



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00057

(22) Data de depozit: 27/01/2015

(41) Data publicării cererii:
29/07/2016 BOPI nr. 7/2016

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN
CUZA" DIN IAȘI, BD. CAROL I, NR.11, IAȘI,
IS, RO

(72) Inventatori:
• ZAHARIA MARIUS-MIHAI,
STR. TINERETULUI, BL. 14, SC. B, AP. 12,
BUHUȘI, BC, RO;

• GRADINARU VASILE-ROBERT,
STR. AEROPORTULUI, BL. 1D, SC. V,
AP. 19, IAȘI, IS, RO;
• ZAHARIA ELENA-ADELINA,
STR. TINERETULUI, BL. 14, SC. B, AP. 12,
BUHUȘI, BC, RO;
• MURARIU MANUELA, REDIU, IS, RO;
• DROCHIOIU GABI, STR. PETRU RAREȘ
NR. 19, C 15, TÂRGU FRUMOS, IS, RO

(54) METODĂ SPECTROFOTOMETRICĂ DE DETERMINARE A
ACTIVITĂȚII AGENȚILOR DECUPLANȚI AI FOSFORILĂRII
OXIDATIVE

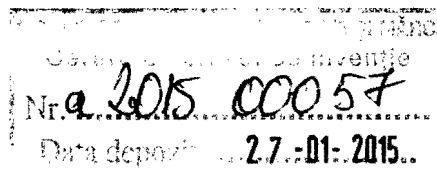
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare a activității unor agenți decuplanți ai fosforilării oxidative, în procesul de respirație a organismelor eucariote. Metoda conform invenției constă în determinarea colorimetrică a alcoolului etilic, prin reducerea bicromatului de potasiu, de culoare portocalie, în mediu puternic acid

H₂SO₄, la săruri de crom (III) de culoare verde, utilizând apa distilată ca martor care nu are acțiune decuplantă, și un agent de decuplare clasic, drept etalon.

Revendicări: 3
Figuri: 6





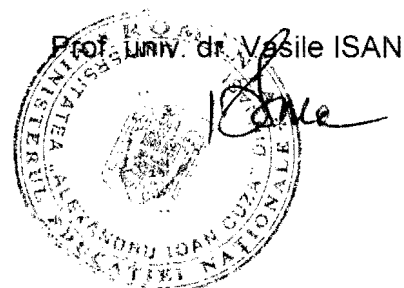
Descrierea invenției

METODA SPECTROFOTOMETRICĂ DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII AGENȚILOR DECUPLANȚI A FOSFORILĂRII OXIDATIVE

Invenția se referă la un procedeu de determinare a agenților decuplanți ai fosforilării oxidative bazat pe formarea alcoolului etilic în radiculele plantelor superioare și în drojdia de bere sub acțiunea dinitrofenolilor și al altor compuși chimici cu potențială acțiune de decuplare. Prin fosforilare oxidativă se înțelege formarea moleculelor de acid adenzin-trifosforic (notat aici ATP), bogate în energie, în cadrul lanțului transportor de electroni existent în matricea mitocondrială a organismelor eucariote [1]. Acest proces este esențial pentru toate aspectele vieții celulare în organismele aerobe, deoarece ATP-ul constituie principala lor sursă de energie utilizabilă [2]. Prin lanț transportor de electroni se înțelege sistemul de reacții biochimice prin care compușii bogați în atomi de hidrogen (H^+) de tipul NADH și $FADH_2$ reduc succesiv unele feroproteine, chinonele și citocromii *b*, *c*, *a*; acesta din urmă, citocromul *a*, reduce oxigenul molecular ajuns în celule în decursul procesului de respirație cu formare de molecule de apă. Energia rezultată din fiecare moleculă de NADH consumată și, respectiv, fiecare moleculă de flavinadenindinucleotidă redusă (notată aici $FADH_2$) este înmagazinată în câte 3 molecule de ATP și, respectiv, 2 molecule de ATP [3].

Agenții de decuplare sunt compuși chimici de natură organică sau proteică ce inhibă formarea moleculelor de ATP (acid adenzin-trifosforic) în procesul de respirație a organismelor eucariote. Energia rezultată în procesul respirator în reacția globală a NADH și $FADH_2$ cu oxigenul nu se acumulează sub forma moleculelor de ATP, ci se eliberează sub formă de căldură. Prin eucariote se înțeleg organismele celulare care posedă un nucleu bine diferențiat. Respirația și formarea de ATP în procesul respirator are loc în astfel de celule, dar la nivelul unor corpusculi subcelulari ce poartă denumirea de mitocondrii. Acestea se deosebesc de organismele anaerobe, numite și organisme procariote, care folosesc o altă strategie de a obține energie și anume prin intermediul procesului de fermentație. De asemenea, organismele procariote posedă un nucleu nediferențiat în celule, iar oxigenul este toxic pentru acestea. Procesul de fermentație reprezintă eliberarea energiei din moleculele de glucoză și alte zaharuri în absența oxigenului, sub acțiunea unor enzime specifice, cu formare de alcool etilic [4].

RECTOR,



25

În literatură sunt descrise procesele biochimice de procurare a energiei prin respirație, adică prin arderea în celule a zaharurilor în prezența oxigenului molecular, iar energia rezultată este înmagazinată sub forma moleculelor de ATP. În schimb, în lipsa oxigenului, în celulele eucariotelor apar o serie de procese fermentative care conduc la eliberarea unei cantități mai mici de energie, înmagazinată într-un număr relativ mai mic de molecule de ATP. În decursul proceselor fermentative rezultă și molecule de alcool etilic [5].

Deși există numeroși agenți decuplanți, nu este cunoscută o metodă eficientă și simplă de evidențiere a acțiunii acestora și, în consecință, de clasificare a substanțelor chimice funcție de gradul lor de decuplare [6].

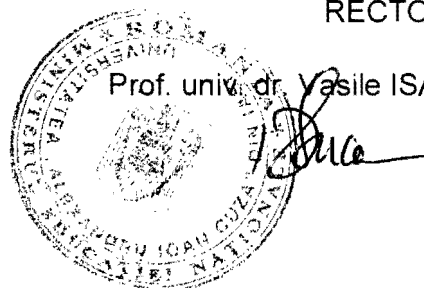
Dinitrofenolii și alți agenți decuplanți ai fosforilării oxidative de respirație inhibă oxidarea glucozei cu oxigenul din atmosferă cu formare de dioxid de carbon și apă și eliberare de ATP. Mai mult decât atât, acești agenți stimulează procesele fermentative ale glucozei cu formare de alcool etilic [7]. De aceea, măsurarea cantității de alcool formate sub acțiunea agenților de decuplare poate fi o măsură a activității acestora. Trecerea de la respirație la fermentație sub acțiunea decuplanților poate fi evidențiată utilizând diverse organisme vii cum ar fi drojdia de bere, plantele superioare sau chiar țesuturi vegetale ce conțin încă celule intacte. Se pot folosi de exemplu radiclele de grâu sau porumb, tratate pentru scurt timp cu 2,4-dinitrofenol sau alți agenți decuplanți. Dacă țesutul respectiv nu mai are celule intacte, atunci are loc numai fermentația alcoolică indiferent dacă se introduce decuplantul sau nu, deoarece enzimele caracteristice procesului de fermentație nu sunt afectate de distrugerea celulelor și mitocondriilor, în timp ce respirația se desfășoară în celule, numai la nivelul mitocondriilor.

Prezența invenției se bazează pe faptul că, sub acțiunea agenților decuplanți, este inhibată respirația celulelor organismelor eucariote și se formează alcoolul etilic, ce poate fi determinat colorimetric prin reducerea bicromatului de potasiu ($K_2Cr_2O_7$), de culoare portocalie, în mediu puternic acid (H_2SO_4) la săruri de crom (III) de culoare verde. Astfel, utilizând apa distilată ca martor care nu are acțiune decuplantă și 2,4-DNP, un agent de decuplare clasic, drept etalon [8], se poate determina intensitatea acțiunii decuplante a celorlalți compuși chimici, dacă aceștia sunt într-adevăr agenți decuplanți.

În principiu, într-un vas de sticlă închis cu capac prevăzut intern cu un al doilea vas de dimensiuni mai mici ce conține materialul vegetal tratat în prealabil cu soluții de agenți de decuplare sau de alți compuși chimici analizați și o soluție de hidroxid de sodiu de concentrație 0,1N (NaOH).

RECTOR,

Prof. univ. dr. Vasile ISAN



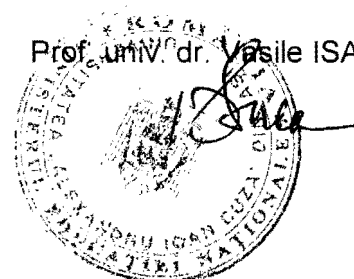
În vasul mare, exterior celui în care s-a plasat materialul vegetal, se introduce o soluție de $K_2Cr_2O_7$ și H_2SO_4 (**Figura 1**). După închiderea ermetică a vasului exterior, întregul dispozitiv se termostatează la o temperatură de aproximativ $55\text{ }^\circ\text{C}$, cel puțin o oră, în scopul evaporării alcoolului etilic, rezultat în urma biosintezei, din vasul interior și captarea sa în cel exterior, în care are loc oxidarea alcoolului și reducerea bicromatului de potasiu, reacție care poate fi pusă în evidență pe baza virajului de culoare a soluției de la portocaliu la verde. Din soluția de culoare verde, rezultată, se prelevează un volum bine determinat sau întregul volum de soluție și se diluează cu apă distilată, astfel încât maximele de absorbție ale spectrelor rezultate, cu ajutorul unui spectrofotometru sau colorimetru, să nu depășească valoarea 1. În paralel, se realizează o curbă de etalonare folosind alcool etilic (în domeniul de concentrație 0-5 mM), în vederea determinării exacte a concentrației alcoolului etilic format sub acțiunea agenților decuplanți.

Metoda colorimetrică de determinare a activității agenților decuplanți ai fosforilării oxidative prezintă o serie de avantaje:

- este singura metodă de evidențiere a acțiunii decuplanților și se bazează pe determinarea alcoolului etilic rezultat sub acțiunea acestora;
- deși reacția cu bicromatul de potasiu a alcoolului etilic format este cunoscută, însă eliberarea sa controlată, sub acțiunea hidroxidului de sodiu la $55\text{ }^\circ\text{C}$, într-un vas închis și captarea sa în soluția de bicromat, nu a fost descrisă până în prezent;
- evidențierea acțiunii decuplante este simplă și ușor de realizat într-un laborator de chimie sau biochimie cu dotări modeste;
- prin definiție agenții decuplanți produc trecerea de la respirație la fermentație, iar avantajul metodei constă în aceea că determină cantitativ principalul produs de fermentație;
- măsurătorile colorimetrice sunt precise și exacte, permițând diferențierea netă între capacitatea de decuplare a unor diferiți agenți decuplanți;
- curba de calibrare se poate realiza, utilizând alcool etilic de diferite concentrații, la diferite lungimi de undă, cea mai potrivită fiind măsurarea absorbanței în ultraviolet, la 350 nm;
- poate constitui un test vizual rapid deoarece schimbarea culorii sub acțiunea decuplanților poate fi observată direct în vasul de reacție;

RECTOR,

Prof. univ. dr. Vasile ISAN

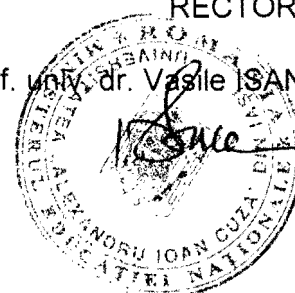


Caracterul de noutate al metodei descrise constă în măsurarea, pentru prima dată, a acțiunii decuplante a unor compuși chimici prin determinarea cantității de alcool etilic produs de celulele vii, sub acțiunea acestora. De asemenea, măsurătorile se efectuează printr-un procedeu nou bazat pe reacția cunoscută a bicromatului de potasiu cu alcoolul etilic, pentru care au fost optimizați o serie de parametri de lucru: durata tratamentului materialului vegetal cu compușii chimici de analizat, cantitatea de material luată în lucru, modalitatea de eliberare controlată a alcoolului etilic format respectiv captarea sa după evaporare la 55 °C și stabilirea parametrilor analitici ai reacției propriu zise. Procedeu descris nu necesită instalații și dispozitive suplimentare, în afara celor utilizate curent în laboratoarele de chimie și biochimie.

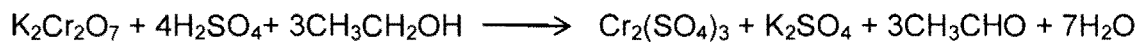
În continuare sunt prezentate 2 modalități de realizare a invenției.

Exemplu 1. Se taie cu o foarfecă radiclele proaspăt recoltate (rădăcini de plante tinere, numite și plantule) de grâu, porumb sau alte plante superioare. Din aceste radicle secționare, se cântăresc în duplicat o cantitate de 1 g de material vegetal. Separat, în pahare de tip Berzelius sau echivalente, se pipetează câte 5 mL de soluție proaspăt preparată de 2,4-DNP sau dintr-o altă substanță care ulterior va fi supusă analizei, având o concentrație de 50 μ M, peste care se adaugă fragmentele de radicle și se lasă în repaos timp de 15 minute pentru penetrarea compușilor în materialul vegetal. După 15 minute, rădăcinile se scot și se tamponează folosind hârtie de filtru pentru îndepărtarea lichidului rezidual, fiind incubate, la temperatura camerei, timp de 30 minute în vederea satisfacerii procesului biochimic/biologic de fermentație alcoolică. Pentru determinarea indirectă a nivelului de alcool etilic produs, se folosește dispozitivul din **Figura 1**. Acest dispozitiv constă dintr-un vas prevăzut cu două compartimente: unul central și unul extern acestuia, în care se află primul. În compartimentul central se adaugă rădăcinile tratate peste care se pipetează câte 2 mL de NaOH (0,1 N), cu scopul eliminării produșilor secundari de reacție cum ar fi aldehida acetică. În compartimentul extern se pipetează succesiv câte 3 mL de $K_2Cr_2O_7$ (10^{-2} M) și 3 mL de H_2SO_4 (96%). După adăugarea acestor componente, vasul se incubează pe o plită electrică, timp de 1 oră, la temperatura de 55 °C.

RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile SAN



În decursul procesului de incubare are loc evaporarea alcoolului etilic format și transformarea aldehidei acetică rezultate în urma procesului de fermentație în acetat de sodiu și alcool etilic. Alcoolul etilic rezultat în procesul de fermentație este captat în soluția acidă de bicromat de potasiu. Amestecul de reacție rezultat ce conține bicromat de potasiu nereacționat, acid sulfuric, alcool etilic și vapori de apă captați se prelevează și diluează la un volum final de 10 mL cu apă distilată. Spectrul de absorbție al soluției rezultate este înregistrat în domeniul spectral $\lambda = 250-650$ nm (**Figurile 2-4**). Reacția alcoolului etilic cu $K_2Cr_2O_7$ este redată prin următoarea ecuație chimică:

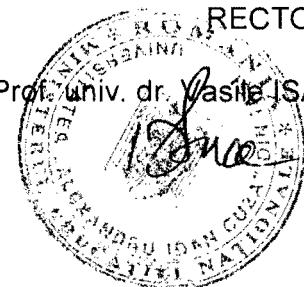


Așadar, formarea alcoolului etilic este evidențiată prin această reacție de culoare, deoarece soluția se colorează în verde, ca urmare a reducerii cromului(VI) la crom(III). Concomitent, se formează și aldehida acetică, ce poate fi decelată și după miros. Cantitatea de alcool format este însă dependentă de gradul de decuplare a fosforilării oxidative, de către dinitroderivați sau de alți compuși care manifestă acțiune asemănătoare decuplantă, precum și de concentrația și de timpul de acțiune al acestora al acestora.

Din **figura 2**, ce reprezintă etalonarea metodei de lucru, rezultă următoarele: soluția de $K_2Cr_2O_7$ 10^{-2} M prezintă un maxim de absorbție maximă la 350 nm cu o intensitate de 0,450; tratamentul cu apă distilată al radiculelor (control) a condus la o valoare a absorbantei de 0,269, caz în care nu s-a evidențiat reducerea bicromatului de potasiu. Soluția de ioni de Cr^{3+} 10^{-2} M, de culoare verde, utilizată pentru evidențierea procesului de reducere a bicromatului de potasiu, a prezentat mai multe benzi de absorbție (la 296 nm, 403 nm respectiv 573 nm cu intensitățile de 0,082, de 0,061 respectiv de 0,049). Soluția rezultată prin tratarea radiculelor cu o soluție de 2,4-DNP de concentrație 50 μ M a prezentat un maxim de absorbție la 350 nm de intensitate 0,014, indicând formarea alcoolului etilic ce a redus bicromatul de potasiu la săruri de crom trivalent, soluția finală de culoare verde conține astfel $Cr_2(SO_4)_3$.

În acest exemplu soluția de Cr^{3+} 10^{-2} M a fost folosită pentru a evidenția modificările spectrale în cazul în care întreaga cantitate de bicromat de potasiu ar fi redusă. Totodată, folosirea soluției de 2,4-DNP 50 μ M drept etalon, pentru determinarea activității de decuplare în cazul în care este estimată activitatea decuplantă a altor compuși investigați.

RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile ISAN

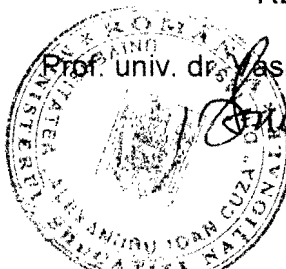


Testele realizate cu diferiți compuși au condus la modificări spectrale ale soluției acide de $K_2Cr_2O_7$ datorită producerii unor cantități diferite de alcool etilic în funcție de natura compusului investigat. Surprinzător, acțiunea decuplantă cea mai intensă a fost observată în cazul *p*-nitrobenzalhidei care a depășit-o pe aceea a etalonului folosit, 2,4-DNP. 2,4-Dinitroclorbenzenul nu a prezentat acțiune decuplantă, iar toxicitatea acestuia ar putea să fie cauzată de alte proprietăți ale acestuia, cum ar fi reacția cu grupările aminice ale proteinelor și acizilor nucleici. Dinitrofenil-S-glutationul, dimpotrivă, a prezentat o acțiune stimulatorie asupra respirației, inhibând producția de alcool prin fermentație. Celelalte substanțe testate au prezentat grade diferite de decuplare. Remarcabilă este și acțiunea acidului picric care a fost asemănătoare cu aceea a 2,4-DNP (**Figura 3**). Aceste rezultate sunt redate în **figura 4**.

Exemplu 2. Se procedează ca în exemplul 1, însă materialul biologic utilizat îl constituie drojdia de bere (*Saccharomyces cerevisiae*). Pentru aceasta se utilizează o suspensie de drojdie preparată într-o soluție de glucoză (5 g de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* și 5 g de glucoză sunt suspendate într-un volum final de 100 mL). Din suspensia proaspăt preparată, se reținează 1 mL și se amestecă cu 1 mL de soluție de 2,4-DNP de concentrație 50 μ M. Dispozitivul utilizat, soluțiile de $K_2Cr_2O_7$ 10^{-2} M, NaOH (0,1 N), H_2SO_4 (96%) precum și procedeul de lucru sunt identice cu cele descrise în exemplul 1. Singura diferență o constituie adăugarea, a unui mL de amestec de suspensie de drojdie cu un volum egal de soluție de 2,4-DNP sau aceea unui alt compus chimic ce trebuie investigat.

Rezultatele obținute sunt prezentate în **Figura 5**. În prezența drojdiei de bere, spectrul de absorbție al bicromatului de potasiu prezintă aceleași benzi în domeniul ultraviolet ca și în cazul soluției de $K_2Cr_2O_7$ pur. 2,4-DNP induce trecerea drojdiei de la respirația aerobă la fermentația anaerobă și formare de alcool etilic fapt care permite reducerea ionilor de Cr^{6+} la ioni Cr^{3+} , respectiv apariția colorației verzi și dispariția, benzii caracteristice bicromatului de potasiu. De asemenea, pe baza acestor date experimentale putem afirma faptul că: concentrația sau cantitatea de alcool produs este proporțională cu intensitatea acțiunii decuplante a fosforilării oxidative. Această afirmație poate fi pusă în evidență pe baza măsurătorilor spectrofotometrice atât în ultraviolet, la aproximativ 350 nm prin diminuarea intensității maximului de absorbție, cât și în vizibil, la aproximativ 600 nm, unde creșterea intensității maximului de absorbție este direct proporțională cu concentrația ionilor de crom trivalent formați în prezență de alcool etilic.

RECTOR,

Prof. univ. dr. Vasile ISAN


Revendicări

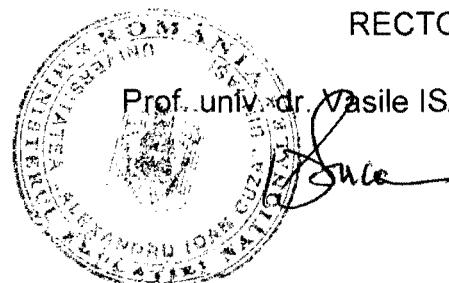
1. Metodă spectrofotometrică de determinare a activității agenților decuplanți ai fosforilării oxidative, **caracterizată prin aceea că se determină**, cu ajutorul unei soluții acide de bicromat de potasiu, cantitatea de alcool etilic ce este produsă sub acțiunea unor substanțe chimice într-un material biologic ce conține celule vii ale unor organisme eucariote.

2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că se folosește** drept probă câte 1 g de radicule secționare, care sunt tratate, timp de 15 minute, cu câte 5 mL de soluție proaspăt preparată de 2,4-DNP sau de altă substanță de analizat, cu concentrația 50 μ M. Proba se menține în soluția de tratament timp de 15 minute, pentru penetrarea compușilor în materialul vegetal, după care este tamponată și menținută la temperatura camerei timp de 30 minute. În instalația utilizată, formată din două compartimente, în compartimentul central, peste rădiculele ce conțin etanol se adaugă 2 mL NaOH (0,1 N), iar în compartimentul extern se introduc câte 3 mL de $K_2Cr_2O_7$ (10^{-2} M) și 3 mL de H_2SO_4 (96%). Vasul se incubează pe o plită electrică timp de 1 oră, la temperatura de 55 °C. După captarea vaporilor de alcool etilic și apă în soluția de bicromat de potasiu, întreg volumul de soluție ce conține bicromat de potasiu nereacționat, acid sulfuric, alcool etilic și vapori de apă captați, se aduce la un volum constant de 10 mL cu apă distilată. Spectrul de absorbție optică al soluției rezultate este înregistrat în domeniul spectral $\lambda = 250-650$ nm. Determinarea concentrației sau a cantității de alcool etilic produse sub acțiunea agenților decuplanți este realizată cu ajutorul unei curbe de etalonare utilizând alcool etilic pur, din care se prepară diluțiile corespunzătoare (Figura 6).

3. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că se folosește** drept probă de măsurat în locul unui gram de radicule secționare, câte 1 mL suspensie de drojdie și 1 mL soluție de 2,4-DNP sau altă substanță de analizat ce se amestecă bine și din care se prelevează 1 mL de probă. Suspensia de drojdie se realizează prin amestecarea a 5 g de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* cu 5 g de glucoză și completare la 100 mL cu apă distilată. Tratamentul probei cu volumul de 1 mL se realizează în aceleași condiții și cu același dispozitiv ca și cantitatea de 1 g de probă din revendicarea 1.

RECTOR,

Prof. univ. dr. Vasile ISAN



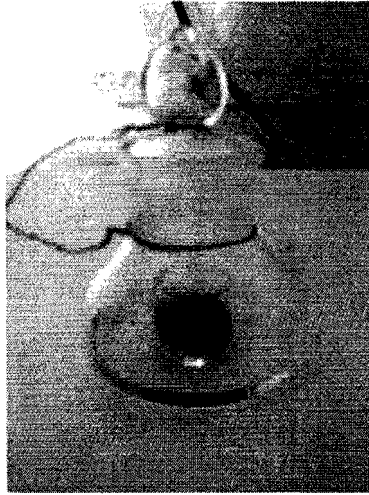


Figura 1. Vas de reacție folosit în determinarea alcoolului etilic produs în materialul vegetal sub acțiunea agenților de decuplare

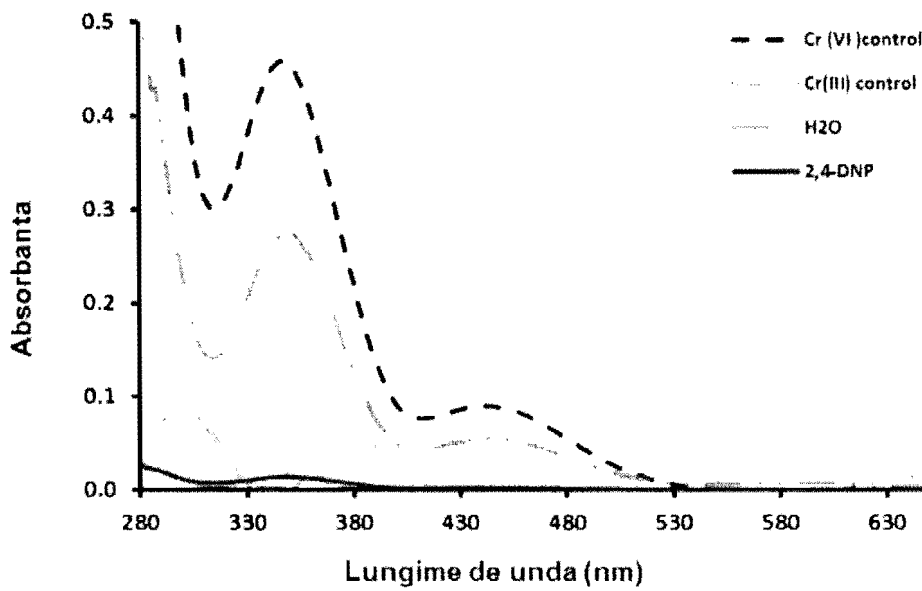


Figura 2. Spectrele UV-Viz ale soluțiilor apoase acide folosite pentru etalonarea metodei de lucru.

REGATOR,
Prof. univ. dr. Vasile ISAN



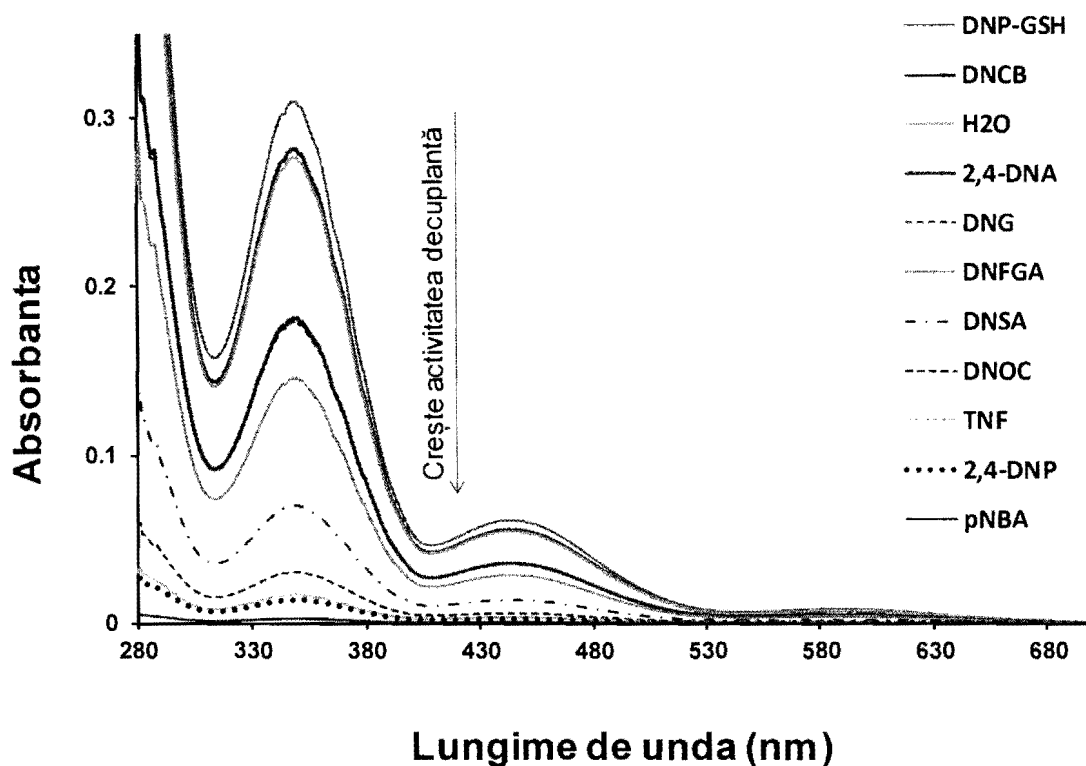


Figura 3. Spectrele de absorbtie UV-Viz a unor potențiali compuși care pot manifesta acțiune decuplantă.

DNP-GSH: dinitrofenil-S-glutation, **DNCB:** 2,4-dinitroclorbenzen, **2,4-DNA:** 2,4-dinitroanisol, **DNG:** 2,4-dinitrofenilglicerină, **DNFGA:** 2-(2-fluoro-5 nitrofenilamino)-acetamidă, **DNSA:** acid 3,5-dinitrosalicilic, **DNOC:** 3,5-dinitro-o-crezol, **TNF:** acid picric, **2,4-DNP:** 2,4-dinitrofenol, **pNBA:** p-nitrobenzaldehida

RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile SAN

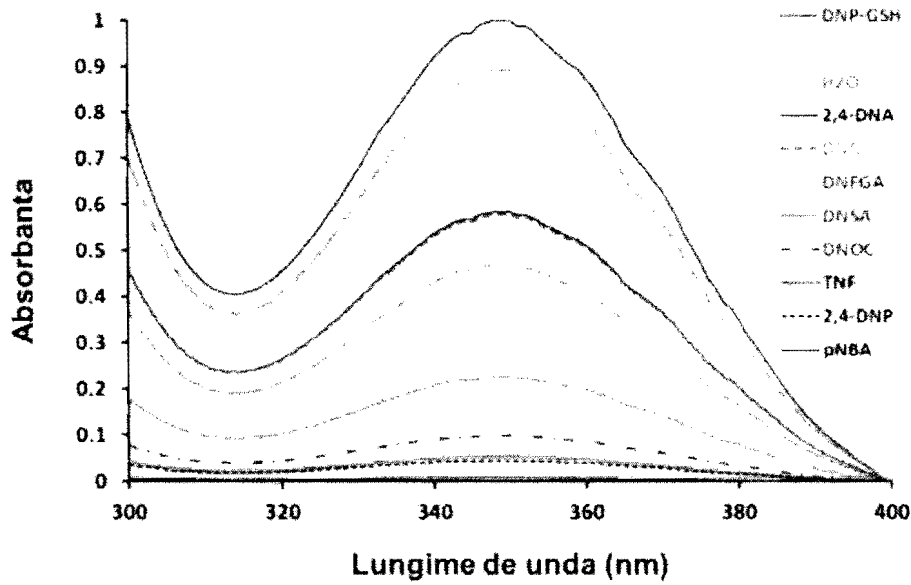


Figura 4. Spectrele UV-Viz (300-400 nm) care indică gradul de conversie al Cr (VI) la Cr (III) respective acțiunea decuplantă, a compușilor investigați, asupra procesului de fosforilare oxidativă

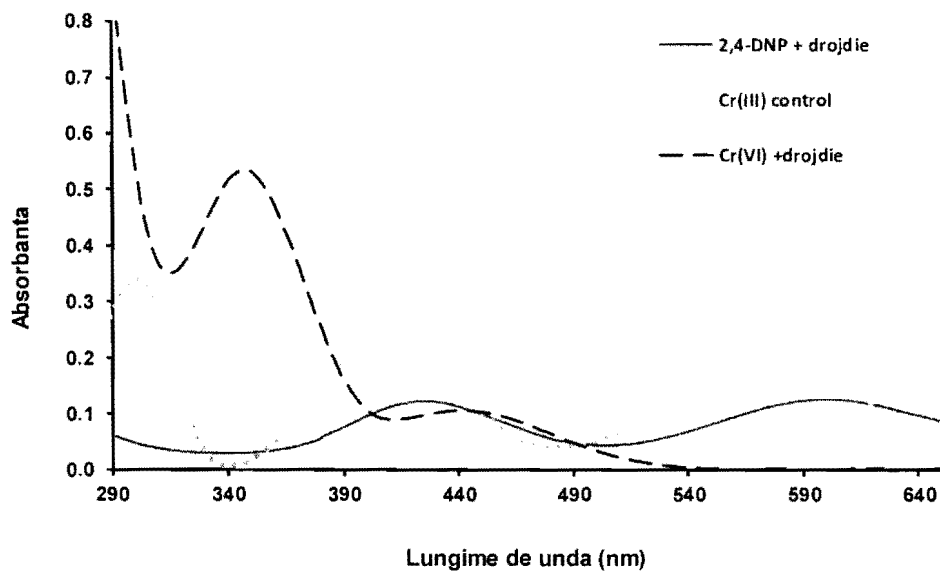
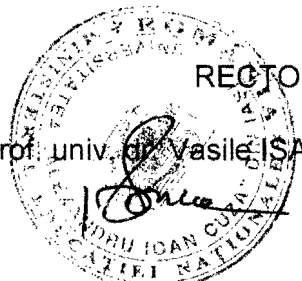


Figura 5. Spectrele UV-Viz ale dinitrofenolului, bicromatului de potasiu și ale ionilor de crom trivalent în prezența drojdiei de bere, în condițiile prezentei invenții.

RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile ISAN



AS

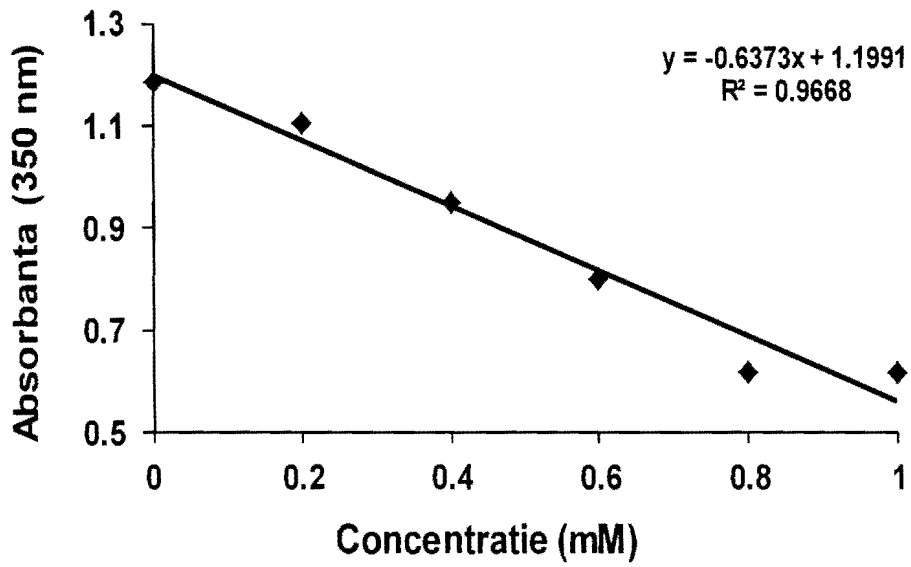


Figura 6. Curba de etalonarea obținută pe baza unui set de concentrații de alcool etilic

RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile ISAN