

STUDII EXPERIMENTALE FOLOSIND BIOSENZORI ENZIMATICI PENTRU DETECȚIA ELECTROCHIMICĂ A METALELOR GRELE

EXPERIMENTAL STUDIES USING THE ENZYMATIC BIOSENSORS FOR THE ELECTROCHEMICAL DETECTION OF HEAVY METALS

conf. univ. dr. *Mihaela Badea*¹, șef lucr. dr. *Laura Floroian, Ligia Chelmea, Claudia Faraian,*
conf. univ. dr. *Marius Moga*, prof.univ.dr. *Liliana Rogozea*¹

prof.univ.dr. *Jean Louis Marty*, prof.univ.dr. *Patrizia Restani*

¹Facultatea de Medicină, Universitatea „Transilvania” din Brașov

²Universite de Perpignan Via Domitia, Franta

³University of Milan, Italia

Autor corespondent: *Mihaela Badea*, email badeamihaela@yahoo.com

Abstract:

Identification of quick and cheap methods in order to analyse specific heavy metal ions has wide applications in analytical toxicology. Enzyme biosensors meet these requirements, and optimization of these detection methods is an area of actual interest for electrochemical research. We optimized the methods for detection of metal ions (cadmium and lead), which could be tested in future for real samples of water, food or biological fluids.

Key-words: cadmium, lead, biosensors, mutant acetylcholinesterase

Introducere

Compușii toxici (pesticide, metale grele) sunt incriminați în multe dintre mecanismele toxicologice datorită efectelor lor asupra biosistemelor. Riscul de toxicitate cronică a metalelor grele depinde de frecvența, intensitatea și durata contactului cu contaminantul, de calea de expunere [6]. Toxicitatea metalelor afectează diferite sistemele și poate determina simptomele specifice. Sistemul nervos central este deosebit de sensibil la contaminări cu metale.

Bariera placentară nu este complet impermeabilă la trecerea de substanțe nocive. Studii științifice au detectat metale grele nu numai în țesuturile placentare, dar și în lichidul amniotic și sângele din cordonul ombilical. Expunerea timpurie la Pb, Hg, Cd și a fost corelată cu efectele asupra sănătății infantile, cum ar fi neurologice, de dezvoltare, și tulburări endocrine [7]. Sunt necesare măsuri preventive pentru a elimina sau a reduce la minimum riscul de expunere a fătului la metale grele sau alte substanțe poluante în timpul sarcinii, o dată sunt identificate acestor factori [1]

Literatura de specialitate indică diferite variante de analize ale ionilor metalelor grele din diferite medii: spectrometrie de absorbție atomică (AAS) [8, 12, 13] ICP-MS (Inductively

coupled plasma mass spectrometry) [10, 11] ICP-AES [9], TLC (cromatografie pe strat subțire) [4].

În urma testării mai multor tipuri de biosenzori enzimatici, s-a remarcat faptul că biosenzorii care conțin mutante ale AChE de tip *Drosophilla melanogaster* sunt mai sensibili în reacțiile cu inhibitori decât cei care utilizează AChE comerciale (Electric eel) [2, 3].

Scopul lucrării îl reprezintă optimizarea de biosenzori enzimatici electrochimici pentru aplicații în toxicologie, analize de mediu sau studii privind calitatea alimentelor, datorită avantajului de a fi metode specifice, rapide și ieftine de detecție.

După optimizarea metodelor de detecție a ionilor metalici, acestea pot să fie testate și pe probe reale de ape, alimente sau lichide biologice.

Substanțe și aparatură

S-au utilizat:

- Substratul clorură de acetiltiocolină (ATCh) - Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, USA)
- Soluții standard de cadmiu și plumb 100ppm
- Toți ceilalți reactivi folosiți în determinări (acid acetic, acetat de sodiu, fosfat mono-

sodic, fosfat disodic) au fost de puritate analitică.

Aparate și consumabile

- Sistem de trei electrozi screen printați, realizați în cadrul Universității din Perpignan, Franța: electrod de referință (Ag/AgCl), electrod auxiliar (grafit) și electrod de lucru (de măsură) – conține imobilizată enzima pe un sistem de grafit care conține incorporat și un mediator electrochimic (cobalt ftalocianină-CoPTCN). Enzima utilizată a fost acetilcolinesteraza (AChE) de tip *Drosophila melanogaster* modificată genetic B394, obținută prin inginerie genetică cu ajutorul DNA recombinant. Depunerea s-a realizat prin metoda PVA cu un raport 70:30, în cadrul laboratoarelor IMAGE din Universitatea din Perpignan.
- Măsurătorile amperometrice s-au realizat utilizând un sistem AUTOLAB, PGSTAT12, EcoChemie, Olanda.

Mod de lucru

Stabilitatea operațională a biosenzorului

Stabilitatea operațională a biosenzorului s-a analizat prin injecții succesive ale aceleiași cantități de substrat în sistemul tampon, celula de lucru fiind spălată intensiv între determinări, cu apă distilată. S-a realizat un număr de 6 determinări pentru analiza statistică.

Stabilitatea în timp a semnalelor

Stabilitatea în timp a semnalelor s-a urmărit prin măsurarea răspunsului electrozilor confecționați în același set de probe, dar cu aceeași metodă de imobilizare a enzimei

Calibrarea electrozilor

S-a realizat prin injecții succesive în aceeași masă de sistem tampon a unor cantități cunoscute de acetiltiocolină. S-a urmărit variația semnalului electric corespunzătoare concentra-

ției finale a substratului enzimatic din masa de reacție.

Studii de inhibare enzimatică

S-a realizat analiza amperometrică pentru cazul de referință: enzimă imobilizată de traductorul imersat în sistem tampon acetat (pH 5,6) care conține 1mM acetiltiocolina. Operația s-a reluat de câteva ori pentru a avea răspunsul de referință.

Electrozii screen printați care posedă enzima de lucru imobilizată se incubează un anumit timp constant pentru un anumit tip de experiment (10 min, 15 min, 20 min), cu un amestec conținând sistem tampon și diverse concentrații de ion metalic. După incubare, electrozii s-au spălat intensiv cu apă distilată și s-a repetat testarea în prezența substratului specific enzimei.

S-au calculat gradele de inhibare (I%) corespunzătoare, ținând cont de variația răspunsului biosenzorului în absența și după incubarea în prezența pesticidului organofosforic [5]:

$$I\% = \frac{I_{\text{initial}} - I_{\text{după incubare cu ionul metalic}}}{I_{\text{initial}}} \cdot 100$$

unde

I_{initial} – intensitatea curentului inițial, în absența ionului metalic

$I_{\text{după incubare cu ionul metalic}}$ - intensitatea curentului după incubarea cu ionul metalic

Scăderea răspunsului biosenzorului este dată de inhibiția parțială sau totală a enzimei în prezența inhibitorului.

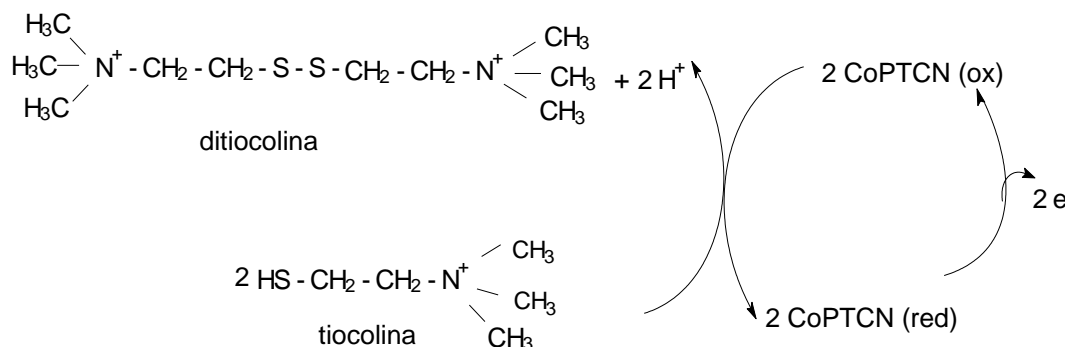
Rezultate experimentale

Funcționarea biosenzorului enzimatic are la bază reacția de hidroliză enzimatică a acetiltiocolinei în prezența acetilcolinesterazei:



Tiocolina obținută dimerizează în prezența mediatorului electrochimic, la un potențial de

lucru de 100 mV, constant față de Ag/AgCl.



Curenții obținuți au fost măsurați secvențial, obținându-se curbe experimentale de forma celei din Fig.1.

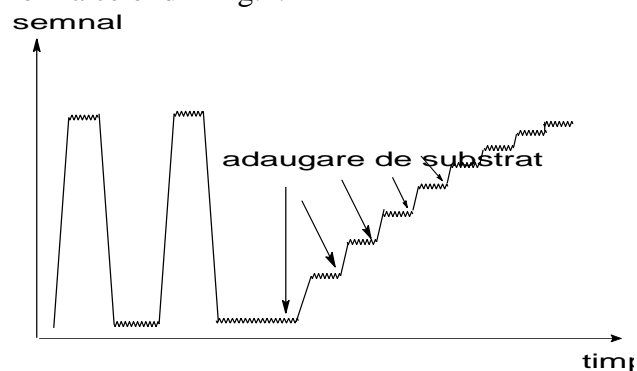


Fig.1. Calibrarea biosenzorului - Semnalele electrice generate de biosenzorul enzimatic la adăugare succesivă de substrat, la un potențial de lucru constant

Semnalele electrice obținute au fost reprezentate grafic pentru sistem tampon fosfat pH 7 (Fig.2.) și respectiv sistem tampon acetat pH 5.6 (Fig.3.)

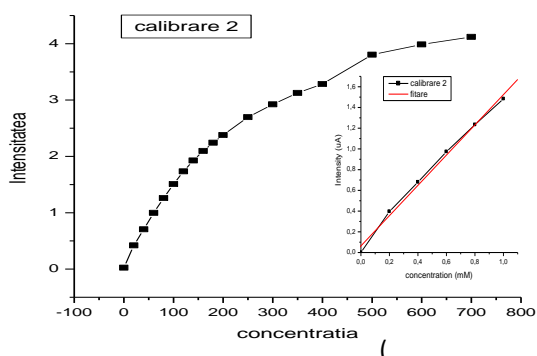


Fig.2. Calibrarea biosenzorilor care contin AChE mutantă B394 - sistem tampon fosfat pH 7

S-a observat un domeniu de liniaritate până la o concentrație de 1mM substrat, caracterizat de ecuația: $y = 1,4606 x + 0,06395$.

Coeficientul de corelație a fost aproape de valoarea unitară $R^2 = 0,99686$.

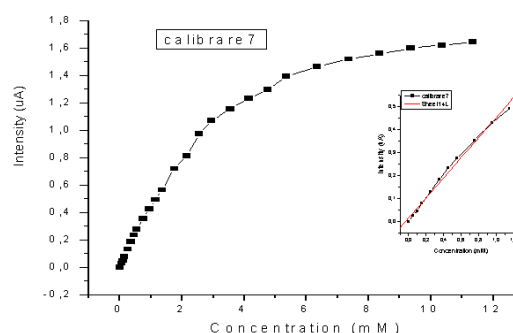


Fig.3. Calibrarea biosenzorilor care contin AChE mutantă B394 - sistem tampon acetat pH 5.6

S-a observat un domeniu de liniaritate până la o concentrație de 1.2mM substrat, caracterizat de ecuația: $y=0,43806 x + 0,01569$. S-a observat o creștere mai puțin accentuată a semnalului în funcție de concentrație, față de sistemul similar testat în mediul cu pH 7. Coeficientul de corelație a fost aproape de valoarea unitară $R^2 = 0,99567$.

Pe baza rezultatelor obținute, se poate concluziona că senzorii testați se pot utiliza și în studii de inhibare enzimatică, urmărind principiul prezentat în Fig. 4. Pentru testarea influenței inhibitoare a pesticidelor asupra sistemului enzimatic se recomandă analizele la pH 7, iar pentru testarea metalelor grele se recomandă testările experimentale la pH acid - sistem tampon acetat pH=5,6 - astfel încât acestea să fie în stare ionică.

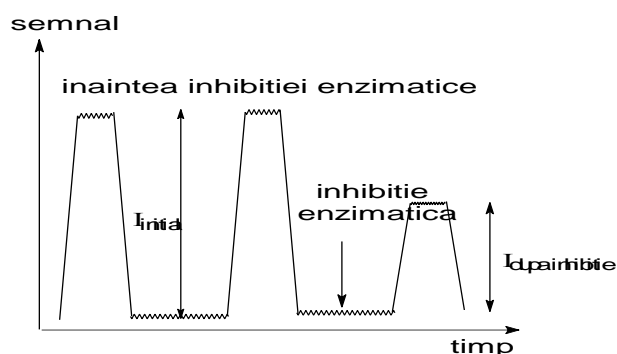


Fig. 4. Variația semnalului electric în studii de inhibiție enzimatică

Rezultatele obținute experimental la testarea influenței ionilor de cadmiu și respectiv de plumb în sistemul enzimatic care a utilizat acetilcolinesteraza de tip B394 imobilizată pe electrodul de lucru al traductorului electrochimic (pH=5,6) au fost sistematizate în tabelul 1.

Metal greu testat	Concentrația ionului metalic (µg/L)	Timp de incubare (min)	Grad de inhibare (%)
Cadmiu	400	10	62,5
	600	10	90,625
Plumb	200	15	8,92
	400	20	12,21

Tabel 1. Gradele de inhibare obținute la testarea ionilor de cadmiu și plumb (pH=5.6)

S-a observat acțiunea inhibitoare a ionilor testați. La aceeași concentrație s-au obținut valori mai mari ale inhibiției în prezența ionilor de cadmiu față de cei de plumb. Creșterea timpului de incubare a indicat o creștere a gradului de inhibare a enzimei.

Concluzii

Studiile realizate au identificat acțiuni inhibitoare diferite ale compușilor studiați, ulterior putându-se realiza o exploatare analitică pentru analize ale probelor reale. Utilizarea mai multor medii de reacție (diferite pH-uri) au condus la evidențierea mediului de reacție favorabil fiecărui inhibitor.

Utilizarea biosenzorilor enzimatici (screening sau analize cantitative) oferă toxicologiei analitice metode rapide și sensibile de cuantificare.

Mulțumiri

Cercetarea care a generat aceste rezultate a primit finanțare de la al șaptelea program-cadru al Comunității Europene (FP7/2007-2013), cu acordul de finanțare nr 245199. Ea a fost realizată în cadrul proiectului PlantLIBRA (site-ul: www.plantlibra.eu). Acest raport nu reflectă neapărat punctele de vedere ale Comisiei sau politica sa viitoare în aceste domenii.

Bibliografie

- [1] Al-Saleh I, Shinwari N, Mashhour A, Mohamed Gel D, Rabah A., Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women, Int J Hyg Environ Health. 2011 Mar;214(2):79-101. doi: 10.1016/j.ijheh.2010.10.001. Epub 2010 Nov 18
- [2] Badea M., Bala C., Rotariu L., Coman G., Gocan S., Marty JL, Methyl paraoxon detection using HPLC-UV and electric eel acetylcholinesterase-based biosensors, Journal of Environmental Protection and Ecology, 4(9) (2008), 763-77
- [3] Badea M., Idomir M., Taus N., Popescu C., Scortea R., Coman Gh., Nunes G. S., Marty J. L., Biosensors for organophosphorus and carbamates pesticides detection from water samples, Journal of Environmental Protection and Ecology, 1(9); 33-42 30 MARCH 2008; ISSN 1311-5065
- [4] Badea M., Moga M., Taus N., Bigiu N., Cobzac S. C., Heavy metals monitoring using TLC, Journal of Environmental Protection and Ecology, 4(2009) 1006-1012
- [5] Badea M., Rogozea L, Idomir M, Taus N, Balaban DP, Marty JL, Noguer T, Nunes GS, Biosensors for Life Sciences, in "Environmental Technologies. New Developments", Edited by Burcu Ozkaraova Gungor, I-Tech Education and Publishing, Viena, pg. 1-24, ISBN 978-3-902613-10-3, 2007
- [6] Calderon J, Ortiz-Perez D, Yanez L, Diaz-Barriga F. Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. Ecotoxicol Environ Saf. 2003;56(1):93-103
- [7] Caserta D, Graziano A, Lo Monte G, Bordi G, Moscarini M., Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns, Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013 Aug;17(16):2198-206
- [8] Garcia-Rico L., Leyva-Perez J., Jara-Marini M.E., Content and daily intake of copper,

- zinc, lead, cadmium, and mercury from dietary supplements in Mexico, *Food and Chemical Toxicology* 45 (2007) 1599–1611
- [9] Lesniewicz A., Jaworska K, Zyrnicki W., Macro- and micro-nutrients and their bioavailability in polish herbal medicaments, *Food Chemistry* 99 (2006) 670–679
- [10] Llorent-Martínez E.J., Ortega-Barrales P., Fernández-de Córdoba M.L., Domínguez-Vidal A., Ruiz-Medina A., Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain, *Food Chemistry* 127 (2011) 1257–1262
- [11] Raman P., Patino L.C., Nair M.G., Evaluation of Metal and Microbial Contamination in Botanical Supplements, *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7822-7829
- [12] Tumir H., J. Bošnjir, I.Vedrina-Dragojevic, Z.Dragun, S. Tomic, D. Puntaric, G. Jurak, Monitoring of metal and metalloid content in dietary supplementson the Croatian market, *Food Control* 21 (2010) 885–890
- [13] Zheljzkova V. D., Craker LE, Baoshan Xing, Nielsen N.E., Wilcox A., Aromatic plant production on metal contaminated soils,*Science of The Total Environment*, Volume 395, Issues 2–3, 1 June 2008, Pages 51–62