

# BIOSENSORI AD INIBIZIONE PER PESTICIDI

*Walter Vastarella, Roberto Pilloton  
Enea, Centro Ricerche Casaccia, SP061  
Santa Maria di Galeria, (Roma)  
walter.vastarella@casaccia.enea.it*

**Biomolecole geneticamente modificate sono state già impiegate per lo sviluppo di biosensori in analisi ambientali.**

In questo articolo sono riportati interessanti risultati raggiunti usando, su frutto contaminato da un pesticida, un biosensore a colina ossidasi, immobilizzata su elettrodi stampati, ed acetilcolinesterasi. Sono stati confrontati i risultati ottenuti con un lievito ingegnerizzato e con l'enzima commerciale, riducendo i tempi di incubazione e favorendo bassi limiti di rivelabilità.

**N**ello sviluppo di nuovi biosensori per il controllo di processi ambientali ove sono richiesti un continuo monitoraggio di particolari inquinanti e rapidi interventi nei casi di accertato inquinamento, è fondamentale il miglioramento delle caratteristiche tipiche di tutte le tecniche analitiche: sensibilità e selettività della risposta, stabilità del dispositivo di misura, facilità di utilizzo e bassi costi. Oggigiorno sono ampiamente diffusi biosensori ottici o elettrochimici a stato solido estremamente pratici ed economici che possono indifferentemente essere riutilizzati per successive misure o destinati al singolo uso. In particolare i biosensori a elettrodi stampati si prestano molto alla diffusione su larga scala di strumenti maneggevoli, che nascondono nella loro progettazione una complessità multidisciplinare intrinseca (1).

Una delle richieste più pressanti nelle prime fasi di screening di inquinanti è quella di effettuare diverse misure contemporaneamente sulla stessa matrice, più o meno complessa, per avere un responso statisticamente valido, conservando comunque un'elevata specificità nella risposta. In questo articolo riportiamo un'applicazione interessante nel monitoraggio di pesticidi organofosforici, basata sull'inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi (AcChE): l'attività residua dell'enzima immobilizzato su membrane in nylon commerciali è misura-

ta amperometricamente con un sensore ad elettrodi stampati basato su colina ossidasi (ChOx), determinando indirettamente la quantità di inibitore (pesticida) presente. È stato messo a punto un protocollo ove lo stadio di incubazione nel substrato è separato dalla misura finale ed è contemplata la possibilità di effettuare diverse analisi in parallelo o consecutivamente.

I risultati ottenuti usando l'enzima disponibile in commercio sono confrontati con una soluzione più economica, che prevede l'impiego di un lievito ingegnerizzato in grado di esprimere attività colinesterasica. Sono riportate misure preliminari su un chicco di uva, contaminato da una definita quantità di pesticida inibitore, e confronti elettrochimici fra biosensori basati sull'elettrodo commerciale ad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quale metodologia di riferimento, e su elettrodi stampati in grafite (SPGEs).

## **Tossicità e limiti consentiti per i pesticidi**

I pesticidi, soprattutto quelli di ultima generazione, sono tuttora utilizzati in agricoltura, in virtù della loro efficacia e della degradazione in ambiente relativamente veloce. Il problema reale è legato al fatto che il loro processo di riciclo e di distribuzione nell'atmosfera provoca danni irreversibili sugli organismi viventi quando permangono nei suoli e nelle acque per un tempo sufficientemente lungo da alterare

la catena alimentare (2, 3). Agiscono principalmente sul sistema nervoso centrale e periferico, inibendo i siti attivi di determinati enzimi o bloccando l'attività di alcuni meccanismi cellulari. In particolare, è stato ampiamente dimostrato che i pesticidi organofosforici (OPs) attaccano ed inibiscono le colinesterasi, coinvolte nella fisiologia dei muscoli e del sistema nervoso (4-10).

Per alcuni di questi composti, ed in generale per i residui di sostanze attive dei prodotti fitosanitari, esistono delle severe normative internazionali che stabiliscono i limiti massimi tollerati e gli intervalli di sicurezza (11, 12). Risale già al 1980 un decreto europeo (European Drinking Water Act) che stabilisce come limite massimo di concentrazione globale di pesticidi nelle acque potabili un valore di 0,1 ng mL<sup>-1</sup>, mentre nel settore ortofrutticolo i limiti massimi di tali residui (contenuto in mg per kg) variano a seconda della tipologia di prodotto (13). La quantificazione di bassi tenori di pesticida resta una problematica analitica aperta quando si è in presenza di sostanze interferenti presenti nella matrice da analizzare. HPLC, GC-MS, ELISA sono metodologie d'analisi comunemente utilizzate per la loro rapidità e sensibilità, ma prevedono comunque costi e tempi ancora troppo sfavorevoli; sono inoltre tecniche relativamente poco selettive e non forniscono alcuna informazione diretta degli effetti dannosi sulla salute umana (14-16).

La tecnologia dei biosensori con elettrodi stampati può aiutare nella misura della tossicità di un inibitore, attraverso la valutazione dell'attività residua di uno specifico enzima dopo esposizione a differenti OPs. Sono piuttosto recenti i risultati sulla progettazione di dispositivi a base di acetilcolinesterasi (17) o di organofosforilasi (18, 19) specifici per paraoxon, metil-paration e diazinon, ove si è già scesi a limiti di rivelabilità (LOD) dell'ordine delle micromoli L<sup>-1</sup>.

### Screen Printed Electrodes - Elettrodi stampati

La tecnologia dello strato spesso (TFT) (20), comunemente adottata nel settore della microelettronica e per la creazione di circuiti integrati, ha aperto la strada verso la diffusione su vasta scala di biosensori monouso, portatili e a basso costo di produzione. Nella Figura 1 sono riportati alcuni esempi di configurazioni elettrodiche create grazie alla TFT presso i nostri laboratori. Gli elettrodi sono stampati secondo un tipico processo in cui una pasta (o un inchiostro) viene stratificata sulla superficie posteriore di uno schermo, sotto il quale viene posta la lastrina in PVC. Una spatola flessibile con bordo inclinato, esercitando una pressione sulla superficie, porta lo schermo a contatto con il substrato, mentre le maglie dello schermo si allargano e "dosano" la quantità di inchiostro, a formare il disegno voluto. Per ottenere una precisa localizzazione dello schema stampato sul substrato e la deposizione a registro degli strati successivi è impiegata una stampante serigrafica il cui schermo è costituito da una rete a maglie finemente intessute, montata in tensione su di una cornice metallica, e su cui va impressa l'immagine desiderata di un circuito. Le paste utilizzate per la stampa di elementi sensibili sono composte

da almeno due ingredienti: un veicolo organico ed un componente attivo o funzionale. Il veicolo organico è una miscela di solventi volatili e polimeri (resine) necessari a mantenere le particelle di materiale attivo in una sospensione omogenea e con opportune proprietà reologiche.

Le stampe a strato spesso sono soggette spesso a cicli di essiccaimento e di cottura (sinterizzazione per i substrati ceramici) durante i quali il veicolo organico viene rimosso ed avvengono una serie di reazioni chimiche e fisiche che genereranno le proprietà elettriche finali delle paste. Si ricorre all'essiccaimento per rimuovere i solventi organici volatili e per fare aderire al supporto lo strato che ancora contiene leganti organici; questo stadio avviene a temperature relativamente basse (70-150 °C) e non dipende dalle condizioni di riscaldamento purché la velocità del processo sia tale da non causare un'evaporazione troppo violenta del solvente che possa danneggiare l'uniformità della stampa.

Solitamente si usano come paste conduttrici Pt, Ag/Pd, carbone drogato (con Rh o Pt), grafite. Laddove necessario è possibile usare delle paste polimeriche con diversi gradi di conducibilità. Spesso bisogna ricorrere ad opportuni trattamenti della superficie stampata, allo scopo di migliorare il responso elettrochimico, ed ottimizzare la riproducibilità. Sono state considerate all'uopo diverse soluzioni:

a) doping delle paste di grafite con metalli, ad esempio Pt o Rh, per migliorare le caratteristiche di conducibilità dell'elettrodo di lavoro (WE). È stato dimostrato che la sensibilità della risposta amperometrica all'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di un WE aumenta proporzionalmente con l'aumento del contenuto di metallo, fino allo 0,5%, nella pasta di grafite. L'inchiostro di carbonio può essere drogato anche con mediatori elettrochimici tipo ferrocene, sali complessi, blu di Prussia, o direttamente con enzimi;

b) trattamenti chimici, che risultano importanti nel ridurre i tempi di stabilizzazione ed incrementare sensibilità e riproducibilità degli elettrodi. Si è potuto constatare che gli elettrodi stampati impiegano tempi lunghi prima di raggiungere la stabilità della linea di fondo e sono stati sperimentati trattamenti di condizionamento della superfi-

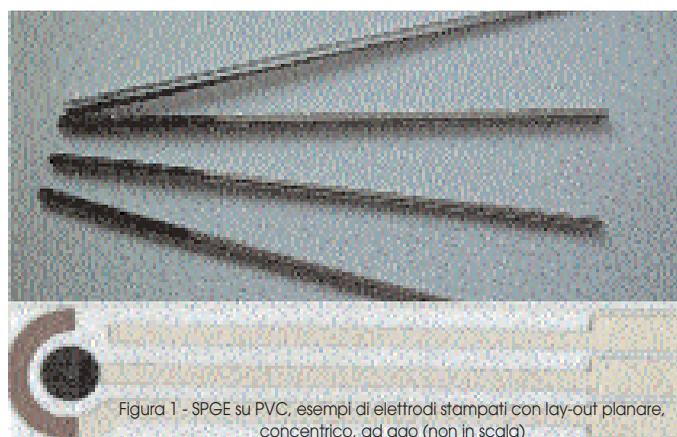


Figura 1 - SPGE su PVC, esempi di elettrodi stampati con lay-out planare, concentrico, ad ago (non in scala)

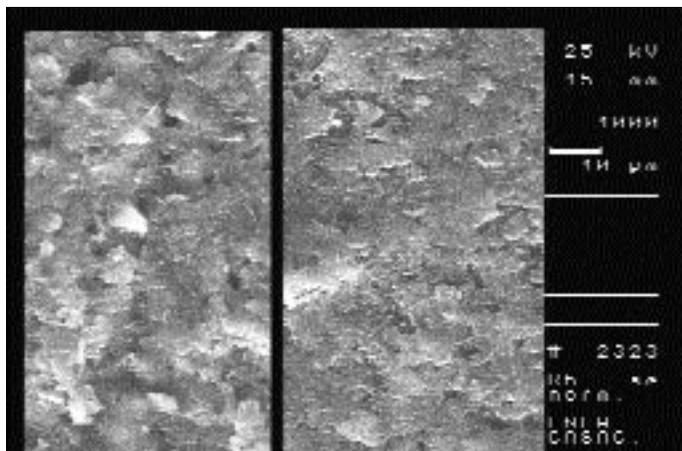


Figura 2 - Fotografie SEM di superfici di elettrodi di grafite pressati (destra) e non (sinistra); nel primo caso si nota un maggiore contatto fra i grani di grafite che generano una maggiore conducibilità

cie con cicli di pulizia a potenziale costante e con voltammetrie cicliche in soluzione a diversi pH. I trattamenti di pulizia superficiale dell'elettrodo rimuovono le impurezze presenti nelle paste conduttive, che si possono ossidare o ridurre ai potenziali di misura;

c) trattamenti fisici, in cui l'elettrodo è sottoposto a pressioni variabili. Si è verificato che il valore ottimale di pressione prima che avvenga una deformazione del supporto in PVC è di circa 100 kg cm<sup>-2</sup>, arrivando ad un incremento della conducibilità fino al 40%. Queste osservazioni sono ancora più evidenti confrontando la superficie degli elettrodi pressati e non, attraverso microscopia elettronica a scansione, SEM (Figura 2);

d) uso di membrane selettive, ampiamente diffuse coi biosensori elettrochimici di prima generazione, per risolvere i problemi di selettività.

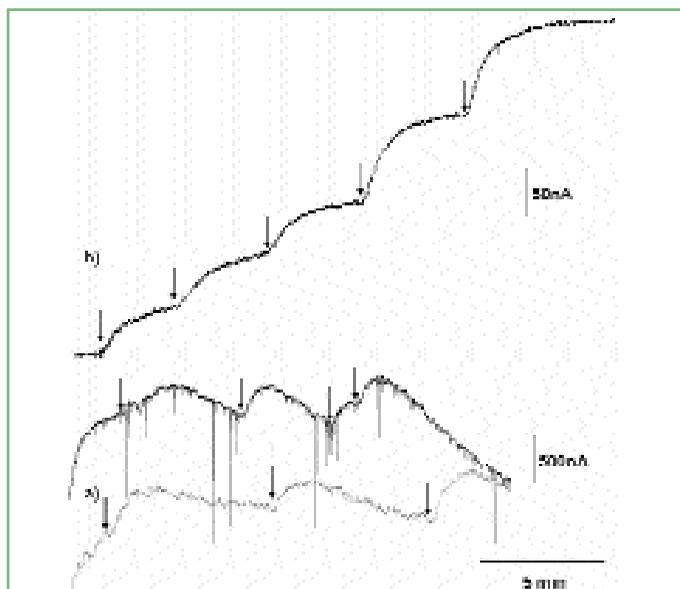


Figura 3 - SPE per la rivelazione di ossigeno in biosensori al glucosio in assenza (a) e in presenza (b) di una membrana di acetato di cellulosa. Le frecce verticali indicano le successive aggiunte di analita

vità. Sugli elettrodi stampati la procedura risulta meno efficace, per la difficoltà pratica e la scarsa stabilità meccanica della membrana. In Figura 3 è riportato un esempio di tale applicazione. Un biosensore a glucosio (glucosio ossidasi immobilizzata su elettrodo stampato), in assenza di qualsiasi membrana sulla superficie, mostra correnti elevatissime, un lungo tempo di stabilizzazione e una pronunciata deriva del segnale (3a): la pressione parziale dell'ossigeno prodotto che raggiunge la superficie dell'elettrodo nudo influisce negativamente sul segnale che risulta rumoroso e instabile. Se viene stratificata una membrana sull'elettrodo stampato che limiti la diffusione dell'O<sub>2</sub> (come succede negli elettrodi di Clark), si possono osservare una linea di base stabile, una correlazione lineare fra corrente e concentrazione di glucosio ossidato, uno stato stazionario stabile dopo ogni aggiunta e una maggiore sensibilità (3b).

### Rivelazione dei pesticidi con AcChE purificata

I biosensori basati sull'AcChE prevedono procedure di monitoraggio facili e veloci, con rivelazione potenziometrica (pHmetri differenziali, ISFET, Light Addressable Potentiometric Sensors) o amperometrica con elettrodi in carbone modificato o SPEs a colina ossidasi. In tutti questi casi l'attività residua dell'AcChE viene rivelata nella stessa soluzione ove è effettuata l'incubazione dell'inibitore. Tuttavia restano limitazioni legate alla frazione di enzima adsorbito, che può produrre un effetto memoria, alle interferenze di eventuali specie elettroattive ed alla scarsa stabilità del sensore stesso. Recentemente è stato sviluppato un protocollo di controllo del paraoxon in acque reflue usando un biosensore ove lo stadio dell'incubazione viene separato dalla fase di misura vera e propria nella soluzione standard, evitando l'ausilio di membrane selettive (21). Il basso LOD (0,1 ppb), l'elevata riproducibilità delle misure, e i bassi tempi di analisi (4,5 minuti per campione con possibilità di operare su campioni in parallelo) sono i principali risultati conseguiti, in aggiunta al fatto che il biosensore può essere utilizzato per centinaia di analisi consecutive. Sulla base di tale protocollo di lavoro riportiamo di seguito una procedura ottimizzata ed estendibile al controllo di qualsiasi composto OP con biosensori ad inibizione.

L'AcChE, che catalizza l'idrolisi dell'acetilcolina a colina secondo la reazione (1), viene immobilizzata per via covalente su una membrana preattivata in nylon (Pall Inc. Italia):



Le membrane vengono lavate e messe ad incubare in soluzione tamponata di acetilcolina cloruro 10<sup>-3</sup> M, in un semplice apparato a 24 pozzetti (Figura 4), con un consistente abbassamento dei tempi di analisi. L'attività catalitica di AcChE è inibita dai composti OPs, quali ad esempio il paraoxon stesso, che è stato preso come pesticida di riferimento. L'attività residua dell'enzima dopo esposizione all'inibitore viene quindi misurata in condizioni di flusso con un biosensore elet-

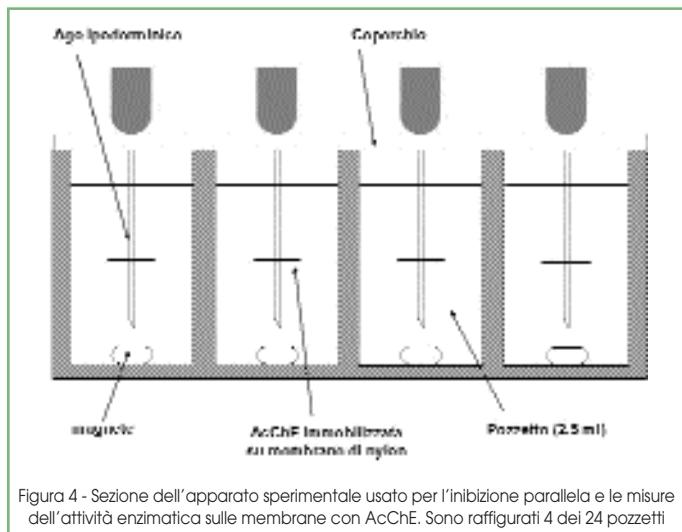
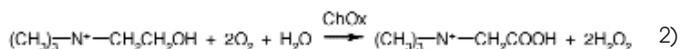


Figura 4 - Sezione dell'apparato sperimentale usato per l'inibizione parallela e le misure dell'attività enzimatica sulle membrane con AcChE. Sono raffigurati 4 dei 24 pozzetti

trochimico stampato a colina ossidasi (ChOx), sfruttando l'ossidazione catalitica a betaina della colina prodotta nella prima reazione e la produzione dell'acqua ossigenata sull'elettrodo di lavoro (come riportato nella (2):



Il biosensore a ChOx è stato ottenuto ricoprendo il WE con una membrana di acetato di cellulosa e successivamente immobilizzando in modo covalente l'enzima con poliazetidina sullo stesso elettrodo. Una membrana per dialisi è stata successivamente posta sopra la prima. Tipiche curve di calibrazione per concentrazioni crescenti di colina sono riportate in Figura 5: dal confronto fra il responso ottenuto usando un elettrodo commerciale al platino e i nostri SPEs risulta che i biosensori basati su elettrodi stampati in grafite mostrano maggiore sensibilità e riproducibilità. Si è lavorato in un intervallo di concentrazioni di paraoxon fra 10 e 75 ppb a differenti tempi di incubazione dell'enzima. Le misure sono state condotte sulla superficie di un acino di uva contaminato spruzzando una soluzione 0,5 ppm di paraoxon in etanolo. Come riportato in Figura 6 la membrana Pall contenente AcChE è stata deposta sul frutto contaminato, favorendone l'adesione sul chicco con 10  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato 0,1 M.

Dopo le fasi di lavaggio ed incubazione, è stata misurata la concentrazione di colina, e dunque inversamente la capacità di inibire l'AcChE, usando il dispositivo in una cella a flusso. Con una riprodu-

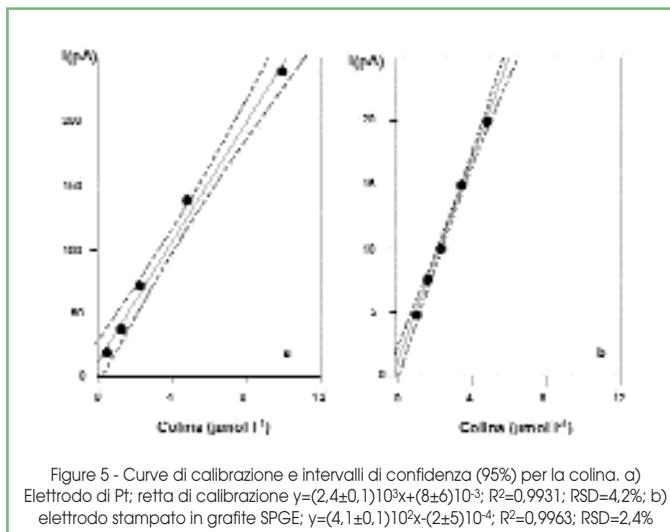


Figure 5 - Curve di calibrazione e intervalli di confidenza (95%) per la colina. a) Elettrodo di Pt; retta di calibrazione  $y = (2,4 \pm 0,1) \cdot 10^3 x + (8 \pm 6) \cdot 10^3$ ;  $R^2 = 0,9931$ ;  $RSD = 4,2\%$ ; b) elettrodo stampato in grafite SPGE;  $y = (4,1 \pm 0,1) \cdot 10^2 x - (2 \pm 5) \cdot 10^4$ ;  $R^2 = 0,9963$ ;  $RSD = 2,4\%$

cibilità analitica (preparativa e strumentale) entro il 4,5%, si è misurata una concentrazione di pesticida più alta sul fondo (+15%) rispetto alla sommità dell'acino d'uva. Come nella maggior parte dei frutti anche sull'uva è presente una membrana lipofila cerosa prodotta dalla parete, che lo protegge dall'ambiente esterno, ad esempio dalla perdita d'acqua e dagli attacchi di alcuni agenti patogeni. I differenti risultati ottenuti nelle varie zone sono dovuti allo scivolamento della soluzione di pesticida spruzzata sulla cuticola lipofila, fino a raccogliersi in fondo al frutto dove si misura una maggiore percentuale di inibizione.

### Rivelazione dei pesticidi con lieviti ingegnerizzati

La procedura applicata nel determinare gli OPs su frutto, effettuata immobilizzando l'enzima purificato, è stata estesa allo stesso sistema con un lievito geneticamente modificato (*Kluyveromyces Lactis*), in grado di esprimere l'attività colinesterasica sulle pareti di cellule di topo. Ciò permetterebbe una riduzione di costi nella preparazione dei biosensori, spesso legati al costo elevato degli stessi enzimi (22). Le cellule di lievito sono state fissate su una siringa per filtrazioni (filtri Whatman da 0,2  $\mu\text{m}$ ). Pompando una soluzione  $10^{-3}$  M di acetilcolina cloruro attraverso il filtro si è misurata la concentrazione di colina prodotta (secondo la sequenza di reazioni 1-2), in condizioni di flusso. È stata esaminata la risposta elettrochimica dell'ossidazione della colina in funzione del tempo di incubazione delle membrane nel substrato: l'andamento è proporzionale, ma un incremento superiore ai 30 minuti di incubazione non ha prodotto significativi miglioramenti (dati non riportati). Come si vede dalle curve di inibizione in Figura 7

### Anticholinesterase Activity on Grapes by Electrochemical Biosensors

ABSTRACT

Engineered biomolecules and cells immobilised on screen printed electrodes are already employed for biosensing purposes in environmental analysis. In this work an engineered yeast was used for detection of organophosphorous compounds. Enzyme was immobilised on a membrane and placed in solution, separating the incubation step from the sample measurement. Reduced analysis times and good limits of detection for paraoxon were obtained. The procedure was applied to determine inhibitors on fruits.

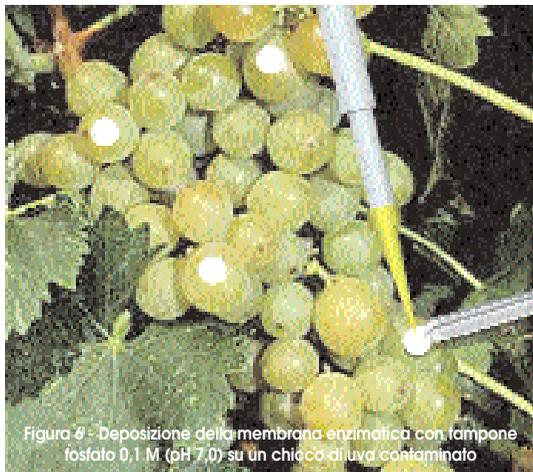


Figura 6 - Deposizione della membrana enzimatica con tampone fosfato 0,1 M (pH 7,0) su un chicco di uva contaminato

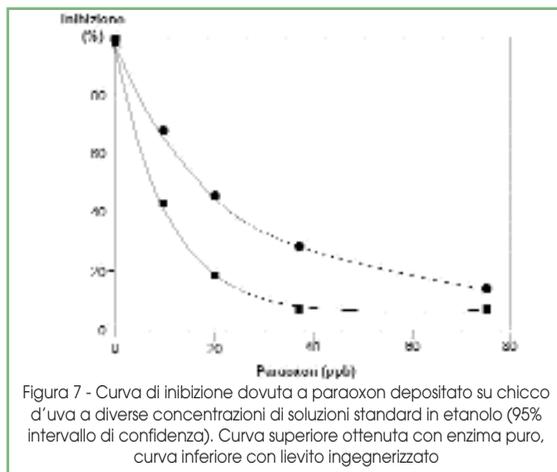


Figura 7 - Curva di inibizione dovuta a paraoxon depositato su chicco d'uva a diverse concentrazioni di soluzioni standard in etanolo (95% intervallo di confidenza). Curva superiore ottenuta con enzima puro, curva inferiore con lievito ingegnerizzato

il biosensore basato sul lievito geneticamente modificato ha dato risultati molto simili, nelle stesse condizioni sperimentali, a quello basato sull'enzima disponibile e reperibile in commercio.

## Conclusioni

L'accoppiamento della ingegneria genetica con la *thick film technology* ha consentito l'ampia diffusione di biosensori ad inibizione usa e getta, grazie principalmente all'elevata attività specifica di queste molecole ricombinanti e ai bassi costi di produzione di SPEs. È stato riportato un esempio applicativo di biosensore per la rivelazione di pesticidi organofosforici, che sfrutta il meccanismo di inibizione di particolari enzimi, dove una colinesterasi, o un lievito ingegnerizzato che esprime attività colinesterasica, sono accoppiati al sensore amperometrico SPE a colina ossidasi per la determinazione della diminuzione di attività enzimatica. L'AcChE è stata immobilizzata su una membrana e posta in soluzione, consentendo la separazione tra la fase d'incubazione nel substrato e la misura finale nella soluzione standard, e quindi evitando l'uso di membrane protettive. Con tale

sistema sono stati raggiunti limiti di rivelabilità di 0,1 ppb per il paraoxon (pesticida di riferimento) e rapidi tempi per effettuare analisi contemporanee anche su 24 campioni acquosi (270 s per campione), con una buona riproducibilità e la possibilità di riutilizzare consecutivamente il biosensore a colina ossidasi dopo la fase di lavaggio dell'inibitore. Il protocollo è stato anche applicato alla misura dell'attività AcChE su acini di uva contaminati. Il lievito ingegnerizzato al posto dell'enzima commerciale permette di ridurre i costi della preparazione ed immobilizzazione dell'enzima, senza perdere in prestazioni.

Va tuttavia ricordato che il metodo non consente la quantificazione assoluta di un singolo composto OP bensì una specificità dell'enzima per l'intera classe, per cui risulta scarsa la correlazione tra questo approccio e quello analitico classico. Il dato interessante è quello di poter disporre di un indice *apparente* di tossicità che tiene in considerazione l'attività enzimatica, e che in futuro dovrebbe contemplare informazioni provenienti da altri parametri coinvolti nell'adsorbimento dinamico del pesticida da tessuti animali (idrofobicità, cammino catabolico). Dal momento che l'assenza di falsi negativi è una delle richieste primarie nelle analisi ambientali, tale metodologia è un sistema preliminare affidabile, rapido ed economico per controllare e selezionare i campioni analitici a rischio. Le comuni tecniche analitiche restano tuttavia lo strumento principale di quantificazione, da usare in modo sinergico e complementare ai biosensori solo sui campioni risultati positivi ai primi test.

**Ringraziamenti:** Questo lavoro è stato realizzato grazie al progetto COSMIC ([www.biosensing.net](http://www.biosensing.net)). Si desidera inoltre ringraziare il prof. C. Palleschi del dipartimento di biologia cellulare dello sviluppo della Università di Roma "La Sapienza" per i suoi preziosi suggerimenti e per averci fornito il lievito ingegnerizzato *Kluyveromyces Lactis*.

## Bibliografia

- (1) F. Scheller, F. Schubert, Biosensors-Techniques and Instrumentation, in *Anal. Chemistry*, 1992, Elsevier, vol. 11.
- (2) A.W. Jury *et al.*, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1987, **99**, 119.
- (3) D.A. Laskowski *et al.*, *Residue Reviews*, 1983, **85**, 139.
- (4) K. Verscheuren, *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*, 2<sup>nd</sup> Ed., 1983, Van Nostrand Reinhold Comp. Inc. Publ.
- (5) T.M. Farahat *et al.*, *Occupat. & Environ Med.*, 2003, **60**(4), 279.
- (6) B. Bazylewicz-Walczak *et al.*, *Neurotoxicology*, 1999, **20**(5), 819.
- (7) C.S. Lu *et al.*, *Environ. Health Persp.*, 2001, **109**(3), 299.
- (8) P.Z. Ruckart *et al.*, *Environ. Health Persp.*, 2004, **112**(1), 46.
- (9) M.J. Gartrell *et al.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1986, **69**(1), 146.
- (10) F.P. Carvalho *et al.*, *J. Environ. Monit.*, 2002, **4**(5), 778.
- (11) U.S. EPA, 1988, Atrazine: Health advisory. Office of drinking Water, U.S. EPA Washington DC.
- (12) U.S. Federal Register, October 14, 1986, 51 FR 36634.
- (13) DM 22 gennaio 1998 del Min. della Sanità-Supplemento straordinario della GU n. 78 del 3 aprile 1998.
- (14) V. Pacakova *et al.*, *J. Chromatography*, 1996, **754**, 17.
- (15) P. Schneider *et al.*, *J. Agricultural Food Chem.*, 1994, **42**, 413.
- (16) P. Schneider, B.D. Hammock, *J. Agricultural Food Chem.*, 1992, **40**, 525.
- (17) I. Palchetti *et al.*, *Analytica Chimica Acta*, 1997, **337**(3), 315.
- (18) A. Mulchandani *et al.*, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 2246.
- (19) A. Mulchandani *et al.*, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4140.
- (20) N-M. White, *Thick film sensor: Thick film technology*, 1994, Elsevier, vol. 1, 3.
- (21) C. Cremisini *et al.*, *Analytica Chimica Acta*, 1995, **311**, 273.
- (22) D. Uccelletti *et al.*, *Biochim. and Bioph. Res. Comm.*, 2002, **298**, 559.