

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CINETICA INACTIVĂRII ENZIMATICE MODULATĂ DE
ADITIVI**

Doctorand:

Anca Ruxandra Cantemir

Conducător doctorat:

Prof. Dr. Dumitru Oancea

2012

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE

Comisia de doctorat:

Președinte: Prof. Dr. Camelia Bala, Directorul Școlii Doctorale

Conducător doctorat: Prof. Dr. Dumitru Oancea, MC al Academiei Române

Referenți oficiali:

-  Acad. Prof. Dr. Eugen Segal, Universitatea București
-  Dr. CSI. Dan-Florin Anghel, Institutul de Chimie Fizică „Ilie Murgulescu”
-  Prof. Dr. Ing. Dan Geană, Universitatea Politehnica din București

2012

(Numerotarea capitolelor, subcapitolelor, figurilor, tabelelor, schemelor, ecuațiilor și a trimiterilor bibliografice este cea din teza de doctorat.)

Cuprins

Introducere.....	4
I. Stadiul actual al cunoașterii în domeniu	8
I.1. Cinetica reacțiilor catalizate de enzime	8
Modelul Michaelis-Menten	9
Inhibiția enzimatică	11
Factori ce influențează activitatea enzimatică	13
Influența pH-ului	13
Influența tăriei ionice.....	16
Influența temperaturii	16
Efectul temperaturii asupra parametrilor cinetici	17
I.2. Termoinactivarea enzimelor	18
Influența solventului asupra cineticii reacțiilor chimice în soluție	19
Influența solventului asupra enzimelor.....	22
Caracterizarea inactivării enzimelor prin metoda izoconversională	25
I.3. Mecanisme de apărare împotriva stresului oxidativ	27
Radicalii liberi	27
Speciile reactive ale oxigenului și azotului întâlnite in vivo și in vitro	27
Sisteme de apărare contra ROS și RNS	28
Antioxidanți enzimatici	28
Antioxidanți neenzimatici.....	30
Oxidarea catechinei	32
Autooxidarea catechinei	33
Oxidarea enzimatică	34
Oxidarea quercetinei	38
I.4. Activitatea catalitică a unor oxidoreductaze.....	42

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Cinetica inactivării enzimatică modulată de aditivi

Catalaza: funcție și structură.....	42
Peroxidaza: funcție și structură.....	44
Mecanismul catalitic al peroxidazelor	45
Peroxidaza din hrean (HRP)	46
Alte reacții catalizate de peroxidaze	48
II. Partea originală	49
II.1. Stabilitatea și inactivarea catalazei	49
II.1.a. Influența solventului asupra cineticii descompunerii apei oxigenate în prezența catalazei	51
Efectul constantei dielectrice	57
Efectul hidrofobicității solventului (logP)	60
Efectul concentrației de grupări hidroxil	62
Corelații multiliniare.....	62
Concluzii.....	65
II.1.b. Influența pH-ului și a tăriei ionice asupra cineticii descompunerii apei oxigenate în prezența catalazei	66
Efectul tăriei ionice asupra cineticii descompunerii apei oxigenate în prezența catalazei.....	70
Efectul pH-ului asupra cineticii descompunerii apei oxigenate în prezența catalazei	71
Concluzii.....	73
II.1.c. Efectul unor aditivi asupra stabilității termice a catalazei.....	74
Termoinactivarea în prezența substratului	78
Utilizarea metodei izoconversionale.....	81
Termoinactivarea în absența substratului.....	83
Concluzii.....	89
II.2. Cinetica inactivării peroxidazei la oxidarea unor substraturi fenolice	90
II.2.a. Utilizarea metodei izoconversionale pentru identificarea inactivării peroxidazei	90
II.a.1. Oxidare a capsaicinei.....	90
II.a.2. Oxidarea guaiacolului	92
II.a.3. Oxidarea catechinei	94
II.a.4. Oxidarea quercetinei	94
Concluzii.....	96
II.2.b. Stabilitatea și inactivarea peroxidazei din hrean în prezența quercetinei și a apei oxigenate	97

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Cinetica inactivării enzimatică modulată de aditivi	
Identificarea produşilor reacţiei de oxidare ai quercetinei	98
Analiza HPLC	98
Analiza LC-MS	100
Cinetica oxidării quercetinei	104
Autooxidarea quercetinei	105
Oxidarea quercetinei cu apă oxigenată	109
Influenţa concentraţiei reactanţilor asupra oxidării quercetinei cu apă oxigenată	112
Oxidarea quercetinei cu apă oxigenată în prezenţa peroxidazei	114
Influenţa concentraţiei de apă oxigenată	114
Influenţa concentraţiei de quercetină	116
Influenţa concentraţiei iniţiale de enzimă	117
Concluzii	119
II.2.c. Stabilitatea şi inactivarea peroxidazei din hrean în prezenţa catechinei şi a apei oxigenate	
Identificarea produşilor reacţiei de oxidare ai catechinei	122
Analiza HPLC	122
Analiza LC-MS	124
Cinetica oxidării catechinei	133
Autooxidarea catechinei	135
Oxidarea enzimatică a catechinei	139
Influenţa concentraţiei de catechină	139
Influenţa concentraţiei de apă oxigenată	140
Influenţa concentraţiei de enzimă	141
Influenţa pH-ului mediului	142
Concluzii	145
Concluzii generale	146
Articole publicate sau în curs de publicare	148
Participări la comunicări ştiinţifice şi conferinţe	148
Bibliografie	149

INTRODUCERE

Enzimele sunt utilizate în multe domenii de activitate incluzând cercetarea medicală și farmaceutică, diagnoza clinică, industria (farmaceutică, chimică, alimentară sau textilă), epurarea apelor reziduale. Avantajele precum: înalta specificitate, activitatea mare în condiții blânde de mediu, eficacitatea catalitică, natura biodegradabilă a făcut posibilă utilizarea enzimelor ca alternativă modernă și avantajoasă pentru catalizatorii convenționali.

Diferiți factori precum temperatura și aditivii chimici duc la inactivarea enzimelor. Creșterea termostabilității și a stabilității operaționale a enzimelor poate fi făcută, cu costuri scăzute, prin adăugarea în mediul de reacție a diferitelor substanțe chimice: săruri, polioli, dextran, albumină serică bovină, polietilenamină, polielectroliți, osmoliți organici, solvenți organici, glucide și alți aditivi [5].

Pentru a putea înțelege mecanismul de stabilizare al unor aditivi, este necesar mai întâi studiul cineticii inactivării enzimelor. Există puține studii în ceea ce privește acest subiect [11], iar fenomenul inactivării enzimelor este de obicei tratat mai mult empiric. Depistarea și măsurarea inactivării enzimelor în condiții normale de reacție poate fi un instrument important pentru descrierea stabilizării acestora în prezența diferiților aditivi.

Deși potențialul de utilizare al oxidoreductazelor este foarte mare, aplicațiile acestora în industrie sunt limitate de inactivarea de către produșii de reacție și stabilitatea lor scăzută în soluții apoase. De aceea, îmbunătățirea stabilității oxidoreductazelor este un obiectiv de importanță majoră pentru biotehnologie.

Datorită capacității de a înlătura radicalii liberi proveniți de la speciile active de oxigen și de azot, catalaza și peroxidaza au fost încadrate în clasa de enzime ce apară sistemele celulare de stres oxidativ. In vivo, stresul oxidativ este compensat și de sistemele neenzimatică din care fac parte alături de alte clase de compuși și flavonoide naturale.

Studii in vitro arată că flavonoidele prezintă capacitate antioxidantă [34-42]. Quercetina și catechina posedă elemente structurale și abilitatea de a distruge in vitro speciile de oxigen și oxigen singlet pe lângă radicalii de alte origini. Flavonoidele de tipul capsaicinei ce se găsesc în ardei din specia *Capsicum* au fost studiate datorită proprietăților antioxidante ce le dețin. O altă flavonoidă, cu structura simplă, des întâlnită în plantele comestibile, este guaiacolul. Guaiacolului i s-a atribuit activitate antioxidantă celulară și abilitatea de a contracara efectele unor agenți patogeni. [45].

Obiectivul principal al acestei teze este studiul cineticii unor reacții catalizate de anumite oxidoreductaze, în vederea obținerii unor modele cinetice simple și plauzibile și găsirea celor mai buni modulatori pentru mărirea stabilității operaționale și a termostabilității acestora. Dintre multitudinea de enzime cu potențial de utilizare în industrie au fost alese *catalaza* (enzimă cu specificitate mare de substrat) și *peroxidaza* (enzimă cu specificitate mică, capabilă să oxideze un număr mare de derivați fenolici). Aceste enzime au în structura situsului activ Fe. Din analiza interacțiilor între modulatori și situsul activ al enzimei se preconizează elaborarea unei strategii de selecție a unui stabilizator optim pentru fiecare enzimă.

Principalele aspecte urmărite în cadrul acestei lucrări au fost:

- Studiul efectului solventului, tăriei ionice și pH-ului asupra stabilității și inactivării catalazei din ficat bovin în cursul reacției de descompunere a apei oxigenate.
- Studiul efectului unor aditivi asupra termostabilității catalazei, în absența și în prezența substratului.

Cinetica inactivării enzimatice modulată de aditivi

- Studiul influenței naturii substratului asupra cineticii oxidării cu apa oxigenată în prezența peroxidazei din hrean și a inactivării acesteia folosind metoda izoconversională.
- Cinetica oxidării quercetinei cu diferiți agenți oxidanți: oxigen (autooxidare) în diferite medii, apa oxigenată (oxidare chimică), apa oxigenată și peroxidaza din hrean (oxidare enzimatică) și identificarea produșilor de oxidare rezultați.
- Cinetica oxidării catechinei cu diferiți agenți oxidanți: oxigen (autooxidare), apă oxigenată (oxidare chimică), apă oxigenată și peroxidaza din hrean (oxidare enzimatică) și identificarea produșilor de oxidare rezultați.
- Identificarea produșilor de oxidare ai catechinei și quercetinei și stabilirea unui model cinetic plauzibil.

Teza de doctorat cuprinde o parte de literatură care descrie stadiul actual al cunoașterii în domeniul studiat și o a doua parte, de contribuții originale, bazată pe rezultatele experimentale obținute pe perioada derulării cercetării pentru elaborarea tezei de doctorat.

În partea de literatură sunt prezentate aspecte referitoare la: cinetica reacțiilor catalizate de enzime (cap. I.1), inactivarea enzimelor (cap I.2), modalități de combatere a stresului oxidativ prin sisteme enzimatice și neenzimatice (cap I.3), activitatea catalitică a catalazei din ficat bovin și a peroxidazei din hrean (HRP) (cap. I. 4). În partea originală a lucrării sunt prezentate studiile cinetice în ceea ce privește stabilitatea și inactivarea catalazei (Cap. II.1) și inactivarea peroxidazei din hrean la oxidarea unor substraturi precum: catechina, quercetina, guaiacolul și capsaicina (cap. II.2)

II. PARTEA ORIGINALĂ

II.1.a. Influența solventului asupra cineticii descompunerii apei oxigenate în prezența catalazei

Studiul a urmărit cinetica descompunerii apei oxigenate în prezența catalazei în medii parțial apoase. Pentru componenta neapoasă s-au folosit alcooli mono și polihidroxilici în încercarea de a schimba concentrația grupărilor OH păstrând nemodificată natura chimică a mediului. S-au realizat corelații viteză de reacție/constante de viteză cu proprietățile fizice ale solventului: constanta dielectrică (D), hidrofobicitatea (log P), concentrația de grupări hidroxil (OH), polarizabilitatea (α), parametrul Kamlet Taft (β) și parametrul Kosover (Z). Printr-o metodă spectrofotometrică s-a urmărit descompunerea apei oxigenate în prezența catalazei folosind ca mediu de reacție amestecuri apoase cu metanol, etanol, propanol, butanol, 2 propanol, 1, 2 etandiol, 1,2,3 propantriol, în diferite concentrații. Din datele absorbanta în funcție de timp, au fost calculate concentrațiile de apă oxigenată rămasă neraționată, [S], conform legii Lambert-Beer, după ce s-au scăzut absorbanțele corespunzătoare enzimei și solventului.

În figura (II.1.2.) sunt prezentate pentru ilustrare curbele cinetice integrale obținute pentru descompunerea apei oxigenate în amestecurile apă – etanol. Similar s-au obținut curbe cinetice integrale pentru celelalte amestecuri apă- alcool.

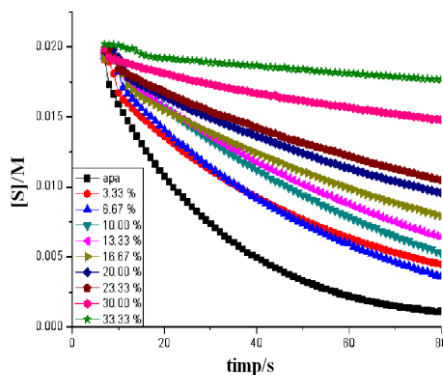


Figura II.1.2. Curbele cinetice integrale în amestecuri etanol-apă (%vol)

Din curbele cinetice integrale $[S] = f(\text{timp})$ au fost estimate vitezele momentane de reacție (v_R) și vitezele inițiale de reacție (v_R^0) prin fitarea unor funcții cu 4 parametri (a,b,c,d) date de ecuația (II.1.1) și derivarea acestora la fiecare timp.

$$y = ae^{-bx} + ce^{-dx} \quad (\text{II.1.1})$$

Ținând cont de stoichiometria reacției, se obțin expresiile pentru vitezele de reacție:

$$v_R = \frac{1}{v_S} \frac{d[S]}{dt} = abe^{-bt} + cde^{-dt} \quad (\text{II.1.2})$$

$$v_R^0 = \left(\frac{1}{v_S} \frac{d[S]}{dt} \right)_{t=0} = ab + cd \quad (\text{II.1.3})$$

Vitezele inițiale de reacție sunt prezentate în figura (II.1.8.).

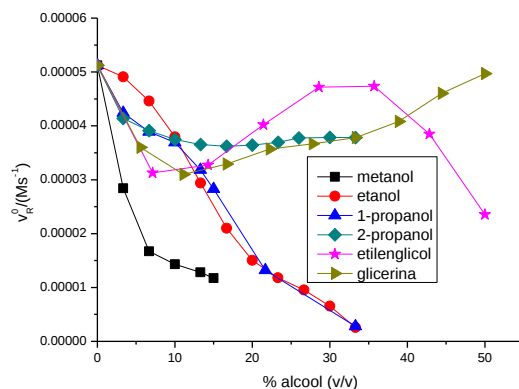


Figura II.1.8. Variația vitezei inițiale de reacție cu proporția de component hidroxilic (%vol)

S-a observat că se produce scăderea vitezei inițiale de reacție pentru majoritatea amestecurilor de reacție. Pentru a explica inactivarea enzimei în cursul reacției s-a utilizat un model cinetic (II.1.6), care presupune existența unei etape de inactivare lentă a enzimei, datorită adăugării componentului neapos [125].



unde E_{in} reprezintă o formă inactivă a catalazei.

Datele de literatură arată că prima etapă a modelului cinetic este controlată de difuzie, deci valoarea k_1 este aproape constantă [68]. Pentru estimarea constantelor de viteză k_2 și k_3 s-a folosit metoda de rezolvare numerică a sistemului de ecuații diferențiale ce descrie evoluția în timp a sistemului [114]. Sistemul de 5 ecuații diferențiale corespunzător modelului cinetic (II.1.6) este reprezentat de vitezele de transformare ale celor 5 componenți:

$$\begin{cases} \frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_2[X_1][S] - k_3[E] \\ \frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] - k_2[X_1][S] \\ \frac{d[X_1]}{dt} = k_1[E][S] - k_2[X_1][S] \\ \frac{d[P]}{dt} = k_2[X_1][S] \\ \frac{d[E_{in}]}{dt} = k_3[E] \end{cases} \quad (II.1.8)$$

Prin introducerea condițiilor inițiale ($k_1=1.4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ și $[E]_0=3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, $[S]_0=0.021 \text{ M}$), au fost estimate cele mai bune constante de viteză k_2 și k_3 , care duc la o suprapunere a datelor simulate cu cele experimentale. Valorile constantei de inactivare k_3 sunt situate în intervalul $10^{-2} \cdot 10^0 \text{ s}^{-1}$, ceea ce confirmă presupunerea unei inactivări lente a enzimei; k_3 crește cu conținutul de component neapos pentru toate amestecurile binare; pentru amestecurile ce conțin 2-propanol și glicerină, variația este mai mică.

În continuare au fost analizate efectele mai multor proprietăți ale solventului asupra parametrilor cinetici v_R^0 , k_2 și k_3 .

Una din cele mai utilizate proprietăți ale solventului, din punct de vedere al influenței asupra cineticii reacțiilor chimice, este constanta dielectrică (D). Pentru a studia efectul alcoolilor asupra cineticii descompunerii apei oxigenate în prezența catalazei a fost utilizat un model de solvatare dielectrică, propus de Hiromi [128,129]. Acest model consideră solventul ca un mediu continuu izotrop, cu constanta dielectrică D , iar ionul inclus într-o cavitate sferică cu raza b și constantă dielectrică internă D_i în care se găsesc M sarcini discrete, punctiforme $e_1, e_2 \dots e_M$. Ca mediu de referință se utilizează un mediu ipotetic de constantă dielectrică infinită. Modelul cinetic propus anterior (II.1.6) poate fi scris, ținând cont de formarea în fiecare etapă a complexilor activați respectivi, astfel:



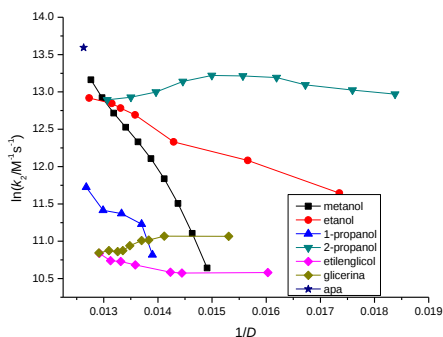
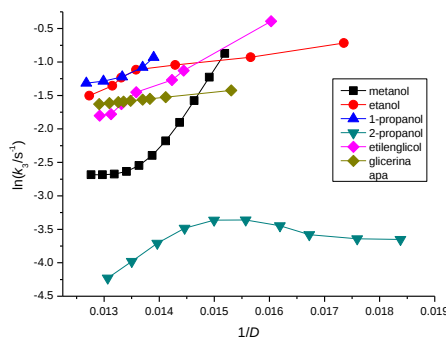
unde $ES^\ddagger$ și $E^\ddagger$ sunt complexii activați (stările de tranziție) corespunzătoare etapelor elementare 2 și 3.

Folosind modelul Hiromi și presupunând că razele moleculare ale complexului X_1 și ale complexului activat $ES^\ddagger$ sunt egale cu cele ale enzimei libere, ținând cont că apa oxigenată are o rază foarte mică comparativ cu cea a enzimei, s-a considerat că $b_{X_1} = b_{ES^\ddagger} = 42 \cdot 10^{-10} \text{ m}$ [129]; se obțin astfel ecuațiile pentru variația constantelor de viteză k_2 și k_3 .

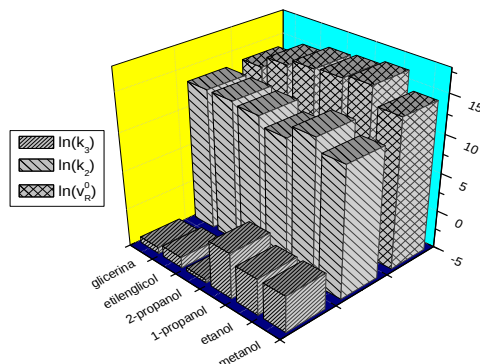
Conform acestor ecuații, în cazul în care solvatarea este dielectrică, se obține o dependență liniară între logaritmul constantei de viteză și inversul constantei dielectrice a solventului. Din dependența $\ln k_2 = f(1/D)$ și $\ln k_3 = f(1/D)$, se pot face aprecieri cu privire la configurația sarcinilor în complexul X_1 și starea de tranziție $ES^\ddagger$, respectiv în catalaza E și

Cinetica inactivării enzimice modulată de aditivi

complexul activat $E^\ddagger$. În figurile (II.1.12.) și (II.1.13.) sunt prezentate variațiile constantelor k_2 și k_3 în funcție de constanta dielectrică a mediului, care sunt cvasiliniare sau prezintă domenii cvasiliniare. Rezultatele au fost utilizate pentru a evalua dispersia sarcinii în stările de tranziție comparativ cu stările inițiale corespunzătoare.


 Figura II.1.12. Variația constantei k_2 în funcție de $1/D$

 Figura II.1.13. Variația constantei k_3 în funcție de $1/D$

Pentru a vedea dacă influența solventului este descrisă numai de constanta dielectrică, au fost calculate valorile v_R^0 , k_2 și k_3 pentru un mediu izodielectric cu $D = 76$ prin interpolare. Rezultatele sunt prezentate în figura (II.1.14.), aceeași tendință a fost obținută și pentru alte medii izodielectrice. Cum valorile obținute nu sunt constante, aceasta înseamnă că cinetica acestei reacții este influențată și de prezența altor interacții specifice (hidrofobe, acido-bazice, etc). În concluzie, se poate spune că efectul solventului poate fi explicat parțial prin influența constantei dielectrice, dar există și alte interacții care sunt importante.


 Figura II.1.14. Variația parametrilor cinetici în condiții izodielectrice ($D=76$)

De aceea, s-a studiat și influența altor proprietăți fizice ale solvenților. Una din proprietățile larg utilizate pentru a descrie hidrofobicitatea/lipofilicitatea unui solvent este $\log P$ ce reprezintă coeficientul de partiție a unui compus între două faze nemiscibile [132].

Pentru amestecurile binare utilizate, valorile $\log P$ au fost calculate ca [133]:

$$\log P_{\text{mixture}} = x_w \log P_w + x_s \log P_s \quad (\text{II.1.14})$$

S-a observat că în toți solvenții binari, mai puțin 2-propanolul, variația parametrilor cu $\log P$ este monotonă. În cazul în care se consideră o fracție molară constantă ($x_s = 0.06$), dependența nu mai este monotonă figura (II.1.18.).

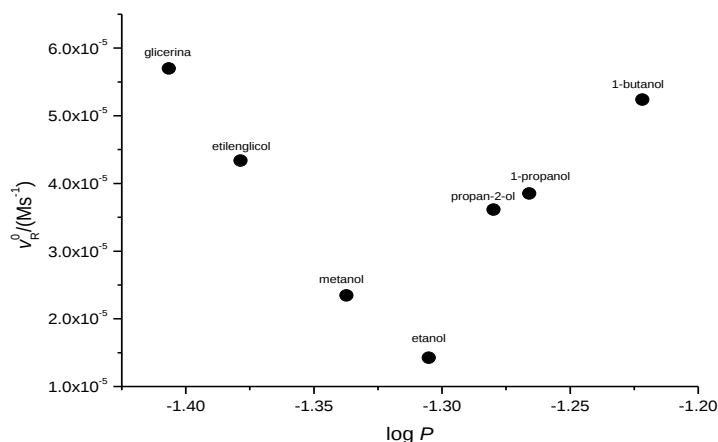


Figura II.1.18. Variația vitezei inițiale cu hidrofobicitatea la compoziție constantă ($x_s = 0.06$)

Datorită faptului că pentru 1-propanol și 2-propanol s-au obținut valori mai mari ale vitezei inițiale, au fost realizate experimente și în amestecuri de apă cu 1-butanol (până la limita de solubilitate a acestuia). Rezultatele arată că dependența vitezei inițiale de hidrofobicitatea mediului, exprimată prin $\log P$ poate fi împărțită în două zone distincte: până la valoarea $\log P = -1.30$ are loc o scădere a activității catalazei, iar la valori mai mari de -1.30 se observă o creștere a activității catalazei. Pentru alcoolii multihidroxicilici (etilenglicol și glicerina) și alcoolii monohidroxicilici cu lanț scurt (metanol, etanol) activitatea catalazei scade cu hidrofobicitatea solventului, în timp ce pentru alcoolii monohidroxicilici cu lanț hidrocarbonat mai mare (1-propanol, 2-propanol, 1-butanol), are loc o creștere a activității cu hidrofobicitatea solventului.

Comparând aceste rezultate cu cele obținute în cazul efectului constantei dielectrice, se poate spune că pentru alcoolii care solvatează preponderent dielectric, activitatea enzimatică scade cu $\log P$, în timp ce pentru alcoolii pentru care s-au evidențiat și efecte de solvatare specifică, activitatea catalazei crește cu hidrofobicitatea solventului.

Datele de literatură arată că numărul de grupări hidroxil, în special în cazul alcoolilor polihidroxicilici, are un efect semnificativ asupra stabilității și activității unor enzime [134]. Pentru toate amestecurile apa-alcool utilizate, a fost calculată concentrația de grupări hidroxil $[\text{OH}]$ din datele de densitate [135] și fracțiile molare corespunzătoare. S-a observat că viteza inițială de reacție crește cu concentrația grupărilor hidroxil pentru toți solventii.

Pentru alcoolii primari (metanol, etanol și 1-propanol) variația este aproximativ liniară, cu pante de aproximativ 10^{-7} s^{-1} . Pentru alcoolii polihidroxicilici (etilenglicol și glicerina), variația este tot liniară, dar pantele sunt aproximativ de 10 ori mai mici decât în cazul alcoolilor monohidroxicilici, iar în cazul 2-propanolului variația nu este liniară. Se poate spune că cel mai important efect asupra activității catalazei îl au grupările hidroxil primare ale alcoolilor.

Deoarece rezultatele obținute pentru fiecare parametru al solventului în parte nu au dus la o concluzie clară în ceea ce privește ponderea pe care o au diferitele proprietăți fizice ale solventului asupra parametrilor cinetici ai reacției de descompunere a apei oxigenate în prezența catalazei, s-a trecut la o abordare multiliniară, în care se consideră efectul cumulat al mai multor proprietăți. Datele de literatură arată că se pot utiliza numeroase proprietăți fizice și empirice ale solventilor pentru analiza multivariată a comportării unei reacții chimice în solventi organici [136]. Pentru o abordare cât mai rațională și corectă, trebuie ales un set cuprinzând un număr mic de parametri reprezentativi, care să fie independenți unul față de celălalt.

Există mai multe seturi de parametri ce au fost utilizați în literatură. Dintre acestea, o abordare utilizată frecvent în cinetica chimică [137, 138] cuprinde un set de patru parametri caracteristici, dintre care doi caracterizează interacțiile nespecifice, iar doi interacțiile specifice solvent-solut. Ecuația dependenței multiliniare descrie variația vitezei de reacție sau a constantelor individuale de viteză cu acest set de patru parametri și este de forma:

$$A = A_0 + yY + pP + eE + bB \quad (\text{II.1.15})$$

unde A este variabila dependentă (viteza inițială de reacție sau constanta de viteză), A_0 valoarea variabilei dependente în mediul de referință, Y și P sunt proprietăți nespecifice ale solventului care măsoară solvatarea electrostatică, E și B proprietăți specifice ale solventului care măsoară aciditatea și bazicitatea Lewis (solvatarea electrofilă și nucleofilă) iar y , p , e și b sunt coeficienții de regresie care măsoară sensibilitatea răspunsului variabilei dependente la cele patru variabile independente [136].

În cazul reacției studiate au fost aleși ca descriptori ai solventului următoarele proprietăți: funcția Kirkwood $(D-1)/(2D+1)$ pentru Y , polarizabilitatea α pentru P , parametrul Kamlet – Taft β pentru E și numărul lui Kosower Z pentru B ; cu acești descriptori, ecuația (II.1.14) devine:

$$A = A_0 + y \cdot \frac{D-1}{2D+1} + p \cdot \alpha + e \cdot \beta + b \cdot Z \quad (\text{II.1.16})$$

A fost utilizată această ecuație pentru fiecare amestec apă alcool, la diferite proporții ale alcoolului. Se observă că există corelații foarte bune în cazul amestecurilor de apă cu metanol, etanol, 1-propanol; coeficientul de determinare r^2 scade ușor în cazul amestecurilor cu 2-propanol și etilenglicol, iar în cazul glicerinei se obțin coeficienți de determinare foarte mici.

Pentru a vedea efectul acestor descriptori globali, asupra tuturor amestecurilor, viteza inițială și constantele de viteză k_2 și k_3 au fost estimate la o singură fracție molară de solvent ($x_s = 0,06$).

Se observă că sensibilitatea vitezei inițiale de reacție este de același ordin de mărime în raport cu parametrul Kirkwood, α , și β , dar mai mică în raport cu Z . Viteza inițială crește cu variația tuturor descriptorilor, cu excepția $(D-1)/(2D+1)$. Deoarece viteza inițială nu ia în considerare și inactivarea enzimei, aceeași corelație este de așteptat și în cazul constantei k_2 . Rezultatele prezentate în tabelul (II.1.5) sugerează că valoarea constantei de viteză k_2 este influențată majoritar de $(D-1)/(2D+1)$ și α și crește cu creșterea valorii tuturor descriptorilor. În ceea ce privește constanta de inactivare k_3 , corelația este slabă.

II.1.b. Influența pH-ului și a tăriei ionice asupra cineticii descompunerii apei oxigenate în prezența catalazei

În acest capitol este prezentat studiul cinetic privind descompunerea apei oxigenate în prezența catalazei la tărie ionică cuprinse între 0.002M și 0.1M și pH între 4 și 11. Tăria ionică a fost modificată prin utilizarea de concentrații diferite de tampon citrat, tampon fosfat și tampon carbonat. S-a observat că la toate tăriele ionice studiate, activitatea catalazei nu variază foarte mult cu pH-ul, cu excepția pH-ului extrem acid. Vitezele inițiale de reacție, calculate conform ecuației (II.1.3) sunt prezentate în figura (II.1.25.).

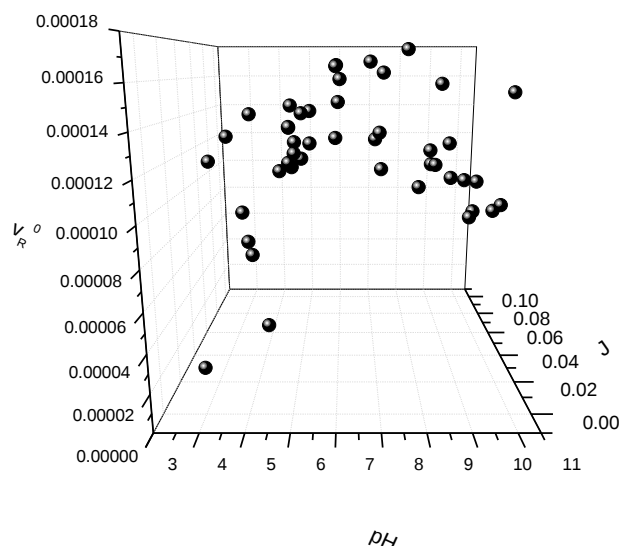


Figura II.1.25. Variația vitezei inițiale de reacție cu pH-ul și tăria ionică a mediului

Se observă că există o variație sub formă de clopot a vitezei inițiale de reacție cu pH-ul mediului; în ceea ce privește tăria ionică, nu există o dependență bine definită.

Pentru $pH = 6$ au fost utilizate două soluții tampon diferite (acid citric-fosfat disodic și fosfat monosodic-fosfat disodic) pentru a vedea dacă și componenții tamponului au o influență asupra activității catalazei. S-a observat că pentru tării ionice mici valorile vitezei de reacție nu depind semnificativ de prezența tamponului și de natura acestuia. Estimarea constantelor individuale de viteză a fost făcută pe baza modelului cinetic (II.1.6), utilizând rezolvarea sistemului de ecuații diferențiale ce descrie evoluția în timp a sistemului (II.1.8). Pentru pH-uri medii, nu există o variație semnificativă cu tăria ionică a tamponului utilizat. Pentru pH 4, la tării ionice extreme, se obțin valori mici ale constantei de viteză k_2 . În ceea ce privește variația constantei de inactivare k_3 cu tăria ionică a mediului, și în acest caz se observă că valorile cele mai mici se găsesc pe intervalul de pH mediu (6-8). La pH acid (4) și tării ionice mari, catalaza se inactivează foarte mult, datorită denaturării [139].

II.1.c. Efectul unor aditivi asupra stabilității termice a catalazei

O modalitate simplă de a stabili enzimă împotriva inactivării termice este adăugarea în mediul de reacție a unor substanțe simple: săruri, poliooli, glucide, alți compuși organici [111,126, 144]. De aceea, s-a încercat estimarea constantelor de inactivare termică pentru reacția de descompunere a apei oxigenate în prezența catalazei în condițiile în care în mediul de reacție au fost prezenți diferiți aditivi. Aceștia au fost: etanolul, etilenglicolul, glicerina și zaharoza. [134,146 - 148]. Termoinactivarea catalazei a fost studiată în două tipuri de condiții: în prezența substratului, prin măsurarea cantității de apă oxigenată consumată în timp la diferite temperaturi cuprinse în intervalul 30-60°C, sau prin incubarea enzimei în absența substratului la diferite temperaturi și pentru diferiți timpi și efectuarea de măsurători cinetice la temperatura camerei, după diferiți timpi de incubare [154]. De asemenea, pentru experimentele realizate în mediu apos fără aditivi, au fost făcute și măsurători la concentrație constantă de apă oxigenată și concentrații variabile de enzimă 10^{-7} - 10^{-6} M (în proteină) și mai multe temperaturi situate în intervalul 30-

55°C. Aceste măsurători au fost necesare pentru aplicarea metodei izoconversionale [148] pentru estimarea constantelor globale de inactivare.

Vitezele inițiale de reacție, calculate conform ecuației (II.1.3) și prezentate în figura (II.1.42.) corespunzătoare termoinactivării catalazei în prezența substratului, prezintă un maxim la valoarea de 40°C pentru apă și amestecurile apă-etilenglicol și glicerină, 43°C pentru amestecul apă-NaCl și 45°C pentru amestecul apă-zaharoză.

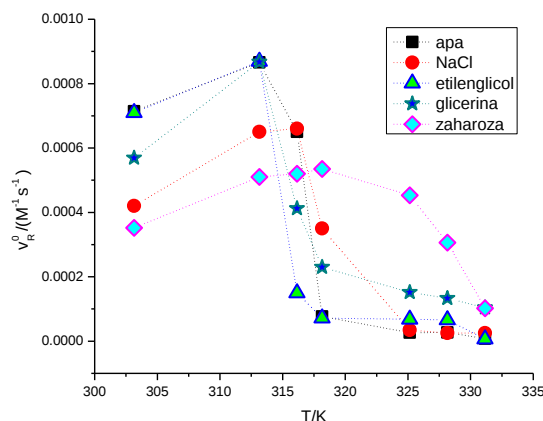


Figura II.1.42. Variația vitezelor inițiale de reacție cu temperatura

În prezența NaCl sau a zaharozei, vitezele inițiale sunt mai mici decât în celelalte medii la temperaturi sub 45°C. La temperaturi mai mari în prezența zaharozei și a glicerinei, termoinactivarea este mai puțin vizibilă. Ținând cont că determinările s-au făcut la temperaturi diferite, toate constantele cinetice corespunzătoare modelului cinetic (II.1.6) variază cu aceasta. S-a utilizat metoda de estimare a tuturor constantelor de viteză prin rezolvarea sistemului de ecuații diferențiale (II.1.8). Pentru mediul apos rezultatele sunt prezentate în figura (II.1.43.).

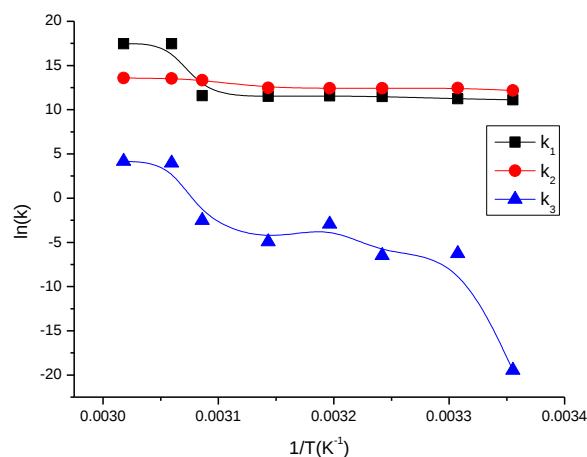


Figura II.1.43. Variația constantelor de viteză cu temperatura în mediu apos.

Se observă în figura (II.1.43.) că cea mai mare variație o prezintă constanta de inactivare k_3 . Pentru fiecare din etape s-au estimat energiile de activare din panta dependenței $\ln(k_i) = f(1/T)$. Rezultatele indică faptul că inactivarea termică este un proces lent și de probabilitate mică,

energia sa de activare fiind de aproximativ 50 de ori mai mare decât energiile de activare ale celorlalte două etape.

O metodă utilă dar calitativă de a determina dacă o enzimă suferă un proces de inactivare, este metoda Selwyn [149], care implică efectuarea a mai multor seturi cinetice, la concentrații inițiale diferite de enzimă și aceeași concentrație de substrat. Pe baza acestei metode s-a propus utilizarea unei metode izoconversionale [148] pentru estimarea constantelor de inactivare. S-au făcut determinări cinetice în mediu apos la mai multe temperaturi pe intervalul 35-55 °C, utilizând mai multe concentrații de enzimă pe intervalul $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ M.

Pentru fiecare din temperaturi s-a evidențiat apariția fenomenului de inactivare din dependența $[S]=f([E]_0 \cdot t)$. S-a observat că la creșterea temperaturii, inactivarea devine mai importantă, așa cum se vede din figurile (II.1.47.) și (II.1.48.).

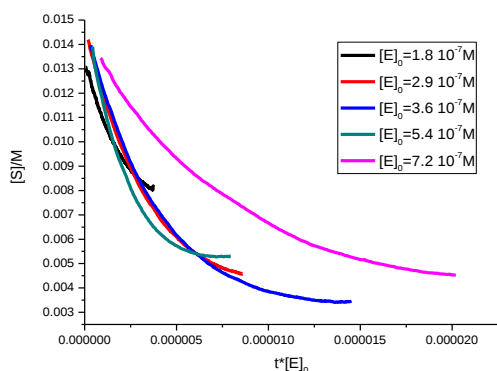


Figura II.1.47. Curba Selwyn pentru apă la 55°C

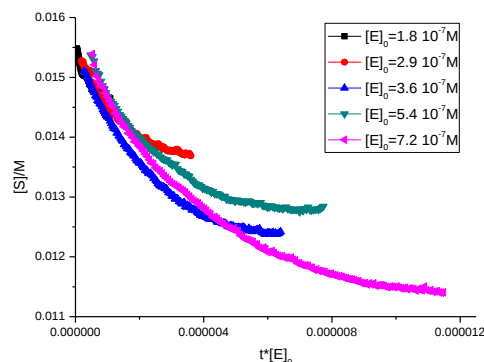


Figura II.1.48. Curba Selwyn pentru apă la 35°C

Odată ce procesul de inactivare a fost pus în evidență, din curbele $[S]=f(\text{timp})$, au fost determinați timpii de reacție corespunzători unei concentrații fixe de substrat la diferite valori $[E]_0$, precum și derivatele în punctul respectiv. Aceasta s-a făcut prin fitarea unei funcții de forma ecuației (II.1.1) pe datele experimentale, urmată de interpolare și derivare numerică în punctul respectiv.

Pentru o inactivare globală de ordinul I, derivatele $(d[S]/dt)_i$ pentru o valoare fixă a $[S]$ depind de timpii izoconversionali și, conform ecuației (II.1.16):

$$\frac{d[S]}{dt} = f([S])[E]_{0,i} e^{-k_{in} t_i} \quad (\text{II.1.16})$$

Din această ecuație, constanta globală de inactivare k_{in} poate fi estimată prin regresie liniară pe ecuația (II.1.17):

$$\ln \left[\left(\frac{d[S]}{dt} \right)_i \frac{1}{[E]_{0,i}} \right] = \ln f([S]) - k_{in} t_i \quad (\text{II.1.17})$$

când panta obținută este egală cu constanta de inactivare. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura (II.1.49.). Se observă că, valorile obținute sunt de același ordin de mărime pentru temperaturi de până la 45°C, la temperatura de 55°C existând abateri semnificative, ce pot fi puse pe seama erorilor apărute în cazul estimării pe baza modelului cinetic, unde numărul de parametri estimați este destul de mare.

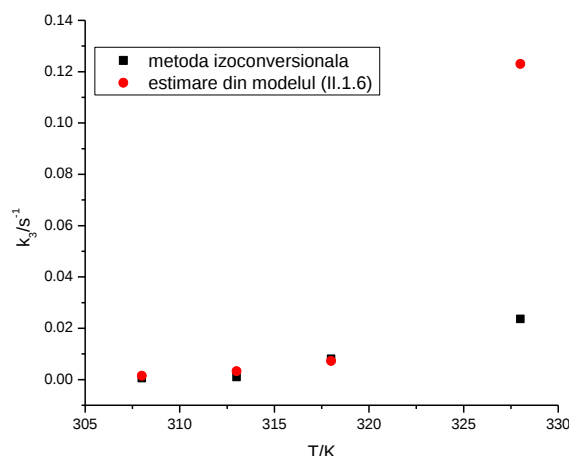


Figura II.1.49. Valori comparative ale constantelor de inactivare în mediu apos

Energia de activare corespunzătoare inactivării a fost estimată din dependența $\ln(k_{in}) = f(1/T)$ și este de 136 kJ/mol, similară celei obținute în cazul estimatelor din modelul cinetic (II.1.6).

Termoinactivarea în absența substratului

Au fost calculate vitezele inițiale de reacție conform ecuației (II.1.3), ținând cont că acestea depind atât de natura aditivului, de timpul de incubare, și de temperatură. Au fost calculate vitezele relative de reacție conform ecuației:

$$v_R^{rel} = \frac{(v_R^0)t_{in}}{(v_R^0)t_0} \quad (II.1.18)$$

unde $(v_R^0)t_{in}$ este viteza inițială de reacție după un anumit timp de incubare t_{in} și $(v_R^0)t_0$ este viteza inițială de reacție corespunzătoare timpului inițial (înaintea incubării). Variația vitezelor inițiale relative arată că gradul de inactivare crește cu temperatura pentru toți aditivii utilizați. Dacă se compară valorile relative pentru mediile cu aditivi la fiecare temperatură, se poate spune că adăugarea de NaCl sau etilenglicol nu are nici un efect asupra stabilizării termice a enzimei, în timp ce glicerina și zaharoza au efect de termostabilizare. Odată cu creșterea temperaturii, peste temperatura la care activitatea catalazei este optimă, se observă un efect de inactivare al etilenglicolului, în timp ce glicerina și zaharoza protejează enzima împotriva inactivării termice.

Pentru a afla modelul cinetic adecvat termoinactivării catalazei, ecuațiile cinetice caracteristice unor modele des întâlnite în literatură [142,150], au fost fitate pe datele vitezei inițiale relative în funcție de timpul de incubare. Modelele au fost alese pe baza observației că datele obținute de noi arată o scădere exponențială, caracteristica unor procese de ordinul I; modelele alese sunt prezentate în tabelul (II.1. 9.). Au fost selectate trei modele: un model de ordinul I cu formare de enzimă total inactivă (D), un model de ordinul I cu formarea unei specii parțial active (E^*) și un model în care formarea enzimei inactive are loc în două etape succesive de ordinul I. (k_1 este constanta cinetică a primei etape de inactivare, k_2 este constanta cinetică a celei de-a doua etape de inactivare, iar β^* reprezintă activitatea parțială inițială a enzimei active).

Tabelul II.1.9. Modele de termoinactivare și ecuațiile cinetice caracteristice

Model cinetic	Ecuatie cinetică
E→D (inactivare totală)	$v_R^{rel} = \exp(-k_1 \cdot t)$ (II.1.19)
E→E* (inactivare parțială)	$v_R^{rel} = (1 - \beta^*) \exp(-k_1 \cdot t) + \beta^*$ (II.1.20)
E→E*→D (inactivare succesivă)	$v_R^{rel} = \exp(-k_1 \cdot t) + \beta^* \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 \cdot t))$ (II.1.21)

Estimarea parametrilor cinetici corespunzători procesului de termoinactivare a fost făcută prin regresie neliniară, iar pentru discriminarea între modelele cinetice au fost considerate atât criterii statistice, cât și restricții fizice. Între criteriile statistice au fost incluse intervalul de confidență a parametrilor estimați și calitatea fitării dată de coeficientul de corelație ajustat (R^2_{adj}), suma pătratelor reziduurilor (SS) și distribuția acestora. A fost de asemenea inclusă și valoarea testului Fischer (F) astfel încât valorile să fie cât mai mari și peste valoarea critică corespunzătoare numărului de puncte experimentale și numărului de parametri din modelul considerat. Restricțiile fizice au inclus obținerea unor parametri pozitivi și care să nu depășească valoarea limită maximă corespunzătoare teoriei complexului activat. În funcție de aditivul adăugat, cel mai potrivit model obținut este cel cu inactivare parțială a enzimei în apă și în prezența NaCl sau a zaharozei, modelul cu inactivare totală în cazul în care aditivul a fost etilenglicolul și modelul de inactivare succesivă în cazul utilizării glicerinei.

În figura (II.1.55.) sunt reprezentați timpii de înjumătățire relativi, calculați ca raport între timpii de înjumătățire în prezența aditivilor și cei obținuți în mediu apos. Se observă că la 30°C fiecare aditiv utilizat duce la stabilizarea catalazei, la 45°C doar etilenglicolul duce la inactivarea suplimentară a enzimei, iar la 60°C, cel mai bun termostabilizator este zaharoza.

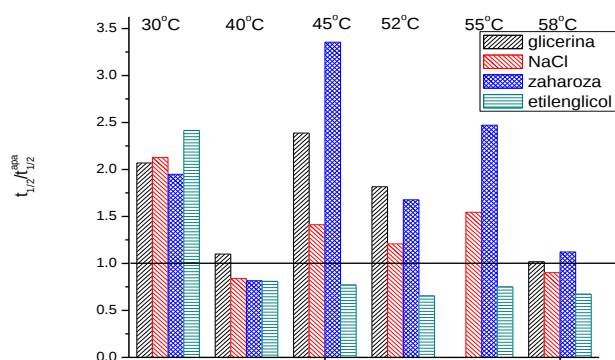


Figura II.1.55. Timpii relativi de înjumătățire în prezența aditivilor

Pentru a caracteriza capacitatea globală de termostabilizare a aditivilor, s-au estimat de asemenea și energiile de activare corespunzătoare inactivării prin regresie liniară pe ecuația:

$$\ln(k_1) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (\text{II.1.23})$$

Rezultatele, prezentate în tabelul (II.1.11), arată că cei mai buni stabilizatori sunt glicerina și zaharoza.

Tabelul II.1.11. Energiile de activare în prezența aditivilor

Aditiv	E _a (kJ/mol)
-	106.2±15.1
NaCl	115.4±18.1
etan-1,2-diol	100.7±15.5
propan-1,2,3-triol	125.9±14.7
zaharoza	127.6±12.2

II.2.a. Utilizarea metodei izoconversionale pentru identificarea inactivării peroxidazei

II.2.a1. Oxidarea capsaicinei

Pentru oxidarea capsaicinei a fost utilizată tot metoda spectrofotometrică; a fost utilizat un extract alcoolic de capsaicină obținut dintr-o specie de ardei iute (*Capsicum*). Au fost înregistrate spectrele de absorbție UV-VIS și a fost aleasă ca lungime de undă pentru măsurători cantitative $\lambda=262\text{nm}$, unde absorb produșii de reacție. Pentru a vedea dacă enzima este inactivată în timpul procesului catalitic, s-a realizat o reprezentare Selwyn care a indicat existența inactivării. În continuare s-a utilizat metoda izoconversională și au fost calculați timpii corespunzători absorbanței $A=1.8$ și derivatele corespunzătoare dA/dt ; din reprezentarea grafică $\ln[(dA/dt)_i \cdot 1/[E]_{0,i}] = f(t_i)$ figura (II.2.3.) a fost determinată constanta de inactivare egală cu $(2.87 \pm 0.16) 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

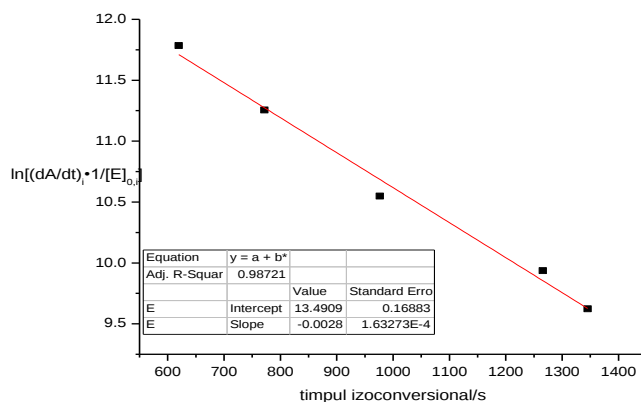


Figura II.2.3. Estimarea constantei de inactivare la oxidarea capsaicinei

II.2.a2. Oxidarea guaiacolului

Pentru oxidarea guaiacolului a fost utilizată tot metoda spectrofotometrică. S-a confirmat inactivarea peroxidazei utilizând o reprezentare Selwyn și s-a utilizat în continuare metoda

izoconversională. Dependența $\ln[(d[P]/dt)_i \cdot 1/[E]_{0,i}] = f(t_i)$ este liniară, iar constanta de inactivare medie este de $(9.22 \pm 0.28) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

II.2.a3. Oxidarea catechinei

Printr-un procedeu similar s-a determinat constanta medie de inactivare cu valoarea de $(2.32 \pm 1.28) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

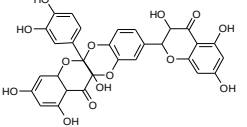
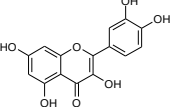
II.a4. Oxidarea quercetinei

Reacția de oxidare a quercetinei a fost urmărită atât în etanol, cât și în metanol pentru a vedea dacă solventul are o influență semnificativă asupra inactivării peroxidazei. Valorile constantelor de inactivare obținute în metanol sunt mai mari decât cele obținute în etanol.

II.2.b. Stabilitatea și inactivarea peroxidazei din hrean în prezența quercetinei și a apei oxigenate

Identificarea produșilor de reacție pentru autooxidare și oxidare enzimatică a quercetinei a fost realizată în timpul unui stadiu de pregătire la *Mediterranean Agronomic Institute of Chania (M.A.I.C.H)*, în cadrul departamentului “*Food Quality and Chemistry of Natural Products*” sub îndrumarea *Dr. Panagiotis Kefalas*. Folosind tehnicile cromatografice: LC-MS și HPLC a fost urmărită reacția de autooxidare și de oxidare enzimatică (în prezența și în absența apei oxigenate) a unor soluții etanolice de quercetină în prezența tamponului fosfat. În tabelul (II.2.3) sunt prezentați compușii identificați. Rezultatele tehnicilor utilizate indică faptul că produșii formați în urma autooxidării și oxidării sunt similari, dar mecanismul reacției diferă în funcție de agentul oxidant folosit [164, 168].

Tabel II.2.3. Compușii identificați prin analiza LC-MS pentru oxidarea enzimatică a quercetinei în prezența și absența apei oxigenate

Structură compus	Denumire	$[M+H]^+$
	Acid 2,4,6-trihidroxibenzoic	170
	Acid 3,4-dihidroxibenzoic	154
	Dimeri ai quercetinei	602.8
	Quercetina	303.5

Oxidarea enzimatică conduce la ruperea scheletului flavonoic rezultând acizii catehuic și galic și de asemenea dimeri și trimeri.

Cinetica oxidării quercetinei

Folosind o metoda spectrofotometrică a fost urmărită reacția de oxidare a quercetinei cu diferiți agenți oxidanți (oxigen, apă oxigenată) atât în absența cât și în prezența (HRP). În

absența enzimei a fost urmărită autooxidarea (oxidarea cu oxigenul dizolvat în apă) și oxidarea cu apă oxigenată. Oxidarea enzimatică a fost realizată în prezența apei oxigenate și a HRP. Pentru a vedea influența pe care o are mediul de reacție, măsurătorile au fost efectuate în mai multe medii: apă, soluții tampon, în prezența de surfactanți (Brij-neionic, HDPC-clorura de hexadecilpiridina-cationic, APG-alchilpoliglucozid) și alcoolii (metanol și etanol). În cazul investigării autooxidării soluției de quercetină dizolvată în surfactanții Brij sau HDPC, s-au observat două picuri la lungimile de undă 260 nm și 375 nm Brij, respectiv 389 nm HDPC, caracteristice quercetinei. Analiza spectrelor a condus la concluzia ca reacția de autooxidare poate fi neglijată în raport cu reacțiile de oxidare în prezența unor agenți oxidanți și a surfactanților.

În toate mediile utilizate, quercetina este oxidată, fenomen evidențiat prin scăderea maximelor de absorbție corespunzătoare lungimilor de undă 270 nm și 390 nm. De asemenea, se observă în toți solvenții, cu excepția etanolului o creștere a absorbanței la $\lambda = 320$ nm, creștere atribuită formării produșilor de reacție, dintre care heterodimerul este majoritar. Ținând cont că la toate maximele de absorbție există mai mult de un compus care absoarbe, analiza cinetică s-a realizat pe viteze inițiale de reacție la $\lambda = 370$ nm lungime de unda unde absoarbe majoritar quercetina, sau la $\lambda = 330$ nm [167], unde se formează dimerii. Pentru lungimea de undă corespunzătoare maximului de absorbție al benzii III ($\lambda = 370$ nm) s-au realizat curbe de calibrare pentru diluții succesive de quercetină. Pentru calculul vitezelor inițiale de reacție s-au utilizat numai absorbantele obținute la 370 nm și la 320 nm, utilizându-se absorbantele ca atare; pentru o analiză calitativă comparativă s-a utilizat ecuația (II.2.1), urmată de calculul derivatelor în punctul $t = 0$ [ecuația (II.2.2)].

$$[Qu] = ae^{-bt} + ce^{-dt} \quad (II.2.1)$$

$$v_R^0 = \left(\frac{1}{v_s} \frac{d[Qu]}{dt} \right)_{t=0} = ab + cd \quad (II.2.2)$$

Vitezele inițiale obținute sunt prezentate în tabelul II.2.5. Se observă că viteza de autooxidare este mai mare în medii alcoolice și crește cu creșterea pH-ului tamponului adăugat. În ceea ce privește formarea dimerilor, a fost observată aceeași ordine.

Tabelul II.2.5. Viteze inițiale la autooxidarea quercetinei în diferite medii

Mediu de reacție	$v_R^0 \cdot 10^8 / \text{Ms}^{-1}$
apa fara O ₂ dizolvat (Ar)	0.232
tampon pH=5.7	0.967
APG	0.658
etanol - apa	0.869
etanol – pH8	1.730
metanol-pH8	2.110
metanol-pH10	9.720

Pentru studiul oxidării chimice și enzimatică a quercetinei cu apa oxigenată, s-au utilizat în continuare numai soluții alcoolice, datorită solubilității mai mari a quercetinei în aceste medii, la care s-au adăugat soluțiile tampon realizate în apă.

Oxidarea quercetinei cu apă oxigenată

Soluțiile etanolice și metanolice de quercetină au fost oxidate cu apă oxigenată în prezența tamponului fosfat pH 8. Oxidarea a fost urmărită spectrofotometric prin înregistrarea unor spectre consecutive în timp, pe domeniul 250-450 nm. Datele sunt prezentate în figura (II.2.40.).

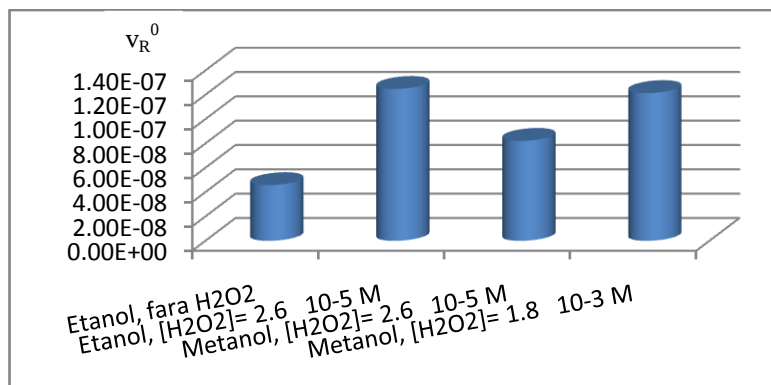


Figura II.2.40. Vitezele inițiale de reacție la oxidarea quercetinei cu H_2O_2 în mediu alcoolic

Influența concentrației reactanților asupra oxidării quercetinei cu apă oxigenată

Pentru a vedea influența concentrației reactanților și determinarea ordinelor parțiale de reacție, s-au făcut determinări în metanol utilizând metoda izolării. Din spectrele consecutive au fost calculate concentrațiile de quercetină rămasă nereacționată. Au fost determinate ordinele parțiale de reacție, obținându-se ordinul I în raport cu quercetina și ordinul 0 în raport cu apa oxigenată. Din aspectul curbelor absorbantă de dimeri în timp, se poate spune că la concentrații mari ale reactanților, dimerii se acumulează până la o anumită concentrație, după care are loc o transformare a acestora în acizi benzoici, dintre care au fost identificați acidul galic și acidul protocatehuic.

Oxidarea quercetinei cu apa oxigenată în prezența peroxidazei

S-a urmărit cinetica oxidării quercetinei cu apa oxigenată în prezența peroxidazei printr-o metodă spectrofotometrică, înregistrând spectre succesive în timp. S-au făcut determinări, în care s-au variat pe rând concentrația de enzimă, apă oxigenată și quercetină, menținând celelalte concentrații constante și modificând mediul de reacție prin solubilizarea quercetinei în metanol, etanol, utilizarea de soluții tampon de diferite pH-uri sau prin adăugarea de surfactanți. S-au obținut următoarele valori pentru ordinele parțiale de reacție: $\alpha_{Qu}=1$, $\alpha_{H_2O_2}=0.35$, $\alpha_{HRP}=0.11$. Pentru apa oxigenată și peroxidaza, coeficienții de determinare sunt foarte mici, indicând faptul că reacția urmărită nu este o reacție simplă, lucru confirmat și de celelalte date cinetice și de analizele cromatografice făcute pentru identificarea produșilor.

II.2.c. Stabilitatea și inactivarea peroxidazei din hrean în prezența catechinei și a apei oxigenate

Identificarea produșilor de reacție pentru autooxidarea și oxidarea enzimatică a catechinei a fost realizată în condiții similare cu cele discutate în cazul quercetinei. A fost urmărită reacția de autooxidare și oxidare enzimatică (în prezența și absența apei oxigenate) a unor soluții etanolice de catechină în prezența tamponului fosfat. În urma analizelor făcute au fost identificați

ca produși de reacție dimeri ai catechinei (dihidrocatechina A și B) cu structuri și proprietăți asemănătoare.

Cinetica oxidării catechinei

Oxidarea catechinei a fost urmărită printr-o metodă spectrofotometrică, în diferite condiții (mediu apos sau alcoolic în absența și prezența tamponului). S-a studiat atât oxidarea cu oxigen atmosferic (autooxidarea), cât și oxidarea enzimatică în prezența peroxidazei utilizând ca agent oxidant apa oxigenată. S-a urmărit cinetica autooxidării catechinei în mediu apos sau la pH acid și neutru.

Absorbanțele caracteristice catechinei și produșilor rezultați în urma reacției sale de autooxidare prezintă o deplasare batocromă cu creșterea pH-ului. Din absorbanțele caracteristice lungimii de undă corespunzătoare dimerilor, au fost calculate concentrațiile acestora. Dimerii formați suferă în timp alte reacții care duc la scăderea absorbției în timp. Folosind porțiunea inițială liniară a curbelor cinetice $[Dimeri] = f(t)$ s-au estimat vitezele inițiale de reacție pentru autooxidarea soluției etanolice de catechină la diferite pH-uri. În figura II.2.94 este prezentată variația vitezei inițiale de reacție cu pH-ul pentru reacția de autooxidare a soluției etanolice de catechină.

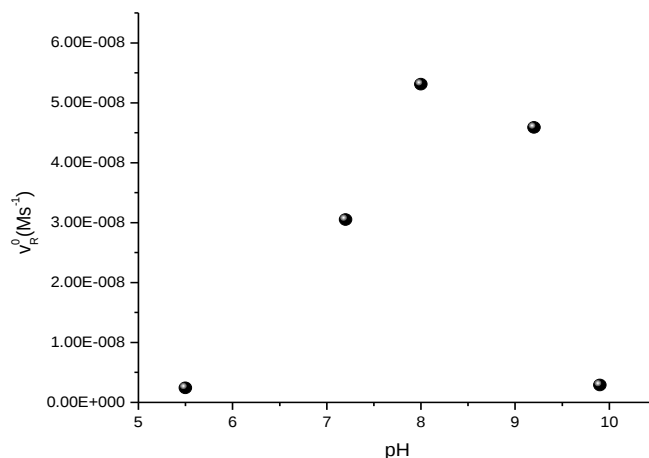


Figura II.2.94. Variația vitezei inițiale de reacție cu pH-ul soluției tampon adăugate pentru reacția de autooxidare a soluției etanolice de catechină

Oxidarea enzimatică a catechinei

Oxidarea enzimatică a catechinei a fost urmărită spectrofotometric. S-au realizat determinări experimentale în mai multe condiții: varierea concentrației de catechină și păstrarea concentrațiilor de apă oxigenată și enzima constantă, varierea concentrației de apă oxigenată și păstrarea concentrației de enzimă și de catechină constante, varierea concentrației de enzimă și păstrarea concentrațiilor de catechină și apă oxigenată constante. S-au înregistrat spectre succesive UV-VIS la intervale convenabile de timp, pe intervalul 200-800 nm, timp de 800 - 2000 secunde.

Influența concentrației de catechină

Folosind porțiunea liniară a curbelor cinetice $[Dimeri] = f(t)$, au fost estimate vitezele inițiale de reacție pentru diferite concentrații inițiale de catechină. Acestea au fost trecute în Tabelul (II.2.7).

Tabel II.2.7. Variația vitezeor inițiale de reacție cu concentrația de catechină

[Catechină]/M	$v_R^0 \cdot 10^8 (\text{Ms}^{-1})$
$5.00 \cdot 10^{-5}$	(2.68±0.15)
$7.50 \cdot 10^{-5}$	(4.40±0.39)
$1.25 \cdot 10^{-4}$	(9.25±0.78)

Valorile sunt mai mari decât cele obținute pentru autooxidare, iar din graficul $\ln(v_R^0) = f(\ln([Dimeri]))$ a fost determinat ordinul parțial de reacție în raport cu catechinea, obținându-se o valoare de 1.35 ± 0.06 , cu un coeficient de determinare de 0.9978.

Influența concentrației de apă oxigenată

Rezultatele obținute utilizând un procedeu similar sunt trecute în Tabelul (II.2.8).

Tabel II.2.8 Variația vitezelor de reacție cu concentrația de apă oxigenată

$[\text{H}_2\text{O}_2] \cdot 10^5 / \text{M}$	$v_R^0 \cdot 10^8 (\text{Ms}^{-1})$
5.5	(6.11±0.33)
6.0	(7.69±0.32)
7.3	(7.85±0.45)
8.0	(5.44±0.23)

Valorile sunt mai mari decât cele obținute pentru autooxidare; la creșterea concentrației de apă oxigenată peste $7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ apare o scădere a vitezei inițiale de reacție care poate fi atribuită inactivării peroxidazei. Din graficul $\ln(v_R^0) = f(\ln([Dimeri]))$ a fost determinat ordinul parțial de reacție în raport cu apa oxigenată, obținându-se o valoare de 1.01 ± 0.25 , cu un coeficient de determinare de 0.9678.

Influența concentrației de enzimă

S-a folosit un procedeu similar cazurilor prezentate mai sus și s-a calculat concentrația de dimeri pentru cazul în care concentrația de enzimă a fost variată iar restul componentelor au fost păstrate constante. Folosind porțiunea liniară a curbelor cinetice $[Dimeri] = f(t)$, au fost estimate vitezele inițiale de reacție.

Tabel II.2.9. Variația vitezelor inițiale de reacție cu concentrația de enzimă

$[\text{HRP}] \cdot 10^9 / \text{M}$	$v_R^0 \cdot 10^8 (\text{Ms}^{-1})$
6.75	(8.41±0.75)
7.89	(9.63±0.12)
11.5	(13.8±1.20)
14.1	(9.97±0.96)

Valorile sunt mai mari decât cele obținute pentru autooxidare; la creșterea concentrației de apă oxigenată peste 10^{-8} M apare o ușoară scădere a vitezei inițiale de reacție care poate fi atribuită inactivării peroxidazei. Din graficul $\ln(v_R^0) = f(\ln([Dimeri]))$ a fost determinat ordinul parțial de reacție în raport cu peroxidaza, obținându-se o valoare de 0.98 ± 0.12 , cu un coeficient de determinare de 0.9997.

Influența pH-ului mediului

S-a oxidat enzimatic, în prezența apei oxigenate și a soluțiilor tampon cu valori diferite de pH, soluția etanolică de catechină. Soluțiile tampon folosite au fost: tampon fosfat monosodic-fosfat disodic pH 7.2 și 8, carbonat de sodiu- bicarbonat de sodiu pH 9.9. Din seturile de date în care s-a variat pH-ul, s-au extras valorile absorbanțelor pentru lungimea de undă: $\lambda = 440 \text{ nm}$ și s-au calculat concentrațiile dimerilor. Din porțiunea inițială a curbelor cinetice [Dimeri] în funcție de timp s-au estimat vitezele inițiale de reacție.

Tabelul II.2.10. Variația vitezei de reacție cu pH-ul

pH	$v_R^0 \cdot 10^8 (\text{Ms}^{-1})$
5.5	(1.22±0.05)
7.2	(5.48±0.46)
8.0	(7.53±0.55)
9.9	(1.37±0.10)

Se observă din figura (II.2.103.) că vitezele de formare ale dimerilor în oxidarea enzimatică a catechinei sunt mai mari decât vitezele de autooxidare.

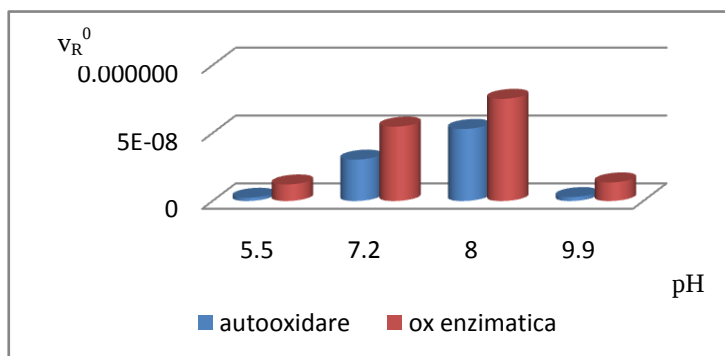


Figura II.2.103. Vitezele inițiale cu variația pH-ului la autooxidarea și oxidarea enzimatică a catechinei

La pH-uri apropiate de pH-ul optim al peroxidazei, viteza de formare a dimerilor este mai mare, dar aceasta catalizează reacția de oxidare a catechinei chiar și la pH-uri extreme.

Concluzii generale

În vederea studiului inactivării unor enzime în prezența unor aditivi au fost alese două oxidoreductaze: catalaza, enzimă cu specificitate mare de substrat, care catalizează descompunerea unui substrat simplu - apa oxigenată - și peroxidaza, enzimă cu specificitate mică de substrat, care catalizează oxidarea unui număr mare de compuși fenolici.

Pentru sistemul model catalază-apă oxigenată s-a studiat efectul mai multor factori asupra inactivării și termoinactivării enzimei:

- ✓ A fost studiat efectul pH-ului și al tăriei ionice asupra inactivării catalazei. A fost propus un model cinetic simplu, care cuprinde o etapă de inactivare de ordinul 1; modelul permite o estimare bună a parametrilor implicați și sugerează că influența pH-ului se datorează inactivării catalazei prin transformarea acesteia într-un complex inactiv, lucru

evidențiat prin variația constantei de inactivare cu pH-ul. Tăria ionică, datorată componentelor tamponului, are o influență asupra activității catalazei, în special în cazul în care se lucrează la pH-uri extreme. Din compararea datelor obținute înampoane cu componenți diferiți și în mediu apos netamponat, se poate spune că în apă inactivarea este mai scăzută.

- ✓ Efectul solventului (amestecuri binare apă-alcool) asupra vitezei inițiale de reacție și a constantelor de viteză corespunzătoare unui model cinetic simplu cu trei etape au fost discutate prin prisma mai multor proprietăți caracteristice solventului: constanta dielectrică, polarizabilitatea, hidrofobicitatea, concentrația de grupări hidroxil, sau unii parametri empirici (de exemplu parametrii Kamlet-Taft și numărul Kosower). În cazul amestecurilor de apă cu metanol, etanol, 1-propanol și etilen glicol, au fost obținute corelații bune și între $\ln(v_R^0)$, $\ln(k_2)$ și $\ln(k_3)$ în funcție de funcția Kirkwood, $(D-1)/(2D+1)$, sugerând astfel că influența solventului are o componentă dielectrică importantă. Când sunt analizate amestecurile care conțin aceeași fracție molară a solventului neapos (de exemplu $x_S = 0,06$), pentru alcoolii multihidroxilici (etilenglicol și glicerină) și alcoolii monohidroxilici cu lanț scurt (metanol, etanol), activitatea catalazei scade cu hidrofobicitatea solventului, în timp ce pentru alcoolii monohidroxilici cu lanț hidrocarbonat mai mare (1-propanol, 2-propanol, 1-butanol), are loc o creștere a activității cu hidrofobicitatea solventului. Pe de altă parte, cu cât concentrația grupărilor hidroxil este mai mare, cu atât crește și viteza inițială de reacție. Prin regresie multiliniară, folosind patru parametri ce descriu solventul, $(D-1)/(2D+1)$, polarizabilitatea, parametrul Kamlet-Taft și Kosower, folosind fracții molare constante ale alcoolilor, s-a demonstrat că v_R^0 , k_2 , și k_3 depind în mod semnificativ de parametrii aleși.
- ✓ S-a investigat cinetica inactivării catalazei în prezența și absența apei oxigenate, la temperaturi cuprinse între 30 și 60 °C. Reacția a fost studiată în mediu apos în absența și în prezența aditivilor ce au efect stabilizator asupra multor enzime: NaCl, 1,2- etandiol, 1,2,3- propantriol și zaharoză. Folosind curbele cinetice extinse (concentrație de substrat în funcție de timp) și aplicând modele cinetice din literatură pentru incubarea enzimei în absența substratului și măsurând descompunerea apei oxigenate la diferiți timpi de incubare s-au estimat parametrii de inactivare: constantă de viteză, timp de înjumătățire, energie de activare. Efectul de stabilizare depinde de temperatura de lucru, zaharoza fiind cel mai bun termostabilizator pentru catalază. Datorită atât inactivării termice cât și prezenței substratului, constanta de viteză de ordin I pentru inactivare este mai mare în prezența substratului decât în absența acestuia.

Pentru sistemul model peroxidază –derivați fenolici cu proprietăți antioxidante, au fost studiate efectele câtorva factori asupra inactivării și stabilității enzimei:

- ✓ Pentru studiul inactivării peroxidazei de către apa oxigenată, au fost estimate constantele globale de inactivare ale enzimei în reacția de oxidare a mai multor substraturi fenolice din categoria antioxidanților (capsaicina, guaicolul, catechina, quercetina) utilizând o metodă izoconversională propusă în cadrul laboratorului de cinetică chimică.
- ✓ Pentru toate substraturile utilizate inactivarea este de ordinul I. În cazul capsaicinei, quercetinei și guaiacolului constantele de inactivare globale sunt de același ordin de mărime ($10^{-3}s^{-1}$), în timp ce în cazul oxidării catechinei, inactivarea este mult mai lentă

(10^{-5}s^{-1}), ceea ce înseamnă că aceasta are un efect de protecție a peroxidazei împotriva inactivării de către apă oxigenată.

- ✓ A fost studiată reacția de oxidare a quercetinei în diferite condiții: autooxidare, oxidare cu apă oxigenată în absența și în prezența peroxidazei din hrean. Reacția a fost urmărită atât în mediu apos, cât și în medii apoase tamponate, medii parțial alcoolice și micelare (surfactanți anionici și neutri). Identificarea produșilor de reacție pentru autooxidare, oxidare chimică și enzimatică a quercetinei a fost realizată în timpul unui stagiu de pregătire la „Mediterranean Agronomic Institut of Chania” prin tehnici cromatografice: LC-MS și HPLC. În urma analizelor făcute au fost identificați ca produși de reacție acizi benzoici: acid catechuic și acid galic, precum și dimeri ai quercetinei cu structuri și proprietăți asemănătoare. Produșii formați în urma autooxidării și oxidării quercetinei sunt aceiași, dar cantitatea obținută diferă în funcție de agentul oxidant folosit. În cazul autooxidării soluției de quercetină în prezența metanolului și tamponului fosfat este favorizată producerea acizilor benzoici, iar în cazul oxidării enzimatică este favorizată producerea dimerului. Peroxidaza este inactivată în prezența concentrațiilor mari de apă oxigenată, comportament întâlnit și în cazul altor substraturi.
- ✓ A fost studiată reacția de oxidare a catechinei în diferite condiții: autooxidare și oxidare cu apă oxigenată în prezența peroxidazei din hrean. Reacția a fost urmărită atât în mediu apos, cât și în medii apoase tamponate și medii parțial alcoolice (metanol sau etanol). Identificarea produșilor de reacție pentru autooxidare și oxidare enzimatică a catechinei a fost realizată în timpul unui stagiu de pregătire la „Mediterranean Agronomic Institut of Chania” prin tehnici cromatografice: LC-MS și HPLC. În urma analizelor făcute au fost identificați ca produși de reacție dimeri ai catechinei (dihidrocatechina A și B) cu structuri și proprietăți asemănătoare. A fost obținut amestecul de dimeri, dar nu s-a reușit separarea acestora. Din analiza spectrelor de absorbție, au fost alese pentru analiza cinetică maximele corespunzătoare absorbției dimerilor. În cazul oxidării enzimatică este favorizată formarea dimerilor, chiar la pH-uri extreme. Datele obținute sunt susținute de alte date de literatură și confirmă un mecanism de oxidare în care catechina formează dimeri, iar ca intermediari de reacție se formează semichinone.

Bibliografie selectivă

- 5 *Thermal inactivation of glucose oxidase. Mechanism and stabilization using additives*, M.D.Gouda, S.A.Singh, A.G.Rao, M.S.Thakur, N.G.Karanth, J. Biol. Chem., (2003), **278**, 24324-24333
- 11 *Fast determination of biocatalyst process stability*, M.Boy, A.Dominik, H.Voss, Process Biochemistry, (1999), **34**, 535-547
- 34 *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*, M.Valko, C.J.Rhodes, J.Moncol, M.Izakovic, M.Mazur, Chemico-Biological Interactions, (2006), **160**, 1-40
- 35 *Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?*, B.Halliwell, Archives of Biochemistry and Biophysics, (2008), **476**, 107-112
- 36 *How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper*, T.Schewe, Y.Steffen, H.Sies, Archive of Biochemistry and Biophysics, (2008), **476**, 102-106
- 37 *Identification of autoxidation oligomers of flavan-3-ols in model solutions by HPLC-MS/MS*, F.He, Q.H.Pan, Y. Shi, X.T.Zhang, C.Q.Duan, Journal of Mass Spectrometry, (2009), **44**, 633-640
- 38 *Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins*, M.Mochizuki, S.Yamazaki, K.Kano, T.Ikeda, Biochimica et Biophysica Acta, (2002), **35**, 35-44
- 39 *Microbial and Enzymatic Transformations of Flavonoids*, S.Das, J.P.N.Rosazza, Journal of Natural Products, (2006), **69**, 499-508

Cinetica inactivării enzimatică modulată de aditivi

- 40 *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*, A.Scalbert, G.Williamson, J. Nutr., (2000), **130**, 20735-20855
- 41 *Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids*, J.V.Formica, W.Regelson, Food and Chemical Toxicology, (1995), **33**, 1061-1080
- 42 *The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer*, E.Middleton, C.Kandaswami, In The flavonoids: advances in research since, (1993), **157**, 619-652
- 45 *Molecular modeling and spectroscopic studies on the binding of guaiacol to human serum albumin*, W.He, Y.Li, H.Si, Y.Dong, F.Sheng, X.Yao, Z.Hu, Journal of Photochemistry and Photobiology, (2006), **182**, 158-167
- 111 *Physical factors influencing catalase rate constants*, G.K.Strother, E.Ackerman, Biochimica et Biophysica Acta, (1961), **47**, 317-326
- 114 *Kinetics of hydrogen peroxide decomposition by catalase: hydroxylic solvent effects*, A Raducan, A Cantemir, M Puiu, D Oancea, Bioprocess and Biosystems Engineering, 2012, DOI: 10.1007/s00449-012-0742-0
- 123 *Physical factors influencing catalase rate constants*, G.K.Strother, E.Ackerman, Biochim. Biophys. Acta, (1961), **47**, 317-326
- 124 *Catalase Reaction by Myoglobin Mutants and Native Catalase*, S.Kato, T.Ueno, S.Fukuzumi, Y.Watanabe, The Journal of Biological Chemistry, (2004), **279**, 52376-52381
- 125 *Understanding and increasing protein stability*, C.O.Fagain, Biochimica et Biophysica Acta, (1995), **1252**, 1-14
- 126 *Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment*, P.V.Iyer, L.Ananthanarayan, Process Biochemistry, (2008), **43**, 1019-1032
- 128 *Theory of the Influence of the Dielectric Constant on the Rate of Reaction of Solution with Application to Enzyme Reaction II*, K.Hiromi, Bull. Chem. Soc. Japan, (1960), **33**, 1251-1264
- 129 *Theory of the Influence of the Dielectric Constant on the Rate of Reaction of Solution with Application to Enzyme Reaction I*, K.Hiromi, Bull. Chem. Soc. Japan, (1960), **33**, 1264-1268
- 132 *Study of phytoproteases stability in aqueous-organic biphasic systems using linear free energy relationships*, S.Barberis, E.Quiroga, S.Morcelle, N.Priolo, J.M.Luco, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, (2006), **38**, 95-103
- 133 *Theoretical study of the solvent effect on the hydrogen abstraction reaction of the methyl radical with hydrogen peroxide*, A.Delabie, S.Creve, B.Coussens, M.T.Nguyen, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, (2000), **2**, 977-981
- 134 *Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from Trichoderma reesei QM 9414*, A.Cobos, P.Estrada, Enzyme and Microbial Technology, (2003), **33**, 810-818
- 135 *Fluorimetric study of water-ethanol interaction and its effect on the micellisation of sodium dodecyl sulphate in the presence of bovine serum albumin*, N.Deb, S.Bagchi, A.K.Mukherjee, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, (2009), **73**, 370-373
- 136 *A three dimensional solubility parameter approach to nonaqueous enzymology*, L.V.Schneider, Biotechnology and Bioengineering, (1991), **37**, 627-638
- 137 *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, C.Reichardt, second ed., Verlag Chemie, (1990) Weinheim
- 138 *A role of proton transfer in peroxidase-catalyzed process elucidated by substrates docking calculations*, J.Kulys, A.Ziemys, BMC Structural Biology, (2001), **12**, 137-142
- 139 *Study of the temperature influence on catalase using spin labelling method*, M.Bartoszek, M.Ksciuczyk, Journal of Molecular Structure, (2005), **744-747**, 733-736
- 142 *Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism*, C.Aymard, A.Belarbi, Enzyme and Microbial Technology, (2000), **27**, 612-618
- 144 *Studies of stabilization of native catalase using additives*, S.A.Costa, T.Tzanov, A.F.Carneiro, A.Paar, G.M.Gübitz, A.Cavaco-Paulo, Enzyme and Microbial Technology, (2002), **30**, 387-391
- 146 *Compatible solute effects on thermostability of glutamine synthetase and aspartate transcarbamoylase from Methanococcus jannaschii*, K.Neelon, H.J.Schreier, H.Meekins, P.M.Robinson, M.F.Roberts, Biochimica et Biophysica Acta, (2005), **1753**, 164-173

Cinetica inactivării enzimatice modulată de aditivi

- 147 *Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain*, H.A.Sathish, P.R.Kumar, V.Prakash, International Journal of Biological Macromolecules, (2007), **41**, 383-390
- 148 *Estimation of the overall kinetic parameters of enzyme inactivation using an isoconversional method*, D.Oancea, A.Stuparu, M.Nita, M.Puiu, A.Raducan, Biophysical Chemistry, (2008), **138**, 50-54
- 149 *A simple test for inactivation of an enzyme during assay*, M.J.Selwyn, Biochim. Biophys. Acta, (1965), **105**, 193-195
- 150 *Experimental modelling of thermal inactivation of urease*, V.Illeová, M.Polakovici, V.Štefuca, P.Acai, M.Juma, Journal of Biotechnology, (2003), **105**, 235-243
- 154 *Kinetics of thermal inactivation of catalase in the presence of additives*, A.Cantemir, A.Raducan, M.Puiu, D.Oancea, Process Biochem., (2012), *trimis spre publicare*
- 164 *Biomimetic oxidation of quercetin: Isolation of a naturally occurring quercetin heterodimer and evaluation of its in vitro antioxidant properties*, A.Gulsen, D.P.Makris, P.Kefalas, Food Research International, (2007), **40**, 7-14
- 167 *Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity*, J.L.Munoz, F.Garcia-Molina, R.Varon, J.N.Rodriguez-Lopez, F.Garcia-Canovas, J.Tudela, Analytical Biochemistry, (2006), **351**, 128-138
- 168 *Investigation on biocatalytic properties of a peroxidase-active homogenate from onion solid wastes: An insight into quercetin oxidation mechanism*, A.Osman, D.P.Makris, P.Kefalas, Process Biochemistry, (2008), **43**, 861-86

Articole publicate sau în curs de publicare

- *Kinetics of hydrogen peroxide decomposition by catalase: hydroxylic solvent effects*, A Raducan, A Cantemir, M Puiu D Oancea, Bioprocess and Biosystems Engineering, 2012, DOI: 10.1007/s00449-012-0742-0
- *Kinetics of thermal inactivation of catalase in the presence of additives*, A. Cantemir, A.Raducan, M. Puiu, D. Oancea, Process Biochem. 2012, *trimis spre publicare*

Participări la comunicări științifice și conferințe

- *Kinetics of peroxidase inactivation during the oxidation of phenols*, Anca Ruxandra Cantemir, Adina Raducan & Dumitru Oancea, International Conference of Physical Chemistry, Romphyschem-14, 2010, (poster)
- *Cinetica descompunerii apei oxigenate în prezenta catalazei : efectele solventului*, A.R. Cantemir, D.Oancea, Sesiunea de comunicări științifice a studenților, 2010, (prezentare)