



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00713**

(22) Data de depozit: **25/11/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2023 BOPI nr. **5/2023**

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

(72) Inventatori:
• **IGNAT BARSAN MĂDĂLINA MARIA,
STR.CRIZANTEMELOR, NR.21A, ET.2,
AP.6, MĂGURELE, IF, RO;**
• **GOMES CAROLINE, STR.FIZICIENILOR,
NR.40A, AP.1, MĂGURELE, IF, RO;**
• **ALDEA ANCA, BD.DINICU GOLESCU,
NR.39, BL.5, SC.2, AP.37, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **BIOSENZOR ENZIMATIC PE BAZĂ DE FIBRE
ELECTROFILATE ACOPERITE CU AUR ȘI SUPEROXID
DISMUTAZĂ PENTRU DETECȚIE DE SUPEROXID**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biosenzor având ca element de biodetecție enzima peroxid dismutază, care intră în componența unei celule electrochimice pentru detecția electrochimică a radicalului superoxid. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: realizarea transductorului ampermetric din plasă de fibre polimerice electrofilate de policaprolactonă (PCI) din soluție preparată în solvent 4:1 clorform: dimetilformamidă, acoperirea fibrelor de PCI cu un strat de Au prin pulverizare catodică, tăierea plaselor la

dimensiunile dorite, modificarea acestora cu cisteină adsorbită chimic pe PCI/Au prin imersie într-o soluție de cisteină în solvent 1:1 apă:etanol, modificarea în picătură a PCI/Au/cisteină prin intermediul agenților de reticulare, rezultând un biosenzor enzimatic pentru detecție de superoxid în probe reale, adaptabil în diverse celule de măsurare.

Revendicări: 1
Figuri: 2



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2021 00713
Data depozit	25-11-2021

21

DESCRIEREA BREVETULUI DE INVENȚIE

Titlu: Biosenzor enzimatic pe bază de fibre electrofilate acoperite cu aur și superoxid dismutaza pentru detecție de superoxid

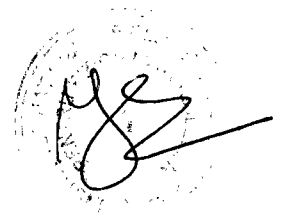
Elaborat de: Ignat-Bârsan Mădălina-Maria, Gomes Caroline, Aldea Anca.

Prezenta invenție se refera la un biosenzor pentru detecție electrochimică de superoxid, integrat pe fibre electrofilate din policaprolactona (PCL) și acoperite cu aur (PCL/Au) și având ca element de biodetecție enzima superoxid dismutază (SOD), imobilizată covalent prin intermediul agenților de reticulare EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimidă și N-hidroxisuccinimidă) pe PCL/Au modificate chimic în prealabil cu cisteină.

Metodele de detecție a radicalului superoxid disponibile pe piața folosesc în general substanțe chimice chemiluminescente (luminol sau săruri solubile de tetrazoliu), care în urma interacțiunii cu radicalul superoxid își modifica proprietățile optice. De asemenea, se poate măsura cantitatea de peroxid de hidrogen, rezultat în urma dismutării radicalului superoxid, utilizând reactivi care în urma oxidării produse de H_2O_2 își schimbă proprietățile optice. Metoda de detecție utilizând H_2O_2 și reactivi stabilizați în ciclodextrine și derivate ale acestora a fost brevetată (US7025734B1). Aceste metode spectrofotometrice de detecție a radicalului superoxid corelează modificările proprietăților optice ale reactivilor utilizați cuantificate de un spectrofotometru cu concentrația de superoxid. În aceste metode, reactivii utilizați, care includ și enzima superoxid dismutaza, nu sunt reutilizabili.

De asemenea, s-a brevetat un senzor electrochimic de superoxid al cărui element de detecție este un film polimeric constituit dintr-un complex molecular porfirina-ion metalic (WO2005088290). Acesta se bazează pe reducerea ionilor de F^{3+} la Fe^{2+} de către superoxid, și oxidarea Fe^{2+} la F^{3+} la electrod, având astfel dezavantajul unei selectivități reduse, neutilizând enzima SOD.

Biosenzorul revendicat prin prezenta invenție este un dispozitiv care permite conversia semnalului din reacția biochimică catalizată de enzima SOD și dependentă de concentrația de



radical superoxid, într-un semnal electric măsurabil. Biosenzorul utilizează ca substrat de electrod fibre electrofilate de PCI acoperite cu aur și modificat chimic cu cisteină. Stratul de detecție include enzima SOD și doi agenți de reticulare EDC/NHS care permit imobilizarea eficientă a SOD pe electrozii de aur modificați cu cisteină. Pentru realizarea detecției amperometrice a superoxidului, se utilizează o celulă electrochimică în trei electrozi: 1) biosenzorul, electrodul de lucru în care are loc reacția chimică, 2) contraelectrodul care servește ca sursă de curent, și 3) electrodul de referință care permite măsurarea și controlul potențialului electrodului de lucru prin utilizarea unui potențiostat. Electrozii sunt imersați într-o soluție de electrolit, de pH optim enzimatic, cu valori cuprinse între 6 și 9.

Invenția prezintă următoarele avantaje: scăderea costului procedurii de detecție a superoxidului și creșterea selectivității procedurii de detecție a radicalului superoxid prin utilizarea enzimei superoxid dismutază.

Biosenzorul conform invenției rezolvă dificultățile de obținere a unei biodetecții eficiente și rapide, prin aceea că este format din:

- transductor amperometric realizat din fibre electrofilate polimerice și acoperite cu aur
- monostrat de cisteină realizat prin modificarea chimică a suprafeței de Au, cu rolul de a introduce grupări carboxilice, folosite pentru imobilizarea prin legături covalente a enzimei prin intermediul agenților de reticulare EDC/NHS.
- strat de recunoaștere biologică constituit din enzima SOD, imobilizată eficient pe electrod și care permite biodetecția selectivă a radicalului superoxid.

Un aspect important al invenției se referă la scăderea costului procedurii de detecție a superoxidului prin utilizarea biosenzorului fabricat prin procedeul revendicat, prin reducerea consumului de reactivi dar și limitarea deșeurilor.

Alt avantaj general al biosenzorului revendicat este performanța analitică superioară, și anume o sensibilitate și stabilitate superioare, un timp de răspuns rapid și limite mici de detecție. Atât sensibilitatea cât și stabilitatea operațională ridicată a biosenzorului se datorează metodei de imobilizare enzimatică cu EDC/NHS pe electrozi modificați în prealabil cu cisteină și utilizarea de suporturi de electrod din fibre electrofilate din policaprolactonă și acoperite cu aur. Fibrele au diametrul de ordinul sutelor de nanometri, și formează ochiuri de rețea submicronice care permit



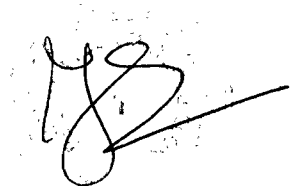
înglobarea eficientă a enzimei utilizând metodologia de reticulare cu EDC/NHS și cisteină adsorbită chimic în prealabil pe fibrele electrofilate și aurite.

Biosenzorul conform invenției are de asemenea avantajul de a putea fi scalat la diferite forme/dimensiuni, astfel încât să se adapteze la diverse celule de măsurare, ca de exemplu celule de măsurare în flux.

Un alt avantaj semnificativ al invenției reprezintă posibilitatea cuantificării *in vivo* a superoxidului din culturi celulare care pot fi crescute direct pe plasele electrofilate aurite PCI/Au. Biocompatibilitatea acestora a fost verificată prin testul LDH (lactat dehidrogenaza) - o metodă bazată pe testarea integrității membranei celulare prin determinarea cantității de LDH eliberat în mediu. Rezultatele au fost satisfăcătoare pentru aplicații *in vivo*, viabilitatea celulelor crescute pe membrane electrofilate fiind chiar îmbunătățită în comparație cu celulele crescute în godeu pe placa de cultura (control 2D).

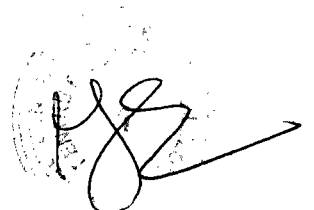
Se dă în continuare un exemplu de realizarea invenției în legătura cu **Figura 1** - Reprezentare schematică generală a fabricării biosenzorului; Componente: (1)-fir din plasa polimetrică policaprolactona electrofilat și acoperit cu aur (PCI/Au); (2) fir de PCI/Au modificat chimic cu cisteină (PCI/Au/cisteină) și (3) biosenzorul enzimatic PCI/Au/cisteină/SOD; Etape: (a) imersia PCI/Au într-o soluție de cisteină; (b) modificarea în picătură a PCI/Au/cisteină cu EDC/NHS și enzima și **Figura 2** - Curba cinetică de oxidare (cronoamperometrie la potențial fix) și curba de calibrare a biosenzorului cu elementele de identificare a concentrației de superoxid utilizând curba de calibrare.

În **Figura 1** sunt descriși pașii de fabricare al biosenzorului. Substratul transductorului este constituit din plase electrofilate de PCI și acoperite cu un film subțire de Au. Soluția utilizată în electrofilare este de 16% w/v PCI preparată într-un solvent 4:1 cloroform : dimetilformamidă. S-a utilizat un debit de 1,5 ml/h și un potențial aplicat de 15 kV iar colectarea s-a făcut pe cadrane de cupru plasate la 15 cm distanță de seringă, folosind un sistem de colectare rotativ. Fibrele de PCI au fost apoi acoperite cu un strat subțire de Au (200 nm) prin pulverizare catodică. Plasele pot fi apoi tăiate în forme și dimensiuni dorite. Plasele au fost apoi modificate cu cisteină, adsorbită chimic pe PCI/Au prin imersia plaselor într-o soluție de 10 mM cisteină într-un solvent de 1:1 apă:etanol. Plasele au fost apoi spălate cu apă ultrapură și uscate în aer. Enzima SOD a fost imobilizată prin legături covalente. Pentru aceasta s-au coimobilizat în picătura o soluție de 1%



SOD, 1% EDC și 4% , într-un raport volumetric de 1:2:1. Biosenzorul este lăsat apoi 3 h la temperatura camerei înainte de utilizare.

Figura 2 reprezintă răspunsul tipic al biosenzorului la 5 adășii succesive de substrat de superoxid. Măsurătorile electrochimice s-au realizat într-o celulă tipică de trei electrozi: electrozul de lucru-biosenzorul, electrozul de referință-Ag/AgCl și contraelectrozul-fir de Pt, imersați într-o soluție de tampon cu valori de pH adecvate enzimei SOD, între 6 și 9. Astfel, prin tehnica de cronoamperometrie la potențial fix, se aplică un potențial adecvat, de +0.3 V vs. Ag/AgCl, și se înregistrează o creștere a curentului anodic subsecvent injectării de superoxid (Δj). Răspunsul cronoamperometric al biosenzorului permite construirea curbei de calibrare corespunzătoare (Δj versus concentrație de superoxid) și determinarea parametrilor analitici ai biosenzorului astfel: i) panta curbei Δj versus concentrație de superoxid reprezintă sensibilitatea biosenzorului, ii) domeniul linear și iii) limita de detecție ca fiind de trei ori deviația standard raportată la sensibilitate. Utilizând ecuația dreptei curbei de calibrare, biosenzorul poate fi aplicat în probe reale și in situ sau in vivo, prin tehnica regresiei lineare.



REVENDICĂRI:

Invenția, biosenzor enzimatic pentru superoxid caracterizat prin aceea ca utilizează ca transductor electrochimic fibre electrofilate acoperite cu aur si ca element de biodetecție enzima superoxid dismutaza immobilizata prin legături covalente prin intermediul agenților de reticulare EDC/NHS pe plase electrofilate acoperite cu aur și modificate chimic cu cisteină.



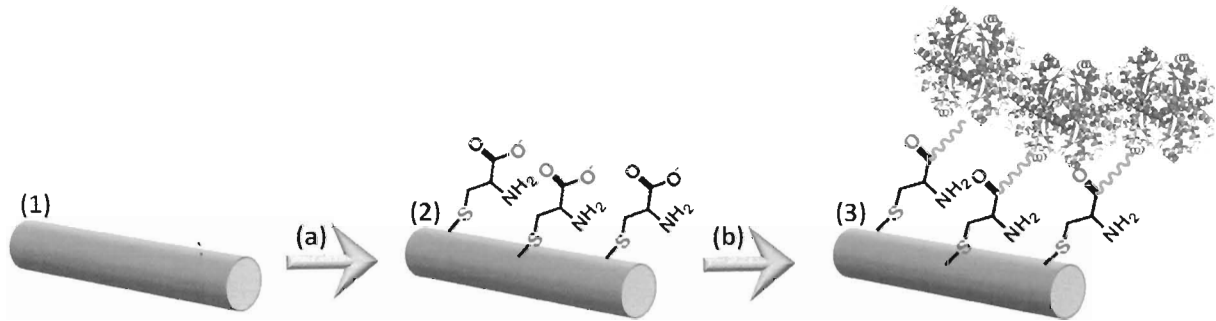


Figura 1. Reprezentare schematică generală a fabricării biosenzorului.

Componente: (1)-fir din plasa polimerică electrofilatată și acoperită cu aur (PCI/Au); (2) fir de PCI/Au modificat chimic cu cisteină (PCI/Au/cisteină) și (3) biosenzorul enzimatic PCI/Au/cisteină/SOD

Etape: (a) imersia PCI/Au într-o soluție de cisteină; (b) modificarea în picătură a PCI/Au/cisteină cu EDC/NHS și enzima SOD

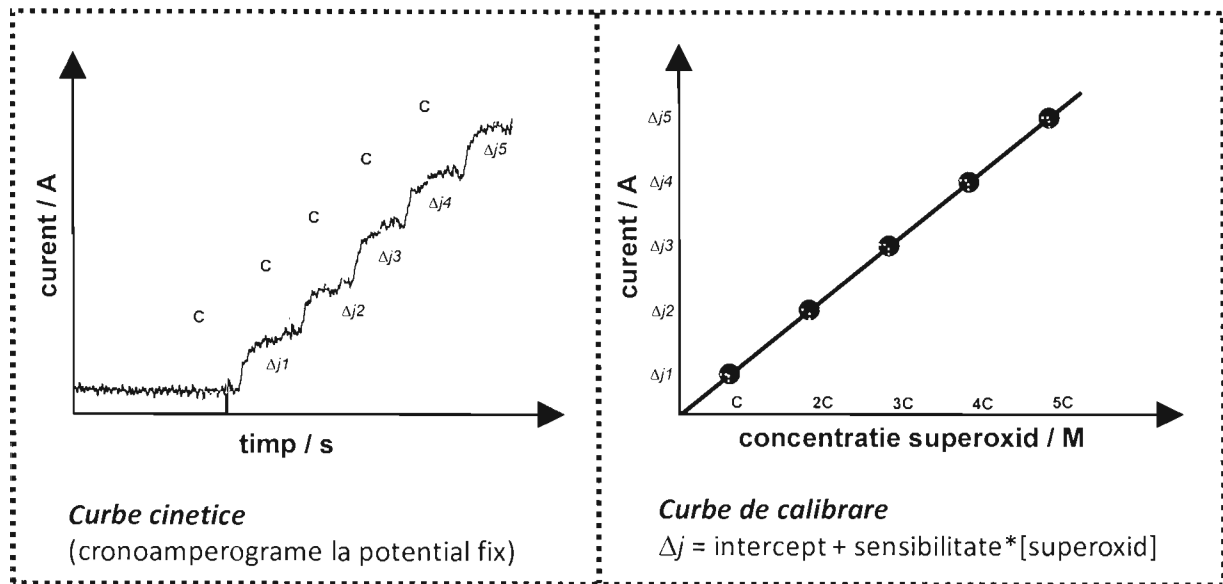


Figura 2. Curba cinetică de oxidare (cronoamperometrie la potențial fix) și curba de calibrare a biosenzorului cu elementele de identificare a concentrației de superoxid utilizând curba de calibrare.

