

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902089700A1

Publication Date

20140405

Applicant

H & D S.R.L.

Title

METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE OSSIDANTE DEGLI
IDROPEROSSIDI PLASMATICI

Deposito della domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

“METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE OSSIDANTE DEGLI IDROPEROSSIDI PLASMATICI”

Campo dell'invenzione

La presente invenzione concerne un metodo per la determinazione degli idroperossidi plasmatici che rappresentano le principali molecole ossidate dell'organismo e quindi l'espressione indiretta più efficiente dello stress ossidativo (SO) rispetto a tutti gli altri indici in uso, vantaggiosamente offrendo rapidità di valutazione ed un ridotto coefficiente di variazione (CV).

Stato della tecnica

Negli organismi aerobi l'impiego di ossigeno (O_2) è una necessità fondamentale ai fini della normale funzionalità cellulare, la quale si svolge in un'alternanza continua e vitale di processi di ossidazione e riduzione. Il processo di ossidazione è possibile, come noto, anche senza la presenza di O_2 in quanto si basa sulla sottrazione di uno o più elettroni (e^-) a qualsiasi elemento o composto dell'organismo. Comunque provocato, con o senza O_2 , tale evento determina una modificazione della corteccia elettronica del composto o elemento tale da tradursi essenzialmente in una sua diversa reattività o funzione.

Lo SO può essere generato anche da specie reattive (o RS) che non sono "centrate" sull' O_2 , ma su altri elementi, quali prevalentemente l'azoto (N), il carbonio (C) e lo zolfo (S). Anche queste specie hanno la capacità di ossidare dei substrati con efficienza simile a quella dei ROS (specie reattive all'ossigeno). Una particolare menzione si deve fare per il monossido di azoto (NO^*) il quale è attivamente sintetizzato da diversi sistemi cellulari (in particolare dalle cellule endoteliali) denominati NO-sintetasi o NOS per svolgere una funzione vasodilatatrice, antiaggregante ed anche di trasduzione. Si può notare come esso contenga ossigeno e quindi potrebbe configurarsi come una ROS. La pericolosità potenziale di NO^* risiede nella sua capacità di reagire con O_2^* a formare $ONOO^-$, il quale, oltre ad essere un più potente ossidante, tende a trasformarsi in OH^* , che è in assoluto l'ossidante più reattivo dell'organismo. Ogni molecola biologica (proteine, lipidi, acidi nucleici, vitamine antiossidanti, etc.), una volta ossidata, ha

la capacità di ossidare a sua volta dei substrati comportandosi come RS. Tra queste RS sono di particolare importanza gli idroperossidi di natura lipidica (ma non solo) i quali, una volta ossidati, innescano il processo di propagazione ossidativa, operando da moltiplicatori dello SO.

Essenzialmente, tutte le RS si comportano in modo chimicamente simile e sostanzialmente perdono la funzionalità fisiologica e diventano ossidanti alla stessa stregua dei ROS (Tabella 1 seguente). Gli idroperossidi organici riportati nella Tabella 1 come ROOH si riferiscono a tutti i composti che sono stati combinati con una molecola di O₂ e i più frequenti sono dei derivati lipidici, ma anche proteici, saccaridici o acidi nucleici. Pertanto, 'R' indica diverse tipologie di composti. Questi idroperossidi hanno la tendenza a reagire con i metalli di transizione (vedi di seguito "reazione di Fenton") assumendo la forma radicalica (RO• oppure ROO•), pertanto hanno notevole potenzialità ossidante.

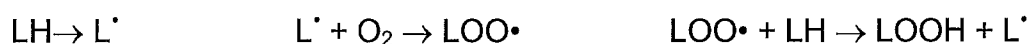
Tabella 1. Alcuni tra i principali agenti ad azione ossidante per l'organismo umano, definiti in generale come specie reattive (RS) e suddivisi a seconda dell'elemento rappresentativo

Specie reattive dell'ossigeno (ROS)			
Specie di natura radicalica	Formula	Specie di natura non radicalica	Formula
Ossigeno	O ₂ •	Ossigeno singoletto	Δ o ΣO ₂
Superoossido	O ₂ • ⁻	Perossido di idrogeno	H ₂ O ₂
Idrossile	OH•	Ozono	O ₃
Idroperossile	HO ₂ •	Acido ipoclorico ^a	HOCl
Percossile	RO ₂ •	Acido ipobromoso	HOBr
Alcossile	RO•	Idroperossidi organici	ROOH
Carbonato	CO ₃ • ⁻	Ione perossinitrito	ONOO ⁻
Diossido di carbonio	CO ₂ • ⁻	Acido perossinitroso ^a	ONOOH
Specie reattive del cloro (RCIS)			
Cloro atomico	Cl•	Cloruro di nitrile	NO ₂ Cl
Acido ipoclorico ^a	HOCl	Cloro	Cl ₂
Clorammine	RNHCl		
Specie reattive dell'azoto (RNS)			
Ossido d'azoto o nitrico	NO•	Acido nitroso	HNO ₂
Diossido di azoto	NO ₂ •	Acido perossinitroso ^a	ONOOH

Alchilperossinitriti	ROONO	Ione perossinitrito ^a	ONOO ⁻
Cloruro di nitrile	NO ₂ Cl		

^aAlcune specie reattive sono inserite in più di una categoria poiché alcuni attribuiscono il ruolo centrale a elementi diversi del composto. Il puntino in alto a destra (a volte a sinistra) indica la natura di radicale.

Una caratteristica particolare dei processi di ossidazione dei lipidi insaturi è la propagazione. In presenza di un ossidante (iniziatore), il lipide insaturo (LH) forma un alchilradicale (L[•]) e poi in presenza di O₂ si forma un perossilradicale (LOO[•]) che propaga la reazione ossidativa come segue:



Questo fenomeno comunque è possibile anche per proteine, acidi nucleici, glucidi. Tali sostanze una volta ossidate alla condizione di radicali, se entrano in contatto con altri composti simili o diversi, trasferiscono la loro condizione ossidativa nel fenomeno di propagazione per il quale si genera una cascata ossidativa, appunto 'propagazione', la quale può essere interrotta dagli antiossidanti liposolubili (detti "chain breakers") i cui prototipi sono la vitamina E ed i carotenoidi.

Una volta che si sono formati gli idroperossidi, il loro successivo decadimento a specie reattive a basso peso molecolare, quali malonildialdeide (MDA) e 4-idrossinonenale (4-HNE), è impedito dalla barriera antiossidante, in particolare dai cosiddetti antiossidanti circolanti, dei quali l'acido ascorbico è il principale protagonista.

Il fenomeno di propagazione è ovviamente dannoso per le membrane cellulari interne ed esterne, ma in particolare per le lipoproteine che sostanzialmente sono delle membrane fosfolipidiche circolanti.

Le lipoproteine essendo circolanti possono trasferire con estrema facilità alle cellule endoteliali (ed in generale a tutti i loro recettori) la condizione ossidativa.

Come accennato, anche le proteine ossidate possono svolgere un ruolo propagativo, il quale sostanzialmente è indirizzato a ripercuotersi sui glicerofosfolipidi (PL), che appartengono sia alle strutture circolanti (cellule, piastrine, lipoproteine) sia alle strutture stanziali come le cellule endoteliali.

Pertanto, emerge ancora una volta l'importanza del ruolo degli idroperossidi come markers estremamente sensibili dello SO, precoci rispetto alle aldeidi reattive (MDA, acroleina, 4-HNE ecc.) che sono espressione della demolizione delle

macromolecole biologiche (lipidi, proteine, DNA ecc.) conseguente alla mancanza di "tamponamento antiossidante".

Da moltissimo tempo i ricercatori cercano di mettere a punto un metodo che possa consentire una valutazione della condizione di SO.

Il sistema ESR (electric spin resonance) che capta le specie reattive non è applicabile come test di routine per la complessità di determinazione.

L'uso di resine che catturano le ROS non è applicabile, in quanto queste dovrebbero essere somministrate, la qual cosa è possibile negli animali sperimentali, ma non nell'uomo a causa della loro tossicità.

Pertanto, per la valutazione dei ROS, i ricercatori si sono rivolti a sistemi di derivatizzazione che consentano la determinazione di sostanze endogene che sono state modificate dalla presenza di ROS (Tabella 2 seguente).

Tabella 2. Alcuni dei metodi principali utilizzati per la misurazione dello SO.

Tipo di metodo	Derivato
DNA	deossiribonucleico
SPC	Proteine carbonilate
LPH	Idroperossidi lipidici
TBARS	reattivi all'acido tiobarbitutico
LNO ₂	nitrolinoleati
MDA	malonildialdeide
4-HNE	4-idrossinonenale
IsoPs	F ₂ /D ₂ /E ₂ /isoprostani
NeuroPs	F ₃ /F ₄ isoprostani
H ₂ O ₂	Perossido di idrogeno
BH	Idrocarburi respiratori
ONOO ⁻ *	perossinitrito
PTN*	Alfa-fenil-N-tert-butiltirone
AHS*	Idrossilazione aromatica del salicilato

* metodi tipo "spin trap" che implicano la somministrazione di resine o sostanze potenzialmente molto tossiche

Molti di questi tests sono basati sull'uso di sostanze "spin trap" che non sono ammesse per uso umano. Altri metodi sono estremamente lunghi e dispendiosi quindi utilizzabili esclusivamente ai fini di ricerca, ma non per valutazioni di monitoraggio che implicano tests semplici e poco costosi.

Di fatto nella letteratura medica, i metodi più utilizzati riguardano l'analisi dei TBARS, della MDA, delle 4-HNE, degli isoprostani urinari (F2), delle proteine carbonilate, del DNA ossidato ed infine degli idroperossidi.

Ogni metodo ha le sue limitazioni: ad esempio l'analisi dei TBARS, della MDA e delle 4-HNE sono indicatori che emergono quando le riserve circolanti sono esaurite e pertanto non sono indicatori precoci. In altri termini, quando sono alterati si è chiaramente in uno stato patologico e quindi non consentono di fare diagnosi precoce.

L'analisi degli isoprostani, delle proteine carbonilate, del DNA e degli idroperossidi possono invece avere valenza precoce di diagnosi di malattia e si prestano anche al monitoraggio della condizione patologica segnalando con la loro dimensione (aumentata o ridotta) eventuali miglioramenti o peggioramenti.

Di fatto è quest'ultima condizione che serve per il monitoraggio della condizione clinica di una determinata malattia. Ovvero, è importante poter disporre di un test sensibile alle variazioni dello stato patologico.

La dimensione dello SO, comunque misurata, non consente di fare diagnosi sul tipo di patologia, ma serve per dare una dimensione dello "stato di gravità" della malattia.

Per questi motivi diventa importante che un test sia caratterizzato da bassi coefficienti di variazione ovvero di limitate oscillazioni dei valori nei soggetti affetti da un grado di malattia simile.

In tali condizioni, il marker che si modifica in modo più omogeneo (ovvero con variazioni interindividuali più ridotte) si può ritenere quello più affidabile.

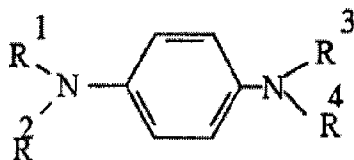
Questo tipo di esperienza è stata svolta mettendo a confronto i markers più utilizzati, ovvero isoprostani, proteine carbonilate, DNA ossidato e idroperossidi controllando le loro modificazioni a confronto con un indice di infiammazione, la proteina C reattiva.

Da questa esperienza [Cornelli U, Belcaro G, Finco A. The oxidative stress balance measured with different markers, following a single oral antioxidant supplement or a diet poor of antioxidants. JCDA 2011;1:64-70], è emerso che gli idroperossidi sono i primi ad essere modificati e sono quelli con variazioni interindividuali più limitate.

In tal senso, esiste in commercio il test denominato 'd-ROMs', come da brevetto europeo EP0783692, che si basa sulla radicalizzazione degli idroperossidi ematici da parte del Fe^{2+} attraverso la reazione di Fenton. Nella reazione di Fenton, sia il Fe^{2+} sia il Fe^{3+} reagiscono secondo un andamento ciclico, il Fe^{2+} risulta essere però sempre la prima specie a reagire attraverso uno step più rapido rispetto al Fe^{3+} , come segue:

Reazione di Fenton	
$(1) \text{Fe}^{2+} + \text{ROOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{RO}\cdot + \text{OH}^-$	VELOCE
$(2) \text{Fe}^{3+} + \text{ROOH} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{ROO}\cdot + \text{H}^+$	LENTA

In tale test, i radicali che si formano attraverso la reazione di Fenton tra Fe^{2+} e idroperossidi reagiscono con un cromoforo di formula:



dove R^1 , R^2 , R^3 ed R^4 possono essere H, CH_3^- , C_2H_5^- oppure alogenuro; tale cromoforo si radicalizza a sua volta ed assume colorazione in proporzione alla concentrazione di radicali, che può essere rilevata fotometricamente a 505 nm. Tale reazione impiega non meno di 5 minuti.

Lo scopo della presente invenzione è migliorare il test di cui sopra, in particolare in termini di rapidità di ottenimento dell'esito, precisione, accuratezza, ripetibilità e specificità nella determinazione del potere ossidativo e del livello degli idroperossidi nel plasma.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Tale scopo è stato raggiunto mediante un metodo per la determinazione del potere ossidante degli idroperossidi plasmatici, come riportato in rivendicazione 1.

Sotto un altro aspetto, la presente invenzione concerne un kit per l'implementazione del metodo di cui sopra come da rivendicazione 10.

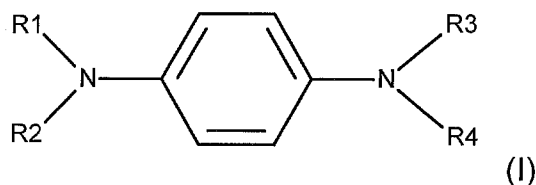
DESCRIZIONE DELLA FIGURA

Le caratteristiche ed i vantaggi della presente invenzione saranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata, dagli Esempi realizzativi forniti a titolo illustrativo e non limitativo ed all'annessa Figura 1 in cui è riportata la cinetica delle reazioni alla base del metodo dell'invenzione e del d-ROMs (media di 3 determinazioni su campione di plasma umano), come da Esempio 6.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'invenzione dunque riguarda un metodo per la determinazione del potere ossidante degli idroperossidi plasmatici comprendente le fasi di:

- i) fornire una soluzione A acquosa comprendente acido solforico ed un agente cromoforo di formula (I)



o suo sale, dove R^1 , R^2 , R^3 ed R^4 sono, indipendentemente l'uno dall'altro, H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ oppure alogenuro;

- ii) fornire una soluzione B acquosa comprendente acido acetico, idrossido di metallo alcalino o alcalino-terroso, sale di Fe(II) ed ioduro;

- iii) fornire un campione di plasma;

- iv) unire la soluzione A, la soluzione B ed il campione e misurare l'assorbanza della miscela risultante a t_0 e a t_1 , in cui t_0 è da 1 a 3 secondi e t_1 è da 1,50 a 2,30 minuti dalla preparazione della miscela; e

- v) sottrarre l'assorbanza a t_0 dall'assorbanza a t_1 , ottenendo il valore del potere ossidante degli idroperossidi nel campione in esame in termini di concentrazione di equivalenti di H_2O_2 , secondo la legge di Lambert-Beer.

In riferimento alla reazione di Fenton sopra citata, nel presente metodo dell'invenzione, è solo la specie Fe^{2+} a reagire velocemente con gli idroperossidi (ROOH) e di conseguenza è la specie responsabile della riduzione dei tempi di

reazione. Quest'ultimo obiettivo è stato raggiunto aggiungendo un opportuno agente riducente, ossia lo ioduro, alla miscela del metodo dell'invenzione. Lo ioduro, reagendo rapidamente con il Fe^{3+} , porta alla formazione di Fe^{2+} , senza interagire direttamente con la componente idroperossidica in soluzione. La reazione di Fenton modificata secondo il metodo dell'invenzione è riportata di seguito:

Reazione di Fenton modificata secondo il metodo dell'invenzione	
$(1) \text{Fe}^{2+} + \text{ROOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{RO}\cdot + \text{OH}^-$	VELOCE
$(2) \text{Fe}^{3+} + \text{RED} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{ROO}\cdot + \text{H}^+$	VELOCE

In tali condizioni operative, la concentrazione di Fe^{2+} è controllata e costante nella reazione; ciò permette di evitare la diminuzione della velocità di reazione dovuta alla riduzione della concentrazione del reagente coinvolto nella reazione limitante la velocità di reazione. Infatti, lo ioduro, reagendo rapidamente con il Fe^{3+} porta alla formazione di Fe^{2+} , senza interagire direttamente con la componente idroperossidica in soluzione. Questo effetto è significativo quando reagiscono grosse quantità di Fe^{2+} segnatamente quindi a valori elevati di U.Carr. L'effetto ottenuto quindi è duplice: da un lato consente di ottenere un aumento della velocità di reazione proporzionale all'aumento della quantità di Fe^{2+} , mentre dall'altro consente di estendere l'intervallo di linearità verso l'alto. Un altro effetto inaspettatamente riscontrato è stata la significativa diminuzione del coefficiente di variazione relativo a ai replicati analitici quando sono eseguite un numero di prove pari o superiori a 5.

L'accelerazione e la stabilizzazione di tale reazione è stata quindi sorprendentemente raggiunta mediante un'opportuna combinazione di reagenti come sopra riportato. Tale combinazione consente la piena utilizzazione del Fe^{2+} nella reazione con il cromoforo, che, come detto, si radicalizza a sua volta ed assume colorazione in proporzione alla concentrazione di radicali, che può essere rilevata fotometricamente a 505 nm, e consente l'eliminazione di alcuni passaggi manuali. Tale obiettivo è stato raggiunto mediante l'aggiunta di un agente stabilizzante dello stato di ossidazione del ferro, ossia lo ioduro. Tali reagenti hanno sorprendentemente consentito di ridurre i tempi di esecuzione del test, in

quanto la reazione modificata si svolge nel tempo di 2 minuti invece degli almeno 5 minuti necessari per ottenere il medesimo risultato con il test noto, quindi vantaggiosamente con una riduzione percentuale di tempo del 60%.

Inoltre, il metodo dell'invenzione ha portato ad ottenere un intervallo di linearità più esteso 50 – 600 U.Carr, dove le U.Carr. rappresentano un metodo per il calcolo del potere ossidante plasmatico (concentrazione ematica di idroperossidi), dove 1 U.Carr corrisponde a 0.08 mg/dL di H₂O₂.

In aggiunta, l'invenzione vantaggiosamente consente di impiegare una soluzione di siero di controllo come campione "standard" per il controllo di qualità dei reagenti.

Secondo una forma di realizzazione preferita, il cromoforo è fornito in forma condensata, dove per 'condensata' si intende che la soluzione acquosa in cui è disciolto il cromoforo è lasciata evaporare fino a secchezza. Ciò consente vantaggiosamente una maggiore stabilità e la riduzione drastica dei passaggi manuali, invece previsti dal test noto.

Preferibilmente, detto agente cromoforo è p-N,N-dietilfenilendiammina o suo sale. Adatti sali del cromoforo sono solfato, ossalato, fumarato, cloruro, fosfato, nitrato e loro miscela.

Adatti sali di Fe(II) sono cloruro, clorato, ammonio solfato, solfato, solfuro, fosfato, nitrato, acetato, succinato, fumarato, gluconato, lattato e loro miscela. Preferibilmente, detto sale di Fe(II) è solfato.

Adatto ioduro è ioduro di potassio, ioduro di sodio, ioduro di calcio e ioduro di magnesio e loro miscela. Preferibilmente, detto ioduro è ioduro di potassio.

Preferibilmente, detto idrossido di metallo alcalino o alcalino-terroso è idrossido di potassio, sodio, calcio, magnesio o loro miscela.

In dette soluzioni acquose, il solvente è acqua, preferibilmente demineralizzata o deionizzata.

Preferibilmente, detto cromoforo è in concentrazione da 0,19 a 0,57 mol/l nella soluzione A acquosa, più preferibilmente da 0,30 a 0,45 mol/l. Preferibilmente, detto cromoforo è in concentrazione da 0,0072 a 0,22 mol/l nella miscela risultante nella fase iv).

Preferibilmente, l'acido solforico è in concentrazione da 0,17 a 0,53 mol/l nella

soluzione A acquosa, più preferibilmente da 0,20 a 0,40 mol/l. Preferibilmente, l'acido solforico è in concentrazione da 0,0064 a 0,20 mol/l nella miscela risultante nella fase iv).

Preferibilmente, il Fe(II) è in concentrazione da 0,00035 a 0,029 mol/l nella soluzione B acquosa, più preferibilmente da 0,001 a 0,01 mol/l. Preferibilmente, il Fe(II) è in concentrazione da 0,00033 a 0,027 mol/l nella miscela risultante nella fase iv).

Preferibilmente, lo ioduro è in concentrazione da 0,00018 a 0,027 mol/l nella soluzione B acquosa, più preferibilmente da 0,001 a 0,01 mol/l. Preferibilmente, lo ioduro è in concentrazione da 0,00017 a 0,026 mol/l nella miscela risultante nella fase iv).

Preferibilmente, l'acido acetico è in concentrazione da 0,17 a 0,35 mol/l nella soluzione B acquosa, più preferibilmente da 0,20 a 0,30 mol/l. Preferibilmente, l'acido acetico è in concentrazione da 0,16 a 0,33 mol/l nella miscela risultante nella fase iv).

Secondo una forma di realizzazione preferita, nella soluzione A acquosa detto cromoforo è in concentrazione da 0,19 a 0,57 mol/l, l'acido solforico è in concentrazione da 0,17 a 0,53 mol/l, e nella soluzione B acquosa il Fe(II) è in concentrazione da 0,00035 a 0,029 mol/l, lo ioduro è in concentrazione da 0,00018 a 0,027 mol/l, e l'acido acetico è in concentrazione da 0,17 a 0,35 mol/l.

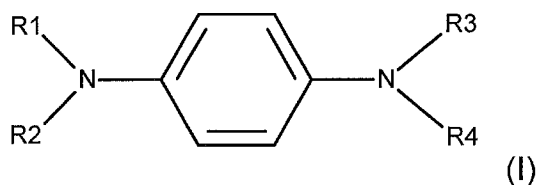
Secondo una forma di realizzazione preferita, la soluzione A acquosa comprende acqua, p-N,N-dietilfenilendiammina o suo sale in concentrazione di 0,3797 mol/l, acido solforico in concentrazione di 0,3526-0,3637 mol/l sul peso della soluzione A, e la soluzione B acquosa comprende acqua, Fe(II) in concentrazione di 0,2601 mol/l, ioduro in concentrazione di 0,0090 mol/l, acido acetico in concentrazione di 0,015 mol/l, ed idrossido di sodio in concentrazione di 0,1875 mol/l, sul peso della soluzione B.

Risulta altresì preferita la forma di realizzazione in cui la soluzione A acquosa comprende acqua, p-N,N-dietilfenilendiammina o suo sale in quantità di 2-6 mg, acido solforico in quantità di 0,4-1,2 ml, e la soluzione B acquosa comprende acqua, Fe(II) in quantità di 0,1-8 µl, ioduro in quantità di 0,1-1,5 µl, acido acetico in quantità di 0,01-0,02 ml, ed idrossido di sodio in quantità di 5-8 mg.

Ulteriormente preferita è la forma di realizzazione in cui la soluzione A acquosa comprende acqua, p-N,N-dietilfenilendiammina o suo sale in quantità di 4 mg, acido solforico in quantità di 0,8 ml, e la soluzione B acquosa comprende acqua, Fe(II) in quantità di 0,5 µl, ioduro in quantità di 0,5 µl, acido acetico in quantità di 0,015 ml, ed idrossido di sodio in quantità di 7,5 mg.

Preferibilmente, il metodo dell'invenzione impiega 10 µl di campione di plasma, 40 µl di soluzione A acquosa, e 1000 µl di soluzione B acquosa.

Secondo un'altra forma di realizzazione, la soluzione A acquosa consiste in acqua, acido solforico ed un agente cromoforo di formula (I)

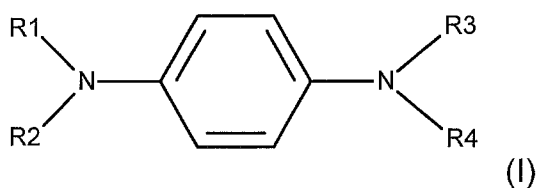


o suo sale, dove R^1 , R^2 , R^3 ed R^4 sono, indipendentemente l'uno dall'altro, H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ oppure alogenuro; e

la soluzione B acquosa consiste in acqua, acido acetico, idrossido di metallo alcalino o alcalino-terroso, sale di Fe(II) ed ioduro.

Sotto un altro aspetto, la presente invenzione concerne un kit per l'implementazione del metodo di cui sopra, comprendente:

a) almeno un contenitore comprendente un agente cromoforo di formula (I)



o suo sale, dove R^1 , R^2 , R^3 ed R^4 sono, indipendentemente l'uno dall'altro, H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ oppure alogenuro,

b) almeno un contenitore comprendente sale di Fe(II) ed ioduro; ed

c) un foglietto illustrativo comprendente le istruzioni per l'effettuazione della determinazione del potere ossidante degli idroperossidi.

Preferibilmente, detto cromoforo è presente nel contenitore a) del kit in forma condensata.

È da intendersi che tutti gli aspetti identificati come preferiti e vantaggiosi per il

metodo dell'invenzione, sono da ritenersi analogamente preferiti e vantaggiosi anche per il kit per l'implementazione dello stesso.

Si riportano di seguito Esempi di realizzazione della presente invenzione forniti a titolo illustrativo e non limitativo.

ESEMPI

Esempio 1. Metodo per la determinazione della concentrazione plasmatica di idroperossidi secondo la presente invenzione a confronto con il test d-ROMs noto

I reagenti che sono stati preparati secondo il metodo della presente invenzione sono riportati di seguito:

	Reagenti dell'invenzione	Concentrazione [moli/l]	Quantità	Volume
Campione di plasma				10 µl
Soluzione (1)	p-N,N-dietilfenilendiammina condensata	0,3797	4 mg	40 µl
	Acido solforico (95-98%)	0,3526-0,3637	0.8 mL	
	Acqua demineralizzata		q.b. a volume	
Soluzione (2)	Acido acetico	0,2601	0.015 mL	1000 µl
	NaOH	0,1875	7.5 mg	
	Ferro (II)	0,0018	5 µL	
	Ioduro	0,0090	0.05 µL	
	Acqua demineralizzata		q.b. a volume	
Totale				1050 µl

La soluzione acida di ammina (1) era introdotta in una cuvetta per l'analisi spettrofotometrica UV-Vis. Tale cuvetta era già preparata con una massa pari a 40µl di p-NN-dietilfenilendiammina in precedenza condensata (parte del processo produttivo) per evaporazione. Successivamente, era aggiunto nella soluzione (2) il campione biologico con un volume pari a 10µl. La soluzione così formata era introdotta nella cuvetta contenente la soluzione (1), generando così la colorazione da trasparente a rosa, la cui intensità era proporzionale alla presenza di idroperossidi che avevano reagito con l'ammina. La lettura dell'assorbanza veniva effettuata allo spettrofotometro dopo 2 secondi e successivamente dopo 2 minuti utilizzando una lunghezza d'onda pari a 505 nm.

La differenza tra la seconda e la prima lettura di assorbanza consente, mediante la legge di Lambert-Beer, di ricavare la concentrazione in termini di U.Carr. (dove 1 U.Carr. corrisponde a 0.08 mg/dL di H₂O₂ in soluzione acquosa), impiegata come standard di riferimento e quindi del potere ossidante del campione in esame secondo il seguente algoritmo:

$$Y = [(\log S_1 - \log S_2) * \frac{Kf_1}{2} * \frac{Kf+10}{20}]$$

dove S₁= segnale ottico 1° misura; S₂= segnale ottico 2° misura

Kf₁= K factor interno pari a 13000; Kf= Kfactor del kit

Per rendere il più possibile significativo il confronto con il test d-ROMs noto, sono stati selezionati i seguenti reagenti, in cui il Fe(II) è nella quantità indicata dal test d-ROMs stesso:

	Reagenti secondo il test d-ROMs	Quantità	Volume
Campione di plasma			10 µl
Soluzione (1)	p-N,N-dietilfenilendiammina	4 mg	40 µl
	Acido solforico (95-98%)	0.8 mL	
Soluzione (2)	Acido acetico	0.015 mL	1000 µl
	NaOH	7.5 mg	
	Ferro (II)	0.05 µL	
Totale			1050 µl

I campioni di plasma umano analizzati confrontando il test d-ROMs ed il metodo dell'invenzione sono riportati nella Tabella 3 seguente, utilizzando sempre lo stesso campione per 10 determinazioni in sequenza:

Tabella 3.

Prova	d-ROMs	Metodo dell'invenzione
1	235	238
2	245	250
3	238	246
4	267	235
5	244	245

6	245	239
7	241	245
8	242	250
9	229	242
10	242	237
M	242,8	242,7
Ds	9,86	5,33

Si può osservare come i valori medi siano identici nelle due serie di determinazioni mentre i coefficienti di variazione (CV) siano inferiori del 45 % nel metodo dell'invenzione rispetto al test d-ROMs. Si ritiene che la riduzione della varianza sia dovuta all'impiego del cromogeno condensato che riduce possibili errori di manualità nel dosaggio del cromogeno che nel metodo originale avveniva attraverso l'aggiunta manuale di una "goccia" di reattivo la cui entità poteva oscillare tra 35 e 45 μL .

Esempio 2. Metodo dell'invenzione su siero ricostituito

È stato anche impiegato un siero di controllo bifasico (siero in polvere e acqua demineralizzata), in ragione del suo contenuto noto in idroperossidi e soprattutto della sua stabilità a lungo termine in soluzione acquosa una volta ricostituito, si è ritenuto potesse essere lo standard di riferimento per il metodo dell'invenzione. In altri termini, il siero di controllo può essere utilizzato per testare l'esattezza della misurazione del contenuto in idroperossidi di un campione biologico.

Allo scopo erano effettuate 10 prove consecutive, utilizzando 10 μL di siero di controllo ricostituito secondo metodica standard e aggiunti alla soluzione di reazione del metodo dell'invenzione.

Il valore medio di riferimento atteso era di $150 \pm 10\%$ U.Carr. e il valore medio ottenuto con il metodo dell'infezione era di $161 \pm 6\%$ U.Carr.

Pertanto, in confronto al metodo standard si osserva che con il metodo oggetto dell'invenzione si confermava ancora una riduzione del CV. Circa la differenza media osservata (161 Vs 150), il metodo dell'invenzione è nel range di variazione del metodo standard che tuttavia, come accennato in precedenza, ha una più limitata precisione nella misura, in ragione della misura non precisa del cromogeno

la cui quantità poteva oscillare tra 35 e 45 µL.

Esempio 3. Linearità del metodo della presente invenzione

Lo scopo dell'Esempio era dimostrare la linearità del metodo dell'invenzione tra i valori 50 e 600 U.Carr.. Le letture venivano effettuate per via fotometrica a lunghezza d'onda fissa di 505 nm, secondo la procedura del metodo dell'invenzione in presenza descritto.

Per sviluppare la curva di taratura sono stati utilizzati sia campioni di siero di controllo (plasma liofilizzato) sia campioni di plasma da pazienti sani.

L'impiego di due diversi tipi di plasma ha permesso di determinare una perfetta corrispondenza dei valori indipendentemente dal tipo di campione usato (liofilizzato o fresco).

Il siero di controllo è stato fortificato con soluzioni a concentrazione nota di t-butil-idroperossido (t-BHP), usato come fonte di idroperossidi. Sono state preparate differenti soluzioni di t-BHP, ottenute diluendo (1:4; 1:5; 1:10; 1:25) con acqua demineralizzata una soluzione di t-BHP concentrata (0.039 moli/L). Sono state preparate 3 diverse soluzioni stock di t-BHP.

Le determinazioni erano svolte in numero di 3 per ciascuna diluizione di ogni soluzione di t-BHP, operando la misura con successioni diverse (concentrazioni crescenti e decrescenti) (Tabella 4). Tutte le misure erano effettuate a temperatura controllata (25°C).

Tabella 4. Linearità d-ROMs fast con siero di controllo + tBHP

Campioni		mmol/L di tBHP aggiunto	U.Carr.
Siero controllo	t-BHP		
5 µl	0	0	74
5 µl	10 µl dil 1:4	9,75	430
5 µl	10 µl dil 1:5	7,8	372
5 µl	10 µl dil 1:10	3,9	202
5 µl	10 µl dil 1:25	1,56	110

Come si può osservare dalla disamina dei dati riportati in Tabella 4, la curva di taratura è perfettamente lineare, sino a valori di 400 U.Carr. ($y=38,229x+61,672$;

$R^2=0,9947$).

Il plasma umano è stato anch'esso fortificato con soluzioni a concentrazione nota di t-butil-idroperossido (t-BHP), usato come fonte di idroperossidi. Sono state preparate differenti soluzioni di t-BHP, ottenute diluendo (1:4; 1:5; 1:10; 1:25) con acqua demineralizzata una soluzione di t-BHP concentrata (0.039 mol/L).

Sono state preparate 3 diverse soluzioni stock di t-BHP. Le determinazioni erano svolte in numero di 3 per ciascuna diluizione di ogni soluzione di t-BHP, operando la misura con successioni diverse (concentrazioni crescenti e decrescenti) (Tabella 5). Tutte le misure erano effettuate a temperatura controllata (25°C).

Come si può osservare dalla disamina dei dati riportati in Tabella 5, la curva di taratura è perfettamente lineare, sino a valori di 580 U.Carr. ($y=38,855x+207,39$; $R^2=0,9951$).

Tabella 5. Linearità del metodo dell'invenzione con plasma umano + tBHP

Campioni		mmol/L di tBHP aggiunto	U.Carr.
Plasma umano	t-BHP		
10 µl	0	0	222
10 µl	10 µl dil 1:4	9,75	586
10 µl	10 µl dil 1:5	7,8	517
10 µl	10 µl dil 1:10	3,9	352
10 µl	10 µl dil 1:25	1,56	254

Al fine di confermare i dati di linearità del metodo dell'invenzione è stato eseguito un terzo esperimento. In tale prova, si sono modificati i volumi di siero di controllo (a concentrazione nota) aggiunti alla miscela di reazione. I volumi impiegati sono stati di 5 µl, 10 µl, 20 µl e 30 µl di siero di controllo ricostituito il cui valore di riferimento per 20 µl pari a 300 ± 10 % U.Carr.. Le prove sono state effettuate in numero di 5 per ogni volume impiegato (Tabella 6). Questa prova ha consentito di confermare le prestazioni del metodo sia in termini di linearità che di robustezza nei confronti del possibile effetto matrice dovuto al siero.

Tabella 6. Linearità del metodo dell'invenzione con siero di controllo aggiunto a diversi volumi (valore medio di 3 misure)

Volume di siero aggiunto	Valore Atteso U.Carr	Valore ottenuto U.Carr	$\Delta\%$
5 μ l	75	77	3%
10 μ l	150	147	4%
20 μ l	300	321	1%
30 μ l	450	465	2%

Come si può osservare dalla disamina dei dati riportati in Tabella 6, la curva di taratura è perfettamente lineare ($y=15,939x- 5,5085$; $R^2=0,9989$).

I dati ottenuti evidenziano un eguale comportamento del metodo dell'invenzione nei confronti sia di campioni standard di riferimento (siero di controllo) sia di campioni biologici (plasma umano). Ne risulta che l'impiego di siero di controllo e di plasma umano in esperimenti paralleli ha permesso di determinare la linearità del metodo dell'invenzione nel range 50-600 U.Carr. in quanto le rette di taratura ottenute presentavano la medesima pendenza (rispettivamente 38,855 per la retta con il siero di controllo e 38,855 per la retta con il plasma umano).

Esempio 4. La selezione dell'agente riducente adatto

La selezione dell'adatto agente riducente è stata condotta su numerosi composti per valutare la capacità di stabilizzare la maggiore quantità di specie Fe^{2+} , specie rilevante per il controllo della velocità della reazione. Infatti, l'agente riducente adatto, reagendo rapidamente con il Fe^{3+} , avrebbe indotto la formazione di Fe^{2+} , senza interagire direttamente con la componente idroperossidica in soluzione.

Tra i composti esaminati, si riportano i seguenti agenti riducenti:

- NH_2OH (idrossilammina);
- Na_2SO_3 (solfito di sodio);
- Na_2SO_4 (solfato di sodio); e
- KI (ioduro di potassio).

Tutti gli agenti riducenti sono stati aggiunti a concentrazioni identiche.

Dalle prove effettuate è emerso che sia l'idrossilammina sia i sali di zolfo interferiscono con la determinazione degli idroperossidi. L'idrossilammina, infatti, interferisce con l'andamento della reazione del metodo dell'invenzione favorendo reazioni secondarie e producendo composti colorati (gialli) che impediscono la lettura fotometrica alla lunghezza d'onda di 505 nm, inficiando la reazione

colorimetrica del metodo dell'invenzione. I sali di zolfo inducono invece una inibizione della reazione alla base del metodo dell'invenzione.

Sorprendentemente, lo ioduro si è mostrato essere l'unica tipologia di riducente che non interferiva con la successiva determinazione degli idroperossidi, ma, al contrario, riduceva i limiti di variabilità mantenendo i coefficienti di variazione tra 1% e 2% in confronto con la reazione svolta in assenza di ioduro che invece si quotava con CV 8 %. Sorprendentemente, è stata confermata l'assenza di interferenza del riducente ioduro con la reazione indipendentemente dalla quantità usata (Tabella 7).

Tabella 7. Effetto di differenti riducenti sulla reazione

	Segnale	CV%
	Valore atteso 150 U.Carr.	
controllo	153	8%
KI		
9 µmol/L	153	2%
45 µmol/L	154	1%
90 µmol/L	147	2 %
NH ₂ OH		
9 µmol/L	38	12%
Na ₂ SO ₃		
9 µmol/L	0	Nv
Na ₂ SO ₄		
9 µmol/L	0	Nv

Nv = non valutabile

Esempio 5. Confronto d-ROMs test e metodo dell'invenzione: valutazione su campione di siero di controllo e t-BHP a diversi tempi di reazione.

Questo esempio è stato effettuato per dimostrare che la diversa velocità di reazione del metodo dell'invenzione non modifica l'esattezza della determinazione degli idroperossidi in un campione di siero di controllo a concentrazione nota.

Il plasma umano è stato fortificato con soluzioni a concentrazione nota di t-butil-idroperossido (t-BHP), usato come fonte di idroperossidi. Sono state preparate

differenti soluzioni di t-BHP, ottenute diluendo (1:2; 1:5; 1:10) con acqua demineralizzata una soluzione di t-BHP concentrata (0.039 moli/L). Sono state preparate 3 diverse soluzioni stock di t-BHP.

Le determinazioni erano svolte in numero di 3 per ciascuna diluizione di ogni soluzione di t-BHP, operando la misura con successioni diverse (concentrazioni crescenti e decrescenti) (Tabella 8). Tutte le misure erano effettuate a temperatura controllata (25°C). L'esperienza ha permesso di valutare la corrispondenza dei valori ottenuti con il metodo dell'invenzione a confronto del d-ROMs test, per il quale la reazione impiega 5 minuti.

Tabella 8. Confronto d-ROMs test e metodo dell'invenzione

Campioni		mmol/L tBHP aggiunto	d-ROMs U.Carr.	Metodo dell'invenzione U.Carr.	CV %
Plasma umano	t-BHP				
10 µl	0	0	277	280	1
10 µl	10 µl dil 1:2	9,75	1044	967	5
10 µl	10 µl dil 1:5	7,8	605	534	9
10 µl	10 µl dil 1:10	3,9	448	388	8

Come si poteva osservare dalla disamina dei dati riportati in Tabella 8, i valori ottenuti con i due test presentano coefficienti di variazione tra l'1 e il 9%.

Esempio 6. Cinetica di reazione d-ROMs e metodo dell'invenzione

Al fine di confermare ulteriormente che la velocità di reazione maggiore del metodo dell'invenzione rispetto al d-ROMs test non inficia la determinazione degli idroperossidi, sono state effettuate prove di cinetica (valutazione ogni 15 secondi per 3 minuti) utilizzando un siero di controllo e in 3 diversi campioni biologici (plasma umano).

Le determinazioni erano svolte in numero di 3 per ciascun campione in esame ed hanno restituito lo stesso andamento, seppur con valori di idroperossidi ovviamente diversi, trattandosi di campioni diversi. Tutte le misure erano effettuate a temperatura controllata (25°C). L'esperienza ha permesso di valutare la corrispondenza dei valori ottenuti con il metodo dell'invenzione a confronto del d-ROMs test, per il quale la reazione impiega 5 minuti. Il contenuto in idroperossidi

ottenuto con il metodo dell'invenzione nel tempo di 2 minuti è lo stesso che viene evidenziato con il d-ROMs nel tempo di 5 minuti. La Figura 1 riporta l'andamento delle due reazioni (metodo dell'invenzione e d-ROMs) in funzione del tempo su campione di plasma umano.

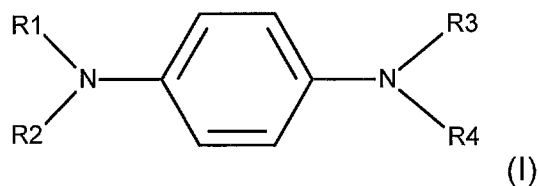
***** **

Dalla descrizione dettagliata e dagli Esempi sopra riportati, risultano evidenti i vantaggi conseguiti mediante il metodo secondo la presente invenzione. In particolare, detto metodo consente di accelerare e stabilizzare la reazione di Fenton mediante l'opportuna combinazione di reagenti come sopra riportato. Tale combinazione consente la piena utilizzazione del Fe^{2+} nella reazione con il cromoforo consente di eliminare alcuni passaggi manuali. Tali reagenti hanno sorprendentemente consentito di ridurre i tempi di esecuzione del test, in quanto la reazione modificata si svolge nel tempo di 2 minuti invece degli almeno 5 minuti necessari per ottenere il medesimo risultato con il test noto. Inoltre, il metodo dell'invenzione ha portato ad ottenere un intervallo di linearità più esteso 50 – 600 U.Carr. In aggiunta, l'invenzione vantaggiosamente consente di impiegare una soluzione di siero di controllo come campione "standard" per il controllo di qualità dei reagenti.

Rivendicazioni

1. Metodo per la determinazione del potere ossidante degli idroperossidi plasmatici comprendente le fasi di:

i) fornire una soluzione A acquosa comprendente acido solforico ed un agente cromoforo di formula (I)



o suo sale, dove R^1 , R^2 , R^3 ed R^4 sono, indipendentemente l'uno dall'altro, H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ oppure alogenuro;

ii) fornire una soluzione B acquosa comprendente acido acetico, idrossido di metallo alcalino o alcalino-terroso, sale di Fe(II) ed ioduro;

iii) fornire un campione di plasma;

iv) unire la soluzione A, la soluzione B ed il campione e misurare l'assorbanza della miscela risultante a t_0 e a t_1 , in cui t_0 è da 1 a 3 secondi e t_1 è da 1,50 a 2,30 minuti dalla preparazione della miscela; e

v) sottrarre l'assorbanza a t_0 dall'assorbanza a t_1 , ottenendo il valore del potere ossidante degli idroperossidi nel campione in esame in termini di concentrazione di equivalenti di H_2O_2 , secondo la legge di Lambert-Beer.

2. Il metodo di rivendicazione 1, in cui detto cromoforo è p-N,N-dietilfenilendiammina o suo sale.

3. Il metodo di rivendicazione 1 o 2, in cui detto ioduro è ioduro di potassio, ioduro di sodio, ioduro di calcio e ioduro di magnesio o loro miscela.

4. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui detto ioduro è in concentrazione da 0,00018 a 0,027 mol/l nella soluzione B acquosa, più preferibilmente da 0,001 a 0,01 mol/l.

5. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui detto cromoforo è in concentrazione da 0,19 a 0,57 mol/l nella soluzione A acquosa, più preferibilmente da 0,30 a 0,45 mol/l.

6. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui il Fe(II) è in concentrazione da 0,00035 a 0,029 mol/l nella soluzione B acquosa, più preferibilmente da 0,001 a 0,01 mol/l.

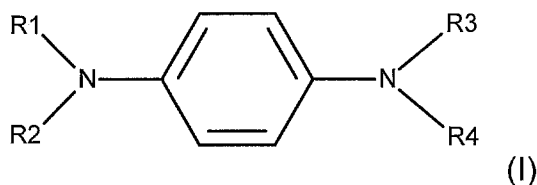
7. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in cui la soluzione A acquosa comprende acqua, p-N,N-dietilfenilendiammina o suo sale in concentrazione di 0,3797 mol/l, acido solforico in concentrazione di 0,3526-0,3637 mol/l sul peso della soluzione A, e la soluzione B acquosa comprende acqua, Fe(II) in concentrazione di 0,2601 mol/l, ioduro in concentrazione di 0,0090 mol/l, acido acetico in concentrazione di 0,015 mol/l, ed idrossido di sodio in concentrazione di 0,1875 mol/l, sul peso della soluzione B.

8. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui la soluzione A acquosa comprende acqua, p-N,N-dietilfenilendiammina o suo sale in quantità di 2-6 mg, acido solforico in quantità di 0,4-1,2 ml, e la soluzione B acquosa comprende acqua, Fe(II) in quantità di 0,1-8 µl, ioduro in quantità di 0,1-1,5 µl, acido acetico in quantità di 0,01-0,02 ml, ed idrossido di sodio in quantità di 5-8 mg.

9. Il metodo di rivendicazione 8, in cui la soluzione A acquosa comprende acqua, p-N,N-dietilfenilendiammina o suo sale in quantità di 4 mg, acido solforico in quantità di 0,8 ml, e la soluzione B acquosa comprende acqua, Fe(II) in quantità di 0,5 µl, ioduro in quantità di 0,5 µl, acido acetico in quantità di 0,015 ml, ed idrossido di sodio in quantità di 7,5 mg.

10. Kit per l'implementazione del metodo di rivendicazione 1, comprendente:

a) almeno un contenitore comprendente un agente cromoforo di formula (I)



o suo sale, dove R¹, R², R³ ed R⁴ sono, indipendentemente l'uno dall'altro, H, -CH₃, -C₂H₅ oppure alogenuro,

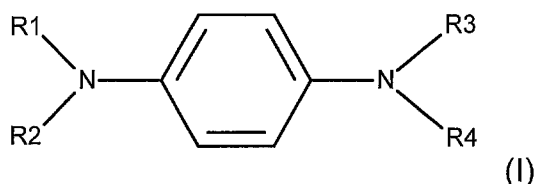
b) almeno un contenitore comprendente sale di Fe(II) ed ioduro; ed

c) un foglietto illustrativo comprendente le istruzioni per l'effettuazione della determinazione del potere ossidante degli idroperossidi.

CLAIMS

1. Method for determining the oxidizing power of plasma hydroperoxides comprising the steps of:

i) providing an aqueous solution A comprising sulphuric acid and a chromophore agent of formula (I):



or a salt thereof, wherein R^1 , R^2 , R^3 and R^4 are, independently of one another, H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ or halide;

ii) providing an aqueous solution B comprising acetic acid, alkali or alkaline-earth metal hydroxide, salt of Fe (II) and iodide;

iii) providing a plasma sample;

iv) reuniting the solution A, the solution B and the sample, and measuring the absorbance of the resulting mixture at t_0 and t_1 , wherein t_0 is 1 to 3 seconds and t_1 is 1,50 to 2,30 minutes from the preparation of said mixture; and

v) subtracting the absorbance at t_0 from the absorbance at t_1 , thus obtaining the oxidizing power value of the hydroperoxides in the plasma sample as a concentration of H_2O_2 equivalents, according to the Lambert-Beer's law.

2. The method of claim 1, wherein said chromophore agent is N,N-diethyl-p-phenylenediamine or a salt thereof.

3. The method of claim 1 or 2, wherein said iodide is potassium iodide, sodium iodide, calcium iodide, magnesium iodide or a mixture thereof.

4. The method of any one of claims 1-3, wherein said iodide is in a concentration of 0,00018 to 0,027 mol/l in the aqueous solution B, preferably of 0,001 to 0,01 mol/l.

5. The method of any one of claims 1-4, wherein said chromophore agent is in a concentration of 0,19 to 0,57 mol/l the aqueous solution A, preferably of 0,30 to 0,45 mol/l.

6. The method of any one of claims 1-5, wherein Fe(II) is in a concentration of

0,00035 to 0,029 mol/l in the aqueous solution B, preferably of 0,001 to 0,01 mol/l.

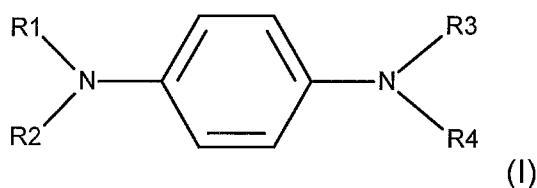
7. The method of any one of claims 1-6, wherein the aqueous solution A comprises water, N,N-diethyl-p-phenylenediamine or a salt thereof in a concentration of 0,3797 mol/l, sulphuric acid in a concentration of 0,3526-0,3637 mol/l, on the weight of the solution A, and the aqueous solution B comprises water, Fe(II) in a concentration of 0,2601 mol/l, iodide in a concentration of 0,0090 mol/l, acetic acid in a concentration of 0,015 mol/l, and sodium hydroxide in a concentration of 0,1875 mol/l, on the weight of the solution B.

8. The method of any one of claims 1-7, wherein the aqueous solution A comprises water, N,N-diethyl-p-phenylenediamine or a salt thereof in an amount of 2-6 mg, sulphuric acid in an amount of 0,4-1,2 ml, and the aqueous solution B comprises water, Fe(II) in an amount of 0,1-8 μ l, iodide in an amount of 0,1-1,5 μ l, acetic acid in an amount of 0,01-0,02 ml, and sodium hydroxide in an amount of 5-8 mg.

9. The method of claim 8, wherein the aqueous solution A comprises water, N,N-diethyl-p-phenylenediamine or a salt thereof in an amount of 4 mg, sulphuric acid in an amount of 0,8 ml, and the aqueous solution B comprises water, Fe(II) in an amount of 0,5 μ l, iodide in an amount of 0,5 μ l, acetic acid in an amount of 0,015 ml, and sodium hydroxide in an amount of 7,5 mg.

10. A kit for implementing the method of claim 1, comprising:

a) at least one container comprising a chromophore agent of formula (I)



or a salt thereof, wherein R^1 , R^2 , R^3 and R^4 are, independently of one another, H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ or halide;

b) at least one container comprising salt of Fe (II) and iodide; and

c) an illustrated leaflet comprising instructions for carrying out the determination of the oxidizing power of plasma hydroperoxides.

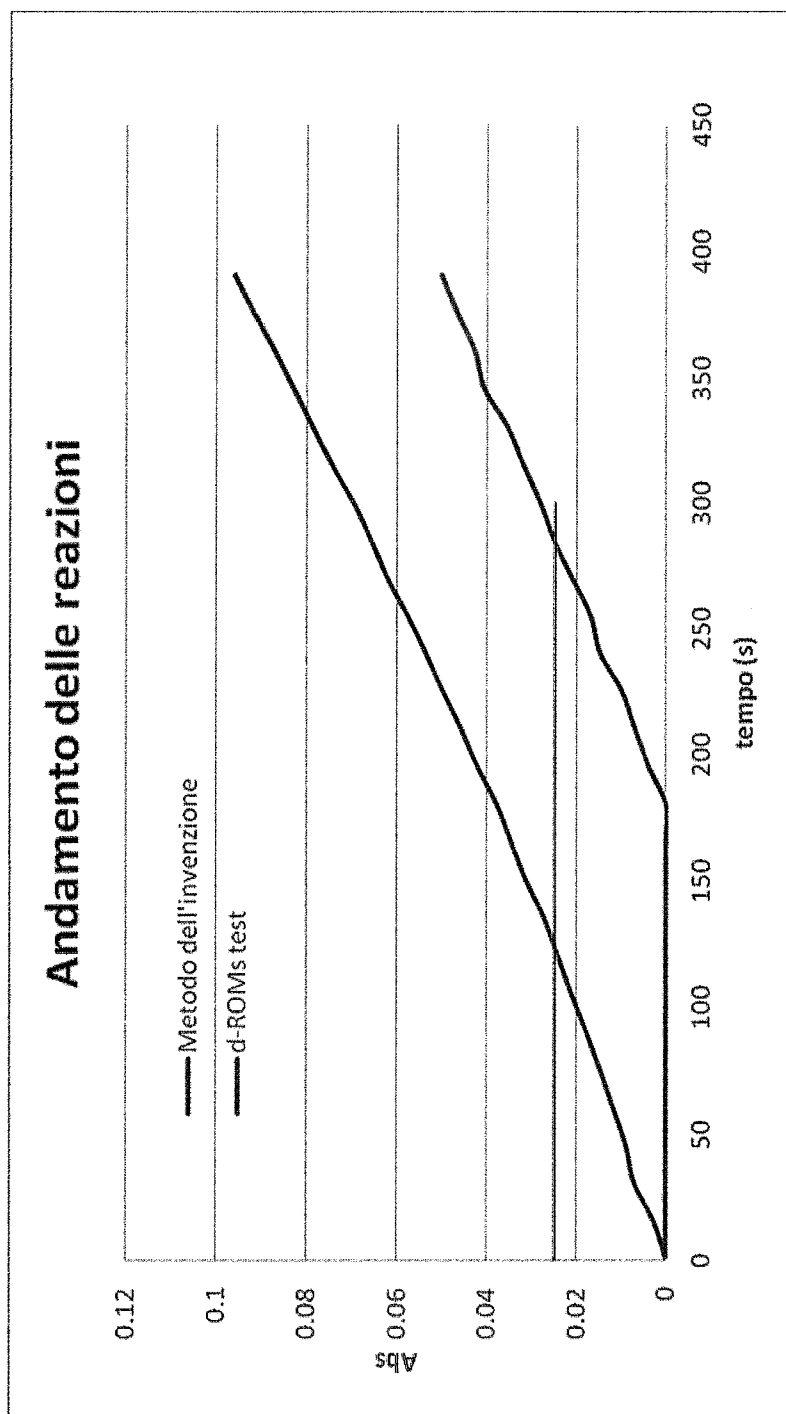


Figura 1