

Historia de los métodos bioanalíticos modernos.

Los biosensores

Eduardo Cortón *

Nuevos métodos y equipamiento sofisticado permiten detectar con elevadísima sensibilidad y especificidad una cantidad cada vez creciente de analitos del más diverso origen, expandiendo las fronteras de la química analítica instrumental. Sin embargo, tales logros están generalmente acompañados de otros aspectos no tan deseables, como el considerable aumento de la complejidad del equipamiento, su elevado costo tanto para su adquisición como para su operación, la necesidad de insumos importantes. Muchas veces, operadores altamente calificados y complejos métodos de preparación de las muestras son también imprescindibles. Por otro lado, biosensores y tecnologías relacionadas permiten la medición de un analito o conjunto de analitos de una manera sencilla, simple y económica; el análisis de las muestras se realiza en condiciones donde la matriz analítica es en general ignorada por el componente de reconocimiento biológico, simplificando en gran medida etapas de preparación de la muestra. Los niveles de concentración alcanzados por

los biosensores raramente alcanzan la sutileza (ppb, ppt) de los métodos analíticos instrumentales más sensibles, pero aun así, los niveles alcanzados son relevantes para muchas aplicaciones. En este trabajo nos concentraremos en establecer las bases y un lenguaje común para el estudio de algunos de los métodos que utilizan materiales biológicos como reactivos, en especial a los biosensores. Sin querer redundar en hechos ya bien conocidos, se incluye la historia de su desarrollo, donde no se puede evitar considerar la medición de glucosa en sangre, aplicación que dio lugar al biosensor con mayor éxito comercial en el mercado mundial, y aún explica más del 90 % del mercado de biosensores.

ALGUNAS DEFINICIONES

Podríamos comenzar este artículo con algunas definiciones, dado que en los últimos tiempos, al menos las palabras que comienzan con "bio" han tenido una expansión considerable, no solo en el número de términos que se ha acuñado (y biosensor es uno de ellos) sino también por el significado preciso de estos términos, que son usados por científicos y técnicos de distintas disciplinas a veces sin el debido cuidado.

La definición recomendada de estos dos términos [1] es:

- Biosensors: A device that uses specific biochemical reactions mediated by isolated enzymes, immunosystems, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals.
- Bioassay: A procedure for determining the concentration or biological activity of a substance (e.g. vitamin, hormone, plant growth factor, antibiotic) by measuring its effect on an organism or tissue compared to a standard preparation.

Como se destaca en ambas definiciones, tanto un biosensor como un bioensayo son utilizados por los humanos con fines analíticos, podríamos decir sin temor a equivocarnos que el propósito de los dos es obtener un resultado analítico, sea este cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo. En gran medida la naturaleza de la respuesta analítica obtenida por cualquiera de los dos sistemas depende de la implementación de cada uno, los procedimientos de calibración y la estandarización de la técnica, lo que permitirá o no obtener datos con la precisión y exactitud requerida. Es cierto sí, que los biosenso-

* Departamento de Química Biológica – IQUIBICEN, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, y CONICET.

res, dado su naturaleza de "instrumento", donde el material biológico esta acoplado a un transductor físico o químico, son normalmente más utilizados con fines analíticos cuantitativos.

La más importante diferencia de ambos sistemas, que no se destaca especialmente en la definición recomendada por IUPAC pero si en otras, es que en los biosensores el material biológico se encuentra asociado, inmovilizado, en estrecho contacto con el transductor, y ambos, de manera indivisible, forman el biosensor; además de ello, el biosensor debe producir una señal eléctrica medible, la que es, dentro de cierto rango de concentración, proporcional a la concentración del analito. En los biosensores microbianos o basados en células de mamífero u otras, se dan casos límite entre ambos sistemas, donde de acuerdo a la perspectiva del autor se estará en presencia de un biosensor o un bioensayo; en general, si el sistema es reusable, las células se encuentran inmovilizadas y la salida analítica es eléctrica, estamos en presencia de un biosensor.

LOS ORÍGENES

Establecer de forma concreta el origen de los bioensayos no es posible, dada la larga historia que este tipo de ensayos, cuya aplicación empírica y cualitativa no requiere de ciencia, ni mucho método; basta observar el efecto mortal que muchas sustancias químicas producen sobre los seres vivos (y realizar la conexión entre ambos hechos) para estar en presencia de un bioensayo cualitativo, vivo-muerto. Una aplicación típica de estos ensayos durante la edad media, era estudiar los restos de comida sospechosos de haber producido la muerte por envenenamiento de una persona. Estos alimentos eran suministrados a algún pequeño animal; la muerte de este era considerada una prueba del crimen cometido. Sin lugar a duda este ensayo de tipo forense, y otros tipos de bioensayos

que se realizaban a los fines de desarrollar sustancias para distintos usos (y en especial venenos para uso criminal) eran utilizados con fines analíticos.

Para los biosensores, mucho más modernos, si es posible establecer no solo la fecha sino su "inventor", como veremos más adelante. Tempranamente en el siglo pasado (1934) los bioensayos fueron aplicados para estudiar la potencia de los nuevos insecticidas orgánicos, utilizando métodos científicos y estadística básica diseñada para ese uso, dando origen a la función probit, aún de gran utilidad [2].

Un bioensayo notorio, que suele mencionarse como el precursor de los biosensores (y que de paso, es un excelente ejemplo para explicar de manera rápida que es y para que sirve un biosensor) son los canarios utilizados por los mineros del carbón, y más tarde por los soldados, en las largas guerras de trincheras de la primera guerra mundial. En la Figura 1 puede observarse un grupo de rescatistas, en minas del carbón en Inglaterra, preparados para entrar en acción. La foto corresponde a "The Kemberton Colliery Mines Rescue Brigade 'C' Team", fotografiada enfrente a la Estación de Rescate, en 1914.

Todas las personas que se observan en poseen un equipo de reparación autónoma, el denominado respirador "Proto", que es una versión avanzada del aparato respirador denominado "Fleuss". Este moderno equipamiento (en su época) era un equipo cerrado que llevaba oxígeno (se estima un 70% de pureza) e hidróxido de potasio como absorbente de CO_2 , no era de uso estándar por el personal que explotaba la mina de carbón; estos equipos respiratorios fueron diseñados originalmente para su uso bajo el agua, y sus diseñadores en general eran buzos deportivos o profesionales con conocimientos ingenieriles. Los canarios fueron elegidos dado que su color claro y brillante hacia más

fácil la observación de su comportamiento en el interior de la mina; por otro lado, y más importante, el metabolismo elevado de las aves en general las hace especialmente sensibles a los gases contaminantes o asfixiantes; sin importar si la acumulación fuese de gas grisú, monóxido de carbono, dióxido de metano u otros, el comportamiento de la ave se altera cuando sufre asfixia o toxicidad (produciendo una alerta para el minero, que es afortunadamente para él, menos sensible).

En la primera guerra mundial, los canarios indicaban cuando ocurría un ataque con los denominados gases de guerra, como el fosgeno (COCl_2) y otros clorados, o fosforados, muchos de los cuales no pueden ser fácilmente detectados por el color u olor, tomando valor la utilización de este tipo de bioensayos simples y de observación directa. Es interesante notar que se observó en esta guerra que algunos gases tóxicos podían causar la muerte prácticamente instantánea del canario, que mantenía sus músculos contraídos; por lo tanto la desafortunada ave se mantenía erguida en su percha, sin cumplir su función de alerta. La solución encontrada en esos momentos de angustia fue cortar las uñas del ave, de tal manera que el ave cayera de la percha cuando un ataque con gases venenosos ocurría.

A partir de 1934 la utilización de bioensayos la expansión del uso de este tipo de análisis se extendió para ensayar la actividad biológica de sustancias químicas para uso médico, farmacológico y en agricultura; pero durante la década del 70' es cuando estos ensayos alcanzan un importancia mayor, dado que la EPA (United States Environmental Protection Agency) establece criterios y normas para calidad de agua basadas en la utilización de bioensayos, luego de reconocer la imposibilidad de medir con procedimientos analíticos tradicionales (química húmeda o química instrumental) la enorme diversidad de compuestos que desde las



Figura 1. Rescatistas en minas de carbón. Nótese en el primero de ellos, a la izquierda, una pequeña jaula que contiene un canario. (Madeley, Shropshire, England)

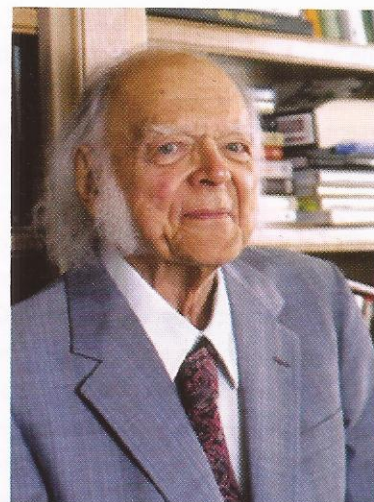


Figura 2. Dr. Leland C. Clark Jr. (1918-2005), los biosensores para glucosa que utilizan millones de diabéticos en todo el mundo derivan de su trabajo pionero

industrias y las ciudades se incorporaban al medio acuático, así como sus productos de degradación y metabolitos. Actualmente el uso de bioensayos se ha incrementado, y es exigido por la legislación de muchos países para comprobar la toxicidad de nuevos productos, licenciar la producción o aprobar el uso específico de productos de uso habitual, medir la posible toxicidad de ambientes alterados por el hombre, y el control de la toxicidad en efluentes de todo tipo.

EL PRIMER BIOSENSOR

Como comentábamos anteriormente, fechar el origen de los biosensores es más sencillo; la comunidad científica está de acuerdo en honrar al Dr. Leland C. Clark Jr. como al "inventor" de los biosensores (Figura 2), dado sus trabajos tan simples como precursores; en 1962 colocó una membrana con glucosa oxidasa (GOx) inmovilizada sobre un electrodo amperométrico sensor de oxígeno (electrodo de Clark, una invención previa de este mismo científico), y observó que a medida que la concentración de glucosa aumentaba en la muestra, la concentración de oxígeno medida por el electrodo

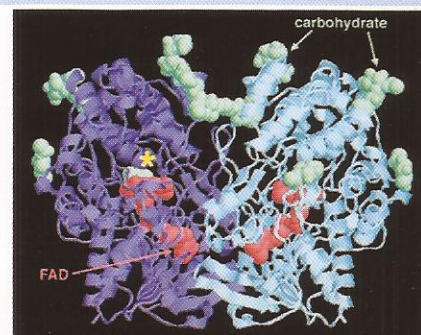
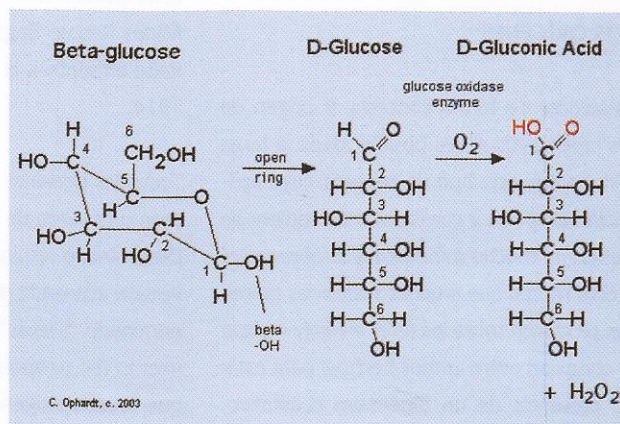
de Clark disminuía, obteniendo de esa manera el primer biosensor de glucosa.

La GOx es un dímero (proteína formada por dos subunidades), una flavoproteína (FAD como cofactor), de unos 155 kD, cuyo origen para uso industrial y científico más habitual es por purificación de cultivos del

hongo *Aspergillus niger*. La reacción catalizada por esta enzima, así como su estructura tridimensional propuesta se muestra en la Figura 3.

El sistema descrito basado en el electrodo de Clark si bien podría ser útil para laboratorios clínicos, no era apto para producción

Figura 3. Glucosa oxidasa, la enzima más utilizada en la fabricación de biosensores. A, reacción redóx, nótese que la acción enzimática consume oxígeno y produce peróxido, ambas sustancias pueden utilizarse para cuantificar la glucosa consumida. B, estructura molecular propuesta para esta enzima (extraída del hongo *Penicillium*), se observa su cofactor (FAD, flavín adenín dinucleótido, en rojo), y una cantidad importante de carbohidratos. La estrella marca el sitio activo, lugar físico donde la reacción catalítica posiblemente ocurra.



en masa y uso domiciliario (relativamente grande y complejo, utiliza mucha enzima, tamaño de muestra grande, etc.). Pero en 1970 un nuevo experimento asombro a Leland, cuando luego de sumergir un alambre de platino en una solución de glucosa oxidada, y polarizar ese electrodo, observo una producción de corriente que era proporcional a la concentración de glucosa en la muestra; la subsecuente sofisticación, miniaturización e industrialización de este sistema dio origen a los biosensores de glucosa modernos, algunos modelos se observan en la Figura 4.

BIOSENSORES, CARACTERÍSTICAS RELEVANTES

Los biosensores de componen de algún tipo de material biológico, que traduce la señal bioquímica de tal manera que pueda ser interpretada por un transductor físico o químico. Los aspectos relevantes en el diseño y construcción de un biosensor son la elección del material biológico, del transductor, el proceso de inmovilización del material biológico sobre el transductor (que es crítico para mantener la actividad biológica), y la utilización de barreras difusivas y/o selecti-

vas para "tunear" o definir el rango lineal de concentración y mejorar la selectividad del sistema. Dependiendo el tipo de transductor seleccionado, las señales eléctricas obtenidas tendrán cierta proporcionalidad con el analito; por ejemplo la utilización de transductores potenciométricos que tienen respuesta nernstiana producirá biosensores con alta sensibilidad a bajas concentraciones de analito, pero relativamente insensibles a altas concentraciones (3).

Según el transductor utilizado, los biosensores suelen clasificarse en varios grandes grupos, como el de los biosensores electroquímicos (que pueden funcionar en el modo amperométrico, potenciométrico o impedimétrico); los termométricos (basados en la medición del calor liberado por procesos tanto enzimáticos como celulares); los piezoeléctricos (basados en general en la medición de pequeñas masas, como por ejemplo utilizando microbalanzas de cuarzo); y los ópticos (los de onda evanescente y resonancia de plasmón superficial son los más importantes, pero hay una gran variedad de modos de medición). Naturalmente también pueden clasificarse los biosensores considerando el material biológico utilizado, entonces tendremos biosensores enzimáticos, inmunobiosensores si se utilizan anticuerpos, biosensores de hibridación si se utilizan ácidos nucleicos, microbianos si se utilizan bacterias u otros tipos celulares procariontes, y basados en células de mamífero. En algunos casos materiales algo más exóticos han sido utilizados, pero no es una aplicación difundida, como por ejemplo la utilización de antenas de insectos para detectar sustancias volátiles, tejidos vegetales, u otros [4].

Es interesante comparar las características o ventajas de los biosensores respecto a los métodos analíticos instrumentales; a grandes rasgos se puede decir que los biosensores:



Figura 4. Modernos biosensores para glucosa. Más de 20 patentes y cientos de modelos están basados en similares principios, en general son pequeños potenciostatos de potencial fijo (+400 mV vs Ag/AgCl), con una tira descartable impresa por screen-printing, en una configuración de 2 o tres electrodos, una enzima redóx (usualmente glucosa oxidada), y un mediador redóx (usualmente derivados de ferroceno).

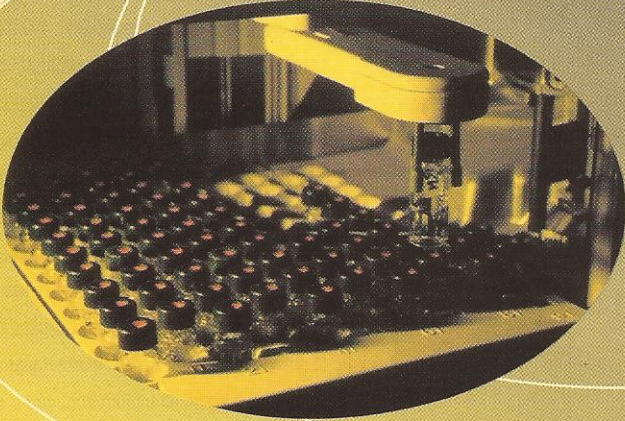
- Permiten medir un analito o grupos de analitos sin purificación previa en matrices analíticas de alta complejidad (sangre, leche, etc.).
- Altamente específicos (basados en enzimas o anticuerpos), o más o menos inespecíficos (basados en bacterias u otros tipos celulares).
- La información obtenida es mucho más real que con los métodos analíticos clásicos (biodisponibilidad).
- Mediciones rápidas y equipos portátiles han sido diseñados.
- La lista de posibles compuestos tóxicos en el ambiente aumenta continuamente, para estas aplicaciones la baja especificidad de biosensores de toxicidad es una ventaja.
- Bajo costo cuando industrializados, tamaño pequeño, portátiles.
- Aptos para ser utilizados en zonas rurales o países con baja infraestructura.

Naturalmente hay todavía muchos obstáculos para que esta tecnología pueda ser competitiva en una cantidad de áreas; si bien los pronósticos elaborados 10 años atrás preveían una fuerte expansión de los biosensores fuera del área de la química clínica, la medición de glucosa en el cuidado diario en el hogar de pacientes diabéticos, estos pronósticos no se han cumplido. Para la utilización de biosensores en mercados que tienen productos tan diversos como el de la industria alimentaria o farmacéutica, y donde las normas de calidad son muy rigurosas, es necesario mejorar las características de reproducibilidad, exactitud y precisión de los biosensores. Se necesita trabajo experimental y nuevos diseños para lograr una elevada estandarización de los métodos basados en biosensores, lo que ofrece su dificultad dada la inherente variabilidad e inestabilidad del material biológico, parte fundamental de los biosen-

sores. La estandarización llevará sin duda a la elaboración de normas y regulaciones que tomen en cuenta la utilización de estas técnicas bioanalíticas, lo que es un paso necesario para que aumente la producción y comercialización de biosensores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PAC, 1992, 64, 143. Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992).
- [2] Bliss, C. I. (1934), "The Method of Probits," *Science*, 79, 38-39.
- [3] CASS, A. E. G. *Biosensors*. Oxford University Press. (1990).
- [4] LOWE, C.R. An introduction to the concepts and technology of biosensors. *Biosensors* 1:3-16 (1985).



ARYL S.A. Productos Químicos
 Tucumán 141 4° "K" • C1049AAC Ciudad Autónoma de Buenos Aires
 Teléfono +54 11 4315 0840 • Fax +54 11 4311 4455
 Correo electrónico: aryl@aryl.com.ar
 Web: www.aryl.com.ar

