

ANTON CIUCU

BIOCHIMIE ANALITICĂ

Partea I

**Editura Universității din București
2000**



BIBLIOTECA CENTRALA
UNIVERSITARA
Bucuresti

Cota *IV 516.638*
Inventar *C20002117*

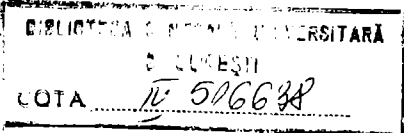
ANTON CIUCU

200

BIOCHIMIE ANALITICĂ

Partea I

Editura Universității din București
2000



Referenți științifici: Prof. dr. *George Emil BAIULESCU*
Prof. dr. *Vasile MAGEARU*

© Editura Universității din București
Șos. Panduri, 90-92, București - 76235; Telefon 410.23.84

B.C.U. București



C20002117

Tiparul s-a executat sub. cda 657/1999
la Tipografia Editurii Universității din București

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale
CIUCU, ANTON

Biochimie Analitică / Anton Ciucu - București:
Editura Universității din București, 2000

p.: 28 cm

Bibliogr.

ISBN: 973-575-415-0

577.1

CUPRINS

1. NOȚIUNI GENERALE DESPRE ENZIME	7
1.1. Terminologie	7
1.2. Nomenclatura și clasificarea enzimelor	12
1.3. Enzime ca reactivi analitici	15
1.4. Metode de imobilizare a enzimelor	17
1.4.1. Adsorbție	19
1.4.2. Legarea covalentă	19
1.4.3. Entrapare	20
1.4.4. Legarea încrucișată	20
1.4.5. Electropolimerizare	21
1.5. Aplicațiile enzimelor în chimia analitică	21
1.5.1. Reactoare analitice enzimatic	22
1.5.2. Aplicațiile enzimelor în controlul calității alimentelor	23
1.5.3. Aplicațiile enzimelor în laboratorul clinic	25
1.5.4. Aplicațiile enzimelor în controlul poluării mediului	27
2. ELEMENTE DE CINETICĂ ENZIMATICĂ	30
2.1. Ecuația Michaelis-Menten	31
2.2. Semnificația cinetică și analitică a parametrilor K_m și V_{max}	35
2.3. Natura hiperbolică a ecuației Michaelis-Menten	37
2.4. Reprezentări grafice ale ecuației Michaelis-Menten. Determinarea parametrilor cinetici K_m și V_{max} .	38
2.4.1. Metoda vitezei inițiale	38
2.4.2. Metoda vitezei integrate	45
2.5. Factori care influențează cinetica reacțiilor enzimatic	49
2.5.1. Efectul temperaturii	49
2.5.2. Efectul pH-ului	50
2.5.3. Efectul tăriei ionice	51
3. ANALIZA ENZIMATICĂ	52
3.1. Mecanismul enzimatic	54
3.2. Activarea și inhibarea enzimelor	55
3.3. Alosterie	55
3.4. Izoenzime	56
3.5. Determinări enzimatic	57
3.5.1. Determinarea enzimei	57

3.5.1.1. Determinarea enzimelor prin analiza cinetică a activității catalitice	58
3.5.1.2. Reacții enzimatic cuplate	63
3.5.1.3. Unități enzimatic	66
3.6. Determinarea substratelor	68
3.6.1. Metoda modificării totale (echilibrului)	68
3.6.2. Metoda cinetică	71
4. APLICAȚIILE BIOANALITICE ALE REACȚIILOR ENZIMATICE BAZATE PE INHIBITORI	72
4.1. Inhibiția în soluție	73
4.1.1. Inhibiția reversibilă	74
4.1.1.1. Inhibiția competitivă	74
4.1.1.2. Inhibiția necompetitivă	80
4.1.1.3. Inhibiția non-competitivă	83
4.1.1.4. Inhibiția mixtă	86
4.1.1.5. Inhibiția prin substrat	90
4.1.2. Inhibiția ireversibilă	92
4.2. Inhibiția enzimelor imobilizate pe suprafața biosensurilor	94
4.3. Aplicații bioanalitice ale reacțiilor de inhibiție	95
4.3.1. Determinarea pesticidelor organofosforice și carbamate	96
4.3.2. Determinarea fungicidelor ditiocarbamate	100
5. BIOSENSORI. APLICAȚII BIOANALITICE	103
5.1. Biosensuri clasici	105
5.1.1. Principiul de construcție și funcționare al biosensurilor	106
5.1.2. Definiția biosensurilor	108
5.1.3. Dezvoltarea istorică a conceptului de biosensur	110
5.1.4. Aplicațiile biosensurilor	111
5.2. Tehnici de imobilizare a biocomponenților pe suprafața sensurilor	113
5.3. Electrozi enzimatici bazați pe traductori electrochimici	115
5.3.1. Electrozi enzimatici potențiometrici	119
5.3.2. Electrozi enzimatici amperometrici	123
6. APLICAȚIILE REACȚIILOR IMUNOCHIMICE ÎN CHIMIA ANALITICĂ	129
6.1. Introducere	129
6.2. Anticorpi-aspecte generale	130
6.2.1. Structura și rolul anticorpilor	130
6.2.2. Producerea de anticorpi	132
6.2.2.1. Anticorpi policlonali	132
6.2.2.2. Anticorpi monoclonali	132
6.2.3. Reactivitatea încrucișată (nespecifică) și modul de lucru cu haptena (antigenul incomplet)	133
6.2.4. Anticorpii - elementele de recunoaștere moleculară	133

6.3.	Imobilizarea anticorpilor	133
6.3.1.	Imobilizarea nedirecționată realizată prin grupele ϵ -amino ale anticorpilor	133
6.3.2.	Imobilizarea direcționată prin intermediul unor grupe specifice ale Ac	134
6.4.	Interacția specifică față de cea nespecifică	135
6.5.	Regenerarea imunosensibilor	135
6.6.	Aspecte teoretice ale imunoanalizei	136
6.7.	Principiile imunoanalizei	138
6.7.1.	Imunoanaliza competitivă	139
6.7.2.	Imunoanaliza necompetitivă	139
6.8.	Markeri folosiți pentru obținerea informației analitice și biochimia conjugării	140
6.9.	Imunodeterminări electrochimice	141
6.10.	Imunosensibili	142
	BIBLIOGRAFIE	144

1. NOȚIUNI GENERALE DESPRE ENZIME

Domeniul biochimiei analitice este un domeniu vast din cadrul biochimiei și/sau al chimiei analitice foarte dinamic și modern, el incluzând metode biochimice de separare și de identificare a reactanților și a produșilor de reacție biochimici (electroforeza, ultracentrifugarea, gel-cromatografia, cromatografia de afinitate ș.a.) precum și metode enzimatiche de analiză care au la bază diferite tehnici cum sunt: volumetrice, manometrice, spectrometrice și electrometrice.

Enzimele sunt molecule proteice care acționează drept catalizatori ai reacțiilor chimice complexe acestea întreținând și reproducând viața la temperatura ambiantă, ocupând astfel un loc central în cadrul biochimiei.

Enzimele pot fi izolate din diferite surse animale sau vegetale. În cadrul organismelor animale, surse bogate în enzime sunt pancreasul, ficatul, sângele, mitocondria. Enzimele sunt fie extracelulare, ele fiind deci, eliberate de către celulele vii în mediul lor înconjurător, fie intracelulare, acestea fiind asociate cu membrane sau particule subcelulare. Enzimele extracelulare sunt mai ușor de izolat și purificat comparativ cu enzimele intracelulare, și de aceea ele au fost mult mai studiate din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice. Majoritatea enzimelor de importanță comercială sunt extracelulare și sunt obținute din surse microbiene prin procedee fermentative industriale.

În ultimii ani, cunoștințele despre enzime au evoluat de la conceptul de "proteine cu activitate catalitică specifică", la o descriere a macromoleculilor chimice cu o structură, funcție și control bine definite.

Până în prezent, în literatura de specialitate s-au descris aproximativ 2000 de enzime diferite, câteva sute dintre acestea fiind purificate și obținute într-o stare omogenă, iar dintre ele, 50 au fost caracterizate din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice.

Enzima, este deci o proteină care posedă atât *specificitate* cât și *activitate catalitică*.

Există enzime care prezintă numai o componentă proteică și enzime complexe a căror acțiune specifică se manifestă numai în prezența unor substraturi speciale (denumite *cofactori*). Acestea din urmă sunt alcătuite dintr-un component termolabil proteic și unul termostabil neproteic ele fiind denumite *holoenzime* (figura 1.1).

Pentru enzimele care necesită componente neproteice pentru a fi active funcțional, este unanim acceptat faptul că termenul de *holoenzimă* se referă la entitatea catalitică completă care constă dintr-o parte proteică cunoscută sub numele de *apoenzimă* și un constituent neproteic (*cofactorul*). Dacă se îndepărtează constituentul neproteic (*cofactorul*), componenta proteică nu mai prezintă activitate enzimatică.

1.1. TERMINOLOGIE

Termenii utilizați pentru constituenții neproteici necesari funcțional sunt totuși ambigui și diferă de la o lucrare la alta.

Lucrările lui Lehninger [1] descriu *cofactorul* drept un component neproteic asociat enzimei, reprezentând termenul general prin care se desemnează compusul chimic diferit de *apoenzimă* și care poate fi necesar sau chiar esențial în manifestarea *activității catalitice*. În categoria cofactorilor se includ *coenzimele* și *ionii metalici esențiali* (figura 1.1).

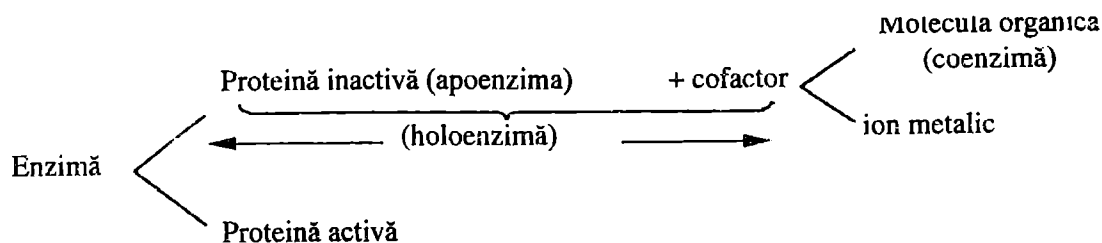


Fig. 1.1. Reprezentarea schematică a componentelor structurale ale enzimelor

Coenzimele sunt substanțe chimice care au proprietatea de a transporta diferite grupări chimice cum ar fi: grupări metabolice, echivalenți de oxido-reducere ș.a. O *coenzimă* poate fi definită ca fiind un compus organic care prezintă proprietăți fizico-chimice diferite de cele ale catenei polipeptidice ale enzimei și care acționează împreună cu enzima pentru a cataliza reacția biochimică. Ele sunt compuși din clasa vitaminelor sau derivați ai acestora. *Coenzimele* pot funcționa drept catalizatori în absența proteinelor (enzimelor), dar activitatea *coenzimelor* crește odată cu legarea lor de macromolecula proteică. Majoritatea *coenzimelor* sunt legate de enzime prin legături necovalente; cele care formează legături covalente cu enzimele sunt denumite uneori *grupări prostetice*, ele fiind parte integrantă a centrului activ al unei enzime, iar în urma reacției enzimatiche ele rămân nemodificate.

În cadrul reacțiilor enzimatiche la care *coenzimele* participă, acestea pot suferii modificări chimice. Regenerarea moleculei poate fi catalizată de o enzimă diferită. Astfel, *coenzima* funcționează în esență ca un *cosubstrat*. Conform acestei din urmă descrieri a *coenzimei*, Mottgomery și colab., au definit termenii de *coenzimă* și *cofactor* conform rolurilor acestora în cadrul reacției catalitice. În timp ce *coenzima* este descrisă ca o moleculă organică implicată direct în cataliză, un *cofactor* (o moleculă organică sau un ion metalic) nu participă direct la cataliză.

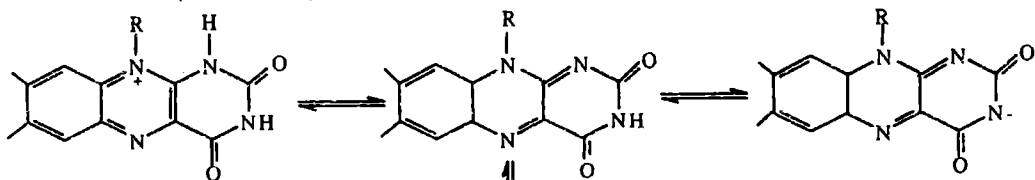
Coenzimele pot fi deci împărțite în două grupe :

a) *cosubstrate* - termen care indică faptul că transportându-și grupa metabolică, *coenzima* se desprinde de centrul catalitic al unei enzime, devenind astfel substrat pentru o reacție catalizată de o altă enzimă. Rolul lor este acela de a lega diferite căi metabolice în care au loc schimburi de substanță (ex. H_2 , H_3PO_4 , ș.a.);

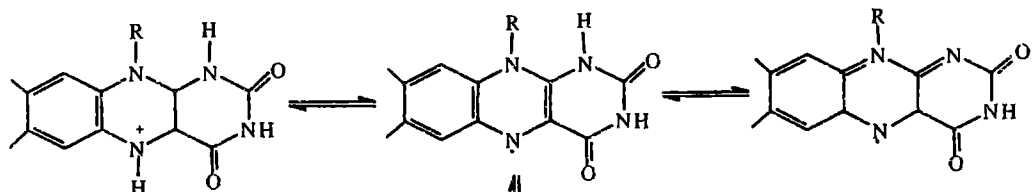
b) *grupe prostetice* - care reprezintă *coenzimele* legate de o enzimă pe tot parcursul ciclului acțiunii catalitice a acesteia, cu alte cuvinte, este o componentă a centrului activ al enzimei respective. Unele *grupe prostetice* nu sunt *coenzime* (în sensul definiției), fiind posibil ca acestea să derive din aminoacizii lanțului polipeptidic al enzimelor. Un astfel de exemplu îl reprezintă grupa biocitin a acetil coenzimei A-carboxilazei, care este inclusă covalent în catena polipeptidică.

Un exemplu de grupare prostetică îl reprezintă flavin nucleotidele (figura 1.2) care derivă de la riboflavină sau vitamina B_{12} . Acestea nu pot fi separate de macromolecula proteică (enzimă) fără ca aceasta să se denatureze.

Structura chinonică (FAD sau FMN)



Forma semichinonică



Forma hidrochinonică (FADH₂ sau FMNH₂)

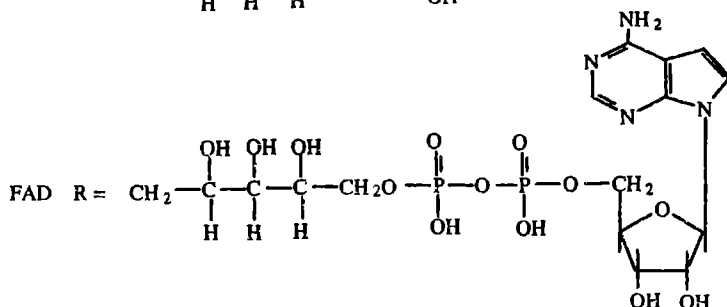
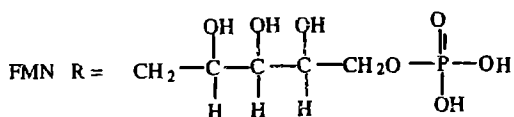
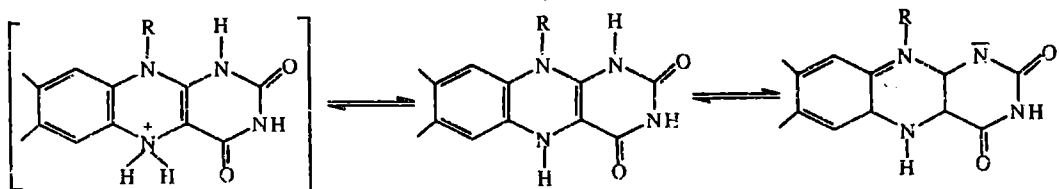
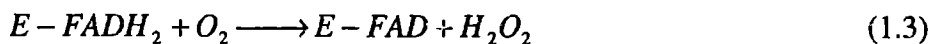
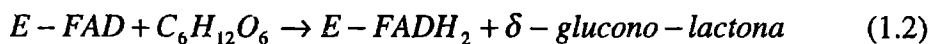


Fig. 1.2 Structura și chimia redox a grupărilor prostetice flavin adenin dinucleotidei (FAD) și a flavin mononucleotidei (FMN)

Mecanismul cinetic al reacției de oxidare enzimatică a glucozei la acid gluconic, reacție catalizată de glucoz-oxidază (Gox) și implicând FAD-ul este redat în continuare:



În cazul flavinenzimelor, reducerea flavinei are loc în două etape succesive, implicând un radical instabil semichinonic (figura 1.2).

Coenzimele slab legate de macromolecula proteică poartă denumirea de *cosubstrate*; acestea se leagă de macromolecula proteică împreună cu alte substraturi, dar spre deosebire de *gruparea prostetică*, ele pot fi modificate la sfârșitul reacției (procesului catalitic). O astfel de *coenzimă* este reprezentată de nicotinamid dinucleotidele ($\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$) care derivă de la vitamina niacin (acidul nicotinic) ele conținând un inel piridinic (figura 1.3):

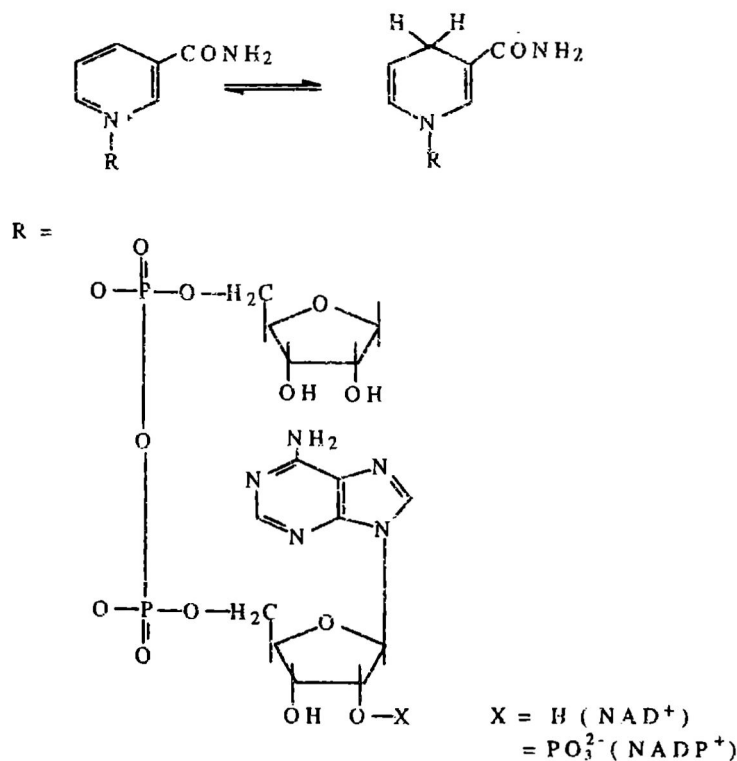
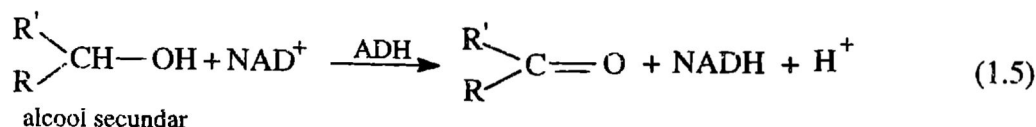
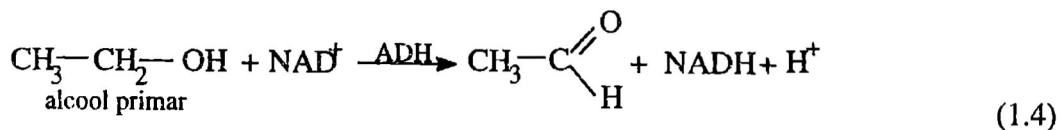


Fig. 1.3. Structurile cuplurilor redox ale coenzimelor $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$

Mecanismul cinetic al reacției catalizate de alcool dehidrogenază (ADH) implică NAD^+ drept coenzimă; reacția enzimatică catalizată de ADH, pentru un alcool primar și secundar este redată în continuare:



Mecanismul cinetic al reacției de oxidare a alcoolilor primari și secundari nu este elucidat. În mecanismul propus se admite inițial faptul că NAD^+ este primul substrat care se leagă de enzimă într-o primă etapă de reacție, ulterior complexul format reacționând cu substratul conform mecanismului prezentat în figura 1.4:

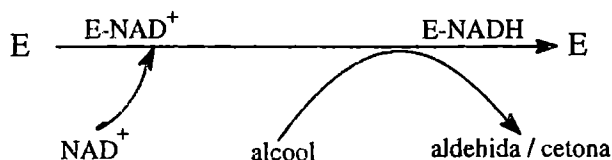


Fig. 1.4 Mecanismul cinetic propus pentru reacția de oxidare a alcoolilor.

Reacția poate fi urmărită spectrometric ($\lambda_{\text{NADH}} = 328 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{NAD}^+} = 350 \text{ nm}$).

În tabelul 1.1. sunt redate principalele *coenzime* și tipurile de reacții enzimatică în care acestea sunt implicate.

Fiecare dintre *coenzimele* prezentate conțin ca parte a structurii lor o moleculă a unei vitamine, sau a unor molecule organice necesare metabolismului celular.

Tab. 1.1. Coenzime implicate în reacțiile de transfer de grupe.

Coenzima	Gruparea transferată
Nicotinamid adenin dinucleotida (NAD)	Atomi de H (electroni)
Nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (NADP)	Atomi de H (electroni)
Flavin mononucleotida (FMN)	Atomi de H (electroni)
Flavin-adenin dinucleotida	Atomi de H (electroni)
Coenzima Q	Atomi de H (electroni)
Coenzima A	Grupări aci!
Piridoxal fosfat	Grupări amino
Coenzimele tetrahidrofolat	Grupări metil, metilen, formil sau formimino
Tiamin pirofosfat	Aldehide
Biotina	Bioxid de carbon

Coenzimele funcționează în mod uzual ca purtători intermediari ai grupărilor funcționale, a atomilor specifici, sau a electronilor care sunt în general transferați în cadrul reacțiilor enzimatică (de ex. grupa biocitin a acetil-CoA carboxilazei care este legată covalent de catena polipeptidică).

În cadrul *cofactorilor* pot fi incluși și *ionii metalici* care participă în mecanismul catalitic al metalo-enzimelor.

Ionii metalici esențiali sunt anionii și cationii specifici a căror prezență este esențială în activitatea unor enzime; acești ioni se numesc de obicei *activatori*, însă în acest context se pot numi *cofactori ionici*.

În tabelul 1.2. sunt redate exemple de enzime care necesită *ioni metalici* drept *cofactori*. În cadrul structurii acestor enzime, *ionul metalic* poate servi drept: centru catalitic primar, grupare de legare a substratului de enzimă pentru a forma un complex coordinativ, agent stabilizator al conformației proteinei (enzimei) în forma ei catalitic activă.

Tab. 1.2. Enzime care necesită sau conțin drept cofactori ioni metalici

Metalul	Enzima
Zn ²⁺	Alcool dehidrogenaza Carboxipeptidaza Carbonic anhidraza
Mg ²⁺	Fosfohidrolaze Fosfotranferaze
Mn ²⁺	Arginaza Fosfotranferaze
Fe ²⁺ sau Fe ³⁺	Citocromi, Ferredoxina, Peroxidaza, Catalaza
Cu ²⁺ (Cu ⁺)	Tirozinaza Citocromoxidaza
K ⁺	Piruvat kinaza (necesită și Mg ²⁺)
Na ⁺	ATP-aza din membrane plasmatică (necesită și K ⁺ și Mg ²⁺)

Enzimele care necesită *ioni metalici* pentru a prezenta activitate catalitică sunt denumite uneori *metal enzime*. În cadrul structurii *metal enzimelor*, componentul metalic (numai el exclusiv) posedă o activitate catalitică simplă care este mult mărită de componenta proteică. De exemplu reacția catalizată de catalază (CAT), enzimă care descompune rapid H₂O₂ la apă și oxigen, poate fi catalizată și de către sărurile de fier, dar cu o viteză mult mai mică.

Anumite enzime sunt sintetizate sub forma unor molecule precursorare inactive numite *zimogeni* sau *proenzime*. Trecerea de la starea de *zimogen* la cea de enzimă activă se numește *activare*. Termenul de *activare* se mai folosește și în cazul când are loc o creștere a activității enzimatică a unei enzime.

Prin *substrat* se înțelege reactantul implicat într-o reacție catalizată de o enzimă sau într-o reacție ne-enzimatică și, deoarece majoritatea reacțiilor sunt formal reversibile, rezultă că produșii de reacție pot constitui deasemenea substrate.

Prin *produs* se înțelege compusul chimic care rezultă în urma reacției directe.

Prin *ligand* se înțelege orice compus chimic care se leagă de o enzimă. Concentrația unui *ligand* se poate modifica sau nu în cursul reacției.

Inhibitorul este acel compus care se leagă de o enzimă ducând la scăderea vitezei reacției catalizate enzimatic sau chiar la pierderea acesteia.

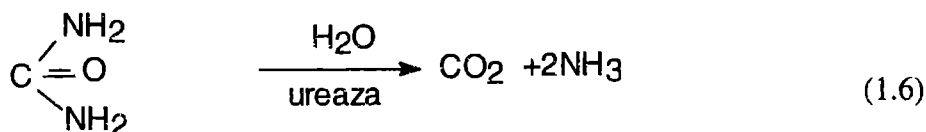
În concluzie, un *cofactor* poate fi un *ion metalic (activator)* sau o moleculă organică (*coenzimă*), acesta putând fi atașat mai slab sau mai puternic de o enzimă. Unele enzime necesită pentru manifestarea activității catalitice prezența atât a *coenzimei*, cât și a *cofactorului*.

1.2. NOMENCLATURA ȘI CLASIFICAREA ENZIMELOR

Nomenclatura enzimelor se află într-o stare de confuzie în ciuda eforturilor de a le clasifica și denumi în acord cu specificitatea lor.

În secolul XIX, multor enzime li s-au dat denumiri terminate în "ina", precedat de numele substratului sau cel al sursei enzimatică. Multe din aceste denumiri cum ar fi de exemplu: pepsina, tripsina, emulsina, etc. sunt denumiri utilizate și astăzi.

La sfârșitul secolului XIX s-a sugerat folosirea sufixului “ază” precedat de numele substratului enzimei, propunere acceptată și folosită și azi ca un mod general de a denumi enzimele în industrie, exemplu: proteaze, peptidaze, pectinaze, amilaze. Alte exemple sunt ureaza care catalizează hidroliza ureei la amoniac și bioxid de carbon:



și arginaza care catalizează hidroliza argininei la ornitină și uree.

Această denumire s-a dovedit a fi confuză deoarece nu specifică tipul reacției catalizate de enzimă. Spre exemplu termenul de protează reprezintă o denumire generică pentru enzimele care hidrolizează legăturile peptidice; acest termen nu este suficient de precis pentru că în el sunt incluse atât endo- cât și exo-peptidazele.

Acest tip de nomenclatură este folosit deasemenea pentru descrierea generală a grupelor de enzimă. De exemplu, o hidrolază catalizează o reacție de hidroliză.

Enzimele au fost denumite în acord cu tipul de reacție catalizate, ca de exemplu invertaza, enzimă care invertește sucroza, sau depolimeraza, o enzimă care catalizează transformarea unor substraturi polimerice.

Este clar că o nomenclatură bazată parțial pe nume istorice, parțial pe numele substanțelor și parțial pe numele reacțiilor, nu este satisfăcătoare; deoarece enzimele își desfășoară activitatea în sisteme vii complexe ele au o proprietate esențială și anume *specificitatea*. Această proprietate caracteristică a enzimelor stă la baza schemei de clasificare a enzimelor.

În 1956 Uniunea Internațională de Biochimie a desemnat o comisie pentru a propune o schemă a clasificării și nomenclaturii enzimelor. În 1961, schema propusă de Comisia Internațională pentru Enzime, a fost adoptată oficial de către Uniunea Internațională de Biochimie.

Comisia de Enzime a formulat o listă a regulilor de denumire și numerotare a enzimelor, și au fost clasificate peste 800 de enzime.

Până în 1973 au fost tabelate peste 1800 de enzime. Împărțirea enzimelor în grupe a fost bazată în principal pe tipul reacției catalizate. Nomenclatura menționată mai sus a fost folosită pentru descrierea grupelor principale de enzime. Astfel, funcție de tipul reacției catalizate, ele au fost împărțite în 6 clase, fiecare clasă fiind sub-divizată în funcție de substratul și coenzima sau gruparea chimică implicată în reacție (tabelul 1.3.):

1. **Oxidoreductaze** (enzime care catalizează transferul atomilor de hidrogen sau oxigen sau al electronilor): enzime care catalizează reacțiile de oxidare și reducere. În general, pentru enzimele din această clasă se folosește numele de dehidrogenaze, majoritatea acestor enzime folosesc ca acceptori sau donori de electroni piridin nucleotidele, flavinele sau citocromii. Alte oxidoreductaze sunt oxidazele și hidroxilazele, care au drept acceptor de electroni oxigenul și peroxidazele care au H₂O₂ ca acceptor de electroni.

2. **Transferazele** (enzime care catalizează transferul unor grupe specifice): sunt enzime care catalizează reacțiile de transfer a grupelor funcționale, cum ar fi gruparea metil sau amino de la un substrat (donor) la altul (acceptor). Majoritatea transferazelor necesită fie prezența unei coenzime, fie formarea unui intermediar covalent enzimă-substrat.

3. **Hidrolaze** : enzime care catalizează reacțiile de hidroliză și sunt împărțite funcție de tipul legăturii hidrolizate.

Tab. 1.3. Clasificarea internațională a enzimelor (denumirea claselor, numerele de cod și a tipurilor reacțiilor catalizate); listă parțială

<p>1. Oxido-reductaze (reacții de oxido reducere)</p> <p>1.1. Acționând asupra $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} \text{H} \text{---} \text{OH} \\ \diagdown \end{array}$</p> <p>1.2. Acționând asupra $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} = \text{O} \\ \diagdown \end{array}$</p> <p>1.3. Acționând asupra $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} = \text{CH} \text{ -} \\ \diagdown \end{array}$</p> <p>1.4. Acționând asupra $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} \text{H} \text{---} \text{NH}_2 \\ \diagdown \end{array}$</p> <p>1.5. Acționând asupra $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} \text{H} \text{---} \text{NH} \text{---} \\ \diagdown \end{array}$</p> <p>1.6. Acționând asupra NADH; NADPH</p>	<p>3. Hidrolaze (reacții de hidroliză)</p> <p>3.1. esteri</p> <p>3.2. legături glicozidice</p> <p>3.4. legături peptidice</p> <p>3.5. alte legături C-N</p> <p>3.6. anhidrie acide</p>
<p>2. Transferaze (reacții de transfer al unor grupe funcționale)</p> <p>2.1. grupe de carbon</p> <p>2.2. grupe aldehidice sau cetonice</p> <p>2.3. grupe acil</p> <p>2.4. grupe glicozil</p> <p>2.7. grupe fosfat</p> <p>2.8. grupe conținând sulf</p>	<p>4. Liaze (reacții de adiție la duble legături)</p> <p>4.1. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} = \text{C} \\ \diagdown \end{array}$</p> <p>4.2. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} = \text{O} \\ \diagdown \end{array}$</p> <p>4.3. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} = \text{N} \text{---} \\ \diagdown \end{array}$</p> <p>5. Izomerazele (reacții de izomerizare)</p> <p>5.1. Racemaze</p> <p>6. Ligaze (reacții de formare de legături prin scindarea ATP-ului)</p> <p>6.1. C-O</p> <p>6.2. C-S</p> <p>6.3. C-N</p> <p>6.4. C-C</p>

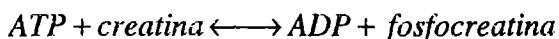
4. **Liaze**: enzime care catalizează reacțiile de îndepărtare nehidrolitică a grupărilor substituente, exemplu de formare a legăturilor duble prin îndepărtarea nehidrolitică a grupărilor substituente. Liazele includ carboxilazele și aldolazele.

5. **Izomerazele** : enzime care catalizează reacții de izomerizare, cum sunt: racemizarea și/sau izomerizarea legăturilor duble, rearanjarea structurii carbonice, transformarea unui stereoisomer în altul sau transportarea dublei legături dintr-o poziție în alta.

6. **Ligaze** (enzime care catalizează formarea de legături necesitând prezența ATP-ului): deseori denumite sintetaze, catalizează reacțiile de sinteză în care energia potențială a ATP-ului este folosită în formarea legăturilor.

Comisia Internațională de Biochimie (1961) a adoptat și o clasificare sistematică a enzimelor. Ea a creionat o serie de reguli pentru denumirea și numerotarea enzimelor; totodată, Comisia a stabilit atât denumirea trivială, cât și sistematică a enzimelor. Deci conform acestei clasificări unei enzime i se atribuie:

1. un nume trivial (recomandat)-majoritatea denumirilor triviale sunt identice cu denumirile folosite anterior acestei scheme de clasificare, în mod uzual. În anumite cazuri, același nume trivial poate fi folosit pentru mai mult decât o singură enzimă, sau o enzimă este cunoscută sub mai multe denumiri triviale;
2. nume sintetic- în general numele unei enzime constă din două părți. Prima va consta din numele substratului asupra căruia acționează sau în cazul reacțiilor bimoleculare din cele două substraturi separate prin două puncte. A doua parte terminată în "ază", va indica natura procesului.
3. Un număr de clasificare (sau codul enzimei) – care este format din patru cifre. Prima cifră desemnează una din cele 6 grupe principale. A doua cifră menționează subclasa, iar a treia, sub-subclasa. Ultima cifră indică numărul de ordine al enzimei în cadrul subclasei. Codul enzimei este precedat de inițialele EC. El este utilizat acolo unde este necesară o identificare precisă a enzimei. De exemplu în cazul enzimei care catalizează reacția:



i s-a stabilit un nume : nume recomandat – ADP-creatinchinaza

nume sistematic – ATP : creatinfosfotransferaza

un număr de clasificare : EC 2.7.3.2 unde EC înseamnă Comisia de Enzime, 2 numele clasei (transferaze) deci a reacției catalizate, 7 desemnează subclasa (fosfotransferaza) indicând în general substratul sau gruparea implicată, 3 desemnează sub-subclasa (fosfotransferaze cu o grupă de azot ca acceptor) indicând substratul specific sau coenzima și 2 desemnează creatinchinaza –numărul de ordine al coenzimei.

1.3. ENZIME CA REACTIVI ANALITICI

Enzimele nu au putut intra mai rapid în practica analitică datorită unor dezavantaje pe care acestea le prezentau și anume: instabilitate pe parcursul folosirii și păstrării lor (ceea ce conduce la o activitate variabilă), condiții speciale de lucru pe care le impun, preț de cost ridicat, nu puteau fi obținute într-o stare de puritate analitică precum și faptului că ele presupuneau procedee analitice complicate care necesitau un timp mare de analiză, conducând la o precizie mică și nu în final datorită faptului că acestea nu puteau fi folosite în analiza continuă în flux. Toate acestea la un loc au limitat utilizarea enzimelor ca reactivi analitici.

Posibilitatea obținerii enzimelor în cantitate suficientă la un preț de cost rezonabil reprezintă încă o problemă, în special în cazul enzimelor descoperite recent sau al enzimelor intracelulare. Prețul de cost mare al enzimelor, limitează utilizarea lor ca reactivi analitici, dacă se ține cont și de faptul că tendința actuală în cadrul metodelor analitice este deplasată spre procedee automatizate, în care se analizează un număr mare de probe, și deci se consumă cantități mari de reactivi.

Principalul dezavantaj pe care-l prezintă enzimele solubile este legat de instabilitatea lor, ele pierzându-și activitatea catalitică prin păstrare sau pe parcursul utilizării lor în cadrul procedeelelor analitice. Instabilitatea enzimelor este unanim recunoscută, dar cu anumite precauții efectul ei poate fi minimalizat.

O a treia problemă legată de utilizarea enzimelor ca reactivi analitici, o reprezintă limitările operaționale asociate cu folosirea catalizatorului solubil; în acest sens se poate menționa faptul că, acestea prezintă o stabilitate mecanică redusă și deasemenea faptul că ele nu pot fi refolosite. În soluție enzimele suferă așa numitul proces de denaturare, proces care apare ca rezultat al modificării unor parametri fizici și/sau chimici (ex. prin modificarea temperaturii sau a pH-ului, enzimele suferă modificări structurale). Dacă condițiile externe în care sunt menținute enzimele se modifică pe o perioadă scurtă de timp acestea se denaturează, dar prin refacerea condițiilor optime de acțiune a lor, enzimele își recapătă activitatea catalitică.

O posibilă stabilizare a structurii enzimatică se realizează prin fixarea acestora (imobilizare) pe diferite suporturi organice sau anorganice (figura 1.5).

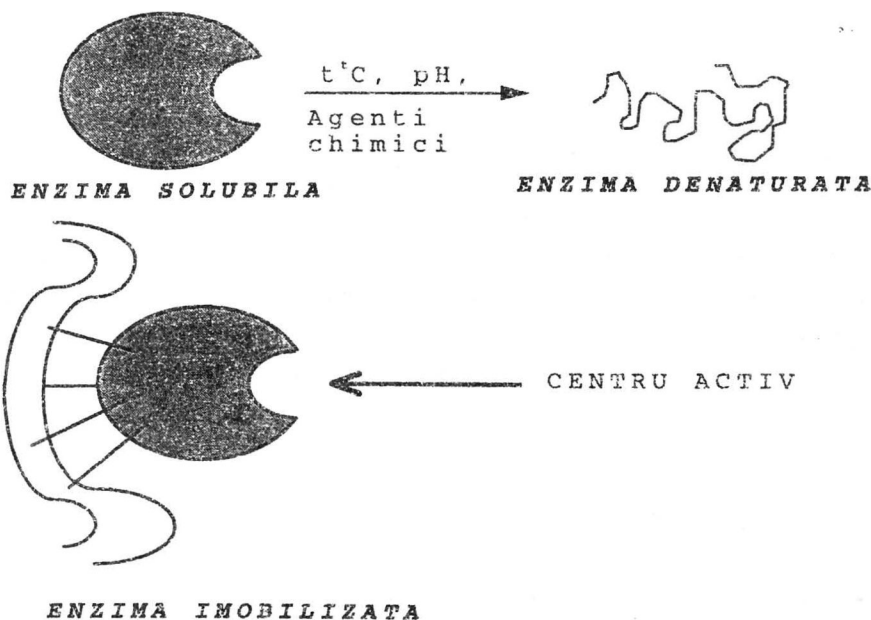


Fig. 1.5 Modificarea structurii enzimei datorită modificării unor parametri fizico-chimici; posibila stabilizare a enzimei prin imobilizare.

Odată cu dezvoltarea tehnicilor de imobilizare a enzimelor, s-a înlăturat principalul dezavantaj menționat mai sus, care limita utilizarea enzimelor ca reactivi analitici.

Enzimele imobilizate precum și cele solubile, pot fi folosite pentru determinarea concentrației unui substrat specific al unei enzime, a unui inhibitor care inactivează enzima, sau al unui activator care conduce la mărirea activității acesteia, a coenzimelor precum și pentru determinarea enzimelor.

La ora actuală, există enzime cu o activitate specifică mare la un preț de cost rezonabil; de asemenea ultimele două dezavantaje sunt mai degrabă o consecință a metodelor și tehnicilor utilizate decât una datorată enzimei.

Prin apariția unor noi tehnici analitice, precum și prin dezvoltarea celor existente s-au eliminat o parte din dezavantajele menționate. În plus posibilitatea automatizării reacțiilor

enzimatice a condus la mărirea vitezei, a ușurinței și reproductibilității determinărilor bazate pe enzime.

Elaborarea procedeeleor de obținere a enzimelor de puritate analitică, cu activitate specifică mare la un preț de cost rezonabil, împreună cu dezvoltarea tehnicilor de imobilizare, precum și cu dezvoltarea unor noi tehnici analitice, au făcut ca preparatele de enzime imobilizate să substituie enzimele solubile și să fie din ce în ce mai mult utilizate în cadrul procedeeleor analitice. S-a ajuns astfel, ca, analizele enzimaticе să devină suficient de sensibile, precise, reproductibile putând fi totodată ușor automatizate.

Datorită acestor progrese, în ultimii ani enzimele au fost unanim acceptate ca reactivi analitici, iar metodele enzimaticе de analiză au fost aplicate cu succes în diferite domenii (biochimie, chimie clinică, controlul poluării mediului ș.a.).

1.4. METODE DE IMOBILIZARE A ENZIMELOR

Termenul de imobilizare a enzimelor se referă la procesul de localizare fizică a moleculelor de enzimă, pentru a fi utilizate în cadrul unui proces catalitic continuu.

Utilizarea enzimelor imobilizate în cadrul sistemelor analitice oferă o serie de avantaje comparativ cu folosirea celor solubile. Un prim avantaj constă în faptul că forma fizică a enzimei imobilizate face posibilă o utilizare economică a acesteia în cadrul proceselor analitice continue sau semicontinue. În general, în cazul utilizării enzimelor solubile ca reactivi analitici o cantitate fixă de reactiv este folosită pentru fiecare determinare, ea neputând fi recuperată în scopul refolosirii ei; în acest mod nu se atinge întreg potențialul catalitic al enzimei. Prin folosirea enzimelor imobilizate, o cantitate fixă de preparat enzimatic, poate fi folosită pentru efectuarea unui număr mare de analize, acesta putând fi ușor de recuperat și refolosit, astfel reducându-se mult cantitatea de enzimă pentru fiecare analiză.

Un alt avantaj constă în aceea că prin imobilizare, enzimele sunt plasate într-un mediu mai apropiat de cel natural, ceea ce face ca acestea să prezinte o stabilitate mărită în timp, cât și față de variațiile de temperatură, pH, tărie ionică, sau față de acțiunea diferiților inhibitori.

Un ultim avantaj, care este o consecință a primelor două, este acela că enzimele imobilizate pot fi utilizate în cadrul analizelor chimice sau biochimice mult mai economic decât enzimele solubile. Acest lucru rezidă din faptul că enzimele imobilizate pot fi utilizate fie repetitiv, fie continuu, datorită formei lor fizice și stabilității mărite, ceea ce face ca același preparat să fie folosit pe o perioadă mai mare de timp, eliminându-se necesitatea preparării reactivilor enzimatici în laborator.

În scopul imobilizării enzimelor se utilizează două metode majore și anume: chimice și fizice. Metodele chimice presupun formarea a cel puțin unei legături covalente (sau parțial covalente) între catenele laterale ale proteinelor (enzimelor) și un polimer funcțional insolubil în apă sau între două sau mai multe molecule de enzimă. În realitate, între componentii care interacționează se formează mai mult decât o legătura covalentă. Metodele chimice de imobilizare sunt ireversibile, enzima fiind imposibil de recuperat sau regenerată.

Metodele fizice, includ acele tehnici care nu conduc la formarea legăturilor chimice covalente; imobilizarea se realizează prin acțiunea forțelor fizice (interacții electrostatice, legături ionice ș.a.) sau prin entrapare (incluere) în interiorul unor matrice de polimeri sau al microcapsulelor. În tabelul 1.4, se prezintă clasificarea metodelor de imobilizare, fiind incluse și o serie de metode specifice utilizate în acest scop.



Modul în care se realizează imobilizarea, prezintă o importanță funcțională; astfel prin imobilizare chimică, enzima este accesibilă substratelor de orice dimensiuni, în timp ce în cazul enzimelor imobilizate fizic sau prin entrapare, acestea sunt izolate de substratele de dimensiuni moleculare mari. Deci, pentru determinarea substratelor de dimensiuni moleculare mari ex. proteine trebuie utilizate enzime (proteaze) imobilizate covalent; pentru determinarea substratelor mici (uree, glucoză) pot fi folosite oricare dintre cele două tipuri de enzime imobilizate. Cele două tipuri de enzime imobilizate, diferă din punct de vedere al cineticii și al interferențelor posibile.

Tab. 1.4 Sistemul de clasificare al metodelor folosite pentru imobilizarea enzimelor [2]

<p>A) <i>Metode chimice</i> (presupun formarea unor legături covalente):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fixarea moleculelor de enzimă de un polimer funcțional insolubil în apă; • Includerea moleculelor de enzimă într-un lanț de polimer în formare; • Legarea încrucișată covalentă intermoleculară a enzimei prin intermediul unui agent multifuncțional de greutate moleculară mică.
<p>B) <i>Metode fizice</i> (presupun formarea unor legături necovalente):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adsorbția enzimei pe matrici insolubile în apă; • Entraparea enzimei în interiorul unei matrici de gel insolubilă în apă; • Entraparea enzimei în interiorul microcapsulelor semipermeabile.

Prin imobilizare chimică sau fizică, în urma interacțiunii moleculelor de enzimă cu suporturile respective, poate avea loc o modificare a structurii centrului activ, uneori acesta fiind chiar blocat, ceea ce conduce la scăderea sau pierderea capacității catalitice.

Metodele de legare chimică, conduc la obținerea unui preparat enzimatic care poate fi utilizat de câteva mii de ori în cadrul metodelor analitice, în timp ce preparatele enzimatic obținute prin entrapare sau adsorbție pot fi folosite de zeci sau chiar sute de ori în astfel de determinări.

În concluzie, se poate afirma faptul că, în cazul utilizării enzimelor solubile, în cadrul analizei enzimatic se consumă cantități mari de enzimă, spre deosebire de cazul utilizării enzimelor imobilizate.

Dintre biocomponenții utilizați în construcția biosensibilizatorilor, cel mai adesea au fost utilizate enzimele, datorită proprietăților acestora, care au fost prezentate mai sus. Totuși, multe dintre metode și tehnici, sunt în general aplicabile pentru majoritatea biocomponenților.

Prin imobilizarea enzimei se presupune ca are loc o creștere a stabilității și a capacității catalitice, acestea conducând la o micșorare a timpului de reacție și în final a sensibilității metodei.

Se vor descrie succint principalele metode de fixare a enzimelor pe diferite suporturi organice și anorganice, prezentându-se totodată avantajele și dezavantajele acestor metode în analiza biochimică.

Orice metodă de imobilizare trebuie să țină cont de o serie de factori și anume: posibilitatea fixării pe diferite suporturi; prin imobilizare, biocomponentul trebuie să prezinte o activitate maximă, stabilitate pe un domeniu larg de pH, să prezinte o stabilitate termică mai mare față de enzima din soluție, iar desprinderea biocomponentului de pe suprafața suportului să fie minimă.

1.4.1. ADSORBȚIA

Adsorbția biocomponentului pe suprafața diferitelor suporturi reprezintă una dintre cele mai simple și des utilizate tehnici pentru fixarea biocomponenților (figura 1.6). Dintre suporturile utilizate se menționează rășinile schimbătoare de ioni, cărbunele activ, silicagelul, oxidul de aluminiu, sticla poroasă și ceramică ș.a.

Printre avantajele acestei tehnici se menționează faptul că: aceasta nu necesită reactivi speciali, structura enzimei rămâne practic nemodificată, denaturarea macromoleculilor proteice este minimă.

Deoarece adsorbția unei proteine pe un suport oarecare este în principiu un proces reversibil, modificările de pH, concentrație ionică și de temperatură pot duce la desprinderea macromoleculii proteice.

Dintre dezavantajele metodei se menționează: o dependență mărită față de pH, temperatură și tărie ionică, precum și faptul că necesită un grad mai mare de optimizare a condițiilor de imobilizare și de lucru.

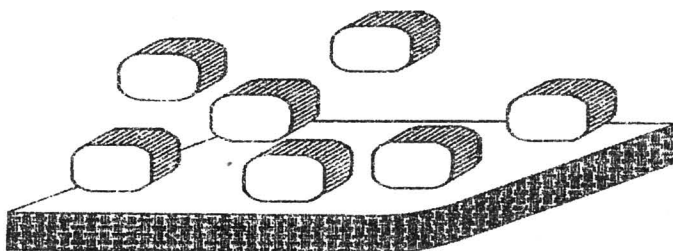


Fig. 1.6 Reprezentarea schematică a metodei de adsorbție

Metoda nu se aplică pe scară largă, pentru că biocomponentul se poate desprinde de pe suprafața suportului (a matricei), acest neajuns putând fi minimalizat prin utilizarea concomitentă a tehnicii de legare încrucișată. Adsorbția se realizează în mod practic prin evaporarea la 4°C a unei soluții tampon conținând enzima. Ea poate fi urmată de legarea încrucișată a macromoleculilor de enzimă.

1.4.2. LEGAREA COVALENTĂ

Tehnicile de imobilizare covalentă (figura 1.7) sunt mai dificil de realizat comparativ cu metoda adsorbției. Acestea conduc însă la obținerea unui preparat enzimatic care prezintă stabilitate ridicată având totodată aplicații multiple.

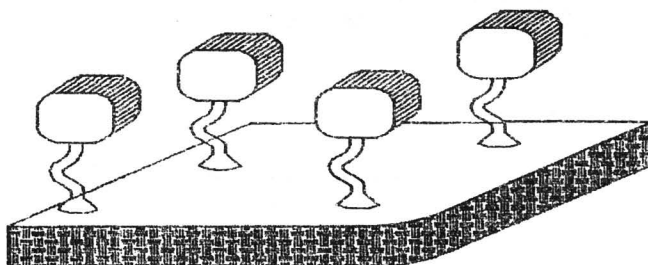


Fig. 1.7 Diagrama legării covalente

Legarea covalentă implică 3 etape: activarea suportului, cuplarea enzimei și îndepărtarea enzimei nelegate. Activarea suportului este de obicei realizată cu diferiți reactivi chimici dintre care se menționează derivații silanici și cianurile halogenate (BrCN, ClCN). În etapa ulterioară enzima reacționează cu suportul activat, urmând etapa de îndepărtare a enzimei nelegate de suport prin spălarea acestuia din urmă. Fiecare dintre cele trei etape menționate trebuie optimizate. În condițiile legării covalente a biocompuenților trebuie ținut cont de o serie de factori care influențează în final activitatea catalitică și stabilitatea biocompuențului.

1.4.3 ENTRAPAREA

Metodele de entrapare (sau includere) a enzimelor în diferite geluri sau polimeri presupun: condiții blânde de imobilizare, biocompuenții putând fi foarte ușor incluși în matrice în concentrație mare, o varietate mare de geluri și polimeri care pot fi folosiți; metoda poate fi îmbunătățită prin utilizarea simultană a altor tehnici de imobilizare cum sunt legarea încrucișată și covalentă. Dintre dezavantajele metodei se poate menționa faptul că pentru realizarea ei trebuie controlați un număr mare de factori experimentali, biocompuențului poate fi denaturat prin interacție cu radicalii rezultați pe parcursul formării polimerului, conduce la realizarea unei bariere difuzionale mari.

1.4.4. LEGAREA ÎNCRUCIȘATĂ

Adsorbția fizică și entraparea în gel este de obicei urmată de legarea încrucișată a macromoleculilor proteice (figura 1.8) pentru a preveni pierderea (desprinderea) biocompuențului. Cea mai cunoscută utilizare a acestei metode este aceea de realizare de membrane enzimatice prin folosirea unor agenți bifuncționali (ex. glutaraldehida, bisizocianatul sau derivații ai acestuia) care să lege biocompuențului.

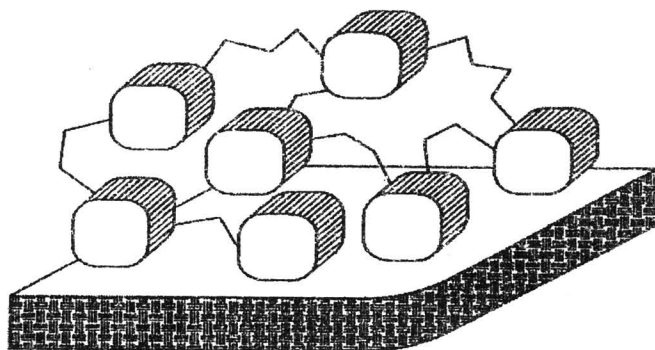


Fig. 1.8 Diagrama legării încrucișate

Dificultatea acestei metode constă în faptul că, trebuie stabilite condițiile optime de formare ale membranelor (pH, temperatură, tărie ionică și timpul de reacție).

1.4.5 ELECTROPOLIMERIZAREA

Electropolimerizarea este o metodă simplă de imobilizare a enzimelor pe suprafața electrozilor. Enzima și mediatorul se fixează odată cu monomerul utilizat (ex. cobalt sau fero-ftalocianina) pe suprafața electrozilor (ex. cărbune sticlos) procedeu care se realizează prin baleerea potențialului pe un anumit domeniu (ex. -0,2 - +1,0 V față de Ag/AgCl) și cu o anumită viteză de baleere a acestuia.

În tabelul 1.5 sunt redată principalele metode de imobilizare ale enzimelor, și deasemenea principalele lor avantaje și dezavantaje analitice.

Tab.1.5 Procedee de imobilizare a enzimelor

Metoda	Avantaje	Dezavantaje
1. Adsorbția pe matrici insolubile	Simplă, condiții de lucru blânde, fără distrugerea (denaturarea) enzimei.	Legăturile enzimei cu suportul, sunt puternic dependente de pH, solvent și temperatură.
2. Entraparea în gel	Metodă general aplicabilă enzimelor, presupune condiții blânde de reacție.	Barriere difuzionale largi, pierderea activității enzimei, posibila denaturare a moleculei enzimei ca rezultat al apariției unor radicali liberi.
3. Legarea covalentă de o membrană sau de un suport insolubil (celuloza, dextranul, colagenul, gelatina, albumina, policlorura de vinil, sticla poroasă)	Complexul enzimă-suport este stabil, metoda este ideală pentru producția în masă și comercializare a preparatelor enzimatiche.	Tehnica complicată, timp de lucru mare, posibilitatea pierderii activității datorită reacțiilor în care sunt implicate grupările esențiale pentru activitatea biochimică.
4. Legarea încrucișată prin intermediul unui agent multifuncțional (cum ar fi glutaraldehida)	Procedeu simplu, presupune formarea unor legături chimice puternice între biomolecule și suport, larg folosită în stabilizarea fizică a enzimelor adsorbite pe un suport.	Dificultăți în controlul reacției, necesită o cantitate mare de enzimă, activitate enzimatică relativ mică după imobilizare.
5. Electropolimerizarea	Procedeu relativ simplu, se poate controla grosimea stratului de polimer sau film obținut precum și cantitatea de enzimă inclusă în acesta, se poate folosi ușor la realizarea microelectrozilor.	Mecanismul proceselor cinetice de electropolimerizare este încă neelucidat.

1.5. APLICAȚIILE ENZIMELOR ÎN CHIMIA ANALITICĂ

O dată cu progresele realizate în domeniul ingineriei genetice, cu posibilitatea obținerii enzimelor într-un grad de puritate avansat precum și cu progresele realizate în domeniul tehnicilor de imobilizare a enzimelor, acestea au găsit largi aplicații în diferite

domenii cum ar fi: chimia analitică, controlul alimentelor, analize clinice, controlul mediului și al biotehnologiilor.

1.5.1 REACTOARE ANALITICE ENZIMATICE

În cadrul laboratoarelor analitice în care se efectuează sute de determinări sunt necesare realizarea și utilizarea unor metode automate pentru efectuarea analizelor de rutină. La ora actuală sunt comercializate o serie de analizoare automate care sunt folosite ca echipament standard în majoritatea laboratoarelor biochimice. Cu toate acestea, multe dintre ele au la bază enzimele solubile și folosesc reactivi de culoare în scopul monitorizării reacțiilor. Acest lucru conduce la o creștere a prețului de cost/analiză deoarece enzima nu poate fi reutilizată.

O posibilă soluție la această problemă o reprezintă utilizarea enzimelor imobilizate care pot fi reutilizate. Majoritatea analizoarelor automate funcționează în sistem de flux continuu, în care probele și reactivii sunt introduși printr-un sistem de canale și camere de amestecare ajungând în final la detector. Un sistem tipic este redat în figura 1.9.

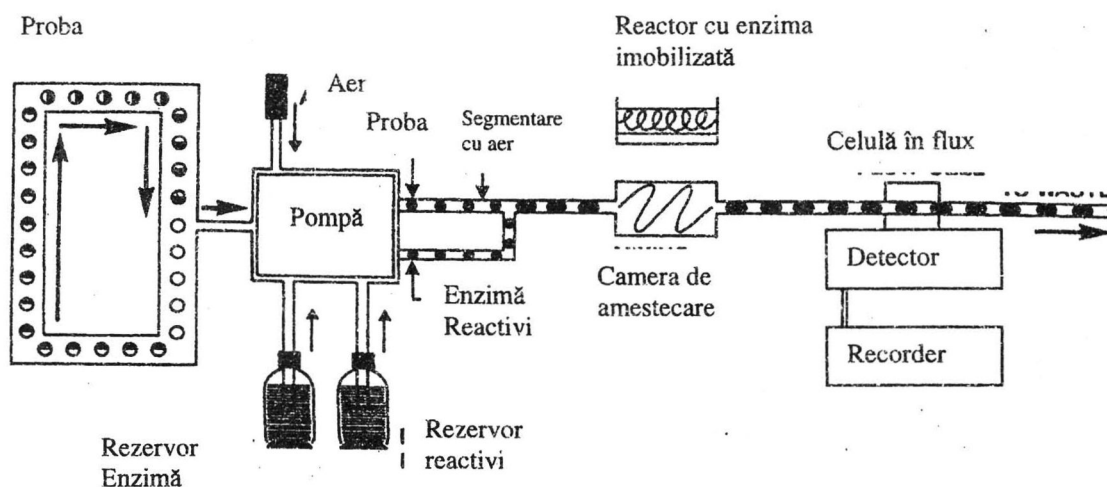


Fig. 1.9 Reprezentarea schematică a unui sistem simplu de analiză automată în flux [3]

Reactorul enzimatic reprezintă configurația cea mai adecvată pentru utilizarea enzimelor imobilizate. Acestea au la bază un compartiment de curgere în flux care include enzima imobilizată. Proba conținând substratul ajunge în acest compartiment, unde are loc reacția enzimatică rezultând produșii de reacție. În cadrul analizoarelor automate, practic, reactorul enzimatic înlocuiește camera de amestecare. În cadrul analizei în flux cel mai adesea au fost studiate două tipuri de reactoare enzimaticice cel tubular și cel sub formă de strat împachetat (figura 1.10).

În sistemul tubular, enzima este fixată pe suprafața internă a tubului (tuburile de nylon sunt adecvate acestui scop).

În reactorul sub formă de pat împachetat enzima este imobilizată de exemplu pe straturi poroase sau în interiorul unor fibre, ulterior preparatul enzimatic astfel obținut fiind

introdus (împachetat) într-un tub de plastic sau sticlă obținându-se astfel un mic reactor enzimatic sub formă de coloană.

Ambele sisteme sunt eficiente în ceea ce privește înlocuirea enzimei solubile, ambele având avantaje și dezavantaje. Timpul de răspuns este similar cu cel obținut folosind un electrod enzimatic.

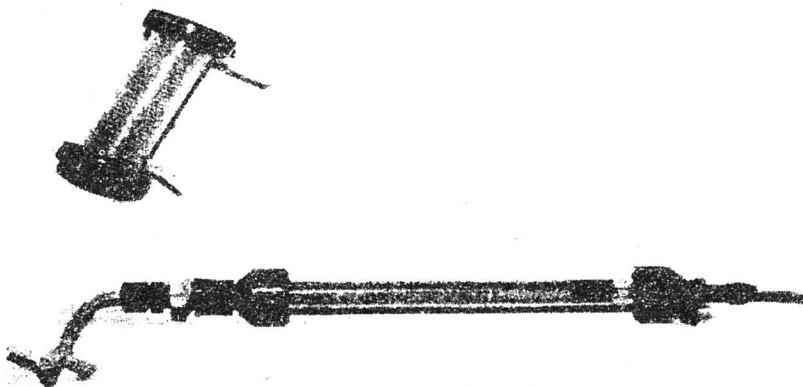


Fig. 1.10 Reactor sub formă de coloană (pat împachetat) –dreapta- conținând alcool dehidrogenaza legată covalent de agaroză și reactor enzimatic tubular (spirală) –stânga- conținând glucoz-dehidrogenaza fixată pe tuburi de nylon. Reactoarele au fost folosite pentru determinarea alcoolului și respectiv a glucozei [3].

1.5.2 APLICAȚIILE ENZIMELOR ÎN CONTROLUL CALITĂȚII ALIMENTELOR

O mare parte din industria alimentară se bazează pe procesarea și prepararea unui material perisabil rezultat din plante și animale. În cele mai multe cazuri alimentele constau din țesuturi moarte, precum și din organe și organisme aflate în diferite stadii de descompunere; de aceea este importantă monitorizarea integrității produselor alimentare, dat fiind faptul că acestea trec prin diferite stadii de procesare, până la obținerea produsului final care trebuie să fie nealterat și să atragă consumatorul.

Enzimele au fost utilizate pentru determinarea (analiza) unui număr mare de substanțe din produsele alimentare plecând de la conținutul de alcool din vin până la determinarea concentrației insecticidelor reziduale din țesuturile plantelor. Deasemenea, determinarea enzimelor interne, reprezintă un indicator al unei etape de procesare a alimentelor. Eficiența pasteurizării laptei poate fi estimată prin determinarea activității invertazei înainte și după pasteurizare. O pasteurizare eficientă trebuie să conducă la o inactivare substanțială a enzimei.

În scopul menținerii unor standarde ridicate în industria alimentară, enzimele au fost utilizate pentru determinarea calității inferioare a unor substituenți introduși în produsele alimentare.

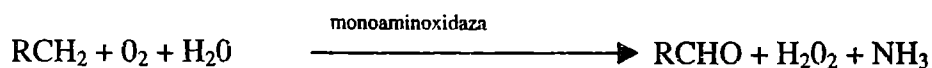
Un exemplu reprezentativ relativ la aplicațiile enzimelor în analiza alimentelor îl reprezintă metodele utilizate în controlul calității cărnii. Controlul calității preparatelor din carne s-a realizat utilizând un electrod enzimatic sau printr-o metodă imunochimică.

Una dintre caracteristicile fundamentale ale vieții îl reprezintă controlul permanent al proceselor metabolice din celule și dintre țesuturi. În viață există un echilibru dinamic între degradare și biosinteza macromoleculor care asigură generarea continuă a componentelor de bază pentru formarea compușilor care întrețin și reproduc viața. După moarte acest control dispare. Deasemenea enzimele responsabile pentru degradare, care în mod normal există sub un control metabolic riguros sunt eliberate în mediu; ele conduc la o descompunere a țesuturilor și celulelor, proces în urma căruia rezultă o serie de compuși de degradare cum sunt amoniacul, aminele, carboxilații, bioxidul de carbon ș.a. Acumularea acestor molecule simple creează un mediu ideal pentru creșterea bacteriilor, drojdiilor și a fungilor. Aceste organisme produc o degradare avansată a cărnii, având ca efect modificarea culorii și mirosului acesteia. Deoarece, bacteriile produc alterarea alimentelor nu se recomandă consumarea acestora din urmă în stare de degradare. Estimarea prospețimii cărnii și a produselor din carne, reprezintă un indicator important pentru calitatea acestor produse obținute în industria alimentară.

În concluzie, înainte de a fi comercializate alimentele trebuie supuse unui control analitic de calitate care vizează: prospețimea cărnii și a peștelui, nivelul de glucide, conținutul de alcool al băuturilor, conținutul în aditivi toxici.

Metoda clasică de analiză a prospețimii cărnii constă în determinarea conținutului de amoniac rezultat la hidroliza acidă a azotului organic total (test Kjeldahl) - o analiză de durată incluzând o serie de etape (extracții, distilări și titrări). În ultimii ani a fost propusă ca metodă alternativă folosirea unui electrod enzimatic pentru determinarea monoaminelor (histamina, tiramina) rezultate din decarboxilarea aminoacizilor eliberați în timpul protolizei proteinelor din carne. Deoarece în timpul procesului de degradare al cărnii rezultă o serie de amine, monitorizarea acestor substanțe poate reprezenta un bun indicator al prospețimii preparatelor din carne.

Monoaminele pot fi determinate folosind un electrod enzimatic având la bază un sensor de oxigen și enzima monoamin oxidaza care catalizează reacția:



Sensorul de oxigen determină scăderea concentrației de oxigen din sistem datorată oxidării monoaminei. Curentul electric generat este direct proporțional cu concentrația de monoamină. În comparație cu metoda Kjeldahl de analiză, metoda enzimatică este una simplă, rapidă și economică care poate fi utilizată în analize de rutină.

Similar, a fost propusă o metodă pentru determinarea hipoxanthinei din carnea de pește folosind un electrod pe bază de xantinoxidază și ca mediator hexacianoferat (II).

Pentru dozarea glucidelor (glucoza, sucroza, lactoza, amidon) există deja o serie de analizoare pe bază de biosenzori produse de Yellow Springs Analyser. Deși cerința unei astfel de analize în industria alimentară este mare, introducerea noilor metode de analiză bazate pe folosirea reactivilor enzimatici se face încet datorită condițiilor de lucru speciale pe care le presupun.

1.5.3. APLICATIILE ENZIMELOR ÎN LABORATORUL CLINIC

Laboratorul clinic de biochimie reprezintă o componentă cheie a oricărui spital modern. Principala sa utilitate este de a efectua o serie de analize ale substanțelor prezente în probe biochimice cum sunt sânge, urină, fecale, lichid cerebro-spinal, măduvă, ș.a.

Analizele conduc la generarea de informații care contribuie și facilitează detecția și diagnosticarea anumitor boli și/ sau dereglări metabolice. Datele analitice obținute contribuie totodată la controlul și monitorizarea tratamentului medical, de ex. poate fi vitală determinarea concentrației unui medicament în sânge în scopul stabilirii dozei optime în cadrul unui tratament medical bun sau poate genera date privind relația dintre concentrația medicamentului și efectele dăunătoare ale acestuia. Numărul de analize diferite care pot fi efectuate în cadrul unui laborator bioanalitic dintr-un spital poate fi de cel puțin 20000/săptămână. Cel puțin 20% din aceste analize pot avea la bază enzimele ca reactivi analitici, deci enzimele au un rol important în cadrul analizelor clinice, tendința actuală fiind aceea de a fi, din ce în ce mai mult folosite în cadrul procedurilor analitice.

În cele ce urmează se vor prezenta o serie de tehnici analitice cu posibile aplicații, în laboratoarele clinice, având la bază enzimele.

Metodele spectrometrice de analiză sunt foarte bune pentru determinări *in vitro*, dar aparatura este complexă și pregătirea probelor poate fi de durată. O alternativă valabilă o oferă de multe ori folosirea biosenzorilor - care pot genera un răspuns direct și rapid având la bază o aparatură simplă și ieftină.

Estimarea glucozei din serul sanguin, este una dintre cele mai des întâlnite analize efectuate în laboratoarele clinice; într-o săptămână în cadrul unui laborator, poate fi necesară efectuarea a 1500 de determinări de glucoză.

Glucoza rezultă în organism, în principal din degradarea carbohidraților din alimentele folosite în dieta zilnică. Aceasta este oxidată de celulele din organism proces în urma căreia se produce energie chimică (ATP) necesară activităților celulare. Concentrația optimă de glucoză din sânge este cuprinsă între 80-100 mg/100 cm³, fiind esențială în cadrul metabolismului glucidic. Un nivel constant de glucoză este menținut printr-o serie de mecanisme complexe implicând și diferiți hormoni, incluzând și insulina. Dacă, conținutul de glucoză scade sub 50 mg/100 cm³ (hipoglicemie), apar o serie de manifestări clinice diferite de acelea în care concentrația de glucoză depășește 180mg/100 cm³ (hiperglicemie), caz în care sângele devine acid și glucoza este eliminată în urină. În ambele cazuri consecințele pot fi fatale dacă concentrația de glucoză nu este adusă la limite normale.

Insulina joacă un rol important în reglarea concentrației de glucoză din sânge și în cazul bolnavilor cronici de diabet, producerea acestui hormon încetează sau este substanțial redusă. În această situație, concentrația de glucoză din sânge crește, celulele nefiind capabile să consume glucoza din sânge. Un prim diagnostic de diabet, pentru un pacient, poate indica o concentrație de glucoză de aproximativ 700 mg/100 cm³. În cadrul unui organism sănătos concentrația de glucoză este monitorizată de către pancreas, care odată cu creșterea concentrației de glucoză, eliberează o cantitate suficientă de insulină în sânge; insulina are rolul de a metaboliza glucoza și prin aceasta are loc o scădere a glucozei din sânge la un nivel normal.

În cazul bolnavilor de diabet este necesară administrarea prin injectare a unei cantități corecte de insulină. Diabetul cronic este o boală des întâlnită (aprox. 2% din populația

României suferă de această boală) și de aceea sunt necesare metode de determinare a glucozei în sânge și urină.

Metodele chimice reprezintă, metodele clasice de determinare a glucozei, bazată pe proprietățile ei reducătoare. Reactivi chimici utilizați în cadrul metodelor, nu erau specifici pentru glucoză deoarece și alți componenți din sânge erau capabili să-i reducă. Utilizarea glucoz-oxidazei nu a înlăturat problema specificității cu toate că enzima este destul de specifică pentru glucoză (figura 1.11), dar metodele utilizate pentru determinarea apei

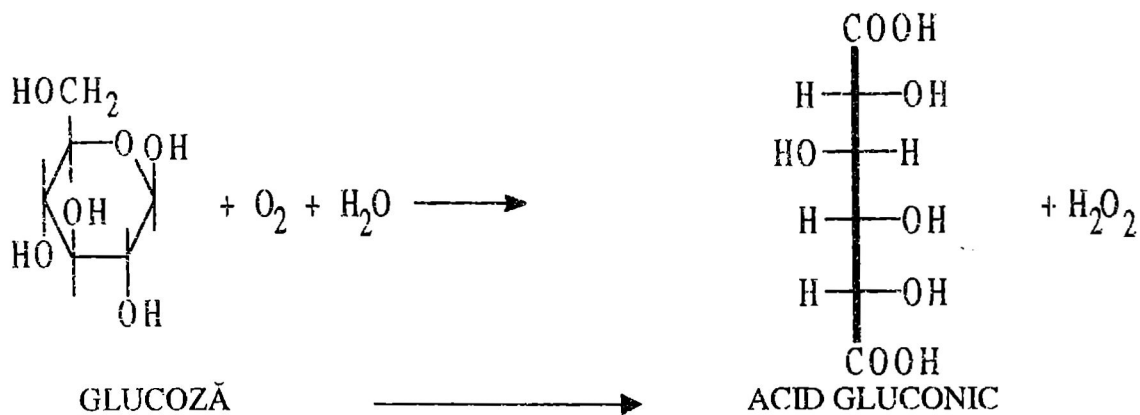
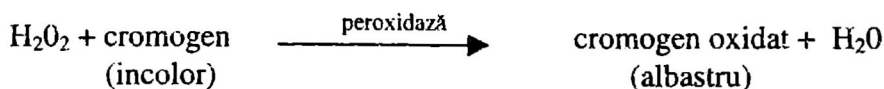


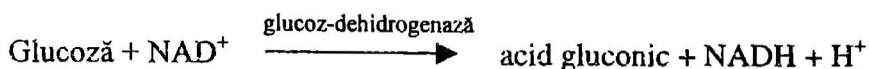
Fig 1.11. Reacția catalizată de glucoz-oxidază. Enzima catalizează oxidarea glucozei la glucono-lactonă (ne-redată) care hidrolizează spontan formând acid gluconic. Oxigenul este utilizat ca acceptor de hidrogen formând H_2O_2 .

oxigenate, nu erau specifice. Pentru mărirea specificității s-a folosit o reacție enzimatică cuplată cu prima (care poartă denumirea de reacție indicatoare), reacție catalizată de peroxidază:



Necesitatea utilizării unui sistem de reacții enzimatic cuplate, presupunând folosirea mai multor enzime nu este avantajos din punct de vedere economic (datorită prețului de cost ridicat al enzimelor).

În ultimii ani analiza enzimatică a glucozei se efectuează folosind o enzimă bacteriană descoperită recent și care poartă denumirea de glucoz-dehidrogenază. Această enzimă combină specificitatea detecției cu generarea unui semnal specific.



Enzima necesită participarea cofactorului NAD^+ care acționează ca acceptor de hidrogen. Forma redusă a acestuia NADH , poate fi detectată spectrometric la 340 nm. În

perspectivă, această enzimă va înlocui sistemul enzimatic cuplat menționat mai sus, pentru determinarea cantitativă a glucozei.

Pentru determinarea glucozei, s-a realizat un aparat simplu bazat pe un electrod enzimatic de unică folosire, care utilizează ca probă o picătură de sânge. Timpul de răspuns este de 30s. Comparând rezultatele obținute pe probe de ser prin metoda enzimatică clasică cu cele obținute cu ajutorul electrodului enzimatic pe probe de sânge integral, se constată o diferență sistematică de 5 - 8% în minus pentru cel de-al doilea caz, variațiile fiind datorate tipului de analizator. La interpretarea rezultatelor trebuie avută în vedere această diferență.

Un deziderat îl constituie monitorizarea intravenoasă a glucozei. Acest lucru se poate realiza cu ajutorul unui microelectrod sau a unui biosenzor cu fibre optice. Realizarea unui biocip pentru măsurători *in vivo* prezintă următoarele avantaje: posibilitatea de a măsura variații mici ale curentului (de ordinul 10^{-16} A); rezistența chimică mică, datorită scăderii dimensiunii, viteza proceselor de transport spre suprafață crește; curenți capacitivi mici; prezintă caracteristici de răspuns (semnal/zgomot) foarte bune; sunt ieftini și ușor de realizat în serie.

Un parametru important pentru diagnosticarea rinichiului și pentru controlul dializei renale îl constituie nivelul de uree în sânge. Pentru determinarea ureei s-au realizat senzori potențiometrici pe bază de urează.

O altă direcție de utilizare a biosenzorilor o constituie realizarea și folosirea lor pentru măsurători *in vivo*; în ultimii ani au fost raportați o serie de electrozi implantabili pentru glucoză, dar puțini răspund cerințelor unui senzor *in vivo* fiabil (tabel 1.6)

Tab. 1.6 Condițiile pe care trebuie să le îndeplinească un senzor pentru măsurători *in vivo*

PARAMETRU	OBSERVAȚII
Biocompatibilitate	Reacție tisulară minimă
Stabilitate în timp	Devierea liniei de bază 10% / zi
Calibrare	În fabrică sau într-un singur punct <i>in vitro</i>
Domeniu de răspuns linear	30 mM în cazul glucozei
Specificitate	Excluderea metaboliților interferenți
Timp de răspuns	2 min
Sterilizare	Realizată prin iradiere
Rezistență mecanică și fizică	Să nu-și modifice caracteristicile în condițiile folosirii lui în cadrul măsurătorilor <i>in vivo</i>

Rezultatele cercetărilor efectuate până în prezent sugerează că realizarea unor senzori de glucoză *in vivo* este foarte probabilă deși sunt încă multe probleme de rezolvat (răspunsul senzorului la concentrații mari de analit, colmatarea senzorului datorită altor constituenți din sânge, infecțiile la nivelul interfeței cu pielea).

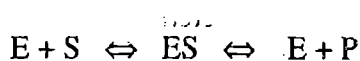
1.5.4. APLICAȚIILE ENZIMELOR ÎN CONTROLUL POLUĂRII MEDIULUI

În perioada ultimilor 300 de ani, caracterizată printr-un progres tehnologic rapid omul a modificat în mod radical mediul înconjurător, fără a ține cont de protecția acestuia față de efectele dăunătoare cum este și poluarea.

Marea majoritate a poluanților sunt biodegradabili, prezentând efecte dăunătoare pe perioade scurte de timp, până când sunt distruși de alte componente ale mediului. De

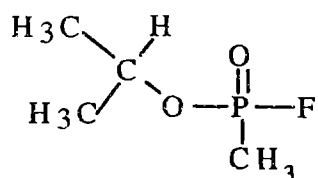
exemplu resturile menajere lichide deversate în mare devin eventual ne-dăunătoare datorită bacteriilor sau a altor microorganisme. Cu toate acestea, unii poluanți își păstrează caracteristicile dăunătoare pe o perioadă mare de timp ei ridicând probleme de mediu grave serioase datorită pericolului acumulării lor în lanțul trofic natural. Plumbul și mercurul sunt recunoscuți ca poluanți persistenți și care se acumulează la fel cum sunt și bifenolii policlorurați (PCB). Controlul și monitorizarea mediului are în vedere în primul rând detectarea și evaluarea poluanților temporari și persistenți astfel încât efectele toxice ale acestora să poată fi cuantificate, putând fi realizate procedee de reducere a poluanților din mediu.

Enzimele sunt din ce în ce mai utilizate în analiza mediului datorită în primul rând a faptului că majoritatea poluanților au efect inhibitor asupra enzimelor. Multe dintre insecticidele organice sunt realizate în scopul omorării insectelor prin inhibarea respirației celulare și sintezei de ATP. Alți compuși, în special compușii organici clorurați cum este DDT acționează asupra sistemului nervos. Astfel, detecția inhibiției enzimatică reprezintă o metodă de monitorizare a poluanților din mediu. Această metodă depinde de reacția enzimei (E) cu un inhibitor (I), reacție în urma căreia poate rezulta un complex catalitic inactiv.

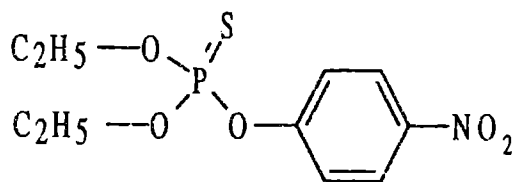


Deoarece numărul de molecule de enzimă active scad transformarea substratului în produs prezintă o scădere corespunzătoare.

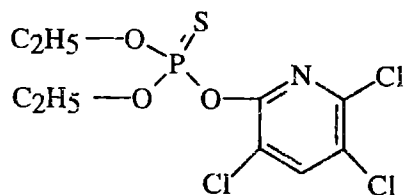
O enzimă des utilizată în astfel de studii este colinesteraza. Enzima este inhibată de un număr mare de compuși organici incluzând multe insecticide și câteva gaze toxice de luptă (figura 1.12)



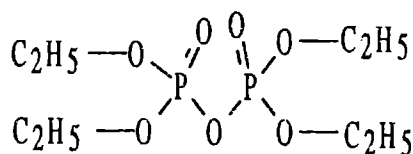
SARIN(GAZ TOXIC)



PARATHION (INSECTICID)



DURBAN (INSECTICID)



TETRAETHYLPYROPHOSPHATE (TEPP), (INSECTICID)

Fig. 1.12 Inhibitori ai colinesterazei

În prezent, există o serie de biosenzori comercializați pentru monitorizarea probelor de aer și apă. Enzima este immobilizată într-o matrice de gel și depusă pe un strat adecvat de poliuretan, substratul enzimei fiind iodura de butiriltiocolină. În timpul unei determinări preparatul de enzimă este introdus în soluția unui flux care conține substratul, care este rapid hidrolizat de către enzimă rezultând produșii de reacție corespunzători:



Stratul enzimatic este plasat între anodul și catodul unui electrod potențiomtric utilizat drept traductor fizic. Tiocolin-iodura se oxidează la anod generând un potențial de aproximativ 250 mV. Deci, în absența inhibitorului se înregistrează un potențial de aproximativ 250 mV. Proba de analizat este ulterior introdusă în fluxul conținând substratul. Dacă proba conține un inhibitor al colinesterazei, activitatea enzimei va scădea. Concentrația de tiocolin-iodură va scădea iar potențialul electrodului crește la aproximativ 500 MV. Această modificare a potențialului poate fi corlată cu concentrația inhibitorului enzimatic prezent în probă. Metoda este rapidă și sensibilă putând fi determinate cantități de ordinul micro-gramelor de insecticid. Prin intermediul ei nu pot fi determinați și alți poluanți care nu inhibă activitatea enzimei. Sistemul poate fi ușor adaptat pentru monitorizarea probelor de aer și apă.

Au fost realizate de asemenea și o serie de metode de determinare a contaminării solului datorată lichidelor menajere poluante.

Totodată sistemele enzimatică au fost utilizate pentru detecția altor poluanți cum sunt: fenolii, fenoxi-acizii de ex. erbicidul 2,4-D (acidul 2,4-diclorofenoxiacetic), a acidului nitrilotriacetic (component al unor detergenți) și nu în ultimul rând a unor metale grele cum ar fi cuprul, zincul și plumbul.

2. ELEMENTE DE CINETICĂ ENZIMATICĂ

Mulți ani experiențele de cinetică enzimatică au adus dovezi asupra existenței complexului enzimă substrat ca un intermediar în reacțiile catalizate enzimatic.

Cinetica enzimatică prezintă trei aplicații de bază în studiul unei enzime și anume: determinarea enzimei, efectul variabilelor și în studii asupra mecanismului de reacție. Principiile din cadrul catalizei ne-enzimatice (chimice) se aplică și în cazul catalizatorilor enzimatici atâta timp cât se ține seama de faptul că enzima este supusă denaturării.

Concentrația unui substrat care ia parte la o reacție enzimatică poate fi determinată în două moduri:

- prin măsurarea modificării totale care se realizează prin analiză fizică, chimică sau enzimatică a substratului nereacționat sau a produsului de reacție format;
- din viteza reacției enzimatică, care depinde de concentrația enzimei, substratului, activatorului sau inhibitorului;

Dat fiind faptul că enzima este un catalizator, ea afectând viteza și nu echilibrul reacției, activitatea enzimelor trebuie determinată printr-o metodă cinetică. Activatorii și inhibitorii, care afectează capacitatea catalitică a enzimei, și deci viteza reacției enzimatică, pot fi determinați deasemenea numai prin metode cinetice.

În cinetica enzimatică se aplică în mod obișnuit condițiile de reacție de pseudo-ordinul unu, cu deosebirea că factorul limitativ de viteză este enzima (catalizatorul) și nu substratul.

Pentru a trata pe scurt principiile determinărilor enzimatică prin metoda cinetică de analiză, se consideră ca un caz simplificat, conversia catalizată enzimatic a substratului S în produsul de reacție P; în cele ce urmează se presupune că în timpul reacției catalitice (2.1):



- substratul (S) este complexat cu enzima (E);
- echilibrul tinde către formarea produsului de reacție (P);
- etapa cea mai lentă (limitativă de viteză) este conversia complexului ES în P și E, enzima fiind refolosită.

Dacă substratul se află într-un exces suficient de mare, comparativ cu enzima, imediat după amestecarea enzimei cu substratul, concentrația enzimei tinde către zero (figura 2.1), ceea ce înseamnă că enzima se află aproape toată sub forma complexului ES și rămâne astfel până aproape de sfârșitul reacției. Condițiile de reacție de acest tip, se numesc condițiile stării staționare (în condițiile stării staționare, concentrația de enzimă, nu este esențial să fie aproximativ egală cu zero). Figura 2.1 redă un caz limită al stării staționare în care substratul saturează enzima.

În cazul reacției bimoleculare (2.1) se mai consideră și următoarele ipoteze:

- substratul reacționează cu enzima un timp finit pentru a forma complexul ES;
- complexul ES poate disocia fie pentru a forma E + S, sau poate reacționa pentru a forma E+P;

- pe parcursul reacției substratul reacționează continuu cu enzima pentru a forma complexul ES;
- în formarea produsului de reacție există o perioadă de “lag” (mult exagerată în figură), premergătoare realizării stării staționare.

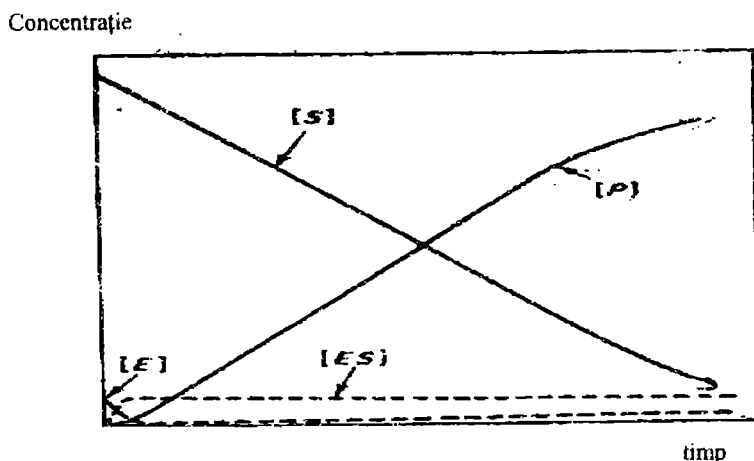


Fig. 2.1. Modificări în concentrația reactanților pe parcursul unei reacții enzimatice ipotetice care presupune transformarea ireversibilă a substratului (S) în produsul de reacție (P) prin intermediul complexului enzimă-substrat (ES) [4].

Reacția (2.1) poate fi utilizată ca un caz simplificat pentru a explica principiile determinărilor enzimelor și a efectelor concentrațiilor de substrat, inhibitor și activator.

2.1. ECUAȚIA MICHAELIS-MENTEN

Deoarece atât viteza cât și specificitatea reacțiilor catalizate enzimatic depind de formarea unui complex specific ES, prima și cea mai importantă contribuție a cineticii enzimatice a fost descoperirea complexului enzimă-substrat, numit și *complex Michaelis-Menten*, de a cărui formare depind atât specificitatea, cât și viteza reacției.

Michaelis și Menten au efectuat experiențe asupra invertazei, măsurând vitezele inițiale ale reacției la diferite concentrații de substrat. Plecând de la mecanismul de reacție (2.1), unde ES reprezintă complexul intermediar sau Michaelis-Menten, ei au propus prima etapă de reacție reversibilă și suficient de rapidă pentru a putea fi reprezentată printr-o constantă de echilibru (disociere):

$$K_d = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (2.2)$$

K_d = constanta de disociere

Concentrațiile instantanee ale enzimei libere și ale substratului nu pot fi măsurate direct și de aceea trebuie exprimate în termenii concentrației inițial măsurate și anume:

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (2.3)$$

și

$$[S_0] = [S] + [ES] \quad (2.4)$$

Deoarece concentrația inițială de substrat este mare se poate aproxima faptul că $[S] \approx [S_0]$. De aceea, în toate calculele și ecuațiile care vor urma se poate folosi fără a greși concentrația inițială de substrat $[S_0]$ în locul concentrației de substrat $[S]$, la un timp t oarecare

Din ecuația (2.3) se obține:

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (2.5)$$

care introdusă în relația (2.2) conduce la:

$$K_d = \frac{[S]([E_0] - [ES])}{[ES]}$$

sau exprimând $[ES]$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_d + [S]} \quad (2.6)$$

Etapa a II-a de reacție este de ordinul întâi, caracterizată de constanta de viteză k_{+2} :

$$v_0 = k_{+2}[ES] \quad (2.7)$$

și ținând cont de ecuația (2.6) obținem:

$$v_0 = k_{+2} \frac{[E_0][S]}{k_d + [S]} \quad (2.8)$$

Dacă echilibrul dintre enzimă, substrat și complexul enzimă-substrat este atins rapid, etapa limitativă de viteză va fi descompunerea complexului ES, și deci dacă $[S_0] \gg [E_0]$, viteza de reacție va fi independentă de concentrația de substrat. În concluzie, odată cu creșterea concentrației de substrat, viteza va crește spre un maxim definit, cunoscut sub denumirea de viteză de saturație V_s figura (2.2).

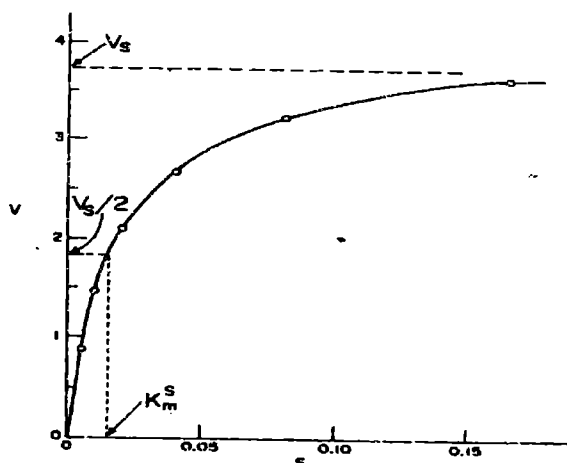


Fig.2.2 Variația vitezei de reacție funcție de concentrația de substrat.

Ipoteza echilibrului dintre complexul enzimă-substrat și reactanți, a fost criticată de Briggs și Haldane. În anul 1925 aceștia au introdus conceptul de stare staționară în cadrul

reacțiilor enzimactice și au demonstrat ca neesențial conceptul echilibrului propus de Michaelis și Menten.

Înainte de a adăuga substratul la o soluție enzimatică, toate moleculele de enzimă sunt libere. Când se adăugă substratul, enzima și substratul se combină rapid, urmând o fază de tranziție în care se acumulează complexul ES, până când se atinge nivelul de stare staționară. Cu cât este mai mare concentrația de substrat adăugată, cu atât va fi mai mare concentrația inițială a stării staționare. Când toată enzima este sub forma complexului ES, orice altă creștere neglijabilă a concentrației de substrat, va duce la o creștere neglijabilă a concentrației complexului și deci a vitezei de reacție [5,6].

Tratarea stării staționare se bazează pe ipoteza că în cursul unei reacții concentrația anumitor intermediari de reacție, cum ar fi complexul ES, nu se modifică rapid. Conform acestei ipoteze rezultă că:

$$\frac{d[S]}{dt} \gg \frac{d[ES]}{dt} \approx 0 \quad (2.9)$$

Această ipoteză este valabilă pe tot parcursul reacției, cu excepția perioadei inițiale, înainte ca starea staționară să fi fost atinsă și de asemenea, cu excepția perioadei finale a reacției când condiția $[S_0] \gg [E_0]$ nu mai este valabilă. Briggs și Haldane au argumentat că în orice alte momente ale reacției viteza netă de modificare a concentrației complexului ES este egală cu zero. În aceste condiții ecuațiile cinetice devin:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[E][S] - k_{-1}[ES] - k_{+2}[ES] \quad (2.10)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_{+1}[E][S] + k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \quad (2.11)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] \quad (2.12)$$

Din ecuația (2.10), se observă că viteza de modificare a complexului ES în timp trebuie să egaleze diferența dintre formarea lui în prima etapă caracterizată prin constanta de viteză k_{+1} și desfacerea lui în produși sau reactanți caracterizată prin constantele k_{-1} și k_{+2} . Dacă presupunem că:

$[S_0] \gg [E_0]$ se va stabili o situație staționară în care concentrația $[ES]$ se modifică foarte încet comparativ cu $[S]$ și $[P]$, adică:

$$\frac{d[ES]}{dt} \approx 0 \quad (2.13)$$

La începutul reacției, substratul și enzima reacționează repede. Formarea complexului ES începe cu viteza $k_{+1}[E][S]$. Pe perioada fazei de tranziție $[ES]$ tinde către un nivel de stare staționară adecvat concentrațiilor de enzimă și substrat introduse inițial, după care scade prin scăderea concentrației de substrat. În ipoteza că $[S_0] \gg [E_0]$, scăderea concentrației complexului enzimă-substrat datorată micșorării concentrației de substrat va fi relativ mică. Deci în cadrul fazei stării staționare a reacției $d[ES]/dt \ll k_{+1}[S_0][E_0]$ adică mai mică decât viteza rapidă de formare a complexului ES de la începutul fazei de tranziție. Știind că:

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (2.14.)$$

din ecuațiile (2.10) și (2.14) se obține:

$$k_{+1}[S]([E_0] - [ES]) = (k_{-1} + k_{+2})[ES]$$

sau

$$k_{+1}[S][E_0] = (k_{+1}[S] + k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad (2.15)$$

Rezultă că:

$$[ES] = \frac{k_{+1}[S][E_0]}{(k_{+2} + k_{-1}) + k_{+1}[S]} \quad (2.16)$$

Ținând cont de ecuațiile (2.12) și (2.16)

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] = k_{+2} \frac{k_{+1}[E_0][S]}{(k_{+2} + k_{-1}) + k_{+1}[S]}$$

sau împărțind totul cu k_{+1} :

$$v_0 = k_{+2} \frac{[E_0][S]}{[K_m] + [S]} \quad (2.17)$$

unde:

$$K_m = \frac{k_{+2} + k_{-1}}{k_{+1}} \quad (2.18)$$

În relațiile (2.17) și (2.18) s-au notat prin:

$[E_0]$ – concentrația inițială de enzimă;

$[S_0]$ – concentrația inițială de substrat;

K_m - constanta Michaelis-Menten;

k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} - constantele cinetice respective.

Ecuția (2.17) este deci aceeași ca și ecuația Michaelis-Menten cu excepția faptului că în locul lui K_d apare K_m . Dacă $k_{-1} \gg k_{+2}$ atunci $K_m \cong K_d$

La concentrații mari de substrat, $[S] \gg [K_m]$ din ecuația (2.17) se obține:

$$v = k_{+2}[E_0] \quad (2.19)$$

În acest caz, viteza atinge o valoare maximă:

$$V_{max} = k_{+2}[E_0] \quad (2.20)$$

și deci:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.21)$$

unde: K_m = constanta Michaelis-Menten

V_{max} = viteza maximă

Cei doi parametrii cinetici K_m și V_{max} caracterizează enzima care catalizează reacția. Ecuția (2.21) este ecuația de viteză a stării staționare pentru o reacție omogenă care implică un catalizator re folosibil. Ea reprezintă ecuația fundamentală a cineticii enzimatice și este denumită ecuația Michaelis-Menten.

Această ecuație se aplică și la mecanisme mult mai complexe decât mecanismul Michaelis-Menten, dar în aceste cazuri expresiile constantelor V_{\max} și K_m au definiții mai complexe.

Ecuația (2.21) descrie o hiperbolă rectangulară cu asimtotele la $[S_0] = -K_m$ și $v_0 = V_{\max}$. Centrul acestei secțiuni conice este în punctul $(-K_m, V_{\max})$. Porțiunea din curbă relevantă pentru cinetica enzimatică este secțiunea din hiperbolă care prezintă valori pozitive ale concentrației de substrat (a se vedea secțiunea 2.3). Forma grafică a ecuației (2.21) este redată în figura 2.3, iar proprietățile acesteia în tabelul 2.1 [7].

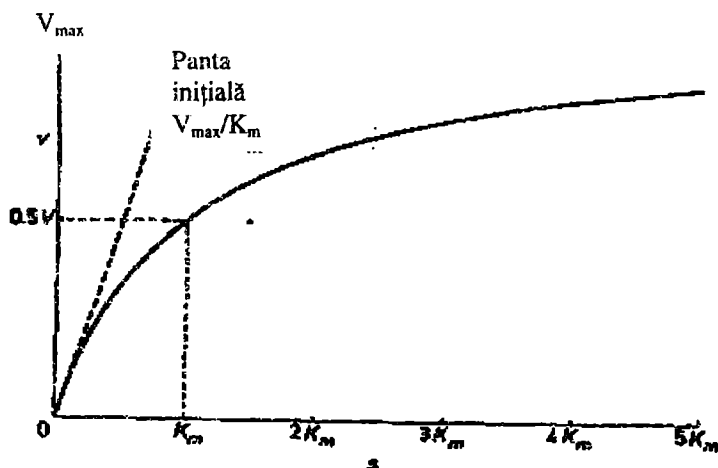


Fig. 2.3 Graficul vitezei inițiale de reacție funcție de concentrația de substrat pentru o reacție enzimatică care respectă ecuația Michaelis-Menten.

Tab. 2.1 Proprietățile ecuației Michaelis-Menten

[S]	v_0
1000 K_m	0,999
100 K_m	0,990
10 K_m	0,910
3 K_m	0,750
K_m	0,5
0,33 K_m	0,25
0,10 K_m	0,091
0,01 K_m	0,010

2.2. SEMNIFICAȚIA CINETICĂ ȘI ANALITICĂ A PARAMETRILOR K_m ȘI V_{\max}

Constantele cinetice K_m și V_{\max} reprezintă doi parametrii foarte importanți și utili pentru descrierea caracteristicilor unei enzime care catalizează o reacție chimică; în practică nu se poate afirma faptul că parametrul K_m se exprimă în mod simplu prin ecuația (2.18) sau că $V_{\max} = k_{+2}[E_0]$. V_{\max} nu este o proprietate fundamentală a unei enzime, pentru că depinde de concentrația de inițială de enzimă.

Pentru ecuația cinetică (2.21) se pot introduce o serie de ipoteze simplificatoare, care prezintă un rol important în cadrul studiilor cinetice, cât și în cadrul determinărilor enzimatice.

Una dintre aceste ipoteze este următoarea:

- dacă $[S] \ll K_m$, din ecuația (2.21) rezultă că viteza inițială depinde atât de concentrația de substrat, cât și de cea de enzimă:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m} \quad (2.22)$$

După cum se observă din relația (2.22), la concentrații fixe de enzimă viteza inițială crește direct proporțional cu concentrația de substrat până când, la adăugarea unui mic exces de substrat, viteza de reacție rămâne constantă. Raportul V_{\max}/K_m poate fi privit ca o constantă cinetică și deci reacția este de ordinul unu în raport cu substratul. Deci, din punct de vedere analitic, pentru determinarea substratelor, reacția trebuie să fie de ordinul unu sau pseudo-ordinul unu în raport cu acesta; domeniul pentru care se obține liniaritatea și în care determinarea analitică a concentrației unui substrat poate fi realizată prin măsurarea vitezei inițiale de reacție se află la valori ale concentrației de substrat $[S] < 0,1 K_m$.

- dacă $[S] = K_m$ din ecuația (2.21) rezultă că

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{2} \quad (2.23)$$

Din ecuația (2.23) se poate da o definiție simplă pentru constanta Michaelis-Menten și anume: ea reprezintă acea concentrație de substrat pentru care se obține jumătate din viteza maximă.

- dacă concentrația de substrat este cuprinsă între $0,1 K_m < [S] < 10 K_m$ atunci reacția este intermediară între ordinul zero și unu în raport cu substratul.

- dacă $[S] \gg K_m$ tot din ecuația (2.21) se obține pentru viteza inițială de reacție:

$$v_0 = V_{\max} \quad (2.24)$$

În aceste condiții viteza de reacție este de ordinul zero în raport cu substratul și de ordinul întâi față de concentrația de enzimă. Când concentrația de $[S] > 100 K_m$, deviația de la cinetica de ordinul zero este mai mică decât 1% rezultând că $v_0 = 0,99 V_{\max}$; chiar când $[S] > 10 K_m$, deviația de la cinetica de ordinul zero este de numai 9%, rezultând că $v_0 = 0,91 V_{\max}$. În realitate, viteza inițială v_0 se apropie foarte greu de viteza maximă V_{\max} , chiar în condițiile în care concentrația de substrat este foarte mare ($[S] = 10 K_m$). De aceea, V_{\max} nu poate fi determinată prin măsurători directe, însă ea poate fi estimată din valorile vitezei inițiale, obținute la valori ale concentrației de substrat de subsaturare.

Presupunând că se cunoaște concentrația enzimei, se poate defini mărimea k_{cat} denumită "*constantă catalitică*" sau "*număr de turnover*", ca fiind:

$$k_{cat} = \frac{V_{\max}}{[E_0]} \quad (2.25)$$

În cazul mecanismului Michaelis-Menten, $k_{cat} = k_{+2}$, dar în general se preferă notația k_{cat} .

Valoarea vitezei maxime se corelează cu cantitatea de enzimă folosită, iar K_m reprezintă o măsură a activității acesteia. Enzimele care prezintă valori mari de K_m au o activitate enzimatică mică fiind mai puțin active.

2.3. NATURA HIPERBOLICĂ A ECUAȚIEI MICHAELIS-MENTEN

Graficul vitezei de reacție în funcție de concentrația de substrat, conform ecuației Michaelis-Menten, este deseori descris ca o hiperbolă rectangulară. În matematică, hipebolele prezintă două arcuri, iar prin reprezentarea ecuației Michaelis-Menten rezultă numai unul; de asemenea, chiar exprimarea matematică a ecuației Michaelis –Menten (2.21) pare să aibă prea puțin în comun cu expresia obișnuită a unei hiperbole rectangulare cu axele x și y ca asimptote

$$x \cdot y = a \quad (2.26)$$

și chiar mai puțin cu expresia unei hiperbole rectangulare cu asimptotele înclinate la 45° față de axele x și y :

$$x^2 - y^2 = a^2 \quad (2.27)$$

Efectuând însă substituția în ecuația (2.21.):

$$\begin{aligned} x &= [S] + K_m \text{ sau } x = [S] - (-K_m) \\ y &= v - V_{\max} \\ a &= -V_{\max}K_m \end{aligned} \quad (2.28)$$

și introducând în relația (2.26), se va obține:

$$([S] + K_m)(v - V_{\max}) = -V_{\max}K_m \quad (2.29)$$

ceea ce reprezintă o formă rearanjată a ecuației Michaelis-Menten.

Deoarece asimptotele hiperbolei (2.26) sunt $x = 0$ și $y = 0$, rezultă că din definiția lui x și y din ecuația (2.28), asimptotele graficului vitezei funcție de concentrația de substrat sunt :

$$[S] = -K_m \text{ și } v = V_{\max}$$

Pentru că asimptota verticală apare la o valoare negativă a concentrației de substrat, este clar de ce curba pare să aibă o singură parte; întreaga parte negativă și o parte din cea pozitivă apar într-o regiune a graficului imposibilă din punct de vedere fizic, deci nu pot fi observate.

Aceste concluzii sunt redată în figura 2.4, care redă mai mult din curbă decât poate fi în mod normal observată. Acest fapt are o importanță practică atunci când se estimează valorile K_m și V_{\max} din studiul influenței concentrației de substrat asupra vitezei de reacție v_0 , estimându-se practic forma întregii hiperbole din numai câteva observații efectuate de-a lungul unui arc scurt.

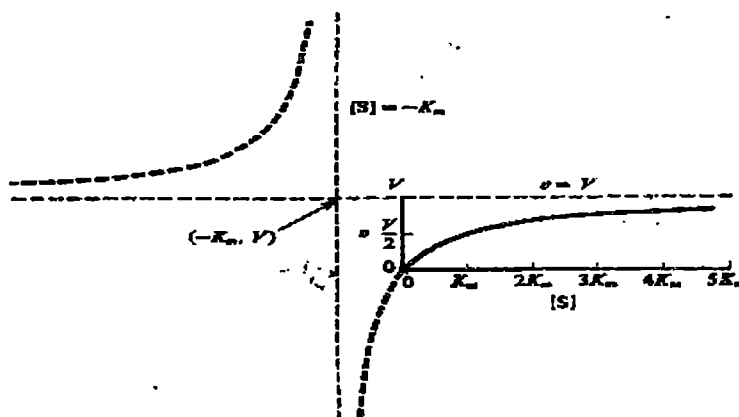


Fig. 2.4 Graficul vitezei inițiale v_0 în funcție de concentrația de substrat $[S]$, pentru o reacție care se supune ecuației Michaelis-Menten redând natura hiperbolică a ecuației [5].

Figura 2.4 ilustrează o proprietate a curbei, corelată cu faptul că orice dreaptă care trece prin punctul de intersecție al asimptotelor, taie axele în două puncte, care împreună, corespund coordonatelor unui punct de pe curbă. Această proprietate formează baza graficului linear direct, care este totuși trasat ca o reflecție a figurii (2.4), privind axa verticală, deoarece este tratat ca un grafic viteză funcție de constanta K_m , mai degrabă decât o trasare a unui grafic viteză funcție de concentrația de substrat.

2.4 REPREZENTĂRI GRAFICE ALE ECUAȚIEI MICHAELIS-MENTEN. DETERMINAREA PARAMETRILOR CINETICI K_M ȘI V_{MAX} .

Reacția enzimatică este inițiată odată cu amestecarea enzimei cu substratul; pe măsură ce reacția progresează, concentrațiile de substrat și produs se vor modifica, ca de altfel și viteza. Curba progresivă tipică, rezultată prin trasarea graficului produs de reacție format în funcție de timp, pornește de obicei cu o pantă constantă, care, în mod gradual, va scădea pe măsură ce modificările în concentrațiile de substrat și de produs vor fi mai mari. În cinetica enzimatică există două metode pentru evaluarea relației dintre viteza de reacție v_0 și concentrația de substrat, din curbe progresive de această formă.

2.4.1. METODA VITEZEI INIȚIALE

Deoarece concentrațiile de substrat și a altor liganzi sunt în mod cert prezente la timpul $t=0$, determinarea vitezei de reacție inițială are avantajul că dă naștere la erori mici de-a lungul scării de concentrație. Estimarea vitezei inițiale necesită extrapolarea curbei progresive la timpul $t=0$, prin metode vizuale sau computerizate (fig. 2.5).

a. Metoda vizuală

Trasându-se tangenta în origine la curba progresivă se obține panta tangentei la curbă, la timpul zero, care corespunde vitezei inițiale a stării staționare.

b. Estimarea computerizată

Din studii experimentale se pot obține o serie de valori ale concentrațiilor produșilor de reacție la timpi succesivi, iar seriile de puncte (P_1, t_1) , (P_2, t_2) , ..., (P_i, t_i) ... pot fi introduse într-o formulă de extrapolare, de ex. o serie de puteri în timp. O serie simplă este:

$$P = a_0 + a_1t + a_2t^2 + a_3t^3 + \dots \quad (2.30)$$

Introducând punctele obținute în seria de puteri, se pot determina coeficienții a_0 , a_1 , a_2 , etc. Panta inițială este dată de coeficientul a_1 , deoarece:

$$\begin{aligned} \frac{d[P]}{d[t]} &= a_1 + 2a_2t + 3a_3t^2 + \dots \\ &= a_1 \quad \text{când } t=0 \end{aligned} \quad (2.31)$$

Pentru curbele progresive care au o formă regulată și sunt înregistrate continuu, ambele tipuri de procedee conduc, în general, la rezultate similare. În general, procedeele computerizate sunt mult mai puțin susceptibile erorilor vizuale sistematice. În ambele cazuri recizia este îmbunătățită dacă se utilizează metode sensibile de determinare, prin intermediul

căroră se urmărește numai porțiunea inițială a curbei progresive (înaintea apariției unor modificări mari de concentrație).

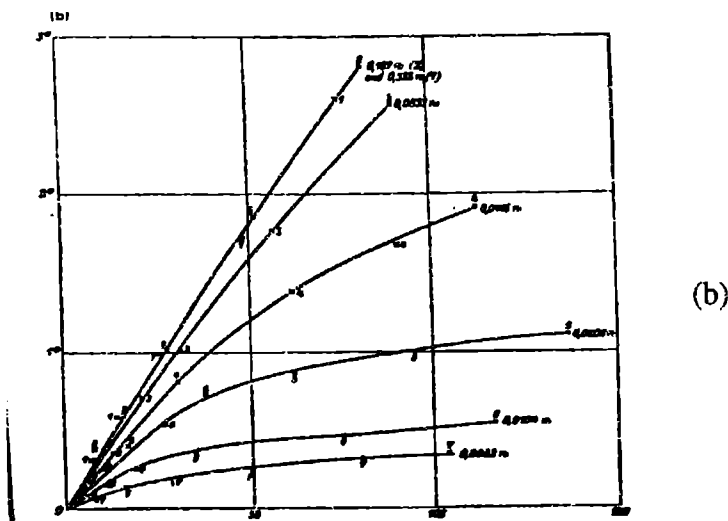
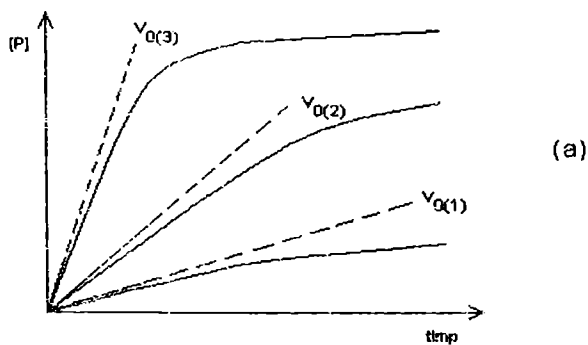


Fig.2.5 Curba progresivă. (a) Curba progresivă rezultată prin trasarea graficului concentrație de produs în funcție de timp. Viteza inițială poate fi determinată fie prin trasarea tangentei la curbă la $t=0$ sau (b) curba progresivă obținută pentru o serie de concentrații de substrat (sucroză) de la 0,0052 M la 0,333 M [6]

Prin determinarea vitezei inițiale v_0 pentru o serie de amestecuri de reacție conținând diferite concentrații de substrat, se poate trasa graficul viteză inițială în funcție de concentrația de substrat. Ecuația de viteză a stării staționare (2.21) indică faptul că graficul reprezintă o hiperbolă rectangulară, generată de cei doi parametri numerici: V_{max} și K_m . După cum s-a demonstrat mai sus forma acestei hiperbole devine evidentă dacă se evaluează viteza pentru trei concentrații limită de substrat:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \begin{cases} [S]=0 & v_0=0 \\ [S]=K_m & v_0=V_{max}/2 \\ [S] \gg K_m & v_0 \sim V_{max} \end{cases} \quad (2.32)$$

Viteza este zero când concentrația de substrat este zero, se apropie de V_{max} când concentrația de substrat este foarte mare; viteza este egală, cu $V_{max}/2$ când concentrația de substrat este egală cu constanta Michaelis (K_m). Figura 2.5 b redă vitezele de hidroliză ale sucrozei de către invertază, ilustrând totodată tipul de comportare prezentat mai sus.

După cum s-a demonstrat, viteza inițială este funcție de concentrațiile inițiale de enzimă și substrat (a se vedea ecuația 2.21). La o concentrație fixă de enzimă, viteza crește cu concentrația de substrat până este atins un nivel de concentrație de substrat (exces), care limitează viteza reacției (figura 2.3), după care orice altă adăugare de substrat nu mai duce la o creștere a vitezei.

Metoda cea mai evidentă pentru reprezentarea ecuației (2.21) este aceea de a trasa graficul viteza inițială (v_0) în funcție de concentrația de substrat, din care rezultă o hiperbolă rectangulară cu asimptotele la $v_0=V_{max}$ și $[S] = -K_m$ (figurile 2.3 și 2.4).

Acest grafic prezintă unele dezavantaje legate de faptul că este greu de folosit în practică, deoarece este dificil de trasat o hiperbolă rectangulară, existând totodată o tendință puternică ca asimptotele să fie trasate prea aproape de curbă ceea ce face dificilă estimarea corectă a asimptotelor (cu toate că la concentrații mari de substrat viteza v_0 se apropie de V_{max}); este deci foarte greu să se estimeze valoarea exactă a V_{max} din curba hiperbolică. Dacă V_{max} este estimată greșit, rezultă că și $V_{max}/2$ și implicit K_m vor fi estimate greșit; un alt dezavantaj este legat de faptul că este dificilă găsirea unei relații între o familie de hiperbole, fiind deasemenea greu de a se stabili deviațiile de la curba probabilă.

Deci, ecuația unei hiperbole rectangulară nu reprezintă o formă convenabilă pentru evaluarea constantelor cinetice V_{max} și K_m . Aceste dezavantaje au fost recunoscute de Michaelis și Menten, care în loc să reprezinte viteza inițială (v_0) în funcție de concentrația de substrat ($[S]$) au reprezentat v_0 în funcție de $\log[S]$. Acest grafic dă naștere unei curbe simetrice în formă de S care are panta maximă când $[S]=K_m$ (figura 2.6).

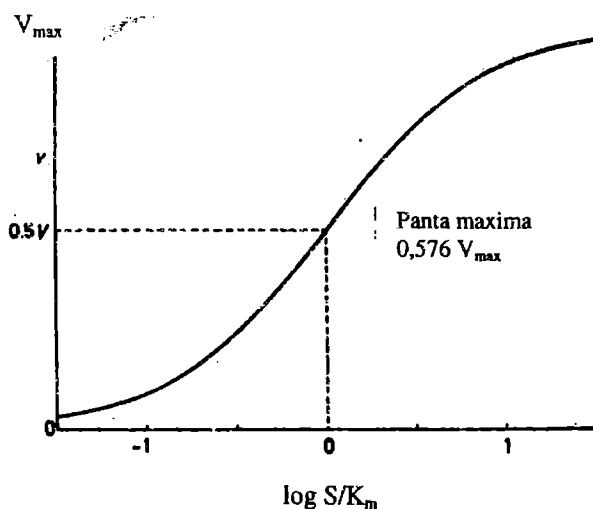


Fig.2.6 Determinarea V_{max} și K_m prin metoda lui Michaelis --Menten. Graficul este aproximativ liniar pe un domeniu apreciabil de viteze și astfel panta maximă poate fi estimată ușor [6].

Diferențiind ecuația (2.21) rezultă:

$$\frac{dv_0}{d \ln[S]} = \frac{K_m \cdot V_{\max} \cdot [S]}{(K_m + [S])^2} \Leftrightarrow \quad (2.33)$$

$$\frac{dv_0}{d \log[S]} = 2,303 \frac{K_m \cdot V_{\max} \cdot [S]}{(K_m + [S])^2}$$

Valoarea maximă a pantei rezultă atunci când $[S]=K_m$ și este egală cu $\frac{2,303V_{\max}}{4} = 0,576V_{\max}$. Deci, V_{\max} poate fi determinată astfel: $V_{\max} = \frac{\text{panta} \cdot \text{maxima}}{0,576}$.

Michaelis-Menten au estimat parametrul K_m ca fiind valoarea concentrației de substrat pentru care viteza a fost egală cu $v_0=V_{\max}/2$.

Determinarea parametrului cinetic K_m în acest mod este mult mai precisă decât estimarea punctului în care apare panta maximă. Acest grafic nu mai este folosit azi, dar prezintă un interes istoric putând fi folosit pentru a reda saturarea enzimelor care prezintă mai multe centre de legare.

Începând cu Lineweaver și Burk, mulți cercetători au preferat să retranscrie ecuația lui Michaelis-Menten într-o formă care să permită trasarea rezultatelor sub forma unui grafic liniar. Segal (1985), a descris originea istorică a graficelor lui Lineweaver și Burk (1934), Eadie (1942) și Hanes (1932), care rezultă din expresia hiperbolică (2.21) astfel [5]:

se trasează graficul:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) \frac{1}{v_0} \rightarrow f\left(\frac{1}{[S]}\right) \quad (2.34)$$

Lineweaver și Burk (1934)

$$v_0 = V_{\max} - K_m \frac{v_0}{[S]}; v_0 \rightarrow f\left(\frac{v_0}{[S]}\right) \quad (2.35)$$

Wolf (1932)

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}}; \frac{[S]}{v_0} \rightarrow f([S]) \quad (2.36)$$

Hanes (1932)

Prin intermediul ecuației (2.34) $\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right)$ se poate obține un grafic liniar

$\frac{1}{v_0} \rightarrow f\left(\frac{1}{[S]}\right)$, având panta $= \frac{K_m}{V_{\max}}$ și intersecția pe ordonată $1/V_{\max}$ (figura 2.7), iar pe abscisă $-1/K_m$.

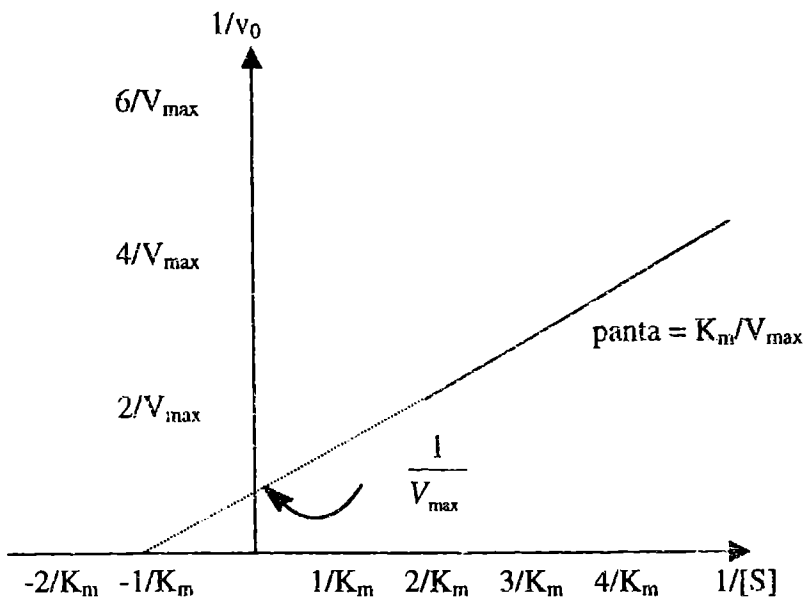


Fig. 2.7 Graficul schematic al datelor de cinetică enzimatică folosind ecuația Lineweaver-Burk (2.34).

O analiză, prin simpla regresie liniară a celor mai mici pătrate, a datelor în această formă nu este recomandabilă pentru că inversarea influențează mărimea erorilor. Datele pot fi totuși folosite în această formă dacă ele sunt mediate adecvat.

Ținând cont de ecuația (2.36) se poate obține un grafic $\frac{[S]}{v_0} \rightarrow f([S])$, liniar având panta egală cu $1/V_{max}$ și intersecțiile K_m/V_{max} cu axa $[S]/v_0$ și $-K_m$ cu axa $[S]$ (figura 2.8).

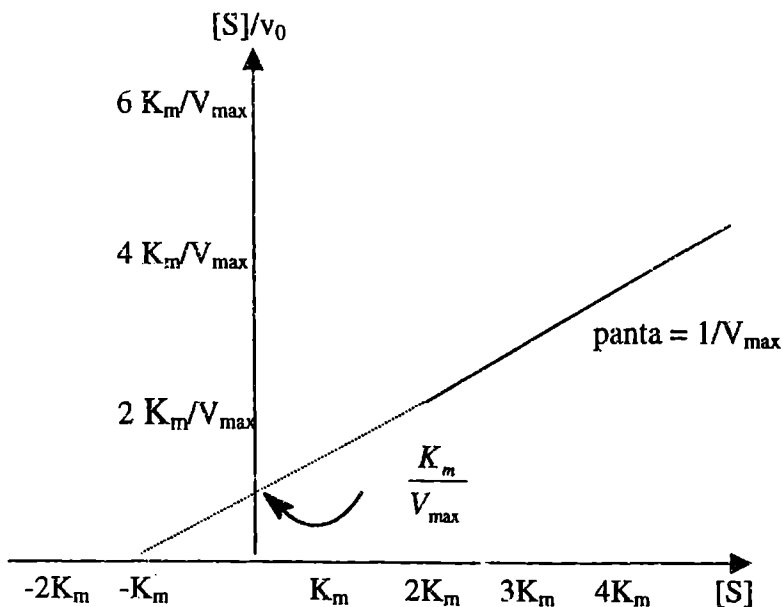


Fig.2.8. Graficul schematic al datelor de cinetică enzimatică folosind ecuația Hanes (2.36).

Ecuția (2.35) conduce la obținerea graficului $v_0 \rightarrow f\left(\frac{v_0}{[S]}\right)$, reprezentând o dreaptă de pantă $-K_m$ și intersecție pe ordonată V_{max} și V_{max}/K_m pe abscisă (figura 2.9).

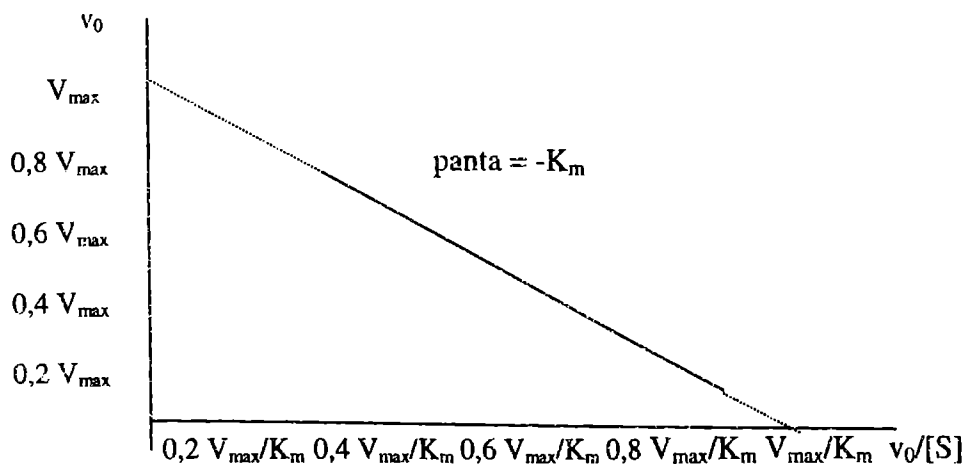


Fig. 2.9 Graficul schematic al datelor de cinetică enzimatică folosind ecuația Wolf (2.35).

Ecuția (2.21) poate fi aranjată și sub forma propusă de Eadie și Hofstee (1952):

$$\frac{v_0}{[S]} = \frac{V_{max}}{K_m} - \frac{v_0}{K_m} \quad (2.37)$$

Prin intermediul ecuației (2.37) se poate trasa graficul $\frac{v_0}{[S]} \rightarrow f(v_0)$, care reprezintă o dreaptă cu pantă $-1/K_m$ și intersecția pe ordonată $\frac{V_{max}}{K_m}$, iar pe abscisă V_{max} (figura 2.10):

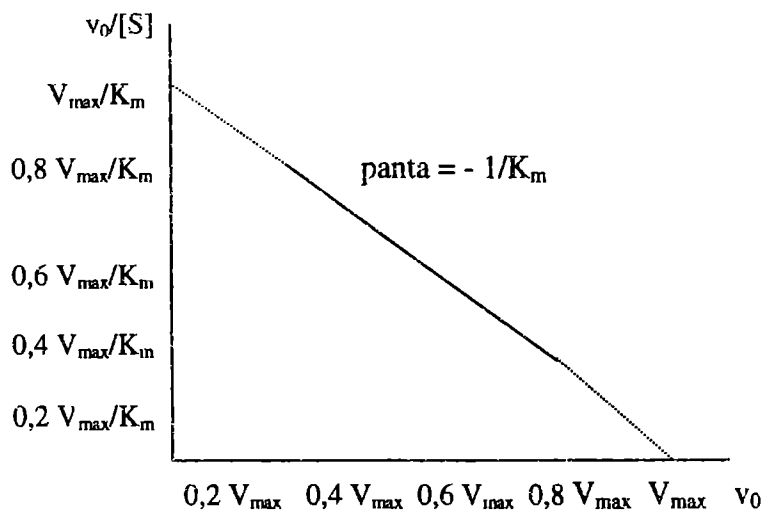


Fig. 2.10 Reprezentarea schematică a datelor de cinetică enzimatică bazată pe ecuația Eadie-Hofstee (2.37).

Ecuatiile (2.35) și (2.37) conduc la erori mari în determinarea parametrilor cinetici, deoarece viteza inițială apare în ambii membri ai ecuațiilor, determinarea acestora conducând la erori mai mari decât în cazul măsurării concentrației de substrat. În scopul determinării parametrilor cinetici, V_{\max} și K_m , se recomandă un domeniu de concentrații de substrat cuprins între 0,2 și 5 K_m .

Avantajele graficelor de mai sus constau în ușurința și acuratețea unei reprezentări liniare comparativ cu aceea a unei hiperbole precum și în estimarea simplă a pantei și intersecțiilor dreptei.

Recent au fost luate în discuție influențele statistice inerente rezultate ca urmare a transformărilor liniare ale ecuației Michaelis-Menten; din aceste studii au rezultat o serie de concluzii dintre care se poate folosi orice grafic, dar cel mai adesea în practică fiind utilizat graficul Lineweaver-Burk care este totodată și cel mai puțin corect. Graficul Lineweaver-Burk prezintă deviații de la linearitate la concentrații mici de substrat. Probleme similare apar și în condițiile folosirii celorlalte două grafice (figurile 2.8 și 2.9). Graficele din figurile 2.7, 2.8 și 2.9 prezintă o serie de dezavantaje fiind considerate ca nesatisfăcătoare.

Graficul $v_0 \rightarrow f\left(\frac{v_0}{[S]}\right)$ prezintă dezavantajul că v_0 - variabilă dependentă- apare în

ambele coordonate. Din cele trei grafice, graficul $\frac{[S]}{v_0} \rightarrow f([S])$ este cel mai satisfăcător.

Pentru estimarea parametrilor cinetici pot fi utilizate și o serie de programe de calculator.

Eisenthal și Cornish- Bowden (1974) [5], au descris o metodă complet diferită de a reprezenta grafic rezultatele cineticii enzimatică, ei denumind graficul folosit de ei "graficul liniar direct". Astfel, în locul scrierii ecuației Michaelis-Menten sub forma ecuației 2.21, care prezintă dependența vitezei inițiale de concentrația de substrat, ei au rearanjat expresia pentru a reda dependența vitezei maxime (V_{\max}) de constanta Michaelis K_m :

$$V_{\max} = v_0 + \frac{v_0}{[S]} K_m \quad (2.38)$$

În acest caz, pentru orice valoare a vitezei inițiale și a concentrației de substrat se poate trasa un grafic al vitezei maxime (V_{\max}) în funcție de K_m sub forma unei drepte care are panta egală cu v_0/S și cu intersecțiile: $-[S]$ pe axa K_m și v_0 pe axa V_{\max} . Dacă se trasează mai multe drepte de același fel, pentru mai multe determinări, acestea se vor intersecta într-un punct comun ale cărui coordonate dau numai valorile V_{\max} și K_m (figura 2.11). În cazul determinărilor reale, punctul de intersecție este prost definit (nu ca în figura 2.11), datorită erorilor experimentale; punctul cel mai corect este ușor de găsit el fiind acela în care dreptele se strâng cel mai aproape unele de altele. De asemenea, determinările greșite sunt ușor de recunoscut într-un astfel de grafic, deoarece ele dau naștere la drepte care diferă mult una de alta. Avantajul principal al acestui tip de grafic este acela că nu necesită nici un fel de calcul.

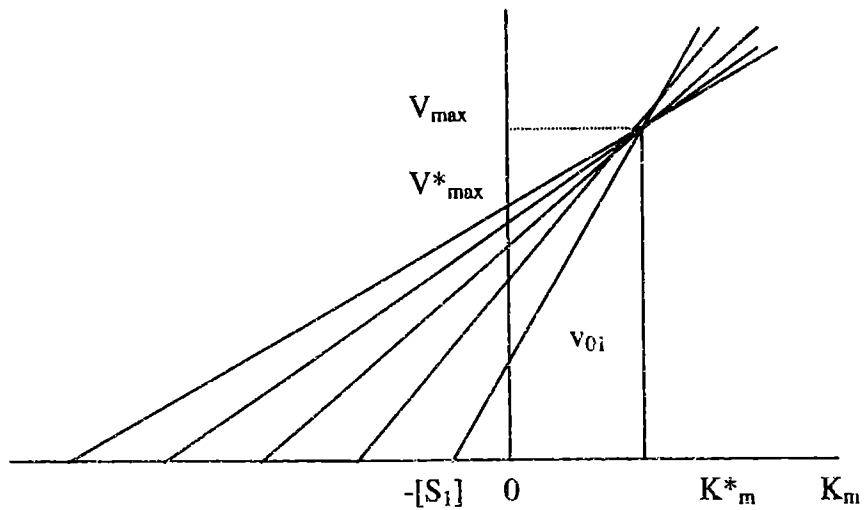


Fig. 2.11 Graficul linear direct bazat pe ecuația (2.38). Fiecare linie reprezintă o determinare având intersecțiile: $-[S]$ pe axa K_m și respectiv v_0 pe axa V_{max} . Punctul de intersecție dă coordonatele cele mai bune a lui K_m^* și V_{max}^* .

2.4.2. METODA VITEZEI INTEGRATE

O ecuație cinetică poate fi scrisă în două forme diferite: ca o expresie care să indice modificarea concentrației unui reactant în timp sau, ca una care să redea variația vitezei de reacție în funcție de concentrația reactanților.

Enzimologii iau în considerare a doua posibilitate, în timp ce chimiștii pe prima; chimiștii preferă totodată ecuațiile de viteză integrate, acestea având avantajul că reprezintă ceea ce se determină la moment dat.

Michaelis și Menten (1913) au abordat problema studierii enzimelor prin măsurarea vitezelor inițiale de reacție situație în care se elimină erorile introduse de inhibiția prin produși de reacție și a scăderii concentrației de substrat sub nivelul necesar saturării enzimei cu substrat. Inițial biochimiștii nu au încercat să aplice ecuațiile de viteză integrate, chiar atunci când acestea erau adecvate studiilor lor.

Determinările vitezelor inițiale sunt adecvate în etapele preliminare ale unui studiu de cinetică enzimatică, când problema principală este aceea de a găsi și ecuația adecvată și valorile aproximative ale parametrilor cinetici. În aceste studii este indicat să se înlăture efectele produșilor de reacție sau să fie luate în considerare în mod controlat. Totuși, odată încheiat acest studiu preliminar, este bine să se studieze viteza de reacție de-a lungul unei perioade mai mari de timp, observându-se astfel efectul progresiv al acumulării produșilor, precum și cel al scăderii substratului. În principiu este posibil să se obțină valori exacte ale parametrilor cinetici dintr-un număr destul de mic de experiențe, evitându-se astfel natura subiectivă a estimării vitezei inițiale dintr-un grafic de forma unei curbe care în mod practic este imposibil să se realizeze fără erori. O curbă progresivă de reacție conține mult mai multă informație comparativ cu cea generată printr-o determinare a vitezei inițiale prin extrapolare la timpul $t = 0$.

Până în prezent s-au menționat metodele de tratare a datelor de cinetică care presupun determinarea vitezei inițiale a reacției catalizate de enzimă pentru o serie de diferite concentrații de substrat. Datele pot fi reprezentate grafic conform cu una din transformările liniare ale ecuației, obținându-se astfel parametrii cinetici: K_m și V_{max} . Acest procedeu este echivalent cu metoda diferențială.

Un procedeu alternativ, care cel puțin în teorie, poate fi folosit pentru determinarea valorilor V_{max} și K_m , este acela de a introduce datele dintr-o singură curbă progresivă într-o ecuație de viteză integrată adecvat. Deoarece atât viteza de reacție cât și concentrația de substrat variază continuu în cursul reacției, o singură curbă progresivă poate genera o serie de puncte (viteză- concentrație) suficientă pentru determinarea vitezei maxime și a constantei K_m .

În scopul integrării ecuației Michaelis-Menten (ca orice altă ecuație de viteză) este necesară introducerea relațiilor care există între concentrațiile reactanților. Astfel, concentrația de substrat $[S]$ și concentrația de produs $[P]$ nu sunt independente, suma lor fiind o constantă:

$$[S] + [P] = [S_0]$$

Deci, $[S]$ sau $[P]$, pot fi eliminate prin intermediul acestei ecuații. În consecință, ecuația

Michaelis-Menten ($v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S_0]}{K_m + [S_0]}$), o ecuație diferențială simplă, care redă viteza de

dispariție a substratului sau viteza de formare a produsului, poate fi ușor integrată prin separarea variabilelor:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2.39)$$

$$-\int_{t=0}^t V_{max} dt = \int_{[S_0]}^{[S_t]} \left(\frac{K_m}{[S]} + 1 \right) d[S] \Leftrightarrow$$

$$-V_{max} t = [S_t] - [S_0] + K_m \int_{[S_0]}^{[S_t]} \frac{d[S]}{[S]} \Rightarrow$$

$$-V_{max} t = [S_t] - [S_0] + K_m \ln[S_t] - K_m \ln[S_0]$$

De unde:

$$V_{max} t = K_m \ln \frac{[S_0]}{[S_t]} + ([S_0] - [S_t]) \quad (2.40)$$

unde:

$$[S_0] = [S] + [S_t]$$

$$[S_t] = [P]$$

Ecuația (2.40), reprezintă forma integrată a ecuației Michaelis-Menten și definește curba progresivă a unei reacții (sau evoluția reacției în timp) pentru care ecuația Michaelis-Menten continuă să fie valabilă pentru o perioadă mare de timp, de la începutul reacției.

În continuare în loc de a defini $[P]$ în termeni de t , așa cum ar fi de dorit, se definește t în termeni de $[P]$, acest lucru neconstituind un impediment mare în practică. Se recomandă

folosirea formei $\ln \frac{[S_0]}{[S]}$ a acestei ecuații de viteză integrate, deoarece prin aceasta se evită orice confuzie legată de cazul adăugării produsului la începutul reacției (când la $t=0$, $[P_0] \neq 0$).

Ca și forma ei diferențială, ecuația (2.40) poate fi transformată în câteva alte ecuații, în scopul de a permite obținerea unui grafic liniar:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S_0] - [P]} = \frac{V_{\max}}{K_m} - \frac{1}{K_m} \frac{[P]}{t} \quad (2.41)$$

$$\frac{t}{\ln \frac{[S_0]}{[S]}} = \frac{1}{V_{\max}} \left[\frac{[S_0] - [S]}{\ln \frac{[S_0]}{[S]}} \right] + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (2.42)$$

$$\frac{[S_0] - [S]}{t} = V_{\max} - \frac{K_m}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]} \quad (2.43)$$

$$\frac{t}{[S_0] - [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S_0] - [S]} \right) \ln \frac{[S_0]}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.44)$$

Din ecuația (2.42) se poate reprezenta grafic: $\frac{t}{\ln \frac{[S_0]}{[S]}} \rightarrow f \left(\frac{[S_0] - [S]}{\ln \frac{[S_0]}{[S]}} \right)$ care reprezintă o

dreaptă având panta egală cu $1/V_{\max}$ și cu intersecțiile: K_m/V_{\max} pe ordonată și $-K_m$ pe abscisă, semănând deci cu graficul Hanes din cazul metodei vitezei inițiale.

Grafice liniare se obțin și din ecuațiile (2.43) și (2.44), care se aseamănă cu graficele Eadie și respectiv, Lineweaver și Burk. În figura 2.12 se reprezintă grafic ecuația 2.43.

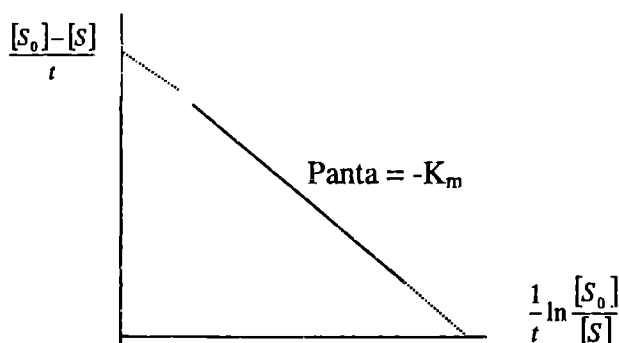


Fig. 2.12 Reprezentarea schematică a datelor de cinetică enzimatică, folosind ecuația Michaelis-Menten integrată (2.43).

Deci graficul din figura 2.12 dă naștere unei drepte cu panta $-K_m$ și cu intersecțiile: V_{max} , pe ordonată și V_{max}/K_m , pe abscisă.

Problema asociată folosirii graficului din figura (2.12) și deci a ecuației (2.43) este aceea că nu se face nici o ipoteză asupra mecanismului modificării vitezei inițiale pe parcursul evoluției reacției.

Reacția poate fi inhibată de produși, să se apropie de o poziție de echilibru sau poate suferi modificări în condițiile experimentale folosite în timpul reacției, cum ar fi pH-ul.

Dacă reacția enzimatică se supune unei cinetici de tip Michaelis-Menten pe toată durata experienței, atunci, așa precum rezultă din ecuația (2.43) și figura 2.12, punctele obținute pentru diferite concentrații inițiale vor fi pe aceeași dreaptă. Dacă poziția dreptei se modifică cu concentrația inițială de substrat, atunci comportarea nu este descrisă de ecuația Michaelis-Menten (2.21).

Din ecuația (2.41), s-a reprezentat graficul $\frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S_0] - [P]} \rightarrow f\left(\frac{[P]}{t}\right)$ redat în figura

2.13; graficul rezultat prezintă o pantă $= -1/K_m$ și cu intersecțiile: V_{max}/K_m , pe ordonată și V_{max} , pe abscisă:

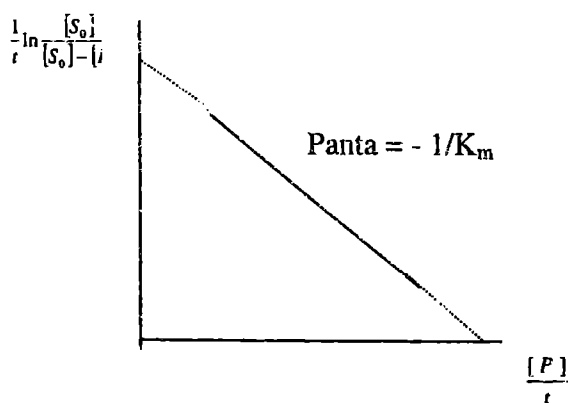


Fig. 2.13 Reprezentarea datelor de cinetică enzimatică în acord cu ecuația (2.41)

Aplicarea acestei metode este simplă în condițiile în care reacția este ireversibilă și atunci când produsul reacției nu este inhibitor.

În toate cazurile este posibil, în principiu, să se determine V_{max} și K_m dintr-o singură determinare (experiență). În acest scop este necesar ca S_0 să fie mult mai mare decât K_m , iar reacția să fie studiată până în situația în care $(S_0 - S)$ este mult mai mare decât K_m . Pentru ca această metodă să fie valabilă nu trebuie să existe o inhibiție prin produși.

Prin studiul vitezei inițiale, inhibiția prin produși poate fi neglijată dacă reacția este urmărită pe o perioadă scurtă de timp (când $P = 0$). Pe de altă parte, dacă reacția este urmărită pe o perioadă mai lungă de timp inhibiția prin produși nu poate fi neglijată. Mai mult, este foarte dificil să distingem în cadrul unei singure experiențe, diferența între scăderea datorată dispariției substratului și cea datorată inhibiției competitive prin produșii acumulați.

2.5. FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ CINETICA REACȚILOR ENZIMATICE

Enzimele sunt proteine sau proteine conjgate conținând în structura lor și grupări neproteice. Activitatea lor catalitică depinde de menținerea structurii lor native, astfel încât orice modificare a condițiilor de mediu poate conduce la modificarea activității lor catalitice.

Principali factori care influențează viteza inițială a unei reacții enzimaticе și deci activitatea enzimelor sunt: pH-ul, temperatura, tăria ionică, concentrația de enzimă, concentrația de substrat, precum și diferiți activatori și inhibitori ai enzimelor. În cele ce urmează ne vom referi numai la influențele primilor trei parametri, restul fiind tratați în capitolul 3.

2.5.1 EFECTUL TEMPERATURII

O reacție enzimatică totală, constă din trei stadii succesive: formarea complexului ES, convesia acestuia în complexul EP și disocierea în produși și enzima liberă. Efectul total al temperaturii asupra reacției va fi dat de suma efectelor separate asupra fiecărei etape.

Temperatura influențează viteza reacției enzimaticе modificând stabilitatea enzimei, afinitatea enzimei pentru substrat, viteza de scindare a complexului ES, afinitatea enzimei pentru diferiți efectori. Enzimele au o temperatură optimă de funcționare de aproximativ 37-38°C. La această temperatură se înregistrează o viteză maximă a reacției enzimaticе. Un număr mic de enzime fac excepție de la această regulă generală. Astfel, peroxidaza, este o enzimă termostabilă, purificată uneori prin denaturarea celorlalte proteine la 80°C. Papaina este, deasemenea, o enzimă stabilă la temperaturi ridicate, dar această proprietate este puternic dependentă de pH. Inactivarea termică a enzimelor este în mod cert datorată denaturării părții proteice a enzimei rezultată prin creșterea temperaturii. (figura 2.14).

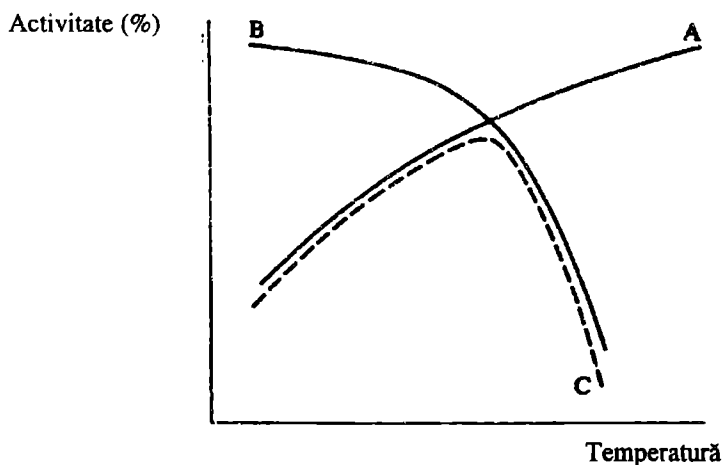


Fig. 2.14 Efectul temperaturii asupra reacțiilor catalizate enzimatic.

Viteza unei reacții chimice crește o dată cu temperatura (A) dar datorită apariției denaturării proteinei apare o scădere a cantității de enzimă activă (B). Cele două procese sunt redade schematic prin curba C reprezentând dependența de temperatură a unei enzime.

Cu toate că în multe lucrări se indică o temperatură optimă de funcționare a enzimelor, trebuie menționat faptul că temperatura optimă pentru o anumită reacție catalizată enzimatic reprezintă un compromis dintre activitatea maximă pe o perioadă scurtă de timp și pierderea activității datorată denaturării enzimei pe perioade mai mari de timp.

Efectul temperaturii asupra reacțiilor enzimatică este dat de coeficientul de temperatură, Q_{10} , care reprezintă factorul cu care viteza de reacție crește odată cu creșterea temperaturii cu 10°C .

$$E = 2,303 RT^2 \log Q_{10}/10 \quad (2.45)$$

Coeficientul de temperatură al reacțiilor enzimatică are valori cuprinse între 1 și 2, iar creșterea temperaturii va determina creșterea vitezei de reacție și descreșterea temperaturii va determina scăderea acesteia. În cele mai multe, cazuri prin creșterea temperaturii cu 10°C viteza de reacție aproximativ se dublează, fiind necesar deci un control riguros al temperaturii în cadrul oricărei determinări enzimatică (cinetice).

Uniunea Internațională de Biochimie a recomandat inițial folosirea unei temperaturi standard de 25°C folosită în determinările enzimatică, dar ulterior au recomandat o temperatură de 30°C datorită dificultăților întâmpinate pentru menținerea unor temperaturi scăzute în regiuni cu un climat termic ridicat. Este posibilă transformarea activității enzimatică determinată la o anumită temperatură în unități echivalente corespunzătoare altor temperaturi folosind o serie de factori de conversie, dar acest lucru introduce o serie de erori. În cadrul determinărilor enzimatică este obligatoriu să se indice temperatura de lucru [4].

2.5.2 EFECTUL pH-ului

Enzimele sunt active numai într-un domeniu limitat de pH, în majoritatea cazurilor efectul catalitic fiind maxim la o anumită valoare de pH, denumit pH optim de acțiune. Există și enzime care posedă o activitate maximă într-un domeniu mai larg de pH (figura 2.15). Astfel, glutaminaza are o activitate optimă la pH cuprins între 7,9 - 8,1. Majoritatea enzimelor au o activitate maximă în vecinătatea valorii fiziologice a pH-ului.

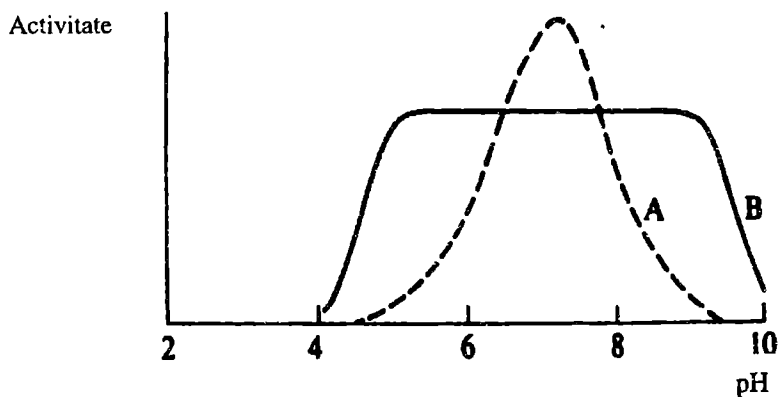


Fig. 2.15. Efectul pH-ului asupra enzimei lactat dehidrogenază. Enzima prezintă un maxim de activitate la $\text{pH}=7.4$ (A). Prin păstrarea enzimei în soluții tampon de diferite pH-uri timp de o oră, se constată o păstrare a activității pe un domeniu de pH cuprins între 5 și 9 și o inactivare permanentă prin menținerea enzimei la valori de pH în afara domeniului menționat (B).

Un număr redus de enzime fac excepție de la această regulă. De exemplu, pepsina prezintă activitate optimă la valori ale pH-ului cuprinse între 1 și 4, prezentând un maxim de activitate la $\text{pH} = 1,8$. Câteva enzime au activitate catalitică maximă în domeniu puternic alcalin (de ex. arginaza în prezență de Mn^{2+} prezintă un pH optim = 10).

pH-ul poate determina modificări ale stabilității enzimei, putând conduce la inactivarea enzimei (pierderea activității catalitice) precum și ale afinității enzimei, care poate să scadă ș.a. Efectele pH-ului sunt datorate modificărilor stării ionice a resturilor de aminoacizi ale enzimei și a moleculelor de substrat, conducând la modificarea eficienței de legare a substratului. Anumite resturile de aminoacizi sunt implicați în cataliză și deci orice modificare a sarcinii lor va afecta viteza de reacție. Concentrația ionilor de hidrogen modifică viteza unei reacții enzimatică prin schimbarea stării de ionizare a tuturor componentelor prezente în mediul de reacție: enzimă, substrat, complexul ES. Pe un anumit domeniu de pH aceste efecte sunt reversibile dar ele devin ireversibile la valori extreme de pH, putând conduce la o denaturare totală a enzimei.

2.5.3 EFECTUL TĂRIEI IONICE

Prezența sărurilor străine poate afecta viteza de reacție, fie prin modificarea echilibrului de formare a complexului activ, fie prin combinare cu reactanții.

Primul efect denumit “efect de salinizare” de ordinu unu poate fi calculat pe baza formulei [8]:

$$\log K = \log K_0 + Z_A Z_B \sqrt{\mu} + (k_A + k_B - k^*) \mu \quad (2.46)$$

unde: K = constanta de viteză a reacției

K_0 = constanta de viteză în absența substanțelor străine

$Z_A Z_B$ = sarcinile reactivilor A și B

μ = tăria ionică

k_A, k_B, k^* = coeficienți empirici pentru reactivii A, B și respectiv complexul activat.

Pentru a se obține rezultate exacte, trebuie eliminați ionii străini care pot influența cinetica reacției și realizat un control adecvat asupra tăriei ionice a mediului.

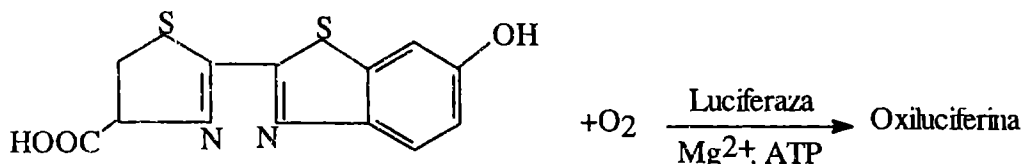
3. ANALIZA ENZIMATICĂ

Enzimele ocupă un loc important în biochimia analitică, studiul; lor presupunând existența unor metode de determinare adecvate. Ele pot fi considerate reactivi analitici care stau la baza unor metode sensibile și specifice de determinare cantitativă a unor compuși chimici de importanță biochimică.

Prin analiză enzimatică se înțelege totalitatea tehnicilor chimice în care enzimele sunt folosite ca reactivi analitici pentru determinarea substratelor, inhibitorilor, activatorilor, coenzimelor, precum și pentru determinarea însăși a enzimelor [8].

Pentru că enzimele acționează în cadrul sistemelor vii, complexe una din proprietățile lor importante este *specificitatea*. O enzimă este specifică atât pentru tipul reacției pe care o catalizează cât și pentru tipul substratului pe care îl accepta. *Specificitatea* este caracteristică cea mai semnificativă a enzimelor și probabil că în viitor enzimele vor fi definite în mod simplu drept "*catalizatori foarte specifici*". O enzimă este deci capabilă să catalizeze o reacție particulară a unui substrat particular, chiar dacă în mediul de reacție sunt prezenți și alți izomeri ai substanței sau substraturi similare. Aceasta rezolvă o problemă importantă din chimia analitică și anume analiza unui compus în prezența altora similari cu care primul poate interfera în cadrul analizei.

Un exemplu al *specificității* enzimelor față de un substrat particular este ilustrat de acțiunea luciferazei, care catalizează oxidarea luciferinei la oxiluciferină:



Studiindu-se diferiți compuși similari ca structura luciferinei, s-a constatat că, oxidarea catalitică, conduce la producerea unei fluorescențe verzi, care are loc numai în prezența luciferinei [8].

Un alt exemplu de *specificitate* absolută îl constituie acțiunea glicerol kinazei asupra glicerolului când se formează L-glicerol-3-fosfat (nu se formează niciodată glicerol -1-fosfat) figura 3.1.

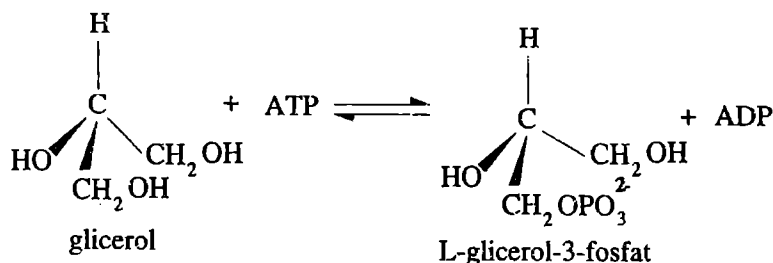


Fig. 3.1 Reacția catalizată de glicerol kinază

Glucoz-oxidaza care catalizează oxidarea glucozei la acid D-gluconic reprezintă un exemplu de enzimă cu specificitate mare față de substrat; studiindu-se un număr de peste 60 de zaharuri oxidabile s-a observat că numai β-D-glucoza, 2-deoxi-D-glucoza

și 6-deoxi-fluoro-D-glucoza sunt oxidate cu o viteză apreciabilă. Anomerul α -D-glucoza este oxidat catalitic cu o viteză foarte mică (0,6% din cea de oxidare a β -D-glucozei).

Activitatea catalitică a enzimelor este proprietatea componentului major al acestora și anume proteina. Relativ la mecanismul lor de acțiune, se poate menționa faptul că reacțiile catalizate de enzime apar prin interacția substratelor cu o mică parte ($\approx 1\%$) din aria suprafeței totale a enzimelor denumită *centru activ*.

Regiunea din macromolecula proteică care conține *centrii de legare și catalitici* se numește *centru activ* al enzimei (figura 3.2).

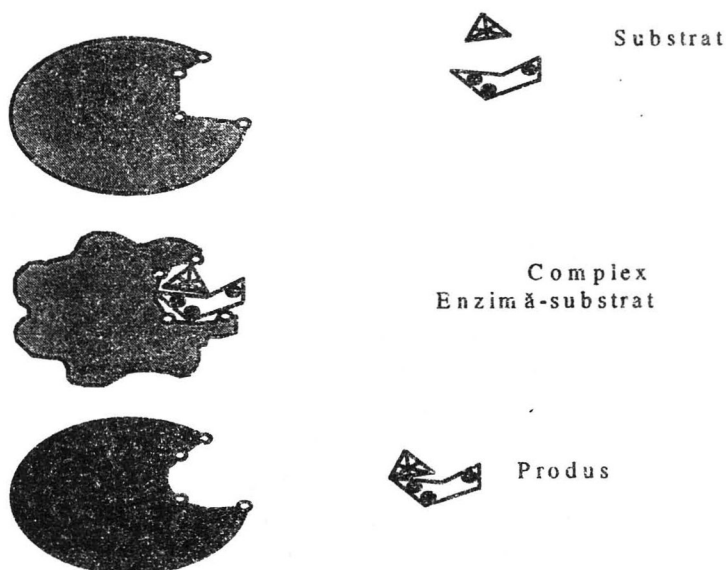


Fig. 3.2 Reprezentarea schematică a interacției dintre o enzimă implicând centrul activ (o) și substratul ei specific.

Centrul de legare (fixare) al substratului include catenele laterale ale aminoacizilor care sunt implicate în legarea substratului la nivelul centrului activ. *Centrul catalitic* al enzimei include catenele laterale ale aminoacizilor implicați în procesul de cataliză enzimatică (figura 3.3).

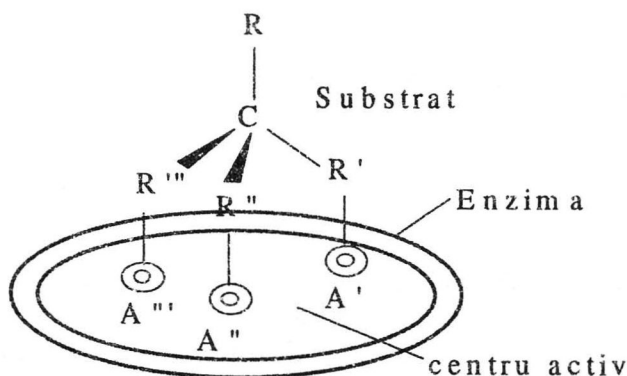


Fig. 3.3 Reprezentarea schematică a centrelor de interacție dintre enzimă și substrat. unde: A', A'' și A''' sunt centrii ai enzimei care interacționează cu grupările R', R'' și R''' ale substratului; A' și A''' sunt centri de legare și A'' este centrul catalitic

Datorită condițiilor blânde folosite în cadrul analizei enzimatic, se pot, deseori identifica și determina substanțe labile, care prin utilizarea altor metode chimice de analiză sunt determinate într-un mod imprecis (se pot determina radicalii liberi care rezultă din reacții și deci se poate studia mecanismul reacției respective).

O altă proprietate importantă a enzimelor o reprezintă *capacitatea catalitică*; prin analiza enzimatică pot fi determinate cantități de substanțe de până la 10^{-10} g.

Specificitatea enzimelor și capacitatea lor de a cataliza reacții ale substratelor la concentrații mici reprezintă un mare avantaj în analiza chimică, ceea ce a făcut ca acestea să fie privite ca reactivi analitici.

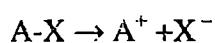
Prin utilizarea enzimelor în cadrul analizei chimice se poate elimina etapa de separare a componentelor unui amestec, ceea ce conduce la scurtarea timpului de efectuare al analizei[8].

3.1. MECANISMUL ENZIMATIC

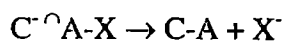
O primă etapă în reacțiile catalizate enzimatic, o reprezintă legarea reactanților la suprafața enzimei, iar una dintre funcțiile enzimei este aceea de a orienta reactanții unul față de celălalt. Această idee a fost sugerată de către Fischer care a introdus ipoteza “lacătului și chieii”, relativă la interacția dintre enzimă și substrat (enzima fiind lacătul și substratul chieia); această teorie era una mecanicistă în care proteina era privită ca având o structură rigidă, teoria explicând parțial specificitatea unei enzime față de un substrat particular. Ipoteza lui Fischer nu explică posibilitatea legării și a altor molecule de substrat cu o structură chimică apropiată de cea a substratului particular și care pot fi catalizate cu viteze de reacție mult mai mici.

Teoria lui Coshland are la bază ipoteza “inducerii prin potrivire”, care presupune că, o dată cu legarea substratului are loc o modificare a conformației enzimei rezultând într-o orientare corectă și adecvată, a grupărilor reactive aparținând atât enzimei cât și substratului. Această ipoteză sugerează idea flexibilității structurii enzimatic [4].

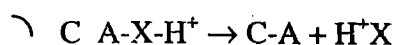
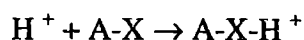
Multe reacții enzimatic decurg ca o consecință a atacului nucleofilic sau electrofilic asupra substratului, primul fiind cel mai des întâlnit în practică. Reactivii nucleofili sunt donori de electroni. Dacă reacția de catalizat este următoarea:



atunci în urma unui atac nucleofil (C^- este catalizatorul), reacția decurge mult mai ușor :



În urma ruperii unei legături este important de a se stabili natura grupării îndepărtate pentru a se determina energia de activare. Bazicitatea unei grupări poate fi corelată cu caracterul ei nucleofil astfel încât dacă, bazicitatea grupării îndepărtate scade, va scădea și tendința de reformare a legăturii rupte:



Exemplul de mai sus corespunde catalizei acide și efectul ei este acela de a îndepărta electronii de la gruparea implicată în reacție. De cele mai multe ori atât cataliza acidă cât și atacul nucleofil sunt implicate în reacțiile catalizate enzimatic redate prin mecanismul “push-pull”.

3.2. ACTIVAREA ȘI INHIBAREA ENZIMELOR

În literatură sunt descrise numeroase exemple de enzime care necesită diferite substanțe pentru a-și manifesta activitatea catalitică. Exemple în acest sens sunt catalaza care conține hemul drept grupare prostetică sau ascorbat oxidaza care conține atomi de cupru. O serie de anioni și cationi conduc la o creștere a activității enzimelor ei fiind denumiți activatori. Activarea anionică este ne-specifică existând multe exemple în acest sens (ex. amilaza este activată de o serie de anioni și în special de ionii de clor). Activarea cationică este mult mai specifică, prezența ionilor de magneziu fiind esențială de exemplu în cadrul reacțiilor în care sunt implicate moleculele de ATP și ADP, fiind foarte probabil ca inițial ionii de magneziu să se lege de substrat și nu de enzimă.

O substanță care conduce la scăderea activității enzimelor poartă denumirea de inhibitor; efectul lor poate fi reversibil sau ireversibil. Inhibarea prin substanțe care reprezintă produși de reacție prezintă importanță în controlul metabolismului celular, în timp ce inhibarea selectivă a anumitor enzime reprezintă baza unor procese farmacologice și chemoterapeutice. Despre aplicațiile reacțiilor enzimatiche inhibitate selectiv în biochimia analitică se va discuta într-un capitol separat.

3.3. ALOSTERIE

Enzimele alosterice prezintă o serie de efecte de activare și inhibiție competitive, care sunt corelate cu modificările conformaționale ale structurii enzimatică. Enzimele alosterice prezintă importanță în cadrul metabolismului, ele exercitând un control asupra reacțiilor care au loc în diferite organisme. Numele de alosterie se referă la faptul că inhibiția enzimei se datorează unor substanțe care prezintă o structură și formă diferită de cea a substratului. Conceptul de bază al enzimelor alosterice a fost inițial propus de Monod și reprezintă o extensie a teoriei “inducerii prin potrivire” dată de Coshland [8]. Pentru a-și manifesta activitatea catalitică o enzimă alosterică trebuie să existe într-o conformație care să permită legarea substratului.

Structura acestora este flexibilă și este stabilizată numai prin legarea altor molecule. Prin urmare, legarea unui activator de centrul său specific, conduce la modificări conformaționale ale enzimei făcând posibilă legarea eficientă a substratului. Spre deosebire de acesta, un inhibitor care se leagă de centrul său specific poate conduce la o modificare atât a structurii de legare a substratului cât și a activatorului (figura 3.4).

6-posfocfructochinaza (E.C.2.7.1.11) o enzimă importantă în metabolismul glicolitic, este inhibată de ATP și citrat, fiind activată de AMP, ADP și substratul ei, 6 –fosfatfructoza. Aceste efecte fac ca activitatea ei să fie redusă atunci când concentrația compușilor cu energie înaltă este mare sau atunci când există o sursă adecvată de energie rezultată din ciclul acidului citric. Enzima este activată de către compuși a căror prezență în concentrații mari sugerează o lipsă a compușilor de energie înaltă în celulă.

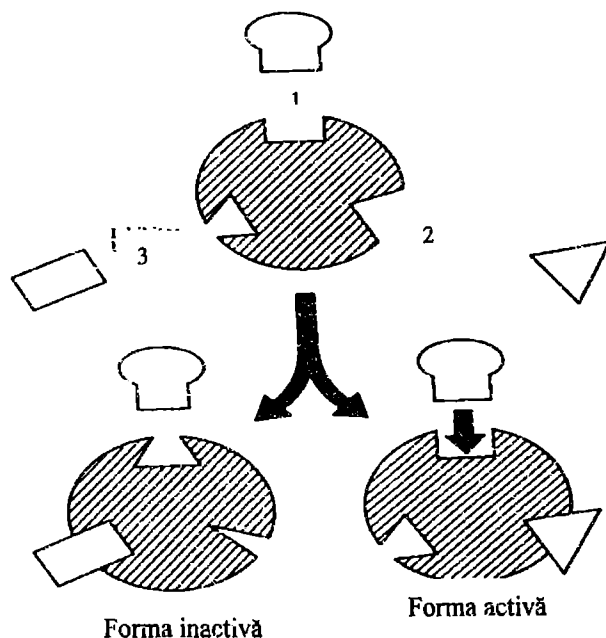


Fig. 3.4 Enzime alosterice. Legarea activatorului stabilizează enzima în forma ei activă, în timp ce legarea inhibitorului modifică conformația centrului activ ducând la pierderea activității. (1) Centrul de legare al substratului, (2) centrul de legare al activatorului și (3) centrul de legare al inhibitorului.

3.4 IZOENZIME

Enzimele care prezintă aceeași funcție catalitică sunt denumite enzime omoloage și sunt împărțite în două clase. Heteroenzimele sunt obținute din diferite surse și cu toate că ele catalizează aceeași reacție ele posedă proprietăți fizico-chimice și cinetice diferite. Enzima hidrolitică α -amilaza se găsește în secreția pancreatică umană ea fiind diferită de enzimele cu același nume rezultate din bacterii sau malț. Iso-enzimele sunt forme moleculare diferite ale aceleiași enzime care se găsesc în același organism sau animal, ele prezentând deseori un anumit profil de distribuție în țesuturi.

Multe dintre izoenzimele existente sunt rezultatul hibridizării dintr-un număr limitat de subunități (cum este cazul lactat dehidrogenazei). Unele enzime prezintă forme multiple datorită creșterii gradului de polimerizare a unei singure subunități; acestea nu trebuie privite ca izoenzime deoarece ele nu au la bază diferențe genetice între diferitele forme. Colinesteraza, de exemplu, prezintă cinci forme, constând dintr-o singură subunitate, și existând sub formă de monomeri, dimeri, trimeri, tetrameri, și pentameri.

Lactat de hidrogenaza (1.1.1.27) reprezintă un exemplu de izoenzimă tipică. În organismul uman aceasta este compusă din două subunități proteice diferite cunoscute sub numele de A și B, structurate sub forma unor tetrameri (figura 3.5), dând naștere la cinci forme hibride diferite rezultate din cele două unități de bază. Subunitățile A și B sunt enzimatic inactive dar toți tetramerii sunt activi; deasemenea datorită compoziției lor diferite pot fi separați unul de altul prin electroforeză sau prin

cromatografie de schimb ionic. Tetramerii prezintă proprietăți catalitice diferite relative la specificitatea de substrat și cinetica de inhibiție.

Izoenzimele sunt distribuite în diferite țesuturi și spre exemplu forma B4 a lactat dehidrogenazei, se găsește în special în mușchiul inimii iar forma A4 numai în mușchiul oaselor. (skeletal), dar în general ele sunt prezente în diferite cantități în toate țesuturile.

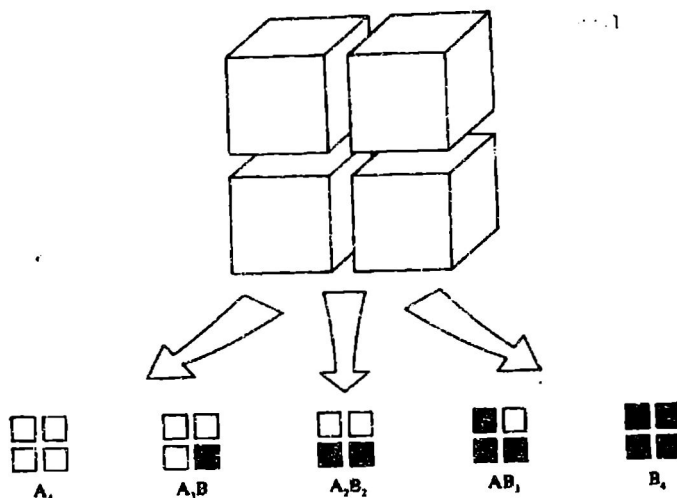


Fig. 3.5 Structura cuaternară a proteinelor. Lactat dehidrogenaza are o greutate moleculară de aproximativ 140.000 D, ea existând sub forma unui tetramer rezultat prin asocierea a două proteine globulare diferite (A și B) ceea ce conduce la existența a 5 forme hibride active diferite ale enzimei. Peptidele A și B sunt inactive enzimatic fiind deseori notate prin M (mușchi) și H (inimă).

Izoenzimele diferă între ele în special prin capacitatea lor catalitică. Ele sunt activate sau inhibitate în mod diferit, permițând unei izoenzime să funcționeze în condiții care reduc activitatea altei izoenzime; prin astfel de efecte se asigură un control asupra unei aceiași reacții care poate avea loc în condiții celulare sau tisulare diferite.

În studiul enzimelor este de dorit să se poată determina nu numai activitatea acestora dar și procentul activității izoenzimelor. Utilizarea inhibitorilor, care au o influență mai mare asupra unei izoenzime comparativ cu alta sau, alterarea specificității reprezintă o soluție în sensul menționat mai sus.

3.5 DETERMINĂRII ENZIMATICE

Determinările enzimatică trebuie efectuate în condiții de pH, temperatură, tărie ionică și de concentrație a reactivilor folosiți optime pentru activitate. De aceea, înainte realizării unui procedeu de determinare a activității enzimelor, este necesară cunoașterea, din datele de literatură a unor parametri cum sunt pH-ul și temperatura optimă, cunoașterea cofactorilor, activatorilor, inhibitorilor și a valorilor de K_m .

3.5.1 DETERMINAREA ENZIMEI

Scopul determinărilor enzimatică este acela de a afla câtă enzimă având caracteristici cunoscute este prezentă într-o probă a unui omogenat tisular sau în lichidele biologice. În cadrul unor astfel de determinări trebuie avut în vedere faptul că menținerea organizării și integrității celulare, reprezintă o caracteristică a vieții și

că distrugerea celulară prin procese naturale (autoliză), însoțită de modificări enzimatică și descompunerea cofactorilor, începe odată cu moartea unui organism sau cu izolarea unui țesut. Autoliza este minimalizată dacă țesutul este păstrat la 4° C, atât înainte cât și după prepararea omogenatelor acestuia. Deasemenea, multe enzime se denaturează la temperaturi înalte sau moderate, acesta fiind un motiv în plus de a păstra probele biologice sau preparatele rezultate din acestea, la temperaturi scăzute înainte de a se efectua determinarea enzimatică.

Determinarea activității unei enzime are un domeniu larg de aplicații. Determinările enzimatică prezintă importanță în domeniul chimiei și biochimiei analitice, al alimentației, agriculturii, chimiei clinice și în special în identificarea diferitelor dereglări metabolice ale organismului. Deasemenea, sunt necesare procedee exacte de determinare a enzimelor pentru a se realiza metode analitice de analiză a diferitelor substanțe (substrate), a unor cofactori precum și a activatorilor și inhibitorilor enzimatici.

Deoarece enzimele sunt caracterizate prin reacțiile pe care ele le catalizează concentrația unei enzime poate fi determinată măsurând viteza cu care aceasta este capabilă să catalizeze reacția ei specifică (metoda cinetică).

3.5.1.1. Determinarea enzimelor prin analiza cinetică a activității catalitice

Metoda cea mai utilizată de estimare a concentrației unei enzime dintr-un preparat biochimic este aceea de a se determina activitatea ei catalitică, cu alte cuvinte să se afle cât substrat este transformat în produs într-o unitate de timp și în condiții specifice.

După cum s-a arătat, viteza inițială a unei reacții catalizate enzimatic este proporțională cu concentrația inițială de enzimă $[E_0]$, așa cum rezultă din ecuația Michalis – Menten:

$$v_0 = \frac{k_{+2}[E_0][S_0]}{K_m + [S_0]}$$

Această dependență este redată în figura 3.6.

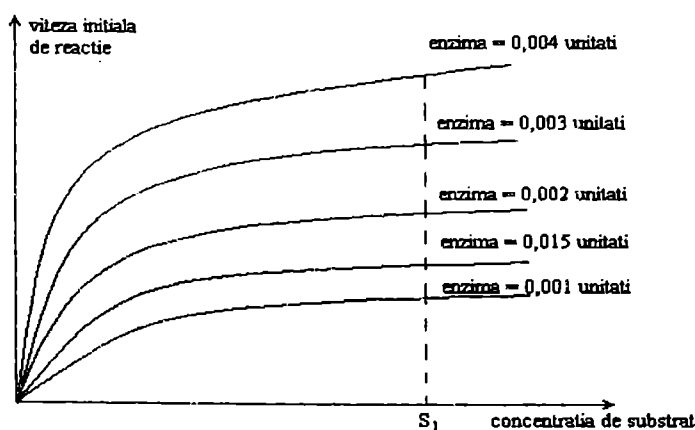


Fig. 3.6. Graficul vitezei inițiale funcție de concentrația de substrat la diferite concentrații de enzimă. S_1 = concentrație de substrat nelimitativă [8].

La o concentrație constantă de substrat S_0 , viteza inițială v_0 este direct proporțională cu concentrația de enzimă $[E_0]$. Cu toate că în teorie pentru o concentrație fixă de substrat această relație este adevărată, în practică este mult mai

utilă situația în care concențrația de substrat este suficient de mare astfel încât enzima să fie saturată cu substrat. Acest lucru se justifică din două motive principale; în primul rând, integrarea ecuației Michaelis-Menten (a se vedea paragraful 2.4.2.), redă faptul că porțiunea lineară a fazei stării staționare a reacției este mult marită pe măsură ce gradul de saturare al enzimei crește (toți ceilalți factori fiind menținuți constanți). Cu alte cuvinte, în termeni simplii, acest lucru se datorează faptului că viteza de transformare a substratului este nesemnificativă relativ la concențrația totală a substratului prezent, în condițiile în care concențrația inițială de substrat crește. Din aceste motive rezultate mult mai precise ale vitezei inițiale se obțin la concențrații inițiale mari de substrat comparativ cu cele obținute la valori mici ale acestuia.

În al doilea rând, așa cum s-a demonstrat, la valori mari de $[S_0]$ din ecuația Michaelis-Menten rezultă că $v_0 = k_{+2} [E_0]$ și deci v_0 nu variază odată cu micile modificări ale $[S_0]$; aceasta înseamnă ca se pot obține rezultate precise fără a menține concențrația substratului la o valoare fixă, presupunând că substratul se găsește într-o concențrație suficientă ca să satureze enzima. În concluzie cu cât este mai mare concențrația de substrat cu atât determinarea este mai precisă.

În acord cu ecuația Michaelis-Menten, o enzimă este saturată de substratul ei numai la concențrații foarte mari de substrat, astfel încât condițiile experimentale realizate practic sunt apropiate valorii saturării complete. Ecuația permite calculul valorii v_0/V_{max} pentru fiecare valoare a concențrației inițiale de substrat, în ipoteza că valoarea constantei K_m este cunoscută (vezi tabelul 2.1, din capitolul 2). Trebuie menționat faptul că valorile rapoartelor v_0/V_{max} și ale saturării parțiale sunt independente de concențrația de $[E_0]$, presupunând că $[S_0] \gg [E_0]$. Cu toate acestea valorile de v_0 și V_{max} variază cu concențrația de $[E_0]$, ceea ce reprezintă cheia problemei în cadrul determinării enzimelor prin metodă cinetică.

Din cele expuse mai sus, ar rezulta faptul că un procedeu utilizat pentru determinarea enzimei poate fi îmbunătățit prin creșterea concențrației de substrat, fără limită, dar în mod cert și alți factori trebuie luați în considerare incluzând: solubilitatea substratului, prețul de cost al acestuia și posibila inhibiție prin substrat (vezi capitolul 4). Deci alegerea concențrației de substrat reprezintă în final un compromis.

Prin folosirea unei concențrații de substrat în exces, reacția prezintă o viteză maximă care este proporțională cu cantitatea de enzimă prezentă. În acest scop, este suficient să se utilizeze o concențrație de substrat care este de cel puțin 10 ori mai mare decât valoarea constantei K_m a enzimei. Cu toate că viteza maximă poate fi numai teoretic atinsă la o concențrație infinită de substrat prin folosirea ecuației Michaelis-Menten, este posibilă calcularea procentului vitezei maxime pentru o anumită concențrație de substrat. Cu toate că în determinările enzimatice este de dorit să se folosească concențrații mari de substrat, unele enzime prezintă o inhibiție datorată acestuia, care are caracteristicile prezentate în figura 3.7. În astfel de cazuri trebuie aleasă concențrația de substrat pentru care se obține maximum de viteză. Este important ca în cadrul determinărilor enzimatice să se raporteze procentul de viteză maximă, obținut în cadrul metodei.

Dacă reacția implică mai multe substrate, atunci trebuiesc stabilite concențrațiile fiecăruia, preferabil la valori apropiate de cele de saturare.

Viteza reacțiilor catalizate enzimatic, depinde și de concențrația cofactorilor. La fel ca și în cazul substratelor fiecare cofactor trebuie să existe la o concențrație fixă, de preferat în exces, în scopul obținerii unei metode precise și reproductibile de determinare a enzimelor.

De asemenea se impune necesitatea existenței unei metode adecvate de studiere a reacției enzimaticе, ceea ce presupune ca în cadrul sistemului de analizat, pe măsura transformării substratului în produs, să existe o modificare a unui parametru fizico-chimic (optic, electric, etc.); dacă nu apar astfel de modificări reacția poate fi urmărită în mod indirect prin cuplarea ei cu o a doua reacție catalizată enzimatic (reacție indicatoare), în care pot apărea astfel de variații.

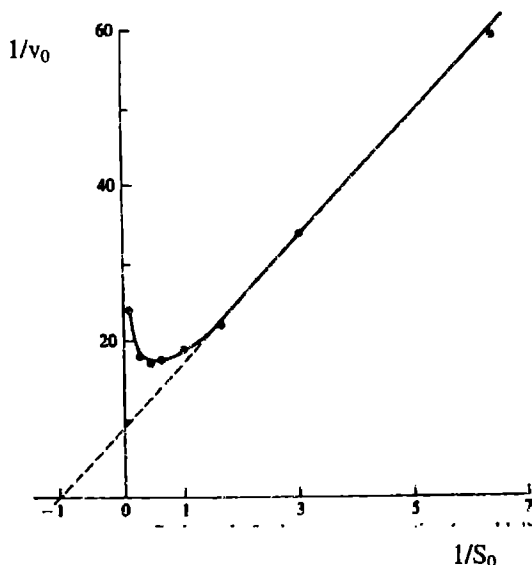


Fig. 3.7 Inhibiția prin substrat. L aminoacid oxidaza este inhibată de substrat la concentrații de L-leucină mai mari decât 3 mM. Graficul Lineweaver-Burk redă devierea de la linearitate a curbei obținute în această situație.

Viteza este măsurată fie prin urmărirea vitezei de dispariție a unui substrat, fie (de preferat) prin viteza de formare a unui produs (în practică este mult mai precis să se determine o creștere a unei cantități mici în mediul de reacție, decât să se măsoare o scădere mică a unei cantități mari). În urma realizării unor astfel de măsurători se obține graficul concentrației de produs format în funcție de timp numit și curbă progresivă de reacție (figura 3.8).

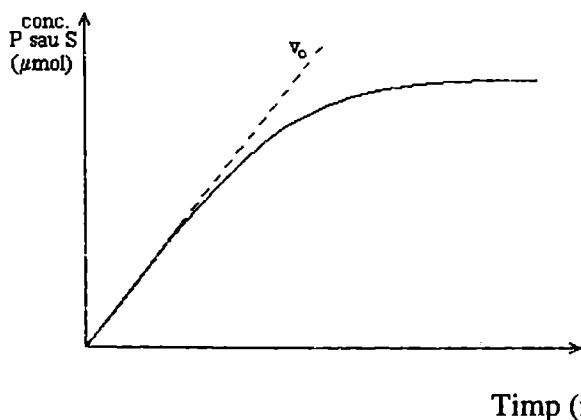


Fig. 3.8 Curba viteză-timp sau curba progresivă pentru o reacție enzimatică. Viteza inițială v_0 este determinată din panta tangentei trasată din originea curbei.

Atribuirea unei reacții enzimaticice a unui ordin clasic pentru reacții necatalizate (ordinul 1 sau 2) este de obicei imposibilă. De aceea prin viteza unei reacții enzimaticice se înțelege întotdeauna viteza inițială v_0 . Viteza inițială, așa cum este ea indicată prin tehnicile obișnuite de măsurare, se obține numai atunci când complexul enzimă-substrat este format și concentrația lui este staționară. Numai atunci când a fost atinsă concentrația optimă a complexului enzimă-substrat (ES) viteza etapei descompunerii complexului ES în enzimă și produși este maximă. Etapa formării complexului ES poate fi măsurată numai în cazul reacțiilor foarte lente și cu instrumente foarte sensibile.

Pentru ca determinările enzimaticice să fie valabile ele trebuie în condițiile vitezei inițiale, înțelegând prin aceasta că viteza trebuie măsurată pe domeniul de liniaritate al curbei progresive, curba concentrațiilor de substrat transformat sau produs format în timp, deoarece după echilibru curba se aplatizează (figura 3.8).

Măsurând viteza inițială, v_0 , reacția se studiază în condițiile în care se aproximează ireversibilitatea, se elimină erorile introduse de reacția inversă, cele introduse prin denaturarea enzimei, inhibiția prin produsul de reacție și erorile introduse prin scăderea concentrației de substrat sub nivelul necesar pentru a menține enzima în forma complexului enzimă-substrat de-a lungul stării staționare.

Vitezele inițiale v_0 sunt măsurate ca tangente la originea curbelor progresive la $t = 0$ (figura 3.8) ele fiind exprimate în unități de μmol produs format / minut.

După cum s-a menționat, în cadrul unei determinări enzimaticice trebuie demonstrat că viteza inițială este proporțională cu cantitatea de enzimă adăugată (lucru valabil cel puțin în primele momente ale reacției). Teoretic, trebuie observată o creștere a vitezei pentru fiecare creștere în concentrația de enzimă până la infinit. Deviațiile de la linearitate cu concentrația de enzimă pot fi datorate limitărilor din condițiile experimentale sau prezenței inhibitorilor (figura 3.9). Uneori, se observă o deviere de la linearitate la concentrații mari de enzimă. Aceasta nu indică o scădere reală a activității enzimei, ci reprezintă o limitare în tehnica de măsurare. Inhibitorii pot fi îndepărtați prin purificarea enzimei. Limitările datorate condițiilor de determinare (figura 3.9, curba B) sunt eliminate prin creșterea concentrației substratului limitativ astfel încât v_0 să devină din nou direct proporțională cu $[E_0]$.

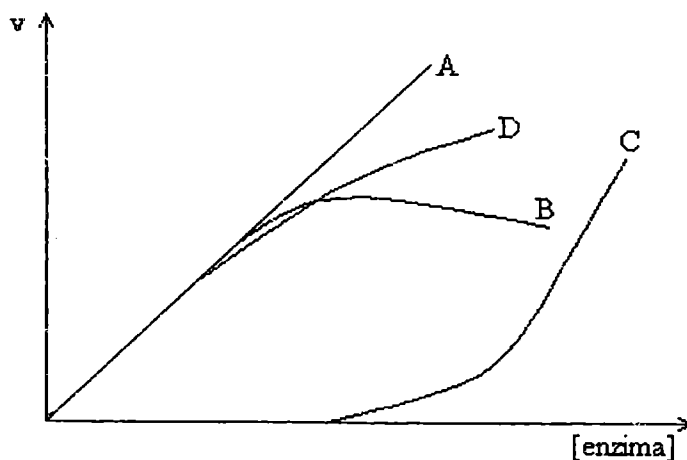


Fig. 3.9 Efectul concentrației de enzimă asupra vitezei inițiale. Curba A redă o reacție care se comportă normal: curba B este aceea a unei reacții care are insuficient substrat pentru a satura enzima la concentrații mari ale acesteia E; curba C redă tipul de curbă obținută dacă în soluția substratului există un inhibitor pentru care enzima prezintă o afinitate mare; curba D redă tipul de curbă obținută dacă în soluția enzimatică există o substanță inhibitoare [4].

Deci, dintr-o măsurătoare a vitezei inițiale și un grafic de calibrare a vitezei în funcție de concentrația de enzimă se poate calcula ușor concentrația catalizatorului biochimic (a enzimei). Această proporționalitate formează baza metodelor folosite în determinarea concentrației de enzimă în proba necunoscută. Pentru majoritatea reacțiilor enzimatiche, cel puțin în primele etape ale acesteia viteza de reacție este proporțională cu concentrația de enzimă (figura 3.10).

Acid eliberat, μ mol/min.

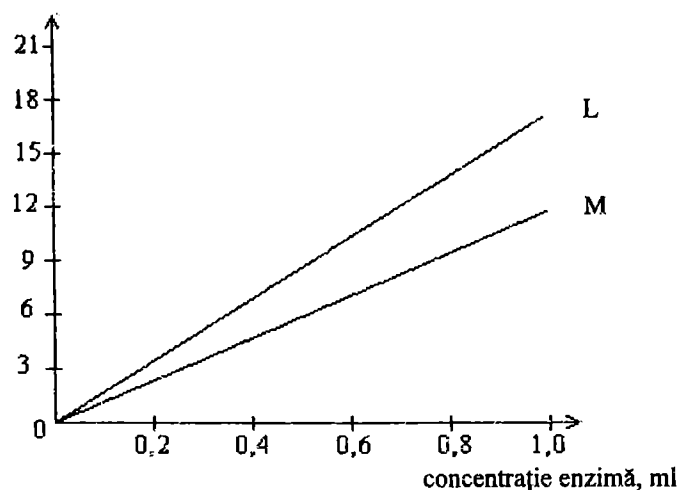


Fig. 3.10 Hidroliza laptelui gras (L) și a uleiului de măsline (M) funcție de concentrația de enzimă (lipază purificată din lapte).

Dacă reacția enzimatică este lăsată să decurgă în timp, viteza ei scade. Acest lucru este prezentat în curba din figura 3.11, care redă grafic transformarea enzimatică progresivă a substratului în timp. În general, curbele progresive sunt liniare dacă în timpul reacției enzimatiche nu a fost transformat mai mult de 10 – 20 % din substrat. Scăderea ulterioară a vitezei reacției enzimatiche se datorează mai multor cauze.

hidroliza (%)

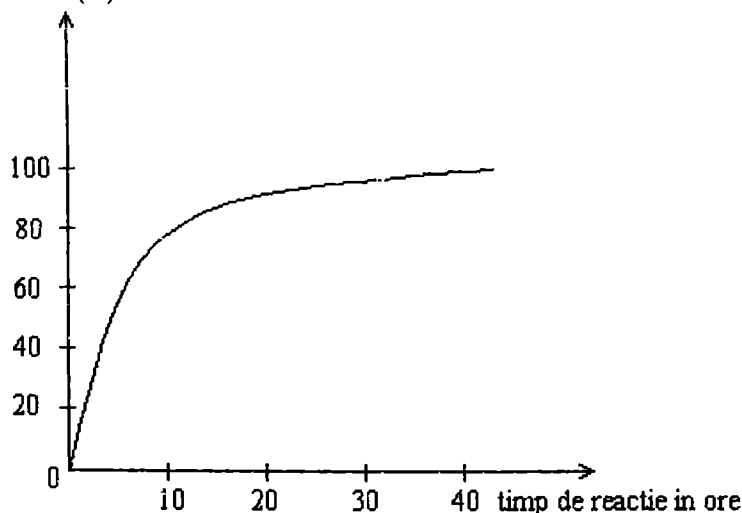


Fig. 3.11 Hidroliza progresivă uleiului de măsline cu lipaza fungică funcție de timp.

S-a observat că, în cazul unor enzime se obțin curbe neliniare ale vitezei funcție de concentrația acesteia, de obicei prezentând o aplatizare spre axa orizontală. Un exemplu în acest sens îl reprezintă proteazele care acționează asupra proteinelor conform ecuației lui Schultz, $v_0 = k [E]^{1/2}$. Un număr de preparate proteazice care

acționează asupra hemoglobinei, urmează ecuația: $v_0 = k [E]^{2/3}$, care a fost utilizată în determinările activității proteolitice. Roy a demonstrat faptul că viteza reacției catalizate de arilsulfataza A, urmează o ecuație de forma: $v_0 = k [E]^{3/2}$, argumentând aceasta din punct de vedere teoretic ca un rezultat al dimerizării enzimei [8].

În toate aceste cazuri, deviația de la linearitate este dată, probabil, de prezența activatorilor sau inhibitorilor din preparatul enzimatic.

În cazul curbelor progresive de reacție neliniare intervalele la care se efectuează măsurătorile trebuie să fie mici (măsurători efectuate imediat după începerea reacției și apoi extrapolate la $t = 0$), deoarece în aceste cazuri se obțin valori aproximative ale vitezelor inițiale, dar utile în cadrul determinărilor de rutină.

Gradul de avansare al unei reacții enzimatice poate fi urmărit prin metode chimice și instrumentale (fizico-chimice), studiindu-se modificarea în timp fie a concentrației substratului (a reactantului), fie a unuia dintre produșii de reacție.

Procedeele analitice folosite în obținerea rezultatelor cinetice sunt fie continue, fie discontinue.

Procedeele discontinue presupun luarea de probe din amestecul de reacție la timpi diferiți și analizarea acestora. În scopul analizării produsului sau a reactantului, reacția din proba de analizat trebuie stopată, în special dacă reacția decurge cu o viteză apreciabilă. În cazul determinărilor de acest tip, reacția trebuie stopată prin inactivarea enzimei lucru care se realizează în diferite moduri și anume: prin adăugarea unei substanțe care reacționează cu unul din reactanți fie inhibă reacția, prin scăderea temperaturii sub 4°C sau, dacă reacția este dependentă de pH, prin adăugarea rapidă a unui acid sau a unei baze care modifică pH-ul. În cazul determinărilor discontinue pot fi utilizate puncte experimentale individuale dacă probele au fost luate din porțiunea liniară a curbei progresive. Această porțiune nu depășește de obicei 5-10% din reacție.

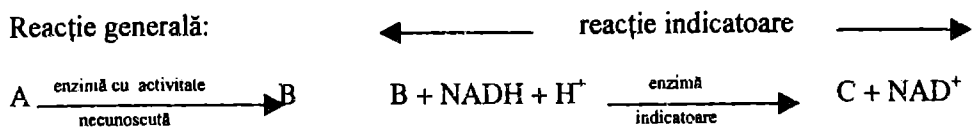
Urmărirea continuă a reacției poate fi realizată prin intermediul metodelor instrumentale de analiză. Prin intermediul acestora reacția poate fi studiată urmărindu-se transformarea substratului sau formarea produșilor de reacție, prin monitorizarea directă a modificării unor parametri fizico-chimici ai acestora sau, folosind o secvență de reacție cuplată. În general este de dorit ca reacția enzimatică fie urmărită într-un mod continuu, fără a lua probe din amestecul de reacție la diferiți timpi, care urmează a fi analizate, dar unele reacții nu au proprietăți care să permită o urmărire continuă a lor.

Spre deosebire de determinările de substrat, determinarea activității enzimatice se efectuează la o concentrație optimă de substrat și dacă este necesar soluția enzimatică se diluează. Reacția enzimatică trebuie să decurgă lent (cu câteva excepții) astfel încât la sfârșitul măsurătorii numai o mică parte din substrat să fie transformată.

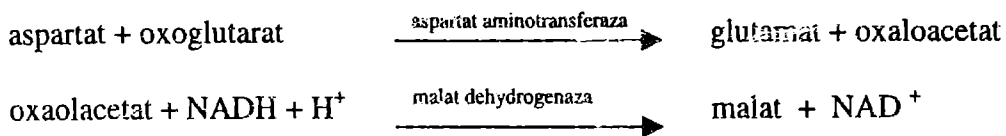
3.5.1.2 Reacții enzimatice cuplate (Determinări cinetice cuplate)

Uneori, este necesară folosirea procedeelelor de determinare cuplate, în care produsul primei reacții (reacția de studiat) devine substrat pentru o doua reacție enzimatică (denumită reacție indicator) care este analizată mult mai ușor. Acest tip de reacții sunt utilizate și în situațiile în care echilibrul reacției de studiat (determinat) este nefavorabil. Rolul reacției indicatoare în determinarea activității enzimatice este acela de a indica cantitatea de produs de reacție (în exemplul de mai jos malatul) format în timp. Acest lucru este posibil numai dacă oxaloacetatul este redus extrem de

rapid de către NADH. Viteza reacției catalizate enzimatic poate fi urmărită prin intermediul scăderii absorbanței la 340 nm datorată oxidării NADH-ului.



Exemplu: enzima aspartat aminotransferaza (EC 2.6.1.1) conduce la formarea oxaloacetatului care poate fi transformat în acid malic prin intermediul enzimei malat dehidrogenază (EC 1.1.1.37) simultan cu transformarea NADH-ului în NAD^+ reacție care poate fi studiată spectrometric la 340 nm.

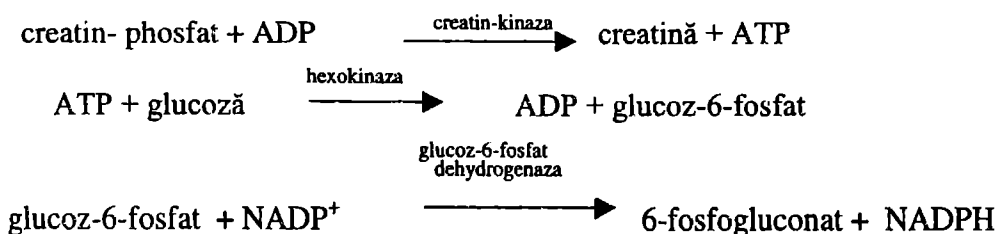


În acest exemplu malat dehidrogenaza este enzima indicatoare. Amestecul de reacție în condițiile determinărilor cuplate include substratele primei reacții enzimatică (reacție de testat) enzimele adiționale precum și reactivii necesari transformării produsului primei reacții într-un produs final detectabil.

Condițiile necesare realizării unor determinări enzimatică având la bază reacții cuplate presupun ca prima reacție enzimatică să fie de ordinul zero în raport cu substratul și ireversibilă, în timp ce reacția indicatoare trebuie să fie de ordinul 1 în raport cu produsul primei reacții și ireversibilă.

În astfel de determinări este necesar ca enzima indicatoare să fie adăugată în exces ceea ce de altfel reprezintă și un inconvenient al metodei (conduce la un consum mare de enzimă și implicit la un preț de cost ridicat/determinare). Viteza maximă pentru cea de a doua reacție trebuie să fie de cel puțin zece ori mai mare ca cea a primei reacții. În condițiile determinărilor cuplate este necesar ca ambele enzime să funcționeze aproape de optimul lor sau ca determinarea să fie realizată în două etape.

Multe determinări au la bază reacții multi-enzimatică cum este și cazul determinării creatin-kinazei (EC 2.7.3.2), care implică hexokinaza (EC 2.7.1.1) ca enzimă auxiliară și glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (EC 1.1.1.49) drept enzimă indicatoare:



Curba tipică de reacție obținută în cazul determinărilor directe prezentând o viteză maximă, se modifică de obicei în cazul determinărilor cuplate în care poate apărea o perioadă inițială de "lag", perioadă în care concentrația produsilor de legătură tinde spre o stare staționară, viteza maximă fiind determinată în acest caz din curba având panta cea mai mare (figura 3.12). În cadrul unor astfel de determinări este dificil de determinat pH-ul optim al reacției enzimatică cuplate datorită prezenței mai

multor enzime. De obicei se determină în mod separat pH-ul optim precum și efectul diferitelor tamponare, a activatorilor și inhibitorilor asupra enzimei test și indicatoare, informația obținută fiind utilizată în cadrul protocolului general de determinare a activității enzimei test. Selectarea pH-ului optim al protocolului nu este ușor de realizat datorită diferențelor în pH-ul optim de acțiune al fiecărei enzime implicate în proces. În general, pentru obținerea unei sensibilități maxime, se recomandă utilizarea pH-ului optim al enzimei test, scăderea proporțional a activității celorlalte enzime putând fi determinată din curbele pH-activitate corespunzătoare și compensată printr-un adaos suplimentar de enzimă în amestecul de reacție.

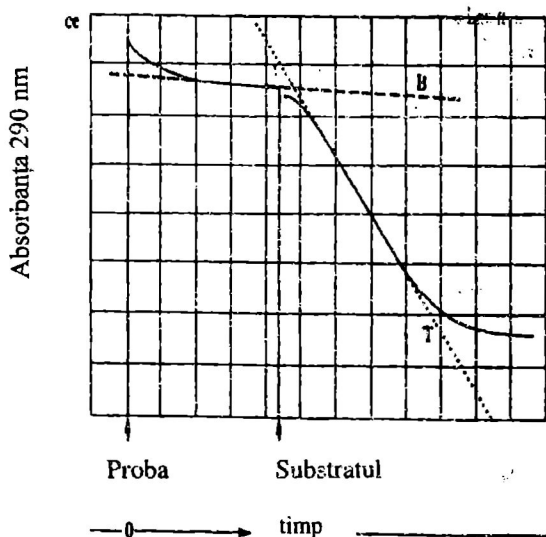


Fig. 3.12 Curba tipică de reacție pentru determinările enzimice cuplate.

În cadrul unor astfel de determinări reacția indicatoare va prezenta de cele mai multe ori modificări vizibile în urma adăugării probei dar și înaintea adăugării substratului specific pentru reacția test. Această reacție blank se poate datora prezenței în probă a substratelor endogene și viteza ei (B) trebuie măsurată pentru a se putea calcula activitatea enzimei de testat (T-B) din viteza de reacție totală (T) care rezultă în urma adăugării substratului.

Deoarece viteza inițială este dependentă de temperatură, determinarea trebuie efectuată în condiții controlate de temperatură. Acizii slabi sau bazele slabe folosite ca tamponare într-o determinare enzimatică trebuie testate pentru a fi siguri că ele nu inhibă enzima. În cadrul determinărilor enzimice cuplate prezența inhibitorilor reprezintă o problemă, deoarece se poate întâmpla ca activatorul unei enzime să fie totodată inhibitorul alteia.

Factorul limitativ de viteză în cadrul unor astfel de determinări trebuie să fie concentrația produsului primei reacții și a produșilor reacțiilor ulterioare, toți ceilalți reactivi fiind în exces. În condiții optime, viteza reacției indicatoare trebuie să fie egală cu viteza formării produsului inițial al primei reacții enzimice (reacție test). Viteza reacției indicatoare este definită prin ecuația Michaelis-Menten:

$$\text{Viteza reacției test} = \text{viteza reacției indicator} = \frac{V_{\max} \times [P]}{K_m + [P]}$$

unde [P] reprezintă concentrația produsului reacției test.

În condiții normale concentrația produsului este foarte mică și aproximativ constantă datorită stabilirii unei stări staționare între formarea și consumarea acestuia în reacția indicatoare. Deci:

$$\text{viteza} = \frac{V_{\max} [P]}{K_m}$$

Pentru ca reacția indicatoare să decurgă în mod paralel (simultan) cu reacția test, raportul V_{\max}/K_m pentru enzima indicatoare trebuie să fie mult mai mare decât raportul similar pentru enzima test. Valoarea vitezei maxime (V_{\max}) este singura variabilă din ecuație și este determinată de cantitatea de enzimă prezentă, exprimată de obicei în unități/volumul amestecului de reacție.

După ce au fost stabilite condițiile optime de determinare se poate scrie un protocol al modului de desfășurare al reacțiilor implicate; acest protocol conține concentrațiile și volumele tuturor reactivilor folosiți precum și ordinea în care aceștia sunt adăugați. În general, reacțiile încep prin adăugarea fie a enzimei, fie a substratului la amestecurile de determinat care au atins temperatura optimă de reacție. Este preferabilă prepararea așa numitor "amestecuri cocktail" pentru determinarea enzimei. Aceste amestecuri conțin toți reactivii stabili, care pot fi amestecați și păstrați împreună. Aceste amestecuri fac ca în toate determinările să se utilizeze exact aceeași concentrație, eliminându-se astfel o serie de erori (cum sunt cele de pipetare). Trebuie ca, prin procedeul și tehnicile utilizate în cadrul unei determinări enzimatică să se elimine posibilitatea denaturării enzimei.

3.5.1.3 Unități enzimatică

Analiza activității unei enzime se numește *determinare*. Rezultatele obținute prin determinări enzimatică nu sunt în termeni de greutate ale enzimei, ci în unități ale activității catalitice.

Spre deosebire de reactivii analitici organici și anorganici care au o puritate cuprinsă între 90-100%, puritatea majorității enzimelor variază, ele neputând să fie obținute într-o stare de puritate analitică. De aceea, în cazul enzimelor este esențială definirea unei unități arbitrare prin care să se poată exprima cantitativ activitatea și puritatea acesteia. Pentru descrierea experiențelor de cinetică enzimatică și a activității enzimelor sunt utilizate definiții și unități standard.

Enzima trebuie determinată calitativ prin reacția pe care o catalizează și cantitativ prin viteza reacției respective.

Unități arbitrare

Concentrația enzimei este de obicei exprimată prin unități enzimatică. Unitatea enzimatică este legată într-un mod arbitrar de viteza reacției catalizate de enzimă. De exemplu, unitatea pentru lipaza fungică poate fi definită ca fiind "cantitatea de enzimă care va produce acizi grași echivalentă cu 1 ml soluție de KOH 0,05 n, în condiții experimentale date" (substratul este uleiul de măsline 15%, timp de reacție 150 min., pH=5,6, temperatura 30° C). Definiția este arbitrară deoarece condițiile de lucru pot varia sau diferi (normalități, timpi de reacție, temperatură). În majoritatea cazurilor un autor alege o definiție pe care a găsit-o adecvată studiului său particular și care poate varia mult față de cea a altor autori.

La ora actuală, există o varietate de definiții ale unitatilor enzimatică deoarece există o multitudine de metode pentru determinarea enzimelor individuale. Acest fapt

este generat de necesitatea ca definiția unităților enzimatică să fie bazată pe condițiile experimentale care să reflecte folosirea practică a enzimei. De exemplu unitățile unei amilaze pot fi definite în funcție procesul în care aceasta este folosită; acestea se vor defini în termenii zaharurilor reducătoare formate sau al vâscozității pastelor de amidon atunci când enzima este folosită în producerea siropului de fructe, sau respectiv la solubilizarea amidonului.

Unități oficiale

Din nefericire au fost propuse multe unități diferite pentru aceeași enzimă determinată prin metode diferite. Pentru a înlătura confuziile care pot apărea, au fost făcute diferite încercări pentru standardizarea unităților enzimatică.

În vara anului 1959, Comisia de Enzime a Uniunii de Biochimie și a Comisiei de Chimie Clinică, a Uniunii Internaționale de Chimie Pură și Aplicată a acceptat adoptarea unei unități internaționale [9]. Această unitate este definită ca reprezentând acea cantitate de enzimă care duce la transformarea 1 μmol de substrat /min /25°C sau 30°C la concentrație de substrat, tărie ionică a tamponului și pH optime. Includerea concentrației de substrat în definiție este esențială pentru cazul enzimelor care experimental nu pot fi saturate cu substrat (ex. catalaza).

La propunerea Comisiei de Enzime a Uniunii Internaționale de Biochimie în anul 1961 – o unitate a activității enzimatică a fost definită ca fiind cantitatea de enzimă care catalizează transformarea 1 μmol de substrat /min în condiții definite.

Dacă substratul este un polimer, ca de exemplu o proteină sau pectină, atunci în locul “1 μmol de substrat “ trebuie utilizat “1 μ echivalent al grupei implicate”. Aceasta înseamnă că, în cazul proteinelor unitatea enzimatică a proteazelor se va baza pe echivalenți de grupări carboxil libere (sau amino libere) formate per minut.

Trebuie realizat faptul că unitatea enzimatică, nu poate fi definită astfel atunci când determinarea enzimei este bazată pe un test fizic, cum ar fi vâscozitatea unei paste de amidon sau pe determinarea proteinei reziduale care poate fi precipitată cu acid. În astfel de cazuri numărul de legături hidrolizate în reacție rămân necunoscute.

Comisia de Nomenclatură Biochimică a recomandat ca activitatea enzimatică (A.E.) să fie raportată în Katali; 1 katal reprezintă cantitatea de enzimă care transformă 1 mol de substrat/sec (= $6 \times 10^7 \mu\text{mol}/\text{min}$). Katalul, nu a fost încă adoptat de enzimologi. În locul Katalului se mai folosește μkatal . Deci, toate valorile vitezei de reacție (v_0) trebuie exprimate în μmol de produs format (sau substrat transformat) / min.

Prin intermediul Unităților Internaționale preparatele enzimatică obținute din surse diferite pot fi comparate din punctul de vedere al activității enzimatică.

Activitatea specifică a unui preparat enzimatic exprimată ca numărul de unități enzimatică/mg proteină (enzimă) și permite calcularea purității acestuia dacă se cunoaște activitatea specifică a enzimei pure sau a unui preparat pur. De exemplu activitatea specifică a unui preparat fungic de α -amilază pură este de circa 5.000 unități enzimatică/mg. Un preparat fungic de α -amilază comercială are aproximativ 5 unități α -amilaze/mg, deci puritatea preparatului comercial va fi de 0,1 %.

Gradul purificării unei enzime este dat de raportul dintre activitatea specifică a enzimei purificate și cea a preparatului enzimatic neprelucrat (brut).

Dacă se cunoaște greutatea molară a unei enzime, activitatea ei poate fi exprimată ca activitate moleculară. Aceasta este definită ca număr de unități/ μmol de enzimă, la o concentrație optimă de substrat, ceea ce reprezintă numărul de molecule

de substrat transformate/minut/moleculă de enzimă sau μmoli de substrat transformat în produs/ μmol enzimă/minut. Activitatea molară (sau moleculară) mai poate fi definită ca număr de katali/mol de enzimă. Aceasta expresie particulară a activității enzimatice a fost denumită deseori număr de turnover. În prezent se preferă termenul de activitate moleculară, deoarece numărul de turnover a fost folosit în sensuri diferite. Activitatea moleculară este o caracteristică a enzimelor individuale și nu reflectă puritatea preparatului enzimatic.

Activitatea catalitică a unei enzime pure este exprimată deseori și ca numărul ei de turnover sau constanta catalitică. Această valoare cu dimensiunea min^{-1} reprezintă numărul evenimentelor catalitice care apar/min., adică numărul μmoli de substrat transformat în produs/min./ μmol de enzimă.

Activitatea centrului catalitic (care este tot o măsură a activității enzimatice) se definește ca fiind numărul de molecule de substrat transformate în produși/min./centru catalitic al enzimei.

Determinarea activității enzimelor prezintă importanță în controlul proceselor de biosinteză a enzimelor, în procesele de izolare și purificare a acestora, și în construcția biosensibilizatorilor precum și în determinarea cantității corecte de enzimă care trebuie adăugată într-un produs comercial.

3.6. DETERMINAREA SUBSTRATELOR

Enzimele, datorită specificității lor prezintă importanță în determinările analitice ale unor compuși chimici de importanță chimică, biochimică, clinică, medicală, alimentară și al unor poluanți. În prezent există un număr mare de enzime comerciale, de diferite grade de puritate la un cost de preț rezonabil (ținând cont și de faptul că în determinările enzimatice se folosesc cantități mici de enzimă).

Concentrația unui reactant care participă într-o reacție enzimatică poate fi calculată în două moduri:

- ◆ prin măsurarea modificării totale care rezultă, care se poate realiza printr-o analiză chimică, fizică sau enzimatică a produsului sau a reactantului nereacționat, sau
- ◆ din viteza reacției enzimatice care depinde de concentrația substratului coenzimei, activatorului sau inhibitorului.

La o concentrație fixă de enzimă, viteza inițială a unei reacții enzimatice crește odată cu creșterea concentrației de substrat până când se atinge un exces care nu limitează viteza, dar după care, la adăugarea în continuare de substrat nu mai conduce la creșterea vizibilă a vitezei. Regiunea în care se obține linearitatea dintre viteza de reacție și concentrația de substrat și în care o determinare analitică a concentrației de substrat bazată pe viteza de reacție poate fi efectuată, se află la valori mai mici decât $0,2 K_m$.

3.6.1. METODA MODIFICĂRII TOTALE SAU A ECHILIBRULUI.

În cadrul acestei metode se folosesc cantități mari de enzimă și cantități mici de substrat pentru a asigura o reacție relativ rapidă. Reacția este lăsată să decurgă total și cantitatea de substrat din probă poate fi calculată din cantitatea de produs formată. Spre sfârșitul reacției concentrația de substrat va fi foarte mică și timpul necesar atingerii echilibrului va fi relativ mare. Raportul V_{max}/K_m este util în determinarea concentrației de enzimă necesară, în acest sens fiind recomandate valori ale raportului

egale cu 1; în aceste condiții timpul de reacție este puțin mai mare decât 3 minute presupunând concentrația de substrat utilizată ca fiind mai mică decât valoarea K_m , timp în care se obține o transformare de aproximativ 99% a substratului. Produsul de reacție trebuie să fie într-un mod oarecare chimic sau fizic diferit de substratul de determinat; de exemplu etanolul poate fi determinat printr-o reacție enzimatică catalizată de alcool-dehidrogenază:

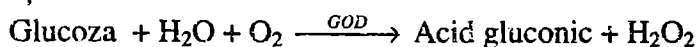


Reacția poate fi urmărită spectrometric prin măsurarea creșterii concentrației formei reduse a NAD-ului și anume NADH, care prezintă o absorbție puternică la 340 nm, domeniu în care NAD^+ nu absoarbe. Cantitatea totală de NADH rezultată reprezintă deci o măsură a cantității inițiale de etanol prezentă în probă.

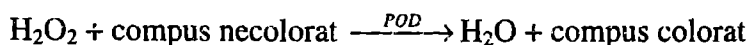
Există puține reacții care decurg spre echilibru iar relativ la cantitatea de enzimă folosită aceasta nu influențează poziția acestuia. În cadrul determinărilor cantitative directe este important ca reacția să decurgă aproape total lucru care se poate realiza pe diverse căi. Poziția de echilibru poate fi modificată prin modificarea pH-ului la o valoare cât mai depărtată de valoarea pH-ului optim al enzimei. De exemplu, poziția echilibrului pentru reacția catalizată de lactat dehidrogenază în care are loc transformarea piruvatului în lactat este mult deplasată spre formarea piruvatului la $\text{pH} = 7,6$ și spre lactat la $\text{pH} = 9,0$.

Deasemenea, poate fi folosită și o reacție cuplată care să indice cantitatea de substrat transformată în produs. Un exemplu în acest sens îl constituie determinarea glucozei, prin utilizarea glucoz-oxidazei, din reacție rezultând H_2O_2 . Gradul de avansare al reacției poate fi determinat urmărindu-se scăderea concentrației de oxigen din mediu folosind un sensor pentru oxigen sau, mult mai ușor cu ajutorul unei reacții cuplate cu prima (reacție indicatoare) care conduce la formarea unui produs de reacție colorat dintr-un compus necolorat (ex. o-dianisidina).

Reacție enzimatică:



Reacție indicatoare



Intensitatea totală a culorii compusului rezultat este o măsură a concentrației de glucoză prezentă.

În cadrul reacțiilor implicând două sau trei substraturi folosirea unor concentrații mari pentru cel de al doilea sau al treilea substrat deplasează echilibrul reacției de testat spre formarea produsului iar utilizarea unei a doua reacții care conduce la regenerarea unuia dintre substraturile inițiale din producția rezultată conduce deasemenea la transformarea substratului de determinat (testat). Determinarea glutamatului, de exemplu, poate fi realizată prin intermediul unei reacții catalizate de glutamat dehidrogenaza, reacție în urma căreia se formează oxoglutaratul; reacția poate decurge aproape total prin utilizarea unei a doua enzime și anume lactat dehidrogenaza care conduce la regenerarea NAD^+ utilizat în cadrul reacției test (figura 3.13). Cantitatea de oxoglutarat formată poate fi determinată și pe această bază poate fi calculată în mod indirect cantitatea inițială de glutamat.

Metoda echilibrului se poate aplica și în cazul sistemelor enzimice cuplate în cadrul cărora produsul reacției test generează substrat pentru reacțiile auxiliare și indicatoare.

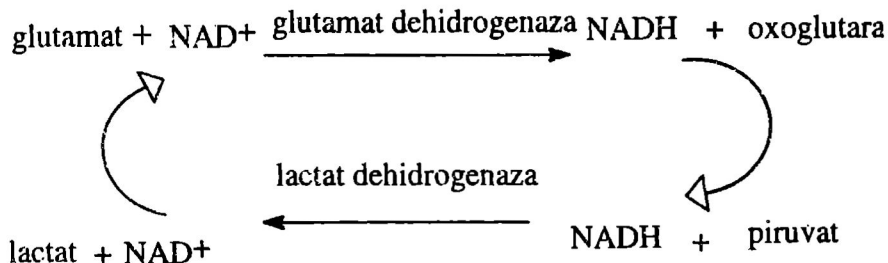
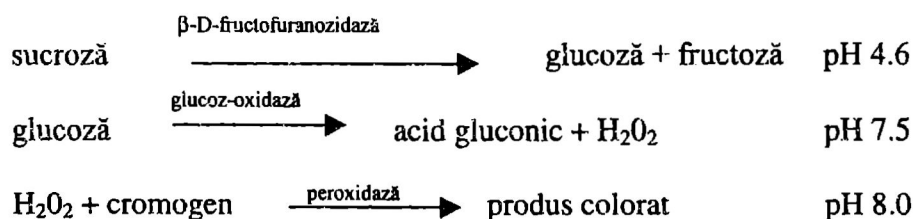


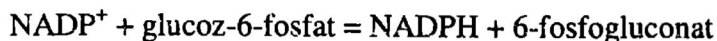
Fig. 3.13 Reformarea NAD⁺ în reacția de determinare a L-glutamatului

Alegerea pH-ului este mai puțin critică decât în cazul determinării enzimelor, în general fiind utilizată o valoare de pH de compromis, fiind folosită totodată o cantitate în exces de enzimă pentru a compensa pierderea din activitate. De asemenea, reacția poate decurge total în două etape de reacție, modificând pH-ul pentru fiecare etapă în parte. De exemplu, determinarea cantitativă a sucrozei folosind invertaza (EC 3.2.1.26) și glucoz-oxidaza (EC 1.1.3.4), poate fi realizată permițând fructofuranozidazei să acționeze la un pH=4,6 iar după o anumită perioadă de timp modificând pH-ul la 7,5 pentru ca cea de a doua etapă de reacție să decurgă total:



Cicluri enzimatic

Substratele existente în concentrații foarte mici pot fi determinate prin reformarea substratului de determinat (test) pe o perioadă apreciabilă și definită de timp, măsurându-se cantitatea de produs format. De exemplu, coenzima NADPH, poate fi determinată folosind două enzime: glutamat dehidrogenaza (EC 1.4.1.3) și glucoz-6-fosfat dehidrogenaza (EC 1.1.1.49):



Amestecul de reacție conține oxoglutaratul, amoniacul, glucozo-6-fosfatul și cele două enzime. Reacția se inițiază prin adăugarea substratului de determinat (NADPH) și lăsată să decurgă o perioadă definită de timp. Reacția se stopează prin inactivarea enzimelor iar cantitatea de 6-fosfogluconat acumulată se determină printr-o metodă adecvată fiind ulterior corelată cu cantitatea inițială de NADPH existentă în probă. În acest caz produsul poate fi determinat folosind glucozo-6-fosfat dehidrogenaza și urmărindu-se oxidarea NADPH-ului aflat în exces. Astfel de metode necesită o calibrare folosind cantități cunoscute de substrat de testat.

3.6.2. METODA CINETICĂ

În metoda cinetică viteza inițială a reacției, v_0 , este măsurată printr-unul din modurile convenționale, prin urmărirea fie a dispariției substratului, fie a obținerii produsului. Viteza este funcție de concentrația de substrat (S), enzima (E), inhibitor (I) și activator (A). De exemplu, concentrația de glucoză poate fi determinată măsurând viteza inițială a producerii colorantului din exemplul de mai sus.

Deoarece enzima este un catalizator ea afectând deci viteza de reacție și nu echilibrul unei reacții, activitatea ei trebuie determinată printr-o metodă cinetică (sau de viteză) sau printr-o titrare directă a centrului activ. Deasemenea, activatorii sau inhibitorii care afectează capacitatea catalitică a enzimelor pot fi măsuțați numai prin metode cinetice. Substratele pot fi determinate fie prin metoda echilibrului fie prin metoda cinetică; precizia ambelor metode este comparabilă.

Metoda cinetică de determinare a substratelor este asemănătoare cu cea a determinării enzimelor, dar este mai puțin utilizată datorită dificultății măsurării vitezei de dispariție a substratului la concentrații mici ale acestuia.

Determinările cinetice au fost utilizate și în cadrul sistemelor cuplate în care concentrația de substrat este menținută constantă printr-un proces de reciclare. În astfel de cazuri viteza reacției indicatoare va rămâne deasemenea constantă și poate fi corelată cu concentrația inițială de substrat. Cantități mici de NAD^+ pot fi determinate prin cuplarea reducerii acestuia la NADH cu reducerea simultană a citocromului c, proces care poate fi urmărit la o lungime de undă de 550 nm (figura 3.14).

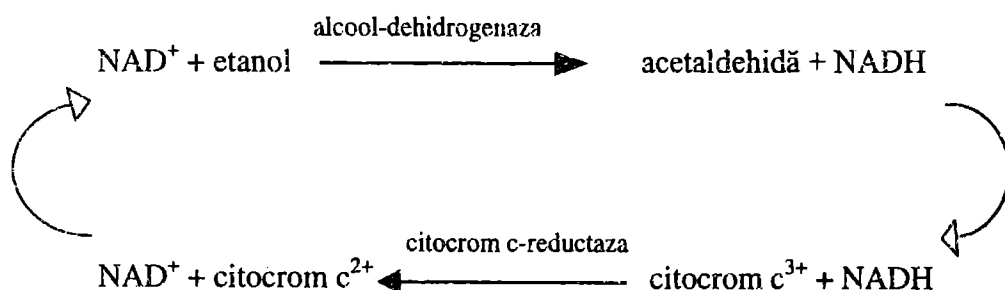


Fig. 3.14 Determinarea cinetică a NAD^+ . Viteza de creștere a absorbției la 550 nm datorată reducerii citocromului c poate fi corelată cu concentrația NAD^+ corespunzătoare stării staționare.

Amestecul de reacție conține etanol și citocrom c, împreună cu enzimele alcool dehidrogenaza (EC 1.1.1.1) și citocrom c reductaza (EC 1.6.99.3). Odată cu inițierea reacției prin adăugare de NAD^+ , apare o stare staționară în care viteza de reducere a citocromului c poate fi corelată cu concentrația de NAD^+ .

Viteza reacției este influențată de condițiile de pH, temperatură și tărie ionică și pentru a obține rezultate reproductibile, toți acești factori trebuie controlați în mod riguros. Guilbault și Pardue au arătat că lucrând cu precauție se pot obține rezultate cu o precizie mai mare de 1%. Mai mult, prin metodele de viteză pot fi preântâmpinate unele dificultăți relative la reacțiile secundare și în multe cazuri pot fi obținute sensibilități mari [8].

Există diferite metode posibile pentru a calcula viteza unei reacții enzimatică și anume: metoda pantei inițiale, metoda concentrației fixe sau a timpului variabil și metoda timpului fix. Toate cele trei metode pot fi automatizate. Aceste metode nu vor fi tratate în acest capitol.

4. APLICAȚIILE BIOANALITICE ALE REACȚIILOR ENZIMATICE BAZATE PE INHIBITORI

Un număr mare de poluanți atmosferici sunt reprezentați printr-o serie de compuși care acționează ca inhibitori ai enzimelor și pe această bază au fost realizate o serie de metode de determinare a unor astfel de compuși. Poluanții sunt răspândiți în apă, aer și sol, ei regăsindu-se în deșeurile rezultate din procese industriale, agricole și casnice. Dintre poluanții cu efect inhibitor asupra enzimelor pesticidele și metalele grele au cea mai mare răspândire, acești compuși având efecte toxice asupra organismului uman influențând totodată și funcționarea ecosistemului. O parte din acești inhibitori și enzimele asupra cărora acționează sunt redată în tabelul 4.1.

Tab. 4.1 Grupele principale de inhibitori și enzimele asupra cărora acționează[10]

Inhibitor	Enzima
Pesticide:	
Insecticide: (organofosforice și carbamate)	Colinesteraza, alcalin fosfataza, fosfataza acidă, acilaza, lipaza, chimotripsina
Erbicide (sulfoniluree, triazaine)	Tirozinaza, acetolactat sintetaza, peroxidaza
Fungicide (ditiocarbamate)	Aldehyd dehidrogenaza, tirozinaza
Metale grele:	
Beriliu	Alcalin fosfataza
Cadmium	Colinesteraza, G-3-PDH, L-LDH, LAP
Crom	L-LDH, G-6-PDH, colinesteraza, piruvat kinaza, hexokinaza
Cobalt	Ureaza
Cupru	L-LDH, ureaza, GOD, colinesteraza, fosfataza acidă
Plumb	Fosfataza alcalină, L-LDH
Mercur	Ureaza, GOD, colinesteraza, fosfataza acidă, piruvat oxidaza, L-LDH, invertaza, L-glicerofosfat oxidaza
Argint	L-LDH, GOD, ureaza
Zinc	L-LDH

G-3-PDH: glicerol-3-fosfat dehidrogenaza; L-LDH: L-lactat dehidrogenaza; GOD: glucoz oxidaza; LAP: leucin aminopeptidaza; G-6-PDH: glucozo-6-dehidrogenaza;

Una dintre cele mai studiate enzime este colinesteraza care este inhibată de insecticidele organofosforice și carbamate precum și de o serie de metale grele. Metodele spectrometrice sunt cel mai adesea folosite în determinarea inhibitorilor. Aceste metode folosesc enzima în soluție, astfel încât biocatalizatorul nu poate fi refolosit ceea ce conduce la o creștere a prețului de analiză. Tehnicile bazate pe biosensori prezintă avantajul că folosesc enzima imobilizată permițând astfel folosirea repetitivă a enzimei.

Inhibarea anumitor reacții de către o serie de substanțe care pot fi produși ai reacțiilor respective sau, a unor reacții ulterioare reprezintă baza mecanismului de control a metabolismului celular, în timp ce inhibarea selectivă a enzimelor formează baza pentru o serie de procese chemoterapeutice sau farmacodinamice.

Definită în termeni biochimici de către Peters, inhibiția unei enzime presupune scăderea vitezei reacției catalizate de aceasta. Clasificarea reacțiilor de inhibiție enzimatică are la bază

interacția dintre inhibitori cu principalele componente ale sistemului enzimatic și anume cu: enzima, substratul, coenzima, activatorul, complexul enzimatic și cu alte componente din sistem. Cu toate că unii inhibitori acționează asupra substratelor sau cofactorilor discuția se va restrânge numai la acei inhibitori care se combină direct cu enzima.

În prima parte a acestui capitol se va trata inhibiția enzimelor în soluție. În acest scop se vor prezenta o serie de aspecte teoretice legate de inhibiție, urmate de ecuațiile cinetice ale reacțiilor de inhibiție din soluție precum și de metodele cinetice de determinare a inhibitorilor enzimelor solubile și imobilizate.

4.1. INHIBIȚIA ÎN SOLUȚIE

Inhibitorii enzimatici sunt substanțe care determină scăderea vitezei unei reacții catalizate enzimatic, efectul lor fiind tranzitoriu sau permanent; în funcție de modul lor de acțiune chimică inhibitorii sunt împărțiți în două grupe: inhibitori reversibili și ireversibili. Principalele caracteristici ale diferitelor tipuri de inhibiție sunt redată în tabelul 4.2.

Tab. 4.2 Caracteristicile principale ale inhibiției reversibile și ireversibile

	Reversibilă	Ireversibilă
Reacții	$E + I \xrightleftharpoons{K_i} EI$	$E + I \xrightleftharpoons{k_i} [EI] \longrightarrow EI'$
Parametrii inhibiției	constanta de disociere (echilibru)	Constanta de viteză bimoleculară k_i
Ecuatii	$v_0 = V'_{max} [S] / (K'_m + [S])$ (ecuația Michaelis – Menten) -competitivă: $K'_m = K_m (1 + [I]/K_i)$ $V'_{max} = V_{max}$ -noncompetitivă: $K'_m = K_m$ $V'_{max} = V_{max} / (1 + [I]/K_i)$ - Necompetitivă: $K'_m = K_m / (1 + [I]/K_i)$ $V'_{max} = V_{max} / (1 + [I]/K_i)$	$\ln (v_0/v_0) = k_i [I] t$ (ecuația Aldridge)
Modul de legare al inhibitorului	Necoalent (ionic, Van der Walls)	Coalent
Modificări ale moleculei de inhibitor după disociere	-	+ (hidroliză, oxidare)
Necesitatea preincubării	-	+
Reactivare	Rapidă, prin procedee de îndepărtare a inhibitorului prin spălare	Necesită procedee de reactivare speciale

Inhibitorii reversibili, după cum sunt denumiți, se leagă de enzimă într-un mod reversibil, aceasta recăpătându-și activitatea enzimatică după ce inhibitorul este înlăturat prin dializă sau simpla diluție a probei. Inhibitorii reversibili determină o inhibiție progresivă, formând rapid un sistem de echilibru cu enzima, rezultând un grad bine definit de inhibiție care este funcție de concentrația de enzimă, de concentrația de substrat și de concentrația de inhibitor și care rămâne constant pe toată perioada vitezei inițiale în care se efectuează măsurătorile.

În cazul inhibiției ireversibile, enzima nu-și mai recapătă activitatea catalitică, inhibitorii neputând fi îndepărtați de pe suprafața enzimei prin dializă. Un inhibitor ireversibil poate fi îndepărtat de pe suprafața enzimei, prin introducerea unui alt component în amestecul de reacție,

dar aceasta nu afectează clasificarea inițială. Inhibitorii ireversibili determină o inhibiție progresivă care depinde de creșterea concentrației de inhibitor, ea devenind totală la o concentrație suficient de mare de inhibitor pentru a se combina cu întreaga cantitate de enzimă prezentă. Spre deosebire de inhibitorii reversibili, gradul de inhibiție se poate modifica (crește) pe perioada vitezei inițiale în care se efectuează măsurătorile.

Trebuie specificat faptul că substratul trebuie să fie prezent în toate cazurile de determinare enzimatică a inhibitorilor. În cele mai multe cazuri, cantitatea de substrat utilizată este suficient de mare astfel încât viteza reacției neinhibate poate fi considerată ca fiind nemodificată și folosită drept punct de referință. Printre parametrii care influențiază procesul de inhibiție, unul dintre cei mai importanți este pH-ul, care trebuie selectat corespunzător deoarece interacția dintre enzimă și inhibitor este pH-dependentă.

În capitolul de față discuția relativă la inhibiție se va restrânge la reacțiile enzimatiche implicând un un singur substrat și care se supune cineticii Michaelis-Menten.

4.1.1 INHIBIȚIA REVERSIBILĂ

Inhibiția competitivă se caracterizează printr-un echilibru între enzimă și inhibitor caracterizat printr-o constantă de echilibru K_i (constanta de disociere a complexului enzimă-inhibitor, $K_i = [E][I]/[EI]$, unde $[E]$ și $[I]$ reprezintă concentrațiile de enzimă și respectiv de inhibitor) care redă afinitatea enzimei pentru inhibitor. Reversibilitatea inhibiției presupune faptul că nu este necesară o incubare prealabilă a enzimei cu inhibitorul. Funcție de comportarea inhibitorului față de centrul activ al enzimei există trei tipuri principale de inhibiție reversibilă: competitivă, necompetitivă și non-competitivă. Odată cu apariția procesului de inhibiție expresia vitezei de reacție enzimatică se modifică cu termenul $(1 + [I]/K_i)$ care afectează fie viteza maximă (V_{max}) –inhibiția non-competitivă-, sau constanta de afinitate K_m (inhibiția competitivă) sau ambii parametrii (inhibiția necompetitivă) – a se vedea tabelul 4.2. După cum se va demonstra în continuare, considerându-se graficul Lineweaver-Burk, ficare tip de inhibiție poate fi determinată în funcție de modificările pantei K_m/V_{max} , și a intersecțiilor cu axa $1/[S]$ ($-1/K_m$) și/sau cu axa $1/V$ ($1/V_{max}$).

4.1.1.1 Inhibiția competitivă

Inhibiția competitivă este o inhibiție reversibilă. În principiu, se consideră inhibitorii competitivi acei componenți care reacționează reversibil cu centrul activ al enzimei ale cărei reacții le inhibă, concurând în mod egal pentru acesta cu substratul specific cu care adesea seamănă ca structură; aceștia se leagă de enzime dar nu sunt transformați în produși de reacție. În această situație se formează un complex inactiv, și pentru ca reacția enzimatică să decurgă la nivelul centrului activ inhibitorul trebuie să disocieze de la nivelul acestuia fiind înlocuit de moleculele de substrat. Acest tip de inhibiție apare atunci când inhibitorul și substratul se exclud reciproc astfel încât legarea unui dintre aceștia exclude posibilitatea legării celuilalt. În literatură există modele mult mai complexe relative la acest tip de inhibiție care nu sunt luate în discuție (figura 4.1). În toate aceste cazuri, gradul de inhibiție scade odată cu creșterea concentrației de substrat și deci inhibiția este reversibilă odată cu creșterea concentrației de substrat. Datorită faptului că formarea complexului dintre enzimă și inhibitor este o reacție reversibilă inhibitorul poate fi îndepărtat prin creșterea concentrației substratului specific.

După cum s-a menționat, inhibitorii competitivi au în general o structură similară cu cea a substratelor cu care intră în competiție față de același centru activ de legare al enzimei, ei blocând astfel anumite grupări reactive de pe suprafața enzimei. Un exemplu în acest este reprezentat de malonat care este un inhibitor competitiv al reacției catalizate de succinat dehidrogenază (figura 4.2). Malonatul prezintă două grupe carboxilice, ca și substratul specific (succinatul) și se poate

lega de centrul activ al enzimei. Reacția ulterioară presupune formarea unei duble legături și deoarece malonatul spre deosebire de succinat are un singur atom de carbon între cele două grupări carboxilice acesta nu poate reacționa. Alt exemplu clasic pentru inhibitorii reversibili îl reprezintă acțiunea unor medicamente terapeutice (antibiotice) din clasa sulfamidelor care prezintă similarități structurale cu substratul natural acidul p-aminobenzoic (figura 4.3).

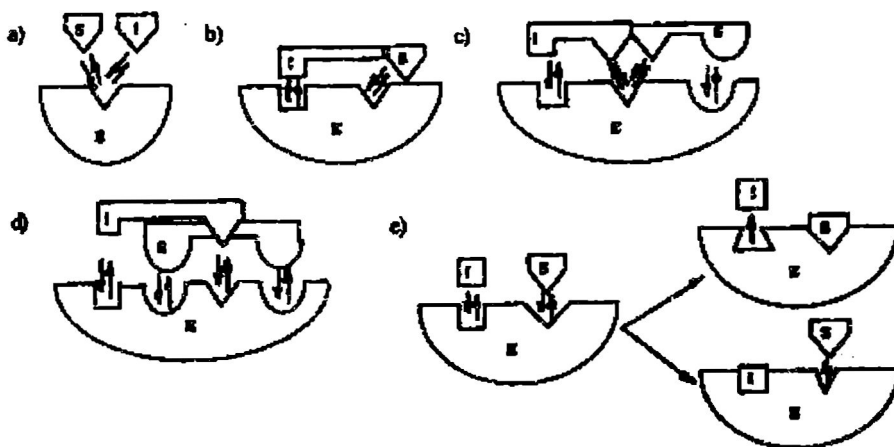


Fig. 4.1 Modele de inhibiție competitivă: a) S și I sunt în competiție pentru același centru de legare; b) împiedicări de ordin steric nu permit legarea I și S; c) I și S împart același centru de legare; d) centrele de legare ale lui I și S sunt diferite dar se suprapun; e) legarea ligandului modifică conformația centrului de fixare pentru cel de al doilea ligand [3].

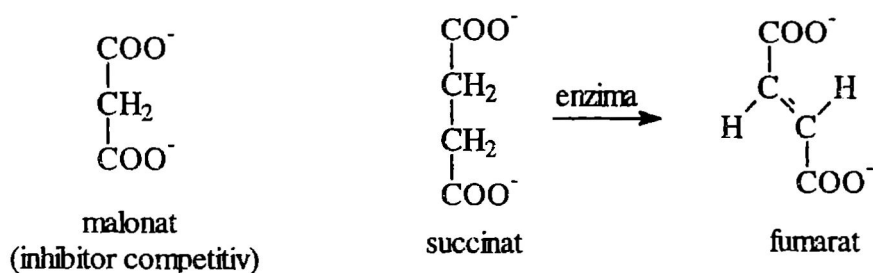
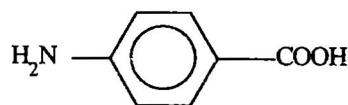
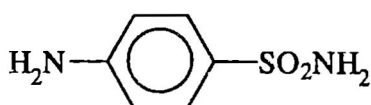


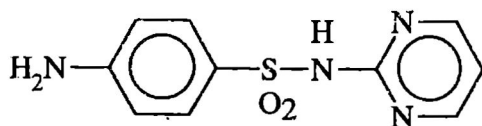
Fig. 4.2 Inhibitori competitivi având o structură similară cu a substratului specific



Acidul p-amino benzoic



Sulfenilamida



Sulfodiazine

Fig. 4.3 Inhibiția competitivă. Sulfamidele intră în competiție cu acidul p-aminobenzoic care reprezintă un factor esențial de creștere pentru majoritatea bacteriilor.

Efectul inhibiției competitive este funcție de concentrațiile relative ale inhibitorului și ale substratului și de afinitatea inhibitorului și a substratului față de enzimă. În general, la o concentrație mică de substrat și la o anumită concentrație de inhibitor și de enzimă, inhibitorul va concura favorabil cu substratul pentru centrul activ al enzimei și gradul de inhibiție va fi mare. Dacă la aceeași concentrație de inhibitor și de enzimă, concentrația substratului este mare, inhibitorul va fi mai puțin favorizat în competiție cu substratul pentru centrul de legare disponibil și gradul de inhibiție va fi mai mic. La o concentrație foarte mare de substrat, moleculele de substrat vor depăși cu mult numărul moleculelor de inhibitor și gradul de inhibiție va fi neglijabil. În acest caz viteza maximă (V_{max}) a reacției rămâne nemodificată (figura 4.4) iar ca rezultat al inhibiției constanta aparentă K_m crește.

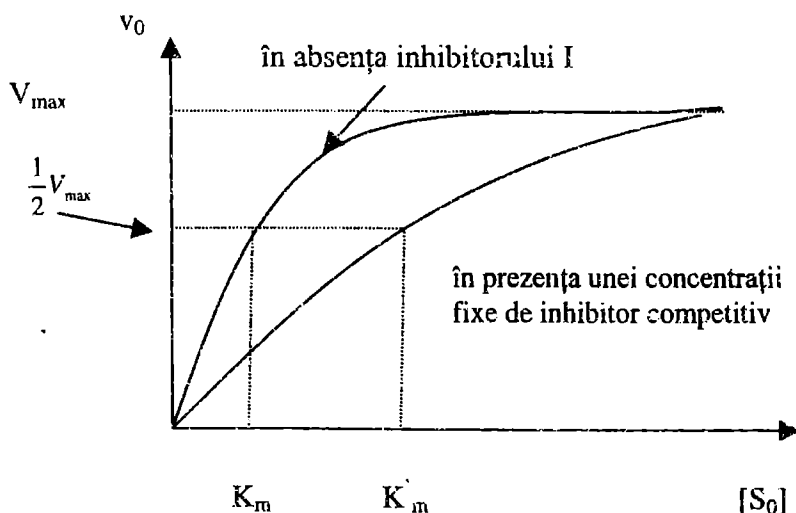
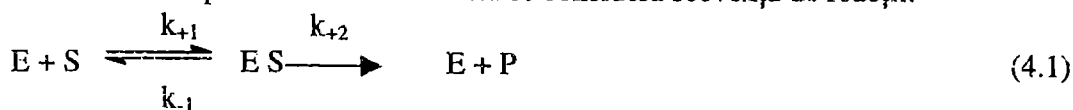


Fig. 4.4 Graficul Michaelis-Menten redând efectul unui inhibitor competitiv (la $[E_0]$ fixă) .

În cele ce urmează, se vor deduce ecuațiile cinetice corespunzătoare stării staționare, pentru o reacție cu un singur substrat, un singur centru de legare, un singur intermediar de reacție, în prezența inhibitorului competitiv I. Pentru aceasta se consideră secvența de reacții:



Constanta de disociere pentru reacția (4.2) este dată relația:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}, \quad (4.3)$$

unde K_i = constanta de inhibiție.

Echilibrul dintre inhibitor și enzimă se stabilește instantaneu la scurt timp după amestecarea acestora. Plecând de la una din relațiile prin se poate deduce ecuația vitezei inițiale în ipoteza teoriei stării staționare și anume:

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+1}}{k_{+1}} = K_m \quad (4.4)$$

și ținându-se cont de expresia concentrației inițiale de enzimă:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI] \quad (4.5)$$

în care se efectuează substituția corespunzătoare concentrației de $[EI]$ din relația 4.3, rezultă:

$$[E_0] = [E] + [ES] + \frac{[E] \cdot [I]}{K_i} \quad (4.6)$$

$$[E_0] = [E] \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [ES] \quad (4.7)$$

Din relația 4.7 se poate exprima $[E]$:

$$[E] = \frac{[E_0] - [ES]}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (4.8)$$

care introdusă în relația 4.4, conduce la relația:

$$\frac{([E_0] - [ES])[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) [ES]} = K_m \quad (4.9)$$

de unde:

$$\frac{([E_0] - [ES])[S]}{[ES]} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (4.10)$$

Ținându-se cont de faptul că viteza inițială este dată de relația:

$$v_0 = k_{+2} \cdot [ES] \quad (4.11)$$

și înlocuind $[ES]$ explicitată din relația 4.10, în relația 4.11 se obține:

$$[E_0] \cdot [S] = [ES] \left[[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \right] \quad (4.12)$$

$$[ES] = \frac{[E_0] [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad (4.13)$$

$$\Rightarrow v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad (4.14)$$

Ecuția (4.14) este similară cu ecuația Michaelis-Menten cu diferența că valoarea de K_m se modifică (crește) cu factorul $(1 + [I]/K_i)$. Trebuie menționat faptul că inhibitorul se găsește într-o

concentrație aproximativ egală cu cea a substratului, astfel încât se poate afirma că $[I] \cong [I_0]$ așa cum s-a presupus că $[S] \cong [S_0]$. Deci pentru cazul inhibiției competitive se poate afirma că V_{\max} rămâne nemodificată, iar K_m se modifică, putându-se introduce notația $K'_m = K_m (1 + ([I_0]/K_i))$, unde K'_m reprezintă constanta K_m aparentă în prezența unei concentrații inițiale de inhibitor competitiv $[I_0]$. În situația în care $K_i = [I_0]$ (și cu condiția că $[I_0] \cong [S_0] \gg [E_0]$) se obține: $K'_m = 2K_m$.

Expresia ecuației Lineweaver-Burk în prezența inhibitorului competitiv este dată de relația:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K'_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4.15)$$

iar reprezentarea grafică este redată în figurile 4.5 a) și b).

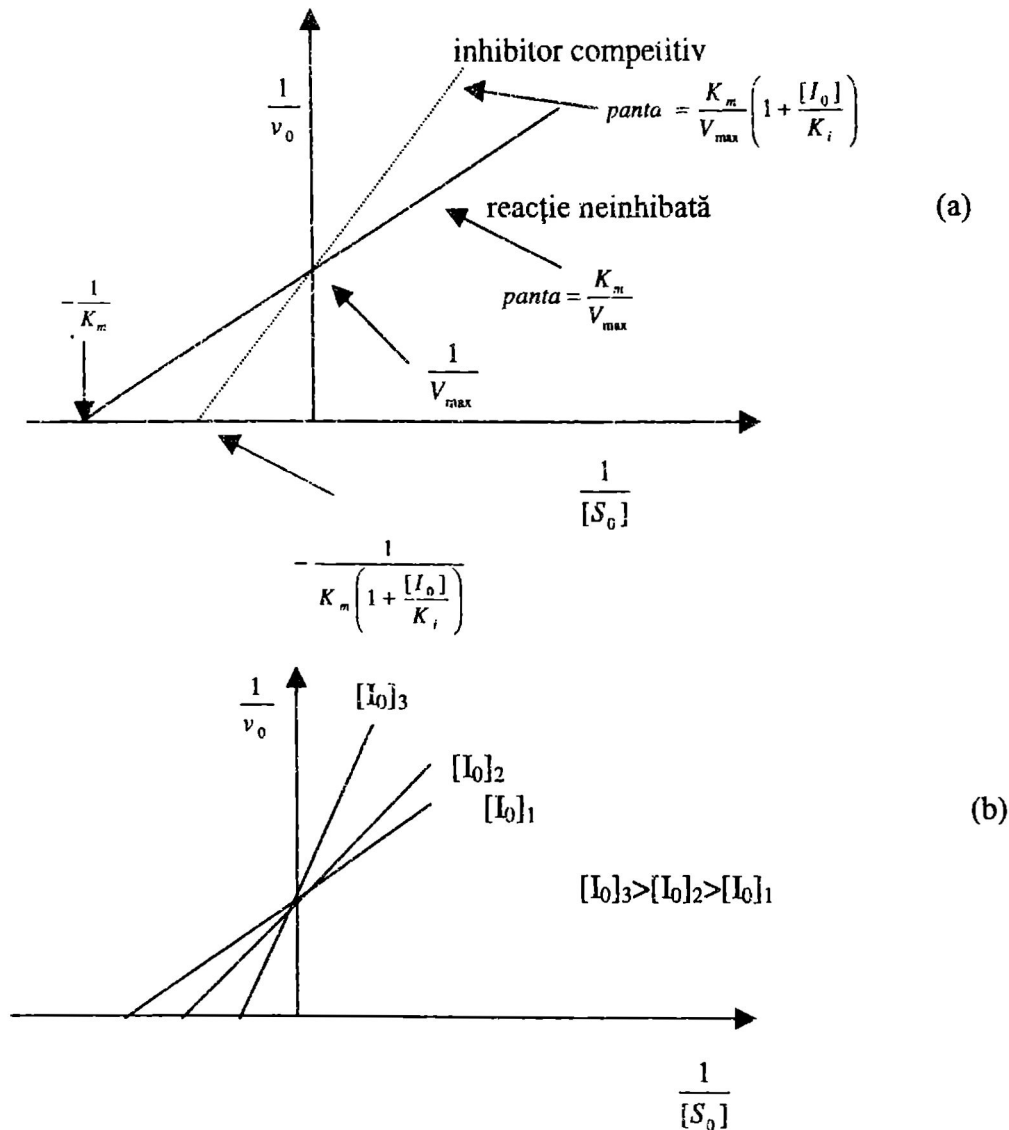


Fig. 4.5 – a) Graficul Lineweaver-Burk care redă efectul inhibiției competitive; b) același grafic pentru diferite concentrații de inhibitor, la o concentrație constantă de enzimă.

Trebuie menționat faptul că o expresie identică se obține și în cazul în care centrul de legare al inhibitorului este separat de cel al substratului, presupunând că legarea substratului de enzimă conduce la blocarea centrului de legare a inhibitorului ca urmare a unor modificări conformaționale sau a altor mecanisme. În acest caz inhibitorul se poate lega de E și nu de ES (cazul discutat mai sus). Din acest motiv, un inhibitor este clasificat drept competitiv, dacă în prezența lui, graficul

Lineweaver-Burk obținut conduce la valori diferite ale K_m , valoarea V_{max} rămânând neschimbată, indiferent de mecanismul de reacție.

Odată stabilit tipul inhibitorului, este de dorit să se determine constanta de inhibiție K_i care rezultă din expresia (4.16):

$$K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i} \right) \quad (4.16)$$

preferându-se în general o metodă grafică și nu una numerică (se elimină astfel erorile determinărilor individuale). Ținându-se cont de expresia de mai sus (4.16), se obține relația:

$$K'_m = \frac{K_m}{K_i} \cdot [I_0] + K_m \quad (4.17)$$

Reprezentându-se grafic K'_m (determinat din intersecția cu axa $1/S_0$ a graficului **primar** Lineweaver-Burk) funcție de $[I_0]$, se obține o dreaptă, având intersecția cu axa $[I_0]$ egală cu $-K_i$ (figura 4.6 a). Deoarece panta graficului Lineweaver-Burk în prezența inhibitorului competitiv este $K_m/V_{max} (1 + [I_0]/K_i)$, atunci graficul pantei **primare** (Lineweaver-Burk) funcție de $[I_0]$ va fi deasemenea linear și din intersecția cu axa $[I_0]$ se obține valoarea $-K_i$ (figura 4.6 b).

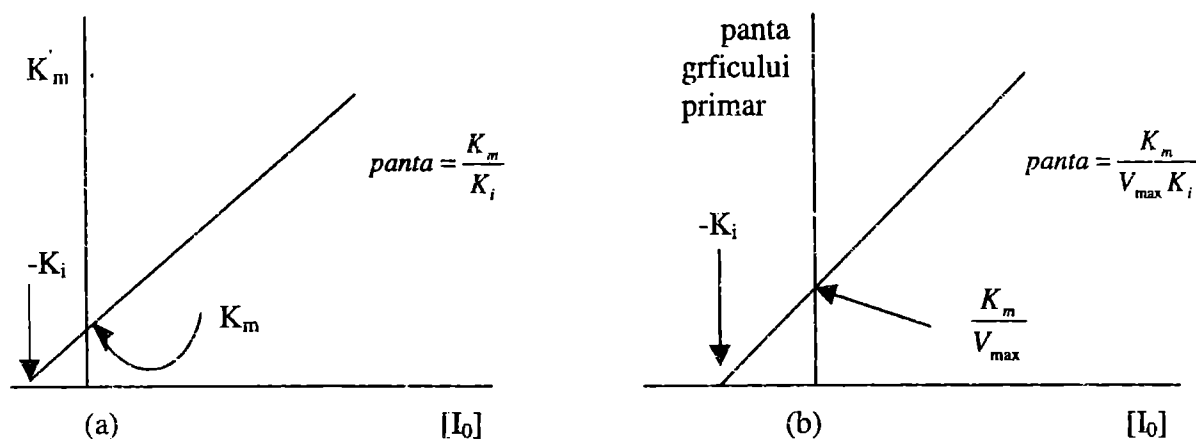


Fig.4.6 Graficele secundare pentru inhibiția competitivă

Aceste grafice **secundare**, K'_m funcție de $[I_0]$ și panta graficului **primar** funcție de $[I_0]$, se obțin din date cinetice la o concentrație fixă de enzimă $[E_0]$.

Cazul cel mai simplu de inhibiție competitivă este uneori numit inhibiție lineară competitivă deoarece, atât graficele primare cât și cele secundare sunt lineare. În sisteme mai complicate graficele primare pot fi lineare, dar cele secundare nu mai sunt lineare. De exemplu, dacă nu una, ci două molecule de inhibitor se pot fixa la centrul de legare al substratului, atunci apare o așa numită inhibiție competitivă parabolică. Similar, dacă inhibitorul se leagă la un centru diferit de cel de legare a substratului și reduce afinitatea enzimei pentru substrat fără schimbarea caracteristicilor de reacție a substratului fixat, atunci rezultă o inhibiție competitivă hiperbolică. În ambele cazuri graficele primare sunt lineare și aspectul inhibiției nu se deosebește de cele ale inhibiției competitive lineare.

Inhibitorii competitivi, asemenea altor tipuri de inhibitori, pot fi folosiți la elucidarea căilor metabolice, în medicină și în agricultură cu condiția ca aceștia să nu fie toxici pentru organismele umane. Studii detaliate asupra caracteristicilor de legare a diferiților inhibitori competitivi la același centru ca și substratul natural, pot conduce la obținerea unor informații utile relative la factorii care guvernează legarea substratului.

Inhibiția ureazei de către tiourea reprezintă un exemplu de inhibiție competitivă care prezintă aplicații în controlul poluării mediului, tiourea fiind un produs de degradare al fungicidelor ditiocarbamate.

4.1.1.2 Inhibiția necompetitivă

Inhibitorii necompetitivi sunt reprezentați prin acei compuși care se leagă numai de complexul ES și nici odată de enzima liberă, generând un complex ESI inactiv. Acest tip de inhibiție apare numai în cadrul sistemelor enzimatice implicând un singur substrat. În acest caz gradul de inhibiție va fi dependent numai de concentrația de inhibitor și de K_i . Spre deosebire de inhibiția competitivă gradul de inhibiție crește odată cu creșterea concentrației de substrat. În cazul unei astfel de inhibiții legarea substratului de enzimă poate conduce la o modificare conformațională a structurii enzimei generându-se astfel un centru de legare pentru inhibitor, sau inhibitorul se poate lega direct de complexul ES. În nici unul din cele două cazuri inhibitorul nu concurează cu substratul pentru același centru de legare, deci inhibiția nu poate fi îndepărtată prin creșterea concentrației de substrat. În cazul inhibitorilor necompetitivi atât valoarea constantei K_m cât și a vitezei maxime V_{max} se modifică. În figura 4.7 sunt redată diferite modele de inhibiție necompetitivă.

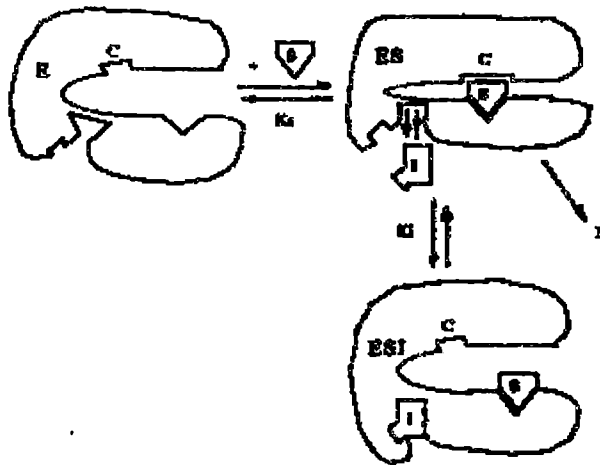
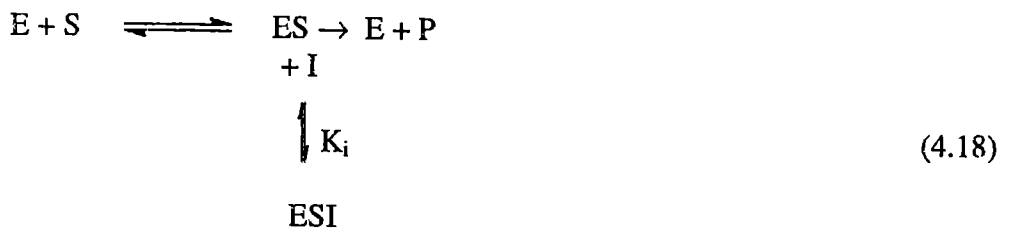


Fig. 4.7 Modele de inhibiție necompetitivă. I se leagă numai de complexul ES [3].

Ureaza și acetilcolinesteraza inhibitate de ionii de florură reprezintă exemple de inhibiție necompetitivă. De asemenea fosfataza alcalină obținută din intestine de șobolani este inhibată în acest mod de către L-fenilalanină.

Considerându-se din nou reacțiile simple:



unde ESI este un complex inactiv. Echilibrul de mai sus redă faptul că și în condițiile unor concentrații mari de substrat are loc formarea complexului ESI. Constanta de inhibiție este dată de relația:

$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (4.19)$$

În condițiile stării staționare valoarea constantei Michaelis-Menten este dată de relația:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (4.20)$$

Pentru sistemul de mai sus, concentrația inițială de enzimă este dată de relația:

$$\begin{aligned} [E_0] &= [E] + [ES] + [ESI] = [E] + [ES] + \frac{[ES][I]}{K_i} \\ &= [E] + [ES] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \end{aligned} \quad (4.21)$$

de unde:

$$[E] = [E_0] - [ES] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (4.22)$$

Tinându-se cont de expresia $[E]$ și bazându-ne pe un raționament similar cu cel de mai sus, pentru viteza inițială se obține expresia:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S_0]}{[S_0] \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right) + K_m} \quad (4.23)$$

și împărțind totul la $\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)$, se obține:

$$v_0 = \frac{\frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I_0]}{K_i}} [S_0]}{[S_0] + \frac{K_m}{1 + \frac{[I_0]}{K_i}}} \quad (4.24)$$

Aceasta este o ecuație asemănătoare ecuației Michaelis-Menten, constantele K_m și V_{\max} fiind amândouă împărțite la factorul $\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)$.

În cazul inhibiției necompetitive expresiile pentru V'_{\max} și K'_m sunt date prin relațiile:

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I_0]}{K_i}} \quad \text{și} \quad K'_m = \frac{K_m}{1 + \frac{[I_0]}{K_i}} \quad (4.25)$$

unde V'_{\max} reprezintă valoarea V_{\max} în prezența unei concentrații inițiale de inhibitor necompetitiv $[I_0]$, iar K'_m este valoare aparentă a lui K_m în aceleași condiții. O concentrație de inhibitor egală cu K_i va înjumătăți valorile de K_m și V_{\max} .

Ecuația Lineweaver-Burk în prezența unui inhibitor necompetitiv devine:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K'_m}{V'_{\max}} \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V'_{\max}} \quad (4.26)$$

iar panta graficului Lineweaver-Burk este egală cu:

$$\frac{K'_m}{V'_{\max}} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)}{V_{\max} \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)} = \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (4.27)$$

Cu alte cuvinte, panta graficului Lineweaver-Burk nu se modifică în prezența inhibitorului necompetitiv, dar ambele intersecții cu axele se modifică (figura 4.8).

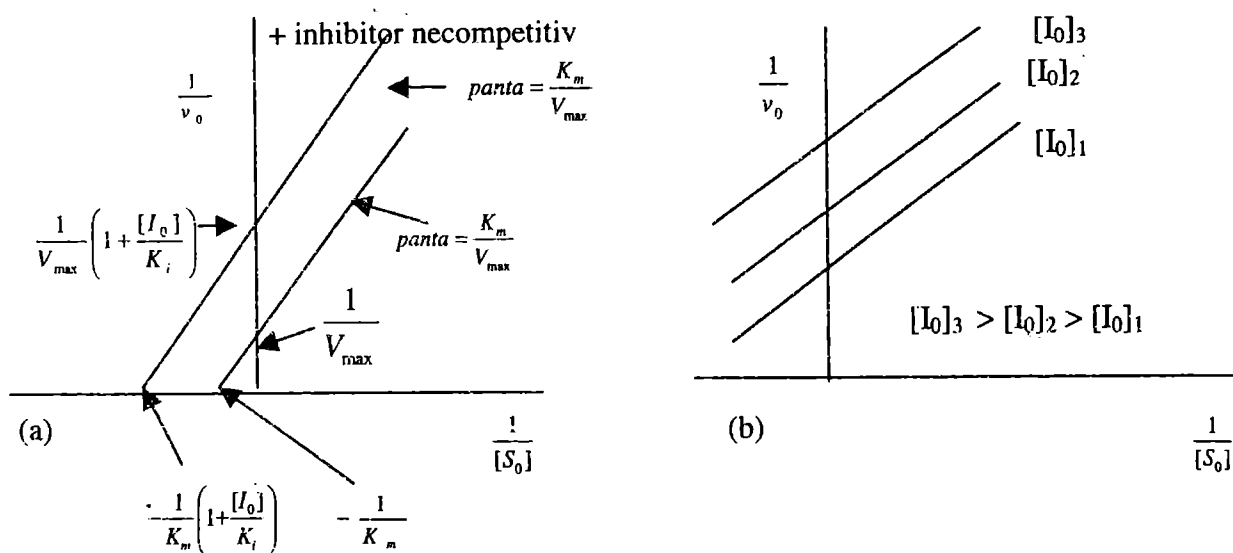


Fig. 4.8 (a) Graficele Lineweaver-Burk pentru inhibiția necompetitivă; (b) aceleași grafice redând influența diferitelor concentrații de inhibitor la o concentrație fixă de enzimă.

Constanta de inhibiție K_i poate fi determinată din graficele **secundare**. În cazul inhibiției necompetitive:

$$\frac{1}{V'_{\max}} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right) \text{ și } \frac{1}{K'_m} = \frac{1}{K_m} \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right) \quad (4.28)$$

Deci graficele $1/V'_{\max}$ și $1/K'_m$ (obținute respectiv prin intersectarea axelor $1/v_0$ și $1/S_0$ din graficele **primare**) funcție de $[I_0]$ sunt lineare, intersecția cu axele $[I_0]$ dând $-K_i$ (figura 4.9).

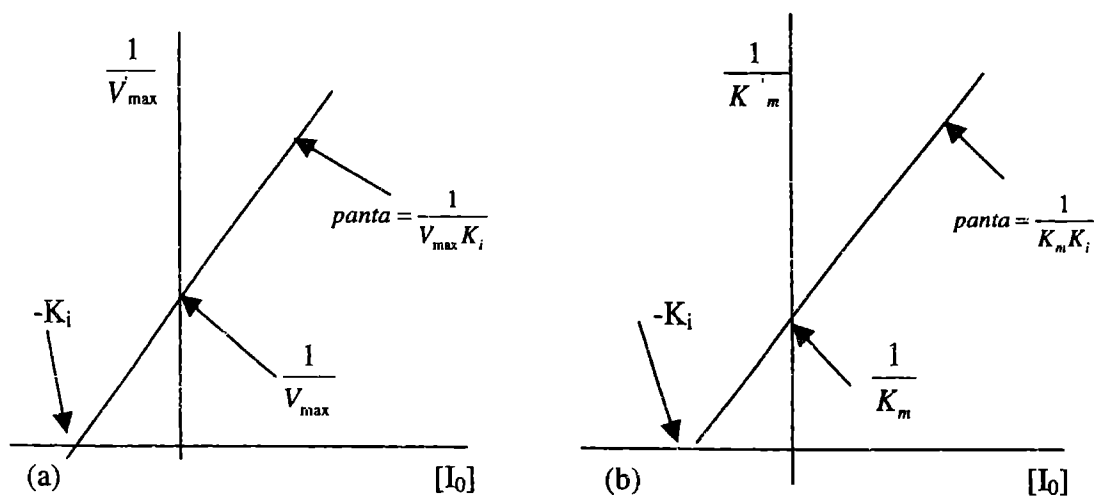


Fig. 4.9 Graficele secundare pentru inhibiția necompetitivă

Inhibiția necompetitivă a reacțiilor enzimatice implicând un singur substrat este un proces destul de rar, unul dintre puținele exemple cunoscute fiind și inhibiția arilsulfatazei de către hidrazină.

4.1.1.3 Inhibiția non-competitivă

Inhibitori non-competitivi se leagă de moleculele de enzime, indiferent dacă moleculele de substrat se leagă sau nu, fără a modifica afinitatea enzimei față de acesta din urmă proces datorită căruia rezultă un complex inactiv. Din această cauză inhibitorul se leagă de un centru diferit de cel al substratului. Inhibiția este în acest caz independentă de concentrația de substrat. Mecanismele principale ale inhibiției non-competitive sunt redată în figura 4.10.

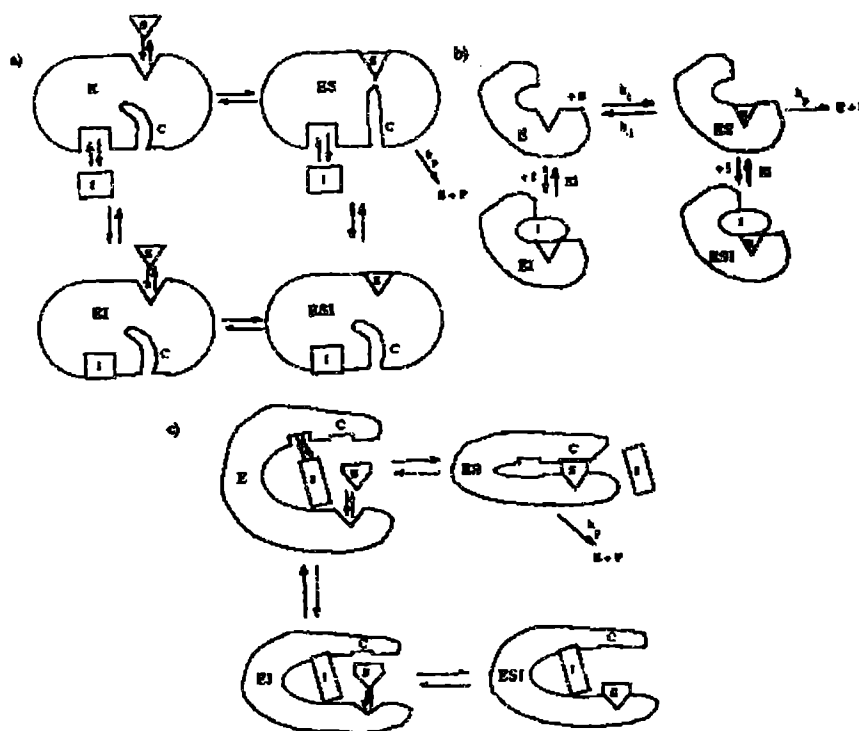


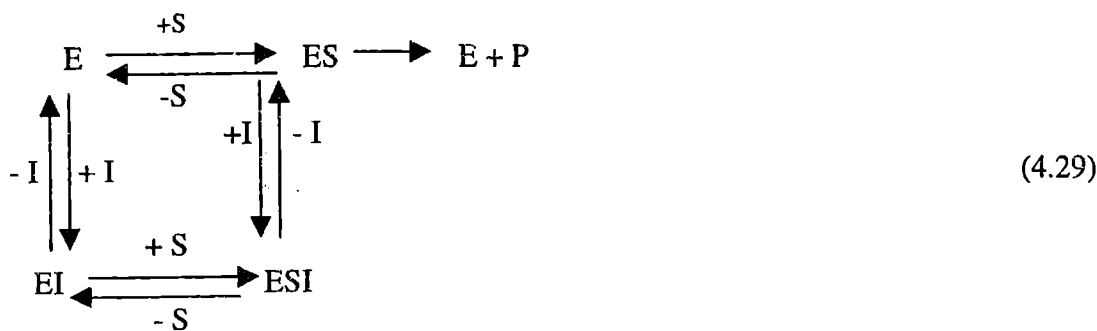
Fig. 4.10 Modele pentru inhibiția non-competitivă. a) legarea lui I nu împiedică legarea lui S dar conduce la modificări conformaționale ale centrului catalitic (C); b) legarea lui I împiedică steric legarea lui S; c) dacă I se leagă primul centrul catalitic nu se aliniază față de substrat, iar pe de altă parte dacă S se leagă primul el împiedică steric legarea lui S [3].

Acești compuși interacționează cu enzima într-o altă poziție decât cea corespunzătoare centrului activ astfel încât, deși formarea complexului ES nu este afectată, este influențată în schimb, disocierea acestuia și deci scade viteza de formare a produșilor de reacție. Acest tip de inhibiție nu este reversibilă și deci prin adăugarea unui exces de substrat nu se înlătură efectul ei, iar în general inhibitorii de acest tip nu prezintă o structură similară cu a substratelor.

Există numeroase exemple de inhibitori non-competitivi, mulți dintre ei fiind toxici pentru diferitele organisme. De exemplu ionii de cianură inhibă orice enzimă care conține ioni de cupru drept cofactor sau ca parte componentă a centrului activ, cum este cazul citocrom c oxidazei.

Se va considera doar cazul în care inhibitorul distruge activitatea catalitică a enzimei, fie prin legarea la centrul catalitic sau ca un rezultat al modificării conformaționale afectând astfel centrul catalitic al acesteia, dar fără afectarea legării substratului.

Reacțiile de echilibru care descriu inhibiția non-competitivă redau faptul că I se leagă atât de E cât și de ES procese în urma cărora rezultă complexe inactivă EI și ESI:



Trebuie notat faptul că și în condiții de concentrație de substrat mare nu toată enzima se află sub forma complexului enzimă substrat. În consecință, un inhibitor non-competitiv conduce la scăderea valorii aparente a vitezei maxime în timp ce valoarea aparentă a constantei K_m rămâne nemodificată.

Plecând de la teoria stării staționare, în această situație complexă este imposibil să se obțină o ecuație asemănătoare ecuației Michaelis-Menten chiar în condițiile în care concentrația de ES poate fi dedusă pe căi alternative. Totuși, plecând de la ipoteza echilibrului, se pot deduce ecuații de tip Michaelis-Menten și grafice Lineweaver-Burk lineare pentru diferite tipuri de inhibiție non-competitivă. În cel mai simplu model posibil, cel al inhibiției non-competitive liniară simplă, substratul nu afectează legarea inhibitorului. În aceste condiții reacțiile: $E + I \rightleftharpoons EI$ și $ES + I \rightleftharpoons ESI$ au o constantă de disociere K_i identică, denumită deasemenea constanta de inhibiție. Concentrația totală de enzimă este redusă efectiv de către inhibitor, ceea ce duce la o scădere a valorii V_{max} , dar nemodificând valoarea K_m , întrucât nici inhibitorul nici substratul nu afectează legarea celuilalt.

În cele ce urmează se va deduce ecuația vitezei inițiale, ținându-se cont de această dată de cazul special pentru care $K_m \approx K_s$. Ca și în cazurile anterioare valoarea constantei K_m este:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

În prezența inhibitorului non-competitiv, care se legă în mod egal atât de enzimă cât și de complexul ES, constanta de inhibiție K_i este dată prin relația:

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} = \frac{[ES] \cdot [I]}{[ESI]} \quad (4.29)$$

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

$$\begin{aligned}
 &= [E] + [ES] + \frac{[E] \cdot [I]}{K_i} + \frac{[ES] \cdot [I]}{K_i} \\
 &= ([E] + [ES]) \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)
 \end{aligned}
 \quad (4.30)$$

de unde:

$$[E] + [ES] = \frac{[E_0]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (4.31)$$

și deci se poate exprima [E]:

$$[E] = \frac{[E_0]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} - [ES] \quad (4.32)$$

Urmând un raționament similar cu cel anterior, rezultă că viteza inițială de reacție este dată prin relația:

$$v_o = \frac{V_{\max} [S_0]}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right) ([S_0] + K_m)} \quad (4.33)$$

Ecuția (4.33) este asemănătoare ecuației Michaelis-Menten, în care termenul V_{\max} este împărțit la factorul $\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)$. Astfel, pentru inhibiția non-competitivă lineară simplă, K_m este neschimbat, iar

V_{\max} este modificat astfel încât :

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I_0]}{K_i}} \quad \text{sau} \quad \frac{1}{V'_{\max}} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right) \quad (4.34)$$

unde V'_{\max} este valoarea lui V_{\max} în prezența concentrației de inhibitor non-competitiv, $[I_0]$. Se observă că, constanta de inhibiție K_i reprezintă acea valoare a concentrației de inhibitor pentru care se obține jumătate din viteza maximă V_{\max} .

Ecuția Lineweaver-Burk pentru inhibiția noncompetitivă lineară simplă este :

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V'_{\max}} \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V'_{\max}} \quad (4.35)$$

efectul inhibitorilor de acest tip fiind redat în graficele Lineweaver-Burk (figura 4.11).

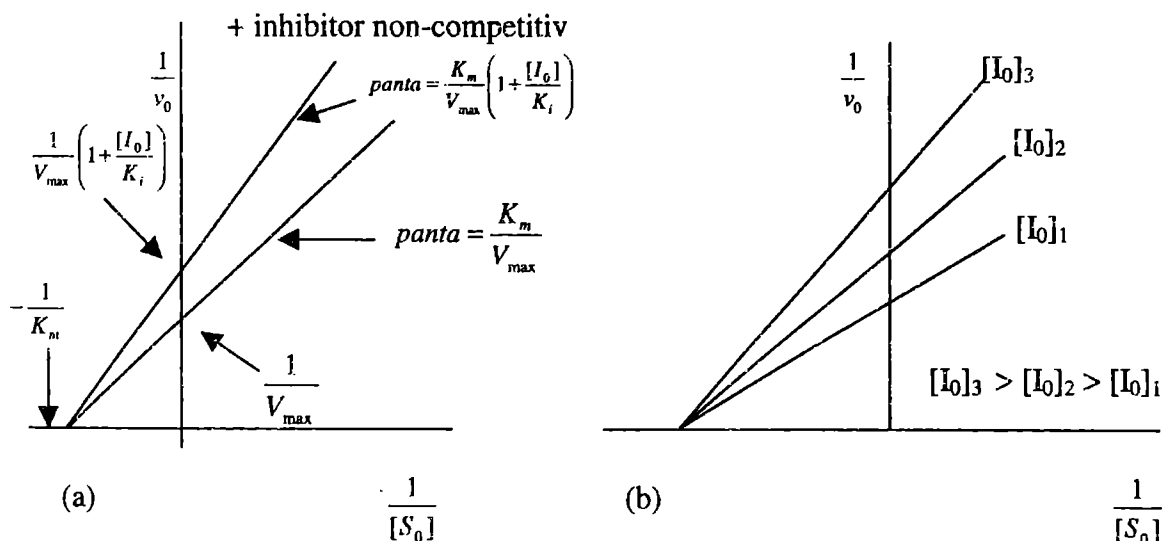


Fig.4.11 a) Graficul Lineweaver-Burk pentru inhibiția non-competitivă lineară simplă;
b) același grafic pentru diferite concentrații de inhibitor la o concentrație fixă de enzimă.

Odată stabilit tipul de inhibiție, constanta de inhibiție K_i poate fi determinată folosindu-se graficele secundare. Deoarece:

$$\frac{1}{V'_{\max}} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right) \quad (4.36)$$

panta graficului **primar** Lineweaver-Burk este:

$$\frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right) \quad (4.37)$$

rezultă că graficele $\frac{1}{V'_{\max}}$ în funcție de $[I_0]$ și panta graficului **primar** funcție de $[I_0]$ sunt lineare, intersecția cu axa $[I_0]$ dând valoarea lui K_i (figura 4.12 a și b).

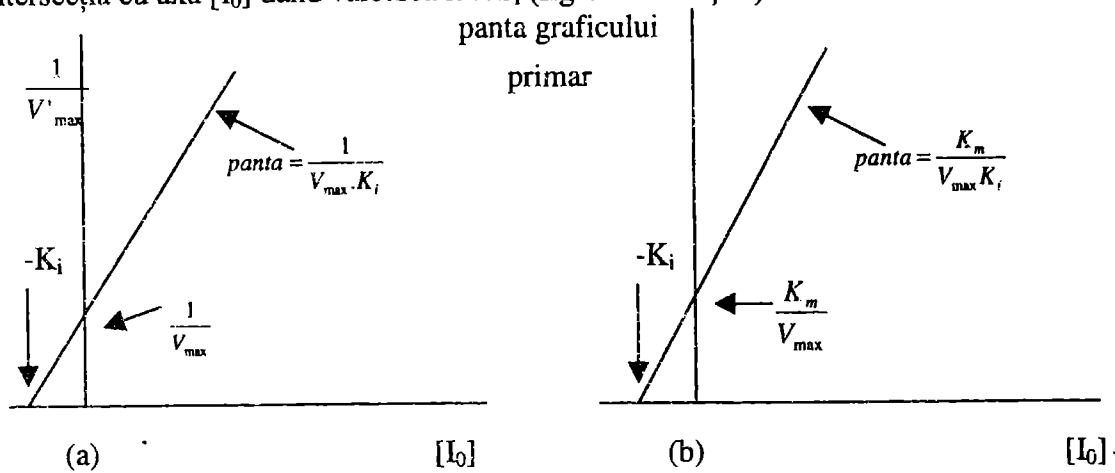


Fig. 4.12 Graficele secundare pentru inhibiția non-competitivă lineară simplă, pentru o concentrație constantă de enzimă $[E_0]$.

În situațiile în care se obține un grafic Lineweaver-Burk linear dar tipul inhibiției observate nu se încadrează în nici unul din cele prezentate anterior (inhibiție competitivă simplă, necompetitivă sau non-competitivă lineară simplă) atunci procesul poate fi încadrat în tipul de inhibiție mixtă, indiferent de mecanismul implicat.

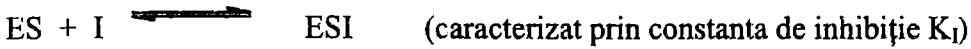
Și în acest caz se cunosc puțini inhibitori de acest tip. Ionii de hidrogen pot reprezenta un exemplu simplu în acest sens; de exemplu chimotripsina a cărei centru activ este acceptor de protoni poate fi inhibată prin creșterea concentrației ionilor de hidrogen, fapt demonstrat de alura graficelor Lineweaver-Burk pentru diferite valori de pH. Trebuie ținut cont totuși de faptul că modificarea pH-ului unei soluții conținând enzima are efecte complexe asupra enzimelor în general. Ionii metalici și compușii organici care se leagă de grupările tiolice ale cisteinei sunt exemple ale inhibiției non-competitive, așa cum sunt și ionii de cianură care se leagă de ionii metalici aparținând enzimelor. Inhibiția acetilcolinesterazei și a L-glicerofosfatazei de către ionii de mercur (Hg^{2+}) reprezintă două exemple de inhibiție non-competitivă de interes pentru controlul poluării mediului. Trebuie înțeles că toxicitatea substanțelor ca cianurile, tiolii și metalele grele este dată de acțiunea lor ca inhibitori enzimatici, indiferent de mecanismul implicat în acest proces.

4.1.1.4 Inhibiția mixtă

Acest tip de inhibiție rezultă din cele trei tipuri prezentate mai sus. În toate cazurile de inhibiție mixtă apare o modificare atât a valorii de K_m cât și a celei de V_{\max} . Inhibarea fosfatazei alcaline de paraoxon (un insecticid organofosforic) reprezintă un exemplu în acest sens pentru care substratul S prezintă o afinitate mai mare față de complexul EI decât față de E, complexul ESI fiind inactiv.

În paragraful anterior, s-a dedus expresia pentru cazul unei inhibiții non-competitive lineare simple plecându-se de la ipoteza echilibrului și presupunând că legarea substratului și a inhibitorului sunt două procese independente. Se consideră cazul în care cea de a doua ipoteză nu mai este valabilă.

Există două procese prin care inhibitorul se poate fixa la enzimă :



și deci :

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{iar} \quad K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (4.38)$$

Tinându-se cont de faptul că:

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_m \quad (4.39)$$

și că:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

în care se înlocuiesc valorile constantelor de inhibiție date prin relația (4.38)

$$[E_0] = [E] + [ES] + \frac{[E][I]}{K_i} + \frac{[ES][I]}{K_i} \quad (4.40)$$

rezultă că:

$$[E] = \frac{[E_0] - [ES](1 + \frac{[I]}{K_i})}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (4.41)$$

Înlocuind expresia [E] în relația (4.39) se obține:

$$\frac{\left\{ [E_0] - [ES](1 + \frac{[I]}{K_i}) \right\} [S]}{(1 + \frac{[I]}{K_i}) [ES]} = K_m$$

$$[ES] \left\{ [S](1 + \frac{[I]}{K_i}) + K_m(1 + \frac{[I]}{K_i}) \right\} = [E_0][S] \quad (4.42)$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{[S](1 + \frac{[I]}{K_i}) + K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

Urmându-se raționamentul menționat în paragrafele anterioare se obține expresia vitezei inițiale:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S_0]}{[S_0](1 + \frac{[I_0]}{K_i}) + K_m(1 + \frac{[I_0]}{K_i})} \quad (4.43)$$

Se împarte atât numărătorul cât și numitorul cu termenul $(1 + \frac{[I_0]}{K_i})$:

$$v_0 = \frac{\frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I_0]}{K_i}} [S_0]}{K_m \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right) + \frac{[S_0]}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)}} \quad (4.44)$$

Această ecuație este o formă asemănătoare ecuației Michaelis-Menten ea putând-se scrie sub forma:

$$v_0 = \frac{V'_{\max} [S_0]}{[S_0] + K'_m} \quad (4.45)$$

unde:

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)} \quad \text{și} \quad K'_m = K_m \frac{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)} \quad (4.46)$$

În mod similar, ecuația Lineweaver-Burk este dată prin relația :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K'_m}{V'_{\max}} \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V'_{\max}} \quad (4.47)$$

graficul Lineweaver-Burk fiind linear. În general atât K'_m , V'_{\max} cât și panta corelate prin expresia:

$$\frac{K'_m}{V'_{\max}} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right) \quad (4.48)$$

sunt influențate de prezența inhibitorului.

Astfel, graficele la diferite concentrații de inhibitor (și la concentrație fixă de enzimă $[E_0]$) nu se vor intersecta pe nici o axă, nici nu vor avea aceleași pante, și deci tipul de inhibiție va fi diferit de celelalte tipuri caracteristice competitive, necompetitive și non-competitive. Acest tip de inhibiție poartă numele de inhibiție mixtă. Când $K_i > K_i$, graficele se intersectează la stânga axei $1/v_0$ și deasupra axei $1/S_0$ (figura 4.13 a).

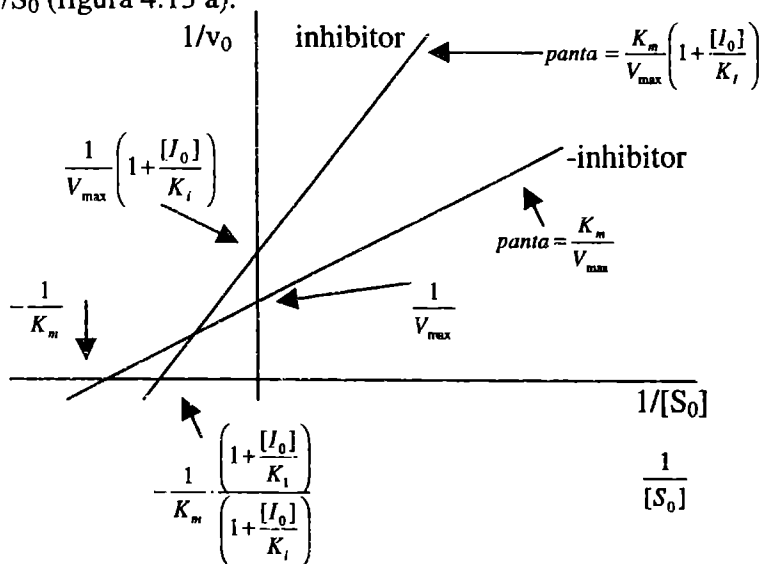


Fig.4.13 a) Graficul Lineweaver-Burk pentru inhibiția mixtă, când $K_i > K_i$.

Această formă de inhibiție mixtă este denumită inhibiție competitivă-non-competitivă, deoarece tipul de inhibiție observat este între cel al inhibiției competitive și non-competitive (figurile 4.5 și respectiv 4.11).

Când $K_I < K_i$, graficele se intersectează încrucișează la stânga axei $1/v_0$ dar dedesubtul axei $1/S_0$ (figura 4.13 b). Această formă de inhibiție mixtă se numește inhibiție non-competitivă-necompetitivă, deoarece tipul de inhibiție este intermediar între acestea (figurile 4.11 și respectiv 4.8)

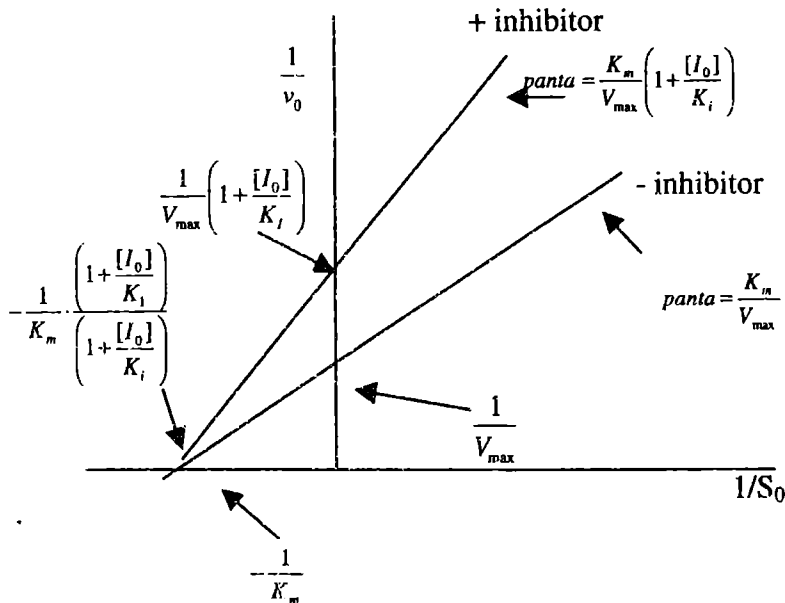


Fig.4.13 b) Graficul Lineweaver-Burk pentru inhibiția mixtă, când $K_I < K_i$.

În oricare din cele două cazuri K_I și K_i se determină din graficele secundare. În cazul inhibiției mixte:

$$\frac{1}{V'_{\max}} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right) \quad (4.49)$$

și deci:

$$\text{panta pentru reacția inhibată} = \text{panta reacției neinhibate} \cdot \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right).$$

Deci graficul secundar $1/V'_{\max}$ funcție de $[I_0]$ va fi linear, intersecția cu axa $[I_0]$ dând $-K_I$ (figura 4.14 a), iar reprezentarea pantei graficului primar funcție de $[I_0]$ va fi de asemenea linear, intersecția cu axa $[I_0]$ dând $-K_i$ (figura 4.14 b).

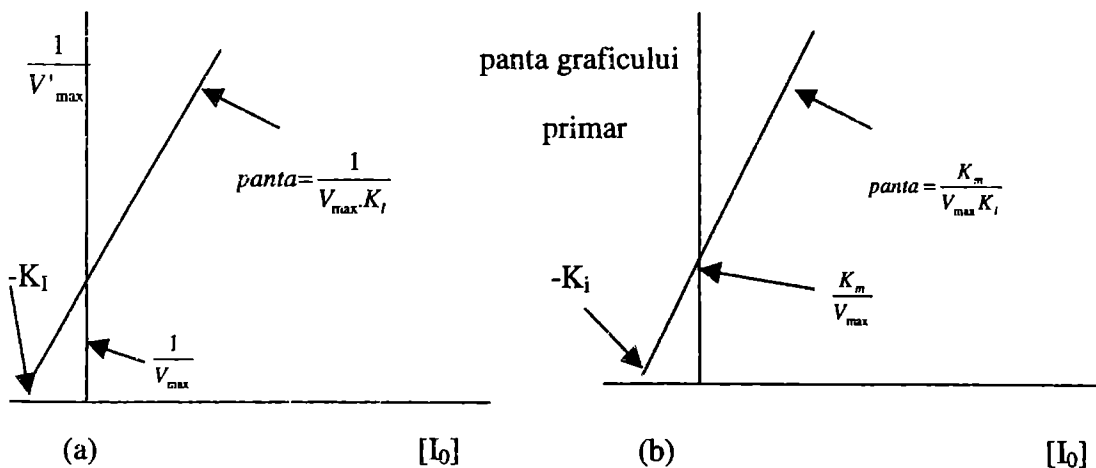


Fig. 4.14 Graficele secundare pentru inhibiția mixtă.

Deoarece $K'_m = K_m \frac{(1 + \frac{[I_0]}{K_i})}{(1 + \frac{[I_0]}{K_I})}$ rezultă că graficul K'_m funcție de $[I_0]$ nu va fi linear.

Ecuția vitezei inițiale v_0 dedusă mai sus este relativ generală deoarece nu sau făcut nici un fel de ipoteze relative la valorile K_i și K_I , ea poate fi simplificată pentru cazuri speciale. Dacă ESI nu se poate forma atunci $K_I = \infty$ și ecuația devine identică cu cea pentru inhibiția competitivă, indiferent dacă substratul și inhibitorul se leagă la același centru sau la centre de legare diferite.

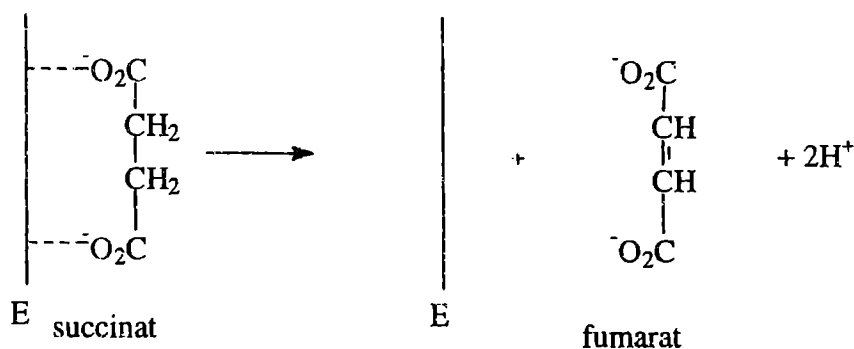
Dacă complexul ESI se poate forma, dar nu are loc formarea complexului EI, atunci $K_i = \infty$ și ecuația se simplifică la cea corespunzătoare tipului de inhibiție necompetitive.

Când $K_i = K_I$, ecuația se reduce la cea corespunzătoare inhibiției non-competitive lineare simple.

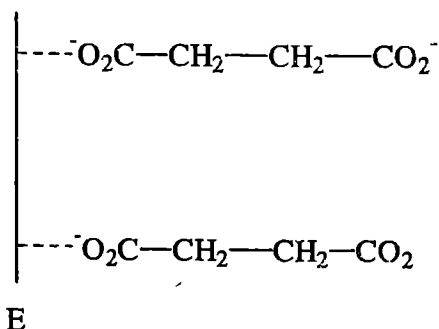
4.1.1.5 Inhibiția prin substrat

Caracteristica reacțiilor catalizate enzimatic, așa după cum s-a arătat, este aceea că la o concentrație fixă de enzimă viteza inițială crește odată cu creșterea concentrației inițiale de substrat până la o valoare limită V_{max} . La concentrații mai mari de substrat, viteza inițială pare a fi mai mică decât viteza maximă. În anumite cazuri astfel de situații pot fi explicate prin interacția dintre sistemul de detecție și substrat, iar în alte cazuri prin faptul că la concentrații foarte mari de substrat apare o inhibiție a transformării acestuia în produși.

Se consideră în continuare mecanismul posibil de inhibiție prin substrat la concentrații mari ale acestuia, pentru o reacție catalizată de succinat dehidrogenază. Pentru ca reacția să se desfășoare trebuie ca ambele grupări carboxil ale substratului să se lege de enzimă:



La concentrații foarte mari de substrat există o probabilitate crescută ca două grupări carboxil aparținând la două molecule separate de substrat să se lege de aceeași moleculă de enzimă:



În acest caz, reacția nu are loc până când una din cele două molecule nu disociază.

Trăsăturile caracteristice ale inhibiției prin substrat sunt redată în figura 4.15. În general se observă că inhibiția prin substrat apare atunci când o moleculă de substrat se leagă de enzimă și o a doua moleculă de substrat se leagă de un centru separat al enzimei rezultând un complex inactiv. Aceasta poate fi privită ca o formă de inhibiție necompetitivă a doua moleculă de substrat putând fi privită ca un inhibitor.

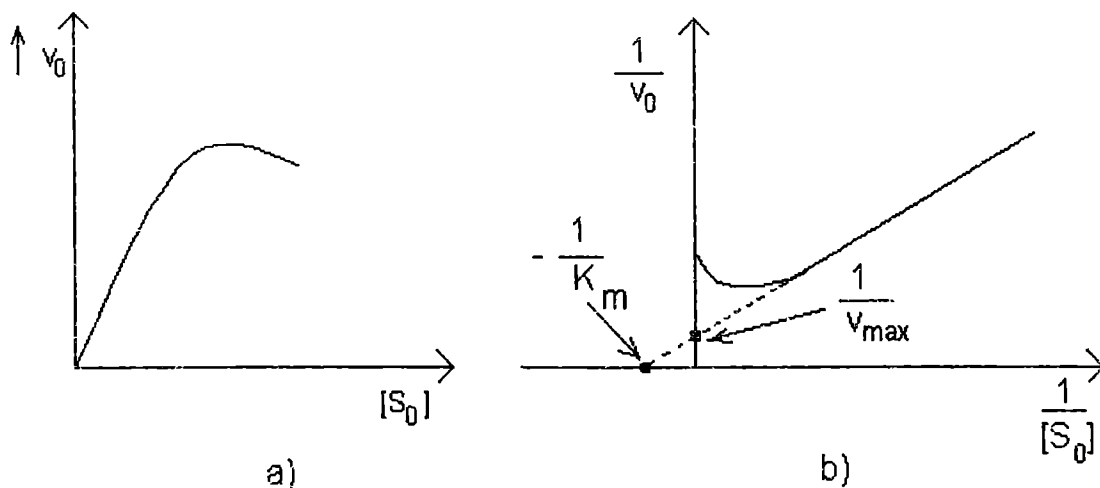


Fig. 4.15 Graficele Michaelis Menten (a) și Lineweaver-Burk (b) care redau inhibiția prin substrat

După cum s-a arătat, ecuația vitezei inițiale în cazul inhibiției necompetitive este dată prin relația:

$$v_0 = \frac{\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)} [S_0]}{[S_0] + \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)}} \quad (4.50)$$

dacă inhibitorul este identic cu substratul, ecuația devine:

$$v_0 = \frac{\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)} [S_0]}{[S_0] + \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)}} = \frac{V_{\max} [S_0]}{[S_0] \left(1 + \frac{[S_0]}{K_i}\right) + K_m} \quad (4.51)$$

Această ecuație este descrisă de curbele din figura 4.15. La concentrații mici de substrat, termenul $[S_0]/K_i$ este neglijabil, expresia reducându-se la o ecuație Michaelis-Menten normală. Când $[S_0]$ este foarte mare, atunci rezultă că:

$$[S_0] \left(1 + \frac{[S_0]}{K_i}\right) + K_m \cong [S_0] \left(1 + \frac{[S_0]}{K_i}\right) \quad (4.52)$$

ecuația simplificându-se la forma:

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{1 + \left(\frac{[S_0]}{K_i} \right)} \quad (4.53)$$

În aceste condiții v_0 scade pe măsură ce $[S_0]$ crește, așa cum s-a observat la inhibiția prin substrat pentru concentrații mari de substrat.

4.1.2. INHIBIȚIA IREVERSIBILĂ

Un inhibitor ireversibil se leagă de centrul activ al enzimei printr-o reacție ireversibilă:

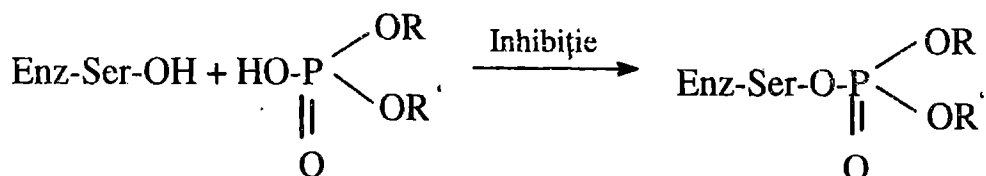


și deci ulterior nu poate disocia; în general inhibitorii de acest tip spre deosebire de cei reversibili conduc la formarea unei legături covalente între inhibitor și enzimă. Inhibitorul poate acționa asupra enzimei prin împiedicarea legării substratului de aceasta sau poate distruge anumiți componenți aparținând centrului catalitic. În practică nici un proces nu este total ireversibil dar, un inhibitor care prezintă o afinitate mare față de enzimă (constanta de disociere aproximativ 10^{-9} mol/l), este privit ca fiind nereversibil. Spre deosebire de inhibiție reversibilă unde echilibrul dintre inhibitor și enzimă este atins rapid, sistemul putând fi urmărit prin studii asupra vitezei inițiale, inhibiția ireversibilă este progresivă și crescătoare în timp, până când tot inhibitorul sau toată enzima prezentă a fost transformat în complexul enzimă-inhibitor.

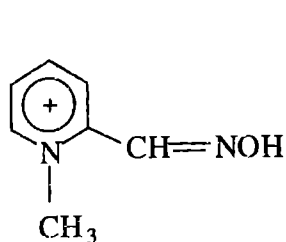
Studiile asupra vitezei inițiale nu conduc de loc sau, conduc la foarte puține informații relative la caracteristicile inhibitorului, indiferent dacă reacția dintre enzimă și inhibitorul ireversibil decurge total. Este mult mai util ca sistemul să fie descris în termenii constantei de viteză de legare a inhibitorului de substrat. Dacă aceștia reacționează în proporție de 1:1, atunci timpul necesar pentru a reduce activitatea enzimei cu 50% din valoarea inițială va fi invers proporțional cu concentrația de inhibitor (la o concentrație fixă de enzimă).

Dacă inhibitorul se află în exces, toate moleculele de enzimă se leagă de inhibitor, activitatea enzimatică scăzând practic spre zero. În general, legarea unui astfel inhibitor de centrul catalitic va distruge total activitatea enzimei, dar în condițiile legării lui de substrat poate exista probabilitatea mică a unei catalize enzimatică, în ipoteza că centrul catalitic rămâne activ și accesibil moleculelor de substrat din soluție.

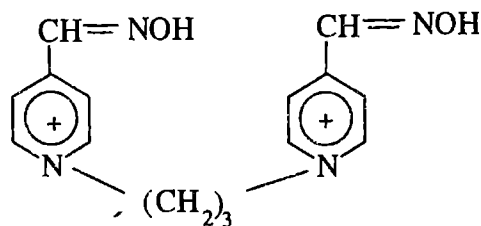
Deci, datorită naturii ireversibile a inhibiției, reacția nu poate fi discutată în termenii unei situații de echilibru ci în termenii vitezei inițiale. Parametrul important este constanta de viteză bimoleculară k_i (tabelul 4.2). Ecuația Aldridge este valabilă atunci când concentrația de inhibitor este mult mai mare decât cea a centrelor active ale enzimei. Odată cu legarea inhibitorului de enzimă, complexul tranzitoriu EI evoluează rapid spre un nou complex EI' ireversibil rezultat ca urmare a modificărilor structurale. De exemplu, legarea insecticidelor organofosforice de colinesterază duce la fosforilarea restului de serină din centrul catalitic al enzimei:



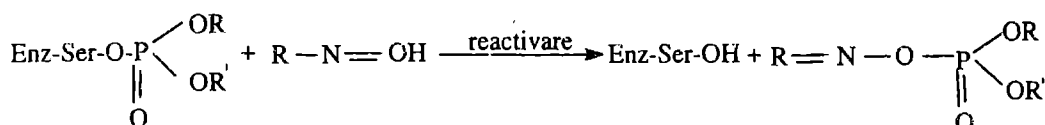
Activitatea enzimei nu poate fi regenerată prin scăderea concentrației de inhibitor, astfel înât enzima trebuie regenerată și reactivată utilizând reactivi speciali. Colinesterazele fosforilate pot fi reactivate prin folosirea unui compus puternic nucleofil cum este 2-PAM ((metiodura de 2-piridinaldoxidă) sau TMB-4 (1,1'-trimetilenbis-4-(hidroxiimino-metil) bromura de piridiniu):



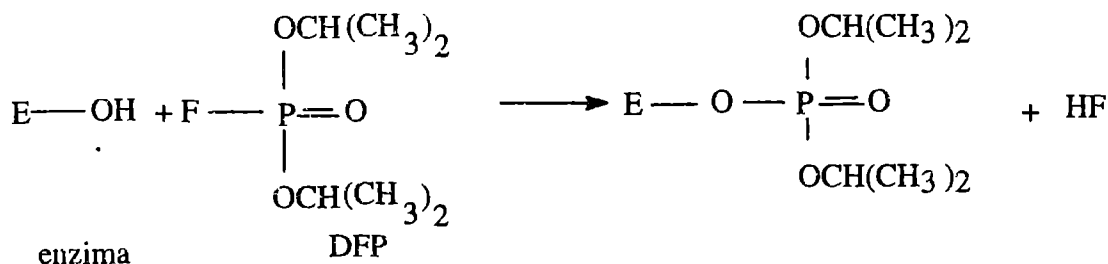
2-PAM



TMB- 4



Un exemplu în acest sens îl reprezintă diizopropilfosfofluoriodatul (DFP) care acționează asupra sistemului nervos prin inactivarea acetilcolinesterazei:



Inhibitorii ireversibili reduc în mod efectiv concentrația enzimei prezente. Un inhibitor de concentrație inițială $[I_0]$ va reduce concentrația de enzimă activă de la valoarea $[E]$ la $[E] - [I]$, presupunând că acesta ne se găsește în exces. Dacă, după un timp oarecare în care reacția dintre inhibitor și enzimă a decurs total, în amestecul de reacție se introduce substratul, se obține o ecuație de tipul Michaelis-Menten. Valoarea de K_m va fi identică cu cea obținută pentru cazul unei reacții neinhibate, dar V_{\max} se va reduce la o valoare notată cu V'_{\max} .

$$\text{În absența inhibitorului} \quad V_{\max} = k_{cat} [E_0] \quad (4.54)$$

$$\text{În prezența inhibitorului} \quad V'_{\max} = k_{cat} ([E_0] - [I_0]) \quad (4.55)$$

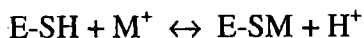
$$\frac{V'_{\max}}{V_{\max}} = \frac{[E_0] - [I_0]}{[E_0]} \quad (4.56)$$

$$V'_{\max} = V_{\max} [E_0] \left(1 - \frac{[I_0]}{[E_0]} \right) \quad (4.57)$$

Rezultate similare se pot obține chiar dacă reacția dintre inhibitor și enzimă nu de curge total, în ipoteza că gradul de inhibiție a fost constant pe perioadaefectuării studiilor asupra vitezei inițiale. Deci, în cazul inhibitorilor ireversibili pot apărea forme de inhibiție asemănătoare cu cele ale inhibiției non-competitive și care prezintă valori nemodificate de K_m și valori reduse ale V_{\max} , chiar în condițiile în care inhibitorul se leagă la același centru ca și substratul. Cu toate acestea, există o diferențiere clară între cele două tipuri de inhibiție și orice încercare de calcul a K_i din măsurători ale vitezei inițiale este sortită eșecului, deoarece în acest caz relația dintre V'_{\max} și V_{\max} nu implică

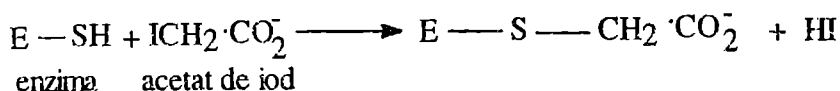
și K_m . În concluzie, dacă în urma studierii unui sistem rezultă un tip de inhibiție non-competitivă, trebuie stabilit dacă aceasta corespunde unei inhibiții reversibile sau ireversibile.

Ionii metalici (tabelul 4.1) pot fi considerați drept inhibitori ireversibili datorită vitezei foarte mici a reversibilității inhibiției. Acești compuși acționează prin legarea metalului de grupele tiol ale proteinelor. În consecință, ținta principală a acțiunii metalelor grele o reprezintă enzimele din clasa dehidrogenazelor și oxidazelor care prezintă resturi de cisteină în jurul centrului activ:



În unele cazuri, enzimele care au fost inhibitate cu metale grele pot fi reactivate prin folosirea unor agenți de complexare cum EDTA sau tiolii (ditiotreitoli).

Mulți inhibitori ireversibili atacă grupele $-SH$ ale catenei laterale aparținând cisteinei, care sunt prezente în centrul activ al enzimelor. Exemple în acest sens sunt date de o serie de agenți cum sunt acetatul de iod și iodacetamida, care formează legături covalente cu grupele $-SH$:



O altă diferență comparativ cu inhibiția reversibilă este necesitatea realizării unei incubări prealabile între enzimă și inhibitor fapt datorat vitezei mici a procesului de inhibiție. Din acest motiv gradul inhibiției și sensibilitatea sistemului sunt direct corelate cu timpul de incubare.

Inhibitorii ireversibili prezintă importanță și în studiul centrului activ al enzimelor, datorită faptului că, spre deosebire de substrat, aceștia rămân ferm legați de unul dintre resturile de aminocizi prezenți în structura enzimei acționând astfel ca markeri pentru identificarea acestuia.

4.2. INHIBIȚIA ENZIMELOR IMOBILIZATE PE SUPRAFAȚA BIOSENSORILOR

Folosirea enzimelor imobilizate în locul celor solubile ridică o serie de noi probleme în detectarea inhibitorilor. În primul rând, imobilizarea unei enzime în general conduce la modificări conformaționale ce-i pot afecta activitatea și sensibilitatea la inhibiție. De exemplu, s-a arătat faptul că inhibiția în soluție a L-glicerofosfat oxidazei de către sărurile mercur a fost reversibilă și non-competitivă și ireversibilă în urma imobilizării ei într-un film de gelatină. În plus, o serie de lucrări au demonstrat că imobilizarea conduce la o scăderea activității enzimelor față de inhibitori.

Aspectele teoretice ale folosirii electrozilor enzimatici bazați pe reacții de inhibiție au fost analizate de către mulți cercetători. Prin utilizarea biosenzorilor, procesul inhibiției este influențat de o serie de parametri noi și diverși cum ar fi efectele micromediului, limitările datorate difuziei și posibilele interacții între substrat și/sau inhibitor cu membrana. Acest efect de adsorbție poate fi micșorat prin adăugarea de surfactanți, mărindu-se astfel sensibilitatea biosenzorului față de pesticidele organofosforice.

Spre deosebire de biosenzorii folosiți la determinarea substratelor, detecția inhibitorilor necesită folosirea unei cantități mici de enzimă pentru determinarea unor concentrații foarte mici de inhibitori. În consecință, electrozii enzimatici folosiți în aceste determinări analize trebuie să funcționeze sub un control cinetic. Acest concept nu este uzual în proiectarea biosenzorilor pentru determinări de substrate, unde se folosesc concentrații mari de enzime, răspunsul fiind controlat de difuzie.

În general detecția inhibitorilor decurge în trei etape (figura 4.16 a):

1. Prima etapă este determinarea răspunsului inițial (I_1) al biosenzorului față de o concentrație suficient de mare a substratului;

2. A doua etapă constă în incubarea biosenzorului cu inhibitorul pentru o perioadă definită de timp;
3. Ultima etapă este reprezentată de determinarea răspunsului rezidual (I_2) al biosenzorului folosindu-se o aceeași concentrație de substrat ca și în prima etapă. Gradul de inhibiție (I %) este apoi calculat prin compararea răspunsurilor înainte și după inhibiție, conform relației (4.58):

$$I = \frac{(I_1 - I_2)}{I_1} \times 100 \quad (4.58)$$

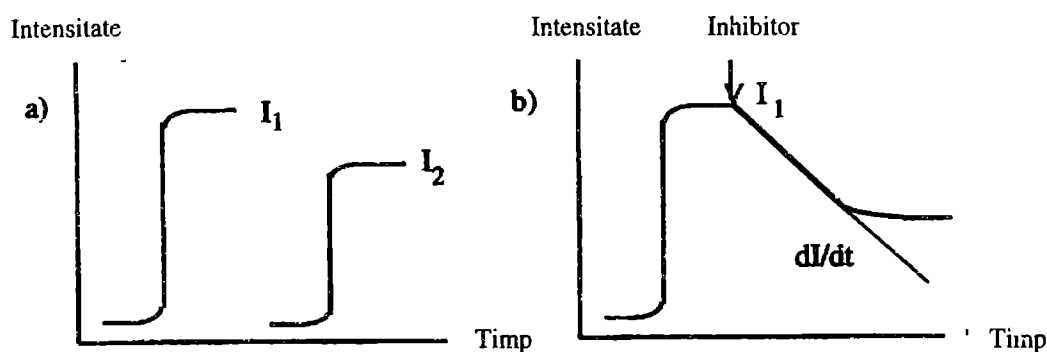


Fig.4.16 Reprezentarea schematică a două posibile metode de determinare a inhibitorilor bazate pe biosensori. a) determinarea indirectă: răspunsul față de substrat este măsurat înainte (I_1) și după (I_2) în urma incubării cu inhibitorul pe o perioadă definită de timp; b) determinarea directă: inhibitorul este adăugat în amestecul de reacție imediat după atingerea răspunsului stării staționare (I_1) față de substrat.

Principalul inconvenient al procedurii este acela că durează mult în timp deoarece presupune două măsurători separate a activității, precum și o etapă adițională de incubare cu inhibitorul. Totuși, prin această metodă pot fi determinate concentrații foarte mici de inhibitori.

O alternativă a procedurii descrisă constă în adăugarea într-o primă etapă a unei concentrații corespunzătoare de substrat în mediul de reacție. Când se atinge curentul stării staționare, în mediul de reacție se injectează o anumită concentrație de inhibitor (figura 4.16 b), ceea ce va conduce la o scădere a intensității curentului în timp (dI/dt). Inhibiția relativă (RI) se determină prin relația (4.59):

$$RI = \frac{\left(\frac{dI}{dt}\right)}{I_1} \quad (4.59)$$

Cu toate că metoda este rapidă ea prezintă dezavantajul unei sensibilități mici față de inhibitori. Acest neajuns se poate datora faptului că timpul de contact dintre enzimă și inhibitor este prea mic pentru a putea determina o inhibiție notabilă în prezența unor concentrații foarte mici de inhibitor.

4.3. APLICAȚII BIOANALITICE ALE REACȚIILOR DE INHIBIȚIE

Multe enzime sunt inhibate de o serie de substanțe care au importanță din punct de vedere al mediului, cum sunt pesticidele sau metalele grele (tabelul 4.1). Detecția acestor compuși în concentrații foarte mici necesită existența unor tehnici analitice foarte sensibile și precise. De exemplu directiva Comunității Europene relativă la calitatea apei potabile stabilește pentru pesticide o concentrație maximă admisibilă de 0,1 ppb pentru pesticidele individuale și a produșilor înrudiți și de 0,5 ppb pentru pesticidele totale. Există un număr foarte mare de metode de identificare și determinare a acestor compuși dintre care se amintesc spectrometria în U.V. și I.R.,

cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) și de gaze (GC), spectrometria de masă (MS) precum și metode tandem (GC/MS, HPLC/MS). Unele dintre acestea sunt foarte sensibile iar prin intermediul unora pot fi deosebiți compuși aparținând aceleiași clase. În ciuda sensibilității lor aceste metode au la bază o aparatură scumpă, sunt laborioase, necesită un personal calificat și nu pot fi utilizate *in situ* pentru determinări continue.

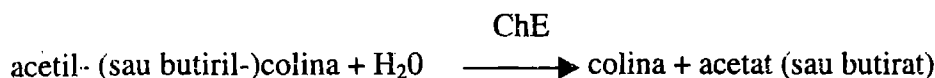
În ultimii ani, o atenție deosebită s-a acordat realizării de biosensori care permit o determinare continuă și rapidă a diferiților compuși. Astfel de instrumente au la bază enzime imobilizate și fixate pe suprafața unor traductori fizici. În acest sens au fost realizați o serie de electrozi enzimatici bazați pe reacții de inhibiție pentru determinarea unor poluanți ai mediului. Enzima cea mai des utilizată în construcția unor astfel de biosensori este colinesteraza care a fost folosită pentru determinarea insecticidelor organofosforice (care sunt inhibitori ireversibili fiind necesară reactivarea enzimei în urma inhibiției).

O altă clasă de compuși toxici importanți este reprezentată de sărurile metalelor grele. Ele sunt în general determinate folosindu-se enzime imobilizate din clasa dehidrogenazelor și oxidazelor. Trebuie menționat faptul că unele metale grele acționează și ca activatori sau cofactori ai enzimelor conducând astfel la o creștere a activității acestora în prezența poluanților. De exemplu anhidraza carbonică se leagă în mod specific de cofactorul ei –ionii de Zn^{2+} - pentru a da naștere holoenzimei active. Bazat pe aceasta, s-a realizat un sensor optic prin intermediul căruia se pot determina concentrații de ordinul nanomolar de zinc. Spre deosebire de metodele chimice de determinare, metodele enzimatică par a fi mai simple și mai sensibile. Totuși aceste instrumente suferă de lipsa unei specificități deoarece există mulți compuși care conduc la inhibarea activității enzimatică. Cu toate acestea, lipsa de specificitate poate conduce la evaluarea unui indice global de toxicitate.

4.3.1 DETERMINAREA PESTICIDELOR ORGANOFOSFORICE ȘI CARBAMATE

Insecticidele organofosforice și carbamate reprezintă un procent mare din pesticidele (insecticide, fungicide și ierbicide..) folosite în mod frecvent. Aceste pesticide au efecte dăunătoare întrucât acționează ca inhibitori ai colinesterazei care este implicată în transmisia neuronală. Nu este deci surprinzător că în literatura de specialitate cel mai frecvent sunt descriși electrozii bazați pe colinesteraze ca principalii electrozi folosiți pentru detecția pesticidelor. Acetil- sau butiril-colinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7 sau BuChE, EC 3.1.1.8), enzime ce catalizează hidroliza acetil- sau butiril-colinei la colină și acetat sau butirat, au fost purificate și sunt acum disponibile sub formă comercială. După cum s-a menționat folosirea colinesterazei în construcția biosenzorilor nu permite o determinare selectivă a unei pesticide anume, ea permițând însă o estimare a activității totale anticolinesterazice a probei. Această activitate reprezintă "indexul toxicologic" care este definit drept cantitatea de compuși care induc un procent de inhibiție colinesterazică echivalent cu cel produs de o cantitate cunoscută a unei pesticide de referință. Drept compus de referință, de cele mai multe ori, se utilizează paraoxonul, deoarece acest compus este stabil, disponibil sub formă comercială și cunoscut ca având o activitate puternic inhibitorie asupra colinesterazelor. Fiecare colinesterază a fost caracterizată prin afinitatea proprie față de insecticidele organofosforice și carbamate. Activitatea și stabilitatea colinesterazelor, precum și sensibilitatea lor față de un anumit inhibitor depind de tipul și sursa colinesterazei. Astfel, selectarea unei colinesteraze adecvate este un pas important în proiectarea unui biosenzor pentru pesticide. În continuare, se vor discuta în special aplicațiile biosenzorilor potențiometrici și amperometrici bazați pe reacții de inhibiție a enzimelor în detecția unor poluanți.

În general biosenzorii potențiometrici se bazează pe măsurarea modificărilor de pH, sau de potențial. De exemplu, modificarea pH-ului poate rezulta ca urmare a formării unui acid organic în cadrul unei reacții de hidroliză a esterului colinei, reacție catalizată de o esterază specifică, și care poate fi urmărită cu ajutorul unui electrod de pH:



Așa cum se observă din tabelul 4.3, cea mai mare sensibilitate (0,3 ppb) a fost obținută prin folosirea AchE imobilizată în gel de poliacrilamidă prin legare încrucișată și fixată pe suprafața unui electrod de sticlă. În general, cu excepția de mai sus, limitele de detecție raportate au fost în general în jur de 3 ppb (tabelul 4.3).

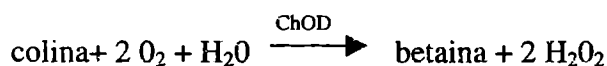
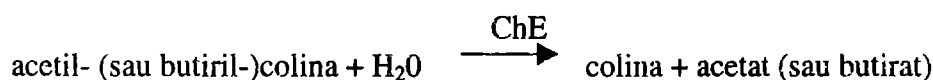
Tab. 4.3 Electrozi potențiometrici bazați pe colinesteraze [11]

Enzima	Mod de imobilizare	Limita de Detecție a paraoxonului (ppb)
BuChE (ns)	Legare încrucișată cu BSA și glutaraldehidă	3
BuChE (hs)	Imobilizare pe naylon cu HAS și glutaraldehidă	3
AchE (ns)	Legare încrucișată în Poliacrilamidă	0,3
AchE	Imobilizare pe membrană de nitrat de celuloză biotinitată folosind și legarea încrucișată bazată pe streptavidină	2,8

AChE: acetilcholinesteraza; BSA: albumina serică bovină; BuChE: butirilcolinesterază; hs : ser de cal; HSA: albumină serică umană; ns : nespecificat.

Metodele potențiometrice sunt rapide și precise, dar ele au limite de detecție relativ mari.

Metoda amperometrică de detecție este în general mult mai sensibilă, permițând totodată obținerea unui semnal analitic direct proporțional cu concentrația analitului. În funcție de substratul colinesterazic implicat în reacție, au fost descrise diferite metode amperometrice implicând sisteme mono- sau bi-enzimatică, bazate pe detecția tiocolinei, O₂, H₂O₂, sau 4-aminofenol. Astfel, au fost realizați electrozi bienzimatici implicând reacții cuplate între colinesterază și colin oxidaza (ChOD), având drept substrat acetil- sau butiril-colina, măsurătorile fiind bazate pe detecția oxigenului sau a apei oxigenate (ultima fiind mai sensibilă, tabelul 4.4):

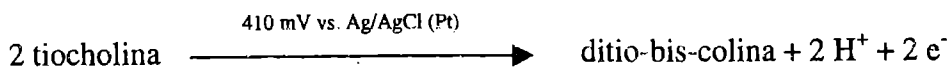
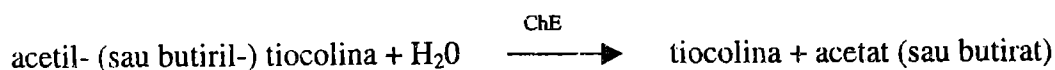


Este posibilă efectuarea unei reacții de hidroliză preliminară a substratului folosind colinesteraza în soluție urmată de detecția colinei prin intermediul biosenzorului pentru colină, obținându-se în acest fel o limită de detecție de 0,5 ppb paraoxon. Folosindu-se un biosenzor pentru colină în care AchE a fost imobilizată separat de ChOD, fapt care permite efectuarea incubării și a realizarea măsurătorilor în mod independent, obținându-se o limită de detecție de 1,3 ppb paraoxon.

Un alt mod de proiectare constă în co-imobilizarea celor două enzime pe suprafața electrodului, ceea ce a condus la obținerea unor sensibilități mai mari și a unor timpi de răspuns mai mici.

Proiectarea senzorului și optimizarea performanțelor acestuia pot fi simplificate prin folosirea unor sisteme mono-enzimatică bazate pe hidroliza acetil- sau butiril tiocolinei de către o

colinesterază selectată (AChE sau BuChE). Folosind acest principiu, detecția se bazează pe oxidarea tiocolinei produse la suprafața unui electrod de platină (tabelul 4.5):



Tab. 4.4 Electrozi bienzimatici bazați pe detecție amperometrică (detecția O_2 sau a H_2O_2).

Modul de immobilizare al enzimelor	Potențialul	Limita de detecție a paraoxonului (ppb)
BuChE (hs) + ChOD Două enzime pe membrană de dializă	Electrod de oxigen tip Clark	300
AChE (ns) + ChOD Legare covalentă pe naylon folosindu-se glutaraldehida	650 mV vs. Ag/AgCl (Pt)	2
(AChE (ns) or BuChE (ns) + ChOD) Legare covalentă pe naylon folosindu-se glutaraldehida	650 mV vs. Ag/AgCl (Pt)	2
AChE (ee) + ChOD Imobilizare pe PVA-SbQ	650 mV vs. Ag/AgCl (Pt)	0,03
AChE (ee) + ChOD Imobilizare pe PVA-SbQ	650 mV vs. Ag/AgCl (Pt)	2,8

AChE: acetilcolinesteraza; BSA: albumina serică bovină; BuChE: butirilcolinesterază; ChOD: colin oxidază; hs : ser de cal; PVA-SbQ: alcool polivinilic conținând grupe de stirilpiridiniu.

Tab. 4.5 Electrozi monoenzimatici bazați pe detecție amperometrică (oxidarea tiocolinei).

Modul de immobilizare al enzimei	Potențial	Limita de detecție a paraoxonului (ppb)
BuChE (hs) / legare încrucișată cu glutaraldehidă	250 mV față de Ag/AgCl (electrod de cărbune modificat cu CoPC)	0,08
AChE sau BuChE (hs)/legare încrucișată cu glutaraldehidă	300 mV față de Ag/AgCl (electrod de cărbune modificat cu CoPC)	1,5
AChE și/sau BuChE (hs) / legare încrucișată cu BSA și glutaraldehidă	250 mV față de Ag/AgCl (electrod de grafit modificat cu CoPC)	2,8
AChE / imobilizare în grafit-epoxi	700 mV față de Ag/AgCl	28
AChE / imobilizare în PVA-SbQ	410 mV față de Ag/AgCl (Pt)	0,03
AChE (be) sau BuChE (hs) Imobilizare pe particule de siliciu aminate în epoxi-grafit	300 mV față de Ag/AgCl (electrod de grafit modificat cu TCNQ)	27,5
AChE / imobilizare în PVA-SbQ	410 mV față de SCE (Pt)	0,3

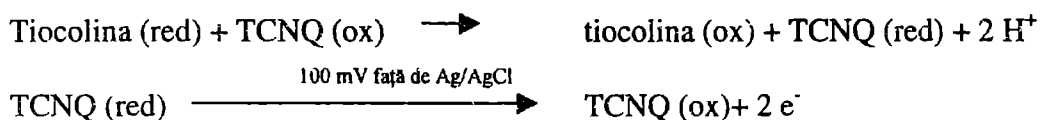
AChE: acetilcolinesteraza; be: eritrocite de bovină; BSA: albumină serică bovină; BuChE: butirilcolinesteraza; CoPC: cobalt ftalocianină; hs: ser de cal; ns: nespecificat; PVA-SbQ: alcool polivinilic conținând grupe de stirilpiridiniu; TCNQ: tetracianoquinodimetan.

În acest fel, potențialul este mai mic decât cel folosit pentru oxidarea H₂O₂ descrisă anterior (410 mV în loc de 650 mV față de Ag/AgCl și platină). Deasemenea, este posibilă obținerea de rezultate similare prin folosirea mediatorilor cum ar fi TCNQ sau CoPC. Astfel, prin legarea încrucișată a BuChE cu glutaraldehida pe suprafața unui electrod de carbon modificat cu cobalt ftalocinaină (CoPC) s-au putut detecta 0,08 ppb paraoxon. Folosindu-se AChE imobilizată pe o matrice de PVA-SbQ, limita de detecție pentru paraoxon a fost de 0,03 ppb. Unele dintre aceste studii au fost validate cu succes folosindu-se metodele cromatografice. Au fost descrise deasemenea instrumente monoenzimatice folosindu-se 4-aminofenil acetatul ca substrat; în aceste cazuri detecția s-a efectuat prin oxidarea 4-aminofenolului la un potențial de 0,25 V față de SCE pe suprafața unui electrod de cărbune sticlos. Prin intermediul acestor electrozi, este posibilă obținerea unei limite de detecție de 1,1 ppb paraoxon. Este de notat și faptul că indoxil acetatul a fost folosit ca substrat, iar detecția amperometrică s-a bazat pe oxidarea albului de indigo la 0,3 V față de Ag/AgCl. În acest caz, s-a folosit butiril colinestreraza în soluție.

În concluzie, pot fi realizați biosensori prin co-imobilizarea a două colinestrase diferite pe același suport, fapt care prin comparație cu senzorii care folosesc o singură colinesterază specifică, conduce la creșterea numărului de pesticide care pot fi detectate, mărindu-se în acest mod domeniul compușilor care pot fi determinați.

Una din principalele cerințe în vederea detecției inhibitorilor este necesitatea reactivării enzimei inhibate în scopul realizării unor determinări continue. După cum s-a arătat, în cazul inhibitorilor ireversibili ai colinesterazei, cum sunt insecticidele organofosforice, reactivarea enzimei este realizată prin folosirea unui agent puternic nucleofilic cum este fi 2-PAM sau TMB-4.

Un alt mod de determinare se bazează pe utilizarea electrozilor "screen printed" modificați cu TCNQ ca mediator redox, care permit aplicarea unui potențial mai puțin oxidant (100 mV față de Ag/AgCl); prin aceasta scad totodată și interferențele posibile existente în probele reale.



Determinarea activității rămase după incubarea cu inhibitor permite calcularea procentului de inhibiție (% I) care este corelat cu concentrația inhibitorului. Electrozii "screen printed" modificați cu AchE prezintă o bună stabilitate și reproductibilitate a determinărilor. Stabilizarea curentului de bază și a timpului de răspuns au fost de până la 2-3 minute.

Există posibilitatea comparării gradului de inhibiție a enzimei libere din soluție (caracterizată prin constanta de inhibiție, k_i) și sub formă imobilizată (caracterizată prin valoarea I_{50} , concentrația de inhibitor pentru care se obține 50% din inhibiție). Așa cum se poate observa în tabelul 4.6, enzimele își păstrează sensibilitatea față de inhibitori chiar și atunci când sunt sub formă imobilizată. Valorile raportului k_i și I_{50} variază (cresc sau descresc) în același mod. Este important de notat că printre enzimele modificate, unele sunt de 100 ori mai sensibile față de insecticide și deci este posibilă folosirea acestora în construcția biosenzorilor pentru detecția pesticidelor în concentrații foarte mici. Enzimele modificate, permit detecția unor concentrații de până la 0,5 ppb paraoxon și carbofuran.

Electrozii "screen printed" modificați cu AchE sunt electrozi de unică folosință, produși în masă, la un preț de cost scăzut și ușor de reprodus. Insecticidele organofosforice și carbamate sunt compuși hidrofobi care necesită solvenți organici pentru extracția și concentrarea lor. În prezent se studiază inhibiția în medii organice, incluzând atât solvenții solubili în apă (etanol) cât și insolubili în apă (hexan).

Tab. 4.6 Comparația valorilor $k_{i(wt)}/k_{i(m)}$ determinate pentru enzimele libere și a valorilor I_{50} (ppb) determinate pentru enzimele imobilizate. Raportul $k_{i(wt)}/k_{i(m)}$ unde $k_{i(wt)}$, reprezintă enzima brută și $k_{i(m)}$, reprezintă enzima mutantă m.

	Paraoxon			carbofuran	
	$K_{i(wt)}/k_{i(m)}$	I_{50} (ppb)		$K_{i(wt)}/k_{i(m)}$	I_{50} (ppb)
F368W	74	>10	F368L*	4.42	>10
WT	1	7.5	F368W	3.33	8.8
Y408F	0.43	1	WT	1	1
F368L*	0.42	2.1	Y408F	0.57	0.7

*Exemplu, F368L corespunde enzimei mutante în care fenilalanina din poziția 368 a fost înlocuită de către leucină, acest fapt conducând la formarea unei enzime modificate mult mai sensibilă față de paraoxon (raportul $k_i < 1$) și mult mai rezistentă la acțiunea carbofuranului (raportul lui $k_i > 1$)

În acest scop se folosește o metodă în două etape (figura 4.17): inhibiția colinesterazei de către pesticide este realizată în solvent organic în timp ce activitatea remanentă este măsurată în tampon. Se poate nota faptul că, folosirea etanolului ca solvent permite măsuratori atât a activității enzimatice cât și a inhibiției în același mediu organic. Prin intermediul acestei metode în două etape este posibilă detecția a 1,4 ppb paraoxon, inhibiția realizându-se în etanol sau în amestec hexan/apă (80/20).

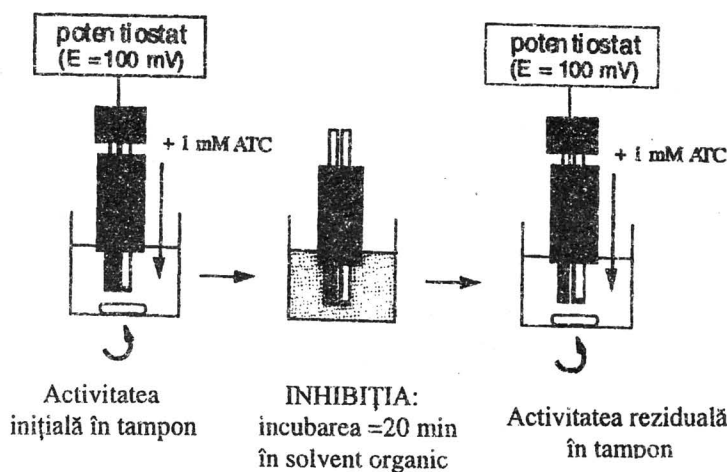


Fig 4.17 Măsurători în două trepte ale inhibiției/activității

Inițial electrodul (un sistem de doi electrozi, indicator și referință) este introdus în soluția tampon și este conectat la un potențostat; se determină activitatea inițială (răspunsul față de o soluție de acetilcolină 1 mM). Ulterior electrodul este deconectat, iar inhibiția este realizată prin introducerea electrodului timp de 20 min. într-o soluție de insecticid preparată în solvent organic. În final, electrodul este conectat la potențostat iar activitatea reziduală este determinată în soluție tampon (răspuns față de soluția de 1mM acetilcolină). În final se determină procentul inhibiției.

4.3.2 DETERMINAREA FUNGICIDELOR DITIOCARBAMATE

Biosensorul bazat pe aldehyd-dehidrogenază (AIDH) este utilizat în detecția fungicidelor ditiocarbamate, deoarece s-a dovedit că acești compuși sunt potențiali inhibitori ai AIDH. Sărurile etilenbisditiocarbamate cum ar fi maneb, zineb și mancozeb sunt componenți majori ai fungicidelor ditiocarbamate. În ciuda toxicității lor scăzute acești compuși sunt potențiali agenți cancerigeni și mutageni. Maneb, zineb și mancozeb sunt incluse într-o listă de prioritate a Comisiei Europene

pentru pesticidele care sunt folosite într-o cantitate mai mare de 50 tone pe an în lume și care pot fi regăsite în apa din sol. Metoda clasică de determinare a acestor compuși este bazată pe o hidrolază preliminară a compusului în urma căreia rezultă disulfura de carbon. Acest compus poate apoi fi detectat folosind metode spectrometrice sau cromatografice.

Pentru detecția funcigidelolr ditiocarbamate s-a realizat un biosensor bazat pe asocierea aldehyd dehidrogenazei și diaforezei. Diaforaza reoxidează NADH-ul la NAD^+ cu reducerea concomitentă a ferocianurei la ferocianură. Ferocianura produsă este apoi oxidată la un potențial scăzut (250 mV vs SCE) la suprafața unui electrod de platină. Când în mediu este prezent un inhibitor al aldehyd dehidrogenazei, activitatea ALDH descrește, conducând la o scădere a răspunsului sensorului. Metoda de măsurare a ditiocarbamaților este redată în figura 4.18. După stabilizarea curentului de bază, reacția este inițiată prin adaugare de NAD^+ și aldehydă propionică. În scopul eliminării influenței NAD^+ existent în stratul sensibil se realizează o determinare ulterioară, efectuată în absența NAD^+ . Incubarea cu inhibitor se efectuează pe o perioadă definită de timp, reacția fiind inițiată prin adaugarea de NAD^+ și aldehydă propionică. Procentul de inhibiție este determinat prin compararea răspunsului sensorului înainte și după inhibiție.

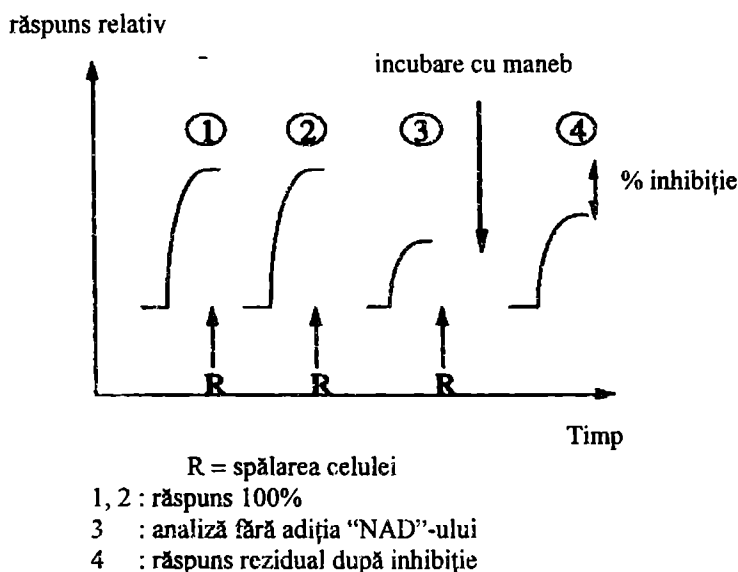


Fig.4.18 Metoda de măsurare a ditiocarbamaților

Sensibilitatea sensorului a fost optimizată prin descreșterea cantității de enzimă imobilizată și prin creșterea timpului de incubație cu pesticid. În figura 4.19 se poate observa că pe măsură ce cantitatea de enzimă este redusă, viteza inhibiției crește. De exemplu, pentru o concentrație de 13 ppb maneb se obține 20% inhibiție, pentru un sensor care conține 80 mUI de enzimă și 65% pentru un sensor conținând 16 mUI.

Pe de altă parte, mărind timpul de contact între pesticid și senzor se poate mări sensibilitatea. De exemplu, folosind 16mUI de enzimă, la o concentrație de 7 ppb maneb se obține 20% inhibiție, pentru un timp de incubare de 2 minute și 55 % pentru un timp de incubare de 10 minute.

Concentrația cea mai mică de maneb detectată cu ajutorul sensorului a fost de 1,5 ppb. Prin comparație, metoda gaz-cromatografică permite detectarea a 20 ppb, iar cromatografia de lichide de înaltă performanță a 200 ppb, în timp ce metodele standard spectrometrice permit detectarea numai a 400 ppb.

Metoda bazată pe biosenzori este mult mai sensibilă și simplă comparativ cu alte metode. Unul dintre dezavantajele metodei constă în faptul că inhibiția aldehyd dehidrogenazei este

ireversibilă. Acest neajuns poate fi înlăturat prin folosirea electrozilor pe bază de pastă de carbon, care sunt de unică folosință și au un preț de cost scăzut.

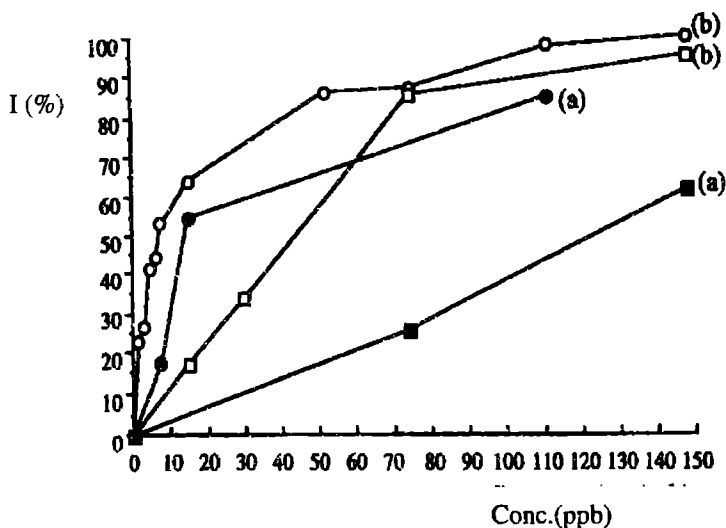


Fig.4.19. Influența concentrației de enzimă și a timpului de incubare asupra sensibilității biosezorului față de maneb; (a) timpul de incubare 2 min. (●)0.016 UI, (■) 0.080 UI timpul de incubare 10 minute (○) 0.016 UI (□) 0.080 UI

Un alt inconvenient al metodei este legat de solubilitatea scăzută a acestor compuși în apă și în solvenți organici, ceea ce face dificilă atât extracția cât și detecția acestora. S-a sugerat mărirea solubilității fungicidelor etilenbis-ditiocarbamate prin transformarea pesticidelor într-o formă disodică foarte solubilă. Aceasta se poate realiza prin pretratarea lor cu o sare disodică a acidului etilendiaminotetraacetic în condiții slab bazice (Figura 4.20).

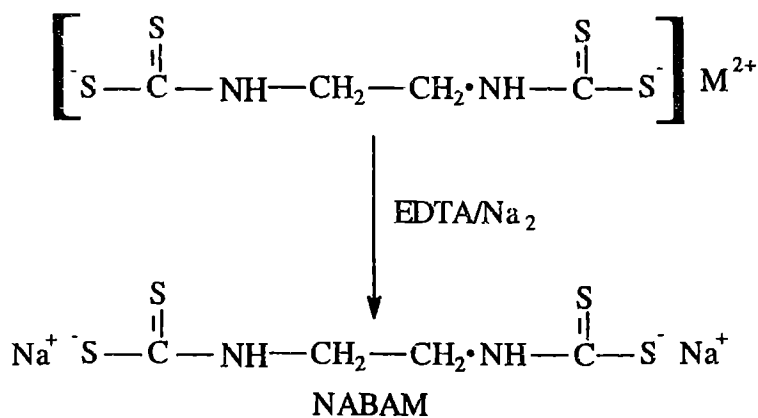


Figura 4.20 Transformarea etilenbis-ditiocarbamaților în sărurile sodice (nabam) prin intermediul EDTA.

În afara obținerii unei solubilități mari, această formă disodică corespunde compusului nabam, care este un alt fungicid etilenbis-ditiocarbamat cunoscut ca inhibitor al aldehid dehidrogenazei. Întrucât nabamul este un pesticid disponibil comercial, este posibilă folosirea acestui compus ca pesticid de referință.

5. BIOSENSORI. APLICAȚII ANALITICE

Proiectarea, construcția și caracterizarea biosensibilor constituie o problemă de mare actualitate pe plan mondial, aceasta datorându-se în principal aplicațiilor multiple ale acestor noi instrumente analitice.

Evoluția biosensibilor, s-a datorat în mare parte progreselor înregistrate în cadrul a două domenii de înaltă tehnologie și anume: biotehnologia și electronica. Diversificarea cercetărilor din domeniul biotehnologiei, a condus la necesitatea realizării unor tehnici îmbunătățite de detecție, incluzând și metodele bazate pe biosensibili. Noile produse rezultate din cercetările biotehnologice impuneau un control riguros al acestora, pe de o parte, precum și optimizarea proceselor fermentative și biochimice, pe de altă parte, lucru care poate fi realizat prin intermediul biosensibilor. Deasemenea, computerizarea sistemelor instrumentale simple a condus la creșterea capacității de procesare a unui număr mare de date. Din acest moment s-a simțit nevoia diversificării sensibilor, aceștia urmând să corespundă necesităților impuse de computerizare.

Sensibili, sunt dispozitive care sesizează variația unor parametri din sistem prin emiterea de semnale corespunzătoare, corelate cu mărimea (intensitatea) parametrului respectiv. Se mai numesc și *traductori*, după funcția lor de a transforma anumiți parametri ai sistemului în mărimi de altă natură. Sensibili care emit un semnal corelat cu concentrația unei specii din proba de analizat se numesc *sensibili (traductori) chimici*. Dacă semnalul de ieșire al unui traductor analitic este de natură electrică, dispozitivul respectiv se numește *traductor electrochimic* sau *sensor electrochimic*.

Biosensibili pot fi definiți în modul cel mai simplu ca: "*instrumente analitice care transformă activitatea biologică într-un semnal cuantificabil*" [12]. Aceștia constau dintr-un sistem de doi traductori în contact direct (figura 5.1), și anume:

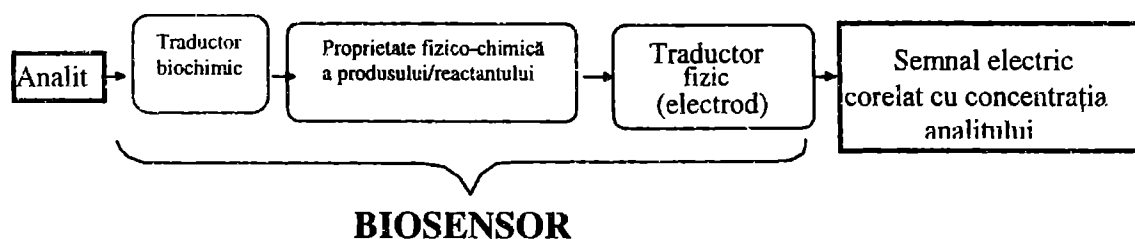


Fig. 5.1 Reprezentarea schematică a unui biosensor [13]

unul *biochimic* (responsabil pentru selectivitatea instrumentului analitic) și unul *fizic* (responsabil pentru sensibilitatea acestuia) și care corelează concentrația compusului de analizat cu un semnal electronic.

Dintre traductorii *biochimici* cel mai adesea se utilizează enzimele, dar și imunoagenți, chemoreceptori, țesuturi și organite celulare și chiar microorganisme intacte.

Dintre traductorii *fizici* pot fi menționați cei electrochimici, piezoelectrics, termistorii, cei optoelectronici ș.a. (tabelul 5.1).

În paralel cu extinderea cercetărilor din domeniul biosensibilor, s-a intensificat și cercetarea în domeniul electrozilor chimic modificați. Acest domeniu de cercetare este

atractiv datorită multiplelor lui aplicații [14]. Un aspect interesant din acest domeniu, îl reprezintă faptul că suprafața electrodului poate fi modificată chimic, în mod selectiv, în scopul utilizării acestora în cadrul unor determinări practice specifice. Cercetările din acest domeniu vor conduce la noi direcții în proiectarea și realizarea biosensozilor.

Tab. 5.1. Componente utilizate în construcția biosensozilor[12]

Traductori biochimici	Traductori fizici
Organisme	Potențiometrici
Țesuturi	Amperometrici
Celule	Conductometrici
Organite	Impedimetrici
Acizi nucleici	Optici
Enzime	Calorimetrici
Componente enzimatică	Acustici
Receptori	
Anticorpi	

Biosensozii clasici convenționali, sunt construiți folosindu-se tehnologia “bulk” în care componentele individuale sunt asamblate fizic. Acest mod de construcție al electrozilor, este limitat la două suprafețe dimensionale, astfel încât, fiecare sensor trebuie construit individual. Inconveniențele acestei tehnologii clasice, sunt legate, în primul rând, de faptul că este foarte dificilă realizarea optimizării micromediului suprafeței, biosensozii astfel realizați fiind greu de miniaturizat. Deasemenea, membranele, relativ groase, impun procese complexe și lente de difuzie astfel încât reactanții să reacționeze cu enzima, precum și pentru ca produșii de reacție să ajungă la suprafața electrozilor. Vitezele de difuzie mici afectează timpul de răspuns al electrozilor, și deci rapiditatea determinărilor. În plus, pentru senzorii având la bază procese lente și complexe de difuzie, vitezele de difuzie trebuie să rămână constante pentru ca altfel calibrarea și mai important, păstrarea calibrării, sunt dificil de realizat. Un număr de factori pot influența vitezele de difuzie precum și performanțele stratului enzimatic și în final caracteristicile de răspuns ale senzozilor. Datorită celor menționate mai sus, rezultă clar faptul că în general, construcția majorității biosensozilor este dificil de realizat. În concluzie, se poate afirma că tehnologia “bulk” nu corespunde tendințelor actuale de miniaturizare și microelectronizare a senzozilor. Miniaturizarea biosensozilor este un aspect critic în aplicațiile acestor instrumente “*in vivo*” în domeniul clinic.

Microelectronica este strâns legată de miniaturizare datorită circuitelor electrice de dimensiuni reduse și a electronicii generate de tehnologia semiconductorilor. Scopul final pentru reunirea dintre biosensozii și microelectronică este realizarea unui “biocip” (adică integrarea unui sistem de biosensozii cu un “micro-cip” pentru a rezulta un sistem bioelectric), în cadrul căruia senzozii multipli și procesarea electronică electrochimică se găsesc pe același “cip”. În mod ideal o astfel de tehnologie ar produce un “biocip” miniaturizat multisenzozii, care ar putea fi produs în masă, la un preț de cost scăzut. În perspectivă, biosensozii vor necesita un control intenționat al structurii moleculare a suprafeței, pentru a se realiza aplicații specifice. Microstructura suprafeței va deveni în perspectivă din ce în ce mai complicată și odată cu optimizarea acesteia, ea va putea îndeplini o funcție specifică.

5.1. BIOSENSORI CLASICI

Tendințele actuale de dezvoltare ale biochimiei analitice se caracterizează și prin utilizarea pe scară largă a metodelor electrochimice, a procedurilor care au la bază detectarea și prelucrarea unui semnal de natură electrică. Un astfel de semnal apare în urma interacției sistemului analitic cu semnalul de excitație aplicat sistemului, el fiind corelat cu natura, calitatea și cantitatea componentelor de determinat. Dacă semnalul de excitație este de natură electrică, astăzi, după natura sistemului de analizat, se folosesc funcții de timp ale curentului sau ale tensiunii foarte diferite și complexe. În general se aleg acele forme de curent sau de potențial care asigură o selectivitate și o sensibilitate maximă.

Biosensorii, reprezintă una dintre cele mai interesante combinații între reacțiile chimice, având la bază biocatalizatori și determinările chimice bazate pe electrozi. Biocatalizatorul este fixat pe suprafața electrodului, el făcând posibilă reacția unei molecule organice (substrat) în cadrul careia se consumă sau se produce o specie chimică electroactivă, care poate fi măsurată prin intermediul unui sensor electrochimic:



În construcția biosensibilor clasici au fost utilizați atât senzori potențiometrici cât și amperometrici; legat de acest aspect, în literatura de specialitate au apărut o serie de revii și monografii.

În același scop, au fost utilizați și diferiți biocatalizatori și anume: enzime, organite celulare, țesuturi, precum și celule bacteriene intacte. S-a arătat că, în unele cazuri, ultimele tipuri de biocatalizatori prezintă o serie de avantaje comparativ cu folosirea sistemelor enzimatiche, în special în condițiile în care enzima respectivă nu poate fi ușor izolată. Folosirea biocatalizatorilor în cadrul determinărilor analitice, face ca reacția să aibă loc în condiții blânde de temperatură și pH, la concentrații mici de substrat.

Urmărirea electrochimică a reacțiilor având la bază biocatalizatori, conduce deci la o tehnică eficientă cu un consum mic de reactivi, care prezintă multiple avantaje.

Din cele expuse mai sus, se poate afirma că o direcție principală de studiu din domeniul bioelectrochimiei analitice o prezintă realizarea și caracterizarea sensibilor cu membrană biocatalitică (biosensibilor).

Biosensibilor și-au găsit aplicații în domeniul chimiei analitice, clinice, a mediului înconjurător, alimentare, agrochimiei, biochimiei și biofizicii. Pe lângă faptul că prin intermediul acestora pot fi determinate substanțe biochimice importante, cum sunt: proteinele, enzimele, precum și diferiți metaboliți rezultați sau utilizați în cadrul proceselor biochimice din organism, biosensibilor pot fi folosiți și-n detectarea unor intermediari instabili, rezultați din reacții sau procese metabolice, putându-se astfel observa modificările în mecanismele reacțiilor biochimice, ceea ce în final, poate conduce la elucidarea lor.

În perspectivă, biosensibilor își vor găsi din ce în ce mai multe aplicații în controlul analitic al proceselor chimice sau biotehnologice; informația obținută rapid și continuu prin intermediul acestora va putea fi folosită pentru menținerea parametrilor caracteristici ai unui proces pe un domeniu optim.

5.1.1. PRINCIPIUL DE CONSTRUCȚIE ȘI FUNCȚIONARE AL BIOSENSORILOR

Biosensorul este un instrument analitic care are la bază un material biologic sensibil (traductor biochimic) prin intermediul căruia se pot detecta specii biochimice sau chimice în mod direct fără o prelucrare complexă a probei. Acesta este realizat prin fixarea traductorului biochimic pe suprafața unui traductor fizic adecvat care are rolul de a transforma semnalul biochimic (răspunsul biochimic) într-un semnal analitic cuantificabil și procesabil. Deci biosensorii sunt instrumente analitice constând din două traductoare biochimic și fizic în contact direct și care corelează concentrația compusului de analizat cu un semnal electric (figura 5.2.).

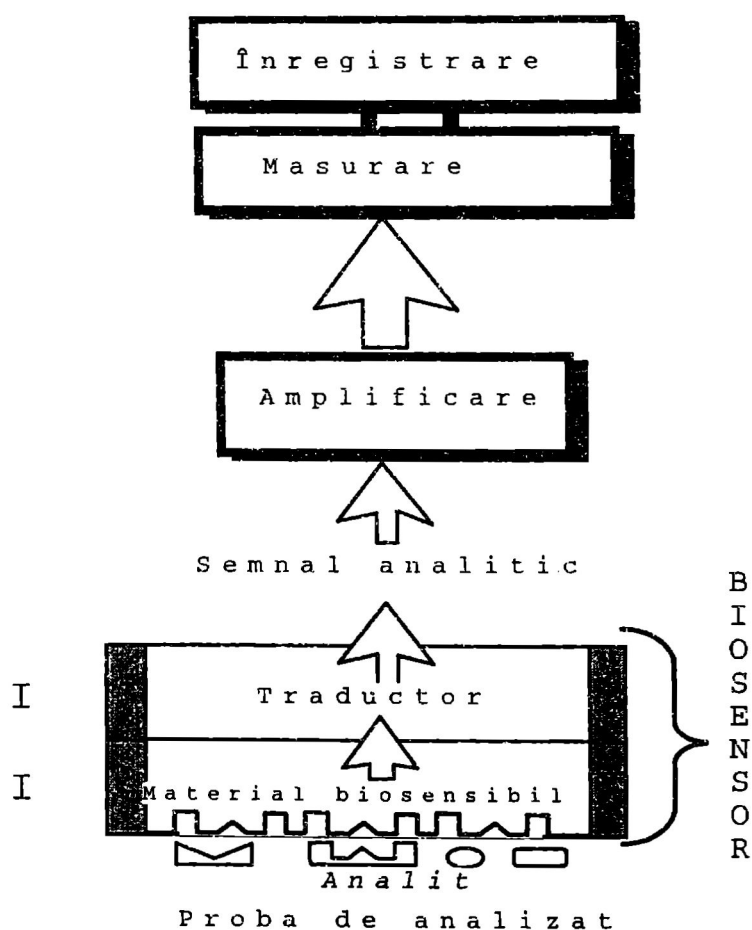


Fig. 5.2 Principiul constructiv și de funcționare al unui biosensor

Traductorul biochimic este responsabil pentru recunoașterea moleculară specifică a compusului de analizat; este evident din reprezentarea schematică a biosensorului (figura 5.2.), că recunoașterea moleculară a compușilor de analizat în amestecul de reacție se realizează pe principiul “cheii” și “lacătului” (principiul complementarității structurale) între componenta biochimică și compusul chimic de determinat.

Principiul de funcționare al unui biosensor se bazează pe difuzia substratului spre suprafața detectorului, unde are loc inițial interacția cu traductorul biochimic (enzime,

microorganismele, țesuturi, etc.); dacă componenta biochimică (moleculă biochimică) interacționează specific și reversibil cu compusul chimic de determinat (substrat), apare o modificare a unuia sau a mai multor parametri fizico-chimici asociați cu această interacție. În urma acestei interacții pot apărea modificări ale masei, de temperatură, generare de ioni, electroni, lumină sau degajare de gaze. Aceste cantități sunt transformate într-un semnal analitic de către traductorul fizic, amplificate, procesate și afișate într-o formă adecvată.

În tabelul 5.2, sunt prezentate diferitele tehnici utilizate pentru măsurarea semnalului analitic și deci care pot detecta cantitățile menționate mai sus, precum și diferitele tipuri de substanțe care pot fi determinate.

Tab. 5.2 Tipuri de traductori utilizați în construcția biosensibilor

TRADUCTOR	TIP DE DETERMINARE	APLICAȚIE
1. Electrometric		
a) conductometric	Conductanța	Reacții catalizate enzimatic
b) electrod enzimatic	Amperometrică (curent)	Substrat enzimatic, sisteme imunologice (Ag/Ac)
c) electrod ion-selectiv (EIS)	Potențiomtrică (tensiune)	Ioni în medii biologice, substrat enzimatic, imunoelectrozi
d) tranzistor cu efect de câmp (FET)	Potențiomtrică (tensiune)	Ioni, gaze, substrat enzimatic, sisteme imunologice
e) electrod gaz-sensibil	Potențiomtrică (tensiune)	Gaze, enzime, organite celulare, electrozi țesut
Impedimetric	Impedanța	Imunosensibil enzimatic
2. Optoelectronic fibre optice, dispozitive cu ghid de undă	Optic	Substrat enzimatic, analiți imunologici
3. Cristale piezoelectrice	Diferență de masă	Substanțe ușor volatile, analiți imunologici
4. Termistori	Termometrie / calorimetrie	Enzime, celule, țesut, gaze, poluanți, antibiotice, vitamine, analiți imunologici

Alegerea traductorului și construcția de bază a biosensibilor trebuie să îndeplinească o serie de caracteristici dintre care se menționează următoarele:

- selectivitate ridicată față de compusul de analizat;
- să răspundă liniar pe un anumit domeniu de concentrații relevant pentru proba analizată;
- să prezinte un timp de răspuns și de revenire rapid (circa 1-3 minute);
- să poată fi miniaturizat ;
- să poată compensa (intern) deplasarea determinată de temperatură sau de alți factori;
- să prezinte reproductibilitate în condițiile aplicațiilor practice.

Deoarece componenta biochimică este responsabilă de recunoașterea compusului de analizat dintr-un amestec complex, aceasta determină selectivitatea sensorului, fiind parțial responsabilă și de sensibilitatea acestuia. De cele mai multe ori selectivitatea biocomponentului este micșorată de traductorul fizic.

Traductorul fizic transformă semnalul biochimic într-un semnal electronic, fiind responsabil de sensibilitatea acestuia. Există o varietate mare de traductori fizici, iar dintre aceștia trebuie ales cel care este cel mai adecvat măsurării modificării proprietății fizice sau chimice rezultate în sistem. Dintre traductorii fizici se pot menționa cei electrochimici, optici, termici, piezoelectrics (tabelul 5.2). În prezent sunt utilizate și evaluate diferite tehnici de măsurare a răspunsului precum și diferite tipuri de traductori fizici. Dintre traductorii menționați cel mai adesea în practică se folosesc senzorii amperometrici și potențiometrici. Acești senzori pot constitui o alternativă puternică și ieftină la tehnologiile convenționale permițând identificarea substanțelor de analizat în prezența a numeroși compuși interferenți.

Biosenzorii prezintă o serie de caracteristici unice cum sunt: forma compactă, ușurința (simplitatea) în utilizare, posibilitatea realizării analizei într-o singură etapă fără un consum adițional de reactivi, absența radioactivității.

În tabelul 5.3, se redau o serie de substanțe (compuși de analizat) a căror determinare este frecvent întâlnită în literatura de specialitate și care pot fi dozați prin intermediul unor biosenzori de specificitate și selectivitate adecvată.

Tab. 5.3 Compuși de dozat [13]

Compuși	Exemple
Gaze anestezice	N_2O
Gaze respiratorii	CO_2, O_2
Gaze inflamabile	CH_4
Gaze toxice	CO, H_2S, Cl_2, NH_3
Metaboliți	Glucoză, uree
Metaboliți în urme	Hormoni, steroizi,
Ioni	$H^+, Li^+, Na^+, K^+, Ca^{2+}, PO_4^{3-}$
Ioni ai metalelor grele	$Pb^{2+}, Hg^{2+}, Cu^+, Cd^{2+}$
Vapori organici toxici	Benzen, toluen
Proteine, acizi nucleici	AND, ARN, cazeina
Microorganisme	Virusi, bacterii

5.1.2 DEFINIȚIA BIOSENSORILOR

Conform definiției IUPAC, un biosensor este un instrument analitic integrat și compact, capabil de a genera informații analitice cantitative sau semi-cantitative specifice, el fiind realizat prin cuplarea directă a unui bioreceptor (componenta biochimică) cu un traductor fizic. Se recomandă de asemenea, a se face o distincție clară între biosensor și sistem bioanalitic, sistem care necesită de obicei o serie de etape adiționale de prelucrare a probei cum ar fi adăugarea de reactivi. În plus, biosenzorul

5.1.3. DEZVOLTAREA ISTORICĂ A CONCEPTULUI DE BIOSENSOR

Este binecunoscut faptul că domeniul sensorilor bazați pe recunoaștere fizică este mult mai dezvoltat comparativ cu cel al sensorilor bazați pe recunoaștere chimică. În ultimii 35 de ani, s-a dezvoltat un nou concept de sensor bazat pe recunoaștere biochimică denumit *biosensor*, în construcția căruia se utilizează molecule biochimice în contact intim cu un traductor fizic.

În prezența unui substrat care poate fi recunoscut de componenta biochimică se obține un semnal care poate fi detectat prin intermediul unui traductor fizic, semnal corelat ulterior cu concentrația substratului.

Enzimele au fost des utilizate împreună cu diferiții electrozi în scopul realizării *electrozilor enzimatici*; majoritatea *electrozilor enzimatici* realizați au avut la bază detectori electrochimici comercializați, prin intermediul cărora se urmărește variația concentrației reactanților sau a produșilor implicați în reacția enzimatică și astfel în mod indirect se determină concentrația substratului enzimatic.

În anul 1962, Clark și Lyons [15] au fost primii cercetători care au descris conceptul de biosensor. Ei au studiat posibilitatea utilizării unor membrane conținând enzime specifice pentru transformarea ureei sau glucozei în produși detectabili prin intermediul unui sensor de pH, sau pentru oxigen. Autorii, au realizat un sensor pentru glucoză, obținut prin imobilizarea glucoz-oxidazei (Gox) în gel de poliacrilamidă și fixarea preparatului enzimatic obținut pe suprafața unui sensor pentru oxigen, realizând astfel un contact intim cu sensorul de oxigen (figura 5.4). Electrocul de oxigen este un sensor amperometric care măsoară intensitatea curentului care traversează celula atunci când între cei doi electrozi (catod metal nobil –Au sau Pt și anod Ag) se aplică o diferență de potențial (-0,6 V) [16]. În absența glucozei electrocul răspunde față de concentrația de oxigen din soluție. Prin adăugarea glucozei oxigenul din soluție este consumat în cadrul reacției de oxidare enzimatică a glucozei la acid gluconic și deci mai puțin oxigen ajunge la suprafața sensorului. Aceasta se traduce printr-o scădere a curentului observat (înregistrat); mărimea acestei modificări în curent este corelată cu concentrația de glucoză.

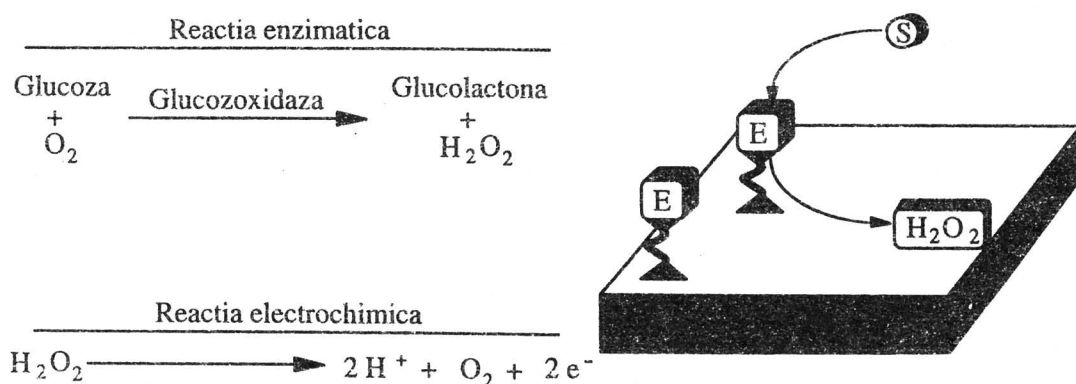


Fig. 5.4 Reprezentarea schematică a sensorului enzimatic clasic pentru glucoză (R.Clark, C.Lyons) [15].

Ulterior în anul 1967, Updike și Hicks [17] au preluat acest concept, l-au dezvoltat și au introdus termenul de "*electrod enzimatic*", pentru a descrie noul instrument analitic. Această descoperire a reprezentat un pas decisiv în analiza biochimică. Astfel s-a creat o nouă clasă de sensori numită *biosensori* (sau sensori de membrană biocatalitici). Aceștia au rezultat prin asocierea dintre sensorii existenți cum ar fi cei amperometrici, potențiometrici, termici, piezoelectrice, acustici și optici și sistemele biologice cum ar fi enzimele, celulele, microorganismele, receptorii chimici și agenți imunologici.

Interesul asupra domeniului electrozilor enzimatici a crescut mult în ultimii ani; astfel de la primele publicații ale lui Guilbault [18], care a realizat un electrod enzimatic potențiometric pentru determinarea ureei, în literatura de specialitate au apărut mii de articole legate de realizarea, caracterizarea și utilizarea practică a biosenzorilor în determinarea diferitelor substraturi. Toate acestea au condus începând cu anii 1980, la apariția unei reviste internaționale de specialitate intitulată "*BIOSENSORS*".

Lucrările de pionerat ale lui Clark și Lyons, respectiv Updike și Hicks au stimulat progresul în utilizarea enzimelor imobilizate în cadrul analizei chimice. Modul de realizare al primului sensor de glucoză este simplu drept concept, dar are și unele dezavantaje, dintre care cel mai notabil este dependența răspunsului de concentrația de oxigen. De-a lungul anilor, s-au făcut diferite încercări pentru a se minimaliza sau îndepărta această dependență; de exemplu recent Gough și colab. [19] au propus o nouă variantă de construcție a electrodului enzimatic pentru glucoză în care geometria electrodului a fost astfel proiectată încât O_2 poate ajunge la suprafața sensorului pentru oxigen atât prin difuzie axială cât și radială, în timp ce glucoza poate ajunge numai prin difuzie axială. Prin acest mod de construcție transportul de masă al oxigenului este mult mărit comparativ cu cel al glucozei și astfel problemele legate de concentrația de O_2 sunt minimalizate dar nu rezolvate.

Metodele electrochimice bazate pe electrozi enzimatici implică în mod frecvent măsurarea fie a consumului de oxigen utilizând un electrod de tip Clark, fie formarea de H_2O_2 utilizând un electrod de Pt. În ultimul caz este necesară aplicarea unui suprapotențial (+ 0,7 V), potențial la care unele specii, cum ar fi acidul ascorbic și acidul uric, sunt de asemenea electroactive. Efectul acestor interferenți determină o dificultate majoră în analiza unor probe biologice fără o pretratare prealabilă a probei.

5.1.4. APLICAȚIILE BIOSENZORILOR

Proiectarea, construcția și caracterizarea biosenzorilor constituie o problemă de mare actualitate pe plan mondial, aceasta datorându-se în principal aplicațiilor multiple ale acestor noi instrumente analitice în diferite domenii cum sunt: chimie, biochimie, controlul proceselor tehnologice și biotehnologice, medicină, agricultură, industria alimentară, mediul înconjurător, apărare și securitate. În tabelul 5.5 sunt redate aplicațiile biosenzorilor în diferitele domenii.

Numărul compușilor chimici și biochimici care pot fi determinați prin intermediul biosenzorilor este în continuă creștere, fapt datorat în principal folosirii pe scară largă a țesuturilor vegetale și animale, a microorganismelor intacte, a enzimelor solubile sau imobilizate, în realizarea acestor instrumente analitice.

Biosensorii și-au găsit largi aplicații în determinările clinice, biomedicale și farmaceutice, ei fiind utilizați tot mai mult pentru determinarea unor metaboliți importanți cum ar fi: glucoza, ureea, glutatiunea, colesterolul, alcoolul, aminoacizii, hemoglobina, etc. Domeniul biomedical constituie potențiala piață de comercializare a biosensurilor, datorită în principal posibilităților aplicației ale acestor instrumente în special în scopul menținerii sănătății. În prima fază, a fost realizat electrozodul bazat pe glucozoxidază (Gox), pentru determinarea glucozei din sânge și urină, pentru diagnosticarea diabetului. Acesta a fost urmat de electrozodul pentru lactat, realizat în scopul evaluării efortului muscular și de electrozii pentru uree și creatinină, pentru controlul funcțiilor renale. O serie de alți biosensuri au la bază, fie enzime, fie anticorpi, pentru determinarea neurotransmițătorilor, hormonilor și a altor metaboliți importanți.

Tab. 5.5 Aplicații posibile ale biosensurilor [12]

Domeniul	Aplicații
Clinic/medical	Analiza medicamentelor, analiza sângelui, monitorizarea medicamentelor terapeutice, diagnostice clinice
Industrial	Procese biotehnologice și fermentative, procese industriale și alimentare, controlul calității, detecția contaminanților, analiza apei și apelor uzate, detecția unor produși/subproduși toxici, testarea produselor cosmetice
Agricultură/veterinar	Diagnosticarea bolilor la plante și animale, detecția compușilor toxici, testarea calității solului și apei, măsurarea necesarului biochimic de oxigen, controlul calității produselor vegetale și animale, monitorizarea păstrării lor în timp.
Securitate/apărare	Detecția substanțelor chimice dăunătoare și agenților biologici, incluzind explozivi, gaze de luptă, micotoxine, viruși, bacterii patogene și toxine biologice.
Mediu	Detecția unor compuși chimici toxici în apă, aer, sol, detecția contaminării personale.
Robotică	Instrumente senzoriale pentru construcția unor sisteme automate care funcționează în medii ostile, în mediu casnic și sănătate.

Biosensuri implantabili au, de asemenea, aplicații în domeniul biomedical aceștia putând fi implantați în regiuni precise ale organismului uman, fără a fi necesară o extracție sau un consum de lichide biologice. Astfel, se pot obține rezultate imediate, care sunt extrem de utile în condițiile impunerii unor decizii rapide, spre exemplu în cazul operațiilor. În viitor, biosensuri vor putea fi utilizați în controlul și reglarea medicamentelor din organismul uman.

Există, de asemenea, o mare cerință pentru biosensuri în industria alimentară, în scopul urmăririi diferitelor etape de producție și de control al calității produsului final.

Electrozodul de glucoză este folosit pentru urmărirea procesului de fermentație, cel de lactat pentru controlul calității laptelui și iaurtului, iar cel de etanol pentru evaluarea concentrației de alcool în băuturile alcoolice.

Electrozii microbieni, pot contamina proba prin eliberarea microorganismului în mediul de determinare. Ei sunt utili, totuși, în controlul poluării mediului (cum ar fi estimarea poluării organice). Prin intermediul lor se poate determina necesarul biochimic de oxigen, care nu necesită procedee selective. Toxicitatea totală a unor compuși chimici poate fi măsurată prin urmărirea inhibiției unei enzime specifice (acetil-colinesteraza) imobilizate pe suprafața unui electrod. Biosensorii enzimatici pe bază de colinesterază reproduc inhibiția enzimatică din corpul uman și detectează compușii organofosforici prezenți ca agenți poluanți în mediu. Biosensorii pot genera informații continue asupra stării mediului înconjurător și reprezintă buni înlocuitori pentru testele biologice care utilizează specii vii, precum peștii.

Alți biosensori aflați în studiu la ora actuală vizează detecția agenților biologici, cum ar fi virușii, bacteriile și substanțele toxice, care sunt incluși în compoziția unor arme bacteriologice.

În ultimii ani combinarea cunoștințelor din electrochimie, biochimie, fizică și tehnologia circuitelor integrate a condus la realizarea unor biosenzori foarte specifici sensibili, selectivi și preciși. În perspectivă, pe plan mondial se întrevide posibilitatea comercializării biosensozilor în domeniile prezentate mai sus; în tabelul 5.6 se redă comparativ evoluția comercializării acestora în decursul anilor.

Tab. 5.6 Comercializarea pe plan mondial a biosensozilor [12].

Domeniul	1990	1995	2000
Milioane \$			
Diagnostic clinic	20	85	450
Analize industriale	3	20	145
Agricultură/veterinar	2	50	100
Apărare	2	15	85
Instrumente medicale	5	25	50
Mediu	2	20	35
Robotică	1	5	10
Diverse	-	10	20
TOTAL	35	240	895

În anul 1987 piața comercială a biosensozilor a fost de 25 milioane \$, dintre care vânzările în domeniul clinic, biomedical și al sănătății cifrându-se la aproximativ 10 milioane \$. Într-un studiu de prospectare al pieții în domeniul comercializării biosensozilor, pentru anul 2000, prognoza specialiștilor prevede o creștere a vânzărilor redată în tabelul 5.6.

5.2 TEHNICI DE IMOBILIZARE A BIOCOMPONENTILOR PE SUPRAFAȚA SENSORILOR

În mod clasic biosensorii se realizează prin “tehnologia bulk” discutată anterior, în care componentii individuali sunt fizic asamblați.

Caracteristicile de răspuns ale biosensozilor depind în principal de modul de realizare al legării (cuplării) dintre componenta biochimică și suprafața traductorului

electrochimic, deci de imobilizare a biocomponentului. Aspectele detaliate legate de imobilizarea biocomponenților pe diferite suporturi și suprafețe au fost discutate în capitolul 1. Biocomponenții, cel mai adesea utilizați în construcția biosensibilor sunt enzimele și deci se vor trata pe scurt, în special imobilizarea acestora; multe dintre metodele și tehnicile relative la imobilizarea enzimelor sunt general aplicabile pentru majoritatea biocomponenților.

Prin imobilizare enzimele pot fi ușor separate din amestecul de reacție și refolosite. În plus, printr-un control adecvat al micromediului din vecinătatea enzimei imobilizate și printr-o modificare chimică a suprafeței de electrod, intenționată, rațională și stabilă se pot obține proprietăți dorite ale acestor instrumente analitice cum ar fi: o stabilitate crescută, o sensibilitate mărită, răspuns rapid, posibilitatea utilizării lor în analiza în flux (FIA), flexibilitate în alegerea dimensiunilor și formei electrodului, posibilitatea miniaturizării acestuia, sau folosirea unor suprafețe complexe cum este RVC-ul (electrodul reticulat de cărbune vitros) și prevenirea acoperirii suprafeței cu compuși nedorți, sau precipitate, precum și eliminarea unor interferențe posibile.

Prin studii teoretice, Mell și Melloy [20] au demonstrat faptul că, curentul stării staționare pentru biosensibilii amperometrici este determinat în mare măsură de aria efectivă a electrodului, de grosimea membranei și de concentrația de enzimă imobilizată activă. Din aceste studii a rezultat că biosensibilii amperometrici având la bază straturi enzimice subțiri dar foarte active pot conduce la performanțe optime din punctul de vedere al răspunsului și al sensibilității.

După cum s-a arătat (vezi paragraful 1.4) există diferite procedee de imobilizare a componenților biochimici pe suprafața sau în imediata vecinătate a traductorului fizic. Multe dintre proprietățile biosensibilor depind de metoda de imobilizare. Termenul de imobilizare a enzimelor se referă la procesul de localizare fizică a moleculelor de enzimă, pentru a fi utilizate în cadrul unui proces catalitic continuu.

Prin ajustarea factorilor de mediu ale enzimei imobilizate acestea sunt plasate într-un mediu mai apropiat de cel natural, ceea ce face ca ele să prezinte o stabilitate mărită în timp față de variațiile de temperatură, pH, tărie ionică, sau față de acțiunea diferiților inhibitori. În scopul imobilizării enzimelor se utilizează două tehnici majore și anume: chimice și fizice (discutate la paragraful 1.4).

În istoria electrozilor enzimatici, în general enzimele au fost imobilizate în membrane hidrofiele, ulterior ele fiind fixate pe suprafața unui electrod. În mod firesc, primele metode de fixare au presupus o reținere fizică, în scopul unei mențineri pe cât mai mult posibil a integrității sistemului biologic.

La sfârșitul anilor '70, enzimele au fost direct imobilizate pe suprafața unui electrod, fie prin adsorbție, prin legare covalentă, entrapare, legare încrucișată sau prin electropolimerizare.

Imobilizarea enzimelor este o etapă de maximă importanță în construcția biosensibilor. Atâta timp cât enzimele rămân active imobilizarea acestora permite folosirea lor repetitivă putându-se astfel realiza determinări multiple [21].

Imobilizarea a mai mult de o enzimă pe un același suport, a reprezentat un alt pas important în dezvoltarea sensibilor enzimatici. O singură enzimă nu este întotdeauna suficientă pentru a transforma substanța de studiat într-o formă detectabilă de către traductorul fizic. Adesea, este necesar să se folosească mai multe enzime pentru a se realiza o serie de transformări, astfel încât produsul primei reacții devine substrat pentru a

doua, ș.a.m.d. Incorporarea mai multor enzime în același sensor prezintă următoarele avantaje: transformarea compusului de analizat prin intermediul unei secvențe de reacții într-o formă detectabilă electrochimic, minimalizarea interferențelor posibile din proba de analizat, posibilitatea refolosirii reactanților.

Imobilizarea mediatorilor redox a fost realizată recent. Acești compuși cum sunt feroceni sau sărurile organice conductoare tetraciano-chinodimetan (TCNQ) pot fi imobilizate pe suprafața unor polimeri conductori cum este polipirolul. Mediatorii, în general, au rolul de a reoxida chimic cofactorii enzimatici eliminând astfel dependența sensorilor enzimatici de concentrația de oxigen [22,23]. În cazul sensorului enzimatic pentru glucoză fără mediatori, oxigenul, fiind acceptorul natural pentru electroni ai reacției catalizate de glucoz-oxidază, este esențial pentru regenerarea cofactorului (FAD) pe parcursul oxidării glucozei. Folosirea mediatorilor reprezintă o contribuție importantă în analiza biomedicală, în special în cadrul măsurătorilor "in vivo" unde concentrația de oxigen este variabilă. În situația în care se folosesc mediatori redox în construcția biosensurilor, aceștia pot funcționa și în absența oxigenului, ceea ce este important pentru studiul proceselor fermentative anaerobe. Regenerarea mediatorilor necesită totuși electrozi amperometrici care generează curentul necesar pentru reoxidarea cofactorului.

5.3 ELECTROZI ENZIMATICI BAZAȚI PE TRADUCTORI ELECTROCHIMICI

Sensorii electrochimici sunt traductori care transformă parametrul concentrației într-o mărime de natură electrică: curent, potențial de electrod, rezistență, conductivitate, impedanță, etc. În funcție de natura semnalului de ieșire, se deosebesc trei mari categorii de sensori electrochimici: potențiometrici, amperometrici și conductometrici. Dintre aceștia, în continuare vor fi descriși sensorii potențiometrici și sensorii amperometrici, deoarece, aceștia sunt cei mai utilizați în construcția biosensurilor.

Utilizarea sensorilor electrochimici în construcția biosensurilor oferă o serie de avantaje dintre care se menționează: sensibilitate ridicată, domeniul mare de linearitate, metodele în care se utilizează preupun folosirea unor volume mici de probă, preț de cost scăzut, posibilități de utilizare în cadrul metodelor FIA și "in vivo", de miniaturizare, oferă posibilitatea studierii și determinării oricărei specii electrochimic active, prezintă un caracter nedistructiv asupra probelor.

În cazul sensorilor potențiometrici interfața, măsoară concentrația stării staționare a unor specii rezultate din reacția enzimatică. Concentrația stării staționare este cinetic determinată și depinde de transportul de masă a substratului sau produsului de reacție spre suprafața sensorului și în masa soluției precum și de concentrațiile lor inițiale. În plus, în cazul sensorilor enzimatici potențiometrici este importantă asigurarea unei cinetici rapide și existența unui potențial de referință stabil.

În cazul sensorilor electrochimici amperometrici, se urmărește în mod direct viteza reacției enzimatică prin măsurarea curentului. Un rol important în funcționarea acestora îl are și transportul de masă al substratului precum și potențialul impus electrodului care poate influența cinetica reacțiilor de electrod (reacțiile lente pot fi accelerate prin mărirea potențialului).

În general, comparându-se biosensorii amperometrici și cei potențiometrici, din punctul de vedere al caracteristicilor de răspuns, rezultă că primii prezintă o serie de avantaje comparativ cu ceilalți.

Potențiometria este o tehnică la care curentul se menține constant și se măsoară diferența de potențial dintre doi electrozi care este o funcție logaritmică de activitatea ionilor din soluție. În cadrul metodelor amperometrice de analiză se aplică un anumit potențial între electrozi și se măsoară curentul care este o funcție liniară de concentrația speciei reactionate la interfața electrodului în soluție.

Relația între aceste două metode vine de la faptul că orice celulă electrochimică este caracterizată printr-o funcție de trei variabile (la temperatură și presiune constantă): potențialul, curentul și activitatea speciilor chimice din soluție.

Biosensorii sau sensorii cu membrană catalitică sunt instrumente analitice în care un biocatalizator (enzimă, sisteme multienzimatice, componente membranare, fracțiuni subcelulare sau organite celulare, țesuturi, celule bacteriene intacte) este fixat pe suprafața unui sensor electrochimic, el făcând posibilă reacția unei molecule organice (substrat) în cadrul căreia se consumă sau se produce o specie chimică electroactivă ce poate fi măsurată prin intermediul sensorului electrochimic. În figura 5.5 este redată reprezentarea schematică a unui biosensor.

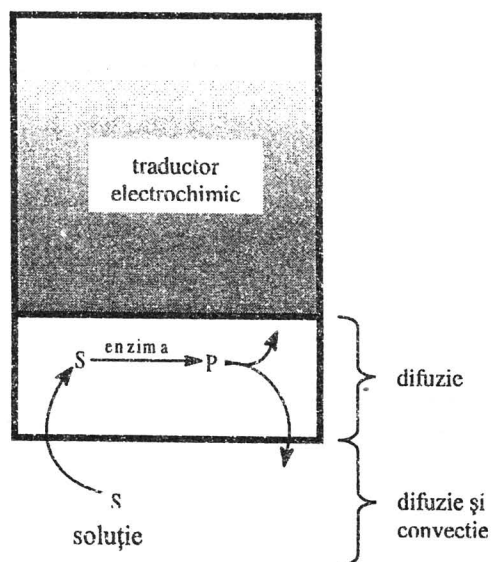


Fig. 5.5 Reprezentarea schematică a principiului de construcție și funcționare al unui electrod enzimatic

Deoarece componenta biolochimică (enzima) este responsabilă pentru recunoașterea compusului de analizat, ea este cea care determină gradul de selectivitate al metodei analitice. Practic are loc o reacție catalizată enzimatic, în cadrul căreia se consumă sau se produce o specie chimică electroactivă, care poate fi detectată prin intermediul sensorului. Deci, enzima catalizează reacția ce permite determinarea substratului sau a efectivelor.

Traductorul electrochimic este cel care convertește semnalul biochimic într-un semnal electronic, care poate fi procesat și măsurat.

Există în prezent două tendințe principale pentru realizarea biosensurilor. Una dintre acestea constă în utilizarea enzimelor izolate, sau a unor sisteme enzimatic care conduc la reacții catalizate enzimatic cuplate.

Cea de a doua constă în utilizarea unor complexe biocatalitice, incluzând celule bacteriene și fragmente de țesuturi animale și vegetale, care înlocuiesc enzimele izolate. În cazul biosensurilor având la bază organite celulare, țesuturi sau celule bacteriene intacte, activitatea biocatalitică se datorează unei enzime sau complex enzimatic localizat în interiorul materialului biocatalitic [24].

În tabelul 5.7 sunt redată diferitele tipuri de biocatalizatori care stau la baza construcției biosensurilor clasici, prezentându-se totodată și câteva dintre avantajele sau dezavantajele folosirii acestora.

Tab.5.7 Principalele tipuri de biocatalizatori utilizați în construcția biosensurilor.

Nr.crt.	Biocatalizator	Avantaje	Dezavantaje
1.	Enzimă izolată	Selectivitate și activitate mare	Utilizare și stabilitate limitată
2.	Secvență enzimatică	Posibilități multiple de imobilizare, mărirea gamei de compuși detectabili	Creșterea interferențelor, probleme legate de optimizarea condițiilor de lucru
3.	Microorganisme	Varietate mare, simplitate în construcție, posibilități de regenerare	Selectivitate redusă, Timp mare de răspuns
4.	Țesut animal sau vegetal	Simplitate în construcția biosensurului, creșterea gamei de compuși detectabili	Creșterea interferențelor, timp mare de răspuns

Un electrod enzimatic clasic este obținut prin depunerea pe suprafața oricărui tip de sensor electrochimic a unui strat enzimatic, cu condiția ca sensorul să facă posibilă detecția fie a substratului fie a produsului reacției catalizate enzimatic. În construcția acestor electrozi enzima poate fi utilizată într-o formă solubilă sau imobilizată.

Enzimele nu au putut intra mai rapid în practica analitică datorită dezavantajelor pe care acestea le prezentau, și anume:

- instabilitate pe parcursul folosirii și păstrării;
- activitate enzimatică variabilă atât pe parcursul păstrării cât și folosirii lor în cadrul procedeelelor analitice;
- condiții de lucru speciale;
- nu se pot obține într-o stare de puritate analitică;
- timp mare de analiză;
- nu puteau fi refolosite sau utilizate în sisteme în flux;
- preț de cost foarte ridicat.

Enzimele suferă procesul de denaturare, proces care apare prin modificarea unor parametrii chimici și fizici ai mediului în care acestea sunt introduse. După cum s-a arătat în capitolul 2, enzimele prezintă un pH, o temperatură și o tărâie ionică a mediului optime de funcționare. Enzimele sunt termolabile, temperatura optimă pentru majoritatea

enzimelor fiind sub 40°C; deasemenea, ele funcționând în organismul uman pH-ul optim al majorității lor este în jurul valorii pH-ului fiziologic. Datorită modificărilor de temperatură, pH și a altor factori apare o modificare a structurii enzimelor care poate conduce la denaturarea reversibilă sau ireversibilă a acestora. Dacă condițiile externe în care sunt menținute enzimele se modifică o perioadă scurtă de timp și nu foarte drastic, procesul denaturării este reversibil, înțelegând prin aceasta că o dată cu refacerea condițiilor optime de mediu acestea își recapătă activitatea enzimatică.

O posibilă stabilizare a structurii enzimatică se realizează prin imobilizare; cel mai adesea, în construcția electrozilor enzimatici clasici imobilizarea enzimelor sa realizat prin fixarea acestora într-un gel, care a fost depus și fixat pe suprafața electrodului prin intermediul unei membrane semipermeabile.

Electrozii enzimatici reprezintă instrumente analitice selective și sensibile, fapt datorat specificității și capacității catalitice a enzimelor care intră în componența lor. Datorită acestui fapt, ei sunt utili în determinarea multor compuși chimici de importanță biochimică.

În general, pentru construirea unui sensor enzimatic sunt necesare a fi parcurse următoarele etape:

- alegerea unei enzime care să interacționeze cu compusul de determinat;
- obținerea enzimei;
- imobilizarea enzimei;
- fixarea enzimei imobilizate pe suprafața electroactivă a unui electrod indicator convenabil ales, care să permită urmărirea desfășurării reacției catalizate enzimatic.

Principiul general constructiv al acestora a fost redat în figura 5.5. Suprafața sensorului este în contact direct cu stratul enzimatic și se presupune că la această interfață nu există transport de masă. Sensorul enzimatic se introduce în soluția conținând substratul de determinat; acesta migrează în stratul enzimatic unde are loc reacția catalizată enzimatic, în urma căreia rezultă produșii de reacție. Pentru ca reacția să decurgă rapid spre echilibru este necesar ca membrana enzimatică să fie cât mai subțire. Deasemenea este necesar ca soluția să fie bine agitată astfel încât să se asigure un transport eficient al substratului. Schematic principiul de funcționare al unui electod enzimatic presupune o serie de etape [25]:

- i) transportul substratului la suprafața electrodului ;
- ii) difuzia substratului prin membrană în stratul enzimatic;
- iii) reacția enzimatică;
- iv) transportul produșilor reacției enzimatică spre suprafața electrodului;
- v) măsurarea produșilor de reacție la suprafața electrodului.

Viteza primului proces depinde de viteza de agitare a soluției, astfel încât o agitare puternică face ca substratul să ajungă rapid la suprafața electrodului. Dacă membrana este foarte subțire, etapele ii) și iv) pot fi eliminate sau minimalizate. Deoarece etapa iii) este foarte rapidă răspunsul teoretic al electrodului enzimatic ar trebui să fie aproximativ același cu cel al electrodului folosit.

Baza difuzională a mecanismului de răspuns este corelată cu procesul stării staționare. Deci la suprafața electrodului se acumulează o concentrație fixă de specii electroactive răspunsul electrodului fiind corelat cu concentrația substratului din masa soluției. Stabilirea unei stări staționare este deci esențială pentru obținerea unui răspuns

precis. Cinetica procesului de stabilire a stării staționare , care reprezintă timpul necesar atingerii unei acestei stării depinde de foarte mulți parametri, care nu sunt discutați în acest capitol.

Problema centrală a folosirii electrozilor enzimatici, ca și în cazul oricărui sensor chimic este problema selectivității acestuia. Contribuția majoră la selectivitatea sensorului, dar nu unica, este cea generată de către componenta biochimică.

Cercetările inițiale în domeniul biosensurilor au avut la bază studierea posibilităților utilizării numai a unei singure enzime depuse pe suprafața electrodului. Dacă enzima respectivă prezintă o activitate mare, o selectivitate bine definită, stabilitate pentru un timp relativ lung și poate fi folosită în condiții comparabile cu cerințele traductorului electrochimic, există posibilitatea proiectării unui sensor cu caracteristici de răspuns foarte bune. În practică există un număr redus de senzorii care să întrunească toate aceste criterii dintre care se amintesc electrozii enzimatici pentru glucoză, aminoacizi și nucleotide. Construcția electrozilor enzimatici este limitată de numărul senzorilor comercializți și nu de enzime deoarece numărul acestora din urmă este foarte mare.

Un biosensor cu o stabilitate mare poate fi realizat prin folosirea enzimelor artificiale (sinzime). În acest sens în literatura de specialitate există însă un număr relativ mic de exemple. De asemenea folosirea enzimelor cuplate este o altă soluție în mărirea gamei de electrozi enzimatici care pot fi realizați și care pot conduce la mărirea numărului de compuși detectabili.

5.3.1 ELECTROZI ENZIMATICI POTENȚIOMETRICI

Senzorii potențiometrici sunt traductori concentrație-potențial, care în condiții bine determinate generează un potențial reversibil, determinat de o anumită specie prezentă în sistem. Dacă curentul este zero, semnalul de ieșire depinde numai de compoziția mediului cu care sensorul este în contact. Potențimetria, este o metodă electrochimică bazată pe măsurarea unei diferențe de potențial între un electrod de lucru și un electrod de referință (care are un potențial constant și reproducibil, independent de condițiile de mediu).

Potențialul electrodului de lucru reprezintă potențialul la interfața dintre fazele solidă și lichidă unde apar reacțiile de oxido-reducere. De exemplu la interfața dintre un conductor metalic și soluția unui cuplu redox apare o reacție de schimb de electroni între conductor și compușii care se oxidează și/sau reduc.

Echilibrul se realizează atunci când viteza de oxidare și reducere sunt egale și compoziția soluției din jurul electrodului este constantă. Potențialul de echilibru este dat de relația lui Nernst:

$$\varepsilon = \varepsilon^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_{ox}}{C_{red}}$$

în care C_{ox} și C_{red} reprezintă concentrația formei oxidate și respectiv redate din sistem.

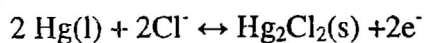
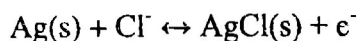
Relația lui Nernst este valabilă numai în cazul soluțiilor diluate. Odată cu creșterea concentrației ionice sistemul se deplasează față de condițiile termodinamice ideale și concentrația, C , trebuie înlocuită cu activitatea, a :

$$a = \gamma c$$

unde γ este coeficientul de activitate.

În funcție de tipul purtătorului de sarcină schimbat la interfață se deosebesc electrozi ionici sau redox. Determinarea potențialului de electrod, generează o indicație directă asupra concentrației speciei de analizat, semnalul obținut fiind proporțional cu logaritmul concentrației.

După cum s-a menționat potențialul electrodului este măsurat față de un electrod de referință. Acești electrozi au (generează) un potențial constant în diferite soluții de electroliți de diverse compoziții, astfel încât orice modificare în măsurarea potențialului se datorează numai proceselor care apar la suprafața electrodului de lucru (indicator) sau electrodului sensibil. Electrozii de referință cel mai des folosiți sunt electrozii de calomel și cei de argint/clorură de argint. Pentru a se genera un potențial de referință, conform reacțiilor de electrod corespunzătoare ambelor sisteme, concentrația clorurii trebuie menținută constantă:



Acest criteriu este îndeplinit prin păstrarea unei concentrații constante a ionilor de clorură în soluție, sau prin separarea semicelulei de referință de electrolitul de studiat prin intermediul unei diafragme. Trebuie menționat că separarea celor doi electroliți determină apariția unui potențial de difuzie, care conduce la o serie de erori în măsurarea potențialului dacă pH-ul și compoziția celor două soluții sunt foarte diferite. În literatură sunt descrise o serie de metode de a minimaliza influența acestui potențial de joncțiune asupra măsurătorilor de potențial [26].

În cazul măsurătorilor practice de potențial, electrozii indicator (sensibil) și de referință sunt conectați la un voltmetru digital cu rezistență de intrare mare ($Z > 10 \text{ G}\Omega$) care permite măsurarea diferenței de potențial și la un circuit electric care amplifică semnalul. Potențialele standard de electrod sunt măsurate față de electrodul standard de hidrogen (SHE) iar în tabelul 5.8 sunt prezentate valorile acestora pentru diferiți electrozi.

Tab 5.8 Potențialul unor electrozi de referință față de potențialul electrodului standard de hidrogen [25]

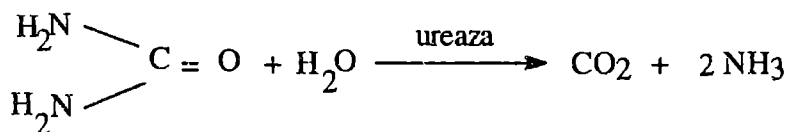
Electrozi	Potențialul față de SHE (V)
Ag/AgCl, KCl(sa)	+0.197
Ag/AgCl, KCl(1mol/l)	+0.236
Hg(Hg ₂ Cl ₂ , KCl)(sa)	+0.241
Hg/Hg ₂ Cl ₂ , KCl(1mol/l)	+0.280
Hg/Hg ₂ SO ₄ , H ₂ SO ₄ (0.5mol/l)	+0.679

Dintre sensorii potențiometrici, electrozii ion selectivi și sensorii de gaz au fost cel mai adesea utilizați în construcția biosensibilor. Acest lucru se datorează faptului că electrozii redox nu sunt selectivi, ceea ce determină apariția interferențelor.

Combinarea senzorilor potențiometrici cu diverși biocompauenți se bazează pe posibilitatea detecției produșilor reacției biocatalitice în care sunt implicate diferite substrat. Produșii de reacție pot fi NH₃, CO₂ sau protoni. În ultimul caz, sunt detectate modificările de pH din vecinătatea electrodului de pH, rezultate în urma reacției enzimatic. Sensibilitatea măsurătorilor este influențată de capacitatea de tamponare a soluției. Deasemenea utilizarea reacției enzimatic urmată de o reacție chimică a condus la posibilitatea utilizării și a altor electrozi ion-selectivi în construcția biosenzorilor.

Trebuie reținut faptul că electrozii de pH de sticlă și stibiu, senzorii de gaz pentru CO₂ și NH₃, precum și diverșii electrozi ion-selectivi (pentru iodură, cianură, amoniu ș.a.) au fost utilizați în construcția electrozilor enzimatici datorită faptului că în cadrul multor reacții enzimatic se consumă sau se produc specii chimice față de care acești electrozi sunt sensibili.

Electrozii pentru uree au fost printre primii senzori enzimatici potențiometrici construiți. Determinarea ureei din sânge și urină se bazează pe hidroliza enzimatică a acesteia:

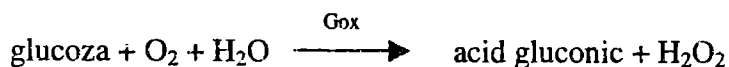


În domeniul de pH în care enzima este activă (pH≈7), în soluție se stabilesc următoarele echilibre:



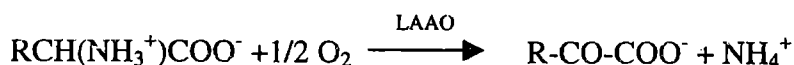
Deci pentru determinarea ureei pot fi folosiți o gamă largă de senzori potențiometrici și anume senzorii de gaz, electrozii amoniu-selectiv sau de pH.

Electrodul potențiometric pentru glucoză este construit prin imobilizarea glucozoxidazei (Gox) pe suprafața unui electrod de sticlă. Enzima catalizează oxidarea glucozei la acid gluconic:



Electrodul de pH detectează variațiile de pH care apar ca urmare a formării acidului gluconic în mediu, putându-se astfel determina în mod indirect concentrația de glucoză.

Biosenzorii aminoacid-sensibili pot avea la bază o mare varietate de enzime care catalizează oxidarea, hidroliza sau decarboxilarea aminoacizilor. De exemplu, aminoacidoxidazele (AAO) catalizează reacția:



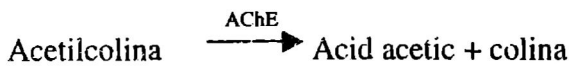
Utilizând enzime din această clasă se poate măsura concentrația de aminoacid amperometric – utilizând un electrod de oxigen sau potențiomtric – utilizând un electrod amoniu-selectiv.

Electrozii bazați pe hidrolaze prezintă importanță practică deoarece construcția acestora nu implică utilizarea cofactorilor. Spre exemplu, β -glucozidaza catalizează hidroliza amigdalinei conform următoarei reacții:



Un electrod enzimatic amigdalin-sensibil este obținut prin simpla imobilizare a β -glucozidazei pe suprafața unui electrod cianură-selectiv [27].

Neurotransmițătorii pot fi de asemenea determinați utilizând hidrolaze. Acetilcolina este hidrolizată de acetilcolinesterază (AChE) conform reacției:



Deci sensorul pentru determinarea acetilcolinei a fost realizat prin imobilizarea AchE pe suprafața electrodului de sticlă.

În tabelul 5.9 sunt menționați diverși electrozi enzimatici având la bază sensori potențiometrici.

Tab. 5.9 Electrozi enzimatici potențiometrici

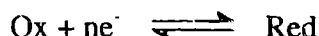
Sensor Electrochimic	Enzima	Metabolitul	Domeniul de măsurare nmol/l
Sticlă, pH	Ureaza	Uree	0.05-5
	Glucoz-oxidaza	Glucoza	0.1-1
	Penicilinaza	Penicilina	0.01-3
	Acetilcolinesteraza	Acetilcolina	0.01-10
Sb, pH	Ureaza	Uree	0.1-10
Sensorul pentru NH ₃	Ureaza	Uree	0.05-50
	Glutaminaza	Glutamina	0.05-5
	Phenilalanin-amoniu-Liaza	Phenilalanina	0.05-1
	Asparaginaza	Asparagina	0.1-10
	AMP diaminaza	5'-AMP	0.1-10
	Creatinin diaminaza	Creatinina	0.1-10
Sensorul pentru CO ₂	Ureaza	Uree	0.1-10
	Uricaza	Acid uric	0.1-2.5
	Enzimele Decarboxilante	Tirozina	0.1-2.5
		Asparagina	0.1-10
		Lizina	0.1-30
		Glutamina	0.5-5
Electrod amoniu-Selectiv	Ureaza	Uree	0.01-10
	Creatininaza	Creatinina	0.01-5
	Asparaginaza	Asparagina	0.01-1

Electrod iodură- Selectiv Redox	Aminoacidoxidaza	Aminoacizi	0.01-10
	Lactat dehidrogenaza	Lactat	0.1-1
Electrod cianură- Selectiv	β -glucozidaza	Amigdalina	0.1-100

5.3.2 ELECTROZI ENZIMATICI AMPEROMETRICI

Amperometria aparține grupului de metode voltametrice prin care se măsoară curentul ca o funcție de potențialul aplicat; sensorii amperometrici sunt deci traductori concentrație-curent. În cadrul metodelor amperometrice de detecție potențialul de electrod este menținut la o valoare la care are loc conversia electrocatalitică a substanței în soluție, măsurându-se curentul stării staționare. La interfața electrod-soluție apare un transfer heterogen de electroni între substanță și electrod (oxidare-reducere). Semnalul de ieșire, curentul, este determinat de natura și concentrația speciei electroactive, de forma semnalului de excitație și de modul de transport al materiei spre electrod. Acesta din urmă, depinde de forma electrodului și de agitația electrolitului.

Dacă unui electrod de lucru inert introdus în soluția unui cuplu redox i se aplică un potențial constant, se declanșează reacția de electrod:



Oxidarea sau reducerea unei specii are loc la un electrod de lucru, cel de-al doilea electrod acționând ca electrod de referință. În timpul electrolizei, electrodul de lucru poate acționa ca anod sau catod în funcție de potențialul aplicat.

Se consideră, că reacția de mai sus este rapidă în comparație cu procesul de transport al materiei (reacție reversibilă) și ca atare, pe electrod se stabilește un echilibru electrochimic.

Aplicând un potențial constant, experimental se constată că răspunsul sistemului este apariția unui curent având următoarele proprietăți: este proporțional cu C_{ox} , cu aria suprafeței electrodului A și descrește cu timpul. Relația intensitate-concentrație trebuie să fie în concordanță cu aceste date experimentale.

La valori mari ale potențialului aplicat (suprapotențial) viteza reacției cu transfer de electroni este mărită astfel încât concentrația la suprafață a substanței devine egală cu zero; aceasta se datorează faptului că toate particulele transportate la suprafața electrodului sunt imediat transformate. În aceste condiții curentul este limitat de difuzia substanței prin stratul de difuzie din imediata vecinătate a electrodului (figura 5.6).

În acord cu prima lege de difuzie a lui Fick curentul este dat de relația:

$$I_l = nFDA \frac{C_s}{\delta}$$

unde: n , F și D reprezintă numărul de electroni schimbați, constanta lui Faraday și respectiv coeficientul de difuzie al speciei redox-active;

A reprezintă aria electrodului;
 δ reprezintă grosimea stratului de difuzie,
iar C_S este concentrația din întreg volumul de soluție.

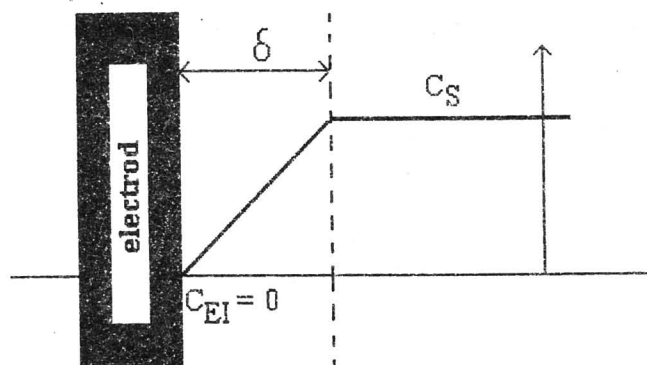


Fig. 5.6 Reprezentarea schematică a variației concentrației din stratul adiacent electrodului amperometric pentru cazul în care aceasta este limitată de difuziune (C_{EI} este concentrația speciei la suprafața electrodului, C_S este concentrația totală din soluție)

Relația de mai sus se respectă numai în condițiile în care conductivitatea totală este mult mai mare decât suma, contribuțiilor la conductivitate ale speciilor ce se determină, astfel încât efectul migrării să poată fi neglijat (de exemplu prin utilizarea unor electroliți suport).

În condițiile unei convecții constante ($\delta = \text{const.}$) se obține o dependență liniară a curentului de gradientul de concentrație de la suprafața electrodului. În general metodele amperometrice au la bază procese limitate de difuzie.

Biosensorii amperometrici au la bază un detector amperometric pe suprafața căruia se fixează o membrană enzimatică de a cărei grosime depind caracteristicile de răspuns ale acestuia. Metodele amperometrice sunt foarte sensibile, prin intermediul lor putându-se determina concentrații din domeniul milimolar sau chiar submicromolar. Sensibilitatea foarte bună, precum și timpul mic de răspuns reprezintă două avantaje majore ale traductorilor amperometrici.

Determinările amperometrice se realizează în celule electrochimice (voltametrice) de diferite configurații, două dintre acestea fiind reprezentate în figura 5.7. (celule având la bază doi și respectiv trei electrozi). În general, folosirea sistemului cu trei electrozi este mai avantajoasă deoarece prin electrodul de referință nu trece curent electric, fiind posibil astfel măsurători foarte precise la potențiale impuse bine definite. Totuși, în cazul densităților mici de curent, determinările realizate în celule având la bază doi electrozi sunt suficient de precise. Prin combinarea electrodului de referință cu cel auxiliar, trebuie să se asigure o rezistență electrică scăzută și o arie a suprafeței electrodului mărită pentru a se evita astfel polarizarea suprafeței electrodului.

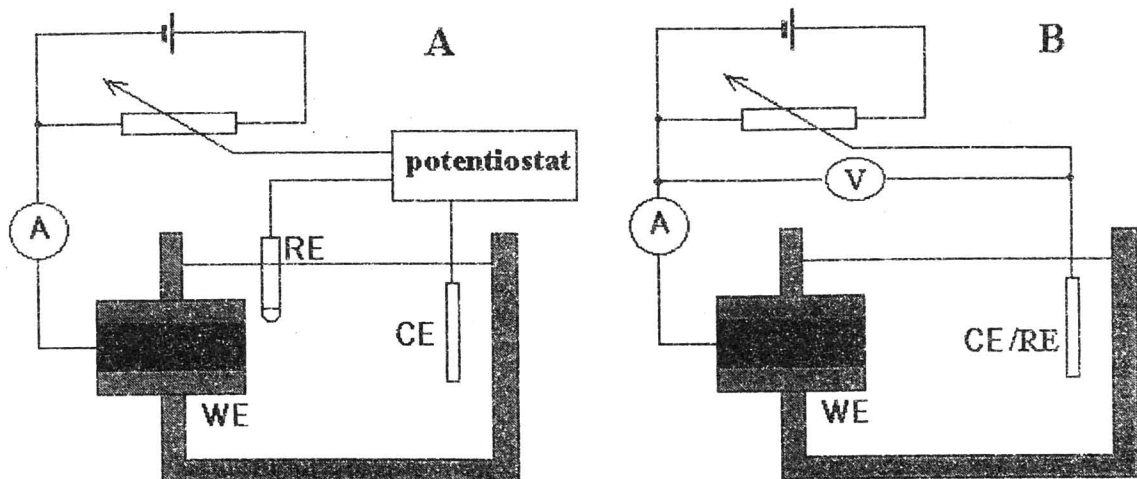


Fig.5.7 Reprezentarea schematică a motajelor voltametrice. A-celulă cu trei electrozi, B-celulă cu doi electrozi (WE-electrod de lucru, RE-electrod de referință, CE-contra electrod sau auxiliar)

Selectivitatea și sensibilitatea determinărilor amperometrice depinde în mare măsură de potențialul aplicat la electrodul de lucru, în condițiile în care în soluția probei de analizat există specii electrochimic active având potențiale formale de oxido-reducere apropiate. Eliminarea interferențelor poate fi realizată pe diferite căi.

Una dintre acestea constă în modificarea selectivă a materialului de electrod prin introducerea de noi grupări chimice (electrozi chimic modificați) care fac ca reacția de interes să decurgă la valori de potențiale mai mici decât ale interferențelor posibili sau prin găsirea unor noi materiale electrodice [28].

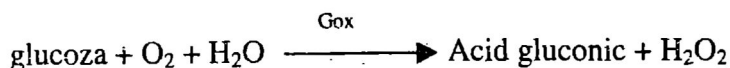
O altă posibilitate este aceea de a folosi diferite membrane care prin fixarea lor pe suprafața electrodului de lucru conduc la mărirea selectivității acestuia prin limitarea accesului interferențelor la suprafața electrodului, permițând însă accesul compușilor de determinat (de ex. utilizarea membranelor de nafion).

Interferențele posibile pot fi limitate sau eliminate și prin folosirea enzimelor, care pot cataliza reacții de transformare a interferențelor în produși de reacție electrochimic inactivi sau care suferă procese redox la potențiale diferite de cele ale compusului de determinat.

În construcția electrozilor enzimatici amperometrici se pot folosi o gamă restrânsă de electrozi dintre care se menționează sensorii de oxigen, electrozii pentru apă oxigenată, cei pe bază de materiale carbonice ș.a. În același scop se folosesc enzimele din clasa oxidoreductazelor (oxidaze, dehidrogenaze și peroxidaze) deci enzime implicate în reacții cu transfer de electroni. În general, determinările amperometrice având la bază electrozi enzimatici au fost realizate prin măsurarea oxigenului sau a apei oxigenate care se consumă sau se formează în timpul reacției biocatalitice. Folosirea sensorilor amperometrici ca traductori în construcția biosensibilor, apare un consum foarte mic al speciei electrochimic active, ceea ce reprezintă una dintre diferențele majore față de utilizarea sensorilor potențiometrici.

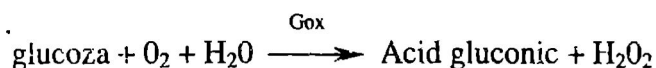
Sensorii amperometrici au stat la baza construcției unor biosensori pentru determinarea glucozei, polizaharidelor, alcoolilor, aminoacizilor, etc.

De exemplu glucoza a fost determinată amperometric prin intermediul unui electrod enzimatic având la bază Gox care catalizează reacția [29,30]:



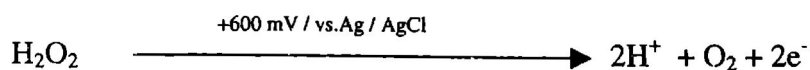
determinarea glucozei realizându-se indirect prin urmărirea scăderii concentrației de oxigen din sistem sau creșterii concentrației de apă oxigenată. Metoda prezintă o serie de dezavantaje dintre care cel mai semnificativ este faptul că oxigenul este limitativ de viteză, deoarece solubilitatea lui în soluție este limitată și dependentă de temperatură. Totodată, la anumite concentrații H_2O_2 poate denatura Gox, ceea ce conduce la modificări ale activității acesteia care în final se traduc prin modificarea caracteristicilor de răspuns ale biosensorului enzimatic. Din acest punct de vedere se poate constata o modificare a pantei de răspuns, a stabilității precum și a reproductibilității măsurătorilor.

O parte din inconvenientele menționate anterior pot fi eliminate prin coimobilizarea Gox și catalazei (CAT) pe suprafața unui sensor amperometric, enzimele catalizând următoarele reacții:



Din reacții, se observă că descompunerea enzimatică a H_2O_2 poate fi astfel utilizată pentru producerea a jumătate din cantitatea de O_2 consumată în prima reacție; deasemenea prin folosirea CAT se elimină influența apei oxigenate asupra Gox. Electrozii enzimatici obținuți în acest fel pot fi utilizați în determinarea glucozei din sânge și ser și în urmărirea proceselor fermentative.

Având în vedere faptul că unul dintre produșii al reacției catalizate de Gox este apa oxigenată, dozarea glucozei se poate face și prin determinarea electrochimică a apei oxigenate:

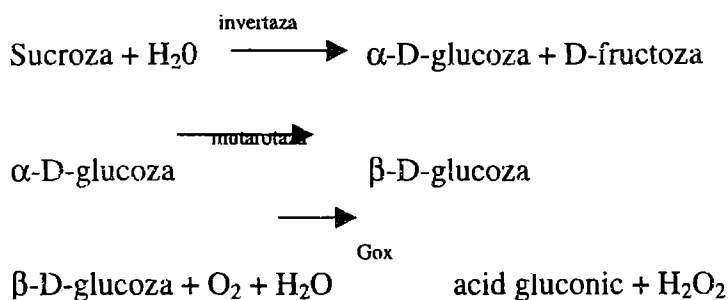


Astfel a fost realizat un analizor de glucoză având la bază doi electrozi de Pt, dintre care unul acoperit cu o membrană în care se află imobilizată enzima. Între cei doi electrozi se aplică un potențial de +600mV vs. electrod Ag / AgCl.

Aceasta a fost prima generație de biosensori amperometrici. S-au realizat numeroși astfel de biosensori care au la bază determinarea oxigenului sau a apei oxigenate. Diferența constă în geometria celulei, tehnica de imobilizare a enzimei, compoziția membranei, configurația electrodului. Deși aparent, dozarea oxigenului sau a apei oxigenate este simplă, ea prezintă o serie de limitări în cazul probelor reale. Potențialul de +600 mV vs. Ag/AgCl necesar oxidării apei oxigenate este suficient de

pozitiv pentru a permite și oxidarea altor specii prezente în probele biologice, apărând astfel interferențe.

Pentru detecția polizaharidelor sunt necesare reacții catalizate enzimatic cuplate. Astfel, inițial are loc hidroliza polizaharidelor până la monozaharide, având loc apoi oxidarea acestora în acord cu metodele descrise anterior. Determinarea sucrozei necesită 3 enzime: invertaza, mutarotaza și glucoz-oxidaza. Acestea catalizează următoarele reacții:



Determinarea polizaharidelor prin intermediul electrozilor enzimatici ridică o serie de probleme legate de optimizarea condițiilor de lucru.

Etanolul sau metanolul, pot fi determinați utilizând două tipuri de enzime: alcooldehidrogenazele și alcooloxidazele. Alcooloxidazele prezintă avantajul că pot fi regenerate în prezența O_2 , dar necesită o furnizare constantă de oxigen pentru a asigura un răspuns corect.

În contrast, alcooldehidrogenazele necesită drept cofactor NAD^+ a cărei formă redusă (NADH) nu poate fi oxidată de către oxigen. Regenerarea NAD^+ se face de obicei utilizând un electrod de Pt căruia i se aplică un potențial de + 0,75 V vs. SCE, intensitatea curentului obținut fiind proporțional cu concentrația de alcool.

În literatură sunt descriși un număr mare de electrozi enzimatici amperometrici dintre care în tabelul 5.10 sunt redați o parte dintre aceștia precum și unele dintre cele mai importante caracteristici.

Tab. 5.10. Sensori enzimatici amperometrici [25]

Analit	Enzima	Tehnica de imobilizare	Traductor	Timp de răspuns	Domeniu de linearitate
Glucoză	Glucozoxidază	E + poliacrilamidă	pO_2	30s – 3min	0-0.5g/l
Glucoză	Glucozoxidază	E + BSA +GA	pO_2	1-3 min	$0\text{-}2 \times 10^{-2} \text{M}$
Glucoză	Glucozoxidază	E / nylon	pO_2	26-38s	1-20mg/dl
Glucoză	Glucozoxidază	E + poliacrilamidă	pO_2	1-2min	0-200mg/l
Glucoză	Glucozoxidază	E + gelatină +GA	pO_2	2-3min	0-2g/l
Glucoză	Glucozoxidază	E + poliacrilamidă	Pt	1min	$0\text{-}1.5 \times 10^{-2} \text{M}$
Glucoză	Glucozoxidază	E / colagen	Pt	2-3min	$10^{-7}\text{-}2 \times 10^{-3} \text{M}$
Glucoză	Glucozoxidază	E + BSA +GA	Pt	10s	$10^{-7}\text{-}2 \times 10^{-3} \text{M}$
Glucoză	Glucozoxidază	E + acrilamidă	Pt	1-10min	$0\text{-}0.25 \times 10^{-2} \text{M}$
Glucoză	Glucozoxidază	E + BSA +GA	Pt	1-2min	$0\text{-}0.27 \times 10^{-2} \text{M}$

Tab.5.10. Continuare

Glucoză	Glucosoxidază	E/membrană Semipermeabilă	Pt	6min	10^{-5} - 7×10^{-3} M
Glucoză	Glucosoxidază	E/celofan	Pt	3-4min	10^{-4} - 6×10^{-3} M
Glucoză	Glucosoxidază	E+cărbune modificat cu ferocen	grafit	1-1.5min	10^{-2} - 3×10^{-2} M
Glucoză	Glucosoxidază	E/NMP ⁺ TCNQ	Pt	-	0 - 0.26×10^{-2} M
Glucoză	Glucos- dehidrogenază	E + BSA +GA	pO ₂	3-15min	10^{-3} - 8×10^{-4} M
Sucroză	Invertază Mutarotază Glucosoxidază	E + colagen +GA	pO ₂	2-6min	0 - 10^{-3} M
Maltoză	Glucamilază	E + colagen	Pt	6-7min	10^{-7} - 3×10^{-4} M

Cercetările recente din domeniul biosensurilor vizează îmbunătățirea caracteristicilor de răspuns, fapt care se poate realiza prin utilizarea mediatorilor redox cum ar fi ferocenu, ftalocianinele, sărurile organice conductoare N-metilfenazina (NMP⁺) și tetracianochinodimetan (TCNQ⁻). Mediatorii sunt compuși chimici care pot media transferul de electroni între enzimă și suprafața electrodului și care au rolul de a micșora potențialul aplicat sensorului amperometric de bază. O altă direcție de cercetare în sensul menționat o reprezintă studiile privind posibilitatea realizării unui schimb direct de electroni între electrod și centrul activ al enzimei. Aceste aspecte nu sunt tratate în acest capitol

6. APLICAȚIILE REACȚIILOR IMUNOCHEMICE ÎN CHIMIA ANALITICĂ

6.1. INTRODUCERE

Imunodeterminările reprezintă tehnici analitice care se bazează pe interacția specifică dintre antigen (Ag) și anticorp (Ac). Din punct de vedere analitic anticorpii sunt molecule de biorecunoaștere specifică. În principiu, anticorpii, ca reactivi analitici, pot să reacționeze cu orice structură chimică; anticorpii se obțin prin tehnica simplă a imunizării animalelor, ori prin tehnicile moderne de recombinare. În scopuri analitice, anticorpii au fost folosiți pentru prima dată în anii '50 de către Berson și Yalow [31] (laureați ai Premiului Nobel), care au pus la punct o metodă imunochimică de determinare cantitativă a insulinei umane în concentrații mici (picograme) din probe biologice. În următorii ani, aplicațiile tehnicilor immunoanalitice în domeniile biochimiei, chimiei clinice și al monitorizării mediului au crescut exponențial. În anul 1980 Hammock și Mumma [32] au demonstrat posibilitatea utilizării acestor metode pentru determinarea pesticidelor, metodele imunochimice de analiză fiind astfel acceptate de către chimiștii care lucrează în domeniul controlului poluării mediului. În prezent este evident impactul acestor metode asupra domeniului protecției mediului înconjurător, în literatura de specialitate existând numeroase metode de determinare a diverșilor poluanți (contaminanți) incluzând pesticidele, rezidurile industriale și produșii lor de degradare. Intensificarea cercetărilor din domeniul metodelor imunochimice de analiză se datorează în principal avantajelor de care beneficiază aceste tehnici dintre care se menționează: specificitatea, simplitatea, sensibilitatea mare precum și prețul de cost scăzut. În plus, orice compus chimic este capabil să inducă un răspuns imun.

Odată cu dezvoltarea tehnicilor de obținere a anticorpilor monoclonali și policlonali tehnicile imunochimice s-au dezvoltat foarte mult. În prezent anticorpii policlonali produși în urma imunizării animalelor sunt înlocuiți cu anticorpii monoclonali care reprezintă amestecuri omogene de anticorpii care pot fi preparați cu ușurință în cantități mari în culturile de celule. Recent anticorpii recombinati obținuți prin metode ale ingineriei moleculare sunt din ce în ce mai folosiți în immunoanaliză, astfel încât se pare că în perspectivă nu vor mai fi necesare animalele de experiență pentru obținerea anticorpilor.

Dezvoltarea immunoanalizelor din ultimii 40 de ani au revoluționat metodologia de detecție a medicamentelor și a hormonilor în analizele clinice clasice precum și a poluanților din mediul înconjurător. Aceste metode clasice bazate pe interacții de afinitate necesită o serie de "marker"-i enzimatici, fluorescenți sau radioactivi. Metodele imunochimice de analiză și-au găsit aplicații numeroase în domeniile chimiei clinice, alimentare, în controlul apei potabile, a apei de suprafață și în monitorizarea solului.

Există foarte multe moduri de a realiza metodele de immunoanaliză (heterogene și omogene), dar cele mai utilizate sunt tehnicile analizei immunosorbante cu enzima legată (ELISA) care poate fi competitivă (directă sau indirectă), sau de tip "sandwich". ELISA, combină selectivitatea anticorpilor cu sensibilitatea mare dată de amplificarea enzimatică, caracteristici ce conduc la obținerea unor limite de detecție în domeniul femtomolar. Tehnica ELISA este realizată pe micro-plăci ea având la bază o serie de etape de incubare și spălare, ceea ce determină ca această tehnică să fie complicată și laborioasă. Această metodă este una de echilibru în formarea complexului Ac-Ag, lucru care de obicei durează o oră sau mai mult. Determinările în mediu omogen se bazează pe modificarea semnalului generat de "marker", ca urmare a formării unui immuno-complex în soluție. În mod

asemănător, sistemele pseudo-omogene nu necesită etape de separare, dar imunoreacția principală are loc la suprafața electrodului.

În ultimii ani, au apărut o serie de noi metode imunochimice având la bază imunosensorii; aceștia au apărut ca urmare a necesității scurtării timpului de analiză, ei putând fi folosiți și în analiza "in situ". Utilizarea anticorpilor pentru construcția biosensibililor imunochimici (imunosensibililor) se realizează cu succes de peste 20 de ani. Imunosensibilul reprezintă un instrument analitic care detectează în mod selectiv compusul de interes, el generând un semnal dependent de concentrația celui compus. Imunosensibilii electrochimici au la bază drept elemente de bio-recunoaștere fie Ac fie Ag sau haptene care sunt fixate pe suprafața traductorilor electrochimici. Anticorpul asigură specificitatea metodei în timp ce traductorii electrochimici sunt responsabili pentru sensibilitatea acestora, în final obținându-se un instrument analitic la un preț de cost scăzut.

Recent IUPAC [33] a propus o definiție pentru biosensibilii electrochimici (vezi capitolul 5). Conform acestei definiții un imunosensibil reprezintă un instrument integrat, de sine stătător, care constă dintr-un component imunochimic de recunoaștere aflat în contact direct cu un traductor, făcându-se astfel o diferențiere netă de un sistem imunochimic sau de o imunoprobă. Sistemul imunochimic necesită în plus o serie de alte operații cum ar fi etapele de adăugare de reactivi, separare, spălare, iar imunoprobă se realizează într-o singură etapă, fiind de unică folosință, și deci nu poate fi utilizată în monitorizarea continuă a concentrației de analit.

În funcție de modalitatea de preluare a semnalului, există două categorii de imunosensibilii: direcți și indirecti. Imunosensibilul direct (nemarkat) este acela care determină în mod direct interacția dintre anticorp și antigen, într-un mod continuu și într-un timp real. Imunosensibilii nemarcați sunt bazați pe măsurarea modificărilor unor proprietăți fizice ca permeabilitatea ionică, conductivitatea, constanta dielectrică, mobilitatea ionică, masa, vâscozitatea, indicele de refracție, sau a grosimii stratului sensibil, din momentul formării complexului Ac-Ag. Sensibilitatea obținută depinde de tipul de traductor folosit și de afinitatea moleculelor biosensibile. Pentru detecția directă au fost folosiți traductorii electrochimici, piezoelectrici, optici.

Pe de altă parte, imunosensibilul indirect (marcat) măsoară rezultatul evenimentului de cuplare cum ar fi de exemplu creșterea sau scăderea cantității de "marker" legat (enzima, mediator redox, ș.a.), astfel încât acest tip de imunosensibil determină "marker"-ul și deci, indirect, imunoreacția. În cazul imunosensibililor marcați generarea semnalului este ușurată semnificativ, datorită proprietăților "marker"-ilor de fluorescență, radioactivi, enzimatici folosiți, dar apar o serie de probleme legate de sinteza, stabilitatea și prețul de cost al "marker"-ilor folosiți, precum și de imposibilitatea realizării determinărilor într-un timp real.

6.2. ANTICORPI - ASPECTE GENERALE

6.2.1. STRUCTURA ȘI ROLUL ANTICORPILOR

Prin expunerea unui individ, spre exemplu, la un agent infecțios, se activează răspunsul imun și limfocitele B încep să producă proteine receptor specifice, numite anticorpi. Anticorpul este glicoproteină care aparține familiei imunoglobulinelor (Ig). Există cinci tipuri mai importante de anticorpi (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) care diferă prin poziția ale anumitor grupări, sarcină electrică, compoziție în aminoacizi și conținutul în carbohidrați. Tipul IgG reprezintă grupul de anticorpi cel mai abundent și deasemenea cel

mai des folosit ca reactiv imunochimic. Toate moleculele IgG au aceeași structură de bază și o masă moleculară aproximativă de 150 kDa.

Anticorpul se produce în serul și fluidele celulare ale tuturor mamiferelor. Un anticorp constă în două lanțuri grele și două lanțuri ușoare unite între ele prin punți disulfurice. Fiecare din lanțurile grele posedă trei domenii constante și un domeniu variabil, iar fiecare din lanțurile ușoare posedă un domeniu constant și un domeniu variabil. Domeniile variabile sunt responsabile de specificitatea anticorpilor și conțin situsurile de legare pentru antigen. Structura anticorpului este descrisă de forma literei Y, cu două situsuri de legare a antigenului denumite fragmentele Fab și un fragment Fc care leagă receptorii celulelor specializate din organism. Astfel, fragmentul Fc nu prezintă o importanță reală când se lucrează cu anticorpii ca elemente de recunoaștere folosite în construcția imunosensibilizatorilor, dar acest fragment are o mare importanță în imobilizarea direcționată prin anumite grupări ale fragmentului Fc. Cel mai răspândit anticorp, IgG, are o masă moleculară de aprox. 150 kDa. Reprezentarea schematică a structurii unui Ac este redată în figura 6.1. Structura moleculei de imunoglobulină s-a stabilit prin analiza proteinelor omogene secretate de plasmocitoame, utilizându-se metode, cristalografice prin difracție cu raze X.

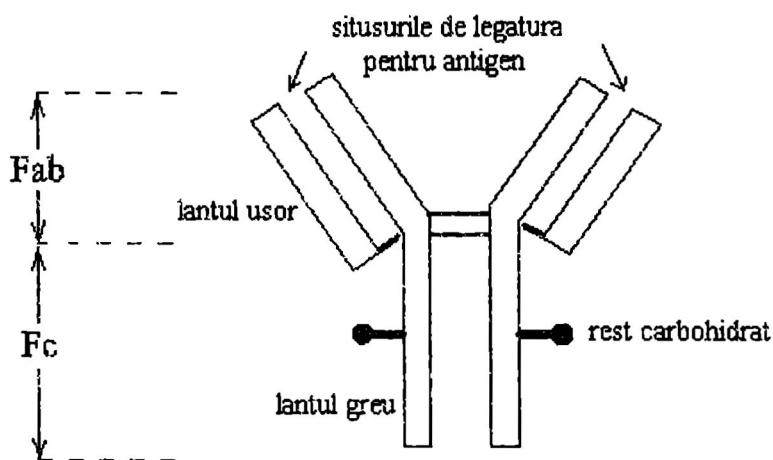


Fig. 6.1. Structura unui anticorp de tipul IgG

Este posibil ca fragmentul Fc al anticorpului să conducă la formarea unor legături nespecifice. Înainte de imobilizare pentru îndepărtarea acestui fragment, molecula de anticorp poate fi tratată cu pepsină ori papaină. Atacul proteolitic al papainei va produce două fragmente separate de legare a antigenului, Fab, în timp ce atacul pepsinei va produce un singur fragment cu două situsuri de legare a antigenului $F(ab')_2$ (figura 6.2). Fragmentele Fab au forme elipsoidale cu axele mare și mică de 6 și respectiv 4 nm. Numărul posibil de molecule de anticorpi a fost estimat la mai mult de 10^{10} , iar diversitatea anticorpilor este guvernată de regiunile hipervariabile ale situsurilor de legare a antigenului (fragmentul Fab). Datorită flexibilității regiunii "balama", doi antigeni pot lega anticorpul în același timp sau se poate cupla un antigen multivalent. Fragmentul Fc al anticorpului poate interacționa cu celulele fagocite mononucleare care prezintă la suprafața membranei receptori pentru acesta. În momentul în care anticorpul se leagă de receptorul său specific de pe fagocit, are loc stimularea diverselor funcții ale celulei.

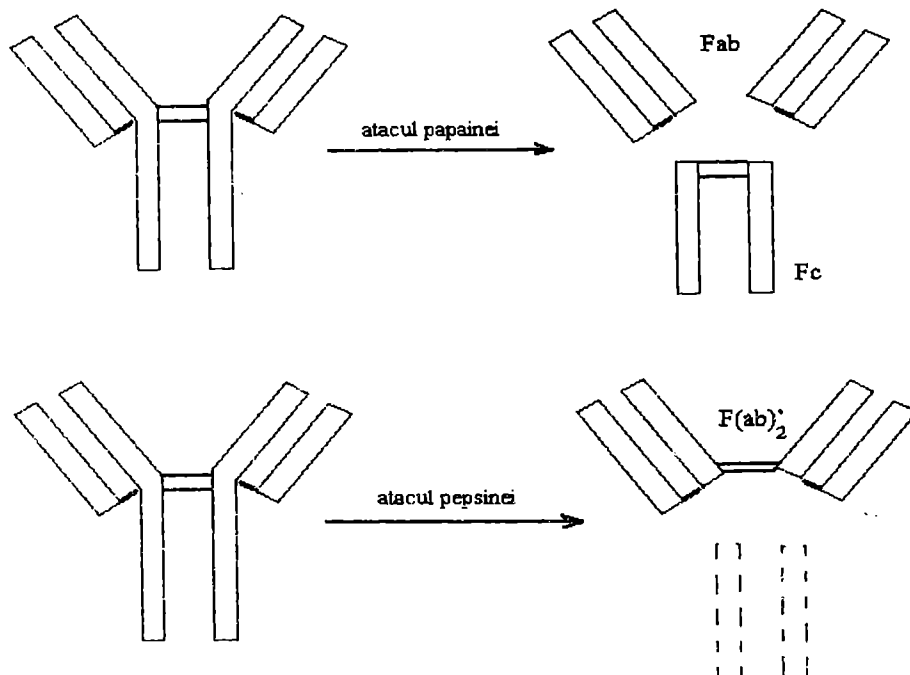


Fig. 6.2. Schema de fragmentare a IgG. Partea de sus ne arată fragmentarea folosind papaina iar cea de jos folosind pepsina.

6.2.2. PRODUCEREA DE ANTICORPI

6.2.2.1. ANTICORPI POLICLONALI

Anticorpii policlonali sunt produși printr-o tehnică de imunizare a unui animal (iepure, oaie) prin injectare directă de antigen țintă (imunogen). De obicei un răspuns imun nu poate fi indus de molecule mai mici de 2.000 Da, adică de haptene. Pentru a se obține totuși anticorpi și împotriva acestor molecule mici (haptene) acestea trebuie cuplate de proteine purtătoare (de exemplu albumina serică bovină - BSA, hemocianină, sau ovalbumină). Legarea de aceste proteine se realizează înaintea procesului de imunizare. Apoi se recoltează sânge de la animalul respectiv, iar antisera rezultat este supus purificării. Rezultatul procedurii de imunizare este un amestec ce conține câteva sute de anticorpi diferiți (anticorpi policlonali), ce pot interacționa cu diverși epitopi ai antigenilor cu diferite afinități. Dacă molecula imunogenă este o haptentă cuplată cu o proteină purtătoare, numai o fracțiune de 10-15% din anticorpii produși vor acționa specific împotriva antigenului țintă.

6.2.2.2. ANTICORPI MONOCLONALI

Pentru a se putea produce anticorpi monoclonali, animalul, de obicei șoarece sau șobolan, va fi imunizat în același mod ca și pentru producerea de anticorpi policlonali, apoi se extrage splina animalului. Limfocitele B din splină vor fuziona cu o linie de celule mielomice, din acest proces de fuziune rezultând celule hibridom. Aceste celule hibridom sunt testate pentru a se determina care dintre ele vor produce anticorpii doriti. Celulele cu

reacție pozitivă sunt clonate și testate iarăși pentru a se obține hibridoame de un singur tip. Aceste celule sunt crescute și menținute în viață în niște recipiente de sticlă ce conțin mediu de cultură, ele secretând anticorpii monoclonali. Anticorpii monoclonali sunt identici între ei și au aceeași capacitate de legare pentru aceluiași epitop al unui antigen.

6.2.3. REACTIVITATEA ÎNCRUCIȘATĂ (NESPECIFICĂ) ȘI MODUL DE LUCRU CU HAPTENA (ANTIGENUL INCOMPLET)

Reactivitatea încrucișată a anticorpilor se referă la specificitatea anticorpului față de alți compuși decât cel ce reprezintă antigenul țintă. Reactivitatea încrucișată pentru anticorpii policlonali este în general mai mare decât a anticorpilor monoclonali, dar în ambele cazuri gradul reactivității încrucișate este dependent de structura imunogenului și de procedeul de imunizare.

Haptena (moleculă de dimensiune mică) reprezintă un antigen incomplet în sensul că introdusă în organism nu va determina apariția unui răspuns imun umoral (secreție de anticorpi), dar cuplată cu o macromoleculă purtătoare va stimula secreția de anticorpi cu care va interacționa ca un antigen normal.

Optimizarea folosirii haptenei se va face astfel încât macromolecula purtătoare să fie cuplată la o "distanță" cât mai mare posibil de situsul de recunoaștere, această haptенă devenind astfel o adevărată moleculă țintă. Pentru controlul calității mediului, când analiții sunt reprezentați de molecule de dimensiuni mici, iar structural pot fi asemănătoare, reactivitatea încrucișată este teoretic mult mai mare decât cea implicată în analizele biologice ale macromoleculilor.

6.2.4. ANTICORPII – ELEMENTE DE RECUNOAȘTERE MOLECULARĂ

Performanța imunosensibilor depinde de selectivitatea și de afinitatea anticorpilor imobilizați. Dezvoltarea tehnologiei de fuziune, pentru producerea de anticorpi monoclonali, a deschis oportunități puternice în domeniul imunosensibilor și producerii pe scara largă a anticorpilor monoclonali cu sensibilitate și selectivitate dorite. Urmatoarea etapă este de a aplica tehnicile de producere a anticorpilor recombinati și de a crea o bancă de anticorpi recombinati care va conține o gamă largă de tipuri de anticorpi.

6.3. IMOBILIZAREA ANTICORPILOR

În această paragraf se vor trata pe scurt metodele de imobilizare covalentă a Ac, deoarece acestea sunt cel mai des folosite în proiectarea biosensibilor.

6.3.1. IMOBILIZAREA NEDIRECȚIONATĂ REALIZATĂ PRIN GRUPELE ϵ -AMINO ALE ANTICORPILOR

Anticorpii sunt de obicei imobilizați prin intermediul grupelor ϵ -amino datorită faptului că Ac conțin în jur de 60-80 resturi de lizină. O metodă generală se bazează pe activarea unui suport hidroxilat cu brom-cian; această metodă are o serie de dezavantaje descrise în literatură [28].

Una dintre cele mai folosite metode pentru imobilizarea proteinelor este bazată pe folosirea glutaraldehydie care poate reacționa cu diverse suporturi conținând gruparea amino. Deoarece glutaraldehyda este un reactiv de cuplare bifuncțional, poate avea loc

deasemenea și legarea încrucișată între proteine. Principalul dezavantaj al cuplării prin intermediul glutaraldehidei este reproductibilitatea mică a procedurii.

O altă modalitate este aceea de crea grupări aldehydice active pe un suprafața unui suport, care formează baze Schiff stabile cu grupele amino primare ale proteinei. Randamentul de cuplare este de 80-90% în acest caz. Prin această metodă raportul de combinare Ac:Ag nu a fost mai mare de 1:1, chiar și atunci când anticorpul a prezentat două situsuri de legare pentru antigen. Acest lucru indică faptul că jumătate din numărul situsurilor de legare pentru antigen ale anticorpilor ar putea fi inaccesibile interacției cu acesta.

În același scop s-a utilizat și carbodiimidă. Prin utilizarea acesteia, suportul carboxilat reacționează cu carbodiimida pentru a forma un intermediar ce va reacționa cu aminele primare formându-se legături amidice. Legăturile covalente astfel formate sunt foarte stabile. Imunoglobulina G a fost astfel imobilizată pe monostraturi carboxilate.

Toate metodele descrise mai sus se bazează pe cuplarea la grupele ϵ -amino ale Ac. Totuși, aceste grupe sunt distribuite întâmplător pe suprafața anticorpului, conducând la multiple orientări ale anticorpilor pe suprafața de imobilizare. Pentru a se evita acest lucru, se poate folosi o metodă de cuplare directă la situsul dorit, aspect discutat în continuare.

6.3.2. IMOBILIZAREA DIRECȚIONATĂ PRIN INTERMEDIUL UNOR GRUPE SPECIFICE ALE Ac

Prin aceste metode situsurile active ale elementelor de recunoaștere sunt orientate spre soluție, obținându-se o activitate mai mare. O'Shannessey și Wilchek [34] au arătat că Ac imobilizați prin fragmentul Fc au o capacitate de legare a Ag de două ori mare comparativ cu Ac imobilizați întâmplător. Imobilizarea direcționată printr-o anumită grupare se realizează de obicei prin intermediul unui număr redus de grupele funcționale de pe suprafața anticorpului și a căror poziție în cadrul structurii proteice este cunoscută. În plus aceste grupe trebuie să fie poziționate la o anumită distanță de centrul activ pentru a nu-l bloca.

Există trei metode de imobilizare directă la situsul dorit. Prima metodă folosește cuplarea prin restul carbohidrat al fragmentului Fc al anticorpului. Cea de a doua metodă are la bază cuplarea prin intermediul punților disulfurice, menținându-se cele două lanțuri grele împreună; cea de a treia metodă folosește imobilizarea inițială a proteinei A sau a proteinei G pe suprafața traductorului, deoarece este cunoscut că anticorpii se leagă de aceste proteine prin intermediul fragmentului Fc. Din date experimentale a rezultat că moleculele de anticorpi denaturate parțial sunt mai bine orientate pe suprafață comparativ cu Ac naturali, expunând situsurile de legare pentru antigen la exterior în soluție, mărindu-se astfel activitatea de legătură a antigenului.

Imobilizarea anticorpilor prin restul carbohidrat

Anticorpi pot fi imobilizați pe suporturi activate cu hidrazidă dacă catenele carbohidrate ale anticorpilor sunt oxidate la grupele aldehydice cu periodat de sodiu. Eficiența cuplării depinde de cantitatea de proteină și de accesibilitatea catenelor laterale de carbohidrați. În cazul imunoglobulinelor randamentul cuplării a fost de 74% și raportul anticorp-antigen legat este 1:2. Această metodă conduce la obținerea unor suprafațe având toate situsurile de legătură pentru antigene accesibile cuplării.

Anticorpul sau fragmentele de anticorp $F(ab')_2$ pot fi reduse prin tratarea cu 2-mercaptoetilamină. Aceasta este o metodă de reducere preferențială a punților sulfurice din regiunea "balama" menținându-se împreună lanțurile grele ale anticorpului. Drept rezultat molecula de anticorp este scindată în două fragmente cu grupe sulfhidril libere, ce pot fi folosite pentru imobilizarea directă pe un suport activat cu iodacetil sau bromacetil. Se formează o legătură tioeterică foarte stabilă între anticorp și suport. În plus, cinetica cuplării este foarte rapidă (15 min). De cele mai multe ori este mai avantajos să se folosească fragmentul $F(ab')_2$ redus decât reducerea întregului anticorp, deoarece fragmentul F_c al întregului anticorp poate da naștere la legături nespecifice. Fragmentele F_{ab} au fost imobilizate ele generând suprafețe cu capacitate mare de cuplare, adsorbția nespecifică fiind mică în acest caz, preparatele obținute având o stabilitate mare. O altă posibilitate este autoasambiarea anticorpilor reduși sau a fragmentelor de anticorp direct pe suprafețe de aur.

6.4. INTERACȚIUNEA SPECIFICĂ FAȚĂ DE CEA NESPECIFICĂ

O problemă asociată cu imunosensorii nemarcați este legarea nespecifică dintre antigen și anticorp, deoarece nu există posibilitatea discriminării exacte între semnalele măsurate pentru interacțiile specifice și cele nespecifice. Pentru a se putea realiza o astfel de diferențiere, traductorul ar trebui să fie sensibil la modificările conformaționale ale situsului de legare a antigenului sau la modificările de distribuție a sarcinilor în jurul acestui situs în momentul legării antigenului. Lee și colab.[35] au construit un astfel de imunosensor, prin cuplarea fluoresceinei de proteina A. La adăugarea IgG care se leagă de proteina A, câmpul electric local s-a modificat, și ca urmare s-a modificat concentrația locală a grupărilor OH. Deoarece intensitatea fluoresceinei este dependentă de pH, această interacțiune (proteina A cu IgG) poate fi măsurată.

Pentru a se obține un imunosensor cu caracteristici controlabile suprafața acestuia trebuie proiectată într-un mod care să se asigure o cuplare specifică superioară celei nespecifice. Factorii care influențează adsorbția antigenilor de proveniență proteică sunt: caracteristicile suprafeței, proteina și condițiile din soluție. Este bine cunoscut faptul că adsorbția este mai mare în cazul suprafețelor hidrofobe decât în cazul celor hidrophile. Mai mult s-a demonstrat că, de obicei, adsorbția maximă are loc în jurul valorii punctului izoelectric al proteinei adsorbite. O explicație posibilă pentru aceasta este apariția unei repulsii minime între moleculele adsorbite. Pentru a proiecta o suprafață cu o adsorbție nespecifică redusă ar trebui să se obțină o energie liberă interfacială minimă între acea suprafață și soluție. Acest lucru este posibil dacă se folosesc, spre exemplu, hidrogelurile sau polimeri hidrofili cum ar fi oxizii polietilenici.

6.5. REGENERAREA IMUNOSENSORILOR

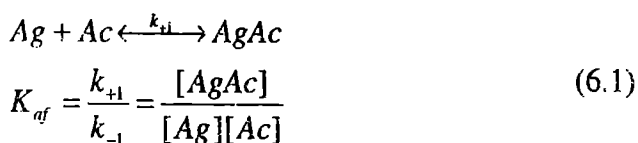
Regenerarea suprafeței imunosensibililor este una dintre problemele des întâlnite în studiul acestora. În organism anticorpul este utilizat de către sistemul imunitar pentru a se ataca de moleculele străine în vederea eliminării lor de către anumite celule. În acest mod în natură se asigură ireversibilitatea interacțiilor anticorp/antigen. Pentru realizarea unor imunosensibili foarte sensibili ar trebui folosiți anticorpul cu afinitate mare. În acest caz cuplarea dintre anticorp și antigen devine aproape ireversibilă, ceea ce se poate explica prin faptul că, constanta de afinitate este controlată de viteza de disociere și mai puțin de viteza

de asociere. Astfel apare o contradicție între reversibilitatea rapidă și sensibilitatea mare, care reprezintă proprietăți dorite în cadrul aplicațiilor practice ale biosensibilor. În acest sens se pot folosi anticorpi cu o afinitate mică dar în aceste condiții imunosenzorul nu mai este sensibil. De asemenea, s-a demonstrat faptul că dacă în soluție complexul liber poate disocia, acest lucru nu este întotdeauna valabil în condițiile în care anticorpii sunt imobilizați pe un suport solid. Cinetica disocierii de pe un suport solid este câteodată mult mai lentă. O posibilă explicație se bazează pe faptul că stratul de separare dintre suprafață și soluție conține o concentrație foarte mare de anticorpi fapt care împiedică deplasarea antigenului în acest mediu pentru a difuza înspre masa soluției. De aceea sunt necesare condiții extreme de eluție cum ar fi un pH foarte mare sau foarte mic, concentrații mari de săruri sau anumiți agenți de denaturare. Eluția realizată în astfel de condiții extreme conduce de obicei la o denaturare parțială a anticorpilor imobilizați. În literatură se specifică faptul că chiar în condițiile utilizării unei soluții de uree 8 M ca agent de disociere imunoreactivitatea anticorpilor scade foarte puțin, aceștia putând fi folosiți în cadrul a 40 de determinări. O soluție pentru evitarea problemei regenerării este aceea de a realiza imunosenzori de unică folosință, care ar presupune însă ca reproductibilitatea obținerii acestora să fie foarte bună deoarece acești senzori nu pot fi calibrați. O altă soluție ar fi legată de posibilitatea îndepărtării complexului anticorp:antigen după fiecare măsurătoare. Acest lucru se poate realiza prin folosirea unei suprafețe pe care să fie imobilizată proteina A sau G deoarece fragmentul Fc al anticorpilor se legă de una din aceste proteine.

6.6. ASPECTE TEORETICE ALE IMUNOANALIZEI

Interacția dintre anticorp și antigen este asemănătoare celei dintre enzimă și substratul său. Centrul de legare pentru antigen al anticorpului este similar centrului activ al enzimei. Prin studii cristalografice cu raze X, s-a stabilit faptul că 15 până la 22 resturi de aminoacizi aparținând centrului de legare ai Ag sunt implicați în legarea acestuia de Ac. Dintre acești 3 până la 6 resturi de aminoacizi contribuie la energia liberă a legăturii. Interacția, ca și în cazul celei dintre enzimă și substrat este, de natură biospecifică conformația tridimensională a acestora având o contribuție decisivă. Interacția Ag-Ac are la bază legături slabe necovalente cum ar fi cele electrostatice, legături de hidrogen sau prin forțe van der Waals.

Prin definiție, o imunoanaliză reprezintă un instrument analitic care se bazează pe distribuția antigenului liber (analitului) în raport cu antigenul legat de anticorpul corespunzător. Astfel se pot obține informații cantitative. Cel mai folosit model teoretic pentru descrierea legării reversibile a antigenului de anticorp este modelul Scatchard:



$$K_{af} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[AgAc]}{[Ag][Ac]} \quad (6.2)$$

k_{+1} reprezintă constanta vitezei de formare, k_{-1} reprezintă constanta vitezei de disociere iar K_{af} constanta de afinitate care descrie tăria cu care anticorpul leagă antigenul corespunzător și se situează în domeniul 10^6 - 10^{12} M⁻¹. Performanțele metodelor imunochimice sunt legate de valoarea constantei K_{af} în sensul că pentru valori mari ale acesteia se obțin limite de detecție scăzute.

Concentrația totală de anticorp $[Ac_{tot}]$ este descrisă de ecuația 6.3:

$$[Ac_{tot}] = [Ac] + [AgAc] \quad (6.3)$$

Prin înlocuirea concentrației anticorpului liber cu concentrația anticorpului total minus anticorpul legat, rezultă următoarea ecuație:

$$K_{af} = \frac{[AgAc]}{([Ac_{tot}] - [AgAc])[Ag]} \quad (6.4)$$

prin rearanjare rezultă:

$$\frac{[AgAc]}{[Ag]} = K_{af}[Ac_{tot}] - K_{af}[AgAc] \quad (6.5)$$

Fracțiunea legată $[AgAc]$ este notată în general cu (B) iar fracția liberă este notată cu $[Ag]$. Reprezentarea grafică a raportului B/F (legat/liber) în funcție de B este redat în figura 6.3.

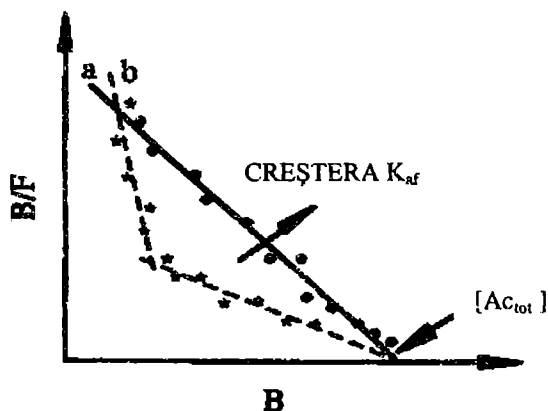


Fig. 6.3. Graficul Scatchard pentru (a)-anticorpi monoclonali; (b)-anticorpi policlonali.

În condițiile utilizării anticorpilor monoclonali, din graficul Scatchard este posibilă determinarea constantei K_{af} precum și a concentrației totale de anticorp care se obține din intersecția cu abscisa. În cazul anticorpilor policlonali, este dificilă estimarea valorii K_{af} datorită amestecului de tipuri de anticorpi cu diferite constante de afinitate.

În funcție de curba Scatchard obținută este posibilă uneori împărțirea populației de anticorpi în două, așa cum rezultă și din figura 6.3.b. Partea superioară a curbei reprezintă anticorpii cu afinitate mare, iar partea de jos a curbei reprezintă anticorpii cu afinitate mică. Prin trasarea graficului B funcție de $\lg F$ (a se vedea figura 6.4.) se poate estima valoarea medie sau aparentă pentru K_{af} pentru o populație de anticorpi policlonali. În cazul unei analize competitive aceasta corespunde unei curbe de calibrare relativă la Ag obținută în condițiile unei legări libere de 50% a anticorpilor (IC_{50}).

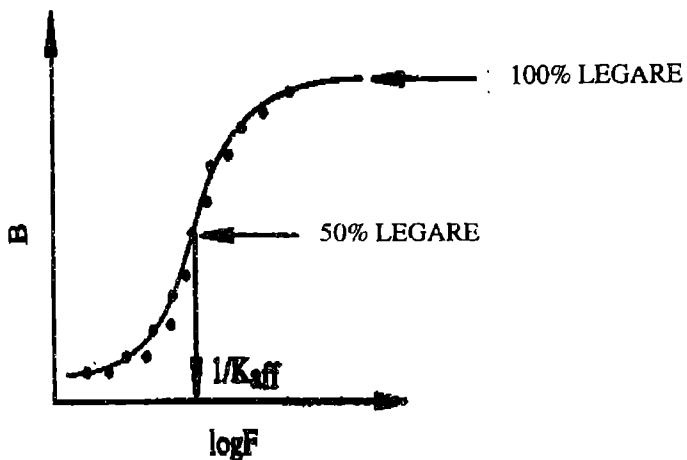


Fig.6.4. Curba de saturare a anticorpului

6.7. PRINCIPIILE IMUNOANALIZEI

Clasificarea principalelor metode imunoanalitice este redată figura 6.5.

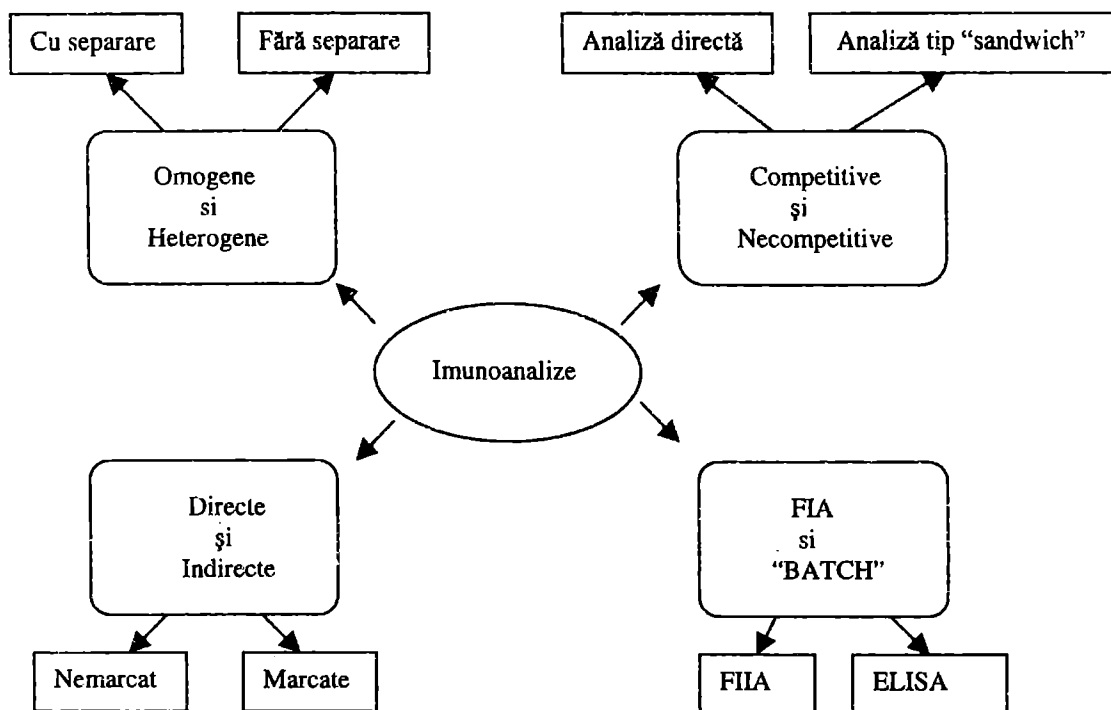


Fig. 6.5. Clasificarea imunoanalizelor

Imunodeterminările pot fi împărțite în determinări directe și indirecte. Determinările directe nu necesită folosirea unor markeri în scopul cuantificării relației dintre antigenul legat și cel liber. O metodă directă bine cunoscută este RPS (rezonanța plasmonică de suprafață). Totuși, în majoritatea imunodeterminărilor este necesară utilizarea markerilor (ex. imunoanaliza indirectă), în special în cazul realizării unor determinări foarte sensibile. Markerul este legat fie de antigen fie de anticorp. Enzimele, radioizotopii sau moleculele care generează fenomene de fluorescență, sau de chemiluminiscentă sunt exemple de markerii folosiți în imunoanalize.

Imunodeterminările pot fi de asemenea clasificate după principiul competitiv sau necompetitiv al acestora. Imunodeterminarea omogenă nu necesită etape de separare a moleculelor marcate (Ag^* sau Ac^*) de cele nemarcate (Ag sau Ac), astfel încât reacția imunochimică dintre moleculele marcate și cele nemarcate dă naștere direct la o modificare de semnal măsurabilă. S-au realizat de asemenea, diverse tipuri de analize omogene bazate pe markerii enzimatici. În general metodele heterogene conduc la o mărire a sensibilității atâta timp cât efectele de matrice nu vor influența tot atât de mult performanțele analizei. Metodele imunoanalitice pot fi de asemenea clasificate în competitive (metoda reactivului limitat) și necompetitive (metoda reactivului în exces), care la rândul lor pot fi împărțite în sub-clase.

6.7.1. IMUNOANALIZA COMPETITIVĂ

Imunodeterminările competitive pot fi realizate în moduri diferite, cele mai utilizate fiind tipurile directe și indirecte și înlocuirii. Molecule mici de antigen sunt de obicei determinate prin metode competitive, de exemplu modalitatea directă a fost utilizat pentru detecția atrazinei, acidului 2,4-difenoxi acetic și a paraquat-ului. Modalitatea indirectă a fost folosită, de asemenea, pentru analiza unor molecule mici, cum ar fi atrazina sau, clorpirifosul. Determinarea acidului 2,4-diclorofenoxi acetic s-a realizat pe baza utilizării principiul înlocuirii.

Sensibilitatea metodelor competitive directe este limitată de diverși factori, cum ar fi: constanta de afinitate K_{af} , precizia determinărilor la concentrații mici de compus de determinat precum și de legarea nespecifică. Teoretic, cu cât concentrația de analit-marker folosită este mai mică cu atât limita de detecție scade și cu atât mai puțin Ac este necesar în determinare. Pentru a se minimaliza eroarea estimării centrelor de legare rămase neocupate este necesară folosirea unei concentrații mici de anticorp. În principiu, acest lucru înseamnă că K_{af} limitează sensibilitatea determinărilor deoarece procentul de ocupare a centrelor de legare este determinat de afinitatea dintre anticorp și antigen. Sensibilitatea depinde totuși de o precizie mare și de o legarea nespecifică foarte mică.

6.7.2. IMUNOANALIZA NECOMPETITIVĂ

Metodele imunochimice având la bază interacții necompetitive pot implica un singur centru de legare al Ac sau doi centrii de legare ai Ac ("sandwich"). Determinarea prin tehnica "sandwich" se aplică numai în cazul antigenelor de dimensiuni moleculare mari, deoarece Ag necesită cel puțin doi epitopi pentru a fi capabil să lege doi anticorpi simultan. Acest tip de analiză prezintă o sensibilitate mare.

Imunodeterminările necompetitive sunt mai sensibile decât cele competitive. Teoretic, se poate calcula valoarea limitei optime de detecție în determinării competitive comparativ cu cea necompetitivă pentru o aceeași reacție antigen-anticorp. Pentru o

valoare a constantei de afinitate de 10^{12} M^{-1} limita de detecție pentru analizele competitive și necompetitive a fost găsită a fi 10^{-14} M și respectiv 10^{-16} M .

6.8. MARKERI FOLOSIȚI PENTRU OBTINEREA INFORMAȚIEI ANALITICE ȘI BIOCHIMIA CONJUGĂRII

Unul dintre cei mai importanți factori în dezvoltarea metodelor imunochimice îl reprezintă marcarea a antigenului sau a anticorpului, acesta având și o contribuție semnificativă și la sensibilitatea metodelor. Markerii sunt folosiți pentru a diferenția și cuantifica distribuția antigenelor legate față de cele nelegate. Inițial au fost utilizați markerii radioizotopici: ^{131}I , ^{125}I , ^3H , și ^{14}C , la care se renunță treptat datorită în special toxicității lor. Proprietățile chimice ale markerilor sunt esențiale în cadrul determinărilor imunochimice, fiind important ca aceștia să posede anumite proprietăți cum ar fi: (i) să poată fi detectabili în concentrații foarte mici pentru a asigura o sensibilitate de 10^{-15} - 10^{-18} moli; (ii) capacitatea de legare a reactantului marcat trebuie să fie nealterată și prin aceasta neinfluențându-se interacțiile biochimice; (iii) interacțiile nespecifice ale markerului trebuie să fie cât mai mici posibil; (iv) reactantul marcat trebuie să fie cât mai stabil; și (v) să prezinte o toxicitate scăzută. În tabelul 6.1 se prezintă o serie de markeri neizotopici folosiți în imunoanalize.

Tab. 6.1. Markerii neizotopici folosiți în imunoanaliză [28]

Markeri		Determinare
Enzimă	Catalază Glucoz oxidază Peroxidază Luciferază Urează	Amperometrică- determinarea O_2 Determinarea luminiscentei Determinare potențiomtrică a fenolului
Catalizatori	Hemina	Determinarea luminiscentei
Fluorofori	Fluoresceina ex.FITC (fluorescein izotio- cianatul)	Determinarea fluorescenței
Substanțe electroactive	Ferrocenii	Determinare amperometrică
Lipozomi	Marker ionic	Determinarea potențiomtrică a markerului ionic

Antigenul (sau anticorpul) trebuie marcat în așa fel încât să nu prezinte un impediment steric pentru legarea anticorpului sau antigenului de compusul de dozat. În cazul unor analizi de dimensiuni mici, între marker și imunoreactant se intercalează un compus chimic care are rolul de menține conformația sterică. Principalele aspecte care se au în vedere în condiția conjugării imunoreactanților sunt următoarele: (i) grupele reactive ale markerului, (ii) reactivii folosiți pentru cuplarea acestor grupe reactive (iii) cantitatea de marker folosită (iv) condițiile experimentale (v) izolarea și purificarea conjugatului. Exemple de grupe reactive aparținând enzimelor și anticorpilor și care sunt folosite în mod curent pentru conjugare sunt: amino, tio, fenoxi, carboxi.

6.9. IMUNODETERMINĂRI ELECTROCHIMICE

Aceste metode sunt cele mai apropiate de sensul adevărat al imunosensivilor. Uneori, este dificil să se facă o distincție clară între imunosensivi și tehnici imunoanalitice care au la bază metode electrochimice, deoarece modurile de abordare și tehnologia folosite sunt foarte apropiate sau identice. Tehnicile analizei omogene se bazează pe modificarea semnalului dat de marker în momentul în care conjugatul analit-marker formează imunocomplexul cu anticorpul (figura 6.6.). Datorită formării complexului, centrul activ al enzimei este ecranat (mascat) și accesul către acesta al moleculelor de substrat este parțial sau complet blocat. Acest mod de determinare este foarte simplu, componenții reacției se amestecă cu proba iar răspunsul se măsoară de obicei cinetic. S-au descris astfel de tehnici având la bază clorperoxidază și glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza.

Tipurile de determinări heterogene au fost studiate mai mult datorită limitelor lor de detecție mult mai bune pe care acestea le prezintă. De obicei, imunoanaliza convențională în fază solidă bazată pe enzima imobilizată (ELISA) se realizează pe micro-plăci, în tuburi, capilare sau plăci de sticlă. Reacția este urmărită prin intermediul unui de sensor electrochimic care poate detecta semnalul generat de markerul folosit; deci componenta imunochimică nu este în contact intim cu traductorul. Metoda presupune în continuare o serie de etape de spălare, de adăugire a substratului și de incubare după care în final se obține produsul de reacție care poate fi măsurat electrochimic prin intermediul unor senzorii chimici sau al unor biosensivi.

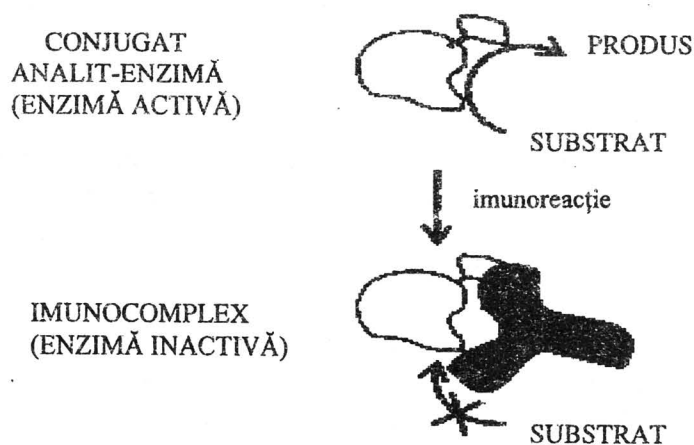


Fig. 6.6. Principiul imunoanalizei omogene. Prin cuplarea analitului de Ac specific rezultă inactivarea enzimei.

Markerii enzimatici au fost utilizați în cadrul imunodeterminărilor electrochimice, în tabelul 6.2. fiind redate o serie de exemple.

Tab. 6.2. Exemple de markeri enzimatici folosiți pentru imunodectia electrochimică [28].

ENZIMA	SUBSTRATUL	TRADUCTOR
Peroxidaza	H ₂ O ₂ + iodura (ferocen, qinona) H ₂ O ₂ transfer direct de electroni	Amperometric Potentiometric
Lacaza	O ₂ + hidrochinona	Amperometric (O ₂)
Catalaza	H ₂ O ₂	Amperometric(O ₂)
Glucoz-oxidaza	O ₂ (ferocen + glucoza)	Amperometric
Alcalin-fosfataza	p-aminofenil fosfat	Amperometric
Galactozidaza	p-aminofenil β-D-galactozidaza	Amperometric
Ureaza	Urea	Potentiometric Conductometric
Acetil-colinesteraza	Acetilcolina	Amperometric

Afinitatea anticorpilor pentru analit este caracterizată de obicei cu ajutorul constantei cinetice de echilibru al asocierii K_A . Valori mari ale constantei K_A conduc la o sensibilitate mică a metodelor. În scopul regenerării suprafeței sensibile a sensorului anticorpilor trebuie să prezinte anumite proprietăți cinetice. Astfel, anticorpilor cu constante cinetice ale vitezelor de disociere foarte scăzute ($k_d < 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), sunt adecvați sistemelor de unică folosință, suprafața sensorilor neputând fi regenerată prin disocierea imunocomplexilor.

În cazul analizelor competitive, limita de detecție poate fi îmbunătățită prin folosirea analiților marcați la diluții foarte mari, deoarece o cantitate mai mică de analit este suficientă pentru a satura situsurile de legare de pe suprafața sensibilă. Pe de altă parte, această abordare este limitată de faptul că semnalul generat de markerul legat trebuie să fie măsurat cu precizie. Pentru obținerea unui semnal mărit, este necesară aplicarea unor scheme de amplificare pentru reciclarea produșilor eliberați în reacția markerului enzimatic. În continuare se vor prezenta câteva exemple elocvente.

Alcalin-fosfataza (ALP) este folosită frecvent în imunoanalizele fotometrice și amperometrice convenționale. Substratul utilizat în reacția enzimatică este 4-aminofenil fosfat (PAPP), acest compus putând fi ușor oxidat la un potențial scăzut al electrozului (0,3V). În acest mod s-a determinat α -fetoproteina și teofilina, în cadrul unei analize în flux.

Determinarea fosfatazei acide prostatice, necesită ALP cu NADP⁺ drept cosubstrat. NAD⁺, produs în urma hidrolizei este regenerat în urma reacției cu alcool-dehidrogenaza și diaforaza, semnalul analitic fiind generat prin oxidarea amperometrică a ferocianurii.

6.10. IMUNOSENSORI

Imunosensorii se bazează pe interacția specifică dintre Ag:Ac, discutată mai sus. Analizele au la baza modele imunochimice heterogene. Conexiunile dintre elementele de biorecunoaștere și electrozi sunt realizate prin diverse tehnici. Inițial, erau tehnicile bazate pe membrane de biorecunoaștere, acestea fiind aplicate la construcția biosensibilizatorilor. Câteva modele s-au bazat pe electrozului de oxigen Clark ce era pus în contact cu membrana ce conținea anticorpilor legați. Catalaza era folosită drept marcator ce cataliză eliberarea oxigenului, determinarea α -fetoproteinei folosind conjugarea ei cu catalaza fiind un bun exemplu. Mai convenabil a fost, mai apoi, legarea directă a moleculelor imunospecifice de suprafața sensibilă datorită ori adsorbției, ori legării covalente. A fost descrisă în literatură o metodă de analiză tip "sandwich" în care anticorpul primar era imobilizat pe particule de

grafit dispersate, încât imunoreactorul astfel construit servea simultan și ca electrod. Anticorpul secundar a fost marcat cu peroxidază. De obicei electrozii sunt folosiți de mai multe ori și numai membranele de biorecunoaștere sunt înlocuite. Sensorii obținuți prin tehnica "screen printed" au servit la dezvoltarea imunosenzorilor amperometrici pentru detecția ierbicidului acid 2,4-diclorfenoxiacetic folosindu-se peroxidază drept marcator. Limita de detecție obținută a fost de 0,1 μg/L, mai târziu obținându-se o creștere substanțială de sensibilitate (9 ng/L, timp de analiza 30 min) folosind acetilcolinesterază cu activitate foarte mare ca marcator.

Electrozii potențiometrici au fost aplicați la monitorizarea modificărilor supratensiunii de reacție în cursul transferului electronic direct dintre electrod și peroxidaza legată și marcatorii pe bază de lacază. Conjugatul acetilcolinesterază-hCG a fost determinat cu un electrod de pH.

Un sistem bazat pe capacitatea electrică este cel folosind electrozi pe care s-a depus polimerul Eudragit S 100 care se dizolvă spontan în mediu bazic. Prin hidroliza enzimatică a ureei are loc o mărire a pH-ului. Această posibilitate a fost utilizată la determinarea IgG folosindu-se ambele tipuri de analize, competitivă și necompetitivă; limita de detecție fiind de 0,1 μg/L în ambele cazuri, obținându-se o modificare a capacității electrice de peste două ordine de mărime. Un alt marker folosit în astfel de determinări este catalaza care descompune apa oxigenată cu producere de oxigen care poate conduce deasemenea la modificări ale capacității. Acest principiu este aplicat la construcția CASIS (sistem instrumental pe baza de sensor capacitiv de afinitate), dispozitiv care este livrat comercial de firma Biotronic System.

BIBLIOGRAFIE

1. A. L. Lehninger, *Biochemistry, the Molecular Basis of Cell Structure and Function*, Flammarion, Paris 1972.
2. A. Ciucu, *Teză de Doctorat*, Institutul Politehnic București, București 1986.
3. M. Mascini, G. Palleschi, *Selective Electrode Rev.*, 11 (1989) 191.
4. K. G. Scrimgeour, *Chemistry and Control of Enzyme Reactions*, Academic Press, New York 1977.
5. D. V. Roberts, *Enzyme Kinetics*, Cambridge University Press, Cambridge, London-New York-Melbourne 1977.
6. A. Cornish-Bowden, *Principles of Enzyme Kinetics*, Butterworths, London-Boston 1975.
7. A. Ciucu, V. Magearu, C. Luca, *Rev. roum. Biochim.*, 20 (1983) 105.
8. G. G. Guilbault, *Enzymatic Methods of Analysis*, Pergamon Press, Oxford 1970.
9. I. F. Dumitru, D. Iordăchescu, *Introducere în Enzimologie*, Edit. Medicală, București 1981.
10. J. L. Marty, N. Mionetto, I. Karube, *Biosens. Bioelectron.*, 9 (1994) 463.
11. T. Noguier, A. Gradinaru, A. Ciucu, J. L. Marty, *Anal. Lett.*, 32 (1999) 1723.
12. C. Tran Minh, *Biosensors*, Chapman Hall, London 1993.
13. R. S. Sethi, *Biosens. Bioelectron.*, 9 (1994) 243.
14. A. Ciucu, R. P. Ealdwin, *Electroanalysis*, 4 (1992) 515.
15. L. C. Clark, C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102 (1962) 29.
16. V. Magearu, *Controlul Analitic al Proceselor Biotehnologice*, Edit. Tehnică, București 1988.
17. S. J. Updike, G. P. Hicks, *Nature* (London), 214 (1967) 986.
18. G. G. Guilbault, G. J. Montalvo, *J. Am. Chem. Soc.*, 91 (1969) 2164.
19. N. Gough, P. Carr, *Electroanalysis*, 6 (1992) 600.
20. I. Mell, J. Melloy, *Electroanalysis*, 8 (1992) 684.
21. A. Ciucu, V. Magearu, C. Luca, *Anal. Lett.*, 18 (1985) 299.
22. F. Munteanu, A. Lindgren, J. Emneus, L. Gorton, T. Ruzgas, A. Ciucu, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2596.
23. A. Lindgren, L. Stoica, T. Ruzgas, A. Ciucu, L. Gorton, *The Analyst*, 124 (1999) 527.
24. A. Ciucu, V. Magearu, S. Fleschin, I. Lucaciu, F. David, *Anal. Lett.*, 24 (1990) 2005.
25. M. Mascini, G. Palleschi, *Anal. Chem.*, 69 (1979) 249.
26. G. E. Baiulescu, V. V. Coșofreț, *Applications of Ion-Selective Membrane Electrodes in Organic Analysis*, Wiley Chichester 1977.
27. A. Ciucu, V. Magearu, C. Luca, *Anal. Lett.*, 22 (1989) 2673.
28. A. Ciucu, *Biosensors for Environmental Monitoring*, Ed. Niculescu, Bucharest 2000.
29. A. Ciucu, G. L. Radu, *St. Cerc. Biochim.*, 31 (1988) 125.
30. V. Magearu, A. Ciucu, *Anal. Lett.*, 23 (1990) 2005.
31. S. A. Berson, R. S. Yallow, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 82 (1959) 338.
32. B. D. Hammock, R. O. Mummas, in *Recent Advances in Pesticide Analytical Methodology*, J. Harvey, G. Zweing, Ed., ACS, Washington D.C. 1980.
33. D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, *J. Electroanal. Chem.*, 402 (1996) 227.
34. D. J. O'Shannessy, M. Wilchek, *Anal. Biochem.*, 191 (1990) 1.
35. C. S. Lee, P. Y. Huang, D. M. Ayres, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 464.



ISBN: 973-575-415-0

Lei 25700