



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00929**

(22) Data de depozit: **27/11/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/10/2019** BOPI nr. **10/2019**

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

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **HOSU IOANA SILVIA, STR. SALCIILOR
NR. 4, ÎNTORSURA BUZĂULUI, CV, RO;**
• **JECU MARIA-LUIZA,
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 8895317 (B2); KR 101174585 (B1)

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE ȘI DE UTILIZARE A UNUI
MATERIAL ELECTROSENZITIV PENTRU DETERMINAREA
SELECTIVĂ A PEROXINITRITULUI**



RO 131154 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de obținere și de utilizare a unui material electrosenzitiv pentru determinarea selectivă a peroxinitritului din amestecuri complexe.

3 Sunt cunoscute diferite procedee pentru determinarea peroxinitritului. Peroxinitritul (ONOO⁻) are caracterul cel mai oxidant dintre speciile reactive ale oxigenului și ale azotului, având un rol (pato)fiziologic extrem de important. Peroxinitritul, care este o specie moleculară cu o durată de viață foarte scurtă, poate fi determinat prin diverse metode, cea mai accesibilă fiind metoda spectrofotometrică prin măsurarea absorbției la 302 nm [R. Kissner, T. Nauser, P. Bugnon, P. G. Lye, W. H. Koppenol, Chem. Res. Toxicol. 1997, 101, 1285-1292]. Această metodă prezintă următoarele dezavantaje: (i) nu este foarte sensibilă și (ii) este lipsită de specificitate, fiind dificil de aplicat în fluide biologice nepurificate, datorită multitudinii de compuși biologici care absorb în domeniul 280...340 nm.

11 Este cunoscută din brevetul **US 8895317 B2** o amină aromatică care este utilizabilă pentru măsurarea, detectarea sau screeningul speciilor reactive de azot, inclusiv peroxinitrit.

13 De asemenea, este cunoscut, din cerea de brevet **WO 2015128622 A1**, un procedeu de detecție a peroxinitritului care include următoarele etape: (i) obținerea unui complex de zaharide cu aril-boronați, care conține un fluorofor și un substituent care stinge fluorescența; 15 (ii) punerea în contact a complexului zaharidă-aril-boronați cu o probă care conține peroxinitrit; (iii) detectarea reducerii intensității fluorescenței ca urmare a clivării de către peroxinitrit a complexului zaharidă-aril-boronați.

17 Cererea de brevet **WO 2013113279 A1** descrie o serie de compuși fluorogenici sau fluorescenți bazați pe di-arilamine pentru detecția peroxinitritului, determinarea acestuia fiind posibilă pentru concentrații mai mici de 10 μM. Tehnicile de analiză fluorimetrice au dezavantajul de a fi destul de laborioase și de a necesita reactivi scumpi. În plus, prin tehnicile de fluorimetrie se integrează de fapt nivelele de concentrație ale ONOO⁻ pentru perioada de determinare, fără a se putea preciza cu exactitate valorile la un moment dat, datorită ireversibilității reacțiilor care formează/sting compușii cu caracteristici de fluorescență, timpului scurt de viață al peroxinitritului și reactivității sale foarte ridicate.

21 Metodele electrochimice bazate pe utilizarea unor materiale electrosenzitive pentru peroxinitrit au o serie de avantaje comparativ cu metodele optice, pentru că sunt mai rapide, mai simple, mai ieftine și permit determinarea nivelelor de concentrație în timp real. A fost demonstrată capacitatea catalitică a unui film de hemină electropolimerizată pe un electrod de carbon de a oxida peroxinitritul [S. F. Peteu, T. Bose, M. Bayachou, Anal. Chim. Acta 2013, 780, 81-88] la potențiale din domeniul (+ 0,7 V) - (+ 1,1 V) vs Ag/AgCl. Dezavantajul utilizării acestui material pentru detecția peroxinitritului este reprezentat de selectivitatea redusă, datorată oxidării unui număr mare de compuși (acid ascorbic, azotiți, peroxid de hidrogen) în același domeniu de potențial. Filmul de poli(cianocobalamină) obținut prin electropolimerizare pe suprafața unui electrod de carbon sticlos are, de asemenea, proprietăți electrocatalitice în procesul de oxidare a peroxinitritului, observându-se apariția unui pic anodic la potențialul de + 0,83 V vs SCE, mărimea acestuia fiind proporțională cu concentrația peroxinitritului [Y. Wang, Z. Chen, Talanta 2010, 82, 534-539]. Filmul de poli(cianocobalamină) permite determinarea peroxinitritului în domeniul de concentrații 2...300 μM utilizând tehnica voltametriei în puls diferențial (DPV), fără a fi observată o interferență mai mare de 5% pentru concentrația fiziologică din ser uman a unor compuși (acid ascorbic, dopamină, nitriți, acid uric) care ar putea fi oxidați la acest potențial pozitiv. Totuși, acest material nu ar putea fi utilizat la determinarea peroxinitritului în probe de produse alimentare, în care concentrația acestor interferenți este mult mai mare comparativ cu cea fiziologică, cum ar fi probele de carne la care se adaugă aditivi alimentari electroactivi din categoria nitriților, nitraților, acidului ascorbic etc.

RO 131154 B1

Brevetul **KR 101174585 B1** revendică un biosenzor pentru determinarea peroxinitritului, care utilizează mangan-[poli-2,5-di-(2-tienil)-1H-pirol-1-(p-benzoic acid)] (Mn-pDPB) ca polimer electrosenzitiv, un strat de nanoparticule de aur și un strat de acoperire de polietilenimină, format pe stratul de nanoparticule de aur. Biosenzorul a fost exemplificat pentru determinarea peroxinitritului prin voltametrie ciclică, între -0,2 V și 0,6 V. Dezavantajul acestui biosenzor este determinat de procedeul laborios de obținere, care implică depunerea a trei straturi succesive.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția, așa cum rezultă din descriere, constă în obținerea unui material electrosenzitiv care să permită determinarea rapidă și selectivă a peroxinitritului într-un domeniu de potențial apropiat de 0 V, potențial la care interferenții electroactivi din probe biologice nu sunt oxidați.

Procedeul de obținere a materialului electrosenzitiv pentru peroxinitrit, conform invenției, constă în electrodepunerea pe un electrod de pastă de carbon, carbon sticlos sau platină, de preferință pastă de carbon, a unui film de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) prin voltametrie ciclică în 2,6-dihidroxi-naftalină cu concentrația 0,5...5,0 mM preparată în soluție tampon fosfat salin ($pH = 7,4$), pentru un număr de 10...40 cicluri, cu o viteză de scanare de 5...50 mV/s, în domeniul de potențial (-0,2...0,2)...(1,0...1,3) V vs Ag/AgCl.

Procedeul de determinare a peroxinitritului conform invenției constă în utilizarea electrodului modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) și în funcție de natura probei și concentrația peroxinitritului a următoarelor tehnici electrochimice, cu mențiunea că probele trebuie aduse la $pH 9,0$ pentru a încetini procesul de descompunere a peroxinitritului:

- voltametrie ciclică - în domeniul de potențial -0,6...+0,5 V, cu o viteză de scanare de 50...100 mV/s pentru probe cu concentrații de peroxinitrit în domeniul 10...400 μM ;

- voltametrie în puls diferențial - prin scanare în domeniul de potențial -0,3 V \pm 0,4 V cu un pas al potențialului de 5...50 mV și o amplitudine de 10...100 mV pentru probe cu concentrații de peroxinitrit în domeniul 1...200 μM ;

- cronoamperometrie în flux - prin utilizarea unui sistem de analiză prin injectare în flux (FIA) cu un singur canal și cu o celulă electrochimică de analiză în flux cu 3 electrozi, electrodul de lucru fiind constituit din electrodul pe care a fost depus filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) căruia i se aplică un potențial de -0,05...+0,2 V vs Ag/AgCl, pentru probe cu concentrații de peroxinitrit în domeniul 1...100 μM .

Avantajele acestei invenții sunt următoarele:

- materialul reprezentat de filmul electrodepus de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) pe suprafața activă a unui electrod de pastă de carbon, carbon sticlos sau platină este electrosenzitiv pentru peroxinitrit la potențiale aplicate electrodului de lucru apropiate de 0 V, eliminând astfel interferența speciilor electroactive din probele biologice care sunt electro-oxidate la potențiale mai mari de +0,5 V;

- procedeul de obținere a filmului electrodepus de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) este simplu și reproductibil, proprietățile filmului putând fi ușor controlate prin intermediul parametrilor de electrodepunere, iar prețul de cost este scăzut;

- procedeul de determinare electrochimică a peroxinitritului utilizând filmul electrodepus de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) poate fi utilizat pentru probe biologice complexe (inclusiv extracte de carne) nefiind necesară purificarea acestora.

În continuare, se prezintă exemple de realizare a invenției, în relație și cu fig. 1...8, care reprezintă:

- fig. 1, voltamogramele înregistrate în timpul formării pe suprafața electrodului de lucru a unui film neconductor de poli(2,6-dihidroxi-naftalină), prin electrodepunere dintr-o soluție de 2,6-dihidroxi-naftalină cu o concentrație de 2 mM, dizolvată în tampon fosfat salin $pH 7,4$;

RO 131154 B1

1 - fig. 2, voltamogramele ciclice obținute cu electrodul modificat cu filmul de
2 poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în tampon fosfat salin 100 mM, pH 9,0, în absență și în prezență
3 de peroxinitrit 100 μ M;

4 - fig. 3, voltamogramele ciclice obținute cu electrodul modificat cu filmul de poli(2,6-
5 dihidroxi-naftalină) în prezența de (a) peroxinitrit 100 μ M, (b) nitrit de sodiu 10 mM, (c) acid
6 ascorbic 10 mM;

7 - fig. 4, voltamogramele ciclice corespunzătoare următoarelor concentrații de
8 peroxinitrit: (a) 0; (b) 10 μ M; (c) 22 μ M; (d) 48 μ M; (e) 100 μ M; (f) 160 μ M; (g) 360 μ M;

9 - fig. 5, graficul de calibrare realizat prin reprezentarea intensității picului anodic în
10 funcție de concentrația de peroxinitrit;

11 - fig. 6, cronoamperograma FIA obținută pentru injectarea, în duplicat sau triplicat,
12 de soluții de peroxinitrit cu concentrații de la 1 μ M la 125 μ M;

13 - fig. 7, graficul de calibrare pentru determinarea peroxinitritului utilizând electrodul
14 modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în cronoamperometrie în flux;

15 - fig. 8, compararea semnalului FIA înregistrat la injectarea unei soluții de peroxinitrit
16 50 μ M cu cele înregistrate la injectarea unor soluții de nitrit de sodiu, nitrat de sodiu și acid
17 ascorbic de concentrații de 40 de ori mai mari decât a soluției de peroxinitrit.

Exemplul 1

18 Un film de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) este electrodepus pe un electrod serigrafat de
19 carbon (SPCE) (Dropsens, Spania) prin plasarea pe suprafața electroactivă a acestuia a
20 100 μ L soluție de monomer de 2,6-dihidroxi-naftalină (Sigma - Aldrich) cu concentrația de
21 2 mM dizolvată în tampon fosfat salin pH 7,4. Filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) este depus
22 prin realizarea a 20 cicluri de scanare a potențialului în intervalul (-0,1 V)...(+1,0 V), cu viteza
23 de scanare de 10 mV/s, utilizând un potențostat/galvanostat μ Autolab tip III (Ecochemie,
24 Olanda). În fig. 1 se observă apariția a două picuri de oxidare în primul ciclu de scanare la
25 0,05 și 0,4 V, atribuibile oxidării celor două grupări hidroxilice ale monomerului, cu formarea
26 unei poli(naftochinone), în timp ce, începând cu cel de-al doilea ciclu al voltamogramei
27 ciclice, se observă dispariția acestor picuri de oxidare. Pe lângă dispariția picului de oxidare,
28 odată cu creșterea numărului de cicluri de scanare se observă și o diminuare a picului de
29 reducere înregistrat la potențialul de circa 0 V. Voltamogramele înregistrate descriu formarea
30 la suprafața electrodului de lucru a unui film neconductor în condițiile de pH 7,4.

31 În fig. 2 sunt reprezentate voltamogramele ciclice obținute cu electrodul SPCE
32 modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în tampon fosfat salin 100 mM, pH 9,0, în
33 absență și în prezență de peroxinitrit 100 μ M. Se observă apariția unui pic de oxidare
34 semnificativ la un potențial de circa +0,1 V în prezența peroxinitritului, fapt ce demonstrează
35 capacitatea catalitică a filmului de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în procesul de oxidare a
36 peroxinitritului.

37 În fig. 3 sunt reprezentate voltamogramele ciclice obținute cu electrodul modificat cu
38 filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în prezența de (a) tampon fosfat pH 9,0 (b) nitrit de sodiu
39 5 mM, (c) acid ascorbic 5 mM (d) peroxinitrit 100 μ M, fiind astfel demonstrată selectivitatea
40 filmului de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) pentru peroxinitrit și lipsa interferenței nitritului și
41 acidului ascorbic.

Exemplul 2

42 Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se utilizează un electrod de carbon sticlos.
43 Caracteristicile de electrosensitivitate și selectivitate pentru peroxinitrit sunt mulțumitoare,
44 dar sunt inferioare celor obținute în exemplul 1.

Exemplul 3

45 Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se utilizează un electrod de platină.

Caracteristicile de electrosenzitivitate și selectivitate pentru peroxinitrit sunt satisfăcătoare, dar sunt inferioare celor obținute în exemplul 1.	1
Exemplul 4	3
Electrodul SPCE modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) obținut conform procedurii din exemplul 1 a fost utilizat pentru determinarea peroxinitritului prin voltametrie ciclică prin plasarea unui volum de 100 μL soluție de peroxinitrit pe suprafața electroactivă a electrodului modificat. Utilizând același potențiosat-galvanostat ca cel din exemplul 1 au fost înregistrate voltamograme ciclice (viteza de scanare = 100 mV/s) pentru următoarele concentrații de peroxinitrit: (a) 0; (b) 10 μM; (c) 22 μM; (d) 48 μM; (e) 100 μM; (f) 160 μM; (g) 360 μM, în fig. 4 fiind reprezentate voltamogramele ciclice corespunzătoare. Se observă creșterea proporțională a intensității picului anodic cu creșterea concentrației de peroxinitrit.	5
Graficul de calibrare din fig. 5 a fost realizat prin reprezentarea intensității picului anodic în funcție de concentrația de peroxinitrit, calculându-se o sensibilitate a metodei de determinare de $0,6161 \pm 0,020 \text{ A}/\mu\text{M}$ peroxinitrit. Conform acestui procedeu, peroxinitritul poate fi determinat în domeniul de concentrații 10...400 μM, ecuația dreptei de calibrare fiind:	7
$I = 0,6161 \cdot C_{\text{peroxinitrit}} - 0,0039,$	9
unde I este exprimată în μA, iar c _{peroxinitrit} în μM.	11
Exemplul 5	13
Electrodul SPCE modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) obținut conform procedurii din exemplul 1 a fost utilizat pentru determinarea peroxinitritului prin cronamperometrie în flux. A fost utilizat un sistem de analiză prin injectare în flux (FIA) cu un singur canal format din: pompă peristaltică cu tub pompă din Tygon cu d.i. = 0,89 mm; valvă de injectare de inox cu 6 căi; tub PTFE cu d.i. = 0,50 mm pentru fluxul purtător; celulă de analiză în flux pentru electrozi serigrafiați în care a fost introdus electrodul SPCE modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină); potențiosat-galvanostat. Fluxul purtător reprezentat de tampon fosfat salin pH 9,0 a fost pompat în sistemul FIA cu un debit de 0,4 mL/min, iar determinările au fost realizate la un potențial de +0,05 V aplicat electrodului de lucru. Volumul de probă injectată în sistemul de analiză în flux a fost de 100 μL.	15
În fig. 6 este reprezentată cronoamperograma FIA obținută pentru injectarea, în duplicat sau triplicat, de soluții de peroxinitrit cu concentrații de la 1 la 125 μM. Se observă obținerea unor picuri caracteristice FIA a căror mărime este direct proporțională cu concentrația de peroxinitrit. În fig. 7 este prezentat graficul de calibrare pentru determinarea peroxinitritului, utilizând electrodul SPCE modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în cronamperometrie în flux. Domeniul linear de concentrații este cuprins între 1...80 μM peroxinitrit, sensibilitatea metodei fiind de $2,267 \pm 0,096 \text{ nA}/\mu\text{M}$. Răspunsul electrodului în sistemul FIA este reproductibil, deviația relativă standard (RSD) determinată pentru n = 8 injectări ale unei soluții de peroxinitrit 20 μM fiind de 2,78%.	17
Selectivitatea electrodului SPCE modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) pentru peroxinitrit a fost verificată prin compararea semnalului FIA înregistrat la injectarea unei soluții de peroxinitrit 50 μM cu cele înregistrate la injectarea unor soluții de nitrit de sodiu, nitrat de sodiu și acid ascorbic de concentrații de 40 de ori mai mari decât a soluției de peroxinitrit (fig. 8), observându-se obținerea unor semnale nesemnificative pentru acești potențial interferenți. Având în vedere faptul că nitriții sunt interferenții majoritari în cazul procedurilor electrochimice de determinare a peroxinitritului în probe biologice, pentru o verificare suplimentară a selectivității electrodului SPCE modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină), în sistemul FIA a fost injectat un amestec de peroxinitrit 50 μM și nitrit de sodiu 2 mM, observându-se că, practic, mărimea semnalului FIA înregistrat este egală cu cea a semnalului obținut pentru soluția de peroxinitrit 50 μM (fig. 8).	19

RO 131154 B1

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unui material electrosenzitiv pentru obținerea unui electrod pentru determinarea selectivă a peroxinitritului, **caracterizat prin aceea că** va cuprinde următoarele etape: electrodepunerea unui film de poli(2,6-dihidroxi-naftalină), pe un electrod de pastă de carbon prin voltametrie ciclică într-o soluție de 2,6-dihidroxi-naftalină cu concentrația 0,5...5,0 mM, preparată în soluție tampon fosfat salin cu un pH de 7,4, cu o viteză de scanare cuprinsă între 5...50 mV/s, repetarea electrodepunerii pentru un număr de 10...40 de cicluri.

2. Procedeu de obținere a unui material electrosenzitiv conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** electrodul este de carbon sticlos sau pastă de carbon sau platină.

3. Procedeu de obținere a unui material electrosenzitiv conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** materialul obținut are proprietăți catalitice în procesul de electro-oxidare a peroxinitritului, la potențiale cuprinse în domeniul (-0,2)...(+0,2) V care nu sunt afectate de prezența unor potențiali interferenți de tipul nitriților, nitraților sau acidului ascorbic.

4. Procedeu de utilizare a electrodului modificat cu materialul electrosenzitiv definit în revendicările 1...3, pentru determinarea selectivă a peroxinitritului, **caracterizat prin aceea că** va cuprinde următoarele etape: aducerea probei la un pH 9,0, plasarea electrodului pe care este depus materialul electrosenzitiv obținut conform revendicării 1 în lichidul de analizat, care conține peroxinitrit și cuantificarea peroxinitritului prin tehnici analitice electrochimice în funcție de natura probei și concentrația peroxinitritului.

5. Procedeu de utilizare a electrodului modificat conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că** se ciclează potențialul în domeniul (-0,6 V)...(+0,5) V, cu o viteză de scanare de 50...100 mV/s, pentru a fi analizate probe cu concentrații de peroxinitrit în domeniul 10...400 μM la pH 9,0 fără ca nitriții, nitrații sau acidul ascorbic cu concentrații de până la 5 mM să interfereze.

6. Procedeu de utilizare a electrodului modificat conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că** aplică o tehnică de volumetrie în plus diferențial, prin scanare în domeniul de potențial (-0,3 V)...(+0,4) V cu un pas al potențialului de 5...50 mV și o amplitudine cuprinsă între 10...100 mV, pentru probe cu concentrații de peroxinitrit în domeniul 1...200 μM în tampon fosfat salin cu un pH 9,0 fără ca nitriții, nitrații sau acidul ascorbic cu concentrații de până la 5 mM să interfereze.

7. Procedeu de utilizare a electrodului modificat conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că**, aplică o tehnică de cronoamperometrie în flux, pe un sistem de analiză prin injectare în flux FIA, cu un singur canal și cu celulă electrochimică de analiză în flux cu 3 electrozi, electrodul de lucru fiind constituit din electrodul pe care a fost depus filmul electrosenzitiv și selectiv pentru peroxinitrit de poli(2,6-dihidroxi-naftalină), căruia i se aplică un potențial de - 0,05...+ 0,2 V versus Ag/AgCl, pentru probe cu concentrații de peroxinitrit în domeniul 1...100 μM în tampon fosfat salin pH 9,0 fără ca nitriții, nitrații sau acidul ascorbic cu concentrații de până la 2 mM să interfereze.

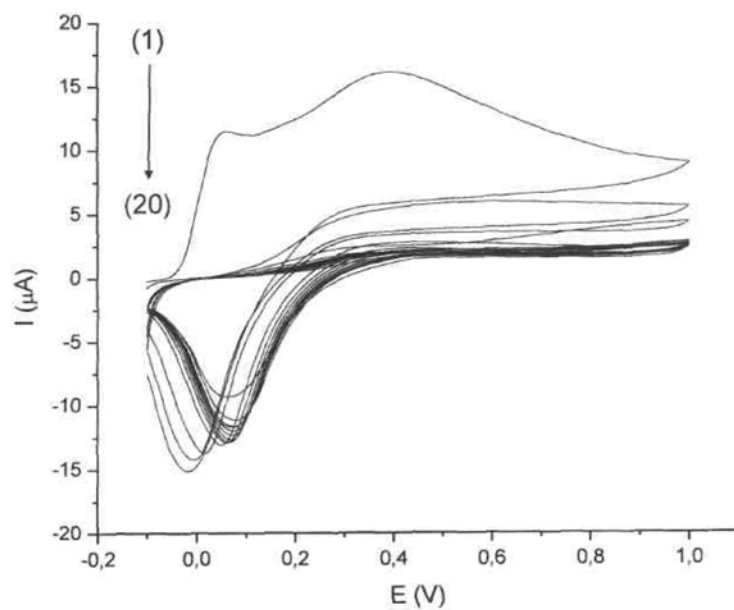


Fig. 1

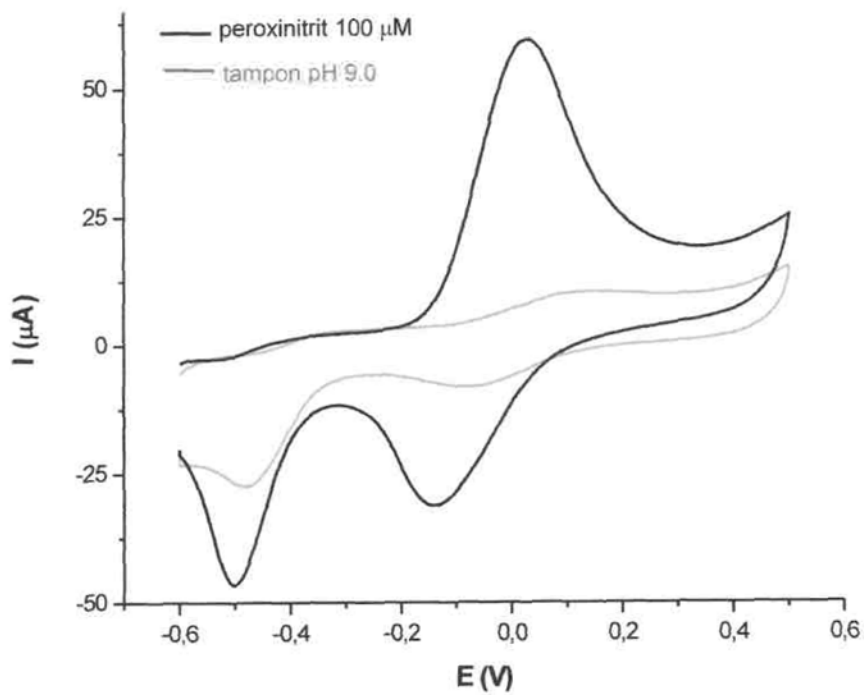


Fig. 2

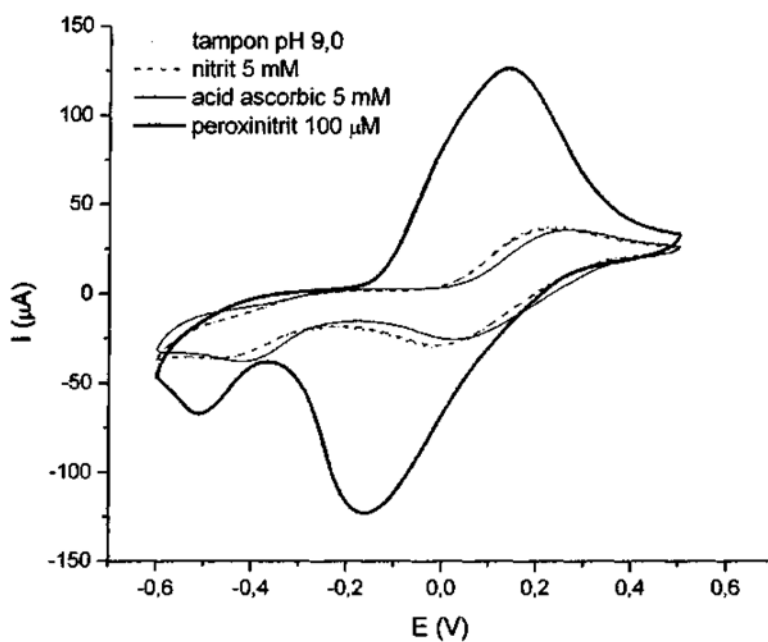


Fig. 3

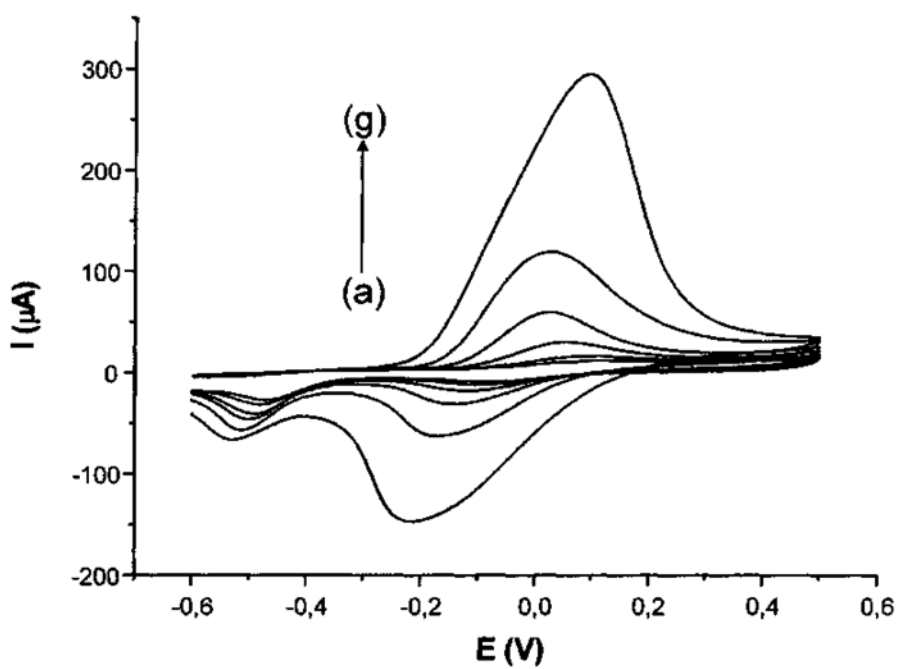


Fig. 4

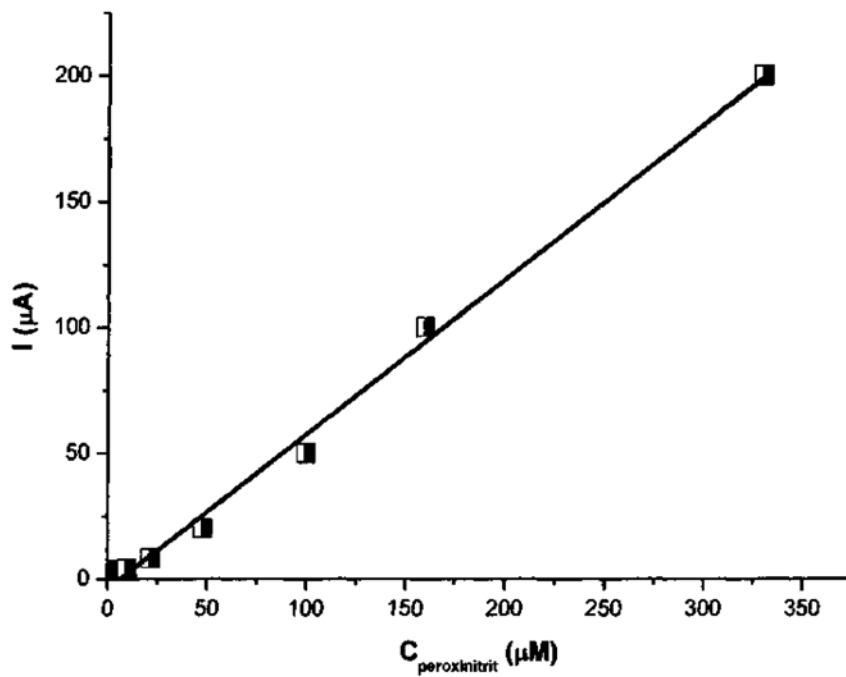


Fig. 5

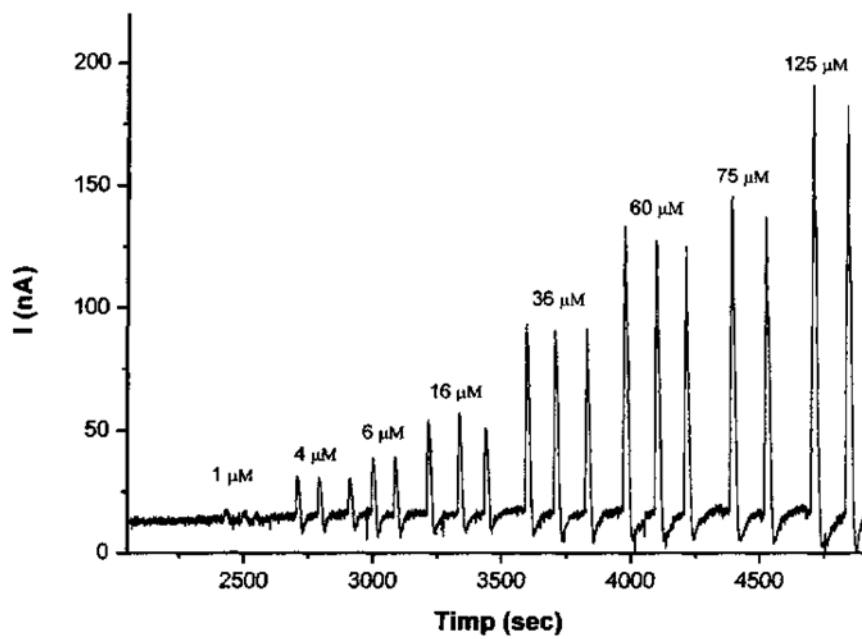


Fig. 6

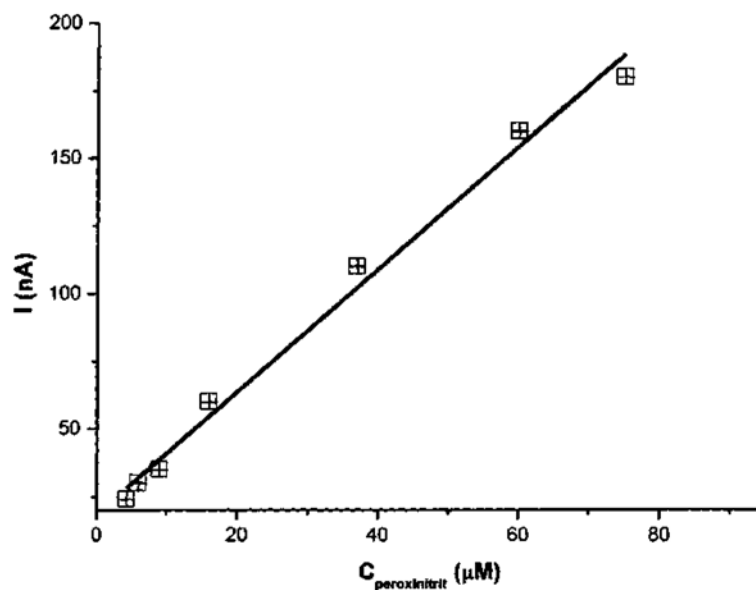


Fig. 7

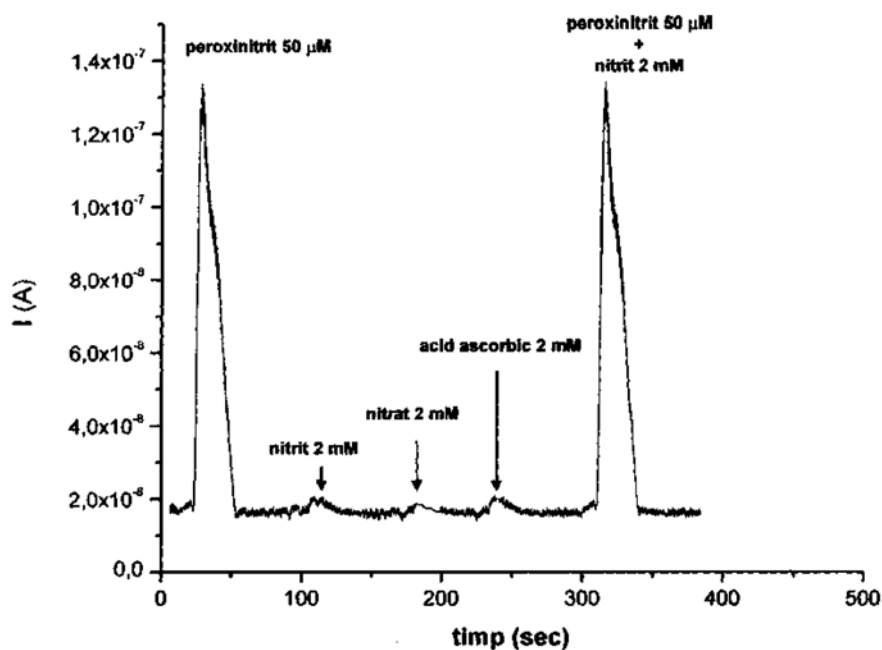


Fig. 8

