

Di Tocco Aylén¹, Boffadossi Micaela¹, Robledo Sebastián Noel², Fernández Héctor¹, Zon María Alicia¹, Arévalo Fernando Javier¹

¹Grupo de Electroanalítica (GEANA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Instituto para el desarrollo agroindustrial y de la salud (IDAS). Río Cuarto (CP X5804BYA), Córdoba, Argentina.

²Grupo de Electroanalítica (GEANA), Departamento de Tecnología Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Río Cuarto. Instituto para el desarrollo agroindustrial y de la salud (IDAS). Río Cuarto (CP X5804BYA), Córdoba, Argentina.

Introducción

El desarrollo de inmunosensores electroquímicos para la detección de contaminantes ambientales es de gran interés por su simplicidad, alta sensibilidad y intervalo analítico extendido. Debido a que el anticuerpo se inmoviliza sobre un electrodo, es importante conocer los parámetros cinéticos involucrados en la inmunoreacción sobre el mismo. En este trabajo se introduce el uso de la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) para determinar la cinética de la inmunoreacción en tiempo real.

Resultados y discusión

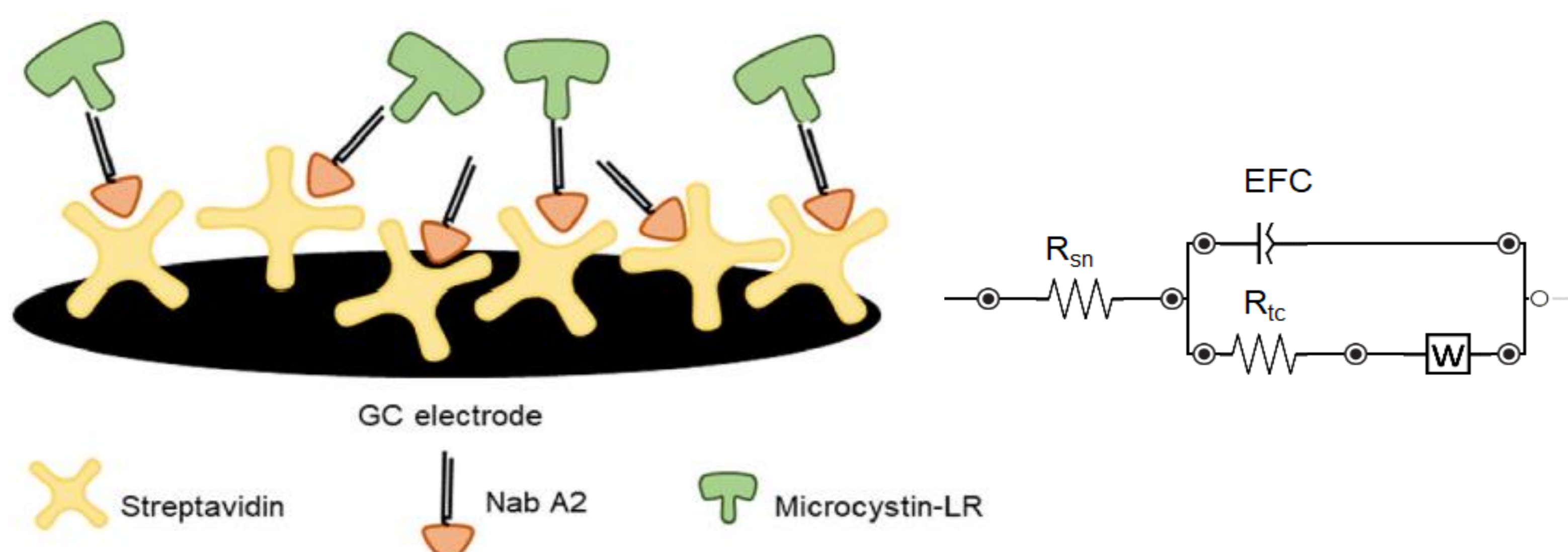
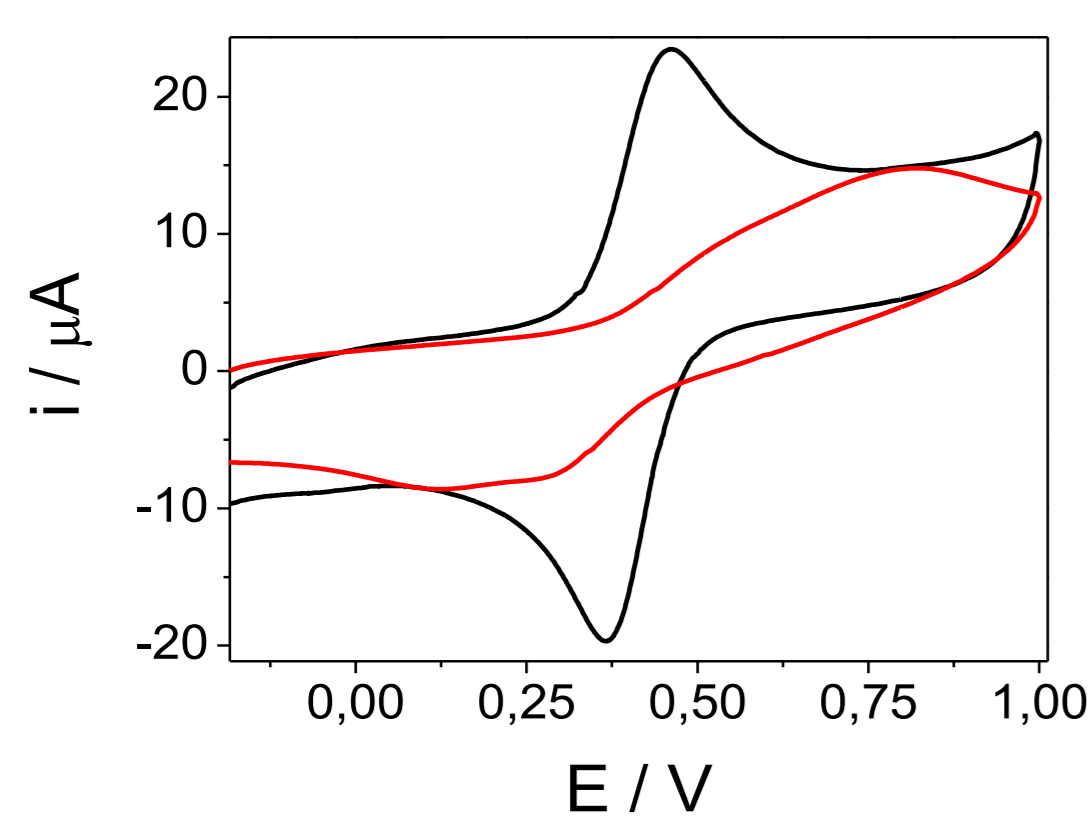


Figura 1. Representación esquemática del inmunosensor electroquímico para determinar microcistina-LR Nab A2/estreptavidina/electrodo CV.

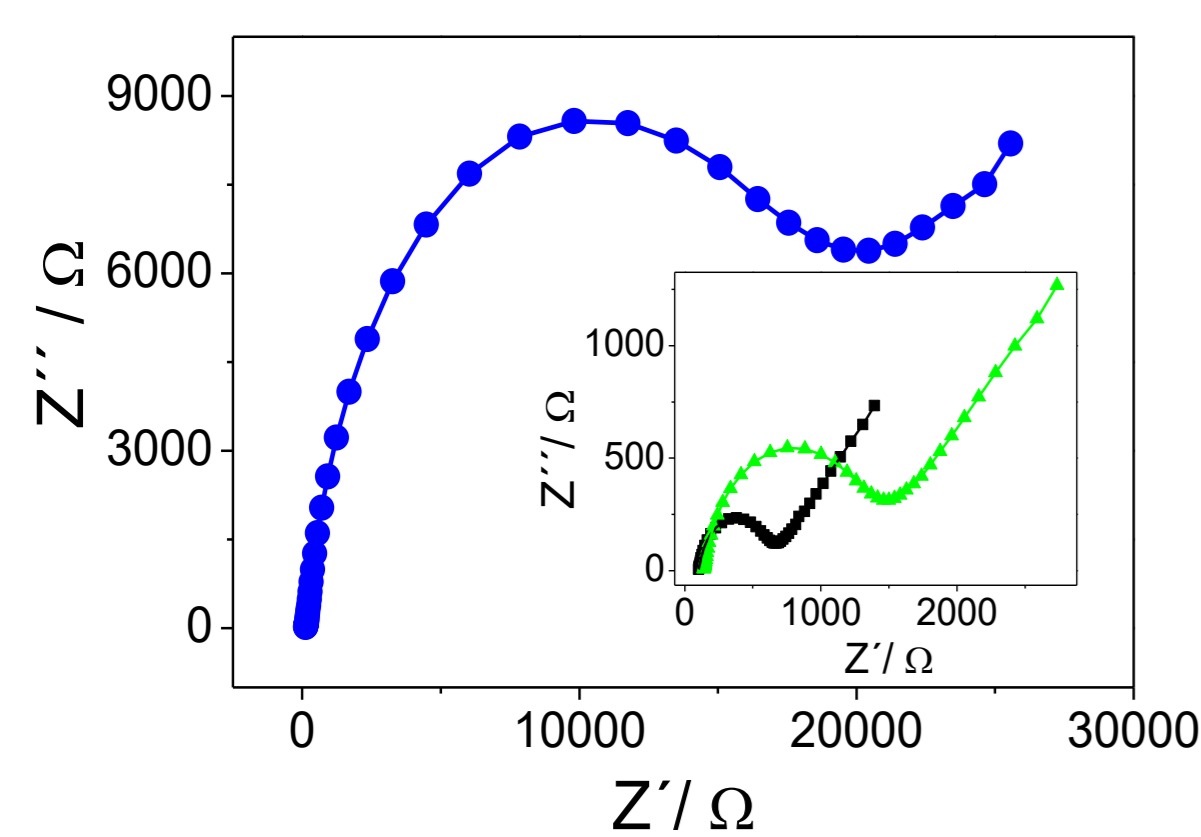
Activación de la superficie del electrodo. Generación de grupos oxigenados



La oxidación en medio alcalino genera una densidad mayor de grupos carbonílicos.

Figura 2. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para el electrodo de carbono vítreo en solución 1 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 + 0,1 \text{ M KCl}$ luego de su oxidación electroquímica en — 0,1 M NaOH y — 0,1 M H_2SO_4 . $v = 0,1 \text{ mV s}^{-1}$.

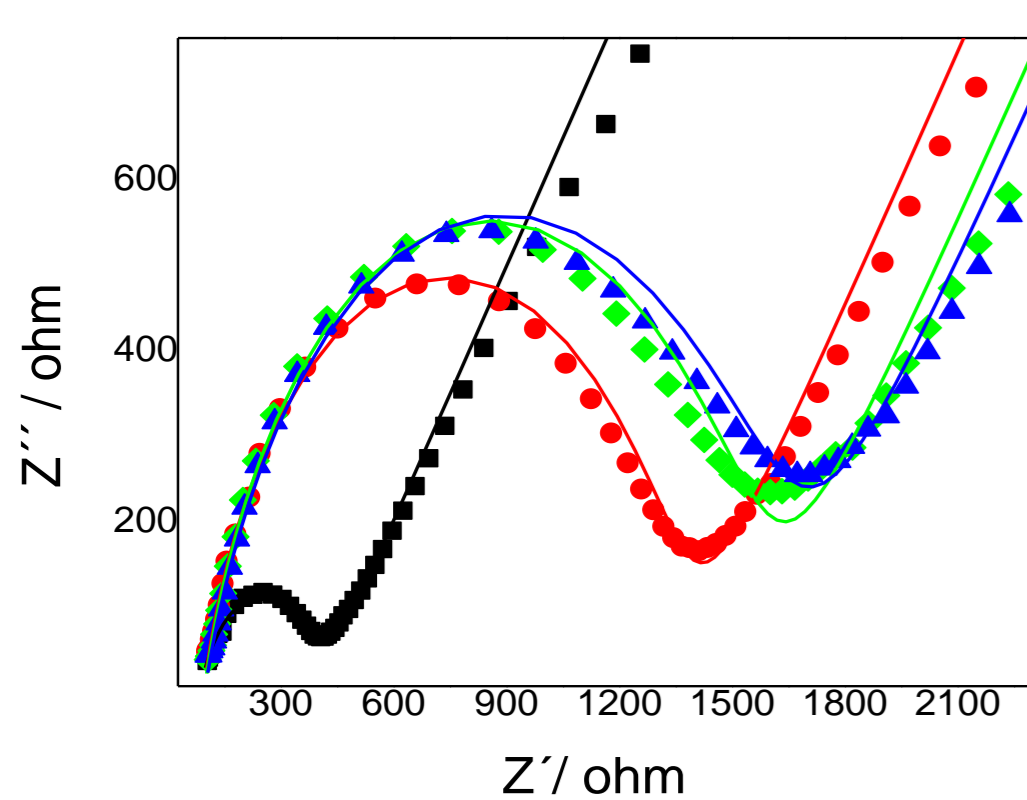
Elección de la concentración óptima de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ para realizar EIE



Se seleccionó una concentración de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-} = 5 \text{ mM}$.

Figura 3. Espectros de impedancia electroquímica obtenidos con el inmunosensor electroquímico empleando soluciones de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ de \blacksquare 10 mM, \blacktriangle 5 mM y \bullet 1 mM, en 0,1 M KCl.

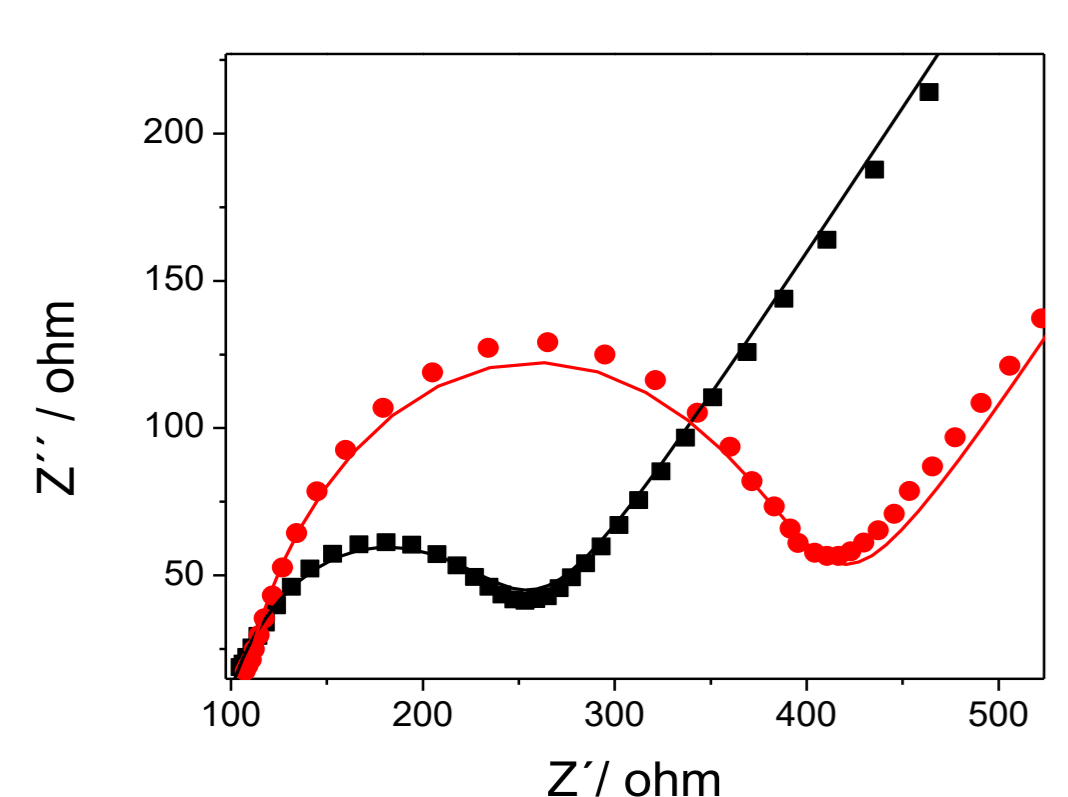
Elección de la concentración óptima de Nab A2



Se seleccionó una concentración de Nab A2 = $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 4. Espectros de impedancia electroquímica obtenidos para el armado del inmunosensor electroquímico usando concentraciones de Nab A2 de \blacksquare 2,5, \bullet 5, \blacklozenge 10 y \blacktriangle 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Estudios de las etapas de la modificación de la superficie del electrodo



Aumento en la R_{ct} debido a la unión de STP en la superficie del electrodo.

Figura 5. Espectros de impedancia electroquímica obtenidos para \blacksquare electrodo CV y \bullet electrodo de STP/ CV. Concentración de STP = 100 mg mL^{-1} .

Materiales y métodos

Se utilizó un nano-anticuerpo anti MC-LR biotinilado (Nab A2), obtenido a partir de llama. Los reactivos estreptavidina (STP), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, Microcistina-LR (MC-LR) fueron adquiridos comercialmente. La técnica electroquímica empleada fue la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE).

Procedimiento

Oxidación de la superficie del electrodo de carbono vítreo en solución de NaOH por amperometría.

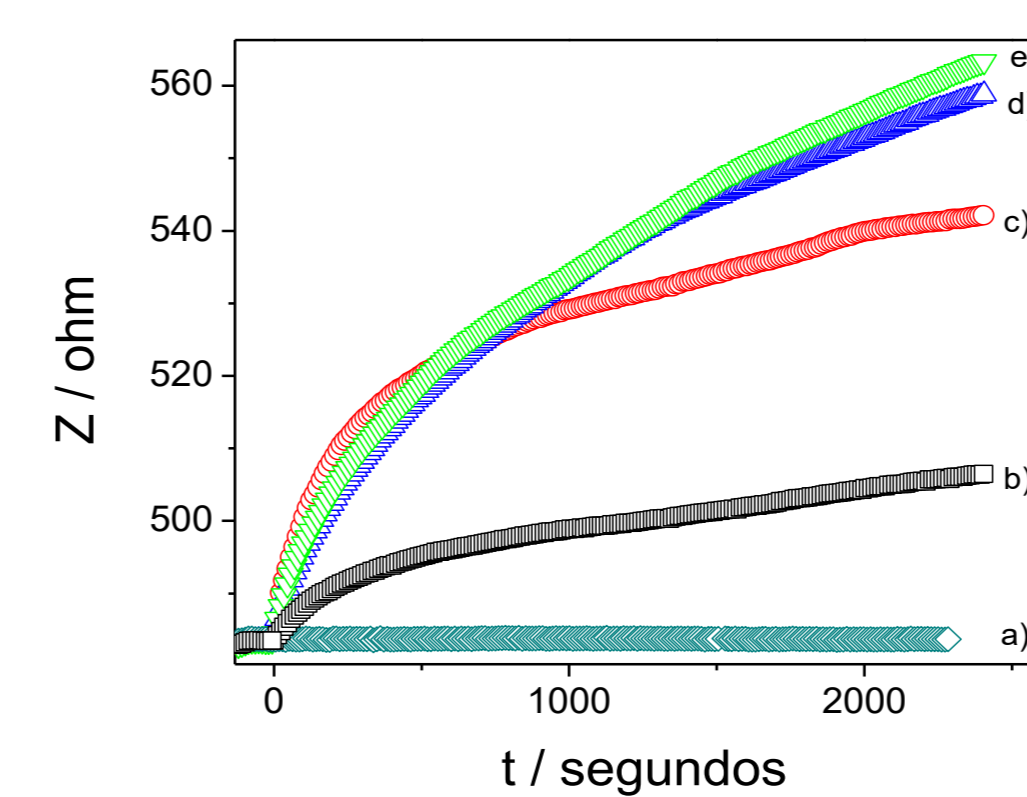
Inmovilización covalente de STP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) con los grupos carbonílicos del electrodo de carbono vítreo por la vía de EDAC/NHS.

Incubación del Nab A2 ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) para formar el inmunosensor electroquímico.

Incubación de la muestra de agua con MC-LR durante 30 min.

Medición por EIE aplicando una amplitud de potencial de 15 mV alrededor del potencial de equilibrio del par redox.

Determinación por EIE de la k_{as} y k_{dis} entre Nab A2 y MC-LR



La reacción obedece una cinética de primer orden

Figura 6. Variación de la impedancia electroquímica a una $f = 80 \text{ Hz}$ para concentraciones de microcistina-LR. a) 0, b) 0,01, c) 0,1, d) 1 y e) 10 ng mL^{-1} .

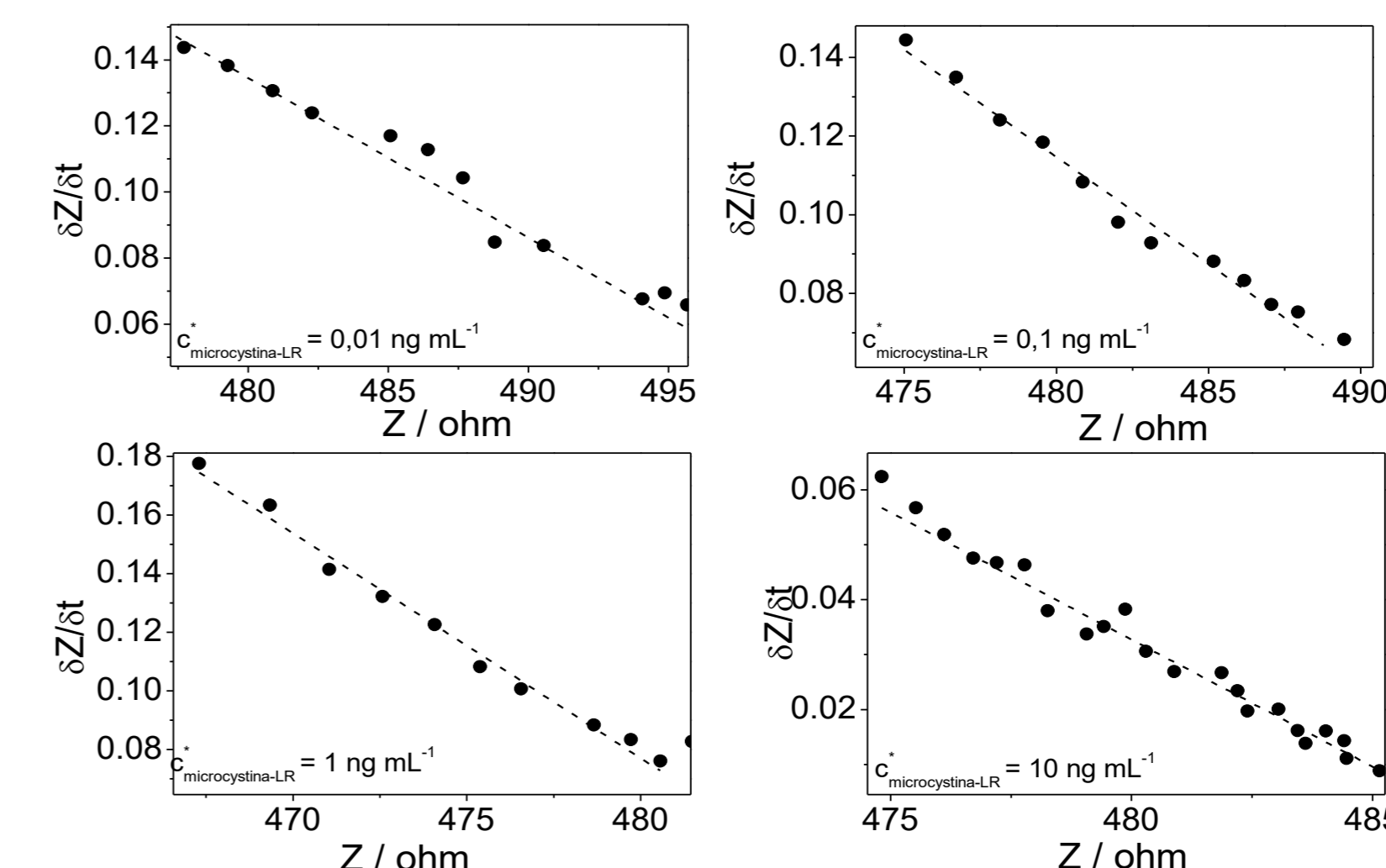
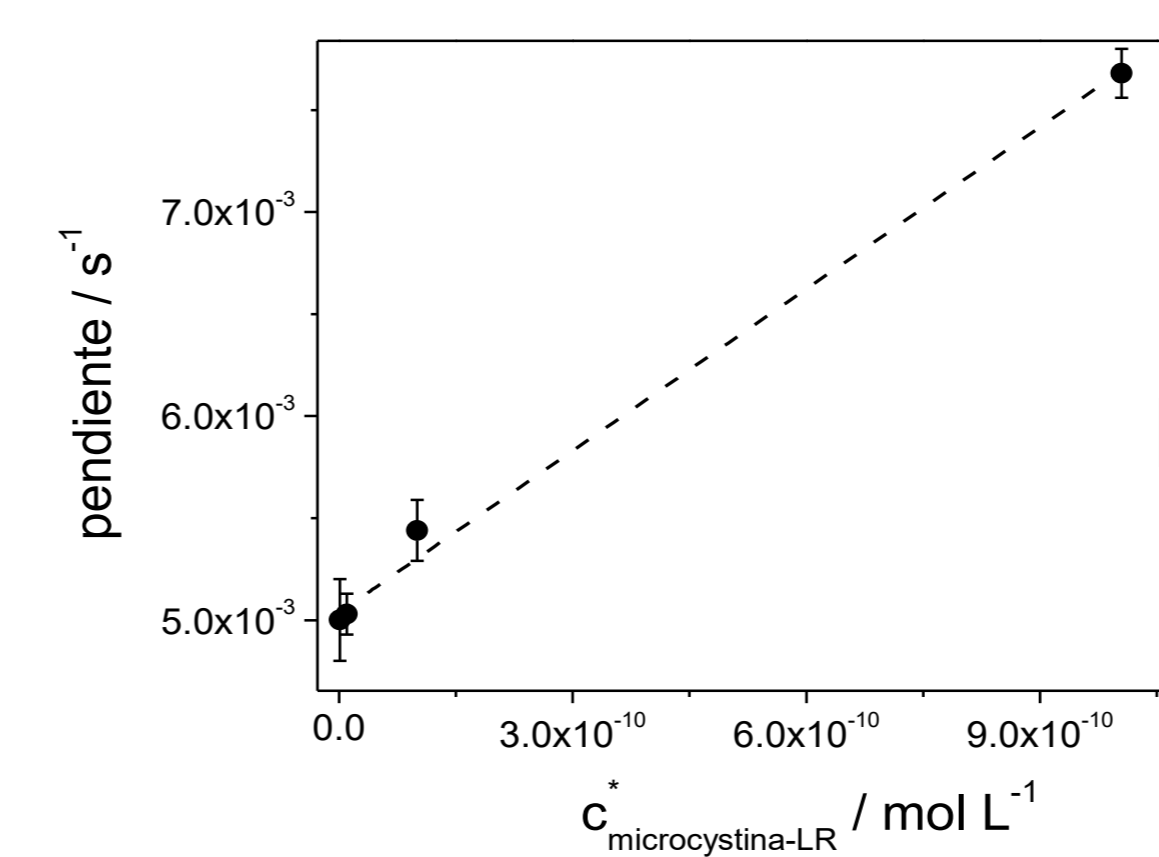


Figura 7. Variación de $\delta Z / \delta t$ a diferentes concentraciones de microcistina-LR.



Las pendientes obtenidas de el $\delta Z / \delta t$ frente a Z para cada sensograma impedimétrico se graficaron en función de la concentración la microcistina-LR.

Figura 8. Análisis cinético de microcistina-LR unida a Nab A2. Cada punto es el promedio de tres mediciones repetidas.

A partir de:

$$\frac{\partial Z}{\partial t} = \text{pendiente} * Z$$

$$\frac{\partial Z}{\partial t} = k_{as} * C_{MC-LR}^* + k_{dis}$$

$$k_{as} = (1,4 \pm 0,3) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{dis} = (2,0 \pm 0,5) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$K_D = (1,4 \pm 0,9) \text{ nM}$$

Conclusiones

Se logró desarrollar una nueva metodología para determinar los parámetros cinéticos de una inmunoreacción que permitirá optimizar la inmovilización de anticuerpos en el electrodo y evaluar posibles cambios en la afinidad de los anticuerpos tras la inmovilización. Esta metodología se puede aplicar a electrodos de diferentes materiales en la construcción de inmunosensores, mostrando una gran ventaja sobre la resonancia de plasmón superficial y la microbalanza de cristal de cuarzo.

Agradecimientos: La Ing. Aylén Di Tocco agradecen a CONICET por su beca doctoral. Los autores también agradecen a FONCYT, CONICET y a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNRC por su aporte financiero que permitieron llevar a cabo este trabajo.