



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2018 00587**

(22) Data de depozit: **13/08/2018**

(41) Data publicării cererii:
28/02/2020 BOPI nr. **2/2020**

(71) Solicitant:
• **CENTRUL INTERNAȚIONAL DE BIODINAMICĂ,**
INTRAREA PORTOCALOR, NR.1B, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **INSTITUTUL DE BIOLOGIE,**
STR.SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **VASILESCU ALINA,** *BDUL.1MAI, NR.27, BL.C7, AP.38, ET.9, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;*

• **TITOIU ANA MARIA,**
STR.CALEA FERATĂ, NR.15, SAT.VAIDEENI, COMUNA VAIDEENI, VL, RO;
• **PURCAREA CRISTINA,**
STR.IEPURAȘULUI, NR.4, CORBEANCA, IF, RO;
• **NECULA PETRAREANU GEORGIANA,**
INTRAREA ȘTIUCII, NR.8, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **METODA DE DETERMINARE A FUNGICIDULUI TIRAM BAZATĂ PE INHIBIȚIE ENZIMATICĂ ȘI SENZOR ELECTROCHIMIC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare a fungicidului tiram din produse alimentare. Metoda, conform invenției, constă în reacția enzimatică în soluție a unei enzime aldehyd dehidrogenază izolată dintr-o bacterie de tip *Flavobacterium* provenită din apele din Antarctica, în prezența cofactorului enzimatic și a unui substrat de benzaldehidă și realizarea de măsurători amperometrice cu un senzor sensibil pentru cofactorul

enzimatic, de tip electrod de grafit modificat cu nanofibre de carbon și cu mediatorul Meldola Blue, pentru detecția electrochimică a gradului de inhibiție și implicit a concentrației de tiram din cantități reduse de probe supuse analizei.

Revendicări: 1
Figuri: 4



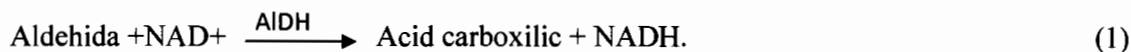
Metoda de determinare a fungicidului tiram bazata pe inhibitie enzimatica si senzor electrochimic

Inventia se refera la o metoda de determinare a fungicidului tiram bazata pe cuplarea dintre o enzima sensibila la tiram (aldehid dehidrogenaza dintr-o tulpina psihrofila de *Flavobacterium* PL2 izolata din Antarctica, denumita „F-ALDH”) si un senzor electrochimic.

Tiramul este un fungicid cu spectru larg din clasa ditiocarbamatilor utilizat frecvent in agricultura pentru combaterea bolilor fungice la fructe si legume. Tiramul a fost aprobat in 2004 intr-o serie de tari europene intre care si Romania. Conform reglementarilor UE, limita maxima admisibila pentru orice pesticid individual in ape este de 0.1 ppb iar pentru totalitatea pesticidelor este admis un maxim de 0.5 ppb. Controlul alimentelor in ceea ce priveste catitatile reziduale de pesticide este strict reglementat de asemenea iar catitatile maxime admisibile fixate de Comisia Europeana in produse animale, vegetale si alimente sunt de ordinul ppm, fiind diferite in functie de tipul de produs si de pesticid (FAO. Codex Alimentarius Pesticide Database, disponibil online la 2018. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/>).

In acest context, importanta existentei de metode rapide, fiabile si cu cost scazut pentru determinarea tiramului este evidenta. Metodele de analiza utilizate curent pentru detectia tiramului presupun costuri importante si un timp de analiza lung datorita concentratiei scazute a acestui compus in mediu si in diversele matrici alimentare. In general, este vorba de metode cromatografice sau spectrofotometrice bazate pe determinarea disulfurii de carbon eliberate prin hidroliza acida a compusilor ditiocarbamati. Biosenzorii reprezinta o alternativa atractiva la aceste metode instrumentale costisitoare, deoarece permit detectia rapida si cu cost scazut a analitilor fara a necesita separarea prealabila a acestora din probele complexe supuse analizei. In particular, in cazul fungicidelor ditiocarbamate acestea inhiba activitatea aldehid dehidrogenazei (EC 1.2.1.5) din drojdie (*Saccharomyces cerevisiae*), principiu care a fost exploatat pentru realizarea de biosenzori.

Aldehid dehidrogenaza (ALDH) este o enzima care catalizeaza transformarea alchidelor in acizii carboxilici respectivi cu reducerea concomitenta a cofactorului enzimatic NAD^+ , conform reactiei:



Noguer si colaboratorii au descris in anii 1997-2000 cativa biosenzori enzimatici electrochimici pentru determinarea unor fungicide ditiocarbamate si metaboliti ai acestora, functionand pe principiul inhibitiei activitatii aldehid dehidrogenazei. (Marty, J.L.; Noguer, T. Analysis 1993,21, 231-233.; Noguer, T.; Marty, J.-L., Anal. Chim. Acta 1997,347,63-70. Noguer, T.; Gradinaru, A.; Ciucu, A.; Marty, J.L. Anal. Lett.1999,32(9), 1723-1738). Majoritatea biosenzorilor necesitau prezenta unei a doua enzime (NADH oxidaza sau diaforaza), ceea ce le limita stabilitatea si ducea la cresterea costului. In 2001, acelasi grup de cercetare a dezvoltat un biosenzor monoenzimatic pentru detectia fungicidului metam sodiu si

a metabolitului sau MITC bazat pe un electrod de grafit serigrafat modificat cu mediatorul Meldola Blue, la suprafata caruia aldehyd dehidrogenaza era imobilizata intr-un polimer de alcool polivinilic grefat cu grupari stiril piridinium, PVA-SbQ. (Noguer T, Ana-Maria Balasoiu A-M, Avramescu A, Marty J-L, Anal. Lett 34(4), 513–528 (2001).

Prin utilizarea unui mediator electrochimic, Meldola Blue, valoarea potentialului electric E aplicat in masuratorile amperometrice a scazut semnificativ, permitand o detectie selectiva, lipsita de interferente bazata pe cuplarea reactiei catalizate de aldehyd dehidrogenaza cu reactia chimica la suprafata electrodului dintre cofactorul redus NADH si mediatorul electrochimic, urmata de re-oxidarea electrochimica a mediatorului. Cofactorul si mediatorul devin astfel disponibili pentru realuarea secventei de reactii (1-3):



Utilizarea acestui biosenzor electrochimic monoenzimatic necesita 1IU AIDH si 0.6 mg NAD per test, ceea ce se traduce in costuri semnificative asociate recativilor per test, tinand cont de faptul ca inhibitia enzimei de catre ditiocarbamati este ireversibila. In plus, niciunul din biosenzorii dezvoltati pana in prezent nu a fost testat fata de tiram.

Problema pe care o rezolva inventia este dezvoltarea unei metode simple, rapide si care implica consum scazut de enzima si cofactor si implicit costuri scazute la determinarea tiramului si a altor compusi ditiocarbamati. Metoda este bazata pe un senzor electrochimic care permite detectia in volume mici de proba cuplat cu o anumita enzima, aldehyd dehidrogenaza dintr-o tulpina psihrofila de *Flavobacterium* PL2 izolata din Antarctica, provenita din ape din Antarctica. Reactia enzimatice are loc in solutie la suprafata electrodului. Principiul metodei consta in inhibarea activitatii enzimatice a aldehyd dehidrogenzei de catre tiram proportional cu concentratia acestui fungicid si determinarea cu ajutorul unui senzor electrochimic a gradului de inhibitie si implicit a concentratiei de tiram din proba de analizat.

Metoda testului enzimatic cu detectie electrochimica pentru determinarea tiramului conform inventiei consta in: (1) obtinerea unei solutii de aldehyd dehidrogenazei dintr-o tulpina psihrofila de *Flavobacterium* PL2 izolata din Antarctica si diluarea la 0.02 mg/mL cu solutie tampon fosfat de concentratie 0.1 M pH 10; (2) realizarea unui senzor electrochimic pentru NADH folosind un electrod serigrafat de grafit modificat cu un mediator adecvat pentru NADH, Meldola Blue; (3) incubarea enzimei cu tiram timp de 15 minute; (4) realizarea reactiei enzimatice in solutie la suprafata electrozilor serigrafati (in absenta si prezenta tiramului) folosind un amestec optimizat de cofactor enzimatic NAD^+ (de concentratie finala 1 mM) si substrat (benzaldehyda, concentratie finala 53 μM) pentru masurarea pe cale electrochimica a benzaldehydei; (5) detectia electrochimica a cantitatii de NADH formate si de benzaldehyda transformata, testul durand in total 10 minute si in final (6) corelarea variatiei semnalului electrochimic cu concentratia de tiram din proba.

Metoda conform inventiei are ca si utilizare practica determinarea tiramului si altor ditiocarbamati, inhibitori ai aldehyd dehidrogenzei din *Flavobacterium*.

Exemplu de realizare a unui senzor electrochimic pentru determinarea tiramului din volume mici de proba

Pentru detectia rapida a tiramului folosind un senzor electrochimic si aldehyd dehidrogenaza conform inventiei se realizeaza masuratori amperometrice in volum mic de lichid (75 μ L) folosind un sistem din trei electrozi serigrafati: (1) electrod de lucru din grafit modificat cu un mediator electrochimic adecvat pentru NADH (de ex Meldola Blue), care este utilizat pentru detectarea NADH, (2) electrod auxiliar din grafit pentru masurarea intensitatii curentului electric generat in celula electrochimica si un pseudoelectrod de referinta din pasta de Ag pentru aplicarea unei diferente de potential electric constanta, cunoscuta. Modificarea electrodului de lucru cu mediatorul Meldola Blue se realizeaza prin adsorptie dintr-o solutie apoasa sau precipitare cu un complex, de exemplu $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$. De asemenea, pot fi utilizati electrozi disponibili comercial continand mediatorul inglobat in cerneala de grafit folosita la realizarea electrodului prin serigrafie. Pentru cresterea sensibilitatii si cantitatii de mediator dispnibila la suprafata electrozilor, electrozii de grafit pot fi modificati cu nanomateriale, de exemplu cu nanofibre de carbon.

Metoda pentru detectia tiramului presupune realizarea a doua masuratori, una pentru masurarea activitatii enzimatice a aldehyd dehidrogenazei F-AIDH in absenta tiramului iar cealalta pentru masurarea in prezenta fungicidului. Masuratorile electrochimice s-au realizat intr-o solutie de tampon fosfat 0,1 M pH=10 prin amperometrie, aplicandu-se un potential de +100 mV intre electrodul de lucru si cel de referinta. Celula electrochimica, constand din 3 electrozi serigrafati este fixata orizontal iar pe suprafata sa se depune un volum de 50 μ L electrolit, astfel incat sa acopere cei 3 electrozi. Solutia de masura contine 1 mUI F-AIDH. La un minut de la aplicarea potentialului, peste cei 50 μ L solutie de masura se adauga 25 μ L amestec continand NAD^+ (cofactor enzimatic) si solutie standard de benzaldehida (substrat enzimatic). Cantitatea de NAD^+ in celula de masura este de 53 μ g iar concentratia de benzaldehida de 53 μ M. Se inregistreaza variatia semnalului analitic din momentul adaugarii solutiei de benzaldehida ($t_1=1$ min) pana la 10 minute (t_2) de la aplicarea potentialului electric, ΔI_1 (Figura 1). Semnalul electrochimic masurat este proportional cu concentratia de benzaldehida din proba (Figura 2).

Aldehyd dehidrogenaza din bacteria psicrofila *Flavobacterium* PL2 are proprietatea ca activitatea sa este inhibata de tiram, intr-o proportie care este corelata cu concentratia acestui fungicid. De exemplu, gradul de inhibitie poate fi calculat prin masurarea pe cale spectrofotometrica a activitatii enzimatice in prezenta a diverse concentratii de tiram (Figura 3). O concentratie de tiram de 0.6 ppb provoaca o scadere a activitatii enzimatice de 10% iar o concentratie de 435 ppb provoaca o scadere a activitatii enzimatice de 54%. Specificitatea metodei este determinata de specificitatea enzimei. Enzima este inhibata in afara de tiram si de alti compusi din clasa ditiocarbamatilor precum disulfiram, maneb zineb sau propineb. In schimb, alti compusi intre care si poluanti precum metalele grele nu inhiba enzima decat la concentratii foarte mari de ordinul mM.

Pentru determinarea selectiva pe cale electrochimica a tiramului, se realizeaza un amestec de aldehyd dehidrogenaza cu tiram, de exemplu de concentratie 8 ppm, se lasa la incubat timp de 15 minute, apoi din acest amestec se iau 50 μ L care se depun pe sistemul de electrozi

serigrafiați și se repeta măsurătoarea cu NAD^+ și benzaldehida, în condiții identice. Se înregistrează valoarea variației intensității curentului electric de la t_1 la t_2 în acest caz, ΔI_2 . Se calculează gradul de inhibiție enzimatică astfel:

$$I (\%) = 100 - \frac{\Delta I_2}{\Delta I_1} \times 100.$$

Procentul de inhibiție este corelat cu concentrația de tiram din proba de analizat (Figura 4). De exemplu, pentru o concentrație de tiram de 2.7 ppm s-a obținut un procent de inhibiție de 35.2%. Limita de detecție a metodei, definită ca acea concentrație care determină o inhibiție enzimatică de 10% este de 675 ppb tiram. Metoda poate fi aplicată și pentru alți compuși ditiocarbamați care inhibă aldehyd dehidrogenaza psihrofilă din *Flavobacterium*, de exemplu o soluție de disulfiram de concentrație de 3.3 ppm provoacă o inhibiție enzimatică de 36.5 %, în condiții experimentale identice. Sensibilitatea metodei poate fi îmbunătățită prin concentrarea probelor sau imobilizarea enzimei pe microparticule magnetice ce sunt apoi concentrate pe suprafața electrodului.

Nota: Acest test enzimatic cu detecție electrochimică este doar un exemplu. Domeniul de aplicare al metodei dezvoltate conform invenției pentru detecția tiramului cu senzor electrochimic și aldehyd dehidrogenaza dintr-o tulpină psihrofilă de *Flavobacterium* PL2 izolată din Antarctica este extins la toate tipurile și materialele de electrozi și metodele de modificare a acestora cu Meldola Blue sau un alt mediator adecvat pentru NADH.

Revendicari:

1. Metoda de detectie a tiramului si altor compusi ditiocarbamati caracterizata prin aceea ca:

- determina selectiv tiramul si alti compusi ditiocarbamati in raport cu alte tipuri de poluanti, folosind o anumita aldehyd dehidrogenaza (dintr-o tulpina psihrofila de *Flavobacterium* PL2 izolata din Antarctica, denumita F-AIDH) a carei activitate este inhibata de acesti compusi.

- permite detectia rapida (timp total de analiza: 30 minute) a tiramului din volume mici de probe (zeci de microlitri) cu echipament electrochimic adecvat pentru determinari in situ

-enzima este lasata in contact cu tiramul in solutie la suprafata unor electrozi serigrafiati, unde se adauga ulterior si restul reactivilor necesari-substratul si cofactorul enzimatic

-electrozii serigrafiati modificati adecvat cu un mediator electrochimic pentru NADH permit stabilirea unei corelatii liniare intre semnalul electrochimic si concentratia de substrat enzimatic

- semnalul electrochimic este corelat cu interactia dintre enzima si tiram in conditii bine stabilite (concentratie fixa si optimizata de enzima, cofactor si substrat, timp fix de incubare enzima-tiram)

-permite determinarea concentratiei de tiram dintr-o proba necunoscuta pe baza unei calibrari prealabile a senzorului.

25

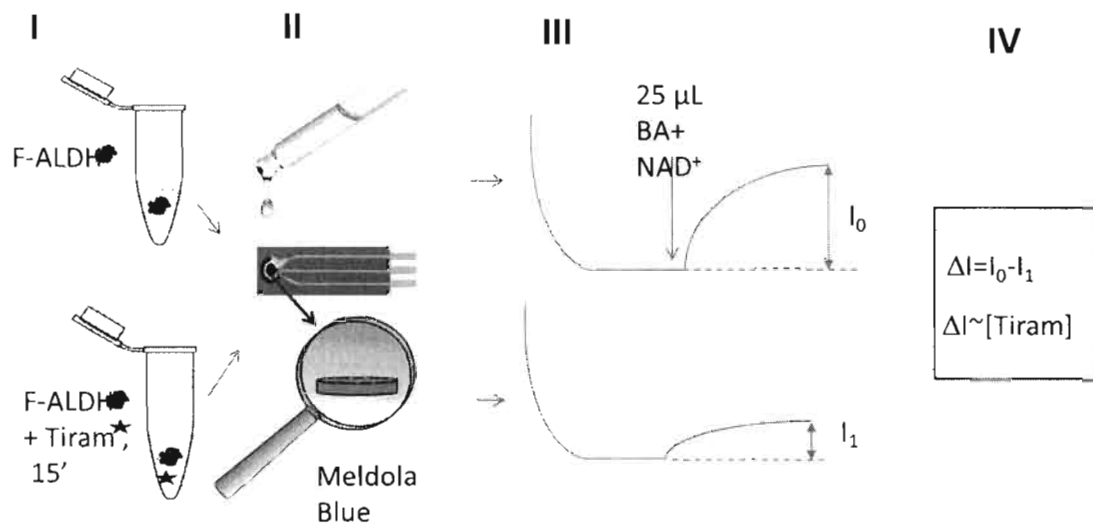


Figura 1. Principiul și etapele determinării tiramului cu F-ALDH și senzor electrochimic: I: enzima F-ALDH este incubată cu proba care conține tiram timp de 15 minute. II: un alicot de 50 μ L de amestec F-ALDH-tiram este aplicat pe electrozii serigrafiați, unde electrodul de lucru este modificat cu mediatorul Meldola Blue. III. La 1 minut de la aplicarea unui potențial adecvat în celula electrochimică, peste cei 50 μ L se depun 25 μ L de amestec de benzaldehidă și cofactor NAD⁺ și se înregistrează variația curentului electric între momentele $t_1=1$ min și $t_2=10$ minute. IV. Se determină scăderea intensității curentului electric datorată tiramului $\Delta I = I_0 - I_1$. Se corelează cu concentrația de tiram din proba de analizat.

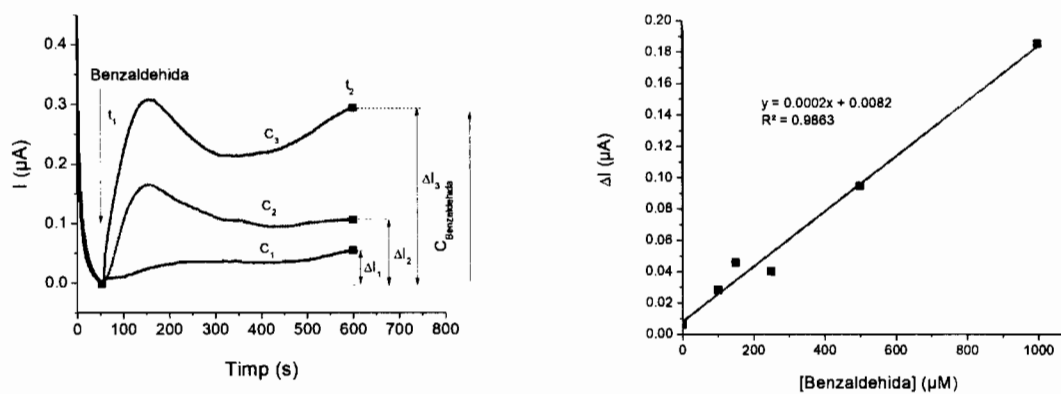


Figura 2. (A) Principiul metodei de detectie prin cronoamperometrie a benzalhidei folosind F-AIDH si un electrod de grafit modificat cu nanofibre de carbon si Meldola Blue. (B) Curba de calibrare obtinuta la determinarea cronoamperometrica a benzalhidei F-AIDH si electrod cu nanofibre de carbon si Meldola Blue.

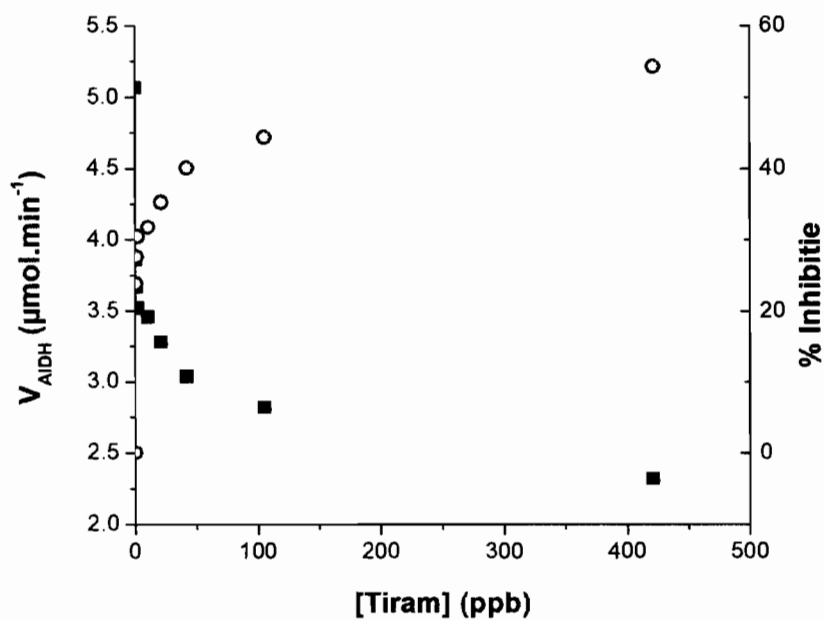


Figura 3. Variatia activitatii enzimatice a aldehyd dehidrogenazei in prezenta tiramului determinata spectrofotometric, folosind benzaldehida ca substrat enzimatic (stanga, patrat albastru) si respectiv variatia % de inhibitie a AIDH de catre tiram in functie de concentratia de fungicid (dreapta, cerc rosu).

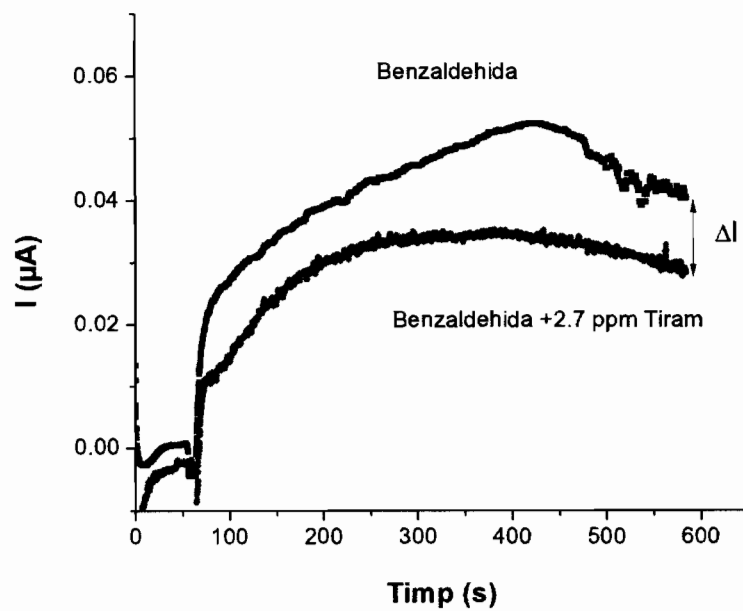


Figura 4. Semnale analitice inregistrate prin cronoamperometrie la determinarea tiramului. Scaderea semnalului analitic dupa incubarea F-AIDH cu tiram este corelata cu concentratia de tiram din proba de analizat. Benzaldehida (concentratie finala $53 \mu\text{M}$) este folosita in aceste masuratori ca substrat al F-AIDH.