

BIOSENSORES

*David Cedeño, Alonso Jaramillo
Departamento de Química
Universidad del Valle*

Introducción

La realización de mediciones sensibles, selectivas y confiables en células y tejidos vivos es una labor interesante y un proyecto muy importante para químicos, médicos, fisiólogos y profesionales clínicos, pues abre la posibilidad de estudiar procesos metabólicos y mecanismos a un nivel bioclínico y fisiológico. Los desarrollos científicos más recientes son los biosensores, pequeños diseños electroquímicos o electrónicos utilizados para detectar y medir selectivamente sustancias biológicamente importantes. El objetivo de este artículo es presentar las características, ventajas, desventajas y evolución de los diferentes tipos de biosensores.

Los biosensores utilizan biomoléculas inmovilizadas en combinación con transductores que detectan o responden a interacciones específicas con reactivos químicos. Para obtener una señal óptima al biocomponente inmovilizado está en estrecho contacto físico con la unidad de transducción. La Figura 1 enseña un diseño esquemático de la composición y estructura de un biosensor típico. Los biosensores en cuanto a selectividad son muy superiores a los sensores químicos.

La selectividad de la medición es un problema de particular importancia, (las muestras biológicas son complejas y diversas, en el contenido de electrólitos y moléculas en solución) y generalmente se obtiene mediante reacciones químicas específicas. Es sorprendente que los reactivos más versátiles y selectivos son suministrados por la naturaleza en la forma de

enzimas, anticuerpos y receptores, que inmovilizados forman sensores que tienen uso en el análisis clínico, seguimiento biomédico, y estudios fundamentales de procesos bioquímicos a nivel celular. Los biosensores podrían ser los sensores ideales si su tiempo de vida no se afectara por problemas de estabilidad.

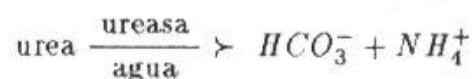
La introducción de los test enzimáticos representó una simplificación de los procedimientos analíticos. La muestra se deja gotear sobre el reactivo, evitando la dilución y la toma de alícuotas. Sin embargo, en estos tests los reactivos no pueden reutilizarse después de la inmovilización de la enzima. Clark y Lyons, en 1962, aplicaron la inmovilización de enzimas a la química analítica basándose en el principio de un electrodo de membrana selectiva para oxígeno, atrapando una enzima sobre una membrana semipermeable colocada frente al electrodo indicador que convierte el analito en oxígeno, siendo éste detectado por el electrodo. Esta modificación facilitó la reutilización de la enzima, y fue por tanto el nacimiento del primer biosensor. En la actualidad existen biosensores comerciales para sustratos importantes como glucosa, lactato, urea, penicilina, etc.

Tipos de Biosensores

Básicamente hay dos tipos de biosensores, que difieren en el tipo de elemento sensor usado en el reconocimiento molecular o de acuerdo al tipo de transductor:

1. Biosensores de afinidad directa: usan un evento enlazante para detectar sustancias. El enlace del analito o receptor biológico complementario produce un cambio conformacional de la biomolécula (un cambio químico), o cambios físicos en el medio de inmovilización tales como carga, espesor, temperatura, masa, parámetros ópticos (color o fluorescencia). Análogamente a la cromatografía por afinidad se conocen pares complementarios de analito y bioligando usados en el reconocimiento molecular (ver Tabla 1).
2. Biosensores del tipo enzimático-metabólico: el reconocimiento del sustrato por el receptor inmovilizado (enzimas, organelas, microorganismos) es complementado por su conversión química a un producto que es posteriormente detectado.

Un ejemplo de este tipo es la determinación de urea mediante un electrodo de amoníaco modificado con ureasa según la reacción:



Un sistema modificado representa una combinación de ambos principios: en los biosensores “catalíticos” se utiliza el enlazamiento del analito sin su conversión y la generación de la señal por la conversión de un reactivo auxiliar. Este tipo de sensor se usa en la determinación de grupos prostéticos e inhibidores, y en inmunosensores enzimáticos.

Tabla 1. Tipos de biosensores de acuerdo a su función

ANALITO	BIOAFINIDAD	PASO GENERADOR DE SENAL	CLASE DE BIOSENSOR
Sustratos Análogos	Enzimas		
Antígenos Haptenos	Anticuerpos		
Virus Células Glicoproteínas	Lectinas	Enlazamiento del analito	Sensor enlazante (puro)
Grupo prostético	Apoenzimas		
Inhibidores	Enzimas	Conversión de una sustancia auxiliar	Sensor Catalítico
Antígenos marcados enzimáticamente	Anticuerpos		
Sustratos	Enzimas	Conversión química del analito	Sensor Metabólico
Cofactores	Organelas Microbios		Enzimático

Generaciones de Biosensores

Desde el punto de vista integracional, los biosensores pueden dividirse en tres generaciones:

Primera Generación: Es la más simple y se basa en el enlazamiento o sostenimiento de los biocomponentes en una membrana. Un ejemplo típico es un electrodo de enzima, donde una solución altamente concentrada de la enzima está contenida en una cámara de reacción mediante una membrana

de diálisis, colocada frente al electrodo indicador. Este sistema representa una unidad consistente en dializador, reactor, y transductor electroquímico.

Segunda Generación: El acople covalente adicional de un cosustrato es una precondition de regímenes de medida sin reactivo. En este caso, no se adiciona un reactivo a la muestra. Este método ha sido desarrollado inmovilizando un cofactor o donador de electrones en la vecindad del centro activo de la enzima. Un principio más reciente de integración sensorial es la combinación de reconocimiento molecular y el procesamiento de la señal en el nivel del biocomponente.

Tercera Generación: La inmovilización del biocomponente directamente sobre un elemento electrónico, por ejemplo, sobre la barrera de un transistor de efecto de campo (*FET*). La barrera del *FET* es sensible a cambios de sus propiedades superficiales. Permite además amplificar e integrar el reconocimiento biospecífico y el procesamiento de la señal electrónica. Con la utilización de este *FET* se consigue la eliminación diferencial de ruido y es posible la evaluación estadística con el uso de sensores.

Sensores Electroquímicos

Estos sensores son de dos clases, los potenciométricos y los amperométricos.

En los potenciométricos el potencial a corriente cero, desarrollado en una membrana selectiva o superficie de electrodo en contacto con una solución de la muestra se relaciona con la concentración del analito.

En los amperométricos el potencial del electrodo de trabajo se mantiene constante para la oxidación o reducción de la especie de interés (o sustancia química acoplada a ella). La corriente que fluye es proporcional a la concentración de la especie electroactiva.

Electrodos Potenciométricos

En general, se pueden subdividir en:

Electrodos de membrana solvente polimérica: Son comercialmente accequibles y comúnmente usados en la detección selectiva de varios iones (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ , CO_3^{2-}) en matrices biológicas complejas. El término solvente polimérico se refiere a una matriz de cloruro de polivinilo (*PVC*) semirígida, aunque plastificada en estado líquido, que provee firmeza

mecánica y permite la difusión de especies hasta sitios enlazantes en la membrana (portadores neutros o intercambiadores iónicos). La separación de carga, y por tanto un cambio en el potencial, se produce a través de la interfase cuando los sitios enlazantes extraen selectivamente especies en la fase de la membrana dejando los coiones en la fase de la muestra. La selectividad del sensor está dictada por la especificidad de las reacciones ión-enlazante o de partición.

Analizadores gas selectivos: Se utilizan membranas de portadores neutros como transductores internos de un arreglo gas selectivo convencional. Así, por ejemplo, se utiliza un sensor basado en una membrana polimérica con una enzima inmovilizada que convierte creatinina a amoniaco.

Transistor de efecto de campo químicamente selectivo (*Chem FET*): Es un dispositivo *FET* miniaturizado que ha sido modificado para responder a la presencia de iones u otras especies a través de la separación de carga en una interfase.

Un *ChemFET* es una barrera aislada de un *FET* en donde el contacto metálico ha sido reemplazado por una capa químicamente modificada capaz de extraer o donar carga respecto a una solución acuosa de la muestra. La separación de carga genera un potencial que modula la corriente fuente-salida del *FET*, y es esta modulación la que sirve como un indicador de la concentración de analito.

Hay varios tipos de *ChemFET* y entre ellos se incluyen los ión selectivo-*FET* (*ISFET*) que responden a iones en solución; el *ISFET* posee un convertidor de impedancia donde el sensor es una membrana polimérica ión-selectiva. Los enzima-*FET*, (*ENFET*) en los que una enzima inmovilizada se usa para medir sustratos enzimáticos o especies acopladas a reacciones enzimáticas; los inmunoquímicos-*FET*, que generan una separación de carga mediante interacciones antígeno anticuerpo; y los *FET* de barrera suspendida, que se basan en la función trabajo y la orientación del dipolo que resulta de la interacción del elemento sensible con un gas. Así, el paladio se disuelve en hidrógeno y se usa como elemento sensible para la detección de hidrógeno gaseoso.

Se ha desarrollado un diseño relacionado con los *FET* de barrera suspendida que utiliza semiconductores de óxidos metálicos (*MOSFET*). Mientras las respuestas de un *ChemFET* se monitorean midiendo el voltaje inducido por los cambios en la conductividad de la región canal del *FET*, el *MOSFET* se basa en la medida de cambios de capacitancia en esa región.

La mayor ventaja de los *FET* consiste en su tamaño reducido, lo cual permite la oportunidad de combinar diferentes barreras selectivas en un mismo chip, y la incorporación a sistemas analíticos miniaturizados que involucran volúmenes de solución de microlitros. Otra ventaja es la posibilidad de utilizar técnicas microlitográficas para producción a bajo costo.

Cuando se trabajan muestras *in vivo*, el *FET* debe protegerse del ambiente químico introduciéndolo dentro de una membrana de vidrio u otro material (encapsulación), sin embargo, la encapsulación debe hacerse de modo que la capa químicamente selectiva esté expuesta a una muestra húmeda mientras, simultáneamente, debe prevenirse que el transductor electrónico haga corto al exponerse a la humedad.

Los sensores potenciométricos presentan interferencias que incluyen el ruido eléctrico, la adsorción no selectiva y la oclusión superficial que conducen a cambios en actividad y generación de mezclas de potenciales. Estas fuerzas fisicoquímicas asociadas al proceso de enlazamiento selectivo deberán ser separadas cuantitativamente de la serie de eventos dinámicos enlazantes que ocurren en la interfase, si se quieren obtener resultados óptimos.

Un sistema comercial se basa en el principio de potenciometría a punto cero. Como en estos sensores los sistemas de medición y referencia son idénticos, la diferencia de potencial con las membranas en contacto en la misma solución es cero. Si se coloca sobre una superficie del sensor una solución de referencia de concentración conocida y sobre la otra la solución cuya concentración se va a determinar, el potencial desarrollado da una medida directa de esta diferencia en concentración de las dos soluciones. Los errores en estos métodos diferenciales son minimizados pues se evitan los problemas con los electrodos de referencia convencionales, los efectos de envejecimiento y los efectos de envenenamiento. Sin embargo, las mediciones continuas no son posibles con este dispositivo.

Electrodos Amperométricos

Los electrodos químicamente modificados se han desarrollado en los últimos 20 años estimulando el interés de investigadores para ejercer un control más directo sobre el carácter de la superficie del electrodo. Si se diseñan películas moleculares sobre los electrodos se obtiene flexibilidad para hacer una reacción más sensible o selectiva, basándose en la aplicación racional de la química. Las áreas donde se han desarrollado incluyen:

Electrocatalisis: Involucra la mediación de una transferencia electrónica mediante un catalizador inmovilizado o una película molecular entre el electrodo y el sustrato o la solución del analito; resultan reacciones de electrodo rápidas y potenciales aplicados menos extremos.

Preconcentración: Involucra el uso de una película molecular que muestra un efecto de partición significativo para un sustrato, conservando la superficie del electrodo con una concentración más alta del sustrato.

Membranas límites: Son cubiertas libres de agujeros extremadamente delgadas que exhiben partición desfavorable hacia constituyentes en la solución que actúan como interferencias.

Electrodescargas: Involucra la expulsión de especies o reactivos a partir de una película electrodica mediante cambios conducidos electrónicamente en el estado de oxidación de la película; el propósito es descargar microdosis controladas de esas sustancias en la fase solución.

Microestructuras: Son electrodos miniaturizados con películas moleculares poliméricas. Ello involucra la utilización de microlitografía para miniaturizar electrodos y películas, haciendo posible la implantación de microsensores a seres vivos.

Uno de los aspectos promisorios en biosensores implica el uso de la microestructuración para diseñar celdas electroquímicas totalmente en estado sólido sin requerir líquidos para funcionar. La muestra se agrega como líquido y se deja que se absorba sobre la película polimérica, una fase semirígida iónicamente conductora. La dificultad más severa es el envenenamiento del microelectrodo. Conservar el electrodo limpio requiere destreza y exigencia.

Sensores Electrónicos

Sensores de fibra óptica (optodos) Se basan en la absorción, dispersión o fluorescencia de luz por una muestra colocada en el extremo de una fibra óptica cuya fuente de excitación y dispositivo de detección se localizan al comienzo de la fibra. La señal analítica puede ser directa (absorción, dispersión o fluorescencia originadas por la especie analizada), o indirecta (un reactivo actúa como intermediario exhibiendo un cambio en las propiedades espectrales si está presente el analito). Los sensores de fibra óptica han sido diseñados para medidas de *pH* y la detección de la presión parcial de gases en la sangre como O_2 y CO_2 .

Un problema que se ha visualizado en el desarrollo de sensores in vivo es la selectividad, que busca que el sensor mida el analito de interés sin la interferencia de otros componentes de la muestra biológica. El problema se ha enfocado tomando datos fluorométricos multidimensionales mediante los sensores de fibra óptica; así no sólo puede tenerse en cuenta la longitud de onda, sino, el tiempo de fluorescencia, la polarización de la radiación, y los tiempos de correlación rotacional que también son parámetros de interés y pueden utilizarse para resolver componentes que son espectralmente similares. El aspecto multidimensional involucra el uso de muchos datos, cada uno contiene información independiente de otro que se encuentra en las otras dimensiones. Si se tienen cuatro parámetros de selectividad (longitud de onda de excitación, de emisión, tiempo de fluorescencia y polarización) y considerando cada parámetro con cien elementos de resolución, con el uso simultáneo de estos cuatro parámetros se obtienen 10^8 elementos de resolución.

Las mediciones con los sensores de fibra óptica no necesitan de un sistema de referencia; sólo se comparan las intensidades de luz en el rayo luminoso antes y después de pasar por la muestra (I/I_0). Los optodos se pueden miniaturizar y utilizar en medios tan complejos como la sangre.

Eventualmente pueden aparecer problemas debido a la dispersión y retroceso de la luz que circula por el optodo.

Dispositivos piezoeléctricos Son transductores sensibles a la relación masa-frecuencia.

El principio de medición depende del cambio en la frecuencia característica de un oscilador de cuarzo debido a un cambio de masa que ocurre cuando una capa de material extraño se deposita en su superficie. La frecuencia de oscilación está normalmente entre 9 y 14 *MHz*, la selectividad se obtiene cubriendo la superficie con un adsorbente apropiado.

Existen dos grupos de esta clase de sensores:

- Diseños volumen-onda (Bulk-Wave) ó *BW*.
- Diseños superficie acústica onda (Surface Acoustic Wave) ó *SAW*.

Los *SAW* son capaces de responder a oscilaciones fundamentales a frecuencias más altas que los *BW*, por lo que algunos investigadores consideran que los primeros tienen límites de detección más bajos.

Un diseño piezoeléctrico es sensible a cambios de masa, densidad o viscosidad de la muestra en contacto con su superficie activa. La aplicación más directa de los sensores piezoeléctricos involucra el micropesaje de sustancias depositadas sobre la superficie activa del diseño en una manera no específica. También son utilizados para controlar reacciones de superficie, como procesos de cubrimiento o reacciones químicas que afectan enlaces covalentes. Además, son utilizados para medir la viscosidad de líquidos en contacto con la superficie sensora, y son aplicables al monitoreo de reacciones electroquímicas con base en la sensibilidad a los cambios de masa asociados con los procesos redox. Ya hay diseños SAW para la determinación de inmunoglobulinas G humanas (usando una superficie que contiene inmunoglobulina G humana) y para coriogonadotropina humana (la hormona que sirve como indicador de embarazo).

La oscilación mecánica de los sensores (usualmente a frecuencias de MHz) es muy constante y puede ser perturbada por cambios pequeños de masa o microviscosidad. Los cambios de frecuencia menores que 1 Hz pueden, en ocasiones, medirse con reproducibilidad, obteniéndose sensibilidad de nanogramos con respecto a la absorción a la superficie del dispositivo.

Los sensores piezoeléctricos pueden ser aplicables a un amplio rango de análisis tales como detección de bioespecies con cubiertas de tipo antígeno-anticuerpo, determinación de iones en solución usando compuestos quelantes y fabricación de sensores de especies en fase gaseosa, utilizando polímeros sorbentes.

Las limitaciones de estos diseños están gobernadas por la absorción no selectiva, oclusión superficial y desnaturalización del receptor.

Biosensores de Enzimas

El concepto fundamental es el control electroquímico o electrónico continuo e instantáneo de reacciones catalizadas por enzimas. El sustrato es convertido a un producto por la enzima y medido como tal.

Es posible realizar las reacciones en soluciones homogéneas y luego determinar la cantidad de sustrato usando un electrodo selectivo al producto de la reacción enzimática. Sin embargo, es más conveniente la inmovilización para que la reacción tenga lugar sólo en la superficie del electrodo. De este modo, sólo se requieren pequeñas cantidades de enzima y el gasto de muestra es insignificante; además el sensor puede utilizarse repetidamente

en otras muestras.

Existen varias técnicas de inmovilización de enzimas: ser atrapadas en una gel sintética, entrecruzar las moléculas de enzima para formar membranas; enlazarse químicamente a membranas u otras superficies, ser copolimerizadas con otras enzimas o proteínas, o ser atrapadas físicamente entre dos membranas.

El límite de detección es del orden de 10^{-5} a $10^{-4} M$, suficiente para determinar analitos en muestras de 10 a 100 μL . Lamentablemente, la concentración de muchas hormonas, drogas o toxinas está muy lejos de este límite bajo de detección. Los inmunoelectrodos permiten determinaciones mucho más sensibles.

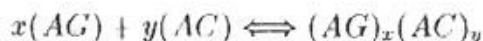
Las reacciones acopladas entre dos o más enzimas y/o sustratos ha ampliado la variedad de analitos que se pueden analizar, obteniéndose mayor sensibilidad en las mediciones, hasta nanomolar.

El producto de una primera reacción selectiva es consumido en una subsiguiente reacción originando nuevos productos susceptibles de detección, mediante electrodos ión-selectivos convencionales o coulombimétricos. Una especie electroinactiva, puede así ser convertida a una que sí pueda ser detectada mediante un electrodo.

Inmunosensores

La estructura molecular de un anticuerpo es prácticamente constante. Las diferencias pueden resultar debido al enlazamiento con un antígeno específico; por tanto, pueden utilizarse sistemas antígeno-cuerpo un mecanismo de transducción común.

Las reacciones son del tipo:



donde,

AG = Antígeno, AC = Anticuerpo.

Se conocen dos clases de inmunosensores: *Heterogéneo* en donde el anticuerpo enlazado al antígeno debe separarse del antígeno en algún punto del proceso y *Homogéneo* no se requiere la separación, es menos sensible.

Las interacciones inmunológicas antígeno-anticuerpo no involucran generalmente reactivos electroactivos. Debido a esto se utilizan marcajes en-

zimáticos o ionóforos como mediadores del proceso inmunológico y electroquímico.

Los inmunosensores enzimáticos son preparados uniendo anticuerpos a la superficie del electrodo: una enzima se une a otro anticuerpo (prueba de dos sitios) o a un antígeno (configuración competitiva). El diseño implica el enlace de la enzima *a*, o su desplazamiento *de*, el electrodo en presencia del antígeno o su desplazamiento de éste. El sustrato analizado produce un cambio en la corriente que está directa o inversamente relacionada con la concentración de antígeno. Hay sensores de este tipo para insulina, albúmina, inmunoglobulinas, tiroxina, coriogonadotropina humana, α -fetoproteína, antígeno de hepatitis B.

Otro esquema es el utilizado por competición entre un antígeno fluoromarcado y uno no marcado (analito). El desplazamiento del antígeno marcado ocasiona una caída en la intensidad de la señal de fluorescencia. Por ejemplo, la inmunoglobulina G de conejo se inmoviliza sobre un extremo de una fibra óptica; el sensor se expone a un antígeno marcado con isocianato de fluoresceína y antígeno sin marcar (analito). La respuesta a la emisión de fluorescencia es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno no marcado en la muestra.

Receptrodos

Los sentidos químicos de los organismos vivos proveen selectividad, sensibilidad y respuestas dinámicas excepcionales. Así, por ejemplo, ciertos insectos responden sólo a ciertas moléculas estimulantes y muchos animales marinos pueden percibir aminoácidos en concentraciones acuosas del orden picomolar. Como son procesos electroquímicos los involucrados en las señales neuronales del sentido químico, es posible aplicar el principio de quimiorrecepción a un tipo de sensor: *el receptrodo*.

Por ejemplo, la forma purificada del receptor acetilcolina nicotínico del *torpedo californica*, se ha usado como receptrodo para acetilcolina. La molécula receptora consta de 5 subunidades que contiene los sitios enlazantes y los canales iónicos. En ausencia de acetilcolina los canales se cierran mientras que los sitios de enlace se abren iniciándose un flujo de iones sodio. Si un receptor puro se deposita sobre un FET, la capa de la barrera de Si_3N_4 es sensible a los iones sodio. Así, el FET recubierto del receptor exhibe una respuesta específica a acetilcolina e iones sodio. Una membrana lipídica previene que los iones sodio en solución alcancen la barrera y se produzca

un gradiente de concentración.

El flujo iónico a través del canal del receptor se refleja en un cambio en el potencial de la barrera cuando se adiciona acetilcolina.

La separación, reconstitución e inmovilización del receptor puede obviarse si las estructuras naturales que lo contienen se utilizan directamente como elemento de reconocimiento del biosensor. Las antenulas de un cangrejo azul fueron cortadas y las fibras neuronales acopladas a electrodos en micropipetas de manera que los impulsos generados en el proceso de reconocimiento pudieran ser registrados electrónicamente y almacenados. Este arreglo es útil para detectar concentraciones extremadamente bajas de aminoácidos, menores de 10^{-13} M, con una selectividad sorprendente.

Aplicaciones

El empleo de los biosensores se extiende desde la tecnología en el control de procesos a través de aplicaciones en química clínica, hasta su uso en los servicios municipales. Existen numerosos mercados que utilizan sensores semiconductores para detectar gases tales como CO , NO_x y CH_4 en garajes subterráneos, túneles y minas y en emanaciones industriales. Las áreas que usan sensores potenciométricos son la medicina y la tecnología ambiental. En química clínica los electrodos ión-selectivos tienen uso para medidas en medios biológicos. Así, por ejemplo, puede determinarse fluoruro en orina y sangre utilizando un electrodo de cristal de LaF_3 . Los sensores selectivos a yoduro y bromuro son de interés para la toxicología clínica, en conjunto con las investigaciones del funcionamiento de la glándula tiroide. Una aplicación tecnológica importante está en el control de procesos fermentativos; es fundamental hacer mediciones continuas para optimizar el proceso de fermentación y minimizar el consumo de nutrientes costosos.

Una aplicación notoria está en la tecnología alimenticia. Por ejemplo, el contenido de glucosa en vinos y jugos de frutas, la producción de lactato durante el proceso lácteo y la frescura del pescado.

Otra área de importancia es el control de la calidad de aguas y afluentes, con sensores basados en la combinación de microorganismos y transductores. Además de la perspectiva en la aplicación de sensores "in vivo" para el seguimiento fisiológico y clínico de seres vivos.

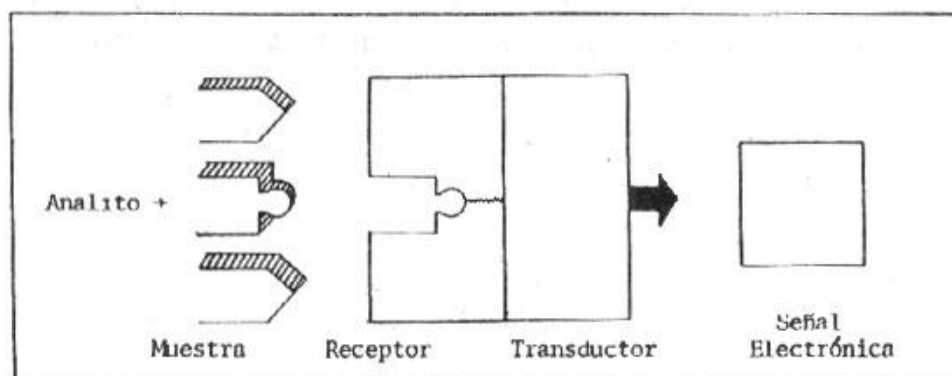


Figura 1 Representación esquemática de la composición y función de un biosensor

El analito o sustancia a analizar interacciona física o químicamente con un bioligando selectivo (receptor) enlazado al transductor. Este se encarga de identificar y coleccionar el cambio físico o químico que ocurre y los componentes electrónicos reproducen este cambio en forma de señal eléctrica.

REFERENCIAS

1. Clark, L.C., Lyons, C. *Ann. NY. Acad., Sci.* 102, 29, (1962).
2. Scheller, F., Schubert, F., Pfeiffer, D., Hintsche, R., Dransfeld, I. *The Analyst*, 114, 653-62, (1989).
3. Borman, S. *Anal. Chem.*, 59 (18), 1091A-8A, (1987).
4. Borman, S. *Anal. Chem.*, 59 (19), 1161A-4A, (1987).
5. Buch, R., Rechnitz, G. *Anal. Chem.*, 61 (8), 533A-42A, (1989).
6. Rechnitz, G. *J. Chem. Educ.*, 60 (4), 282-4, (1983).
7. Rechnitz, G. *Chem. Eng. News*, 53 (4), 29-35, (1975).
8. Gough, D., Andrade, J. *Science*, 180, 380-4, (1973).

9. Thompson, M., Krull, U. J. *Anal. Chem.*, 63 (7), 393A-405A, (1991).
10. Cammann, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Hildegard, W., Winter, B. *Angew. Chem. Int., Ed. Engl.*, 30 (5), 516-539, (1991).