

# **DESARROLLO DE MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS Y FLUORIMÉTRICOS PARA MONITORIZACIÓN DEL CARBONATO DE LITIO EMPLEANDO QUANTUM DOTS**

***DEVELOPMENT OF  
ELECTROCHEMICAL  
AND FLUOROMETRIC  
METHODS FOR  
MONITORING  
LITHIUM  
CARBONATE  
USING QUANTUM  
DOTS***



**Daniel Fernández Benito**

Curso académico 2023/2024

Autora deseño da portada, *Formulando o Futuro*: Marta Gerpe González.

# Índice

Resumen .....	5
Abstract.....	5
Keywords .....	6
Palabras clave: .....	6
1. Introducción .....	6
2. Objetivo .....	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1 Materiales .....	10
3.2 Síntesis de QDs.....	11
3.3 Síntesis de cubierta IIP .....	11
3.4 Eliminación del <i>template</i> .....	12
3.5 Caracterización de los QDs .....	12
3.5.1 Análisis por difracción de Rayos X .....	12
3.5.2 Análisis por HRTEM .....	13
3.6 Estudios de fluorescencia .....	13
3.7 Modificación de los electrodos.....	13
3.8 Medidas electroquímicas .....	16
3.8.1 Estudios de tiempo de equilibrio .....	17
3.8.2. Estudio de concentración óptima de electrolito .....	17
3.8.3. Determinación de concentraciones de Li <sup>+</sup> y recta de calibrado .....	17
3.8.4. Estudio de interferencia: Efecto impronta y factor de selectividad .....	17
3.8.5 Evaluación de potenciostatos portátiles .....	18
4. Resultados y Discusión .....	18
4.1 Caracterización de QDs.....	18
4.1.1 Análisis por difracción de Rayos X .....	18
3.1.2 Análisis por HRTEM .....	19
4.2 Estudios de fluorescencia .....	20

<b>4.3 Estudios de electroquímica con electrodos modificados.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3.1 Estudio de tiempo de equilibrio .....</b>	<b>22</b>
<b>4.3.2. Estudio de concentración óptima de electrolito .....</b>	<b>22</b>
<b>4.3.3. Determinación de concentraciones de Li<sup>+</sup> y recta de calibrado .....</b>	<b>23</b>
<b>4.3.4. Estudio de interferencia: Efecto impronta y factor de selectividad .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3.5 Evaluación de potenciostatos portátiles .....</b>	<b>26</b>
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>27</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>28</b>
<b>7. Agradecimientos .....</b>	<b>31</b>

## Resumen

El carbonato de litio es un fármaco comúnmente utilizado en el tratamiento del trastorno afectivo bipolar, tanto en su profilaxis como en el tratamiento de episodios depresivos, maníacos o hipomaníacos. Debido a su estrecho margen terapéutico suele ser necesario realizar análisis de sangre para el ajuste de dosis y la monitorización de los pacientes. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar un método portátil y más cómodo para el paciente de cuantificación de concentración de  $\text{Li}^+$  mediante el uso de Quantum Dots (QDs). En el trabajo se sintetizaron QDs de ZnS dopados con  $\text{Mn}^{2+}$ , que incorporan un polímero en la superficie con reconocimiento y especificidad para la detección de iones  $\text{Li}^+$ . El producto obtenido fue analizado mediante técnicas de microscopía electrónica y difracción de rayos X. Además de las medidas fluorimétricas, se estudiaron métodos de detección electroquímicos, y se compararon dos métodos para adherir los QDs modificados a electrodos serigrafados. Para la determinación de concentración de  $\text{Li}^+$  en disoluciones acuosas se empleó un potenciostato, que demostró rapidez y precisión en sus mediciones. Los parámetros para la realización de estas medidas con electrodos fueron optimizados para su potencial uso en la detección sérica de  $\text{Li}^+$  en muestras reales. Para garantizar el uso doméstico, se estudiaron potenciostatos portátiles de bajo costo. Los QDs demostraron excelentes cualidades fluorescentes y capacidad de *quenching*. Los electrodos modificados, una vez optimizados, se presentan como un método rápido y eficaz de detección selectiva de iones  $\text{Li}^+$ .

## Abstract

*Lithium carbonate is a commonly used drug in the treatment of bipolar affective disorder, both for prophylaxis and for the treatment of depressive, manic or hypomanic episodes. Due to its narrow therapeutic index, blood tests are often necessary for dose adjustment and patient monitoring. The aim of this work was to develop and evaluate a portable and more convenient method to quantify  $\text{Li}^+$  concentration using Quantum Dots (QDs) for patients. In this study,  $\text{Mn}^{2+}$  doped ZnS QDs were synthesized, incorporating a surface polymer with recognition and specificity for  $\text{Li}^+$  ion detection. The resulting product was analysed using electron microscopy and X-ray diffraction techniques. In addition to fluorometric measurements, electrochemical detection methods were studied, employing and comparing two methods for adhering the modified QDs to screen-printed electrodes (SPE). For this purpose, a potentiostat was used, demonstrating its speed and precision for determining  $\text{Li}^+$  concentration in aqueous solutions. The parameters for conducting these measurements with electrodes were optimized for their potential use in the serological detection of  $\text{Li}^+$  in real samples. To ensure at-home use, low-cost portable potentiostats were studied. Synthesized QDs exhibited excellent fluorescent qualities and quenching capability. Once optimized, these modified electrodes present themselves as a fast and effective method for the selective detection of  $\text{Li}^+$  ions.*

**Keywords:** Lithium carbonate, TDM, quantum dots, QD, electrochemistry, fluorescence, potentiostat

**Palabras clave:** Carbonato de litio, TDM, quantum dots, QD, electroquímica, fluorescencia, potenciostato.

## 1. Introducción

El trastorno afectivo bipolar es una patología caracterizada por fluctuaciones del estado de ánimo, cursando con episodios maníacos o hipomaniacos según si la enfermedad es de tipo I o tipo II, ambos acompañados con episodios depresivos (1). Se estima que su prevalencia a nivel mundial está entre 1% y 2,4%, con inicio entre los 20 y 30 años, afectando a hombres y mujeres en igual proporción (2).

Para el tratamiento de esta patología se emplea carbonato de litio, al igual que anticonvulsivos como el valproato de sodio, carbamazepina y lamotrigina. El carbonato de litio es el tratamiento de elección en el trastorno afectivo bipolar, tanto en su tratamiento clínico como en la profilaxis, debido a su elevado índice de eficacia. Es empleado en monoterapia o en tratamientos combinados junto a valproato sódico. El litio actúa como inhibidor no selectivo de la recaptación de ciertos neurotransmisores como serotonina y norepinefrina (3). El problema con el uso clínico del carbonato de litio es su estrecho intervalo terapéutico y gran variabilidad inter e intraindividual en parámetros farmacocinéticos (4).

En la prevención de brotes maníacos en adultos se usan dosis iniciales de 300mg a 600mg, 2 o 3 veces al día, para alcanzar concentraciones en plasma de entre 0,8mEq/L y 1,2mEq/L, y para el tratamiento agudo de la manía se emplean 600mg 3 veces al día, cuya concentración plasmática oscila entre 1,0mEq/L a 1,5mEq/L (5). Si el paciente presenta concentraciones superiores a los 1,5mEq/L pueden aparecer anorexia o convulsiones, y por encima de los 2mEq/L, el paciente puede quedar en coma o incluso fallecer (3).

Estos requerimientos obligan a que sea necesaria una persistente monitorización de la concentración de fármaco para poder individualizar la dosis para cada paciente, mediante analíticas conocidas como litemias. Al igual que con otros fármacos con estrecho margen terapéutico, se recurre a la Monitorización Terapéutica de Fármacos (MTF) o "*Therapeutic Drug Monitoring*" (TDM) mediante biosensores, con el objetivo de optimizar los resultados clínicos de los pacientes, minimizando la toxicidad y maximizando la efectividad de los tratamientos. Esto se realiza mediante la medición de concentraciones de fármaco en el paciente, normalmente en sangre, pero se puede emplear cualquier matriz biológica que demuestre resultados fiables. Conociendo la concentración de fármaco en el paciente se puede adaptar la dosis administrada para lograr el efecto terapéutico esperado (6).

Para la monitorización y cuantificación de litio, en la práctica, se toman muestras de sangre para determinar los niveles plasmáticos una vez alcanzado el estado de equilibrio estacionario, aproximadamente 10-12h desde la toma de la última dosis (4). Se ha demostrado que la concentración en los eritrocitos es superior a la encontrada en muestras de suero, pero este método presenta mucha variabilidad y una menor correlación con la dosis terapéutica, por lo que no es un método fiable de monitorización (7). Se han realizado diferentes estudios

respecto a la correlación entre concentraciones de litio entre plasma, saliva y orina. Se ha demostrado que, en pacientes normales, la concentración de litio en saliva es cerca de 2 veces superior a la del plasma, y se correlacionan con factor de relación  $r=0,70$  (8, 9). Estos resultados posicionan la medición en saliva como un método potencialmente viable para la determinación no invasiva de concentraciones en litio, pero se descarta su uso actual por no ser completamente fiable.

Las técnicas analíticas más empleadas en la determinación de los niveles plasmáticos de  $\text{Li}^+$  están basadas en medidas relativas, requiriendo estándares stock de suero para su calibración. Principalmente se utiliza la espectroscopía de absorción atómica, pero también otras como espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo y espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo (10).

Actualmente se están buscando nuevos métodos de cuantificación de  $\text{Li}^+$  que podrían dar lugar a sistemas portátiles. Las fases sensoras basadas en Quantum Dots (QDs) pueden ser adecuadas para el desarrollo de nuevos métodos de determinación *in situ*. Los QDs son nanocristales semiconductores de tamaño nanométrico (1-10nm). Su pequeño tamaño provoca un efecto de confinamiento cuántico lo cual induce la discretización de los niveles de energía y produce la emisión de luz de color (11). A tamaños inferiores a 30nm, el tamaño de partícula de los QDs genera modificaciones en sus propiedades fundamentales, produciendo cambios en la excitación energética, en la absorción óptica y por tanto en el color de su luz emitida (12). El tamaño de partícula de QD puede ser modificado en su etapa de síntesis modificando el tiempo de reacción y temperatura, normalmente con agentes refrigerantes en el momento específico del proceso de reacción, obteniendo un producto de color y tamaño homogéneos y altamente luminiscentes (13).

El potencial uso de los QDs como métodos de detección de sustancias reside en sus propiedades de “*Quenching*” de su luminiscencia, esto es la reducción de la fluorescencia de forma rápida y reversible ante la presencia de agentes desactivadores (14). Sus descubridores fueron galardonados con el premio Nobel de Química en 2023. Su fluorescencia natural y funcionalización superficial con marcadores específicos ha permitido su implementación en los últimos años en campos biomédicos, electrónicos y tecnológicos (12, 15). Durante la síntesis de QDs, se suelen añadir metales de transición como el cobre o manganeso, lo cual permite modificar sus propiedades y rendimientos ópticos, además de hacerlos más estables ante modificaciones térmicas o químicas, a estos se les conoce como QDs dopados (16). Los QDs pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica, los QDs de ZnS dopados con  $\text{Mn}^{2+}$  son unos de los más estudiados por presentar un método de síntesis sencillo.

Los QDs no presentan propiedades de discriminación o reconocimiento de analitos, es por esto que los nanocristales se recubren con un polímero de reconocimiento molecular o *Molecularly Imprinted Polymer* (MIP), que cuenta con sitios de unión específicos para moléculas y permiten la interacción con el analito deseado (17). Esto se consigue mediante el uso de la propia molécula analito como plantilla (*template*), que se adiciona al monómero, entrecruzante y otros reactivos durante el proceso de polimerización. Una vez acabado, se retira el *template* en un proceso de sangrado, quedando los huecos específicos de la plantilla en el polímero (16). En el caso de la detección de iones en vez de moléculas de gran tamaño, como en el caso del  $\text{Li}^+$ , se conocen como *lon-*

*Imprinted Polymers* (IIP), que son polímeros que presentan huecos para el reconocimiento de iones, demostrando excelente selectividad y afinidad por iones de carga positiva o negativa (18). Para la adhesión de la cubierta polimérica a la superficie de los QDs, posteriormente a su síntesis, se emplean sustancias como (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) y polietilenglicol (PEG) como portadores de funcionales a la superficie del QD. Ciertos estudios han desarrollado y demostrado un método de síntesis de una cubierta polimérica con N-isopropilacrilamida (NIPAM) y Benzo-12-crown 4-eter (B12C4) como monómeros bifuncionales, formando un complejo quelante que por su tamaño y distancia capta  $\text{Li}^+$  de manera selectiva (19).

Los QDs pueden permitir la detección de litio mediante fluorescencia con luz UV. Se ha demostrado que las dispersiones microcristalinas de QDs de ZnS demuestran tener picos de absorción en el espectro UV-visible, de 400nm aproximadamente, aunque responden casi exclusivamente a iluminación UV en comparación a luz visible (20). Es por esta razón por la que los detectores de luz UV presentan gran importancia en la detección de luz emitida por QD. Se han llegado a utilizar QD con cubierta iónica para detección de litio en muestras de agua, analizadas mediante técnicas fluorimétricas y presentaron elevada selectividad y buena sensibilidad (21).

Los QDs, pese a no disponer de propiedades eléctricas, pueden acoplarse a un electrodo para su uso como fases sensoras electroquímicas. Se aplica un potencial a una disolución con un electrolito, en este caso  $\text{Li}^+$ , con el objetivo de medir la corriente de electrones proveniente de reacciones de oxidación o reducción. Estas corrientes eléctricas se relacionan con las concentraciones del analito mediante la ecuación de Nernst (22).

En la determinación de la corriente percibida en una disolución ante la aplicación de un potencial dado, se pueden diferenciar dos fuentes de distintas: La corriente faradaica ( $I_f$ ), que se debe a la transferencia de electrones en reacciones de oxidación o de reducción entre sustancias electroactivas y electrodos, es la principal corriente que se trata de cuantificar. Por otro lado, aparece una corriente debida a la descarga de electrones de la propia superficie del electrodo cuando a este se le aplica un potencial, conocida como corriente capacitativa ( $I_c$ ). Debido a que la corriente faradaica decae más lento en el tiempo que la corriente capacitativa (Figura 1), se emplean técnicas basadas en la aplicación de potenciales de manera brusca en ciclos, midiendo la corriente después de cada pulso, pues es ahí donde la corriente es mayoritariamente faradaica (22).

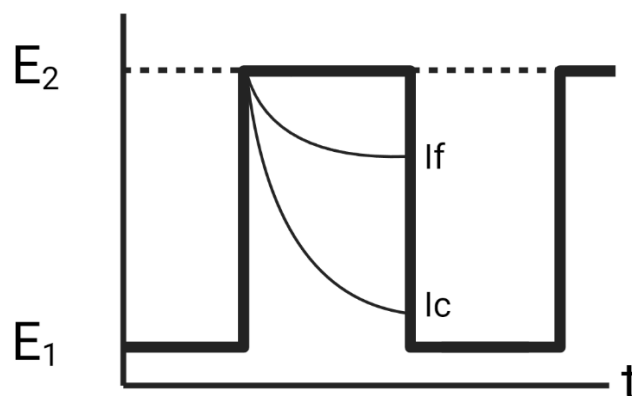


Figura 1: Efecto sobre la corriente al aplicar un potencial en pulso (22). Creado con BioRender.com.

De esta manera se podría determinar la concentración de  $\text{Li}^+$  en diferentes muestras mediante la técnica de Voltamperometría Diferencial de Pulsos o *Differential Pulse Voltammetry* (DPV), siendo de los métodos más ventajosos en estudios cuantitativos, obteniendo respuestas de analitos en forma de picos bien definidos y disminuyendo la señal de efectos de electrones no deseados (22).

A la hora de medir corrientes electroquímicas, se suelen utilizar sistemas de tres electrodos. Estos constan de un electrodo de trabajo o "*Working electrode*" (WE), generalmente de platino o de oro en electrodos en celdas, o de carbón vitrificado en electrodos serigrafiados; un electrodo de referencia o "*Reference electrode*" (RE), de calomelanos, Ag/AgCl o de carbono; y un contra-electrodo o "*counter-electrode*" (CE), de platino, plata o de un material inerte (23). El WE es el metal sobre el cual se aplica un potencial y se mide la corriente que está fluyendo a través de la muestra. El RE actúa como referencia, aplicando un potencial conocido, permitiendo medir diferencia de potencial respecto al WE. El CE sirve para completar el circuito cerrado, a través de él fluye corriente que polariza el WE y permite la medición electroquímica. De esta manera se consiguen resultados analíticos precisos y se consiguen medir diferentes parámetros electroquímicos (24, 25).

Los electrodos serigrafiados o "*Screen Printed Electrodes*" (SPE) presentan un pequeño tamaño y gran reproducibilidad, y podrían permitir la incorporación de QDs de reconocimiento de Litio.

Estos electrodos modificados permitirán realizar mediciones mediante un sistema formado por un potencióstato, el cual es un instrumento analítico que permite mantener un potencial constante producido por un electrodo de una celda electroquímica (26). En caso de controlar la corriente se le conoce como galvanostato, los cuales suelen ir integrados en la mayoría de potencióstato actuales. Además, un potencióstato cuenta con un Amplificador Operacional (*Op-Amp*), que permite amplificar la señal de potencial (26). En estudios anteriores, la determinación de concentración de litio en suero mediante métodos electroquímicos presentó una elevada correlación con la dosis terapéutica, además de ser un método más rápido que los biosensores ópticos que requieren un tiempo de incubación (7, 27). La combinación de ambos métodos podría permitir resultados, rápidos, fiables, y reproducibles.

Para facilitar el uso doméstico del sistema de medición, se teorizó sobre el uso de potencióstatos portátiles, tales como KickStat, los cuales son muy efectivos a la hora de realizar mediciones electroquímicas y presentan un bajo coste, menor a 30\$ (28).

## 2. Objetivo

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método de detección de iones  $\text{Li}^+$  mediante métodos electroquímicos usando QDs para la monitorización terapéutica del carbonato de litio. Para ello se estudiará un método de síntesis de QDs de ZnS dopados con  $\text{Mn}^{2+}$ , con una cubierta polimérica con afinidad específica hacia iones  $\text{Li}^+$ . Se emplearán y compararán dos metodologías diferentes para la adhesión de los QDs polimerizados a

la superficie de los electrodos serigrafiados. En este estudio se optimizarán las condiciones para el uso de los electrodos modificados en la cuantificación de Litio en muestras de pacientes. De igual manera se demostrarán sus propiedades fluorescentes y de *quenching* para una posible detección mediante técnicas fluorimétricas. Adicionalmente se evaluarán diferentes opciones de potenciostatos portátiles de bajo coste con los que realizar medidas electroquímicas.

El objetivo último será el acoplamiento de estos electrodos modificados a un potenciostato portátil, de bajo coste y fácil de usar para el paciente, que permita su monitorización de carbonato de litio en muestra biológicas sin la necesidad de acudir a un centro de salud.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Materiales

Para sintetizar los QDs fueron usados Sulfato de zinc (Panreac, Barcelona, España), Sulfuro de Sodio monohidrato (Fluka Analytical, Buch, Suiza) y Cloruro de manganeso (II) (Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Alemania), además de (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) (Trapaga, Vizcaya, España) y Polietilenglicol (Panreac, Barcelona, España) como portadores de grupos funcionales amino, y Metanol (Merck, Hohenbrunn, Alemania) para el lavado. Agua ultrapura de resistividad 18,2 MΩcm fue obtenida de un dispositivo de purificación Mili-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

La cubierta IIP fue sintetizada con Cloruro de Litio (BLDpharmatech, Shanghái, China) como molécula portadora de Li<sup>+</sup> y *template*, Benzo-12-crown-4 (B12C4) (BLDpharmatech, Shanghái, China) y N-isopropilacrilamida (NIPAM) (abcr, Karlsruhe, Alemania) como monómeros bifuncionales, Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) como entrecruzante, 2,2-azobisisobutironitrilo (AIBN) (Fluka, Steinheim, Alemania) como iniciador de la reacción y acetonitrilo (Merck) como disolvente y medio de reacción (19). Se empleó acetato de 1-hexil-3-metilimidazolio (HMIA)(io-li-tec, Heilbronn, Alemania) para su sangrado.

En la modificación del electrodo se empleó una dispersión de Nafion D-520, 5 % p/p en agua y 1-propanol,  $\geq$ capacidad de intercambio de 1,00 m/g (Alfa Aesar, Kandel, Alemania), y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Panreac, Barcelona, España) para la limpieza de los electrodos serigrafiados.

Durante los estudios de fluorescencia y electroquímica se realizaron medidas a partir de un patrón de Li<sup>+</sup> de 1000mg/L (Merck, Hohenbrunn, Alemania) y NaCl (Panreac, Barcelona, España) como electrolito. En el estudio de interferencia se utilizaron patrones de 1000mg/L de K<sup>+</sup> (Scharlab, Barcelona, España), Ca<sup>2+</sup> (Merck), Mg<sup>2+</sup> (Merck), Zn<sup>2+</sup> (Scharlab), Fe<sup>2+</sup> (PerkinElmer, Massachusetts, Estados Unidos) y Cu<sup>2+</sup> (PerkinElmer).

### 3.2 Síntesis de QDs

Para la síntesis de los QDs se siguió el protocolo descrito por Chantada-Vázquez et al. (16). Se añadieron 12,5 mmol  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3,595g) y 1 mmol  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  (0,1259g) a un matraz de fondo redondo de tres bocas, junto a 40 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura. En una boca se introdujo una válvula con flujo de  $\text{N}_2$  constante, otra se tapó con un tapón perforado que permita la salida de gases, y en la boca central se situó un embudo de decantación con una solución de 1,25M de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,9755g) en 10mL de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura. El matraz se introdujo en un baño ultrasónico Ultrasonic 3L (OVAN, Barcelona, España) y se dejó gotear lentamente hasta que haya caído toda la solución y aparezcan cristales visibles. En esta etapa, para un primer lote se añadieron 2,5mL de APTES, y durante la elaboración de un lote distinto, 3,3g de PEG diluidos en 10mL de agua ultrapura. En ambos casos se dejó reaccionar 4 horas en el baño de ultrasonidos.

La disolución de QDs se centrifugó 10min a 1300rpm, eliminándose el sobrenadante. Los QDs se lavaron con 5mL metanol y resuspendieron con la ayuda de un vórtex y se centrifugaron a igual tiempo y velocidad, este proceso de lavado y centrifuga se repitió 3 veces. El producto lavado se dejó secar en un desecador 24h.

### 3.3 Síntesis de cubierta IIP

Para la polimerización de la cubierta de detección selectiva de  $\text{Li}^+$ , se siguió el protocolo utilizado por Chang, L., et al. (19), utilizando  $\text{LiCl}$  en vez de  $\text{LiClO}_4$  como fuente de  $\text{Li}^+$  como *template*, y sin emplear KH-570 como portador de grupos funcionales a la superficie de la partícula, pues ya se utilizó PEG durante la síntesis de los QDs (Figura 2).

La obtención de los QDs con cubierta IIP (IIP-QDs) comienza con la disolución de 0,2 mmol (8,47 mg) de  $\text{LiCl}$  y 0,2mmol (44,84mg) de B12C4 en 70mL de acetonitrilo, el cual se sometió a agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente. En otro vaso de precipitados se añadieron 0,4g de los QDs sintetizados previamente a 10 mL de agua, y se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos o hasta que los QDs estén totalmente dispersados. Se añadieron 0,8mmol (90,52mg) de NIPAM, 4mmol (0,76mL) de EGDMA, 0,08mmol (13,12mg) de AIBN y los QDs dispersados en agua a la disolución de acetonitrilo. La disolución se depositó en baño de ultrasonidos durante 30min a 25 °C y se dejó reposar en un bote hermético en atmósfera de  $\text{N}_2$  a 60 °C durante 24h. La misma síntesis se repitió sin la adición del *template* para obtener los QDs con polímero sin cubierta iónica o *Non Imprinted Polymer* (NIP-QDs).

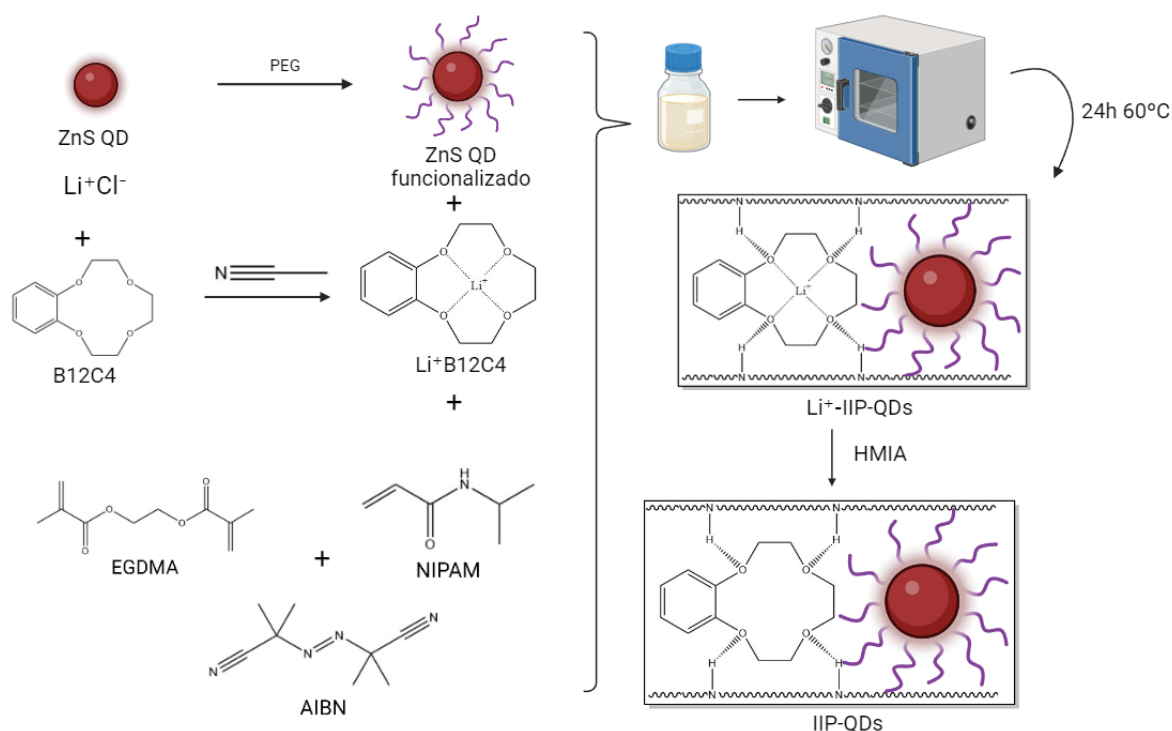


Figura 2: Proceso de síntesis de IIP-QDs. Creado con BioRender.com.

### 3.4 Eliminación del *template*

Las disoluciones de NIP-QDs y de IIP-QDs fueron centrifugadas a 2000rpm durante 10min para eliminar los reactivos restantes tras la polimerización, presentes en el sobrenadante.

En un primer intento, siguiendo paso a paso el protocolo de Chang, L., et al. (19), se utilizaron 10mL de HNO<sub>3</sub> a 1M para el lavado del litio, y en otro lote se utilizó una disolución iónica con acetato de 1-hexil-3-metilimidazolio (HMIA) para el sangrado del litio, el cual ha demostrado ser un excelente vehículo para el lavado de *templates* en IIP de distinta naturaleza, sin dañar la integridad del polímero (29). La disolución con IIP-QDs se lavó 10 veces con una disolución al 1% de HMIA, y el sobrenadante de la quinta y décima centrifuga se analizaron por ICP-Óptico para asegurar la completa eliminación del litio.

### 3.5 Caracterización de los QDs

Para garantizar el funcionamiento y las correctas propiedades de los QDs, se realizaron estudios de fluorescencia, de difracción de rayos X y de imagen.

#### 3.5.1 Análisis por difracción de Rayos X

Se llevó a cabo una determinación estructural de muestras sólidas en la Unidad de Rayos X del Edificio CACTUS. Se recogieron datos mediante geometría Bragg-Brentano usando un difractómetro de rayos X tipo “Bruker D8 Advance” (40 kV, 40 mA, theta/theta) equipado con un tubo de rayos X de cobre sellado (CuKα1 ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ), y

un detector de tipo LYNXEYE XE-T. Se empleó el programa “HighScore Plus Release: Version 3.0d” para los análisis de los difractogramas.

Se analizaron muestras para QDs, IIP-QDs con el template Li+, IIP-QDs lavados (sin template Li+) y NIP-QDs. A partir de los difractogramas experimentales se determinaron las propiedades matemáticas de los picos y bandas presentes, caracterizando las fases cristalinas o análogos estructurales en bases de datos cristalográficas.

### 3.5.2 Análisis por HRTEM

Se realizaron análisis por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución o HRTEM (“*High-resolution transmission electron microscopy*”) de una muestra de QDs de ZnS. El dispositivo empleado fue un HRTEM JEOL F200. Posteriormente se hizo un escaneo mediante fluorescencia de rayos X por energía dispersiva o EDXRF (“*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*”), para obtener una caracterización química y análisis elemental de la muestra. Por último, se realizó un mapeado de otra muestra mediante microscopía electrónica de transmisión de barrido o STEM (“*Scanning transmission electron microscopy*”), acoplado a un detector de electrones a alto ángulo en campo oscuro o HAADF (“*High Angle Annular Dark Field*”), para obtener imágenes del material en función de su composición cualitativa y cuantitativa de diferentes elementos.

### 3.6 Estudios de fluorescencia

Para demostrar la fluorescencia de los QDs, se preparó una disolución de 50mL de agua ultrapura con 10 mg/L de IIP-QDs y se midió en un espectrofotómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo NexION® 2000 de Perkin Elmer (Waltham, EEUU) equipado con auto muestreador. Posteriormente se preparó una disolución de 2mL de agua ultrapura con 100mg/mL de IIP-QDs, y 1mg/mL de Li<sup>+</sup>, obtenido a partir de la disolución patrón de 1000mg/L. De esta manera se determinó el efecto *quenching* y capacidad de fluorescencia. Se empleó el software *FL Solutions* para realizar los análisis de las muestras.

### 3.7 Modificación de los electrodos

Los electrodos empleados en el estudio, Metrohm DropSens 110 (Herisau, Suiza), tienen electrodos de trabajo (WE) de carbono, contra-electrodos (CE) de carbono y electrodos de referencia (RE) de plata (Figura 3).

Los electrodos Metrohm DropSens 110 se lavaron para eliminar cualquier posible modificación realizada previamente sobre la superficie de estos. La etapa de limpieza permite un aumento en el reconocimiento del analito específico y una mejor adherencia del polímero (30). Se empleó una disolución 0,5M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de la cual se añadieron alícuotas de 50 μL sobre la superficie del WE y se aplicó un potencial de barrido entre -0,5 y +1,0V a 0,1V · s<sup>-1</sup>, hasta obtener un voltamograma reproducible (31). Este proceso y las posteriores pruebas de análisis con los electrodos modificados fueron realizadas conectando los electrodos mediante un conector para SPE de Metrohm y utilizando el software DropView.

Posterior al lavado de los electrodos, estos se recubrieron con cinta de teflón dejando al aire libre la superficie correspondiente al electrodo de trabajo (WE) (Figura 3). Esto se realizó para garantizar que el polímero recubra la superficie del electrodo de trabajo.



Figura 3: Recubrimiento con cinta de teflón de los electrodos empleados.

Se siguieron dos enfoques a la hora de depositar los QDs sobre la superficie. El primer método, referenciado posteriormente como Polímero Depositado (PD), basado en el protocolo de Yao y Yang (32), se depositaron los IIP-QDs ya polimerizados en la superficie del electrodo. Para ello, se dispersaron los IIP-QDs en una disolución de nafion, que actúa como polímero para garantizar la sujeción de los QDs a la superficie del electrodo (Figura 4).

Se comenzó dispersando 10mg de IIP-QDs en 2mL de una disolución de agua con nafion al 1%. Se depositó en cada electrodo una alícuota de 10 $\mu$ L de esta disolución, previamente agitada en un vórtex. Para garantizar su secado de manera uniforme se empleó un Modular Spin Processor WS-650-23NPP (Landsdale, PA, USA). Mediante la técnica de “*spin coating*”, se hace rotar el electrodo a una velocidad constante, en una atmósfera inerte de N<sub>2</sub>. Se empleó un programa que consta con dos etapas. La primera etapa, de aproximación, se usó 1min a 150rpm y aceleración de 25s, y en la segunda, de secado, se dejó 4min a 250rpm con aceleración de 25s.

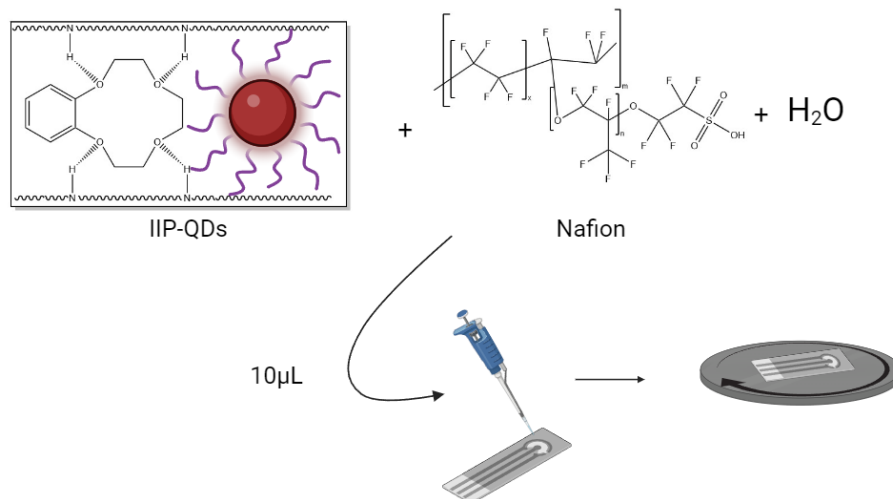


Figura 4: Modificación de electrodo mediante técnica de Polímero Depositado. Creado con BioRender.com.

Este proceso se repitió dos veces más, sustituyendo los IIP-QDs por NIP-QDs para uso en posteriores experimentos.

Se estudió además un segundo método para la modificación de los electrodos, que se denominará Polimerización *in situ* (PIS), el cual está basado en el estudio de Prasad et al. (31). Se probó a depositar los QDs junto con los reactivos polimerizantes, entrecruzantes y LiCl como *template*, para realizar el proceso de polimerización de la cubierta selectiva para Li<sup>+</sup> directamente en la superficie del electrodo. Se emplearon los mismos reactivos que para la polimerización *in vitro*, pero en menores cantidades (Figura 5). Se añadieron 0,005mmol (0,212mg) de LiCl y 0,005mmol (1,121mg) de B12C4 en un vaso con 1,5mL de acetonitrilo, el cual se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 30 min a temperatura ambiente. En otro vaso se dispersaron 0,01g de los QDs sintetizados en 0,5mL de agua ultrapura también con ayuda de un baño de ultrasonidos. Se añadieron 0,002mmol (2,263mg) de NIPAM, 0,1mmol (0,019mL) de EGDMA, 0,002mmol (0,328mg) de AIBN y los QDs dispersados en agua a la disolución de acetonitrilo.

Se depositaron 20μL de esta disolución sobre el WE de los electrodos serigrafiados y se empleó el *Modular Spin Processor* para asegurar la adherencia a la su superficie. El programa empleado en este método también consiste en dos etapas, la primera de 1min a 75rpm y aceleración de 25s, y la segunda etapa de 4min a 125rpm y aceleración de 25s. Los electrodos fueron depositados en una atmósfera inerte de N<sub>2</sub> durante 24h a 60°C. Para el lavado del litio, se depositaron los electrodos serigrafiados en un vaso de precipitados junto a la disolución iónica limpiadora de HMIA, y se introdujo en un baño ultrasónico durante 30min. Posteriormente, se realizó el mismo proceso usando agua ultrapura para eliminar todas las impurezas.

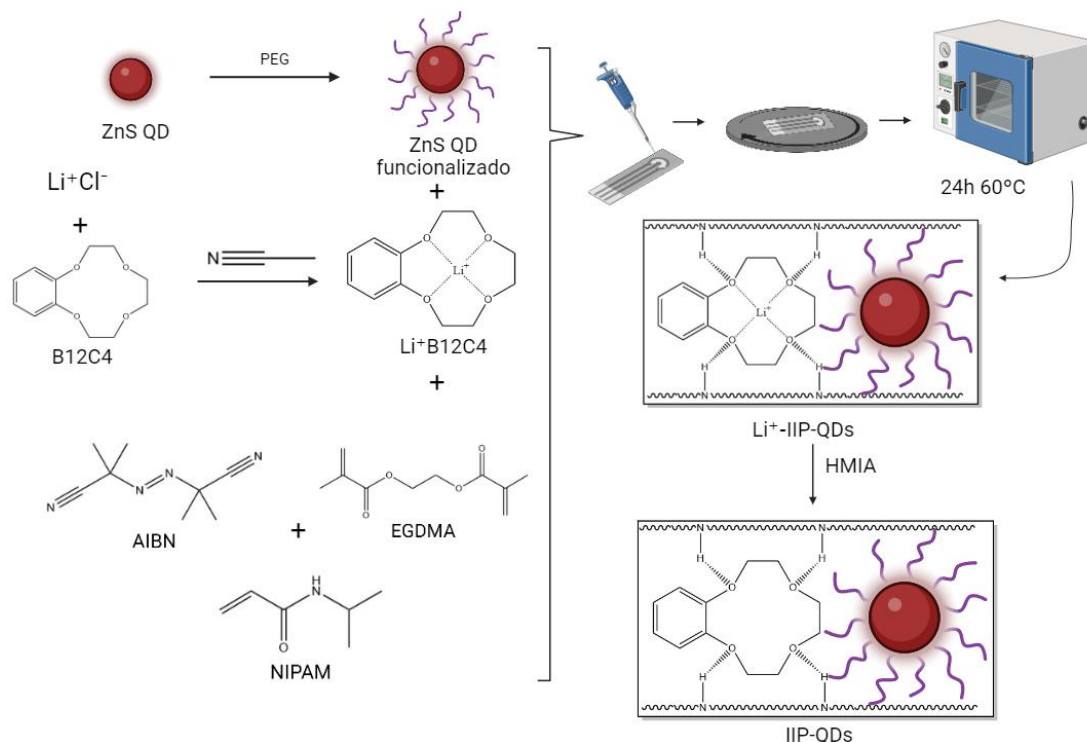


Figura 5: Modificación de electrodo mediante técnica de Polimerización in situ. Creado con BioRender.com.

De igual manera se prepararon dos electrodos en ausencia de template para obtener el Non Imprinted Polymer (NIP).

### 3.8 Medidas electroquímicas

Los electrodos modificados se sometieron a estudios electroquímicos para demostrar su especificidad de reconocimiento y sus condiciones óptimas de estudio.

Se usó una disolución de cloruro sódico como electrolito en disolución con el objetivo de aumentar la conductividad de la disolución con el analito y facilitar la lectura de la respuesta obtenida. El NaCl es una sal inorgánico naturalmente abundante y presente en el suero humano, que ha demostrado tener alta conductividad iónica y fácil disolución en agua, además de elevada estabilidad química y térmica (33).

Después de cada medida de litio, para lavar los electrodos y eliminar los restos de Li<sup>+</sup> que pudieran quedar retenidos en la cubierta iónica, se empleó la disolución iónica de HMIA al 1%, durante 5min en un vaso de precipitados sometido a baño de ultrasonidos. Posteriormente se lavan de la misma manera con agua ultrapura para eliminar el remanente que pueda quedar tras el lavado iónico.

Para determinar el funcionamiento de los electrodos, se realizaron experimentos utilizando un potencióstato  $\mu$ Stat 200 de Metrohm y un Conector para SPE de Metrohm para conectar los electrodos modificados a un ordenador. Se empleó el software ViewDrop de Metrohm para realizar las medidas de corriente ( $\mu$ A) a diferentes potenciales (V).

Se empleó la técnica de Voltametría Diferencial de Pulsos, con potencial inicial de -1,0V y final de +0,7V., ratio de escaneo de 0,2 V/s, incrementos de voltaje de 0,0005V y pulsos de 0,01V a tiempo 10ms.

### **3.8.1 Estudios de tiempo de equilibrio**

La primera variable en optimizar fueron los tiempos de equilibrio, que es el tiempo que se debe esperar entre cada medida para garantizar la correcta captura por el polímero y el equilibrio de disolución entre los electrolitos y los electrodos. Para ello se empleó una disolución sin  $\text{Li}^+$ , únicamente con electrolito NaCl a concentración 0,9%(m/v) y agua destilada ultrapura. Se realizaron medidas a tiempos de 1s, 15s, 1min, 2min y 5min.

### **3.8.2. Estudio de concentración óptima de electrolito**

Para garantizar la concentración óptima de electrolito en disolución se prepararon disoluciones de 5mL con concentración de  $\text{Li}^+$  10 mg/L a partir de una disolución patrón de 1000 mg/L. A cada disolución se le añadieron cantidades crecientes de NaCl, obteniendo 5 patrones con concentraciones de 0%(m/v), 0,3%(m/v), 0,6%(m/v), 0,9%(m/v), 1,2%(m/v) y 1,5%(m/v) de NaCl. Se realizaron lecturas por triplicado empleando los electrodos modificados con IIP-QDs mediante ambos métodos de modificación de superficie.

### **3.8.3. Determinación de concentraciones de $\text{Li}^+$ y recta de calibrado**

Para garantizar la precisión y exactitud del método de análisis, se realizaron medidas con los electrodos modificados con IIP-QDs a diferentes concentraciones de  $\text{Li}^+$  preparadas a partir de una disolución patrón de 1000 mg/L. Estas disoluciones se prepararon con agua ultrapura y NaCl al 0,9%(m/v). Se analizaron concentraciones crecientes de  $\text{Li}^+$ , a 0ppm, 1ppm, 5ppm, 10ppm, 15ppm y 20ppm. Para cada método se realizaron medidas por triplicado, y se realizó el experimento en dos días aislados para garantizar la reproducibilidad.

Mediante las lecturas obtenidas, se realizó una recta de calibrado que relaciona pico de altura medida en  $\mu\text{A}$  con concentración de  $\text{Li}^+$  en mg/L.

### **3.8.4. Estudio de interferencia: Efecto impronta y factor de selectividad**

Se comprobó la especificidad hacia el  $\text{Li}^+$  del polímero realizando mediciones con disoluciones de iones similares al  $\text{Li}^+$  en cuanto a carga o radio iónico, además de iones presentes en suero que puedan interferir en la medida de litio. Se emplearon disoluciones patrón a concentración 1000mg/L de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , además de las disoluciones a 0,9%(m/v) de NaCl preparadas anteriormente. A partir de estas disoluciones patrones se prepararon muestras de 10mg/L de cada analito, las cuales se midieron con los electrodos modificados con IIP y NIP, obtenidos por las técnicas PD y PIS.

Con los datos obtenidos se calculó el efecto impronta, que permite comparar la efectividad de reconocimiento del polímero, comparando los electrodos modificados en los que se empleó  $\text{Li}^+$  en la síntesis del polímero (IIP-QDs) con aquellos en los que no se usó (NIP-QDs). Además, se calculó el factor de selectividad, este compara la selectividad hacia el ion analito  $\text{Li}^+$  con respecto a otros iones, de los electrodos con impronta iónica (IIP) al igual que los que no tienen impronta iónica (NIP).

### 3.8.5 Evaluación de potenciostatos portátiles

Para la obtención de un método portátil, se estudiaron diferentes marcas de potenciostatos “do it yourself” (DIY) de bajo coste, considerando factores como precio, técnicas electroquímicas posibles, facilidad de uso, resolución de voltaje y rango de corriente.

## 4. Resultados y Discusión

El protocolo de síntesis de IIP-QDs fue adecuado, obteniendo un producto de forma segura y en 3 días de trabajo. Los QDs en los que se utilizó APTES, una vez secados, formaban aglomerados más compactos difícilmente resuspendibles en agua, por lo que se optó por utilizar PEG para la modificación de la superficie, por ser más fácilmente resuspendibles y aportar los mismos grupos funcionales amino que el APTES.

Durante el lavado del *template*, siguiendo el protocolo de Chang et al. (19), se realizaron lavados con HNO<sub>3</sub> 1M, pero se demostró que los QDs de ZnS no son estables en medio ácido y se descomponían, por lo que posteriormente se utilizó una disolución iónica con acetato de 1-hexil-3-metilimidazolio (A1E3MI) para el sangrado del litio.

### 4.1 Caracterización de QDs

#### 4.1.1 Análisis por difracción de Rayos X

En la Figura 6 se representa los difractogramas para la muestra de QDs de ZnS. En el eje X se representa el ángulo de incidencia y en el eje Y la intensidad en escala de raíz cuadrada para apreciar mejor los picos poco visibles. En la Figura 6A se distingue el difractograma experimental en rojo y el ajuste de los picos en azul. Los picos se analizan y se superponen con una base de datos estructural (Figura 6B), al cual se le asigna una estructura análoga “Disodium tetraaquabis(sulfato)iron(II)” (34).

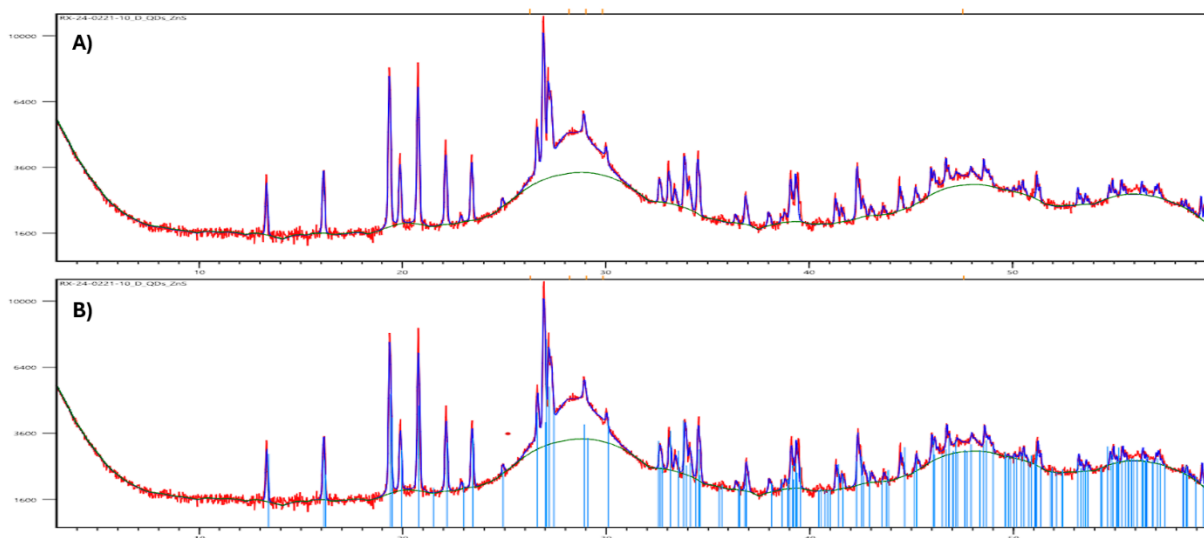


Figura 6: A) Análisis por difracción de rayos X para muestra ZnS-QDs. B) Superposición con estructura “Disodium tetraaquabis(sulfato)iron(II)”.

Las siguientes muestras presentes en la Figura 7 están menos cristalizadas, pues presentan picos de menor intensidad y más anchos, estas son IIP-QDs con el *template* Li<sup>+</sup> (A), IIP-QDs lavado (B) y NIP-QDs (C). El difractograma experimental se representa en verde y el simulado en azul. Estas muestras están menos cristalizadas por la polimerización realizada sobre su superficie, dándole un aspecto más plano.

Para estas estructuras, se calcularon las características matemáticas de las bandas, a partir de los cuales se calculó el tamaño cristalino mediante la aproximación de Scherrer (Figura 7D). Este tamaño calculado demostró ser similar al tamaño teórico de un QD, y resultó ser muy similar entre las diferentes muestras, demostrando que no hay cambio en el tamaño de la estructura cristalina entre el polímero de impronta molecular lavado y sin lavar, ni con el polímero sin impronta molecular.

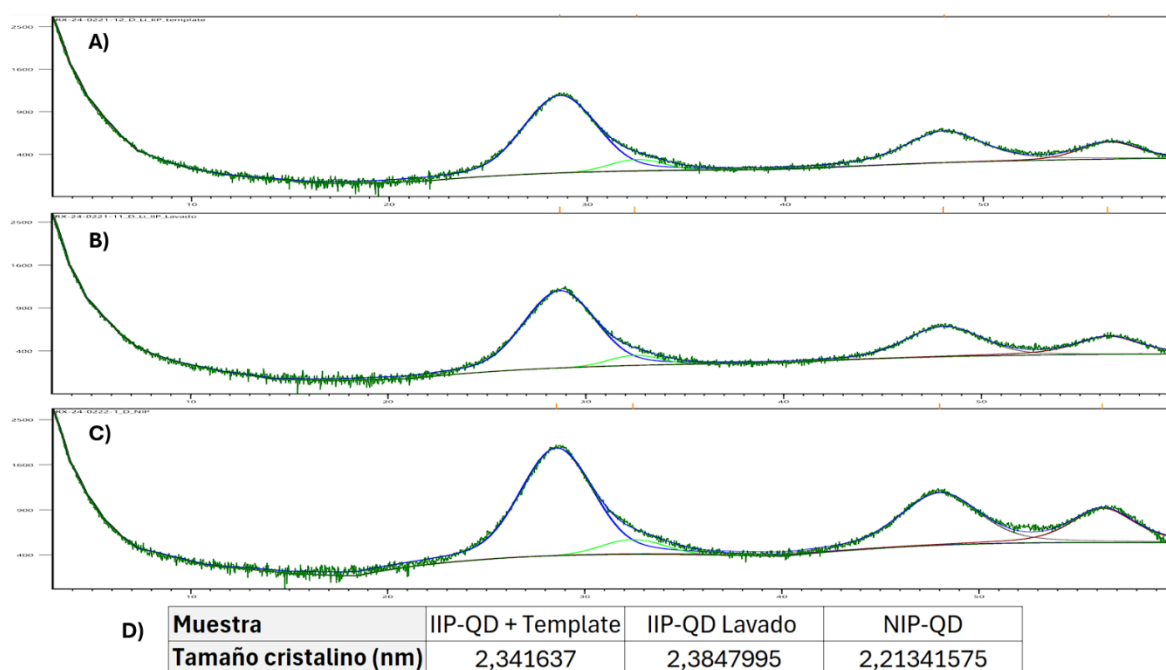


Figura 7: Análisis estructural por difracción de rayos X de las muestras A) IIP-QDs-template, B) IIP-QDs-lavado y C) NIP-QDs. D) Estimación de tamaño de estructuras cristalinas.

### 3.1.2 Análisis por HRTEM

El análisis por microscopía electrónica (Figura 8A) muestra que los QDs, debido al proceso de cristalización, forman aglomerados de mayor tamaño (1,2µm). Los tamaños observados para el aglomerado no son comparables por los obtenidos con la difracción de rayos X, puesto que este último analiza estructuras cristalinas aisladas.

Se consiguió realizar un análisis cualitativo mediante EDXRF (Figura 8B) y STEM-HAADF (Figura 8C). Las Figuras 8B y 8C reseñan la elevada concentración de S, Zn y O, que son los componentes principales de los QDs. Las lecturas por EDXRF en la Figura 8B muestran también señales para C y Cu, que son los materiales presentes en la rejilla donde se deposita la muestra. Cada punto observado en el análisis elemental en la Figura 8C corresponde con un cristal de QD, de tamaño nanométrico.

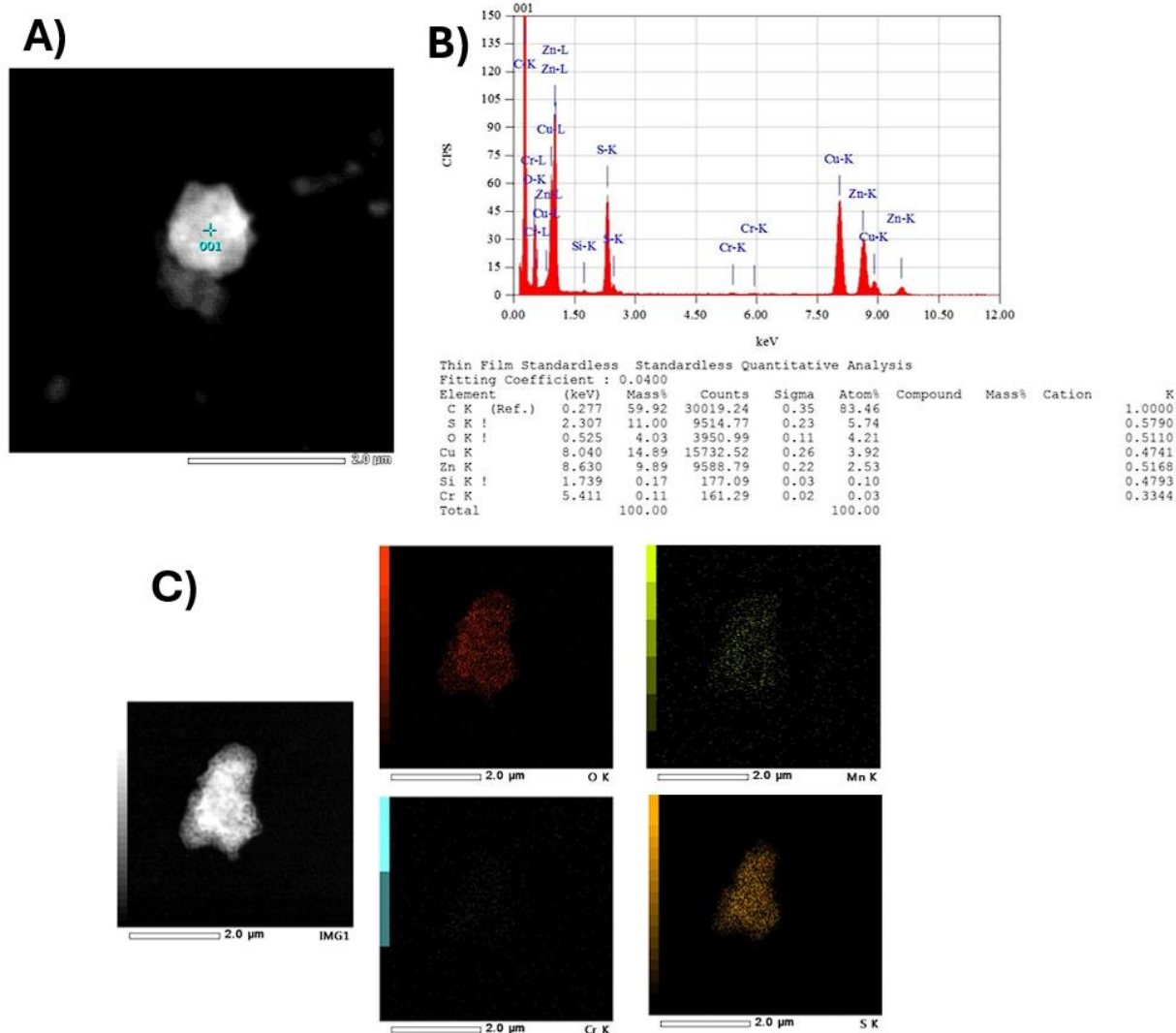


Figura 8: A) Análisis por HRTEM de QDs de ZnS. B) Caracterización cuantitativa mediante EDXRF. C) Mapeado con diferentes elementos con STEM-HAADF.

## 4.2 Estudios de fluorescencia

En primer lugar se obtuvo el espectro de excitación llevando a cabo un barrido de 220 a 800nm y empleando como 450nm como longitud de onda de emisión fluorescente (Figura 9A). Se detectaron longitudes de onda de excitación a 236, 472 y 706nm, aunque este último sea poco notable. Posteriormente se excitó la muestra a las longitudes de onda presentes en el espectro de excitación, representado en las Figuras 9B, 9C y 9D respectivamente, con el objetivo de hayar a qué longitud de onda se detecta una mayor emisión. El mayor pico de emisión se encuentra en 475,5nm cuando se excita la muestra a 236nm (Figura 9B).

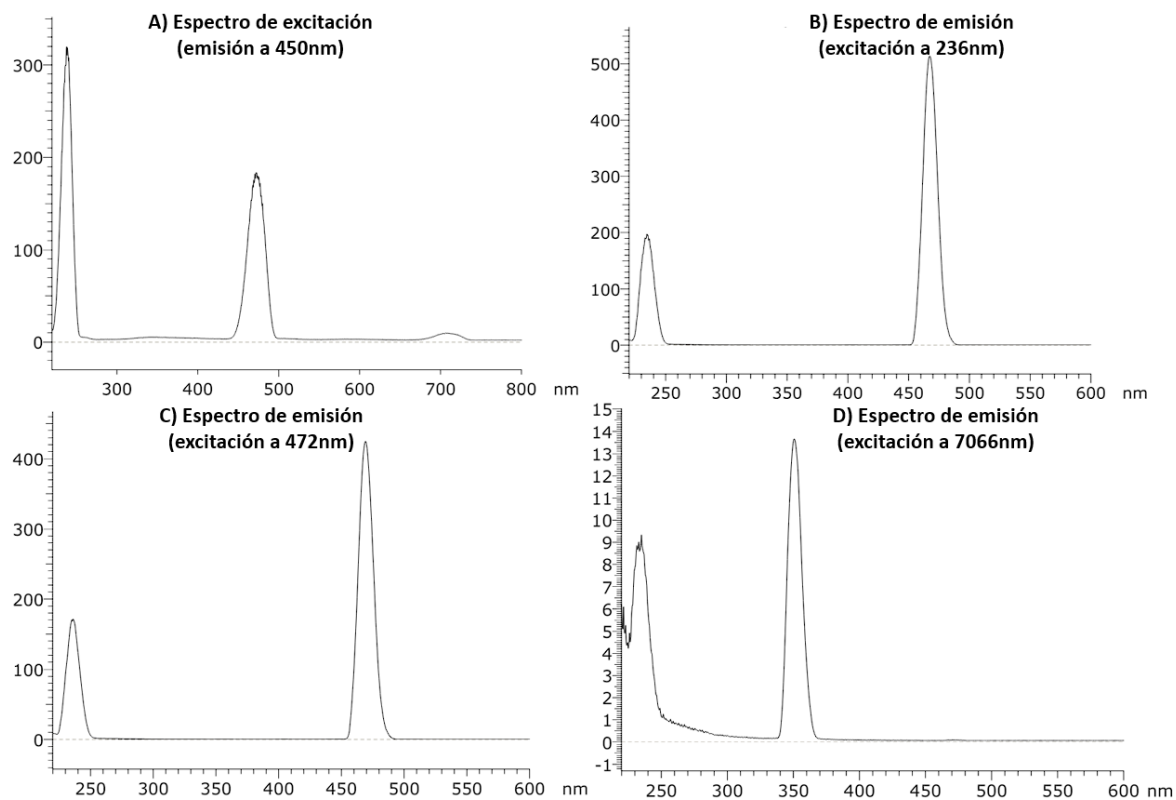


Figura 9: A) Espectro de excitación a una longitud de onda de detección de 450nm. B) Espectro de emisión para una longitud de onda de excitación de 236nm. C) Espectro de emisión para una longitud de onda de excitación de 472nm. D) Espectro de emisión para una longitud de onda de excitación de 706nm.

Una vez determinado el óptimo, se comprobará el efecto *quenching* ante la presencia de iones  $\text{Li}^+$ . Se realizaron medias de emisión con una muestra de 2mL de agua ultrapura con IIP-QDs a 100mg/L y  $\text{Li}^+$  a 1mg/L en el espectrofotómetro con excitación a 236nm (Figura 10), antes (A), después de añadir la disolución de  $\text{Li}^+$  (B), y 5 minutos después de añadirlo (C).

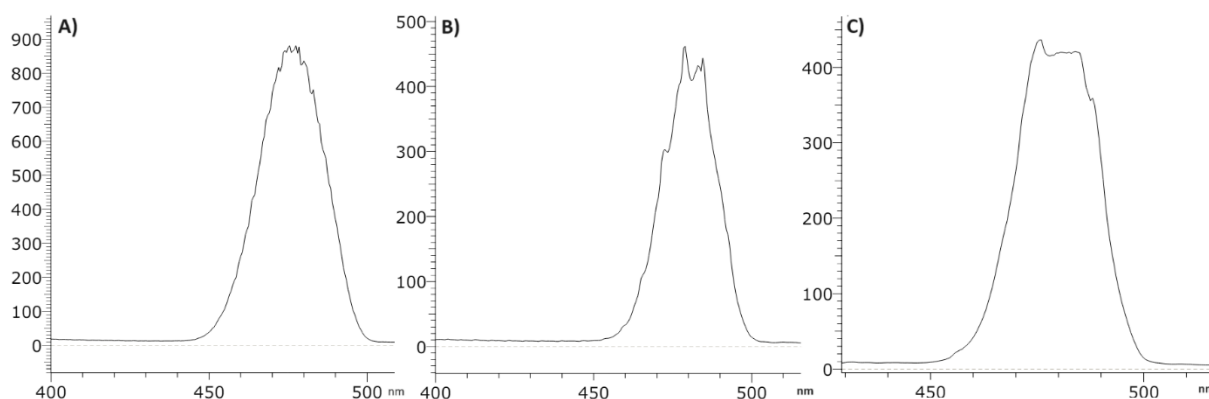


Figura 10: Espectro de emisión con excitación a 263nm de las muestras A) QDs 100mg/L, B) QDs 100mg/L +  $\text{Li}^+$  1mg/L y C) QDs 100mg/L, B) QDs 100mg/L +  $\text{Li}^+$  1mg/L tras 5 minutos de reacción.

Se consiguió una reducción de la fluorescencia por el efecto *quenching* nada más introducir la disolución de  $\text{Li}^+$ , lo cual es más apreciable al dejarle mayor tiempo de reacción a la muestra. Estudios posteriores con este método

pueden demostrar su utilidad en clínica, tratando de encontrar las características óptimas para el análisis cuantitativo de  $\text{Li}^+$  mediante fluorescencia. Estos pueden ser concentración óptima de electrolito, concentración óptima de QDs o tiempo óptimo de estudio.

### 4.3 Estudios de electroquímica con electrodos modificados

#### 4.3.1 Estudio de tiempo de equilibrio

Las medias tomadas a distintos tiempos se representan en la Figura 11, la cual demuestra que a mayor tiempo de equilibrio antes de realizar la medición, más aumenta la corriente en la superficie del electrodo, y que esta se igualaba a los 5min. Se fijó este como tiempo de equilibrio óptimo para la determinación de la corriente de disolución

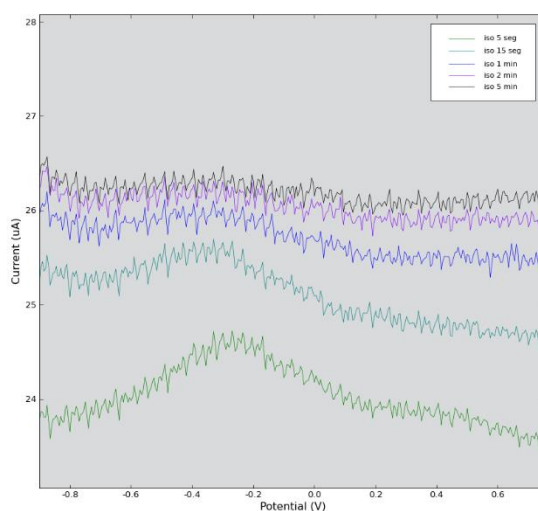


Figura 11: Captura de DropView. Cambios en corriente medida en función de tiempo de equilibrio.

#### 4.3.2. Estudio de concentración óptima de electrolito

La Figura 12A demuestra las alturas de los picos de lectura en  $\mu\text{A}$  para  $\text{Li}^+$ , obtenidos a distintas concentraciones de  $\text{NaCl}$  mediante ambos métodos de modificación de superficie de los electrodos. La Figura 12B representa las medias de las alturas. La respuesta se ve amplificada con concentraciones cerca de los 0,9%(m/v) y decae con concentraciones superiores. La Figura 13 muestra el mayor pico de  $\text{Li}^+$  medido, con concentración 0,9%(m/v)  $\text{NaCl}$ . Demostrada esta como concentración óptima de electrolito, se emplearon disoluciones con 0,9%(m/v)  $\text{NaCl}$  para el resto de experimentos.

Coincidentemente, este valor de concentración de electrolito se corresponde con la osmolaridad plasmática representada en % de  $\text{NaCl}$ , por lo que es una disolución isotónica con el plasma humano. Esto puede presentar una gran ventaja a la hora de realizar medidas reales en plasma de pacientes con tratamiento con carbonato de litio.

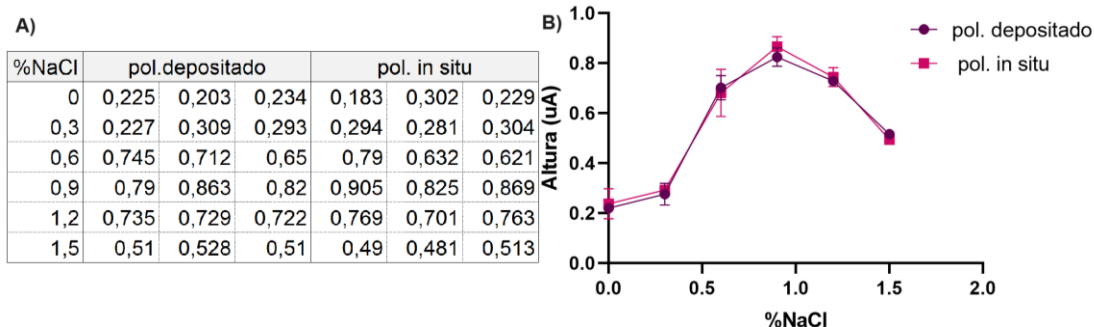


Figura 12: A) Medidas en  $\mu\text{A}$  de los picos obtenidos con disoluciones de  $\text{Li}^+$  10ppm a diferentes concentraciones de NaCl y B) representación de las medias.

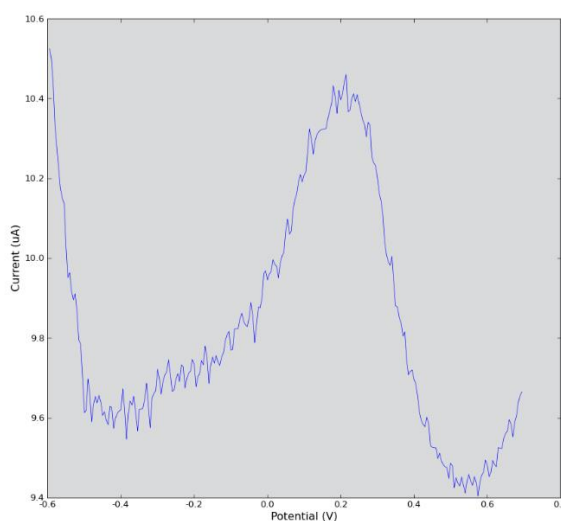


Figura 13: Pico máximo obtenido en el software DropView con  $\text{Li}^+$  a concentración de electrolito 0,9%NaCl.

#### 4.3.3. Determinación de concentraciones de $\text{Li}^+$ y recta de calibrado

Para cada muestra a distinta concentración de  $\text{Li}^+$  se midieron las alturas de los picos en  $\mu\text{A}$  por triplicado, tomándose medias en dos días aislados (Figura 14A). La representación de estos valores (Figura 14B) mostró un carácter ascendente de las medidas. Mediante regresión lineal se calcularon las pendientes de las rectas, y se observó que se obtiene un mayor coeficiente de determinación ( $R^2$ ) si se representan únicamente los 4 primeros puntos de la gráfica, obviando el punto correspondiente a concentración de  $\text{Li}^+$  20mg/L. Se tomaron las medias de las pendientes obtenidas en ambos días, obteniendo así un  $R^2$  y una pendiente única para cada método de modificación de superficie de los electrodos.

**A)**

DÍA 1						
[litio] (ppm)	pol.depositado			pol. in situ		
1	0,101	0,095	0,111	0,391	0,144	0,198
5	0,352	0,328	0,362	0,371	0,454	0,362
10	0,798	0,814	0,794	0,831	0,877	0,861
15	1,139	1,049	1,083	1,15	1,175	1,229
20	1,299	1,198	1,254	1,334	1,205	1,278

DÍA 2						
[litio] (ppm)	pol.depositado			pol. in situ		
1	0,157	0,108	0,21	0,115	0,156	0,214
5	0,375	0,391	0,46	0,421	0,492	0,309
10	0,765	0,842	0,831	0,798	0,824	0,905
15	1,08	1,12	1,159	1,139	1,06	1,11
20	1,187	1,231	1,272	1,159	1,274	1,219

**B)**

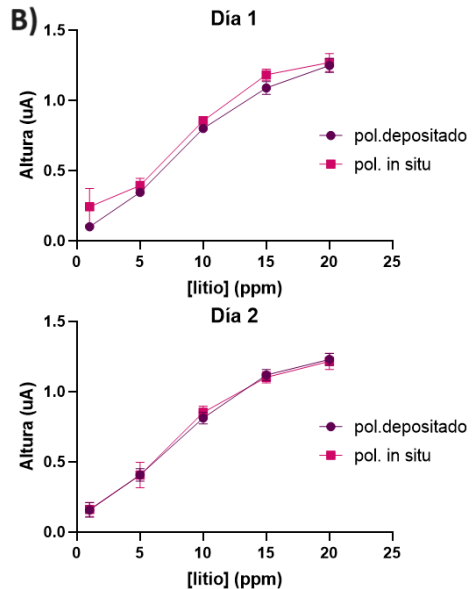


Figura 14: A) Lecturas obtenidas en dos días diferentes para concentraciones. B) Representación.

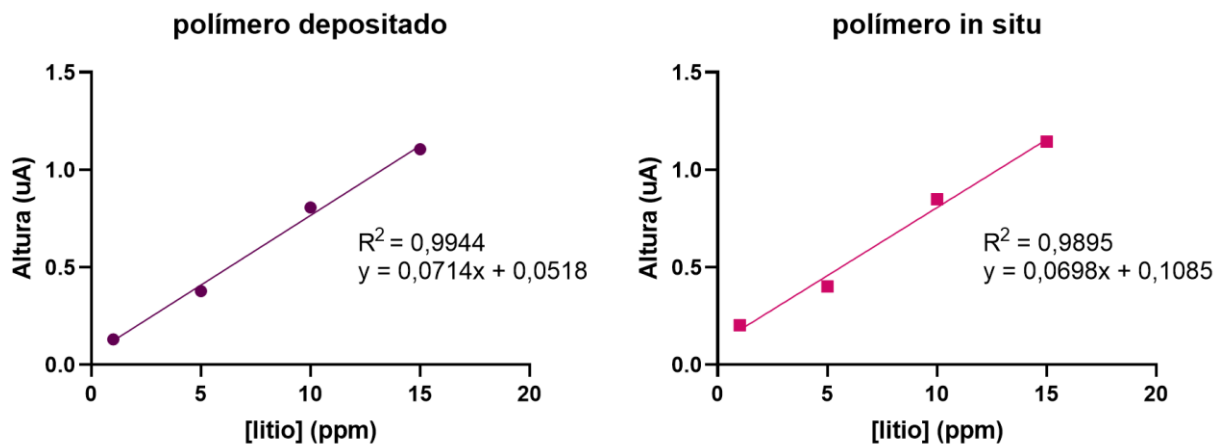


Figura 15: Rectas de calibrado para cada técnica de modificación de superficie de los electrodos.

Mediante las rectas de calibrado calculadas en la Figura 15, se puede obtener el valor de la concentración de  $\text{Li}^+$  a partir de la altura medida en  $\mu\text{A}$  por el método electroquímico. Ambos métodos de modificación de superficie demuestran un  $R^2$  elevado.

El valor suprimido para el cálculo de la recta de calibrado, correspondiente a 20mg/L no es necesario en la práctica. Como se referenció anteriormente, el valor mínimo de  $\text{Li}^+$  en plasma para el tratamiento del trastorno bipolar es de 0,8mEq/L, lo que corresponde con 5,55mg/L, y la concentración a partir de la cual aparecen efectos adversos es cerca de 1,5mEq/L, o 10,41mg/L. El rango de valores en los que la ecuación es lineal corresponde con los valores necesarios para la monitorización de  $\text{Li}^+$  en plasma. Esto resultará muy ventajoso en el análisis de pacientes reales, pues no hay necesidad de modificar la concentración o proporción del suero humano.

#### 4.3.4. Estudio de interferencia: Efecto impronta y factor de selectividad

Analito	Alturas Obtenidas (uA)				Efecto impronta		Factor de selectividad			
	IIP		NIP		p.d.	p.i.s.	p.d.		p.i.s.	
	$A_{IIP,pd}$	$A_{IIP,pis}$	$A_{NIP,pd}$	$A_{NIP,pis}$	$A_{IIP,pd}/A_{NIP,pd}$	$A_{IIP,pis}/A_{NIP,pis}$	$A_{IIP,pd(Li)}/A_{IIP,pd(x)}$	$A_{IIP,pd(Li)}/A_{NIP,pd(x)}$	$A_{IIP,pis(Li)}/A_{IIP,pis(x)}$	$A_{IIP,pis(Li)}/A_{NIP,pis(x)}$
Li+	0,848	0,837	0,103	0,306	8,233	2,735	1	8,233	1	2,735
Na+	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
K+	0,010	0,005	0,062	0,168	0,161	0,030	84,800	13,677	167,400	4,982
Ca <sup>2+</sup>	0,268	0,379	0,117	0,167	2,291	2,269	3,164	7,248	2,208	5,012
Mg <sup>2+</sup>	0,045	0,104	0,173	0,213	0,260	0,488	18,844	4,902	8,048	3,930
Zn <sup>2+</sup>	0,081	0,033	0,713	0,612	0,114	0,054	10,469	1,189	25,364	1,368
Fe <sup>2+</sup>	0,025	0,020	0,283	0,321	0,088	0,062	33,920	2,996	41,850	2,607
Cu <sup>2+</sup>	0,887	0,425	0,821	0,857	1,080	0,496	0,956	1,033	1,969	0,977

Figura 16: Alturas medidas con diferentes analitos interferentes y cálculo de efecto impronta y factor de selectividad.

Las medias de las alturas obtenidas tras tres medidas con cada analito aparecen representadas en la Figura 16, además de los valores calculados de efecto impronta y factor de selectividad, que permitieron buscar una posible explicación a las alturas obtenidas para cada ion estudiado.

A primera vista se aprecia que el IIP presenta mayores picos para el Li<sup>+</sup> que el NIP, tal y como se esperaba. El efecto impronta calculado para el Li<sup>+</sup> es elevado, demostrando que las interacciones con el polímero se realizan mediante los huecos específicos de unión. Sin embargo, el valor del efecto impronta obtenido con el método PD (8,2) es mayor que el calculado para PIS (2,7); por esta razón se determinó que los electrodos modificados mediante la deposición del polímero previamente sintetizado son capaces de medir Li<sup>+</sup> de manera más selectiva. Una razón para esta mayor selectividad es que la polimerización de superficie de este método se realizó en condiciones óptimas, con una cantidad de disolvente adecuada y en un bote hermético, mientras que en el otro método la polimerización ocurrió de manera directa sobre la superficie del electrodo y una alícuota de reactivo. Así se pudo haber obtenido un producto con huecos para los iones Li<sup>+</sup> más específicos.

Las medidas con Na<sup>+</sup> no produjeron ningún pico, demostrando que es un electrolito ideal de disolución, pues no produce interferencias. El resto de iones tienen valores bajos de efecto impronta, demostrando buena especificidad. Con el ion Ca<sup>2+</sup> se obtiene un efecto impronta de 2,2 para ambos métodos de síntesis, esto puede deberse que los huecos para el Li<sup>+</sup> son también afines a los iones Ca<sup>2+</sup>.

En la Figura 16 se calcularon dos factores de selectividad. El primero compara los picos selectivos para el Li<sup>+</sup> ( $A_{IIP(Li)}$ ) con las medidas obtenidas con el IIP para cada ion interferente ( $A_{IIP(x)}$ ), y el segundo factor de selectividad compara la misma altura selectiva obtenida con el Li<sup>+</sup> ( $A_{IIP(Li)}$ ), con cada medida obtenida con el NIP ( $A_{NIP(x)}$ ). Para la mayoría de iones interferentes, las alturas de los picos medidos fueron mayores con el NIP que con el IIP, esto puede deberse a que la corriente medida se debe a que los iones interactúan con el polímero por adsorción, y no por reconocimiento iónico (unión a los huecos específicos).

El factor de selectividad demuestra valores correctos con la mayoría de los iones, salvo para el  $\text{Ca}^{2+}$  por la razón previamente dada, y para el ion  $\text{Cu}^{2+}$ . El ion cobre (II) tiene valores de picos de corriente elevados tanto para las medidas con IIP como con NIP, esto se puede deber a que el ion  $\text{Cu}^{2+}$  se adhiere a la superficie del polímero con elevada afinidad, interfiriendo en las medias de  $\text{Li}^+$ . Una forma de lidiar con este problema a la hora de emplear muestras reales de suero humano sería tratar previamente las muestras con un agente quelante específico para iones  $\text{Cu}^{2+}$ .

#### 4.3.5 Evaluación de potenciostatos portátiles

Durante el estudio se contactó con fabricantes y usuarios de distintos potenciostatos para obtener más información. Entre los potenciostatos destacaron KickStat (28), con un precio cerca de 12\$, con el cual se demostró elevada precisión en el reconocimiento de muestras de cocaína con resultados que solo se alejaban un 0,6% de un potenciostato comercial; CheapStat (35), cerca de los 80\$, de mayor tamaño y resultados igualmente precisos, aplicando su uso en la detección de ADN; y ACEstat (36), rondando los 60\$, desarrollado por el cuerpo de ingenieros del ejército de los Estados Unidos, que se empleó para la detección de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), exhibiendo rapidez y precisión, además de la posibilidad de conectar a un dispositivo móvil de manera fácil. Se seleccionó KickStat por su capacidad de proporcionar resultados comparables a equipos comerciales a un bajo precio y remarcable pequeño tamaño y portabilidad.

Estos microcontroladores (Figura 17A) funcionan conectándose a un ordenador o teléfono móvil mediante un USB, y se controlan mediante un código introducido en software de programación adaptado a estas placas de circuito, como *Arduino*. Para su obtención se encargó su montaje, siguiendo las instrucciones de su autor, a una página web destinada al montaje de placas de circuito impreso o *Printed Circuit Boards* (PCB), como puede ser PCBWay.com. Se realizaron pruebas conectando estos circuitos a un ordenador mediante un cable USB y conectando los electrodos serigrafados con un Conector para SPE de Metrohm (Figura 17B).

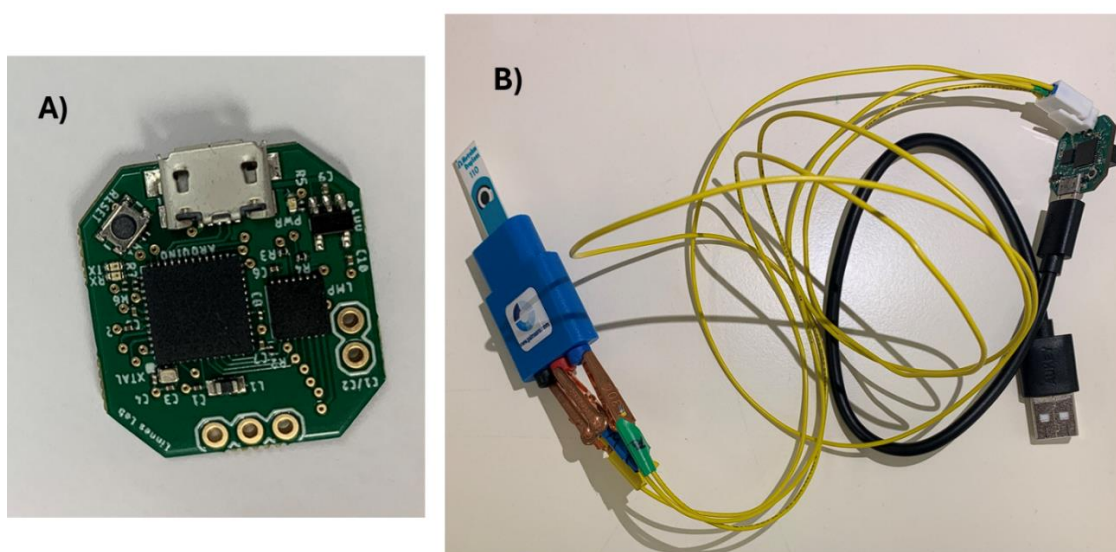


Figura 17: A) Placa de circuito KickStat B) Electrodo serigrafado integrado en un sistema de medición con un potenciostato portátil KickStat.

No se pudo comprobar el funcionamiento de KickStat por fallos en la etapa de bootloading, o carga de datos del software en el microcontrolador, aunque se demostró el funcionamiento de las placas de circuito. Sin embargo, se sientan las bases para la continuación en su investigación. La resolución de estos problemas de software puede posibilitar su aplicación clínica en la determinación in situ de  $\text{Li}^+$  en pacientes con tratamiento con carbonato de litio.

## 5. Conclusiones

Se desarrolló un método novedoso, sencillo y funcional para la futura detección de  $\text{Li}^+$  en muestras de pacientes tratados con carbonato de litio. La síntesis del polímero orgánico de recubrimiento para los QDs demostró ser capaz de captar selectivamente iones  $\text{Li}^+$ , salvo interferencias con iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , las cuales pueden ser evitadas mediante el tratamiento de las muestras previo a su análisis.

Se estudió y optimizó el análisis cuantitativo mediante mediciones electroquímicas con los electrodos modificados. Ambos métodos de adhesión de los QDs con cubierta polimérica demostraron elevada utilidad en la detección de  $\text{Li}^+$ . Además, se demostraron las propiedades de fluorescencia y *quenching* para una posible detección cuantitativa con un método de detección fluorimétrica.

Se obtuvieron potenciostatos portátiles de bajo coste, sin embargo, por falta de tiempo no fue posible obtener resultados positivos como se obtuvieron con el potenciostato comercial.

El uso de los nuevos electrodos de detección específica de  $\text{Li}^+$  junto a potenciostatos portátiles se presenta como una potencial alternativa más sencilla de monitorización para los pacientes tratados con carbonato de litio. Este trabajo sienta un precedente para la continuación en la investigación, reafirmando el uso futuro de biosensores para la monitorización terapéutica de fármacos.

## 6. Bibliografía

1. Martínez Hernández O, Montalván Martínez O, Betancourt Izquierdo EJ. Trastorno Bipolar. Consideraciones clínicas y epidemiológicas. *Rev.Med.Electrón.* 2019;41(2):467-82.
2. Suárez MZ, Montes MG, Jarabo DS, Forteza GL. Trastorno bipolar. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.* 2015;11(85):5075-85.
3. Barreto Aguirre LP. Descripción del mecanismo de acción del carbonato de litio, el valproato de sodio y la olanzapina como tratamiento farmacológico en pacientes diagnosticados con trastorno bipolar [Trabajo de grado - Pregrado]. Bogotá: Corporación Tecnológica de Bogotá; 2023.
4. Faus Soler M, Pérez Castelló IJFH. CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE UNA POBLACIÓN EN TRATAMIENTO CON LITIO A PARTIR DE SU CONFIGURACIÓN EN LA APLICACIÓN ABBOTTBASE PHARMACOKINETIC SYSTEM. *Farm Hosp.* 1998;22(6):295-9.
5. Chokhawala K, Lee S, Saadabadi A. Lithium. National Library of Medicine [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Ene. Lithium. 14 Ene 2024 [Consultado 12 Mar 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519062/>
6. Leslie Escobar QF. MONITORIZACIÓN TERAPÉUTICA DE FÁRMACOS Y ASPECTOS PRÁCTICOS DE FARMACOCINÉTICA. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2016;27(5):605-14.
7. Grizelj M, Crnković D, Kostanjšak L, Vrkić N, Karlović D. Comparison of Lithium Concentration in Serum, Plasma and Erythrocytes. *Alcoholism and psychiatry research.* 2017;53(2):99-114.
8. Parkin GM, McCarthy MJ, Thein SH, Piccerillo HL, Warikoo N, Granger DA, et al. Saliva testing as a means to monitor therapeutic lithium levels in patients with psychiatric disorders: Identification of clinical and environmental covariates, and their incorporation into a prediction model. *Bipolar Disord.* 2021;23(7):679-88.
9. Shetty SJ, Desai PB, Patil NM, Nayak RB. Relationship Between Serum Lithium, Salivary Lithium, and Urinary Lithium in Patients on Lithium Therapy. *Biological Trace Element Research.* 2012;147(1):59-62.
10. Winkelmann A, Morcillo D, Richter S, Recknagel S, Riedel J, Vogl J, et al. Determination of lithium in human serum by isotope dilution atomic absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2022;414(1):251-6.
11. Sánchez AI. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PUNTOS CUÁNTICOS DE PbSe CON APLICACIONES EN CELDAS FOTOVOLTAICAS CON CONFIGURACIÓN FTO/TiO<sub>2</sub>/CdS/PbSe/ZnS [Tesis de Maestría en Ciencias (Óptica)]. León, Guanajuato: Centro de Investigaciones en Óptica, A.C; Ago 2016.
12. Bera D, Qian L, Tseng T-K, Holloway PH. Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review. *Materials (Basel).* 2010;3(4):2260-345.
13. Zlateva G, Zhelev Z, Bakalova R, Kanno I. Precise Size Control and Synchronized Synthesis of Six Colors of CdSe Quantum Dots in a Slow-Increasing Temperature Gradient. *Inorganic Chemistry.* 2007;46(16):6212-4.
14. AM C. SÍNTESIS Y SOLUBILIZACIÓN DE QUANTUM DOTS: SU APLICACIÓN AL DESARROLLO DE SENSORES QUÍMICOS FOTOLUMINISCENTES [Tesis Doctoral]. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2012.
15. Manna L. The Bright and Enlightening Science of Quantum Dots. *Nano Lett.* 2023;23(21):9673-6.
16. Chantada-Vázquez MP, Sánchez-González J, Peña-Vázquez E, Tabernero MJ, Bermejo AM, Bermejo-Barrera P, et al. Synthesis and characterization of novel molecularly imprinted polymer-coated Mn-doped ZnS quantum dots for specific fluorescent recognition of cocaine. *Anal Chem.* 2016; 75:213-21.
17. Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry.* 2001;370(7):795-802.

18. Kusumkar VV, Galamboš M, Viglašová E, Daňo M, Šmelková J. Ion-Imprinted Polymers: Synthesis, Characterization, and Adsorption of Radionuclides. *Materials (Basel)*. 2021;14(5).
19. Chang L, Xiaopei Z, Weifeng L, Xingfu S, Shuying S, Dongju F, et al. Thermo-responsive ion imprinted polymer on the surface of magnetic carbon nanospheres for recognizing and capturing low-concentration lithium ion. *Minerals Engineering*. 2023; 201:108210.
20. Li R, Tang L, Zhao Q, Teng KS, Lau SP. Facile synthesis of ZnS quantum dots at room temperature for ultra-violet photodetector applications. *Chemical Physics Letters*. 2020; 742:137127.
21. Shao H, Li C, Ma C, Sun L, Chen R, Cheng R, et al. An ion-imprinted material embedded carbon quantum dots for selective fluorometric determination of lithium ion in water samples. *Microchimica Acta*. 2017;184(12):4861-8.
22. Harvey D. *Analytical Chemistry 2.1* [Internet]. DePauw University, Greencastle, Indiana: Libretexts; 2016. [revisado 2019; consultado 23 mar 2024]. Disponible en: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Analytical\\_Chemistry\\_2.1\\_\(Harvey\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey))
23. Flores EJRDQ. Voltametría cíclica: la espectroscopía electroquímica. Parte I. *PUCP Revista de Química*. 1995;9(2):165-72.
24. Choi, Seyoung, Kang, Jihyeon, Jang, Seohyeon, et al. Evaluating the Electrochemical Properties of Supercapacitors using the Three-Electrode System. *J Vis Exp*. 2022 Jan 7;(179)
25. PalmSens. Potentiostat [Internet]. Vleugelboot, Países Bajos; 2022 [consultado 11 Mar 2024]. Disponible en: <https://www.palmsens.com/potentiostat/>.
26. Spinner N. What is a Potentiostat and how does it work? [Internet]. Durham, NC: Pine Research Instrumentation ;2023.[revisado 3 jun 2023; consultado 21 feb 2024] .Disponible en: <https://pineresearch.com/shop/kb/theory/instrumentation/what-potentiostat-does/>.
27. Garzon V, Pinacho DG, Bustos RH, Garzon G, Bustamante S. Optical Biosensors for Therapeutic Drug Monitoring. *Biosensors (Basel)*. 2019;9(4).
28. Hoilett OS, Walker JF, Balash BM, Jaras NJ, Boppana S, Linnes JCJS. KickStat: A coin-sized potentiostat for high-resolution electrochemical analysis. *Sensors*. 2020;20(8):2407.
29. Jinadasa KK, Peña-Vázquez E, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. New adsorbents based on imprinted polymers and composite nanomaterials for arsenic and mercury screening/speciation: A review. *Microchemical Journal*. 2020; 156:104886.
30. Stan D, Mirica A-C, Iosub R, Stan D, Mincu NB, Gheorghe M, et al. What Is the Optimal Method for Cleaning Screen-Printed Electrodes?. *Processes*.2022;10(4):723.
31. Bali Prasad B, Kumar A, Singh R. Synthesis of novel monomeric graphene quantum dots and corresponding nanocomposite with molecularly imprinted polymer for electrochemical detection of an anticancerous ifosfamide drug. *Biosensors & bioelectronics*. 2017; 94:1-9.
32. Yao Z, Yang X, Liu X, Yang Y, Hu Y, Zhao Z. Electrochemical quercetin sensor based on a nanocomposite consisting of magnetized reduced graphene oxide, silver nanoparticles and a molecularly imprinted polymer on a screen-printed electrode. *Microchimica Acta*. 2017;185(1):70.
33. Wei W, Xu J, Chen W, Mi L, Zhang J. A Review of Sodium Chloride-based Electrolytes and Materials for Electrochemical Energy Technology. *Journal of Materials Chemistry A*. 2022;10.
34. Hudák M, Díaz JG, Kožíšek J. Disodium tetra-aqua-bis(sulfato)iron(II). *Acta crystallographica Section E, Structure reports online*. 2008;64(Pt 2):i10.
35. Rowe A, Bonham A, White R, Zimmer M, Yadgar R, Hobza T, et al. CheapStat: An Open-Source, "Do-It-Yourself" Potentiostat for Analytical and Educational Applications. *PloS one*. 2011;6:e23783.

36. Brown EW, Glasscott MW, Conley K, Barr J, Ray JD, Moores LC, et al. ACEstat: A DIY Guide to Unlocking the Potential of Integrated Circuit Potentiostats for Open-Source Electrochemical Analysis. *Analytical chemistry*. 2022;94(12):4906-12.

## **7. Agradecimientos**

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han acompañado durante este proyecto:

A mi tutor Dr. Álvaro Goyanes, por su dirección, consejos y la gran oportunidad de trabajar junto a él.

Al grupo de investigación del departamento de Química Analítica de la facultad de Química, y en especial al Dr. Antonio Moreda , por su disposición, orientación y dedicación a la hora de trabajar en el laboratorio.

Por último, a mis amigos, familiares y a mi pareja, por toda vuestra paciencia y apoyo durante toda mi carrera universitaria.

Gracias.