



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

“Diseño de un dispositivo electroquímico para la detección de Serotonina y Dopamina”

Opción de titulación

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

Presenta:

Ing. Yolanda Jesús Martínez Pimentel

Dirigido por:

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Dra. Vanessa Vallejo Becerra
Presidente

Firma

Dr. Abraham Ulises Chávez Ramírez
Secretario

Firma

Dra. Minerva Guerra Balcázar
Vocal

Firma

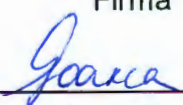
Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández
Suplente

Firma

Dr. Rufino Nava Mendoza
Suplente

Firma


Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Enero de 2017

RESUMEN

En la actualidad el estudio de neurotransmisores se ha vuelto de gran importancia en el área científica, principalmente médica y farmacológica, debido a que desempeñan un papel importante en el funcionamiento del sistema nervioso central, cardiovascular, renal y hormonal. El estudio de diferentes neurotransmisores, como dopamina (DA), adrenalina (AD), noradrenalina (NE) y/o serotonina (5-HT), radica en poder detectar a tiempo, de acuerdo a sus concentraciones, la aparición de diferentes enfermedades neurodegenerativas como esquizofrenia, epilepsia, trastorno hiperactivo, déficit de atención, depresión, entre otras.

En este trabajo se realizó la determinación de diferentes concentraciones de dopamina y serotonina utilizando, como electrolito de apoyo para experimentos voltamperométricos, una solución buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.0. La determinación de los neurotransmisores se realizó por un método electroquímico utilizando electrodos modificados en su superficie por materiales nanoparticulados de NiAl hidróxidos dobles lamiares (LDH) y de PdNiO, con la finalidad de mejorar propiedades físicas y químicas de la superficie del electrodo de carbón vítreo.

Se obtuvieron los perfiles electroquímicos, utilizando una celda convencional de tres electrodos, de cada material por medio de voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de pulso diferencial (DPV) a diferentes concentraciones de dopamina y serotonina, así como las curvas de calibración para cada neurotransmisor. Una vez realizada la comparación de los materiales electroquímicamente se optó por el material NiAl / LDH ya que presento una mejor sensibilidad en la detección de DA y 5-HT. El material NiAl / LDH fue caracterizado fisicoquímicamente por microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos-X (XRD) y fluorescencia de rayos X (XRF).

El desarrollo del dispositivo electroquímico se realizó en base a electrodos serigrafados de carbono, modificados con el material seleccionado. Se obtuvieron curvas de calibración y con los datos arrojados se realizó la programación de un dispositivo electrónico capaz de detectar concentraciones de serotonina y/o dopamina en una solución buffer fosfatos (PBS) pH 7.0 basados en los niveles encontrados en orina real (0.003mM de DA y 0.001mM de 5-HT), y de esta manera diagnosticar si los niveles son altos, bajos o normales.

Los resultados obtenidos de la integración del dispositivo servirán como base para el desarrollo de sensores electroquímicos en condiciones reales altamente sensibles que puedan realizar la detección de de estos neurotransmisores en la orina y realizar diagnósticos oportunos en enfermedades neurodegenerativas.

Palabras Clave: Serotonina, Dopamina, NiAl / LDH, PdNiO, DPV, CV, Dispositivo electroquímico.

SUMMARY

Nowadays the study of neurotransmitters has gained great importance in the scientific area, mainly in medical and pharmacological fields, because they play an important role in the performance of central nervous system, cardiovascular, renal and hormonal. The study of different neurotransmitters, such as dopamine (AD), adrenaline (AD), noradrenaline (NE) and / or serotonin (5-HT), lies in being able to detect on time, according to their concentrations, the appearance of different Neurodegenerative disorders and diseases such as schizophrenia, epilepsy, attention deficit, hyperactivity, depression, among others.

In this work the determination of different concentrations of dopamine and serotonin, as a support electrolyte for voltammetric experiments was carried out using a phosphate buffer solution (PBS) at pH 7.0. The determination of the neurotransmitters is performed by electrodes modified on its surface by nanoparticles of NiAl double lamellar hydroxides (LDH) and PdNiO, in order to improve the physical and chemical properties of the surface of the vitreous carbon electrode.

Electrochemical profiles were obtained using a conventional three-electrode cell of each material by means of cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) at different concentrations of dopamine and serotonin, and obtaining calibration curves for each Neurotransmitter. Once the comparison of the materials was done electrochemically the LDH material was chosen because it presented a better sensitivity in the detection of DA and 5-HT. The LDH material was characterized physicochemically by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and X-ray fluorescence (XRF).

The development of the electrochemical device was based on screen-printed carbon electrodes, modified with the selected material. Calibration curves were obtained and with the data set, an electronic device capable of detecting serotonin and / or dopamine concentrations in a pH 7.0 buffered phosphate solution (PBS) was performed based on the levels found in real urine (0.003mM of DA and 0.001mM 5-HT), and in this way to diagnose if the levels are high, low or normal.

The integration of the electronic device plus the obtained results from the would serve as a basis for the development of electrochemical sensors for real conditions to perform the detection of these neurotransmitters in the urine and make timely diagnoses in neurodegenerative diseases.

Keywords: Serotonin, Dopamine, NiAl / LDH, PdNiO, DPV, CV, Electrochemical device.

Con especial dedicatoria a Dios, porque me llena de fe, esperanza y sin el nada
podría lograr. A mis padres, amigos, profesores y pareja que siempre me han
apoyado.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece de manera particular al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACY) por el apoyo y financiamiento del proyecto 242787.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Neurotransmisores.....	17
2.1.1 Serotonina.....	18
2.1.2 Dopamina.....	21
2.2 Sensores.....	24
2.2.1 <i>Sensores químicos</i>	25
2.2.2 <i>Sensores electroquímicos</i>	27
2.3 Técnicas electroquímicas.....	29
2.3.1 Celda electroquímica convencional de tres electrodos.....	29
2.3.2 Electrodo Serigrafados.....	31
2.3.3 Voltametría Cíclica.....	33
2.3.4 Voltametría de Pulso Diferencial.....	35
2.4 Técnicas analíticas convencionales para la detección de neurotransmisores.....	37
2.5 Sensores electroquímicos para la detección de dopamina (DA) y serotonina (5-HT).....	39
2.6 Materiales modificadores de la superficie del electrodo.....	41
2.6.1 Hidróxido doble laminar de Aluminio y Níquel.....	42
2.6.2 Nanopartículas de Paladio en combinación con Óxido de Níquel.....	44
3. HIPÓTESIS.....	45
4. OJETIVOS.....	45
4.1 Objetivo General.....	45
4.2 Objetivos particulares.....	45
5. METODOLOGÍA.....	46
5.1 Reactivos.....	46

5.2	Pre-tratamiento del electrodo de carbón vítreo.....	46
5.3	Síntesis de Nanomateriales	47
5.3.1	Síntesis de nanopartículas NiAl hidróxidos dobles laminares.	47
5.3.2	Síntesis de nanopartículas de PdNiO	47
5.4	Preparación de tintas catalíticas	48
5.4.1	Preparación de tinta catalítica con NiAl / LDH.....	48
5.4.2	Preparación de tinta catalítica con PdNiO	48
5.5	Modificación de la superficie del electrodo de carbón vítreo.....	49
5.6	Preparación de solución electrolítica para los experimentos electroquímicos.....	49
5.7	Preparación de solución con neurotransmisores.....	49
5.8	Caracterización y medición electroquímica en celda convencional de tres electrodos.....	50
5.8.1	Mediciones por Voltametría Cíclica (CV)	50
5.8.2	Mediciones por Voltametría de Pulso Diferencial (DPV)	50
5.9	Caracterización fisicoquímica del material seleccionado.....	50
5.9.1	Microscopio Electrónico de Barrido.....	51
5.9.2	Difracción de Rayos X.....	52
5.9.3	Espectroscopia de Fluorescencia de Rayos X.....	54
5.10	Caracterización electroquímica con electrodos serigrafiados modificados en su superficie por NiAl / LDH	56
5.10.1	Modificación de la superficie del electrodo serigrafiado de carbono.....	56
5.10.2	Evaluación electroquímica con electrodos serigrafiados	56
5.11	Integración de los electrodos serigrafiados con electrónica	57
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
6.1	Caracterización electroquímica en celda convencional de tres electrodos.	59
6.1.1	Voltametría Cíclica (CV)	59
6.1.2	Voltametría de Pulso Diferencial (DPV)	66

6.1.3	Comparación de materiales	73
6.2	Caracterización Físicoquímica del material NiAl / LDH	76
6.2.1	Microscopio Electrónico de Barrido (MEB o SEM)	76
6.2.2	Fluorescencia de Rayos X (XRF).....	80
6.2.3	Difracción de Rayos X (XRD).....	81
6.3	Pruebas electroquímicas con electrodos serigrafiados de carbono.....	83
6.3.1	Respuesta Voltamperométrica de 5-HTyDA.....	84
6.4	Evaluación del desempeño del dispositivo electrónico.....	86
6.4.1	Programa.....	86
6.4.2	Circuito electrónico	87
6.4.3	Integración de circuitos electrónicos con electrodo serigrafiado modificado con NiAl / LDH	89
6.4.4	Obtención de datos de la oxidación de DA y 5-HT.....	90
6.4.5	Respuesta Voltamperométrica de 5-HT y DA con electrodos serigrafiados en el circuito electrónico.	91
7.	ANEXOS.....	94
8.	CONCLUSIONES.....	1
9.	REFERENCIAS.....	3

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas fundamentales de la neurotransmisión: 1, Impulso eléctrico; 2, Síntesis del neurotransmisor; 3, Almacenamiento del neurotransmisor; 4, Liberación del neurotransmisor; 5, Interacción con el receptor postsináptico; 6, Señal emitida por el neurotransmisor; 7, Incorporación a la terminación nerviosa de la célula presináptica; 8, Inactivación enzimática.	18
Figura 2. Estructura química de la 5-Hidroxitriptamina (5-HT, serotonina).....	19
Figura 3. Biosíntesis y catabolismo de la 5-HT.....	20
Figura 4. Estructura química de la dopamina (3, 4-dihidroxifeniletilamina).	22
Figura 5. Síntesis de la Dopamina.....	23
Figura 6. Sensor químico. a) Elemento reconocimiento (químico, biológico); b) Soporte o Receptor (Físicos, Químicos, Biológicos); c) Elemento transductor (electroquímico, óptico, piezoeléctrico, térmico); d) Elemento amplificador; e) Programa informático (procesamiento); f) Interfaz física.	26
Figura 7. Publicaciones en sensores químicos.....	27
Figura 8. Sistema de una media celda convencional de tres electrodos.	30
Figura 9. Componentes de un electrodo serigrafado.....	32
Figura 10. Electrodo serigrafado modificado en la superficie del electrodo de trabajo. (a) Inmunosensor: electrodo modificado con anticuerpos; (b) Genosensor: electrodo modificado con ADN; (c) Bimetálico: electrodo modificado con materiales metálicos.	33
Figura 11. Voltamperograma cíclico típico reversible en un proceso redox.	35
Figura 12. Señal de excitación aplicada en DPV.	36

Figura 13. Respuesta típica en DPV.	37
Figura 14. Representación estructural de los HDLs.	43
Figura 15. Detectores de señales emitidas por una muestra al recibir el haz.	52
Figura 16. Principio base de una difracción de rayos X.	54
Figura 17. Producción del espectro característico de Fluorescencia de Rayos X. (A) Excitación por bombardeo con fotones de rayo X (excitación secundaria). (B) Emisión del espectro característico de rayos X (Radiación X secundaria o radiación de Fluorescencia).	55
Figura 18. Esquema de dispositivo electrónico.	57
Figura 19. (A) Voltametría cíclica del electrodo NiAl / LDH en PBS (pH7.0) que contiene 0.1mM de DA. (B) Voltametría cíclica del electrodo modificado con PdNiO en PBS (pH 7.0) que contiene 0.1mM de DA.	61
Figura 20. Voltamperogramas cíclicos tanto del electrodo modificado con NiAl / LDH como del electrodo modificado con PdNiO en PBS (pH 7.0) que contiene 0.1mM de DA.	62
Figura 21. (A) Voltametría cíclica del electrodo NiAl / LDH en PBS (pH7.0) que contiene 0.1mM de 5-HT. (B) Voltametría cíclica del electrodo modificado con PdNiO en PBS (pH 7.0) que contiene 0.1mM de 5-HT.	64
Figura 22. Actividad electrocatalítica de 0.1mM de 5-HT sobre los electrodos modificados con NiAl / LDH y PdNiO en solución buffer fosfatos (PBS, pH 7.0).	65
Figura 23. Oxidación de Dopamina y Serotonina en la superficie del electrodo...	66
Figura 24. DPVs de DA en PdNiO / GCE (A) y NiAl / LDH / GCE (B) en solución 0.05M PBS (pH 7.0). (A) Concentraciones de DA en electrodo modificado con PdNiO: 0.005mM a 1mM partiendo de una concentración 0mM. (B) Concentración	

de DA en electrodo modificado con NiAl / LDH: 0.008mM a 1mM partiendo de una concentración 0mM. Cada DPV con su correspondiente curva de calibración..... 69

Figura 25. DPVs de 5-HT en PdNiO / GCE (A) y NiAl / LDH / GCE (B) en solución 0.05M PBS (pH 7.0). (A) Concentraciones de 5-HT en electrodo modificado con PdNiO: 0.01mM a 2Mm partiendo de una concentración 0mM. (B) Concentración de 5-HT en electrodo modificado con NiAl / LDH: 0.001mM a 0.2mM partiendo de una concentración 0mM. Cada DPV con su correspondiente curva de calibración. 72

Figura 26. Imágenes de SEM del material seleccionado NiAl / LDH a 5kV a diferentes aumentos..... 77

Figura 27. EDS del material 78

Figura 28. Mapeo del material NiAl LDH. 79

Figura 29. XRF del material NiAl LDH..... 80

Figura 30. Patrón de difracción del material NiAl LDH. 81

Figura 31. Voltamperogramas de pulso diferencial con electrodo serigrafiado de carbono modificado en su superficie por NiAl / LDH en una solución PBS (0.05M, pH 7.0). (A) Curva de calibración correspondiente a concentraciones de DA de 0mM, 0.006mM, 0.008mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM, 0.06mM, 0.08mM y 0.1mM. (B) Curva de calibración correspondiente a concentraciones de 5-HT de 0mM, 0.002Mm, 0.004mM, 0.006mM, 0.008mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM ya 0.06mM..... 85

Figura 32. Tren de pulsos obtenido del código de programación..... 87

Figura 33. Circuito Pontenciostatico 88

Figura 34. Integración de circuitos electrónicos con electrodos serigrafiados. 90

Figura 35. Voltamperogramas de Pulso Diferencial obtenidas a partir del circuito electrónico con electrodos serigrafiados modificados con NiAl / LDH. (A) DPV para DA en PBS (pH 7.0) con concentraciones: 0mM, 0.006mM, 0.008mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM, 0.06mM 0.08mM y 0.1mM. (B) DPV para 5-HT en PBS (pH 7.0) con concentraciones: 0mM, 0.004mM, 0.006mM, 0.008mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM ya 0.06mM. 92

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los sistemas biológicos más importantes del ser humano es el sistema nervioso central (SNC) el cual está formado por una compleja red de comunicación compuesta de células o neuronas las cuales se comunican, a través de axones, con otras células cercanas o que se encuentran en lugares más alejados a través de impulsos eléctricos (Myers, 2005). La generación y transmisión de dichos impulsos se logra a través de complicados mecanismos electroquímicos los cuales generan diversas sustancias químicas conocidas como neurotransmisores. Un neurotransmisor es una biomolécula liberada por las neuronas pre-sinápticas al espacio sináptico para después ser captados por receptores ubicados en la células post-sinápticas y de esta manera producir señales (Wilmore & Costill, 2007). Los neurotransmisores son encargados de transmitir o influir diversas señales sobre el cuerpo o célula nerviosa, provocando de esta forma diferentes respuestas fisiológicas en el ser vivo (Corsi, 2004).

Existen diversos neurotransmisores, entre los más importantes se encuentran las monoaminas como serotonina (5-HT) y dopamina (DA). Estos neurotransmisores, son de gran importancia en el estudio farmacológico y médico debido a la relación que tienen con diversas enfermedades del corazón, el estrés, trastornos neurológicos y tumores cancerosos (Tohgi, Abe, Takahashi, Ueno, & Nozaki, 1990) . En niveles normales, están encargados de regular diversas funciones en el cuerpo como el pensar, el sentir o influir de manera concreta sobre nuestros movimientos y emociones. La alteración en los niveles, es decir, altos o bajos, de estas sustancias químicas en el organismo puede ser contribuida a algunos defectos en la síntesis, la liberación, degradación o función entre las células sinápticas, provocando graves alteraciones en el organismo como enfermedades neurológicas, musculares y psiquiátricas (Myers, 2005).

La DA es producida bioquímicamente a partir de fenilalanina y tirosina, una concentración anormal en los niveles de este neurotransmisor está relacionado

con una variedad de enfermedades incluyendo Alzheimer (Liu, y otros, 2011) (Durstewitz, Kelc, & Güntürkün, 1999), Parkinson (Bosquet, y otros, 2004) (Vallone, Picetti, & Borrelli, 2000), Esquizofrenia (Rao & Remington, 2013) (Winterer & Weinberger, 2004) (Cai, Zhu, & Li, 2010) y Epilepsia (Gonon, Buda, & Pujol, 1984). La 5-hidroxitriptamina (5-HT), también conocida como serotonina, es derivada del triptófano y contribuye en el estado de bienestar y felicidad (Young, 2007). Una mala regulación en los niveles de serotonina en el organismo puede provocar alteraciones en la alimentación (Breisch, Zemlan, & Hoebel, 1976) (Saller & Stricker, 1976), la respiración (McCall & G., 1979) (Jacobs & Fornal, 1993) (White, Fung, Jackson, & Imel, 1996), el sueño (Zhong, Zhang, & Wang, Effects of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptamine 2A/2C agonist on the genioglossus activity and sleep apnea in rats., 2010), la conducta social y sexual (Hull, Lorrain, Du, & Matuszewich, 1999) (Raleigh, McGuire, Brammer, & Pollak, 1991) (Weiger, 1997), la ansiedad (Roy, Merali, Poulter, & Anisman, 2007) (Zangrossi, Viana, Zanoveli, & Bueno, 2001), el estado de ánimo (McMorris, y otros, 2006), entre otras afecciones

La gran contribución y los efectos de estos neurotransmisores han generado gran interés en los investigadores los cuales han realizado estudios sobre las funciones como biomarcadores clínicos en fluidos biológicos como el tejido cerebral, plasma, microdiálisis y orina, para la detección de enfermedades fisiológicas en una etapa temprana (Cook, 2008) (Lu, y otros, 2016). El análisis de DA y 5-HT en orina es ventajoso con respecto al plasma porque la vida biológica es mayor y porque el muestreo de orina es menos invasivo (Tohgi, Abe, Takahashi, Ueno, & Nozaki, 1990).

Actualmente existen métodos encargados de la detección de niveles de serotonina y dopamina en el organismo (Davidson, 1987) (Zhou, Wang, Tian, Dong, & Hu, 2007) (Liu, y otros, 2011) (Cai, Zhu, & Li, 2010). En los últimos años, los electrodos modificados químicamente se utilizan con éxito como métodos electrocatalíticos debido a los modificadores adsorbidos en las superficies del

electrodo, utilizando diferentes materiales químicos o biológicos para la detección., mejorando la sensibilidad y selectividad del electrodo. (Li & X., Simultaneous determination of dopamine and serotonin on gold nanocluster/overoxidized polypyrrole composite modified glassy carbon electrode., 2007) (Rand, y otros, A carbon nanofiber based biosensor for simultaneous detection of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid., 2013) (Mao, Bao, Gan, Li, & Niu, 2011) (Cesarino, Galesco, & Machado, Determination of serotonin on platinum electrode modified with carbon nanotubes/polypyrrole/silver nanoparticles nanohybrid., 2014) (Cun, y otros, 2012) (Jia, Dai, Yuan, Lei, & Xiao, 2011) (Golapan, y otros, 2007).

El presente trabajo se enfoca en el desarrollo de un dispositivo electroquímico integrado por diferentes elementos: un electrodo de carbón vítreo con superficie modificada a partir de materiales nanoestructurados, sensible y selectivo a la detección de serotonina y dopamina, y dispositivos electrónicos que ayudan a la transmisión de la señal de forma real.

Justificación

Desde los años 50's en que se comenzó a estudiar el aumento de neurotransmisores en excreciones urinarias (Kagedal & Godstein, 1988) los métodos para medir monoaminas han ido mejorando en cuanto a la sensibilidad y especificidad. Estos métodos de análisis durante muchos años han servido para aplicaciones clínicas a gran escala y han sido ampliamente investigados para determinar los niveles de NT monoaminas en fluidos biológicos basados principalmente en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Mashige, y otros, 1995) (Vuorenola, Sirén, & Karjalainen, 2003) la cual ha sido acoplada a diversos detectores como fluorescencia inducida por láser (LIF) (Zhou, Wang, Tian, Dong, & Hu, 2007), detección fluorimétrica (FD) (Sakaguchi, y otros, 2011) (Iizuka, Ishige, Ohta, & Yajima) (Benedetto, y otros, 2014), espectrometría de masas (MS) (Wei, y otros, 2014) (Kovac, Somikova, Zika, & Novak, 2014) (Gosetti, Mazzucco, & Gennaro, 2013) (Moriarty, y otros, 2011) (Carvalho, 2012). Estos

ensayos presentan una alta sensibilidad en la detección de monoaminas además de una aplicaciones clínicas a gran escala (Panholzer, Beyer, & Lichtwald, 1999) (Westermann, Hubl, Kaiser, & Salewski, 2002) (Kagedal & Godstein, 1988) sin embargo, presentan algunas limitaciones como el tiempo de análisis de la muestra es lento, tiempo de preparación de la muestra prolongado, los equipos son altamente costosos y requieren personal capacitado para la preparación de muestras y uso del equipo (Greco, Danysz, Zivkovic, Gross, & Stark, 2013). Avances como el uso de pruebas ELISA (Westermann, Hubl, Kaiser, & Salewski, 2002) y radioinmunoensayo (RIA) (Francis, Pickerodt, Salewski, Boemke, & Hohne, 2010) han permitido en los laboratorios clínicos un alto rendimiento y que los costos de análisis se reduzcan, sin embargo la preparación de la muestra para el análisis al igual que la entrega de resultados son tardados, añadiendo a esto personal capacitado para la manipulación del equipo.

La importancia de un continuo mejoramiento y practicidad de estos sistemas analíticos ha llevado a investigadores al desarrollo de nuevos métodos simples, económicos y de respuesta rápida en la medición y cuantificación de Dopamina y Serotonina en análisis de rutina: el estudio y desarrollo de sensores electroquímicos basados en electrodos de carbón vítreo. Puesto que el área electródica del electrodo de carbón vítreo muestra una baja corriente residual, es decir, una detección de corrientes muy pequeñas, permite una excelente interacción con diversas sustancias químicas o biológicas; modificados en su superficie resulta una gran opción para la cuantificación y detección de estas monoaminas. Los sensores enzimáticos que utilizan enzimas inmovilizadas se han utilizado para el análisis cuantitativo y el reconocimiento se han estudiado debido a su buena selectividad y alta sensibilidad (Zhong, y otros, 2016). Sin embargo, el uso de enzimas puede limitar la aplicación debido a su alto coste y a que el procedimiento de inmovilización puede resultar complicado si ocurriera una desnaturalización de la enzima por cambios de temperatura lo que conduce a una baja bioactividad, baja estabilidad y reproducibilidad (Amit, y otros, 2014), por lo

que el uso de sensores no enzimáticos es atractivo, seleccionando los materiales adecuados para la detección.

Teniendo en cuenta lo anterior es necesario desarrollar un método electroanalítico con materiales que permitan hacer la detección a un bajo costo, fácil operación, respuesta rápida y alta selectividad para un diagnóstico temprano y oportuno a partir de un fluido corporal como lo es la orina. Incorporar materiales sintetizados en los electrodos y elementos electrónicos en un dispositivo brindará una solución tecnológica muy útil, en el diagnóstico o medición de los neurotransmisores como una herramienta en el control preciso los niveles de serotonina y dopamina en el organismo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Neurotransmisores

En la gran mayoría de vertebrados e invertebrados la comunicación neuronal en el sistema nervioso central se realiza mediante transmisión química. Generalmente, esta unión química ocurre gracias a la liberación de una sustancia transmisora en el terminal nervioso pre-sináptico como se observa en la Figura 1, donde cada neurona produce diversos tipos de neurotransmisores (Patrick, 2005). La liberación de neurotransmisores en la neurona pre-sináptica es iniciada, al parecer en todos los casos, por un aumento transitorio de la concentración intracelular de Ca^{2+} en la neurona, debido a la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), lo que da lugar a un ingreso de Ca^{2+} en el citosol pre-sináptico, desencadenando la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana pre-sináptica, dando lugar a la segregación del neurotransmisor (exocitosis) el cual se fija a un receptor específico ubicado en la célula post-sináptica y de esta forma desencadena una respuesta fisiológica. (Myers, 2005).

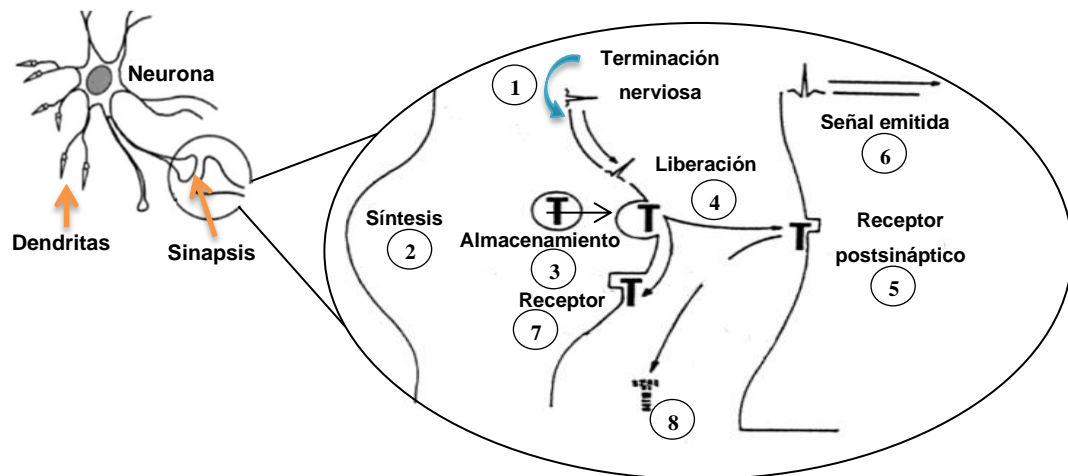


Figura 1. Etapas fundamentales de la neurotransmisión: 1, Impulso eléctrico; 2, Síntesis del neurotransmisor; 3, Almacenamiento del neurotransmisor; 4, Liberación del neurotransmisor; 5, Interacción con el receptor postsináptico; 6, Señal emitida por el neurotransmisor; 7, Incorporación a la terminación nerviosa de la célula presináptica; 8, Inactivación enzimática.
(Tomada de: (Martín Velasco & Gonzalez Alvarez, 1988))

La mayoría de las neuronas se comunican entre sí de una manera electroquímica, es decir, debe haber movimiento de iones y, por lo tanto, corrientes eléctricas y una parte química, siendo esta la liberación del neurotransmisor, la sustancia que genera una señal en la neurona post-sináptica. Esta transmisión de señales en el sistema nervioso central (SNC) ocurre en milésimas de segundos. Existen diversos tipos de neurotransmisores, entre los más importantes se encuentran los adrenérgicos como adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina, melatonina e histamina; y cada uno de ellos es fundamental para mantener un funcionamiento apropiado del SNC (Gerrig & Zimbardo, 2005).

2.1.1 Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) es una monoamina sintetizada en las neuronas serotoninérgicas del SNC perteneciente a la clasificación de los adrenérgicos en el grupo de indolaminas. Su estructura química formada por dos

anillos aromáticos, un grupo amino y un grupo hidroxilo principalmente se muestra en la Figura 2.

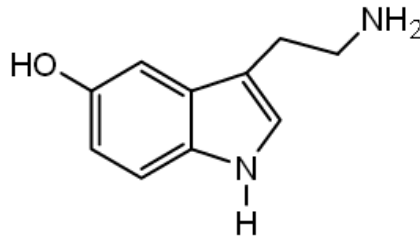


Figura 2. Estructura química de la 5-Hidroxitriptamina (5-HT, serotonina).
(Tomada de: (Martín Velasco & Gonzalez Alvarez, 1988)).

En la actualidad se sabe que la serotonina es una sustancia, segregada en los núcleos del Rafe, principalmente en el noveno núcleo del Rafe, que se localiza entre la línea media del puente y el bulbo raquídeo, y actúa como neurotransmisor o como neuromodulador. Está presente en la mayoría de las especies animales y vegetales, localizándose en el caso de los mamíferos, en un 95% en el tracto gastrointestinal, y el resto en las plaquetas y neuronas triptaminérgicas del sistema nervioso central y del sistema nervioso entérico (Ahlmán, y otros, 1981) (Gronstad, y otros, 1985) (Gershon, Drakontides, & Ross, Serotonin: synthesis and release from the myenteric plexus of the mouse intestine, 1965) (Wade, Tamir, Kirchgessner, & Gershon, 1994).

Como se observa en la Figura 3 la serotonina es producida a partir del aminoácido triptófano, el cual es transportado a través de la barrera hematoencefálica hasta las neuronas. El triptófano debe competir con estos otros aminoácidos para el transporte en el cerebro. Por lo tanto, la cantidad de triptófano, transportado depende tanto de su concentración como de la concentración de los otros aminoácidos en el cuerpo. A pesar de la importancia y la diversidad de los mecanismos serotoninérgicos en el sistema nervioso central, el cerebro contiene muy poca 5-HT en términos relativos, ya que, como hemos

comentado anteriormente, el 95% de la 5-HT reside en el tracto digestivo y el resto en el sistema sanguíneo y urinario (Salvador, Rodríguez-Yoldi, Alcalde, & Rodríguez, 1997).

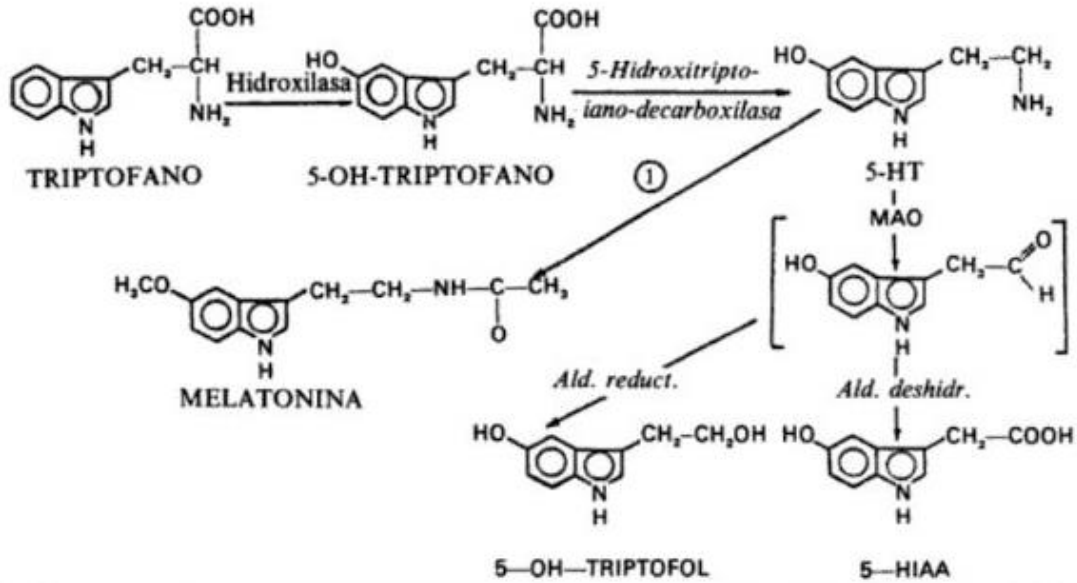


Figura 3. Biosíntesis y catabolismo de la 5-HT.
(Tomada de: (Martín Velasco & Gonzalez Alvarez, 1988)).

En el tracto digestivo, cuando la serotonina es liberada por las células enterocromafines, da origen a una gran diversidad de respuestas motoras y sensoriales a través de neuronas del plexo submucoso y mientérico, y de absorción y secreción, a través del propio epitelio intestinal. Tanto los plexos como el epitelio intestinal responden a la 5-HT a través de una gran diversidad de receptores serotoninérgicos, lo cual permite modular la actividad digestiva. De este modo, la 5-HT inicia respuestas tan diversas como, por un lado, náuseas, vómitos y secreción intestinal, desarrollando un papel importante como neurotransmiso y por otro lado, induce la alteración de la absorción intestinal de nutrientes y de la secreción de agua y electrolitos, para lo cual desarrolla su actividad como sustancia endocrina/paracrina (Hardcastle, Hardcastle, Klaren, Taylor, & White, 1999).

La 5-HT participa de un modo importante en la transducción sensorial desde la mucosa intestinal a diversos efectores (Pan & Gershon, 2000). Así, cuando hay un incremento de la presión intraluminal, las células enterocromafines liberan 5-HT se comporta como una molécula o señal química, con el objeto de estimular terminaciones nerviosas de la pared intestinal para poder iniciar el reflejo peristáltico (Bülbring & Crema, 1959). Esto se debe a que las neuronas serotoninérgicas entéricas no se proyectan directamente sobre el músculo u otros efectores, y la 5-HT actúa de modo paracrino (Bertrand, 2004).

El 5% restante de la serotonina que no va al tracto digestivo, se traslada al torrente sanguíneo y al sistema urinario provenientes de las células enteroendocrinas cuando son estimuladas por la acetilcolina o noradrenalina, por aumento de la presión intraluminal del intestino o por aumento del pH intestinal produciendo activación entérica y reflejo peristáltico (Tamir, Kupsky, Huang, & Gershon, 1983)

La serotonina ejerce importante acción en la conducta, movimiento, apreciación del dolor, actividad sexual, apetito, secreciones endocrinas, funciones cardiacas y el ciclo del sueño-vigilia. El neurotransmisor también ha sido implicado en tener un papel en la fisiopatología de los trastornos. En niveles bajos de serotonina se presentan padecimientos como alteraciones del apetito, ansiedad, irritabilidad o depresión y a altos niveles de este neurotransmisor podemos encontrar trastornos como déficit de atención e hiperactividad, desorden de aprendizaje, trastorno del espectro autista (Myers, 2005).

2.1.2 Dopamina

Perteneciente a la clasificación de los neurotransmisores adrenérgicos en el grupo de las catecolaminas, la dopamina es una de las catecolaminas más importantes del sistema nervioso central, en los mamíferos, se encuentra ubicada específicamente en el hipotálamo y sustancia negra. La estructura química de la Dopamina (DA o 3, 4-dihidroxifeniletilamina) como se muestra en la Figura 4 se encuentra conformada por un anillo aromático, dos grupos hidroxilos y un grupo amino.

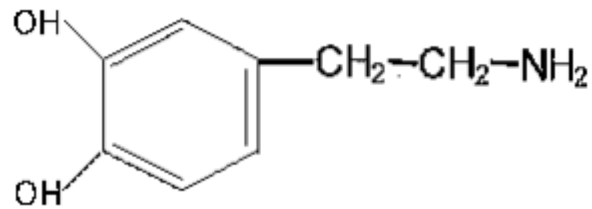


Figura 4. Estructura química de la dopamina (3, 4-dihidroxifeniletilamina).
(Tomada de: (Bahena Trujillo, Flores, & Arias Montaña, 2000)).

La síntesis de la dopamina como se observa en la Figura 5 tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas donde se encuentra en alta concentración las enzimas responsables, la tirosina hidroxilasa y la descarboxilasa (Cooper, Bloom, & Roth, 1996). En estudios previos, se ha demostrado que la hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el sistema nervioso central y a causa de esto la tirosina hidroxilasa es la enzima limitante de la síntesis de dopamina. Esta enzima utiliza L-tirosina como sustrato y tetrahidrobiopterina como cofactor para adicionar un grupo hidroxilo al aminoácido para formar L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), que a partir de la oxidación de la enzima descarboxilasa produce Dopamina (3, 4-dihidroxifeniletilamina) (Freund, Powell, & Smith, 1984).

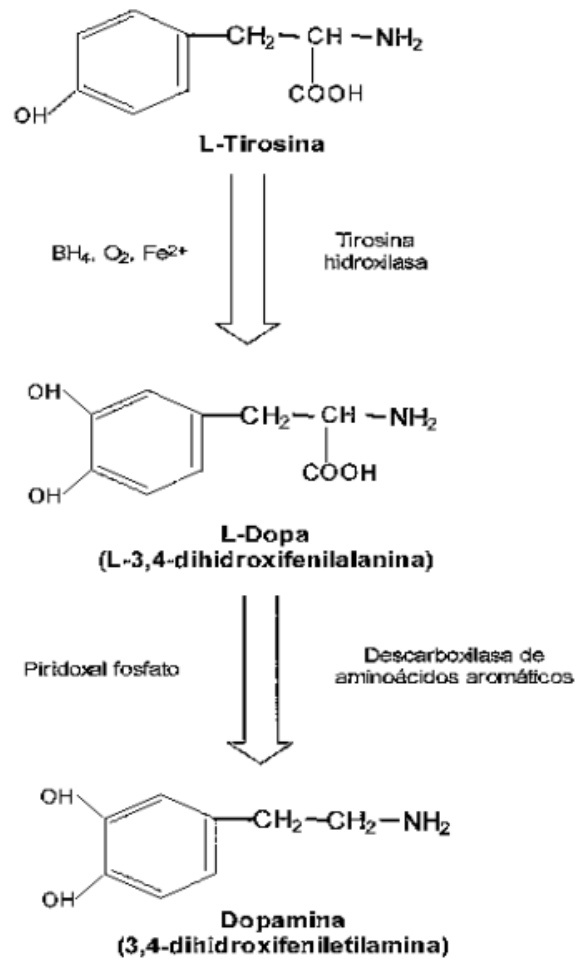


Figura 5. Síntesis de la Dopamina.
(Tomada de: (Bahena Trujillo, Flores, & Arias Montaña, 2000)).

La dopamina, participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendocrina (Liu, y otros, 2011). El equilibrio de los neurotransmisores es importante para un buen funcionamiento del cuerpo, y al igual que la serotonina, la dopamina se encuentra en diferentes niveles. Si se desequilibran los niveles de dopamina, pueden presentarse una serie de padecimientos mentales. A niveles bajos, podemos encontrarnos con trastornos como rápido aumento de peso, problemas para concentrarse, Parkinson, y a niveles elevados padecimientos como alucinaciones, paranoia, Esquizofrenia (Bosquet, y otros, 2004) (Cai, Zhu, & Li, 2010) (Rao & Remington, 2013) .

La importancia en la detección de estos dos neurotransmisores hoy en día va en aumento debido a la gran importancia de sus efectos en el sistema fisiológico humano. Los sensores electroquímicos, son una excelente alternativa rápida, sensible y selectiva en la detección de estas moléculas para diagnósticos oportunos en enfermedades neurodegenerativas.

2.2 Sensores

En los últimos años el interés por realizar análisis de forma sencilla, rápida y económica, así como por optimizar la producción mediante análisis en continuo, ha tomado mucha importancia en el área de investigación abriendo paso a métodos analíticos compatibles con las necesidades. Los sensores son dispositivos que convierten la información física o química en una señal digital que puede ser procesada y de este modo estudiada de manera más fácil, rápida y sin necesidad de análisis complejos. Estas características hacen a los dispositivos de gran interés para la industria, ya que incorporados a la miniaturización en la fabricación los vuelve más económicos y rentables. (Ristic, 1994)

Los sensores se pueden clasificar en dos clases según el tipo de información que puedan proporcionar: Físicos, encargados de detectar cambios en parámetros físicos como temperatura, presión, etc., y Químicos los cuales detectan cambios como la concentración, composición, pH, presencia de determinados compuestos químicos, monitorizando la actividad química en el cuerpo por motivos terapéuticos o de diagnóstico, etc., (Soloman, 1998).

En la actualidad, en la industria, la mayor parte de los sensores utilizados para el control de procesos son físicos, por lo que para el área de sensores químicos aún hay mucho campo por estudiar. No fue hasta principio del siglo XX que los sensores químicos comenzaron a tomar relevancia en la producción científica pero, debido a que la fabricación en este sector suele ser de manera

manual, el coste de producción suele ser muy elevado. Por ello la importancia de desarrollar dispositivos a partir de nuevos métodos de fabricación que generen una producción de sensores químicos automatizada y de esta forma reducir los costos de adquisición y producción (Göpel & Zemel, 1991).

2.2.1 *Sensores químicos*

En los últimos años los sensores químicos se han utilizado en diversas áreas como biomedicina, medioambiente, la industria alimentaria, bioseguridad, etc., desarrollándose día con día de manera exponencial. La definición clásica de sensor químico es la de “pequeño dispositivo que como resultado de una interacción química entre el analito gaseoso y el sensor transforma información química o bioquímica de tipo cualitativo o cuantitativo en una señal medible y útil analíticamente” (Stetter, Penrose, & Yao, 2003).

En los análisis de química analítica se utilizan equipos muy sofisticados y costosos por ejemplo cromatógrafos, espectrofotómetros, ICP-masas, etc., que requieren de personal altamente capacitados para el manejo e interpretación de los resultados, además de que no realizan análisis en continuo o pruebas de campo. Es por ello que los sensores químicos muestran una amplia alternativa de producción, ya que permiten realizar análisis en continuo, pruebas de campo, y su sensibilidad se puede mejorar con la incorporación de materiales que ayuden a intensificar las señales y ser más sensible a la detección de una muestra (Zagatto & Sá, 2003).

Un sensor químico es un dispositivo capaz de traducir la información química de una muestra en una señal analítica útil (Ristic, 1994). Los sensores químicos constan de dos componentes importantes encargados de la generación de una señal, un receptor y un transductor, como se observa en la Figura 6.

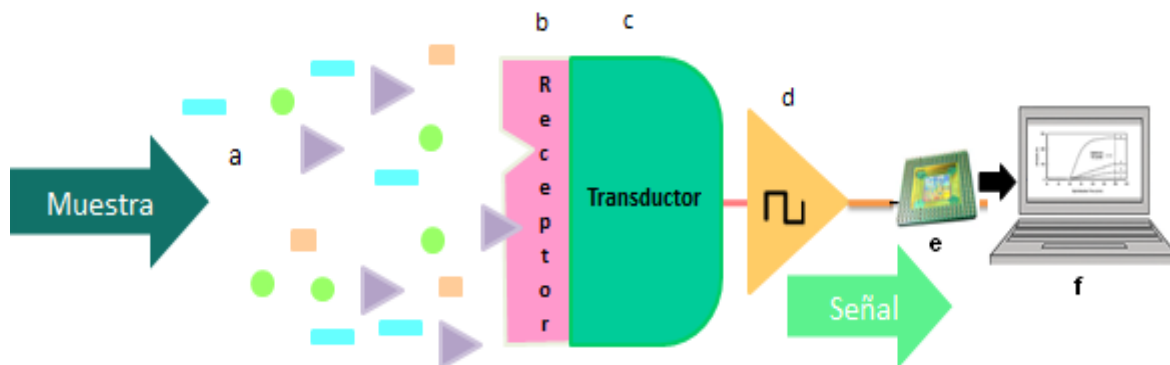


Figura 6. Sensor químico. a) Elemento reconocimiento (químico, biológico); b) Soporte o Receptor (Físicos, Químicos, Biológicos); c) Elemento transductor (electroquímico, óptico, piezoeléctrico, térmico); d) Elemento amplificador; e) Programa informático (procesamiento); f) Interfaz física. (Tomada de: (Ristic, 1994)).

El elemento de reconocimiento es la muestra con la que se va a tratar, puede ser químico o biológico. El receptor reconoce selectivamente la información química o biológica de la muestra convirtiéndola de tal manera que pueda ser entendida por el transductor. Existen tres tipos de transductores: Físicos, por ejemplo materiales pizoeléctricos, termómetros, galvanómetros, etc., Químicos, por ejemplo quelantes, ionóforos, etc., y Biológicos, por ejemplo enzimas, anticuerpos, ADN, células, etc.

Los transductores transforman la información primaria que el receptor recibe en una señal secundaria procesable fácilmente. Los transductores pueden clasificarse en (Turner, 1987):

- Ópticos: Transforman las variaciones producidas en una señal óptica por la interacción de un analito con el receptor.
- Electroquímicos: La señal transformada se debe a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo.
- Piezoeléctricos: Transforman un cambio de masa que se da sobre el electrodo modificado con materiales con propiedades piezoeléctricas.

- Térmicos: Transforman la diferencia de temperatura sobre la superficie del receptor en una señal medible.

La investigación de sensores químicos ha ido aumentando con el paso del tipo de forma rápida desde la década de los 90's como se observa en la Figura 7 principalmente los sensores electroquímicos debido a su amplio intervalo de linealidad y tiempo de respuesta muy corta (Janata, Centennial Retrospective on Chemical Sensors, 2001).

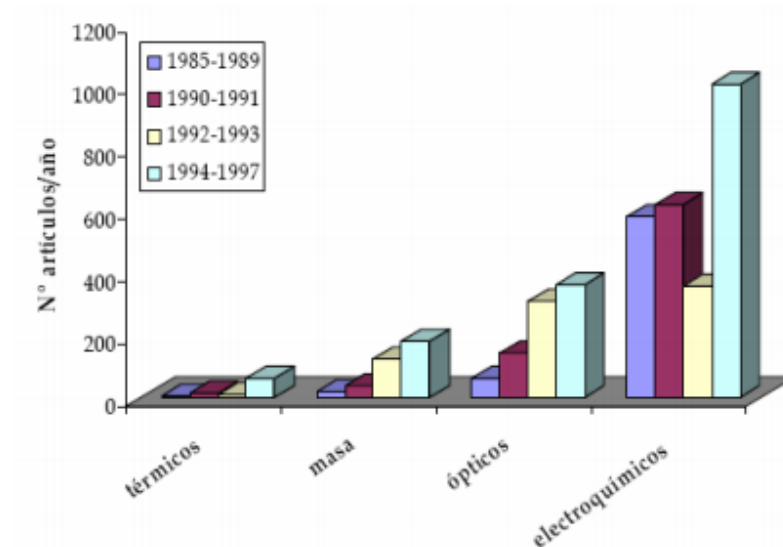


Figura 7. Publicaciones en sensores químicos.
(Tomada de: (Janata, Josowicz, & DeVaney, Chemical Sensors, 1994).

2.2.2 Sensores electroquímicos

Durante la pasada década, los sensores basados en transductores electroquímicos fueron los que más publicaciones científicas generaron (Janata, Centennial Retrospective on Chemical Sensors, 2001). Hecho que estaba claramente ligado al diseño de que estos dispositivos, su fabricación es más simple y económica que la del resto de transductores, y además, poseen un amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta muy cortos. Así mismo, los equipos necesarios para recoger y procesar la señal, tales como potenciostatos y

conductímetros, son económicos, de fácil mantenimiento, manejo y miniaturización, y son de uso común en la mayoría de laboratorios de análisis (Stradiotto, Yamanaka, & Zanoni, 2003).

Existen tres grandes grupos de transductores electroquímicos clasificados según la técnica electroquímica utilizada para obtener la información de la muestra; conductimétricos, potenciométricos y amperométricos.

2.2.2.1 Transductores amperométricos

Recientemente han aparecido un nuevo tipo de sensores selectivos de iones denominados “Sensores Voltamperométricos”. Las curvas intensidad-potencial generadas proporcionan analíticamente más información que las curvas de potencial de equilibrio obtenidas bajo condiciones potenciométricas; además, el potencial reversible puede calcularse a partir de datos obtenidos bajo condiciones dinámicas (Pravda, y otros, 1995).

Este tipo de dispositivos se basan en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o grafito, respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica. También es posible realizar análisis basados en técnicas voltamperométricas, variando el potencial de trabajo de forma controlada (Thevenot, Toth, Durst, & Wilson, 2001).

Los transductores amperométricos se fundamentan en la proporcionalidad existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado. Esta relación intensidad-concentración se comporta según el siguiente modelo que proviene de la Ley de Fick,

$$I = nFAD_0 \frac{\delta(C_0(o, t))}{\delta_x}$$

Donde A es el área del electrodo de trabajo, D_0 y C_0 son el coeficiente de difusión y la concentración del analito, respectivamente, y x representa la distancia de la doble capa.

En el caso de que la solución esté agitada constantemente, se puede considerar que x se mantiene constante y se corresponde con el tamaño de la capa de difusión (δ). Así, la ecuación anterior puede simplificarse obteniéndose una relación lineal entre la intensidad medida y la concentración del analito,

$$I = \frac{nFAD_0}{\delta} C_0$$

El trabajo con este tipo de sensores electroquímicos ha sido muy variado, siendo los transductores amperométricos el grupo de dispositivos electroquímicos más desarrollados y estudiados durante los últimos años debido a sus características de manipulación y detección (Cano Luna, 2008).

2.3 Técnicas electroquímicas

2.3.1 Celda electroquímica convencional de tres electrodos

El análisis electroquímico ha sido utilizado para resolver diferentes problemas analíticos y dar información sobre la presencia y cantidad de una sustancia en una muestra. Algunas de las herramientas primordiales para la realización de un análisis electroquímico son:

- La instrumentación que se utiliza para aplicar y medir corrientes y potenciales eléctricos
- El sistema de tratamiento de datos utilizando regularmente computadoras para la interpretación y análisis.

- Los electrodos, que son los elementos que se encuentran en contacto con la disolución y que pueden ser modificados para una mejor respuesta.

Comúnmente se trabaja con sistemas en celda convencional de tres electrodos como se muestra en la Figura 8.

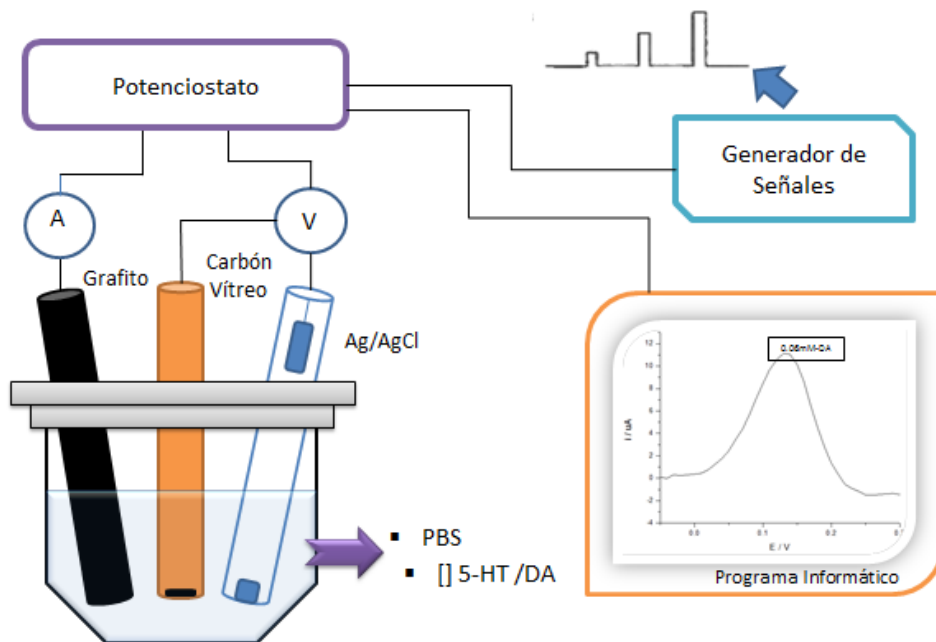


Figura 8. Sistema de una media celda convencional de tres electrodos. (Autoría Propia).

El sistema está compuesto por:

- Una celda, normalmente de vidrio
- Solución amortiguadora con el analito a analizar.
- Tres electrodos:
 - ✓ electrodo de trabajo, normalmente de carbón vítreo (GCE), aunque existen otros materiales como platino, grafito, etc;
 - ✓ electrodo de referencia, este puede ser: electrodo de hidrógeno NHE; electrodo saturado de calomelanos (SCE por sus siglas en inglés); electrodo de plata / cloruro de plata (Ag/AgCl); electrodo de mercurio / óxido de mercurio (Hg/HgO, NaOH); electrodo de

mercurio / sulfato de mercurio ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4, \text{H}_2\text{SO}_4$); o electrodo de plata / nitrato de plata no acuoso (Ag/AgNO_3)

- ✓ electrodo auxiliar o contraelectrodo, puede ser de grafito, alambre de platino.

Seleccionados los electrodos, dependiendo los parámetros que se tengan (ventana de potencial, pico de oxidación), se conectan a una estación de trabajo electroquímica (potenciostado) que está conectada a una computadora la cual contiene un software previamente cargado (analizador de datos) y en que se cargan los datos de barrido deseados. Al iniciar el barrido, el potenciostato inyecta un pulso de voltaje al electrodo de trabajo haciendo que la superficie de este interactúe con la muestra a analizar. El software registra el barrido interpretando los datos en forma de señal para que el analista pueda hacer sus conclusiones (Mantell, 2003).

2.3.2 Electrodo Serigrafiados

Los electrodos serigrafiados, debido a su eficiente característica de manipulación, en los últimos años han tomado una gran popularidad en el uso para el análisis electroquímico, sustituyendo de esta forma a las celdas convencionales.

Un electrodo serigrafiado es una pequeña tarjeta que consiste en la integración de los tres electrodos como se observa en la Figura 9 utilizados en una media celda, y que, junto a contactos eléctricos permiten una conexión al sistema de medida. Los primeros trabajos con electrodos serigrafiados aparecieron en la década de los 90's, por lo que es una tecnología relativamente moderna (Yerga, 2012). Actualmente están siendo utilizados en diversas áreas como la industrial, medioambiental, agroalimentaria y farmacéutica.

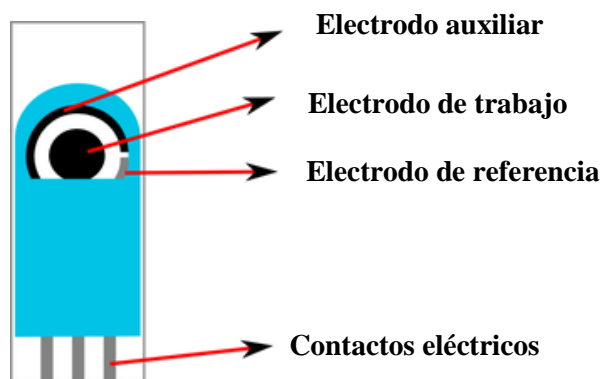


Figura 9. Componentes de un electrodo serigrafiado.
(Tomada de: (Yerga, 2012)).

La fabricación de los electrodos serigrafiados consiste en el depósito de una tinta sobre un sustrato determinado utilizando una plantilla. Posteriormente, se procede con una etapa de secado y de curado a cierta temperatura. Por último, se recubre con un aislante para dejar libre solamente las conexiones y el área de trabajo del electrodo.

La variedad de las tintas con las que se puede serigrafiar es muy grande como por ejemplo grafito, oro, platino, plata, nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas de oro, etc., como se observa en la Figura 10. Un material puede ser más adecuado para el análisis de una sustancia que otro, y se debe utilizar el más conveniente en cada caso (Yerga, 2012).

Las principales ventajas de usar electrodos serigrafiados frente a los sistemas electroquímicos o químicos convencionales son las siguientes:

- Bajo costo: El costo es relativamente bajo en comparación con equipos o materiales sofisticados. Una vez que se logren producir en masa, la producción de estos puede ser muy bajo.

- Flexibilidad del diseño: La ventaja de ello es que el electrodo puede ser acondicionado de acuerdo a las necesidades de trabajo, los diferentes materiales depositados permiten su aplicación a la solución de diferentes problemas analíticos.
- Pequeño tamaño: Su tamaño tan pequeño permite que puedan ser portables y manipulados fácil, además de que la poca instrumentación para el análisis electroquímico permite llevar a cabo análisis *in situ*.
- Volumen de muestra bajo: Los volúmenes de muestra, alrededor de 50 μ l o menos, que necesita el electrodo para su funcionamiento lo hace un atractivo dispositivo de análisis.
- Desechables: Esta ventaja puede llegar a ahorrar mucho tiempo en un análisis electroquímico, ya que los electrodos son de usar y tirar.
- Posibles modificaciones en el electrodo de trabajo: La superficie de los electrodos permite que pueda ser modificada con otro tipo de material o sustancia para la mejora de sus propiedades o la resolución de un problema analítico (Yerga, 2012).

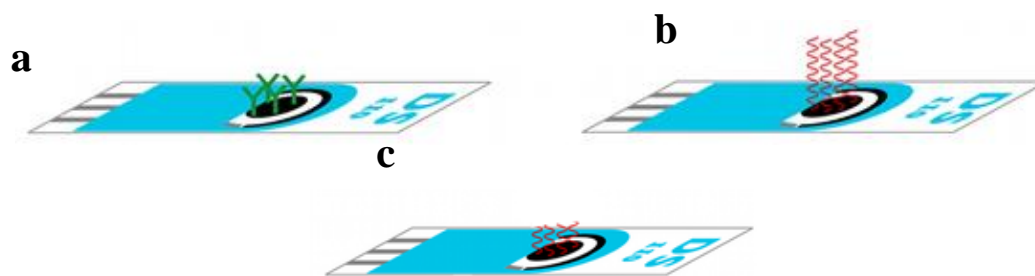


Figura 10. Electrodos serigrafiados modificados en la superficie del electrodo de trabajo. (a) Inmunosensor: electrodo modificado con anticuerpos; (b) Genosensor: electrodo modificado con ADN; (c) Bimetalico: electrodo modificado con materiales metálicos. (Tomada de: (Yerga, 2012)).

2.3.3 Voltametría Cíclica

Voltametría cíclica (CV, por sus siglas en inglés cyclic voltammetry) es la técnica más utilizada en la obtención de información cualitativa en reacciones electroquímicas. Una de sus ventajas principales es que puede proporcionar

información rápida acerca de la termodinámica en una reacción redox, la cinética de las reacciones de transferencia y las reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción.

La voltametría cíclica consiste en escanear linealmente el potencial de electrodo de trabajo estacionario (en una solución sin agitar) utilizando una forma de onda de potencial triangular. Dependiendo de la información buscada, los ciclos simples o múltiples pueden ser utilizados. Durante el barrido de potencial, el potencióstato mide la corriente resultante sobre el potencial aplicado. La señal resultante de la corriente en función del potencial se denomina un voltamograma cíclico. El voltamograma cíclico es una función dependiente totalmente del tiempo y un gran número de parámetros físicos y químicos (Ortíz, Martínez, & Hernández, 2006).

La forma de la señal es un pico oxidado y uno reducido dicho proceso ocurre en el cátodo y el ánodo respectivamente. El pico oxidado aparecerá siempre en potenciales positivos mientras que a potencial con pendiente negativa se observa la reducción. A medida que el potencial aplicado se aproxima a la característica E_0 para el proceso redox, una corriente catódica comienza a aumentar, hasta que se alcanza un pico. Después de pasar la región de potencial en el que el proceso de reducción se lleva a cabo, la dirección del barrido de potencial está fija. Durante la exploración inversa, las moléculas R (generadas a la mitad del ciclo, y acumuladas cerca de la superficie) se reoxidan de nuevo a O y se producirá un pico anódico como se observa en la figura 11. Los picos característicos en el voltamograma cíclico son causados por la formación de la capa de difusión cerca de la superficie del electrodo (Wang, Liu, Mitsui, & Tsurugi, 2001).

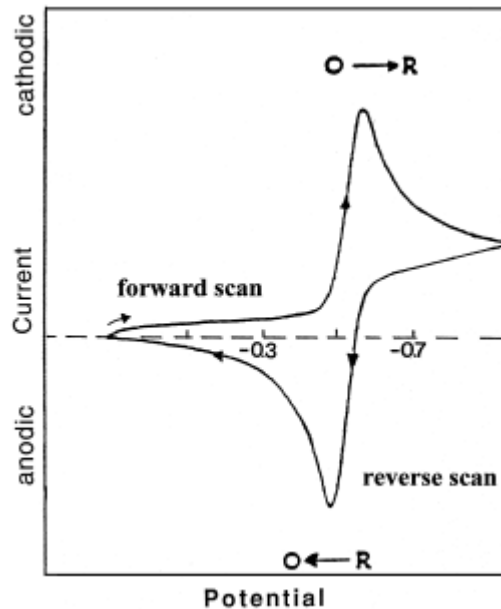


Figura 11. Voltamperograma cíclico típico reversible en un proceso redox.
(Tomada de: (Wang, Liu, Mitsui, & Tsurugi, 2001)).

2.3.4 Voltametría de Pulso Diferencial

La técnica de voltametría de pulso diferencia (DPV, por sus siglas en inglés differential pulse voltammetry) está dirigida a la reducción de los límites de detección de las mediciones voltamperométricas. La voltametría de pulso diferencial es una técnica extremadamente útil para niveles de trazas de especies orgánicas e inorgánicas. En esta técnica, la forma de la onda en la señal de excitación, consiste en una serie de pulsos a manera de escalera como se observa en la figura 12, donde el potencial de base aumenta gradualmente en pequeños intervalos entre 10 y 100 mV (ancho de pulso= ΔE_s). La amplitud de pulso ΔE_p , se mantiene constante con respecto al potencial de base. (Ortíz, Martínez, & Hernández, 2006).

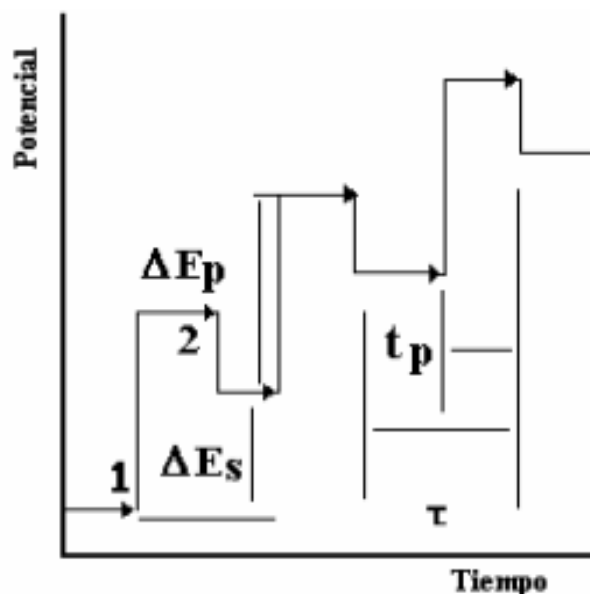


Figura 12. Señal de excitación aplicada en DPV.
(Tomada de: (Ortíz, Martínez, & Hernández, 2006)).

Una técnica electroquímica donde la corriente se mide como una función del tiempo y como una función del potencial entre los electrodos: indicador y de referencia. El potencial se varía utilizando pulsos de amplitud creciente y la corriente se muestrea antes y después de cada pulso de voltaje. Voltametría de pulso diferencial produce picos de corrientes faradaica en lugar de la forma de onda sigmoideal obtenidos con corriente continua. Este pulso técnica resulta en la mejora de la resolución de múltiples sistemas de analitos y cuantificación más conveniente. La corriente resultante del proceso se mide justo antes de la aplicación del pulso y al final de la aplicación del mismo, de esta manera al graficar la diferencia de corrientes obtenidas en función del potencial aplicado se obtienen respuestas típicas como la mostrada en la figura13, (Ortíz, Martínez, & Hernández, 2006).

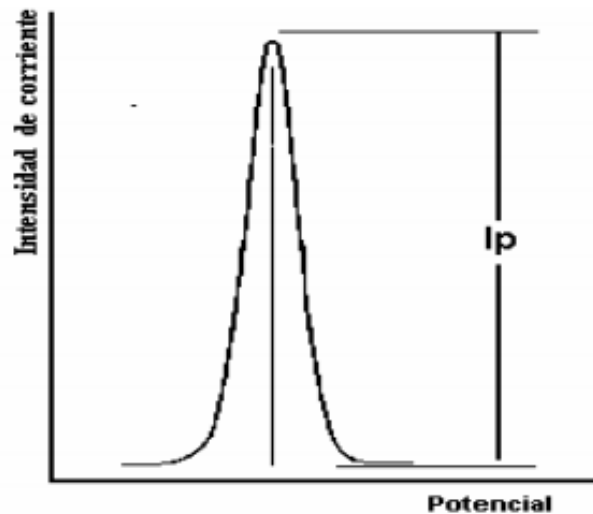


Figura 13. Respuesta típica en DPV.
(Tomada de: (Ortíz, Martínez, & Hernández, 2006)).

La técnica de DPV es mucho más sensible que CV. La sensibilidad de esta técnica puede detectar al analito en concentraciones muy bajas y nos permite observar que tan rápido o lento se oxida la molécula.

2.4 Técnicas analíticas convencionales para la detección de neurotransmisores.

Algunas de las investigaciones que se han realizado para detectar serotonina o dopamina a partir de técnicas analíticas, como por ejemplo cromatografía líquida, han dado excelentes resultados

- Gunaratna y otros (2006) desarrollaron un método de cromatografía líquida acoplada con detección electroquímica para la medición de 5 hidroxitriptamina directa (5-HT, Serotonina) y ácido 5 hidroxiindolacético (5-HIAA) en microdiálisis cerebrales de la glándula pineal de ratas. Se utilizaron muestras a diferentes concentraciones estándar para investigar la

precisión y exactitud del método. Los resultados indican una buena exactitud y precisión.

- Bhavik y otros (2005), describieron un método para el análisis rápido de neurotransmisores y sus metabolitos utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada con detección electroquímica. En esta publicación se obtuvieron voltamperogramas hidrodinámicos de estados cuasi-estacionarios (50mVs⁻¹) para serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), noradrenalina (NA), adrenalina (AD), ácido homovanílico (HVA) y octopamine (OA) (20 μ ml⁻¹) en flujo continuo entre el potencial de rango 0.2 - 0.9V. Diversas aminas biogénicas fueron estudiadas y la separación óptima de todos los analitos se logró dentro de 15 min. Los tiempos de retención de DOPAC, 5 HIAA, NA, AD, DA y 5-HT son 2.6, 2.9, 3.3, 3.8, 5.2 y 8.7 min, respectivamente.

Este corto tiempo de múltiples análisis para neuroquímicos proporciona una base ideal para un ensayo rápido. Otros informan tiempos de análisis típicamente de ~ 15 min a 40 min. El uso de detección electroquímica para el análisis de los neuroquímicos permite que sea posible llevar a cabo la separación en virtud de un sistema de HPLC.

- Yoshitake y otros (2003), realizaron un método en cromatografía líquida en columna microbore para la determinación simultánea de la norepinefrina (NE), la serotonina (5-HT), y Dopamina (DA) en muestras de microdiálisis de cerebro de rata. La detección de concentraciones fueron de 135 nmol (NE), 315 nmol (5HT), y 390 nmol (DA) en volumen de la muestra 15 μ l. El método es especialmente adecuado para estudios de microdiálisis de la eficacia antidepressiva de los fármacos que combinan la inhibición de la recaptación de 5HT y NE, antagonistas en auto-presináptica y heterorreceptores, y/o inhibidores de la monoamina oxidasa.

Sin embargo, a pesar de los resultados de estas investigaciones para la detección de serotonina, esta técnica y algunas otras como espectrofotómetros, ICP-Masas, equipo de procesamiento de imágenes, son especialmente costosas, sofisticadas y requieren especialización por parte del operario, además de que estos equipos son incompatibles con análisis en continuo, de rutina o pruebas de campo.

2.5 Sensores electroquímicos para la detección de dopamina (DA) y serotonina (5-HT)

Estos hechos han animado a los investigadores a desarrollar técnicas más sensibles, rápidas y simples para satisfacer las diversas demandas. Diversos trabajos se han publicado describiendo la detección de dopamina y serotonina en suero utilizando electrodos modificados químicamente.

Cesarino y cols. (2014) publicaron una investigación sobre la detección de serotonina en Ácido Ascórbico (AA) y Ácido Úrico (UA) mediante el desarrollo de un electrodo de Pt modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) / polipirrol (PPy) / nanopartículas de plata (AgNPs) el cual fue utilizado para la determinación de la serotonina en muestras de suero plasmáticas. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando voltametría de pulso diferencial (DPV) con parámetros optimizados en soluciones con 0.2 mol L⁻¹ en solución buffer fosfato (PBS) (pH 8,0), Se realizó la determinación de serotonina por triplicado, sin ningún procedimiento de tratamiento y utilizando el método de adición estándar. Se observó que, incluso a concentraciones iguales de AA, y serotonina, no mostró un proceso de solapamiento del pico de oxidación de la serotonina y los picos de oxidación de las sustancias interferentes estudiadas, lo que indicó que la señal analítica no sufrió interferencia del AA y del UA. Concluyeron que el electrodo de Pt / MWCNT / PPy / AgNPs es adecuado para ser utilizado con éxito para la determinación de la serotonina en presencia de AA y UA en muestras de

suero plasmáticas en las condiciones optimizadas y utilizando el enfoque de adición estándar.

Rand y cols. (2013) publicaron el desarrollo de un sensor basado en una matriz de nanofibras de carbono alineados verticalmente (CNFs) cultivadas por plasma de deposición química de vapor encontrando una gran afinidad para la detección simultánea de dopamina (DA) y serotonina (5-HT) en presencia de exceso de ácido ascórbico (AA). Este desempeño se atribuye a la estructura de las nanofibras y la presencia de muchos sitios activos a lo largo de la pared lateral. Realizaron estudios electroquímicos con la técnica analítica voltametría de pulso diferencial (DPV), observando en una mezcla de DA, 5-HT y AA picos de oxidación en 0.13 V, 0.45 V, y 0.70 V respectivamente. El electrodo CNF demostró una sensibilidad con detección hasta 50 nM para serotonina.

En 2010 Liu M. y cols., publicaron un nuevo método electroquímico rápido, conveniente y sensible basado en electrodo serigrafiado con una membrana de oro coloidal modificado con Nafion (Nafion / CGSPE) para la determinación de la serotonina en presencia de alta concentración de dopamina, ácido ascórbico y ácido úrico. La respuesta electrocatalítica se evaluó mediante voltametría cíclica (CV). La determinación individual de DA en el rango de concentración $0-3 \times 10^{-6}$ M se llevó a cabo en soluciones que contienen 5-HT a una concentración fija de 1×10^{-7} M. Se encontró que 1×10^{-6} M DA no interfiere con las señales de oxidación de 5-HT. Además el aumento de la concentración de DA hizo que la corriente de pico declinará. En este artículo, el electrodo serigrafiado (SPE) se utilizó en primer lugar para la determinación de 5-HT en el plasma rico en plaquetas (PRP) y homogeneizado en el cerebro de los ratones. Una vez modificado, el Nafion / CGSPE mostró buena sensibilidad, selectividad, reproducibilidad y alta estabilidad. El Nafion / CGSPE exhibió efectos electrocatalíticos notables sobre la oxidación de 5-HT por el aumento de sus corrientes de pico de oxidación. La razón más probable para tal aumento en la sensibilidad es la capacidad de oro coloidal como pequeños centros de conducción en el polvo de grafito del SPE que hace que los

sitios activos más cerca de la superficie del electrodo y que aceleran la velocidad de transferencia de electrones de 5-HT y por lo tanto el aumento de la sensibilidad

Si bien estas investigaciones revelan buenos resultados, la obtención de información dinámica sobre el proceso de medición de serotonina, dopamina y otras monoaminas requiere el desarrollo de nuevos enfoques para medir el perfil de concentración de 5-HT.

Es por ello que, debido a que la determinación electroquímica de serotonina y dopamina en fluidos biológicos es inhibida por la interferencia de otros neurotransmisores también presentes en tales matrices en altas concentraciones, en este trabajo se plantea el desarrollo de electrodos enzimáticos funcionalizados a partir de técnicas avanzadas de procesamiento de señales que sean capaces de reducir tales interferencias sin disminuir la señal de serotonina permitiendo así una mejor selectividad de los niveles de serotonina en un fluido con condiciones similares a las del cuerpo humano.

Las técnicas electroquímicas proporcionan una plataforma para determinaciones de DA y 5-HT que son preferibles a otros métodos analíticos (Ejaz, Joo, & Jeon, 2017) y han demostrado sus grandes ventajas sobre otros en simplicidad, respuesta rápida, bajo costo, buena sensibilidad y alta selectividad (Zhao, Zhu, & Zhou, 2012). En los últimos años, los electrodos modificados químicamente se utilizaron con éxito como electrocatalizadores debido a modificadores adsorbidos en las superficies de electrodo (Anithaa, Asokan, & Sekar, Highly sensitive and selective serotonin sensor based on gamma ray irradiated tungsten trioxide nanoparticles., 2017), utilizando diferentes materiales para la detección.

2.6 Materiales modificadores de la superficie del electrodo

Una modificación en superficie de los electrodos puede ser la forma más común practicada por investigadores para la detección, la separación o eliminar de picos de oxidación de DA y 5-HT.

Recientemente, el desarrollo de materiales versátiles para modificar la superficie del electrodo ha sido objeto de numerosas investigaciones en el análisis biológico y ambiental mediante métodos electroquímicos. En la mayoría de los casos, esta modificación aumenta la sensibilidad, selectividad, y la reproducibilidad en comparación con los electrodos convencionales. Se han estudiado una gran variedad de materiales para modificar la superficie de un electrodo y llegar o aumentar estas características, tales como mediadores redox orgánicos (Kalimuthu & A., 2009), polímeros (Ensafi, Taei, Khayamian, & Arabzadeh, 2010) (Yao, Sun, Lin, Tang, & Huang, 2007), nanopartículas (Liu, Huang, Hou, & You, 2008) (Kannan & John, 2009) y complejos metálicos (Hu, Ma, Guo, & Shao, 2008) (Shahrokhian & Zare-Mehrjardi, 2007).

La combinación de nanopartículas metálicas o nanopartículas de metales nobles han atraído la atención de los investigadores en electrocatálisis debido a sus altas actividades electrocatalíticas (Chen, y otros, 2015) (Singh, Laffir, McCormac, & Dempsey, 2010)..

2.6.1 Hidróxido doble laminar de Aluminio y Níquel

Los hidróxidos dobles laminares (por sus siglas en inglés LDHs) son compuestos de arcillas sintéticas formados por láminas de hidróxidos metálicos cargadas positivamente y estables con aniones intercambiables. La existencia de grupos hidroxilo sobre la superficie de las láminas y los aniones intercambiables, como se observa en la figura 14, los hacen compuestos ideales para la obtención de nuevos materiales en escala nanométrica (Martínez & Carbajal, 2012).

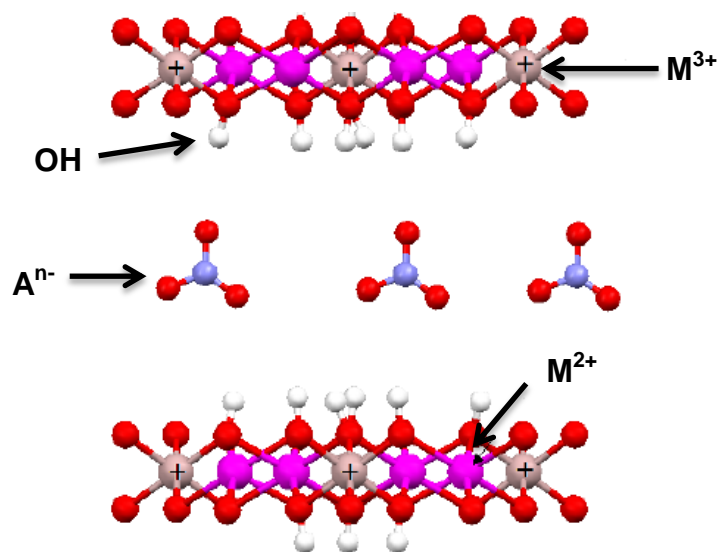


Figura 14. Representación estructural de los HDLs.
(Tomada de: (Martínez & Carbajal, 2012)).

La fórmula general de los LDH es $[M^{2+}_{1-x} M^{3+}_x (OH)_2]^{x+} (A^{n-})_{x/n} \cdot mH_2O$, donde M^{2+} es un catión divalente (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}), M^{3+} es un catión trivalente (Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Ni^{3+} , Mn^{3+}), A^{n-} es un anión (Cl^- , NO_3^- , ClO_4^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-}).

Recientemente, el interés se ha puesto en las nanopartículas de metales transición debido a sus múltiples estados de oxidación para los procesos de transferencia de electrones. Especialmente, las nanopartículas de Níquel (Ni) y Aluminio (Al) se han estado utilizando por si solas o en combinación con otros metales debido a su actividad electrocatalítica inherente para reacciones de oxidación, así como su buena estabilidad, resistencia mecánica, rápido transporte de electrones y bajo costo (Shervedani, Karevan, & Amini, 2014) (Yu, y otros, 2014) (Lu, y otros, 2009).

Las nanopartículas de Ni son inestables y fácilmente oxidables en el aire y en soluciones que contengan agua, sin embargo el níquel en forma de hidróxido u óxido es relativamente estable debido a su pequeño tamaño cristalino que muestra

un alto coeficiente de difusión de protones, lo que conduce a excelentes resultados electroquímicos (Babaei & Taheri, 2013).

Utilizando Ni^{2+} como catión divalente, Al^{3+} como catión trivalente y CO_3^{2-} como anión para la formación de hidróxidos dobles laminares de Aluminio y Níquel se planteó de la siguiente forma:



Coordinados con grupos OH permiten una mejor interacción con los grupos OH de la serotonina y dopamina permitiendo una mejor oxidación e interacción de electrones.

Gracias a la presencia de grupos hidroxilo en las superficies de sus láminas y los aniones intercambiables, los hidróxidos dobles laminares de aluminio y níquel permiten un excelente intercambio electrónico con moléculas orgánicas.

2.6.2 Nanopartículas de Paladio en combinación con Oxido de Níquel

El paladio (Pd) ha ganado mucha atención debido a su actividad catalítica favorable y coste bajo comparado a otros metales nobles, con muchas aplicaciones como material del catalizador en los campos de la producción del hidrógeno, de las celdas de combustible de baja temperatura y de los sensores químicos. Las nanopartículas, especialmente los óxidos metálicos de transición, como el Óxido de Níquel (NiO), aumentan su área superficial, mejoran el transporte de masa y mantienen una buena interacción con compuestos orgánicos, las nanopartículas metálicas pueden ser usadas como modificación para sensores (Uzunoglu, Scherbath, & Stanciu, 2015).

El propósito de este trabajo es el diseño de un dispositivo electroquímico basado, primeramente, en un electrodo de carbón vítreo y, posteriormente, en electrodos serigrafados de carbono, ambos modificados en su superficie con la finalidad de mejorar sus propiedades para la detección de DA y 5-HT, y que pueda sustituir un equipo sofisticado mejorando el tiempo de análisis, la sensibilidad y el análisis de forma continua.

3. HIPÓTESIS

El desarrollo de un dispositivo electroquímico basado en electrodos modificados en su superficie para la detección sensible y selectiva de serotonina y dopamina podrá contribuir a futuras investigaciones para la detección temprana de estos neurotransmisores.

4. OJETIVOS

4.1 Objetivo General

Desarrollar un dispositivo electroquímico con un material sensible y selectivo que permita la detección de serotonina y dopamina, y a partir de una integración electrónica obtener una respuesta confiable.

4.2 Objetivos particulares

- ✓ Evaluar a partir de técnicas electroquímicas los materiales nanoestructurados NiAl / LDH y PdNiO para determinar que material es más sensible y selectivo en la detección de serotonina y dopamina.
- ✓ Adquirir las señales de oxidación de serotonina y dopamina (diferentes concentraciones).
- ✓ Seleccionar el material que mejor respuesta electroquímica nos proporcionó y evaluarlo fisicoquímicamente.

- ✓ Estudiado el material fisicoquímica y electroquímicamente, detectar DA y 5-HT con electrodos serigrafados de carbono modificados en su superficie
- ✓ Evaluar las señales adquiridas a partir de los electrodos serigrafados en un dispositivo electrónico.

5. METODOLOGÍA

5.1 Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Clorhidrato de dopamina (DA), Clorhidrato de serotonina hidro (5-HT), Nitrato de Aluminio nonahidratado ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), Nitrato de Níquel (II) hexahidratado ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y (Na_2PdCl_4 , 99.8%) fueron adquiridos por Sigma-Aldrich. (NiSO_4 , 99.9%), NaOH (80%) y el alcohol isopropílico se adquirieron de J. T. Baker. Fosfato de Potasio dibásico trihidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) fueron adquiridos de Macron. La solución de Nafion[®] 5 % es de marca Electrochem Inc. El Carbón Vulcan es de marca Cabot[®]. Todas las soluciones se prepararon con agua doblemente desionizada tipo 1, libre de materia orgánica, obtenida a partir de. Wáter High Purity[®].

5.2 Pre-tratamiento del electrodo de carbón vítreo

Para los experimentos en media celda convencional, el electrodo de carbón vítreo se pulió utilizando alúmina ($0.05\mu\text{m}$) durante 5 min., después se lavó con agua desionizada para retirarle el exceso de alúmina. Posteriormente, fue sometido a una limpieza electroquímica empleando voltametría cíclica, 25 ciclos a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} en un rango de potencial de -0.3 a 0.8 V en agua desionizada.

5.3 Síntesis de Nanomateriales

5.3.1 Síntesis de nanopartículas NiAl hidróxidos dobles laminares.

La síntesis del material NiAl-LDH publicada por Abdolmohammad-Zadeh (2011) se llevó a cabo por el método de coprecipitación que permitió controlar los principales factores que influyen en el diseño de las láminas como la temperatura, el pH y el tratamiento hidrotérmico.

La síntesis consiste en la adición de 0.581g de $N_2NiO_6 \cdot 6H_2O$ y 0.375g de $AlN_3O_9 \cdot 9H_2O$ en 30 mL de agua desionizada, bajo agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se ajustó el pH por medio de una titulación con NaOH 1M. Continuó la reacción por 30 min bajo una atmósfera de nitrógeno, y a continuación se llevó a cabo el tratamiento hidrotérmico a una temperatura de 90 °C por 24 h. Se separó el producto obtenido por centrifugación a 6000 rpm por 10min realizándose tres lavados con agua desionizada. Para finalizar se llevó a secado en mufla a 60 °C durante 6 h para eliminar los residuos de agua en el material.

5.3.2 Síntesis de nanopartículas de PdNiO

Las nanopartículas de PdNiO fueron sintetizadas a partir del método presentado por López-Rico (2007) a temperatura ambiente utilizando Na_2PdCl_4 y $NiSO_4$ como precursores los cuales se colocaron en un vial que contenía 10mL de líquido iónico prótico (PIL, por sus siglas en inglés) previamente sintetizado como se muestra en el Anexo 1, para luego ser dispersados por tratamiento con ultrasonido durante 2 h. Después de los tiempos de reacción se agregó carbón vulcan y se mantuvo en sonicación durante 30 min. Posteriormente se mantuvieron los viales en refrigeración a una temperatura de -18° C durante 24 h para asegurar la reducción completa de los precursores metálicos. Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm y se realizaron varios lavados con agua desionizada. Por último, el material resultante se secó en una mufla durante una noche a 80° C.

5.4 Preparación de tintas catalíticas

La preparación de tintas catalíticas para la modificación de la superficie del electrodo de carbón vítreo se llevaron acabo de la siguiente manera.

5.4.1 Preparación de tinta catalítica con NiAl / LDH

Para la preparación de la tinta catalítica NiAl / LDH, se añadió en un tubo eppendorf 2mg de material sintetizado NiAl / LDH correspondiente a un 30% (es el porcentaje óptimo para la preparación de una tinta catalítica), 70% de carbón vulcan con respecto al porcentaje añadido de material sintetizado dando como resultado mg.

$$\begin{array}{rcl} 2\text{mg} & \text{-----} & 30\% \\ \mathbf{X} \text{ mg} & \text{-----} & 70\% \quad \mathbf{X} = 4.66 \text{ mg} \end{array}$$

Por cada miligramo de material total (2mg material sintetizado + 4.66mg carbón vulcan = 6.66mg) se añadieron 63 μ L de alcohol isopropílico y 7 μ L de nafión, por tanto se añadieron 419.58 μ L y 46.62 μ L respectivamente. Posteriormente se sonicó durante 10 minutos para su uso en la modificación del electrodo de carbón vítreo.

5.4.2 Preparación de tinta catalítica con PdNiO

La tinta catalítica de PdNiO se preparó añadiendo en un tubo eppendorf 7mg de material sintetizado PdNiO correspondiente a un 100% puesto que en la síntesis se añadió el carbón vulcan. Se añadieron por cada miligramo de material total (7mg) 63 μ L de alcohol isopropílico y 7 μ L de nafión, por tanto se añadieron 441 μ L y 49 μ L respectivamente. Posteriormente se sonicó durante 10 minutos para después ser depositado en el electrodo de carbón vítreo.

5.5 Modificación de la superficie del electrodo de carbón vítreo.

Se realizaron dos depósitos sobre la superficie al electrodo de carbón vítreo pre-tratado para modificar sus propiedades. Un depósito se hizo con la tinta catalítica NiAl / LDH y otro con la tinta catalítica PdNiO, cada uno por separado. La cantidad de material depositado fue de 4 μ L respectivamente. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente.

5.6 Preparación de solución electrolítica para los experimentos electroquímicos.

La solución buffer fosfatos (PBS, 0.05 M, pH 7) fue preparada con Fosfato de Potasio dibásico trihidratado ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) como solución electrolítica para los experimentos electroquímicos. Se añadieron en 1L de agua desionizada 6.8045gr de fosfato monobásico y 11.412gr de fosfato dibásico, posteriormente se mantuvo en agitación durante 5min y se midió el pH a 7.0. Si la solución pasa por arriba del pH 7.0, se añadía fosfato monobásico hasta bajar el pH a 7.0. Si pasaba por debajo del pH 7.0 se agregaba fosfato dibásico hasta alcanzar el pH neutro.

5.7 Preparación de solución con neurotransmisores

Con la solución electrolítica se prepararon dos soluciones una con Dopamina y otra con Serotonina a diferentes concentraciones para el analisis de oxidación de cada neurotransmisor con los materiales NiAl / LDH y PdNiO. Todos los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con el fin de obtener resultados más precisos, se sometieron a una atmósfera de nitrógeno de alta pureza (99,9%) durante 10 min.

5.8 Caracterización y medición electroquímica en celda convencional de tres electrodos.

Las mediciones electroquímicas se realizaron en una estación de trabajo electroquímico Epsilon. En todos los experimentos fue empleada una celda de vidrio de 25mL como media celda utilizando un sistema convencional de tres electrodos como se mostró en la Figura 8, un electrodo de referencia (Ag/AgCl), cuyo potencial se mantiene constante; un electrodo de trabajo de carbón vítreo, (GCE, Ø4.0 mm, de CH Instrumento, Texas, EE.UU), modificado con el material depositado y un alambre de platino como contra-electrodo o auxiliar.

5.8.1 Mediciones por Voltametría Cíclica (CV)

Para evaluar la oxidación y reducción de dopamina y serotonina, respectivamente, sobre la superficie del electrodo de trabajo, se realizó con CV en un rango de potencial de -0.1V a 0.4 V vs Ag/AgCl a una velocidad de barrido de 50mV s^{-1} . Se utilizaron dos soluciones con buffer fosfatos pH 7.0 una con DA y otra con 5-HT ambas a 0.1mM. Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

5.8.2 Mediciones por Voltametría de Pulso Diferencial (DPV)

Se utilizó la técnica DPV para evaluar únicamente la oxidación de dopamina o serotonina en la superficie del electrodo de trabajo, para ello se consideraron las siguientes condiciones instrumentales: velocidad de barrido de 20mVs^{-1} , amplitud de impulso de 50mV, anchura de pulso de 50 ms y tiempo de pulso de 200 ms.

5.9 Caracterización fisicoquímica del material seleccionado

Una vez analizadas y obtenidas las señales a partir de pruebas electroquímicas, se eligió el material que mejor sensibilidad y selectividad nos resultó en la detección de dopamina y serotonina, en este caso NiAl / LDH, y se realizaron pruebas fisicoquímicas para observar las características superficiales

que permitieron al material una mejor transferencia de electrones con estas moléculas orgánicas.

5.9.1 Microscopio Electrónico de Barrido

El microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy) permite generar imágenes de una superficie, con una resolución alta y una apariencia tridimensional dentro de un intervalo amplio de aumentos lo cual facilita el estudio topográfico de un material. Otra función que permite realizar el SEM es microanálisis para determinar la presencia cualitativa y/o cuantitativa de elementos en detalles microscópicos.

Para generar la imagen, el SEM utiliza electrones en lugar de luz. De manera general, para lograrlo, el equipo cuenta con un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores se recogen como se observa de manera más detallada en la figura 15. Después los electrones generados de la interacción con la superficie de la misma para crear una imagen que refleja las características superficiales de la misma, pudiendo proporcionar información de las formas, texturas y composición química de sus constituyentes (Hernández-Albañil & Espejo-Mora, 2002).

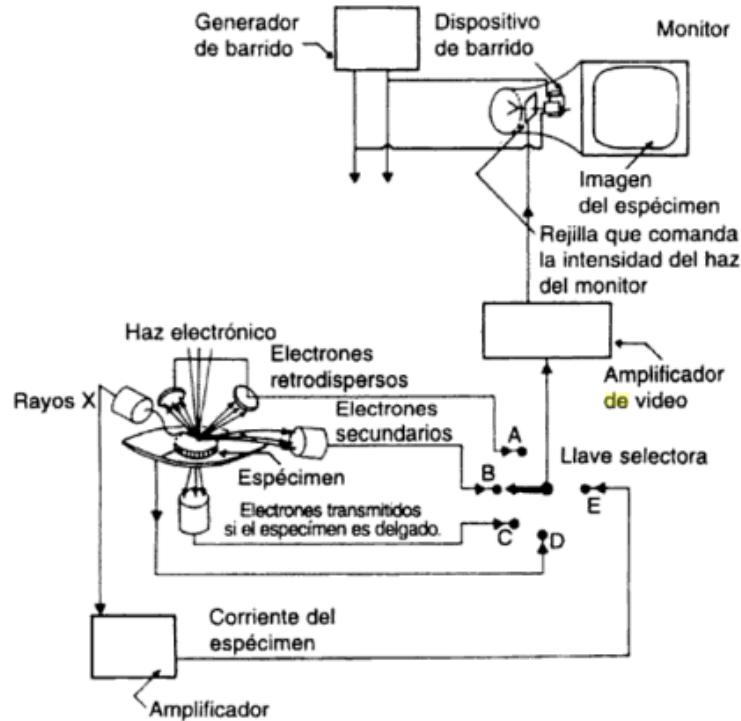


Figura 15. Detectores de señales emitidas por una muestra al recibir el haz.
(Tomada de: (Hernández-Albañil & Espejo-Mora, 2002)).

Las señales producidas por cada uno de los puntos de la muestra son transducidas y amplificadas, para modular el brillo del punto correspondiente de la imagen en la pantalla del monitor, creando una imagen del espécimen. Los rayos X del equipo, dan información cuantificable y graficable mediante su tratamiento por una computadora (Hernández-Albañil & Espejo-Mora, 2002).

Para el uso de la técnica SEM se utilizó el microscopio electrónico de barrido con el que cuenta la Universidad Autónoma de Querétaro marca JEOL modelo JSM-7200F. Para el análisis del material en el SEM, únicamente se colocó unos miligramos de material sobre una cinta conductora de carbón. Se colocó en el portamuestras y se analizó.

5.9.2 Difracción de Rayos X

La difracción de Rayos X (XRD, por sus siglas en inglés Diffraction Ray-X) es una técnica experimental para el estudio y análisis de materiales, basada en el fenómeno de difracción de los rayos X por sólidos en estado cristalino. Los rayos X son una forma de radiación electromagnética que tiene elevada energía y corta longitud de onda: del orden de los espacios interatómicos de los sólidos. Cuando un haz de rayos X incide en un material sólido, parte de este haz se dispersa en todas direcciones a causa de los electrones asociados a los átomos o iones que encuentra en el trayecto como se observa en el principio base de la figura 16, (Callister-D, 2007).

Esta técnica nos proporciona intensidades de las figuras de difracción, siendo posible construir un esquema detallado de los entornos de los átomos. Los métodos de difracción de rayos X constituyen un instrumento muy útil del que se dispone para el estudio de la estructura interna de las moléculas cristalinas, otorgando resultados de compuestos estructurales a la química, mineralogía y biología, debido a que puede construir entornos de moléculas tan complejas como las proteínas. Luego de determinar el orden interno del medio cristalino se establece la geometría de la celda unidad, mediante difracción de rayos X, obteniendo las dimensiones de la celda, el tipo de retículo, el sistema cristalino y los posibles grupos espaciales (Cortes-H., Martinez-Yepes, & Valencia, 2006).

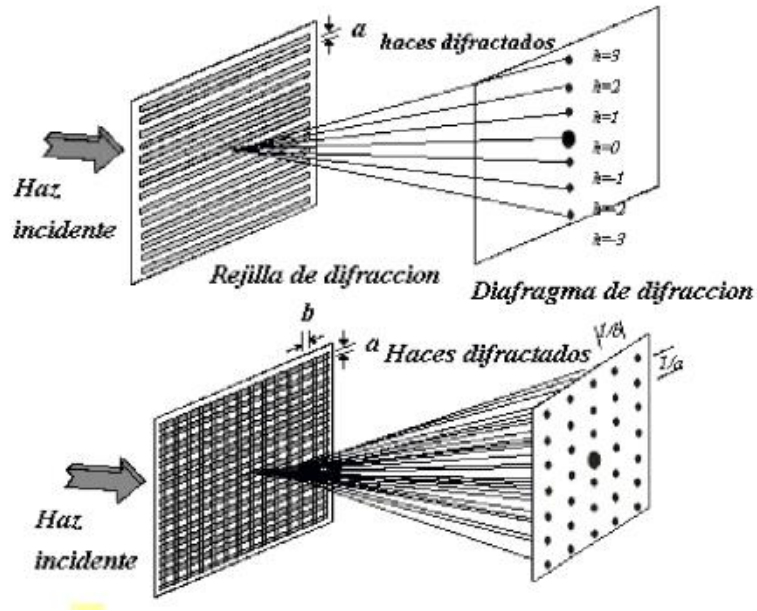


Figura 16. Principio base de una difracción de rayos X.
(Tomada de: (Callister-D, 2007)).

Para el uso de la técnica XRD se utilizó el equipo de difracción de rayos X con el que cuenta la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.9.3 Espectroscopia de Fluorescencia de Rayos X

La espectroscopia de fluorescencia de rayos X (XRF, por sus siglas en inglés) consiste en la emisión de rayos X secundarios o fluorescentes, como se observa en la figura 17, que son característicos de un material que ha sido ya excitado por otra radiación X de alta energía o rayos gamma (Albella, Cintas, Miranda, & Serratos, 1993).

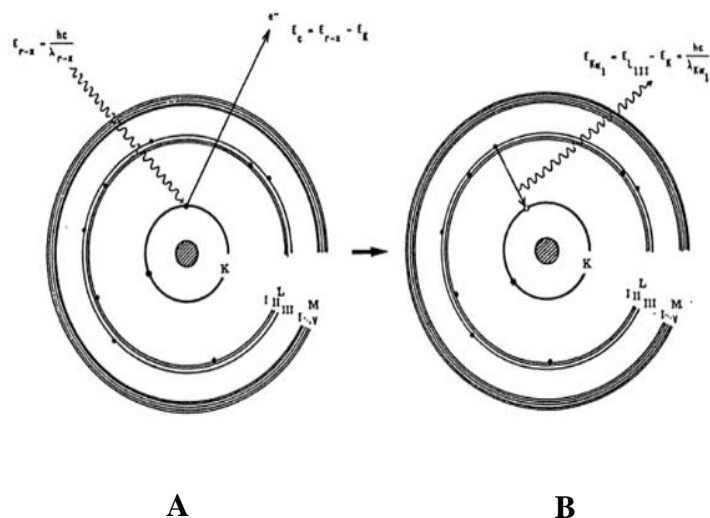


Figura 17. Producción del espectro característico de Fluorescencia de Rayos X. (A) Excitación por bombardeo con fotones de rayoa X (excitación secundaria). (B) Emisión del espectro característico de rayos X (Radiación X secundaria o radiación de Fluorescencia).

(Tomada de: (Albella, Cintas, Miranda, & Serratosa, 1993)).

Esta técnica ha sido ampliamente empleada para la evaluación de la composición de la superficie de los materiales. Aunque es en gran parte un análisis cualitativo, y una estimación de la concentración, teniendo desventajas, incluyendo irregularidades de la superficie y geometría de medición, así como diferencias elementales provocando ciertos errores. La fluorescencia de rayos X análisis es bien conocido como una herramienta poderosa para el análisis elemental no destructivo de pequeñas regiones de muestras en varios campos, incluyendo muestras biológicas (Milazzo, 2004).

Para el uso de la técnica XRF se utilizó un espectrómetro de Fluorescencia de Rayos X con el que cuenta la Universidad Autónoma de Querétaro marca Bruker modelo S2 KODIAK. Se colocó en un vial 1mg de material NiAl / LDH con 970 μ L de alcohol isopropílico y 10 μ L de material estándar, en este caso se utilizó Selenio (Se). Se sonicó durante 1h y posteriormente se colocó en un vortex por un minuto para homogenizar la mezcla. Una vez homogenizada la muestra, se tomaron 10 μ L de la solución y se colocaron en un portamuestras del XRF para ser analizada.

5.10 Caracterización electroquímica con electrodos serigrafiados modificados en su superficie por NiAl / LDH

En base a los resultados del material NiAl / LDH en las pruebas electroquímicas, se evaluó electroquímicamente la detección de Dopamina y Serotonina en electrodos serigrafiados de carbono modificados en la superficie con NiAl / LDH. Estos resultados fueron la base para desarrollo del dispositivo electroquímico.

5.10.1 Modificación de la superficie del electrodo serigrafiado de carbono

Realizado el análisis de materiales se seleccionó el material NiAl / LDH por tener una gran vinculación con la oxidación de materia orgánica. Los electrodos serigrafiados o lengüetas (Dropsens) no requieren de ningún pretratamiento de limpieza, se utilizan y dependiendo de la muestra analizar se puede reutilizar por un par de veces o bien se desecha. Para la modificación del electrodo de trabajo se depositaron 4 μ L del material NiAl / LDH sobre la superficie.

5.10.2 Evaluación electroquímica con electrodos serigrafiados

Al no existir en el mercado electrodos serigrafiados con electrodo de trabajo de carbón vítreo se eligió un material dentro de la misma línea del carbón, electrodos serigrafiados de carbono. Se realizó una evaluación electroquímica por medio de la técnica Voltametría de Pulso Diferencial (VPD). Los electrodos serigrafiados tienen impresos los tres electrodos utilizados en una media celda convencional, el electrodo adquirido cuenta con: electrodo de referencia de Ag, contra electrodo de carbono y electrodo de trabajo de carbono. Los electrodos serigrafiados representan un gran ahorro de tiempo, reactivos y espacio .

Las mediciones electroquímicas con los electrodos serigrafados se realizaron usando un potencióstato Epsilon adaptado a un lector especial para la lectura de las lengüetas. Se colocó una muestra de 50 μ L con solución buffer fosfatos (PBS, pH 7.0) que contenía concentraciones de DA o 5-HT.

5.11 Integración de los electrodos serigrafados con electrónica

La incorporación de electrodos serigrafados modificados en un dispositivo electrónico, como se observa en la Figura 18, nos permitió la evaluación de las señales a partir de un código de programación que nos permitirá identificar de manera real las señales en una muestra con dopamina y / o serotonina colocada en el electrodo serigrafado.

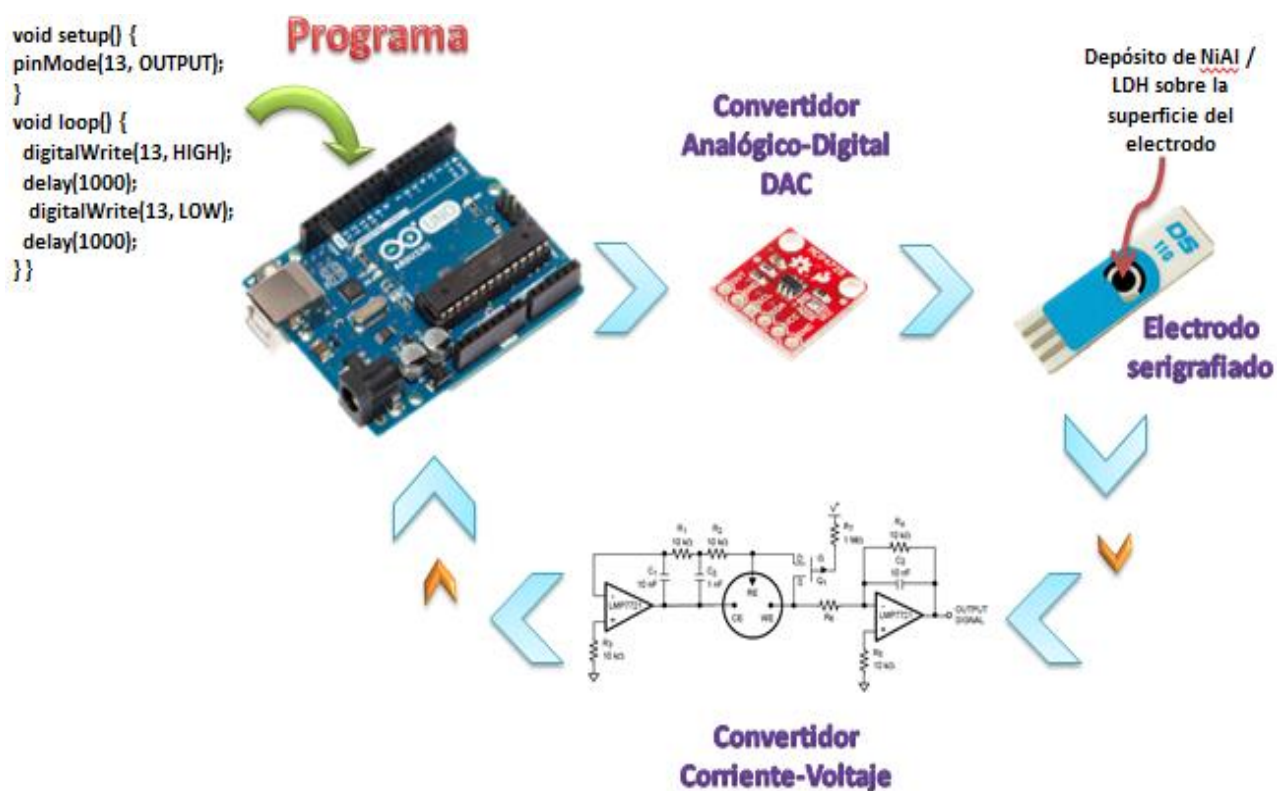


Figura 18. Esquema de dispositivo electrónico.
(Autoría propia).

Se utilizaron como elementos electrónicos un Arduino modelo Uno, conversor analógico digital (DAC, por sus siglas en inglés. Texas Instrument) y un conversor Corriente-Voltaje, además de resistencias, capacitores, transistores.

Se realizó un programa en la interface de Arduino que nos permitió crear un tren de pulsos, este tren condujo a la activación del electrodo serigrafiado para comenzar el intercambio electrónico con las muestras. El tren de pulsos pasa a través del DAC para aumentar la resolución del mismo. Una vez activado el pulso, la solución colocada en el electrodo de trabajo reacciona produciendo un intercambio de electrones dando como resultado una salida de corriente. Dicha corriente pasa por un conversor I-V el cual, como su nombre lo dice, convirtió la corriente en voltaje para poder ser leído por el Arduino y de esta manera analizar los datos en un software e interpretarlos de manera gráfica.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización electroquímica en celda convencional de tres electrodos.

6.1.1 Voltametría Cíclica (CV)

6.1.1.1 *Oxidación electrocatalítica de Dopamina comparando su comportamiento en los electrodos modificados.*

La actividad electrocatalítica del electrodo de carbón vítreo modificado con NiAl / LDH se llevó a cabo en PBS pH 7.0 que contiene 0.1mM de DA por medio de voltametría cíclica usando una velocidad de barrido de 50mV s^{-1} en una ventana de potencial de -0.2 a 0.5 V vs Ag/AgCl como se muestra en la Figura 19 A. En la figura 19 A se observa la dependencia de la respuesta de la DA al electrodo. Como era de esperarse, no se definen picos de oxidación-reducción en la solución blanco. Después de la adición de DA se observan picos redox reversibles bien definidos localizados entres los potenciales 0.1 V y 0.2 V vs Ag/AgCl en correspondencia con lo reportado por Él y cols. (2016), quienes detectaron DA en una solución buffer de fosfatos 0.1M (PBS, pH 7.0) a partir de la oxidación con un electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de Ni soportado sobre carbono (Ni / C), por medio de voltametría cíclica (CV) a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} , utilizando un GCE como electrodo de trabajo, un electrodo de referencia Ag/AgCl saturado y un alambre de platino como contraelectrodo. Observaron un comportamiento redox con un potencial en el pico anódico por el electrodo Ni / C / GCE de 0.27V vs Ag/AgCl. Este trabajo demuestra que el material NiAl / LDH presenta una buena actividad electrocatalítica hacia la oxidación de DA basado en publicaciones de otros autores (Numan, Mehmood, Omar, Ramesh, & Ramesh, 2017) (Meenakshi, Devi, Pandian, Devendiran, & Selvaraj, 2016) que indican que el pico de oxidación se encuentra dentro del límite de potencial al que se detecta la transferencia de electrones de DA.

El electrodo de carbón vítreo previamente tratado y depositado ahora con PdNiO, como se detalla en la metodología, fue colocado en una celda convencional bajo las mismas condiciones de concentración (0.1mM de DA) y pH (PBS, 0.05 M, pH 7). La presencia de DA en la superficie del electrodo modificado con PdNiO se verificó por voltamperometría cíclica (CV) a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} en una ventana de potencial de -0.2 a 0.5 V vs Ag/AgCl como se observa en la Figura 19 B donde se puede observar un cambio significativo en comparación con la solución del blanco (0mM) que no presenta ningún salto de corriente en la oxidación con DA.

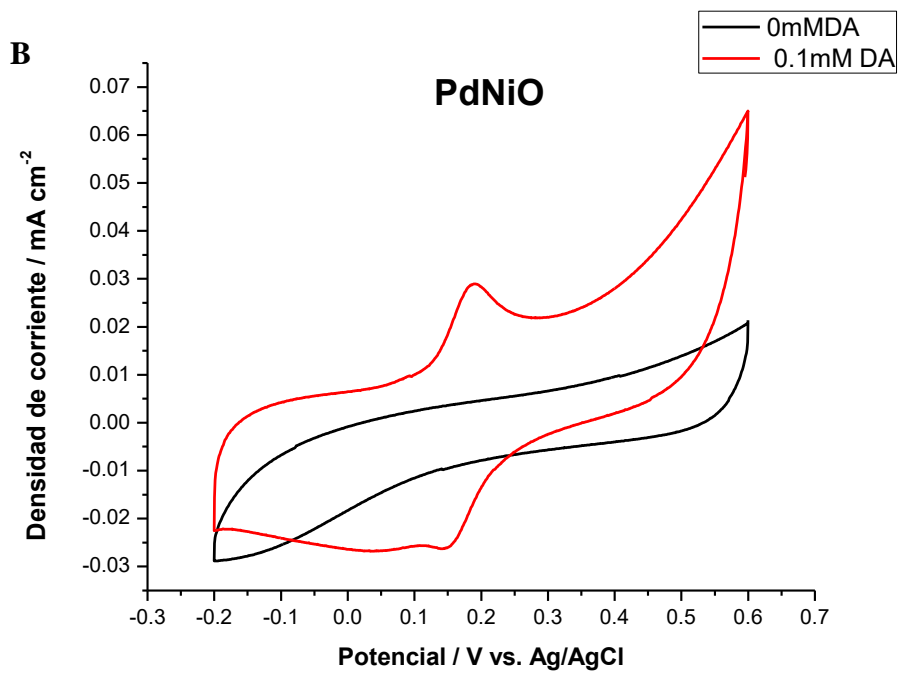
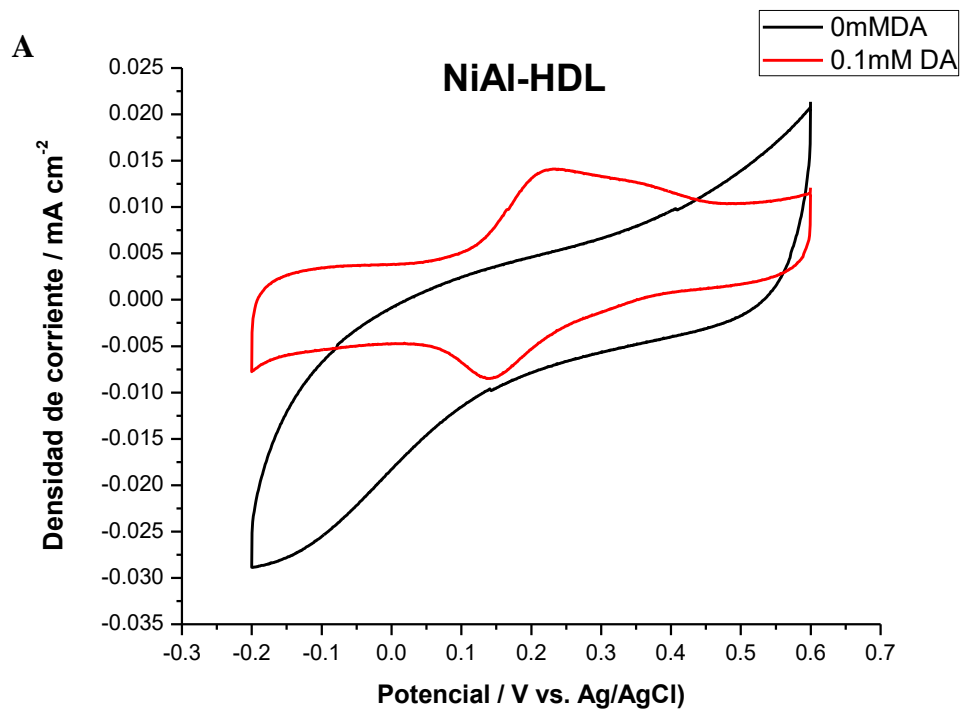


Figura 19. (A) Voltametría cíclica del electrodo NiAl / LDH en PBS (pH7.0) que contiene 0.1mM de DA. (B) Voltametría cíclica del electrodo modificado con PdNiO en PBS (pH 7.0) que contiene 0.1mM de DA.

Las voltametrías cíclicas (CVs) de los diferentes electrodos modificados en PBS (pH 7.0) que contienen 0.1mM de DA se observan en la figura 20.

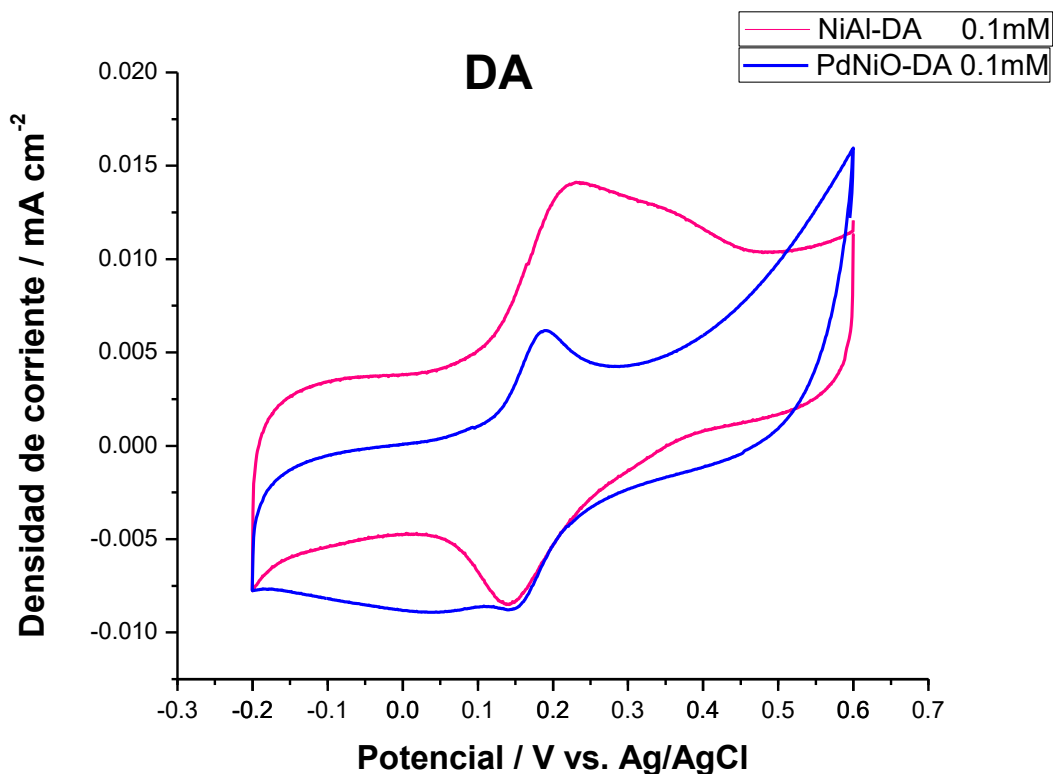


Figura 20. Voltamperogramas cíclicos tanto del electrodo modificado con NiAl / LDH como del electrodo modificado con PdNiO en PBS (pH 7.0) que contiene 0.1mM de DA.

Como se observa en la figura 20, la corriente del pico anódico de DA en electrodo modificado con NiAl / LDH presenta un mayor aumento con respecto al pico anódico del electrodo modificado con PdNiO. El electrodo de PdNiO mostró un pico muy definido de oxidación (0.2 V vs Ag/AgCl) mientras que el pico de reducción (0.17 V vs Ag/AgCl) se muestra poco definido. Por otro lado el electrodo de NiAl / LDH mostró el pico de oxidación en 0.21 V vs Ag/AgCl y reducción en 0.17 V vs Ag/AgCl al igual que el material PdNiO, únicamente con la diferencia de que el material NiAl / LDH muestra un par de picos redox bien definidos. Con lo ya publicado por Xu y cols., 2016 y Li y cols., 2007, quienes utilizaron diferentes

materiales como nanopartículas de oro, polipirrol, grafeno dopado con nitrógeno, nanocompuestos de níquel con flalocianina tetrasulfonados, entre otros, se pudo observar que el desplazamiento del pico de oxidación se debe a la oxidación electrocatalítica de DA en la superficie del material que se utilice en la modificación del electrodo. Las propiedades en estructura del material y la atracción a moléculas orgánicas.

6.1.1.2 *Oxidación electrocatalítica de Serotonina comparando su comportamiento en los electrodos modificados.*

Los voltamperogramas obtenidos con los electrodos modificados con NiAl / LDH (figura 21 A) y PdNiO (figura 21 A) en una solución amortiguadora PBS (pH 7.0) con 0.1mM de 5-HT, con una velocidad de barrido de 50 mVs⁻¹ en una ventana de potencial de -0.2 a 0.6 V vs Ag/AgCl para ambos materiales. Se puede observar una nula presencia de picos redox en la solución blanco. En ambos voltamperogramas se presenta un incremento en la corriente al modificar la superficie del electrodo con un material ajeno, en este caso NiAl / LDH y PdNiO respectivamente. Así mismo se observó al adicionar 5-HT únicamente la presencia de picos de oxidación irreversibles, es decir, no se redujo la misma cantidad que se oxido y en este caso la reducción fue tan poca que no se alcanza a detectar. Los potenciales en los cuales se oxido el material fueron 0.38 V vs Ag/AgCl para NiAl / LDH y 0.42 V para PdNiO que coinciden con los potenciales reportados por otros autores, Li y cols., 2007 y Cesarino y cols, 2014. Li y cols., por medio la técnica de Voltametría Cíclica a una velocidad de barrido de 50mV s⁻¹ reportan una corriente de pico anódico a 0.37 V vs Ag/AgCl y un pequeño pico catódico a 0.32 V vs Ag/AgCl utilizando un GCE modificado con nano partículas de oro con polipirrol oxidado (nano-Au / PPyox) en un solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (PBS, pH 7.0). Por el contrario, Cesarino y cols., reportaron la dependencia de DA en un electrodo de platino modificado con Nanotubos de Carbono de pared múltiple, poipirrol y nanoparticulas de plata coloidal por medio de experimentos de

Voltametría Cíclica usando una velocidad de barrido de 50mV s^{-1} observando un pico de oxidación irreversible en un potencial bien definido a un valor de potencial de 0.42 V vs Ag/AgCl .

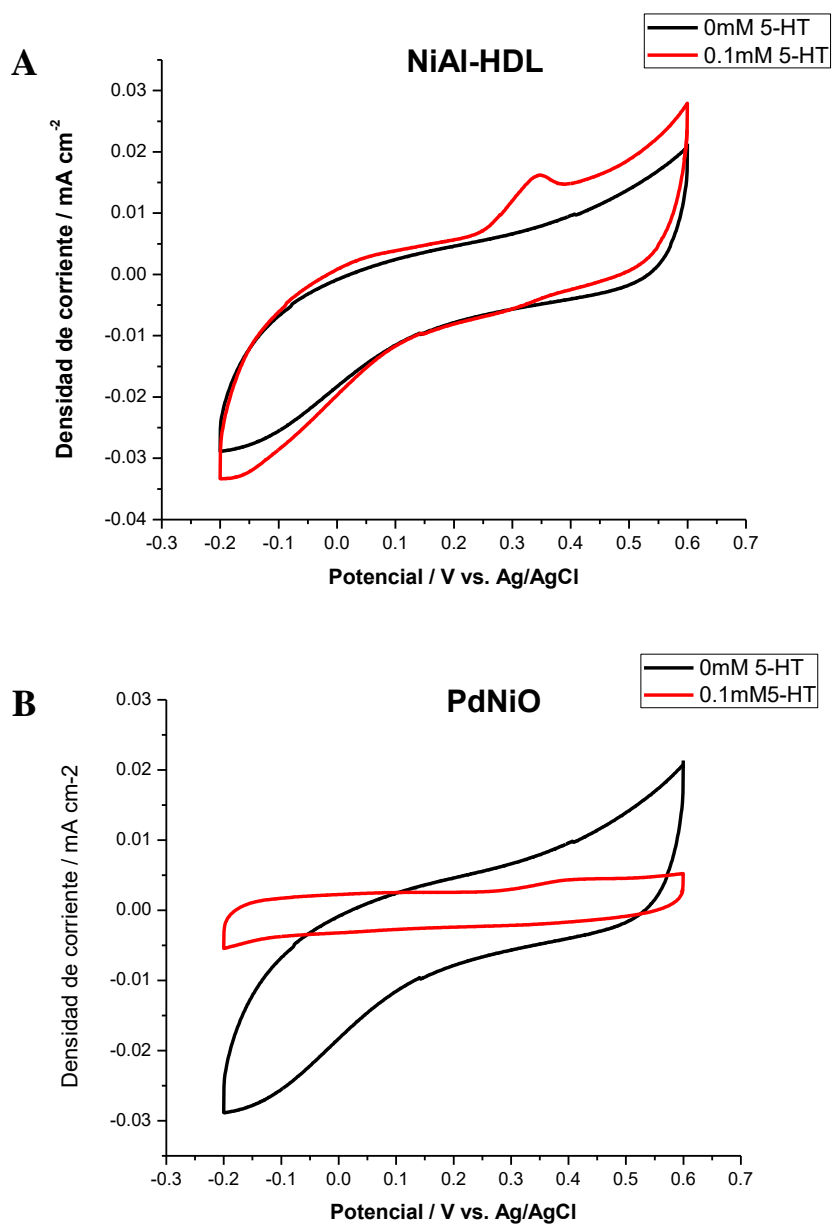


Figura 21. (A) Voltametría cíclica del electrodo NiAl / LDH en PBS (pH7.0) que contiene 0.1mM de 5-HT. (B) Voltametría cíclica del electrodo modificado con PdNiO en PBS (pH 7.0) que contiene 0.1mM de 5-HT.

Los picos de oxidación irreversibles de ambos materiales sobre 0.1mM de 5-HT en una solución PBS (pH 7.0) se atribuyen al grupo hidroxilo presente en el anillo aromático de las especies que forman cetonas en serotonina y se pueden apreciar con mayor claridad en la figura 22. Se muestra que existe una mayor dependencia de la respuesta de 5-HT al electrodo modificado con NiAl / LDH que al electrodo modificado con PdNiO. Esto se debe a los hidróxidos dobles laminares de NiAl que cuentan con grupos hidroxilo en las superficies de sus láminas y los aniones intercambiables permitiendo un excelente intercambio electrónico con moléculas orgánicas.

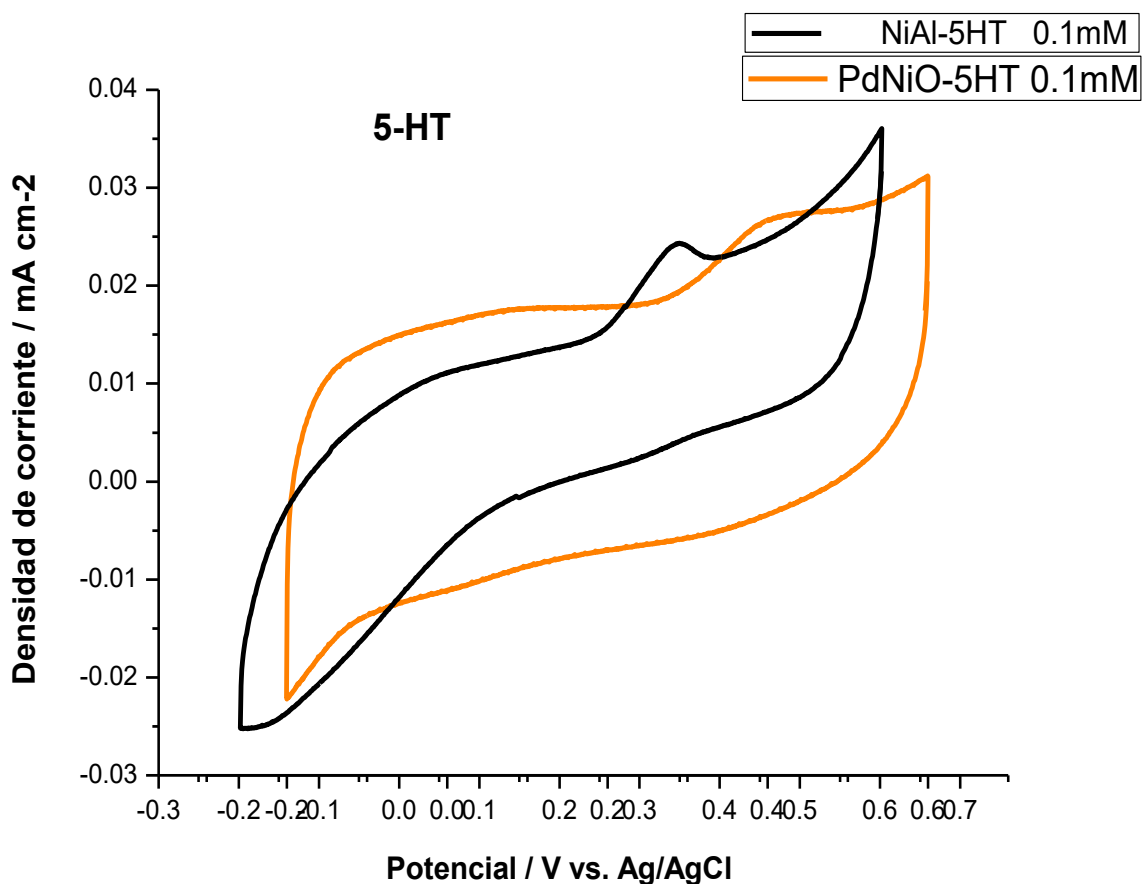


Figura 22. Actividad electrocatalítica de 0.1mM de 5-HT sobre los electrodos modificados con NiAl / LDH y PdNiO en solución buffer fosfatos (PBS, pH 7.0).

Como lo reportan otros autores (Xue, y otros, 2014) (Babaei & Taheri, 2013) (Kim, Kim, & Jeon, 2012) (Abbaspour & Noori, 2011), la variación de materiales como nanopartículas de trióxido de tungsteno, nanopartículas de oro, nanofibras de carbono, Nafion, hidróxido de níquel, entre otros., sobre la superficie del GCE, puede modificar el potencial de oxidación de 5-HT

6.1.2 Voltametría de Pulso Diferencial (DPV)

Se realizaron pruebas de oxidación de los neurotransmisores 5-HT y DA utilizando como técnica Voltametría de Pulso Diferencial (DPV) con los diferentes materiales NiAl / LDH y PdNiO. En la figura 23 se observa la oxidación en la superficie del electrodo de carbón vítreo modificado y el producto de cada uno de los neurotransmisores al ser oxidados.

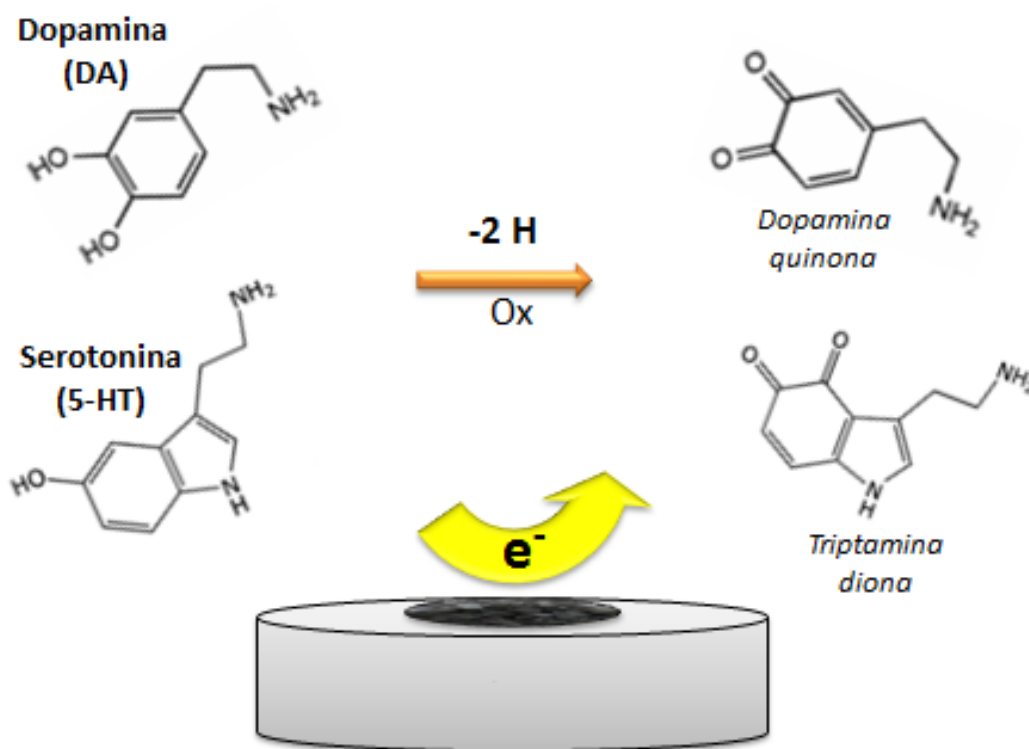


Figura 23. Oxidación de Dopamina y Serotonina en la superficie del electrodo. (Autoría Propia).

6.1.2.1 Oxidación electroquímica de Dopamina en el electrodo modificado con PdNiO y NiAl / LDH

La oxidación de DA en la superficie del electrodo de carbón vítreo previamente tratado y depositado con PdNiO como se observa en la figura 24 A, para la detección de DA a diferentes concentraciones, se verificó por Voltametría de Pulso Diferencial (DPV) en una ventana de potencial de -0.1 a 0.4 V vs Ag/AgCl, a una velocidad de barrido de 20 mVs⁻¹, una amplitud del pulso de 100mV, un periodo de pulso de 2000ms y un tiempo de estabilización de 240s. Se realizaron adiciones de 10µL, 50µL y 100µL, de DA diluidas en solución buffer fosfatos (PBS) pH 7.0 analizando el incremento de oxidación de DA sobre la superficie del electrodo. Se observan picos de oxidación localizados entre los potenciales 0.1 V y 0.2 V vs Ag/AgCl lo cual se puede verificar con lo ya reportado por otros autores como Li y cols., 2007, quienes utilizaron la técnica voltametría de pulso diferencial para la detección de oxidación de DA en un potencial de .18 V vs Ag/AgCl, por medio de un electrodo de carbón vítreo modificado nano-Au / PPyox, obteniendo un rango lineal de $R^2 = 0.9995$ en un intervalo de $7.5 \times 10^{-8}M$ a $2.0 \times 10^{-5}M$.

En el presente trabajo, el incremento en la intensidad es evidente en la primera adición de 0mM y 0.005mM. Se observa que el aumento de concentraciones de DA aumentan gradualmente el pico de oxidación en corriente. Los experimentos se realizaron por triplicado para la realización de una curva de calibración utilizando el método de adición estándar. La curva de calibración para DA a diversas concentraciones en solución PBS (pH 7.0) detectada por el electrodo de carbón vítreo modificado con PdNiO, se muestra en la Figura 24 A. Se obtuvo una respuesta lineal entre la corriente pico y la concentración de DA ($R^2 = 0.9752$) en el intervalo de 0.005mM a 1mM.

Se realizó una limpieza del electrodo como se describe en la metodología para el depósito del material NiAl / LDH y bajo las mismas condiciones de barrido y ventana de potencial que con el material PdNiO para la oxidación de DA se

realizó el análisis de transferencia de electrones con el nuevo material depositado (NiAl / LDH) como se observa en la Figura 24 B. El incremento de concentración en la solución PBS (pH 7.0) se realizó, partiendo de una solución madre de 0.1mM de DA, por adiciones de 10 μ L, 50 μ L y 100 μ L. Los picos de oxidación aparecen nuevamente entre los potenciales de 0.1 V y 0.2 V vs Ag/AgCl.

El incremento de corriente sigue siendo conforme se agrega la concentración, a mayor concentración mayor corriente. Las pruebas se realizaron por triplicado y se elaboró una curva de calibración. Los picos de corriente de DA en respuesta al material NiAl / LDH mostraron significativo incremento en relación lineal ($R^2 = 0.9824$) en el intervalo de 0.008mM a 1mM, en comparación con la relación lineal del material PdNiO en la oxidación de DA. Además de que los picos de corriente con el material NiAl / LDH son mucho mayores, el doble, en comparación con los picos de corriente oxidados por el material PdNiO. Estos puntos nos ayudaron a definir que material es óptimo, económico, sensible y selectivo en la oxidación y detección de DA. El pico de oxidación reversible en ambos materiales se atribuye al grupo hidroxilo presente en el anillo aromático de la DA.

La concentración 0.03mM, de DA no interpretada en ninguna de las gráficas de la Figura 24 pero que claramente puede ser medida por los dos materiales entre 0.02mM y 0.04mM, corresponde a una concentración total de DA en orina en ausencia de enfermedades.

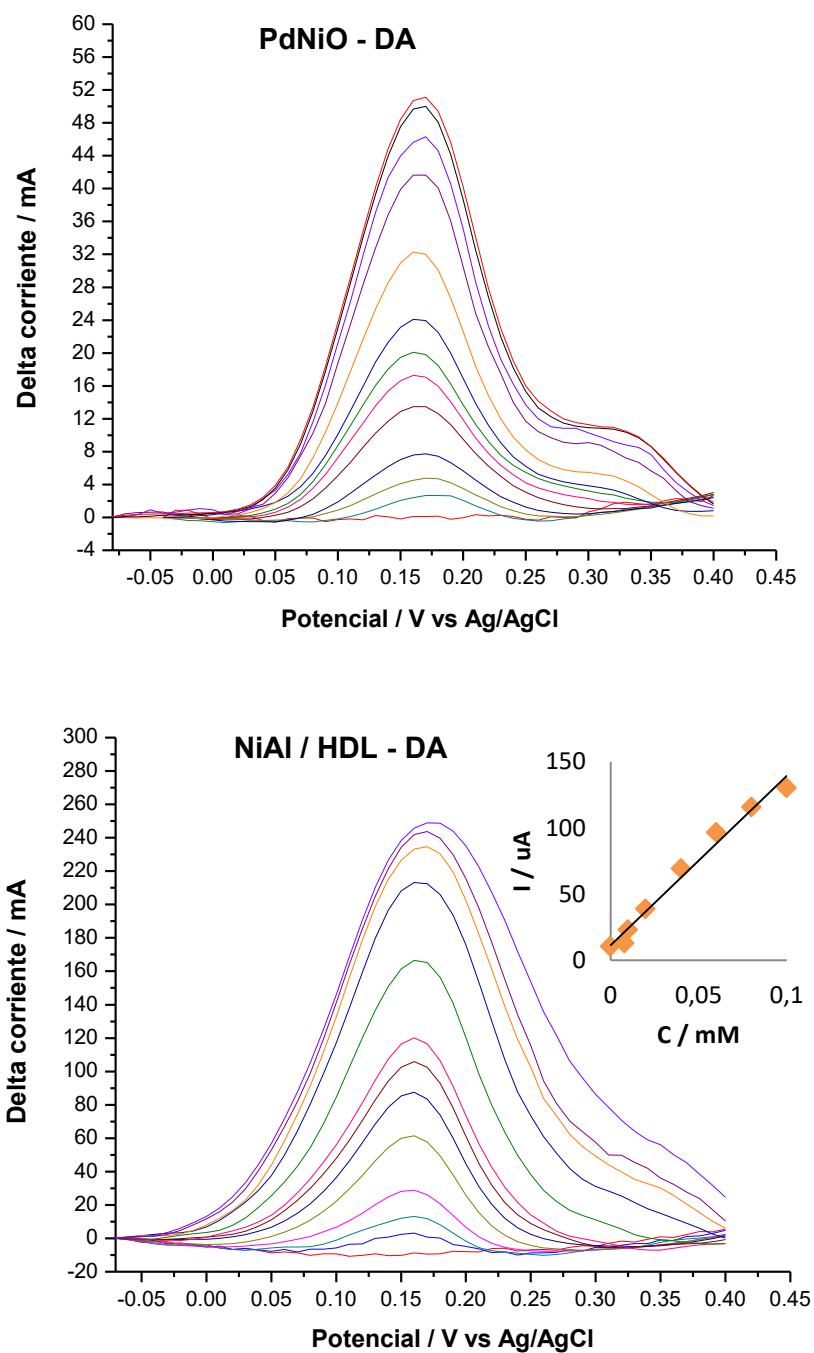


Figura 24. DPVs de DA en PdNiO / GCE (A) y NiAl / LDH / GCE (B) en solución 0.05M PBS (pH 7.0). (A) Concentraciones de DA en electrodo modificado con PdNiO: 0.005mM a 1mM partiendo de una concentración 0mM. (B) Concentración de DA en electrodo modificado con NiAl / LDH: 0.008mM a 1mM partiendo de una concentración 0mM. Cada DPV con su correspondiente curva de calibración.

Los resultados anteriores indican claramente que tanto el electrodo modificado en su superficie por NiAl / LDH como el electrodo modificado por PdNiO son adecuados para ser la determinación selectiva de DA en una solución buffer fosfatos (PBS) pH 7.0.

6.1.2.2 Oxidación electroquímica de Serotonina en el electrodo modificado con PdNiO y NiAl / LDH.

Se realizó la limpieza de los electrodos de carbón vítreo como se detalla en la metodología para la detección y oxidación de Serotonina con los materiales PdNiO y NiAl / LDH, a partir de la técnica DPV bajo una ventana de potencial de -0.1 a 0.5 V vs Ag/AgCl como se observa en la Figura 25. Las condiciones de barrido se llevaron a cabo con una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} , una amplitud del pulso de 100mV, un periodo de pulso de 2000ms y un tiempo de reposo de 240s. Los picos de oxidación que aparecen entre los potenciales 0.3 V y 0.4 V vs Ag/AgCl coinciden con los potenciales de oxidación de 5-HT reportados por otros autores como Anithaa y cols., 2017, quienes realizaron una determinación de 5-HT por medio de voltametría de pulso diferencial una amplitud de 60mV y un período de pulso de 0.2 s, en una solución buffer fosfatos (PBS, pH 7.0) que con tenía concentraciones de 5-HT; teniendo como resultado una relación lineal entre el pico de oxidación y la concentración ($R^2 = 0.998$) en un intervalo de 0.01mM a 600mM. En este trabajo presentado con NiAl / LDH, cada prueba se realizó por triplicado por el método de adición en solución buffer fosfatos (PBS) pH 7.0, para cada uno de los materiales. No obstante, al igual que lo reportado por otros autores, se observa un aumento de corriente conforme se va aumentando la concentración como lo reportado por Li y cols., 2007. La concentración 0.01 Mm, no interpretada en ninguna de las gráficas de la Figura 25 pero que claramente puede ser medida por cualquiera de los dos materiales entre 0.008mM y 0.02mM para NiAl / LDH, y

0mM y 0.02mM para PdNiO, corresponde a una concentración total de 5-HT en orina en ausencia de enfermedades.

La figura 25 A muestra picos de corriente menos intensos en comparación con los picos de corriente de la Figura 25 B correspondiente a la oxidación de 5-HT por el material NiAl / LDH. En la Figura 25 A, el incremento en la intensidad por la acción oxidante del material PdNiO sobre serotonina es poco clara en la primera adición entre 0mM y 0.01mM. Mientras que en la Figura 25 B la transferencia de electrones entre el material NiAl / LDH y la serotonina se muestra muy evidente en la primera adición entre 0mM y 0.001. Se observa que el material NiAl / LDH puede detectar concentraciones más pequeñas de 5-HT. Por el contrario se muestra que el material PdNiO alcanza una detección de concentraciones más altas. Para justificar estas dos posturas se realizaron curvas de calibración para ambos materiales .La relación lineal entre la corriente de pico y la concentración de 5-HT debida a la transferencia de electrones con el material NiAl / LDH mostraron buenos resultados ($R^2 = 0.9936$) como se observa en la Figura 25 B en el intervalo de 0.01mM a 0.2mM. La pendiente en la curva de calibración del material PdNiO en la oxidación de 5-HT como se muestra en la figura 25 A presenta una relación lineal de ligeramente por debajo de la regresión lineal del material NiAl / LDH ($R^2 = 0.9039$) en el intervalo de 0.001mM a 2mM.

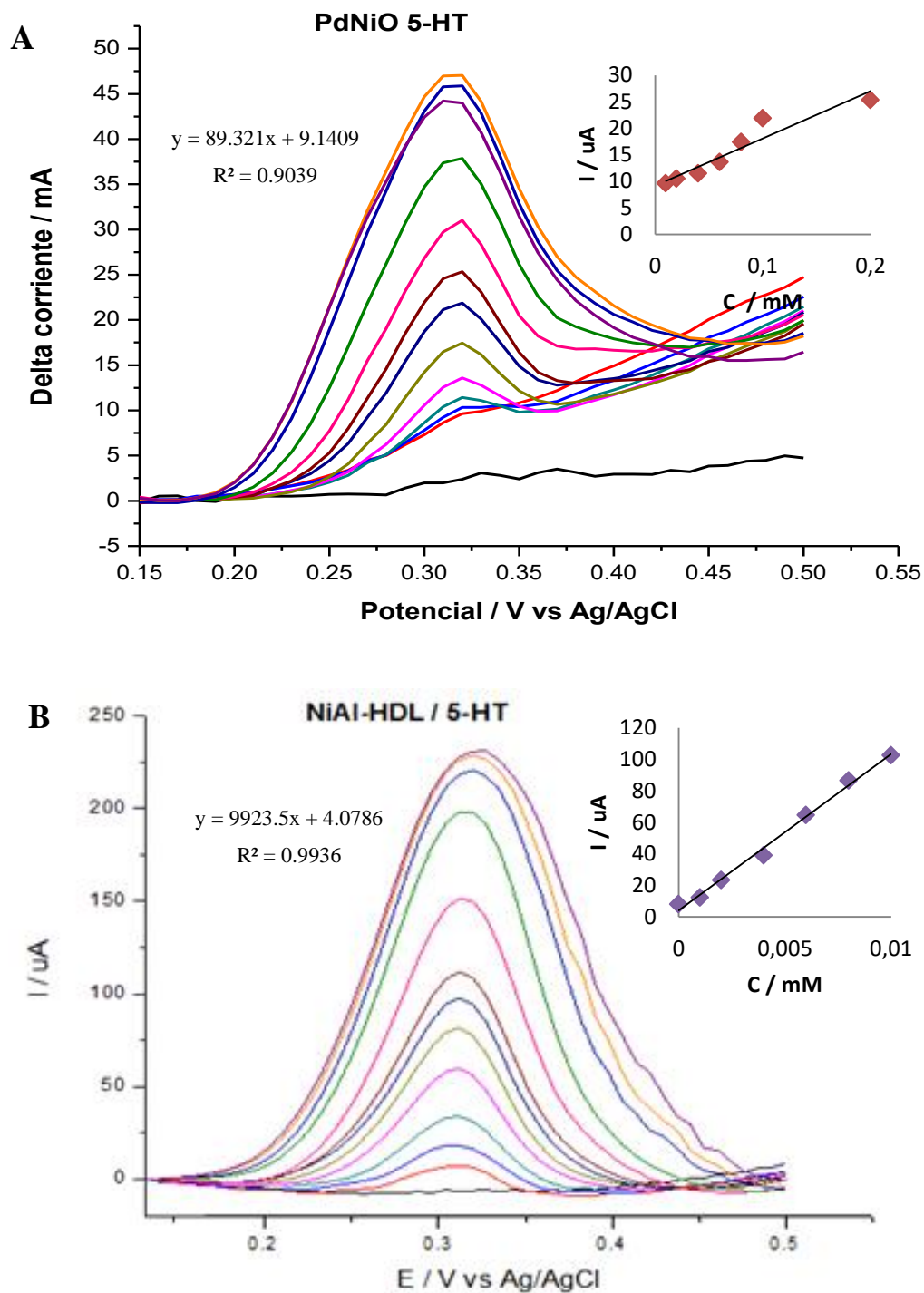


Figura 25. DPVs de 5-HT en PdNiO / GCE (A) y NiAl / LDH / GCE (B) en solución 0.05M PBS (pH 7.0). (A) Concentraciones de 5-HT en electrodo modificado con PdNiO: 0.01mM a 2mM partiendo de una concentración 0mM. (B) Concentración de 5-HT en electrodo modificado con NiAl / LDH: 0.001mM a 0.2mM partiendo de una concentración 0mM. Cada DPV con su correspondiente curva de calibración.

6.1.3 Comparación de materiales

Por tanto:

- NiAl / LDH o PdNiO, se pueden utilizar en la aplicación de sensores electroquímicos para la detección de DA y 5-HT.
- NiAL / LDH presenta una mejor linealidad para ambos neurotransmisores en comparación con PdNiO.
- El costo de adquisición y de síntesis de NiAl / LDH es mucho más bajo.

En la siguiente tabla 1 se presentan diferentes valores de linealidad y límite de detección reportados; en algunos casos se han utilizado materiales y métodos más complejos para la modificación de la superficie del electrodo de trabajo. Por el contrario en el presente trabajo los electrodos de carbón vítreo fueron modificados por depósito de tina catalítica por lo que el método de modificación fue sencillo, económico y rápido. Al comparar lo valores de linealidad se concluye que la linealidad y límites de detección se encuentran dentro de los intervalos ya reportados por otros autores.

Tabla 1. Tabla comparativa de los trabajos publicados en sensores electroquímicos.

Materiales	Solución	Técnicas		Límite de detección	Rango Lineal	Referencia
		Electroquímicas	Neurotransmisores			
SPGE/ AuNPs	Orina tratada con buffer Britton-Robinson (BR), pH 7.0	CV, EIS	DA	5.7nM	0.1 a 120.0 μ M	Kanyong, P. y cols., 2016
Pt/MWCNT/ PPy/AgNPs	Buffer de Fosfatos (PBS), pH 7.0	DPV	5-HT	0.15 M	-----	Cesario I. y col., 2014
GC/ PtNPs	Orina sin tratamiento (orina: agua, 1: 3)	CV, FIA	DA	18.19 M	1 to 11 ppm	García y cols., 2011
Au/PPyox/G CE	Buffer de Fosfatos (PBS), pH 7.0	CV, DPV	DA	1.5×10^{-8} M	7.5×10^{-8} a 2.0×10^{-5} M	Li J. y col., 2007
			5-HT	1nM	7.0nM a 2.2 μ M	
GSCR-MIPs	Buffer de Fosfatos (PBS), pH 7.0	CV y LSV	DA	1×10^{-7} M	1.0×10^{-7} a 8.3×10^{-4} M	Mao Y. y col., 2011
AgNP / Zeo- Y / GCE	Orina tratada con Buffer de Fosfatos (PBS), pH 7.0	CV, EIS, DPV	DA	0.016 M	0,08 x 10^{-4} a 0,96 x 10^{-4} M	Meenakshi y cols., 2016

CNFs	Buffer de Fosfatos (PBS), pH 7.0	DPV	DA 5-HT	50x10 ⁻⁹ M 250nM	-----	Rand E. y col., 2013
SiO ₂ / MWCNT / GCE	Orina tratada con Buffer de Fosfatos (PBS).	CV, DPV	DA	0.014 M	5,0 × 10 ⁻⁷ a 6,0 μ ⁶ M	Canevari y cols., 2013
Au-DT/MOA	Dilución de orina en Buffer Tris (TB), pH 7.4.	CV, DPV, Amperometría	DA	20nM	0,1 M a 5 M	Tsai y cols, 2013.
NiAl / LDH/GCE	Buffer de Fosfatos (PBS), pH 7.0	CV, DPV	DA 5-HT	7.38x10 ⁻⁸ M 7.13x10 ⁻⁸ M	0mM a 1mM 0mM a 0,2mM	Este trabajo
PdNiO/GCE	Buffer de Fosfatos (PBS), pH 7.0	CV, DPV	DA 5-HT	5.42μM 6.12x10 ⁻⁷	0mM a 1mM 0mM a 2mM	Este trabajo

Una vez realizado el análisis electroquímico de los materiales depositados sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo, NiAl / LDH y PdNiO, se eligió el material que mejor respuesta nos dio en cuanto a sensibilidad para la detección de DA y 5-HT. El material por el que se optó fue NiAl / LDH ya que presenta buena respuesta electroquímica exhibida por la combinación de NiAl con los hidróxidos dobles laminares en comparación con materiales plenamente metálico. Gracias a la presencia de grupos hidroxilo en las superficies de sus láminas y los aniones intercambiables permite un excelente intercambio electrónico con moléculas orgánicas. En trabajos posteriores, la excelente transferencia de electrones del material NiAl / LDH con DA y 5-HT podría permitir la determinación simultánea de

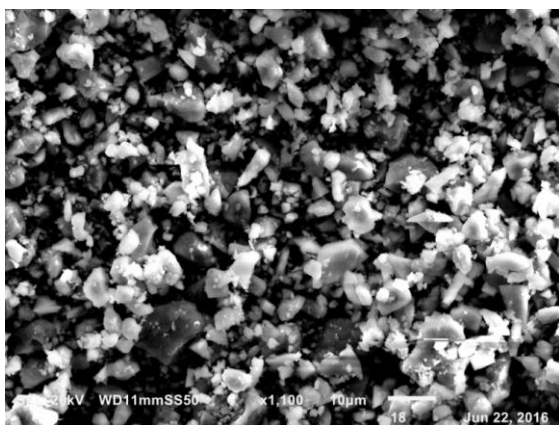
estos neurotransmisores con interferentes como Ácido Ascórbico y Ácido Úrico en una solución mezcla.

Obtenida una excelente respuesta del material NiAl / LDH en pruebas electroquímicas, por ser un material sólido, los HDLs pueden ser estudiados a través de distintas caracterizaciones fisicoquímicas para lograr conocer su composición, características y propiedades.

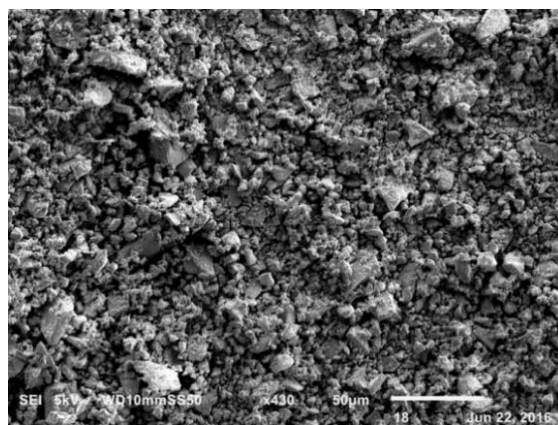
6.2 Caracterización Fisicoquímica del material NiAl / LDH

6.2.1 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB o SEM)

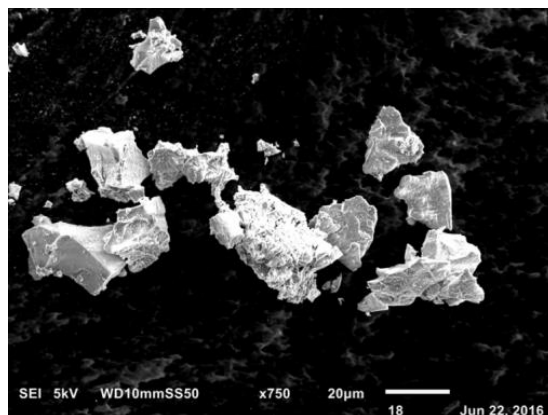
La morfología detectada por la interacción del haz de electrones el equipo en la superficie del material NiAl hidróxidos dobles laminares se muestra en la Figura 26, nos permite observar el diagrama de distribución, la forma, textura y composición de los diferentes compuestos por los que está formado el material



5 kV-x430



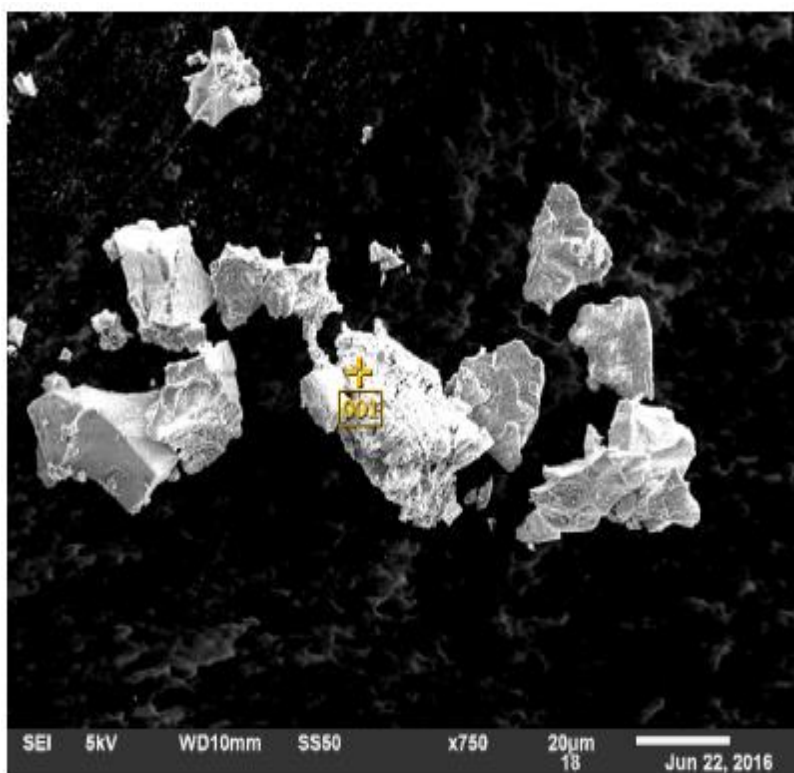
5 kV-x1100

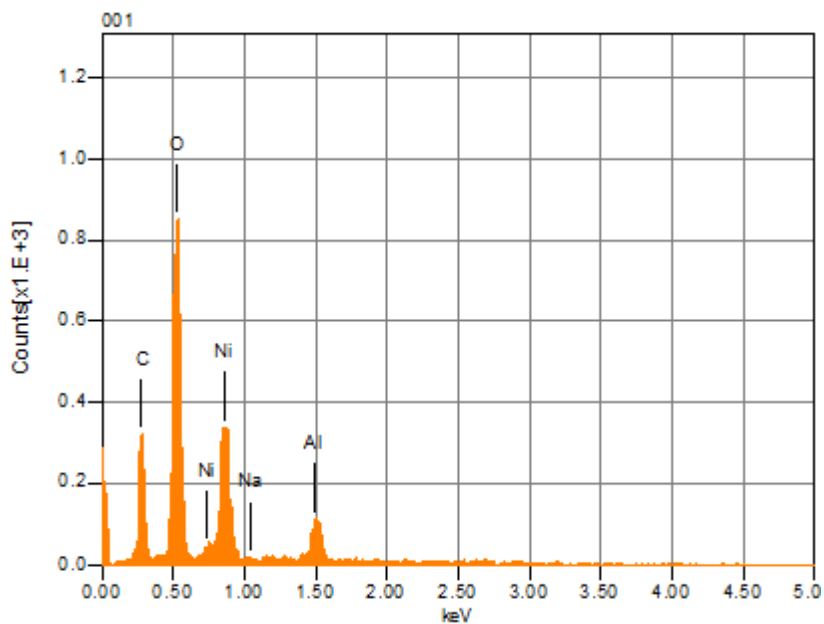


5 kV-x750

Figura 26. Imágenes de SEM del material seleccionado NiAl / LDH a 5kV a diferentes aumentos.

En la Figura 26 se observan diferentes acercamientos a la morfología del material NiAl / LDH, así mismo se exhibe la estructura de lámina con morfología muy similar a lo reportado por (Manríquez, y otros, 2015).





Compuesto	Masa (%)
C	36.16
O	45.26
Na	0.52
Al	3.85
Ni	14.21
Total	100.00

Figura 27. EDS del material

Se realizó un análisis de dispersión de energía (EDS) sobre la superficie del material, como se observa en la figura 27, proporcionando información adicional para el material compuesto. Se observaron grandes cantidades de Ni con respecto al Al, diversos autores (Babaei & Taheri, 2013) (Yu, y otros, 2014) (Yu, y otros, 2014) aseguran que el Ni funciona muy bien como material oxidante en biomoléculas. Las cantidades de carbón corresponden al material de la cinta conductora para el SEM. El oxígeno se atribuye al medio ambiente y las cantidades de Na al uso de NaOH en la síntesis para la regulación del pH (Abdolmohammad-Zadeh, Kohansal, & Sadeghi, 2011).

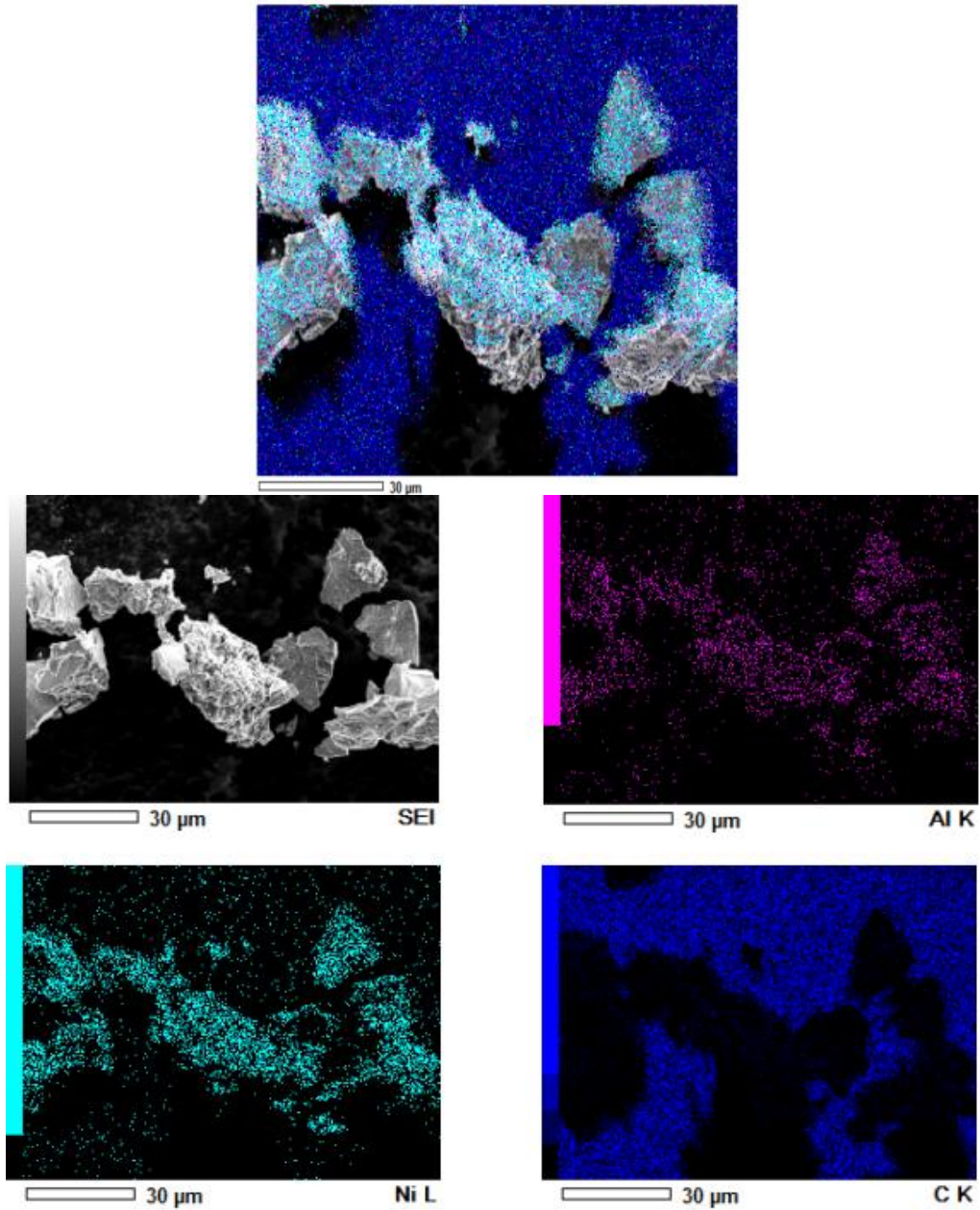


Figura 28. Mapeo del material NiAl LDH.

La figura 28 muestra un escaneo completo de la muestra, mostrando como se esperaba una mayor proporción de Níquel, seguido del Aluminio; se observa Carbón por la cinta conductora. Los mapeos de la figura 28 muestran la distribución de cada uno de los elementos presentes en el EDS.

6.2.2 Fluorescencia de Rayos X (XRF)

El material NiAl / LDH se sometió al análisis por XRF como se observa en la Figura 29. Se evaluó la composición de la superficie de los materiales como análisis elemental no destructivo. El análisis cuantitativo de muestras digeridas por el espectrómetro XRF permitió la cuantificación automática de los elementos en el material.

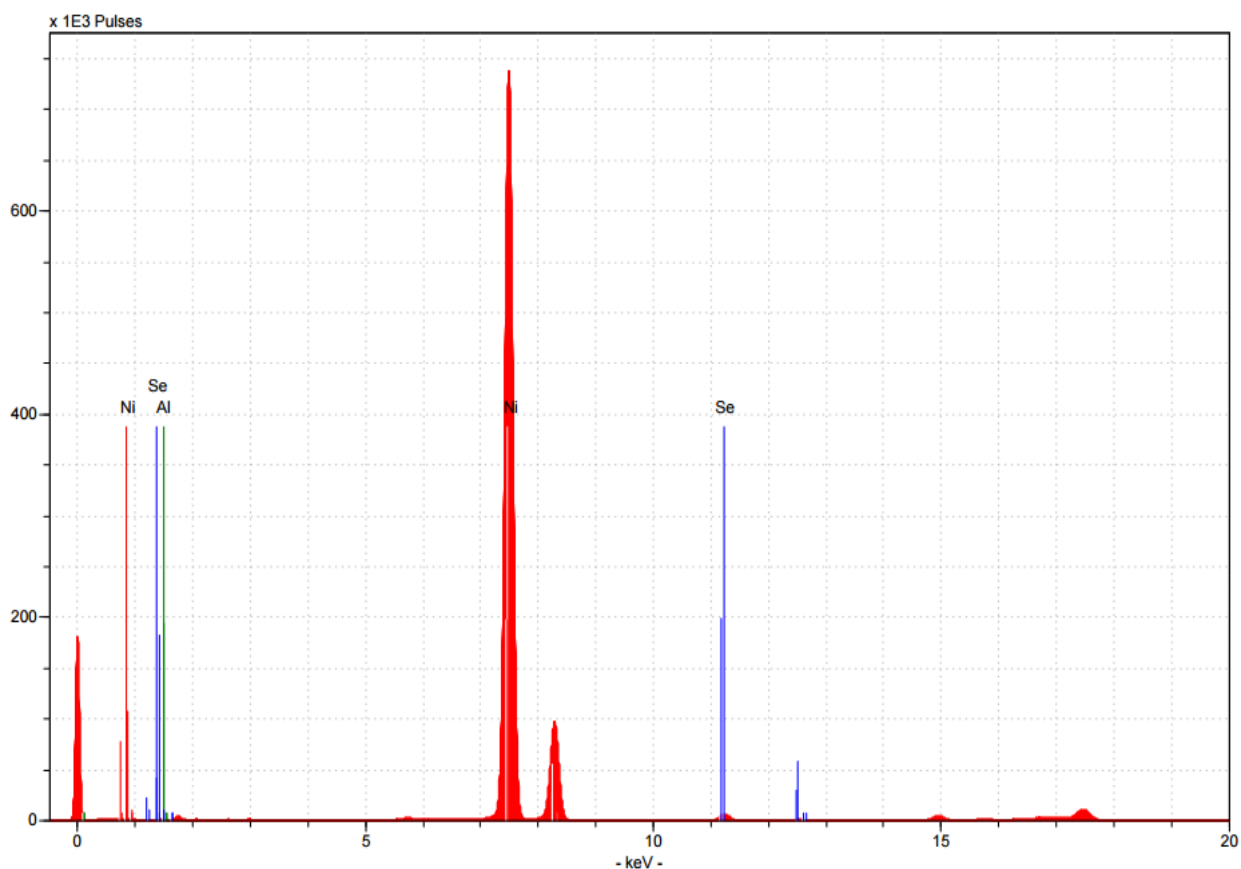


Figura 29. XRF del material NiAl LDH

Tabla 2. Análisis del material NiAl / LDH por Fluorescencia de Rayos X

Elemento	Concentración g/L	Sigma g/L	RSD / %	LLD g/L	Chi
Al	15.89	0.63	4.0	1.23	1.66
Ni	183.60	0.20	0.1	0.01	26654.64
Se (IS)	1.00	0.003	0.3	0.001	292.80

La presencia de Al y Ni provenientes de la síntesis NiAl / LDH se observa en la figura 29 y se comprueba en la tabla 2. Se observa que el Ni se encuentra en una concentración más alta que el Al, esto se debe a las cantidades colocadas en la síntesis de estos nanomateriales. Con las concentraciones obtenidas en esta técnica podemos comprobar lo analizado en el microscopio electrónico de barrido.

6.2.3 Difracción de Rayos X (XRD)

Una técnica indispensable para poder obtener información estructural es el XRD.

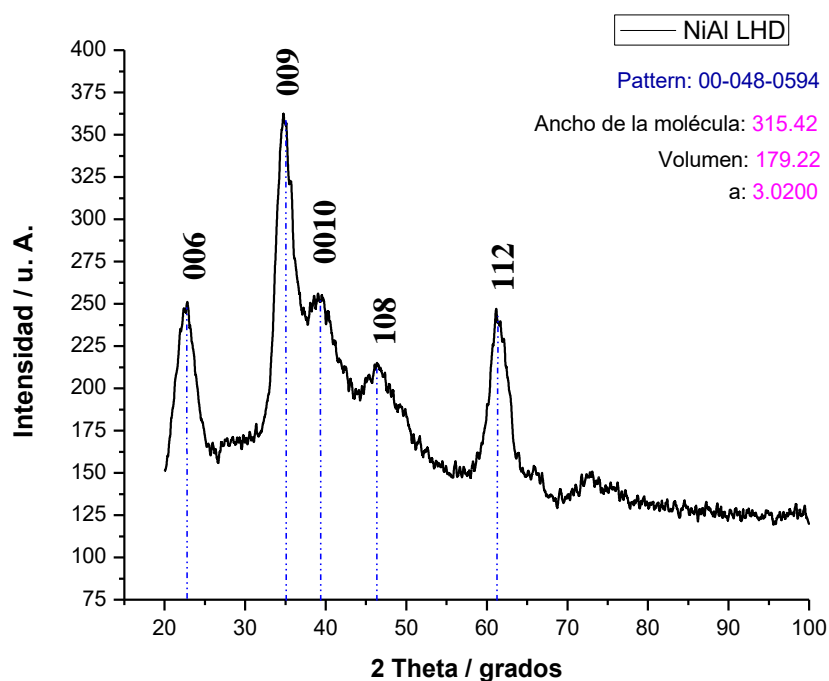


Figura 30. Patrón de difracción del material NiAl LDH.

El material corresponde a una estructura hexagonal característica de las arcillas anicónicas (Bringley & Morris, 2004) con parámetro de red de 3.02 y un volumen de 179.22 obtenidos por el equipo. Con la técnica XRD podemos observar como se observa en la figura 30 claramente los planos cristalinos y la orientación de los mismos.

De acuerdo a un perfil de difracción típico de un HDL propuesto por x, si el HDL es muy cristalino, podrán observarse reflexiones armónicas correspondientes a los planos (006), (009),..., (00n), siendo n un múltiplo de 3. En el patrón de difracción que obtuvimos en este trabajo (figura 30) se pueden observarse estas reflexiones armónicas lo cual nos indica que nuestro material presenta una buena cristalinidad. La calidad de apilamiento de las láminas se observa en las reflexiones encontradas alrededor de los 35 grados (2Theta), en el patrón observado en la figura 30 corresponde al plano (0010) (Marangoni, 2009).

Cuando un HDL se sintetiza con alta calidad cristalina, se puede observar en su perfil de difracción una o dos reflexiones después de los 60 grados (2Theta). Una de ellas, la reflexión (110), que en ocasiones puede aparecer acompañada por la reflexión (112) como se observa en la figura 30, lo cual equivale a la distancia entre los cationes metálicos dentro de las láminas y al parámetro de celda a. Con la distancia de este plano es posible verificar la relación catiónica M_{2+}/M_{3+} (Leroux, y otros, 2001) así como estimar el tamaño cristalino aplicando la ecuación de Scherrer (Couduna, Grillon, & Hochepped, 2006).

El tamaño de cristal se obtuvo a partir de esta técnica utilizando la fórmula de Debye Scherrer (Ecuación 1) obteniendo un tamaño de cristal de 41.1469nm

$$\tau = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Dónde:

- τ es el tamaño medio de los dominios ordenados (cristalina), que pueden ser más pequeño o igual que el tamaño de grano.
- K es un factor de forma adimensional, con un valor próximo a la unidad. El factor de forma tiene un valor típico de aproximadamente 0,9, pero varía con la forma real del cristalito.
- λ es la de rayos X de longitud de onda.

- β es la ampliación de la línea a la mitad del máximo de intensidad (FWHM), después de restar el ensanchamiento de la línea instrumental, en radianes. Esta cantidad también a veces se indica como $\Delta (2\theta)$.
- θ es el Bragg ángulo (en grados).

Con la caracterización fisicoquímica del material pudimos observar la conformación de nuestro material hidróxido doble laminar de aluminio y níquel detectando la presencia de Ni, Al y de los hidróxidos dobles laminares. De igual manera con las tres técnicas utilizadas obtuvimos su estructura tridimensional y sus propiedades físicas lo cual nos permitió comprobar que realmente existe una interacción entre la superficie de las láminas de Ni y Al con los neurotransmisores DA y 5-HT en las pruebas electroquímicas.

Una vez realizadas las pruebas fisicoquímicas del material NiAl / LDH y reafirmada una interacción entre la superficie del material y las moléculas orgánicas, para lograr el objetivo del diseño de un dispositivo electroquímico se trabajó con electrodos serigrafiados. Como se explicó en la sección de antecedentes, los electrodos serigrafiados sustituyen a la celda convencional de tres electrodos ya que esta pequeña tarjeta tiene integrada los tres electrodos requeridos para un análisis electroquímico.

6.3 Pruebas electroquímicas con electrodos serigrafiados de carbono.

Con el material seleccionado en las pruebas electroquímicas de media celda convencional, NiAl / LDH, se realizó la modificación en la superficie del electrodo de trabajo de los electrodos serigrafiados de carbono.

6.3.1 Respuesta Voltamperométrica de 5-HTyDA.

Las corrientes pico de oxidación de DA y 5-HT aumentaron correspondientemente conforme la concentración se incrementó en la solución amortiguadora PBS (pH 7.0) como se observa en la Figura 31. La oxidación de los neurotransmisores se analizó a través de la técnica DPV bajo una ventana de potencial de -0.1 V a 0.5 V vs Ag/AgCl para DA y de 0.1 a 0.5 V vs Ag/AgCl para 5-HT como se observa en la Figura 31 A y 31 B, respectivamente. Las condiciones de barrido se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones que en media celda convencional a una velocidad de barrido de 20 mVs^{-1} , una amplitud del pulso de 100mV, un periodo de pulso de 2000ms y un tiempo de reposo de 240s, descritas en la metodología. Podemos observar en la Figura 31 que los picos de oxidación tanto de DA y como de 5-HT corresponde a lo ya revisado en la literatura y comprobado a partir de pueblas electroquímicas en media celda convencional. Las determinaciones de Dopamina y Serotonina se realizaron por triplicado, sin ningún procedimiento de tratamiento, utilizando el método de diluciones a partir de la solución PBS 0.05M.

Se obtuvo una respuesta lineal entre la corriente de pico y la concentración de DA (Figura 31 A) $R^2 = 0.984$, en el intervalo de 0mM a 0.06mM ($s / n = 3$). Con respecto a la 5-HT (Figura 31 B), el rango lineal era de 0Mm a 0,1mM ($R^2 = 0.9742$), $s / n = 3$.

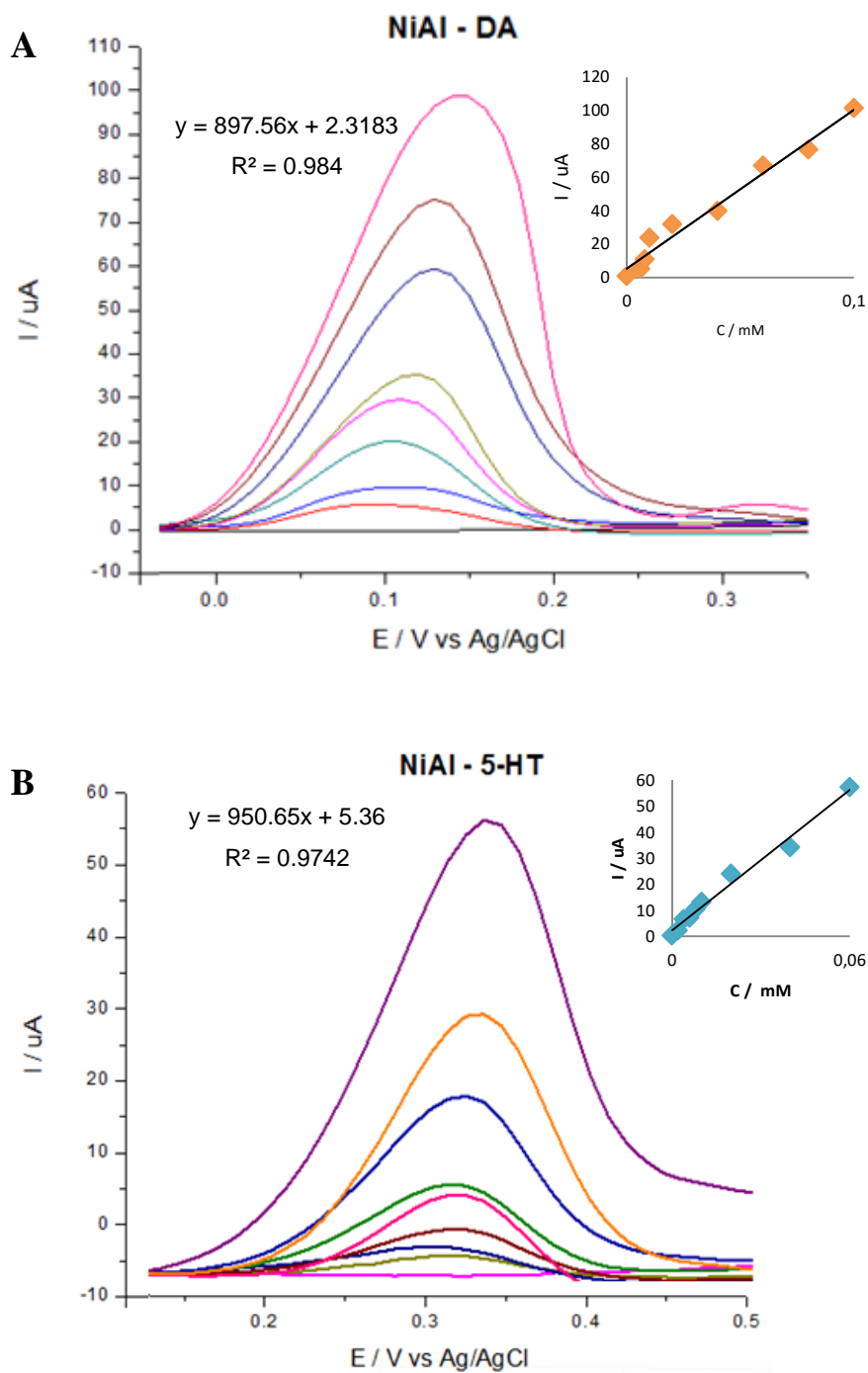


Figura 31. Voltamperogramas de pulso diferencial con electrodo serigrafado de carbono modificado en su superficie por NiAl / LDH en una solución PBS (0.05M, pH 7.0). (A) Curva de calibración correspondiente a concentraciones de DA de 0mM, 0.006mM, 0.008mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM, 0.06mM, 0.08mM y 0.1mM. (B) Curva de calibración correspondiente a concentraciones de 5-HT de 0mM, 0.002mM, 0.004mM, 0.006mM, 0.008mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM y 0.06mM.

A pesar de que la intensidad en los picos de oxidación disminuyó en comparación con las pruebas realizadas en media celda de tres electrodos convencional, lo cual puede deberse al cambio de material base en electrodo de trabajo, de carbón vítreo a carbono; estos resultados demuestran que el sensor de NiAl / LDH / C tiene una excelente respuesta a la oxidación de Dopamina y Serotonina en una solución buffer fosfatos (PBS) pH 7.0.

6.4 Evaluación del desempeño del dispositivo electrónico

Una vez analizadas concentraciones de DA y 5-HT afines a la oxidación con los electrodos serigrafiados en media celda convencional utilizando el potencióstato, se realizó la integración de un dispositivo electrónico con los electrodos serigrafiados para el análisis de DA y 5-HT en una solución amortiguadora de buffer fosfatos (PBS), pH 7, 0.

6.4.1 Programa

Se realizó un código de programación, mostrado en el Anexo 2, para la generación de un tren de pulsos que nos permitió simular la entrada de voltaje en base a una técnica DPV al electrodo serigrafiado. Se puede observar la incorporación en código de una modulación por ancho de pulsos (PWM, por sus siglas en ingles pulse-width modulation) para modificar el ciclo de trabajo de la señal senoidal.

El programa contiene los parámetros esenciales de una prueba DPV tales como velocidad de barrido, ancho del pulso, salto de pulso, ventana de trabajo. Este código es la base de programación en el dispositivo electroquímico para la detección de serotonina y dopamina in vitro.

6.4.1.1 Tren de Pulsos

Como se mencionó anteriormente, el tren de pulsos (figura 32) nos permitirá simular la entrada de voltaje en el electrodo serigrafiado, que es lo que realiza un potenciostato en una media celda convencional inyectar un voltaje en el electrodo de trabajo (WE) para generar la oxidación del analito.

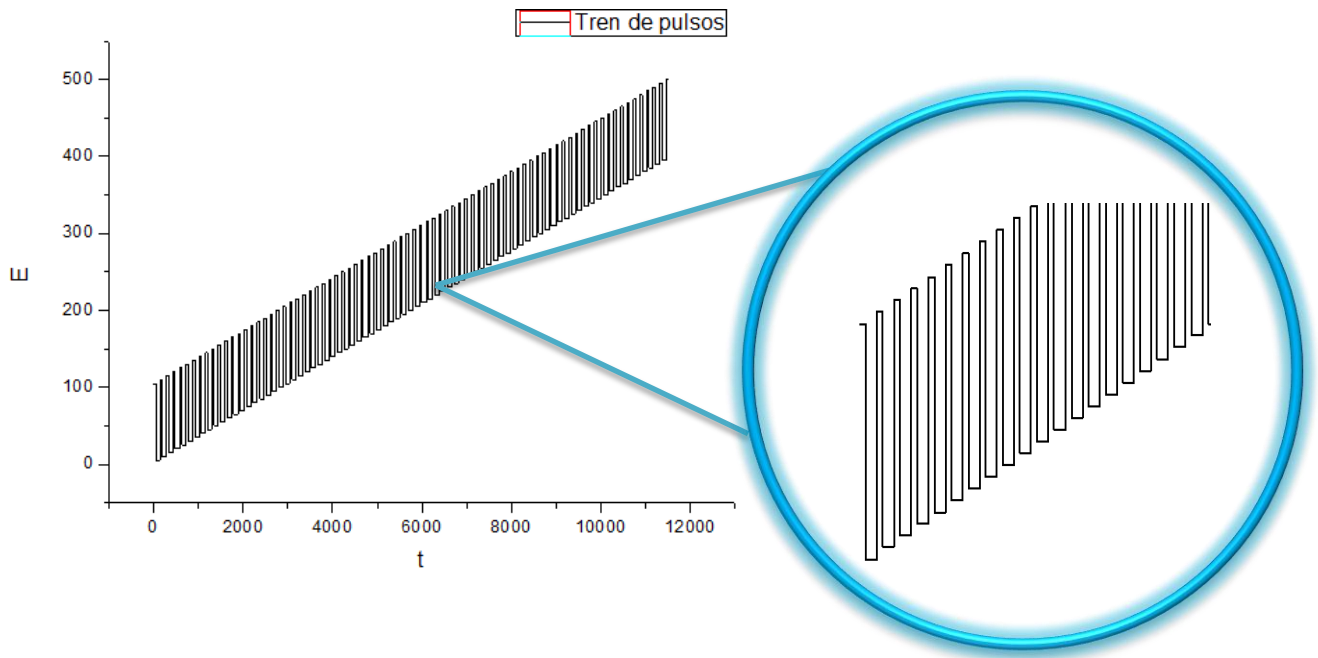


Figura 32. Tren de pulsos obtenido del código de programación

El ancho de pulso utilizado en el código de programación fue de 25, el salto de pulso de 95, velocidad de barrido de 50 y la ventana de trabajo de 0 a 12000.

6.4.2 Circuito electrónico

6.4.2.1 Arduino, DAC y lector de electrodos serigrafiados.

Como se mencionó anteriormente la programación se realizó en el dispositivo electrónico Arduino. La medición del tren de pulsos se realizó a partir de un osciloscopio, permitiéndonos ver que la resolución arrojada por el Arduino era muy pobre. Con este problema se optó por agregar un DAC con una

resolución de 12bits, mejorando después de la incorporación una señal más definida. Posteriormente se conectó el lector de electrodos serigrafados con entrada tipo USB unido a tres cables como salida: Referencia (R), Contraelectrodo (C) y Trabajo (W).

6.4.2.2 Convertidor Corriente-Voltaje

Después de la activación del pulso al electrodo serigrafado para que realicen la oxidación de DA o 5-HT, la salida del electrodo nos muestra un flujo de electrones (Corriente), como era de esperarse. Para que el Arduino pueda leer la señal obtenida de los electrodos, se realizó el cambio de corriente a voltaje utilizando un Convertidor.

Se realizó la búsqueda de un circuito amplificador, como se observa en la figura 33, con el que pudimos realizar las tres conexiones. El circuito encontrado con datasheet AN-1798, es un circuito especialmente diseñado para la fabricación de sensores con electrodos químicos. Su configuración está diseñada como un amplificador de transimpedancia que convierte la corriente obtenida por el electrodo de trabajo en una tensión.

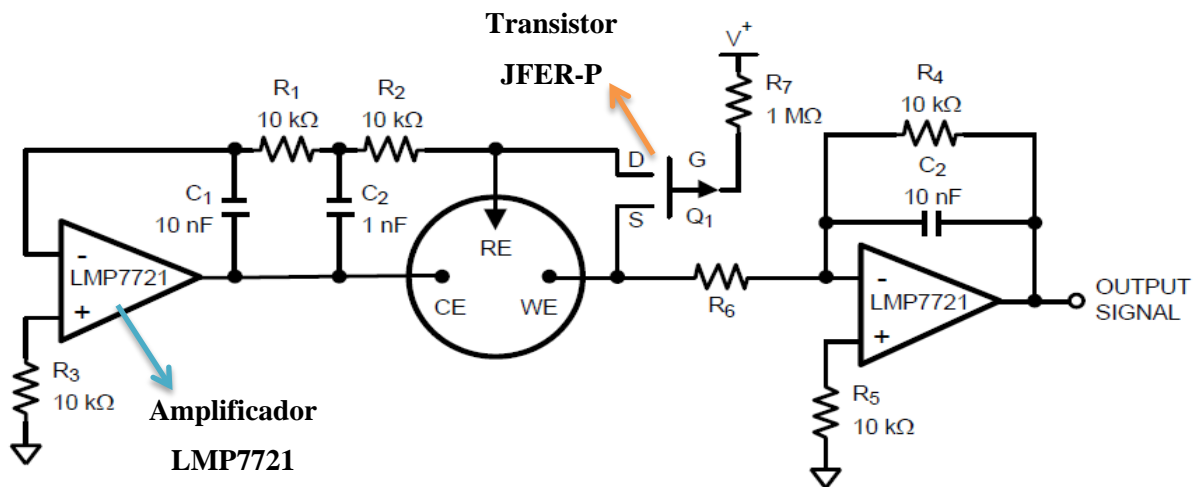


Figura 33. Circuito Pontenciostatico.

La ventaja de este circuito es que mantiene el voltaje entre el electrodo de referencia (RE) y el electrodo de trabajo (WE). Los electrones fluyen desde el electrodo de trabajo a través de la resistencia R6 en la entrada inversora del amplificador. El uso de amplificadores de baja precisión como el LMP7721 mejora el rendimiento del circuito permitiendo detectar concentraciones bajas de muestra con gran exactitud. El transistor JFET tipo P se utiliza como interruptor para evitar que el sensor se polarice cuando el circuito no tiene corriente. Si el sensor estuviera polarizado, tardaría mucho tiempo en estabilizarse en equilibrio. El JFET es sólo está activo cuando la alimentación está apagada y poniendo en cortocircuito al WE y RE para asegurar que el electrodo de trabajo se mantiene al mismo potencial que el electrodo de referencia (Texas Instruments, 2013).

6.4.3 Integración de circuitos electrónicos con electrodo serigrafiado modificado con NiAl / LDH

Una vez cargado el programa en el Arduino conectado con el DAC, el lector de electrodos serigrafiados y el convertidor corriente-voltaje como se observa en la figura 34, se realizaron las pruebas in vitro con los electrodos.

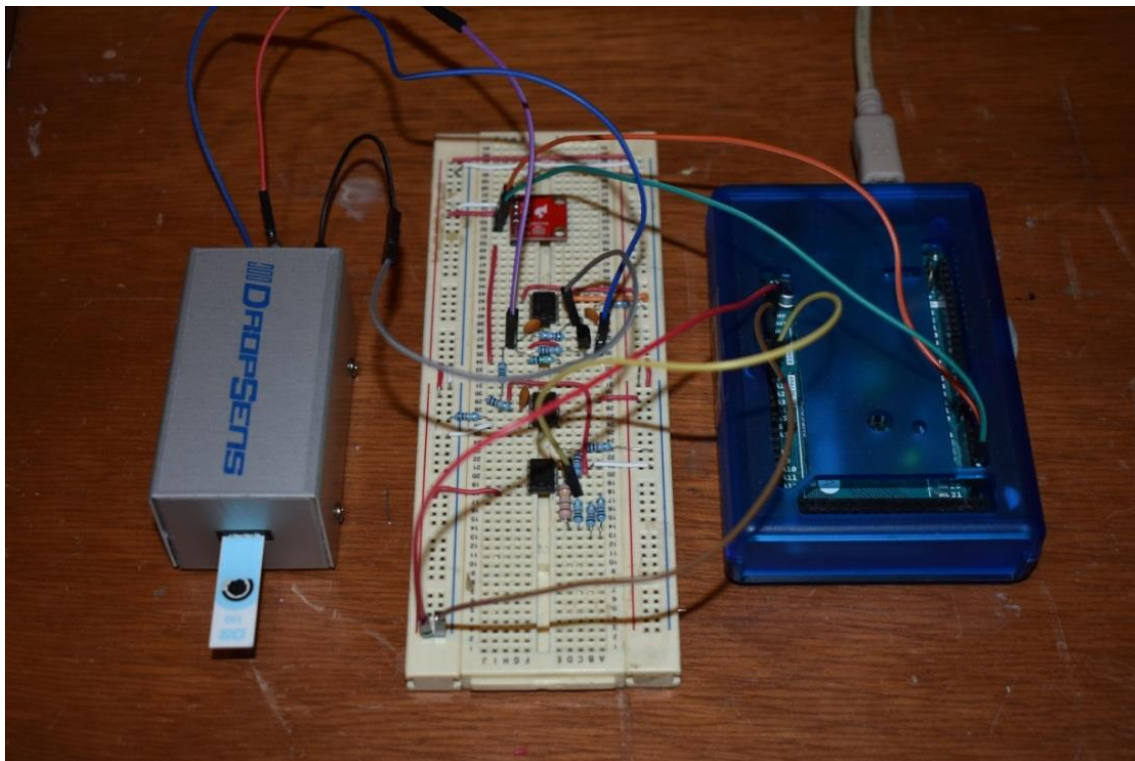


Figura 34. Integración de circuitos electrónicos con electrodos serigrafiados.

Por cuestiones de prueba, las conexiones del convertidor voltaje-corriente se realizaron en un protoboard antes de proceder a construir un circuito impreso. Como se observa en la imagen el electrodo serigrafiado modificado es conectado al lector para posteriormente colocar la muestra, como se define en la metodología, y realizar el análisis de oxidación.

6.4.4 Obtención de datos de la oxidación de DA y 5-HT.

Realizada la oxidación de la muestra con DA o 5-HT, el programa registro una serie de datos en el plano x, y mostradas en el anexo 3, los cuales posteriormente fueron analizados en el software Origin para generar las gráficas características de la técnica DPV (corriente contra voltaje).

6.4.5 Respuesta Voltamperométrica de 5-HT y DA con electrodos serigrafados en el circuito electrónico.

Se presentaron respuestas muy favorables como se observa en la figura 35, a pesar de que las corrientes pico de oxidación disminuyeron en comparación con las pruebas realizadas en el potenciostato y de que existió un ligero desplazamiento hacia potenciales negativos. Estos cambios en los picos de oxidación probablemente se deben a interferencias electrónicas como por ejemplo corrientes parasitas o falta instrumentación más precisa. Sin embargo este problema puede solventarse fácilmente con la creación de un circuito impreso.

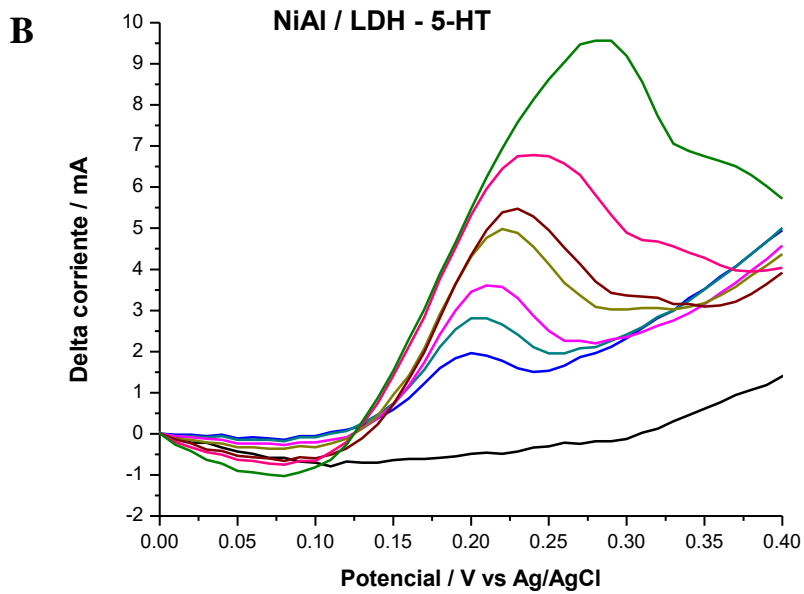
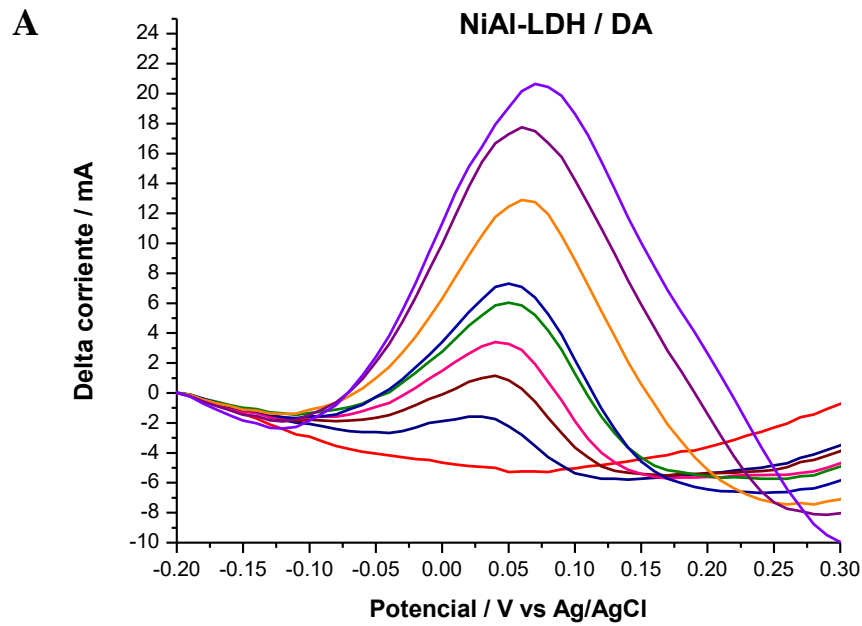


Figura 35. Voltamperogramas de Pulso Diferencial obtenidas a partir del circuito electrónico con electrodos serigrafados modificados con NiAl / LDH. (A) DPV para DA en PBS (pH 7.0) con concentraciones: 0mM, 0.006mM, 0.008mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM, 0.06mM 0.08mM y 0.1mM. (B) DPV para 5-HT en PBS (pH 7.0) con concentraciones: 0mM, 0.004mM, 0.006mM, 0.008mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM ya 0.06mM.

Las condiciones de barrido fueron colocadas en el código de programación: velocidad de barrido: 20mV s^{-1} , amplitud del pulso: 100mV , ancho del pulso: 100mV , salto de pulso: 50ms , ventana de trabajo: -0.2 V a 0.3V (vs Ag) para DA y 0V a 0.4V (vs Ag/AgCl) para 5-HT. Como se observa en la figura 35, las corrientes pico de oxidación de DA y 5-HT fueron aumentando conforme la concentración se aumentaba en la solución PBS (pH 7.0). Las determinaciones de Dopamina y Serotonina se realizaron por triplicado, sin ningún procedimiento de tratamiento previo, utilizando el método de diluciones para lograr las concentraciones deseadas.

7. ANEXOS

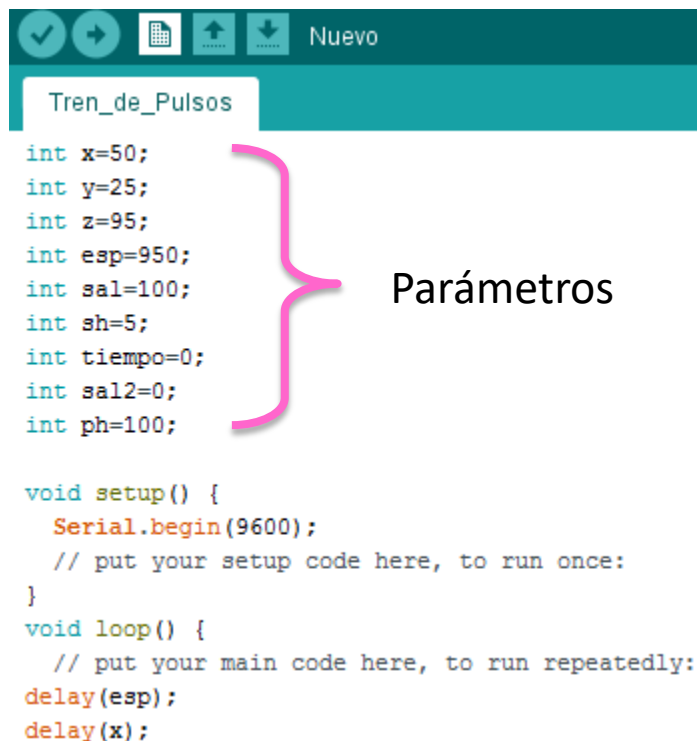
➡ Anexo 1

Síntesis del líquido iónico prótico (PIL)

El PIL se sintetizó a partir de una reacción simple ácido-base utilizando ácido fórmico como reactivo aniónico orgánico y etanolamina como reactivo catiónico orgánico, ambos reactivos fueron adquiridos por Sigma-Aldrich. Se colocó en una celda de vidrio 0.5M de etaloamina, posteriormente se añadió mediante una bomba de jeringa 0.5M de ácido fórmico a una velocidad de flujo de 12ml h⁻¹. Finalmente la celda se agitó magnéticamente bajo una atmosfera inerte con nitrógeno gaseoso a una temperatura de 4°C.

➡ Anexo 2

Código de programación para el circuito electrónico



```
Tren_de_Pulsos


int x=50;
int y=25;
int z=95;
int esp=950;
int sal=100;
int sh=5;
int tiempo=0;
int sal2=0;
int ph=100;


void setup() {
  Serial.begin(9600);
  // put your setup code here, to run once:
}
void loop() {
  // put your main code here, to run repeatedly:
  delay(esp);
  delay(x);
}
```

```

while (sal<=500) {
sal=sal+sh;
analogWrite(4, sal);
Serial.print(sal, DEC);
Serial.print("\t");
Serial.print(tiempo, DEC);
Serial.print("\n");
delay(300);
delay(x);
tiempo=tiempo+x;
Serial.print(sal, DEC);
Serial.print("\t");
Serial.print(tiempo, DEC);
Serial.print("\n");
delay(300);
sal2=sal-ph;
analogWrite(4, sal2);
Serial.print(sal2, DEC);
Serial.print("\t");
Serial.print(tiempo, DEC);
Serial.print("\n");
delay(300);
delay(z);
tiempo=tiempo+z;
Serial.print(sal2, DEC);
Serial.print("\t");
Serial.print(tiempo, DEC);
Serial.print("\n");
delay(300);
}
}

```

 Convertidor digital a análogo, pwm

 DEC, salida de los números en decimal

➡ Anexo 3

Datos de algunas concentraciones de DA y 5-HT obtenidos del Arduino después de la oxidación de los neurotransmisores

Dopamina

0 mM		0.006mM		0.008mM		0.01mM		0.02mM	
-0.39	2.385	-0.39	2.417	-0.39	2.674	-0.39	2.416	-0.39	2.794
-0.38	3.179	-0.38	1.929	-0.38	2.002	-0.38	1.744	-0.38	2.184
-0.37	3.362	-0.37	1.623	-0.37	1.667	-0.37	1.347	-0.37	1.817
-0.36	3.27	-0.36	1.349	-0.36	1.209	-0.36	0.859	-0.36	1.39
-0.35	2.843	-0.35	1.929	-0.35	1.117	-0.35	0.584	-0.35	1.085
-0.34	2.263	-0.34	2.814	-0.34	1.789	-0.34	0.493	-0.34	0.871
-0.33	1.744	-0.33	3.699	-0.33	2.765	-0.33	1.195	-0.33	1.177
-0.32	1.561	-0.32	4.278	-0.32	3.711	-0.32	2.232	-0.32	2.123
-0.31	1.256	-0.31	4.492	-0.31	4.139	-0.31	2.904	-0.31	2.916
-0.3	1.165	-0.3	4.584	-0.3	4.322	-0.3	3.362	-0.3	3.435
-0.29	1.134	-0.29	3.851	-0.29	3.803	-0.29	3.392	-0.29	3.313
-0.28	1.134	-0.28	2.783	-0.28	2.704	-0.28	2.141	-0.28	2.001
-0.27	1.073	-0.27	2.386	-0.27	2.338	-0.27	1.866	-0.27	1.695
-0.26	1.134	-0.26	2.081	-0.26	2.185	-0.26	1.683	-0.26	1.512
-0.25	1.104	-0.25	1.684	-0.25	1.85	-0.25	1.408	-0.25	1.268
-0.24	0.951	-0.24	1.227	-0.24	1.484	-0.24	1.073	-0.24	0.932
-0.23	0.798	-0.23	0.83	-0.23	1.026	-0.23	0.798	-0.23	0.749
-0.22	0.585	-0.22	0.525	-0.22	0.629	-0.22	0.554	-0.22	0.475
-0.21	0.371	-0.21	0.281	-0.21	0.324	-0.21	0.279	-0.21	0.261
-0.2	0.005	-0.2	0.006	-0.2	0.019	-0.2	0.005	-0.2	0.017
-0.19	-0.148	-0.19	-0.116	-0.19	-0.195	-0.19	-0.209	-0.19	-0.105
-0.18	-0.483	-0.18	-0.421	-0.18	-0.5	-0.18	-0.575	-0.18	-0.38
-0.17	-0.728	-0.17	-0.696	-0.17	-0.744	-0.17	-0.85	-0.17	-0.594
-0.16	-1.124	-0.16	-0.94	-0.16	-0.988	-0.16	-1.094	-0.16	-0.807
-0.15	-1.399	-0.15	-1.154	-0.15	-1.172	-0.15	-1.247	-0.15	-0.99
-0.14	-1.704	-0.14	-1.276	-0.14	-1.324	-0.14	-1.338	-0.14	-1.082

Serotonina

	0mM	0.004mM	0.006mM	0.008mM	0.01mM				
-0.17	2.441	-0.14	1.075	-0.14	1.194	-0.14	1.591	-0.14	1.805
-0.16	2.227	-0.13	0.984	-0.13	1.102	-0.13	1.378	-0.13	1.653
-0.15	1.952	-0.12	0.892	-0.12	1.011	-0.12	1.2255	-0.12	1.531
-0.14	2.166	-0.11	0.77	-0.11	0.858	-0.11	1.134	-0.11	1.47
-0.13	1.891	-0.1	0.801	-0.1	0.889	-0.1	1.134	-0.1	1.47
-0.12	1.464	-0.09	0.709	-0.09	0.797	-0.09	1.0424	-0.09	1.348
-0.11	1.189	-0.08	0.618	-0.08	0.675	-0.08	0.8898	-0.08	1.1345
-0.1	1.006	-0.07	0.557	-0.07	0.553	-0.07	0.7677	-0.07	1.0124
-0.09	0.701	-0.06	0.435	-0.06	0.461	-0.06	0.6457	-0.06	0.8598
-0.08	0.548	-0.05	0.404	-0.05	0.431	-0.05	0.5846	-0.05	0.7377
-0.07	0.487	-0.04	0.313	-0.04	0.278	-0.04	0.432	-0.04	0.5241
-0.06	0.487	-0.03	0.251	-0.03	0.248	-0.03	0.3405	-0.03	0.402
-0.05	0.426	-0.02	0.19	-0.02	0.1871	-0.02	0.2794	-0.02	0.3105
-0.04	0.426	-0.01	0.16	-0.01	0.1565	-0.01	0.1879	-0.01	0.2189
-0.03	0.304	0	0.007	0	0.004	0	0.0048	0	0.0053
-0.02	0.213	0.01	-0.023	0.01	-0.0571	0.01	-0.0563	0.01	-0.1168
-0.01	0.091	0.02	-0.023	0.02	-0.0571	0.02	-0.0868	0.02	-0.1473
1.39E-17	-1.00E-03	0.03	-0.054	0.03	-0.0876	0.03	-0.1173	0.03	-0.2083
0.01	-0.062	0.04	-0.023	0.04	-0.0571	0.04	-0.1478	0.04	-0.2388
0.02	-0.215	0.05	-0.115	0.05	-0.1486	0.05	-0.2394	0.05	-0.3304
0.03	-0.215	0.06	-0.084	0.06	-0.1486	0.06	-0.2394	0.06	-0.3304
0.04	-0.337	0.07	-0.115	0.07	-0.1486	0.07	-0.2394	0.07	-0.3609
0.05	-0.428	0.08	-0.145	0.08	-0.1792	0.08	-0.2699	0.08	-0.3609
0.06	-0.489	0.09	-0.054	0.09	-0.0876	0.09	-0.2088	0.09	-0.2999
0.07	-0.581	0.1	-0.054	0.1	-0.0876	0.1	-0.2088	0.1	-0.3304
0.08	-0.581	0.11	0.038	0.11	0.004	0.11	-0.1478	0.11	-0.2388

8. CONCLUSIONES

Del trabajo de investigación realizado se puede concluir que ambos NiAl / LDH y PdNiO depositados tanto en el electrodo de carbón vítreo como en el electrodo serigrafado demostraron una muy buena actividad electrocatalítica en la oxidación de DA y 5-HT en solución buffer fosfatos (PBS) pH 7.0. Ambos materiales pudieron detectar bajas concentraciones de DA y 5-HT en el rango de mM, obteniendo una buena relación lineal entre el pico de oxidación y la concentración, además de alcanzar un bajo límite de detección: $6.12 \times 10^{-7} \text{M}$ para 5-HT y $5.42 \mu\text{M}$ para DA. Por tanto, el dispositivo electroquímico ha demostrado ser prometedor para la detección de DA y 5-HT con muchas propiedades deseables, incluyendo, un buen intervalo lineal, bajo límite de detección y tiempo de respuesta rápido para DA y 5-HT.

El material que se seleccionó por sus propiedades electroquímicas tales como oxidación, sensibilidad y selectividad fue NiAl / LDH, ya que al contar con grupos hidroxilo en las superficies de sus láminas y aniones intercambiables permitieron un mejor intercambio electrónico con los neurotransmisores DA y 5-HT. Esto se demuestra al observar los DPVs ya que en comparación con PdNiO se observa siempre una mayor intensidad en los picos de oxidación de las moléculas.

Los electrodos serigrafados modificados con NiAl / LDH presentaron también en la evaluación electroquímica una muy buena interacción entre los electrones de la superficie del electrodo y los neurotransmisores al observar una relación lineal entre la oxidación y la concentración a pesar de que las corrientes pico de oxidación de DA y 5-HT disminuyeron al realizar la oxidación de las moléculas

Gracias al facilidad de manejo y rápido tiempo de muestreo de electrodos serigrafados en esta investigación se logró desarrollar un dispositivo

electroquímico capaz de detectar concentraciones de DA y 5-HT de manera in vitro para un diagnóstico de enfermedades a edad temprana.

El dispositivo tiene la capacidad de realizar la detección de niveles de serotonina y dopamina en orina ya que los niveles alcanzados en las pruebas electroquímicas con electrodos serigrafiados permiten observar que se alcanzó la detección de DA en buffer PBS pH 7.0 de 0.003mM y para 5-HT en buffer PBS pH 7.0 de 0.001mM, que son las concentraciones encontradas en orina real. Como perspectiva realizar pruebas con interferentes tales como el ácido ascórbico y ácido úrico, permitirán demostrar su viabilidad como elemento sensor de manera in situ.

Modificaciones en la integración electrónica puede ayudar al incremento de corriente para la detección de concentraciones de DA y 5-HT aún más bajas o altas que las presentadas en este trabajo para soluciones biológicas reales.

9. REFERENCIAS

(s.f.).

Abbaspour, A., & Noori, A. (2011). A cyclodextrin host-guest recognition approach to an electrochemical sensor for simultaneous quantification of serotonin and dopamine. *Biosens. Bioelectron*, 26, 4674–4680.

Abdolmohammad-Zadeh, H., Kohansal, S., & Sadeghi, G. (2011). Nickel–aluminum layered double hydroxide as a nanosorbent for selective solid-phase extraction and spectrofluorometric determination of salicylic acid in pharmaceutical and biological samples. *Talanta*, 207, 368-373.

Ahlman, H., Bhargaba, H. N., Dahlstrom, A., Larsson, I., Newson, B., & Petterson, G. (1981). On the presence of serotonin in the gut lumen and possible release mechanisms. *Acta. Physiol. Scand.*, 112, 263-269.

Albella, J. M., Cintas, A. M., Miranda, T., & Serratos, J. M. (1993). *Introducción a la Ciencia de Materiales*. Madrid: CSIC.

Amit, K. D., Sudipto, D., Partha, K., Shounak, R., Bibhotosh, A., & Papu, B. (2014). Non-enzymatic amperometric sensing of hydrogen peroxide at a CuS modified electrode for the determination of urine H₂O₂. *Electrochim. Acta*, 144, 282-287.

Anithaa, A. C., Asokan, K., & Sekar, C. (2017). Highly sensitive and selective serotonin sensor based on gamma ray irradiated tungsten trioxide nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.*, 238, 667–675.

Anithaa, A. C., Asokan, K., & Sekar, C. (2017). Highly sensitive and selective serotonin sensor based on gamma ray irradiated tungsten trioxide nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.*, 238, 667-675.

- Babaei, A., & Taheri, A. (2013). Nafion/Ni(OH)₂ nanoparticles-carbon nanotube composite modified glassy carbon electrode as a sensor for simultaneous determination of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid. *Sens. Actuators B*, *176*, 543–551.
- Bahena Trujillo, R., Flores, G., & Arias Montaña, J. A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Biomed*, *11*, 39-60.
- Benedetto, G., Fico, D., Pennetta, A., Malitesta, C., Nicolardi, G., Lofrumento, D., . . . Pesa, V. (2014). A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *98*, 266-270.
- Bertrand, P. (2004). Real-time detection of serotonin release from enterochromaffin cells of guinea pig ileum. *Neurogastroenterol. Motil.*, *16*, 511-514.
- Bosquet, C. L., Rodriguez, F. M., Bielsa, I. R., Mila, M., Bruis, S. A., & Conesa, J. C. (2004). Differential diagnosis of parkinsonism using dopamine transporters brain SPECT. *Med. Clin.*, *122*, 325-328.
- Breisch, S., Zemlan, F., & Hoebel, B. (1976). Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science*, *192*, 382-385.
- Bringley, J., & Morris, C. (2004). *Patente n° 7,312,252*. New York (US).
- Bülbring, E., & Crema, A. (1959). The release of 5-hydroxytryptamine in relation to pressure exerted on the intestinal mucosa. *J. Physiol*, *146*, 18-28.
- Cai, H. L., Zhu, R. H., & Li, H. D. (2010). Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid

- chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 396, 103-111.
- Callister-D, W. J. (2007). *Ciencia e Ingeniería de los Materiales I*. Barcelona: Reverté.
- Cano Luna, M. (Noviembre de 2008). Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras. (S. d. Córdoba, Ed.) Córdoba.
- Carvalho, V. (2012). The coming of age of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the endocrinology laboratory. *J. Chromatogr. B.*, 883, 50-58.
- Castillo-Ortega, M., Rodríguez, D., & Encinas, J. (2002). Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline–poly(n-butyl methacrylate) composites. *Sens. Actuators B.*, 85(1-2), 19-25.
- Cesarino, I., Galesco, H. V., & Machado, S. (2014). Determination of serotonin on platinum electrode modified with carbon nanotubes/polypyrrole/silver nanoparticles nano hybrid. *Mat. Sci. Engin. C*, 40, 49–54.
- Cesarino, I., Galesco, H., & Machado, S. (2014). Determination of serotonin on platinum electrode modified with carbon nanotubes/polypyrrole/silver nanoparticles nano hybrid. *Mat. Scien. Engin. C*, 40, 49-54.
- Chen, L. X., Zheng, J. N., Wang, A. J., Wu, L. J., Chen, J. R., & Feng, J. J. (2015). Facile synthesis of porous bimetallic alloyed PdAg nanoflowers supported on reduced graphene oxide for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. *Analyst*, 140, 3183–3192.
- Cook, I. A. (2008). Biomarkers in psychiatry: potentials, pitfalls and pragmatics. *Primary Psychiatry*, 15, 54-59.

- Cooper, J. R., Bloom, F. E., & Roth, R. H. (1996). *The biochemical basis of neuropharmacology*. New York: Oxford.
- Corsi, M. (2004). *Aproximaciones de las neurociencias a la conducta* (2 ed.). México, D. F.: El Manual Moderno.
- Cortes-H., H. F., Martinez-Yepes, P. N., & Valencia, H. A. (2006). *Fundamentos de Cristalografía*. Colombia: Armenia, Quindío.
- Couduna, C., Grillon, F., & Hochepped, J. (2006). Surfactant effects on pH-controlled synthesis of nickel hydroxides. *Colloids Surfaces A*, 280, 23–31.
- Cun, W., Ruo, Y., Yaqin, C., Shihong, C., Fangxin, H., & Meihe, Z. (2012). Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan on gold nanoparticles/overoxidized polyimidazole composite modified glassy carbon electrode. *Ana. Chimic. Acta*, 74, 15-20.
- Davidson, D. (1987). Urinary free catecholamines diagnostic application of an HPLC technique to the investigation of neural crest tumours. *Ann. Clin. Biochem*, 24, 494-509.
- Durstewitz, D., Kelc, M., & Güntürkün, O. (1999). A neurocomputational theory of the dopaminergic modulation of working memory functions. *J. Neurosci.*, 19, 2807-2822.
- Ejaz, A., Joo, Y., & Jeon, S. (2017). Fabrication of 1,4-bis(aminomethyl)benzene and cobalt hydroxide @ graphene oxide for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and serotonin. *S. Actuators B Chem.*, 240, 297–307.

- Él, W., Ding, Y., Zhang, W., Ji, L., Xin, Z., & Yang, F. (2016). A highly sensitive sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on ultra-small Ni nanoparticles. *J. Electroanal. Chem.*, 775, 205–211.
- Ensafi, A. A., Taei, M., Khayamian, T., & Arabzadeh, A. (2010). Highly selective determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly (sulfonazo III) modified glassy carbon electrode. *Sens. Actuators B Chem.*, 147, 213–221.
- ershon, M. (1999). Roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 13, 15-30.
- Ferraris, J., Cowan, D., Walatka, V., & Perlstein, J. (1973). Electron transfer in a new highly conducting donor-acceptor complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 95(3), 948-949.
- Francis, R., Pickerodt, P., Salewski, L., Boemke, W., & Hohne, C. (2010). Detection of catecholamines and metanephrines by radio-immunoassay in canine plasma. *Vet. J.*, 183, 228-231.
- Freund, T. F., Powell, J. F., & Smith, A. (1984). Tyrosine hydroxylase immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci.*, 13, 1189-1215.
- Gerrig, R., & Zimbardo, P. (2005). *Psicología y vida* (17 ed.). Stanford: Pearson Educación.
- Gershon, M. (1999). Roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 13, 15-30.
- Gershon, M. (2004). Serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 20, 3-14.

- Gershon, M., Drakontides, A., & Ross, L. (1965). Serotonin: synthesis and release from the myenteric plexus of the mouse intestine. *Science*, *149*, 197-199.
- Golapan, A., Lee, K., Mahnesh, K., Santhosh, P., Kim, J., & Kang, J. (2007). Electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid at a novel gold nanoparticles distributed poly(4-aminothiophenol) modified electrode. *Talanta*, *71*, 1774-1781.
- Gonon, F., Buda, M., & Pujol, J. (1984). Measurements of Neurotransmitter. Release in Vivo. *Wiley Chichester*, 153-167.
- Göpel, W., & Zemel, J. (1991). *Sensors. A comprehensive Survey*. (Vol. 2). W.VCN.
- Gosetti, E., Mazzucco, M., & Gennaro, E. (2013). Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC–MS/MS. *Anal. Bio. Anal. Chem.*, *405*, 907-916.
- Greco, S., Danysz, W., Zivkovic, A., Gross, R., & Stark, H. (2013). Microdialysate analysis of monoamine neurotransmitters a versatile and sensitive LC–MS/MS method. *Anal. Chim. Acta.*, *771*, 65-72.
- Gronstad, K., Magistris, L., Dahlstron, A., Nilsson, O., Price, B., Zinner, M., . . . Ahlman, H. (1985). The effects of vagal nerve stimulation on endoluminal release of serotonin and substance P into the feline small intestine. *Scand. J. Gastroenterol*, *20*, 163-169.
- Gunaratna, P., Cadle, K., & Kissinger, C. (2006). An improved liquid chromatographic method with electrochemical detection for direct determination of serotonin in microdialysates from Caudate-putamen and pineal gland regions of rat brain. *J. Neuro. Methods*, *155*, 143-148.

- Han, H. P., Lee, H. K., Usted, J. M., Jeong, H., & Jeon, S. (2014). Electrochemical biosensor for simultaneous determination of dopamine and serotonin based on electrochemically reduced GO-porphyrin. *Sens. Actuators B*, *190*, 886-895.
- Hardcastle, J., Hardcastle, P. T., Klaren, P., Taylor, C. J., & White, S. J. (1999). The action of 5-hydroxytryptamine on normal and cystic fibrosis mouse colon: effects on secretion and intracellular calcium. *J. Pharmacol.*, *51*(4), 449-456.
- Hernández-Albañil, H., & Espejo-Mora, E. (2002). *Mécanica de fractura y análisis de falla*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Hoffmann, T., Schröder, K., Zacheja, J., & Binder, J. (1996). Fluid Characterization using sensor elements based on interdigitated electrodes. *Sen. Actuators B*, *37*, 37-42.
- Hu, G., Ma, Y., Guo, Y., & Shao, S. (2008). Electrocatalytic oxidation and simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid on the gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta.*, *53*, 6610–6615.
- Hull, E., Lorrain, D., Du, J., & Matuszewich, L. (1999). Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav Brain Res.*, *105*, 105-116.
- Iizuka, H., Ishige, T., Ohta, Y., & Yajima, T. (s.f.). Simultaneous Determination of 5-Hydroxyindoles and Catecholamines by Hplc with Fluorometric Precolumn Derivatization. *Advan. Experi. Medicine Biology*, *467*, 821-826.
- Jacobs, B., & Fornal, C. (1993). 5-HT and motor control: a hypothesis. *Trends Neurosci.*, *16*, 346-352.
- Janata, J. (2001). Centennial Retrospective on Chemical Sensors. *Anal. Chem.*, *73*(5), 150-153.

- Janata, J., Josowicz, M., & DeVaney, D. (1994). Chemical Sensors. *Anal. Chem.*, *66*(12), 207R-228R.
- Jia, D., Dai, J., Yuan, H., Lei, L., & Xiao, D. (2011). Selective detection of dopamine in the presence of uric acid using a gold nanoparticles poly(luminol) hybrid film and multi-walled carbon nanotubes with incorporated-cyclodextrin modified glassy carbon electrode. *Talanta*, *85*, 2344-2351.
- Kagedal, B., & Godstein, D. S. (1988). Catecholamines and their metabolites. *J. Chromatogr*, *429*, 177-233.
- Kalimuthu, P., & A., J. S. (2009). Selective electrochemical sensor for folic acid at physiological pH using ultrathin electropolymerized film of functionalized thiadiazole modified glassy carbon electrode. *Biosens. Bioelectron*, *24*, 3575–3580.
- Kannan, P., & John, S. A. (2009). Determination of nanomolar uric and ascorbic acids using enlarged gold nanoparticles modified electrode. *Anal. Biochem.*, *386*, 65–72.
- Katzy, E., & Willner, I. (2003). Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. *Electroanalysis*, *15*(11), 913-947.
- Kim, S. K., Kim, D., & Jeon, S. (2012). Electrochemical determination of serotonin on glassy carbon electrode modified with various graphene nanomaterials. *Sens. Actuators B*, *174*, 285–291.
- Kovac, A., Somikova, Z., Zika, N., & Novak, M. (2014). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of panel of neurotransmitters in cerebrospinal fluid from the rat model for tauopathy. *Talanta*, *119*, 284-290.

- Leroux, F., Adachi-Pagano, M., Intissar, M., Chauvière, S., Forano, C., & Besse, J. (2001). Delamination and restacking of layered double hydroxides. *J. Mater. Chem.*, *11*, 105-112.
- Li, J., & Lin, X. (2007). Simultaneous determination of dopamine and serotonin on gold nanocluster/overoxidized-polypyrrole composite modified glassy carbon electrode. *Sens. Actuators B Chem.*, *124*, 486–493.
- Li, J., & X., L. (2007). Simultaneous determination of dopamine and serotonin on gold nanocluster/overoxidized polypyrrole composite modified glassy carbon electrode. *Sens. Actuators B.*, *124*, 486-493.
- Liu, L., Li, Q., Li, N., Ling, J., Liu, R., Wang, Y., . . . Bi, K. (2011). Simultaneous determination of catecholamines and their metabolites related to Alzheimer's disease in human urine. *J. Sep. Sci.*, *34*, 1198-1204.
- Liu, Y., Huang, J., Hou, H., & You, T. (2008). Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid with electrospun carbon nanofibers modified electrode. *Electrochem. Commun.*, *10*, 1431–1434.
- Lu, H., Yu, J., Wang, J., Wu, L., Xiao, H., & Gao, R. (2016). Simultaneous quantification of neuroactive dopamine serotonin and kynurenine pathway metabolites in gender-specific youth urine by ultra performance liquid chromatography tandem high resolution mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *122*, 42-51.
- Lu, L. M., Zhang, L., Qu, F. L., Lu, H. X., Zhang, X. B., Wu, Z. S., . . . Yu, R. Q. (2009). A nano-Ni based ultrasensitive nonenzymatic electrochemical sensor for glucose: enhancing sensitivity through a nanowire array strategy. *Biosens. Bioelectron.*, *25*, 218–223.

- Manrriquez, M. E., Hernández-Cortez, J. G., Wang, J. A., Chen, L. F., Zuñiga-Moreno, A., & Gómez, R. (2015). Synthesis of transition metal doped lamellar double hydroxides as base catalysts for acetone aldol condensation. *Applied Clay Sci.*, *118*, 188–194.
- Mantell, C. L. (2003). *Ingeniería Electro-Química*. Barcelona: Reverté, S. A.
- Mao, Y., Bao, Y., Gan, S., Li, F., & Niu, L. (2011). Electrochemical sensor for dopamine based on a novel graphene-molecular imprinted polymers composite recognition element. *Biosen. Bioelec.*, *28*, 291-297.
- Marangoni, R. (2009). Materiais multifuncionais obtidos a partir da intercalação de corantes anionicos em hidróxidos duplos e hidroxissais lamelares e dispersos em polímeros. *Tesis de doctorado*.
- Martín Velasco, A., & Gonzalez Alvarez, F. J. (1988). *Compendio de Psiconeurofarmacología*. Madrid: Diaz de Santos, S. A.
- Martínez, D., & Carbajal, G. (2012). Hidróxidos dobles laminares: arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *Avances en Química*, *7*(1), 87-99.
- Mashige, F., Matsushima, Y., Miyata, C., Yamada, R., Kanazawa, H., Sakuma, I., . . . Nakahara, K. (1995). Simultaneous determination of catecholamines, their basic metabolites and serotonin in urine by high-performance liquid chromatography using a mixed-mode column and an eight-channel electrochemical detector. *Biomed. Chrom.*, *9*, 221-225.
- McCall, R., & G., A. (1979). Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain Research*, *169*, 11-27.

- McMorris, T., Swain, J., Smith, M., Corbett, J., Delves, S., Sale, C., . . . Potter, J. (2006). Heat stress plasma concentrations of adrenaline, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and cortisol, mood state and cognitive performance. *Int. J. Psychophysiol*(61), 204-215.
- McNeil, C. J., Athey, D., Ball, M., Ho, W. O., Krause, S., Armstrong, R. D., . . . Rawson, K. (1995). Electrochemical sensors based on impedance measurement of enzyme-catalysed polymer dissolution: Theory and applications. *Anal. Chem.*, 67, 3928-3935.
- Meenakshi, S., Devi, S., Pandian, K., Devendiran, R., & Selvaraj, M. (2016). Sunlight assisted synthesis of silver nanoparticles in zeolite matrix and study of its application on electrochemical detection of dopamine and uric acid in urine samples. *Mat. Sci. Eng. C*, 69, 85-94.
- Milazzo, M. (2004). Radiation applications in art and archaeometry X-ray fluorescence applications to archaeometry. Possibility of obtaining non-destructive quantitative analyses. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B*, 213, 683–692.
- Moriarty, M., Lee, A., O'Connell, B., Kelleher, A., Keeley, H., & Furey, A. (2011). Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic disorder. *Anal. Bioanal. Chem.*, 40, 2481-2493.
- Myers, D. (2005). *Psicología* (7 ed.). New York: Médica Panamericana.
- Numan, A., Mehmood, M. S., Omar, F. S., Ramesh, K., & Ramesh, S. (2017). Facile fabrication of cobalt oxide nanograin-decorated reduced graphene oxide composite

- as ultrasensitive platform for dopamine detection. *Sens. Actuators B Chem.*, 238, 1043-1051.
- Ortíz, R., Martínez, Y., & Hernández, R. (2006). *Web del Profesor*. Obtenido de Técnicas Electroanalíticas, parte II: Voltamperometría : http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/rmhr/Index_archivos/GuiAIV2.pdf
- Páez, X., Hernández, L., & Baptista, T. (2003). Avances en la terapéutica molecular de la depresión. *Neurology*, 37(5), 459-700.
- Pan, H., & Gershon, M. (2000). Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J. Neurosci.*, 20, 3295-3309.
- Panholzer, T., Beyer, J., & Lichtwald, K. (1999). Coupled-column liquid chromatographic analysis of catecholamines, serotonin, and metabolites in human urine. *Clin. Chem.*, 45, 262-268.
- Patel, B., Arundell, M., Parker, K., Yeoman, M. S., & O'Hare, D. (2005). Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chrom. B.*, 818, 269-276.
- Patrick, H. (2005). *Los aminoácidos, alfabeto de la mente y del estado de ánimo*. En *Nutrición óptima para la mente*. Barcelona: Robinbook.
- Pravda, M., Jungar, C. M., Iwuoha, E. I., Smyth, M. R., Vytras, K., & Ivaska, A. (1995). Evaluation of amperometric glucose biosensors based on co-immobilisation of glucose oxidase with an osmium redox polymer in electrochemically generated polyphenol films. *Anal. Chimic.*, 304(2), 127-138.

- Raleigh, M., McGuire, M., Brammer, G., & Pollak, D. (1991). Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male velvet monkeys. *Brain Res.*, *559*, 181-190.
- Rand, E., Periyakaruppan, A., Tanaka, Z., Zhang, D. A., Marsh, M. P., Andrews, R. J., . . . Koehne, J. E. (2013). A carbon nanofiber based biosensor for simultaneous detection of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid. *Biosens. Bioelectron.*, *42*, 434-438.
- Rand, E., Periyakaruppan, A., Tanaka, Z., Zhang, D., Marsh, M. P., Andrewz, R., . . . Koehne, J. (2013). A carbon nanofiber based biosensor for simultaneous detection of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid. *Biosen. Bioelec.*, *42*, 434-438.
- Rao, N. P., & Remington, G. (2013). Investigational drugs for schizophrenia targeting the dopamine receptor: phase II trials. *Expert Opin. Investig. Drugs*, *22*, 881-894.
- Ristic, L. (1994). *Sensor technology and devices*. Boston: Artech House.
- Roy, V., Merali, Z., Poulter, M., & Anisman, H. (2007). Anxiety responses, plasma corticosterone and central monoamine variations elicited by stressors in reactive and nonreactive mice and their reciprocal F1 hybrids. *Behav. Brain Res.*, *185*, 49-58.
- Sadock, V. A., Sadock, B. J., & Kaplan, H. I. (2005). *Comprehensive textbook of psychiatry* (8 ed.). Comprehensive textbook of psychiatry: Lippicontt Williams & Wilkins.
- Sakaguchi, Y., Yoshida, H., Hayama, T., Itoyama, M., Todoroki, K., Yamaguchi, M., & Nohta, H. (2011). Selective liquid-chromatographic determination of native fluorescent biogenic amines in human urine based on fluoruous derivatization. *J. Chromatogr A.*, *121*, 5581-5586.

- Saller, C., & Stricker, E. (1976). Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7 dihydroxytryptamine. *Science*, *192*, 385-387.
- Salvador, M., Rodriguez-Yoldi, M. C., Alacalde, A., & Rodriguez, M. J. (1997). 5-HT receptor subtypes involved in the serotonin-induced inhibition of L-leucine absorption in rabbit jejunum. *Life Sci.*, *61*, 309-318.
- Shahrokhian, S., & Zare-Mehrjardi, H. R. (2007). Cobalt salophen-modified carbon-paste electrode incorporating a cationic surfactant for simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid and dopamine. *Sens. Actuators B Chem.*, *121*, 530–537.
- Shervedani, R. K., Karevan, M., & Amini, A. (2014). Prickly nickel nanowires grown on Cu substrate as a supersensitive enzyme-free electrochemical glucose sensor. *Sens. Actuators B Chem.*, *204*, 783–790.
- Singh, B., Laffir, F., McCormac, T., & Dempsey, E. (2010). PtAu/C based bimetallic nanocomposites for non-enzymatic electrochemical glucose detection. *Sens. Actuators B Chem.*, *150*, 80–92.
- Soloman, S. (1998). *Sensors Handbook*. New York: McGraw-Hill.
- Stetter, J. R., Penrose, W. R., & Yao, S. (2003). Sensors, Chemical Sensors, Electrochemical Sensors, and ECS. *J. Electrochem. Soc.*, *150*, S11-S16.
- Stradiotto, N., Yamanaka, H., & Zanoni, M. (2003). Electrochemical Sensors: A Powerful Tool in Analytical Chemistry. *J. Braz. Chem. Soc.*, *14*(2), 159-173.
- Tamir, H., Kupsky, W. J., Huang, Y., & Gershon, M. (1983). Serotonin-binding of rat platelets. *J Cell Sci*, *62*, 439.
- Texas Instruments. (Mayo de 2013). *AN-1798*.

- Thevenot, D., Toth, K., Durst, R., & Wilson, G. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biose. Bioelec.*, 63(1-2), 121-131.
- Tohgi, H., Abe, T., Takahashi, S., Ueno, M., & Nozaki, Y. (1990). Cerebrospinal fluid dopamine, norepinephrine, and epinephrine concentrations in Parkinson's disease correlated with clinical symptoms. *Adv. Neurol.*, 53, 277-282.
- Turner, A. K. (1987). *Biosensor: fundamentals and applications*. New York: O. U. Press.
- Uzunoglu, A., Scherbath, D., & Stanciu, A. (2015). Bimetallic PdCu/SPCE non-enzymatic hydrogen peroxide sensors. *Sens. Actuators B: Chem.*, 220, 968-976.
- Vallone, D., Picetti, R., & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosc. Biobehav.*, 24, 125-132.
- Vuorensola, K., Sirén, H., & Karjalainen, U. (2003). Determination of dopamine and methoxycatecholamines in patient urine by liquid chromatography with electrochemical detection and by capillary electrophoresis coupled with spectrophotometry and mass spectrometry. *J. Chrom. B.*, 788, 277-289.
- Wade, P., Tamir, H., Kirchgessner, A., & Gershon, M. (1994). Analysis of the role of 5-HT in the enteric nervous system using anti-idiotypic antibodies to 5-HT receptors. *Am. J. Physiol.*, 266, 3-16.
- Wang, J., Liu, W., Mitsui, K., & Tsurugi, K. (2001). Evidence for the involvement of the GTS1 gene product in the regulation of biological rhythms in the continuous culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccha. Genome*, 489(1), 81-86.
- Wang, L., Chen, X., & Yang, W. (2016). Non-enzymatic acetylcholine electrochemical biosensor based on flower-like NiAl layered double hydroxides decorated with carbon dots. *Sens. Actuators B: Chem.*, 233, 199-205.

- Wei, B., Li, Q., Fan, R., Su, D., Chen, X., Jia, Y., & Bi, K. (2014). Determination of monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in rat brain samples by UFLC–MS/MS for the study of the sedative-hypnotic effects observed during treatment with *S. chinensis*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *88*, 416-422.
- Weiger, W. (1997). Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, *72*, 61-95.
- Westermann, J., Hubl, W., Kaiser, N., & Salewski, L. (2002). Simple, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay, compared with HPLC method. *Clin. Lab.*, *48*, 61-71.
- White, S., Fung, S., Jackson, D., & Imel, K. (1996). Serotonin, norepinephrine and associated neuropeptides: effects on somatic motoneuron excitability. *Prog. Brain Res.*, *107*, 183-199.
- Wilmore, J., & Costill, D. (2007). *Fisiología del esfuerzo y del deporte* (6 ed.). Barcelona: Paidotribo.
- Winterer, G., & Weinberger, D. (2004). Genes dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. *Trends Neurosci.*, *27*, 683-690.
- Xu, H., Xiao, J., Yan, L., Zhu, L., & Liu, B. (2016). An electrochemical sensor for selective detection of dopamine based on nickel tetrasulfonated phthalocyanine functionalized nitrogen-doped graphene nanocomposites. *J. Electroanal. Chem.*, *779*, 92–98.
- Xue, C., Wang, X., Zhu, W., Han, Q., Zhu, C., Hong, J., . . . Jiang, H. (2014). Electrochemical serotonin sensing interface based on double-layered membrane of

- reduced graphene oxide/polyaniline nanocomposites and molecularly imprinted polymers embedded with gold nanoparticles. *Sens. Actuators B*, *196*, 57–63.
- Yao, H., Sun, Y., Lin, X., Tang, Y., & Huang, L. (2007). Electrochemical characterization of poly(eriochrome black T) modified glassy carbon electrode and its application to simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid. *Electrochim. Acta*, *52*, 6165–6171.
- Yerga, M. D. (23 de Marzo de 2012). *Curiosidades de un químico soñador*. Obtenido de Electroodos serigrafiados como plataforma analítica: <https://quimicosonador.wordpress.com/2012/03/23/electrodos-serigrafiados-como-plataforma-analitica/>
- Yoshitake, T., Fujino, K., Kehr, J., Ishida, J., Nohta, H., & Yamaguchi, M. (2003). Simultaneous determination of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. *Anal. Biochem.*, *312*, 125-133.
- Young, S. (2007). How to increase serotonin in the human brain without drugs. *J. Psychiatr. Neurosci.*, *32*, 394-399.
- Yu, H. C., Huang, X. Y., Lei, F., Tan, X. C., Wei, Y. C., & Li, H. (2014). Molecularly imprinted electrochemical sensor based on nickel nanoparticle-modified electrodes for phenobarbital determination. *Electrochim. Acta.*, *141*, 45–50.
- Zagatto, E., & Sá, S. (2003). The Development of Analytical Chemistry in Brazil: Retrospective and Expectations. *J. Braz. Chem. Soc.*, *14*(2), 153-158.

- Zangrossi, H., Viana, M., Zanoveli, J., & Bueno, C. (2001). Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25, 637-645.
- Zhao, L., Zhu, S., & Zhou, J. (2012). A novel amperometric nitric oxide sensor based on imprinted microenvironments for controlling metal coordination. *Sens. Actuators B Chem.*, 171-172, 563–571.
- Zhong, Y., Shi, T., Liu, Z., Cheng, S., Huang, Y., Tao, X., . . . Tang, Z. (2016). Ultrasensitive non-enzymatic glucose sensors based on different copper oxide nanostructures by in-situ growth. *Sens. Actuators B.Chem.*, 236, 326-333.
- Zhong, Y., Zhang, C., & Wang, G. (2010). Effects of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptamine 2A/2C agonist on the genioglossus activity and sleep apnea in rats. *Chin. Med. J.*, 123, 2094-2098.
- Zhou, L., Wang, S., Tian, K., Dong, Y., & Hu, Z. (2007). Simultaneous determination of catecholamines and amino acids by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J. Sep. Sci.*, 30, 110-117.