



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00728**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/01/2024** BOPI nr. 1/2024

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

(73) Titular:
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**PAVEL STRATIL, B. KLEJDUS AND V.
KUBAN, "DETERMINATION OF TOTAL
CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS
AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY IN
VEGETABLES; EVALUATION OF
SPECTROPHOTOMETRIC METHODS",
J. AGRIC. FOOD CHEM., VOL. 54, PP.
607-617, 2006; M. TÂRSINĂ, O.
MIGALATIEV, A. JENAC, V. CARAGIA,
"DETERMINAREA ACTIVITĂȚII
ANTIOXIDANTE ÎN EXTRACTELE DIN
MATERII PRIME VEGETALE",
CONFERINȚA TEHNICO-ȘTIINȚIFICĂ A
COLABORATORILOR, DOCTORANZILOR
ȘI STUDENȚILOR, 2014**

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



1 Invenția se referă la un procedeu ce folosește o platformă portabilă electrochimică
2 nanostructurată cu nanoparticule de aur, destinat determinării capacității antioxidante totale
3 a extractelor hidrosolubile din plante, cu aplicabilitate în domeniul suplimentelor alimentare.

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

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

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

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

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

RO 133102 B1

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. Ozyiirek M., Guclu K., Capanoglu 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.

Determinarea TAC-ului se poate face 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 min; 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.

Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, constă în determinarea electrochimică rapidă a capacității antioxidante totale a extractelor vegetale hidrosolubile, printr-un procedeu simplu la fața locului cu rezultate imediate.

Procedeul de determinare a capacității antioxidante totale a extractelor hidrosolubile din plante 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 electrici pentru extract - (I_0) în absența și respectiv, (I) în prezența H_2O_2 -

RO 133102 B1

1 și compararea valorii raportului I_0/I cu o curbă de etalonare dinaintea stabilită pentru determi-
narea TAC-ului exprimat în echivalent Trolox (antioxidant standard). Platforma portabilă
3 electrochimică nanostructurată (PEN) constă din:

1. Celulă electrochimică cu trei electrozi tipăriți "screen printed": senzorul nanostruc-
5 turat cu AuNP, electrodul auxiliar de platină, electrodul de referință Ag/AgCl,

2. Interfață electrochimică portabilă (potențioștaf) controlată prin intermediul unui
7 software dedicat, conectat la celula electrochimică și,

3. Dispozitiv electronic cu ecran (laptop/tabletă sau telefonul utilizatorului) ce are
9 instalat software-ul dedicat, conectat la potențioștat, pe care se vizualizează valoarea TAC-ul
extractului vegetal hidrosolubil analizat exprimat în echivalent Trolox.

11 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
13 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-
15 ul dedicat folosit la măsurătorile electrochimice în electrolit pentru detecția H_2O_2 , cele mai
17 bune rezultate fiind obținute pentru 0,55 V vs. Ag/AgCl.

c) Se diluează soluția stoc a antioxidantului standard Trolox (acid 6-hidroxi-
19 2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic), concentrație 5 mM, în electrolit pentru a obține con-
centrațiile 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 și 200 μ M după care se realizează măsurătorile
21 pentru determinarea intensității curentului I_0 corespunzătoare fiecărei concentrații. Se repetă
măsurătorile după adăugarea a 0,5 mM H_2O_2 (soluție stoc 100 mM), înregistrându-se
23 intensitatea curentului I corespunzătoare fiecărei concentrații Trolox. Măsurătorile se reali-
zează în triplicat și se calculează valorile medii ale TAC-ului.

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

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

27 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 , $\text{TAC} = f(C_T)$,
29 (folosind software-ul dedicat) ce va fi folosită ca referință pentru raportarea TAC în echivalent
trolox a extractului vegetal hidrosolubil (vezi fig. 1).

31 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
33 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
35 triplicat și se calculează TAC-ul folosind relația (1).

f) Se calculează valoarea medie și se afișează pe ecranul electronic al PEN echi-
37 valentul Trolox corespunzător TAC-ului mediu prin raportarea sa la curba de etalonare pentru
Trolox (folosind software-ul dedicat). Exemplu din fig. 1: valorii TAC = 0,696 îi este corespun-
39 zător TAC = 0,089 mM exprimat în echivalent Trolox.

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

Folosirea unei platforme portabile electrochimice nano structurate cu AuNP îmbună-
45 tățește performanțele metodei electrochimice; prezența AuNP mărește suprafața efectivă de
detecție și crește viteza reacțiilor de oxidare datorită proprietăților electrocatalitice supe-
47 rioare. 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
49 a reduce (inhibă) speciile reactive ale oxigenului.

RO 133102 B1

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:	1
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, potențialul de lucru de 0,55 V vs. Ag/AgCl.	3
Etapele procedurii urmat de către utilizator pentru determinarea TAC-ului unui extract folosind PEN sunt:	5
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 20-25°C; electrolitul și soluția stoc H ₂ O ₂ sunt furnizate.	7
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 .	9
c) Se adaugă H ₂ O 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 valorii intensității curentului I.	11
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).	13
	15
	17
	19
	21
	23
	25

RO 133102 B1

1

Revendicare

3

Procedeu pentru determinarea electrochimică portabilă, rapidă a capacității antioxidante totale a extractelor vegetale hidrosolubile folosind o platformă portabilă electrochimică cu nanoparticule de aur, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde următoarele etape:

5

- diluarea extractului hidrosolubil analizat în electrolit, în raport 1:40, agitarea acestuia,

7

apoi înregistrarea intensitățile curenților I_0 cu platforma electrochimică;

9

- adaugare de apă oxigenată la soluția extract-electrolit pentru a se obține concentrația 0,5 mM, 1 picătură soluție stoc 100 mM în 10 ml soluție extract-electrolit, agitare și măsurare amperometrică utilizând platforma electrochimică, pentru determinarea intensităților curenților I;

11

- calcularea și afișarea echivalentului antioxidant corespunzător capacității totale antioxidante medii, prin raportarea la curba de etalonare pentru antioxidant.

13

