

IMMUNOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA LA DETECCIÓN DE PESTICIDAS

Enrique Valera¹, Javier Ramón-Azcón², Francisco Sánchez-Baeza², M.-P. Marco² y Ángel Rodríguez^{1*}

1: Micro and Nano Technologies group (MNTg), Departament d'Enginyeria Electrònica, Universitat Politècnica de Catalunya, C/. Jordi Girona 1-3 Campus Nord, Mòdul C4, 08034- Barcelona, Spain
e-mail:valera@eel.upc.edu

2: Applied Molecular Receptors Group (AMRg) CSIC, CIBER of Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, C/. Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

Palabras clave: Inmunosensor, Espectroscopía de Impedancias, μ -Electrodos Interdigitados, Atrazina.

Resumen. En este trabajo describimos un inmunosensor impedimétrico para la detección de pesticidas. Para demostrar dicho sensor hemos utilizado atrazina, como pesticida de test. Este sensor está basado en el uso de μ -electrodos interdigitados así como en reactivos específicamente desarrollados para la detección de este pesticida.

Los anticuerpos utilizados no incluyen ningún tipo de etiqueta. Así mismo, el sensor no incluye ningún tipo de par redox que amplifique la señal. La detección inmuno-química de atrazina se alcanza mediante una reacción competitiva entre el antígeno tapizado y el pesticida por una pequeña cantidad de anticuerpo. Los cambios en la impedancia producidos por la inclusión de los bioreactivos son interpretados utilizando un circuito equivalente, el cual representa el sistema de manera fiable. La detección se monitoriza a partir de medidas impedimétricas diferenciales en un amplio espectro de frecuencia.

El inmunosensor muestra límites de detección en el rango de pocos ppb's, lo cual está muy por debajo del Maximum Residue Level (MRL) ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) establecido por la Unión Europea para los residuos de atrazina en uvas de vino así como en otros productos alimenticios.

Aunque en este trabajo el inmunosensor se ha demostrado para la atrazina, otros pesticidas podrían detectarse mediante este método siempre que se utilicen los reactivos adecuados.

1. INTRODUCCIÓN

Los biosensores electroquímicos han revolucionado el análisis químico moderno gracias a su simplicidad técnica y su rápida respuesta, la cual se debe a la transducción directa del

reconocimiento biomolecular en caso de señales electrónicas [1]. La fabricación masiva, el bajo costo, y el análisis descentralizado son otras importantes características de estos sensores.

La espectroscopía de impedancia (IS) es una técnica relativamente nueva y potente para la caracterización de las propiedades eléctricas de los materiales [2] y de las superficies modificada con electrodos [3], así como para la investigación electroquímica de sistemas y procesos [4].

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es una técnica de mucha sensibilidad basada en el control de la respuesta eléctrica del dispositivo de testeo después de la aplicación de una señal AC periódica y de poca amplitud en una amplia gama de frecuencias (por lo general, de 100 kHz a 0,1 Hz, para biosensores). El análisis de los valores de impedancia medidos proporciona información sobre las propiedades eléctricas de la interfaz sensor-muestra [5]. La espectroscopía de impedancia ofrece importantes ventajas para el desarrollo de dispositivos de diagnóstico. Requiere la aplicación de sólo una pequeña perturbación (por lo general, sinusoidal) [4], lo que reduce las interferencias de la matriz en sistemas de análisis, implica mediciones eléctricas relativamente sencillas que pueden ser fácilmente automatizadas, los resultados pueden ser a menudo correlacionados con muchas variables complejas y se pueden predecir los aspectos del funcionamiento de los sensores químicos y de células combustible [2].

La atrazina y otras formas conexas de triazinas tales como ametryn, propazine, prometryn, prometon, simazina y terbutryn, son herbicidas selectivos ampliamente utilizados para el control de cultivos. Por lo tanto, es posible que los residuos de estos herbicidas contaminen los cultivos, pozos, arroyos, etc. A menudo estos han sido encontrados en el agua potable, y por lo tanto, son una amenaza potencial para la salud pública [6]. La Comunidad Europea ha establecido los límites máximos de residuos (MRL) para los diferentes plaguicidas y en particular para la atrazina, en diversos productos alimenticios.

Actualmente existe la necesidad de desarrollar técnicas rápidas de detección y análisis que puedan ser utilizadas como métodos de "advertencia", de pronta detección de residuos de pesticidas en los alimentos, antes de que estos lleguen al consumidor. Los immuno-ensayos (IAs) son pruebas analíticas que utilizan anticuerpos como elementos de reconocimiento específico. Los immuno-ensayos han demostrado ser una de las más productivas contribuciones tecnológicas a la investigación aplicada y fundamental, en el ámbito de las ciencias de la vida, en el siglo XX. Un gran número de trabajos de investigación han sido publicados en los últimos años describiendo el desarrollo de nuevas estrategias immuno-químicas útiles para la detección de enfermedades, drogas, contaminantes o metabolitos en cantidades residuales. Debido al amplio uso de herbicidas de triazina, varios grupos de investigación han reportado la preparación de immuno-reagentes y el desarrollo de métodos immuno-químicos para la detección de atrazina, incluidos immunosensores basados en sensores ópticos, piezoeléctricos o electroquímicos.

En este trabajo se reporta el desarrollo de un immunosensor no etiquetado basado en EIS para la detección de atrazina. El método descrito a continuación no utiliza ningún mediador redox y se basa en la detección directa de la reacción immuno-química competitiva entre el

pesticida y una *haptenized-protein* inmovilizada sobre los μ -electrodos interdigitados (ID μ E's), por los anticuerpos.

2. METODOS EXPERIMENTALES

2.1. Fabricación de los μ -electrodos interdigitados

Se fabricaron electrodos interdigitados delgados (~ 200 nm de espesor) y de $10 \mu\text{m}$ de *pitch* sobre un sustrato de Pyrex 7740. La capa de cromo es mucho más delgada que la capa de oro y fue depositada antes que el oro sólo para mejorar la adherencia entre el oro y el Pyrex. Antes del depósito de los metales, limpiamos el sustrato de Pyrex utilizando etanol absoluto. El depósito de los metales se realizó mediante técnicas de *sputtering*. El diseño de los electrodos fue grabado mediante procesos fotolitográficos. En la Figura 1 se pueden apreciar imágenes de los electrodos obtenidos.

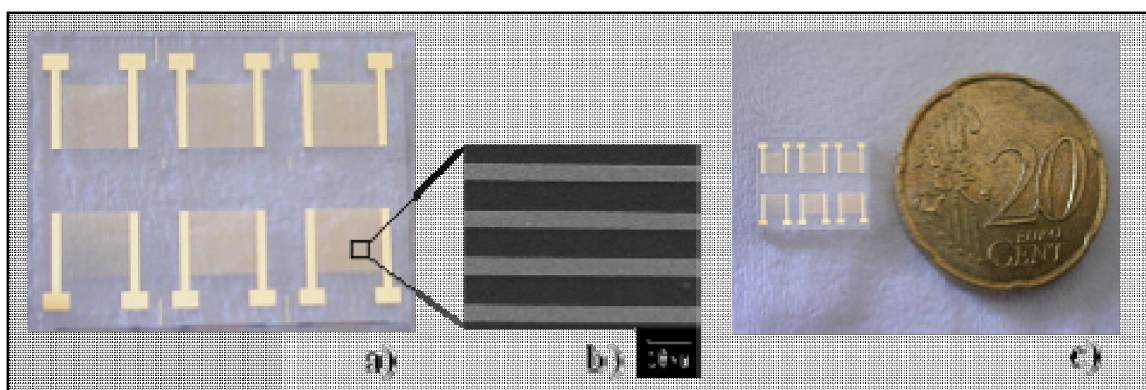


Figura 1. Matriz de μ -electrodos interdigitados (6 dispositivos): a) imagen óptica; b) imagen SEM; c) comparación de tamaño.

2.2. Protocolo de las medidas de impedancia

Las medidas de impedancia se realizaron a temperatura ambiente. No se utilizó ningún par redox para amplificar la respuesta de los dispositivos. Los electrodos fueron cubiertos por una solución diluida de PBS con una conductividad de $1,6 \mu\text{S cm}^{-1}$ a la vez que fueron conectados a la entrada de un analizador de impedancia Agilent 4294 por medio de puntas de prueba. Las mediciones se tomaron en un rango de frecuencias en los 40 Hz a 1 MHz utilizando 0 V de potencial de polarización y un voltaje de modulación de 25 mV de amplitud. Todas las medidas de impedancia se realizaron en una jaula de Faraday.

2.3. Ensayo competitivo

En el inmunosensor impedimétrico desarrollado, la detección de un pequeño número de moléculas se consigue a partir de un ensayo competitivo, donde se produce una reacción

de competencia entre el antígeno libre (analito) y una cantidad fija de antígeno tapizado, por una cantidad limitada (baja concentración) de anticuerpo (Ab). Al final de la reacción se determina la cantidad de anticuerpos capturados sobre la superficie de los ID μ E's y, por ende, la cantidad de pesticida.

2.4. Circuito equivalente

Las medidas de impedancia en función de la frecuencia fueron interpretadas utilizando un circuito equivalente. Para obtener este circuito hemos utilizado una típica modificación del modelo de Randles y Ershler [3], sustituyendo una capacidad por un elemento de fase constante (CPE) [7]. Además de esta modificación se han tenido en cuenta los efectos de los electrodos interdigitados y de los contactos, incluyendo una capacidad en paralelo para tener en cuenta la capacidad natural de los ID μ E's ($C_{ID\mu E}$) y una resistencia en serie para tener en cuenta la resistencia de los contactos (R_c). El circuito equivalente utilizado, el cual ha demostrado ajustar correctamente las medidas experimentales, se muestra en la Figura 2.

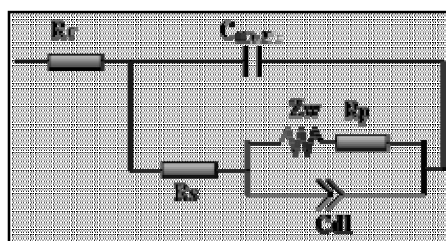


Figura 2. Circuito equivalente. R_c , resistencia de contacto; ($C_{ID\mu E}$), capacidad de los ID μ E's; R_s , resistencia de la solución; R_p , resistencia de polarización; Z_w , impedancia de Warburg; C_{dl} , capacidad de doble capa capacitancia.

3. RESULTADOS

3.1. Respuesta del inmunosensor impedimétrico a la atrazina

La herramienta cuantitativa que nos proporcionó curvas de respuesta sensibles fueron las medidas de impedancia en un amplio rango de frecuencia junto al ajuste de los diagramas de Nyquist al circuito equivalente utilizado. La concentración de atrazina fue por último, relacionada con los valores de al menos algunos de los parámetros del circuito equivalente. Llevamos a cabo un experimento con el fin de mostrar la sensibilidad del inmunosensor a la atrazina, el cual incluyó distintas concentraciones de atrazina durante el paso de competencia utilizando diferentes muestras de ID μ E's para cada concentración. Por lo tanto, la cantidad de anticuerpo específico en cada ID μ E's era diferente para cada muestra. En la Figura 3a se muestra una comparación de los diagramas de Nyquist para tres concentraciones diferentes de atrazina. Como consecuencia se puede observar un cambio importante en los espectros de impedancia, en todo el rango de frecuencias.