

Biosensores electroquímicos. Una herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario y clínico

A. Julio Reviejo y José M. Pingarrón

*Departamento de Química Analítica, Facultad de Químicas,
Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, España*

INTRODUCCION

La utilización de sensores para resolver los problemas analíticos que la Sociedad demanda hoy en día es, sin lugar a dudas, una de las tendencias más claras en la Química Analítica moderna. Aunque actualmente se dispone de un importante arsenal de técnicas analíticas de laboratorio, la gran mayoría implican un elevado consumo de tiempo dada la necesidad de realizar pretratamientos de la muestra costosos y laboriosos. Además, estas técnicas no suelen ser adecuadas en los casos en que el parámetro analítico debe controlarse de manera continua y en tiempo real. La tecnología de sensores es especialmente apropiada para abordar de un modo barato, rápido y fiable muchos de estos retos. Un grupo especialmente atractivo dentro de los sensores en general es el constituido por los denominados biosensores, en los que se emplean mecanismos o principios biológicos para el reconocimiento de especies particulares. En un biosensor, el sistema de reconocimiento biológico, también llamado biorreceptor o receptor, debe inmovilizarse o retenerse sobre la superficie de un dispositivo denominado transductor que permita convertir la velocidad de la reacción bioquímica que se produce en el proceso de reconocimiento biológico en una señal eléctrica que posteriormente es

amplificada, procesada y convertida a la forma deseada. Cuando el elemento transductor está fundamentado en procesos de naturaleza electroquímica (en el sentido más amplio de la acepción), se está ante los denominados biosensores electroquímicos que son el objeto de este artículo.

GENERALIDADES SOBRE BIOSENSORES ELECTROQUIMICOS

La utilización de dispositivos electroquímicos como transductores para el desarrollo de biosensores es, probablemente, la más extendida de todas debido a una serie de importantes ventajas prácticas: a) las medidas electroquímicas pueden llevarse a cabo en volúmenes pequeños de muestra con relativa facilidad, lo que se debe a la naturaleza interfacial de la medida electroquímica; esto hace que estos dispositivos sean especialmente adecuados para la monitorización "in vivo"; b) la señal obtenida es eléctrica y por tanto es factible la transducción directa de la velocidad de reacción en la señal de lectura; c) los límites de detección que se obtienen son suficientes y adecuados para la detección



A. Julio Reviejo



José M. Pingarrón

de muchos analitos de interés; d) la relativa simplicidad y bajo coste de la instrumentación electroquímica permite una fácil disponibilidad de estos dispositivos.

Si bien entre los transductores electroquímicos se encuentran, de forma general, los de tipo conductimétrico, potenciométrico y amperométrico, son los dos últimos y en especial los amperométricos los más utilizados en la práctica. La metodología de trabajo más usual para la construcción de un biosensor electroquímico implica la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico (enzimas, tejidos, microorganismos, anticuerpos) sobre la superficie del transductor que es un electrodo, como se muestra en la Figura 1.

El método de inmovilización del sistema de reconocimiento biológico va a

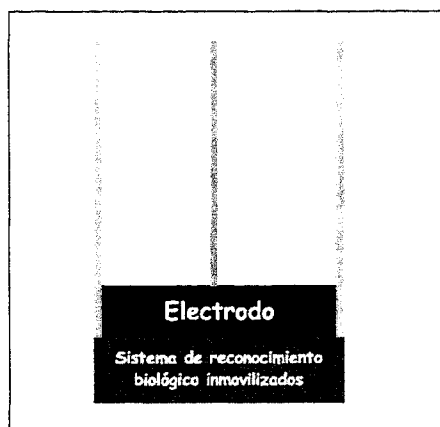


Figura 1: Esquema simplificado de un biosensor electroquímico.

jugar un papel clave en las características de funcionamiento del biosensor y constituye un aspecto esencial en el proceso de su desarrollo. De forma general y no sólo para los biosensores electroquímicos, la inmovilización puede realizarse bien por métodos físicos o bien por métodos químicos.

Entre los primeros pueden citarse como más usuales los métodos que implican la *adsorción* de las moléculas biológicas sobre un material adsorbente, y los denominados métodos de *atrapamiento* que pueden llevarse a cabo mediante la inclusión de las biomoléculas dentro de una matriz de un polímero altamente entrecruzado o de un gel, mediante la inclusión en la propia matriz del transductor (es decir, del electrodo en el caso de los biosensores electroquímicos), o por encapsulamiento dentro de una membrana semipermeable.

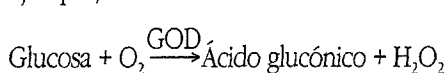
Por lo que respecta a los métodos químicos de inmovilización, estos pueden ser por *unión covalente* que implica la reacción de grupos funcionales de la biomolécula que no sean esenciales para su actividad biológica con un polímero que posea grupos activos (o bien por copolimerización con un monómero), o por *entrecruzamiento* intramolecular entre las biomoléculas y polímeros con grupos bi- o multifuncionales (glutaraldehído, por ejemplo). La diferencia entre ambos métodos de inmovilización química radica en que en el primero la biomolécula sólo está enlazada a un centro activo del polímero (con un solo punto de anclaje), mientras que en el entrecruzamiento puede estar unida a dife-

rentes centros activos del polímero y éstos unidos entre sí, formando una red.

Por otra parte, ya se ha dicho que el sistema de reconocimiento biológico empleado para construir biosensores electroquímicos puede ser de muy diferentes tipos. Sin embargo, hasta la fecha son dos grupos los que se encuentran con mayor frecuencia en la bibliografía especializada y se han aplicado con mayor éxito: los electrodos enzimáticos y los inmunosensores.

BIOSENSORES ENZIMATICOS

En este tipo de biosensores catalíticos, una o varias enzimas son inmovilizadas en la superficie del transductor electroquímico. La reacción analítica implica, en su modalidad más simple, la catálisis por parte de la enzima de una reacción en la que la molécula transformada se denomina sustrato y en la que usualmente se emplea otro reactivo denominado cofactor. Por ejemplo, en la reacción enzimática:



la glucosa es el sustrato, el oxígeno es

el cofactor y la glucosa oxidasa (GOD) la enzima que cataliza la reacción.

Por otra parte, el desarrollo de biosensores enzimáticos en los que se empleen dos o más enzimas permite la consecución de importantes ventajas (Ver Esquema 1):

a) Aumentar la sensibilidad utilizando una enzima auxiliar que regenere el analito, dando lugar por tanto a un reciclado del sustrato.

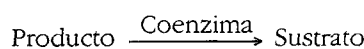
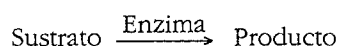
b) Obtener un producto de la reacción que sea fácilmente detectable, empleando una enzima auxiliar que actúe catalíticamente sobre alguno de los productos de la reacción enzimática principal.

c) Eliminar interferencias. Puede ocurrir que alguno de los productos de la reacción enzimática principal actúe sobre la actividad enzimática inhibiéndola, o que existan otros inhibidores en disolución o incluso que haya sustratos interferentes; en estos casos, la enzima auxiliar puede catalizar una reacción de dichas sustancias interferentes de manera que no se vea afectada la reacción enzimática con el sustrato de interés.

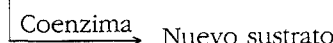
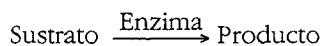
Seguidamente se comentarán algunos ejemplos escogidos de biosensores enzimáticos tanto potenciométricos como amperométricos.

EMPLEO DE REACCIONES ENZIMATICAS ACOPLADAS

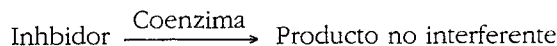
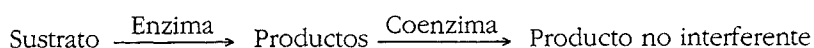
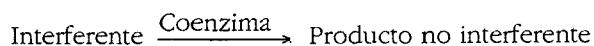
- **RECICLADO DEL SUSTRATO** → **AUMENTO DE SENSIBILIDAD**



- **REACCIONES ENZIMÁTICAS SECUENCIALES**



- **ELIMINACION DE INTERFERENCIAS**



Esquema 1

BIOSENSORES ENZIMÁTICOS POTENCIOMÉTRICOS

El fundamento más común del empleo de un transductor potenciométrico es el basado en la utilización de membranas selectivas de iones. Desde los primeros trabajos del grupo de Guibault, se ha recorrido un largo camino en la sofisticación de los diseños electródicos. Un ejemplo clásico es el biosensor para la determinación de urea basado en la reacción de hidrólisis de este compuesto, catalizada por la enzima ureasa (1), en la que se genera ion amonio como producto el cual es sensorizado mediante un electrodo de membrana de vidrio selectivo a dicho ion. Recientemente se ha utilizado un sensor de urea con un fundamento muy similar al mencionado en sistemas de análisis por inyección en flujo de canal simple y de canal doble (Figura 2) (2). La buena estabilidad del electrodo enzimático permite la utilización del mismo biosensor en los sistemas en continuo durante dos meses. En las condiciones óptimas, es posible la determinación de urea a niveles fisiológicos y patológicos, habiéndose aplicado al análisis de muestras reales de suero humano.

La modificación enzimática de electrodos selectivos de iones, mediante unión covalente de las correspondientes enzimas directamente a la superficie de la membrana, constituye hoy en día un procedimiento generalizado que da lugar

a biosensores con una elevada sensibilidad, estabilidad y con una rápida respuesta (3). Un ejemplo ilustrativo es la construcción de un biosensor para el control de la producción biotecnológica de penicilina G utilizando un electrodo de membrana de pH con tridodecilamina como ionóforo selectivo del ion hidrógeno (4).

Sin embargo, no todos los diseños modernos de biosensores enzimáticos potenciométricos están basados en el empleo de membranas selectivas de iones. Así, por ejemplo, Kubota y col. (5) han reportado recientemente un biosensor para L-ácido ascórbico en el que la enzima ascorbato oxidasa se inmoviliza en un electrodo de grafito/resina epoxi por oclusión en una matriz de poli(etileno-co-vinilacetato) y copolímero EVA. La variación del potencial se origina en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ en la enzima, debida a la presencia de ion ascorbato, lo que cambia la densidad electrónica en la superficie del electrodo, que es medida por el transductor.

Otro enfoque interesante es el empleo de matrices biocompósitas consolidadas. Estas matrices constituyen una importante posibilidad de producir en masa biosensores electroquímicos con propiedades ventajosas, entre las que merece la pena destacar la capacidad de regeneración de su superficie. Un ejemplo de esta metodología es la construcción de un biosensor para D-amigdalina (de interés en alimentos) mediante la consolidación de una mezcla de sales de pla-

ta (Ag_2S , AgI) con la enzima β -glucosidasa (6). La presión aplicada durante la preparación de la pastilla biocompósita determina el grado de inmovilización de la enzima en la membrana. Las sales electroactivas que atrapan la enzima constituyen un medio protector para misma, alcanzándose periodos de vida operacional para el biosensor de más de tres meses.

BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS

Desde que en 1967 Updike y Hicks publicaron el primer electrodo enzimático amperométrico (7), se ha asistido a un extraordinario interés por este tipo de biosensores, con los que además de la selectividad inherente al elemento de reconocimiento biológico puede conseguirse una buena sensibilidad. Los biosensores amperométricos monitorizan las corrientes faradaicas resultantes de intercambios electrónicos entre el sistema biológico y un electrodo mantenido a un potencial constante apropiado. Naturalmente, las "enzimas redox" u oxido reductasas son de particular interés para la construcción de este tipo de biosensores ya que en la conversión enzimática del sustrato tiene lugar una reacción de transferencia de electrones. Con objeto de una mejor comprensión, se procede a continuación a diferenciar entre los grupos más importantes de estas enzimas utilizadas para la construcción de biosensores amperométricos.

a) Oxidasas

Estas enzimas dependen de un cofactor fuertemente enlazado dentro de la estructura de la enzima. La estructura del cofactor redox es o bien del tipo flavina (FAD o FMN) o un grupo que contiene ion cobre. Todas las oxidasas utilizan oxígeno molecular como agente de reoxidación en el ciclo catalítico y, dependiendo de la capacidad de la enzima para donar dos o cuatro electrones al oxígeno, el producto final es peróxido de hidrógeno o agua (Esquema 2)

Como se deduce del esquema 2, la reacción enzimática puede seguirse electroquímicamente bien por la dis-

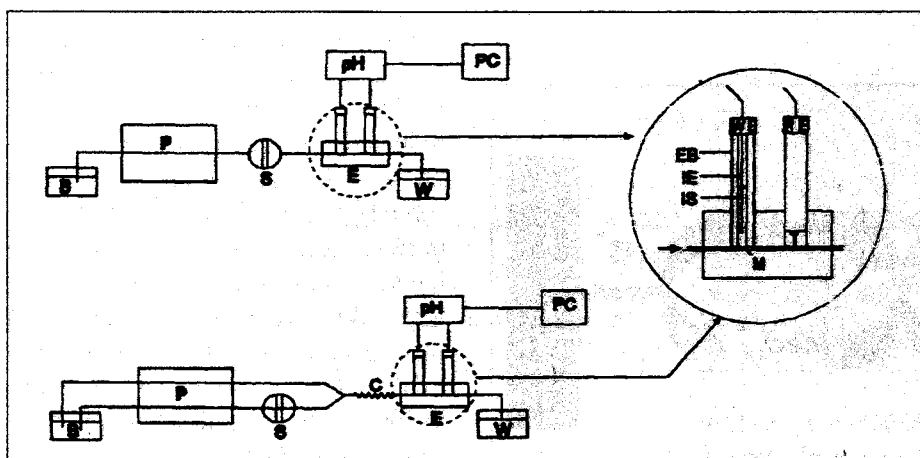
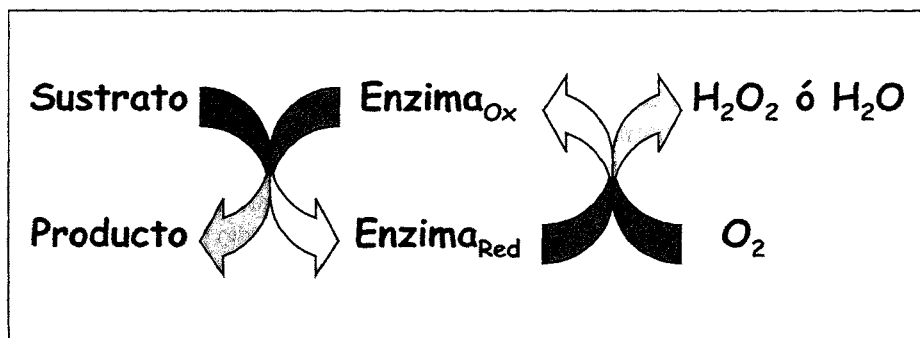


Figura 2. Esquema FIA de los sistemas monocanal (arriba) y de doble canal (abajo). B, disolución reguladora; P, bomba peristáltica; S, válvula de inyección; E, célula, C, bucle de mezcla, W, desecho, WE, electrodo de trabajo (biosensor); RE, electrodo de referencia; M, membrana sensora.



Esquema 2. Secuencia de reacción para una reacción de oxidación catalizada por una oxidasa empleando oxígeno molecular como aceptor de electrones-protones.

minución del contenido de oxígeno en la disolución o, si el peróxido de hidrógeno es el producto final, por su oxidación (o reducción) electroquímica directa sobre el electrodo. Sin embargo, cualquiera de estos dos procedimientos tiene asociados importantes inconvenientes. La reducción electroquímica de oxígeno empleando un electrodo de Clark es poco sensible y necesita un potencial bastante negativo (~ -0.6 V vs. Ag/AgCl) lo que da lugar a una corriente de fondo elevada. La oxidación electroquímica de H_2O_2 ocurre a altos sobrepotenciales ($\sim 0.6-0.7$ V vs. Ag/AgCl, pH 7.0) sobre electrodos metálicos e incluso a potenciales mayores sobre electrodos de carbono ($+0.9-1.15$ V), lo que posibilita reacciones interferentes por parte de especies fácilmente oxidables como ascorbato, urato, paracetamol y neurotransmisores, muy comunes en las muestras clínicas.

Por lo tanto, una de las líneas de investigación más actual es intentar disminuir el potencial aplicado para la detección

electroquímica. Una forma es tratar de obtener una transferencia electrónica directa entre las oxidasas y los electrodos (8), lo que no es posible en muchos casos debido a que el centro activo está profundamente situado dentro de la enzima. Sin embargo, muchas oxidasas reaccionan fácilmente con mediadores artificiales que pueden ser empleados para lanzar los electrones desde la forma reducida de la enzima hacia un electrodo tal y como se muestra en el esquema 3.

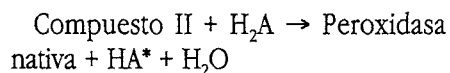
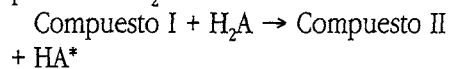
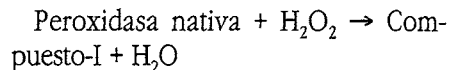
El empleo de estos mediadores artificiales hace que el potencial de trabajo del electrodo enzimático esté fijado ahora por el potencial formal del par mediador, lo que es muy ventajoso si el mediador tiene un bajo valor de dicho potencial, ya que entonces se evitan interferencias debidas a otras especies electroactivas que reaccionen a potenciales más elevados. Además, si en la oxidación de la forma reducida del mediador no están implicados los protones, la respuesta del electrodo enzimático no dependerá del pH.

Algunas de las moléculas que se han utilizado como mediadores enzimáticos son el tetratiofluvaleno, el Meldola Blue y el ferroceno y sus derivados (9).

En la Tabla 1 se recogen algunos ejemplos elegidos de aplicaciones recientes de biosensores enzimáticos amperométricos basados en el empleo de enzimas oxidasas.

b) Peroxidasas

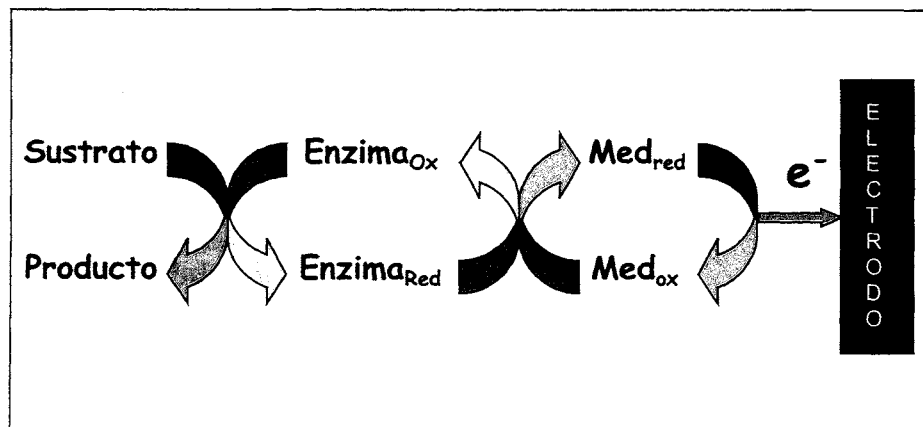
Las peroxidasas son enzimas ampliamente utilizadas para la determinación de peróxido de hidrógeno y de pequeños peróxidos orgánicos. En la reacción con el peróxido la forma nativa de la enzima se oxida en una etapa de dos electrones para formar el denominado compuesto-I. La regeneración de la forma nativa se lleva a cabo mediante dos etapas individuales de reducción de un electrón con una especie intermediaria llamada compuesto-II:



Como especies donadoras de electrones puede utilizarse aminas aromáticas, compuestos fenólicos, hexacianoferrato(II), yoduro, ascorbato, etc. (21).

Los diseños electródicos más simples utilizan monitorización directa de la transferencia electrónica de la peroxidasa a un potencial más negativo de 0.6 V vs. ECS. La corriente es debida a la reducción electroquímica de los compuestos -I y -II, cinéticamente lentas sobre la mayoría de los materiales electródicos. Con objeto de evitar esta transferencia electrónica lenta, los compuestos donadores de electrones mencionados anteriormente se han utilizado como mediadores, bien en disolución o bien inmovilizados, que reaccionan rápidamente con la peroxidasa oxidada.

El mecanismo se muestra en el esquema 4 (22).



Esquema 3.- Empleo de mediadores redox en el desarrollo de un biosensor amperométrico enzimático

TABLA I. BIOSENSORES ENZIMATICOS AMPEROMÉTRICOS BASADOS EN EL EMPLEO DE ENZIMAS EN LA FAMILIA DE LAS OXIDASAS

Enzima	Analito (muestra)	Electrodo	Mediador	E_{ap} , V	Características analíticas	Ref.
POx	Piruvato	PGCE	Polímero de Os	0.35-0.50	IL=0.02-0.3 mM	10
SOx	Sulfitos (Vino)	PGCE		0.50	IL=2-3000 μ M LD=1 μ M	11
GOx	Glucosa D-fructosa D-lactosa Sucrosa	GCE	Cu(PtCl ₂)	0.5	IL=2-1000 μ M	12
ChOx	Colesterol (mantequilla, margarina)	Electrodo de Clark			IL:1.3-2.5 mM	13
GOx	Glucosa	Fibra de carbono	Azul de Prusia		IL=2-14 mM LD=0.1 mM	14
AOx	L- y D -aminoácidos (Leche, zumo, orina)	Electrodos fabricados por estarcido	Rh	0.4	IL=0.2-2.0 mM para L-glicina	15
GOx	Glucosa (Sangre)	Electrodos fabricados por estarcido (Comercial)	Ferroceno			16
GOx	Glucosa (Suero)	GCE	Ir	-0.1	IL= hasta 8 mM LD=1.6 mM	17
GOx	Glucosa	Cristales de TTF-TCNQ	TTF	0.15	IL=2-50 mM	18
LOx	Lisina (muestras farmacéuticas)	Electrodo compuesto conductor rígido		1.0	IL = hasta 1.6×10^{-4} M LD = 8.2×10^{-7} M	19
GOx	Glucosa (Procesos de fermentación)	Electrodos de grafito/resina-epoxi	Au y Pd	0.90	IL=1-10 g/L	20

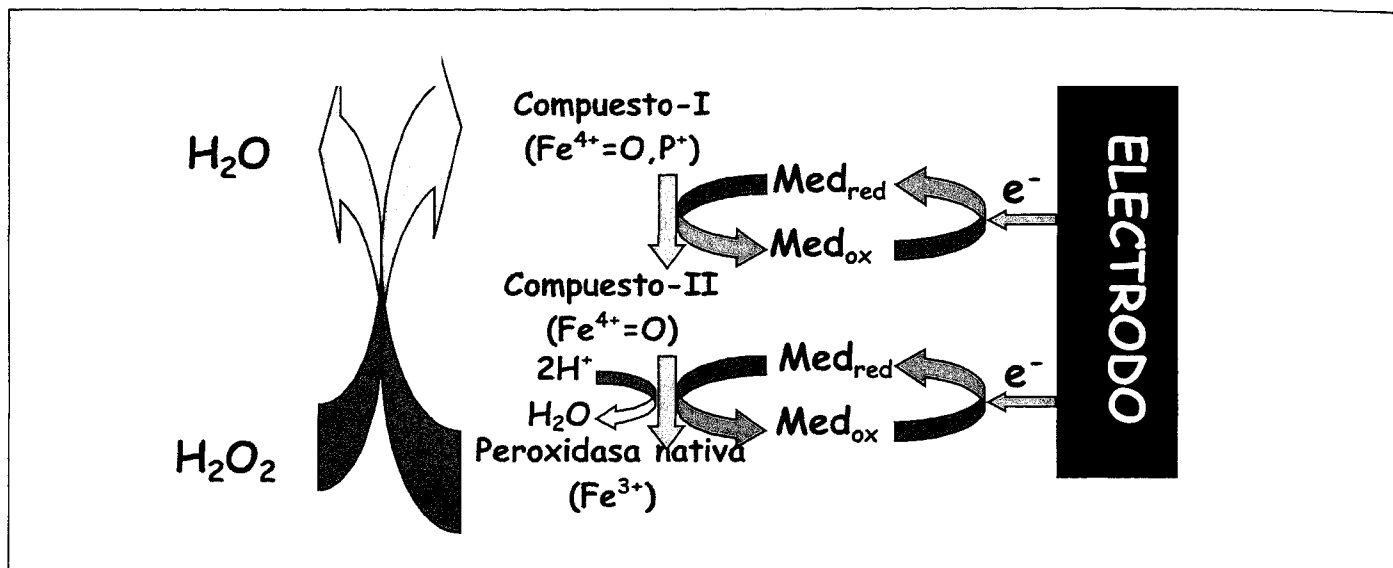
POx = piruvato oxidasa; SOx = sulfito oxidasa; GOx = glucosa oxidasa; LOx = lisina oxidasa. ChOx= colesterol oxidasa; AOx= aminoácido oxidasa TTF = Tetrafluoretileno; TCNQ = tetracianoquinodimetano. PGCE = electrodo de carbono vitrificado platinizado; GCE = electrodos de carbono vitrificado; IL = intervalo lineal; LD = límite de detección.

Cuanto menor sea la velocidad de reacción entre la peroxidasa y el mediador, mayor será la concentración de enzima que habrá de utilizarse para evitar la dependencia de la señal de la concen-

tración del mediador, así como para obtener una elevada sensibilidad de los electrodos. En consecuencia, a menudo se requieren concentraciones milimolares de mediador para medir concentra-

ciones micromolares de H₂O₂.

En general, pueden distinguirse tres tipos de electrodos de peroxidasa para la monitorización de peróxido de hidrógeno: (a) electrodos cuya superficie ha



Esquema 4.- Mecanismo de la peroxidasa empleando mediadores (Med).

sidio modificada con peroxidasa bien adsorbida o enlazada covalentemente, dando lugar a aproximadamente una monocapa de moléculas de enzima sobre el electrodo; (b) electrodos cuya superficie se modifica mediante el recubrimiento con un polímero (redox o conductor electrónico) en el cual las moléculas de peroxidasa están físicamente o químicamente atrapadas; (c) electrodos compósitos en los que la enzima está "homogéneamente" distribuida

en la mezcla de materiales conductor y aislante. En la revisión de Ruzgas y col. (22) se recogen las características de varios electrodos de estos tipos.

La determinación de H₂O₂ es importante a nivel industrial debido, por ejemplo, a que muchos cremas decolorantes de cabello tienen en su composición un 2-7% de peróxido de hidrógeno; además, es necesario determinarlo para el control medioambiental relacionado con el «smog». Por otro lado, los peróxidos orgá-

nicos aparecen como producto de la autooxidación de lípidos insaturados, que son precursores de aldehídos y cetonas, los cuales son responsables del mal sabor en aceites y derivados, por lo que su determinación es importante en el control de calidad de estos alimentos. En la Tabla 2 se recogen algunos ejemplos de determinación de peróxido de hidrógeno y de diferentes peróxidos orgánicos empleando biosensores de peroxidasa.

TABLA II. BIOSENSORES DE PEROXIDASA EMPLEADOS EN LA MONITORIZACION DE PEROXIDO DE HIDROGENO Y PEROXIDOS ORGANICOS

Enzima	Analito (muestra)	Electrodo	Mediador	E _{ap} , V	Características analíticas	Ref.
HRP	H ₂ O ₂	Pasta de carbono	o-fenilendiamina	-0.2	IL=2.1-1.000 μM	23
HRP	H ₂ O ₂ , P2B	Grafito	Ferroceno	+0,1	IL=20-80 μM	24
HRP ARP	Peróxidos orgánicos	Pasta de carbono Grafito/resina epoxi	o-fenilendiamina Transferencia directa de e ⁻	-0.2	IL=5-20 μM para H ₂ O ₂	25
HRP	Peróxidos orgánicos	Pasta de carbono	Ferroceno	-0.2		26
HRP	H ₂ O ₂ , P2B	Grafito/Teflón	Ferrocianuro	0.0	IL=0.5-100 μM	27

HRP= Peroxidasa de rábano; ARP= peroxidasa de *Arthromyces ramosus*; P2B= peróxido de 2-butanona; IL= intervalo lineal.

Finalmente, ya se ha mencionado con anterioridad que una característica común de muchas oxidasas es que producen H_2O_2 en la oxidación de los correspondientes sustratos. Por consiguiente, la utilización de biosensores bienzimáticos de peroxidasa y diferentes oxidasas se ha propuesto como manera de solucionar los problemas asociados con el elevado valor del potencial requerido para la monitorización electroquímica directa de H_2O_2 .

En la Tabla 3 se recogen algunos ejemplos escogidos de aplicaciones recientes de biosensores enzimáticos amperométricos basados en el empleo de peroxidasa junto a enzimas de la familia de las oxidasas.

c) Deshidrogenasa

Las reacciones catalizadas por estas enzimas se caracterizan por no depender del oxígeno molecular. El esquema

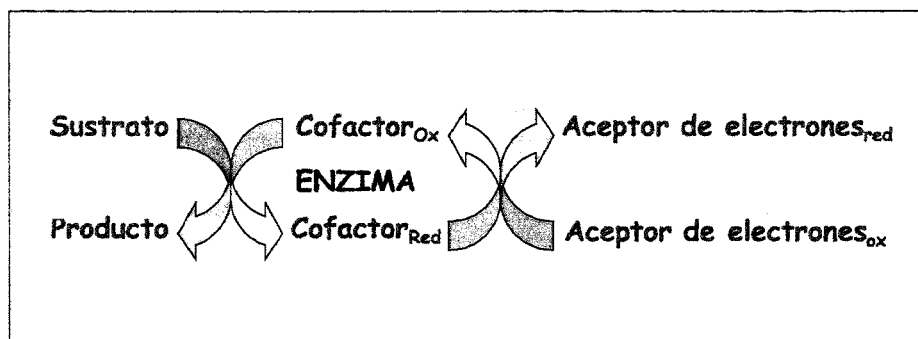
5 muestra un ejemplo del ciclo de reacción global de oxidación de un sustrato a un producto. La forma reducida del cofactor necesita la presencia de un aceptor de electrones y protones distinto del oxígeno molecular para reciclar la enzima.

Las deshidrogenasas pueden diferenciarse entre aquellas que tienen cofactores enlazados y las que dependen de un cofactor soluble que actúa como un cosustrato en el ciclo enzi-

TABLA III. BIOSENSORES BIENZIMÁTICOS AMPEROMÉTRICOS BASADOS EN EL EMPLEO DE ENZIMAS DE LA FAMILIA DE LAS OXIDASAS Y DE LAS PEROXIDASAS

Enzima	Analito (muestra)	Electrodo	Mediador	E_{ap} , V	Características analíticas	Ref.
LOx/HRP	L-Lactato (muestra)	Grafito	Polímero de Os	+0.1	IL=0.02-5 μ M LD=0,02 μ M	28
GOx/HRP	Glucosa (sangre)	Pasta de carbono	Ferrocianuro	0.0	IL=0,01-1.6 μ M	29
GOx/HRP	Glucosa (vinos, mostos)	Grafito/Teflon	Ferroceno	0.0	IL=10-800 μ M IL=2.8 μ M	30
AOD/HRP	Alcoholes	Pasta de carbono		-0.05	IL=10-500 μ M	31
P2O/HRP	Glucosa Xilosa, Galactosa (Procesos de fermentación)	Pasta de carbono	Ferroceno	-0.05		32
XOx/HRP	Hipoxantina (sardinas)	Grafito/Teflón	Ferroceno	0.0	LD=0.09 μ M	33
LOx/HRP	A. Láctico (leche, yogur)	Electrodo compuesto	Ferroceno	0.0		34
ChOx/HRP	Colesterol (mantequilla, manteca, huevos)	Grafito/Teflón	Ferroceno	0.0		35
AAOx/ARP	Aminoácidos	Pasta de carbono		-0.05	IL=20-100 μ M	36
BOx/HRP	Bilirrubina	Pasta de carbono	Ferrocianuro	-0.2	IL=4-100 μ M	37

LOx: lactato oxidas; GOx: Glucosa oxidas; AOD: alcohol oxidas; P2O: piranosa oxidas; XOx: xantina oxidas; ChOx: colesterol oxidas; AAOx: aminoácido oxidas; BOx: bilirrubina oxidas.



Esquema 5. Secuencia de reacciones para una reacción de oxidación catalizada por una deshidrogenasa

mático. El primer grupo puede a su vez ser subdividido en flavoproteínas que tienen como cofactor a FAD o FMN y las deshidrogenasas dependientes de la quinona pirroloquinoleína (PPQ) (21). Aunque la transferencia electrónica directa entre deshidrogenasas y electrodos ha sido verificada por diversos autores, la mayor parte de las aplicaciones de estas enzimas para construir biosensores electroquímicos implica el uso de mediadores redox que transportan los electrones en la mayoría de los casos desde la forma reducida de la enzima al electrodo (38).

Las deshidrogenasas dependientes de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótico) o NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) constituyen el mayor grupo de enzimas redox conocido. Sin embargo, su empleo para desarrollar biosensores amperométricos está limitado por tres inconvenientes importantes. En primer lugar, su actividad depende de un cofactor soluble que actúa como cosustrato y que, como tal, necesita ser añadido al sistema sensor, siendo además caro. Por otra parte, el potencial formal del par NAD(P)⁺/NAD(P)H es bajo (-560 mV vs. ECS a pH 7.0), lo que significa que el NAD(P)⁺ tiene un poder oxidante muy bajo en relación con los potenciales de la mayoría de los sustratos para las deshidrogenasas. En la mayoría de los casos, el empleo analítico de una deshidrogenasa dependiente del NAD(P)⁺ es para oxidar un sustrato con la producción de una cantidad estequiométrica de NAD(P)H, la cual es entonces medida. Por lo tanto, para poder utilizar analíticamente estos sistemas, se necesita una segunda etapa de reacción

que desplace el equilibrio hacia el producto. Esto puede hacerse acoplando una segunda etapa puramente química o enzimática en la que se consuma o bien el NADH producido o bien el propio producto de la reacción. Una manera de llevarlo a cabo es oxidar electroquímicamente el NADH midiendo la corriente como una señal proporcional a la concentración de sustrato. Sin embargo, y este es el tercer inconveniente, esta reacción electroquímica es muy irreversible y para altas concentraciones de NADH (>0.1 mM) se producen reacciones colaterales que ensucian la superficie del electrodo (39).

Dado que para la fabricación de biosensores la oxidación electroquímica del NADH es la vía de mayor interés, se han realizado un gran número de investigaciones para encontrar buenos mediadores que catalicen dicha oxidación electroquímica dentro del intervalo óptimo de potenciales para evitar posibles interferencias. Parece que los mejores resultados se han obtenido con aceptores de dos electrones que también funcionan como aceptores de protones, o mediante el acoplamiento del sistema de deshidrogenasa dependiente de NAD(P)⁺ con una segunda etapa enzimática basada en diaforasa, una enzima que oxida al NAD(P)H. Los electrodos compósitos y, en algunos casos, los electrodos modificados con capas poliméricas son buenos candidatos para resolver los inconvenientes mencionados anteriormente. Estas configuraciones permiten la inmovilización conjunta de la enzima, el cofactor y adicionalmente un mediador o una segunda enzima, de manera que están muy próximos los unos a los otros para permitir el movi-

miento de los electrones desde el sustrato enzimático al cofactor, posteriormente al mediador y finalmente al electrodo. Una completa revisión de los biosensores amperométricos basados en enzimas deshidrogenasas dependientes del NAD(P)⁺ es la realizada por Tuñón y col. (40), recogiendo en la Tabla 4 algunos ejemplos escogidos de aplicaciones recientes.

INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

En general, los inmunosensores están basados en la reacción bioquímica que implica el reconocimiento de la forma del antígeno (Ag) por el anticuerpo (Ab), uniéndose por un punto concreto para formar el complejo antígeno-anticuerpo. La gran selectividad de los anticuerpos viene dada por la estereoespecificidad de los puntos de unión con el antígeno, lo que hace sumamente atractiva la utilización de estos sistemas para el desarrollo del biosensores. La medida de estas interacciones es frecuentemente difícil de realizar de manera directa, por lo que muchos sistemas utilizan el denominado inmunoensayo enzimático, basado en la unión de una enzima al antígeno o al anticuerpo. Dicha enzima actúa sobre el sustrato, dando lugar a un producto que sí puede ser detectado por el transductor.

Dos tipos de configuraciones se suelen emplear en los inmunosensores enzimáticos (Figura 3). En la llamada configuración sandwich, el antígeno se une al anticuerpo inmovilizado en el transductor y, a su vez, a dicho antígeno (analito) se une el anticuerpo marcado con una enzima. La monitorización de la reacción enzimática proporciona la información analítica requerida. En la configuración denominada competitiva, el anticuerpo y el correspondiente antígeno, al que se ha unido la enzima, están inmovilizados en la superficie del electrodo. La adición de analito, es decir, de antígeno sin enzima, provoca una competencia por los anticuerpos inmovilizados en el transductor. La disminución de la respuesta correspondiente a la reacción enzimática proporciona la información analítica requerida

TABLA IV. EJEMPLOS DE BIOSENSORES BASADOS EN ENZIMAS DESHIDROGENASAS

Enzimas	Analito (muestra)	Electrodo	Mediador	E_{ap} , V	Características analíticas	Ref.
GIDH	NH ₄ ⁺ (agua de río)	"Screen.printed"	"Meldola's Blue"		LD=2 µM	41
G6PhDH	Glucosa 6-fosfato (sangre)	Pasta de carbono		0.3	LD=50 µM	42
D-FDH	D-fructosa (miel, leche, chocolate, galletas, zumos)	Electrodo compuesto		0.2	RSD=2.11%	43
D-FDH	D-Fructosa (productos dietéticos)	Pt	Ferricianuro	0.25	RSD=0.68 %	44
ADH	Etanol (vino)	Electrodo compuesto		0.03	Calibrado no lineal=0.2-4 µM	45
D-FDH	D-fructosa (miel, zumos, bebidas de cola)	Pasta de carbono	Polímero de Os	0.1 V	IL=hasta 20 µM	46
AIDH	Acetaldehído (bebidas alcohólicas)	Electrodo compuesto		0.6	IL=0.5-330 µM	47
ADH	Etano (bebidas, alcohólicas)	Pasta de carbono		0.15	LD=20 µM RSD=3.4 µM	48
D-FDH	Fructosa (Zumos)	Au			LD <10 µM	49
FDH/GDH	Fructosa y glucosa (miel)	Pt			LD=0.1 µM	50

GIDH: glutamato deshidrogenasa; G6PhDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; D-FDH: D-fructosa deshidrogenasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; AIDH: aldehído deshidrogenasa; GDH: glucosa deshidrogenasa; IL: intervalo lineal; LD: límite de detección.

De acuerdo con el modo de transducción de la señal, pueden distinguirse dos categorías de inmunosensores electroquímicos. Los inmunosensores directos siguen la interacción antígeno anticuerpo normalmente de manera continua y en tiempo real, mientras que los inmunosensores indirectos miden el resultado del proceso de unión, es decir la cantidad aumentada (o disminuida) del marcador unido (enzima, indicador electroactivo).

También con este tipo de biosensores las técnicas basadas en membranas han resultado ser muy populares, por ejemplo mediante la combinación de un electrodo de oxígeno tipo Clark con anticuerpos enlazados a membranas. Así, se ha empleado catalasa como marcador liberador de oxígeno, por ejemplo, para determinación de α -fetoproteína (51). Sin embargo los enfoques más modernos parecen decantarse sobre la unión directa de las moléculas inmuno-especí-

ficas a la superficie sensora usando adsorción o unión covalente (52).

La aplicación de electrodos modificados con polímeros conductores parece ser bastante interesante para este fin. Por ejemplo, empleando anticuerpos anti-HSA incorporados durante la electropolimerización en polipirrol, es posible la monitorización directa y reversible del correspondiente HSA en disolución utilizando detección amperométrica de impulsos (53). Además, esta metodología es lo bas-

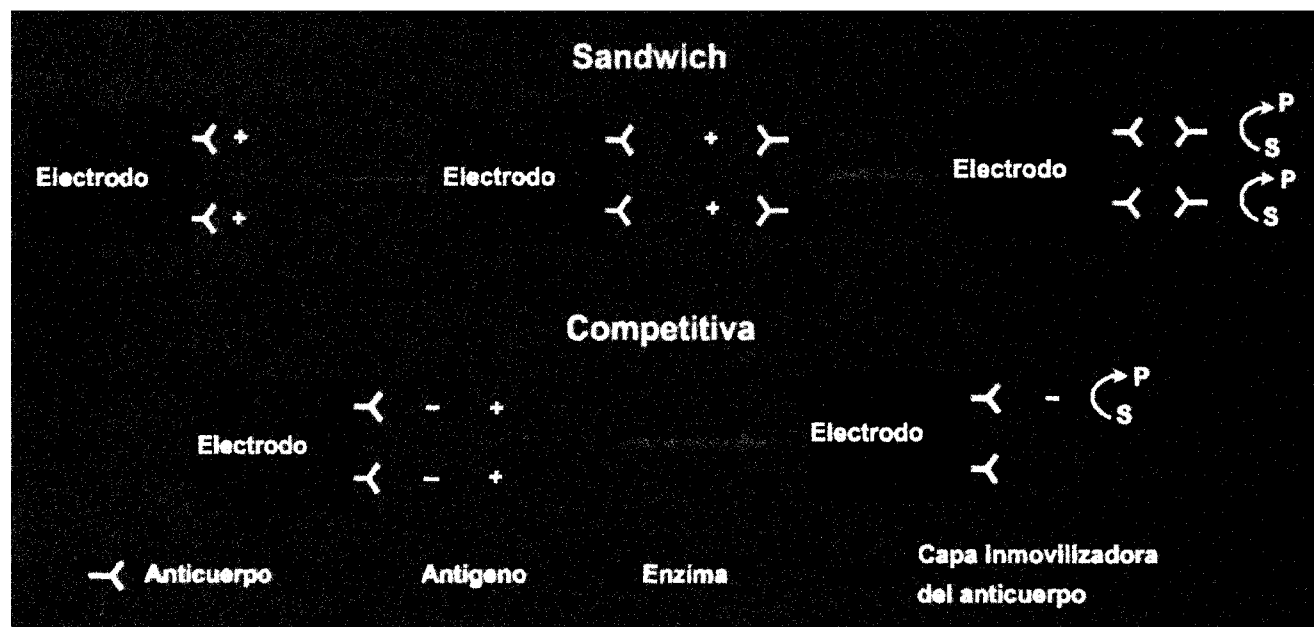


Figura 3. Configuraciones empleadas en los métodos de inmunoensayo enzimático.

tante rápida para ser incorporada a sistemas FIA, no se requieren etapas de regeneración y la señal cae a cero sin analito.

En la Tabla 5 se recogen algunos ejemplos de aplicaciones de inmunosensores electroquímicos en matrices de muestras reales. La mayoría de estos dispositivos se han empleado para análisis clínico o bien para componentes sanguíneos o compuestos farmacéuticos, aunque la capaci-

dad de diseñar equipos portátiles es una gran ventaja para la monitorización medioambiental sobre todo para realizar un "screening" preliminar directamente en el lugar donde se toma la muestra. La mayoría de las aplicaciones implica la utilización de solo una enzima marcadora, si bien, el empleo de sistemas de amplificación basados en el uso de enzimas en cascada permite conseguir límites de detección varios

órdenes de magnitud menor. Por ejemplo, en el caso del herbicida 2,4-D, la diferencia de emplear una sola enzima a un sistema de amplificación es de 100 ng/L (54) frente a 20 pg/L (55) usando el mismo anticuerpo. Sin embargo, los sistemas de amplificación complicados son menos estables y requieren condiciones de operación mucho más controladas para un funcionamiento reproducible. **AQ**

TABLA V. APLICACIONES DE BIOSENSORES INMUNOLOGICOS A LA MONITORIZACION DE DISTINTOS COMPUESTOS EN DIFERENTES MUESTRAS

Analito	Muestra	Marcador	Características ranalíticas	Ref.
h-Albumina	Suero	HSA-Gox	0.5-100 mg/L	56
a-fetoproteina	Suero	Mab2-catalasa	0.5-120 µg/L	57
THS	Suero	Alc DH/NADH OD		55
Tiroxina BG	Suero	Ab2-ALP	30-1000 µg/L	58
Anfetamina	Suero	Cobaltocenium	0.3-130 µg/L	59
Digoxin	Suero	Digoxin-ALP	0.01-1 µg/L	60
Teofilina	Suero	POD-liposomas	Hasta 0.2 µg/L	61
Atrazina	Agua	Atrazina-ALP	0.1-10 µg/L	62
2,4-D	Agua	2,4-D-POD	0.1-1000 µg/L	54
2,4-D	Agua	2,4-D-AchE	0.01-10000 µg/L	63

BIBLIOGRAFIA

1. G. G. Guilbault, J.G. Montalvo; *J. Am.Chem. Soc.*; **92** (1970) 2533.
2. I. Walcerz, S. Glab, R. Koncki; *Anal. Chim. Acta*; **369** (1998) 129.
3. R. Koncki, A. Hulanicki, S. Glab; *Trends Anal. Chem.*; **16** (1997) 528.
4. E. Leszczynska, S. Glab, A. Sokól, K. Dziegielewski, R. Rokicka, R. Koncki; *Anal. Chim. Acta*; **368** (1998) 205.
5. J.C.B. Fernandes, L.T. Kubota, G. de Oliveira Neto; *Anal. Chim. Acta*; **385** (1999) 3.
6. A. Merkoci, S. Braga, E. Fàbregas, S. Alegret; *Anal. Chim. Acta*, **391** (1999) 65.
7. S.J. Updike, G.P. Hicks, *Nature*, **214** (1967) 986.
8. A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **96** (1992) 3579.
9. J. Wang. *Analytical Electrochemistry*, VCH Publishers, Inc., New York 1994.
10. N. Gajovic, K. Habermueller, A. Warsinke, W. Schuhmann, F.W. Scheller; *Electroanalysis*, **11** (1999) 1377.
11. M. Situmorang, D.B. Hibbert, J.J. Gooding, D. Barlett; *Analyst*, **124** (1999) 1775.
12. J.H. Pei, X.Y. Li; *Electroanalysis*, **11** (1999) 1266.
13. G.F. Hall, A.P.F. Turner, *Anal. Letters*, **24** (1991) 1375.
14. X. Zhang, J. Wang, B. Ogorevc, U.E. Spichiger; *Electroanalysis*, **11** (1999) 945.
15. P. Sarkar, I.E. Tothill, S.J. Setford, A.P.F. Turner, *Analyst*, **124** (1999) 865.
16. M.J. Green, P.I. Hilditch, *Anal. Proc.*, **28** (1991) 374.
17. M.C. Rodríguez, G.A. Rivas; *Electroanalysis*; **11** (1999) 558.
18. G.F. Khan; *Electroanalysis*, **9** (1997) 325.
19. J. Saurina, S. Hernández-Cassou, S. Alegret; E. Fàbregas; *Biosensors and Bioelectronics*, **14** (1999) 211.
20. J. Saurina, S. Hernández-Cassou, E. Fàbregas, S. Alegret; *Anal. Chim. Acta*, **371** (1998) 49.
21. L. Gorton, *Electroanalysis*, **7** (1995) 23.
22. T. Ruzgas, E. Csöregi, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga; *Anal. Chim. Acta*, **330** (1996) 123.
23. M.S. Lin, S.Y. Tham, G.A. Rechnitz; *Electroanalysis*, **2** (1990) 511.
24. A.J. Reviejo, F. Liu, J.M. Pingarrón, J. Wang; *J. Electroanal. Chem.*, **374** (1994) 133.
25. J. Wang, B. Freiha, N. Naser, E. González-Romero, U. Wollenberger, M. Ozsoz; *Anal. Chim. Acta*, **254** (1991) 81.
26. J. Wang, A. Ciszewski, N. Naser; *Electroanalysis*, **4** (1992) 777.
27. G. Ortiz, M.C. González, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón; *Anal. Chem.*, **69** (1997) 3521.
28. L. Yang, E. Janle, T. Huang, J. Gitzen, P.T. Kissinger; *Anal. Chem.*, **67** (1995) 1326.
29. J.J. Kulis, V.S.A. Laurinavicius, M.V. Pesliakienė, V.V. Gureviciene; *Anal. Chim. Acta*, **148** (1989) 13.
30. M.A. del Cerro, G. Cayuela, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, J. Wang, *Electroanalysis*, **9** (1997) 1113.
31. T.A. Butler, K.A.J. Johansson, L. Gorton, G.A. Marko-Varga; *Anal. Chem.*, **65** (1993) 2628.
32. T. Buttler, H. Lindén, J.A. Jönsson, L. Gorton, G. Marko-Varga, H. Jeppsson, *Anal. Chim. Acta*, **324** (1996) 103.
33. G. Cayuela, N. Peña, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Analyst*, **123** (1998) 371.
34. B. Serra, A.J. Reviejo, C. Parrado, J.M. Pingarrón; *Biosensors and Bioelectronics*, **14** (1999) 505
35. N. Peña, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, enviada para su publicación.
36. L. Gorton, G. Jönsson-Pettersson, E. Csöregi, K. Johansson, E. Domínguez, G. Marko-Varga, *Analyst*, **117** (1992) 1235.
37. J. Wang, M. Ozsoz, *Electroanalysis*, **2** (1990) 647.
38. P.N. Barlett, P. Tebbutt, R.P. Whitaker, *Prog. React. Kinet.*, **16** (1991) 55
39. W. Schuhmann, H.L. Schmidt, *Advances in Biosensors (A.P.F. Turner, ed.) Vol. 2, JAI Press, London 1992*, pp 79-130.
40. M.J. Lobo, A.J. Miranda, P. Tuñón; *Electroanalysis*, **9** (1997) 191.
41. J.P. Hart, A.K. Abass, D.C. Cowell, A. Chappell, *Electroanalysis*, **11** (1999) 406.
42. A.S. Bassi, D. Tang, M.A. Bergougnou, *Anal. Biochem.*, **268** (1999) 223.
43. M. Strendansky, A. Pizzariello, S. Stredanska, S. Miertus, *Anal. Comm.*, **36** (1999) 57.
44. C.A.B. García, G. De Oliveira-Neto, L.T. Kubota, *Anal. Chim. Acta*, **374** (1998) 201.
45. J. Katrlík, J. Svorc, M. Strendanski, S. Miertus, *Biosensors and Bioelectronics*, **13** (1998) 181.
46. P.A. Paredes, J. Parellada, V.M. Fernández, I. Katakis, E. Domínguez, *Biosensors and Bioelectronics*, **12** (1998) 1233.
47. T. Noguier, J.L. Marty, *Anal. Letters*, **30** (1997) 1069.
48. M.J.L. Castanon, A.J.M. Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Biosensors and Bioelectronics*, **12** (1997) 511.
49. K.T. Kinnear, H.G. Monboukette, *Anal. Chem.*, **69** (1997) 1771.
50. R. Antiochia, G. Palleschi, *Anal. Letters*, **30** (1997) 683.
51. M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, **115** (1980) 61.
52. P. Skládal, *Electroanalysis*, **9** (1997) 737
53. O.A. Sadik, G.G. Wallace, *Anal. Chim. Acta*, **279** (1993) 209.
54. P. Skládal, T. Kaláb, *Anal. Chim. Acta*, **316** (1995) 73
55. F.F. Bier, E. Ehrentreich-Forster, C.G. Bager, F.W. Scheller, *Freseenius J. Anal. Chem.*, **354** (1996) 861.
56. S. Kaku, S. Nakanishi, K. Horiguchi, M. Sato, *Anal. Chim. Acta*, **281** (1993) 35
57. J.L. Boitieux, M.P. Biron, D. Thomas, *Anal. Chim. Acta*, **222** (1989) 235
58. P.H. Treolar, A.T. Nkohkwo, J.W. Kane, D. Barber, P.M. Vadgama, *Electroanalysis*, **6** (1994) 561.
59. B. Limoges, C. Degrand, P. Brossier, R.L. Blankespoor, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 1054
60. N. Kaneki, Y. Xu, A. Kumari, H.B. Halsall, W.R. Heineman, P.T. Kissinger, *Anal. Chim. Acta*, **287** (1994) 253.
61. T.G. Wu, R.A. Durst, *Mikrochim. Acta*, **1** (1990) 187.
62. T.B. Jiang, H.B. Halsall, W.R. Heineman, T. Hiersch, B. Hock, *J. Agric. Food Chem.*, **43** (1995) 1098.
63. T. Kaláb, P. Skláda, *Electroanalysis*, **9** (1997) 293.