications* (2023) 87–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98830-8.00008-4>.
- [22] H.C. Ananda Murthy, A. Gebretsadik, M. Haftu, T. Nemera, T. Bhattacharya, C.R. Ravikumar, Polymer composites for electrochemical sensor applications, (2023). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98830-8.00016-3>.
- [23] K. Chen, W. Chou, L. Liu, Y. Cui, P. Xue, M. Jia, Electrochemical sensors fabricated by electrospinning technology: An overview, *Sensors (Switzerland)* 19 (2019). <https://doi.org/10.3390/s19173676>.
- [24] J. Baranwal, B. Barse, G. Gatto, G. Broncova, A. Kumar, Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review, *Chemosensors* 10 (2022). <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363>.
- [25] N. Elgrishi, K.J. Rountree, B.D. McCarthy, E.S. Rountree, T.T. Eisenhart, J.L. Dempsey, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J Chem Educ* 95 (2018) 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.
- [26] N.A. Bohari, S. Siddiquee, S. Saallah, M. Misson, S.E. Arshad, Optimization and analytical behavior of electrochemical sensors based on the modification of indium tin oxide (ITO) using PANI/MWCNTs/AuNPs for mercury detection, *Sensors (Switzerland)* 20 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3390/s20226502>.
- [27] H.R. Lim, S.M. Lee, M. Mahmood, S. Kwon, Y.S. Kim, Y. Lee, W.H. Yeo, Development of flexible ion-selective electrodes for saliva sodium detection, *Sensors* 21 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.3390/s21051642>.

- [28] J. Min, J.R. Sempionatto, H. Teymourian, J. Wang, W. Gao, Wearable electrochemical biosensors in North America, *Biosens Bioelectron* 172 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112750>.
- [29] Y.A. Yarkaeva, D.A. Dymova, M.I. Nazyrov, L.R. Zagitova, V.N. Maistrenko, Voltammetric sensor based on molecular imprinted polymer for lincomycin determination, *Chimica Techno Acta* 10 (2023). <https://doi.org/10.15826/chimtech.2023.10.2.10>.
- [30] H. Zhou, H. Qiu, J. Zhang, Y. Fang, B. Cui, Y. Shen, Design, preparation, and application of molecularly imprinted nanomaterials for food safety analysis with electrochemistry, *Coord Chem Rev* 500 (2024) 215523. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2023.215523>.
- [31] S.M. Mugo, B.J. Edmunds, D.J. Berg, N.K. Gill, An integrated carbon entrapped molecularly imprinted polymer (MIP) electrode for voltammetric detection of resveratrol in wine, *Analytical Methods* 7 (2015) 9092–9099. <https://doi.org/10.1039/c5ay01799h>.
- [32] E.N. Ndunda, Molecularly imprinted polymers—A closer look at the control polymer used in determining the imprinting effect: A mini review, *Journal of Molecular Recognition* 33 (2020). <https://doi.org/10.1002/jmr.2855>.
- [33] F.M. Suzaei, S.M. Daryanavard, A. Abdel-Rehim, F. Bassyouni, M. Abdel-Rehim, Recent molecularly imprinted polymers applications in bioanalysis, *Chemical Papers* 77 (2023) 619–655. <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02488-3>.
- [34] F. Cui, Z. Zhou, H.S. Zhou, Molecularly imprinted polymers and surface imprinted polymers based electrochemical biosensor for infectious diseases, *Sensors (Switzerland)* 20 (2020). <https://doi.org/10.3390/s20040996>.
- [35] J.J. Belbruno, Molecularly Imprinted Polymers, *Chem Rev* 119 (2019) 94–119. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>.
- [36] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, Molecular imprinting: Perspectives and applications, *Chem Soc Rev* 45 (2016) 2137–2211. <https://doi.org/10.1039/c6cs00061d>.
- [37] A.G. Ayankojo, J. Reut, V. Ciocan, A. Öpik, V. Syritski, Molecularly imprinted polymer-based sensor for electrochemical detection of erythromycin, *Talanta* 209 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120502>.
- [38] S.H. Mohammed Albayatı, Z. Üstündağ, P. Soylu, A novel molecularly imprinted electrochemical sensor for the ultrasensitive detection of tert-butylhydroquinone in edible oils, *Anal Biochem* 682 (2023) 115348. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2023.115348>.
- [39] C. Dhand, N. Dwivedi, S. Mishra, P.R. Solanki, V. Mayandi, R.W. Beuerman, S. Ramakrishna, R. Lakshminarayanan, B.D. Malhotra, Polyaniline-based biosensors, *Nanobiosensors in Disease Diagnosis* (2015) 25. <https://doi.org/10.2147/NDD.S64841>.
- [40] T.H. Le, Y. Kim, H. Yoon, Electrical and electrochemical properties of conducting polymers, *Polymers (Basel)* 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/polym9040150>.
- [41] K. Namsheer, C.S. Rout, Conducting polymers: a comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications, *RSC Adv* 11 (2021) 5659–5697. <https://doi.org/10.1039/d0ra07800j>.
- [42] E. Ozkan, G. Ozcelikay, E.D. Gök Topak, E. Nemutlu, S.A. Ozkan, Ö. Dizdar, S. Aksoy, S. Kır, Molecularly imprinted electrochemical sensor for the selective and sensitive determination of octreotide in cancer patient plasma sample, *Talanta* 263 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124679>.
- [43] R.S. Norouzian, M.M. Lakouraj, E.N. Zare, Novel conductive PANI/hydrophilic thiocalix[4]arene nanocomposites: Synthesis, characterization and investigation of properties, *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)* 32 (2014) 218–229. <https://doi.org/10.1007/s10118-014-1402-4>.

- [44] A.A. Almehizia, A.M. Naglah, M.G. Alanazi, A. El-Galil E. Amr, A.H. Kamel, Potentiometric planar platforms modified with a multiwalled carbon nanotube/polyaniline nanocomposite and based on imprinted polymers for erythromycin assessment, RSC Adv 13 (2023) 35926–35936. <https://doi.org/10.1039/D3RA07482J>.
- [45] M. Drobysk, V. Ratautaite, E. Brazys, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Molecularly imprinted composite-based biosensor for the determination of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein, Biosens Bioelectron 251 (2024) 116043. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2024.116043>.
- [46] K. Jeremiah Aoki, J. Chen, Tips of Voltammetry, in: Voltammetry, IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81341>.
- [47] V. Mirceski, S. Skrzypek, L. Stojanov, Square-wave voltammetry, ChemTexts 4 (2018). <https://doi.org/10.1007/s40828-018-0073-0>.
- [48] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical methods : fundamentals and applications, n.d.
- [49] A. Molazemhosseini, L. Magagnin, P. Vena, C.C. Liu, Single-use disposable electrochemical label-free immunosensor for detection of glycated hemoglobin (HbA1c) using differential pulse voltammetry (DPV), Sensors (Switzerland) 16 (2016). <https://doi.org/10.3390/s16071024>.
- [50] G. Deffo, T. Flavien, N. Tene, L.M. Dongmo, S. Lesly, Z. Jiokeng, R. Clé, T. Temgoua, Differential pulse and square-wave voltammetry as sensitive methods for electroanalysis applications, (2024). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85669-0.00040-4>.
- [51] A.K. Singh, Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles, in: Engineered Nanoparticles, Elsevier, 2016: pp. 125–170. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801406-6.00004-2>.
- [52] W. Zhou, R.P. Apkarian, Z. Lin Wang, D. Joy, Fundamentals of Scanning Electron Microscopy, n.d.
- [53] N. Ishida, Atomic force microscopy, (2024). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91150-4.00011-2>.
- [54] C. Xxii, SCIENCE FOR CONSERVATION Transmission and Reflection (ATR) Far-Infrared Spectroscopy Applied in the Analysis of Cultural Heritage Materials, n.d.
- [55] M. Lu, The synthesis and characterization of polyaniline nanocomposite, n.d.
- [56] J. Moldenhauer, M. Meier, D.W. Paul, Rapid and Direct Determination of Diffusion Coefficients Using Microelectrode Arrays, J Electrochem Soc 163 (2016) H672–H678. <https://doi.org/10.1149/2.0561608jes>.
- [57] M. Lohrasbi, N. Hedayat, S.S.C. Chuang, In-Situ Infrared Study of the Synthesis of Polyaniline under Acid and Neutral pH, Top Catal 57 (2014) 1570–1575. <https://doi.org/10.1007/s11244-014-0334-0>.
- [58] B.J. Waghmode, S.H. Patil, M.M. Jahagirdar, V.S. Patil, R.P. Waichal, D.D. Malkhede, S.D. Sathaye, K.R. Patil, Studies on morphology of polyaniline films formed at liquid-liquid and solid-liquid interfaces at 25 and 5°C, respectively, and effect of doping, Colloid Polym Sci 292 (2014) 1079–1089. <https://doi.org/10.1007/s00396-013-3150-3>.
- [59] O.A. Nunoo, E.K.K. Abavare, R.K. Nkum, K. Singh, Article ID: IJARET_10_04_005GRA Nano composites, International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology (IJARET) 10 (n.d.) 40–46. <http://www.iaeme.com/IJARET/index.asp?40http://www.iaeme.com/ijaret/issues.asp?JType=IJARET&VType=10&IType=4http://www.iaeme.com/ijaret/issues.asp?JType=IJARET&VType=10&IType=4>.
- [60] T.F. Lai'~, R.E. Marsh, A. Amos, The Crystal Structure of Adenosine*, 1972.

- [61] E.A. Green, R. Rosenstein, R. Shiono, D.J. Abraham, A. Amos, The Crystal Structure of Uridine*, 1975.
- [62] Z.T. Kurt, D. Çimen, A. Denizli, N. Bereli, Development of Optical-Based Molecularly Imprinted Nanosensors for Adenosine Detection, *ACS Omega* 8 (2023) 18839–18850. https://doi.org/10.1021/AC SOME GA.3C01028/ASSET/IMAGES/LARGE/AO3C01028_0012.jpeg.
- [63] Y. Zhang, S. Guo, C. Xie, J. Fang, Uridine Metabolism and Its Role in Glucose, Lipid, and Amino Acid Homeostasis, *Biomed Res Int* 2020 (2020). <https://doi.org/10.1155/2020/7091718>.
- [64] T. Yamamoto, H. Koyama, M. Kurajoh, T. Shoji, Z. Tsutsumi, Y. Moriwaki, Biochemistry of uridine in plasma, *Clinica Chimica Acta* 412 (2011) 1712–1724. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.06.006>.
- [65] W. Kang, Quantitative determination of uridine in rabbit plasma and urine by liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry, *Biomedical Chromatography* 26 (2012) 541–544. <https://doi.org/10.1002/bmc.1698>.