



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00728

(22) Data de depozit: 27/09/2018

(41) Data publicării cererii:
28/02/2019 BOPI nr. 2/2019

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "TRANSILVANIA" DIN
BRAȘOV, BD.EROILOR NR.29, BRAȘOV,
BV, RO

(72) Inventatori:
• FLORESCU MONICA,
STR.BRÂNDUȘELOR NR.41, BL.112,
AP.29, BRAȘOV, BV, RO;
• DAVID MELINDA, STR.CARPAȚILOR
NR.37, BL.R1, SC.A, AP.10, BRAȘOV, BV,
RO;
• ȘERBAN ADRIAN, STR.VICTORIEI NR.1,
BL.D2, AP.16, PLOPENI, PH, RO

(54) **PROCEDEU PENTRU DETERMINAREA ELECTROCHIMICĂ
RAPIDĂ A CAPACITĂȚII TOTALE ANTIOXIDANTE
A EXTRACTELOR VEGETALE HIDROSOLUBILE, FOLOSIND
O PLATFORMĂ PORTABILĂ ELECTROCHIMICĂ
CU NANOPARTICULE DE AUR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru determinarea electrochimică rapidă a capacității antioxidante totale a extractelor vegetale hidrosolubile folosind o platformă portabilă electrochimică cu particule de aur PEN. Procedeu conform invenției are următoarele etape:

1) efectuarea măsurătorilor de optimizare a pH-ului electrolitului, care este o soluție tampon de fosfat de sodiu de concentrație 0,1 M NaPB pentru detecția H_2O_2 , valoarea optimă fiind $pH = 7,0$;

2) efectuarea de măsurători de optimizare a potențialului de lucru aplicat PEN folosit la măsurătorile electrochimice în electrolit pentru detecția H_2O_2 , valoarea optimă fiind de 0,55 V vs. Ag/AgCl;

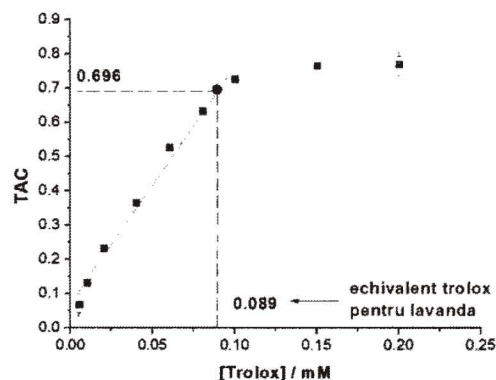
3) folosind antioxidantul standard Trolox diluat în electrolit se prepară soluții cu concentrații de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 și 200 μM și se înregistrează intensitățile curenților I_0 și, respectiv, I, după adăugarea a 0,5 mM H_2O_2 folosind software-ul dedicat;

4) se determină capacitatea antioxidantă totală TAC-ul utilizând relația $TAC = I_0/I$ implementată în software-ul dedicat și se reprezintă grafic în funcție de concentrația Trolox, $TAC = f(C_T)$, pentru obținerea curbei de etalonare a PEN pentru Trolox care va fi folosită ca și referință pentru raportarea TAC în echivalent Trolox a extractului vegetal hidrosolubil;

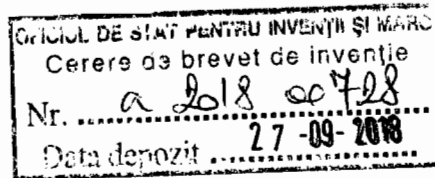
5) se diluează extractul hidrosolubil analizat în electrolit în raport de 1:40 și folosind platforma portabilă mobilă PEN se înregistrează în triplicat intensitățile curenților I_0 și I după adăugarea a 0,5 mM H_2O_2 pentru calcularea TAC-ului utilizând relația $TAC = I_0/I$ implementată de software-ul dedicat, și

6) se calculează și se afișează pe ecranul electronic al PEN echivalentul Trolox corespunzător TAC-ului mediu prin raportarea la curba de etalonare pentru Trolox.

Revendicări: 1
Figuri: 1



Nr. 244 B.P.I. : 203/13.09.2018



1

Procedeu pentru determinarea electrochimică, rapidă a capacității totale antioxidante a extractelor vegetale hidrosolubile folosind o platformă portabilă electrochimică cu nanoparticule de aur

Invenția se referă la un procedeu ce folosește o platformă portabilă electrochimică nanostructurată cu nanoparticule de aur (PEN) **destinat** determinării capacității antioxidante totale (TAC) a extractelor hidrosolubile din plante cu aplicabilitate în domeniul suplimentelor alimentare.

Este cunoscut faptul că extractele hidrosolubile din plante se află printre cele mai folosite extracte vegetale datorită conținutului ridicat de compuși antioxidanți. În prezent nu există o metodă analitică standardizată, portabilă, simplă și rapidă pentru determinarea TAC a suplimentelor alimentare ce pretind că au un caracter antioxidant (Apak R. Özyürek M., Güclu K., Çapanoglu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. J. Agric. Food Chem. 2016, 64, 997–1027). Soluțiile clasice cel mai des folosite pentru determinarea TAC sunt: *chemiluminiscenta* (Bunaciu A. A., Danet A. F., Fleschin Ș., Aboul-Enein H. Y. Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2016, 46(5), 389-399), *cromatografia lichidă de înaltă performanță - HPLC* (Guliyev, V.B.; Gul, M.; Yildirim, A. Hippophae rhamnoides L.: Chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. J. Chromatogr. B. 2004, 812(1-2), 291-307) sau metodele spectroscopice precum *spectroscopia* Raman și cea în infraroșu cu transformată Fourier în reflectanța totală atenuată - ATR-FTIR (Schulz, H.; Baranska, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. Vib. Spectrosc. 2007, 43, 13-25). Aceste soluții au la bază metodele spectrofotometrice.

Sunt cunoscute metodele spectrofotometrice folosite în general, cu ajutorul cărora se poate determina TAC-ul, cum sunt: *ORAC* (Oxygen Radical Absorbance Capacity), *TRAP* (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter), *TEAC* (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), *FRAP* (Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter), *CUPRAC* (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), *DPPH*, reducerea ionilor de Ce(IV) sau Mo(VI), metoda Folin-Ciocalteu, chemiluminiscenta (CL).



Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: necesită aparatură scumpă de laborator (spectrofotometre, spectrofluorimetre, luminometre), procedee laborioase ce sunt consumatoare de timp (pretratamente timp de 30-60 minute, amestecare cu diverse soluții chimice preparate cu reactivi scumpi și toxici – neocuproină, 1,10-fenantrolină, acetonă, tripiridil-s-triazină, fluoresceină, 2,2-difenil-1-picrylhidrazil, 2,2'-azobis (2-amidinopropan) diclorhidrat, fenoli, acid clorhidric, etc.), personal calificat (laboranți specializați) (Repetto M.G. and Llesuy S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. Braz J Med Biol Res, 2002, Volume 35(5) 523-534).

Scopul invenției este de a stabili un procedeu cu pașii metodei electrochimice pentru determinarea portabilă, simplă și rapidă a **capacității totale antioxidante** (TAC) a extractelor vegetale hidrosolubile folosind o platformă portabilă electrochimică nanostructurată (PEN), cu înlăturarea dezavantajelor identificate.

Este cunoscut că metoda electrochimică este foarte sensibilă, prezintă o eficiență mare în cuantificarea și transformarea evenimentelor (bio)chimice prin reacții electrochimice de oxidare-reducere în semnale electrice măsurabile (Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. Biotechnology Advances, 2012, 30, 489-511; David M., Barsan M. M., Brett C. M.A., Florescu M. Improved glucose label-free biosensor with layer-by-layer architecture and conducting polymer poly (3,4-ethylenedioxythiophene). Sensors and Actuators B 255, 2018, 3227–3234) și reprezintă o alternativă simplă și avantajoasă față de metodele de laborator spectrofotometrice clasice folosite.

Antioxidanții reprezintă o clasă de compuși de interes real pentru rolul lor în reducerea efectelor adverse cauzate de speciile reactive de azot (RNS) sau oxigen (ROS). Din categoria ROS este peroxidul de hidrogen, H_2O_2 , fiind un produs secundar reactiv obținut în urma proceselor biochimice și generează stres oxidativ ori leziuni celulare (Nimse S.B. and Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanism. RCS Adv. 2015, 5, 27986). Extractele vegetale hidrosolubile au o capacitate antioxidantă totală (TAC) datorată tuturor antioxidantilor constituenți (vitamine, carotenoizi, polifenoli, etc.) (Apak R. Özyürek M., Güclu K., Çapanoglu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. J. Agric. Food Chem. 2016, 64, 997–1027) care participă la reacții electrochimice de oxidare-reducere. Astfel,



măsurători electrochimice amperometrice pot fi utilizate pentru a evalua TAC-ul soluțiilor cu caracter antioxidant.

Literatura prezintă biosenzori electrochimici care încorporează enzime pentru detecția compușilor polifenolici și fenolici din extracte vegetale prin catalizarea reacțiilor biochimice corespunzătoare, dar nu pot determina TAC-ul (Campanella L., Bonanni A., Finotti E., Tomassetti M. Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: a comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. *Biosens & Bioelectron.* 2004, 19, 641-651; Rodriguez-Sevilla E., Ramirez-Silva M-T., Romero-Romo M., Ibarra-Escutia P., Palomar-Pardave M. Electrochemical quantification of the antioxidant capacity of medicinal plants using biosensors. *Sensors*, 2014, 14, 14423-14439; Di Fusco M., Tortolini C., Deriu D., Mazzei F. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta*, 2010, 14, 235-240). Nanoparticulele sunt de asemenea utilizate împreună cu senzorii electrochimici pentru obținerea nanosenzorilor (senzori nanostructurați) deoarece acestea îmbunătățesc sensibilitatea și acuratețea determinărilor (Sun I.I. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *Trends in Anal. Chem.* 2008, 27(7)). S-a raportat că nanoparticulele de aur (AuNP) au un comportament similar enzimelor, catalizând reacții chimice de oxidare-reducere (Wei, H., Wang, E. K. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 6060–6093; Wang X., Hu Y., Wei H., Nanozymes in bionanotechnology: From sensing to therapeutics and beyond. *Inorg. Chem. Front.*, 2016, 3, 41), fapt ce le recomandă în dezvoltarea nanosenzorilor electrochimici.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în determinarea TAC-ului într-un mod portabil, simplu și rapid pentru utilizator, în urma prestabilirii procedurii și a parametrilor optimi de către inventatori. Simplitatea pentru utilizator constă în efectuarea a două amestecuri și măsurătorile corespunzătoare, ce nu durează mai mult de 3 minute; acestea pot fi efectuate la fața locului, iar rezultatele sunt afișate imediat după efectuarea măsurătorii pe înțelesul tuturor cu înlăturarea dezavantajelor identificate impuse de metodele spectrofotometrice clasice.



Procedeul se definește ca o succesiune de etape și constă în determinarea electrochimică amperometrică, simplă și rapidă a TAC-ului extractelor vegetale hidrosolubile, prin înregistrarea directă a răspunsului platformei portabile electrochimice nanostructurate cu AuNP sub forma unor curenți electrice pentru extract - (I_0) în absența și respectiv, (I) în prezența H_2O_2 - și compararea valorii raportului I_0/I cu o curbă de etalonare dinaintea stabilită pentru determinarea TAC-ului exprimat în echivalent Trolox (antioxidant standard).

Platforma portabilă electrochimică nanostructurată (PEN) constă din:

1. Celulă electrochimică cu trei electrozi tipăriți “screen printed”: senzorul nanostructurat cu AuNP, electrodul auxiliar de platină, electrodul de referință Ag/AgCl,
2. Interfață electrochimică portabilă (potențiostat) controlată prin intermediul unui software dedicat, conectat la celula electrochimică și
3. Dispozitiv electronic cu ecran (laptop/tabletă sau telefonul utilizatorului) ce are instalat software-ul dedicat, conectat la potențiostat, pe care se vizualizează valoarea TAC-ului extractului vegetal hidrosolubil analizat exprimat în echivalent Trolox.

Etapele optimizării procedurii și a parametrilor optimi prestabiliți folosind PEN sunt:

- a) Se fac măsurători de optimizare a pH-ului electrolitului (soluție tampon fosfat de sodiu de concentrație 0.1 M NaPB) folosit la măsurătorile electrochimice pentru detecția H_2O_2 , cele mai bune rezultate fiind obținute pentru pH 7,0.
- b) Se fac măsurători de optimizare a potențialului de lucru aplicat PEN prin software-ul dedicat folosit la măsurătorile electrochimice în electrolit pentru detecția H_2O_2 , cele mai bune rezultate fiind obținute pentru 0,55 V vs. Ag/AgCl.
- c) Se diluează soluția stoc a antioxidantului standard *Trolox* (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), concentrație 5 mM, în electrolit pentru a obține concentrațiile 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 și 200 μ M după care se realizează măsurătorile pentru determinarea intensității curentului I_0 corespunzătoare fiecărei concentrații. Se repetă măsurătoarele după adăugarea a 0,5 mM H_2O_2 (soluție stoc 100 mM), înregistrându-se intensitatea curentului I corespunzătoare fiecărei concentrații.



Trolox. Măsurătorile se realizează în triplicat și se calculează valorile medii ale TAC-ului.

- d) Pentru determinarea TAC-ului se utilizează următoarea relație:

$$\text{TAC} = I_0/I \quad (1)$$

Se reprezintă grafic (folosind valorile medii) și se salvează Fig. 1, ce reprezintă curba de etalonare a PEN pentru trolox în funcție de concentrația acestuia C_T , $\text{TAC} = f(C_T)$, (folosind software-ul dedicat) ce va fi folosită ca referință pentru raportarea TAC în echivalent trolox a extractului vegetal hidrosolubil (vezi Fig. 1).

- e) Se diluează extractul hidrosolubil analizat (în cazul de față un extract de lavandă) în electrolit (raport 1:40) și se realizează măsurătoarea amperometrică folosind PEN pentru determinarea intensității curentului I_0 . Se adaugă 0.5 mM H_2O_2 la soluția extract-electrolit și se înregistrează folosind PEN valoarea intensității curentului I . Măsurătorile se realizează în triplicat și se calculează TAC-ul folosind relația (1).
- f) Se calculează valoarea medie și se afișează pe ecranul electronic al PEN echivalentul Trolox corespunzător TAC-ului mediu prin raportarea sa la curba de etalonare pentru Trolox (folosind software-ul dedicat). Exemplu din Fig. 1: valorii $\text{TAC} = 0.696$ îi este corespunzător $\text{TAC} = 0.089$ mM exprimat în echivalent Trolox.

Procedeele prezintă următorul avantaj: obținerea TAC-ului exprimat în echivalent Trolox cu ajutorul platformei portabile electrochimice nanostructurată (PEN) într-un mod simplu, rapid, la fața locului și pe înțelesul tuturor cu înlăturarea dezavantajelor identificate impuse de metodele spectrofotometrice clasice.

Folosirea unei platforme portabile electrochimice nanostructurate cu AuNP îmbunătățește performanțele metodei electrochimice; prezența AuNP mărește suprafața efectivă de detecție și crește viteza reacțiilor de oxidare datorită proprietăților electrocatalitice superioare. Metodele de detecție electrochimică evidențiază atât puterea de oxidare a extractelor cu proprietăți antioxidante (cum se va arata în exemplul de mai jos), cât și capacitatea lor de a reduce (inhiba) speciile reactive ale oxigenului.



6

Se dă în continuare un exemplu de utilizare conform procedurii în legătură cu Fig. 1: Determinarea TAC, exprimat în echivalent Trolox, pentru un extract de lavandă din curba de etalonare Trolox dată:

Folosind platforma portabilă electrochimică nanostructurată cu AuNP (PEN) se efectuează măsurători amperometrice ale intensității curentului obținut pentru determinarea TAC-ului unui extract diluat în electrolit în celula electrochimică după optimizarea parametrilor de funcționare. S-au stabilit astfel următorii parametri optimi : electrolit = soluție tampon fosfat de sodiu (NaPB) de concentrație 0.1 M cu pH 7,0, potentialul de lucru de 0,55 V vs. Ag/AgCl.

Etapele procedurii urmat de către utilizator pentru determinarea TAC-ului unui extract folosind PEN sunt:

- a) Se verifică următoarele: nu se utilizează componentele electronice sub temperatura de îngheț (0°C) sau în condiții meteorologice extreme; temperatura recomandată a soluțiilor (electrolit și extracte) este între $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$; electrolitul și soluția stoc H_2O_2 sunt furnizate;
- b) Se diluează extractul hidrosolubil analizat în electrolit (raport 1:40 obținut prin adăugarea cu pipeta furnizată 5 picături de extract în 10 ml electrolit) se agită ușor și se realizează în triplicat măsurătoarea amperometrică folosind PEN pentru determinarea intensității curentului I_0 .
- c) Se adaugă H_2O_2 la soluția extract-electrolit pentru a obține concentrația 0.5 mM (1 picătură soluție stoc 100 mM), se agită ușor și se realizează în triplicat măsurătoarea amperometrică folosind PEN pentru determinarea valoarea intensității curentului I.
- d) Se calculează și se afișează pe ecranul electronic al PEN echivalentul Trolox corespunzător TAC-ului mediu obținut prin raportarea valorii măsurată la curba de etalonare pentru Trolox (folosind software-ul dedicat) (exemplul din Fig. 1).

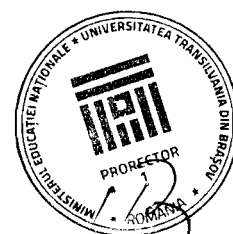
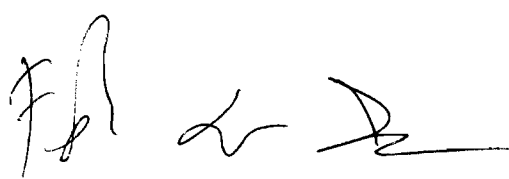


Bibliografie

1. Apak R. Özyürek M., Güçlü K., Çapanoğlu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 997–1027 DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04739.
2. Bunaciu A. A., Danet A. F., Fleschin Ş., Aboul-Enein H. Y. Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2016, 46(5), 389-399 DOI: 10.1080/10408347.2015.1101369.
3. Campanella L., Bonanni A., Finotti E., Tomassetti M. Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: a comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. *Biosens & Bioelectron.* 2004, 19, 641-651 DOI: 10.1016/S0956-5663(03)00276-8.
4. Guliyev, V.B.; Gul, M.; Yildirim, A. *Hippophae rhamnoides* L.: Chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. *J. Chromatogr. B.* 2004, 812(1-2), 291-307 DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.08.047
5. Schulz, H.; Baranska, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 2007, 43, 13-25 DOI: 10.1016/j.vibspec.2006.06.001
6. David M., Barsan M. M., Brett C. M.A., Florescu M. Improved glucose label-free biosensor with layer-by-layer architecture and conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Sensors and Actuators B* 255, 2018, 3227–3234 DOI: 10.1016/j.snb.2017.09.149.
7. Di Fusco M., Tortolini C., Deriu D., Mazzei F. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta*, 2010, 14, 235-240, DOI: 10.1016/j.talanta.2009.11.063.
8. Nimse S.B. and Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanism. *RCS Adv.* 2015, 5, 27986 DOI: 10.1039/c4ra13315c.
9. Rodriguez-Sevilla E., MRamirez-Silva-T., Romero-Romo M., Ibarra-Escutia P., Palomar-Pardave M. Electrochemical quantification of the antioxidant capacity of medicinal plants using biosensors. *Sensors*, 2014, 14, 14423-14439, DOI: 10.3390/s140814423.



10. Repetto M.G. and Llesuy S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res*, 2002, Volume 35(5) 523-534.
11. Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnology Advances*, 2012, 30, 489-511 DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.
12. Suni I.I. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *Trends in Anal. Chem.* 2008, 27(7) DOI: 10.1016/j.trac.2008.03.012.
13. Wei, H., Wang, E. K. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 6060–6093 DOI:10.1039/C3CS35486E.
- 14 Wang. X., Hu Y., Wei H., Nanozymes in bionanotechnology: From sensing to therapeutics and beyond. *Inorg. Chem. Front.*, 2016, 3, 41 DOI: 10.1039/c5qi00240k.



REVENDICĂRI

Procedeeul pentru determinarea electrochimică portabilă, rapidă a capacității antioxidante totale a extractelor vegetale hidrosolubile folosind o platformă portabilă electrochimică cu nanoparticule de aur (PEN) este **caracterizat prin aceea că**, în scopul realizării unei analize simple și rapide, la fața locului, sunt parcurse următoarele etape: în prima etapă se fac măsurători de optimizare a pH-ului electrolitului (soluție tampon fosfat de sodiu de concentrație 0.1 M NaPB) folosit la măsurătorile electrochimice în electrolit pentru detecția H_2O_2 (valoare optimă pH 7,0), după care în a doua etapă se fac măsurători de optimizare a potențialului de lucru aplicat PEN folosit la măsurătorile electrochimice în electrolit în pentru detecția H_2O_2 (valoare optimă 0,55 V vs. Ag/AgCl), urmând ca în a treia etapă folosind antioxidantul standard *Trolox* (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) prin diluarea acestuia în electrolit se prepară soluții cu concentrații 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 și 200 μM și se înregistrează intensitățile curenților I_0 și, respectiv, I după adăugarea a 0,5 mM H_2O_2 (1 picătură soluție stoc 100 mM în 10 ml din fiecare soluție electrolit-Trolox) folosind software-ul dedicat, urmând ca în a patra etapă se determină TAC-ul utilizind relația $TAC = I_0/I$ implementată în software-ul dedicat, se reprezintă grafic în funcție de concentrația Trolox ($TAC = f(C_T)$) (măsurătorile se realizează în triplicat și se folosesc valorile medii ale TAC-ului) pentru obținerea curbei de etalonare a PEN pentru Trolox ce va fi folosită ca referință pentru raportarea TAC în echivalent Trolox a extractului vegetal hidrosolubil, după care în etapa a cincea se diluează extractul hidrosolubil analizat în electrolit (raport 1:40 obținut prin adăugarea cu pipeta furnizată a 5 picături de extract în 10 ml electrolit) și folosind PEN se înregistrează în triplicat intensitățile curenților I_0 și, respectiv, I după adăugarea a 0,5 mM H_2O_2 (1 picătură soluție stoc 100 mM în 10 ml soluție extract-electrolit) pentru calcularea TAC-ului utilizind relația $TAC = I_0/I$ implementată în software-ul dedicat, apoi în etapa a șasea se calculează și se afișează pe ecranul electronic al PEN echivalentul Trolox corespunzător TAC-ului mediu prin raportarea la curba de etalonare pentru Trolox (folosind software-ul dedicat).



4

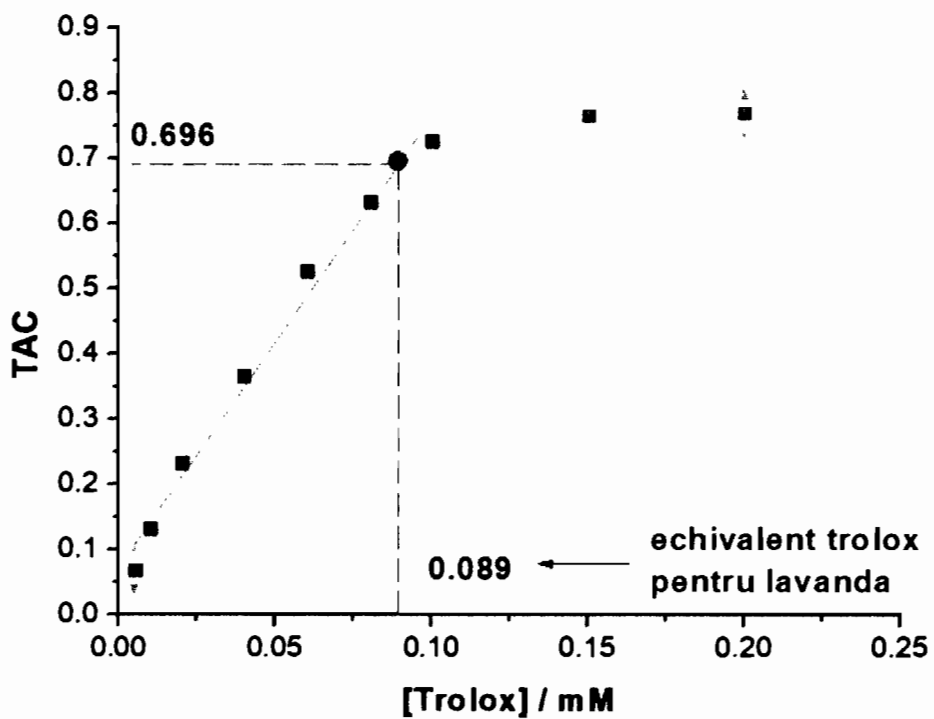


Fig. 1

Handwritten signatures and initials.

