



Superficies de carbón vítreo modificadas con compuestos orgánicos y nanopartículas de oro como sensores de dopamina

Sabino Menolasina*, Maria Isabel De Oliveira, Carlos Travieso

Laboratorio de Investigaciones Electroquímicas, Departamento de Análisis y Control,
Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, 5101, Venezuela.

(*) sabino@ula.ve

Recibido: 19/09/2013

Revisado: 28/11/2013

Aceptado: 16/12/2013

Resumen

El comportamiento de dos sensores electroquímicos construidos a partir de superficies de carbón vítreo modificadas electroquímicamente con sustancias orgánicas, tales como tiourea (TIO) y quitosano (QUIT) y nanopartículas de oro (AuNPs) fue investigado en solución buffer acetato pH = 6,7 + dopamina (DA) + ácido ascórbico (AA) + ácido úrico (AU), empleando las técnicas: voltamperometría cíclica (VC) y voltamperometría de onda cuadrada (VOC). Ambos sensores mostraron una alta selectividad y sensibilidad hacia la DA en presencia de los interferentes AA y AU como resultado de la atracción electrostática que ejercen las AuNPs sobre la forma protonada de la DA. Con el sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV, en presencia de AA y AU 100 μM , se obtuvo un límite de detección de 0,15 μM de DA y una sensibilidad de 70.000 $\mu\text{A mM}^{-1}$ mientras que con el sensor electroquímico AuNPs-QUIT/CV en presencia de AA y AU 100 μM el límite de detección fue de 0,08 μM y una sensibilidad de 74.220 $\mu\text{A mM}^{-1}$.

Palabras clave: Ácido Ascórbico; Ácido Úrico; Dopamina; Nanopartículas de oro; Sensor electroquímico

Abstract

The electrochemical behavior of two electrochemical sensors constructed from glassy carbon surfaces electrochemically modified with organic substances, such as thiourea (TIO) and chitosan (QUIT) and gold nanoparticles (AuNPs) was investigated in acetate buffer solution pH = 6.7 + dopamine (DA) + ascorbic acid (AA) + uric acid (AU), using the techniques: cyclic voltamperometry (CV) and square wave voltamperometry (VOC). Both sensors showed high selectivity and sensitivity to the DA in the presence of AA and UA interferences as a result of electrostatic attraction exerted by the AuNPs on the protonated form of DA. With the electrochemical sensor AuNPs/TIO/ CV, in the presence of AA and UA 100 μM , a detection limit of 0.15 μM DA and a sensitivity of 70,000 $\mu\text{A mM}^{-1}$ was obtained whereas with the AuNPs-QUIT/CV electrochemical sensor in the presence of 100 μM AA and UA the detection limit was 0.08 μM and a sensitivity of 74,220 $\mu\text{A mM}^{-1}$.

Keywords: Ascorbic acid; Uric acid; Dopamine; Gold nanoparticles; Electrochemical sensor

Introducción

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos y es por ello que es de gran interés médico y farmacológico. Cambios en la concentración de este neurotransmisor en ciertas regiones del cerebro pueden dar origen a una variedad de enfermedades, tales como, la enfermedad de Parkinson¹, esquizofrenia² y epilepsia³. Este neurotransmisor es una sustancia que se oxida fácilmente y es por esta razón que existe en la literatura una gran variedad de artículos referentes a su oxidación⁴⁻⁶. Sin embargo la determinación electroquímica de DA es complicada debido a la interferencia de varias sustancias

como el AA y AU presentes en el medio donde ella se oxida. Estas sustancias se encuentran presente en grandes concentraciones y se oxidan a potenciales cercanos al propio potencial de oxidación de la dopamina^{1,2}. Para incrementar la selectividad en la detección de la DA se han desarrollado muchos métodos relacionados con el pretratamiento y modificación de superficies electrónicas para tal fin^{4-6,7,8}.

En la última década se han desarrollado sensores voltamperométricos para la determinación de DA basados en electrodos metálicos, como oro y óxidos de estaño e indio modificados químicamente para soportar a las AuNPs^{9,10}.

Recientemente se han desarrollado sensores electroquímicos modificando superficies de carbón vítreo (SCV) con sustancias químicas que actúan como soporte de las AuNPs. Las superficies electródicas de carbón vítreo son biocompatibles con una gran cantidad de sustancias electroactivas de interés médico y farmacológico. Además, estas superficies ofrecen una baja corriente residual en un amplio intervalo de potencial y un sin fin de posibilidades en la formación de enlaces covalentes con una gran variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas¹¹⁻¹³.

En el presente trabajo, se describe la preparación y el comportamiento electroquímico de dos sensores electroquímicos basados en AuNPs, el sensor AuNPs/TIO/CV, en el cual las AuNPs fueron soportadas sobre una superficie de carbón vítreo previamente modificada con tiourea y el sensor AuNPs-QUIT/CV, en donde las AuNPs y el QUIT fueron electrodepositados simultáneamente sobre la superficie electródica de carbón vítreo. Ambos sensores fueron utilizados para la cuantificación de DA en presencia de altas concentraciones de AA y AU.

Parte experimental

Reactivos

La dopamina (DA), el ácido ascórbico (AA) y el ácido úrico (AU) fueron suministrados por Fluka, la tiourea (TIO) por Merck, el quitosano (QUIT) de viscosidad 20000 cps por Aldrich y el ácido tetracloro úrico por Merck. El agua utilizada fue de calidad Milli Q 18 M Ω (Millipore, Milford, MA, USA). Todos los reactivos fueron utilizados sin ningún tratamiento adicional de purificación. Soluciones stock de DA, AA y AU fueron preparadas en agua desionizada de 18 M Ω .cm. Soluciones de más baja concentración de estos iones fueron preparadas por dilución de las soluciones stock con agua desionizada de 18 M Ω .cm.

Síntesis de AuNPs

Método I: la formación de AuNPs se llevó a cabo a partir de la reducción química del ácido tetracloro úrico en presencia de citrato de sodio como agente reductor tal como fue expuesto en el trabajo desarrollado por Cai *et al.*¹⁴; la disolución de oro coloidal formada fue almacenada en un recipiente de color ámbar a 4°C.

Método II: las AuNPs fueron formadas por reducción del ácido tetracloro úrico (5% p/p) en presencia de QUIT (0,2% p/p) sobre la superficie electródica de carbón vítreo a un potencial de -2,5 V por 150 segundos.

Aparatos

Los experimentos por VC y VOC se realizaron en un potencióstato/galvanostato Autolab PGSTAT12 y una

celda de vidrio de un compartimiento y tres electrodos. Un electrodo de Ag/AgCl (sat) fue utilizado como electrodo de referencia y un alambre de platino como electrodo secundario. Como electrodos de trabajo se utilizaron, electrodos de disco de carbón vítreo (CV), ($d = 3\text{mm}$) sin modificar y modificados con TIO/AuNPs y AuNPs-QUIT.

Los experimentos de UV-visible fueron realizados en un espectrofotómetro UV/VIS JEWAY empleando una celda plástica de 1cm de espesor.

El tamaño y forma de las AuNPs fue investigada con un microscopio de electrónico de transmisión, marca Hitachi, modelo H7000.

Tratamiento de las SCV

Las SCV fueron pulidas con diferentes grados de alúmina (0,3 y 0,05 μm) provenientes de la Buehler usando agua desionizada como lubricante. Posterior a dicha limpieza mecánica, dichas superficies fueron sometidas a una limpieza electroquímica por VC en una solución 0,1 M HClO₄ aplicando un determinado número de barridos cíclicos entre -0,2 V y 1,7 V. Una vez que las SCV fueron tratadas siguiendo los pasos descritos anteriormente se procedió a caracterizarlas electroquímicamente y a realizar las distintas modificaciones sobre sus superficies con la finalidad de desarrollar los sensores electroquímicos utilizados en el presente trabajo:

Sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV: la electrodeposición de tiourea sobre la superficie de CV se hizo siguiendo el procedimiento descrito por Chai *et al.*¹⁵. El electrodo de CV una vez tratado por limpieza electroquímica es modificado con TIO, aplicándole un barrido de potencial por VC entre -0,8 a 1,5 V a una velocidad de 0,1 V/s por diez ciclos. Durante este proceso ocurre la oxidación de la tiourea permitiendo que uno de los grupos amino que posee interactúe con los grupos funcionales presentes en la superficie de carbón vítreo permitiendo así su adsorción electroquímica. Posteriormente se procede a colocar sobre la SCV modificada con TIO, 15 μL de una mezcla coloidal de AuNPs, a la cual se le aplica aire frío hasta que el solvente de la mezcla se evapore. Posteriormente esta SCV modificada fue activada por VC en solución buffer fosfato pH = 6,7 antes de ser utilizada como sensor electroquímico de DA en presencia de AA y AU.

Sensor electroquímico AuNPs/QUIT/CV: la electrodeposición simultánea de QUIT y AuNPs sobre la SCV se llevó a cabo en una mezcla de quitosano (0,2% p/p) y ácido tetracloroúrico (5% p/p) en una relación 1/1 aplicando un potencial de -2,5V por 150 s siguiendo el procedimiento descrito por Yang *et al.*¹⁶. La SCV modificada se lava con agua desionizada y se activa por

VC en solución buffer fosfato pH = 6,7 antes de ser utilizada como sensor electroquímico de DA.

Resultados y discusión

Caracterización del tamaño de las AuNPs

Las técnicas de espectroscopia UV-visible y microscopia electrónica de transmisión (TEM) permitieron caracterizar el tamaño y forma de las nanopartículas de oro sintetizadas. La figura 1A muestra el espectro obtenido con una alícuota de las AuNPs sintetizadas por reducción del ácido tetracloro áurico con citrato, la aparición de un máximo de absorción a 525 nm, es característico de AuNPs con un tamaño de 16 a 20 nm, de acuerdo a los resultados reportados en la literatura¹⁴. La figura 1B muestra la imagen obtenida por TEM de las AuNPs sintetizadas, observándose que presentan una forma irregular y un tamaño promedio de $18,2 \pm 2,1$ nm.

Sensor electroquímico AuNP/TIO/CV

En la figura 2A se muestra el comportamiento electroquímico del electrodo de CV sin modificación

química, modificado con TIO, y del sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV en una solución buffer fosfato pH = 6,7. Se observa que la respuesta electroquímica del sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV se incrementa con respecto a la respuesta electroquímica de los otros electrodos. Este comportamiento es atribuido a un aumento de la actividad electroquímica del electrodo, tal vez debido a que se hace más rugoso aumentando su área superficial. La estabilidad del sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV fue probada ciclándolo varias veces en solución buffer fosfato pH = 6,5, observándose reproducibilidad de la respuesta electroquímica del sensor electroquímico. Esta estabilidad es atribuida a que la película TIO electrodepositada sobre la superficie de CV presenta grupos aminos con carga parcial positiva que permiten que las AuNPs se puedan adsorber por atracción electrostática.

La figura 2B muestra las respuestas electroquímicas del electrodo de CV sin modificación química y del sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV en solución buffer fosfato pH = 6,7 + DA (0,1 mM) en presencia de AA (0,1 mM) y AU (0,1 mM).

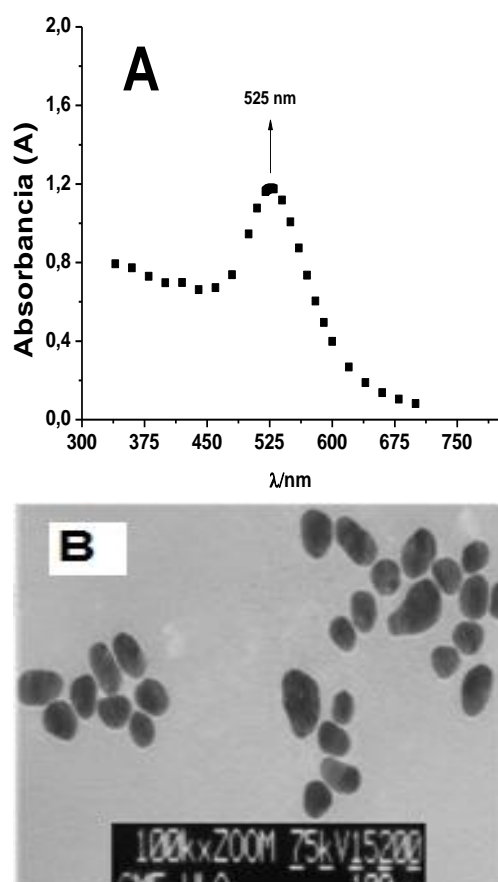


Fig. 1: A) Espectro UV/VIS de una mezcla colooidal de oro en medio acuoso (espectrofotómetro UV/VIS JEWAY y celda plástica de 1 cm de espesor). B) Imagen de AuNPs de oro obtenidas por TEM de las síntesis con citrato de sodio.

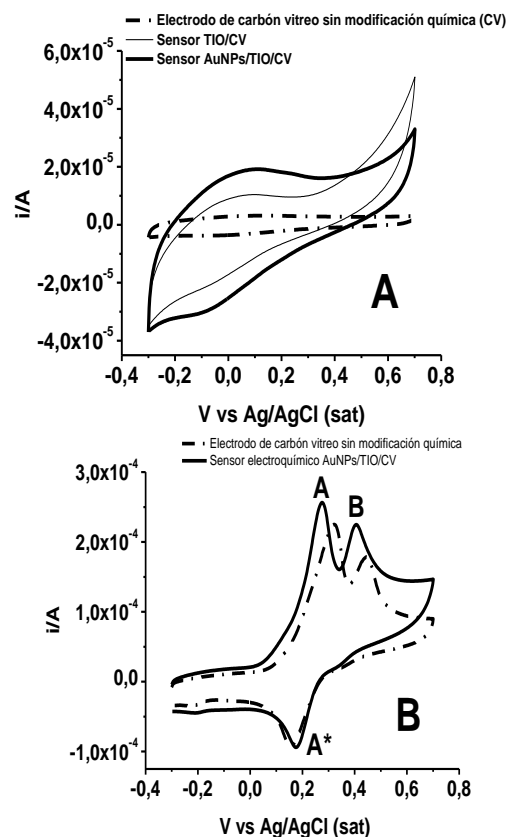
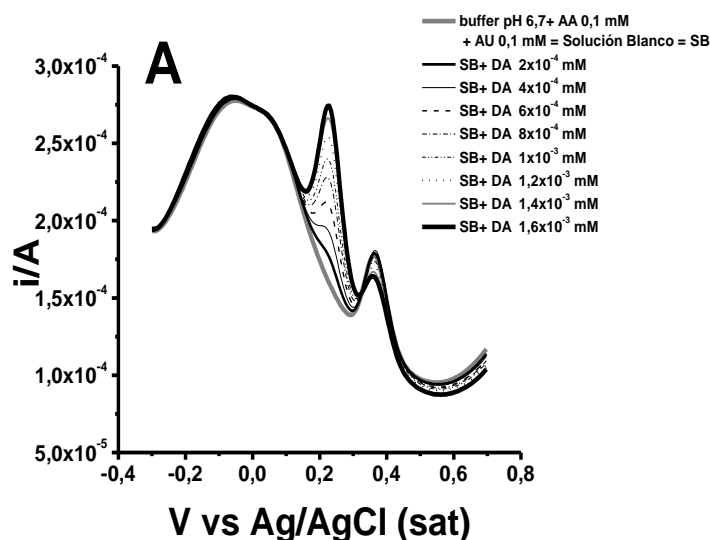


Fig. 2: A) Voltamperogramas cíclicos obtenidos con un electrodo de CV sin modificación química, modificado con TIO y modificado con AuNPs/TIO en solución buffer fosfato de pH = 6,7; $v = 200 \text{ mVs}^{-1}$. B) Respuesta electroquímica del electrodo del electrodo de CV sin modificación química y el sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV en solución buffer fosfato pH = 6,7 + DA (0,1 mM) en presencia de AA (0,1 mM) y AU (0,1 mM); $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Se observan dos picos de oxidación (A y B) correspondientes a la oxidación electroquímica de la DA y el AU respectivamente. La señal de oxidación del AA no se observa, lo que es indicativo de que ambos sensores actúan como una barrera efectiva a la oxidación electroquímica del AA a pH = 6,7. El pico A* corresponde a la reducción de la dopaminoquinona (DAQ), producto de la oxidación de la DA. La respuesta electroquímica del sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV varía muy poco cuando este se cicla indefinidamente por VC entre -0,3 hasta 0,7 V en presencia de DA, AA y AU, lo cual es indicativo que la modificación AuNPs/TIO evita que la superficie electródica se pasive rápidamente tal como se observa cuando se utiliza el electrodo de CV sin modificación química.



En la figura 3A se muestra la familia de voltamperogramas obtenidos con el sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV por VOC manteniendo constante la concentración de AA (0,1 mM) y AU (0,1 mM) y variando la concentración de DA entre 2×10^{-4} y $1,6 \times 10^{-3}$ mM. El pico de corriente a potenciales menores de 0,1 V puede ser atribuido a la señal de oxidación que se observa con el sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV en solución buffer fosfato de PH = 6,7 entre -0,1 y 0,1 V. La figura 3B muestra el comportamiento lineal de I_p vs. concentración de DA. Estos resultados muestran que el sensor electroquímico AuNP/TIO/CV, permite la cuantificación de DA en presencia de AA y AU. El límite de detección fue $0,15 \mu\text{M}$ y el límite de cuantificación fue de $0,50 \mu\text{M}$, con un coeficiente de relación de 0,99561.

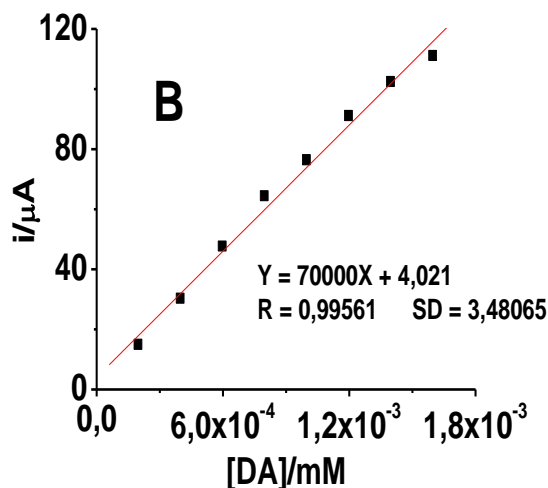


Fig. 3: A) Familia de voltamperogramas obtenidos por VOC en una solución buffer fosfato pH = 6,7 con el sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV al variar la concentración de DA y manteniendo constante las concentraciones de AA y AU. B) Comportamiento de I_p vs [DA] en presencia de AA y AU

Sensor electroquímico AuNPs-QUIT/CV

Se realiza la electrodeposición simultánea de AuNPs y QUIT debido a que al potencial de -2,5 V que se le aplica al electrodo existe evolución de hidrógeno en la interface electrodo-solución, por lo que el pH en dicha interface es más básico que en la solución favoreciendo la coprecipitación de las AuNPs y el QUIT sobre la superficie electródica. La figura 4 muestra el comportamiento electroquímico del electrodo de CV sin modificación química y modificado con AuNPs-QUIT en una solución buffer fosfato pH = 6,7. Se puede observar que la respuesta electroquímica del sensor electroquímico AuNPs-QUIT/CV se incrementa con respecto a la respuesta electroquímica del electrodo de carbón vítreo sin modificación química. Nuevamente este comportamiento puede ser atribuido a un aumento de la actividad electroquímica del electrodo, tal vez debido a que se hace más rugoso aumentando su área superficial.

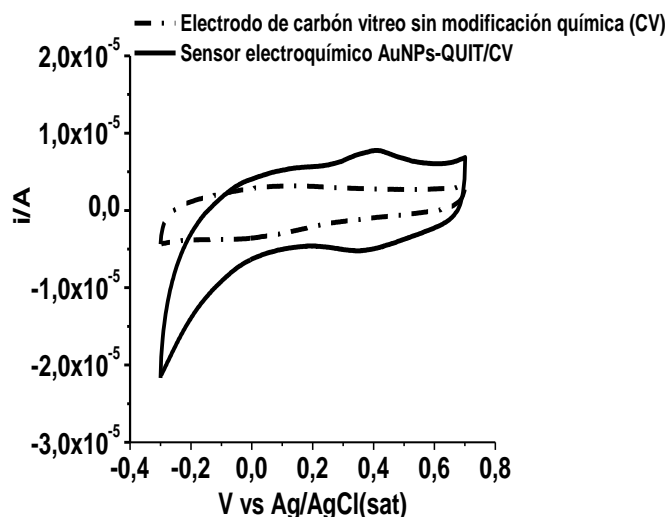


Fig. 4: Voltamperogramas cíclicos obtenidos con un electrodo de carbón vítreo sin modificar y con el sensor electroquímico AuNPs-QUIT/CV en solución buffer fosfato 6,7; $v=200\text{mVs}^{-1}$.

La figura 5A muestra la familia de voltamperogramas que se obtienen con el sensor electroquímico AuNPs-QUIT/CV en solución buffer fosfato pH = 6,7; solución buffer fosfato pH = 6,7 + DA 0,1 mM; solución buffer fosfato pH = 6,7 + DA 0,1 mM + AA 0,1 mM y solución buffer fosfato pH = 6,7 + DA (0,1 mM) + AA (0,1 mM) + AU (0,1 mM). Se observa que la oxidación electroquímica tanto de AA y AU sobre este electrodo modificado es completamente suprimida y que la señal de la oxidación electroquímica de la DA no cambia con la presencia de AA y AU. Este comportamiento es indicativo que el sensor electroquímico AuNPs-QUIT/CV bloquea completamente la oxidación del AA y del AU y hace estable la oxidación electroquímica de la DA. Después de barridos sucesivos la señal de oxidación de la DA y la forma del voltamperograma se mantienen,

indicativo que la presencia de AA y AU no afecta a la señal electroquímica de la oxidación de DA.

En la figura 5B se muestra la familia de voltamperogramas obtenidos con el sensor electroquímico AuNPs-QUIT/CV por VOC en una solución buffer al mantener constante la concentración de AA (0,1 mM) y AU (0,1 mM) y variar la concentración de DA entre 2×10^{-4} mM a 6×10^{-4} mM. La figura 5C muestra el comportamiento lineal de I_p vs. concentración de DA. Este comportamiento muestra que el sensor electroquímico AuNPs/QUIT/CV permite la cuantificación de DA en presencia de AA y AU, con un límite de detección de $0,080 \mu\text{M}$ y un límite de cuantificación de $0,25 \mu\text{M}$, con un coeficiente de relación de $0,99089$.

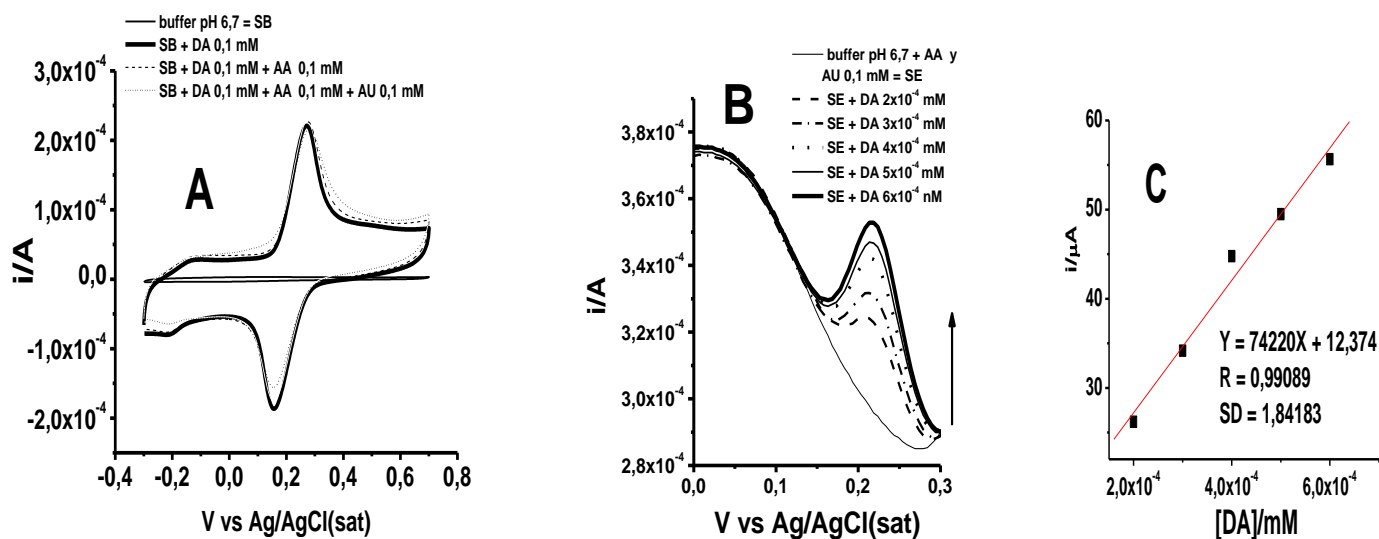


Fig. 5: A) Respuesta electroquímica del sensor (AuNPs-QUIT/CV) en solución buffer fosfato pH = 6,7 + DA (0,1 mM) en ausencia y presencia de AA (0,1 mM) y AU (0,1 mM); $v=200 \text{ mV s}^{-1}$. B) Familia de voltamperogramas obtenidos por VOC en una solución buffer fosfato pH = 6,7 con el sensor electroquímico (AuNPs-QUIT/CV) variando la concentración de DA y manteniendo constante la concentración de AA y AU. C) Comportamiento de I_p vs. $[DA]$ en presencia de AA y AU.

Conclusiones

El desarrollo de cargas opuestas entre la superficie del sensor electroquímico AuNPs/TIO/CV y el analito DA en solución buffer fosfato pH = 6,7 en presencia de AA y AU permitió incrementar la sensibilidad para la detección y cuantificación de DA, obteniéndose un límite de detección de $0,15 \mu\text{M}$ y límite de cuantificación de $0,5 \mu\text{M}$.

El uso de películas de QUIT-AuNPs sobre superficies de carbón vítreo suprime la oxidación electroquímica del AA y del AU permitiendo su empleo en el desarrollo de sensores electroquímicos para la detección y cuantificación de DA en presencia de altas concentraciones de AA y AU con un límite de detección de $0,080 \mu\text{M}$ y límite de cuantificación de $0,25 \mu\text{M}$.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CDCHT-ULA (FA-517-12-08-A) y FONACIT (Proyecto No. 2012000772) por la financiación de este trabajo.

Referencias

1. D Vallone, R Picetti, E Borrelli. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, **24**, 125-32 (2000).
2. A Boulton, G Baker, R Adams. *Voltammetric Methods and rain Systems*. The Humana Press, Clifton, NJ (1995).
3. F Gonon, M Buda, J Pujol. Measurements of Neurotransmitter Release in Vivo. En: Marsden C.A., Editor, Wiley, Chichester, 153-167 (1984).

4. H Zhao, Y Zhang, Z Yuan Z. Determination of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid Using Poly(hippuric acid) Modified Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, **14**, 1031-1034 (2002).
5. A Ciszewski, G Milczarek. Polyeugenol-modified platinum electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid. **Anal. Chem.**, **71**, 1055-1061 (1999).
6. S Menolasina, R Contreras, A Aguilar, O Contreras, A Rodríguez. Comportamiento electroquímico de la dopamina en presencia de ácido ascórbico utilizando un electrodo de oro modificado electroquímicamente y un electrodo de oro modificado electroquímicamente y químicamente con un tiol. **Revista Técnica. Ing. Univ. Zulia**, **30(2)**, 151-157 (2007).
7. S Menolasina, B Martín-Fernández, F García-Iñigo, B López-Ruiz. Comportamiento electroquímico de la dopamina en un electrodo de carbón vítreo modificado con Laponita/ Glutaraldehído. **An. R. Acad. Nac. Farm.**, **75(3)**, 373-388 (2009).
8. S Menolasina, B Martín-Fernandez, F García-Iñigo, B López-Ruiz. Indirect Dopamine Detection on a Glassy Carbon Electrode Based on Laponite/Tyrosinase. **Sensor Lett.**, **9**, 1670-1675 (2011)
9. M Li, F Gao, P Yang, L Wang, Y Fang. Conveniently assembling dithiocarbamate and gold nanoparticles onto the gold electrode: A new type of electrochemical sensors for biomolecule detection. **Surf. Sci.**, **602**, 151-155 (2008).
10. J Aldana-González, M Palomar-Pardavé, S Corona-Avenidaño, M Montes de Oca, M Ramírez-Silva, M Romero-Romo. Gold nanoparticles modified-ITO electrode for the selective electrochemical quantification of dopamine in the presence of uric and ascorbic acids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, **706**, 69-75 (2013).
11. A Gopalan, K Lee, K Mahnesh, P Santhosh, J Kim, J Kang. Electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid at a novel gold nanoparticles distributed poly(4-aminothiophenol) modified electrode. **Talanta**, **71**, 1774-1781 (2007).
12. D Jia, J Dai, H Yuan, L Lei, D Xiao. 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 (2011).
13. W Cun, Y Ruo, C Yaqin, C Shihong, H Fangxin, Z Meihe. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan on gold nanoparticles/overoxidized-polyimidazole composite modified glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, **741**, 15-20 (2012).
14. H Cai, C Xu, P He, Y Fang. Colloid Au-enhanced DNA immobilization for the electrochemical detection of sequence-specific DNA. **J. Electroanal. Chem.**, **510**, 78-85 (2001).
15. R Chai, R Yuan, Y Chai, Ch Ou, Sh Cao, X Li. Amperometric immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and methylene blue on thiourea modified glassy carbon electrode for determination of human chorionic. **Talanta**, **74(5)**, 1330-1336 (2008).
16. G Yang, Y Chang, H Yang, Z Wu. The preparation of reagentless electrochemical immunosensor base on a nano-gold and chitosan hybrid film for human chorionic gonadotrophin. **Analytical Chimica Acta**, **644**, 72-77 (2009).