Seminario de Ingeniería Biomédica
8 de marzo de 2016

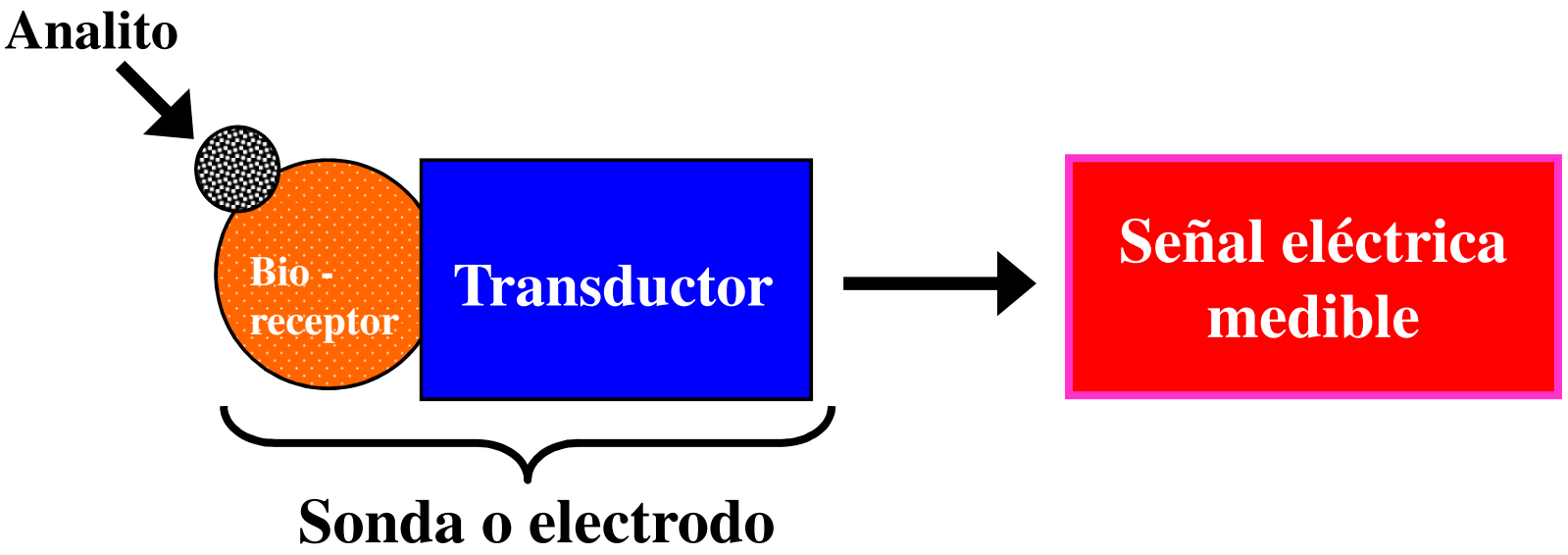
BIOSENSORES PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Prof. Titular Juan Bussi
Cátedra de Fisicoquímica y Laboratorio de Fisicoquímica de Superficies
Fac. de Química
E-mail: jbussi@fq.edu.uy

BIOSENSORES

•dispositivos utilizados para determinar la cantidad de una sustancia (analito) presente en un medio dado.

•constituídos por dos componentes: un bioreceptor y un transductor, acoplados en un mismo elemento material (sonda o electrodo).

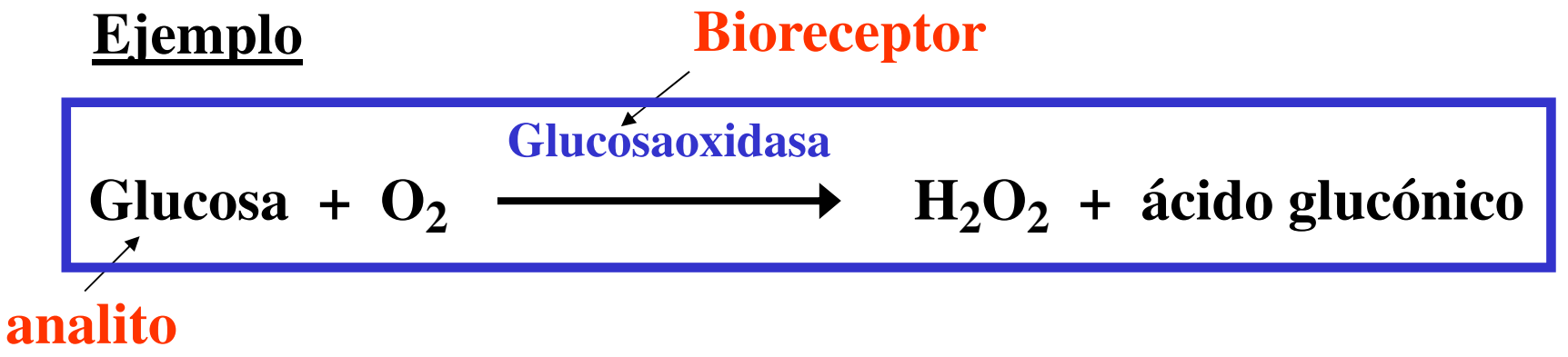


Bioreceptor

•una o más enzimas puras o formando parte de materiales de origen biológico tales como anticuerpos, células, microorganismos.

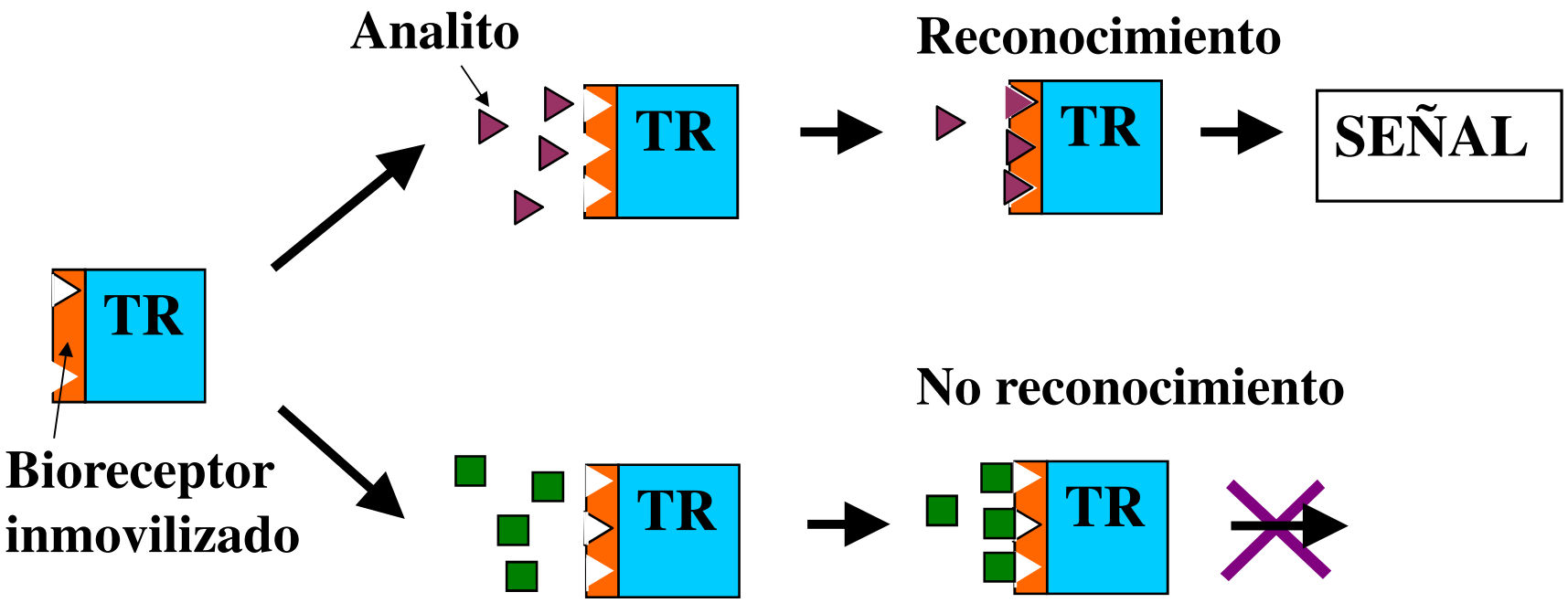
•la sustancia a determinar (analito) reacciona químicamente al ser puesta en contacto con el bioreceptor.

Ejemplo



•Cada tipo de enzima tiene la propiedad de reaccionar sólo con un determinado tipo de compuestos (especificidad), por ejemplo con proteínas, o con azúcares, o con grasas, etc. Esta propiedad es fundamental para su uso en biosensores.

Especificidad de un biosensor (TR: transductor)



Otra propiedad importante de las enzimas:

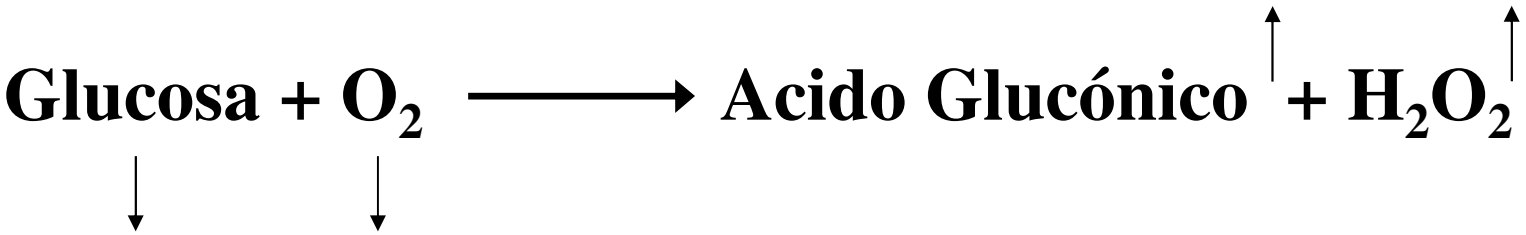
Regenerabilidad

Transductor

•Convierte el evento generado por la enzima y el analito en una señal eléctrica u óptica medible.

•Esto es hecho midiendo el cambio de alguna propiedad durante la reacción química entre el analito y el bioreceptor.

•Por ejemplo, la oxidación de la glucosa promueve cambios de concentración de glucosa, oxígeno, peróxido de hidrógeno y ácido glucónico:



3 tipos de transductores comunmente usados:

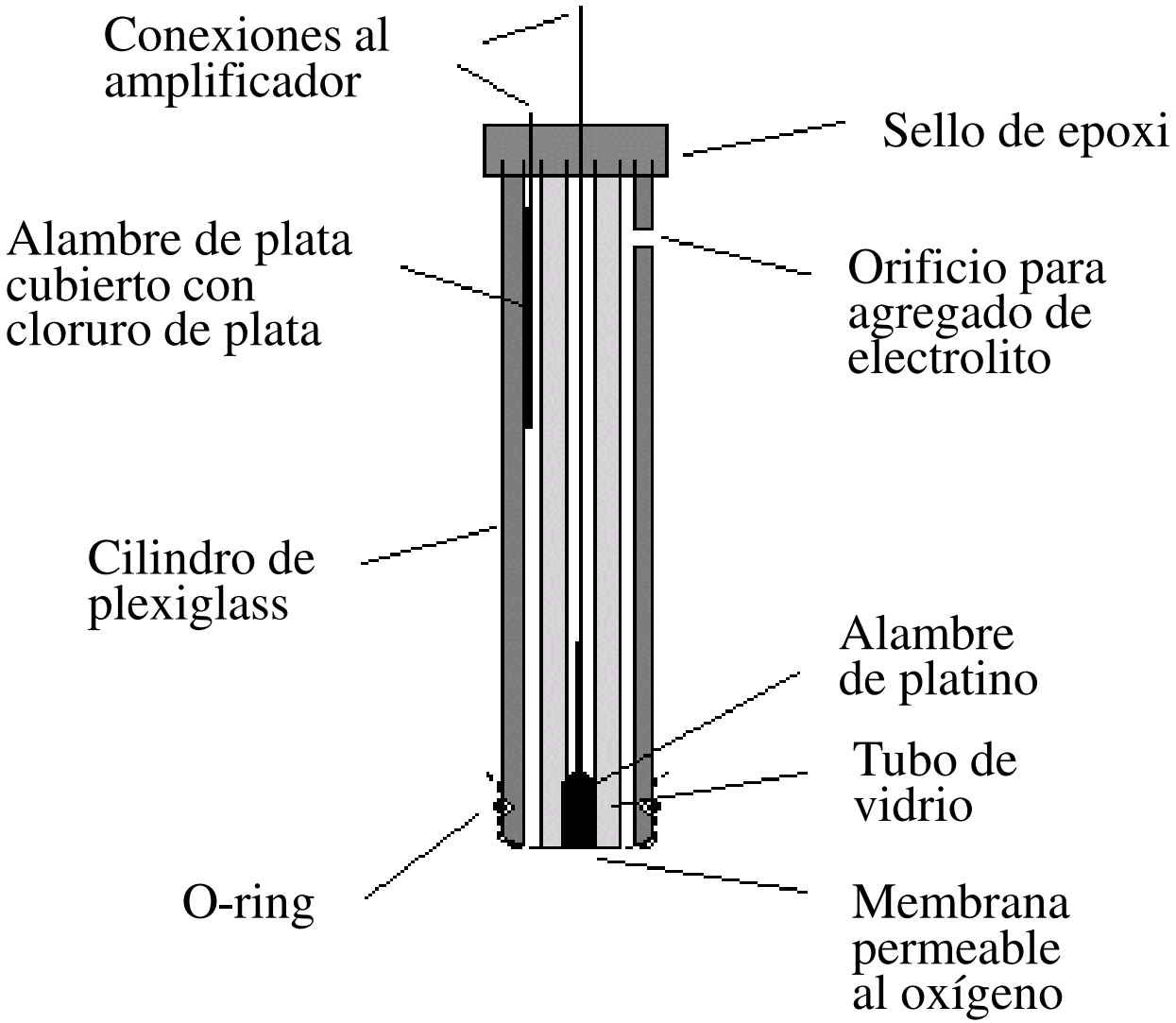
- **Electrodo de oxígeno que mide concentración de oxígeno.**

- **Electrodo de pH que mide el ácido glucónico producido.**

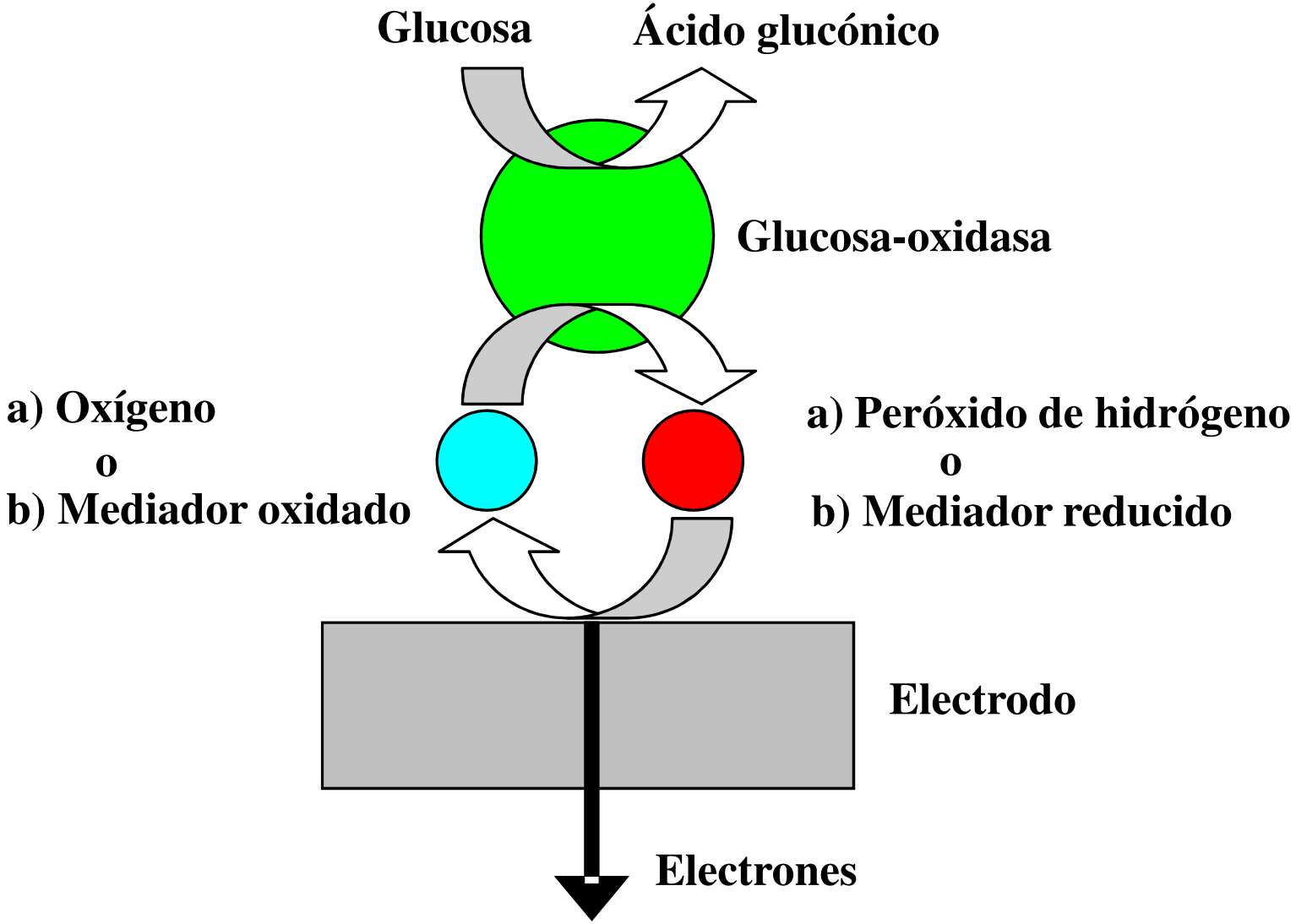
- **Electrodo de peróxido que mide la concentración de H_2O_2.**

Electrodo de oxígeno

Electrodo tipo Clark



La respuesta es una intensidad de corriente proporcional a la concentración de Oxígeno


Glucosa
Ácido glucónico
Glucosa-oxidasa
a) Oxígeno
o
b) Mediador oxidado
a) Peróxido de hidrógeno
o
b) Mediador reducido
Electrodo
Electrones

Ventajas comparativas de biosensores frente a otras técnicas analíticas

- **medición directa del analito**
- **medición in situ**
- **el medio no sufre alteración luego de la medición**
- **medición instantánea**
- **medición continua**
- **capacidad de reuso “ilimitado”**

ETAPAS DE CONSTRUCCIÓN

SELECCIÓN DEL BIORECEPTOR

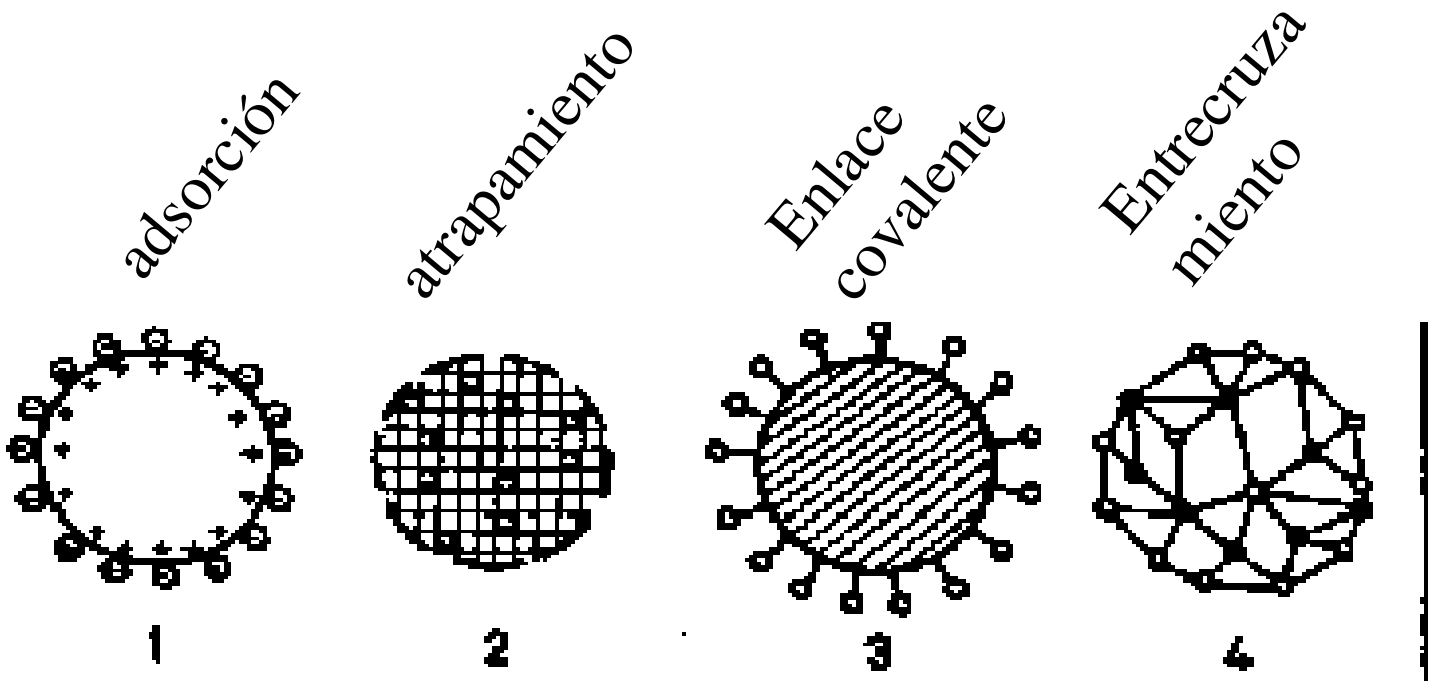
Material biológico adecuado que interaccione con el analito generando un cambio de propiedades medible por alguna técnica instrumental (electroquímica, óptica, etc.).

- **Enzimas**
- **Anticuerpos x Antígenos**
- **Lectinas x Carbohidratos**
- **Complementariedad de ácidos nucleicos.**

(dominio de la Bioquímica)

INMOVILIZACIÓN DEL BIORECEPTOR

Técnicas y materiales (soportes) adecuados.



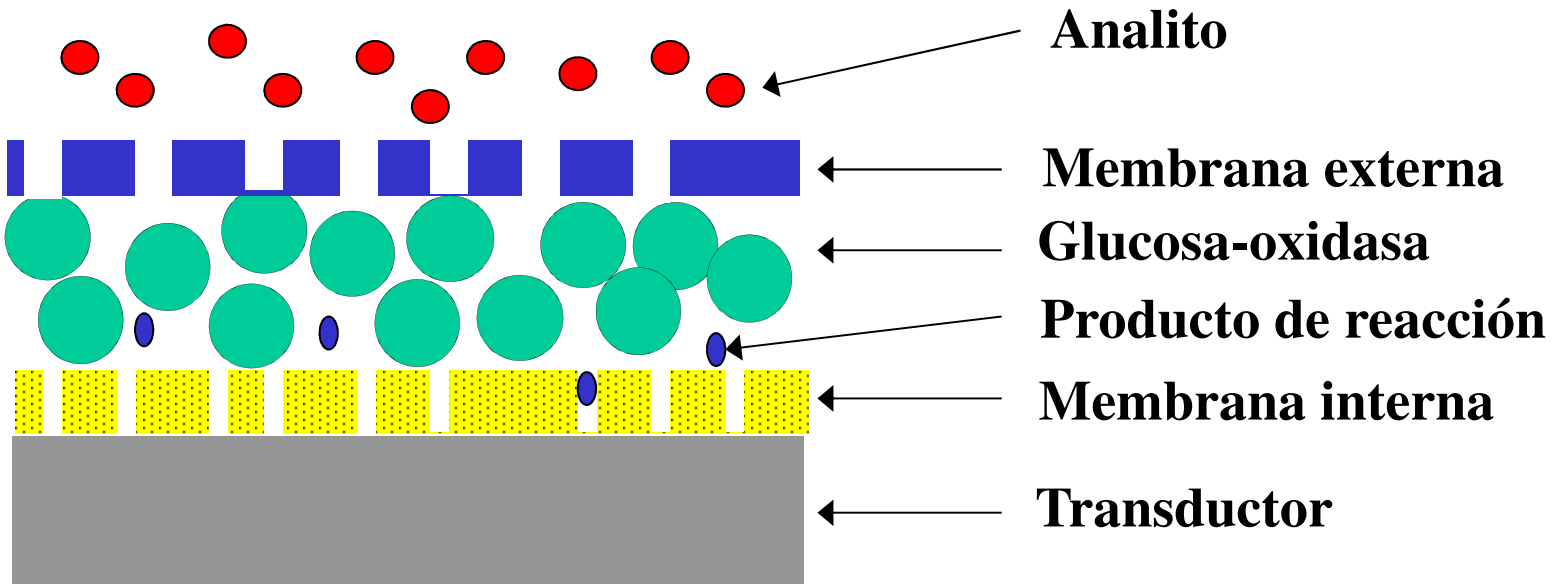
1. adsorción física y química.

Mediante fuerzas de atracción electrostáticas entre bioreceptor y un soporte sólido.

2. atrapamiento (encapsulación)

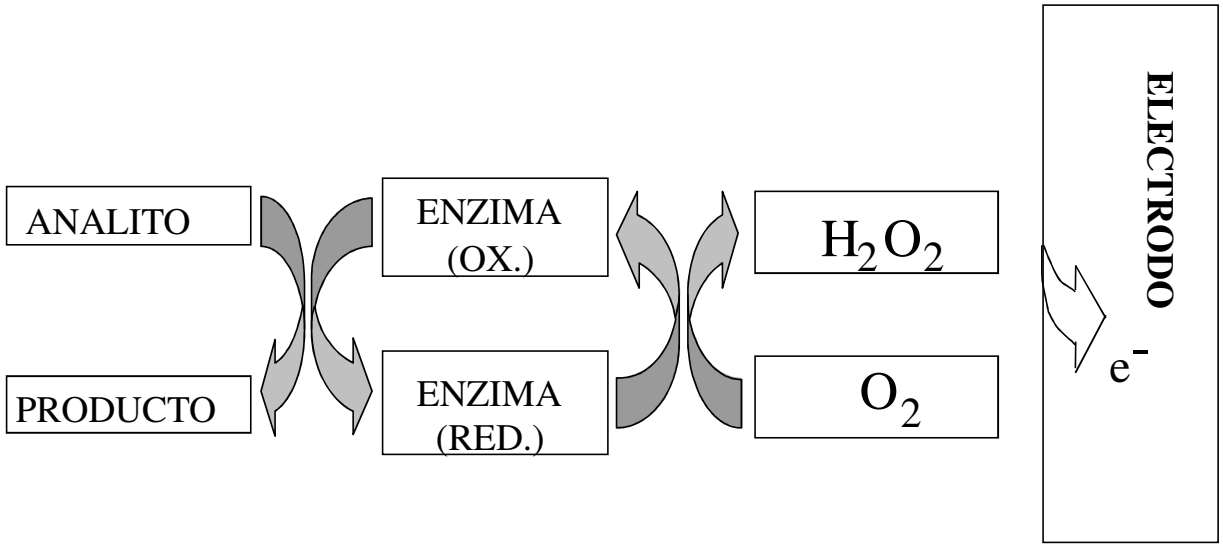
- **con membranas permeables sólo al analito.**
- **red tridimensional de polímeros orgánicos e inorgánicos con elevada porosidad.**

Ejemplo: Inmovilización con membranas

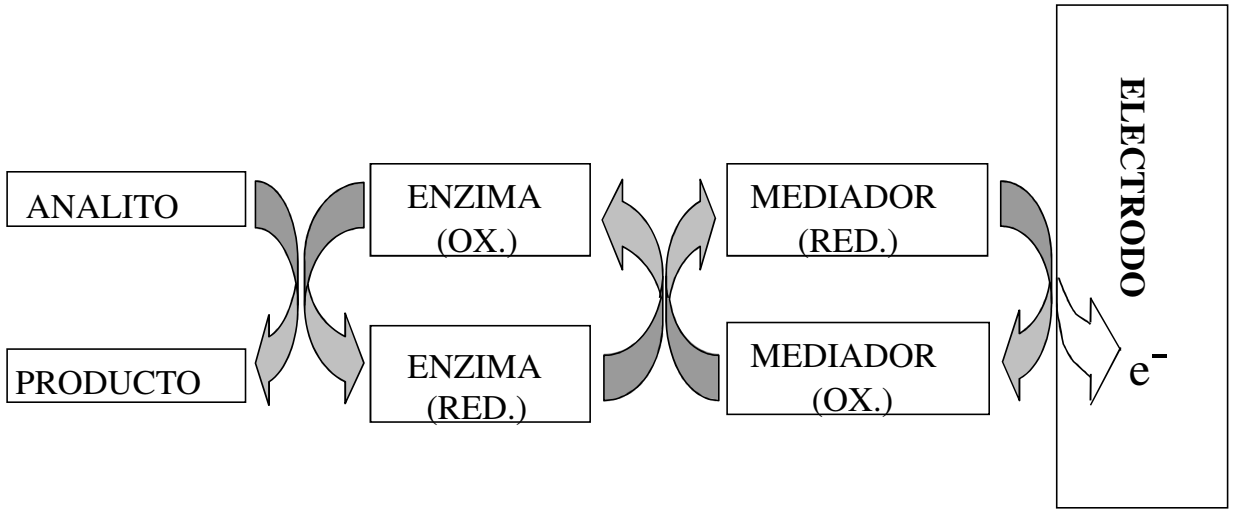


Uso de MEDIADORES: eliminan la necesidad de oxígeno

ESQUEMA SIN MEDIADOR



ESQUEMA CON MEDIADOR



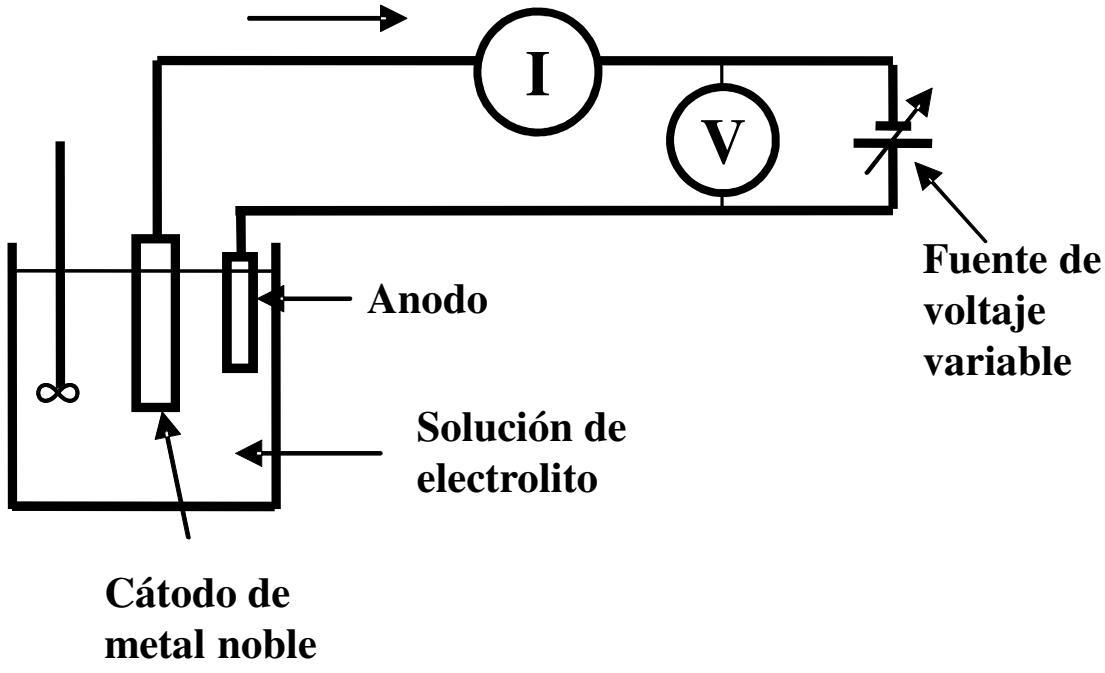
3. **enlaces covalentes.**

4. **entrecruzamiento: formación de copolímeros con otros compuestos (ej. con glutaraldehído).**

SELECCIÓN DEL TRANSDUCTOR

Sensores amperométricos: basados en la medida de un producto de reacción electroactivo (como H_2O_2 o el O_2).

Circuito básico de una celda electroquímica



Ejemplo de la determinación de glucosa:

- **Reacción con el bioreceptor:**

$$\text{Glucosa} + O_2 \longrightarrow H_2O_2 + \text{ácido glucónico}$$

- **Reacción en el transductor:**

reacción catódica:

$$O_2 \longrightarrow O_{2(ads)} \xrightarrow{2e^-} H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{(a)\ 2e^-} 2H_2O$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{(b)\ \text{Difusión}} H_2O_2$$

reacción anódica: $Ag + Cl^- \dashrightarrow AgCl + e^-$

Para la medida de O_2, el voltaje aplicado: entre -0.6 y -0.8 V (cuando se usa el electrodo de referencia Ag/AgCl)

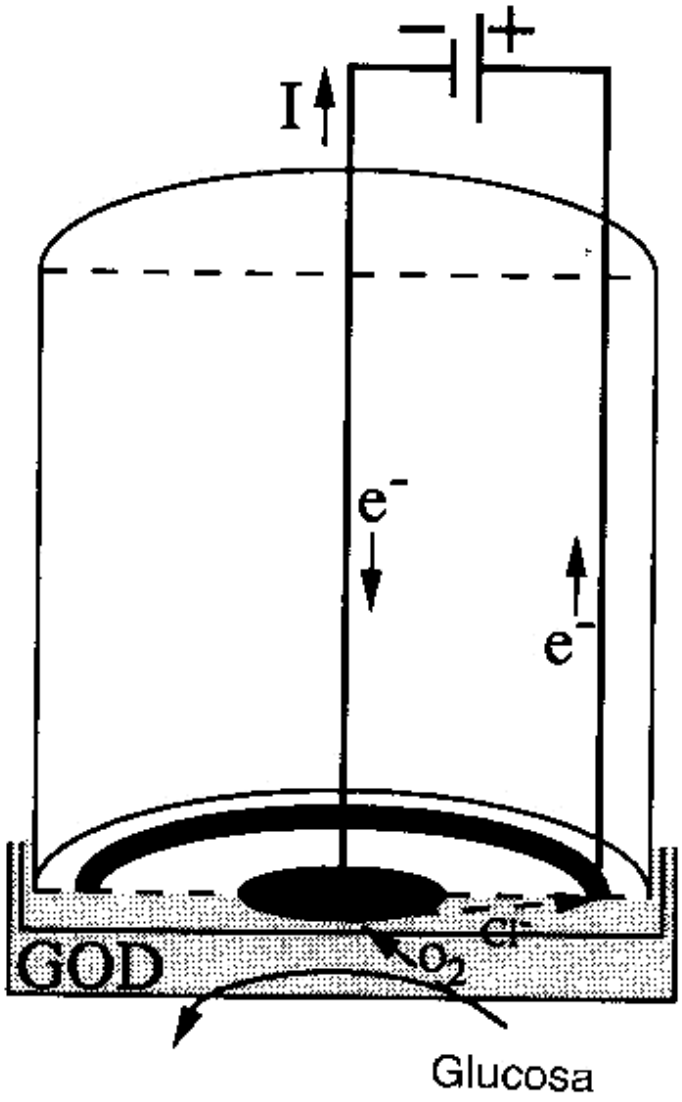
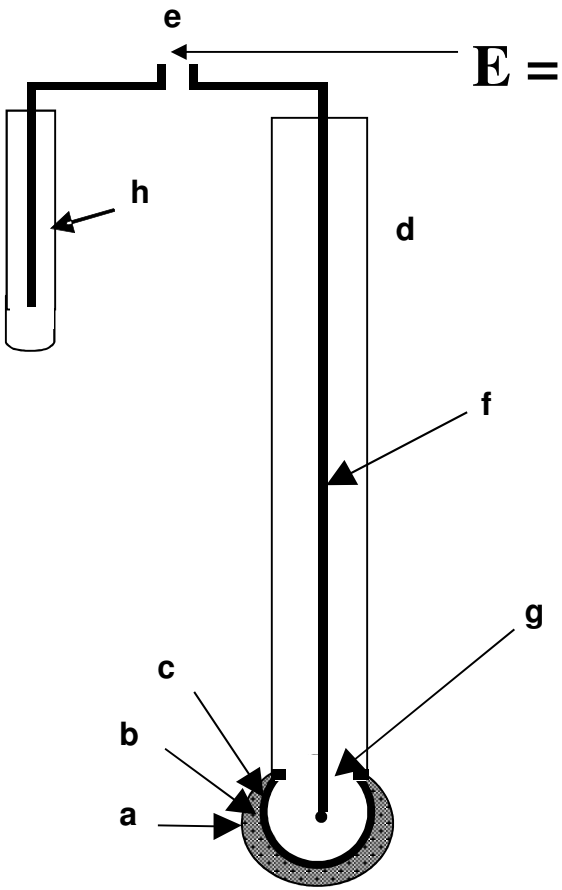


Figura 3 Biosensor amperométrico de glucosa basado en un electrodo de oxígeno que utiliza glucosa-oxidasa (GOD).

Sensores Potenciométricos

Basados en el uso de electrodos selectivos de iones (de membrana de vidrio y otros).

La respuesta es un potencial eléctrico (E) proporcional a la concentración del analito



$$E = \varphi_o - \varphi_i = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C}$$ **(ecuación de Nernst)**

a) membrana semipermeable
b) biocatalizador inmovilizado
c) membrana de vidrio de un electrodo de pH
d) electrodo de pH
e) potenciómetro
f) electrodo Ag/AgCl
g) HCl diluido
h) electrodo de referencia

Ejemplo: Biosensor potenciométrico para determinación de urea.

$$(NH_4)_2CO + H^+ \xrightarrow{\text{Ureasa}} 2NH_4^+ + HCO_3^-$$

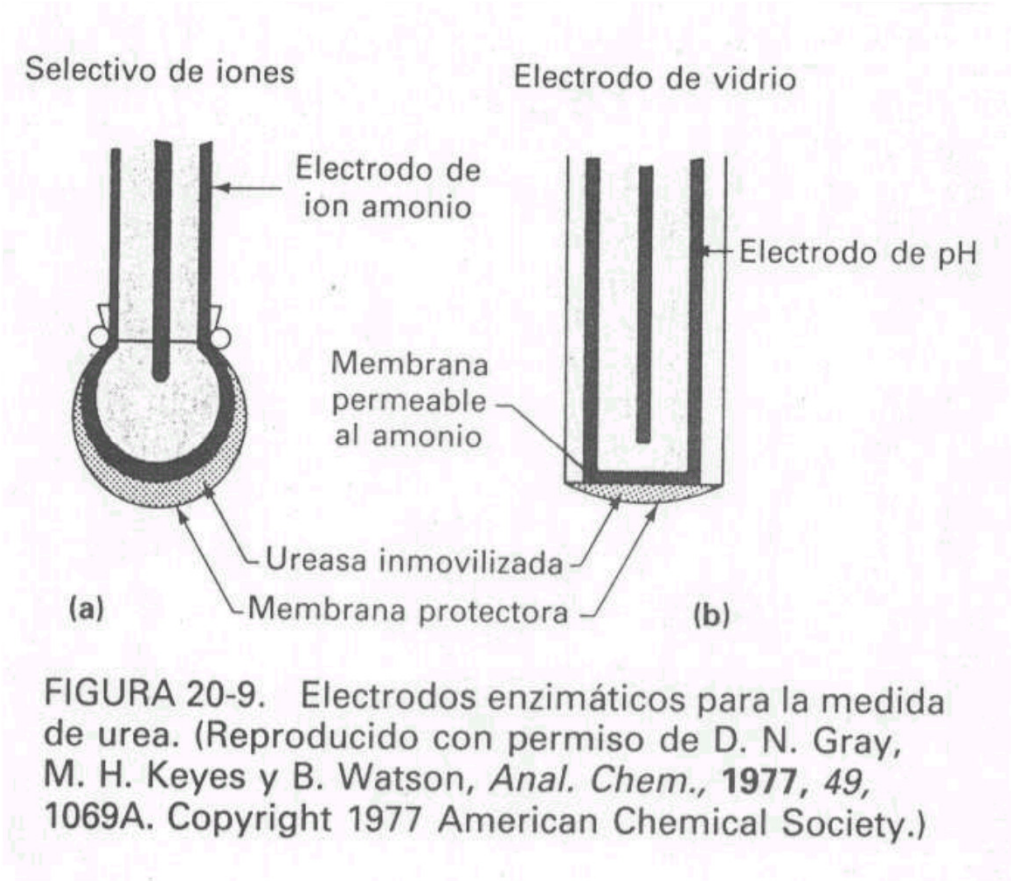
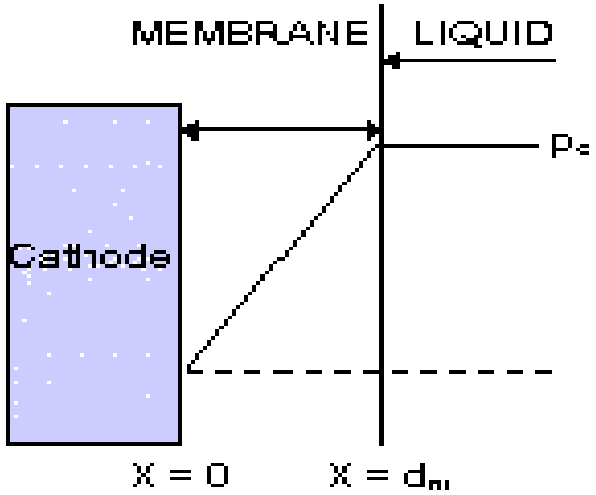


FIGURA 20-9. Electrodos enzimáticos para la medida de urea. (Reproducido con permiso de D. N. Gray, M. H. Keyes y B. Watson, *Anal. Chem.*, **1977**, *49*, 1069A. Copyright 1977 American Chemical Society.)

Respuesta lineal entre $5x10^{-5}$ y $5x10^{-3}$ mol/L

DISEÑO DEL BIOSENSOR

Rango de medida, linealidad, minimización de interferencias, velocidad de respuesta, etc.



Corriente de salida: $I_s = NFA \frac{p_m}{d_m} p_o$

Tiempo de respuesta: $\tau = \frac{d_m^2}{D_m}$

Variables de diseño: P_m, d_m, D_m, A

d_m: espesor de la membrana

D_m: difusividad del oxígeno a través de la membrana.

p_o: presión parcial de oxígeno en el líquido

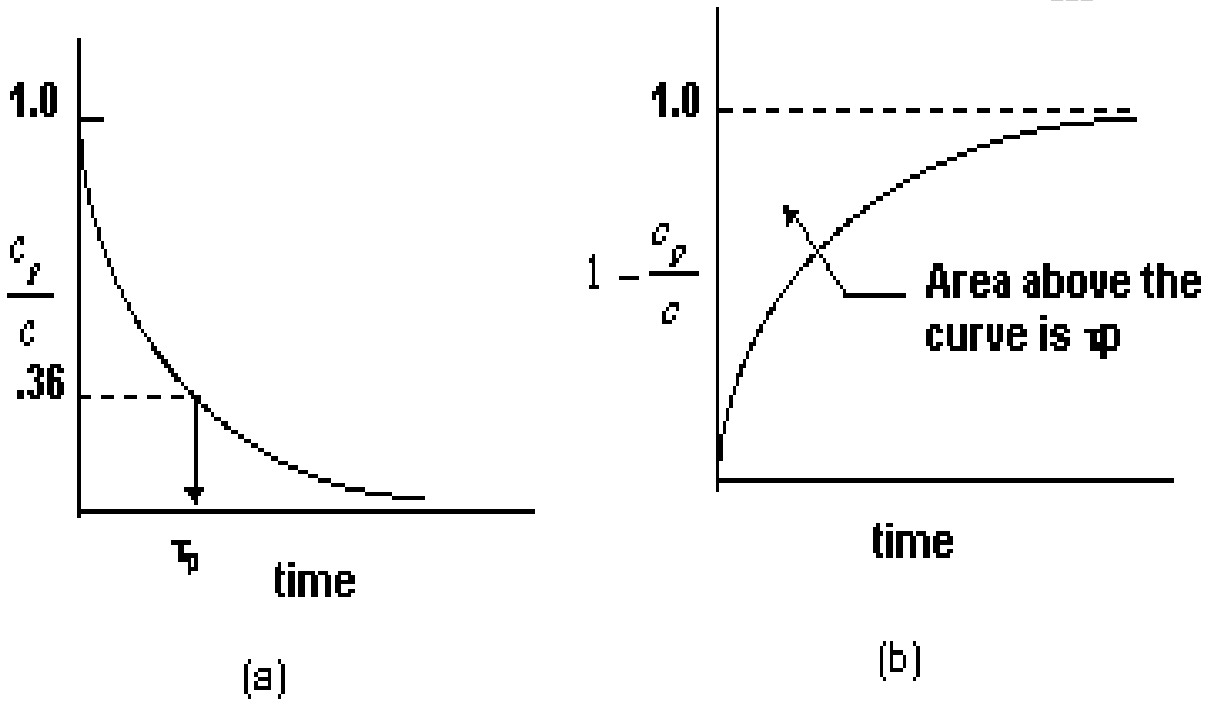
***N*: número de electrones por mol de oxígeno reducido**

***F*: constante de Faraday (= 96,500 coul/mol)**

***A*: área del cátodo**

***P_m*: permeabilidad de la membrana al oxígeno**

Tiempo de Respuesta $\tau = \dfrac{d_m^2}{D_m}$

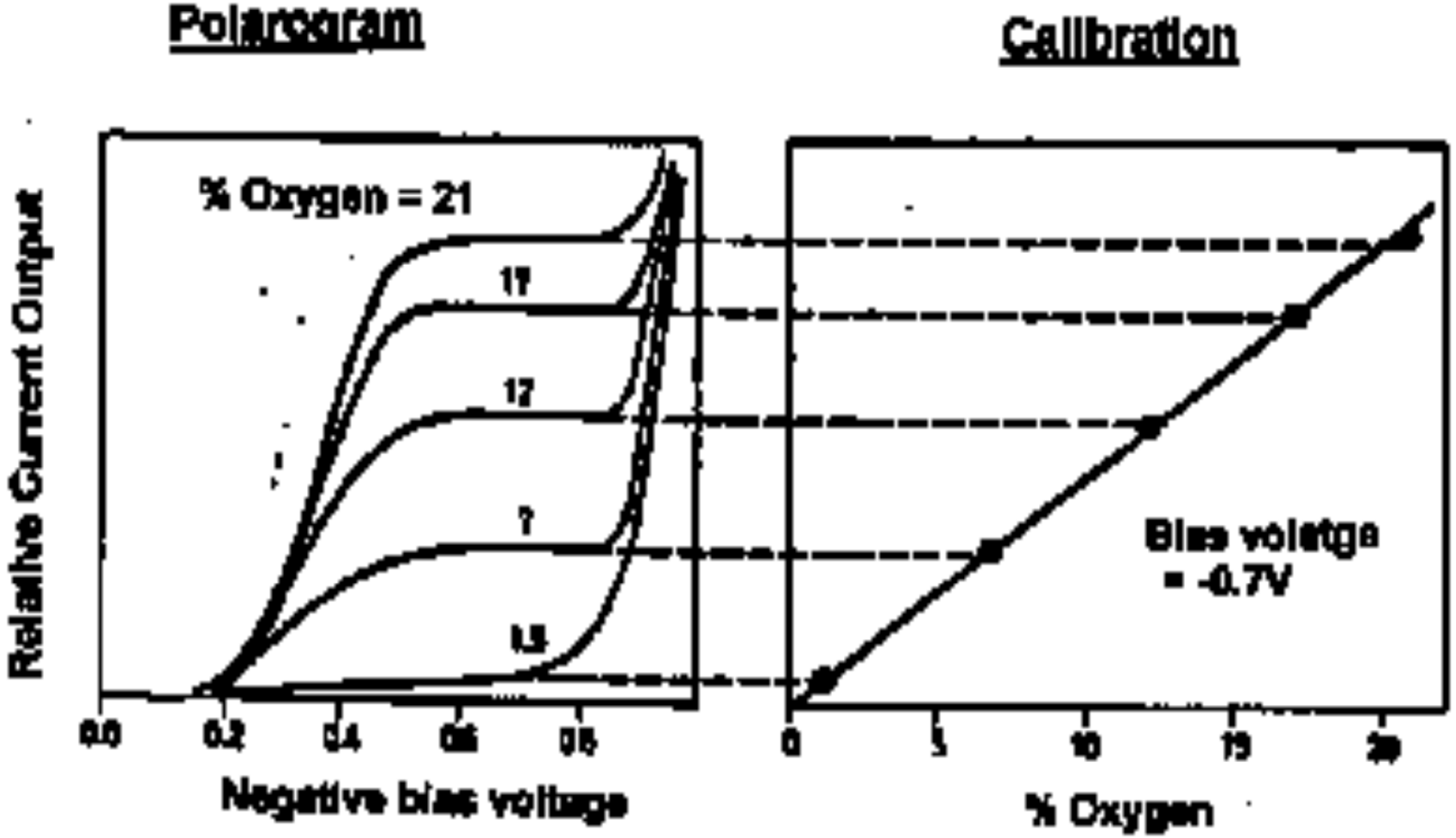


Corriente transitoria I_t del electrodo

$$I_t = NFA \frac{p_m}{d_m} p_o \left(1 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp(-n^2 \pi^2 D_m t / d_m^2) \right)$$

(a) Diagrama corriente-voltaje a diferentes tensiones de oxígeno

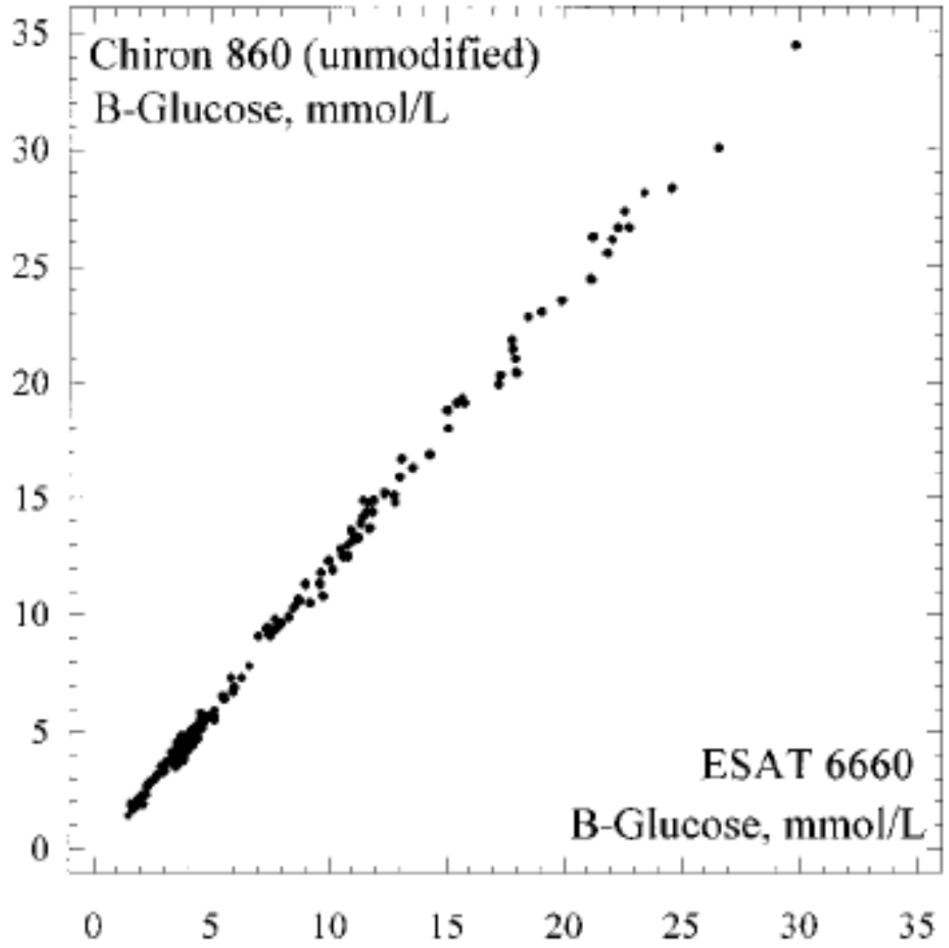
(b) Calibración obtenida a un voltaje de polarización de -0.7V.



•**Para la medida de H_2O_2 puede usarse el mismo sensor con un voltaje de polarización de + 0.7 V en vez de - 0.7 V.**

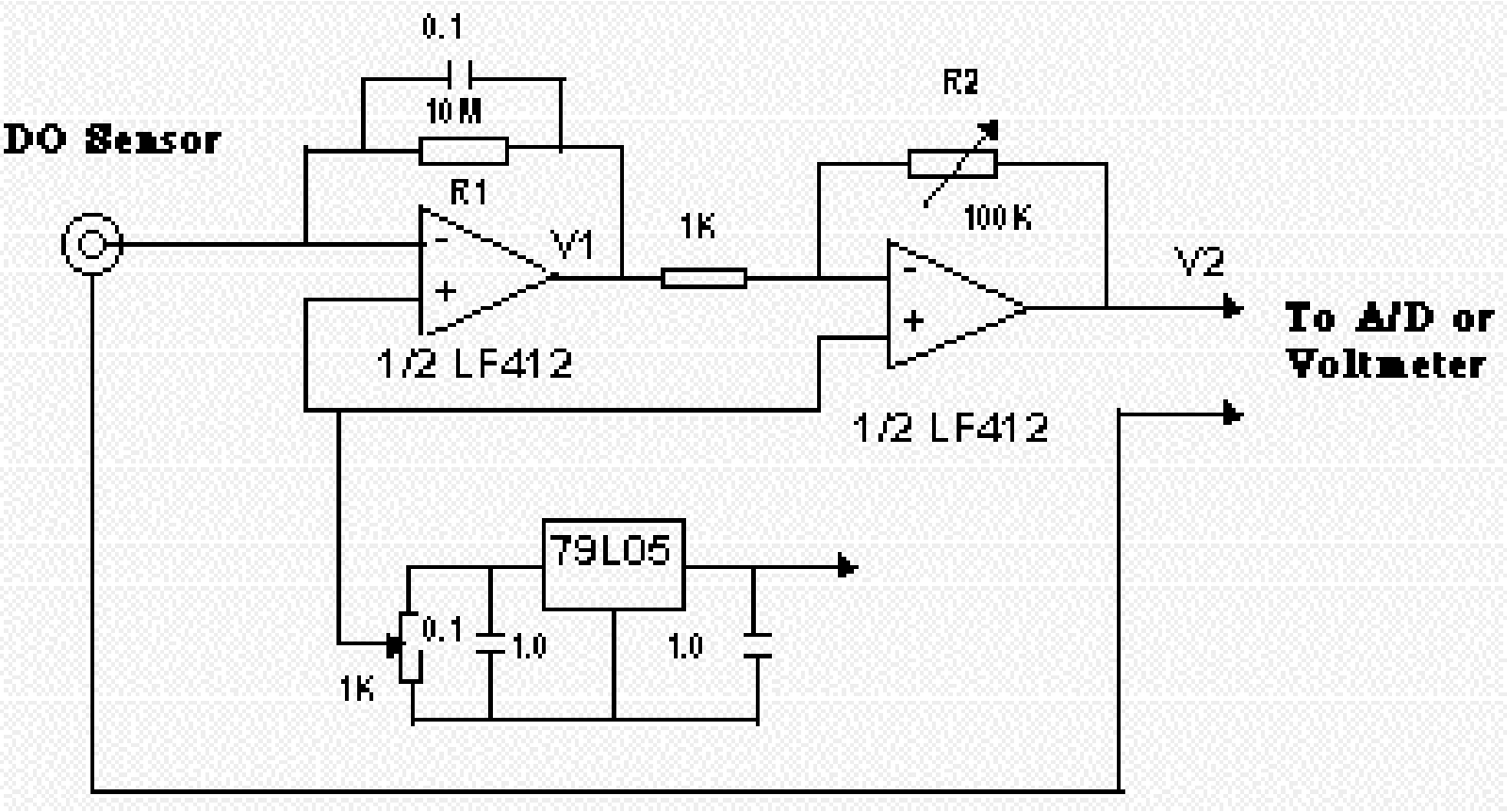
Medición de glucosa en sangre

Biosensor Chiron 860



Clinical Chemistry
44:3, 655–659 (1998)

Circuito para conversión de corriente a voltaje y aplicación del voltaje de polarización.



Dependencia de la señal con la concentración del analito.

- **Para biosensores amperométricos**
  - **Límite inferior de detección 10^{-7} mol/L**
  - **Rango de linealidad entre 10^{-7} mol/L y 10^{-4} mol/L**

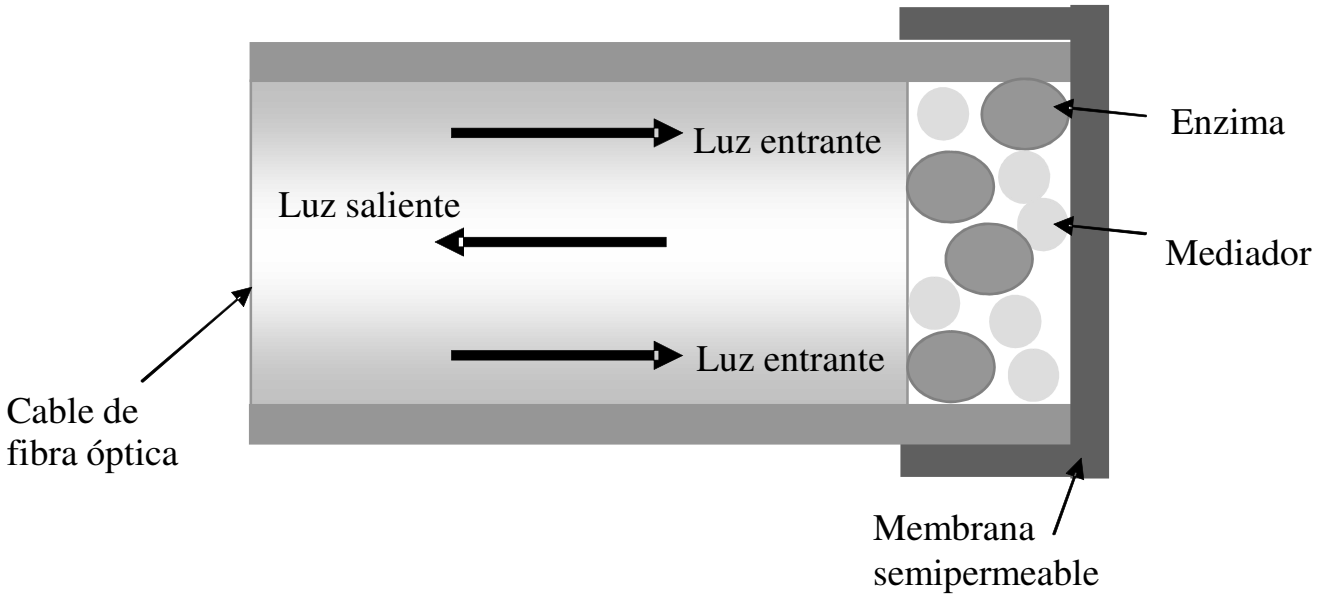
- **Para biosensores potenciométricos**
  - **Límite inferior de detección 10^{-4} mol/L**
  - **Rango de linealidad entre 10^{-4} mol/L y 10^{-1} mol/L**

Tercera generación de biosensores

La remoción de electrones desde la enzima se hace sin necesidad de mediadores

Ciertas enzimas exhiben propiedades conductoras debido a la ubicación periférica de centros redox en la molécula

Biosensores ópticos



- **Permiten el uso de materiales detectores no eléctricos, seguros en ambientes peligrosos o sensibles (in vivo)**
- **No precisan sensores de referencia**

Biosensor de fibra óptica para lactato

- **Detecta cambios en la en la concentración de oxígeno determinando la reducción de la fluorescencia de un fluorocromo (quenching)**

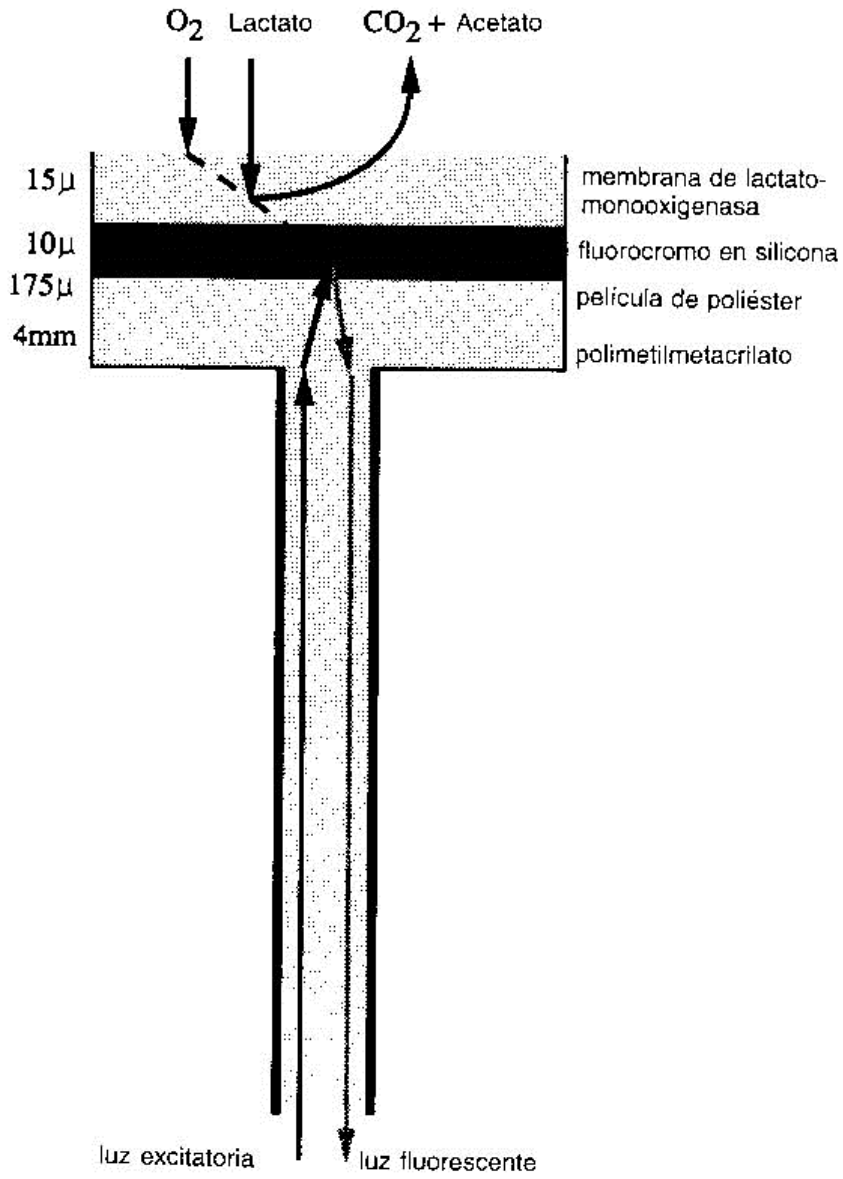


Figura 13 Biosensor de fibra óptica para lactato.

Biosensor de célula óptica para albúmina sérica

- **Detecta la absorción de luz a 630 nm que pasa a través de la célula detectora.**
- **Se evalúa el cambio de amarillo a azul verdoso del verde de bromocresol cuando se une a la albúmina sérica a pH 3.8**
- **Respuesta lineal a la albúmina en un intervalo de 5 a 35 mg/cm^3**

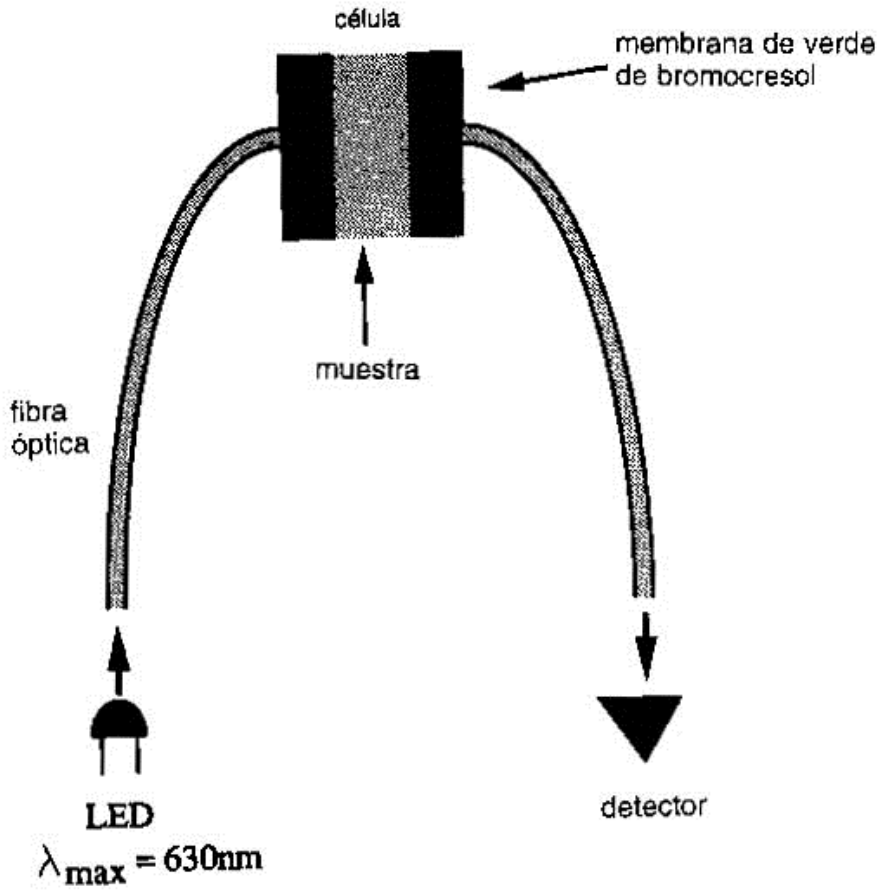
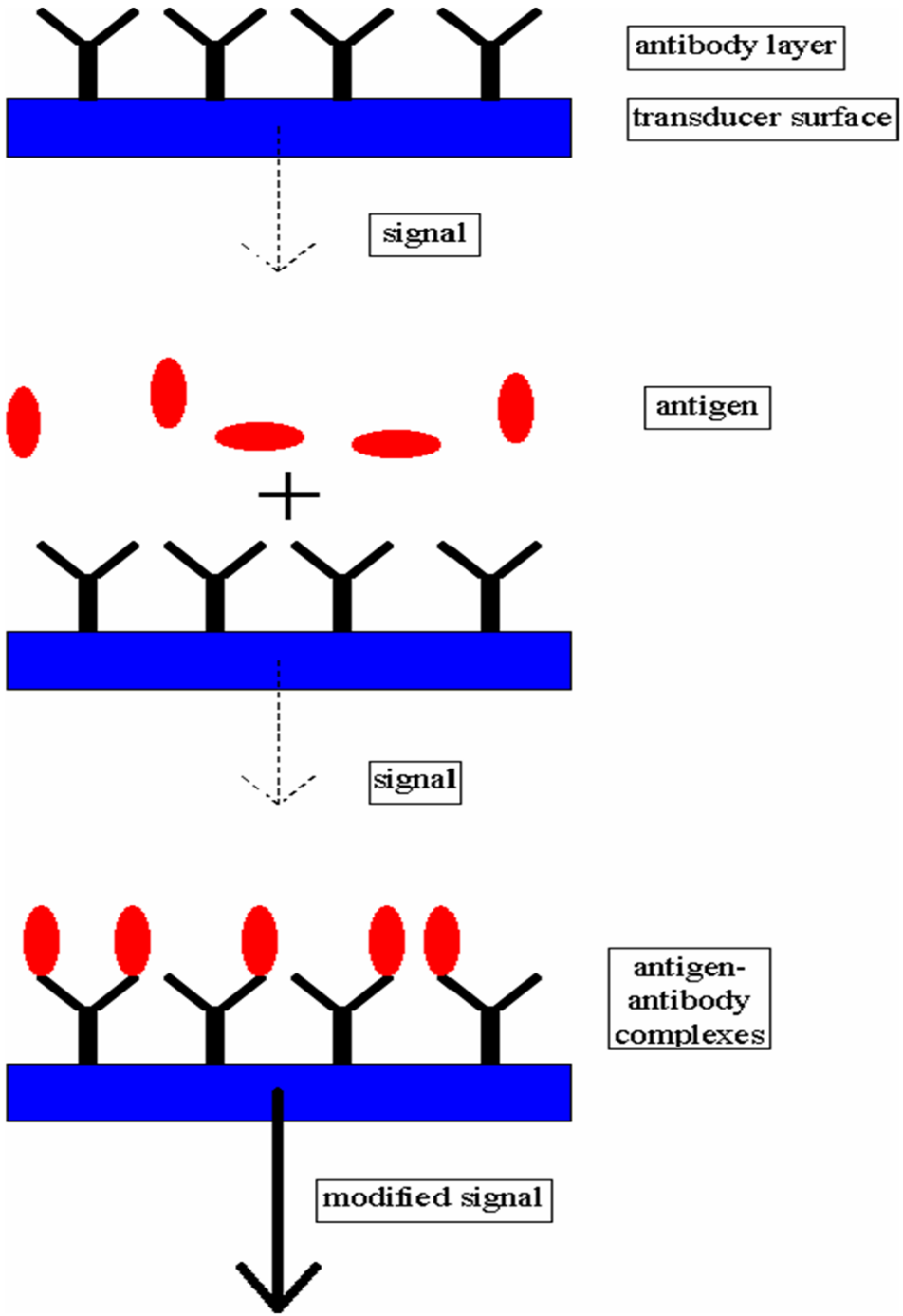
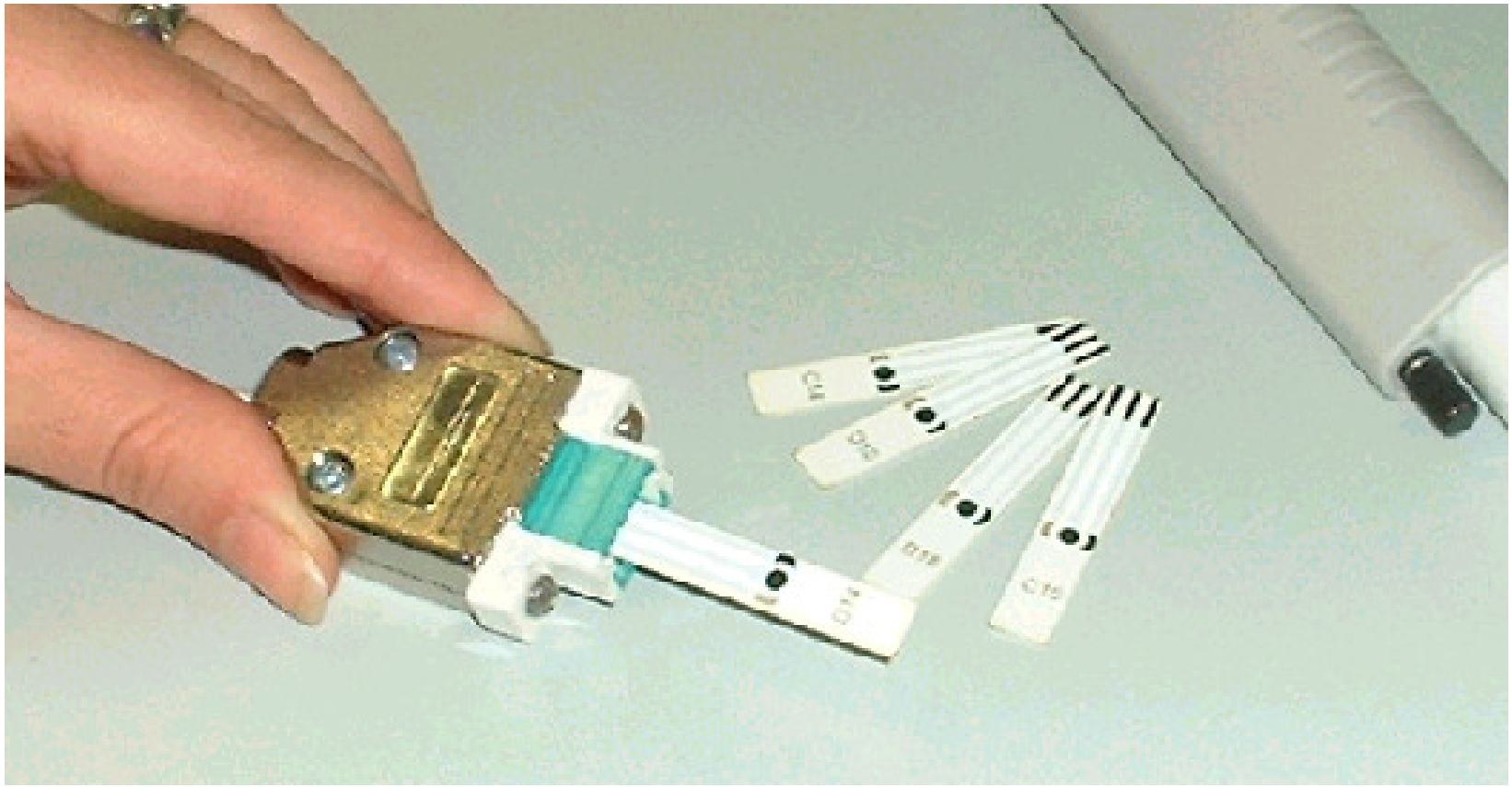


Figura 14 Biosensor de célula óptica para albúmina sérica.

Biosensores ópticos basados en anticuerpos (Immunosensores)



Biosensores descartables



Tiras colorimétricas de un solo uso:

- **Las más utilizadas: análisis de sangre y orina.**
- **Control de la glucemia en diabéticos**
- **Glucosa oxidasa, peroxidasa de rábano y un cromógeno que cambia el color al ser oxidado**

$$\text{Glucosa} + O_2 \xrightarrow{\text{glucosaoxidasa}} H_2O_2 + \text{ácido glucónico}$$

$$\text{Cromógeno(2H)} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxidasa}} \text{colorante} + 2H_2O$$

Biosensores para monitoreo continuo

Biosensor de glucosa tipo aguja (ancho de 1mm)

Implantado a una profundidad de 10-15 mm

Biochemical Recognition	Physical Transducer
Enzyme	Electrochemical detection pH electrode Gas sensor (O_2, NH_3, CO_2) Platinum (H_2O_2) Surface-modified electrodes Ion-selective electrodes ChemFET Optical detection NADH fluorescence/absorption Chromophore reaction product pH and ion-selective optodes Other Conductivity Thermistor/calorimetry
Antibody	Optical detection NADH fluorescence Chemiluminescence Surface plasmon resonance Ellipsometry Electrochemical detection Platinum (O_2 and H_2O_2) Potentiometric Other Piezoelectric (mass)
Plant/animal tissues	Amperometric/potentiometric
Microorganisms	Amperometric/potentiometric

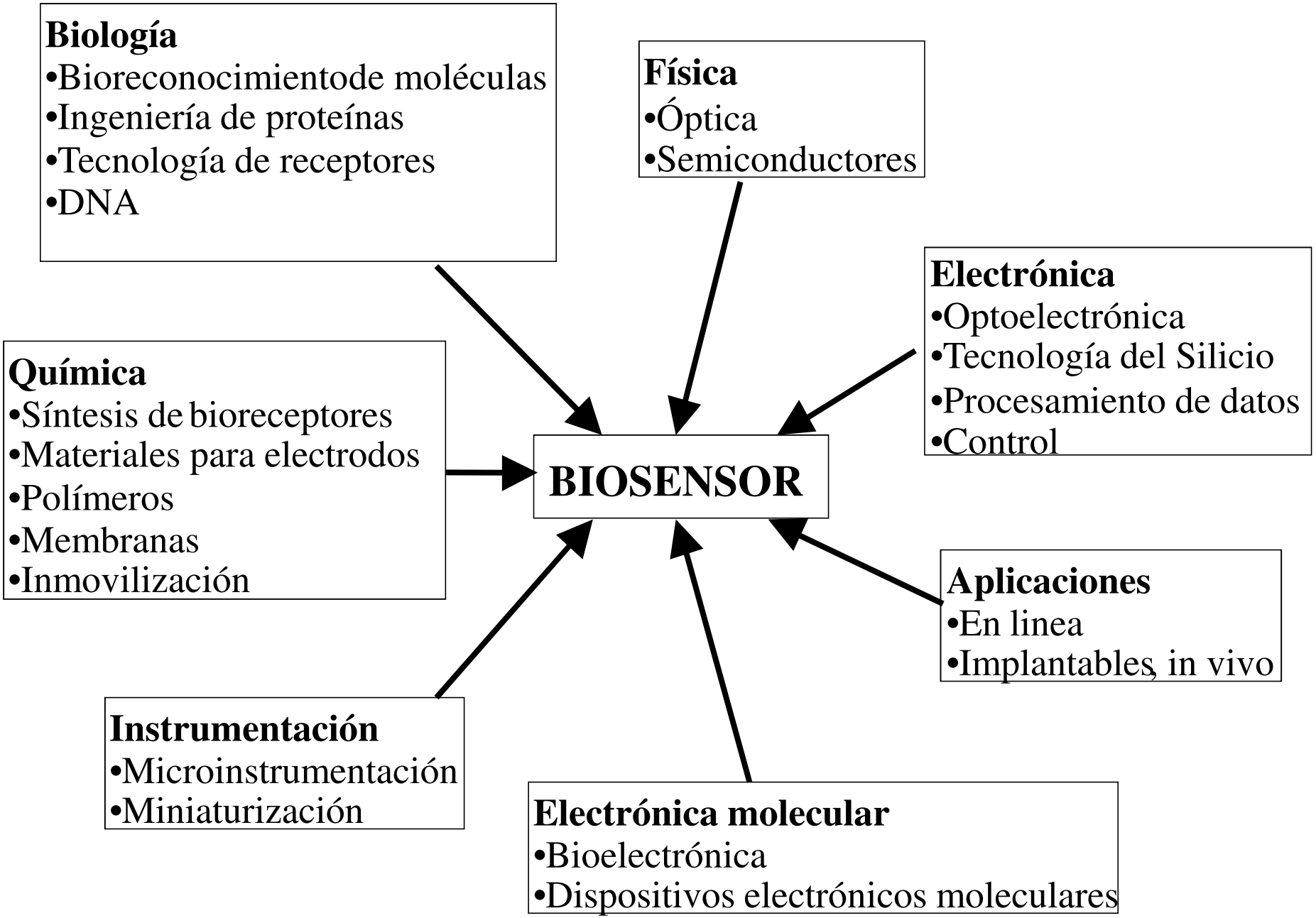
Biosensores celulares

Tabla 7 Biosensores celulares.

Analito	*Organismo*	*Biosensor*
Ácido nicotínico	*Lactobacillus arabinosus*	potenciométrico (H^+)
Amonio	*Nitrosomonas* sp.	amperométrico (O_2)
Cisteína	*Proteus morganii*	potenciométrico (H_2S)
Demanda biológica de oxígeno (DBO)	diversos	amperométrico (O_2/mediado) o potenciométrico (FET/H_2)
Glutamato	*Escherichia coli*	potenciométrico (CO_2)
Glutamina	*Sarcina flava*	potenciométrico (NH_3)
Herbicidas	Cianobacterias	termométrico o amperométrico (mediado)
Sulfatos	*Desulfovibrio desulfuricans*	potenciométrico (SO_3^-)
Tiamina	*Lactobacillus fermenti*	amperométrico (mediado)

USOS DE BIOSENSORES

1. Control de metabolitos críticos durante las operaciones quirúrgicas.
2. Consultas y Urgencias Hospitalarias:
   - Obvia análisis caros y lentos en laboratorios centrales
   - Acelera la diagnosis y el comienzo del tratamiento
   - Menor riesgo de deterioro de la muestra
3. Diagnóstico Doméstico:
   - Ensayos de Embarazos
   - Control de Glucosa en diabéticos
4. Aplicaciones in vivo:
   - Páncreas artificial
   - Corrección de niveles de metabolitos
   - Problemas : Miniaturización y Biocompatibilidad
5. Aplicaciones Industriales, militares y medio ambientales:
   - Alimentación
   - Cosmética
   - Control de Fermentaciones
   - Controles de Calidad
   - Detección de Explosivos
   - Detección de gases nerviosos y/o toxinas biológicas
   - Control de polución.


Biología
•Bioreconocimientode moléculas
•Ingeniería de proteínas
•Tecnología de receptores
•DNA
Física
•Óptica
•Semiconductores
Electrónica
•Optoelectrónica
•Tecnología del Silicio
•Procesamiento de datos
•Control
Química
•Síntesis de bioreceptores
•Materiales para electrodos
•Polímeros
•Membranas
•Inmovilización
BIOSENSOR
Aplicaciones
•En linea
•Implantables, in vivo
Instrumentación
•Microinstrumentación
•Miniaturización
Electrónica molecular
•Bioelectrónica
•Dispositivos electrónicos moleculares

SITIOS DE INTERNET PARA INFORMACIÓN

http://www.hitl.washington.edu/scivw/EVE/I.D.1.c.Biosensors.html

http://www.fetchbook.info/Chemical_Sensors_Biosensors.html

http://www.clinchem.org/cgi/reprint/44/3/655

http://www.ceb.utk.edu/bioprimer.pdf