

## PËRCAKTIMI I TRIAZINAVE ME PËRDORIMIN E TIROZINAZËS OPEE DUKE VEPRUAR NË KLOOROFORM

DALINA LELO<sup>1</sup>, LUIGI CAMPANELLA<sup>1</sup>, GJERGJI MERO<sup>2</sup>, ALBAN YLLI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universiteti i Romes “Sapienza”, Departamenti i Kimisë, Romë, Itali

<sup>2</sup>Universiteti Fan S. Noli, Korçë, Shqipëri

<sup>3</sup>Instituti i Shëndetit Publik, Tiranë, Shqipëri

Email: dalina.lelo@uniroma1.it

AKTET IV, 1: 41-47, 2011

### PËRMBLEDHJE

Në vitet e fundit janë vënë re zhvillime të shpejta në OPEE (Elektrodë enzimat në fazë organike) biosensor, emri i të cilit është në funksion të solventit organik dhe solventit të përzierë. Një biosensor enzimatik i ndërtuar është ai që bazohet mbi tirozinazën. Ne kemi ndërtuar një model biosensori nëpërmjet të cilit vepohet në solucion ujor dhe një që vepohet në solvent organik [1, 2]. Ky biosensor përbëhet nga një transdutor amperometrik i oksigjenit në të cilin vihet enzima e tirozinazës në të cilën imobilizohet xheli kappa-karraginin. Me përdorimin e tij është bërë e mundur të kryhen analiza në produkte ushqimore si dhe në fushën e mjedisit. Në mënyrë të veçantë për këtë qëllim janë përdorur pesticidet triazinike si dhe inhibimi i tyre nga enzima tirozinazë. Kërkimet e fundit në laboratorin tonë [3, 4] kanë treguar vlerën e këtyre biosensoreve qoftë kur përdoret enzima e inhibicionit OPEE në rastin e pesticideve organofosforike [5, 6] apo atyre karbamate, qoftë kur ata përdoren në solucione të tretëshme apo ato ujore. Shumë prej tyre, si për shembull atrazinat, janë shumë të tretëshme në fazë organike si metanol dhe kloroform. Këto metoda të analizës janë të thjeshta, praktike dhe të shpejta. Për këtë qëllim po punohet që edhe në të ardhmen metoda të tilla të aplikohen në kushtet konkrete të Shqipërisë.

**Fjalë kyçe:** Tirozinazë biosensor OPEE, solvent organik e ujor, ushqime

### HYRJE

Pesticidet janë lëndë kimike të sintezës që përdoren në bujqësi për të luftuar tipe të ndryshme të organizmave të dëmshme në mbjelljen e produkteve bujqësore .

Përdorimi i mëtejshëm i këtyre produkteve ka lejuar arritje në nivel të lartë të prodhimit të produkteve bujqësore. Për këtë qëllim shpesh janë injoruar efektet e tyre në ekosistem. Interesi i lartë për metodat e analizës që evidentojnë me shpejtësi mbetjet e pesticideve në ambient apo ushqime është shtuar shumë kohët e fundit sepse këto substanca janë përgjegjëse të shumë sëmundjeve për shkak të disfunktionimit të organizmit human, dhe mbi të gjitha ato

shkaktojnë “biogrubullim” për shkak të rezistencës së lartë në ambient të disave prej tyre. Deri tani janë zhvilluar një numër i madh metodash sidomos ato kromatografike të cilat shërbejnë për të analizuar tipe apo grupe të ndryshme të pesticideve [7, 8].

Një kontribut të vazhdueshëm kanë dhënë metodat biosensorike, të cilat janë studiuar dhe zbatuar që prej shumë vitesh por mbi të gjitha duhet vënë në dukje studimi i grupeve të pesticideve si triazinave, organofosforeve dhe karbamateve. Ky studim përshkruan aplikimin e metodave biosensorike dhe në mënyrë të veçantë biosensor i tirozinazës për përcaktimin e tre tipeve të pesticideve triazinike:

Biosensori i përdorur në këtë rast quhet OPEE (Organic Phase Enzyme Electrodes) dhe funksionon në dy faza: faza organike dhe ajo e përzierë [24-26]. Ky fakt përbën një përparësi shumë të rëndësishme për sektorin biosensorik. Një shembull biosensori enzimatik që ka përparësi në krahasim me të tjerët është ai që bazohet në enzimën e tirozinazës. Në këtë studim kemi prezantuar një model të këtij biosensori që vepron në dy fazat e përmendura më lart. Ky biosensor është i përbërë nga një transdutor amperometrik i oksigjenit në të cilin vendoset enzima e tirozinazës dhe mund të përdoret për analiza të ushqimeve apo edhe në fusha të ndryshme të ambientit. Në mënyrë të veçantë një biosensor i tillë gjen zbatim për kontrollin e përqendrimit të polifenoleve dhe pastërtisë së vajit të ullirit. Kërkimet e fundit qoftë në laboratorin tonë [9, 10] dhe në laboratorë të tjerë tregojnë vlerën e këtij tipi biosensori të përdorur, që bazohet në inhibimin e butirrikolinesterazës dhe tregon se pesticidet triazinike janë shumë të tretshëm në faze organike, në mënyrë të veçantë në kloroform. Ky studim ka si qëllim zbatimin e analizave të tilla në pesticide të grupit triazinik nëpërmjet tirozinazë OPEE dhe që funksionon në një sistem organik tretës.

## PJESA EKSPERIMENTALE

### 1. Reaktivë dhe materiale

Atraton, atrazinë, atrazinë-desetil (Pestanal Sigma-Aldrich), kloroform RPE, diklorometan RPE, kalium fosfat dybazik e njëbazik anidro RPE (Carlo Erba Reagent); klorur kaliumi (Riedel-de Haen)

(Seelze, Germania); Fenol, Membrane dialize (art.D-9777) (Sigma-Aldrich); Kappa-Carraginin dhe Tirozinase (EC 1.14.18.1) nga kerpudha 3216 U/mg (Fluka).

### 2. Aparati

Për të analizuar pesticidet triazinike është përdorur një potenciostat tip Amel mod. 551 VA-Detektor, i lidhur me një multimetër MK 5001, të Mitek, një regjistrator analogjik Omniscrite Recorder, mod. d5126-2, e një elektrodë amperometrik për oksigjenin të Universal Sensor Inc., New Orleans (U.S.A.), Mod. 4000-1.

Soluzioni që duhet analizuar ndodhet në një gotë kimike të termostatuar në 24°C si dhe i mbajtur në levizje nepermjet një perziesi manjëtik (Amel Instruments: mod. 291/lf).

### 3. Metoda e përdorur

Është përdorur një biosensor i tirozinazës për përcaktimin dhe inhibimin enzimatik të quajtur OPEE i cili shërben për të përcaktuar pesticide me strukture triazinike. Një biosensor i tillë është realizuar duke përdorur enzimen e tirozinazës të mbeshtjelle në xhelin e kappa-karragininës. Xheli është vendosur në kontakt me një membranë gas e pershueshme në kapakun e PTFEE të elektrodës TIP Klark që shërben si transdutor (shndërrues transportator i sinjalit). Membrana e xheliformes mbahet në anesor nepermjet një rrjetë najloni dhe një rrethi plastik që e fikson membranën përreth kapucit. Erbicidet triazinike që janë përdorur për këtë studim janë paraqitur në figurën 1:

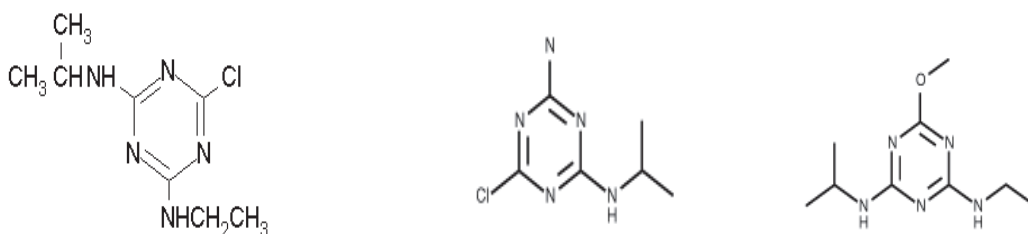


Figura 1: Tre pesticidet e përdorura për studim

### a). Imobilizimi i enzimës në xhel të Kappa-karragininës

Enzima e tirozinazës (3216 U/mg) është peshuar (3,75 mg) e tretet në 100 µl tampon fosfati 0,06 mol<sup>-1</sup>, a pH = 6,6. Solucioni i përgatitur në këtë mënyrë është gati për të ndajthitur një disk të xhelit të Kappa-karragininës e cila lihet në frigorifer për 48 orë, përpara se të përdoret.

### b) Ndërtimi i lakores së kalibrimit

Në këtë rast janë zbatuar dy procedura të ndryshme për kryerjen e analizave të cilat janë aplikuar dhe treguar në shumë punime shkencore mbi fito barnat [10, 13, 39, 42].

### c). Metoda e parë e përdorur

Ne një gotë kimike të termostatuar që përmban 10mL tretës organik (kloroform të ngopur me H<sub>2</sub>O) vihet ne perzjerje të vazhdueshme nepermjet perzjeresit manjëtik. Biosensori i përgatitur si me lart zhytet ne soluzion derisa të arrihet një sinjal i qendrueshem. Mbas ketij veprimi shtohen 200 µl të një solucioni të fenolit 2,5 x 10<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup> ne kloroform të ngopur me H<sub>2</sub>O, regjistrohët ndryshimi i sinjalit ne nA. Ne momentin kur arrihet stadi stazionar i ri, atëhere kryhen shtesa të vazhdueshme 200 µl, të solucionit të atrazinës (o të një pesticidi tjetër triazinik në kloroform të ngopur me ujë), për përqëndrime të ndryshme. Përqëndrimet e përdorura në këtë rast janë: 1,0x10<sup>-4</sup> mol<sup>-1</sup>, 1,0x10<sup>-3</sup> mol<sup>-1</sup>, 1,0x10<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup>. Nga njëra shtesë te tjetra pritët një kohë e caktuar e nevojshme për stabilizimin e sinjalit (rreth 15 minuta). Për ndërtimin e lakores së kalibrimit në abshisë shënohet përqëndrimi final i atrazinës në gotën kimike, ndërsa në ordinatë Δi (ose Δi %), ku:

$$\Delta i \% = [1 - (S_c - S_d)] / S_c \times 100 \quad (1)$$

S<sub>c</sub> = ndryshimi i intensitetit të korrentit për shkak të shtimit të fenolit

S<sub>d</sub> = ndryshimi i intensitetit të korrentit për shkak të shtimit të pesticidit, figura 2.

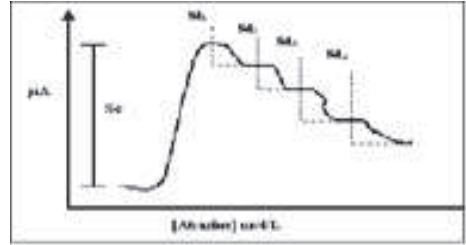


Figura 2: Metoda 1

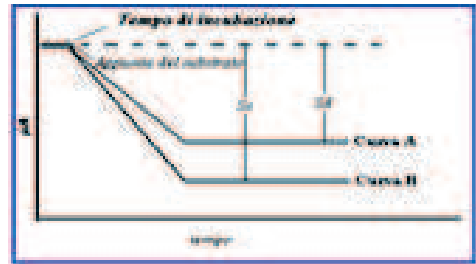


Figura 3: Metoda 2

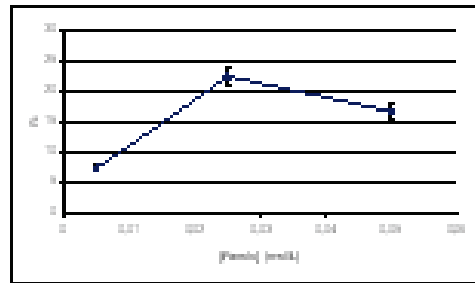


Figura 4: Optimizimi substraktit

### d). Optimizimi i përqëndrimit të substraktit që duhet përdorur në matjet me inhibicion

Optimizimi i përqëndrimit të substraktit që përdoret ne matjet me inibizion është realizuar duke regjistruar % e inibimit të përgjigjes se biosensorit me tirosinase ne funksion të përqëndrimit të fenolit ne soluzionin ku është zhytur biosensori për një përqëndrim të caktuar të atrazines se shtuar. Për këtë qëllim janë kryer matje ne përqëndrime ne rritje të fenolit (substrakti) ne kloroform të ngopur me uje: (5,0x10<sup>-3</sup> mol<sup>-1</sup>, 2,5x10<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup> e 5,0x10<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup>), për një përqëndrim të caktuar të atrazines (inhibitore) 1,0x10<sup>-3</sup> mol<sup>-1</sup>. Praktikisht, ne një gotë kimike që përmban 10 ml të kloroformit të ngopur me uje, perzihet ne mënyrë kostante nepermjet perzjeresit manjëtik zhytet biosensori,

i mbeshtjelle sic është pershkruar me lart, pritet stabilizimi i sinjalit. Ne rastin kur arrihet stadi i ri stacionar shtohen 200 µl të atrazines ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ), regjistrohet një ndryshim i ri i sinjalit ne nA. Perqindja e inhibimit të pergjigjes arrihet nepermjet ekuacionit të pershkruar ne paragrafin më lart.

Përsëritja e procedurës për përqëndrime të ndryshme të fenolit bën të mundur ndërtimin e lakores së kalibrimit që tregon përgjigjen e biosensorit për një sasi të caktuar të pesticidit dhe për përqëndrime në rritje të substraktit (fenolit). Çdo procedurë është përsëritur disa herë duke përdorur një përqendrim fiks të atrazinës (për shembull  $1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  od una  $1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ ), Figura 4.

#### e). Metoda e dytë e perdorur

Në metodën e dytë operative, në ndryshim me atë të parën të pershkruar më lart, lakorja e kalibrimit të përgjigjes së biosensorit me inhibicion, gjatë përqëndrimeve në rritje të pesticidit, arrihet duke regjistruar përqindjen e inhibimit të përgjigjes së biosensorit, në funksion të përqendrimin të atrazinës në solucionin ku është zhytur biosensori për një kohë të caktuar (koha e inkubimit). Rezultati krahasohet me përgjigjen e biosensorit në mungesë të pesticidit fig. 2. Për lakoren e kalibrimit janë përdorur kalibrimet herë pas here me solucione standarti të atrazinës në kloroform të ngopur me ujë:  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ . Në një gotë kimike të termostatuar permban 10 ml të solventit organik (kloroform të ngopur me uje) e nen veprimin e perzjeresit manjetik, zhytet biosensori pritet të stabilizohet sinjali, quindi shtohen 200 µl soluzion të fenolit  $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  në kloroform të ngopur me ujë, shënohet një ndryshim sinjali në nA. Boshatiset gota kimike dhe zbatohet nga e para procedura kryhet matja duke shtuar 10 ml tretës, më parë 200 µl të një solucioni të ndryshëm nga atrazina, pritet për një periudhë kohe, pra njëlloj me kohën e inkubimit (koha e kontaktit midis enzimës dhe inhibitorit, optimizimi i mëparshëm), shtohet 200 µl solucion i fenolit  $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  në kloroform. Mbas

shtimit të soluzionit fenolik si regjistrohet një ndryshim signali ne nA, che viene konfrontohet me atë të shenuar me pare.

Per ndertimin e lakores se kalibrimit ne abshise vihete perqendrimi final i atrazines dhe ne ordinate raporti:

$$\Delta i\% = \frac{[(S_c - S_d)]}{S_c} \times 100$$

$S_c$  = ndryshimi i intensitetit të korrentit për shkak të shtimit të fenolit, në mungesë të pesticidit në solucionin.

$S_d$  = ndryshimi i intensitetit të korrentit për shkak të shtimit të fenolit mbasi biosensori është inkubuar në prani të pesticidit.

Në figurë është treguar rruga e ndjekur nga sinjali në mungesë dhe në prani të inhibitorit [figura 2].

#### f). Optimizimi i kohes së inkubimit

Per të optimizuar kohen e inkubimit janë kryer një sasi matjesh duke aplikuar metoden e dytë e duke mbajtur kostante perqendrimin final qoftë të atrazines ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ), qoftë atë të fenolit  $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ , për “koha e inkubimit”, ne prani të pesticidit, ne rritje, respektivisht me (150; 300; 600; 900 e 1500 sekonda). Ne grafik vlerat e  $\Delta i\%$ , ne funksion të kohes se inkubimit, ndertohet lakorja ne funksion të kohes se inkubimit optimal.

#### g). Analiza e pesticideve triazinike

Me dy pesticidet e tjera triazinike që janë përdorur, përveç atrazinës, janë kryer eksperimente sipas procedurës së dytë të punës.

#### h). Matje të recuperimit mbi kampione reale

Janë kryer shumë prova laboratorike për të përcaktuar rikuperimin e pesticidit në kampione vegjetale natyrale. Përgatitet solucioni i atrazinës duke tretur 10,0 mg të pesticidit në 20 ml eter. Peshohen 10 g kampioni vegjetal bar fushe ose ullinj), përzihen me solucion eteri që përmban pesticid; pastaj eteri lihet i gjithi të avullojë. Kampioni vegjetal shpëlahet për tre herë me 6,5 ml kloroform të ngopur me ujë. Solucioni i larjes bashkohet dhe çohet në volum 20,0 ml dhe i përgatitur në këtë mënyrë përdoret për matje. Përgatitet dhe një solucion standart i atrazinës duke tretur 10,0 mg të pesticidit në 20,0 ml di

kloroformit të ngopur me ujë (solucion standart i riferimit). Në këtë mënyrë vazhdohet matja e pesticidit në kampionin e ujrave të larjes, duke përdorur metodën e parë. Rritet përqëndrimi i pesticidit në kampion për tu krahasuar me sinjalin e kapur. Në solucionin standart të riferimentit të pesticidit.

Në këtë mënyrë vazhdohet me matjet sipas metodës së dytë siç u përshkrua më parë duke u ngjitur në përqëndrimin e pesticidit në kampionin për analizë dhe duke e krahasuar atë me sinjalin direkt që arrihet nga solucionin i kloroformit dhe ujrave të larjes me atë të solucionit standart të riferimit. Më në fund, në të njëjtën mënyrë zbatohet metoda e dytë duke realizuar depozitimin e pesticidit mbi një kokër limoni me peshë 51 g, përdoret solucionin i eterit pesticid (10.0 mg në 20.0 ml eter), në të njëjtën mënyrë duke kryer eksperimentet e përshkruara më lart. Në këtë mënyrë arrihet një përqëndrim i pesticidit në kampion real 0,1% në peshë, përta i përket barit në fushën e ullinjve, ndërsa 0,02%, përta i përket agrumeve (limonit).

## REZULTATET DHE DISKUTIMI

Problemi kryesor për t'u zgjidhur në këtë rast ishte përdorimi i një metode për përcaktimin e pesticideve triazinike duke përdorur një biosensor me inhibicion, që vepron në tretës organik d.m.th një OPEE. Nga të dhënat e literaturës [16, 18] është vënë re që tretësit me të mire janë: eteri, metanoli dhe kloroformi, duke përjashtuar, tretës shumë volatil, ose që demtojnë aktivitetin enzimatik, për shembull metanoli.

L'OPEE është e ndërtaur nga teflon dhe enzima është e imobilizuar në kappa-karraginin, një tip i imobilizimit që përshkruhet në shumë punime shkencore të tjera [19, 20], tregon rezultate pozitive kur punohet në solvent organik. Metoda është optimizuar nëpërmjet zbatimit të dy procedurave eksperimentale: metoda e parë bazohet në fazën organike me substraktin fenol ndërsa si inhibitor përdoret pesticidi. Në metodën e dytë ka dy përgjigje të biosensorit: njëra në mungesë dhe tjetra në prani të inhibitorit pas periudhës së inkubimit.

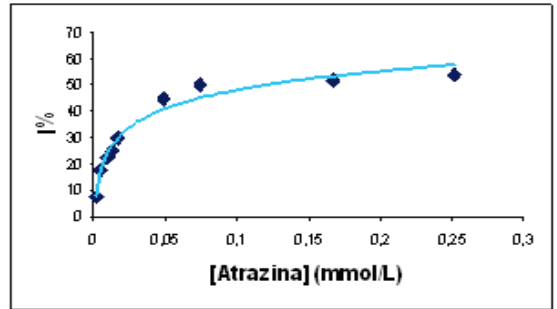


Figura 5: Atrazina: Lakorja e kalibrimit (Metoda 1)

$$y = (10,3 \pm 5,9) \text{Log}(x) + (71 \pm 32)$$

$$y = (13,1 \pm 5,4) \text{Log}(x) + (120 \pm 30)$$

$$r^2 = 0,9215 \quad (1 - \alpha) = 0,90 \quad t = 2,7764$$

$$x = \text{mmol/L} \quad y = I\%$$

intervali i linearitetit nga  $4,0 \times 10^{-3}$  mmol/L në  $2,3 \times 10^{-1}$  mmol/L "pooled SD" % = 13%

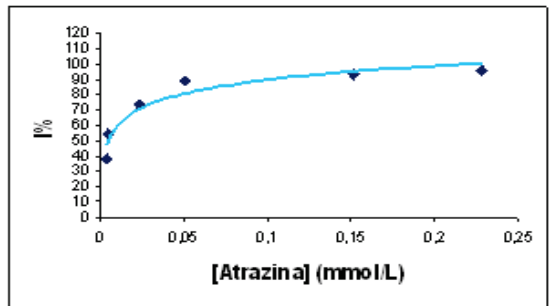


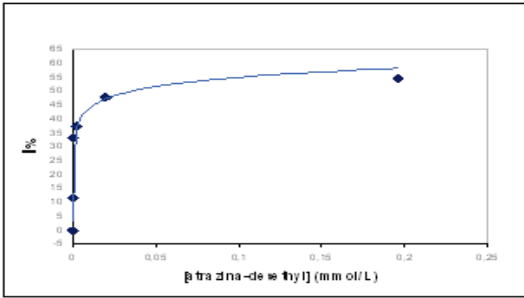
Figura 6: Atrazina: Lakorja e kalibrimit (Metoda 2)

$$r^2 = 0,9724 \quad (1 - \alpha) = 0,90 \quad t = 2,3646$$

$$x = \text{mmol/L} \quad y = I\%$$

Intervali i linearitetit nga  $2,0 \times 10^{-3}$  mmol/L në  $2,5 \times 10^{-1}$  mmol/L.

"pooled SD" % = 11%



**Figura 7:** Atrazina desentil: Lakorja e kalibrimit (Metoda 2)

$$y = (4,8 \pm 2,0) \log(x) + (66 \pm 11)$$

$$r^2 = 0,9559 \quad (1 - \alpha) = 0,90 \quad t = 2,776$$

$$x = \text{mmol/L} \quad y = I \%$$

Përqendrimi i atarzinës	Kampioni 1 Bar i fushës	Kampioni 2 Bar i fushës	Kampioni 3 Ulli	Kampioni 4 Limon
Vlera e kërkuar (nominale)	0.10	0.05	0.10	0.02
Vlera eksperimentale	0.087 ± 0.003	0.042 ± 0.003	0.093 ± 0.002	0.018 ± 0.002
Rekuperimi	87%	84%	93%	90%

**Tabela 1:** Rekuperimi i pesticidit në kampion real vegjetal

Të dhënat e lakores së kalibrimit, kur esperimenti kryhet në dy perzierje të ndryshme tretësi janë prezantuar në grafikun (Figurat 5-7). Vihet re në të dyja rastet se në të dyja rastet grafiku logaritmik, tipik i përgjigjes të një biosensori me inibim [19], mund të jetë i linearizuar, duke vënë të dhënat në një diagrame gjysme logaritmike.

Në kompleks krahasimi i të dhënave eksperimentale të gjetura lejon marrjen e rezultateve të plota dhe lejon të themi që në praktikë veprohet pothuaj në të njëjtën mënyrë për dy tretësa të ndryshëm dhe në këtë rast intervali i linearitetit është pak më i gjerë, koeficienti i korelacionit pak më i mirë dhe një interval i konfidencës më i mirë se sa kur punohet me perzierjen kloroform-hekzan. Kështuqë vlen të theksojmë që të gjitha analizat janë kryer në kloroform të ngopur me ujë.

Intervali i linearitetit nga  $2,0 \times 10^{-6}$  mmol/L në  $2,0 \times 10^{-1}$  mmol/L

Për të optimizuar metodën e parë të analizës janë realizuar shumë matje për të përcaktuar përqendrimin optimal të fenolit; ndërsa përqendrimi i substraktit optimizohet në metodën e parë të analizës. Analiza e lakores në fig. 3 lejon të themi se përgjigja më e lartë është arritur për një përqendrim të fenolit  $2,5 \times 10^{-2}$  mol/l. Ky përqendrim është zgjedhur për të zbatuar në të gjitha matjet.

## PERFUNDIME

- Rezultatet e arritura tregojnë vlerën komplekse të kësaj metode. Biosensori në tirozinazë vepron në dy tretësa të ndryshëm: fazë organike dhe ujore si dhe lejon përcaktimin e dy analitëve të ndryshëm.
- Biosensori në tirozinazë në konfigurimin OPEE shërben për përcaktimin e pesticideve triazinike më mirë në tretës organik.
- Zvogëlohet rreziku i nënvleftësimit të përqendrimit të këtyre pesticideve për shkak të vështirësisë së tyre të tretjes në fazë ujore.

## BIBLIOGRAFIA

1. L. Campanella, M.P. Sammartino, M. Tomassetti; Sensors and Actuators B, 7 (1992), pp 383-388.
2. L. Campanella, G. Favero, M.P. Sammartino, M. Tomassetti; Talanta, 41 (1994), pp 1015-1023.

3. L. Campanella, S. De Luca, M.P. Sammartino, M. Tomassetti; *Analytica Chimica Acta* , 385 (1999), pp 59-71.
4. L. Campanella, L. Persi, M.P. Sammartino, M. Tomassetti, S. Zanella; *Annali di Chimica*, 90 (2000), pp 35-49.
5. L. Campanella, E. Martini, D. Lelo, M. Tomassetti: "Organophosphorus and carbamate triazinic and benzotriazinik pesticide analysis using un inhibition tyrosinase organic phase enzyme sensor". *Journal of Analytica Chimica Acta*, 587 ( 2007), 22-32
6. L. Campanella, R. Dragone, D. Lelo, E. Martini, M. Tomassetti "Tyrosinase inhibition organic phase biosensor for triazinic and benzotriazinic pesticides analysis" *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384 (2006): 915-921.