



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00824

(22) Data de depozit: 12/11/2015

(41) Data publicării cererii:
30/05/2016 BOPI nr. 5/2016

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• VASILESCU IOANA IULIANA MIHAELA,
STR. MĂRGEANULUI NR. 8, BL. M68,
SC. 2, ET. 6, AP. 62, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;

• EREMIA SANDRA ANAMARIA VICTORIA,
INTRAREA BARSEI NR. 2, BL. M12, SC. 1,
AP. 16, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• LITESCU SIMONA CARMEN,
STR. AZURULUI 1, 113B, SC. 1, ET. 7,
AP. 45, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• RADU GABRIEL LUCIAN,
ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H6, SC.D,
AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA
CONȚINUTULUI DE POLIFENOLI METOXI- SUBSTITUIȚI DIN
EXTRACTE DE FRUCTE DE PĂDURE CU UN CONȚINUT
MARE DE ANTOCIANI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biosenzor amperometric și la o metodă de determinare a conținutului de polifenoli metoxi-substituiți din extracte de fructe de pădure cu un conținut mare de antociani. Biosenzorul conform invenției este constituit din:

a. un electrod de lucru obținut prin depunerea uniformă pe suprafața de cărbune a 5 μ l suspensie de material compozit lacază-grafit pirolitic, care să asigure pe electrod 280 mU lacază,

b. un pseudo-electrod screen-printat de referință Ag/AgCl, și

c. un electrod auxiliar screen printat de cărbune. Metoda conform invenției constă în măsurarea intensității curentului de reducere înregistrat în urma reducerii pe electrod a produșilor de reacție obținuți prin cataliza enzimatică, de către enzima lacază a compuşilor polifenolici metoxi-substituiți, și exprimarea cantității în echivalent de acid sinapinic.

Revendicări: 2

Figuri: 1



BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA CONTINUTULUI DE POLIFENOLI METOXI-SUBSTITUITI DIN EXTRACTE DE FRUCTE DE PADURE CU UN CONTINUT MARE DE ANTOCIANI

DESCRIERE INVENTIE

Domeniul Tehnic: Biotehnologii

Prezenta invenție se referă la un procedeu de construcție a unui biosenzor amperometric pentru determinarea conținutului de polifenoli metoxi-substituiți din extracte de fructe de pădure și a protocolului de măsură. Biosenzorul are ca și element de biorecunoaștere moleculară o enzimă din clasa polifenol oxidazelor, lacaza, din *Trametes versicolor*, disponibilă comercial.

Se cunosc biosenzori care utilizează lacaza din diverse surse ca sistem de biorecunoaștere moleculară pentru diverși polifenoli, acizi polifenol policarboxilici, flavone și izoflavone obținuți prin imobilizarea lacazei pe diferite suporturi conductive: electrozi screen – printați (pe bază de carbune, aur, modificați cu grafene, nanoparticule conductive etc), electrozi de carbune sticlos, electrozi de aur, electrozi de platina etc [1-16]. Nu a fost raportată aplicabilitatea acestora în determinarea compusilor metoxi-substituiți din extracte apoase și hidroalcoolice din fructe de pădure, cu un conținut mare de antociani (măceș, merisor).

Se cunosc biosenzori amperometrici enzimatici, pe bază de lacaza, pentru determinarea conținutului în polifenoli totali din extracte de plante și fructe, valorile obținute cu ajutorul acestor biosenzori fiind exprimate în echivalent acid rozmarinic, acid clorogenic, acid cafeic etc [17]. Până acum nu au fost raportate utilizări pentru compusi polifenolici metoxi-substituiți de tip acid sinapinic, malvidin etc.

Se cunosc metode standardizabile de cuantificare a acidului sinapinic, malvidinului și altor compusi metoxi-substituiți care au la bază tehnici cromatografice cu detecție specifică [18]. Aceste metode pentru determinarea cantitativă a acidului sinapinic, malvidinului etc prezintă următoarele dezavantaje: durată mare a timpului total de analiză; costuri mari ale analizei datorate echipamentelor, consumului de reactivi și alte consumabile (filtre, coloane cromatografice etc), metoda este aplicabilă exclusiv de către specialiști.

Prezenta invenție încearcă rezolvarea determinării rapide (maximum 3 minute timp total de analiză) și prin mijloace foarte simple a compusilor fenolici metoxi-substituiți, cu consum foarte mic de reactivi (sub 100 μL).

Procedeu de construcție a biosenzorului constă în imobilizarea unei cantități specifice, optime, de material compozit lacaza-grafit pirolitic, pe electrodul de lucru din carbune al unei celule electrochimice screen-printate de tip DRP110 (comercializată de Dropsens Spania), astfel încât să se asigure o activitate de 280 mU lacaza pe electrodul de lucru.

Protocolul optim de obținere a biosenzorului este original și constă în: o cantitate de 2 mg pulbere de grafită conductiv suspendată în 1 mL soluție tampon acetat 0,1 molL⁻¹, pH = 5,00 prin sonicare timp de 30 minute la 26°C; un volum de 500 μL din suspensie este apoi vortexat timp de o oră cu 3 mg lacaza pulbere liofilizată (conținut de 25 U/mg pulbere). Din acest amestec compozit se depun câte 5 μL pe electrozii de lucru C-SPE care sunt lăsați să se stabilizeze timp de 2 ore la 16-18 °C și apoi stocați la 4 °C.

Protocolul de măsură a cantității de compusi polifenolici metoxi-substituiți din probe de extracte apoase și/sau hidroalcoolice din fructe de pădure cu conținut mare în antociani, utilizând biosenzorul construit se bazează pe măsurarea intensității curentului de reducere înregistrat în urma reducerii pe electrod a produsilor de reacție obținuți prin cataliză enzimatică (de către lacaza) a compusilor de interes. Cu cât cantitatea de compus de interes (polifenol) este mai mare, cu atât cantitatea de produs de reacție enzimatică este mai mare și intensitatea curentului măsurat asociată reducerii acestuia este mai mare.

Protocol de măsură utilizând biosenzorul amperometric pe bază de lacaza pentru determinarea conținutului de polifenoli metoxi-substituiți:

- Tehnică de lucru: cronoamperometrie la potențial controlat;
- Potențial de lucru: -0,025 V ($\pm 0,05$) vs. pseudoelectrod de referință Ag/AgCl (electrod de referință screen-printat);
- Mediu de lucru: tampon acetat 0,1 molL⁻¹; pH=5,00;
- Volum de soluție: 50 μL pe electrod;
- Echilibrare biosenzor: 120 secunde, adădire substrat (sau probă), măsurare răspuns cu citire la 10 secunde;
- Domeniu dinamic de răspuns cuprins între $1,47 \times 10^{-6}$ molL⁻¹ – $3,16 \times 10^{-4}$ molL⁻¹ (echivalent acid sinapinic);

-Domeniu de aplicabilitate: analiza unor compusi polifenolici metoxi-substituiti din extracte de fructe (apoase si hidroalcoolice) de padure – afin, merisor.

Caracteristici de performanta:

- specificitate: de clasa, conform specificitatii elementului de biorecunoastere lacaza;
- domeniul de curent masurat corespunzator raspunsului: 7 nA - 2 µA;
- sensibilitate: 14 mA/mol;
- limita de detectie: $2,50 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$.

Metoda de masura conform inventiei elimina dezavantajele mentionate prin:

- deplasarea potentialului de lucru (caracteristic procesului redox a produsului de reactie al reactiei enzimatic) catre un domeniu care reduce interferentele electrochimice -0,025 V vs. pseudo Ag/AgCl;
- scaderea timpului de analiza pentru compusii metoxi-substituiti la 2 minute de la 5,9 minute raportate pentru acidul sinapinic prin metodele cromatografice;
- posibilitatea analizei pe extract total, cu minim tratament al probei (cel mult dilutii).

Ca urmare a prezentei inventii se obtin urmatoarele avantaje: posibilitatea de analiza inclusiv a compusilor polifenolici metoxi-substituiti din extractele de fructe de padure cu un continut mare de antociani; o analiza rapida; reducerea costurilor de analiza; posibilitatea realizarii analizelor de screening; impact redus asupra mediului (reducerea amprentei de mediu a analizei) prin utilizarea unor volume foarte mici de reactivi.

1. B. Haghighi, L. Gorton, T. Ruzgas, L.J. Jönsson, Anal. Chim. Acta 487 (2003) 3-14.
2. M.L. Mena, V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Electroanalysis 17 (2005) 2147-2155.
3. A.I. Yaropolov, S.V. Shleev, O.V. Morozova, E.A. Zaitseva, G. Marko-Varga, J. Emneus, L. Gorton, J. Anal. Chem. 60 (2005) 553-557.
4. M.R. Montoreali, L.D. Seta, W. Vastarella, R. Pilloton, J. Mol. Catal. B-Enzym. 64 (2010) 189-194. A. Jarosz-Wilkolazka, T. Ruzgas, L. Gorton, Talanta 66 (2005) 1219-1224.
5. M. ElKaoutit, I. Naranjo-Rodriguez, K.R. Temsamani, M.P. Hernández-Artiga, D. Bellido-Milla, J.L. Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, Food Chem. 110 (2008) 1019-1024.
6. X. Xu, P. Lu, Y. Zhou, Z. Zhao, M. Guo, Mater. Sci. Eng. C-Mat 29 (2009) 2160-2164.
7. X. Xu, M. Guo, P. Lu, R. Wang, Mater. Sci. Eng. C-Mat 30 (2010) 722-729.
8. P. Ibarra-Escutia, J. Juarez-Gómez, C. Calas-Blanchard, J.L. Marty, M.T. Ramírez-Silva, Talanta 81 (2010) 1636-1642.
9. S.C. Litescu, S.A.V. Eremia, A. Bertoli, L. Pistelli, G.L. Radu, Anal. Lett. 43, (2010) 1089-1099.
10. M. Diaconu, S.C. Litescu, G.L. Radu, Sensor. Actuat. B-Chem. 145 (2010) 800-806.
11. S. Chawla, R. Rawal, Shabnam, R.C. Kuhad, C.S. Pundir, Anal. Methods 3 (2011), 709-714.
12. T. Shimomura, T. Itoh, T. Sumiya, T. Hanaoka, F. Mizukami, M. Ono, Sensor. Actuat. B-Chem. 153 (2011) 361-368.
13. M. Diaconu, S.C. Litescu, G.L. Radu, Microchim. Acta 172 (2011) 177-184.
14. S.A.V. Eremia, I. Vasilescu, A. Radoi, S.C. Litescu, G.L. Radu, Talanta 110 (2013) 164-170.
15. D. Brondani, B. de Souza, B.S. Souza, A. Neves, I.C. Vieira, Biosens. Bioelectron. 42 (2013) 242-247.
16. I. Cesarino, H.V. Galesco, F.C. Moraes, M.R.V. Lanza, S.A.S. Machado, Electroanalysis 25 (2013) 394-400. Melissa M. Rodríguez-Delgado a
17. M. M. Rodríguez-Delgado, G. S. Alemán-Nava, J.M. Rodríguez-Delgado, G. Dieck-Assad, S. O. Martínez-Chapa, D. Barceló, R. Parra, Trends in Analytical Chemistry 74 (2015), 21-45
18. L Wang, S. Henday, X. Liu, B. Schnute, Profiling Analysis of 15 Prominent Naturally Occurring Phenolic Acids by LC-MS, Dionex (Thermo) Application Note

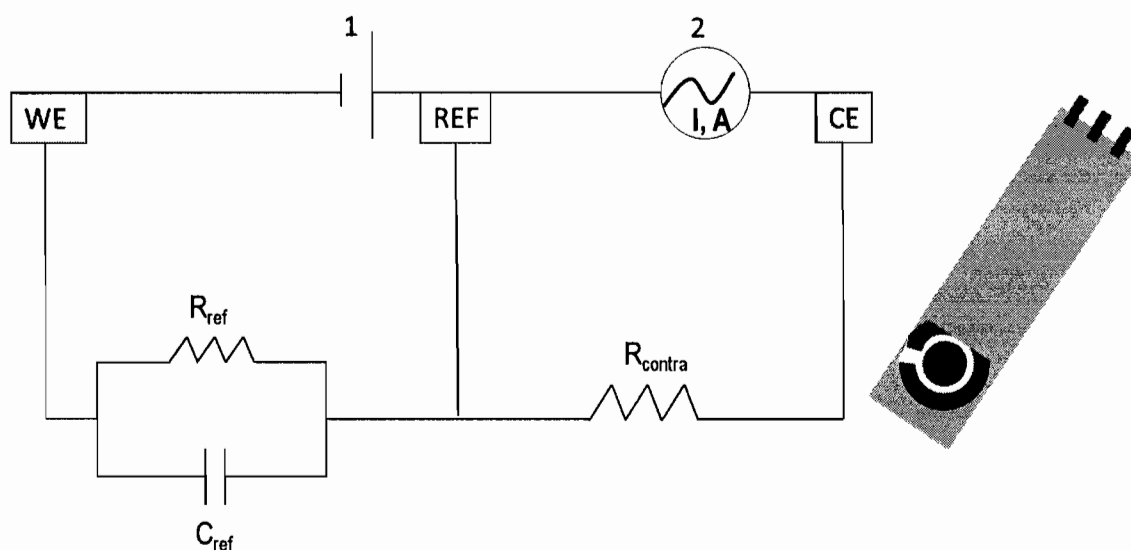
BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA CONTINUTULUI DE POLIFENOLI METOXI-SUBSTITUITI DIN EXTRACTE DE FRUCTE DE PADURE CU UN CONTINUT MARE DE ANTOCIANI

REVENDICARI

1. Procedeu de obtinere al biosenzorului caracterizat prin aceea ca:
 - este constituit din:
 - a. Electrode de lucru obtinut prin modificarea suprafetei conductive screen-printate de carbune prin adsorbtia de nanoparticule de grafit pirolitic cu dimensiuni sub 20 micrometri care au imobilizate pe suprafata, prin adsorbtie, o enzima din clasa polifenol-oxidazelor, lacaza. Protocolul de modificare a electrodului este original si consta in depunerea uniforma pe suprafata de carbune a 5 μL suspensie material compozit lacaza-grafit pirolitic, care sa asigure pe electrod 280 mU lacaza. Suspensia de material compozit lacaza-grafit se obtine astfel: vortexare timp de 1 ora a 3 mg lacaza pulbere liofilizata (sursa: *Trametes versicolor*, disponibila comercial) cu 500 μL suspensie grafit, rezultata prin sonicarea timp de 30 minute a 2 mg pulbere de grafit conductiv in 1 mL solutie tampon acetat 0,1 molL^{-1} , pH=5,00. Toate protocoalele se desfasoara la o temperatura de 26°C.
 - b. Pseudo-electrod screen-printat de referinta Ag/AgCl;
 - c. Electrode auxiliar screen-printat din carbune.
 - Celula electrochimica astfel obtinuta este lasata sa se stabilizeze la o temperatura de 16-18°C timp de doua ore, apoi stocata la 4°C si este stabila timp de 4 luni.
2. Protocol de analiza a acidului sinapinic utilizand biosenzorul construit conform revendicarii 1, caracterizata prin aceea ca:
 - se masoara intensitatea curentului de reducere a produsilor de reactie rezultati prin efectul catalitic al lacazei asupra compusilor polifenolici metoxi-substituiti standard (acid sinapinic) prin adaugarea a 50 μL solutie standard de diverse concentratii in 50 μL tampon acetat, in care s-a echilibrat senzorul la potentialul de lucru de -0,025 V ($\pm 0,05$) vs. Ag/AgCl ; se traseaza curba de etalonare (de calibrare).
 - se masoara intensitatea curentului de reducere a produsilor de reactie rezultati prin efectul catalitic al lacazei asupra compusilor polifenolici metoxi-substituiti in probele de extracte din fructe de padure, in 50 μL tampon acetat si 50 μL proba si se determina concentratia compusilor de interes din proba prin interpolarea semnalului analitic masurat pentru biosenzorul pe baza de lacaza in curba de calibrare prestabilita.

**BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA CONTINUTULUI DE POLIFENOLI
METOXI-SUBSTITUITI DIN EXTRACTE DE FRUCTE DE PADURE CU UN CONTINUT MARE DE
ANTOCIANI**

DESEN



WE = electrod lucru, carbune screen-printat modificat cu lacaza depusa pe grafit

REF =pseudelectrod de referinta, Ag/AgCl

CE = contraelectrod, carbune screen-printat

1,2 -potentiostat (1-tensiune aplicata; 2-ampermetru)