

Bitácora@ Divulga

Del canario al biosensor

Autores: Dr. Tomás Benavidez y Dra. Ana María Baruzzi. INFIQC. Departamento de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Cuando se busca en internet la historia de un sensor, muchos artículos aluden al canario como el primer precursor de estos dispositivos y por esto no debe extrañar que se los conozca como el canario en un chip. ¿Por qué el canario? Porque fue el primer detector de componentes químicos en el ambiente. Es famosa la fotografía de 1914 donde se observa a un minero llevando una jaula con un canario en su interior, el primer "biosensor". Si había gases tóxicos en las minas subterráneas, el canario era el primero en detectarlo, a costa de su propia vida; de este modo los mineros advertían el peligro, podían evacuar a tiempo y salvar las suyas.

Esto es sólo un ejemplo para mostrar que desde siempre hubo una preocupación por contar con dispositivos que permitan detectar y cuantificar compuestos químicos ya sea de interés ambiental, clínico, industrial u otro. Hace poco más de 50 años surgieron estos dispositivos para alegría no solo de los canarios sino también de otros seres vivos que habían corrido su misma suerte como el mono y el perro en viajes espaciales; gracias al desarrollo científico y tecnológico continúan apareciendo con nuevos diseños cada vez más versátiles y con muy diversas aplicaciones.

Actualmente muchos biosensores se utilizan en diagnóstico clínico, monitoreo del medio ambiente, análisis de alimentos, agricultura y seguridad, genómica y proteómica, y prácticamente en todas las áreas de las ciencias "duras". No obstante, es mucho lo que se puede hacer para seguir desarrollando nuevos sensores y mejorando los que ya existen desde el punto de vista analítico y práctico, en cuanto a capacidad de detección, sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, estabilidad, versatilidad, costos y simplicidad de manejo, entre otras características.

Este pequeño artículo tiene por objeto ayudar a que se conozca qué es un biosensor y qué aspectos son estudiados por un grupo de investigadores de nuestra Facultad.

La definición más clara de un biosensor es la que da la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), que lo define como "un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas mediadas por enzimas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos, o células enteras aisladas, para detectar analitos, generalmente por señales eléctricas, térmicas u ópticas".

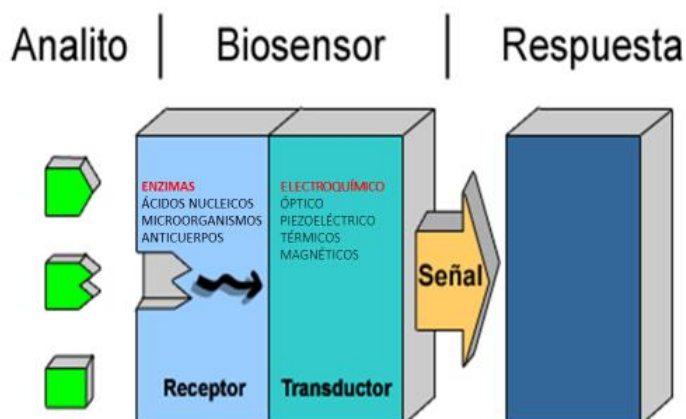
Como surge de esta definición, hay numerosas clases de biosensores, ya sea según el tipo de biomolécula de reconocimiento o de mediación que utiliza para detectar la sustancia de interés, o según el tipo de señal que se use para la detección de la reacción química de reconocimiento; de allí surgen las distintas clasificaciones que se encuentran en la literatura. El analito, es decir el compuesto objeto del análisis, se encuadrará en alguna de estas clases.

En este espectro de posibilidades, los biosensores que miden la reacción química en base a una señal eléctrica que se genera serán biosensores **electroquímicos**, los cuales dependiendo de que dicha señal sea un potencial eléctrico, una corriente eléctrica o una conductancia serán **sensores potenciométricos, amperométricos o**

conductimétricos. En particular, los sensores *amperométricos enzimáticos*, son sin duda los que han recibido mayor atención por parte de los investigadores y utilizan una enzima como elemento de reconocimiento para catalizar una reacción en la que participa el analito. La corriente eléctrica que se mide es la que circula en una celda electroquímica debida a la oxidación o reducción de alguno de los compuestos involucrados en la reacción enzimática, sobre uno de los electrodos de la celda conocido como electrodo de trabajo. Esta señal de corriente se relaciona linealmente con la concentración del analito y la reacción de catálisis enzimática proporciona especificidad y selectividad a este tipo de medidas.

Esquema de un biosensor.

(en rojo receptor y transductor de un biosensor electroquímico enzimático)



La gran actividad catalítica y la elevada selectividad son las principales ventajas de utilizar una enzima como elemento de bio-reconocimiento en estos dispositivos. Sin embargo, también hay algunas desventajas, que justamente son las que hacen que numerosos grupos dediquen sus investigaciones a tratar de solucionar. En particular, un inconveniente importante es la disminución de su actividad como consecuencia de su inmovilización sobre la superficie del transductor, a lo que se suma que muchas veces el sitio activo está en el seno de la proteína, dificultando la transferencia electrónica.

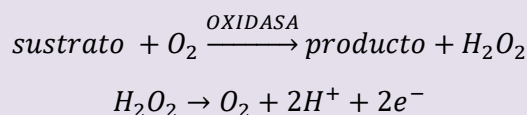
Estas características tan particulares han dado lugar a las tres clases de biosensores que existen en la actualidad, dependiendo del método de transferencia electrónica utilizado para la medición de la reacción bioquímica y del grado de separación de los componentes del sensor. A continuación describiremos brevemente cada uno de ellos.

Biosensores de primera generación

Son los más simples y se basan en la detección directa ya sea del aumento del producto enzimáticamente generado o de la disminución del sustrato, los cuales difunden hacia el transductor y generan la respuesta eléctrica. En estos sensores la enzima esta inmovilizada sobre la superficie del transductor y se aprovecha la capacidad de transformar el sustrato en una especie electroactiva. Las enzimas que se utilizan en estos sensores son de dos clases: las oxidasas y las deshidrogenasas. Ambas requieren de la ayuda de unos compuestos llamados coenzimas para funcionar, las

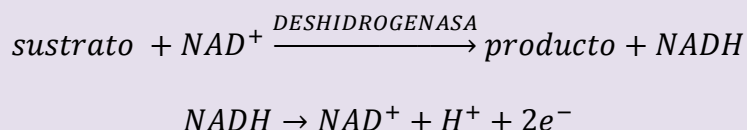
que necesitan ser regeneradas para que la enzima pueda volver a actuar catalíticamente.

El O₂ es el mediador natural de muchas enzimas del tipo oxidasas, que restablecen su forma oxidada transformando O₂ a H₂O₂, pudiéndose medir tanto el peróxido de hidrógeno generado como la disminución de oxígeno, resultantes de la siguiente reacción:



Las enzimas glucosa oxidasa (GOx), lactato oxidasa (LOx), oxalato oxidasa (OOx) y alcohol oxidasa (AOx) pertenecen a este gran grupo de enzimas; por otro lado hay enzimas polifenol oxidasas como la tirosinasa (Tyr) y la lacasa (Lac) que reducen al O₂ llevándolo directamente a H₂O.

En el caso de las deshidrogenasas el producto que se detecta es el NADH generado, según la reacción:



Estos biosensores de primera generación tienen como desventajas que, en caso de funcionar con O₂ como mediador, se debe mantener una concentración de O₂ suficiente y por otro lado algunos compuestos presentes en muestras biológicas pueden interferir al potencial electroquímico utilizado, generando corrientes no deseadas que alteran el resultado. Esto dio lugar al desarrollo de una segunda generación de biosensores.

Biosensores de segunda generación

Estos sensores se basan en el uso de mediadores redox, compuestos que actúan como portadores de electrones, permitiendo trabajar a menores potenciales para evitar interferentes, y en el caso de las oxidasas independizándose del oxígeno presente como mediador. Hay muchísimos compuestos capaces de actuar como mediadores, pudiendo mencionar entre ellos al ferrocianuro, ferricianuro, ferroceno, azul de metileno, violeta de metilo y tionina, entre otros. La forma reducida del mediador que se genera luego de actuar para que la enzima recupere su forma oxidada es la que se va a oxidar sobre el electrodo, generándose así la corriente eléctrica que es proporcional a la concentración de analito. Todo esto obviamente será posible si el mediador elegido tiene un potencial de oxidación menor al de los interferentes y si puede permanecer lo suficientemente cerca de la enzima para mantener el desempeño adecuado del sensor en el tiempo. Justamente ahí radica una de las desventajas de estos sensores de segunda generación, que no siempre solucionan los problemas de los de primera generación.

Biosensores de tercera generación

Estos biosensores serían los encargados de solucionar los problemas de los dos anteriores. La idea es que la enzima se regenere directamente sobre el electrodo evitando el uso de mediador. Para esto es necesario, no obstante, asegurar la

interacción adecuada entre la enzima y el electrodo por lo cual se agrega un tercer elemento encargado de “cablear” el centro redox de la enzima con la superficie del electrodo; esto sin dudas mejoraría el funcionamiento del sensor. Estos diseños están en desarrollo y algunos polímeros conductores, entre otros materiales, serían los encargados de facilitar el encuentro entre elemento de bio-reconocimiento y el transductor.

¿Qué hacemos nosotros en el Departamento de Físicoquímica?

Si bien es mucho lo que se ha avanzado desde la ciencia y la tecnología, sea cual sea el diseño que se aborde, son numerosas las condiciones que se deben controlar para hacer viables estos dispositivos y extender su uso a la comunidad de distintos sectores sociales y productivos; mencionamos entre otras, además de lo ya dicho, la eficiencia en la inmovilización de la enzima, el pH, el potencial eléctrico o la temperatura.

Nuestro grupo está dedicado desde hace algunos años al estudio, desarrollo y aplicación de biosensores electroquímicos enzimáticos de interés biológico y ambiental, teniendo como objetivo principal lograr ventajas analíticas respecto de los métodos tradicionales de análisis especialmente en cuanto a límite de detección, selectividad, sensibilidad, y estabilidad. Además, y en eso estamos trabajando, pretendemos extender el estudio básico al desarrollo de prototipos que puedan ser transferidos al medio productivo buscando características óptimas respecto de la portabilidad, bajo costo, posibilidad de seguimiento continuo (“on-line”) y versatilidad en el diseño.

Hasta el presente en particular hemos trabajado en sensores de oxalato, lactato, glucosa y etanol, lo que dio lugar a tesis doctorales, trabajos posdoctorales y a diversas publicaciones. El método empleado en el laboratorio para la fabricación de estos biosensores consiste en inmovilizar la enzima correspondiente en una matriz polimérica compuesta por mezclas de distintos polímeros, naturales y sintéticos, entrecruzados con glutaraldehído. El desarrollo apunta también al estudio de propiedades fisicoquímicas de las matrices de inmovilización (en especial permeabilidad, conductancia y viscoelasticidad) y a su relación con la respuesta del sensor en la búsqueda de condiciones experimentales óptimas de inmovilización.

En el caso de los sensores mencionados, las enzimas utilizadas son todas oxidasas, siendo el peróxido de hidrogeno el producto de la reacción evaluado electroquímicamente. Todos estos ejemplos se incluyen en los llamados de primera generación y si bien hemos mencionados algunas desventajas, logramos excelente desempeño en cuanto a intervalo lineal estabilidad y reproducibilidad.

En los últimos años y a partir de colaboraciones con Investigadores de la Facultad de Odontología de la UNC, hemos iniciado el desarrollo de un sensor para dosaje de acetaldehído en saliva. Este metabolito es el resultado de la oxidación parcial de etanol en boca y es un potencial responsable del cáncer bucal. En este caso, la enzima empleada es la aldehído deshidrogenasa, la cual necesita el cofactor NAD⁺ para poder catalizar la oxidación del aldehído generando NADH el cual es evaluado electroquímicamente. A raíz de que el potencial de oxidación de NADH es elevado hemos logrado la disminución de este sobrepotencial mediante el empleo de un mediador redox, la tionina, atrapada en una matriz que incluye nanotubos de carbono, logrando así un biosensor de segunda generación. Este sensor responde de manera excelente frente a soluciones de acetaldehído y actualmente estamos evaluando la capacidad formadora de este potencial cancerígeno por parte de las bacterias presentes en saliva.

Un breve comentario sobre un proyecto en el cual estamos comenzando a trabajar y cuya motivación principal es lograr desarrollar **biosensores basados en mecanismos de transducción fotoelectroquímica** con aplicación concreta a la detección de marcadores

de interés bioquímico. Para ello, pretendemos aprovechar la experiencia de nuestro grupo de trabajo, dedicado al desarrollo de biosensores tal como hemos mencionado, y la del grupo que dirige el Dr. Rodrigo A. Iglesias que aborda la fabricación y caracterización de fotoánodos para celdas solares basados en membranas híbridas semiconductoras nanoestructuradas. Un sensor fotoelectroquímico es aquel que brinda una **señal de fotocorriente** dependiente de la naturaleza y concentración de las especies químicas (analito: donador o aceptor electrónico) disueltas en una solución electrolítica que está en contacto con un fotoelectrodo. Del mismo modo que en los biosensores clásicos los sensores fotoelectroquímicos deben contar con un elemento de reconocimiento como parte constitutiva de la membrana para que reaccione específicamente con el analito y genere un producto de reacción que modifique la fotocorriente estacionaria del fotoelectrodo.

Para terminar, deseamos mencionar los doctorandos e investigadores que han participado en los estudios realizados en nuestro laboratorio en el área de biosensores: Dr. Raúl Capra, Dra. Miriam Strumia, Dr. Marcelo Romero, Dr. Fernando Garay, Dr. Fausto Comba, Dr. Lucio Simonella, Ing Lucas Colombo, Od. Lucía Berasategui, Dr. Tomas Benavidez, Dra. Ana M. Baruzzi.