



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00929

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

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

(71) Solicitant:  
• 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

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui material electrosenzitiv, și la o metodă care utilizează acest material, pentru determinarea selectivă a peroxinitritului din probe biologice complexe. Procedeu conform invenției constă în electrodepunerea, pe un electrod de pastă de carbon, carbon sticlos sau platină, a unui film de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) prin voltametrie ciclică în monomer de 2,6-dihidroxi-naftalină cu o concentrație de 0,5... 5 mM, prin realizarea unui număr de 10...40 cicluri cu o viteză de scanare de 5...50 mV/s, într-un domeniu de potențial de (-0,2...0,2)V-(-1,0...

1,3)V vs AgAgCl. Metoda conform invenției constă în aducerea probei lichide de analizat la pH 9, plasarea electrodului pe care este depus materialul electrosenzitiv în proba lichidă de analizat, care conține peroxinitrit și, eventual, specii moleculare interferente, și cuantificarea peroxinitritului prin tehnici electrochimice, în funcție de natura probei și de concentrația peroxinitritului.

Revendicări: 8  
Figuri: 8





formează / sting compuși cu caracteristici de fluorescență, timpului scurt de viață al peroxinitritului și reactivității sale foarte ridicate,

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 (+0,7V) – (+1,1V) 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.

Brevetul **KR101174585 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 -0,2V și 0,6 V. Dezavantajul acestui biosenzor este determinat de procedeul laborios de obținere, care implică depunerea a trei straturi succesive.

Sunt necesare deci materiale electrosenzitive mai simplu de obținut, care să permită determinarea selectivă a peroxinitritului, din diferite probe, inclusiv probe de produse alimentare, în care sunt prezente specii electrochimic active interferente.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea simplă a unui material electrosenzitiv, care să permită determinarea rapidă și selectivă a peroxinitritului, într-un domeniu de potențial apropiat de 0 V, știut fiind că la acest potențial interferenții electroactivi din probele 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/sec, în domeniul de potențial (-0,2...0,2)V – (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 V - +0,5 V, cu o viteză de scanare de 50...100 mV/sec pentru probe cu concentrații de peroxinitrit în domeniul 10 – 400 μM.
- voltametrie în puls diferențial – prin scanare în domeniul de potențial -0,3V - +0,4V 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...+0.2V 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.
- Procedul 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.
- Procedul 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, care o ilustrează fără a o limita, în relație și cu figurile 1-8.

Figura 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 concentrația de 2 mM, dizolvată în tampon fosfat salin pH 7,4.

Figura 2. Voltamogramele ciclice obținute cu electrodul modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în tampon fosfat salin 100 mM, pH 9,0, în absență și în prezență de peroxinitrit 100  $\mu$ M.

Figura 3. Voltamogramele ciclice obținute cu electrodul modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în prezența de (a) peroxinitrit 100  $\mu$ M, (b) nitrit de sodiu 10 mM, (c) acid ascorbic 10 mM.

Figura 4. Voltamogramele ciclice corespunzătoare următoarelor concentrații de peroxinitrit: (a) 0; (b) 10  $\mu$ M; (c) 22  $\mu$ M; (d) 48  $\mu$ M; (e) 100  $\mu$ M; (f) 160  $\mu$ M; (g) 360  $\mu$ M.

Figura 5. Graficul de calibrare realizat prin reprezentarea intensității picului anodic în funcție de concentrația de peroxinitrit.

Figura 6. Cronoamperograma FIA obținută pentru injectarea, în duplicat sau triplicat, de soluții de peroxinitrit cu concentrații de la 1  $\mu$ M la 125  $\mu$ M.

Figura 7. Graficul de calibrare pentru determinarea peroxinitritului utilizând electrodul modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în cronoamperometrie în flux.

Figura 8. Compararea semnalului FIA înregistrat la injectarea unei soluții de peroxinitrit 50  $\mu\text{M}$  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.

### Exemplul 1.

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

În Fig. 2 sunt reprezentate voltamogramele ciclice obținute cu electrodul SPCE modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în tampon fosfat salin 100 mM, pH 9,0, în absență și în prezență de peroxinitrit 100  $\mu\text{M}$ . Se observă apariția unui pic de oxidare semnificativ la un potențial de cca +0,1 V în prezența peroxinitritului, fapt ce demonstrează capacitatea catalitică a filmului de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în procesul de oxidare a peroxinitritului.

În Fig. 3 sunt reprezentate voltamogramele ciclice obținute cu electrodul modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) în prezența de (a) tampon fosfat pH 9,0 (b) nitrit de sodiu 5 mM, (c) acid ascorbic 5 mM (d) peroxinitrit 100  $\mu\text{M}$ , fiind astfel demonstrată

selectivitatea filmului de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) pentru peroxinitrit și lipsa interferenței nitritului și acidului ascorbic.

### **Exemplul 2.**

Se lucrează ca în Exemplul 1, numai că se utilizează un electrod de carbon sticlos. Caracteristicile de electrosenzitivitate și selectivitate pentru peroxinitrit sunt mulțumitoare, dar sunt inferioare celor obținute în Exemplul 1.

### **Exemplul 3.**

Se lucrează ca în Exemplu 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.

### **Exemplul 4.**

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 potențostat-galvanostat ca cel din Exemplul 1 au fost înregistrate voltamograme ciclice (viteza de scanare = 100 mV/sec) 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.

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 ± 0,020 μA/μM peroxinitrit. Conform acestui procedeu, peroxinitritul poate fi determinat în domeniul de concentrații 10 – 400 μM, ecuația dreptei de calibrare fiind:

$$I = 0,6161 \cdot C_{\text{peroxinitrit}} - 0,0039 ,$$

unde I este exprimată în μA, iar  $C_{\text{peroxinitrit}}$  în μM.

### **Exemplul 5**

Electrodul SPCE modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină) obținut conform procedurii din Exemplul 1 a fost utilizat pentru determinarea peroxinitritului prin cronoamperometrie în flux. A fost utilizat un sistem de analiză prin injecție 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); potențiostat-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 electrozului de lucru. Volumul de probă injectată în sistemul de analiză în flux a fost de 100  $\mu$ L.

În Fig. 6 este reprezentată cronoamperograma FIA obținută pentru injectarea, în duplicat sau triplicat, de soluții de peroxinitrit cu concentrații de la 1  $\mu$ M la 125  $\mu$ M. 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 cronoamperometrie în flux. Domeniul linear de concentrații este cuprins între 1 – 80  $\mu$ M peroxinitrit, sensibilitatea metodei fiind de  $2,267 \pm 0,096$  nA/ $\mu$ M. Răspunsul electrozului în sistemul FIA este reproductibil, deviația relativă standard (RSD) determinată pentru n=8 injectări ale unei soluții de peroxinitrit 20  $\mu$ M fiind de 2,78%.

Selectivitatea electrozului 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  $\mu$ M 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 ne semnificative pentru acești potențiali 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 electrozului SPCE modificat cu filmul de poli(2,6-dihidroxi-naftalină), în sistemul FIA a fost injectat un amestec de peroxinitrit 50  $\mu$ M și nitrit de sodiu 2 mM, observându-se că practic mărimea semnalului FIA înregistrat este egală cu cea semnalului obținut pentru soluția de peroxinitrit 50  $\mu$ M (Fig. 8).



## REVENDICĂRI

1. Procedeu de obținere a unui material electrosenzitiv pentru determinarea selectivă a peroxinitritului, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din 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 (pH = 7,4), cu o viteză de scanare de 5...50 mV/sec, în domeniul de potențial (-0,2...0,2) V – (1.0...1.3) V *versus* Ag/AgCl; repetarea electrodepunerii pentru un număr de 10...40 cicluri.
2. Procedeu de obținere a unui material electrosenzitiv pentru determinarea selectivă a peroxinitritului conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** electrodul este de carbon sticlos.
3. Procedeu de obținere a unui material electrosenzitiv pentru determinarea selectivă a peroxinitritului conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** electrodul este de platină.
4. Procedeu de obținere a unui material electrosenzitiv pentru determinarea selectivă a peroxinitritului 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 V) – (+0,2 V), care nu sunt afectate de prezența unor potențial interferenți de tipul nitriților, nitraților sau acidului ascorbic.
5. Procedeu de utilizare a materialului electrosenzitiv pentru determinarea selectivă a peroxinitritului **caracterizat prin aceea că** este constituit din următoarele etape: aducerea probei lichide de analizat la pH 9,0; plasarea electrodului pe care este depus materialul electrosenzitiv selectiv pentru peroxinitrit în lichidul de analizat, care conține peroxinitrit și, eventual, potențiale specii moleculare interferente, și cuantificarea peroxinitritului prin tehnici analitice electrochimice, funcție de natura probei și concentrația peroxinitritului
6. Procedeu de utilizare a materialului electrosenzitiv pentru determinarea selectivă a peroxinitritului conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** se ciclează potențialul în domeniul (-0,6 V) – (+0,5 V), cu o viteză de scanare de

50...100 mV/sec, pentru a fi analizate probe cu concentrații de peroxinitrit în domeniul 10 – 400  $\mu\text{M}$  la pH 9,0 fără ca nitriții, nitrații sau acidul ascorbic cu concentrații de până la 5 mM să interfere.

7. Procedeu de utilizare a materialului electrosenzitiv pentru determinarea selectivă a peroxinitritului conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că aplică o tehnică voltametrie în puls 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 de 10...100 mV, pentru probe cu concentrații de peroxinitrit în domeniul 1 – 200  $\mu\text{M}$  în tampon fosfat salin pH 9,0, fără ca nitriții, nitrații sau acidul ascorbic cu concentrații de până la 5 mM să interfere.

8. Procedeu de utilizare a materialului electrosenzitiv pentru determinarea selectivă a peroxinitritului conform revendicării 1 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 V... +0,2 V *versus* Ag/AgCl, pentru probe cu concentrații de peroxinitrit în domeniul 1 – 100  $\mu\text{M}$  în tampon fosfat salin pH 9,0, fără ca nitriții, nitrații sau acidul ascorbic cu concentrații de până la 2 mM să interfere.

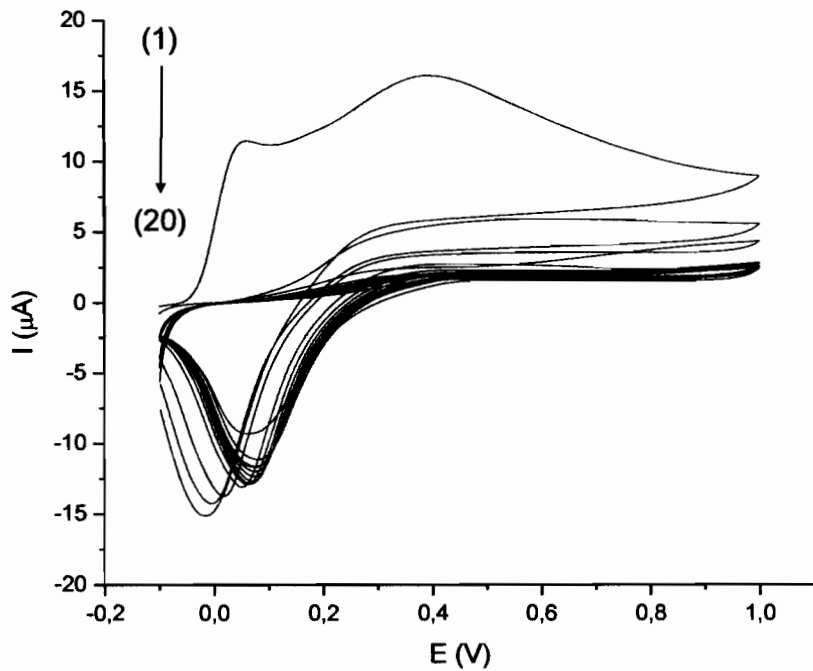


Figura 1

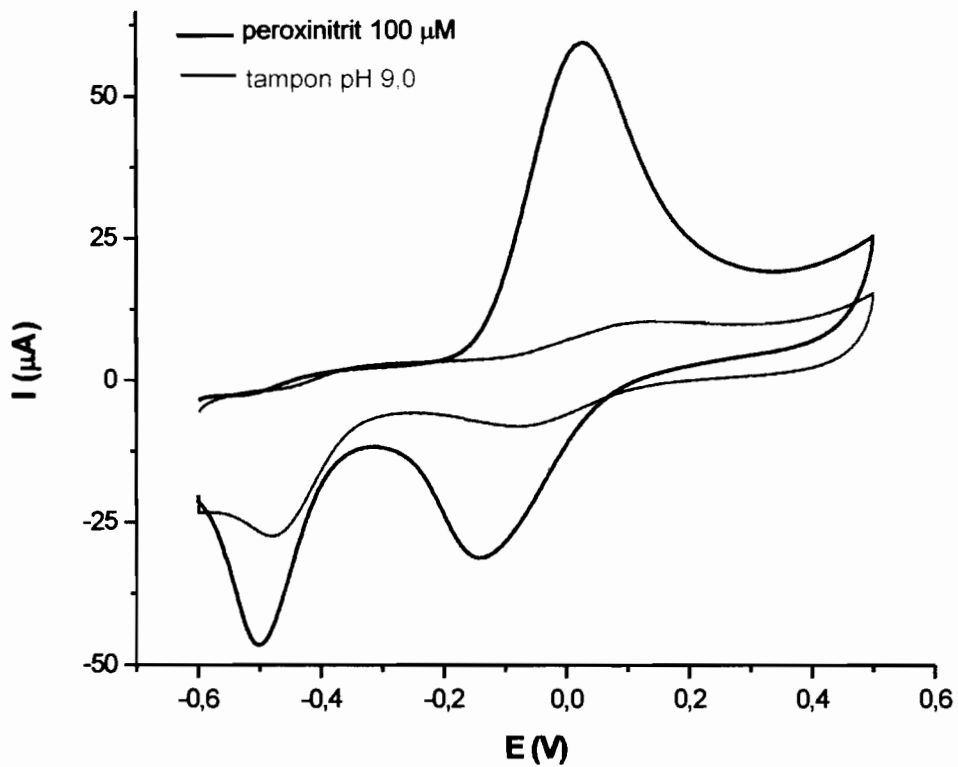


Figura 2

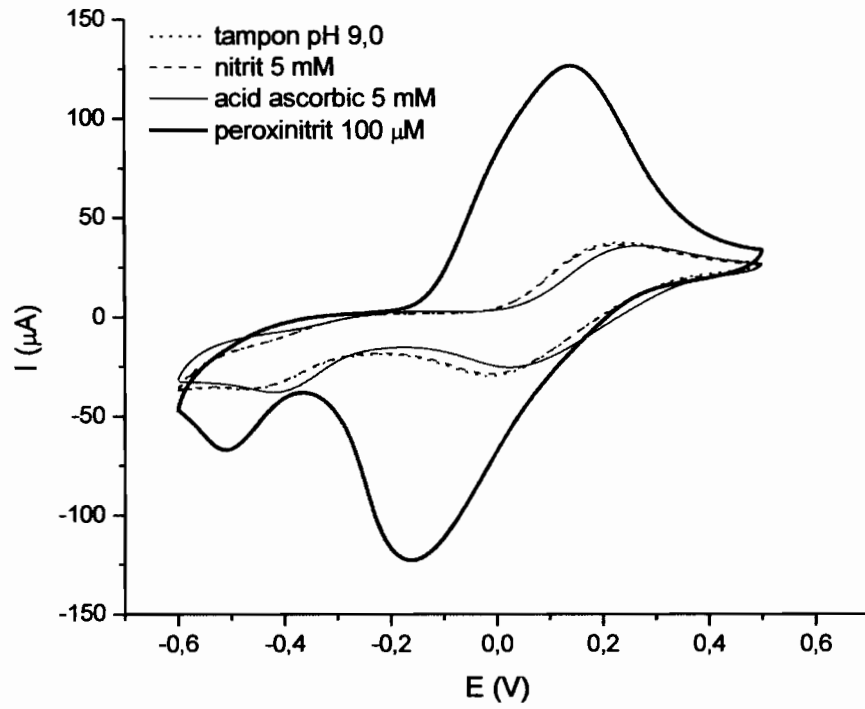


Figura 3

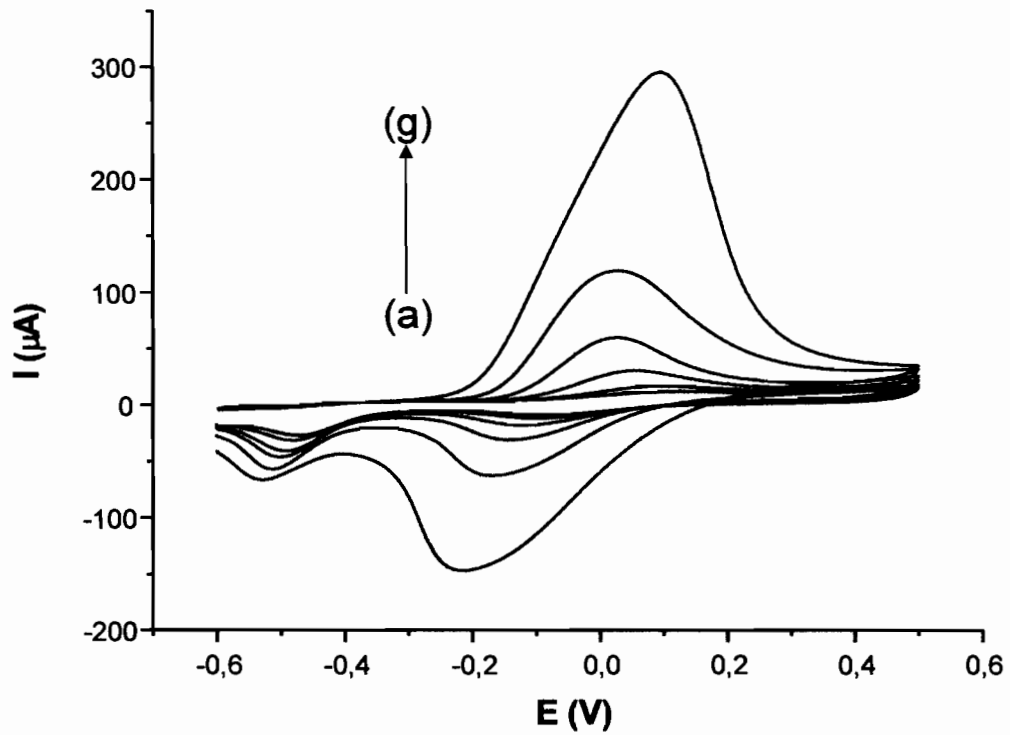


Figura. 4

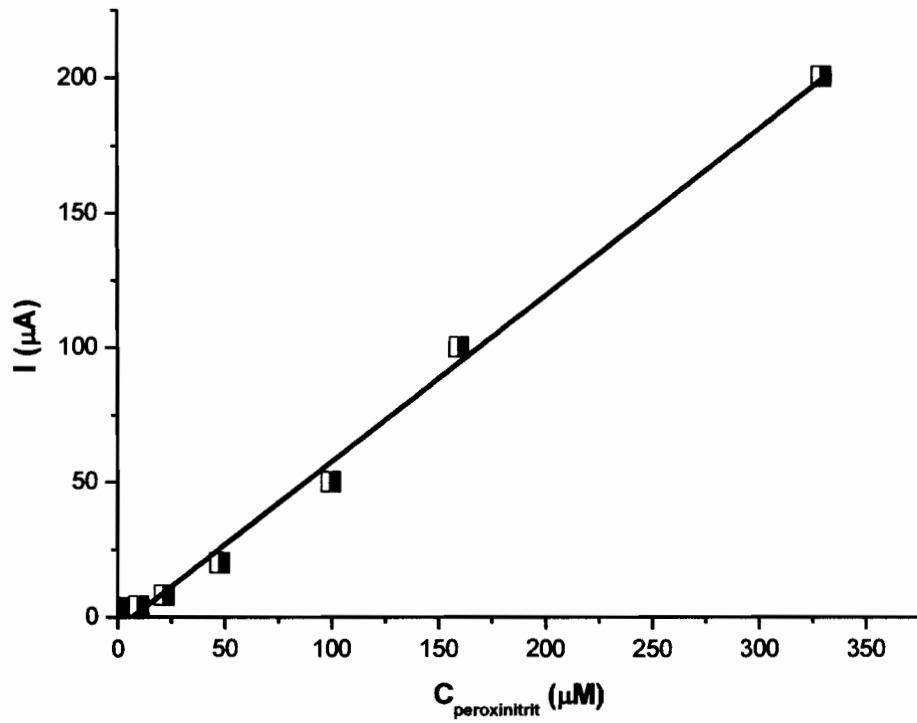


Figura 5

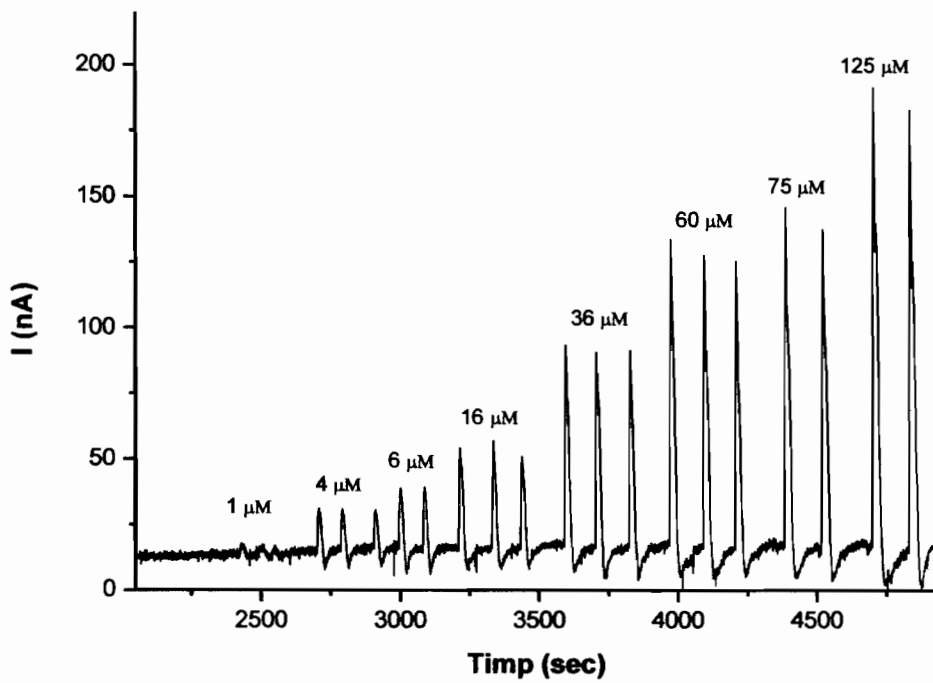


Figura 6

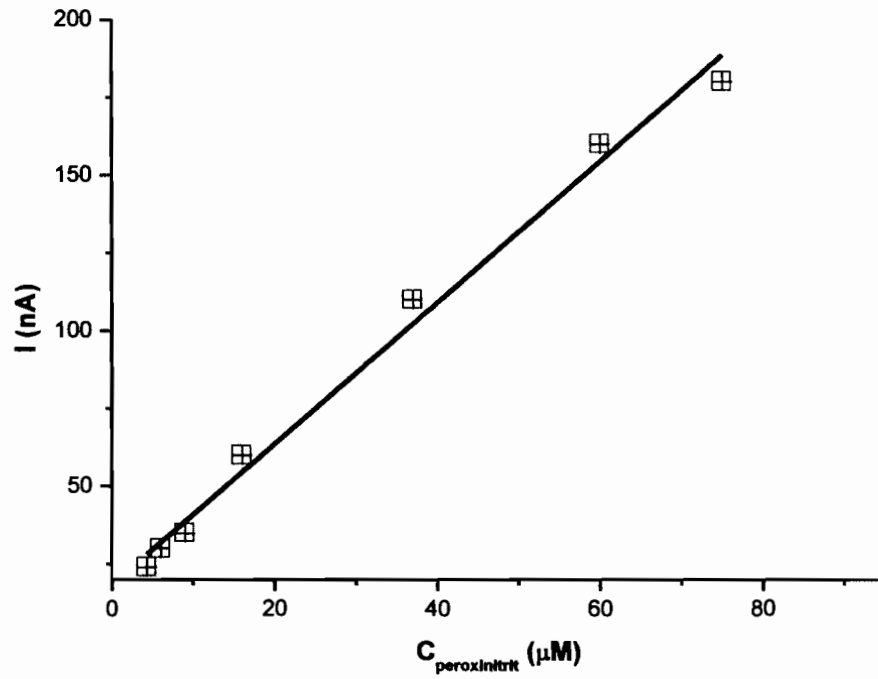


Figura 7

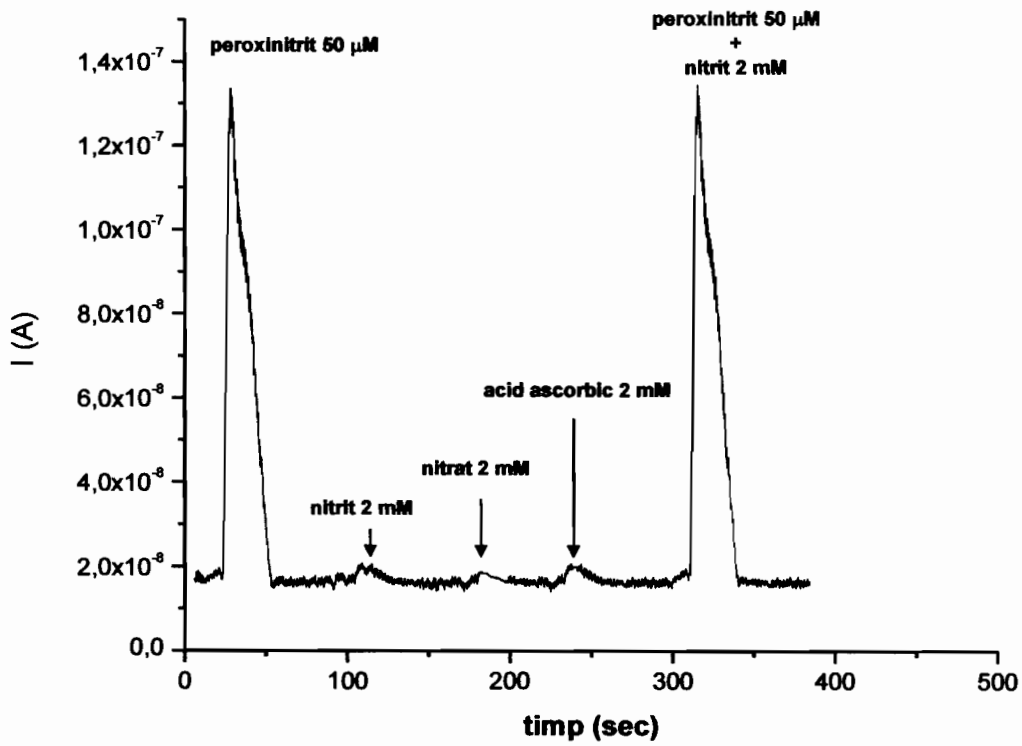


Figura 8