



(12)

BREVET DE INVENȚIE

- (21) Nr. cerere: **a 2021 00128**
- (22) Data de depozit: **25/03/2021**
- (45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2023** BOPI nr. **8/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/09/2021 BOPI nr. **9/2021**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU FIZICA
MATERIALELOR (INCDFM),
STR.ATOMIȘTILOR, NR.405A, CP.MG-7,
MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **DICULESCU VICTOR CONSTANTIN,
STR.NERVA TRAIAN, NR.16, BL.M35, SC.3,
ET.7, AP.88, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **BRANCO LEOTE RICARDO JOSE,
STR.FIZICIENILOR, NR.7, AP.8,
MĂGURELE, IF, RO;**
• **ENACHE TEODOR ADRIAN, SAT NANOV,
COMUNA NANOV, TR, RO;**
• **IGNAT BARSAN MĂDĂLINA MARIA,
STR.CRIZANTEMELOR, NR.21A, ET.2,
AP.6, MĂGURELE, IF, RO;**

• **ENCULESCU MARIA-MONICA,
STR.DESPINA DOAMNA NR.20,
CURTEA DE ARGEȘ, AG, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**DICULESCU V. C., BEREGOI M.,
EVANGHELIDIS A. ȘI AL.,
"PALLADIUM/PALLADIUM OXIDE COATED
ELECTROSPUN FIBERS FOR WEARABLE
SWEAT pH-SENSORS", SCIENTIFIC
REPORT, NR. 9, VOL. 8902, 2019;
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45399-2>;
**A. NUMNUAM, P. THAVARUNGKUL, P.
KANATHARANA, "AN AMPEROMETRIC
URIC ACID BIOSENSOR BASED ON
CHITOSAN-CARBON NANOTUBES
ELECTROSPUN NANOFIBER ON SILVER
NANOPARTICLES", ANALYTICAL AND
BIOANALYTICAL CHEMISTRY", VOL. 406,
PP. 3763-3772, 2014****

(54) **BIOSENZOR ELECTROCHIMIC ȘI METODĂ
PENTRU DETERMINAREA ACIDULUI URIC ÎN FLUIDE
BIOLOGICE**



RO 135235 B1

1 Invenția se referă la un biosenzor electrochimic pentru detecția de acid uric în fluide
biologice mai exact în ser, urină și transpirație și la metoda de detecție a acidului uric
3 utilizând acest biosenzor. Biosenzorul, fabricat din fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni
micro- și nano-metrice acoperite cu paladiu, folosește ca element de biorecunoaștere enzima
5 uricază imobilizată pe suprafața electrodului.

 Acidul uric este un produs al metabolizării bazelor purinice ale acizilor nucleici.
7 Concentrații mari de acid uric în fluidele biologice sunt responsabile pentru diferite anomalii
medicale, printre care guta și calculii renali. Conform datelor disponibile în literatura de
9 specialitate [1] intervalul normal de concentrații de acid uric pentru un individ sănătos variază
în funcție de mediul de detecție/fluidul biologic astfel: în ser între 90 și 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$; în urină
11 excreția normală este situată între 80 și 390 $\mu\text{mol L}^{-1}$; în transpirație între 20 și 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$.
Astfel, cuantificarea precum și monitorizarea continuă a acidului uric în fluide biologice
13 prezintă o necesitate pentru evaluarea stării de sănătate a unui individ.

 Metodele general utilizate pentru determinarea acidului uric mai ales în laboratoarele
15 specializate sunt de tip spectrofotometric, analizele fiind efectuate în ser [2]. De asemenea,
sunt descrise în literatura de specialitate și alte metode de cuantificare a acidului uric prin
17 cromatografie lichidă de înaltă performanță [3], metode optice [4, 5] dar și metode care
folosesc senzorii și biosenzorii electrochimici. Sunt cunoscuți senzori electrochimici bazați
19 pe diverse nanostructuri metalice și oxidice [6-8] dar și pe sisteme hibride metal/oxid metalic
cu nanostructuri de carbon [9, 10], dar care din lipsa elementului de biorecunoaștere prezintă
21 o selectivitate redusă pentru detecția acidului uric, în special în probele complexe. De ase-
menea, sunt cunoscuți diverși biosenzori electrochimici pentru detecția de acid uric prin inter-
23 mediul enzimei uricază [11] imobilizată la suprafața electrozilor obținuți din diverse materiale
[12-14]. Acești biosenzori funcționează la potențiale suficient de pozitive ($> 400 \text{ mV}$) pentru
25 ca răspunsul biosenzorului să fie afectat de semnalele electrochimice ale interferențelor
prezenți în matricele complexe. Diminuarea potențialului de funcționare a fost de asemenea
27 investigată, fiind propuse diverse soluții bazate pe materiale nanostructurate și/sau polimeri
conductori [15, 16], în arhitecturi complexe dar a căror liniaritate [15] este în afara valorilor
29 limitelor fixate de legislația în domeniu.

 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în: costurile reduse de fabricare
31 obținute prin consumul mic de reactivi chimici (de ordinul microlitrilor); costuri reduse de utili-
zare prin posibilitatea utilizării biosenzorului în afara laboratorului fără intervenția persona-
33 lului înalt-calificat; sensibilitate și selectivitate ridicate obținute prin elementul de biore-
cunoaștere, respectiv prin potențialul de detecție; limită de detecție inferioară metodelor
35 general utilizate pentru determinarea acidului uric în laboratoarele specializate; posibilitatea
miniaturizării și integrării în sisteme de tip *array* pentru analiză multiplă; flexibilitatea
37 materialului pentru aplicații în domeniul senzorilor purtabili pentru determinarea acidului uric
in situ, în transpirație.

 Conform invenției, biosenzorul de acid uric se realizează prin imobilizarea de uricază
39 la suprafața electrodului de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano-
41 metrice acoperite cu paladiu iar principiul de funcționare al biosenzorului este caracterizat
prin următoarea schemă de reacții chimice:



 Conform invenției, metoda de determinare e acidului uric în fluide biologice folosind
47 biosenzorul de acid uric se bazează pe cuantificarea indirectă a H_2O_2 produs la suprafața
biosenzorului în urma reacției dintre acidul uric și enzima uricază, prin măsurarea curentului
49 de reducere a stratului superficial de PdO format la suprafața electrodului de fibre polimerice
electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu prin reacția cu H_2O_2 .

RO 135235 B1

În cele ce urmează se prezintă un exemplu de realizare a invenției în legătură cu fig. 1 care reprezintă:	1
A. etapele de fabricare a biosenzorului de acid uric și pașii necesari completării acestor etape;	3
B. metoda de determinare a acidului uric în transpirație cu ajutorul biosenzorului prin cronoamperometrie la potențial fix de -0,05 V (vs. Ag/AgCl), și dependența liniară a curentului de reducere a PdO în funcție de concentrația de acid uric. Fig. 1A ilustrează schematic construirea biosenzorului fiind evidențiate cele două etape ale procedurii de obținere.	5
Etapa 1. Fabricarea electrodului de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano-metrice acoperite cu paladiu se realizează în patru pași:	7
1. o soluție de 10% (m/v %) de polimetacrilat de metil în DMF este electrofilată timp de 15 min la o tensiune de 15 kV, un flux de 0,5 mL/h, o temperatură de 23-25°C și umiditate relativă între 30 și 40%, fibrele polimerice electrofilate cu dimensiuni micro-și nano-metrice fiind acumulate pe un cadru de cupru cu dimensiuni de 5 x 5 cm;	9
2. fibrele polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice astfel obținute sunt metalizate cu Au timp de 90 min prin pulverizare catodică în câmp magnetron, în atmosferă de Ar, din țintă de Au cu o puritate de 99,999%, obținându-se fibre electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu aur;	11
3. fibrele electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu aur sunt transferate pe folie de politereftalat de etilenă (PET) prin încălzirea întregului ansamblu la 120°C timp de 1 min;	13
4. fibrele electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu aur transferate pe folie de PET sunt folosite ca electrod de lucru într-o celulă electrochimică cu volum de 50 mL, formată dintr-un electrod de referință de tip Ag/AgCl și un contra-electrod de Pt imersați într-o soluție de 3 mM PdCl ₂ în 0,1 M HCl pentru depunerea electrochimică a stratului de Pd la un potențial aplicat de -0,10 V timp de 30 min, obținându-se astfel rodului de fibre electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu.	15
Etapa 2. Imobilizarea enzimei uricază pe electrodul de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu se realizează în trei pași:	17
1. 10 μL dintr-o soluție de 5% uricază în tampon fosfat 0,1 M pH = 7,0 este depusă prin metoda drop-casting pe suprafața electrodului de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu cu o suprafață activă de 0,25 cm ² ;	19
2. electrodul este introdus într-un recipient închis împreună cu o sursă de vapori de glutaraldehidă constituită dintr-un tub ce conține 500 μL soluție apoasă de 25% glutaraldehidă, unde este menținut timp de 15 min la o temperatură de 23-25°C;	21
3. electrodul se usucă în aer timp de 60 min, obținându-se astfel biosenzorul de acid uric. Când nu este folosit, biosenzorul se păstrează în soluție de tampon fosfat 0,1 M pH = 7,0 la 4°C.	23
Fig. 1B ilustrează un răspuns electrochimic al biosenzorului în transpirație artificială la concentrații incrementale de acid uric. Pentru aceasta, biosenzorul este imersat în soluție de transpirație artificială (conform Standardului European EN1811:2012) la 35°C împreună cu un electrod de referință de tip Ag/AgCl și un contra-electrod de Pt. Tehnica utilizată este cronoamperometria la potențial fix, fig. 1B1. Potențialul aplicat de -0,05 V (vs. Ag/AgCl) este ales astfel încât să permită reducerea PdO format la suprafața electrodului de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu prin reacția cu H ₂ O ₂ rezultat la suprafața biosenzorului în urma reacției dintre acidul uric și enzima uricază. Pentru detecția de acid uric în ser și urină, acestea se vor dilua cu tampon fosfat	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

1 0,1 M pH 7,4 într-o proporție de 1:10. Fig. 1B2 ilustrează de asemenea dependența liniară
a curentului de reducere a PdO la 35°C cu o sensibilitate de $1,93 \pm 10 \text{ mA cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$ (RSD =
3 2,4% n = 3) și o limită de detecție de $0,65 \pm 0,01 \text{ }\mu\text{M}$ (RSD = 4,1, n = 3) calculată pe baza
unui raport semnal/zgomot egal cu 3.

5 Prin aplicarea prezentei invenției se obțin următoarele avantaje: costurile reduse de
fabricare obținute; costuri reduse de utilizare; sensibilitate și selectivitate ridicate; limită de
7 detecție inferioară metodelor general utilizate pentru determinarea acidului uric în
laboratoarele specializate; posibilitatea miniaturizării și integrării în sisteme de tip *array*
9 pentru analiză multiplă; flexibilitatea materialului pentru aplicații în domeniul senzorilor
portabili pentru determinarea acidului uric *in situ*, în transpirație.

11

Bibliografie

13

[1] Y. Y. Al-Tamer, E.A. Hadi, I.E.I. Al-Badrani, *Sweat urea, uric acid and creatinine concentrations in uraemic patients*, Urological Research, 1997, 25:5, 25 (1997), 337-340. <https://doi.org/10.1007/BF01294662>.

15

[2] Acid uric seric - Synevo, (n.d.). <https://www.synevo.ro/shop/acid-uric-seric/> (accessed March, 22, 2021).

17

[3] X. Dai, X. Fang, C. Zhang, R. Xu, B. Xu, *Determination of serum uric acid using high-performance liquid chromatography (HPLC)/isotope dilution mass spectrometry (ID-MS) as a candidate reference method*, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 857 (2007), 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.07.035>.

19

21

23

25

27

29

[4] J. Gao, Y. Yuan, L. Liang, M. Yang, *A Refractometric Uric Acid Biosensor Based on Immobilized Uricase and PVA+PEG Composite Hydrogels*, IEEE Sens. J. 21 (2021) 2533-2543. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2020.3027672>.

23

25

27

29

[5] A. Badoei-dalfard, N. Sohrabi, Z. Karami, G. Sargazi, *Fabrication of an efficient and sensitive colorimetric biosensor based on Uricase/Th-MOF for uric acid sensing in biological samples*, Biosens. Bioelectron., 141, (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.11420>.

27

29

31

33

[6] B. Rezaei, L. Shams-Ghahfarokhi, E. Havakeshian, A. A. Ensafi, *An electrochemical biosensor based on nanoporous stainless steel modified by gold and palladium nanoparticles for simultaneous determination of levodopa and uric acid*, Talanta. 158 (2016) 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.061>.

31

33

35

37

39

[7] X. Lu, S. Li, W. Guo, F. Zhang, F. Qu, *A covalent organic polymer-TiO₂/Ti₃C₂ heterostructure as nonenzymatic biosensor for voltammetric detection of dopamine and uric acid*, Microchim. Acta. 188 (2021) 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04755-8>.

35

37

39

[8] K. Arora, M. Tomar, V. Gupta, *Reagentless uric acid biosensor based on Ni microdiscs-loaded NiO thin film matrix*, Analyst., 139, (2014), 4606-4612. <https://doi.org/10.1039/c4an01029a>.

37

39

41

43

[9] Y. Wei, Y. Liu, Z. Xu, S. Wang, B. Chen, D. Zhang, Y. Fang, *Simultaneous Detection of Ascorbic Acid, Dopamine, and Uric Acid Using a Novel Electrochemical Sensor Based on Palladium Nanoparticles/Reduced Graphene Oxide Nanocomposite*, Int. J. Anal. Chem. 2020 (2020). <https://doi.org/10.1155/2020/8812443>.

41

43

45

47

[10] H.Y. Yue, H. Zhang, J. Chang, X. Gao, S. Huang, L. H. Yao, X. Y. Lin, E. J. Guo, *Highly sensitive and selective uric acid biosensor based on a three-dimensional graphene foam/indium tin oxide glass electrode*, Anal. Biochem., 488, (2015), 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.007>.

43

45

47

RO 135235 B1

- [11] P. E. Erden, E. Kiliş, *A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection*, *Talanta*, 107, (2013), 312-323. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.043>. 1
3
- [12] Y. Liu, M. Yuan, L. Liu, R. Guo, *A facile electrochemical uricase biosensor designed from gold/amino acid nanocomposites*, *Sensors Actuators, B Chem.* 176 (2013), 592-597. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.08.058>. 5
- [13] R. Devi, C.S. Pundir, *Construction and application of an amperometric uric acid biosensor based on covalent immobilization of uricase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline composite film electrodeposited on Pt electrode*, *Sensors Actuators, B Chem.*, 193,(2014), 608-615. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.12.010>. 7
9
- [14] R. Ahmad, N. Tripathy, N.K. Jang, G. Khang, Y.B. Hahn, *Fabrication of highly sensitive uric acid biosensor based on directly grown ZnO nanosheets on electrode surface*, *Sensors Actuators, B Chem.*, 206, (2015), 146-151. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.026>. 11
13
- [15] S. Piermarini, D. Migliorelli, G. Volpe, R. Massoud, A. Pierantozzi, C. Cortese, G. Palleschi, *Uricase biosensor based on a screen-printed electrode modified with Prussian blue for detection of uric acid in human blood serum*, *Sensors Actuators, B Chem.*, 179, (2013), 170-174, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.10.090>. 15
17
- [16] R. Jirakunakorn, S. Khumngern, J. Choosang, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, A. Numnuam, *Uric acid enzyme biosensor based on a screen-printed electrode coated with Prussian blue and modified with chitosan-graphene composite cryogel*, *Microchem. J.*, 154(2020), 104624. <https://doi.org/10.1016/j-microc.2020.104624>. 19
21
23

RO 135235 B1

Revendicări

1

3

1. Biosenzor electrochimic pentru detecția de acid uric în ser, urină și transpirație, **caracterizat prin aceea că** este format dintr-un electrod din fibre de polimetacrilat de metil electrofilate acoperite cu paladiu la suprafața căruia este imobilizată enzima uricază.

5

7

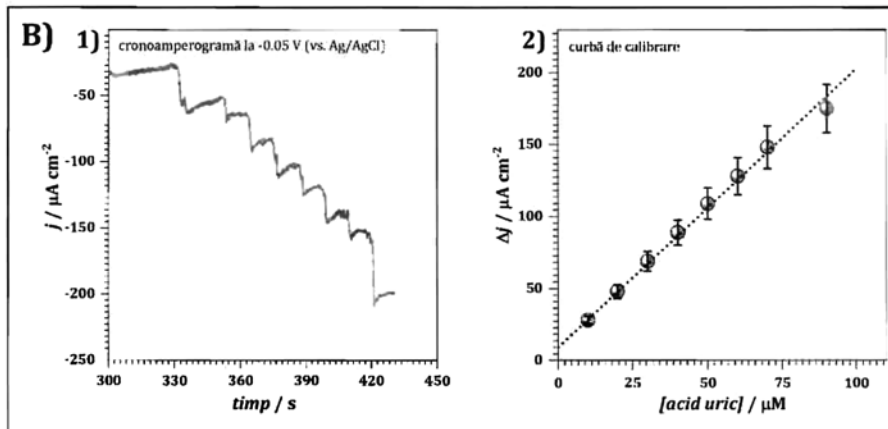
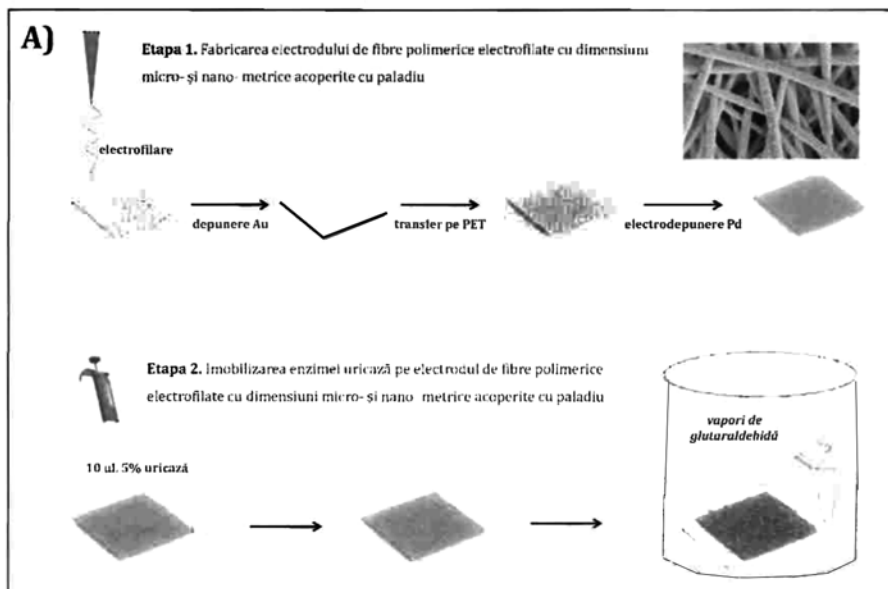
2. Metodă de determinare a acidului uric cu ajutorul biosenzorului din revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că**, determinarea acidului uric se bazează pe cuantificarea de H_2O_2 produs la suprafața biosenzorului în urma reacției dintre acidul uric și enzima uricază, prin măsurarea curentului de reducere a stratului superficial de PdO format la suprafața electrodului de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu prin reacția cu H_2O_2 .

11

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01);

G01N 33/48 (2006.01)



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 336/2023