



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2007 00752**

(22) Data de depozit: **30.10.2007**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.01.2013** BOPI nr. 1/2013

(41) Data publicării cererii:
30.04.2009 BOPI nr. 4/2009

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
MICROTEHNOLOGIE,
STR.EROU IANCU NICOLAE NR.32B,
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;**

• **ILIAN VIRGIL EMIL,
STR.DOAMNA GHICA NR.5, BL.3, SC.A,
ET.8, AP.36, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **BAZU MARIUS, BD.TIMIȘOARA NR.49,
BL.Cc6, SC.A, ET.9, AP.34, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PODARU CECILIA, STR.ALUNELULUI
NR.3, BL.45, SC.2, AP.22, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RO a 2005 00568 A0; EP 0989188 A1;
US 5611900 A**

(54) MICROBIOSENZOR PENTRU DETECȚIA DIURONULUI ȘI PROCEDEU DE REALIZARE A ACESTUIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biosenzor pentru detecția diuronului în mediu apos, bazat pe inhibiția procesului de fotosinteză la cianobacterii, și la procedeul de realizare a acestuia. Biosenzorul conform invenției este constituit dintr-un microtraductor amperometric realizat pe un cip de Si, cu trei microelectrozi, electrodul de lucru (1), contraelectrodul (2) și electrodul de referință (3), electrodul de lucru și contraelectrodul fiind realizați din două straturi metalice, de Ti (e) și Pt (f), iar electrodul de referință (3) fiind realizat dintr-un strat de Ti (e) și unul de Ag/AgCl (g), dintr-un material de interfațare între microelectrodul de lucru și materialul biologic realizat din polipirol (h), și dintr-un material biologic sensibil la prezența diuronului (i), realizat cu cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803, mutant Mscl, de pe stratul de polipirol. Procedeul de realizare conform invenției constă în realizarea microtraductorului amperometric prin depunerea succesivă, pe substratul de Si, a trei straturi dielectrice, după care urmează confecționarea celor trei microelectrozi, prin depunerea straturilor de metalizare prin evaporare în vid și tehnici de

fotolitografie, depunerea pe microelectrodul de lucru a materialului de interfațare realizat din polipirol, și depunerea pe stratul de polipirol a materialului biologic sensibil la prezența diuronului.

Revendicări: 2

Figuri: 2



Fig. 1

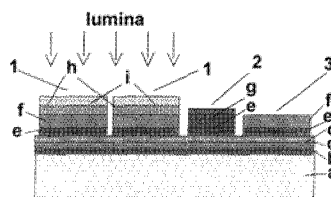


Fig. 2

Examinator: fizician RADU ROBERT



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 123508 B1

1 Prezenta invenție se referă la un biosenzor pentru detecția diuronului în probe
de mediu apos, bazat pe inhibiția procesului de fotosinteză la cianobacterii, și la un procedeu
3 de realizare a biosenzorului.

Dezvoltarea legislației mediului solicită eliminarea și monitorizarea tot mai exactă a
5 concentrațiilor substanțelor poluante în apă, aer și sol. Directiva Comisiei Europene EEC
98/83/CE stabilește limita admisă, în apa de băut, la 0.1 $\mu\text{g/L}$, pentru fiecare substanță din
7 clasa pesticidelor, și de 0.5 $\mu\text{g/L}$, pentru total pesticide. Metodele chimice tradiționale,
precise și selective, nu pot asigura un control operativ și cu atât mai puțin sisteme de monito-
9 rizare on-line a calității mediului, deoarece necesită o instrumentație scumpă și o meto-
dologie laborioasă. Soluția o reprezintă utilizarea biosenzorilor, care au capacitatea de a
11 detecta într-un mod rapid substanțele poluante, având posibilitatea de a genera o informație
continuă. O direcție de dezvoltare o reprezintă realizarea biosenzorilor, care au perfor-
13 manțe superioare privind timpul de răspuns, selectivitatea, reproductibilitatea și fiabilitatea,
datorită gradului înalt de integrare și tehnologiilor utilizate. Realizarea unor biosenzori
15 performanți ridică probleme noi, generate de nivelul dimensiunilor foarte mici ale micro-
electrozilor și care se referă la dificultățile de obținere a unui material biologic suficient de
17 sensibil, cu o fixare robustă, cu o interfață care să asigure compatibilitatea între micro-
electrodul metalic și materialul biologic, precum și o preluare eficientă a sarcinilor electrice,
19 generate în procesul de biodetecție.

Problema pe care o rezolvă invenția constă într-o detecție eficientă și rapidă a
21 diuronului în probe de mediu apos, astfel încât să poată fi monitorizată concentrația acestuia
la nivelurile date de legislația internațională din domeniul mediului.

23 Biosenzorul conform invenției rezolvă dificultățile de obținere a unei biodetecții
eficiente și rapide a diuronului, în condițiile dimensiunilor mici și a gradului de integrare ale
25 unui microdispozitiv, prin aceea că este constituit dintr-un microtraductor amperometric,
realizat pe un cip din/și având pe substratul din Si, 3 straturi dielectrice, din SiO_2 , Si_3N_4 și
27 Al_2O_3 , și pe acestea, sunt realizați 3 microelectrozi, electrodul de lucru, sub forma unei
perechi de electrozi având forma de pieptene, contraelectrodul și electrodul de referință,
29 electrodul de lucru și contraelectrodul fiind realizați din 2 straturi metalice, din Ti și Pt, iar
electrodul de referință având o poziție centrală, între electrodul de lucru și contraelectrod,
31 fiind realizat dintr-un strat din Ti și unul din Ag/AgCl;

- un material de interfațare între microelectrodul de lucru și materialul biologic, realizat
33 din polipirol;

- un material biologic, sensibil la prezența diuronului, realizat cu cianobacteria
35 *Synechocystis* PCC 6803, mutant MscL, depus peste stratul de polipirol, pe perechea de
metalizări care reprezintă microelectrodul de lucru.

37 Procedeu de realizare a biosenzorului pentru detecția și monitorizarea
diuronului în probe de mediu apos, bazat pe inhibiția procesului de fotosinteză la
39 cianobacterii, conform invenției, este caracterizat prin aceea că:

- microtraductorul amperometric se realizează prin depuneri succesive, pe substratul
41 din Si, a celor 3 straturi dielectrice, din SiO_2 , Si_3N_4 și Al_2O_3 , stratul din SiO_2 fiind realizat prin
oxidare termică, stratul din Si_3N_4 prin tehnici CVD, iar stratul din Al_2O_3 fiind realizat în 2
43 etape, depunerea unui strat din Al prin evaporare în vid și oxidarea anodică a acestuia, după
care urmează confecționarea celor 3 microelectrozi, electrodul de lucru, contraelectrodul și
45 electrodul de referință, care se realizează prin depunerea straturilor de metalizare prin
evaporare în vid și tehnici de fotolitografie, electrodul de lucru și contraelectrodul fiind
47 realizați din 2 straturi metalice, din Ti și Pt, iar electrodul de referință fiind realizat dintr-un
strat din Ti și unul din Ag, acesta din urmă fiind supus unui proces de clorurare cu FeCl_3 ,
49 pentru obținerea stratului de Ag/AgCl;

RO 123508 B1

- depunerea, pe microelectrodul de lucru, a materialului de interfațare, realizat din polipirol, se face prin polimerizarea electrochimică a pirolului, pentru aceasta fiind folosită, drept celula electrochimică, însăși cavitatea de lucru a microbiosenzorului și sistemul de microelectrozi al acestuia;	1 3
- depunerea pe stratul de polipirol, a materialului biologic sensibil la prezența diuronului, realizat cu cianobacteria <i>Synechocystis</i> PCC 6803, mutant MscL, se face din soluție apoasă, cuantificată prin tehnici de dozare, o cantitate de cianobacterii fiind fixată în structura poroasă a polipirolului, prin procedee de uscare, materialul biologic nefixat în acest mod fiind îndepărtat prin spălare.	5 7 9
Procedeul de realizare a microbiosenzorului poate fi utilizat la exploatarea industrială a acestuia.	11
Microbiosenzorul conform invenției prezintă avantajul unor performanțe superioare, pentru realizarea biodetecției, și anume, selectivitate, timp de răspuns rapid și costuri reduse, care permit utilizarea acestuia la monitorizarea on-line a concentrațiilor de diuron într-un mediu apos supravegheat.	13 15
De asemenea, utilizarea, pentru procedeul de realizare a microbiosenzorului, a tehnologiilor de fabricație ale microsistemelor, permite obținerea unor niveluri de reproducibilitate și de fiabilitate superioare față de realizarea biosenzorilor cu macroelectrozi.	17
Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1 și 2, care reprezintă:	19
- fig. 1, cipul din/și cu microelectrozi - imagine la microscopul metalografic;	21
- fig. 2, cipul din/și cu microelectrozi - secțiune transversală.	
Microbiosenzorul pentru detecția diuronului în mediu apos, bazat pe măsurarea inhibiției procesului de fotosinteză la cianobacterii, conform invenției, este compus din următoarele elemente principale:	23 25
- microtraductorul amperometric;	
- materialul biologic sensibil la prezența diuronului;	27
- materialul de interfațare între microelectrodul metalic și materialul biologic, care asigură fixarea robustă pe microelectrozi a materialului biologic și preluarea eficientă a sarcinilor electrice generate de acesta.	29
<i>Microtraductorul amperometric</i>	31
Se utilizează un traductor amperometric, având electrozi de dimensiuni "micro", realizați pe un cip din Si, prin tehnologiile de realizare a microsistemelor. În fig. 1 și 2, este prezentat cipul din/și cu microelectrozi. Fig. 1 este o imagine la microscopul metalografic, care prezintă configurarea cipului, iar fig. 2 prezintă o secțiune transversală a acestuia. Pe substratul din/și a., sunt realizate, prin depuneri succesive, 3 straturi dielectrice, din SiO ₂ b , Si ₃ N ₄ c și Al ₂ O ₃ d , care au rol de izolare electrică a microelectrozilor, de pasivare/protecție a suprafețelor, precum și un rol catalitic. Stratul din SiO ₂ b este realizat prin oxidare termică, stratul din Si ₃ N ₄ c este depus prin tehnici CVD, iar stratul din Al ₂ O ₃ d este realizat în 2 etape, depunerea unui strat din Al, prin evaporare în vid, fiind urmată de oxidarea anodică a acestuia. Microtraductorul cuprinde 3 microelectrozi: electrodul de lucru 1 , electrodul de referință 2 și contraelectrodul 3 . Electrodul de lucru 1 este electrodul la care au loc procesele pe care se bazează funcționarea microbiosenzorului. Pe acest electrod, se depune materialul biologic sensibil la prezența diuronului. Electrodul de lucru 1 este realizat sub forma unei perechi de electrozi având forma de pieptene, ceea ce asigură o eficiență crescută a biodetecției. Contraelectrodul 3 este electrodul care permite închiderea în exterior a circuitului electric pentru procesul electrochimic. Electrodul de lucru 1 și contraelectrodul 3	33 35 37 39 41 43 45 47

RO 123508 B1

1 sunt realizați, prin depuneri succesive, de straturi de metalizare din Ti e și Pt f. Stratul din Ti
asigură o bună aderență la substrat, iar stratul din Pt asigură o bună compatibilitate cu
3 materialul biologic. Electrocul de referință 2 este un electrod al cărui potențial rămâne relativ
constant, pe parcursul evoluției procesului electrochimic, astfel încât potențialul său să poată
5 fi considerat potențial de referință față de care se măsoară potențialul celorlalți electrozi.
Electrodul de referință 2 are o poziție centrală, între electrodul de lucru 1 și contraelectrodul
7 3, și este realizat din două straturi, un prim strat din Ti e și un al doilea strat din Ag/AgCl g.
Straturile de metalizare sunt realizate prin evaporare în vid și tehnici de fotolitografie. Stratul
9 din Ag/AgCl g este obținut prin clorurarea unui strat din Ag, deplus, de asemenea, prin
evaporare, în vid și fotolitografie.

11 *Materialul de interfațare între microelectrodul de lucru și materialul biologic*

12 Pentru obținerea unor performanțe competitive ale biosenzorului, este necesară
13 o optimizare a interfațării materialului biologic cu metalul microelectrodului de lucru. Este
necesar să se obțină o bună fixare pe microelectrod a materialului biologic și un transfer
15 eficient al sarcinilor electrice generate în proces. În exemplul de realizare practică a invenției,
s-a utilizat, drept material de interfațare, un polimer conductor, și anume, polipirolul. Polimerii
17 conductori asigură compatibilitatea biologică, conductivitatea electrică, transferul de
electroni, o suprafață mare de contact, o bună aderență la microelectrozii metalici, o bună
19 fixare a materialului biologic și o bună uniformitate a stratului deplus, chiar și pentru
dimensiuni micronice ale acestuia. La dimensiunile foarte mici ale microelectrodului de lucru,
21 depunerea stratului de polipirol s-a efectuat prin polimerizarea electrochimică a pirolului.
Pentru aceasta, s-a folosit, drept celulă electrochimică, însăși cavitatea de lucru a
23 biosenzorului.

În fig. 2, se poate observa stratul de polipirol h, deplus pe perechea de metalizări care
25 reprezintă microelectrodul de lucru 1.

26 *Materialul biologic, sensibil la prezența diuronului*

27 Întrucât performanțele biosenzorului sunt dependente de selectivitatea și sensi-
bilitatea la xenobiotice a materialului biologic, a fost testată inhibiția procesului de fotosinteză
29 în prezența diuronului, la diferite tipuri de cianobacterii. Cele mai bune rezultate s-au obținut
pentru cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803, mutant MscL, care a prezentat o scădere de
31 50% a producției de oxigen, pentru o concentrație de diuron de 30 nM ($CI_{50} = 30nM$).

În fig. 2, se poate observa stratul de cianobacterii i, deplus peste stratul de polipirol
33 h, pe perechea de metalizări care reprezintă microelectrodul de lucru. Depunerea se face
din soluție apoasă, care este cuantificată prin tehnici de dozare. Fixarea pe microelectrod
35 a cianobacteriilor se obține prin procedee de uscare, o cantitate de cianobacterii fiind prinsă
în structura poroasă a polipirolului. Materialul biologic nefixat în structura polipirolului este
37 îndepărtat prin spălare.

RO 123508 B1

Revendicări

1. Microbiosenzor pentru detecția și monitorizarea diuronului în probe de mediu apos, bazat pe inhibiția procesului de fotosinteză la cianobacterii, **caracterizat prin aceea că este constituit din:**
- un microtraductor amperometric, realizat pe un cip din Si, având pe substratul din Si (a), 3 straturi dielectrice, din SiO₂ (b), Si₃N₄ (c) și Al₂O₃ (d), și pe acestea, realizați 3 microelectrozi, un electrod de lucru (1), sub forma unei perechi de electrozi având forma de pieptene, un electrod de referință (2) și un contraelectrod (3), electrodul de lucru (1) și contraelectrodul (3) fiind realizați din 2 straturi metalice, din Ti (e) și Pt (f), iar electrodul de referință (2), având o poziție centrală între electrodul de lucru (1) și contraelectrodul (3), fiind realizat dintr-un strat din Ti (e) și unul din Ag/AgCl(g);
 - un material de interfațare între microelectrodul de lucru și materialul biologic realizat din polipirol (h);
 - un material biologic, sensibil la prezența diuronului (i), realizat cu cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803, mutant MscL, depus peste stratul de polipirol, pe perechea de metalizări care reprezintă microelectrodul de lucru.
2. Procedeu de realizare a microbiosenzorului pentru detecția și monitorizarea diuronului în probe de mediu apos, bazat pe inhibiția procesului de fotosinteză la cianobacterii, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**
- se realizează microtraductorul amperometric prin depuneri succesive, pe substratul din Si (a), a celor 3 straturi dielectrice, din SiO₂ (b), Si₃N₄ (c) și Al₂O₃ (d), stratul de SiO₂ (b) fiind realizat prin oxidare termică, stratul din Si₃N₄ (c) prin tehnici CVD, iar stratul din Al₂O₃ (d) fiind realizat în 2 etape, depunerea unui strat din Al prin evaporare în vid și oxidarea anodică a acestuia, după care urmează confecționarea celor 3 microelectrozi, electrodul de lucru (1), electrodul de referință (2) și contraelectrodul (3), care se realizează prin depunerea straturilor de metalizare prin evaporare în vid și tehnici de fotolitografie, electrodul de lucru (1) și contraelectrodul (3) fiind realizați din 2 straturi metalice, din Ti (e) și Pt (f), iar electrodul de referință (2) fiind realizat dintr-un strat din Ti (e) și unul din Ag, acesta din urmă fiind supus unui proces de clorurare cu FeCl₃, pentru obținerea stratului de Ag/AgCl (g);
 - depunerea pe microelectrodul de lucru (1) a materialului de interfațare, realizat din polipirol (h), se face prin polimerizarea electrochimică a pirolului, pentru aceasta fiind folosită, drept celulă electrochimică, însăși cavitatea de lucru a microbiosenzorului și sistemul de microelectrozi al acestuia;
 - depunerea pe stratul de polipirol a materialului biologic sensibil la prezența diuronului, realizat cu cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803, mutant MscL (i), se face din soluție apoasă, cuantificată prin tehnici de dozare, o cantitate de cianobacterii fiind fixată în structura poroasă a polipirolului prin procedee de uscarea, materialul biologic nefixat în acest mod fiind îndepărtat prin spălare.

(51) Int.Cl.

G01N 21/76 (2006.01),

G01N 21/63 (2006.01),

C12Q 1/02 (2006.01),

G01N 27/26 (2006.01)

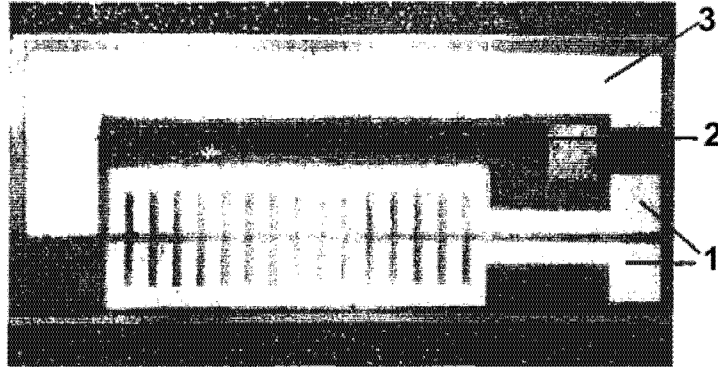


Fig. 1

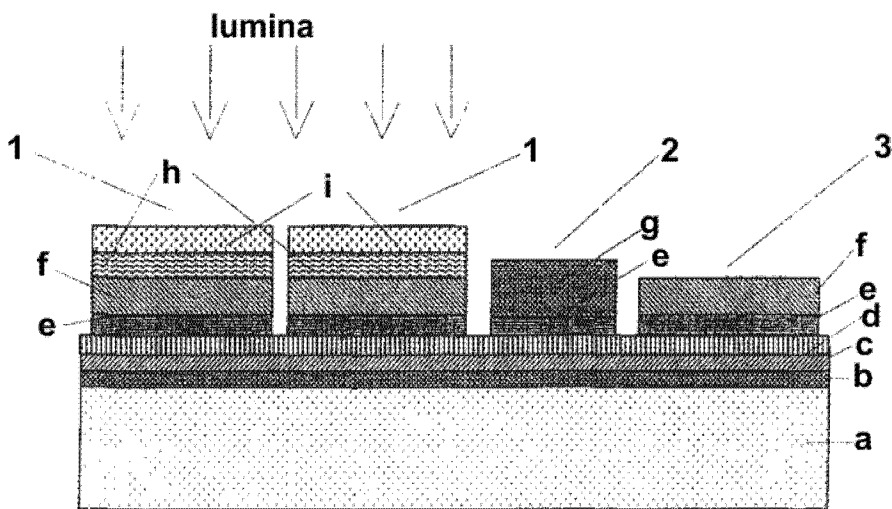


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 9/2013