



BIOSENSORES ÓPTICOS PARA EL MONITOREO DE FOSFATO

OPTICAL BIOSENSORS FOR PHOSPHATE MONITORING

Ing. Daphne Ojeda Rodríguez*

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Universidad Autónoma de Querétaro

Dr. Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

Universidad Politécnica de Sinaloa

*dojeda14@alumnos.uaq.mx

Resumen

El fósforo es uno de los elementos más importantes para el desarrollo de la vida en la Tierra, siendo vital para plantas, animales y seres humanos. Sin él, los procesos básicos para el desarrollo de la vida, como la fotosíntesis y el aprovechamiento de energía, serían imposibles. Es por esto que su monitoreo en diversas áreas, por ejemplo, en la agricultura y la medicina, es de suma importancia para conocer sus niveles y poder actuar asertivamente. El siguiente artículo presenta a los biosensores como una alternativa interesante para la cuantificación de fosfato teniendo en cuenta su bajo costo y alta selectividad al analito de interés, así como una recopilación de trabajos previos que han desarrollado biosensores a través de diferentes técnicas de reconocimiento y transductores.

Palabras clave: biosensor, fosfato, transductor, bacteria, agricultura

Abstract

Phosphorus is one of the most important elements for the development of life on Earth, being vital for plants, animals and humans. Without it, the basic processes for the development of life, such as photosynthesis and energy use, would be impossible. This is why its monitoring in various areas, for example, in agriculture and

medicine, is of utmost importance to know its levels and be able to act assertively. The following article presents biosensors as an interesting alternative for phosphate quantification due to their low cost and high selectivity to the analyte of interest, as well as a compilation of previous works that have developed biosensors through different recognition techniques and transducers.

Keywords: biosensor, phosphate, transducer, bacteria, agriculture

Introducción

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) realizó un estimado que dice que para el año 2030, la población mundial alcanzará los 9000 millones de habitantes, lo que requerirá nuevas estrategias para mantener el ritmo de la producción de alimentos y poder satisfacer la demanda alimenticia. Lo anterior incluye a la industria agrícola (Organización de las Naciones Unidas, 2022), por lo tanto, se emplean diversas prácticas para asegurar cierto nivel de calidad y de productividad en los cultivos, tales como los fertilizantes, que son utilizados con el objetivo de complementar a los cultivos de los nutrientes que necesitan para alcanzar su óptimo crecimiento y desarrollo (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2002).

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

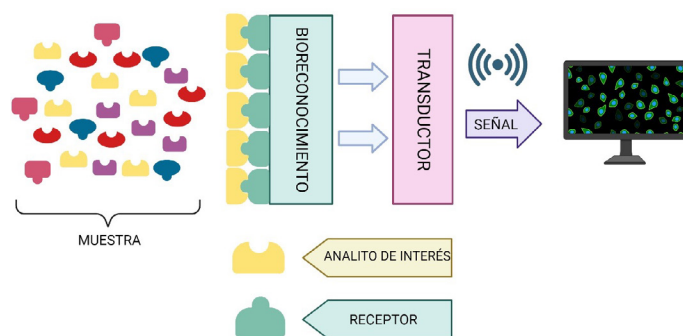
Para diseñar un esquema adecuado para la fertilización de los cultivos se necesitan análisis químicos que usualmente se obtienen a través de pruebas de laboratorio que son complejos e intensos, además de costosos y toman mucho tiempo. El monitoreo continuo de los diferentes parámetros del suelo y de la información química de los cultivos que demanda la agricultura hoy en día no pueden ser atendidos de manera rápida con las técnicas de monitoreo tradicionales [Mapare *et al.*, 2013]. A pesar de que actualmente existen varios métodos de análisis para cuantificar macronutrientes como fósforo, nitrógeno o potasio en los cultivos, estos presentan diversas desventajas [Wieczorek *et al.*, 2022].

Algunos ejemplos de técnicas son las espectrofotométricas y las espectrométricas como la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), espectroscopia de absorción atómica electrotermica (ETAAS), la espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) y la espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES). Todos estos métodos tienen en común que la precisión del análisis dependerá de la efectividad de la destrucción total de la muestra vegetal, lo cual compromete la sensibilidad de los mismos. Otra desventaja es el largo tiempo que toma la descomposición de la muestra y lo peligroso que es hacer este tipo de preparaciones para el analista debido al uso de ácidos concentrados a altas temperaturas [Mapare *et al.*, 2013; Wieczorek *et al.*, 2022].

Por otra parte, un biosensor es un sistema analítico que es utilizado para la detección de cierto analito de interés, por lo que puede asociarse a una alternativa a los métodos tradicionales antes mencionados. Este sistema está conformado por un elemento biológico de reconocimiento y un transductor de señal para obtener una señal medible que es proporcional a la concentración del analito de interés [Dai & Choi, 2013]. Adicional a esto, también es necesaria una herramienta de análisis de datos y de visualización. La tecnología de los biosensores tiene una amplia gama de aplicaciones como la agricultura, estudios ambientales, diagnóstico de enfermedades e inspección y seguridad de los alimentos por mencionar

algunas [Singh *et al.*, 2023]. En la Figura 1 se presenta la composición de un biosensor.

Figura 1
Componentes de un biosensor [Bonetto *et al.*, 2018].



El esquema sugiere que los biosensores son una herramienta competitiva y más atractiva en contra de los métodos convencionales de medición gracias a su alta sensibilidad y especificidad [Singh *et al.*, 2023]. Esto indica que la interacción durante la medición únicamente ocurrirá con el analito de interés, además, el corto tiempo de reacción permite tener una cuantificación rápida y la facilidad de trabajar en tiempo real. Sin embargo, los biosensores actuales aún necesitan el desarrollo de métodos para la detección de la respuesta que sean igual de específicos que los equipos de laboratorio y cumplan con la ventaja de la sensibilidad, puesto que actualmente varían entre el 70% y el 80%, además, deben satisfacer la demanda de portabilidad [Hicks *et al.*, 2020].

Métodos

La búsqueda bibliográfica se realizó en plataformas científicas como Google Académico, ScienceDirect, MDPI, PubMed Springer. Se utilizaron como palabras clave “biosensores”, “biosensores bacterianos”, “agricultura”, “fosfato”, “aplicaciones”, “*E. coli*”. Se consideraron artículos científicos y reviews que pertenecieran a revistas indexadas, así como también artículos de divulgación. Primero se presenta información acerca de las técnicas actuales para la cuantificación de fosfato en los cultivos, en seguida se exponen los tipos de biosensores,

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

su clasificación y características. Finalmente se recopilan ejemplos de diferentes biosensores ópticos y se señalan sus ventajas y desventajas.

Clasificación de biosensores

Existen principalmente dos tipos de biosensores, los catalíticos y los de afinidad [Borisov & Wolfbeis, 2008]. Asimismo, existen biosensores microbianos o celulares [Dai & Choi, 2013]. En la Tabla 1 se muestra una clasificación de biosensores según su característica principal.

Tabla 1
Clasificación de biosensores por su mecanismo de acción

Tipo de Biosensor	Característica	Cita
Catalítico	Uso de biocomponentes que reconocen especies bioquímicas y las transforman a través de una reacción química en un producto.	[Borisov & Wolfbeis, 2008]
Afinidad	Uso de un elemento de reconocimiento biológico para que el analito de interés se una a él.	[Borisov & Wolfbeis, 2008]
Microbiano	Uso de microorganismos como sistema para cuantificar los analitos de interés, a causa de las enzimas que están en las células y que producen una respuesta de manera específica y selectiva a la presencia de estos analitos.	[Dai & Choi, 2013].

La clasificación de los biosensores es amplia y no se limita a los tres tipos antes mencionados, también los podemos clasificar por su transductor o elemento biológico de reconocimiento [Tetyana *et al.*, 2021].

Transductores

Como se mencionó anteriormente, los biosensores necesitan de un transductor que pueda obtener una señal medible proporcionada por la parte biológica del mismo. Las señales electroquímicas, ópticas, térmicas y de masas se pueden utilizar como esos factores medibles asociados al analito de interés presente en las muestras de análisis [Faridbod *et al.*, 2014]. Dicho esto, dependiendo del tipo de señal, los transductores se dividen en electroquímicos, ópticos, térmicos y piezoeléctricos [Bhardwaj, 2015].

Existen diferentes tipos de transductores ópticos dentro de la tecnología de biosensores para producir los cambios necesarios en diferentes propiedades ópticas cuantificables como lo puede ser adsorción, luminiscencia, fluorescencia o índice de refracción. Los más estudiados son los biosensores fluorescentes, bioluminiscentes y los colorimétricos en vista de sus diversas ventajas como su selectividad, sensibilidad y flexibilidad [D'Souza, 2001; Lei *et al.*, 2006].

Los transductores electroquímicos reciben señales eléctricas al momento que hay una reacción entre la biomolécula y el analito de interés, lo que produce un cambio químico sobre el piso de electrodos [Bhardwaj, 2015]. En el caso de los transductores térmicos, estos detectan cambios en la temperatura, debido a que se basan en la absorción o producción de calor. Esto quiere decir que se produce una señal analítica causada por los cambios de temperatura que ocurren en el medio en que se da la reacción. Se componen de termistores (sensores de temperatura) y enzimas inmovilizadas. Una vez que ocurre la unión entre el analito y la enzima, el sensor térmico mide la interacción obtenida de la reacción de calor y esta es calibrada por la concentración del analito, lo que finalmente se traduce como que el total de calor producido o absorbido en la reacción es proporcional a la entalpía y el número total de moléculas en la reacción [Faridbod *et al.*, 2014].

Los transductores piezoeléctricos son capaces de detectar el cambio en la masa por la interacción que ocurre

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

entre el analito y la biomolécula de detección, y funcionan a través de cristales que pasan una deformación eléctrica después de la aplicación de un potencial eléctrico. Los potenciales alternos se encargan de producir ondas estacionarias en el cristal en una frecuencia característica, el cual debe estar recubierto con un elemento biológico de reconocimiento para que la unión del analito y el receptor cause un cambio en la frecuencia de resonancia y de esta manera producir una señal analítica (Faridbod *et al.*, 2014).

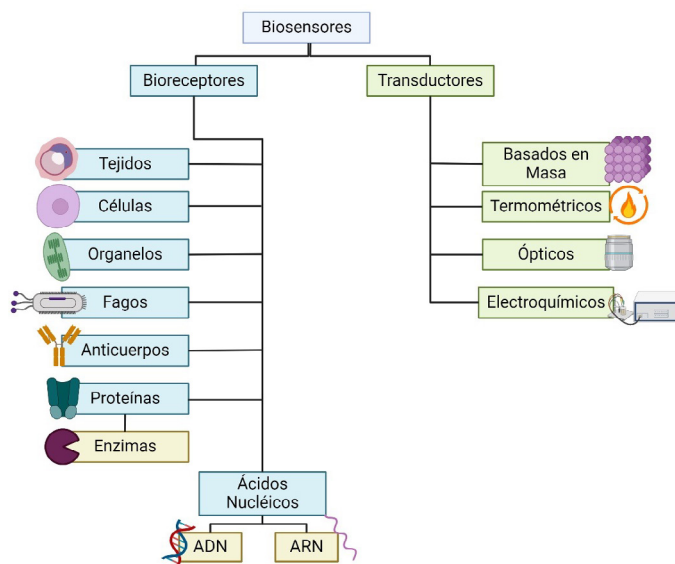
Elemento Biológico de Reconocimiento

Este componente es de suma importancia para el desarrollo de los biosensores, debido a que es este el que será responsable de la detección de tanto la presencia como de la concentración del analito que se busca analizar. Es resultado a este receptor bioquímico que se da el reconocimiento a algún analito en específico, ya que de la interacción entre ambos se genera una señal, que puede ser pH, calor, luz, carga o cambio de masa. Este elemento biológico de reconocimiento debe ser altamente específico, pues se busca que sea capaz de detectar el analito objetivo, por lo tanto, se le atribuye la capacidad del biosensor de ser altamente sensible y selectivo (Bhalla *et al.*, 2016).

Los biosensores enzimáticos son muy útiles para la detección veloz de cambios en niveles de metabolitos en tiempo real. Incluso, el primer biosensor del mundo fue uno de este tipo: creado en 1967 por Updike y Hicks, quienes desarrollaron un electrodo funcional capaz de llevar a cabo la detección de niveles de glucosa (Updike & Hicks, 1967). En su mayoría, este tipo de biosensores son utilizados para la detección de urea y glucosa; por lo que su desarrollo es de mayor interés por su gran importancia comercial para los campos clínicos y médicos. Tienen la ventaja de ser reutilizables y de uso prolongado, debido a que las enzimas como elemento biológico de reconocimiento no pueden ser consumidas, aunque esto también depende de la estabilidad de la enzima (Tetyana *et al.*, 2021).

Dentro de esta clasificación se encuentran los biosensores que utilizan al ADN como elemento biológico de reconocimiento, es decir, se utiliza a los ácidos nucleicos como los receptores que detectan tanto proteínas como compuestos no macromoleculares que interaccionan con fragmentos del ADN llamados cebadores de ADN. La interacción se origina a partir de la creación de enlaces de hidrógeno estables entre las cadenas de ácido nucleico que conforman la doble hélice. La fuerte correlación de las cadenas de nucleótidos alineadas en las regiones complementarias de las bases tiene un impacto significativo en la sensibilidad de los biosensores que se basan en ADN, ARN y ácidos peptídicos-nucleotídicos, convirtiéndolos en la herramienta más sensible (Tetyana *et al.*, 2021). En la Figura 2 se muestra la clasificación de biosensores según su elemento biológico de reconocimiento (bioreceptor y transductor).

Figura 2
Clasificación de biosensores según receptores y transductores (Vaidya & Annapure, 2019)



Métodos de inmovilización de elementos biológicos de reconocimiento

Una vez establecidas las definiciones de elemento biológico de reconocimiento y transductor, es importante

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

hablar acerca de la inmovilización de los elementos biológicos, paso igualmente relevante que no puede faltar en el desarrollo del biosensor para su correcto funcionamiento. La inmovilización hace referencia a la unión del elemento biológico a la superficie del transductor, ya sea atrapando al elemento completo o que haya una interacción entre ambos. Es de especial cuidado la elección del método de inmovilización, debido a que puede inactivarse el elemento biológico de reconocimiento si se elige un procedimiento que sea inapropiado. Existen principalmente dos técnicas de inmovilización, la química y la física (Naresh & Lee, 2021).

Cuando se habla de una inmovilización física se refiere a la unión entre enzimas y la superficie del transductor sin la creación de enlaces químicos de por medio, se clasifican en adsorción y atrapamiento. En el primero pueden intervenir fuerzas de Van Der Waals, enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno y fuerza electrostática. En cuanto al atrapamiento físico, se necesitan matrices 3D que capturen físicamente a los elementos de bioreconocimiento a través de enlaces covalentes y no covalentes. Estas matrices pueden estar hechas de materiales orgánicos (alginato, gelatina, celulosa, fotopolímero, poliacrilamida, etc.) o inorgánicos (carbón activado o materiales porosos de cerámica). Este proceso se puede realizar de dos maneras, donde la enzima se mezcla con una solución de monómeros, luego la polimerización de dicha solución se lleva a cabo mediante una reacción química o a través de la modificación de las condiciones experimentales (Naresh & Lee, 2021; Sassolas *et al.*, 2012).

En cambio, cuando se trata de una inmovilización química se habla de que sí existe la formación de enlaces químicos fuertes entre los grupos funcionales presentes en el elemento de bioreconocimiento (que no son esenciales para su actividad catalítica) y la superficie del transductor. Estos enlaces químicos pueden ser enlaces covalentes o de entrecruzamiento (Naresh & Lee, 2021). Cuando se lleva a cabo una inmovilización mediante un enlace covalente se habla de una unión sólida entre la superficie del transductor a una matriz inerte de membrana (que está fijada directamente al transductor) y al elemento de

reconocimiento. Cuando hay una membrana de por medio se requieren dos etapas, la síntesis del polímero funcional y posteriormente, la inmovilización covalente. La unión del elemento biológico de reconocimiento a la membrana se lleva a cabo, en la mayoría de los casos, a través de la activación inicial de la superficie utilizando reactivos multifuncionales. Después del acoplamiento del elemento de reconocimiento a la membrana ya activada se procede a la eliminación del exceso y de biomoléculas libres (Sassolas *et al.*, 2012).

En cuanto a la inmovilización por entrecruzamiento, esta se produce a través de la creación de enlaces covalentes intermoleculares cruzados entre los elementos biológicos de reconocimiento o entre los elementos de reconocimiento y proteínas funcionalmente inertes. Al igual que en el método anterior, se utilizan reactivos multifuncionales que tienen la función de actuar como un conector entre las moléculas del elemento de reconocimiento y la superficie del transductor (Martinkova *et al.*, 2017).

Características importantes de un biosensor

Tabla 2
Características de un biosensor
(Morales & Halpern, 2018)

Selectividad	Sensibilidad	Reproducibilidad
Es la capacidad que tiene un biosensor de emitir una respuesta positiva relacionada únicamente a la interacción con el analito objetivo.	Es la relación que hay entre el cambio en la concentración del analito de interés y la intensidad de la señal que es transmitida. También se puede referir a las concentraciones mínimas y máximas del analito de interés que el biosensor puede medir con precisión.	La capacidad de elaborar múltiples biosensores iguales que sean capaces de generar la misma respuesta ante un analito de interés.

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

Biosensores para cuantificar fosfatos

El campo de la medicina no se queda atrás en el desarrollo de nuevas alternativas más selectivas y rápidas para detectar ciertos analitos de interés con el uso de biosensores. Se realizó un biosensor enzimático basado en fibra óptica para la cuantificación estimada de fosfato inorgánico en muestras complejas de orina. El biosensor funciona gracias al efecto de inhibición causado por el fosfato inorgánico en la actividad de la fosfatasa ácida, esta enzima es responsable de transformar el p-nitrofenilfosfato en un compuesto coloreado llamado p-nitrofenol, que se puede detectar ópticamente a una longitud de onda de 405 nm. La presencia del fosfato inorgánico en la muestra suprime esta reacción, y la magnitud de la inhibición se relaciona con la concentración de fosfato inorgánico presente en la muestra de orina. En el caso específico de este biosensor, tiene vida de anaquel de más de 80 días y tiene un tiempo de respuesta de 20 minutos [Kulkarni & Karve, 2020]. Las ventajas de este biosensor, por ejemplo, es su rápido tiempo de respuesta y su vida de anaquel, también emplea el uso de una biopelícula para la contención e inmovilización de la enzima (fosfatasa ácida), lo que permitía lograr este tiempo tan largo de anaquel. Lo más importante a recalcar es que se logró una buena selectividad, ya que no hubo interferencia de otros componentes presentes en las muestras de orina, como la urea, ácido úrico, ácido oxálico, glucosa o cloro presente en el cloruro de sodio. Una posible desventaja de este biosensor es que es de suma importancia el control del pH para su correcto funcionamiento, el cual debe de encontrarse a 5.5.

Brune *et al.* (1994), desarrollaron un biosensor fluorescente a través de una proteína de fijación a fosfato (PBP) y *Escherichia coli*. También se utilizó un injerto químico de un colorante emisor de azul, 7-dietilamino-3-[[[2-maleimidil]etil]amino]carbonil]cumarina (MDCC-PBP). La proteína marcada posee un máximo de excitación λ a 425 nm y un máximo de emisión λ a 474 nm en ausencia de fósforo inorgánico (Pi), cambiando a 464 nm con un aumento de 5.2 veces en la fluorescencia [X_{max}/X_{max}] cuando forma complejo con Pi a pH 7,

baja fuerza iónica. Este biosensor fue capaz de medir rápidamente concentraciones micromolares de fosfato inorgánico, con el objetivo de seguir la liberación de Pi en tiempo real de enzimas tales como las fosfatasas [Brune *et al.*, 1994]. En el caso de este biosensor hay que tomar en cuenta que fue de los primeros, por lo que su funcionamiento podría no ser tan efectivo como uno desarrollado actualmente, por ejemplo, se reportó que el colorante azul utilizado (MDCC-PBP) tenía una actividad de entre el 70% al 80%, posiblemente debido a una contaminación del fósforo inorgánico utilizado o a algún reordenamiento del marcador adjunto que evita la unión de este. La ventaja fue que dio la pauta para continuar con el desarrollo de biosensores bacterianos fluorescentes para la detección de fosfato inorgánico.

En el año 2002, se diseñó un biosensor basado en fluorescencia para la detección de endotoxinas y bacterias gramnegativas a través de la mutagénesis dirigida al sitio de la proteína verde mejorada (EGFP) expresado en *E. coli*. La fluorescencia fue evaluada en un espectrofluorímetro a un máximo de excitación λ a 488 nm y hubo respuesta a un máximo de emisión λ a 508 [Goh *et al.*, 2002]. La familia de proteínas que han funcionado a la fecha como base para la construcción de biosensores de fosfatos son las proteínas bacterianas de unión periplásmica (bPBP), que son componentes receptores de los sistemas de transporte ABC [Lamarche *et al.*, 2008]. Una de las ventajas de este arreglo genético fue que la expresión utilizó las propiedades ventajosas de EGFP: fluorescente, altamente soluble y de baja toxicidad. Además, no requiere modificaciones postraduccionales. El tiempo de respuesta de este biosensor fue de 10 minutos, logrando una afinidad alta que fue mantenida ante un amplio rango de pH y fuerza iónica, sin embargo, una desventaja de este es que es necesaria la purificación de los lipopolisacáridos de los lisados de *E. coli* para que funcione correctamente y que su monitoreo se lleva a cabo en el laboratorio, lo que implica que la portabilidad está comprometida [Goh *et al.*, 2002].

Se ha utilizado, igualmente, una cepa termófila de *Synechococcus* para crear un sensor genético PiBP

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

(Proteína de unión específica de fosfato inorgánico). Se realizó a través de una mutagénesis con dirección al sitio para generar bacterias recombinantes con afinidad a una amplia gama de concentraciones de fosfatos. Estas bacterias recombinantes que expresan FLIPi (proteína indicadora fluorescente para fosfato inorgánico) permiten la visualización directa de la actividad de fosfatos inorgánicos en cortes de órganos u organismos completos. Los espectros de emisión se obtuvieron utilizando un lector de microplacas monocromador con una excitación λ de 433/12 nm y una emisión λ 485/12 y 528/12 nm. A pesar de que esta alternativa de biosensor permite la obtención de mediciones dinámicas, tiene la desventaja de que se logra una sensibilidad insuficiente para estudios de células individuales. Las concentraciones de Pi se pueden rastrear en grandes compartimentos, como la vacuola de la planta, pero los organelos como el retículo endoplásmico, los peroxisomas, los plastidios y las mitocondrias tienen pocas concentraciones de Pi, lo que causa que la señal sea indistinguible del ruido de fondo, también el hecho de que se acerque al valor del pH del citosol, causa interferencia. No obstante, la ventaja fue que la mutagénesis dirigida al sitio produjo una familia de sensores Pi con señal mejorada y las afinidades de Pi varían en casi ocho órdenes de magnitud (Gu *et al.*, 2006). Otro aspecto a resaltar de este biosensor es que su desarrollo es complejo y carece de portabilidad debido a que su monitoreo debe realizarse en el laboratorio y que su sensibilidad depende de muchos factores.

En otro ejemplo de un biosensor donde se utilizó *E. coli* se injertaron dos mutaciones de cisteína y fueron marcadas con 6-yodoacetamidotetrametilrodamina para incrementar la fluorescencia hasta 18 veces más de lo habitual, lo cual presenta una ventaja, esto bajo el fundamento de que dos rodaminas unidas a una sola proteína monomérica pueden responder a un cambio de conformación por un cambio en la interacción de apilamiento. Esto, a su vez, resulta en un gran cambio de fluorescencia en respuesta al cambio de conformación impulsado por el Pi; el espectro de absorbancia de la rodamina-PBP purificada mostró un cambio en la unión de Pi con el pico

a 554 nm y aumenta aproximadamente 2,5 veces en la saturación con Pi. Hay una disminución simultánea en el pico de 515 nm. Los espectros de fluorescencia también muestran un gran cambio sobre la unión de Pi a 578 nm emisión λ_{max} (Okoh *et al.*, 2006). La complejidad de este biosensor hace que carezca de portabilidad y que sea de difícil aplicación para el campo agrícola porque la temperatura de la reacción debe de ser controlada a 10 °C.

En ocasiones los biosensores no se diseñan desde cero, sino que se también se han utilizado otros modelos como base para después rediseñarlos y de esta manera mejorar sus características. Un ejemplo de este caso es la modificación de un biosensor para la detección de fosfato inorgánico utilizando la proteína de unión a fosfato PstS de *E. coli*, donde se hicieron cambios para permitir obtener mediciones a concentraciones más altas de fosfato (es común que los biosensores detecten concentraciones micro o nano molares de este) y a su vez a concentraciones más bajas del mismo biosensor, esto con la finalidad de que su uso sea económico al necesitar menor cantidad para cuantificar mayores concentraciones de fosfatos; esto se logró a través del debilitamiento de la unión a fosfato utilizado en el “biosensor base”. Las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofotómetro a una excitación λ de 548 nm y una emisión λ de 570 nm (Solscheid *et al.*, 2015). La ventaja que tiene este biosensor es que fue altamente específico, puesto que no hubo interferencia por otros componentes, como el sulfato. Además de económico puesto que se necesitan cantidades subestequiométricas de Pi para su funcionamiento, sin embargo, su desarrollo es complicado y carece de portabilidad ya que sus mediciones se realizaron dentro de un laboratorio.

Otro ejemplo de un método sensible y versátil para detectar y medir el nivel de fosfato inorgánico en concentraciones que van desde subnanomolar a micromolar en volúmenes de muestra de hasta 10 μ L, combina las ventajas de un receptor biológico basado en una proteína bacteriana que se une al fosfato con el principio de termoforesis, lo que quiere decir que se ve implicado el movimiento de partículas en respuesta a un gradiente

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

de temperatura. Se registraron los cambios en el flujo de difusión neto del sensor de Pi, impulsados por la entropía, en un gradiente de temperatura en intervalos de tiempo definidos, además, se demostró su utilidad al analizar reacciones enzimáticas estacionarias relacionadas con la liberación de Pi en tiempo real (Franz *et al.*, 2020). Se alcanzó una alta sensibilidad y selectividad para el Pi, la capacidad de separar la señal de lectura de posibles interferencias químicas y espectroscópicas, la utilización de volúmenes de muestra mínimos lo hace más económico y permite un análisis de datos sencillo.

La tecnología de biosensores como herramienta de monitoreo para detección de fosfatos es amplia y no se limita a la superficie terrestre. Ha habido interés de monitorear la presencia de fósforo en el agua como resultado al fenómeno de eutrofización que es cuando el exceso de estos elementos (fosfatos, sulfatos etc.) en el agua favorece la sobrepoblación de plantas acuáticas y por ende limita recursos para la fauna que ahí se encuentra. Es por esto que se llevó a cabo el desarrollo de un biosensor basado en transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia, pues permite una alta sensibilidad y selectividad para detectar fósforo inorgánico en el agua. Para este caso se utilizó una proteína fluorescente diferente a la antes mencionada, de nombre NanoLuc y Venus. La primera aportaba la bioluminiscencia y la última como aceptor de energía dando como resultado límites de detección de 3.3 a 434 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo en agua (Yu *et al.*, 2023).

Conclusiones y perspectivas

Como se ha mencionado anteriormente en los diferentes ejemplos de biosensores ópticos, aún existen muchas áreas de oportunidad, las cuales deben ser atendidas antes de convertirse en herramientas de uso cotidiano en las diferentes áreas de aplicación. De lo más importante a tratar se destacan los métodos complicados que se llevan a cabo para la elaboración de estos (Goh *et al.*, 2002, Okoh *et al.*, 2006 y Gu *et al.*, 2006), ya que deben pasar por diversos tratamientos previos para eliminar ruido que interfiera con la selectividad del biosensor. Hablando

de selectividad, la mayoría menciona que sus biosensores alcanzaron una alta selectividad, sin embargo, comúnmente no se destaca esta variable de manera cuantitativa, sería de gran ayuda si esta se expresara de manera clara dentro de los artículos, no solo de manera cualitativa al referenciar una “alta selectividad”. Ahora, en cuanto a la sensibilidad, van desde concentraciones más altas, como lo son los microgramos (Yu *et al.*, 2023), los molares (Gu *et al.*, 2006), los micromolares (Brune *et al.*, 1994, Gu *et al.*, 2006, Okoh *et al.*, 2006, Solscheid *et al.*, 2015), los picomolares (Goh *et al.*, 2002) y los que van desde lo micromolar hasta lo subnanomolar (Franz *et al.*, 2020). Entre más amplio sea el rango resultará más atractivo, aunque esto dependerá también de la aplicación que se le busque dar al biosensor. Otra característica importante es el costo, que es un punto clave para poder llegar a un mercado interesado en herramientas de medición a un precio accesible. En esta ocasión pocos mencionan las ventajas económicas de su biosensor, no obstante, no se habla del precio (Solscheid *et al.*, 2015 y Franz *et al.*, 2020). Algo destacable es que se nota una mejora en las características de selectividad, sensibilidad y costo en los desarrollos más recientes (Solscheid *et al.*, 2015, Franz *et al.*, 2020 y Yu *et al.*, 2023), producto de los antecedentes que han dejado otras investigaciones. Igualmente, es interesante destacar que en todos carece la variable de portabilidad, todos están diseñados hasta ese momento para que puedan utilizarse dentro de un laboratorio, lo cual limita mucho su uso en condiciones cotidianas, que es hacia donde resulta importante dirigir el propósito de estas herramientas de medición, como podría ser la cuantificación de fosfatos en los cultivos *in-situ*. Sería interesante que se buscara integrar a la portabilidad dentro de las características de los biosensores, ya que esto resultaría más atractivo y sería un diferenciador importante.

Se concluye, por lo tanto, que los futuros biosensores necesitan el desarrollo de métodos para la detección de la respuesta para que sean igual o similarmente selectivos que los equipos de laboratorio, teniendo en cuenta que actualmente estas varían entre el 70% y el 80% de precisión. Además, se demanda satisfacer la necesidad

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

de portabilidad, la cual es vital para permitir la popularización de esta alternativa ante las ya tradicionales técnicas de cuantificación de fosfatos. Los biosensores representan grandes ventajas frente a las técnicas tradicionales previamente mencionadas, como lo son la selectividad, sensibilidad y el bajo costo. Sin embargo,

aún existe un camino por recorrer para que esta práctica pueda salir de los laboratorios y emprender un camino rumbo a la comercialización y uso en campo. Tabla 3. Biosensores para la cuantificación de fosfato según la literatura.

Tipo de biosensor	Ventajas	Desventajas	Selectividad	Sensibilidad	Aplicación	Cita
Fluorescente a partir de una proteína de fijación a fosfato (PBP) de <i>E. coli</i>	Aumento 5.2 veces en la fluorescencia.	Actividad de entre el 70 al 80% Se necesita monitorear el pH. No hay desarrollo en la portabilidad.	Alta	Concentraciones micromolares	Monitoreo del ciclo de la ATPasa	Brune <i>et al.</i> , 1994
Fluorescente basado en la mutagénesis dirigida al sitio de la proteína verde mejorada (EGFP) expresado en <i>E. coli</i> .	Altamente soluble y de baja toxicidad. Tiempo de respuesta de 10 min. Afinidad alta que fue mantenida ante un amplio rango de pH y de fuerza iónica.	Es necesaria la purificación de los lipopolisacáridos de los lisados de <i>E. coli</i> para que pueda funcionar correctamente. No hay desarrollo en la portabilidad.	Alta	Concentraciones picomolares	Detección de endotoxinas y bacterias gramnegativas	Goh <i>et al.</i> , 2002
Biosensor genético fluorescente de PiBP (Proteína de unión específica de fosfato inorgánico) para una cepa termófila de <i>Synechococcus</i> que expresan FLIPPI (proteína indicadora fluorescente para fosfato inorgánico).	Una familia de sensores Pi con señal mejorada y las afinidades de Pi varían en casi ocho órdenes de magnitud	Se logra una selectividad insuficiente para estudios de células individuales. Señal indistinguible del ruido de fondo. Diseño complejo y carece de portabilidad.	Baja	Concentraciones desde molares a micromolares.	Determinación de cambios de Fosfato inorgánico (pi) en células vivas.	Gu <i>et al.</i> , 2006

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

Biosensor fluorescente a través del injerto de dos mutaciones de cisteína y marcaje con 6-yodoacetamidotetrametilrodamina en <i>E. Coli</i>	Incremento de la fluorescencia hasta 18 veces más de lo habitual. La longitud de onda de excitación más alta de rodamina presenta una reducción en autofluorescencia celular.	Los espectros de fluorescencia muestran un gran cambio sobre la unión de Pi. Carece de portabilidad. La temperatura de la reacción debe de ser controlada a 10°C.	Alta	Concentraciones micromolares	Determinación de los efectos de acción de los fármacos en las vías dentro de las células.	Okoh <i>et al.</i> , 2006
Biosensor fluorescente a través de la proteína de unión a fosfato PstS en <i>E. Coli</i>	Altamente específico. Económico.	Desarrollo complicado. No es portable.	Alta	Concentraciones micromolares	Detección de fósforo inorgánico.	Solscheid <i>et al.</i> , 2015
Biosensor basado en una proteína bacteriana de <i>E. coli</i> que se une al fosfato con el principio de termoforesis.	Continuo, sensible y versátil. Medición en tiempo real. Económico	El estudio para la cuantificar la formación de producto durante reacciones enzimáticas y derivar parámetros cinéticos en estado estacionario es limitado.	Alta	Concentraciones en el rango de subnanomolares a lo micromolar.	Detección en tiempo real de fosfato inorgánico durante reacciones enzimáticas.	Franz <i>et al.</i> , 2020
Biosensor basado en transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia.	Alta sensibilidad y selectividad.	Carece de portabilidad.	Alta	Concentraciones en el rango de los 3.3-434 µg·L ⁻¹	Detección de fosfato en agua.	Yu <i>et al.</i> , 2023

Bibliografía

- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1-8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Bhardwaj, T. (2015). Review on Biosensor Technologies. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology*, 6 (2), 36-62. https://www.researchgate.net/publication/299410794_REVIEW_ON_BIOSENSOR_TECHNOLOGIES
- Bonetto, M. C., Cortón, E., Pérgola, M. & Sacco, N. J. (2018). Biosensores y celdas de combustible microbianas: Ciencia con texto. *Química viva*, 14(1), https://www.researchgate.net/publication/325428576_Biosensores_y_celdas_de_combustible_microbianas_Ciencia_con_texto/link/5b0d99fd0f7e9b1ed70118f1/download
- Borisov, S. M., & Wolfbeis, O. S. (2008). Optical biosensors. *Chemical reviews*, 108(2), 423-461.
- Brune, M., Hunter, J. L., Corrie, J. E. T., & Webb, M. R. (1994). Direct, Real-Time Measurement of Rapid Inorganic Phosphate Release Using a Novel Fluorescent Probe and Its Application to Actomyosin Subfragment 1 ATPase. *Biochemistry*, 33(27), 8262-8271. <https://doi.org/10.1021/bio0193a013>

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

- Dai, C., & Choi, S. (2013). Technology and Applications of Microbial Biosensor. *Open Journal of Applied Biosensor*, 02(03), 83–93. <https://doi.org/10.4236/ojab.2013.23011>
- D'Souza, S. F. (2001). Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 96(1–3), 225–238. <https://doi.org/10.1385/ABAB:96:1-3:225>
- Faridbod, F., Ganjali, M. R., Larijani, B., Norouzi, P., & Hosseini, M. (2014). Biosensors in Endocrinology- Review Article. *Iranian J Publ Health*, 43(1), 94–104.
- Franz, P., Gassl, V., Topf, A., Eckelmann, L., Iorga, B., & Tsiavaliaris, G. (2020). A thermophoresis-based biosensor for real-time detection of inorganic phosphate during enzymatic reactions. *Biosensors and Bioelectronics*, 169(September), 112616. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112616>
- Goh, YY., Ho, B., Ding, JL. (2002). A novel fluorescent protein-based biosensor for gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6343–6352. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6343-6352.2002>
- Gu, H., Lalonde, S., Okumoto, S., Looger, L. L., Scharff-poulsen, A. M., Grossman, A. R., Kossmann, J., Jakobsen, I., & Frommer, W. B. (2006). A novel analytical method for in vivo phosphate tracking. *FEBS Letters*, 580(25) 5885–5893. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.048>
- Hicks, M., Bachmann, T. T., & Wang, B. (2020). Synthetic biology enables programmable cell-based biosensors. *ChemPhysChem*, 21(2), 132–144.
- Kulkarni, S. J., & Karve, M. S. (2020). Fabrication of enzyme-based optical biosensor for estimation of inorganic phosphate in a urine sample. *SN Applied Sciences*, 2(6), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2748-6>
- Lamarche, M. G., Wanner, B. L., Crépin, S., & Harel, J. (2008). The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 461–473. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x>
- Lei, Y., Chen, W., & Mulchandani, A. (2006). Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 568(1–2), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.065>
- Mapare, S. V., Yu, P. L., Sarkar, A., & Mukhopadhyay, S. C. (2013, December). A Review of sensor technology for in-field phosphate monitoring. *Seventh International Conference on Sensing Technology (ICST)*, 411–418.
- Martinkova, P., Kostelnik, A., Valek, T., & Pohanka, M. (2017). Main streams in the construction of biosensors and their applications. *International Journal of Electrochemical Science*, 12(8), 7386–7403. <https://doi.org/10.20964/2017.08.02>
- Morales, M. A., & Halpern, J. M. (2018). Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. *Bioconjugate Chemistry*, 29(10), 3231–3239. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00592>
- Naciones Unidas (2022). La población mundial llegará a 8000 millones en 2022. <https://www.un.org/es/desa-es/la-poblaci%C3%B3n-mundial-llegar%C3%A1-8000-millones-en-2022>
- Naresh, V., & Lee, N. (2021). A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors (Switzerland)*, 21(4), 1–35. <https://doi.org/10.3390/s21041109>
- Okoh, M. P., Hunter, J. L., Corrie, J. E. T., & Webb, M. R. (2006). A Biosensor for Inorganic Phosphate Using a Rhodamine-Labeled Phosphate Binding Protein *Biochemistry*, 45(49), 14764–14771. <https://doi.org/10.1021/bio60960j>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2002). Los Fertilizantes y su uso. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. <https://www.fao.org/3/x4781s/x4781s.pdf>
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
- Singh, A. K., Mittal, S., Das, M., Saharia, A., & Tiwari, M. (2023). Optical biosensors: a decade in review. *Alexandria Engineering Journal*, 67(1), 673–691. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.12.040>
- Solscheid, C., Kunzelmann, S., Davis, C. T., Hunter, J. L., Nofer, A., & Webb, M. R. (2015). Development of a Reagentless Biosensor for Inorganic Phosphate, Applicable over a

Daphne Ojeda Rodríguez, Luis Miguel Contreras Medina,
Ramón Gerardo Guevara González, Arturo Alfonso Fernández Jaramillo

- Wide Concentration Range. *Biochemistry*, 54(32), 5054–5062. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00449>
- Tetyana, P., Morgan Shumbula, P., & Njengele-Tetyana, Z. (2021). Biosensors: Design, Development and Applications. *Nanopores*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97576>
- Updike, S., Hicks, G. (1967). The enzymatic electrode. *Nature*, 214, 986–988.
- Vaidya, A. M., & Annapure, U. S. (2019). Enzymes in Biosensors for Food Quality Assessment. *Enzymes in Food Biotechnology*, 659–674. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00038-4>
- Wieczorek, D., Żyszka-Haberecht, B., Kafka, A., & Lipok, J. (2022). Determination of phosphorus compounds in plant tissues: from colourimetry to advanced instrumental analytical chemistry. *Plant Methods*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00854-6>
- Yu, J., Zhang, Y., Zhao, Y., Zhang, X., & Ren, H. (2023). Highly Sensitive and Selective Detection of Inorganic Phosphates in the Water Environment by Biosensors Based on Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Analytical Chemistry*, 95(11), 4904–4913.