Rev. Int. Contam. Ambient. 23 (1) 35-45, 2007

ESTADO DEL ARTE Y PERSPECTIVAS DEL USO DE BIOSENSORES AMBIENTALES EN MÉXICO

Lourdes Patricia CASTRO-ORTÍZ[1], Víctor Manuel LUNA PABELLO[1]* y Rafael VILLALOBOS PIETRINI[2]

[1]Laboratorio de Microbiología Experimental, Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510. México D. F. Correo electrónico; lcastroo@yahoo.com, *lpvictor@servidor.unam.mx
[2]Departamento de Ciencias Ambientales. Centro de Ciencias de la Atmósfera. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510. México D. F.

(Recibido agosto 2006, aceptado febrero 2007)

Palabras clave: biosensor, ciliados, *Colpoda cucullus*, plaguicidas

RESUMEN

Un biosensor ambiental es un sistema analítico que acopla un elemento biológico sensible con un transductor para obtener una rápida, proporcional, precisa y sensible detección de sustancias individuales o combinadas presentes en el ambiente. El objetivo de este trabajo fue conocer el uso actual y las perspectivas de aplicación de los biosensores ambientales en México. Al respecto es importante mencionar que no se localizó en México ningún grupo de investigación asociado al uso de biosensores ambientales. Los cuatro grupos que actualmente investigan biosensores, están orientados hacia las áreas de salud y de detección de compuestos puros, emplean enzimas como elemento biológico y sensores ópticos como sistema de detección. Dos de esos grupos aplican la nanotecnología con el fin de darle estabilidad al elemento biológico y obtener así mejor respuesta de detección. En México, la investigación con biosensores no es catalogada como prioritaria, sin embargo, el deterioro ambiental existente representa una excelente oportunidad para el desarrollo y la aplicación de biosensores ambientales. Por ejemplo, empleando células completas (ciliados edafícolas autóctonos) acopladas a un potenciómetro para detectar contaminantes en suelo (plaguicidas).

Key words: biosensor, ciliates, *Colpoda cucullus*, pesticides

ABSTRACT

An environmental biosensor is an analytical tool that combines a biological sensing element with a transducer to get a rapid, proportional, accurate and sensitive detection of single or mixed substances present in the environment. The aim of this review is to highlight the actual uses and perspectives of environmental biosensors in México. After reviewing the biotech research that it is being carried out for biosensor research, some groups were identified and we found they are focused in human health and detection of analytical compounds. Two of them, use nanotechnology in order to stabilize the biological element and to get the best detection response. In México, the environmental deterioration represents an excellent opportunity to develop and to applicate environmental biosensors. For example, using whole cells (indigenous edafic ciliates) coupled with a potentiometer to detect soil pollutants (pesticides).

INTRODUCCIÓN

Los biodetectores ambientales, de acuerdo con el tipo de técnica empleada, pueden ser clasificados en bioensayos y biosensores. Los bioensayos fueron la primera herramienta biológica en ser aplicada al campo ambiental. Básicamente constituyen procedimientos que emplean diversos materiales vivos para estimar la toxicidad potencial de una sustancia o de una matriz contaminada. Un bioensayo se define genéricamente como un experimento enfocado a investigar el papel de alguna sustancia en un contexto biológico, ecológico o evolutivo empleando organismos o sistemas vivos. Mientras que el término biosensor se aplica a un sistema analítico que acopla un elemento biológico sensible asociado a un sistema de transducción, el cual permite detectar y medir de manera rápida, proporcional, precisa y sensible la señal producida por la interacción del elemento biológico y la sustancia de interés (López y Ortiz 2002, Belkin 2003, Mozaz *et al*. 2004, Editorial 2005, González *et al*. 2005a). En sus inicios se emplearon como organismos de prueba mamíferos, aves y peces, sin embargo, actualmente los procedimientos normalizados dan preferencia al uso de plantas, algas, levaduras y bacterias (Campanella *et al.* 2000, Castillo 2004, Farré *et al.* 2005, González *et al.* 2006). Cabe señalar que el uso de ciliados como organismos de prueba ha sido muy poco explorado.

La fabricación del primer biosensor data de 1956 y fue realizada por el profesor Leland C. Clark (Clark y Lynos 1962). Consistía básicamente de un electrodo de oxígeno empleado para medir el contenido de este elemento en la sangre. Este mismo investigador, en 1962, describió como hacer más "inteligentes" estos sensores electroquímicos mediante el atrapamiento de transductores enzimáticos en su superficie. Dichos electrodos enzimáticos implican la inclusión de la enzima glucosa oxidasa en la superficie del electrodo de oxígeno recubierto con una membrana de diálisis. Posteriormente, Guilbault y Montalvo (1969) detallaron el primer electrodo enzimático potenciométrico basado en la inmovilización de la enzima ureasa sobre un electrodo selectivo de amonio. En 1975, estas ideas se plasmaron en la construcción del primer biosensor comercial susceptible de medir glucosa mediante la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno. De esta manera, utilizar transductores de tipo electroquímico, óptico, piezoeléctrico o térmico junto a la inclusión de enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores celulares e incluso células enteras, ha dado lugar a una gran variedad de configuraciones y alternativas para resolver numerosos problemas analíticos en diversos campos como: salud, industria alimentaria, control ambiental, control de procesos industriales, seguridad y defensa (Tauber *et al.* 2001, López y Ortíz 2002, Natarajan *et al.* 2005). Considerando que la calidad de vida, junto con la del ambiente y la salud, requieren de una rápida medición se justifica el desarrollo y uso de biosensores (Castillo *et al.* 2004). Algunas de las principales sustancias que es posible detectar *in situ*, por medio de dichos sistemas son: metales pesados, bifenilos policlorados, organofosforados, fenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos y plaguicidas (Bontidean *et al.* 2004, Mozaz *et al.* 2005, Liao *et al*. 2006).

Los biosensores han sido desarrollados como métodos analíticos, cuantitativos o semicuantitativos para detectar determinados analitos o compuestos específicos, y más recientemente para la detección de efectos de contaminación por agentes químicos en el ambiente. En los últimos 10 años los biosensores han sido integrados a los programas de control de contaminantes, implementándolos en sistemas de seguridad ambiental en dos formas:

1. Métodos de seguimiento capaces de predecir el posible peligro de efectos biológicos, como toxicidad, genotoxicidad o estrogenicidad de un coctel de contaminantes; pudiendo medir una gran cantidad de contaminantes en cortos lapsos.
2. Métodos de cribado (*screening*) que sirven como alerta de presencia de algún compuesto contaminante. Para la confirmación de los resultados positivos se requiere del uso de métodos convencionales como son cromatografía de gases o espectrofotometría de masas, para la identificación de los compuestos causantes del daño.

De los diferentes tipos de biosensores, los que emplean células completas representan una opción interesante debido a que, a diferencia del empleo de enzimas, posibilitan la detección de gran número de compuestos químicos dentro de intervalos de temperatura y pH mayores. No obstante, debido a su versatilidad puede comprometer la selectividad del compuesto a detectar, lo cual podría ser resuelto mediante el empleo de técnicas moleculares para hacer más específica la detección (Tecon y Van de Meer 2005, Haruyama 2006, Lei *et al*. 2006). El tiempo de vida del elemento biológico dependerá del tratamiento que se le de a éste, pero generalmente su tiempo de vida suele ser corto.

En este contexto, el creciente aumento de sustancias tóxicas en el ambiente ha creado la necesidad de

controlar los niveles de contaminantes prevalecientes tanto en la industria, como en procesos de reciclado, tratamiento de aguas residuales, agricultura y sitios urbanos. Así, el desarrollo y el uso de biosensores ambientales tiene como finalidad hacer más práctico el control de la contaminación ambiental en campo, mediante el uso de sensores portátiles, de respuesta rápida, con suficiente sensibilidad y un aceptable tiempo de vida útil (Brett 2001, Mozaz *et al.* 2005). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la situación actual y perspectivas del uso de biosensores en México, con énfasis en los biosensores ambientales.

Características de un biosensor

Un biosensor se compone de tres elementos, en la **figura 1** se pueden observar los principales componentes que lo conforman. En la **cuadro I**, se presentan las características de un biosensor ideal, a las cuales deben sumarse el ser portátiles, sencillos de manejar, automáticos y susceptibles de ser usados como dispositivos remotos (Alcalá 2002, Farré *et al*. 2005). Cabe señalar que, si bien es deseable que no ocurra la inmediata pérdida estructural del elemento biológico, es posible que dicha pérdida constituya precisamente la señal a detectar.

Los elementos biológicos de reconocimiento (biorreconocimiento) pueden dividirse en dos: 1) biocatalíticos, los que comprenden enzimas aisladas, microorganismos, células completas o tejidos, que

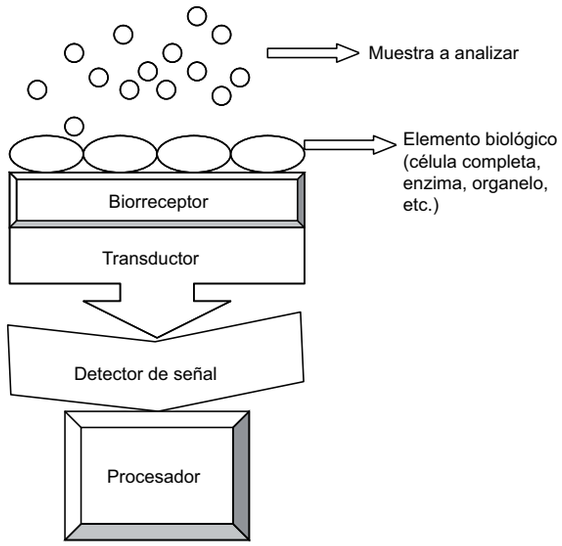

Fig. 1. Esquema que muestra los principales componentes que conforman un biosensor

al llevar a cabo reacciones de catálisis con el analito generan un producto detectable y medible, dando origen a los denominados biosensores catalíticos. 2) bioligandos, tales como anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos y lectinas, los cuales se caracterizan por tener una reacción de afinidad con el analito, conformando los biosensores de afinidad (Gooding 2006). En cuanto a los sistemas de transducción, se encuentran principalmente los de tipo electroquímico, óptico, piezoeléctrico y térmico (Castillo *et al.* 2004).

CUADRO I. CARACTERÍSTICAS SOBRESALIENTES QUE DEBEN PRESENTAR LOS BIOSENSORES

Característica	Descripción
Sensibilidad	Alta para ciertos analitos como los xenobióticos con efectos sobre la salud, incluso a concentraciones de partes por billón (µg/L).
Selectividad	Alta, para que el dispositivo interaccione exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros. Mediante elementos de reconocimiento específicos.
Confiabilidad	Alta, los sistemas de transducción se diseñan de manera que no puedan ser alterados (o lo sean mínimamente) por la muestra.
Tiempo de vida	Largo, que no obligue al empleo del dispositivo por cortos períodos desde su fabricación ni a sustituciones frecuentes del mismo. Lo que depende de su estabilidad química, física y mecánica.
Bajo costo de producción, operación y mantenimiento	En general, pueden fabricarse a escala industrial, lo cual redundaría en un abaratamiento de los costos de producción. Asimismo, sus costos de operación y mantenimiento deberán ser bajos.
No pretratamiento de la muestra	Ahorrando tiempo materiales y reactivos. Aunque, en ciertas determinaciones son imprescindibles las etapas de concentración y purificación, eliminando interferencias para asegurar la presencia de una cantidad suficiente del analito.
Tiempo de análisis	Capaces de medir en tiempo real o muy corto, posibilitando una actuación rápida, controlando parámetros importantes de manera inmediata y automática.

En los **cuadros II** y **III**, se presenta una clasificación de biosensores de acuerdo con los criterios de tipo de interacción, forma de detección, elemento de biorreconocimiento y sistema transductor (Rumayor *et al*. 2005).

CUADRO II. CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES SEGÚN SU TIPO DE INTERACCIÓN

Tipo de interacción	Forma de detección de la interacción
Biocatalítica	Directa
Bioafinidad	Indirecta

Tipos de biosensores

De acuerdo con el **cuadro III**, es posible llevar a cabo la conformación de diversos tipos de biosensores. Entre los más relevantes se encuentran los siguientes:

Biosensores conductimétricos: son sistemas que emplean dos pares de pequeños electrodos de conductividad en configuración plana. Entre uno de los pares se coloca una membrana, la cual contiene una enzima que ha sido inmovilizada, mientras que en el segundo par de electrodos se coloca una membrana blanco (carente de enzima). El aparato mide la conductividad, a través de cada par de electrodos con una frecuencia fija. En presencia del sustrato enzimático es posible registrar cambios de conductividad en la vecindad de la membrana que contiene a la enzima, lo cual dependerá de la concentración del sustrato. Midiendo la diferencia de respuesta entre ambos pares de electrodos se puede compensar la conductividad propia de la muestra biológica, usando para ello el electrodo blanco como referencia.

Biosensores redox: la clave en la construcción de biosensores redox es facilitar la transferencia de los electrones generados por una enzima óxido-reductasa (o un sistema enzimático) a la superficie de un electrodo. Se ha demostrado que intermediarios naturales como los citocromos, promueven el paso de los electrones. El tiempo de respuesta de estos biosensores puede ser del orden de segundos cuando está presente ferroceno o sus derivados. Con el desarrollo de semiconductores orgánicos más eficientes (usualmente por técnicas de "doping"), es posible obtener una asociación todavía más íntima entre la enzima empleada y la superficie del electrodo, lo cual hace factible la miniaturización de este tipo de biosensores.

Biosensores optoelectrónicos: el desarrollo inicial de los mismos se atribuye a Lowe en el año de 1980 (Gimeno y Hueta 1997). Son biosensores basados en principios ópticos que cuentan con un componente biológico inmovilizado, por ejemplo, una enzima ligada a un cromóforo, el cual a su vez está ligado a una membrana. Un cambio de pH, originado por una reacción enzimática, cambia el color del complejo cromóforo/membrana. El sistema transductor consiste en un diodo electroluminiscente, con una longitud de onda correspondiente al pico de absorción del cromóforo y un fotodiodo acoplado. Al ser la cámara de flujo extremadamente estable, permite generar una señal aceptable (Gimeno y Hueta 1997).

De manera particular, el desarrollo de un biosensor ambiental, basado en el uso de anticuerpos específicos, con sistema de transducción electroquímica, e interacción biocatalítica con detección indirecta, permitiría la detección y cuantificación de contaminantes descargados al ambiente. Por ejemplo, en España, se desarrolló a finales de la década de los noventa, un inmunosensor conformado con anticuerpos del 4-nitrofenol que puede detectar

CUADRO III. CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE ACUERDO AL ELEMENTO DE RECONOCIMIENTO

Elemento de biorreconocimiento	Sistema transductor
Enzima	Electroquímico: potencial redox, conductimétricos, amperométricos, etc.
Orgánulo, tejido o célula completa	Óptico: optoelectrónicos
Receptor biológico	Piezoeléctrico: cambios de frecuencia sobre una superficie cristalina, generalmente cuarzos.
Anticuerpo	Termométrico: detección de calor
Ácidos nucleicos PIM, PNA, aptámero	Nanomecánico: cambio en la tensión superficial de una placa de silicio sumergida en un líquido, lo que ocasiona un cambio en la deflexión y/o frecuencia de resonancia.

específicamente este contaminante, además de otros cinco similares, a un nivel de sensibilidad de hasta 0.1 microgramos/L de fenoles, siendo de 0.5 microgramos/L la concentración máxima permitida en el agua potable. Es importante señalar que los fenoles son compuestos contaminantes persistentes, que provienen fundamentalmente de los residuos generados por la industria química, cuya descarga en ríos y lagos se encuentra fuertemente regulada a nivel mundial debido a los efectos negativos que pueden ejercer sobre los organismos acuáticos (http://www.dicat.csic.es/fenolesp.html).

Importancia y usos de los biosensores ambientales

En general, los biosensores han adquirido gran importancia, principalmente en los aspectos médico y alimenticio, así como en lo referente al control de la contaminación ambiental. En el área de la salud y de la medicina, actualmente es posible encontrar analizadores de glucosa que sólo requieren unas cuantas gotas de muestra para obtener el resultado del contenido de glucosa en enfermos diabéticos. Los sensores inmunológicos también son usados en medicina para detectar gonadotropina, hormona empleada en el diagnóstico de embarazo. En la guerra química y bacteriológica han sido utilizadas para la identificación del agente agresor. Asimismo, han sido usados para la búsqueda de vida en Marte (Canh 1993). En lo referente a la agricultura y alimentación es posible la aplicación de biosensores para la detección de contaminantes tóxicos o de microorganismos patógenos (http://www.monografias.com/trabajos7/biul/biul.shtml#uso; Fernández 2003 http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2003/12/02/9675.php, García 2003, Gooding 2006).

En cuanto a la industria agroalimentaria, el uso de los biosensores se orienta hacia las áreas de seguridad, calidad alimentaría y control de procesos industriales (Rumayor *et al.* 2005), así como en el seguimiento de los diferentes estados de la producción y del control de calidad del producto final. Además de la vigilancia de aditivos alimenticios, contaminantes y presencia de posibles toxinas (Canh 1993, González *et al.* 2005a). También se han realizado avances en lo referente a la detección de sustancias prohibidas tales como los narcóticos, lo que facilita su localización (http://www.tavad.com/blog/index.php/2006/03/06/detector-cocaina-portatil). Cabe señalar que las nuevas aplicaciones clínicas tendientes al uso de biosensores, son el análisis rápido, directo y con poca cantidad de muestra para detección de enfermedades como hepatitis B, virus, SIDA, entre otros. (http://www.exploralaciencia.profes.net/ver_noticia.aspx?id=5738; Baeumner 2003).

En lo referente a biosensores ambientales, una de sus principales aplicaciones es la detección de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), el cual es un parámetro de gran importancia en el campo del tratamiento de aguas residuales. Con la tecnología convencional, esta prueba requiere de alrededor de cinco días; mientras que con el uso de biosensores los resultados se obtienen en 20 minutos. De igual forma, es posible usar biosensores ambientales conectados a sistemas de alarma, que alerten, de manera inmediata, el exceso de contaminantes emitidos por una determinada fábrica, permitiendo la toma rápida de decisiones correctivas (http://www.buenasalud.com/index.cfm). Existen otras aplicaciones potenciales como son determinar en suelos y aguas la presencia de contaminantes orgánicos, compuestos orgánicos persistentes (plaguicidas, bifenilos policlorados, hidrocarburos policíclicos aromáticos, entre otros), metales pesados, compuestos genotóxicos y disruptores endocrinos (Cambiaso *et al.* 1996*,* Dawson *et al.* 2005, Anh *et al.* 2006, Norman *et al.* 2006).

A nivel internacional los diferentes grupos de trabajo que existen, en Asia y Europa, han usado biosensores de células completas (bacterias, microalgas e incluso ciliados) como elementos biológicos de un biosensor (Campbell *et al.* 1997, Costa *et al.* 2002, Gutiérrez *et al.* 2003, Sørensen *et al.* 2006).

Con relación a los costos los biosensores, por sí mismos, no son caros ya que se han logrado integrar al mercado, principalmente los relacionados con el aspecto médico, lo realmente caro es la investigación para su desarrollo así como su mejoramiento (miniaturización, producción en masa, mercado amplio, etc.); ya que esto implica la participación multidisciplinaria de científicos (bioquímicos, biólogos, microbiólogos, inmunólogos, médicos, químicos, entre otros). Adicionalmente, se requiere de componentes específicos no siempre disponibles en empresas electrónicas, lo que puede ser una limitante para el uso de los biosensores a gran escala.

Actualmente, los biosensores usados de manera rutinaria son los relacionados con la salud. Los más empleados son los conocidos como medidores de glucosa los cuales, al ser dispositivos portátiles, permiten a las personas diabéticas llevarlos consigo para realizar medición rutinaria de glucosa. En México, muchos de estos son producidos por CAP MENS (Centro de Articulación Productiva de Sistemas Micro Electromecánicos (MEMS) (http://www.capmems.org.mx/pag_cap.htm). Otra empresa que comercializa biosensores médicos, en el mercado

nacional, es Johnson and Johnson con un dispositivo llamado OneTouch® (http://www.jnj.com/home.htm), cuyo precio oscila entre $800.00 y $1,500.00 (ochocientos a mil quinientos pesos mexicanos). Un gran número de biosensores ambientales y biomédicos se encuentran en proceso de ser patentados (http://www.uniovi.es/vicinves/unidades/gruposInv/DptoQuimicaFisica/Inmunoelectroanalisis/patents.htm), así como en investigación y desarrollo, por lo que de momento no es factible conseguir un precio de mercado (De la Rosa 2007). Otros biosensores empleados para la detección de diferentes analitos se presentan en el **cuadro lV** (http://www.alimenatatec.com).

Biosensores en México

En México, la investigación relacionada con la fabricación y el uso de biosensores data de 1983, año en que se reporta el uso de un electrodo microbiano para la determinación de la DBO en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Galindo y Quintero 1983, Zamora *et al.* 1998). En fechas posteriores, se llevó a cabo la formación de algunos grupos de científicos que laboran en el laboratorio de Materiales Avanzados en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), el cual es un centro público de investigación del CONACyT con sede en Saltillo, Coahuila. Actualmente, las investigaciones de este grupo de trabajo están enfocadas hacia el desarrollo y la fabricación de biosensores ópticos mediante la nanoorganización de moléculas conjugadas [poli(feniletinilenos)] en nanopelículas. Se pretende que el sistema conjugado presente propiedades ópticas de absorción o fluorescencia, que además posea un grupo receptor muy específico y selectivo para el reconocimiento de ciertas biomoléculas, virus o bacterias (http://investigadores.ciqa.mx/JorgeRomero/). De igual forma, se están desarrollando investigaciones tendientes a la construcción de biosensores ópticos que permitan una identificación rápida, simple y selectiva de enfermedades de propagación vertiginosa tales como SIDA y hepatitis, entre otras (http://investigadores.ciqa.mx/EduardoArias/index.asp?Func=2&tcon=5&seccion=investigadores.ciqa.mx/EduardoArias/index.asp).

En el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM, desde 1991, se trabaja con biosensores enzimáticos, los que detectan analitos específicos utilizados en el área de la química analítica y ambiental. La investigación realizada se basa en el empleo de contaminantes específicos o precursores de estos últimos. Para llevar a cabo estos trabajos, inmovilizan la enzima sobre la membrana de un electrodo. La investigación que desarrollan es en colaboración con la Universidad de Córdoba, España (Hernández y Gómez 2006). Asimismo, en la Facultad de Ingeniería han trabajado, desde 2004, en la fabricación de elementos electrónicos y mecánicos enfocados a la construcción de un "chip", con dimensiones menores a un milímetro cuadrado, que sea útil para productos inteligentes (biomedicina) destinados a resolver los problemas de salud (Boletín UNAM-DGCS-777, Ciudad Universitaria 2004).

CUADRO IV. BIOSENSORES UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DE DIFERENTE TIPO DE ANALITO

Analito	Biosensor
Aditivos alimentarios	Generalmente se emplean biosensores enzimáticos.
Fármacos para tratamiento de enfermedades en animales	Biosensores de afinidad, principalmente, combinados con transductores ópticos.
Residuos de plaguicidas y fertilizantes	Biosensores enzimáticos (fertilizantes y plaguicidas) Transductores amperométricos y ópticos (herbicidas).
Otros contaminantes	Inmunosensores, biosensores enzimáticos y biosensores de célula completa. Biosensores que incorporan microorganismos modificados genéticamente y enzimas (metales pesados). En ambos casos el sistema de transducción es electroquímico u óptico.
Biotoxinas	Biosensores basados en reacciones de bioafinidad, mediante síntesis de anticuerpos específicos.
Microorganismos patógenos	Principalmente biosensores de tipo inmunológico, combinados con transductores piezoeléctricos, ópticos, bioluminiscentes o de impedancia.
Calidad de alimentos (etanol, glucosa, almidón, colesterol, ácido fólico)	Biosensores amperométricos, electroquímicos.

En el Instituto Politécnico Nacional, el CINVESTAV realiza investigación con biosensores desde 1993 en la sección de biotecnología del departamento de Ingeniería Eléctrica en colaboración con el Centro Nacional de Microelectrónica de la Universidad de España (Leija 2006, http://www.ceiich.unam.mx/Interdisciplina/leija.html).

Perspectivas del uso de biosensores ambientales en México

El futuro de los biosensores tiende al uso de la nanotecnología por medio de nanotubos o nanofibras, principalmente de carbono, para la inmovilización de los materiales biológicos (enzimas, ADN, células completas, etc.) con lo cual se pretende brindarles mayor y mejor estabilidad, incrementando así su sensibilidad (Trojanowicz 2005, Carrascosa *et al.* 2006, Qi *et al.* 2006). Asimismo, con el objeto de conformar biosensores portátiles se está recurriendo al uso de la bioingeniería, microelectrónica y nanotecnología para su miniaturización.

El impulso que proporciona la aplicación de biosensores para aspectos de salud humana puede ser aprovechado para el uso de los biosensores ambientales, ya que a pesar de ser importantes, no igualan el interés existente en el área de la medicina humana. Desde el punto de vista ambiental, los biosensores están siendo desarrollados para lograr que sean capaces de responder bajo situaciones extremas como elevada acidez, alcalinidad, temperatura extrema y la presencia de disolventes orgánicos (Lei *et al.* 2006). Otra de las tendencias futuras es el uso de la ingeniería genética para insertar en una célula plásmidos o genes específicos que permitan la expresión de una señal cuantificable, como por ejemplo, los genes lux de algunas bacterias que emiten fotoluminiscencia al entrar en contacto con ciertos compuestos, lo que permitiría determinar el nivel de toxicidad de los mismos (Rothert *et al.* 2005).

Como un biosensor depende básicamente de la sensibilidad, la selectividad y las propiedades del elemento de biorreconocimiento, un aspecto crucial en el futuro de los biosensores es desarrollar mejores elementos de reconocimiento. A este respecto, la biotecnología y la ingeniería genética ofrecen la posibilidad de adaptar moléculas específicas con propiedades predefinidas (Mozaz *et al.* 2005). Toda la investigación sobre estos nuevos sistemas tiende a la industrialización y a la producción en masa de los dispositivos, lo que conllevaría a que estos sean de bajo costo, facilitando que se encuentren disponibles en el mercado (Prieto 2000 http://www.imm.cnm.csic.es/castell/memoria2000/l7.pdf).

Aunado a lo anterior, los futuros avances en el desarrollo de biosensores requerirán, aún más, de científicos de diferentes disciplinas que reúnan sus esfuerzos en la investigación, promoviendo la tecnología para la detección directa de contaminantes ambientales, confiriéndoles la flexibilidad necesaria para desarrollar métodos en el campo analítico. Otra tendencia se enfoca hacia el desarrollo de unidades integrales capaces de hacer mediciones multianalito que finalmente llevarían a la validación y estandarización de estudios con muestras ambientales complejas (Marco y Barceló 1996). Para lograr esto, es posible utilizar biosensores de célula completa, ya que cuentan con toda un batería de enzimas, usándose desde bacterias, hasta células de eucariotas (Belkin 2003, Bjerketorp *et al.* 2006). En este sentido y a pesar de haber poca investigación sobre el uso de ciliados como elemento biológico de reconocimiento, su uso representa una excelente posibilidad. Lo anterior debido a que cada organismo constituye una célula completa, teniendo como ventajas la posibilidad de medir la biodisponibilidad de diversos componentes. Para obtener la información generada por las células completas, es posible medir los cambios que presenten, por ejemplo, cambio de pH, consumo de O_2, producción de CO_2, potencial redox o generación de algún producto metabólico en particular (Bousse 1996, Bentley *et al.* 2001). Adicionalmente, proporcionaría información cualitativa y cuantitativa de forma directa y los resultados obtenidos se aproximarían, más que los actualmente obtenidos con bacterias, a los posibles daños toxicológicos que sufriría el ser humano (Bousse 1996, Akyilmaz *et al*. 2006).

Por otra parte, en un futuro cercano se tendrán que enfrentar las diversas desventajas que representará el perfeccionamiento en el uso de los biosensores, tales como el manejo de las condiciones apropiadas para el mantenimiento y el desarrollo de las células empleadas como elemento biológico del biosensor (Rogers 2006). Un problema adicional lo representan ciertos compuestos que ocasionan bloqueo de los sistemas de señales debido a que pueden desencadenar la liberación de toxinas paralizantes. Esto último, puede ser también un factor importante de analizar ya que estos receptores pueden tener afinidad por compuestos relacionados estructuralmente, lo cual resulta relevante por abrir la posibilidad de efectuar la detección multianalito. En contraparte, la especificidad de la respuesta empleando células completas es otra variable de suma importancia, cuya solución podría ser abordada mediante el empleo de técnicas de biología molecular que brinden al organismo la

capacidad de responder, de manera específica, a un determinado tipo y concentración de contaminante.

Una posible alternativa de biosensor ambiental es el uso de ciliados como elemento biológico de reconocimiento. Al respecto, existen reportes indicando el uso del ciliado *Tetrahymena pyriformis* como biosensor de célula completa para la medición de descargas tóxicas y para calcular la contaminación en hábitats acuáticos (Bamforth 1997, Díaz *et al.* 2006, Esteban *et al.* 2006). En el caso de biosensores para evaluación de suelos contaminados, no se ha propuesto el uso de ciliados, sino el de bacterias. De manera particular, el uso de ciliados como *Colpoda steinii* y *Colpoda inflata*, se ha limitado a bioensayos toxicológicos, como sería el caso de metales pesados presentes en suelos (Campbell *et al.* 1997, Pratt *et al.* 1997, Foissner 1999, Bamforth 2001, Costa *et al.* 2002, Gutiérrez *et al.* 2003, Lee *et al.* 2004, González *et al.* 2005b, Madoni y Romeo 2006). En México, una opción de biosensor ambiental interesante de desarrollar, para la detección de plaguicidas presentes en suelos, sería el basado en *Colpoda cucullus* (**Fig. 2**). Cabe señalar que esta especie de ciliado edafícola, ya ha sido propuesta como bioindicadora de suelos contaminados con inhibidores de hidratación de arcillas que se emplean en la formulación de fluidos de perforación de pozos petroleros (Castro-Ortíz 2004), lo cual es un punto favorable para su empleo, como elemento biológico, de un biosensor para suelos contaminados. Entre las ventajas que presenta *C. cucullus,* se encuentra su capacidad para reproducirse asexualmente, formando quistes que originan 4 individuos, permitiendo contar con una gran población en poco tiempo. Lo anterior facilita su manejo y almacenamiento debido a que puede ser conservado de manera inactiva por amplios periodos y reactivado en pocos minutos. Desde el punto de vista funcional, en su forma trófica, cada ejemplar cuenta con una delicada membrana externa, lo que le confiere la posibilidad de responder de manera inmediata a los cambios ambientales y, en consecuencia, a la presencia de los contaminantes a evaluar.

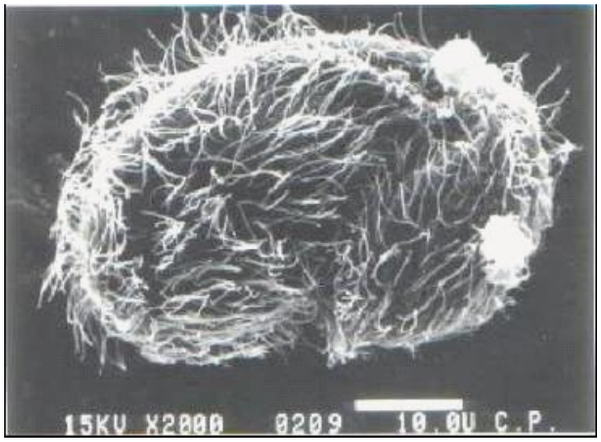

Fig. 2. Micrografía electrónica de barrido de *Colpoda cucullus* extraído de suelo del municipio de Cunduacán, Tabasco

Para la conformación de un biosensor ambiental con *C. cucullus* como elemento biológico, es posible emplear un procedimiento de flujo cerrado (**Fig. 3**). En este caso en particular, es necesario el uso de detectores electroquímicos, tales como potenciómetros que midan pH o potencial redox de la muestra líquida en la que se encuentre el elemento biológico que a la vez sea la receptora de la sustancia de prueba. La respuesta a detectar sería la procedente ya sea de la célula completa (generación de metabolitos), o bien la pérdida de la estructura de la misma (lisis celular), pudiendo ser detectado mediante un cambio de pH o potencial redox, que serían registrandos en la propia pantalla de lectura del equipo. El biosensor ambiental propuesto contempla el uso de un electrodo de referencia que permita indicar únicamente el valor de la lectura del medio, mientras que un segundo electrodo proporcionaría la lectura correspondiente al cambio ocasionado por la respuesta del elemento biológico al interaccionar con el contaminante.

Otra opción a considerar es la inmovilización de la célula para la conformación del biosensor ambiental, lo que permitirá obtener resultados detectables tanto de manera electroquímica como óptica.

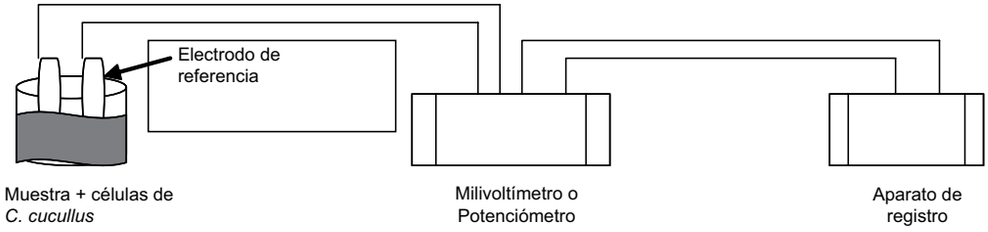

Fig. 3. Posible conformación de un biosensor utilizando un método de flujo cerrado

CONCLUSIONES

En México, el desarrollo y uso de biosensores ambientales es escaso. Tomando en cuenta que una de las características más importantes de este tipo de sistemas analíticos es su capacidad para detectar, de manera rápida, niveles bajos de contaminantes, sería factible realizar la prevención oportuna de posibles daños al ambiente. Lo anterior, aunado a la creciente importancia que el cuidado ambiental ha tomado a nivel mundial, permite prever que en el mediano plazo, a nivel nacional, ocurrirá un auge importante en torno a la investigación y aplicación de este tipo de herramienta. En este contexto, el nuevo reto, en cuanto a investigación se refiere, será mejorar la conformación de biosensores ambientales que puedan ser fabricados en masa a costos accesibles. Para ello, se considera que el uso de la nanotecnología y la biotecnología será crucial.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos del proyecto PAPIME, Clave PE205706 "Desarrollo de prácticas avanzadas para al enseñanza de la Microbiología Ambiental" y del PAIP 6190-14 (VMLP) del año 2006 otorgado por la Facultad de Química de la UNAM. Se agradece al CONACyT la beca otorgada a Lourdes Patricia Castro Ortiz, para la realización de sus estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas. Asimismo, se hace un amplio reconocimiento al Dr. Jorge L. V. Flores Hernández de la BUAP, por el apoyo académico brindado durante la estancia académica en el laboratorio Neuromodelación, bajo su responsabilidad.

REFERENCIAS

Alcalá M.P.L. (2002). Ingeniería de anticuerpos aplicada al desarrollo y aplicación de biosensores enzimáticos. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Barcelona, 100 p.

Akyilmaz E., Yaşa I. y Dinçkaya E. (2006). Whole cell immobilized amperometric biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* for selective determination of vitamin B1 (thiamine). Anal. Biochem. 354, 78-84.

Anh T.M., Dzyadevych S.V., Prieur N., Duc C.N., Pham T.D., Renault N.J. y Chovelon J.M. (2006). Detection of toxic compounds in real water samples using a conductometric tyrosinase biosensor. Mat. Sci. Eng-Bios S. 26, 453-456.

Baeumner J.A. (2003). Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. Anal. Bioanal. Chem. 377, 434-445.

Bamforth S.S. (1997). Evolutionary implications of soil protozoan succession. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 47, 93-97.

Bamforth S.S. (2001). Proportions of active ciliates in soil. Biol. Fert. Soils. 33, 197–203.

Belkin S. (2003). Microbial whole–cell sensing systems of environmental pollutants. Curr. Opin. Microbiol. 6, 206-212.

Bentley A., Atkinson A., Jezek J. y Rawson D.D. (2001). Whole cell biosensors– electrochemical and optical approaches to ecotoxicity testing. Toxicol. Vitro 15, 469-475.

Bjerketorp J., Håkansson S., Belkin S. y Jansson K.J. (2006). Advances in preservation methods: keeping biosensor microorganisms alive active. Curr. Opin. Biotech. 17, 7-7.

Brett C.M.A. (2001). Electrochemical sensors for environmental monitoring. Strategy and examples. Pure Appl. Chem. 73, 1969-1977.

Bontidean I., Mortar A., Leth S., Brown L.N., Karlson U., Larsen M.M., Vangronsveld J., Corbisier P. y Csöregi E. (2004). Biosensors for detection of mercury in contaminated soils. Environ. Pollut. 131, 255-262.

Bousse L. (1996). Whole cell biosensors. Sensor Actuat. B- Chem. 34, 270-275.

Cambiaso A., Chiarugi S., Grattarola M., Lorenzelli L., Lui A., Margesin B., Martinoina S., Zanini V. y Zen M. (1996). An H^+ - FET–based systems for on –line detection of microorganisms in waters. Sensor. Actuat. B- Chem. 34, 245-251.

Campbell D.C., Warren A., Cameron M.C. y Hope J.S. (1997). Direct toxicity assessment of two soils amended with sewage sludge contaminated with heavy metals using a protozoan (*Colpoda steinii*) bioassay. Chemosphere 34, 501-514.

Campanella L., Cubadda F., Sammartino M.P. y Saoncella A. (2000). An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. Water Res. 35, 69-76.

Canh M.T. (1993). *Biosensors*. Chapman y Hall. Nueva York, 187 p.

Carrascosa L. G., Moreno M., Álvarez M. y Lechuga L. M. (2006). Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. Trend. Anal. Chem. 25, 196-206.

Castillo J., Gáspar S., Leth S., Niculescu M., Gortari A., Bontidean I., Soukharev V., Dorneanu S.A., Ryabov A.D. y Csöregi E. (2004). Biosensors for life quality design, development and applications. Sensor Actuat. B-Chem. 102, 179-194.

Castillo M.G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos*

de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México, 188 p.

Castro-Ortíz L. P. (2004). Evaluación de la toxicidad de lixiviados de recortes de perforación sobre el ciliado edafícola *Colpoda cucullus*. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM, 90 p.

Clark L.C. y Lynos C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann. NY Acd. Sci. 102, 29-45

Costa M., Gutiérrez J.C., Hernando J., Hernando I., Martín A. y Moreno M. (2002). Indicadores edáficos, vegetales y microbianos (ciliados colpódidos) de procesos de desertificación. Anal. Biol. 24, 175-183.

Dawson J.J.C., Campbell C.D., Towers W., Cameron C.M. y Paton G.I. (2005). Linking biosensor responses to Cd, Cu and Zn partitioning in soils. Environ. Pollut. 142, 493-500.

De la Rosa H. 2007. Comunicación Personal. Centro de Articulación Productiva de Sistemas Micro Electromecánicos (MEMS). México D. F.

Díaz S., Martín-González A. y Gutiérrez J.C. (2006). Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa. Environ. Int. 32, 711-717.

Editorial (2005). Biosensors technologies. Methods 37, 1-3.

Esteban F.G., Clarke J.K., Olmo L.J. y Finlay B.J. (2006). Soil protozoa-An intensive study of population dynamics and community structure in an upland grassland. Appl. Soil Ecol. 33, 137-151.

Farré M., Brix R. y Barceló D. (2005). Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years. Trend. Anal. Chem. 24, 532-544.

Fernández, M. (2003). En: http://www.consumaseguridad.com/web/.- (consultada 04/04/2006).

Foissner W. (1999). Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. Agr. Ecosyst. Environ**.** 74, 95-112.

García P.N. (2003). Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa. Aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bioenzimáticos y multienzimáticos. Tesis doctorado, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de C. Químicas.

Galindo E. y Quintero R. (1983). Electrodo microbiano para la determinación de la DBO. En: *Biotecnología de enzimas* (C. Huitron, Ed.), UNAM, pp. 365-368.

Gimeno G.V.M. y Hueta O. (1997). Biosensores de última generación. En: http.www.monografias.com. (Consultada el 10/03/2006).

González M.A., Díaz S., Borniquel S., Gallego A. y Gutiérrez J.C. (2006). Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. Res. Microbiol. 157, 108-118.

González R.V., García I.E., Ruiz G.O. y Gago C.L. (2005a). Aplicación de biosensores en la industria agroalimentaria. Informe de vigilancia tecnológica. Madrid, 110 p.

González M., Miglioranza K.S.B., Aizpún de Moreno J.E. y Moreno J.V. (2005b). Evaluation of conventionally and organically produced vegetables for high lipophilic organochlorine pesticide (OCP) residues. Food. Chem. Toxicol. 43, 261-269.

Gooding J.J. (2006). Biosensors technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. Anal. Chim. Acta 559, 137-151.

Guilbault G.G. y Montalvo J. (1969). Urea specific enzyme electrode. J. Am. Chem. Soc. 91, 2164-2569.

Gutiérrez J.C., González M. A., Díaz S. y Ortega R. (2003). Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/ biosensors for heavy metal pollution. Eur. J. Protistol. 39, 461-467.

Hernández G.L. y Gómez R.H. (2006). Comunicación personal. Facultad de Química, UNAM

Haruyama T. (2006). Cellular biosensing: chemical and genetic approaches. Anal. Chim. Acta 568, 211-216.

Lee S., Basu S., Tyler W.C. y Wei W.I. (2004). Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant. Adv. Environ. Res**.** 8, 371-378.

Lei Y., Chen W. y Mulchandani A. (2006). Microbial biosensors. Anal. Chim. Act**.** 568, 200-210.

Leija S. (2006) http://www.ceiich.unam.mx/Interdisciplina/leija.html (Consultada 22/06/2006).

Liao H.V., Chien M., Tseng M. y Ou K. (2006). Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein – based bacterial biosensors. Environ. Pollut. 142, 17-23.

López G.M.A. y Ortiz de Apodaca, F.O. (2002). Inmunosensores: herramientas analíticas con un gran potencial de futuro. Schironia 1, 51-59

Madoni P. y Romeo G.M. (2006). Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protests. Environ. Pollut. 141, 1-7.

Marco M.P. y Barceló D. (1996). Environmental applications of analytical biosensors. Meas. Sci. Techol. 1547-1562.

Mozaz R.S., Marco M.P., López de Alda J.M. y Barceló, D. (2004). Biosensors for environmental applications: future development trends. Pure Appli. Chem. 76, 723-752.

Mozaz R.S., López de Alda J.M., Marco M.P. y Barceló D. (2005). Biosensors for environmental monitoring: a global perspective. Talanta 65, 291-297.

Natarajan A., Molnar P., Sieverdes K., Jamshidi A. y Hickman J.J. (2005). Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high through put method to evaluate pesticide toxicity. Toxicol. Vitro 20, 375-381.

Norman A., Hansen H.L. y Sørensen J.S. (2006). A flow cytometry-optimized assay using an SOS–green fluorescent protein (SOS–GFP) whole-cell biosensor for the detection of genotoxins in complex environments. Mutat. Res**.** 603, 164-172.

Pratt J.R., Mochan D. y Xu Z. (1997). Rapid toxicity estimation using soil ciliates: sensitivity and bioavailability. Bull. Environ. Cont. Toxicol. 58, 387-393.

Prieto F., Sepúlveda, B., Llobera, A. (2000). Desarrollo de microsensores interferométricos con tecnología de silicio para aplicaciones biológicas. En: http://www.imm.cnm.csic.es/castell/memoria2000/l7.pdf . (Consultada 02/03/2006).

Qi H., Zhang C. y Li X. (2006). Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor incorporating multiwall carbon nanotubes and hemoglobin. Sensor Actuat. B-Chem. 114, 364-370.

Rogers K. R. (2006). Recent advances in biosensors techniques for environmental monitoring. Anal. Chim. Acta 568, 222-231.

Rothert A., Deo S.K., Millner L., Puckett L.G., Madou M.J. y Daunert S. (2005). Whole-cell-reporter-gene-based biosensing systems on a compact disk microfluidics platform. Anal. Biochem**.** 342, 11-19.

Rumayor G.V., García I.E., Ruiz G.O. y Gago C.L. (2005). Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica. Madrid, 104 p.

Sørensen J.S., Burmølle M. y Hansen L.H. (2006). Making bio-sense of toxicity: new developments in whole – cell biosensors. Curr. Opin. Microbiol. 17, 1-6.

Tauber M., Rosen R. y Belkin S. (2001). Whole-cell biodetection of halogenated organic acids. Talanta 55, 959-964.

Tecon R. y Van de Meer R.J. (2005). Information from single-cell bacterial biosensors: what is it good for? Curr. Opin. Biotech. 16, 1-7.

Trojanowicz M. (2005). Analytical applications of carbon nanotubes: a review. Trends Anal. Chem. 20, 1-10.

Zamora M.E., García L.J., Méndez I., Aguilar-Aguila A., Ramírez O. T., Galindo E. (1998). Sistema computarizado para la medición rápida y automatizada de la DBO en plantas de lodos activados mediante un biosensor microbiano. Bio. Tecnol. 3, 107-116.

Páginas de Internet:

http://www.alimentatec.com. Portal de Tecnologías y Mercados del Sector Alimentario. (Consultada 13/02/2007).

http://bine.org.mx/?q=node/999. UNAM-DGCS-777 Ciudad Universitaria (Consultada 10/03/06).

http://www.buenasalud.com/index.cfm (Consultada 20/03/2006)

http://www.capmems.org.mx/pag_cap.htm. Centro de Articulación Productiva en MicroSistemas (MEMS). Fundación México-Estados Unidos para la Ciencia (Consultada 19/12/06).

http://www.exploralaciencia.profes.net/ver_noticia.aspx?id=5738 (Consultada 15/03/2006).

http://www.dicat.csic.es/fenolesp.html. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Cataluña (Consultada 19/19/06).

http://www.genciencia.com/2006/03/14-cocaina-detectar-la-facilment.php (Consultada 11/05/06).

http://investigadores.ciqa.mx/JorgeRomero/index.asp?Func=2&tcon=5&seccion=investigadores.ciqa.mx/JorgeRomero/index.asp (Consultada 04/03/06).

http://investigadores.ciqa.mx/EduardoArias/index.asp?Func=2&tcon=5&seccion=investigadores.ciqa.mx/EduardoArias/index.asp. (Consultada 04/04/06).

http://www.jnj.com/home.htm. Johnson and Johnson Medical de México S. A. de C. V. (Consultada 19/12/06).

http://www.monografias.com/trabajos7/biul/biul.shtml Biosensores de última generación. (Consultada 20/03/2006). http://www.tavad.com/blog/index.php/2006/03/06/detector-cocaina-portatil-en-tiempo-real/. (Consultada 04/04/2006).

http://www.uniovi.es/vicinves/unidades/gruposInv/DptoQuimicaFisica/Inmunoelectroanalisis/patents.htm. Universidad de Oviedo. (Consultada 15/02/2007).