

LOS BIOSENSORES EN LA QUIMICA ANALITICA MODERNA

M.Sc. Conrado Camacho Campos

Facultad de Agronomía. Centro de Tecnología Enzimática (CETENZ). *Universidad de Matanzas*
“Camilo Cienfuegos”. *Vía Blanca Km.3, Matanzas, Cuba.*

RESUMEN

Los biosensores son dispositivos analíticos en los que se combinan, en una interfase dada, elementos de carácter biológico con materiales electrónicos. Estos sensores poseen un mercado establecido y creciente en laboratorios analíticos, en el diagnóstico médico y monitoreo de pacientes, en procesos tecnológicos industriales, en tecnología militar y aeronáutica, la agricultura y en el monitoreo y control del medio ambiente, entre otras muchas aplicaciones.

La principal limitante en su desarrollo se basa en la estabilización e inmovilización del medio biológico, capaz de determinar la presencia selectiva de los analitos presentes en la muestra, realizándolo de manera productiva y compatible con las técnicas de la microelectrónica ya establecidas.

La siguiente monografía se propone introducirlo en el mundo de la Electroquímica Analítica con Biosensores así como exponer su importancia en el futuro de la sociedad moderna por su diversidad de aplicaciones.

Palabras claves: biosensor, ciclodextrinas, enzimas.

Introducción

El aumento acelerado de la población, en los últimos decenios, unido a la demanda creciente de bienes de consumo y servicios, ha provocado que la humanidad enfrente peligros reales relacionados fundamentalmente con las esferas de la salud, la alimentación, el medio ambiente y la energía.

El empleo de tecnologías limpias o no contaminantes, el consumo por parte de la comunidad mundial de productos biodegradables o reciclables, así como el incremento en el control de calidad de las producciones y sobretodo de las emisiones al medio ambiente se impone cada día más. Como resultado de esto, la investigación científico técnica ha dirigido sus pasos a la identificación, producción e implementación de nuevos productos o tecnologías que se basan en la utilización de compuestos de origen biológico.

Uno de los principales objetivos de la Química Analítica Moderna es la determinación selectiva de los analitos a bajos niveles de concentración y en presencia de sustancias interferentes. Los considerables avances acontecidos en la instrumentación analítica han dado lugar a una mejora en la selectividad, incluso en el análisis de trazas, debido al desarrollo de técnicas tales como: cromatografía de gases, HPLC, espectrometría de masas, etc; pero son técnicas de elevado costo y en general requieren del tratamiento previo de la muestra.

El desarrollo de sistemas de sensores altamente sensibles, específicos y resistentes a las condiciones donde serán empleados constituye un tópico de gran interés investigativo en la actualidad. Este interés está fundamentado por la necesidad vigente de contar con sistemas analíticos confiables para la cuantificación de determinados compuestos orgánicos asociados con diversas patologías, procesos industriales y contaminación ambiental. Tales sistemas analíticos, y en especial los electroquímicos, ofrecen innumerables ventajas con

respecto a los actuales métodos ópticos de análisis y se vaticinan como los futuros aditamentos portátiles necesarios para el desarrollo de un sistema médico tele-asistido a nivel mundial.

El desarrollo de nuevos y originales métodos orientados a mejorar la estabilidad de las enzimas, así como de incrementar la efectividad de su inmovilización en diferentes electrodos constituye la piedra angular de estas nuevas tecnologías altamente sensibles.

Nos proponemos con la siguiente monografía introducir a aquellos que la lean en el fabuloso mundo de la Electroquímica Analítica con Biosensores así como exponer su importancia en el futuro de la sociedad moderna por su diversidad de aplicaciones.

Desarrollo

Los seres vivos son capaces de reconocer y adaptarse a los diversos cambios químicos de su metabolismo o del entorno con elevada selectividad y sensibilidad gracias a la presencia de estructuras llamadas receptores. Estos sistemas receptores tienen estructuras de proteínas complejas unidas en la mayoría de los casos a las membranas celulares y presentan una gran afinidad hacia los ligandos específicos como pueden ser hormonas, enzimas o anticuerpos. La elevada especificidad y selectividad de los receptores biológicos los convierten en unas sustancias especialmente atractivas para el desarrollo de sensores o biosensores con múltiples aplicaciones en la sociedad moderna.

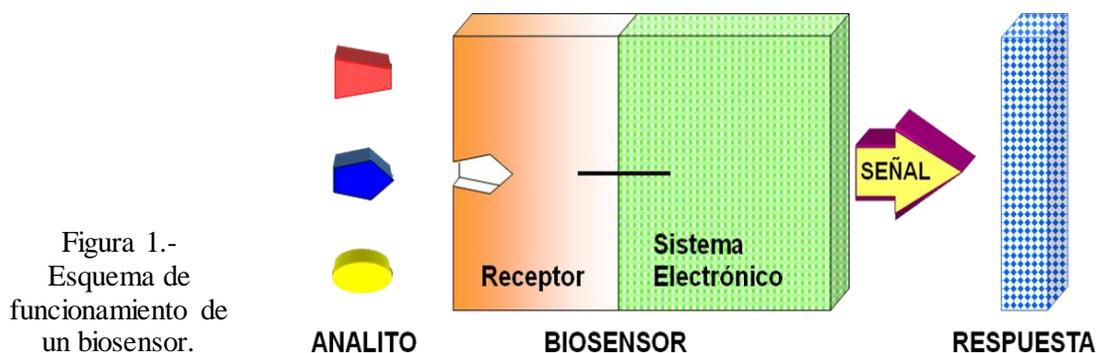
El desarrollo de los biosensores es un área interdisciplinaria cuyos límites no pueden ser definidos con facilidad. El concepto de biosensor para muchos autores es un dispositivo analítico en sí mismo responde selectiva y reversiblemente a la actividad o a la concentración de especies químicas en muestras biológicas. Cualquier sensor operado químicamente o físicamente en muestras biológicas puede ser considerado un biosensor.

En 1956 el principio del papel litmus para la medida del pH fue adoptado para simplificar la determinación enzimática de glucosa. Por impregnación del papel de filtro con enzimas específicas de glucosa se crearon las primeras “tiras de test enzimático”. Este dispositivo puede considerarse como el predecesor de los biosensores ópticos, y al mismo tiempo, el inicio de la llamada “química seca”.

Clark y Lyons (1962) propusieron la inmovilización de una capa enzimática sobre detectores eléctricos construyendo de esta forma el primer biosensor para la detección de glucosa. El primer biosensor comercial se desarrolló también para la determinación de glucosa por la compañía ExaTech™, Medisense Inc., EE.UU., en 1987 (Lechuga y Calle, 1995).

I.- Biosensores

Un biosensor es un dispositivo analítico integrado que combina una parte biológicamente



sensible con un sistema electrónico, de forma que la reacción de reconocimiento molecular que tiene lugar en la primera se traduce en señal eléctrica que luego es amplificada, procesada y convertida en la forma deseada en el segundo. La señal biológica que se procesa electrónicamente es proporcional a la concentración de la sustancia que se quiere determinar (analito).

El reconocimiento molecular se realiza por el principio llave – cerradura del receptor y la sustancia a reconocer.

Para que el dispositivo diseñado funcione correctamente, resulta crucial el comportamiento químico de las interfases entre medio de análisis y la capa de reconocimiento molecular (interfase externa) y entre la biocapa y el sistema electrónico (interfase interna). Por tanto, además de la elección de un material biológico y de un método de inmovilización adecuados, es importante escoger un sistema de traducción de la señal óptimo.

Los biosensores proporcionan, por tanto, una integración temporal, que permite realizar un proceso de medida química directa, y así obtener una señal continua y reversible, además de una integración espacial, lo que favorece la miniaturización.

La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con un elemento transductor. (Peña, 2003)

Las ventajas de un biosensor son, entre otras, la alta selectividad y sensibilidad de la medida, la facilidad de manejo y el bajo costo, permitiendo su utilización por personal no especializado, rapidez en el análisis, posibilidad de miniaturización, la posibilidad de evitar etapas del método analítico tan tediosas como la toma y el tratamiento de la muestra, generalmente no es necesaria la separación del analito y la adición de reactivos y permite realizar mediciones continuas, distribuidas, multidimensionales, remotas, y en condiciones de trabajo difíciles para otras técnicas.

II.- Clasificación.

La clasificación de los biosensores puede realizarse desde dos puntos de vista diferentes: la naturaleza del proceso biológico (receptor) y el mecanismo de traducción electrónica. (Thévenot et al., 1999).

II.I.- Receptor: elemento de reconocimiento biológico.

La mayoría de los biosensores comercializados se basan en reacciones enzimáticas y antígeno – anticuerpo.

En las reacciones enzimáticas la molécula transformada se denomina sustrato y usualmente implica el empleo de otro reactivo llamado cofactor, para generar los correspondientes productos.

Pueden distinguirse dos grandes grupos (Pingarrón y Sánchez Batanero, 1999).

a) Biosensores catalíticos: basados en una reacción catalizada por macromoléculas, las cuales pueden estar presentes en su ambiente biológico o pueden haber sido aisladas y modificadas. Las más utilizadas son:

- Enzimas (mono o multienzimas): constituyen los sistemas de investigados debido a la elevada selectividad de las enzimas y su capacidad de dar respuestas rápidas a sustratos específicos.

El carácter catalítico de las enzimas hace que en su reacción con el sustrato se regeneren a su estado inicial y no sea necesario ningún tipo de tratamiento para restablecer el biosensor.

Se han desarrollado algunos biosensores enzimáticos, donde se emplean dos o más enzimas, con el objetivo de aumentar de la sensibilidad del método utilizando una segunda enzima que regenere el analito o en su lugar que la segunda enzima actúe catalíticamente sobre alguno de los productos de la reacción enzimática principal con el fin de obtener un nuevo producto que se detecte con mayor facilidad.

Por último, puede ocurrir que alguno de los productos de la reacción enzimática principal actúe sobre la actividad enzimática inhibiéndola, o bien existan otros inhibidores en disolución, o incluso que haya sustratos interferentes, en estos casos, la segunda enzima puede catalizar una reacción de dichas sustancias interferentes de modo que la reacción enzimática con el sustrato de interés no se vea afectada.

- Células Vivas: Microorganismos (bacterias, hongos, células eucariotas, levaduras),
Orgánulos o partículas (mitocondrias)
 - Tejidos plantas y animales
- b) Biosensores de afinidad: basados en la interacción de los analitos con macromoléculas o grupos de moléculas organizadas que han sido aisladas de su ambiente biológico. Entre ellos se encuentran los inmunosensores y los que utilizan quimiorreceptores y macromoléculas proteicas (ácidos nucleicos, ADN, ARN).

II.II.- Fundamento del transductor.

Los factores que influyen en la elección del sistema de electrónico son: facilidad de fabricación, miniaturización, estabilidad, resistencia, toxicidad de los materiales y resistencia a la biodegradación. Atendiendo a estos criterios, los biosensores pueden clasificarse en:

- a) Ópticos: espectroscópicos de absorción, reflexión, fluorimétricos, bioluminiscencia, onda evanescente, resonancia de plasmón superficial.
- b) Térmicos o calorimétricos.
- c) De masa (piezoeléctricos)
- d) Electroquímicos: potenciométricos, conductimétricos y amperométricos.

Son los más utilizados como transductores debido a que poseen una serie de ventajas como son:

- Las medidas electroquímicas pueden ser realizadas en volúmenes pequeños, incluso del orden de nanolitros, con relativa facilidad, lo que es debido a la naturaleza interfacial de la medida electroquímica. Esto hace que tales dispositivos sean especialmente apropiados para la monitorización “*in vivo*”.
- La señal obtenida es eléctrica, y por tanto es factible la transducción directa de la

velocidad de reacción en la señal de lectura.

- Los límites de detección que se obtienen, normalmente entre 10^{-9} y 10^{-6} mol Γ^{-1} , son suficientes y adecuados para la detección de numerosos analitos de interés.
- La relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica permiten una fácil disponibilidad de estos dispositivos.

No obstante, los sensores electroquímicos tienen también dos importantes inconvenientes. Como es conocido, las técnicas electroanalíticas poseen una baja selectividad en comparación con otras técnicas analíticas, si bien este inconveniente se minimiza drásticamente al utilizar un sistema de reconocimiento biológico que posea una alta selectividad para ciertos analitos. Por otro lado, es necesario utilizar un electrodo de referencia

III.- Biosensores Amperométricos.

Son los más prometedores en el contexto de los biosensores electroquímicos pues monitorizan las corrientes faradaicas resultantes de intercambios electrónicos entre el sistema biológico y el electrodo mantenido a un potencial apropiado. Los biosensores amperométricos enzimáticos son, sin lugar a duda, los más utilizados de manera que generalmente cuando aparece el término *Biosensores Amperométricos* en la literatura se está haciendo referencia a estos y sobre ellos se tratará a lo largo de este apartado.

Los biosensores amperométricos proporcionan respuestas más rápidas, poseen mayor selectividad e intervalo de actividad más amplio. En su construcción generalmente usan las enzimas purificadas específicas para cada analito, aunque en algunos casos se inmoviliza un tejido vegetal que las contiene (Eggin et al., 1997; Forzani et al., 1997; Moressi et al., 1999; Munteanu et al., 1998; Cosnier y Popescu, 1996).

Estos dispositivos combinan las ventajas de la especificidad para reconocer moléculas particulares con la transducción directa de la velocidad de reacción en una corriente. A pesar de todo lo dicho anteriormente la poca estabilidad de algunas enzimas, la escasa actividad específica en determinados casos, las interferencias por parte de activadores e inhibidores, la necesidad de emplear a veces un cofactor o reactivo auxiliar y el coste del análisis son algunos de los problemas que presentan los biosensores enzimáticos. Sin embargo, estas dificultades se han minimizado con el desarrollo de numerosas técnicas de inmovilización.

La representación, en forma de esquema, de un biosensor enzimático se muestra en la Figura 2. La capa de enzima inmovilizada se interpone entre la superficie del electrodo y la disolución del analito, habiéndose utilizado tanto métodos físicos como químicos para preparar capas de enzimas inmovilizadas sobre diversos tipos de superficies electródicas.

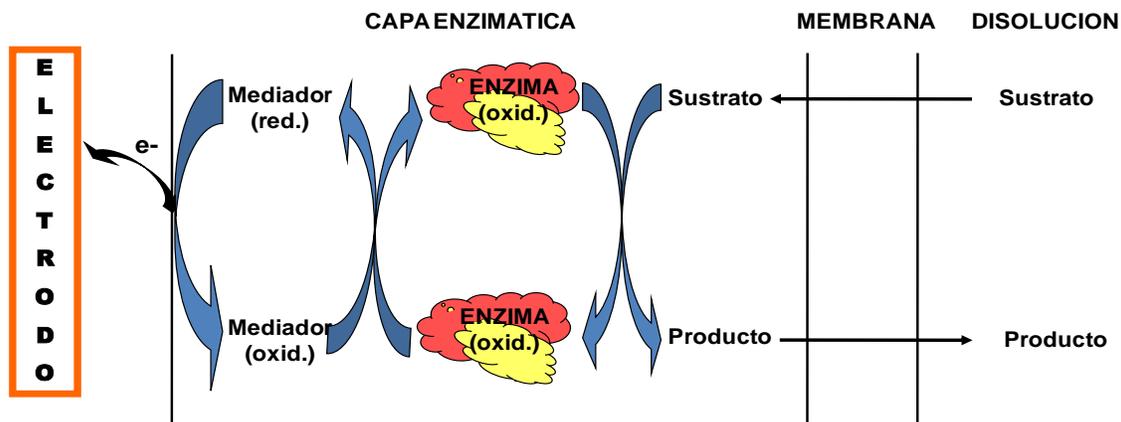


Figura 2.- Diagrama de las etapas que tienen lugar en un biosensor amperométrico

Un electrodo enzimático opera mediante un mecanismo de cinco etapas. La primera es el transporte del sustrato desde la disolución a la superficie del electrodo. En la segunda el sustrato difunde a través de la membrana al punto activo de la enzima; tercero, la reacción del sustrato y la enzima se produce en el punto activo. En cuarto lugar, el producto se forma en el punto activo y es transportado a través de la membrana a la superficie del electrodo. Finalmente el producto formado es sensorizado y se mide la intensidad.

La señal eléctrica obtenida en estos sistemas durante la medición es proporcional a la concentración de compuestos presentes en la disolución. De esta forma, se genera un reciclado electródico – enzimático de sustrato que produce una amplificación de la señal, y por tanto, una mayor sensibilidad del biosensor.

La mayoría de los biosensores desarrollados están basados en la transducción directa de la reacción enzimática, ya que se monitoriza directamente la oxidación o reducción electródica de uno de los reactivos o productos por la acción catalítica de la flavoenzima o cofactor del complejo enzimático.

Por otra parte, algunos métodos utilizan una sustancia mediadora, cuya oxidación o reducción sobre el electrodo sirve para monitorizar la concentración de los sustratos en disolución. La finalidad de este mediador es la de acelerar la transferencia de electrones, lo que permite, en general, obtener respuestas más rápidas y mejores límites de detección. En ciertos casos, el empleo de un mediador puede servir para aplicar un potencial de medida más adecuado. Ejemplos de mediadores son: la hidroquinona y el hexacianoferrato (III) de potasio ($K_3Fe(CN)_6$), el mendola blue y compuestos con partículas de rutenio.

Los biosensores amperométricos generalmente se aplican en medios acuosos que consisten en una disolución reguladora de pH (disolución PO_4^{3-} , con un valor de pH que oscila entre 5.0 y 7.4). Sin embargo, a partir de los trabajos de Hall y col (Hall et al. 1988a; Hall et al. 1988b) ha quedado claro que es posible desarrollar biosensores enzimáticos en fase orgánica con prestaciones que incluso pueden mejorar las conseguidas en medio acuoso, tales como la posibilidad de monitorización de analitos en muestras hasta ese momento inaccesibles, sin necesidad de un exhaustivo tratamiento de muestra.

Los disolventes orgánicos pueden producir grandes cambios en la actividad y especificidad de las enzimas, dado que estas propiedades dependen de diferentes interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, iónicos o interacciones de Van der Waals. Aunque, es obvio que los disolventes orgánicos pueden perturbar estas interacciones y con ello producir cambios cinéticos y termodinámicos en el comportamiento de las enzimas.

Producto de los estudios realizados se ha establecido que es necesaria la presencia de una capa de agua que rodee la enzima para que pueda existir actividad catalítica. Esta cantidad de agua esencial se requiere para mantener la hidratación que proporcione la flexibilidad y polaridad necesarias al microambiente que rodea la parte activa de la enzima. (Peña, 2003)

IV.- Electrodo Empleados en la Construcción de Biosensores.

Los electrodos más utilizados, donde se inmovilizan estas enzimas independientemente o en conjunto, son los de pasta de carbono y los de carbono vitrificado. En ambos casos por su elevada inercia química, amplio intervalo de potencial de trabajo, baja resistencia eléctrica y estructura cristalina responsable de corrientes residuales bajas.

Se reportan también los electrodos compósitos con grafito, como son los de grafito-resina

epoxi (Peña,2003), grafito-Teflón, grafito-Nafión, tecnología de impresión (screen printing) (Schmidt, 1998; Wang y Chen, 1995, Scholz et al., 2000; Serra, 2002). Asimismo, se han llevado a cabo aplicaciones utilizando carbono vítreo reticulado (Peña et al., 2001) y electrodos de oro y de platino. (Zhang et al., 2001; Villalonga et al., 2007 a, b; Camacho et al., 2007).

V.- Métodos de Inmovilización de las Enzimas.

El buen funcionamiento de un biosensor depende en gran medida, de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. El objetivo fundamental de la inmovilización es permitir un íntimo contacto entre la enzima y el transductor manteniendo inalterable en lo posible la estabilidad de dicho sistema de reconocimiento biológico.

El método de inmovilización de las enzimas en la fabricación de los biosensores influye en el tiempo de vida útil, la sensibilidad, la selectividad, el tiempo de respuesta, la estabilidad y la susceptibilidad ante agentes interferentes.

La inmovilización de las enzimas es una de las etapas críticas en el diseño de los biosensores ya que la enzima ha de ser retenida firmemente para que no pueda desprenderse al introducirse en la disolución o producto del proceso de difusión de las especies en ella; por otro lado debe permitir la suficiente movilidad que garantice la comunicación electrónica entre el centro redox de la enzima y el conductor electrónico (Au, Ag, Pt, C).

Es necesario favorecer un íntimo contacto entre el biorreceptor y el transductor, manteniendo inalterable en lo posible la estabilidad de dicho sistema de reconocimiento. La inmovilización de la proteína, particularmente de las enzimas, conlleva una serie de ventajas (Scheller et al., 1997) para su posterior aplicación en Química Analítica:

- En muchos casos la enzima es estabilizada.
- El material inmovilizado puede ser fácilmente separado de la muestra y reutilizado en posteriores análisis.
- La actividad altamente constante y estable de la biomolécula hace que la enzima sea parte integrante del instrumento analítico.

Los métodos de inmovilización comprenden métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento, y métodos químicos, ya sea mediante unión covalente o por entrecruzamiento o crosslinking. Dentro de cada uno de estos métodos existen numerosas variantes y además, también es posible utilizar combinaciones de diferentes métodos de inmovilización, pero no profundizaremos en ellos, ya que solo se pretende proporcionar una visión general.

1. Inmovilización por adsorción: es el método más sencillo. Las biomoléculas se adsorben sobre materiales adsorbentes que sean insolubles en el medio de ensayo. Este tipo de inmovilización se basa en uniones de tipo no covalente, como fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de Van der Waals, entre los lugares activos del adsorbente y las moléculas biológicas. El procedimiento de adsorción consiste en poner en contacto las moléculas de enzima con el material adsorbente durante el tiempo suficiente para que se produzcan las interacciones.

Los adsorbentes más utilizados son resinas de intercambio iónico, gel de sílice, arcillas, alúmina, vidrio poroso y materiales cerámicos. La ventaja de este método es su

sencillez, aunque tiene como contrapartida que es un proceso reversible, por lo que cambios de pH, fuerza iónica o de temperatura en el medio pueden provocar la desorción de la biomolécula. Este tipo de inmovilización es interesante cuando la enzima es insoluble en el medio de trabajo. En este caso, la biomolécula puede adsorberse directamente sobre el transductor, sin necesidad de emplear ningún material adsorbente.

2. Inmovilización por atrapamiento: puede llevarse a cabo de tres formas diferentes (inclusión dentro de una matriz de polímero altamente entrecruzado o en un gel; inclusión en la matriz del transductor; o por separación de la biomolécula del seno de la disolución mediante encapsulamiento en una membrana semipermeable).

En los biosensores de pasta de carbono y en los compósitos, el método de inmovilización más usado es por atrapamiento en la matriz, a veces la inmovilización se realiza en la superficie del electrodo con una capa fina de sol-gel (Kane, 1998).

En otras ocasiones, la enzima se atrapa en la matriz compósito después de haberse mezclado con otras partículas (ej. Zeolitas) (Marko Varga et al., 1996), o después de haber quedado atrapada en gel de sílice con óxido de titanio (Rosatto et al., 1999; Kubota et al., 2002, 2003; Gushikem et al., 2002).

Las inmovilizaciones enzimáticas más frecuentes en los electrodos de grafito sólido son por adsorción, favorecidas por la morfología rugosa de sus superficies. En los electrodos de carbono vitrificado se logran las deposiciones enzimáticas por unión covalente a la superficie, encapsulamiento con película Eastman AQ o de Nafion o atrapamiento en una capa de hidrogel (Huang et al., 2003; Kim et al., 2003).

Los métodos químicos de inmovilización pueden llevarse a cabo por acoplamiento o uniones covalentes entre la enzima y centros activados de polímeros, o por el entrecruzamiento intermolecular a dichos centros activados, presentando de este modo una fuerte fijación al polímero.

3. Acoplamiento covalente: se lleva a cabo haciendo reaccionar la enzima con un polímero insoluble en agua que posea centros activos, o bien por copolimerización con un monómero. La reacción debe involucrar grupos funcionales de la biomolécula que no sean esenciales para su actividad biológica.

Los métodos basados en el entrecruzamiento intramolecular se llevan a cabo entre enzimas y polímeros con grupos bi y multifuncionales (glutaraldehído, derivados de bis-isocianato, etc), por copolimerización con otra proteína inerte o por adsorción de las biomoléculas en un adsorbente, realizándose después el entrecruzamiento.

4. La inmovilización sobre electrodos metálicos como platino u oro se lleva a cabo por la unión covalente entre la enzima y centros activados de polímeros, a grupos que contienen azufre y que se adsorben fuertemente en la superficie electródica (Ducey y Meyerhoff, 1998; Villalonga et al. 2007 a, b) o por el entrecruzamiento intermolecular a dichos centros activados.

Como todo sistema analítico, un biosensor debe caracterizarse por poseer reproducibilidad alta en las mediciones y especificidad en el analito a detectar, así como una elevada estabilidad operacional y funcional. Sin embargo, como todas las proteínas, las enzimas constituyen sistemas dinámicos cuya estructura activa no solo está determinada por su secuencia aminoacídica específica, sino que está afectada por los parámetros físico –

químicos del medio en que se encuentran. Tanto la variación de estos parámetros, como la transformación química de su estructura proteica pueden originar cambios en la conformación tridimensional de la enzima y por consiguiente ocasionar su inactivación.

Las propiedades de la enzima pueden verse alteradas con el proceso de inmovilización, pudiendo afectar a cada enzima de forma diferente. Los cambios producidos se deben a alteraciones conformacionales de la enzima como consecuencia del proceso de inmovilización, y/o a la presencia y naturaleza del soporte, por lo que, los parámetros intrínsecos de la cinética de la enzima se ven también afectados.

Una de las estrategias más efectivas para incrementar la resistencia de las enzimas a la acción inactivante de estos procesos lo constituye la modificación covalente de sus superficies proteicas con sustancias macromoleculares hidrosolubles. En este sentido el Centro de Tecnología Enzimática (CETENZ) ha desarrollado métodos orientados a incrementar la estabilidad funcional de las enzimas mediante la modificación covalente con polisacáridos iónicos. Para ello, han sido empleados diferentes polímeros tales como: carboximetilcelulosa, alginato de sodio y quitosana

En adición, el CETENZ en colaboración con el Laboratorio de Bioinorgánica de la Universidad de La Habana han propuesto la modificación covalente de estas estructuras proteicas o glicoenzimas con derivados de la ciclodextrina (β -CD). Estas experiencias han sido aplicadas en el diseño de biosensores enzimáticos con arquitectura supramolecular. (Villalonga et al. 2008, 2009).

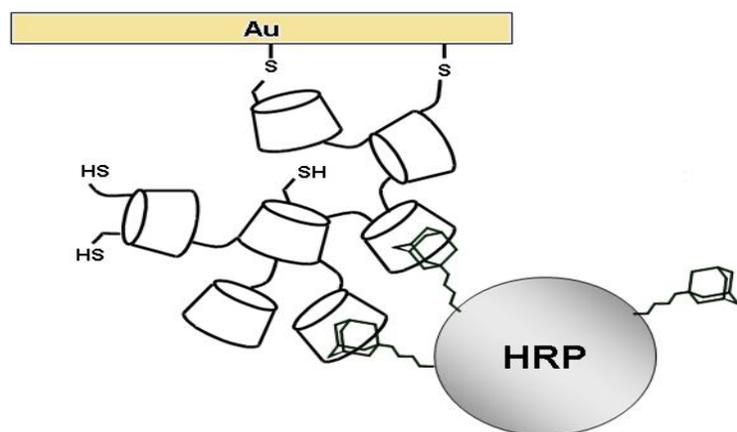


Figura 3.-
Biosensor Enzimático con
arquitectura supramolecular

Con el objetivo de incrementar el contacto entre la enzima y el transductor y de obtener una respuesta electrónica más rápida y fiable se han introducido en el diseño de esta fabulosa tecnología el uso de los nanomateriales. Para ello, los especialistas en nanotecnología han desarrollado nanoalambres, nanopartículas, nanotubos de carbono, oro, platino e incluso algunos con propiedades ferromagnéticas.

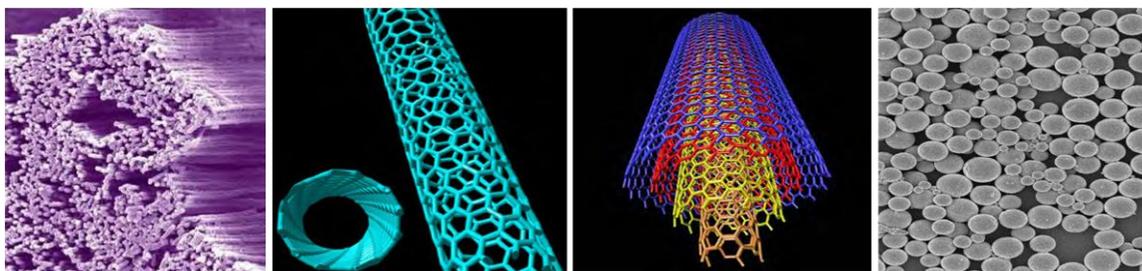


Figura 4.- Nanotecnología (nanoalambres, nanotubos y nanopartículas)

VI.- Las Ciclodextrinas (CD) en el Diseño de Biosensores.

Las ciclodextrinas (CD) constituyen una familia de oligosacáridos cíclicos, no reductores, formados por 6, 7 u 8 unidades de D-glucosa y denominadas α , β y γ -CD, respectivamente. Su forma tridimensional recuerda a la de un cono anular truncado con una cavidad central de interior esencialmente hidrofóbico. Tal estructura les permite alojar en la cavidad moléculas de diferente tipo, orgánicas o inorgánicas. Este tipo de productos se conocen como complejos de inclusión (Szejtli, 1982, 1988) y han sido objeto de amplio y detallado estudio debido a sus variadas aplicaciones.

El proceso de inclusión está condicionado por dos parámetros fundamentales: la polaridad y la compatibilidad geométrica del sustrato que se va a incluir en la cavidad de la ciclodextrina. En la formación del complejo de inclusión la CD se comporta como un receptor u hospedero tridimensional que reconoce molecularmente a la sustancia incluida, denominada sustrato o huésped.

Entre las moléculas que pueden ser reconocidas molecularmente por las CD se encuentran: compuestos alifáticos, éteres, anillos bencénicos y sus derivados, proteínas, esteroides y compuestos heterocíclicos.

Si una ciclodextrina es transformada químicamente puede enlazarse a una enzima y favorecer su estabilización y/o mejorar sus propiedades cinéticas. Si la ciclodextrina modificada se enlaza a una superficie determinada, como puede ser la metálica de un electrodo o una nanopartícula, la proteína pudiera igualmente incluirse y de esa forma fijarse sin la formación de enlace químico.

La formación de capas de derivados de la ciclodextrina en superficies metálicas, bien pudieran ser electrodos de platino u oro, ha sido ampliamente estudiada. Para ello, se prefiere obtener un derivado de ciclodextrina conteniendo grupos tiol o ditiocarbamatos, los cuales tienen la propiedad de adsorberse espontáneamente en las superficies bien limpias.

Las ventajas del método de inmovilización por formación de complejos de inclusión vienen dadas por la posibilidad de recuperar la superficie del electrodo mediante sucesivos lavados, con lo cual quedaría preparada para ser modificada con otra enzima.

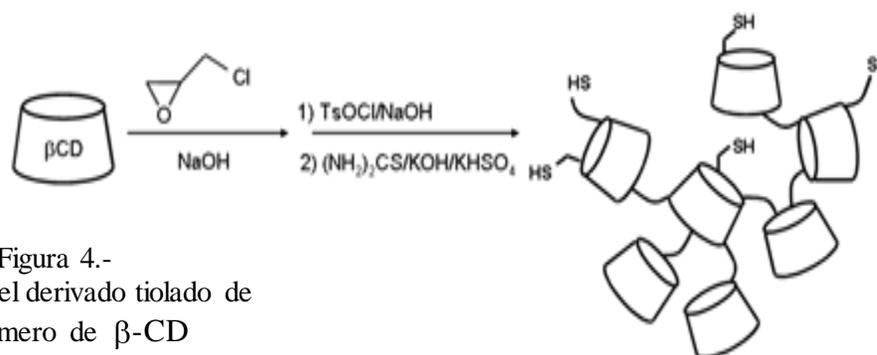


Figura 4.-
Obtención del derivado tiolado de
un polímero de β -CD

VII.- Aplicaciones de los Biosensores

Estos sensores poseen un mercado establecido y creciente en laboratorios analíticos y clínicos, en procesos tecnológicos industriales, en tecnología militar y aeronáutica, en la terapia médica “in vivo” (monitoreo de pacientes), la agricultura, y el monitoreo y control del medio ambiente, en el control de la fermentación y en el análisis de los alimentos.

La mayoría de los biosensores comercializados se basan en reacciones enzimáticas y antígeno-anticuerpo con aplicaciones clínicas específicas para glucosa, metanol, lactato, colesterol, aminoácidos, urea, xantina, hipoxantina, colina, acetilcolina, ácido úrico, oxálico, lactosa, sucrosa, galactosa, dextrosa, almidón, sustancias inmunológicas, para contaminación microbiana y DBO, entre otras.

En este sentido, varias enfermedades tales como la diabetes, la gota, y algunos tipos de cánceres pueden ser prevenidos mediante su detección con sistemas biosensores específicos.

Por otra parte una elevada cifra de los biosensores enzimáticos amperométricos reportados en la literatura han sido utilizados fundamentalmente en muestras medioambientales como efluentes acuáticos, aguas potables, de río, industriales, y de desecho en la determinación de peróxidos, algunos insecticidas fenoles, entre otros contaminantes (Camacho, 2008). Para el caso de muestras de aguas medioambientales es muy importante realizar el estudio con las condiciones de potencial en el intervalo óptimo porque en ellas hay presentes cantidades variables de compuestos electroquímicamente activos, como las sustancias húmicas. También se han aplicado al análisis de suelos, filtros de cigarrillos, muestras de aceites de oliva y cervezas.

En el campo de la industria alimenticia se requiere un control muy amplio de sus constituyentes mayoritarios y minoritarios, como pueden ser edulcorantes y aromatizantes artificiales, agentes antimicrobianos y alergénicos, glucosa en azúcares y siropes, alcoholes en vino, peróxido de hidrógeno y sulfitos como conservantes, antibióticos en leche, colesterol, glutamato y vitaminas por poner algunos ejemplos. En la bibliografía se encuentran biosensores que abarcan prácticamente cualquier tipo de análisis que requiere un alimento para que pueda garantizarse su calidad (Wagner y Guilbault, 1994)

Conclusiones

El fabuloso mundo de los biosensores permanece abierto al conocimiento y sus inmensas posibilidades de aplicación han de estimular la investigación en la búsqueda de métodos que permitan estabilizar funcional y operativamente los catalizadores enzimáticos.

Bibliografía

- Camacho, C; Villalonga, R.; Matías, J.C, García, D.; Simpson, B.K.; García, A. (2007) "Amperometric enzyme biosensor for hydrogen peroxide via ugi multicomponent reaction". *Electrochemistry Communications* 9 (7), 1655 – 1660
- Camacho, C. 2008. Propuesta del uso de biosensores enzimáticos en el monitoreo de compuestos fenólicos. Tesis en opción al título de Máster en Contaminación Ambiental. Centro de Estudios Medio Ambientales. Matanzas
- Cosnier, S.; Popescu, I.C. (1996). Poly(amphiphilic pyrrole)-tyrosinase-peroxidase electrode for amplified flow-injection amperometric detection of phenol. *Anal. Chim. Acta* 319: 145-151
- Ducey Jr., M.W.; Meyerhoff; M.E. (1998). Microporous gold electrodes as combined biosensor/electrochemical detectors in flowing streams. *Electroanalysis* 10(3): 157-162
- Eggins, B.R.; Hickey, C.; Toft, S.A.; Zhou, D.M. (1997). Determination of flavanols in beers with tissue biosensors. *Anal. Chim. Acta* 347: 281-288
- Forzani, E.S.; Rivas, G.A.; Solís, V.M. (1997). Amperometric determination of dopamine on vegetal tissue enzymatic electrodes. *Analysis of interferents and enzymatic*

- selectivity. *J. Electroanal. Chem.* 435: 77-84
- Gushikem, Y.; Rosatto, S.S.; Sotomayor, P.T.; Kubota, L.T. (2002). SiO₂/Nb₂O₅ sol/gel as a support for HRP immobilization in biosensor preparation for phenol detection. *Electrochimica Acta* 47 , 4451_/4458
- Hall, G.F. Best, D.J., Turner A.P.F. (1988a). Amperometric enzyme electrode for the determination of phenols in chloroform. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 543.
- Hall, G.F. Best, D.J., Turner AP.F. (1988b). The determination of p-cresol in chloroform with an enzyme electrode used in organic phase. *Anal. Chim. Acta.* 212, 113-119.
- Huang W., Yang C., Zhang S. (2003) "Simultaneous determination of 2- nitrophenol and 4-nitrophenol based on the multi-wall carbon nanotubes Nafion-modified electrode". *Anal. Bioanal. Chem.* 375: 703.
- Kane, S.A.; Iwuoha, E.I.; Smyth, M.R. (1998). "Development of a sol-gel based amperometric biosensor for the determination of phenolics". *Analyst* 123: 2001-2006
- Kim M.A., Lee W.Y. (2003): "Amperometric phenol biosensor based on sol-gel silicate/Nafion composite film". *Analytica Chimica Acta.* 479: 143.
- Kubota, L.T.; Freire, R.S.; Durán, N. (2002). "Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices". *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 13, No. 4, 456-462
- Kubota, L.T.; Freire, R.S. Pessoa, Ch.A.; Mello, L. (2003) "Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity". *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 14, No. 2, 230-243
- Lechuga, L.M.; Calle, A. (1995). "Biosensores. Los dispositivos analíticos del futuro I y II". *Revista de plásticos modernos* 470: 132-140 y 471: 232-242
- Marko-Varga, G.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T. (1995). "Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds". *Trends Anal. Chem.* 14(7): 319-328
- Marko-Varga, G.; Burestedt, E.; Svensson, C.J.; Emneus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Lutz, M.; Unger, K.K. (1996). "Effect of HY-Zeolites on the performance of tyrosinase - modified carbon paste electrodes". *Electroanalysis* 8(12): 1121-1126
- Moressi, M.B.; Zon, A.; Fernández, H.; Rivas, G.; Solís, V. (1999), "Amperometric quantification of Alternaria mycotoxins with a mushroom tyrosinase modified carbon paste electrode". *Electrochemistry Communications* 1(10): 472-476
- Munteanu, F.-D.; Lindgren, A.; Emneus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Ciucu, A.; van Huystee, R.B.; Gazaryan, I.G.; Lagrimini, L. (1998). "Bioelectrochemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases". *Anal. Chem.* 70: 2596-2600
- Peña, N.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. (2001). "Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase modified reticulated vitreous carbon electrodes". *Talanta* 55: 179-187
- Peña García, N. (2003) "Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa.

Aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bienzimáticos y multienzimáticos”. Memoria presentada para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid

- Pingarrón, J.M. Sánchez Batanero, P. (1999). “Química electroanalítica, Fundamentos y aplicaciones”. Ed. Síntesis.
- Rosatto, S.S.; Kubota, L.T.; de Oliveira Neto, G. (1999). “Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica-titanium”. *Anal. Chim. Acta* 390: 65-72
- Scheller, F.W.; Schubert F.; Fedrowitz J. (Eds.) (1997). “Frontiers in Biosensorics I, Fundamental Aspects”. Birkhäuser Verlag Basel, Suiza
- Schmidt, J.C. (1998). “Enzyme based electrodes for environmental monitoring applications”. *Field Analytical Chemistry and Technology* 2(6): 351-361
- Scholz F., Schadel S., Schultz A., Schauer F. (2000): “Chronopotentiometric study of laccase-catalysed oxidation of quinhydrone microcrystals immobilised on a gold electrode surface and of the oxidation of a phenol-derivatised graphite electrode surface”. *J. Electroanal. Chem.* 480: 241.
- Serra B., Jiménez, S., Mena M.L., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M. (2002). “Composite electrochemical biosensors: a comparison of three different electrode matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors”. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(3) :217-226
- Szejtli, J. (1982). *Cyclodextrins and their inclusion compounds*. Akadémiai Kiadó, Budapest
- Villalonga, R.; Camacho, C.; Cao, R.; Hernández, J.; Matías, J.C. (2007 a). “Amperometric biosensor for xantine with supramolecular architecture”. *Chemical Communications*, 942 – 944
- Villalonga, R.; Camacho, C.; Cao, R.; Hernández, J.; Matías, J.C.; Palchetti, I.; Simpson, B.K.; Mascini, M. (2007 b) “Novel enzyme biosensor for hydrogen peroxide via supramolecular associations”. *Biosensors and Bioelectronics* (Aceptada)
- Villalonga, R.; Camacho, C.; Matías, J.C., Cao, R., Chico, B., Hernández, J., Longo, M.A., Sanromán, M.A., Matos, M. (2008) Hydrogen peroxide biosensor with layer-by-layer supramolecular design. *Langmuir* 2008, 24, 7654-7657
- Chico, B.; Camacho, C.; Pérez, M.; Longo M.A.; Sanromán, M.A.; Pingarrón, J.M.; Villalonga, R. Polyelectrostatic immobilization of gold nanoparticles-modified peroxidase on alginate-coated gold electrode for mediatorless biosensor construction. *Journal of Electroanalytical Chemistry* (2009) (Aceptada)
- Wagner, G., Guilbault G.G. (1994). “Food Biosensor Analysis”. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Wang, J.; Cheng, Q. (1995). “Microfabricated phenol biosensors based on screen printing of tyrosinase containing carbon ink”. *Anal. Lett.* 28(7): 1131-1142
- Zhang, S.; Zhao, H.; John, R. (2001). “A dual-phase biosensing system for the determination of phenols in both aqueous and organic media”. *Anal. Chim. Acta* 441: 95-105

