

NITRITO REDUCTASAS DE COBRE , HACIA EL DESARROLLO DE BIOSENSORES DE NITRITO

Juarez Anahí Aylen^{1,2}.

1- *Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas , FBCB.*

2- *Laboratorio de sensores y biosensores*

Director: Ferroni Felix Martín.

Codirectora: Hernandez Silvia Raquel.

Área: Ciencias Biológicas.

Palabras Claves: Biosensor, Nitrito, Nitrito reductasa.

INTRODUCCIÓN

La preocupación acerca del nitrito como contaminante ambiental, y sus efectos sobre la salud humana (Picetti et al. 2022) y seguridad ambiental, ha impulsado el interés por su detección y cuantificación. Sin embargo, los métodos tradicionales para ello (Wang et al. 2017), son costosos, requieren de material sofisticado y de personal capacitado, y/o no son adaptables al trabajo en campo abierto.

Los biosensores enzimáticos son una excelente alternativa, debido a su portabilidad, simplicidad y sensibilidad. Estos utilizan como elemento de biorreconocimiento enzimas que poseen afinidad por el analito, por lo que las nitrito reductasas son candidatas. La principal desventaja radica en que requieren potenciales de trabajo muy negativos, región donde el oxígeno es una interferencia potencial (Plumeré, 2013). Una posible solución es utilizar mediadores electroquímicos que permiten optimizar el potencial de trabajo, y además combinar esta aplicación, con técnicas electroquímicas sensibles que puedan variar la escala de tiempo de la medición y que requieran pequeños volúmenes de muestras, de manera de minimizar el efecto de esta interferencia.

Título del proyecto (A): Estrategias para el diagnóstico de enfermedades infecciosas de relevancia en Salud Humana y Animal (Zoonosis) mediante dispositivos analíticos microfluidicos basados en la incorporación de nano y/o micromateriales.

Instrumento: CAI+D.

Año convocatoria: 2020.

Organismo financiador: UNL.

Director: Hernandez Silvia R.

Título del proyecto (B): Caracterización de la cadena de transferencia de electrones en una nitrito reductasa de cobre de tres dominios termotolerante. Estudio del comportamiento de la enzima en materiales de uso en el campo de biosensores.

Instrumento: CAI+D.

Año convocatoria: 2020.

Organismo financiador: ANPCyT.

Director: Ferroni Felix M.

Abreviaturas / Siglas: Bio (Biosensor), PMS (phenazine methosulfate), SWV (Square wave voltammetry), E (Electrodeposición), AD (Adsorción directa)

OBJETIVOS

Analizar el comportamiento electroquímico de enzimas nitrito reductasas, obtenidas previamente por técnicas de biología molecular, para evaluar sus potenciales aplicaciones en la elaboración de biosensores para la detección de nitrito.

METODOLOGÍA

Reactivos:

Enzimas: SmNirK (SK) procedente del *Sinorhizobium meliloti* (PM: 40255,67 Da/monómero, pl: 5,7) y TsNirK (TK) procedente del *Thermus scotoductus* (PM: 49748,85 Da/monómero, pl: 6,08). En un trabajo previo, se obtuvieron de manera recombinante según la secuencia: mini preparación de ADN plásmidico sobre sepas de *Escherichia coli*, que contienen plásmidos que ya habían sido clonados con los genes involucrados. Obtención y transformación de células competentes *E. coli* para la expresión, seguida de la recolección, disrupción celular y purificación de las enzimas por cromatografía de intercambio iónico seguida de exclusión molecular, hasta lograr una única banda en gel de poliacrilamida. Las soluciones de stock de las proteínas se realizan en buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.0 y 10 % glicerol, conservada a -20 °C, lográndose concentraciones de 2,64 y 1,34 mM respectivamente.

El **mediador electroquímico**, fenacina metosulfato (PMS, del inglés phenazine methosulfate) y el prepolímero Nafion® 5% (m/v) son la firma Sigma Aldrich, y el resto de los reactivos de la solución del electrolito soporte (Buffer 50 mM Tris-HCl + 100 mM HCl, pH 7.0) y de la solución de nitrito de sodio son de la calidad reactivo analítico de la firma Cicarelli.

Instrumentos y accesorios: Analizador voltamétrico Épsilon Bionalytical System Electrodoos impresos (screen printed electrodes, SPE) con electrodo de trabajo de grafito, pseudoelectrodo de referencia, Ag/AgCl y electrodo auxiliar de Ag. Los E informados se refieren a este electrodo.

Ensayos preliminares: Para optimizar los parámetros de la SWV utilizada con técnica de recolección de la señal analítica (la intensidad de corriente de reducción del biosensor), se realizaron determinaciones a un tiempo fijo, utilizando electrodos SPE desnudos a base de grafito y una solución (enzima+PMS+nitrito). La Figura 1 muestra voltamogramas a distintas velocidades de barridos, obtenidas de la variación de la frecuencia, mientras que el paso y la amplitud del potencial se mantuvieron en valores constantes de 4 mV y 25 mV respectivamente. El pico de corriente con la mejor relación altura/ancho, fue el obtenido bajo los siguientes parámetros (SWV) Paso de potencial 4 mV, Amplitud de potencial 25 mV, Frecuencia 4 Hz, definiendo una velocidad de 16 mV s⁻¹.

Preparación de biosensores: se estudiaron protocolos de inmovilización simples y que evitaran reactivos contaminantes, por lo tanto, se aplicó la AD o en combinación con la cobertura con Nafion® como así también, la electropolimerización (de las enzimas y/o mediador electroquímico) en soluciones acuosas. Los biosensores se estudiaron analizando parámetros electroquímicos y las respuestas frente al nitrito (en el rango de 0,1 a 2 mM) en el tiempo. En la Figura 2 se muestran los voltamogramas de dos biosensores construidos por AD. El Bio1 a partir de una solución de 1,0 mM PMS y 0,1 mM de TK con 0,5% m/v Nafion® (en rojo) y el Bio2 con la misma solución sin Nafion® (en azul).

Por otro lado, por electropolimerización se prepararon otros dos tipos de biosensores según la secuencia del procedimiento (Bio3) E(0,1 mM PMS+0.1 mM SK+1% Nafion®) y (Bio4) E(0,1 mM PMS) y cubierto con (0.1 mM SK+1% Nafion®), obteniéndose la mejor sensibilidad (65 $\mu\text{A}/\text{mM}$) con el biosensor (Bio2) al minuto.

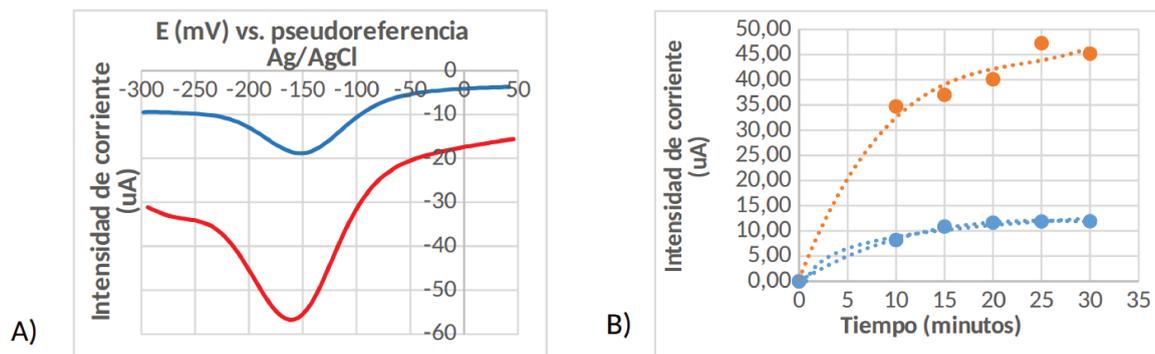


Figura 2: A) Voltamogramas Bio1 (color rojo) y Bio2 (color azul) obtenidos a los 10 minutos de la reacción con una solución 0,5 mM NaNO₂. B) Evolución de la intensidad de corriente de reducción en el tiempo para los biosensores con Nafion® (rojo) y sin Nafion® (azul). Rango de E (-300 a 50) mV.

CONCLUSIONES

Al comparar las repuestas voltamétricas frente al nitrito de los dos biosensores a base de TK (Bio1 y Bio2) construidos por AD, pero uno con y otro sin Nafion® respectivamente, se pudieron observar corrientes cuatro veces más altas para los biosensores con Nafion®, evidenciando su aporte ventajoso. El Nafion al ser un Ionóforo cargado negativamente podría garantizar una distribución más homogénea del PMS cargado positivamente, esto ocasionaría una red de entrapamiento del mediador y de la enzima más homogénea y con mayor contacto con la superficie electródica, favoreciendo la transferencia electródica y, por lo tanto, generando mayores corrientes.

Por otro lado, al comparar biosensores con SK y Nafion® uno obtenido por AD (Bio1 con 1,0 mM PMS) y el otro por electropolimerización (Bio4 con 0,1 mM PMS), si bien se pudieron

observar sensibilidades similares ($\sim 70 \mu\text{A}/\text{mM}$ Bio1 y $\sim 65 \mu\text{A}/\text{mM}$ Bio4), el Bio4 se logra con un menor tiempo de respuesta a los 60 s en contraste a los 300 s necesarios para el otro biosensor. A partir de estos resultados, se ha demostrado que las nitrito reductasas obtenidas por biología molecular por nuestro grupo, poseen características apropiadas para ser utilizadas como elemento de biorreconocimiento para la construcción de biosensores para nitrito. poseen características apropiadas para ser utilizadas como elemento de biorreconocimiento para la construcción de biosensores para nitrito.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Ferroni, F.M., Marangon, J., Neuman, N. I., Cristaldi, J.C., Brambilla, S.M., Guerrero, S. A., Bondino, C.D. 2014. Pseudoazurin from *Sinorhizobium meliloti* as an electron donor to copper-containing nitrite reductase: influence of the redox partner on the reduction potentials of the enzyme copper centers. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 19(6), 913-921.

Majumdar D. 2003. The Blue Baby Syndrome: Nitrate poisoning in humans. *Reson* 8:20–30.

Opperman, D. J., Murgida, D. H., Dalosto, S. D., Brondino, C. D., & Ferroni, F. M. (2019). A three-domain copper-nitrite reductase with a unique sensing loop. *IUCrJ*, 6(2), 248-258.

Picetti, R., Deeney, M. Pastorino, S., Miller, M., Shah, A., Leon, D., Green, R. 2022. Nitrate and nitrite contamination in drinking water and cancer risk: A systematic review with meta-analysis | Elsevier Enhanced Reader.

Wang Q., Yu L., Liu Y., Lin, L., Lu, R., Zhu, J. Lu, Z. 2017 Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review. *Talanta* 165:709–720.