

Nanobiosensores ópticos

Susana de Marcos, Alba Martín, Jesús Navarro, Isabel Sanz, Javier Galbán

Grupo de Biosensores Analíticos. Química Analítica; Instituto de Nanociencia de Aragón, Universidad de Zaragoza

INTRODUCCIÓN

Hace más de 25 años la IUPAC, en un artículo publicado en su revista *Pure & Applied Chemistry* (IUPAC, 1991), definió un sensor como un dispositivo que transforma información química de una muestra (concentración de uno o varios de sus componentes), en una señal analíticamente útil (transformable en información). Para ello un sensor está constituido por (Figura 1):

A) Una zona receptora cuya función es transformar la información química en una forma de energía o señal primaria. En ella habrá generalmente un reactivo (receptor), inmovilizado sobre un soporte sólido y, si el receptor no es capaz de generar la señal primaria por sí mismo, también un indicador. Si el reactivo es de naturaleza biológica, la IUPAC propone la denominación de biosensor; si es sintético, se suele utilizar el término quimiorreceptor. Hay que puntualizar que, tradicionalmente, el término de biosensor también se aplica a quimiorreceptores que actúan de forma similar a los biorreactivos de afinidad; es decir, que tienen tanto la capacidad de reconocimiento molecular del analito como de interactuar químicamente con él, como es el caso de los *Molecularly Imprinted Polymers* (MIPs), o de los reactivos no naturales pero de origen biológico (aptámeros o anticuerpos plásticos). El receptor es la parte más difícil de diseñar del dispositivo. Por un lado, la selectividad, sensibilidad y precisión del sensor dependen esencialmente de este componente. Por otro, la interacción debe ser capaz de generar una señal primaria, por lo que deben contener también los componentes necesarios para ello.

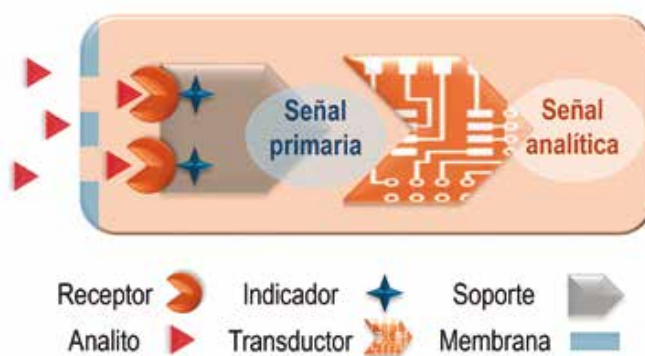
B) Una zona transductora, que transforma la señal primaria en la señal analítica final, generalmente una corriente eléctrica o una diferencia de potencial directa o inversamente proporcional a la concentración de analito. Es la parte más tecnológica o ingenieril del sensor, ya que junto con el transductor propiamente dicho, contiene los componentes necesarios para la transformación y el tratamiento de las señales. Aunque hay diferentes tipos de señales primarias (masa, conductividad, magnéticas...), los transductores más habituales son los electroquímicos y, en particular, los ópticos. En estos últimos el transductor se denomina detector.

C) Una membrana para separar al conjunto del exterior. En el citado artículo de la IUPAC se mencionan algunos aspectos adicionales sobre el concepto de sensor

que clarifican la filosofía, el contexto de utilización y la nomenclatura asociada a estos dispositivos, pero hay dos que son especialmente importantes: 1) que dado el tipo de señal que ofrece, un sensor no se concibe si no es como parte de un analizador (dispositivo que ofrece información química útil de una muestra), y 2) que un sensor puede ser de un solo uso (desechable), aunque si es

capaz de medir repetidas veces y de acuerdo a un plan de muestreo, se habla de un sistema de monitorización. Los requerimientos del sensor en este caso son más difíciles de conseguir, razón por la cual, a día de hoy, hay muy pocos de estos dispositivos a escala comercial.

El progreso de la nanotecnología está permitiendo el desarrollo de nuevas familias de sensores basados en las peculiares propiedades físicas y químicas que tienen >>>



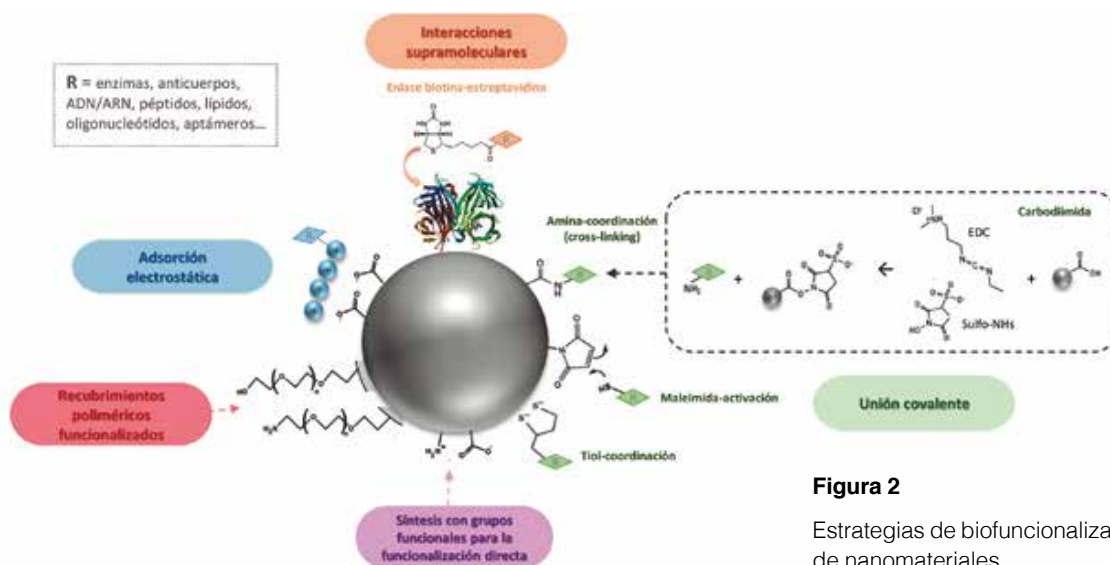


Figura 2
Estrategias de biofuncionalización de nanomateriales.

>>> algunos de estos materiales. Dentro de ellos son de especial interés los que utilizan receptores biológicos y transducción óptica, y que semánticamente responden a la denominación de nanobiosensores ópticos, que son el objeto de este artículo.

¿Qué aportan los nanomateriales a los biosensores ópticos? Los nanomateriales se incorporan generalmente dentro de la “Zona Receptora” por lo que pueden actuar como quimiorreceptores de afinidad, como soporte sólido del biorreceptor o bien como indicador. La capacidad de los nanomateriales de actuar como receptores ha sido puesta de manifiesto en diferentes artículos; sin embargo el fundamento en el que está basada responde a interacciones no covalentes (formación de puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals), por tanto poco selectivas, aunque hay algunos ejemplos de MIP basados en nanopartículas como base de sensores. Como soportes sólidos, los nanomateriales aportan no solo miniaturización, sino también estabilidad (nanopartículas de sílice) e incluso facilidad de manipulación (nanopartículas magnéticas). Pero donde más impacto tiene los nanomateriales es en su capacidad de aportar esquemas indicadores novedosos que, respecto de los colorimétricos y fluorimétricos convencionales, suponen una mejora en sensibilidad, estabilidad y biocompatibilidad, por lo que en un futuro pueden dar lugar a biosensores para la monitorización in vivo de parámetros de interés biomédico y biotecnológico.

UNIÓN DE NANOMATERIALES A BIORECEPTORES

Existe una gran variedad de nanomateriales con propiedades ópticas adecuadas para ser utilizadas como indicadores en biosensores. Previamente, el nanomaterial debe estar unido al receptor de forma estable y garantizando

la sinergia de sus propiedades ópticas con las de reactividad de aquel. En este sentido, la gran relación superficie/volumen de estos materiales frente al de las biomoléculas, garantiza una alta densidad de éste en el nanomaterial, libre, en general, de problemas estéricos.

Las estrategias químicas de unión nanomaterial-receptor más utilizadas (ver esquema en la *figura 2*), pueden resumirse en las siguientes (*Sapsford, 2013*):

- Unión covalente: entre los grupos funcionales de la superficie del nanomaterial y las biomoléculas. Supone ventajas en términos de estabilidad y reproducibilidad de la unión y disminuye la fisorción inespecífica. Pueden formarse enlaces covalentes mediante reacciones clásicas de acoplamiento de amida, reticulación (*cross-linking*) o química-click.
- Unión ligando-ligando a la superficie del núcleo de la nanopartícula. Muchos nanomateriales pueden ser directamente sintetizados con grupos funcionales apropiados para la unión directa al receptor o vía recubrimientos con polímeros funcionalizados que afectan directamente a sus propiedades específicas. Estas estrategias proporcionan alta reproducibilidad en la inmovilización e incluso pueden aumentar la biocompatibilidad de los nanomateriales.
- Adsorción electrostática de biomoléculas cargadas positivamente a nanopartículas cargadas negativamente o viceversa.
- Inmovilización de biomoléculas vía interacciones supramoleculares o coordinativas: sistemas de ligando-receptor basados en afinidad, no covalentes, cuyo

ejemplo más conocido es el enlace biotina/avidina (o estreptavidina), en la que el sistema biomolécula-biotina puede unirse al conjunto biotina-sustrato a través de puentes avidin. La principal ventaja respecto a otros métodos de inmovilización es la reversibilidad, pudiendo romper este enlace y recuperar el nanomaterial y el bioreceptor modificado.

Aunque el número de nanomateriales que se sintetizan es cada vez mayor, los más utilizados como indicadores en biosensores son las nanoparticulas (NPs). Se han desarrollado diversas estrategias indicadoras basadas en NPs, pero las propiedades ópticas más usadas son su fluorescencia o su capacidad para producir efecto de resonancia de plasmón superficial.

BIOSENSORES BASADOS EN NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Cuando se excitan con la longitud de onda adecuada (generalmente UV-visible o IR), las NPs metálicas (en particular de oro o plata, u otras estructuras como nanoshells metálicos) producen intensas bandas de absorción y alta dispersión de la radiación. Estas bandas son debidas al acoplamiento de los electrones de conducción, situados en la superficie del nanomaterial, con la radiación, fenómeno que se conoce como resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) y que se ha utilizado de acuerdo a dos estrategias (Anker, 2008):

1/ Detección directa basada en la medida del espectro de absorción, especialmente en el caso del oro, que presentan mejores prestaciones que los colorantes orgánicos convencionales. Esta propiedad óptica, también se ha aplicado a biosensores visuales (desechables); un ejemplo es la detección de biomoléculas como el ADN, que permite diferenciar dsADN y ssADN.

2/ Medida de las variaciones en longitud de onda y absorbancia observadas en el espectro del plasmón su-

perficial como consecuencia de la agregación de NPs durante el bioensayo.

El LSPR observado en las NPs produce también un efecto de intensificación de bandas de absorción de moléculas localizadas sobre su superficie (*Surface-Enhanced*) que se ha utilizado de varias formas. Así, moléculas orgánicas adsorbidas sobre la superficie de NPs metálicas muestran incrementos de entre 10 y 1000 veces en la intensidad de sus bandas de absorción en el infrarrojo. Este fenómeno conocido como *Surface-enhanced infrared absorption spectroscopy* (SEIRAS) permite, por ejemplo, que al depositar nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos específicos sobre una superficie de SiO₂/Si, se detecte el acoplamiento anticuerpo-antígeno con una mejora de 25 veces respecto a estas superficies carentes de una capa de nanopartículas de oro. Pero donde se producen fenómenos de intensificación superficial más dramáticos (del orden 10⁵ a 10⁶ veces), es en los espectros Raman (*Surface-enhanced Raman scattering*, SERS), que ha llevado al desarrollo de una amplia variedad de esquemas de detección para la medida de ácidos nucleicos, anticuerpos, proteínas y otras moléculas biológicas que pueden ser posteriormente implementados en biosensores.

Finalmente, las NPs metálicas se pueden usar también como aceptores en procesos de transferencia de energía (FRET). Como se sabe, estos procesos están basados en que una especie aceptora con propiedades de absorción adecuadas (en este caso la NPs) produce una disminución de la fluorescencia (*quenching*) de un fluoróforo proporcional a la distancia que hay entre ambos; durante la reacción entre el receptor y el analito esta distancia se modifica y, por tanto, la fluorescencia. La figura 3 muestra dos estrategias indicadoras en los que se utiliza esta cualidad. A) En este caso el *quenching* provocado por la NPs sobre un fluoróforo, ambos dispuestos en una hebra de ssDNA en forma de horquilla (*molecular >>>*

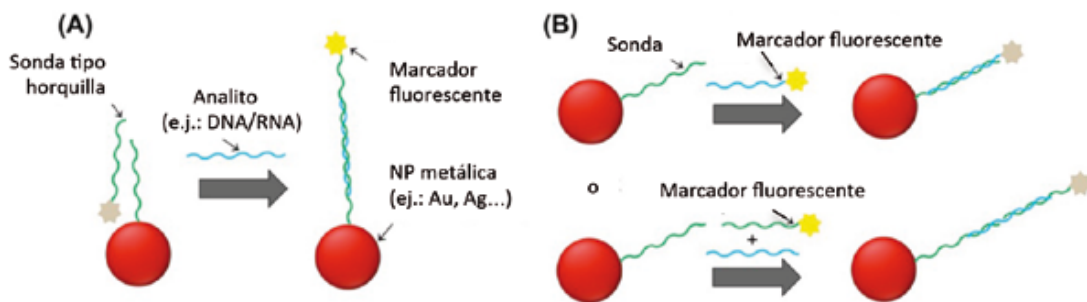


Figura 3

Esquema de detección en el que las NPs actúan como aceptores en procesos FRET (Doria, 2012).

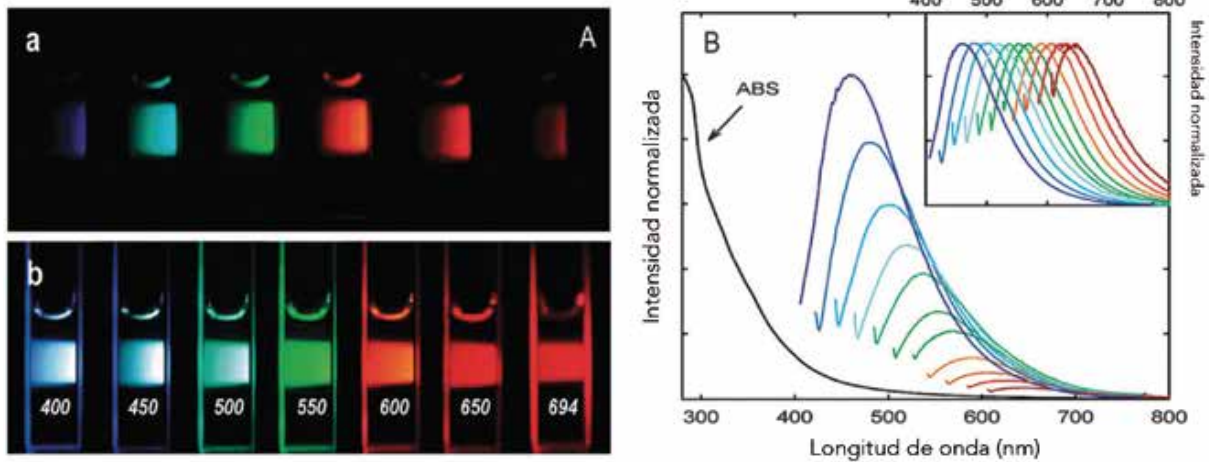


Figura 4

A) Disolución acuosa de CQDs a) excitados a 400nm y b) excitados a la longitud de onda indicada. B) Espectros de absorción y emisión a diferentes longitudes de onda, de CQs en disolución acuosa (interior, espectros de emisión normalizados) (Lim, 2015).

>>> *nanobeacons*), desaparece cuando dicha estructura se deshace en presencia de ADN/ARN complementario. B) La situación inversa se produce cuando la hibridación entre el receptor y el analito provoca un acercamiento entre el fluoróforo y la NPs. Esquemas similares a este se han utilizado con frecuencia para la determinación de proteínas (usando un aptámero como bioreactivo) y muy frecuentemente en inmunoensayos tipo sándwich.

BIOSENSORES BASADOS EN OTROS TIPOS DE NANOPARTICULAS

Hay un amplio grupo de NPs cuyas interesantes propiedades de fluorescencia se emplean en nanobiosensores ópticos.

1/ Nanoclusters metálicos (NCs). Cuando las NPs de algunos materiales como Au o Ag tienen dimensiones menores a los tres nanómetros, sus propiedades ópticas cambian desapareciendo el efecto LSPR y apareciendo propiedades de fluorescencia. La fluorescencia de los NCs aparece generalmente a longitudes de onda superiores a los 500 nm, lo que los hace especialmente atractivos como una nueva clase de fluoróforos biocompatibles. Por una parte, se pueden utilizar para la detección (no selectiva) de distintas moléculas, dado que su interacción directa con la superficie del NC produce modificaciones en sus propiedades fluorescentes. Por otra, la unión de proteínas o péptidos sobre las superficies de estos NCs, producen bioreactivos que pueden detectar productos químicos peligrosos o importante para los sistemas biológicos (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , CN^-) y biomoléculas (biotioles y proteínas) (Chen, 2015).

2/ Puntos cuánticos (Quantum dots, QDs). Son NPs de materiales semiconductores formadas por la combina-

ción de un elemento de los grupos 12-16 con otro de los grupos 14-16 (ZnS, CdS, ...). Estas NPs presentan altos rendimientos cuánticos, alta estabilidad y su longitud de onda de fluorescencia es dependiente de su tamaño. El problema de estos materiales es su toxicidad biológica. En biosensores (Algar, 2010) se suelen utilizar como dadores o aceptores en FRET ((Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia). Ejemplos representativos de los esquemas de trabajo de estos indicadores, son la determinación de cocaína en base a la transferencia de energía (FRET) entre dos unidades de QDs funcionalizadas con dos subunidades de aptámeros, o la determinación de plaguicidas organofosforados basada en los cambios de fluorescencia de QDs unidos a la enzima acetilcolinesterasa, cuya reacción inhibe el analito.

3/ Los nanomateriales de carbono (*Carbon Quantum Dots, CQDs*), presentan una toxicidad más baja que los QDs, aunque sus propiedades ópticas son más complejas, ya que su máximo de fluorescencia depende no solo del tamaño, sino también de la longitud de onda de excitación usada (figura 4), fenómeno todavía no completamente aclarado.

Los biosensores de CQDs (Lim, 2015) se basan en estrategias indicadoras similares a las ya comentadas. Por una parte, en los cambios directos en la fluorescencia del CD durante la reacción; de esta manera se han desarrollado inmunoensayos, biosensores basados en aptámeros (por ejemplo, en la determinación de trombina se consiguen límites de detección extraordinariamente bajos), determinación de proteínas (los CDs se emplean como alternativa a los agentes de tinción convencionales) o inclu-

so detección de moléculas pequeñas, tales como la amoxicilina o dopamina, ácido ascórbico o glucosa. Por otra parte, estos nanomateriales se han utilizado en esquemas indicadores basados en FRET, como es el caso de un inmunosensor para la detección rápida y específica de PBB15 (un contaminante orgánico que perturba el sistema endocrino).

CONCLUSIÓN

La utilización de las propiedades ópticas de los nanomateriales ha abierto nuevas y prometedoras líneas de investigación para el desarrollo de sistemas receptores que pueden ser la base de nanobiosensores ópticos. ■

PARA LEER MÁS

Algar WR, Tavares AJ, Krull UJ. Beyond labels: a review of the applications of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes and biosensors utilizing optical transduction.

Anal. Chim. Acta 673 (2010) 1-25.

Anker JN, Hall WP, Lyandres O, Shahm NC, Zhao J, Van Duyne RP. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat. Mater.* 7 (2008) 442-53.

Chen LY, Wang C, Yuan Z, Chang H. Fluorescent Gold Nanoclusters: Recent Advances in Sensing and Imaging. *Anal. Chem.* 87 (2015) 216-29.

Doria G, Conde J, Veigas B, Giestas L, Almeida C, Assuncao, M, Rosa J, Baptista PV. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. *Sensors* 12 (2012) 1657-87.

IUPAC, Analytical Chemistry Division. Chemical Sensors Definition and Classification. *Pure&Appl.* 63 (1991) 1247-50.

Lim SY, Shen W, Gao Z. Carbon quantum dots and their applications. *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 362-81.

Sapsford KE, Algar WR, Berti L, Gemmill KB, Casey BJ, Oh E, Stewart MH, Medintz IL. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* 113(3) 2013 1904-2074.