



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01154

(22) Data de depozit: 23.11.2010

(41) Data publicării cererii:
30.08.2012 BOPI nr. 8/2012

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

(72) Inventatori:
• COVACI OVIDIU ILIE,
STR. DIMITRIE LEONIDA NR.92, BL.G7,
SC.D, AP.66, PIATRA NEAMȚ, NT, RO;

• BUCUR BOGDAN, STR. BAIA MARE
NR.4, BL.5, SC.1, AP.32, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BUCUR MĂDĂLINA PETRUȚA,
STR.CPT.ION BECLEANU NR.16, BL.C7,
SC.A, AP..8, CÂMPULUNG MUSCEL, AG,
RO;
• RADU GABRIEL LUCIAN,
ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H6, SC.D,
AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) METODĂ DE ANALIZĂ RAPIDĂ ȘI SELECTIVĂ A
ACROLEINEI, BAZATĂ PE INHIBIȚIA ALCOOL
DEHIDROGENAZEI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de analiză a acroleinei. Metoda conform invenției constă în măsurarea spectrofotometrică a activității enzimatică în soluții cu sau fără adaos de cisteină și se bazează pe proprietatea specifică acroleinei de a reacționa cu cisteina adăugată în mediul de reacție și de a forma astfel compuși care nu

inhibă alcool dehidrogenaza, metoda fiind aplicată la analiza apelor industriale și la controlul alimentelor.

Revendicări: 3
Figuri: 2



04

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <i>a 2010 01154</i>
Data depozit <i>28-11-2009</i>

Metodă de analiză rapidă și selectivă a acroleinei bazată pe inhibiția alcool dehidrogenazei

Descrierea invenției

Invenția se referă la o metodă de analiză rapidă și selectivă a acroleinei din probe de mediu și alimente. Metoda se bazează pe faptul că acroleina reacționează cu compușii tiolici și astfel denaturează alcool dehidrogenaza care are cisteină în situsul activ. Pentru creșterea încrederii în rezultatul analizei, proba este analizată de două ori: direct pentru cuantificarea acroleinei împreună cu eventuale interferențe și pretratăată cu cisteină pentru studiul interferențelor. În proba pretratăată, cisteina reacționează cu acroleina și apoi are loc măsurarea inhibiției alcool dehidrogenazei. Dacă în proba tratată se observă reducerea procentului de inhibiție atunci proba conține acroleină, iar dacă proba tratată inhibă în continuare alcool dehidrogenaza înseamnă că în matricea probei de analizat se găsește un interferent care poate denatura proteinele.

Importanța analizei acroleinei: Acroleina (propenal) este un compus poluant care poate fi găsit în fumul provenit de la țigări, combustibili fosili, motoare diesel sau incendii de pădure. Este un reactiv toxic utilizat la sinteza acidului acrilic și a DL-metioninei, un aminoacid folosit ca supliment alimentar pentru îmbunătățirea calității furajelor. Acroleina este folosită în concentrații relativ mari ca biocid acvatic în canalele de irigație, turnuri industriale de răcire și lacuri de tratare a apelor, dar au fost constatate efecte negative la recoltele irigate cu apă tratată cu acroleina sau în mediul înconjurător în apropierea locurilor de deversare. Acroleina poate fi produsă în alimente prin degradarea termică a uleiului de prăjit sau prepararea la temperaturi mari a grasimilor, aminoacizilor sau carbohidraților.

Sunt cunoscute metode de analiză a acroleinei din probe complexe folosind tehnici bazate pe separări cromatografice sau electroforetice, dar acestea presupun un echipament complex, etape suplimentare de pretratare a probelor și un timp de analiză îndelungat. Au fost de asemenea raportate metode spectrometrice sau electrochimice de analiză a acroleinei, dar acestea nu sunt selective deoarece se bazează pe proprietăți generale ale aldehydelor.

Acroleina are o reactivitate crescută datorită proprietăților electrofile și reacționează cu grupările tiolice ale proteinelor și în consecință enzimele care au cisteină în centrul catalitic sunt inhibate. Aceasta proprietate este specifică acroleinei. Alte aldehide nu inhibă alcool dehidrogenaza, aceasta producând în reacția enzimatică de oxidare a alcoolilor diferite aldehide.

În matricea probelor complexe pot să se afle și diferite substanțe care au un efect denaturant asupra proteinelor. Pentru evitarea interferențelor, mecanismul de detecție este utilizat pentru investigarea cauzei inhibiției alcool dehidrogenazei. Astfel proba este amestecată cu cisteină și apoi este măsurată inhibiția remanentă. În cazul în care cisteina reduce inhibiția alcool dehidrogenazei înseamnă că în proba se afla acroleina, iar în caz contrar denaturarea enzimei este cauzată de un interferent. Această posibilitate de a crește selectivitatea măsurătorilor de inhibiție prin consumarea selectivă a analitului este unică în cazul biosenzorilor enzimatici.

Metoda de analiză conform invenției necesită un spectrometru UV și celule de cuarț transparente în acest domeniu al spectrului electromagnetic.

Metoda de analiză, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- permite identificarea rapidă a probelor contaminate cu acroleina;
- asigură selectivitatea analizelor;
- este simplă de utilizat chiar și de personal mediu calificat;
- are un preț de cost scăzut;
- este portabilă;
- nu necesită utilizarea unor reactivi toxici;
- nu necesită efectuarea unor etape lungi de tratare/extragere/purificare/derivatizare a probei înainte de analiză propriuzise.

Pentru metoda de analiză sunt necesari următorii reactivi: etanol, nicotin adenin dinucleotidă forma oxidată (NAD^+), cisteina din care sunt preparate zilnic soluții stoc în apă purificată. Alcool dehidrogenaza din *Saccharomyces cerevisiae* este dizolvată în tampon fosfat pH=7,7 și împărțită în alicoturi păstrate la -20°C . Probele sunt tamponate cu TRIS/HCl (0,1 M, pH=8,8).

Metoda de măsurare a activității enzimatice a alcool dehidrogenazei se bazează pe cuantificarea NADH-ului la $\lambda=340$ nm. Analiza este efectuată în cuve din cuarț cu

volumul de 1 mL. Pentru analiza, 800 μ L de probă este amestecată cu 145 μ L tampon TRIS, 10 μ L soluție 0,1 M NAD⁺, 40 μ L soluție 0,1 M etanol. După omogenizare în cuvă se adaugă 5 μ L soluție de alcool dehidrogenază cu activitate specifică 22 UI/mL. Amestecul este omogenizat și absorbanta este măsurată timp de 50 secunde. Pentru studiul interferențelor: se amestecă 800 μ L de probă cu 135 μ L tampon TRIS și 10 μ L soluție 0,1 M cisteină. După 5 minute se adaugă 10 μ L soluție 0,1 M NAD⁺, 40 μ L soluție 0,1 M etanol și 5 μ L soluție de alcool dehidrogenază cu activitate specifică 22 UI/mL. Viteza reacției enzimatică este exprimată în unități de adsorbantă per secundă ($\Delta A/\Delta t$) și se calculează prin interpolarea părții liniare a curbei experimentale A-t. Procentul de inhibiție se calculează ca reducerea activității enzimatică în raport cu o măsurătoare blank fără acroleină.

Invenția va fi prezentată în continuare în legătură cu figurile 1 și 2 care prezintă:

- figura 1: semnalele analitice obținute folosind soluții standard de acroleină și acroleină cu cisteină în comparație cu un control.
- figura 2: domeniul liniar al curbei de calibrare folosind soluții standard de acroleină și acroleina cu cisteină.

Modul de interpretare al rezultatelor analizelor conform invenției este explicat în figura 1. Inițial se efectuează o măsurare a activității enzimatică de control fără acroleină și a fost măsurată o variație a absorbantei $\Delta A/\Delta t = 0.002$ U.A./sec. Ulterior se investighează efectul inhibitor al acroleinei și pentru o soluție de 0,8 mM acroleină se obține $\Delta A/\Delta t = 0.0013$ U.A./sec ceea ce corespunde la un procent de inhibiție $Inh(\%) = 35\%$. Măsurarea variației absorbantei unei soluții care conține 0,8 mM acroleină și 1 mM cisteină se obține $\Delta A/\Delta t = 0.0019$ U.A./sec care corespunde unei variații a activității enzimatică de 5%. Aceasta este mai mică decât 10% care este considerată limita de detecție și astfel se poate concluziona că în prezența unui exces de cisteină nu are loc o variație semnificativă a activității enzimatică în raport cu un control.

Metoda de analiză conform invenției poate analiza acroleina cu o limită de detecție de 0,2 mM. Curba de calibrare este liniară între 0,2 și 2 mM. Pentru concentrații mai mari de acroleină se obține un platou. Ecuația curbei de calibrare prezentate în figura 2 este: $Inhibiție(\%) = 34,05 \cdot Conc \text{ acroleină (mM)} + 1,07$; $R^2 = 0.9918$ ($n=5$). Tot în figura

2 este prezentată și activitatea enzimatică măsurată pentru soluții în care 1 mM cisteină a fost amestecată cu diferite concentrații de acroleină. Pentru acest amestec variația relativă a adsorbției este sub $\pm 10\%$ și astfel este ne semnificativă.

REVENDICĂRI

1. Metodă de analiză rapidă a acroleinei bazată pe două măsurători spectrometrice ale inhibiției alcool dehidrogenazei produsă de proba în absența și prezenta cisteinei.
2. Metodă conform revendicării 1, caracterizată printr-o sensibilitate bună a măsurătorilor bazată pe inhibiția alcool dehidrogenazei de către acroleină.
3. Metodă conform revendicării 1, caracterizată printr-o selectivitate ridicată a măsurătorilor bazată pe proprietatea specifică acroleinei de a reacționa cu cisteina adăugată în mediul de reacție ceea ce duce la formarea de aducți care nu inhibă alcool dehidrogenaza.

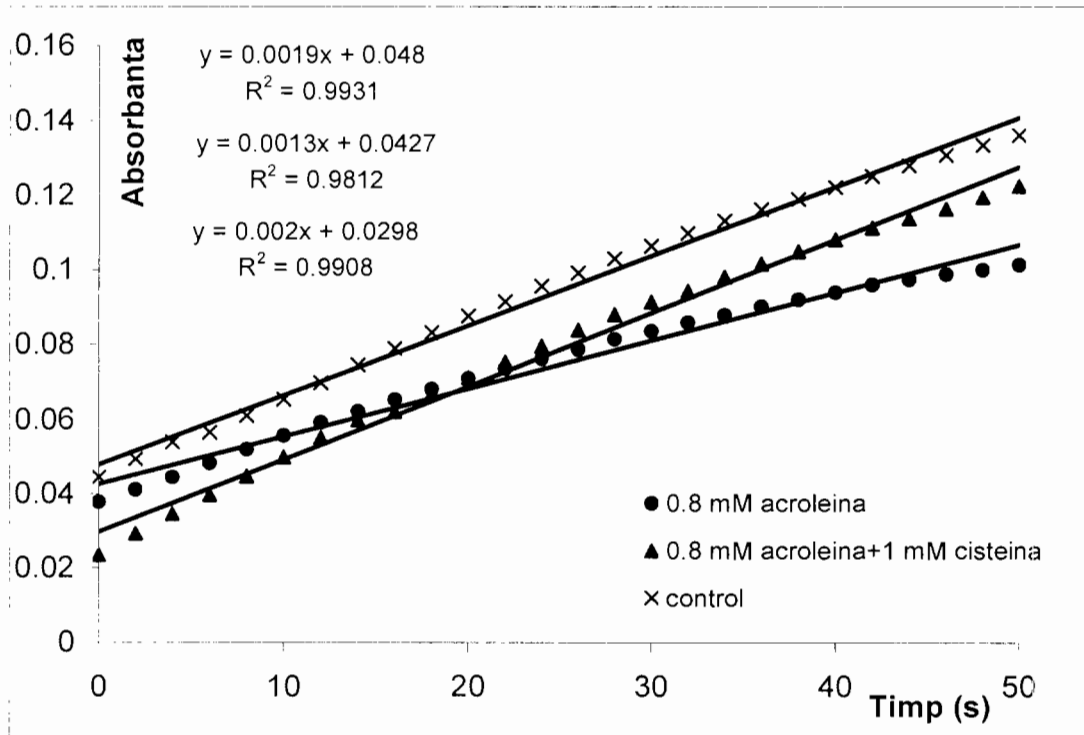


Figura 1. Semnalele analitice obținute folosind soluții standard de acroleină și acroleina cu cisteină în comparație cu un control.

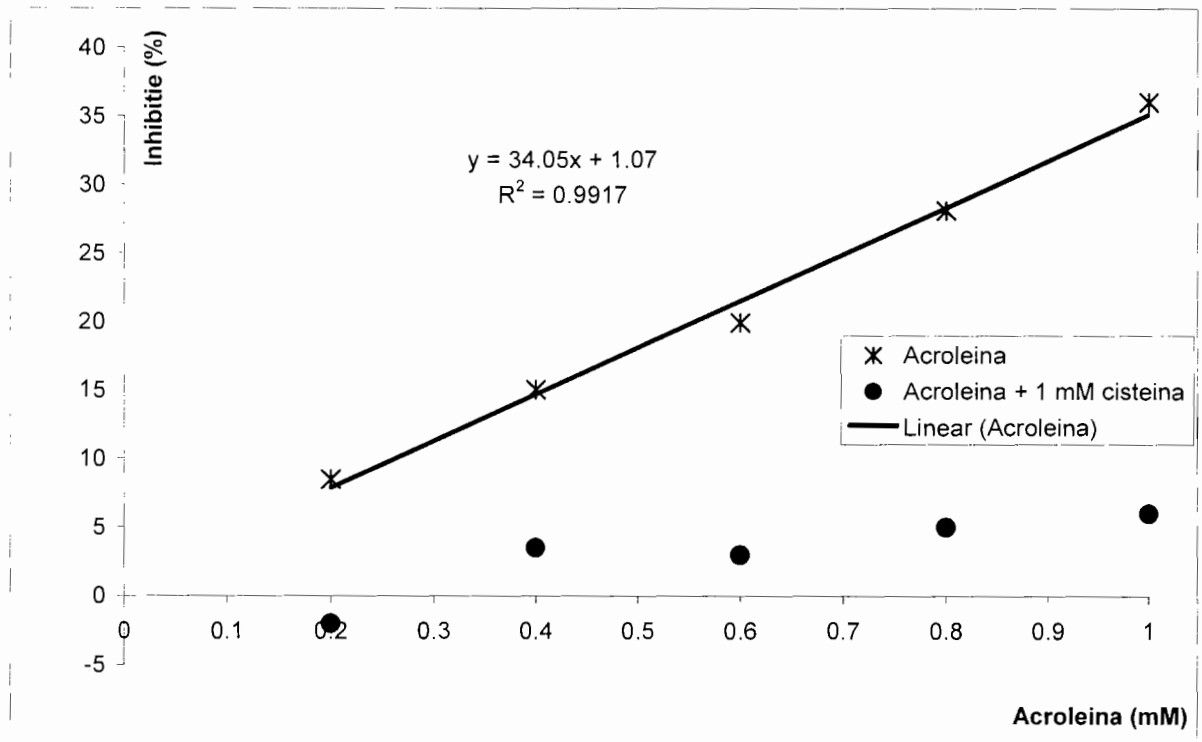


Figura 2. Domeniul liniar al curbei de calibrare folosind soluții standard de acroleină și o comparație cu variația nesemnificativă a activității enzimatică în cazul în care acroleina este amestecată cu cisteina.