



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01264**

(22) Data de depozit: **30.11.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.04.2013** BOPI nr. **4/2013**

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

(73) Titular:

- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU MICROTEHNOLOGIE,**
STR.EROU IANCU NICOLAE NR.32 B, BUCUREȘTI, B, RO;
- **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE BIOLOGICE,**
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- **GĂLĂȚEANU LUCIAN ALEXANDRU,**
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;*
- **ILIAN VIRGIL-EMIL,** *STR.DOAMNA 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.G 7, SC.D, AP.66, PIATRA-NEAMȚ, NT, RO;
- **BUCUR BOGDAN,** *STR.BAIA MARE NR.4, BL.5, SC.1, AP.32, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;*
- **BUCUR MĂDĂLINA-PETRUȚA,**
STR.CPT.ION BECLEANU NR.16, BL.C 7, SC.A, AP.8, CÂMPULUNG, AG, RO;
- **RADU GABRIEL-LUCIAN,**
ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H 6, SC.D, AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- RO a 2007 00752 A2; RS 894 U;**
CN 1673732 A

(54) **MICROBIOSENZOR ENZIMATIC PENTRU DETECȚIA INSECTICIDELOR ORGANOFOSFORICE**



RO 127566 B1

1 Prezenta invenție se referă la un microbiosenzor pentru detecția insecticidelor orga-
nofosforice în probe de mediu și alimente, bazat pe inhibiția acetilcolinesterazei.

3 Este cunoscut un microbiosenzor (RO a 2007 00752 A2) pentru detecția diuronului
în mediu apos, bazat pe inhibiția procesului de fotosinteză la cianobacterii, constituit dintr-un
5 microtraductor amperometric, realizat pe un cip de siliciu, și având, pe substratul de siliciu,
trei straturi dielectrice, de SiO_2 , Si_3N_4 și Al_2O_3 , și pe acestea, sunt realizați trei microelectrozi,
7 electrodul de lucru, sub forma unei perechi de electrozi, având forma de pieptene,
contraelectrodul și electrodul de referință, electrodul de lucru și contraelectrodul fiind realizați
9 din două straturi metalice, de Ti și Pt, iar electrodul de referință având o poziție centrală, între
electrodul de lucru și contraelectrod, fiind realizat dintr-un strat de Ti și unul de Ag/AgCl,
11 dintr-un material de interfațare între microelectrodul de lucru și materialul biologic realizat din
polipirol, și dintr-un material biologic, sensibil la prezența diuronului, realizat cu cianobacteria
13 *Synechocystis* PCC 6803, mutant MscL, deșus peste stratul de polipirol, pe perechea de
metalizări care reprezintă microelectrodul de lucru.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă într-o detecție eficientă și rapidă a
insecticidelor organofosforice în probe de mediu și alimente, astfel încât să poată fi monito-
17 rizată concentrația acestora la nivelurile cerute de legislația internațională din domeniu.

Microbiosenzorul conform invenției rezolvă dificultățile de obținere a unei biodetecții
19 eficiente și rapide a insecticidelor organofosforice, asociate dimensiunilor mici și gradului de
integrare ale unui microdispozitiv, prin aceea că este constituit din:

21 - un microtraductor amperometric, realizat pe o plachetă de siliciu, având, pe
substratul de siliciu, un strat dielectric de SiO_2 și, pe acesta, sunt realizați trei microelectrozi,
23 un electrod de lucru, sub forma unui set de șase benzi de metalizare, un contraelectrod și
un electrod de referință, electrozii de lucru și contraelectrodul fiind realizați din două straturi
25 metalice, de crom și platină, iar electrodul de referință având o poziție centrală, între
electrozii de lucru și contraelectrod, și fiind realizat dintr-un strat de crom și unul de Ag/AgCl;

27 - un strat aminofenil activat cu glutaraldehidă, strat de interfață între microelectrozii
de lucru și materialul biologic, realizat prin modificarea suprafeței microelectrozilor. Acest
29 strat are rolul de a introduce grupări amino pe suprafața electrozilor de lucru, care sunt
folosite pentru imobilizarea, prin legături covalente, a enzimelor, folosind un reactiv
31 bifuncțional: glutaraldehida;

33 - un material biologic, de tip enzimă, sensibil la prezența insecticidelor
organofosforice, reprezentat de acetilcolinesteraza, deșus peste metalizarea de platină, pe
35 setul de metalizări care reprezintă microelectrozii de lucru, după etapele de realizare a
interfeței.

Microbiosenzorul conform invenției prezintă avantajul unor performanțe superioare,
37 pentru realizarea biodetecției, și anume, sensibilitate crescută, timp de răspuns rapid și
costuri reduse, care permit utilizarea acestuia la monitorizarea on-line a concentrațiilor de
39 insecticide organofosforice.

De asemenea, utilizarea, pentru procedeul de realizare a microbiosenzorului, a
41 tehnologiilor de fabricație ale microsistemelor, permite obținerea unor niveluri de
reproductibilitate și de fiabilitate superioare față de realizarea biosenzorilor cu
43 macroelectrozi.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1, 2 și 3,
45 care reprezintă:

- 47 - fig. 1, microtraductorul amperometric - imagine la microscopul electronic de baleiaj;
- fig. 2, microbiosenzorul enzimatic - secțiune transversală;
- fig. 3, schema sistemului de analiză prin injectare în flux (FIA).

Microtraductorul amperometric

Microbiosenzorul utilizează un traductor amperometric, având electrozi de dimensiuni "micro", realizați prin tehnologiile de evaporare în vid. Fig. 1 reprezintă o imagine la microscopul electronic de baleiaj, care prezintă configurația microtraductorului, iar fig. 2 prezintă o secțiune transversală a microbiosenzorului. Pe substratul de siliciu **a**, pe care a fost crescut, prin oxidare termică, un strat dielectric de SiO_2 **b**, având rolul de izolare electrică a microelectrozilor, sunt realizați trei microelectrozi, pentru o funcționare amperometrică a traductorului, și anume: electrodul de lucru **1**, contraelectrodul **3** și electrodul de referință **2**. Electrodul de lucru **1** este realizat sub forma unui set de șase benzi de metalizare, care pot fi conectate electric cu exteriorul, în mod independent. Această construcție asigură o reproductibilitate crescută a rezultatelor, deoarece oferă posibilitatea de a se opera cu media ponderată a șase măsurări. În plus, soluția constructivă cu electrozi de lucru multipli poate asigura detecția simultană a mai multor contaminanți, dacă se fixează elemente biologice, diferite, pe benzile de metalizare ale electrozilor de lucru **1**. Contraelectrodul **3** este electrodul care permite închiderea în exterior a circuitului electric, pentru procesul electrochimic. Electrozii de lucru **1** și contraelectrodul **3** sunt realizați prin depuneri succesive de straturi de metalizare de crom **c** și de platină **d**. Stratul de crom asigură o bună aderență la substrat, iar stratul de platină asigură o bună compatibilitate cu materialul biologic. Pe microelectrozii de lucru **1**, se fixează materialul biologic, de tip enzimă, sensibil la prezența insecticidelor organofosforice, după realizarea unui strat de interfațare, prin modificarea suprafeței microelectrozilor. Electrodul de referință **2** este un electrod al cărui potențial rămâne relativ constant, pe parcursul evoluției procesului electrochimic, astfel încât potențialul său să poată fi considerat potențial de referință, față de care se măsoară potențialul celorlalți electrozi. Electrodul de referință **2** are o poziție centrală, între electrozii de lucru **1** și contraelectrodul **3**, și este realizat din două straturi, un prim strat de crom **c** și un al doilea strat de Ag/AgCl **e**. Straturile de metalizare sunt realizate prin evaporare în vid și tehnici de fotolitografie specifice microtehnologiilor. Stratul de Ag/AgCl **e** este obținut prin clorurarea unui strat de argint, depus, de asemenea, prin evaporare în vid și fotolitografie.

Conexiunea electrică a microelectrozilor la circuitul exterior, al potențostatului, de exemplu, este realizată cu ajutorul unor benzi de metalizare, confecționate din două straturi, de crom și de aur, obținute, de asemenea, prin evaporare în vid și fotolitografie. Aceste metalizări au o configurație care realizează o extensie (fig. 1, zona **h**) de la dimensiunile micronice ale microelectrozilor, la cele milimetrice ale conectorului utilizat, un conector cu opt terminale având un pas între terminale de 1,27 mm. Benzile de conexiune sunt izolate de soluția de măsură, cu ajutorul unui strat de fotorezist negativ (fig. 1, zona **i**)

Stratul de interfață între microelectrozii de lucru și materialul biologic

Pentru obținerea unor performanțe competitive ale microbiosenzorului, este necesară o optimizare a interfațării materialului biologic cu metalul microelectrodului de lucru **1**. Este necesar să se obțină o fixare stabilă, pe microelectrod, a materialului biologic și un transfer eficient al sarcinilor electrice, generate în proces. În exemplul de realizare practică a invenției, metoda de imobilizare a enzimei pe microelectrozii de lucru are mai multe etape independente, succesive: i. electrodepunerea nitrofenildiazoniului pe suprafața microelectrodului, ii. electroreducerea grupărilor nitro, grefate în prima etapă, la grupări amino, iii. reacția între grupările amino și glutaraldehidă, și iv. imobilizarea enzimei prin reacția între grupările carbonil (glutaraldehida) și grupările amino libere de pe suprafața proteinei. Înaintea modificării electrozilor, a fost realizată activarea suprafeței acestora, prin voltametrie ciclică: 25 de cicluri succesive între 0,3 și 0,8 V, la o viteză de scanare de 50 mV/s, în soluție 3 mM

RO 127566 B1

1 acid sulfuric. Un strat de p-nitrofenil a fost electrodepus pe microelectrodul de lucru prin
potențiometrie, la o intensitate a curentului de 10 pA, timp de 10 s, într-o soluție proaspăt
3 preparată de 10 μM para-nitro benzendiazoniu și 0,05 M tetrafluoroborat de tetrabutilamoniu
în acetonitril. Microelectrozii au fost spălați cu acetonitril și apă, și apoi p-nitrofenilul a fost
5 redus la p-aminofenil, prin aplicarea unui potențial de 0,5 V, timp de 10 s, în tampon fosfat
pH=7,0. Apoi grupările amino au fost activate prin reacție, timp de 30 min, cu o soluție 2%
7 (v/v) glutaraldehidă în PBS.

Drept material biologic, sensibil la prezența insecticidelor organofosforice, întrucât
9 performanțele biosenzorului sunt dependente de selectivitatea și sensibilitatea, la prezența
insecticidelor organofosforice, ale materialului biologic, a fost utilizată acetilcolinesteraza
11 (AChE), urmare a faptului că această enzimă este inhibată de insecticidele neurotoxice din
clasa organofosforicelor și a carbamatelor. AChE este o enzimă implicată în procesul
13 neurotransmițător al animalelor cu sistem nervos central.

Drept pseudosubstrat pentru AChE, a fost utilizată clorura de acetiltiocolină, cu care
15 a fost preparată zilnic o soluție stoc în apă distilată.

Stratul de AChE a fost realizat prin depunerea pe suprafața benzilor de metalizare
17 ale electrodului de lucru, după etapele de realizare a stratului de interfață, a 20 mUI AchE,
care au fost lăsate să reacționeze o durată de 30 min.

19 *Sistemul de analiză prin injectare în flux (FIA)*

Sistemul de analiză prin injectare în flux (FIA) (fig. 3) a fost realizat dintr-o pompă
21 peristaltică Gilson Minipuls 3 (Franța), o valvă de injecție Omnifit (SUA) cu buclă de injecție
de 75 μL și o celulă în flux de la DropSens (Spania). În celula în flux, au fost utilizați micro-
23 biosenzorii realizați conform invenției. Debitul fluxului transportor (PBS) sau al probei de
analizat (fig. 3) a fost de 0,67 mii min. Măsurările cronoamperometrice au fost făcute la un
25 potențial de 0,7 V, pentru oxidarea tiocolinei produse în reacția de hidroliză enzimatică a
acetiltiocolinei. Intensitatea curentului a fost înregistrată o dată pe secundă. Semnalul analitic
27 este reprezentat de înălțimea picurilor, care este direct proporțională cu activitatea enzimei
imobilizate pe suprafața microelectrozilor. Concentrația de insecticid, din proba de analizat,
29 este proporțională cu procentul de inhibiție al enzimei, calculat ca reducere a înălțimii
picurilor măsurate după trecerea probelor prin sistemul FIA.

RO 127566 B1

Revendicare

	1
Microbiosenzor pentru detecția insecticidelor organofosforice, în probe de mediu și alimente, bazat pe inhibiția acetilcolinesterazei, caracterizat prin aceea că este constituit din:	3
	5
- un microtraductor amperometric, realizat pe o plachetă de siliciu, având, pe substratul de siliciu (a), un strat dielectric de SiO ₂ (b) și, pe acesta, fiind realizați trei microelectrozi, un electrod de lucru (1), sub forma unui set de șase benzi de metalizare, un contraelectrod (3) și un electrod de referință (2), electrodul de lucru (1) și contraelectrodul (3) fiind realizați din două straturi metalice, de crom (c) și de platină (d), iar electrodul de referință (2) având o poziție centrală, între electrozii de lucru și contraelectrod, fiind realizat dintr-un strat de crom (c) și unul de Ag/AgCl(e);	7
	9
	11
- un strat aminofenil, activat cu un reactiv bifuncțional, glutaraldehida (f), strat de interfață între microelectrodul de lucru (1) și materialul biologic, realizat prin modificarea suprafeței microelectrodului (1), care are rolul de a introduce grupări amino pe suprafața benzilor de metalizare a electrodului de lucru (1), folosite pentru imobilizarea prin legături covalente a enzimelor;	13
	15
	17
- un material biologic, de tip enzimă, sensibil la prezența insecticidelor organofosforice (g), realizat cu acetilcolinesterază, depus peste metalizarea de platină, pe setul de metalizări care reprezintă benzile microelectrodului de lucru (1), după etapele de realizare a interfeței (f).	19
	21

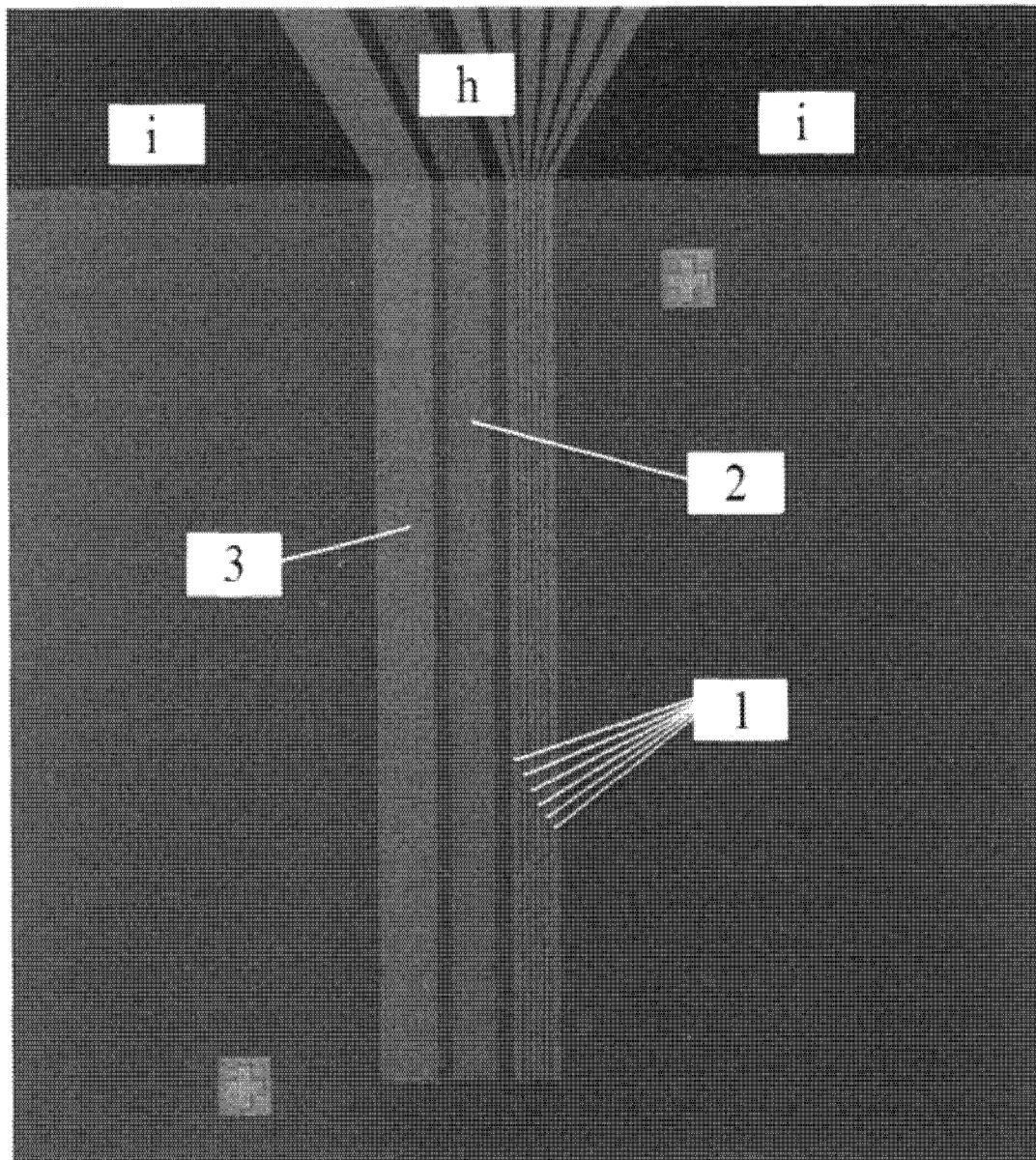
(51) Int.Cl.

G01N 27/26 (2006.01),

G01N 27/49 (2006.01),

C12M 1/40 (2006.01),

C12Q 1/46 (2006.01)



SEM MAG: 62 x
HV: 30.00 kV
VAC: HiVac

DET: SE Detector
Device: VG2920673RO 1 mm



Vega ©Tescan
Digital Microscopy Imaging

Fig. 1

(51) Int.Cl.
G01N 27/26 (2006.01);
G01N 27/49 (2006.01);
C12M 1/40 (2006.01);
C12Q 1/46 (2006.01)

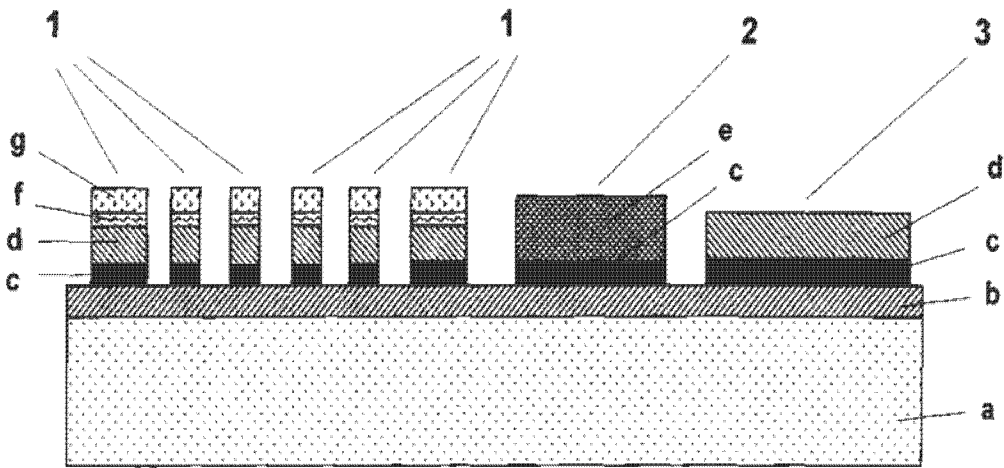


Fig. 2

(51) Int.Cl.

G01N 27/26 (2006.01),

G01N 27/49 (2006.01),

C12M 1/40 (2006.01),

C12Q 1/46 (2006.01)

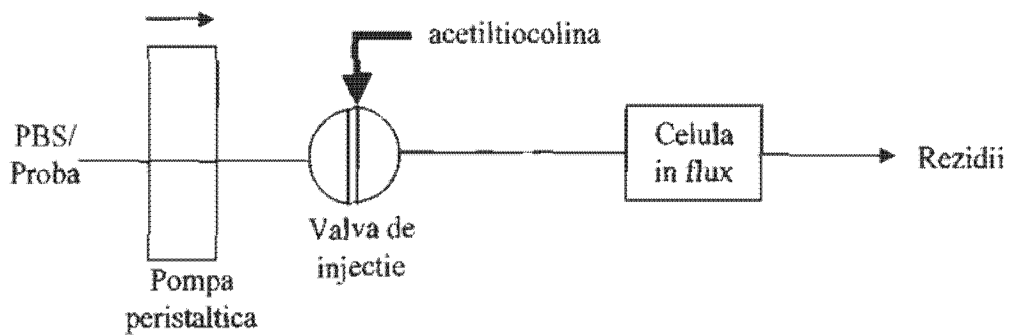


Fig. 3

