



1 de diciembre de 2014 | Vol. 15 | Núm. 12 | ISSN 1607 - 6079

ARTÍCULO

BIOSENSORES ENZIMÁTICOS

*Eduardo Torres Ramírez (Instituto de Ciencias, BUAP) y
Alia Méndez Albores (Instituto de Ciencias, BUAP)*

BIOSENSORES ENZIMÁTICOS

Resumen

Las enzimas son catalizadores de alta selectividad. Es debido a esto que, en la actualidad el uso de enzimas a escala industrial es una realidad y se considera que en los próximos años el número de procesos biocatalíticos se incrementará de manera acelerada. Aquí se presenta un panorama general del uso de las enzimas en procesos industriales y se discuten algunos factores que han permitido el posicionamiento de estos biocatalizadores en sectores estratégicos como el de los alimentos y bebidas o el de la química fina. Se menciona además la relevancia económica que en los últimos años ha desarrollado el sector de los biocatalizadores y en qué sectores industriales ha impactado. Algunos

procesos enzimáticos exitosos son discutidos y se presentan las perspectivas de la biocatálisis para los próximos años.

Palabras clave: biosensores, enzimas, detección de analitos, electroquímica, electrodo

ENZYMATIC BIOSENSORS

Abstract

The first enzymatic biosensor proposed by Lions and Clark in 1962 for the measurement of glucose in blood proved the high efficiency of the enzymes as recognition elements in biosensors. Thus, a great variety of devices have been developed using enzymes as biological recognition element for analytic detec-

tion in several areas such as environmental, food and medicine. This paper describes the enzymatic biosensor in a simple way, emphasizing in the electrochemical type as the most commonly used. Several examples of enzyme biosensors are exposed in areas where they have a significant impact. We conclude from this analysis that the enzyme biosensors have enormous technological potential due to high sensibility of detection and quantification, reproducibility, selectivity, precision and accuracy.

Keywords: biosensors, enzymes, analytic detection, electrochemistry, electrode

“
El primer biosensor enzimático, de tipo electroquímico para la detección de glucosa en sangre, fue desarrollado en el Hospital Infantil de Cincinnati, en Estados Unidos, por Clark y Lyons en el año de 1962.
”

BIOSENSORES ENZIMÁTICOS

Introducción

Como se describió en el artículo introductorio de este número, las enzimas son catalizadores biológicos producidos por los seres vivos para acelerar las reacciones bioquímicas. Esa capacidad es explotada por el hombre para generar diversos bienes y servicios, entre ellos, la detección de moléculas de un cierto compuesto, saber si está presente o no en determinado ambiente, y en qué concentración está. Los biosensores, por otro lado, son dispositivos que proporcionan información cualitativa, cuantitativa o semicuantitativa del medio ambiente que lo rodea a partir de reacciones bioquímicas específicas. De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), un biosensor es un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, anticuerpos, organelos, tejidos o células completas para detectar compuestos químicos usualmente por señales eléctricas, térmicas u ópticas (FLORINEL, 2012).

Los elementos biológicos mencionados funcionan como elementos de reconocimiento, es decir, entran en contacto directo con el compuesto químico que nos interesa detectar (llamado analito), generando un cambio particular que otro componente del sensor, el elemento transductor, convierte en una señal fácilmente medible. En algunas ocasiones, entre el elemento de reconocimiento y el transductor se establece un tercer componente: una interfase para amplificar más la señal o hacer más estable el dispositivo. En la Figura 1 se esquematiza un biosensor con los componentes básicos que lo integran.

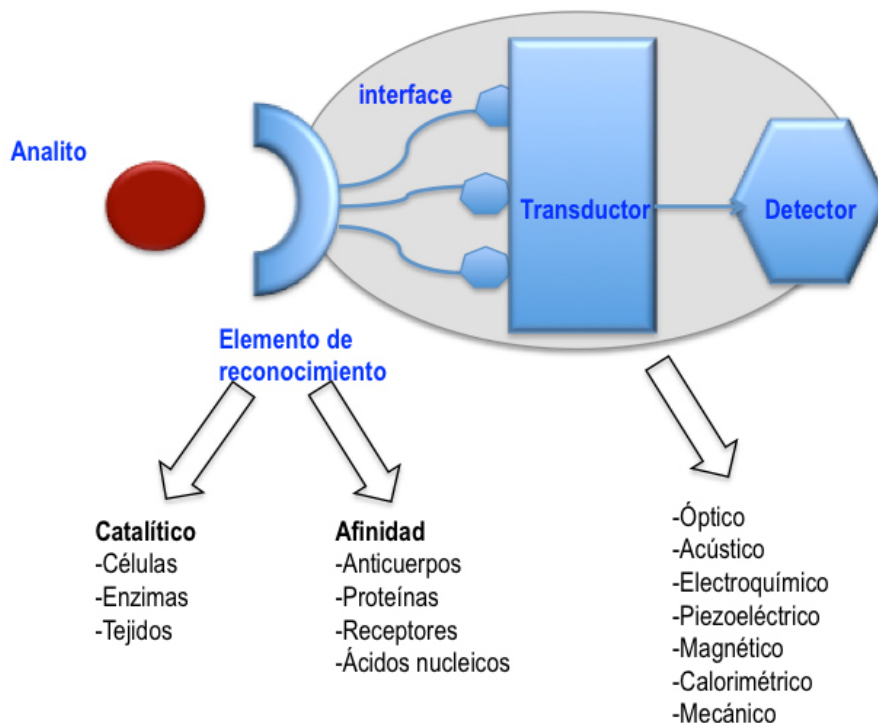
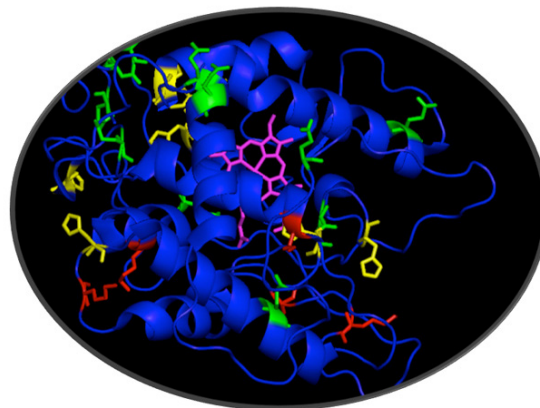


Figura 1. Representación esquemática de un biosensor.

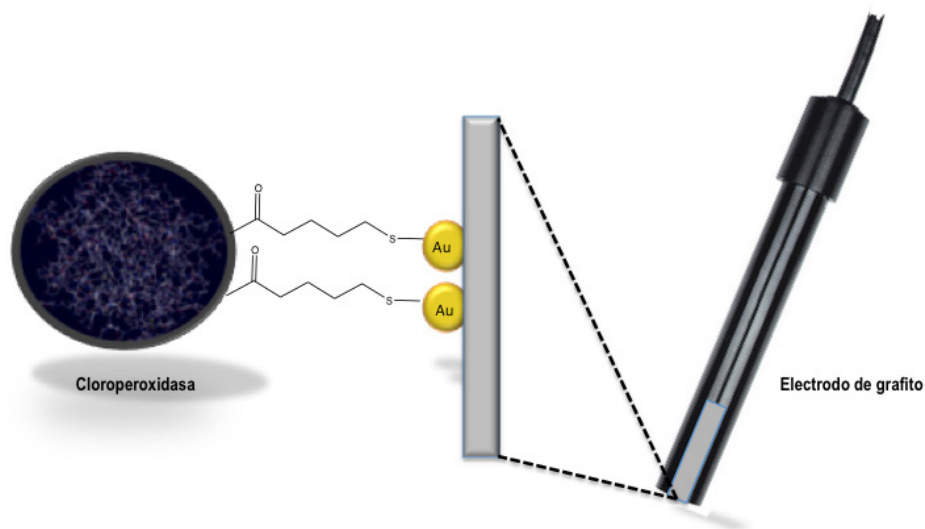
Figura 2. Representación esquemática de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*, donde se muestran en colores los diferentes aminoácidos reactivos en la enzima: rojo (lisinas), verde (ácidos glutámico) y amarillo (histidinas y tirosinas). En rosa se muestra el grupo hemo, sitio activo de la enzima.

Para fabricar un biosensor se debe conocer por separado cada componente que lo conforma. Esto permite construirlo como un dispositivo integrado, es decir, en el que los componentes existen como si fueran uno solo. En el caso de los biosensores enzimáticos, el elemento de reconocimiento es una enzima. A manera de ejemplo, en la Figura 2 se muestra la estructura tridimensional de una enzima en la que se ilustran los diversos grupos químicos que están expuestos en la superficie (por ejemplo, carboxilos y aminos); estos grupos químicos, siempre que no sean esenciales para la función de la enzima como elemento de reconocimiento, pueden ser empleados para unir la enzima al transductor a través de enlaces químicos o simple adsorción.



Como se mencionó, el anclaje o unión de la enzima al transductor usualmente se produce mediante una interfase que puede ser orgánica, inorgánica o híbrida. Las que recientemente son más utilizadas son los nanomateriales, tales como nanopartículas de oro, plata, sulfuro de cadmio, de carbono o sílice. Éstas deben ser modificadas para ser compatibles a las enzimas. La Figura 3 ejemplifica la integración entre enzima, interfase, y transductor para la construcción de un biosensor. El método óptimo de integración de los componentes del biosensor será aquel que permita una respuesta rápida, sensible, selectiva, reproducible, precisa, exacta, y que le dé estabilidad al dispositivo.

Figura 3. Construcción de un biosensor electroquímico a base de la enzima cloroperoxidasa (elemento de reconocimiento). La enzima se une al transductor (electrodo de grafito) mediante una interfase compuesta de ácido mercaptopentanoico y nanopartículas de oro. La interfase puede unirse covalentemente a la enzima por ejemplo por un enlace amida, entre el grupo amino de las lisinas superficiales de la enzima con el grupo carboxilo del ácido (elaboración propia).



Los biosensores enzimáticos son muy utilizados debido principalmente a su alta selectividad, es decir, la capacidad de reconocer un tipo de compuesto en particular en una mezcla donde otros están presentes. Normalmente, un biosensor enzimático cuantifica la concentración del analito a partir del efecto producido por la reacción catalizada. Como consecuencia de la reacción enzimática puede ocurrir un cambio de color, un cambio en la concentración de los protones o electrones en la muestra, un desprendimiento o una captación de gases, una emisión de luz o de calor, o bien la producción de compuestos de productos electroactivos. Todos esos cambios pueden ser transformados por medio de un transductor a una señal amplificada y medible por el usuario final.

Un biosensor puede ser clasificado en óptico, piezoeléctrico, térmico o electroquímico dependiendo del transductor utilizado para medir dichos cambios. Los biosensores enzimáticos electroquímicos (aquellos cuyo transductor es un electrodo) son el tipo más común debido a que presenta múltiples ventajas como: mínima preparación de la muestra, alta sensibilidad y selectividad, conversión directa de la señal electroquímica a señales eléctricas (lo que repercute en simplicidad de diseño y operación), rapidez, viabilidad en costo, miniaturización y portabilidad, entre otros.

El primer biosensor enzimático, de tipo electroquímico para la detección de glucosa en sangre, fue desarrollado en el Hospital Infantil de Cincinnati, en Estados Unidos, por Clark y Lyons en el año de 1962. El dispositivo consistió en confinar a la enzima glucosa oxidasa (abreviada como GOx) dentro de membranas semipermeables unidas a un electrodo, con el fin de detectar oxígeno. El principio de detección fue el siguiente: la GOx cataliza la reacción entre oxígeno y glucosa, produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido glucónico. La concentración de glucosa se determina indirectamente cuantificando el oxígeno remanente, cuya concentración disminuye conforme avanza la reacción. Después de diez años de haber construido el primer prototipo, la compañía estadounidense Yellow Spring comercializó con gran éxito esta tecnología, como el primer analizador de glucosa en sangre que utiliza únicamente 25 l de muestra. Hoy en día existen más de 500 compañías y organizaciones de investigación en todo el mundo dedicadas al desarrollo de biosensores.

Las áreas en las que los biosensores enzimáticos han tenido mayor impacto son las de monitoreo ambiental, la de análisis clínico y la de alimentos. En los próximos párrafos, seleccionamos algunos ejemplos representativos acerca del funcionamiento de algunos biosensores enzimáticos utilizados en estas áreas.

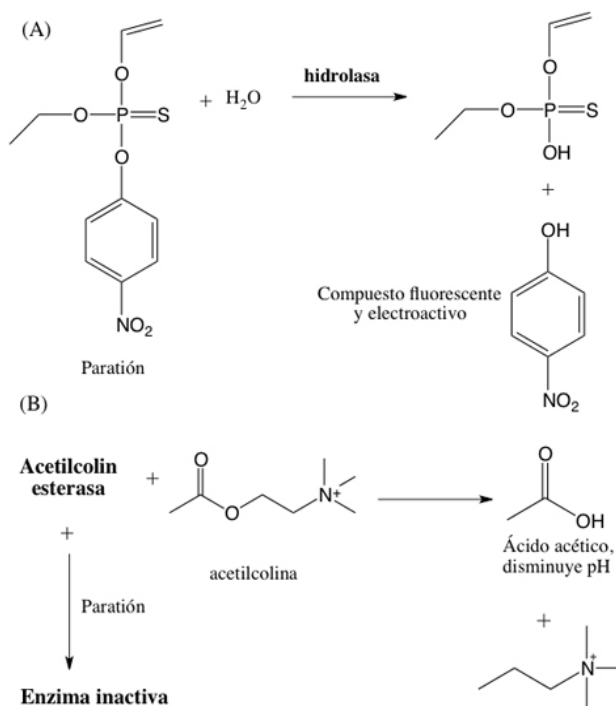
Biosensores en el área del monitoreo ambiental

La descarga creciente y acumulativa de agentes contaminantes y tóxicos al medio ambiente hace necesaria su detección y cuantificación de forma rápida y precisa. Los biosensores, en particular los de tipo enzimático, representan una alternativa interesante en la inspección de diferentes contaminantes en el ambiente forma rápida, eficiente, automatizada y económica.

Una de las familias de compuestos químicos de mayor interés para su monitoreo ambiental es la de los plaguicidas organofosforados, los cuales son utilizados común-

mente en la formulación de insecticidas, y son compuestos neurotóxicos que pueden causar la muerte aun en concentraciones muy pequeñas. Entre los dispositivos para detectar a este tipo de compuestos se encuentran los biosensores enzimáticos que utilizan una enzima llamada hidrolasa, aislada de una bacteria llamada *Pseudomonas diminuta*, la cual reconoce a un gran número de plaguicidas organofosforados como paraoxon, paratión, cumafos, diazinon y clorpirifos, y tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces P–O, P–F, P–S y P–CN de estos compuestos, generando productos. Estos pueden ser coloridos, electroactivos o provocar un cambio en el pH de la muestra, permitiendo su detección mediante el uso de biosensores ópticos o electroquímicos. Otra enzima comúnmente empleada en este tipo de biosensores es la acetilcolin esterasa, la cual es inhibida en su actividad catalítica en presencia de un plaguicida organofosforado. Este fenómeno, la disminución de la actividad catalítica en presencia del analito de interés, se aprovecha como una medida de la cantidad de insecticida presente (Figura 4). Estos biosensores son portátiles, desechables, rápidos y son una excelente opción para una primera determinación cuando se sospecha que muestras de agua, alimentos o fluidos biológicos estén contaminadas con insecticidas organofosforados.

Figura 4. Reacciones enzimáticas llevadas a cabo en la detección de plaguicidas organofosforados. (A) La hidrólisis del paratión por la hidrolasa produce el p-nitrofenol, compuesto fluorescente y electroactivo, que puede ser cuantificado con el transductor óptico o electroquímico. (B) En el caso de la enzima acetilcolin esterasa, al hidrolizarse su sustrato natural, la acetilcolina, produce un cambio de pH que se puede monitorear con un potenciómetro. En presencia del plaguicida la medición se ve afectada ya que la enzima es parcialmente inhibida, afectando con ello la cantidad de ácido producido.



Biosensores en el área del análisis clínico

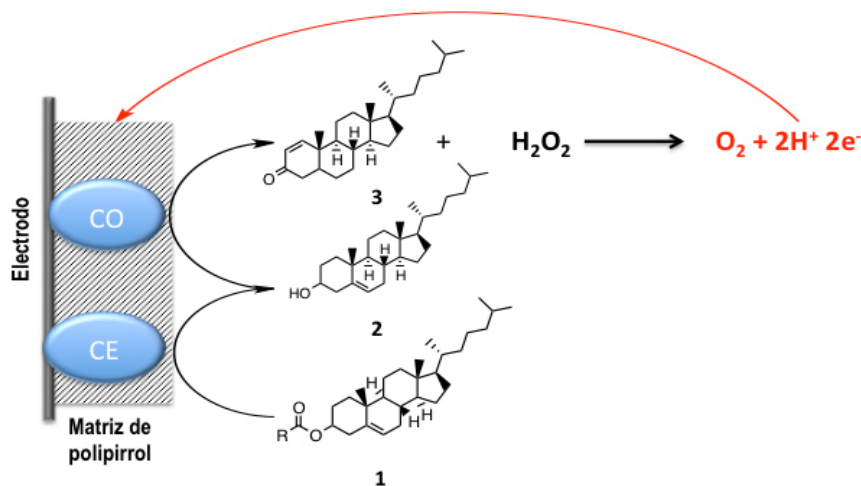
Un órgano o tejido enfermo libera metabolitos (biomarcadores) que inhiben o activan la expresión de ciertas enzimas específicas, y dependiendo del tiempo de evolución y la severidad de la condición, la cantidad de ellos en el organismo incrementa. Por tanto, el uso de enzimas como elemento de reconocimiento biológico para la detección y diagnós-

tico de estos compuestos resulta bastante promisorio.

Como se mencionó anteriormente, los biosensores para la medición de glucosa en sangre son el ejemplo más claro de prototipos que han superado la etapa de investigación, controlando más del 90% del mercado global. Normalmente estos biosensores son de gran utilidad para el monitoreo de pacientes con diabetes. Los biosensores de glucosa disponibles comercialmente muestran una gran sensibilidad, tiempo de respuesta extremadamente rápido y alta estabilidad. Estas propiedades son obtenidas en gran parte debido a un eficiente acoplamiento entre la enzima y el electrodo. Generalmente estos biosensores son del tipo electroquímico y se encuentran disponibles en una gran variedad de diseños como los implantables tipo aguja, los cuales se introducen en el tejido subcutáneo del abdomen o de la parte superior del brazo. La concentración de la glucosa se determina en el fluido intersticial del tejido subcutáneo.

El monitoreo de colesterol en fluidos biológicos, principalmente en sangre, es de gran importancia en el control y diagnóstico de ciertas enfermedades como la hipertensión, hipertiroidismo, anemia y enfermedades cardiovasculares. Los biosensores enzimáticos más eficientes para el colesterol son principalmente del tipo electroquímico y se basan en la combinación de dos enzimas: la colesterol oxidasa (CO) y colesterol esterasa (CE). La segunda es necesaria debido a que el colesterol en la sangre humana está presente en forma de éster y es imperativo hidrolizarlo para que la primera pueda transformarlo. El funcionamiento del biosensor se basa en la acción secuencial de las dos enzimas: la CE cataliza la conversión del colesterol esterificado en colesterol libre, el cual posteriormente se transforma a colesteno y peróxido de hidrógeno en una reacción química catalizada por la enzima CO. Después, aplicando un potencial eléctrico en el electrodo, el peróxido de hidrógeno se transforma a oxígeno. Esta reacción produce una corriente eléctrica, señal que finalmente se detecta y cuya intensidad se asocia con la concentración de colesterol (Figura 5).

Figura 5. La detección electroquímica de colesterol de la sangre requiere una primera hidrólisis del colesterol esterificado. Este paso es catalizado por la enzima colesterol esterasa (CE) (1). El colesterol producido (2) es oxidado por la colesterol oxidasa (CO) para producir colesteno (3) y peróxido de hidrógeno. Es posible determinar la cantidad de colesterol en la muestra midiendo la corriente asociada a la oxidación del peróxido de hidrógeno.



Biosensores en la industria de alimentos

Los biosensores enzimáticos son comúnmente empleados en el análisis de la industria alimentaria en la detección de sustancias no permitidas, tales como fármacos, agroquímicos, microorganismos patógenos y aditivos componentes de los alimentos.

La contaminación con metales pesados aun a bajas concentraciones constituye un serio problema medioambiental global y de salud debido a que los metales no son biodegradables, lo que los hace persistentes en la naturaleza. El monitoreo de estos compuestos mediante biosensores enzimáticos se lleva a cabo gracias a la inhibición de la actividad enzimática que surge como resultado de la formación de complejos estables entre la enzima y el ión del metal pesado, lo que bloquea la actividad catalítica de la enzima. Tal es el caso de la detección de plomo y cobre mediante el empleo de una enzima peroxidasa de origen vegetal, que se obtiene del rábano picante. La reacción química catalizada por la enzima, en ausencia de inhibición, se basa en el monitoreo de la corriente necesaria para reducir a uno de los sustratos, el peróxido de hidrógeno. Cuando el metal está presente en la muestra a analizar, éste interactúa en el sitio activo de la enzima, impidiendo que la reacción se complete y por tanto disminuyendo con esto la corriente. Así, la concentración de metal es inversamente proporcional a la corriente que se detecta con el biosensor. Los límites de detección que se han reportado para estos biosensores son de 2.5 g/L y 4.2 g/L para plomo y cobre, respectivamente.

Conclusiones

Por su alta sensibilidad y actividad electrocatalítica, los biosensores enzimáticos representan una buena alternativa en la detección de compuestos de interés analítico, principalmente en las áreas del monitoreo ambiental, análisis clínico y de alimentos. Su facilidad de uso, tiempos de respuesta cortos, selectividad y la posibilidad de miniaturización hacen a los dispositivos sensores a base de enzimas un campo de investigación intenso y extenso, con tecnologías maduras y en desarrollo.

Bibliografía

- [1] FLORINEL-GABRIEL, Banica. *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*, First Edition. JohnWiley & Sons, 2012.