

(BIO)SENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN POLÍMEROS (POLIBIOSENS)

Palacios-Santander, JM, García-Guzmán, JJ, Sierra-Padilla, A, López-Iglesias, D, Bellido-Milla, D, Cubillana-Aguilera, L

Equipo de investigación Instrumentación y Ciencias Ambientales (FQM-249), Instituto IMEYMAT, Universidad de Cádiz.

Los sensores y biosensores electroquímicos muestran importantes ventajas frente a otras herramientas de análisis: simplicidad, buena reproducibilidad, bajo coste, alta sensibilidad y corto tiempo de respuesta. Además, si conjugamos estas ventajas con las de los polímeros conductores: conductividad eléctrica a medida gracias al dopaje electrónico, alta estabilidad ambiental y biocompatibilidad, el dispositivo resultante goza de unas prestaciones analíticas difícilmente igualables, que lo hacen muy valioso como herramienta de campo para medidas *in situ*, en continuo y en tiempo real, ya sea a nivel industrial, agroalimentario o incluso biomédico.

El grupo de investigación FQM-249 de la Universidad de Cádiz, en colaboración con grupos de investigación de Marruecos, Italia y Rumanía, entre otros países, así como con empresas de la región (Ubrisecurity, S.L.) e instituciones sanitarias como el Hospital Universitario de Puerto Real (Cádiz), lleva varias décadas investigando en este tipo de dispositivos, fundamentalmente, de tipo electroquímico, aunque también se han diseñado (bio)sensores de tipo óptico. Un buen ejemplo de ello es un biosensor para lactato cuya composición es la siguiente: electrodo serigrafado + mediador redox + capa enzimática con nanopartículas + biopolímero 1 + biopolímero 2 + membrana polimérica aniónica. La deposición de las distintas capas se lleva a cabo conjugando la técnica de *drop-casting* con la de *spin-coating* y favoreciendo la inmovilización de la enzima. El biosensor da respuesta lineal en el intervalo de 0,1 a 20 mM y presenta una buena sensibilidad. Los errores de repetibilidad y de reproducibilidad son inferiores al 1% y al 3%, respectivamente. Igualmente, la selectividad es excelente, ya que permite determinar lactato en presencia de cantidades muy superiores de ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina y glucosa, principales interferentes del analito en cuestión. Actualmente, se encuentran pendiente de publicación varios artículos al respecto: una revisión sobre el estado del arte de biosensores de lactato y sus aplicaciones biomédicas y en la industria agroalimentaria, y otro sobre la fabricación y aplicación biomédica del biosensor obtenido en el grupo de investigación.

En relación a los polímeros magnéticos impresos molecularmente (MMIPs), que se emplean habitualmente como sensores biomiméticos por su capacidad para emular los binomios enzima-sustrato o antígeno-anticuerpo existentes en la naturaleza, hay que resaltar la síntesis de un MMIP mediante ultrasonidos de alta energía para la determina-

ción electroquímica de un contaminante emergente que se encuentra en muchos tipos de contenedores plásticos empleados actualmente: el bisfenol A. La novedad de esta investigación radica, fundamentalmente, en el empleo de una nueva aproximación teórica, basada en la teoría del funcional de la densidad (DFT), con idea de encontrar el monómero y el disolvente porógeno más apropiados para diseñar el MMIP específico para el analito en cuestión. A partir de los cálculos del HOMO y del LUMO, así como del potencial electrostático molecular de las interacciones bisfenol A-monómero, se concluyó que tanto el ácido metacrílico como la acrilamida mostraban una buena afinidad hacia el bisfenol A, mientras que el disolvente más apropiado para favorecer dicha interacción era la acetona. Los MMIPs sintetizados a partir de los resultados de la DFT fueron caracterizados mediante STEM, TGA, FTIR y DRX y, posteriormente, fueron aplicados como absorbentes para la extracción en fase sólida acoplada a la detección electroquímica de bisfenol A, obteniendo un límite de detección muy bajo de 66 nM y unas recuperaciones en agua muy próximas al 100%. Por otra parte, y empleando una estrategia similar, se desarrolló un procedimiento simple y rápido de síntesis de MMIP a partir de microondas para determinar, en este caso, sulfametoxazol, un antibiótico ampliamente empleado en humanos y animales de granja. Se emplearon las mismas técnicas de caracterización de materiales que en el caso anterior, pero se utilizó la espectrofotometría UV/vis para determinar el analito. Se obtuvo un límite de detección de 0,59 µM y recuperaciones muy cercanas al 100% en agua del grifo para un MMIP a base de ácido metacrílico. Estas investigaciones se han publicado en varias revistas científicas de alto impacto indexadas en JCR: *Materials Science & Engineering B*, en la categoría *Materials Science, Multidisciplinary* (129/335), con un factor de impacto de 4.051 (2020): <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2021.115568>, y *Talanta*, en la categoría *Chemistry, Analytical* (12/83), con un factor de impacto de 6.057 (2020): <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122430>, respectivamente. Además, se ha generado una tercera publicación en la forma de un capítulo de libro publicado con la prestigiosa editorial *The Royal Society of Chemistry* (ISBN 978-1-83916-210-7), titulado: 'Analytical Applications of Molecularly Imprinted Polymer-decorated Magnetic Nanoparticles', <https://doi.org/10.1039/9781839162756>. Los tres trabajos se han desarrollado en colaboración con la Universidad Hassan II de Casablanca en Mohamedia (Marruecos).

Por una parte, dentro de la línea de investigación enfocada

La selectividad es excelente, ya que permite determinar lactato en presencia de cantidades muy superiores de ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina y glucosa, principales interferentes del analito en cuestión.

al desarrollo de (bio)sensores basados en polímeros conductores, se han finalizado los estudios conducentes a la obtención del material Sonogel-Carbono-PANI y su empleo en sensores electroquímicos para la determinación de 4-cloro-3-metilfenol en aguas. Esta investigación ha sido posible gracias a la colaboración del Prof. Dr. Rodrigo Alcántara Puerto, perteneciente al grupo de investigación ‘Simulación, Caracterización y Evolución de Materiales’ del Dpto. de Química-Física de la UCA, una estudiante Erasmus de la Universidad de Bradford (UK) y la Prof^a. Dra. Marina Cocchi, de la Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia (Italia), publicándose un artículo en la revista Journal of Electroanalytical Chemistry, indexada en JCR en la categoría Chemistry, Analytical (20/83), con un factor de impacto de 4.464: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115971>. Igualmente, cabe resaltar también nuestras investigaciones basadas en la síntesis rápida, verde, simple, en un solo paso y sin usar plantillas de un material nanocompuesto a base de nanofibras de polianilina y nanopartículas de oro, empleando ultrasonidos de alta energía. El nanocompuesto PANI-AuNPs fue caracterizado me-

dante SEM, TEM, EDS, FTIR y técnicas electroanalíticas (voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica); posteriormente, se utilizó como matriz de inmovilización en electrodos Sonogel-Carbono para fijar la enzima glucosa oxidasa. El biosensor resultante se aplicó a la determinación de glucosa en muestras reales de vino tinto y blanco, con recuperaciones excelentes. Esta investigación, junto con una revisión enfocada hacia el empleo de polímeros conductores y materiales compuestos en lenguas y narices electrónicas, se han publicado en la revista Sensors, indexada en la categoría Instruments & Instrumentation (17/64) del JCR, con un factor de impacto de 3.576 (2020): <https://doi.org/10.3390/s21248470> y <https://doi.org/10.3390/s21154976>, respectivamente.

Por otra parte y relacionado íntimamente con la línea de investigación anterior, hay que destacar los trabajos desarrollados en colaboración con el grupo de las Prof^{as}. Chiara Zanardi y Laura Pigani de la Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, en Módena – Italia, y con el grupo del Prof. Stelian Lupu de la Universidad Politécnica de

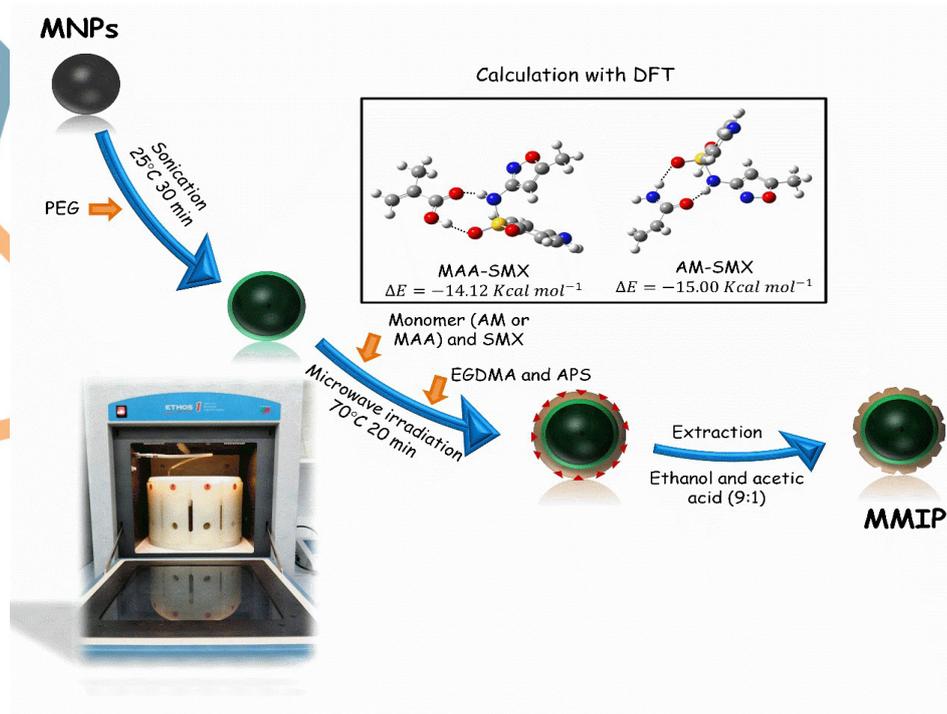


Figura 1. Proceso de síntesis mediante microondas de un material compuesto MMIP (polímero magnético impreso molecularmente) empleando ácido metacrílico o acrilamida como precursores, tras la optimización mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT); el disolvente porógeno empleado es acetona. El material soporte está constituido por nanopartículas magnéticas. Tras la síntesis en presencia de la molécula objetivo (sulfametoxazol) que actúa como plantilla, se extrae dicha especie con una mezcla 9:1 de etanol:ácido acético y se obtiene el MMIP listo para ser empleado en procesos de extracción en fase sólida del analito modelo. (DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122430).

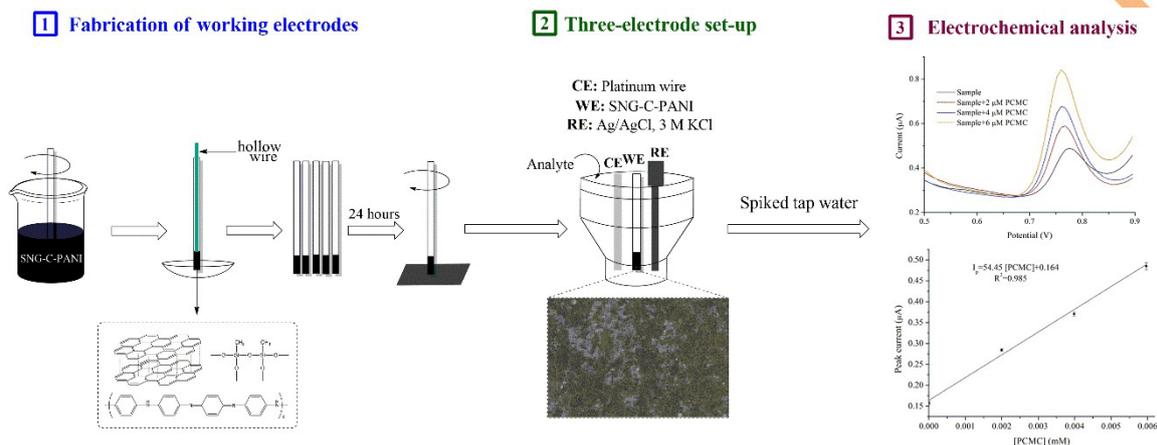


Figura 2. Procedimiento de fabricación del nuevo electrodo Sonogel-Carbono-PANI (polianilina) y su aplicación a la determinación electroanalítica de 4-cloro-3-metilfenol. En primer lugar, una vez irradiada con ultrasonidos de alta energía, se adiciona grafito en polvo a la mezcla de silano precursor y catalizador; se homogeniza y se procede al relleno de los capilares de vidrio que formarán el cuerpo del electrodo Sonogel-Carbono-PANI. Tras 24 h de secado, se pule suavemente el material que sobresale por uno de los extremos del capilar y, por el extremo libre, se inserta un alambre de cobre que conectará el material con el aparato de medida. Dicho electrodo se emplea posteriormente como electrodo de trabajo en una celda electroquímica para determinar el analito en estudio: 4-cloro-3-metilfenol en varias muestras de aguas (DOI: 10.1016/j.jelechem.2021).

Bucarest (Rumanía), éste último también en colaboración con la Dra. Cecilia Lete, del Instituto de Química-Física ‘Ilie Murgulescu’ de la Academia Rumana en Bucarest (Rumanía). En el primer caso, la investigación se basa en la detección simultánea de glucosa y fructosa en mostos sintéticos empleando técnicas de análisis multivariante y electrodos Sonogel-Carbono modificados internamente con AuNPs. Este trabajo es una prueba de concepto, con idea de estudiar la posibilidad de aplicar posteriormente la metodología desarrollada en la determinación de ambos analitos en muestras reales de mosto. El trabajo se publicó también en la revista *Sensors*: <https://doi.org/10.3390/s21124190>. En el segundo caso, se han publicado sendas investigaciones relacionadas con el empleo de electrodos Sonogel-Carbono modificados con AuNPs para la determinación de melatonina en suero humano, con un límite de detección de 8,4 nM (publicado en la revista *Sensors*: <https://doi.org/10.3390/s22010120>), y de electrodos Sonogel-Carbono electrodepositados conjuntamente con poli(3,4-etilendioxitiofeno) y AgNPs, mediante la técnica recientemente desarrollada de voltajes sinusoidales, para la detección de antioxidantes, expresados en equivalentes

de ácido cafeico (límite de detección de 1,9 μM) en zumos de frutas. Esta investigación se ha publicado en la revista científica internacional de alto impacto *Electrochimica Acta*, indexada en la categoría *Electrochemistry* (8/29) del JCR, con un factor de impacto de 6.901: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.139082>.

Finalmente, se han completado con éxito dos estudios relacionados con biosensores. El primero de ellos trata de estudiar la posibilidad de obtener biosensores basados en nanopartículas magnéticas (MNPs) verdes (sintetizadas mediante ultrasonidos de alta energía en tan sólo 1 minuto), recubiertas de ácido cítrico y con enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) inmovilizada sobre su superficie, que sean resistentes a la inhibición provocada por metales pesados como el Hg(II) o el pentaclorofenol. El biosensor obtenido en este estudio es capaz de determinar H₂O₂ en presencia de ambos inhibidores, con resultados bastante aceptables y prometedores en muestras reales de agua. El otro estudio está relacionado con el diseño de un biosensor basado también en la misma estrategia, pero con la enzima glutamato deshidrogenasa inmovilizada. Dicho biosensor

La investigación se basa en la detección simultánea de glucosa y fructosa en mostos sintéticos empleando técnicas de análisis multivariante y electrodos Sonogel-Carbono modificados internamente con AuNPs.

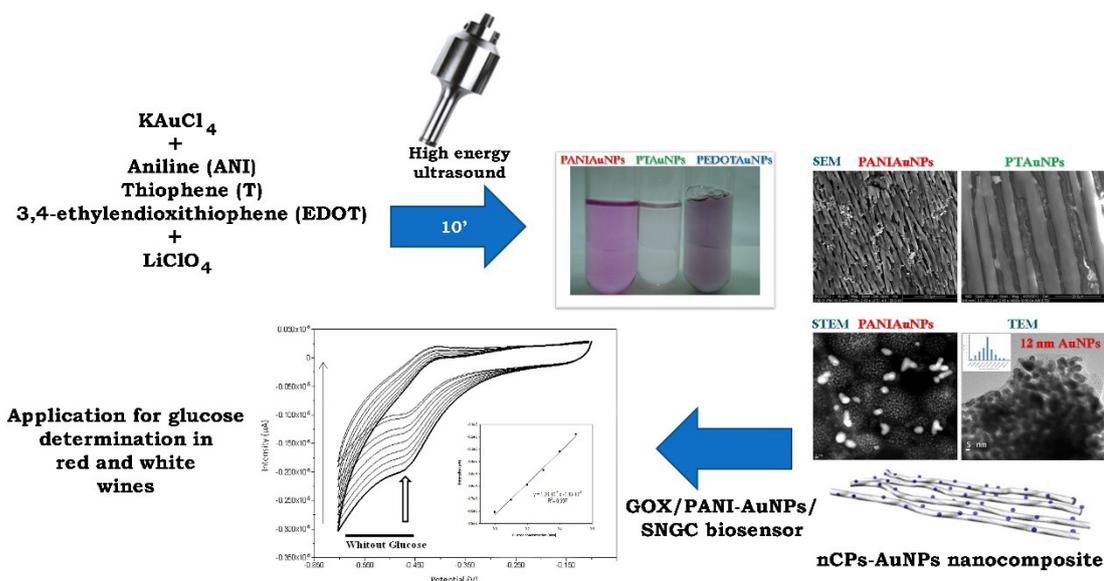


Figura 3. Procedimiento de síntesis conjunta de un material nanocompuesto constituido por nanofibras de diversos polímeros conductores (polianilina, poli(3,4-etilendioxitiofeno) y politiofeno) decoradas con nanoparticulas de oro (AuNPs) empleando ultrasonidos de alta energía. Las nanofibras de polianilina decoradas con AuNPs presentan un grosor cercano a los 100 nm y se emplean como soporte de inmovilización de la enzima glucosa oxidasa para construir un biosensor. Este dispositivo analítico se aplica para determinar glucosa en muestras de vino tinto y blanco. (DOI: 10.3390/s21248470).

forma parte del diseño de una metodología en dos pasos para la detección de carbamato de etilo (posible sustancia cancerígena) en vinos. En la primera etapa, un biosensor basado en la enzima uretanasa transformaría el carbamato de etilo en amonio y, luego, el biosensor de glutamato deshidrogenasa utilizaría el amonio como co-sustrato, permitiendo la detección espectrofotométrica de la transfor-

mación del NADH en NAD⁺. Este último estudio se ha realizado en colaboración con el Prof. Dr. Gustavo Adolfo Cordero Bueso, del Dpto. de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública de la UCA. Ambas investigaciones no están completadas aún y se espera obtener resultados finales en futuros estudios.



El Dr. José María Palacios Santander se doctoró en 2003 en la Universidad de Cádiz con una Tesis Doctoral con Mención Internacional y Premio Extraordinario de Doctorado. Obtuvo una beca 'José Castillejo' en 2008 y colabora con varios grupos de investigación a nivel nacional e internacional (Marruecos, Italia, Rumanía, Cuba, etc.). Es Profesor Titular de Universidad desde 2017 e IP del grupo de investigación FQM-249: 'Instrumentación y Ciencias Ambientales' desde 2018, desempeñando sus labores docentes, de investigación y gestión en el Dpto. de Química Analítica de la Universidad de Cádiz.