

Los biosensores. Una nueva estrategia para el análisis rápido de alimentos



María Isabel Pividori* y Salvador Alegret

Grup de Sensors i Biosensors (GSB), Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

Fax: + 34 93 581 2379; Tel: + 34 93 581 2698

*e-correspondencia: Isabel.Pividori@uab.es

La necesidad de análisis de diferentes componentes a tiempo real en áreas cada vez más diversas ha promovido en estos últimos años que los esfuerzos realizados en el desarrollo de instrumentación analítica se dirijan hacia la construcción de dispositivos cuya utilización no requiera la supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea menor. Como resultado de esta demanda de información relacionada con el análisis de forma rápida, fiable y descentralizada se ha favorecido el desarrollo de sensores químicos y biosensores como alternativa de análisis a la instrumentación analítica convencional (Figura 1).



Figura 1. La instrumentación analítica convencional (izquierda) versus los sensores químicos en formato de *kit* diagnóstico (derecha).

Los sensores químicos existen desde hace mucho tiempo. Se han estudiado en profundidad y han encontrado durante todo este tiempo un gran campo de aplicación. Se conocen muy bien por su uso cotidiano en el laboratorio los electrodos redox, los electrodos selectivos a iones, especialmente el de pH, entre otros muchos. Simultáneamente al avance de los sensores, y debido al gran impulso de la informática, se viene desarrollando del mismo modo instrumentación capaz de realizar el seguimiento continuo de procesos complejos mediante ordenador de los parámetros físicos y/o químicos basados en sensores químicos. Mediante este tipo de instrumentación es posible intervenir en el control de procesos de forma rápida y segura.

Los biosensores, de aparición más reciente, constituyen un campo multidisciplinario de I+D y un mercado muy atractivo. Originariamente la investigación en este campo provenía principalmente del sector clínico y biomédico. Las inversiones realizadas en el desarrollo de biosensores para la aplicación en el campo clínico fueron compensadas en un corto plazo con la aparición de los biosensores para la determinación y control de glucosa en pacientes diabéticos. Los biosensores demostraron así su capacidad de realizar análisis fuera del ámbito del laboratorio y por personas no entrenadas, por ejemplo, en la consulta médica por el mismo paciente.

Actualmente los biosensores no son patrimonio exclusivo de la investigación biomédica. La industria alimentaria demanda métodos rápidos para estimar la identidad, la caducidad, el deterioro o la contaminación de los alimentos. A la industria en general, y a la alimentaria en particular, le es necesario controlar de manera confiable los productos en matrices muy complejas. Con la consolidación de la Unión Europea, las medidas dirigidas hacia el control de alimentos cada vez son más estrictas y generan necesidades analíticas muy variadas.

Sensores químicos y biosensores

Un dispositivo sensor, de forma general, está formado por dos partes. Una de dichas partes es el denominado "elemento de reconocimiento molecular" o "receptor" que interacciona con un determinado componente de la muestra, el que se quiere determinar, de manera "específica", es decir, sin que el resto de la

muestra interfiera en la medida. El otro componente, se conoce como "transductor" (Figura 2). Cuando el componente que se busca determinar en la muestra compleja interacciona con el "receptor" del sensor, se produce un cambio que es detectado por el "transductor" y transformado en una señal eléctrica que es medida por un instrumento.

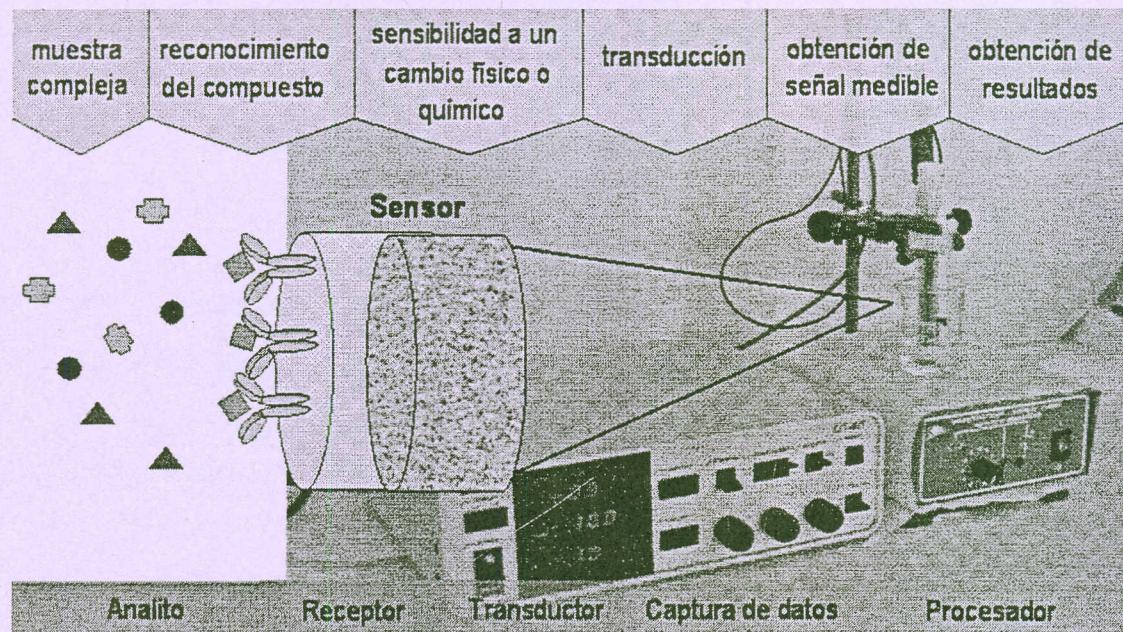


Figura 2. Diagrama esquemático del funcionamiento de un sensor. El "elemento de reconocimiento" o "receptor" sólo reconoce un componente de la muestra. La señal proveniente del proceso de reconocimiento se convierte en una señal eléctrica mediante el transductor. Esta señal es amplificada y posteriormente procesada y presentada en forma digital. El receptor puede interactuar con el analito mediante mecanismos físicos, químicos o biológicos.

Esta configuración tan simple de reconocimiento y transducción es la que ha permitido el diseño de una instrumentación con características prácticas e innovadoras en el campo del análisis. Mediante este esquema analítico tan sencillo fue posible eliminar numerosas etapas necesarias en un proceso analítico convencional tales como el tratamiento de la muestra o la separación del componente que se quiere determinar del resto de la muestra, que complican un procedimiento clásico de análisis basado en equipamiento analítico tradicional.

Un aspecto fundamental de este diseño es la generación de una señal suficientemente intensa entre el componente que se desea analizar (el analito) y el "receptor" selectivo de éste o "elemento de reconocimiento". Mientras más simple y confiable sea el proceso de reconocimiento, más lo será el dispositivo resultante. Los demás aspectos asociados al proceso y al sensor, como la conversión (transducción) de las señales, su procesamiento y transmisión son igualmente importantes pero ya poseen un tratamiento mucho más desarrollado y efectivo gracias a los adelantos constantes y continuos de la micro y optoelectrónica.

La investigación y el desarrollo de los sensores químicos están dirigidos principalmente a la obtención de receptores cada vez más selectivos de moléculas. También es necesario inmovilizar los receptores sobre los transductores más adecuados, sin que unos ni otros pierdan sus características funcionales. Hay todo un espectro de posibilidades de inmovilización de receptores sobre los transductores, desde inmovilizaciones simples por adsorción, retención del receptor en geles o membranas poliméricas, o por entrecruzamiento de los receptores entre sí mediante agentes bifuncionales, hasta inmovilizaciones más complejas por unión química entre el receptor y el transductor. Por otro lado, existe un abanico de posibilidades en el desarrollo de nuevos transductores mediante nuevos materiales de complejidad creciente. De todas formas, los esfuerzos se dirigen hacia el diseño de nuevos materiales de reconocimiento suficientemente selectivos.

Los elementos de reconocimiento o receptores de naturaleza sintética presentan un grado de reconocimiento limitado. A pesar de esto se consiguen cada vez más materiales adecuados para el desarrollo de sensores en aplicaciones muy concretas. Esta limitación hizo que se consideraran como "elementos de reconocimiento" los receptores de naturaleza biológica o biorreceptores, para la construcción de transductores con materiales biológicos de reconocimiento molecular, mucho más selectivos que los de naturaleza sintética. Estos sensores químicos que incorporan materiales biológicos en su construcción se conocen como biosensores. Un biosensor es un sensor químico cuya parte receptora está constituida por material biológico para el reconocimiento molecular de la muestra.

Receptores y transductores

El componente receptor de un sensor químico transforma selectivamente determinada información química contenida en una muestra en una forma de energía susceptible de ser medida por el transductor. El componente transductor es un elemento capaz de transformar la energía que codifica la información química procedente de la muestra en una señal analítica útil.

El componente receptor puede interaccionar con el analito mediante un mecanismo físico sin que haya una reacción. Es el caso en el que se detecta la interacción mediante un cambio de absorbancia, en el índice de refracción, en la conductividad, en la temperatura o en la masa. Más común es que el receptor reconozca al analito mediante una reacción química o bioquímica.

Se conoce la selectividad limitada de la mayoría de las reacciones utilizadas en el análisis químico, que obliga a tratar previamente la muestra a fin de eliminar las interferencias. Este hecho ha ocasionado que sólo un número reducido de reacciones químicas sean aprovechadas como sistemas receptores en los sensores químicos, ya que éstos se diseñan para funcionar en determinaciones directas sin tratamiento de la muestra.

En la actualidad se están utilizando elegantes procedimientos sintéticos de arquitectura molecular para la obtención de reactivos muy innovadores. Por otro lado, se sabe que el reconocimiento molecular es la base de la vida celular, de su organización y mantenimiento. La comunicación química entre células mediante sistemas moleculares complementarios es un proceso de vital importancia, responsable de la organización y la protección de organismos y de la regulación de su metabolismo. Este tipo de reconocimiento, optimizado por la evolución biológica, es el que se ha estado utilizando para el desarrollo de los biosensores. Efectivamente, las interacciones entre enzimas y sustratos o inhibidores, entre anticuerpos y antígenos o haptenos, entre diversos receptores y hormonas, fármacos y neurotransmisores y entre fragmentos de ADN han servido de modelo a variados sistemas biosensores, algunos ya comercializados (Figura 3).

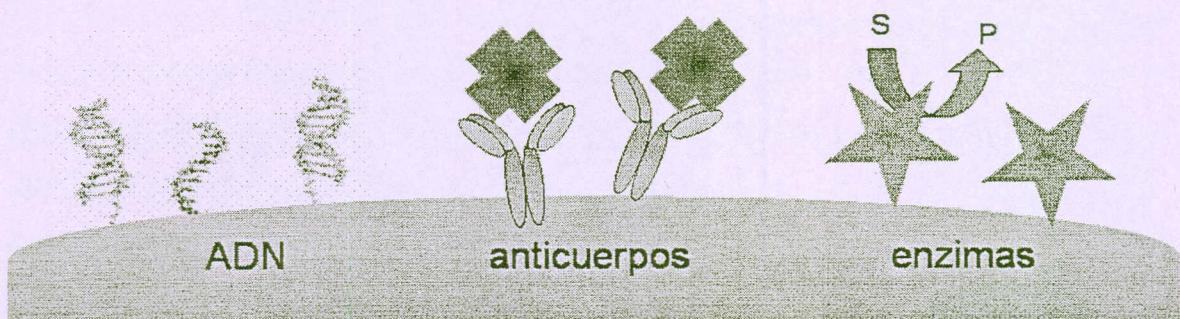


Figura 3. La interacción de dos hebras de ADN (constituyente principal del genoma de organismos vivos), o de un anticuerpo con su antígeno específico (constituyente principal del sistema inmune), o de una enzima con su correspondiente sustrato (efectoras biológicas más importantes mediante la catálisis de reacciones bioquímicas a nivel celular) son algunos modelos de interacciones biológicas en las que se inspiran los biosensores.

Metodologías y tecnologías

La determinación de componentes en medios complejos mediante sensores y biosensores se ha propagado extensamente debido a su simplicidad. En algunos casos son los mismos laboratorios quienes construyen sus propios sensores para aplicaciones muy particulares.

Los sensores y biosensores son ideales para ser utilizados en mediciones directas, es decir, sin un tratamiento preliminar de la muestra. Son particularmente adecuados en los procesos industriales, sin necesidad de tomar muestras, *in situ*. Por ser portátiles y robustos, los sensores químicos también son apropiados en mediciones de procesos, junto a reactores industriales o en circunstancias especiales. Los sensores pueden conectarse de algún modo con el proceso a seguir o controlar muestras en forma continua. Es decir, el sensor está acompañado de un sistema de toma de muestra automatizado.

Los sensores y biosensores pretenden ser dispositivos cuya fabricación se realice de forma masiva a muy bajo coste. Así, con una fabricación económica, estos dispositivos podrían ser de “uso personal” y desechables, es decir, de usar y tirar. Por lo tanto, la investigación y desarrollo de los sensores químicos y biosensores va también dirigida hacia diseños compatibles con tecnologías que posibiliten una gran producción de dispositivos a bajo coste. En este sentido tiene una gran importancia el hecho de que los sensores se puedan desarrollar con tecnologías

planas, de capas delgadas microlitográficas, como las que se utilizan en la fabricación de dispositivos microelectrónicas y en circuitos impresos. Eventualmente pueden construirse sensores de capas gruesas que no requieren inversiones muy elevadas, como los producidos con técnicas serigráficas.

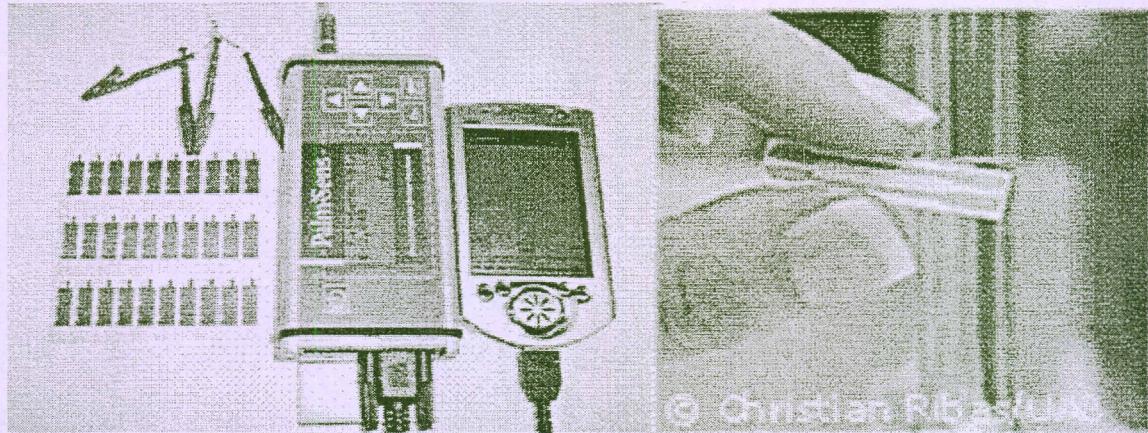


Figura 4. Instrumentación portátil asociada a los sensores y biosensores (izquierda). Sensores de "un solo uso" producidos mediante técnicas serigráficas (derecha). © UAB

Biosensores de ADN o genosensores

El grupo completo de instrucciones codificadas necesarias para producir un organismo vivo y para programar sus actividades para toda su vida se denomina genoma. El constituyente fundamental del genoma es el ADN (ácido desoxirribonucleico). Detectar cadenas de ADN se ha convertido en un área de importancia creciente en numerosas aplicaciones tales como en la identificación de las personas y resolución de casos forenses, en la detección y prevención de enfermedades hereditarias mediante el consejo genético, en antropología mediante el estudio de las corrientes migratorias humanas, en toxicología y farmacología mediante el diseño de fármacos de acción puntual, en investigación biomédica, en la monitorización medioambiental, en la detección de agentes infecciosos (virus, bacterias), y en la industria, principalmente en la monitorización de procesos industriales biotecnológicos y en el control de calidad en industria alimentaria.

Como se puede intuir, la determinación de secuencias de ADN de humanos, microorganismos y plantas tiene cada día mayor relevancia en otras numerosas áreas de interés. Pero las metodologías clásicas de análisis de ADN quedan cada vez más desfasadas frente a una demanda creciente de más información génica en menos tiempo y a un coste menor. Además, la necesidad de análisis de ADN en áreas cada vez más diversas –tales como la industria– con dispositivos cuya utilización no requiera la supervisión profesional, cuyo manejo sea sencillo y cuyo coste sea menor facilitó el desarrollo de metodologías alternativas a las clásicas.

Dentro de este contexto, y debido a la consecución del Proyecto Genoma Humano, los chips de ADN se han convertido en una alternativa necesaria a los métodos clásicos de análisis de ADN. Los chips de ADN son unas plataformas en las que se llevan a cabo centenares o incluso miles de análisis de genes en paralelo y que han llegado a ser insustituibles en proyectos ambiciosos, como descifrar el código genético de un organismo. Los chips de ADN, sin embargo, tienen limitaciones para problemas analíticos más específicos, como el de establecer de manera rápida y económica el origen de una contaminación microbiana o la identificación de un producto alimentario. Los genosensores obedecen a la demanda de análisis de ADN con dispositivos que no necesiten la supervisión profesional, con una operación simple y a un coste reducido.

Respecto a las técnicas clásicas de análisis de ADN la principal ventaja de los genosensores es su capacidad de generar directamente una señal mensurable, en un período corto de tiempo, simplificar el procedimiento de análisis reduciendo el número de etapas, desarrollar los ensayos en condiciones diferentes a las del laboratorio, su posible regeneración y la posibilidad de miniaturización de la instrumentación asociada.

Se puede decir que un genosensor es un sensor químico con ADN como elemento de reconocimiento, o lo que es lo mismo, un biosensor de ADN.

El Grupo de Sensores y Biosensores de la Universitat Autònoma de Barcelona (GSB) viene dirigiendo alguna de sus líneas de investigación hacia el desarrollo de biosensores de ADN electroquímicos, robustos, y económicos, de uso simple, y dirigidos a su aplicación principalmente en la industria alimentaria y biotecnológica. Los biosensores de ADN desarrollados por el GSB tienen como características principales su capacidad de generar una respuesta analítica en un corto lapso de

tiempo, simplificando el procedimiento de análisis y reduciendo el número de etapas necesarias. Estos ensayos genéticos simplificados pueden ser así realizados fuera del entorno del laboratorio mediante instrumentación portátil.

Los dispositivos desarrollados buscan resolver un problema tecnológico en el desarrollo de biosensores: la irreversibilidad de las interacciones entre los electrodos y el material biológico, en este caso el ADN, mediante un proceso de simple pulido con el objeto de reutilizarlos. Alternativamente se pueden fabricar los biosensores mediante técnicas serigráficas (Figura 4), hecho que abarata su coste permitiendo una utilización de un solo uso. La señal analítica empleada se basa en la oxidación selectiva del ADN a un potencial específico. Esta oxidación del ADN ocurre debido a sus bases nitrogenadas guanina y adenina. Esta medida directa simplifica aún más el proceso de análisis ya que no se requiere un paso adicional de marcaje, a diferencia de los procedimientos habituales de hibridación. Los dispositivos desarrollados han llegado a detectar cantidades ínfimas de ADN para algunas aplicaciones, del orden de femtomoles (subnanogramos, o 10^{-10} gramos) de secuencias específicas de ADN.

Todas las características enunciadas hacen de estos biosensores de ADN, desarrollados por el GSB, unos dispositivos de evidente interés comercial, ya que su construcción con materiales simples permite la transferencia de esta tecnología hacia la fabricación en serie de dispositivos de un solo uso en forma de *kit* genosensor.

En particular, en el GSB hemos diseñado biosensores de ADN centrados en el diagnóstico alimentario, para la determinación de contaminación bacteriana. Se ha desarrollado, en colaboración con el Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, un biosensor de ADN para la determinación de la bacteria *Salmonella* (Figura 5). La detección precoz de este patógeno bacteriano es de capital importancia en la industria alimentaria, tanto de materias primas como de productos terminados, ya que es un microorganismo responsable de graves brotes de contaminación alimentaria. El procedimiento total de análisis es de 270 minutos, en contraste con los 3 a 5 días requeridos para su determinación con métodos microbiológicos clásicos basados en el cultivo de la bacteria.

Además de esta aplicación, el dispositivo desarrollado puede ser utilizado en diversas situaciones, para sólo citar algunas, en campos de aplicación tan variados como el clínico, industrial, biotecnológico, o medioambiental. Desde el punto de vista de la tecnología, sólo es necesario diseñar el elemento de reconocimiento biológico del biosensor de ADN con un gen específico del problema analítico concreto.

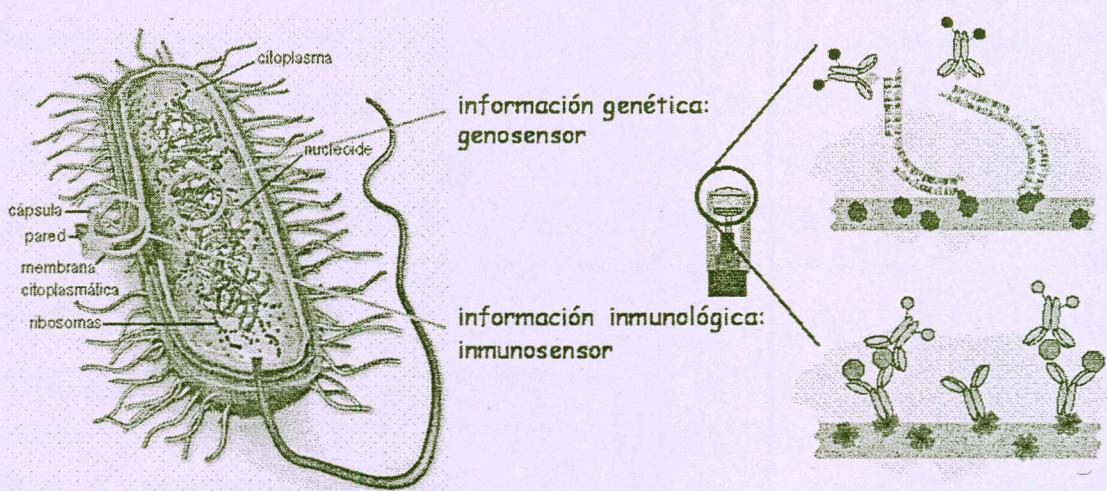


Figura 5. Una bacteria como la *Salmonella*, uno de los principales patógenos alimentarios, puede ser determinada en distintos alimentos precozmente, con el objeto de evitar brotes de salmonellosis, mediante los biosensores. Los mismos pueden analizar la información inmunológica de la bacteria o bien, como en el caso de los dispositivos desarrollados en el Grupo de Sensores y Biosensores de la UAB, su genoma.

Aplicaciones de los biosensores en la industria alimentaria

Como ya se explicara, los biosensores han encontrado su principal aplicación en el ámbito clínico, cuyo mejor exponente es el biosensor de glucosa o en el análisis medioambiental. Sin embargo, sus aplicaciones se han ido ampliando a áreas cada vez más diversas y fuera del ámbito hospitalario. En el campo alimentario existe

una creciente demanda de este tipo de dispositivo respecto a otras metodologías (Figura 6).

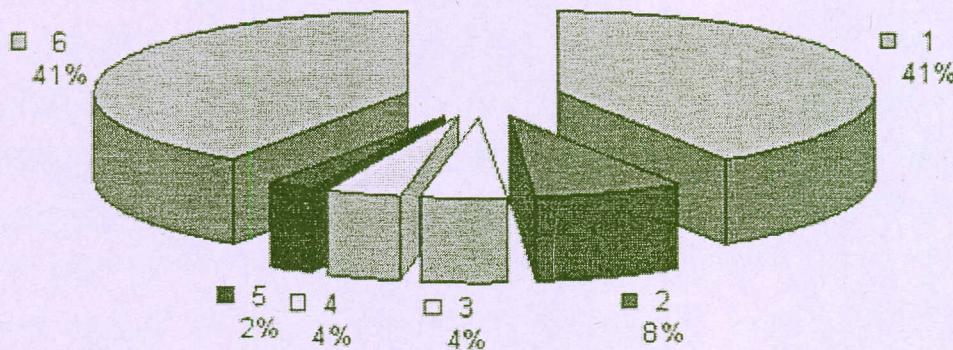


Figura 6. Metodologías utilizadas en el análisis alimentario. PCR (1), biosensores (2), análisis microbiológicos (3), técnicas del ADN recombinante (4), técnicas inmunológicas (6), otras (5).

Por ejemplo, son numerosas las legislaciones europeas que determinan el uso, la elaboración y condiciones de utilización de los diversos aditivos alimentarios, especialmente aquellos que pueden causar efectos mutagénicos, tales como los conservantes, antioxidantes o colorantes. Asimismo, la Unión Europea limita también el contenido de determinados contaminantes en los productos alimentarios, tales como metales pesados, plaguicidas y pesticidas, micotoxinas (aflatoxinas), residuos de antibióticos o residuos de medicamentos (hormonas, antibióticos, beta-agonistas). También para cumplir con lo establecido por la legislación vigente es necesario poder garantizar la ausencia de organismos modificados genéticamente (OMG) en los productos alimenticios o, llegado el caso, cuantificar su presencia y declararla en el etiquetado. En todos estos casos pueden utilizarse biosensores para su determinación rápida. Pero no sólo se debe garantizar la ausencia de OMG, sino que en otras ocasiones puede ser de utilidad la garantía de la identidad de un producto alimentario acorde a su etiquetado, siendo de especial utilidad biosensores para el análisis rápido de la composición de los alimentos o de sus materias primas. Asimismo, pueden encontrar aplicación el análisis de la contaminación con otros productos alimentarios no deseados, o bien, de la contaminación microbiana, en especial de *Candida albicans*, *E. Coli*, o,

como ya se explicara, de *Salmonella*. Otra aplicación consiste en la determinación rápida del frescor de los alimentos, como por ejemplo, de la carne o del pescado, basándose en biosensores capaces de reaccionar con compuestos producidos durante la descomposición de estos alimentos.

Por último, es importante destacar que, como ya se comentara, la principal ventaja del uso de los biosensores en el control de calidad de alimentos respecto a las metodologías analíticas tradicionales, consiste en la rapidez en la respuesta, la elevada especificidad y sensibilidad, así como en la posibilidad de utilizarlos fuera del ambiente del laboratorio *in-line* u *on-line* permitiendo la monitorización de todo un proceso. Una ventaja fundamental de los biosensores es la posibilidad de desarrollar instrumentos miniaturizados capaces de determinar simultáneamente un gran número de analitos. En esta dirección se encuentran principalmente dirigidos los esfuerzos de investigación del Grupo de Sensores y Biosensores de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Referencias bibliográficas relacionadas

- Alegret, S. 1996. Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. *Analyst* 121: 1751-1758.
- Baltimore, D. 2001. Our genome unveiled. *Nature* 409: 814-816.
- Bowtell, D. D. L. 1999. Options available -from start to finish- for obtaining expression data by microarray. *Nature Gen Suppl* 21: 25-32.
- Collins, F.S. 1999. Microarrays and macroconsequences. *Nature Gen Suppl* 21: 2.
- Erdem A., M. I. Pividori, M. Del Valle, and S. Alegret. 2004. Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing. *J. Electroanal. Chem.* 567: 29-37.
- Erdem A., M. I. Pividori, A. Lermo, A. Bonanni, M. Del Valle, and S. Alegret. 2005. Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes. *Sensors & Actuators*, in press.
- Gibert, I., J. Barbé, and J. Casadesús. 1990. Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2555-2560.

- Haukanes, B. I., and C. Kvam. 1993. Application of magnetic beads in bioassays. *Biotechnology* 11: 60-63.
- Lam, S., and J. R. Roth. 1983. IS200. A *Salmonella*-specific insertion sequence. *Cell* 34: 951-960.
- Lander, E. S. 1999. Array of hope. *Nature Gen Supp* 21: 3-4.
- Pividori, M. I., A. Merkoçi, and S. Alegret. 2000. Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosen. Bioelectron.* 15: 291-303.
- Pividori, M. I., A. Merkoçi, and S. Alegret. 2001a. Dot-blot amperometric genosensor for detecting a novel determinant of β -lactamase resistance in *Staphylococcus aureus*. *Analyst* 126: 1551-1557.
- Pividori, M. I., A. Merkoçi, and S. Alegret. 2001b. Classical dot-blot format implemented as an amperometric hybridization genosensor. *Biosen. Bioelectron.* 16: 1133-1142.
- Pividori, M. I. and S. Alegret. 2003. Graphite-Epoxy Platforms for Electrochemical Genosensing. *Anal. Lett.* 36: 1669-1695.
- Pividori, M. I., A. Merkoçi, and S. Alegret. 2003a. Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosen. Bioelectron.* 19: 473-484.
- Pividori, M. I., A. Merkoçi, J. Barbé, and S. Alegret. 2003b. PCR-Genosensor Rapid Test for Detecting *Salmonella*. *Electroanalysis* 15, 1815-1823.
- Pividori, M. I., and S. Alegret. DNA adsorption on carbonaceous materials. In *Immobilization of DNA on Chips*, edited by Wittman. Springer Verlag, in press.
- Southern, E., K. Mir, and M. Shchepinov. 1999. Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics Sup.* 21: 5-9.
- Williams, E., M. I. Pividori, A. Merkoçi, R. J. Forster, and S. Alegret. 2003. Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin carbon polymer biocomposite electrode. *Biosens. Bioelectron.* 19: 165-175.
- Zacco, E., M. I. Pividori, and S. Alegret. 2005. Electrochemical biosensing based on universal affinity biocomposite platforms. *Biosen Bioelectron*, in press.