



núcleo de ingeniería biomédica  
facultades de medicina e ingeniería



universidad de la república

## Principios de funcionamiento de sensores amperométricos, bioreceptores y sistemas de inmovilización.

<sup>1</sup>Ciro Taramasco

<sup>1</sup>Monografía vinculada a la conferencia del Ing. Quím. Juan Bussi sobre Biosensores el día 9 de marzo de 2010  
Email: [Ciro.Taramasco - cirotar2004@gmail.com](mailto:Ciro.Taramasco - cirotar2004@gmail.com)

### Resumen

---

Un biosensor es un dispositivo que permite la detección de una señal bioquímica (presencia de un analito) de manera cuantificable. El biosensor consta generalmente de un bioreceptor adosado a un transductor. El bioreceptor es el elemento biológico (enzima, anticuerpo, célula entera, orgánulo o combinaciones de los mismos) que interactúa con un analito o una familia de analitos y genera una señal que es recogida por el transductor.

Los biosensores se clasifican en (1) electroquímicos, (2) calorimétricos, (3) piezoeléctricos, (4) ópticos.

Los sensores amperométricos son una clase de sensor electroquímico y su funcionamiento se basa en la medida de una corriente eléctrica cuando se le aplica un voltaje dado. Para poder detectar la presencia de analitos se emplean bioreceptores que pueden llegar a ser altamente selectivos, estos pueden ser: anticuerpos, ácidos nucleicos, microorganismos, tejidos orgánicos o enzimas. Las enzimas son los bioreceptores que se utilizan más a menudo.

Los bioreceptores se inmovilizan al transductor para que puedan interactuar con este sin desprenderse. Existen varias técnicas de inmovilización empleadas para este fin estas pueden ser físicas o químicas.

Las técnicas de inmovilización físicas son: atrapamiento o encapsulación

Las técnicas de inmovilización químicas son: adsorción en la superficie, entrecruzamiento y enlaces covalentes.

## 1. Introducción

- 1.1 El uso de biosensores es ampliamente utilizado en el área de la biomédica, estos permiten la monitorización casi en tiempo real de un sinnúmero de analitos presentes en el cuerpo y permiten el seguimiento de procesos sin la necesidad de extensos exámenes de laboratorio. Existen diferentes tipos de biosensores que utilizan principios distintos para realizar la medida, este trabajo se enfocara en el estudio de los sensores electroquímicos del tipo amperométrico y en los distintos tipos de bioreceptores y sus métodos de inmovilización.

- 1.2 Un biosensor es una herramienta o sistema analítico compuesto por un material biológico inmovilizado llamado bioreceptor (tal como una enzima, anticuerpo, célula entera, orgánulo o combinaciones de los mismos), en íntimo contacto con un sistema transductor adecuado que convierta la señal bioquímica (presencia de un analito) en una señal eléctrica cuantificable[1].

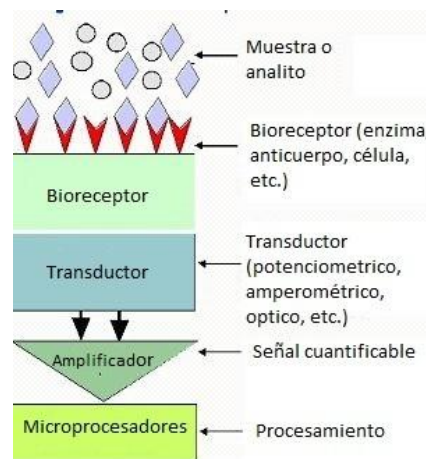


Figura 1: Esquema de un biosensor

- 1.3 Los biosensores iniciaron su desarrollo y comercialización, fundamentalmente, alrededor de los años 60, orientados a aplicaciones clínicas y de impacto bioquímico. El primer biosensor fue un analizador de glucosa desarrollado por Clark y Lyons en 1962 y comercializado a partir de 1975 por Yellow Springs Instrument Company. Este desarrollo fue un sensor enzimático para determinar la concentración de glucosa en sangre a través de la reacción catalizada por la glucosa oxidasa; éste biosensor fue diseñado en 1962, acoplado la glucosa oxidasa a un electrodo selectivo de oxígeno. Posteriormente, las enzimas inmovilizadas se fortalecieron en el diagnóstico clínico permitiendo el desarrollo de biosensores para urea, aunque el reconocimiento solo fue efectivo quince años más tarde cuando empezó a divulgarse en las diferentes publicaciones de carácter científico [2].

- 1.4 Un biosensor se compone de dos partes, un bioreceptor y un elemento transductor, ambos están acoplados en un mismo elemento y se les llama sonda o electrodo [3].

- 1.5 Un biosensor exitoso debe poseer al menos algunos de las siguientes características: El bioreceptor debe ser altamente específico para los fines del análisis, ser estable en condiciones normales de almacenamiento y, salvo en el caso de las tiras de enzimas colorimétricas y tiras reactivas, debe mostrar una buena estabilidad en un gran número de pruebas [3].

La reacción debe ser lo más independiente de los parámetros físicos tales como agitación, el pH y la temperatura. Esto permite el análisis de las muestras con un mínimo de pre-tratamiento [3].

Si la reacción implica cofactores o coenzimas estas deberían preferiblemente, también ser co-inmovilizadas con la enzima [3].

La respuesta debe ser precisa, exacta, reproducible y lineal en el rango de análisis útil, sin dilución o concentración [3].

- 1.5 Si el biosensor se va a utilizar para la monitorización invasiva en situaciones clínicas, la sonda debe ser pequeña y biocompatible, no debe tener efectos tóxicos o antigénicos. El biosensor completo debe ser barato, pequeño, portátil y capaz de ser utilizado por los operadores semi-calificados [3].

- 1.6 Como se menciona existen diferentes tipos de biosensores para medir distintos tipos de analitos, según el analito a medir, se utilizara una reacción que dará un cambio físico como resultado, es este cambio físico lo que el transductor va a medir [3].

Estos cambios físicos pueden ser:

- 1) Calor (biosensor calorimétrico) *Ej. Medición de antígenos*
- 2) Cambios en la distribución de cargas (biosensor potenciométrico) *Ej. Medición de penicilina*
- 3) Movimiento de electrones por una reacción reducción-oxidación (biosensor amperométrico) *Ej. Medición de glucosa*
- 4) Cambios en la conductividad (biosensor conductimétrico) *Ej. Medición de urea*
- 5) Emisión de luz o cambio en la absorbancia (biosensor óptico) *Ej. Microorganismos en la orina*
- 6) Efectos en la masa de los reactivos (biosensor piezoeléctricos) *Ej. Medición de lactato* [3]

Este trabajo se centrará sobre el análisis de los biosensores electroquímicos del tipo amperométrico.

## 2 Biosensores amperométricos

2.5 El funcionamiento de los sensores amperométricos se basa en la medición de la intensidad de una corriente generada cuando se les aplica una diferencia de potencial entre sus electrodos. Estos sensores generalmente tienen tiempos de respuesta, rangos dinámicos y sensibilidad parecidos a los sensores potenciométricos. La diferencia es que los sensores potenciométricos hacen uso de electrodos selectivos a iones para transformar una señal biológica en eléctrica y los amperométricos se basan en la medición de una reacción de reducción-oxidación [3].

2.6 En los sensores de tipo amperométrico se produce una reducción del oxígeno en la superficie del cátodo, si esta reducción es eficiente, la concentración del oxígeno debe de ser cero. De esta manera la velocidad de la reducción dependerá de la difusión del oxígeno y por lo tanto de la concentración del oxígeno a granel. Una pequeña pero importante cantidad de oxígeno se consume en el proceso, por lo que en la medición de dicho proceso el electrodo de oxígeno está lejos del equilibrio y esto lo hace más sensible a los cambios de temperatura que los sensores del tipo potenciométrico ya que trabajan más cerca del equilibrio [3].

2.7 El primer biosensor fue el electrodo de Clark. Electrodo de Clark consiste en un cátodo platino en el cual reducen el oxígeno y un electrodo de referencia de cloruro de plata. Cuando un potencial de  $-0,6\text{ V}$ , en relación con el  $\text{Ag/AgCl}$  se aplica al cátodo de platino, una corriente proporcional a la concentración de oxígeno se produce. Normalmente los dos electrodos están bañados en una solución de cloruro de potasio saturado y separado del seno de la disolución por una membrana plástica permeable al oxígeno (por ejemplo, Teflón, politetrafluoroetileno.) [3]

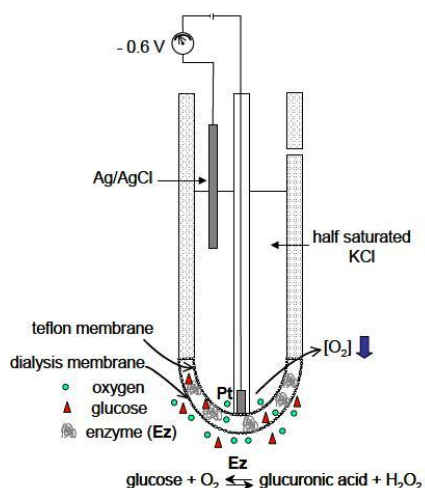


Figura 2: Electrodo de Clark

2.8 En la Figura 2 se muestra la respuesta de un biosensor amperométrico utilizando glucosa oxidasa con la presencia de soluciones de glucosa. La tasa constante de agotamiento del oxígeno puede ser utilizado para generar curvas de respuesta estándar y determinar muestras desconocidas. El tiempo necesario para un ensayo puede reducirse considerablemente si sólo se necesita la fase inicial transitoria (curva) de la respuesta, para esto será necesario recurrir a un modelo adecuado de software [3].

El principal problema de estos biosensores es su dependencia de la concentración de oxígeno disuelto.

Esto puede ser superado por el uso de 'mediadores' que transfieren los electrones hacia el electrodo directamente sin pasar por la reducción del oxígeno co-sustrato. Con el fin de aplicar de forma generalizada estos mediadores deben poseer un número de características útiles [3].

- 1) Ellos deben reaccionar rápidamente con la forma reducida de la enzima.
  - 2) Deben ser lo suficientemente solubles, tanto en la forma oxidada y reducida, para poder difundir rápidamente entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo. Esta solubilidad, sin embargo, no debe ser tan grande como para causar una pérdida significativa del mediador del micro entorno del biosensor.
  - 3) La sobretensión para la regeneración del mediador oxidado, en el electrodo, debe ser baja e independiente del pH.
  - 4) La forma reducida del mediador no debe reaccionar con facilidad con el oxígeno.
- [3]

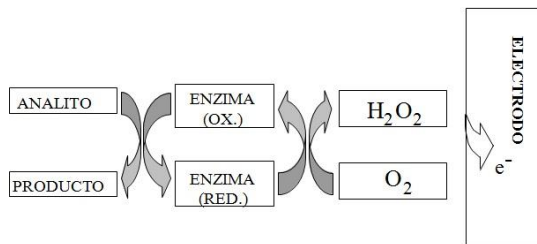


Figura 3: Esquema sin mediador

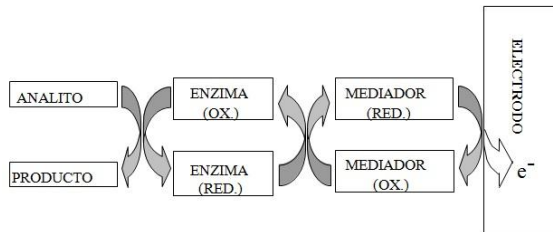


Figura 4: Esquema con mediador

### 3 Bioreceptores

La característica más importante de los materiales biológicos usados para fabricar biosensores es la selectividad. Esta selectividad permite que el sensor pueda detectar un solo tipo de analito, inclusive permitiendo diferenciar isómeros (misma fórmula molecular pero diferente fórmula estructural y, por tanto, diferentes propiedades [5]) de una misma molécula [4].

#### 3.5 Existen diferentes tipos de bioreceptores que se pueden inmovilizar sobre transductores electroquímicos:

- 1) Anticuerpos
- 2) ácidos nucleicos
- 3) Microorganismos
- 4) Tejidos orgánicos
- 5) Enzimas [4]

### 3.6 Anticuerpos

Los anticuerpos al igual que el ADN son los agentes de mayor selectividad existentes hoy en día. Esto se debe a que tienen una estructura tridimensional que le permite enlazarse al antígeno de manera muy específica.

- 3.7 El inconveniente de la utilización de anticuerpos en biosensores es que no tienen capacidad catalítica, esto hace necesario el uso de anticuerpos marcados con isótopos radiactivos, enzimas partículas luminiscentes etc.[4]

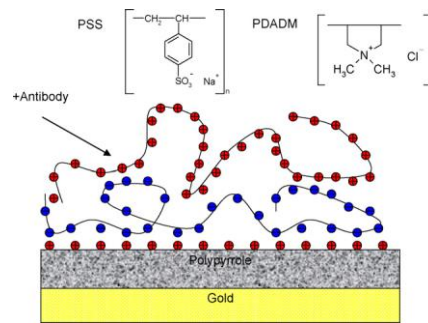


Figura 5: Anticuerpos bioreceptores

### 3.8 Ácidos nucleicos

La cadena de ADN es una doble hélice que tiene pares de bases llamadas adenina/timina y citosina/guanina. Estos pares de bases tienen una alta especificidad y las convierte en un material muy interesante para la fabricación de biosensores. Estas cadenas se inmovilizan sobre los transductores para formar electrodos. La hibridación (proceso de mezclar diferentes especies o variedades de organismos para crear un híbrido [6]) de esta molécula inmovilizada con su par es detectada por el transductor.

- 3.9 Estos materiales también deben ser marcados al igual que los anticuerpos ya que no tienen capacidad catalítica.[4]

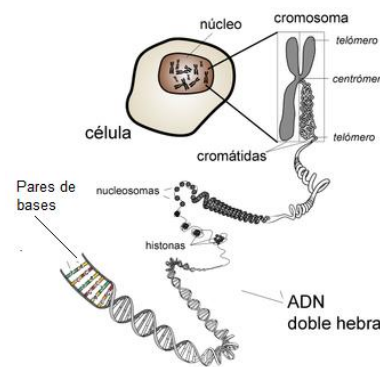


Figura 6: Cadena de ADN

### 3.10 Microorganismos

En el caso de los microorganismos, el principio del funcionamiento del biosensor se basa en que estos tienen la capacidad de asimilar compuestos orgánicos y este cambio es detectado por el transductor. [4]

### 3.11 Tejidos orgánicos

Los tejidos orgánicos pueden ser usados como elementos de reconocimiento casi sin preparación, pero como tienen una gran cantidad de enzimas inmovilizadas son menos selectivos frente a otros materiales biológicos.

La ventaja que tienen es que al encontrarse estas enzimas en su medio natural es más difícil su degradación aumentando así la vida útil del sensor.[4]

### 3.12 Enzimas

Las enzimas son proteínas con la capacidad de catalizar las reacciones químicas.

Estas reaccionan o bien con un analito o con una familia de analitos sin consumirse.

La actividad enzimática está regulada por el pH del medio, la fuerza iónica, la temperatura, y en algunos casos requiere que esté presente un cofactor. El cofactor es un producto no proteico necesario para que se lleve a cabo la reacción (O2 por ej.)[4]

- 3.13 Las ventajas del uso de enzimas son la buena selectividad que tienen y la velocidad de reacción que poseen, la desventaja más importante que tienen es que poseen un corto tiempo de vida útil.[4]

## 4 Inmovilización del bioreceptor

La inmovilización es el proceso por el cual se fija el material biológico al transductor para tener formas insolubles que retienen su actividad.

Para lograr esta inmovilización se pueden usar 2 métodos:

- 1) Físicos
- 2) Químicos

Para los métodos de inmovilización Físicos tenemos:

- 1) Atrapamiento
- 2) Encapsulamiento

Para los métodos de inmovilización Químicos tenemos:

- 1) Adsorción en la superficie
- 2) Entrecruzamiento
- 3) Enlaces covalentes[4]

A continuación haremos un breve resumen de cada uno de estos métodos.

### 4.5 Atrapamiento

El atrapamiento es la retención de una enzima en las cavidades de una matriz porosa.

Esta está construida en general por monómeros fotocurables o polímeros como el PVC, colágeno etc.

Como ventajas presenta una gran simplicidad desde el punto de vista experimental así como el no necesitar gran cantidad de material, también es ventajoso que la enzima no sufre ninguna alteración de punto de vista estructural.[4]

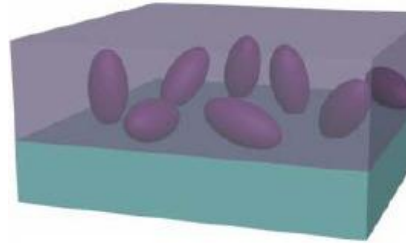


Figura 7: Atrapamiento de una enzima en un polímero

### 4.6 Microencapsulación

En la Microencapsulación las enzimas están en contacto directo con el transductor, estas enzimas están rodeadas de membranas que son semipermeables.

Las membranas semipermeables dejan pasar el sustrato y el producto pero no dejan escapar la enzima.

La ventaja de este método es que las enzimas no se ven afectadas por los cambios de pH, temperatura o fuerzas iónicas del medio ya que están aisladas por la membrana.[4]

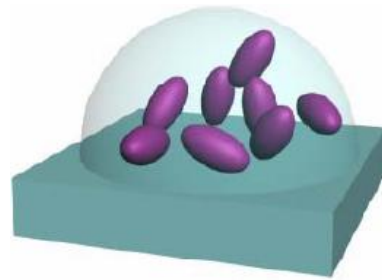


Figura 8: Atrapamiento de una enzima en un polímero

### 4.7 Adsorción en la superficie

En la adsorción, las enzimas se unen a un soporte sin funcionalizar, mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno.[4]

Los principales factores que influyen en la adsorción son:

- 1) El pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.
- 2) La fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción del enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza

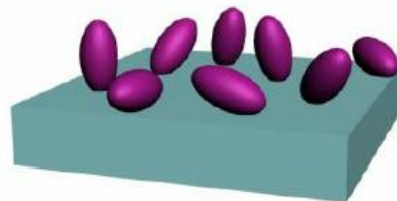


Figura 9: Adsorción a la superficie



- al soporte que la proteína.
- 3) El diámetro del poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor del enzima.
  - 4) La presencia de iones que actúen como cofactores del enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.[4]

Las ventajas de este método son que la preparación es sencilla y barata, pero tiene la desventaja de que la unión es mecánicamente inestable y la unión al soporte es débil.[4]

#### 4.8 Entrecruzamiento

La técnica consiste en usar reactivos bifuncionales que generan uniones intermoleculares. El entrecruzamiento permite eliminar pérdidas de actividad enzimática por efectos disfuncionales.[4]

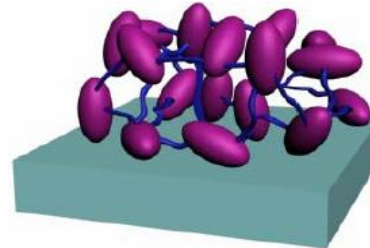


Figura 10: Entrecruzamiento

#### 4.9 Unión covalente

La unión covalente consiste en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con las proteínas.

La inmovilización por unión covalente requiere que ciertos parámetros como el pH o la fuerza iónica de la solución sean controlados, así también se necesita que la superficie del transductor este bien limpia. La ventaja de este sistema es que se consiguen tiempos de vida útil bastante largos (4~14 meses.)[4]

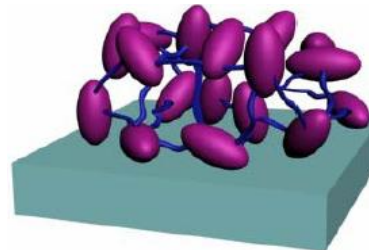


Figura 11: Unión covalente

## 5 Conclusión

En el presente trabajo se pretendió explicar el principio de funcionamiento de los biosensores amperométricos, sus características y los distintos métodos que se utilizan para inmovilizar diferentes tipos de bioreceptores.

Los sensores del tipo amperométrico tienen numerosas ventajas que los convierten en una herramienta valiosísima en la biomédica, permitiendo a los médicos obtener datos del estado del paciente en tiempo real de un sin número de parámetros biológicos, y permitiendo a los pacientes el monitoreo continuo de su propio estado de salud, obteniendo así una mayor calidad de vida.

Hoy en día los avances en lo que respecta a los bioreceptores hacen posible que se pueda medir prácticamente cualquier analito o proceso biológico de interés.

Sin duda para las décadas siguientes esperamos avances importantes dado que el mercado de los biosensores es uno de los más importantes tanto para la ingeniería biomédica como para la industrial.

## 6 Agradecimientos

---

Al Ing. Juan Bussi de la Cátedra de Fisicoquímica y Laboratorio de Fisicoquímica de Superficies. Fac. de Química del Uruguay, quien fue mi tutor en este trabajo.

Al cuerpo de docentes del Núcleo de ingeniería biomédica (Ing. Franco Simini, Ing Daniel Geido, Ing Jorge Lobo)

## 7 Referencias

---

- 1) *Biotecnología ambiental* (pág. 414)  
Francisco Castillo Rodríguez, María Dolores Roldán Ruiz  
Editorial: TEBAR S.L. Madrid  
2005
- 2) *Informe de vigilancia tecnológica aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria* (pág. 14)  
Víctor González Rumayor, Esther García Iglesias, Olga Ruiz Galán, Lara Gago Cabezas  
2005
- 3) *London South Bank University*  
*FACULTY OF ENGINEERING, SCIENCE and THE BUILT ENVIRONMENT*  
<http://www1.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html>
- 4) *Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras* (págs. 26 ~37)  
MANUEL CANO LUNA  
Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2008
- 5) *Isomería*  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Isomer%C3%ADa>
- 6) *Hibridación*  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Hibridaci%C3%B3n>

Figuras:

- 1) [http://dipcia.unica.it/superf/PRIN\\_Campanella/Biosensor.jpg](http://dipcia.unica.it/superf/PRIN_Campanella/Biosensor.jpg) (texto traducido)
- 2) <http://techramble.files.wordpress.com/2009/08/god.jpg?w=410&h=477>
- 3:4) *BIOSENSORES PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS* (pág. 13)  
presentacion Seminario de Ingeniería Biomédica 9 de marzo de 2010 Ing. Juan Bussi
- 5) *Seminars in Cell & Developmental Biology*  
Nanostructured transducer surfaces for electrochemical biosensor construction  
Interfacing the sensing component with the electrode (fig: 3)
- 6) [http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Chromosome\\_Spanish\\_text.png](http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Chromosome_Spanish_text.png)