



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01264

(22) Data de depozit: 30.11.2010

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
MICROTEHNOLOGIE, STR.EROU IANCU
NICOLAE NR.32B, VOLUNTARI, IF, RO

(72) Inventatori:
• GĂLĂȚEANU LUCIAN, BD. LACUL TEI
NR. 126-228, BL. 17-18, SC.1, ET.6, AP.359,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• BAZU MARIUS, BD. TIMIȘOARA NR.49,
BL.CC6, SC.A, ET.9, AP.34, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• EMILIAN VIRGIL, STR. D-NA GHICA
NR. 5, BL. 3, SC. A, ET. 8, AP. 36,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• COVACI OVIDIU ILIE,
STR. DIMITRIE LEONIDA NR.92, BL.G7,
SC.D, AP.66, PIATRA NEAMȚ, NT, RO;
• BUCUR BOGDAN, STR. BAI A MARE
NR.4, BL.5, SC.1, AP.32, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BUCUR MĂDĂLINA PETRUȚA,
STR.CPT.ION BECLEANU NR.16, BL.C7,
SC.A, AP..8, CÂMPULUNG MUSCEL, AG,
RO;
• RADU GABRIEL LUCIAN,
ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H6, SC.D,
AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) MICROBIOSENZOR ENZIMATIC PENTRU DETECȚIA
INSECTICIDELOR ORGANOFOSFORICE ÎNTR-UN SISTEM
DE ANALIZĂ PRIN INJECTARE ÎN FLUX

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biosenzor pentru detecția insecticidelor organofosforice în probe de mediu și alimente, bazat pe inhibiția acetilcolinesterazei. Biosenzorul conform invenției este constituit dintr-un microtraductor amperometric, realizat pe o placetă de siliciu având depus, pe substratul de siliciu (a), un strat (b) dielectric de SiO₂ și, pe acesta, trei microelectrozi: un electrod de lucru, (1) de lucru, constituit din șase benzi de metalizare, realizați din două straturi metalice (c și d) de crom și platină, peste care este depus un strat (f) aminofenil activat cu glutaraldehydă și, peste acesta, un strat (g) realizat dintr-un material biologic de tip enzimă, sensibil la prezența insecticidelor organofosforice, un contraelectrod (3) și un electrod (2) de referință, având o poziție centrală, între electrodul (1) de lucru și contraelectrodul (3), contraelectrodul (3) fiind

realizat din două straturi (c și d) de crom și platină, iar electrodul (2) de referință fiind realizat dintr-un strat (c) de crom și un strat (e) de Ag/AgCl.

Revendicări: 1
Figuri: 3

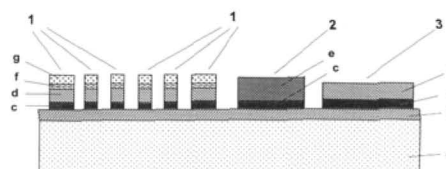


Fig. 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Descrierea invenției

Microbiosenzor enzimatic pentru detectia insecticidelor organofosforice intr-un sistem de analiza prin injectare in flux

Prezenta invenție se refera la un microbiosenzor pentru detectia insecticidelor organofosforice in probe de mediu si alimente, bazat pe inhibitia acetilcolinesterazei.

Problema pe care o rezolva inventia este aceea a realizarii unui microbiosenzor, bazat pe inhibitia acetilcolinesterazei, care realizeaza o detectie eficienta si rapida a insecticidelor organofosforice in probe de mediu si alimente, astfel incat sa poata fi monitorizata concentratia acestora la nivelele cerute de legislatia internationala din domeniu.

Microbiosenzorul, conform invenției, rezolva dificultatile de obtinere a unei biodetectii eficiente si rapide a insecticidelor organofosforice, asociate dimensiunilor mici si gradului de integrare ale unui microdispozitiv, prin aceea ca este constituit din:

- un micro-traductor amperometric realizat pe o placheta de Si avand pe substratul de Si (a), un strat dielectric de SiO₂ (b) si pe acesta, realizati 3 microelectrozi, electrodul de lucru (1), sub forma unui set de 6 benzi de metalizare, contraelectrodul (2) si electrodul de referinta (3), electrozii de lucru si contraelectrodul fiind realizati din 2 straturi metalice, de Cr (c) si Pt (d), iar electrodul de referinta (3) avand o pozitie centrala, intre electrozii de lucru si contraelectrod si fiind realizat dintr-un strat de Cr (c) si unul de Ag/AgCl(e);
- un strat aminofenil activat cu glutaraldehida (f), strat de interfata intre microelectrozii de lucru si materialul biologic, realizat prin modificarea suprafetei microelectrozilor. Acest strat are rolul de a introduce grupari amino pe suprafata electrozilor de lucru care sunt folosite pentru imobilizarea prin legaturi covalente a enzimelor folosind un reactiv bifunctional: glutaraldehida;
- un material biologic, de tip enzima (g), sensibil la prezenta insecticidelor organofosforice, reprezentat de acetilcolinesteraza, depus peste metalizarea de Pt, pe setul de metalizari care reprezinta microelectrozii de lucru, dupa etapele de realizare a interfetei (f).

Microbiosenzorul, conform invenției, prezinta avantajul unor performante superioare pentru realizarea biodetectiei si anume sensibilitate crescuta, timp de raspuns rapid si costuri reduse care permit utilizarea acestuia la monitorizarea on-line a concentratiilor de insecticide organofosforice.

De asemenea, utilizarea pentru procedeul de realizare a microbiosenzorului a tehnologiilor de fabricatie ale microsistemelor, permite obtinerea unor nivele de reproductibilitate si de fiabilitate superioare fata de realizarea biosenzorilor cu macro-electrozi.

Se da in continuare un exemplu de realizare a invenției, in legatura cu figurile 1, 2 si 3 care reprezinta:

- figura 1, Microtraductorul amperometric - imagine la microscopul electronic de baleiaj;
- figura 2, Microbiosenzorul enzimatic - sectiune transversala;
- figura 3, Schema sistemului de analiza prin injectate in flux (FIA).

Microtraductorul amperometric

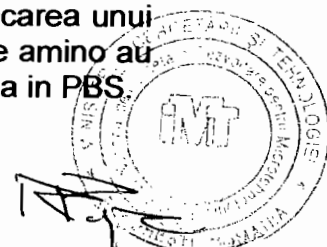
Microbiosenzorul utilizeaza un traductor amperometric avand electrozi de dimensiuni "micro", realizati prin tehnologiile de evaporare in vid. Figura 1 este o imagine la microscopul electronic de baleiaj care prezinta layout-ul microtraductorului iar figura 2 prezinta o sectiune transversala a microbiosenzorului. Pe substratul de Si (a), pe care a fost crescut, prin oxidare termica, un strat

dielectric de SiO_2 (b), avand rolul de izolare electrica a microelectrozilor, sunt realizati 3 microelectrozi pentru o functionare amperometrica a traductorului si anume: electrodul de lucru (1), contraelectrodul (2) si electrodul de referinta (3). Electrodul de lucru este realizat sub forma unui set de 6 benzi de metalizare (1), care pot fi conectate electric cu exteriorul in mod independent. Aceasta constructie asigura o reproductibilitate crescuta a rezultatelor, deoarece ofera posibilitatea de a se opera cu media ponderata a 6 masurari. In plus, solutia constructiva cu electrozi de lucru multipli poate asigura detectia simultana a mai multor contaminanti, daca se fixeaza elemente biologice diferite pe benzile de metalizare ale electrozilor de lucru. Contraelectrodul (2) este electrodul care permite inchiderea in exterior a circuitului electric pentru procesul electrochimic. Electrozii de lucru si contraelectrodul sunt realizati prin depuneri succesive de straturi de metalizare de Cr (c) si Pt (d). Stratul de Cr asigura o buna aderenta la substrat iar stratul de Pt asigura o buna compatibilitate cu materialul biologic. Pe microelectrozii de lucru se fixeaza materialul biologic, de tip enzima, sensibil la prezenta insecticidelor organofosforice, dupa realizarea unui strat de interfatare prin modificarea suprafetei microelectrozilor. Electrodul de referinta (3) este un electrod al carui potential ramane relativ constant pe parcursul evolutiei procesului electrochimic, astfel incat potentialul sau sa poata fi considerat potential de referinta fata de care se masoara potentialul celorlalti electrozi. Electrodul de referinta (3) are o pozitie centrala, intre electrozii de lucru si contraelectrod si este realizat din doua straturi, un prim strat de Cr (c) si un al doilea strat de Ag/AgCl (e). Straturile de metalizare sunt realizate prin evaporare in vid si tehnici de fotolitografie specifice microtehnologiilor. Stratul de Ag/AgCl (e) este obtinut prin clorurarea unui strat de Ag, deus de asemenea prin evaporare in vid si fotolitografie.

Conexiunea electrica a microelectrozilor la circuitul exterior, al potentiostatului, de exemplu, este realizata cu ajutorul unor benzi de metalizare, confectionate din doua straturi, de Cr si de Au, obtinute de asemenea prin evaporare in vid si fotolitografie. Aceste metalizari au layout care realizeaza o extensie (figura 1, zona h) de la dimensiunile micronice ale microelectrozilor, la cele milimetrice ale conectorului utilizat, un conector cu 8 terminale avand un pas intre terminale de 1.27 mm. Benzile de conexiune sunt izolate de solutia de masura cu ajutorul unui strat de fotorezist negativ (figura 1, zona i).

Stratul de interfata intre micro-electrozii de lucru si materialul biologic

Pentru obtinerea unor performante competitive ale biosenzorului, este necesara o optimizare a interfatarii materialului biologic cu metalul microelectrodului de lucru. Este necesar sa se obtina o fixare stabila pe microelectrod a materialului biologic si un transfer eficient al sarcinilor electrice generate in proces. In exemplul de realizare practica a inventiei, metoda de imobilizare a enzimei pe microelectrozii de lucru are mai multe etape independente succesive: (i) electrodepunerea nitrofenildiazoniului pe suprafata microelectrodului, (ii) electroreducerea gruparilor nitro grefate in prima etapa la grupari amino, (iii) reactia intre gruparile amino si glutaraldehida si (iv) imobilizarea enzimei prin reactia intre gruparile carbonil (glutaraldehida) si grupari amino libere de pe suprafata proteinei. Inaintea modificarii electrozilor a fost realizata activarea suprafetei acestora prin voltametrie ciclica: 25 de cicluri succesive intre -0,3 si 0,8 V la o viteza de scanare de 50 mV/sec in solutie 3 mM acid sulfuric. Un strat de p-nitrofenil a fost electrodepus pe microelectrodul de lucru prin potentiometrie la o intensitate a curentului de -10 pA, timp de 10 sec, intr-o solutie proaspat preparata de 10 μM para-nitro benzendiazoniului si 0,05 M tetrafluoroborat de tetrabutilamoniu in acetonitril. Microelectrozii au fost spalati cu acetonitril si apa si apoi p-nitrofenilul a fost redus la p-aminofenil prin aplicarea unui potential de -0,5 V timp de 10 sec in tampon fosfat pH=7,0. Apoi gruparile amino au fost activate prin reactie timp de 30 min cu o solutie 2% (v/v) glutaraldehida in PBS.



Materialul biologic sensibil la prezenta insecticidelor organofosforice

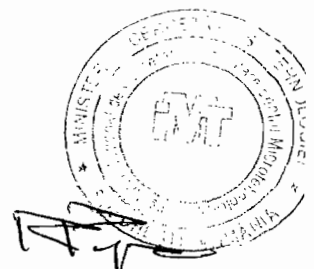
Intrucat performantele biosenzorului sunt dependente de selectivitatea si sensibilitatea la prezenta insecticidelor organofosforice a materialului biologic, a fost utilizata acetilcolinesteraza (AChE) urmare a faptului ca aceasta enzima este inhibata de insecticidele neurotoxice din clasa organofosforicelor si a carbamatelor. AChE este o enzima implicata in procesul neurotransmitator al animalelor cu sistem nervos central.

Drept pseudosubstrat pentru AChE a fost utilizata clorura de acetiltocolina cu care a fost preparata zilnic o solutie stoc in apa distilata.

Stratul de AChE a fost realizat prin depunerea pe suprafata benzilor de metalizare ale electrodului de lucru, dupa etapele de realizare a stratului de interfata, a 20 mUI AChE, care au fost lasate sa reactioneze o durata de 30 min.

Sistemul de analiza prin injectare in flux (FIA)

Sistemul de analiza prin injectare in flux (FIA) (figura 3) a fost realizat dintr-o pompa peristaltica Gilson Minipuls 3 (Franta), o valva de injectie Omnifit (SUA) cu bucla de injectare de 75 μ L si o celula in flux de la DropSens (Spania). In celula in flux au fost utilizati microbiosenzorii realizati conform inventiei. Debitul fluxului transportor (PBS) sau al probei de analizat (figura 3) a fost de 0,67 mL/min. Masurarile cronoamperometrice au fost facute la un potential de 0,7 V pentru oxidarea tiocolinei produse in reactia de hidroliza enzimatica a acetiltocolinei. Intensitatea curentului a fost inregistrata o data pe secunda. Semnalul analitic este reprezentat de inaltimea picurilor care este direct proportionala cu activitatea enzimei immobilizata pe suprafata microelectrozilor. Concentratia de insecticid din proba de analizat este proportionala cu procentul de inhibitie al enzimei calculat ca reducerea inaltimei picurilor masurate dupa trecerea probelor prin sistemul FIA.

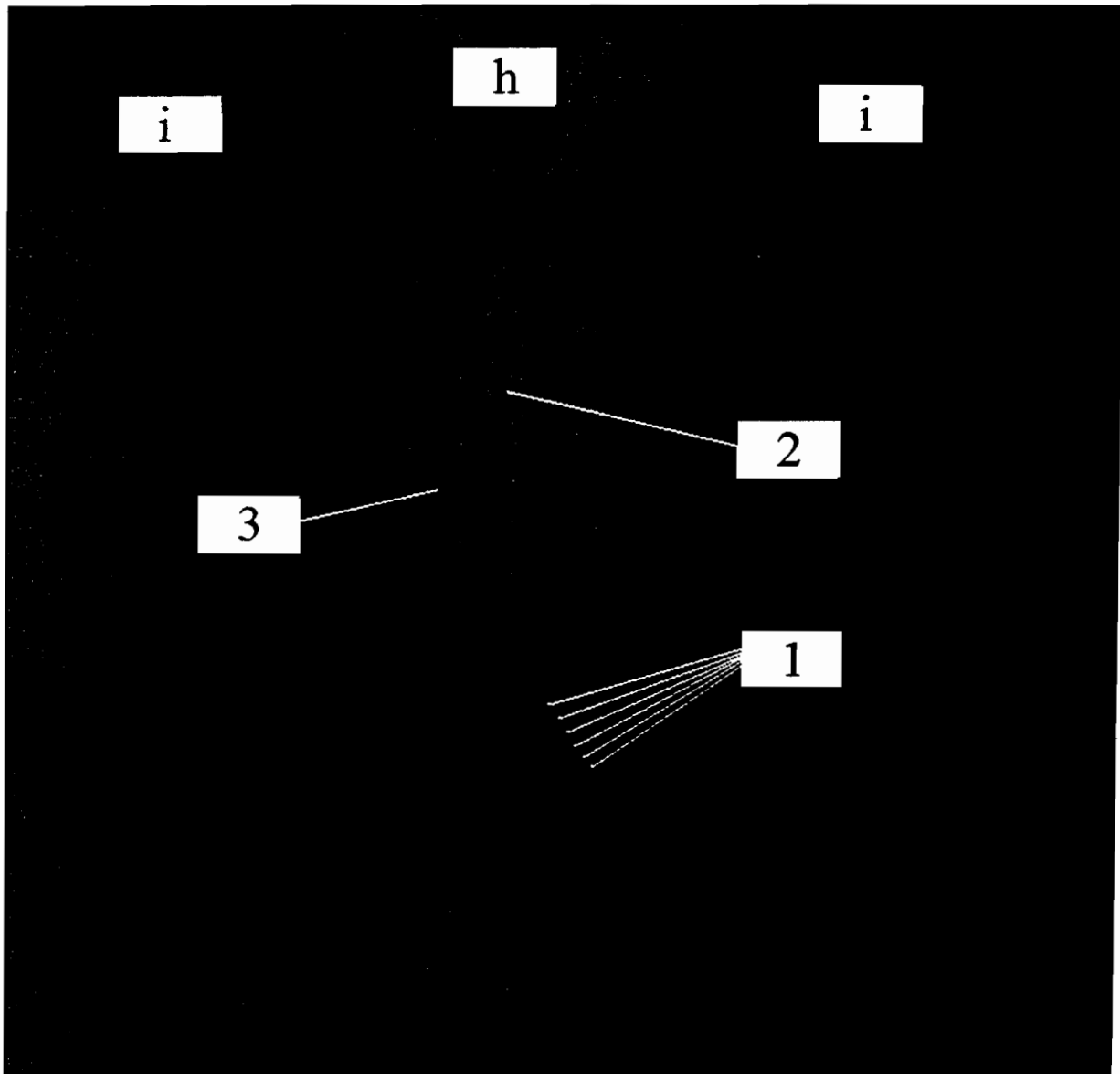


Revendicari

1. Microbiosenzor pentru detectia insecticidelor organofosforice, in probe de mediu si alimente, bazat pe inhibitia acetilcolinesterazei, caracterizat prin aceea ca este constituit din:
 - un micro-traductor amperometric realizat pe o placheta de Si avand pe substratul de Si (a), un strat dielectric de SiO₂ (b) si pe acesta, realizati 3 microelectrozi, electrodul de lucru (1), sub forma unui set de 6 benzi de metalizare, contraelectrodul (2) si electrodul de referinta (3), electrozii de lucru si contraelectrodul fiind realizati din 2 straturi metalice, de Cr (c) si Pt (d), iar electrodul de referinta (3) avand o pozitie centrala, intre electrozii de lucru si contraelectrod, fiind realizat dintrun strat de Cr (c) si unul de Ag/AgCl(e);
 - un strat aminofenil activat cu un reactiv bifunctional, glutaraldehida (f), strat de interfata intre microelectrozii de lucru si materialul biologic, realizat prin modificarea suprafetei microelectrozilor, care are rolul de a introduce grupari amino pe suprafata electrozilor de lucru, folosite pentru imobilizarea prin legaturi covalente a enzimelor;
 - un material biologic, de tip enzima, sensibil la prezenta insecticidelor organofosforice (g), realizat cu acetilcolinesteraza, depus peste metalizarea de Pt, pe setul de metalizari care reprezinta microelectrozii de lucru, dupa etapele de realizare a interfetei (f).



Desene explicative

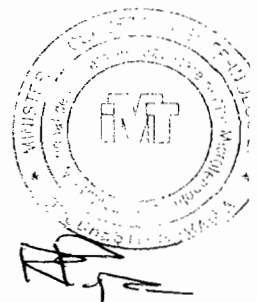


SEM MAG: 62 x DET: SE Detector 
HV: 30.00 kV Device: VG2920673RO 1 mm Vega ©Tescan
VAC: HiVac Digital Microscopy Imaging

Figura 1.

Micro-traductorul amperometric. Imagine la microscopul electronic de baleiaj.

- 1 – Microelectrozi de lucru; 2 Electroful de referinta; 3. Contraelectrod;
- h) zona de extensie a benzilor de metalizare; i) zona de izolare cu fotoresist.



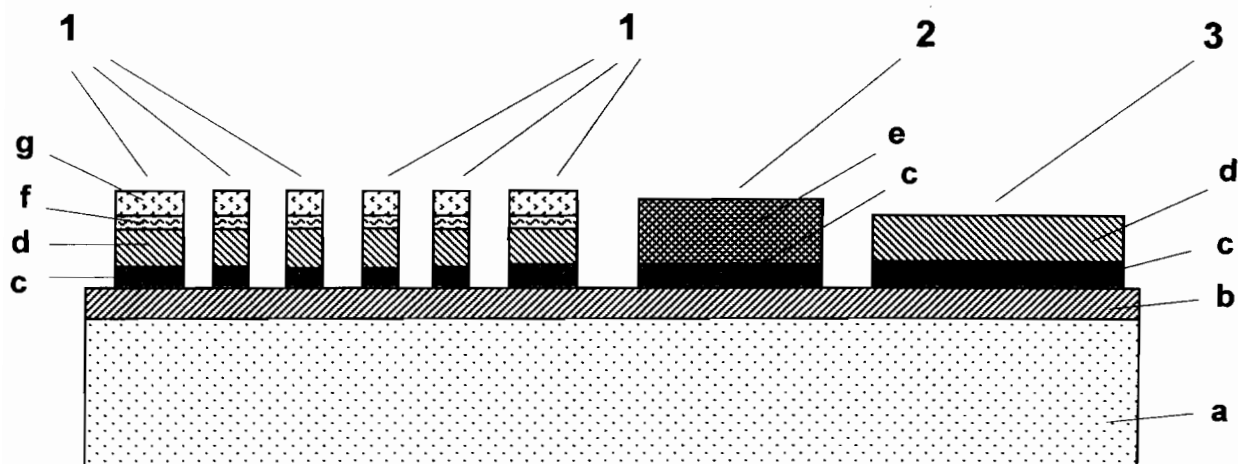


Figura 2

Microbiosenzorul enzimatic. Sectiune transversala.

1. electrozi de lucru; 2. electrodul de referinta; 3. contraelectrod.
a) substratul de Si; b) SiO₂; c) Cr; d) Pt ; e) Ag/AgCl;
f) strat de interfata microelectrozi-enzima; g) acetilcolinesteraza.



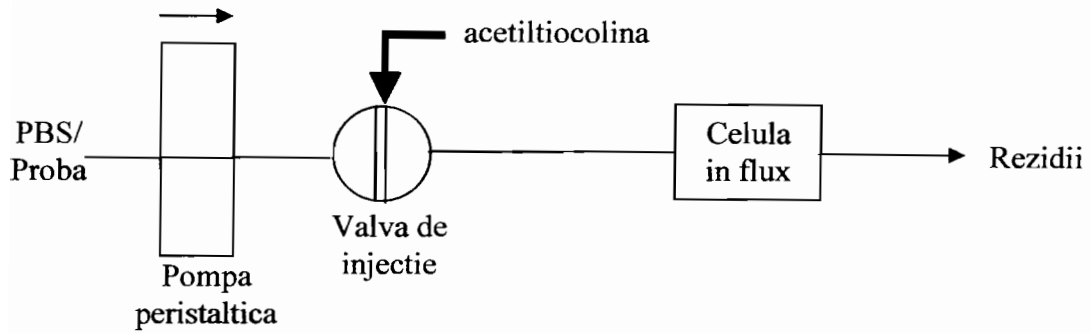


Figura 3.
Schema sistemului de analiza prin injectare in flux (FIA).

PBS-flux transportor (solutie salina de tampon fosfat pH=7.0
cu concentratie 0,1 M suplimentat cu 0,1 M KCl).

