

Non-Linear 3D Impedance Spectroscopy

M. Zamora, M. Trujillo and C. Felice

Abstract— Non-linear Dielectric spectroscopy of Biological suspensions was first proposed by the Woodward and Kell group. The above mentioned arose as a technique able to monitor the enzymes state placed in the cell membrane of the biological tissue. This technique is limited to such enzymes because an external low frequency electrical field notably disturbs the membrane's electrical entourage. This kind of interactions can be monitor if the system generates current harmonics. This phenomenon was theorized by Astumian and Robertson. Treo, on his work suggests that the harmonics are originated at the interface and altered by the microorganism presence. Then Ruiz developed a fast method to detect the global non-linearity of a biological suspension. Nevertheless, on these works, the non-linearity interference due to the electrode-electrolyte interface was not controlled. The observed response is the result of the interface modulation because of the microorganism presence. On our work, we employed a tripolar measurement cell. The working electrode (WE) is a gold disc, the counter electrode (CE) is made of stainless steel and the reference electrode (RE) is a standard Ag/AgCl electrode. 1.74 g of lyophilized *Saccharomyces cerevisiae* was dissolved in 90 ml of saline medium. A frequency (0.1 – 1000 Hz) and tension AC (0- 600 mV) sweep was carried out without DC polarization. The first 5 output current harmonics were monitored. Results would indicate that it was successfully possible to measure the non-linearity due to only the yeasts cells, without the non-linear interference of the electrode – electrolyte interface.

Keywords— non-linear dielectric spectroscopy, bioimpedance biological suspensions, Yeast.

I. INTRODUCCIÓN

LA ESPECTROSCOPIA Dieléctrica No Lineal de Suspensiones Biológicas (EDNLSB) fue propuesta inicialmente por el grupo de Woodward y Kell en 1990 [1]. Surgió inicialmente como una técnica capaz de monitorear el estado de las enzimas que se ubican en la membrana celular de suspensiones o tejidos biológicos. La técnica se limita a las proteínas de membrana porque un campo externo de baja frecuencia (<1kHz) perturba notablemente el entorno eléctrico de las membrana. Esta interacción se puede monitorear externamente si el sistema genera componentes armónicos en la corriente, un fenómeno que fue anticipado teóricamente por Astumian & Robertson, [2].

Para poder medir las características no lineales de una suspensión de levaduras, Woodward y Kell desarrollaron dos celdas electroquímicas tetrapolares, conectadas a un espectrómetro no-lineal [1]. Por acción de las interfaces se observan armónicos de la señal senoidal aplicada, que corresponden puramente a las IEE sin contribución del

medio [3]. A partir de ambas señales se calcula un espectro de frecuencias, y los espectros correspondientes se restan (espectro de la muestra menos espectro de referencia) para eliminar la interferencia de las IEE y obtener el contenido armónico del medio. Así, al espectro obtenido (Figura 1) se lo asocia a la actividad metabólica de la enzima H⁺-ATPasa, la cual predomina en la membrana celular del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*.

También se monitorearon otros microorganismos (anaerobios y fotosintéticos), encontrándose resultados similares [4-5], siempre asociados a las enzimas de membrana y comprobados bioquímicamente. A pesar de estos experimentos satisfactorios, el sistema dependía de la estabilidad de las IEE, lo cual volvía poco confiable al método.

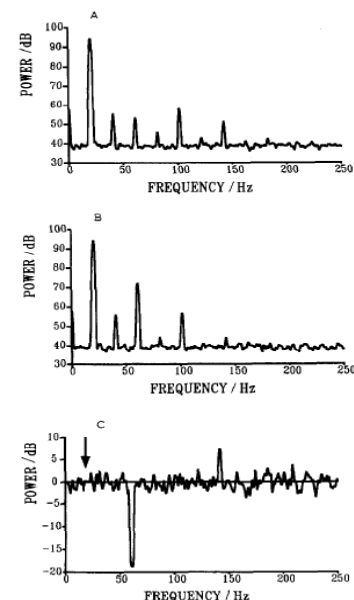


Fig. 1: a) Transformada de Fourier en la celda de medición, b) Transformada de Fourier en celda de referencia, c) Diferencia de espectros. Reeditado de Woodward y Kell 1990

Treo [3] en sus resultados sugiere que los armónicos son originados en la interfase y alterados por la presencia de microorganismos.

Ruiz [6], desarrollo un método rápido para detectar la no-linealidad global de una suspensión biológica. Para ello, utiliza la función de transferencia del sistema, la cual es un diagrama donde se representa la densidad de corriente o la corriente versus el sobre-potencial.

Sin embargo, en todos estos trabajos no se controla el aporte no-lineal de la IEE y la respuesta que se observa es el resultado de la modulación de la interfase debido a la presencia de microorganismos.

En el presente trabajo, se lograron mediciones de no-linealidad biológica pura de células de levadura, a través de

M. Zamora, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.
mzamora@herrera.unt.edu.ar

R. M. Trujillo, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
rmatias.trujillo@gmail.com

C. Felice, Universidad Nacional Argentina, Argentina.
cfelice@herrera.unt.edu.ar

una disminución drástica de la interferencia de las no-linealidades de la interfase electrodo-electrolito.

II. MATERIALES Y METODOS

A. Instrumental y Equipamiento

1) Celda Tripolar

Se utilizó una celda en configuración tripolar, la cual consiste en un electrodo de trabajo (ET) el cual es un cilindro macizo donde sólo está expuesta su sección transversal (área = 1 cm²), recubierta de oro y pulido a 1 micra. El resto fue aislado con grilón. El contraelectrodo (CE) es un casquete semiesférico de acero inoxidable con capacidad de 100 mL, y un área mucho mayor que la del ET para minimizar su impedancia (Figura 2).

Como electrodo de referencia (ER) se utilizó un electrodo de Ag/AgCl.

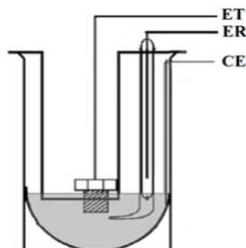


Figura 2. Celda tripolar utilizada.

2) Espectrómetro No Lineal

El espectrómetro no lineal utilizado se muestra en la figura 3 y consiste en una computadora personal (PC) central que sincroniza los instrumentos, genera y digitaliza señales analógicas, un analizador electroquímico Solartron SI1287 y una celda de medición tripolar [5]. La PC comunica instrucciones digitales al SI1287 vía un puerto serie (RS232) para configurar parámetros operativos del mismo. Las señales analógicas se comunican entre la PC y el SI1287 por medio de una placa multifunción incluida en la PC (National Instrument, Texas, USA). La PC genera voltajes senoidales que son aplicados a través del SI1287 a la suspensión biológica contenida en la celda por medio de dos electrodos externos (contraelectrodo CE y electrodo de trabajo ET). El voltaje es controlado por el SI1287 a fin de proveer un campo eléctrico senoidal (sin contenido armónico) entre el electrodo de referencia (ER) y el ET. La corriente que circula por la celda es muestreada y transformada al dominio de las frecuencias utilizando el método del periodograma con una ventana rectangular [7]. La tensión y corriente de salida del SI1287 se digitalizan mediante un conversor analógico-digital (CAD) localizado en la plaqueta multifunción (16 bits, rango dinámico seleccionable) a frecuencia de muestreo variable. La longitud de la señal se elige de modo que haya una separación de al menos cinco muestras entre armónicos. Si bien la estimación espectral se realiza para todo el rango, solo se almacenan los primeros cinco armónicos.

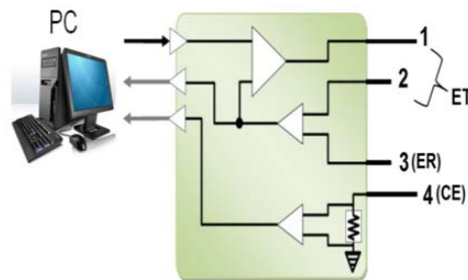


Figura 3. Espectrómetro no-lineal conectado a PC. Se muestra la conexión frontal del SI1287 y las terminales donde se conectan.

3) Protocolo de pulido

El electrodo de Au fue pulido en sucesivos pasos según el esquema mostrado en la tabla 1. El acabado de 1 μm se logró puliendo primero con pasta de diamante de 6 μm (paso 1), luego con pasta de diamante de 3 μm (paso 2) y finalmente con polvo de alúmina (paso 3). El tamaño del grano corresponde a la norma europea FEPA estándar 43-GB-1984 (R1993) [8].

TABLA I. PROTOCOLO DE PULIDO.

Nº de Pasos	Tipo de abrasivo	Tamaño del grano (μm)
1	Pasta de Diamante Prazis®	6
2	Pasta de Diamante Prazis®	3
3	Polvo de Alúmina	1

B. Preparación biológica

En los experimentos realizados se emplearon los siguientes medios:

1. Medio Salino (MS): 20 mM de KH₂PO₄, 30 mM KCl y 1 mM de MgCl₂ a pH 6.5.

2. Suspensión celular (Sc): Se obtuvo agregando 3.7 g de levadura seca (Levex®) en 15 mL de MS.

La suspensión celular se centrifugó durante 10 min a 4000 revoluciones/min y se descartó el sobrenadante. Nuevamente se agregó 15 mL de MS y se agitó magnéticamente. Este proceso se llevó a cabo con el objeto de eliminar los componentes iónicos propios del material biológico y agregados que pudiese contener la levadura comercial [9].

C. Protocolo experimental

1) Voltamperometría cíclica

Se realizó una voltamperometría cíclica del electrodo de Au en medio MS. El barrido de tensión se llevó a cabo entre -1V//1V vs reference.

2) Experimentos No Lineales

Experimentos con espectrómetro no lineal: Se utilizó el espectrómetro no lineal ya descrito. Se realizó un barrido de tensión en AC (0-600 mV), sin polarización en DC, y un barrido en frecuencia (0.1-1000 Hz). La frecuencia de muestreo se tomó tal que los puntos de medición estén igualmente espaciado en escala logarítmica, tomando 10 puntos por década.

III. RESULTADOS

En la figura 4 se observa el voltamperograma del electrodo de Au en MS. La zona "lineal" del electrodo se encuentra comprendida entre -0,3 y 0,5 V. Por arriba de estos valores el electrodo responde de manera "no-lineal".

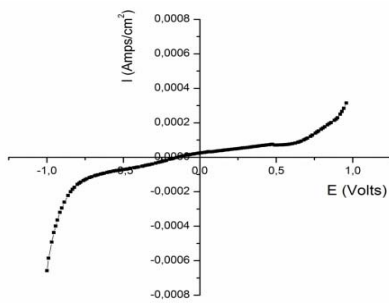


Figura 4. Voltamperograma electrodo de Au.

La figura 5 muestra el barrido de frecuencia y tensión, realizado con el espectrómetro no lineal, del electrodo de Au en medio salino (figura 5a) y del electrodo de Au en MS + SC (figura 5b). En la figura “a” se observa un comportamiento no lineal a tensiones altas y frecuencias entre 2 Hz y 300 Hz, el cual corresponde a la interfase electrodo-electrolito. Al agregar la levadura, el rango de frecuencias en el cual se observa la no-linealidad disminuye (5-300 Hz) así como también el rango de tensión (pasa de 500-600 mV a 400-600 mV). Las superficies están vistas desde la parte superior (en la dirección del eje Z) para una mejor visualización.

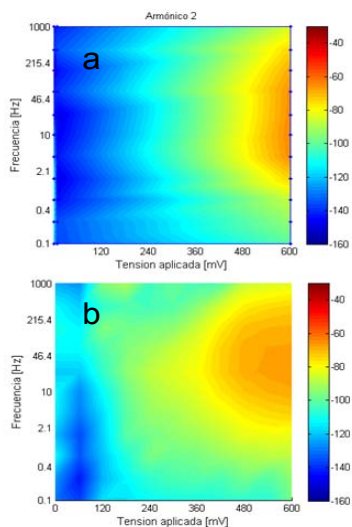


Figura 5. a) Segundo armónico para electrodo de Au en MS, b) Segundo armónico para electrodo de Au en MS + SC.

El mismo estudio se realiza con el armónico 3 (figuras 6a y 6b). En este caso el comportamiento no lineal se observa entre 480-600 mV y 0,4-46,4 Hz para el electrodo sin levadura, mientras que cuando se agrega levadura la no linealidad se desplaza a 400-600 mV y 5-46,4 Hz.

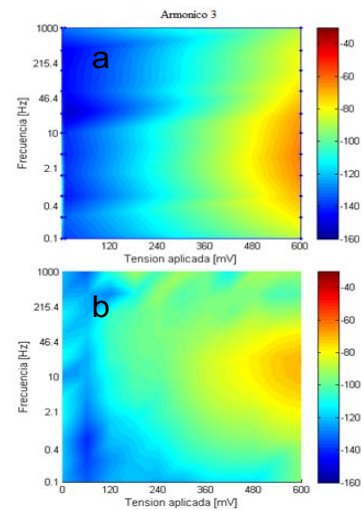


Figura 6. a) Tercer armónico para electrodo de Au en MS, b) Tercer armónico para electrodo de Au en MS + SC.

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La voltamperometría del electrodo de Au (Figura 4) es muy importante al momento de estudiar las propiedades no-lineales de una suspensión biológica. Dentro de la zona “lineal” del electrodo (comprendida entre -0,3 y 0,5 V en la figura 4) es de esperar que cualquier perturbación que se realice al sistema, tendrá una respuesta proporcional a la perturbación aplicada. Cuando las células de levadura se adhieren al electrodo, se produce una disminución significativa en la intensidad de los armónicos observándose, por ejemplo, una disminución de más del 50% en la intensidad del armónico 3.

Los cambios observados, pueden explicarse considerando que la presencia de levaduras produce un efecto de apantallamiento en la interfase electrodo-electrolito. Por lo tanto, al no aplicarse sobre la interfase la totalidad de la tensión de trabajo, se obtiene una interfase más lineal. Prueba de esto es la disminución observada en los armónicos de la interfase.

Esta “modulación” de la interfase electrodo-electrolito, observada en estos resultados, coincide con lo publicado por Treo [3] quien sugiere que los cambios registrados en la amplitud del tercer armónico se deben a la modulación de la interfase electrodo-electrolito por parte de los microorganismos.

Cuando se agrega SC al electrodo de Au, se observa un cambio importante en los espectros de frecuencia del segundo y tercer armónico. En la figura 12a y 12b se registra, a 480 mV de tensión y 24 Hz de frecuencia, un aumento de 13 dB en la intensidad del armónico (datos no mostrados), luego de agregar SC. Si realizamos el mismo análisis para el tercer armónico, veremos un aumento de 10 dB en la amplitud del mismo.

Las mediciones de impedancia se llevaron a cabo controlando la tensión efectiva que cae sobre la capa de células adheridas al electrodo. Previo a cada experimento realizado con el espectrómetro no lineal, se monitoreó el cambio en la impedancia a 2Hz al agregar la suspensión de levaduras. Para el electrodo de Au se obtuvieron cambios en la impedancia alrededor del 35-47%, lo que significa que

del total de la tensión aplicada, ese porcentaje de tensión será efectivo sobre la capa de células. En los trabajos de Treo y Ruiz [3; 6] no se controló la tensión que cae sobre la capa de células. En estos, la variación de la impedancia al agregar la suspensión de microorganismos era cercana al 6%. Por lo tanto, en estos trabajos la no-linealidad de interfase enmascaraba la respuesta no-lineal de la suspensión biológica.

De esta manera, al poder controlar la no-linealidad de interfase, la respuesta no-lineal que observamos en las figuras 5b y 6b, sería la no-linealidad pura del material biológico. A este nuevo método lo denominamos “Espectroscopía 3D de admitancia no-lineal”.

REFERENCIAS

- [1] Woodward, A.M., Kell, D.B., 1990. *On the nonlinear dielectric properties of biological systems: Saccharomyces cerevisiae*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 24, 83-100.
- [2] Astumian, R.D., Robertson, B., 1989. *Nonlinear effect of an oscillating electricfield on membrane proteins*. The Journal of Chemical Physics 91, 4891-4901.
- [3] Treo, E. F., *Estudio de los Espectros de Impedancia Dieléctrica No-Lineal de suspensiones Biológicas y su Aplicación en el Monitoreo de Proteínas de Membrana*, Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, editada por la Universidad Nacional de Tucumán, (UNT, Tucumán, 2009).
- [4] McShea, A., Woodward, A.M., Kell, D.B., 1992. *Non-linear dielectric properties of Rhodobacter capsulatus*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 29, 205-214.
- [5] Woodward, A.M., Kell, D.B., 1991. *On the relationship between the nonlinear dielectric properties and respiratory activity of the obligately aerobic bacterium Micrococcus luteus*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 26, 423-439.
- [6] Ruiz G.A., Felice C.J., *Fast nonlinear región localisation for nonlinear dielectric spectroscopy of biological suspensions*, Biosensors and Bioelectronics 49 (2013)341–347.
- [7] Welch, P., “*The use of fast Fourier transform for the estimation of power spectra: A method based on time averaging over short, modified periodograms*”, IEEE Transactions on Audio and Electroacoustics, 15, 70-73, 1967.
- [8] <http://www.buehler.com/>
- [9] Bekatorou A., Psarianos C., Koutinas A., *Production of Food Grade Yeasts*, Food Technol. Biotechnol. 44 (3) 407–415 (2006).



Martín Zamora received the biotechnologist degree from the National University of Tucumán, Argentina, and is a PhD student in Impedance Spectroscopy at the Laboratory of Medium and Interfaces.



Matías Trujillo received the Engineer degree in Biomedical Engineering from the National University of Tucumán, Argentina. He is a PhD student in Biosensors at the Laboratory of Medium and Interfaces.



Carmelo Felice received his PhD from the National University of Tucumán (UNT) in 1995. He is a professor at the UNT, a Senior researcher for the National Research Council (CONICET) and the director of the Laboratory of Medium and Interfaces.