



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00857**

(22) Data de depozit: **23.10.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.09.2014** BOPI nr. **9/2014**

(41) Data publicării cererii:
29.04.2011 BOPI nr. **4/2011**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA "ȘTEFAN CEL MARE"**
DIN SUCEAVA, STR.UNIVERSITĂȚII NR.13,
SUCEAVA, SV, RO

(72) Inventatori:
• **GUTT ANDREI, STR.VICTORIEI**
NR.185 BIS, SAT SFÂNTU ILIE, SV, RO;

• **GUTT SONIA, STR. VICTORIEI**
NR.185 BIS, SAT SFÂNTU ILIE, SV, RO;
• **GUTT GHEORGHE, STR.VICTORIEI**
NR.185 BIS, SAT SFÂNTU ILIE, SV, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 125798 A2; EP 0145398 A2;
RO 113202 B1; RO 111626 B

(54) **BIOSENZOR ENZIMATIC**

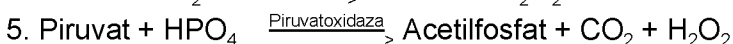
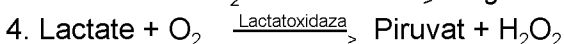
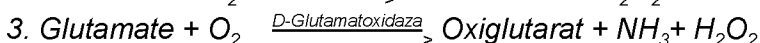
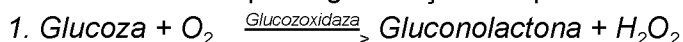


RO 126240 B1

1 Inventția se referă la un biosenzor enzimatic, ce folosește, drept catalizator, enzime
de tip oxidază, destinat determinării rapide și *in situ* a concentrației unor specii chimice sau
3 biologice, fără folosirea de kituri de unică folosință

În vederea determinării rapide și *in situ* a concentrației, a masei sau a grosimii de
5 strat ale unor specii chimice sau biologice, la ora actuală, sunt folosiți biosenzori care repre-
zintă sisteme biologic - electronice, selective, integrate, formate dintr-un receptor biologic
7 activ, un traductor și un sistem electronic de achiziție, prelucrare și afișare date. Receptorul
biologic activ dă informații analitice, specifice, ce permit recunoașterea și determinarea
9 cantitativă sau semicantitativă a unei anumite specii biologice sau chimice dintr-un amestec
complex ce compune materia analizată, componenta biologică, activă, a receptorului, fiind
11 formată dintr-o enzimă, un anticorp, ADN sau chiar din celule întregi. Traductorul transformă
valoarea concentrației unui produs de reacție sau a masei unei specii biologice într-o mărime
13 electrică proporțională. Sistemul electronic de achiziție, prelucrare și afișare date amplifică
semnalul electric al traductorului, îl convertește pe baza unei curbe de calibrare, memorată
15 electronic, în unități de concentrație, pe care le afișează pe display.

Mai jos, sunt redată reacțiile biochimice care stau la baza principalilor biosenzori din
17 categoria celor care folosesc cataliza enzimatică a produsului urmărit în vederea
transformării acestuia în apă oxigenată și un alt produs de reacție.



Cantiatarea de apă oxigenată rezultată, stoichiometric proporțională cu masa speciei
25 urmărite, poate fi determinată cantitativ pe cale amperometrică sau pe cale conductometrică,
transformarea valorilor de curent sau de conductivitate în unități de concentrație făcându-se
27 automat, printr-o curbă de calibrare, memorată în microprocesorul aparatului. Cel mai
reprezentativ biosenzor enzimatic este cel de glucoză, folosit la scară largă, pentru
29 determinarea rapidă a glucozei din sânge, la diabetici și la sportivi. În acest scop, este
necesară doar o singură picătură de sânge, ce se aduce pe un suport din plastic, de unică
31 utilizare, pe care se găsesc doi electrozi și o depunere uscată a unui gel polimeric,
electroconducător, ce conține o anumită cantitate de glucozoxidază, care are rol catalitic, în
33 transformarea, în câteva secunde, a glucozei, din picătura de sânge, în gluconolactonă și
apă oxigenată, conform reacției 1. Aplicarea din partea electronică a unei tensiuni continue
35 și constante celor doi electrozi permite ca, din valoarea medie a curentului de electroliză,
instalat și a legii lui Faraday, să se determine cantitatea de apă oxigenată, rezultată din
37 reacție, care, la rândul ei, conform stoichiometriei proceselor chimice și electrochimice și a
reacției 1, de mai sus, este o măsură a concentrației glucozei din sânge. Același principiu
39 se aplică și la un biosenzor pentru determinarea unor procente mai mari de glucoză, cum
sunt cele din procesele fermentative, cu circa 10...15% glucoză, evident biocatalizatorul
41 glucozoxidază având, în acest caz, o participare masică mai mare.

Dezavantajul principal al biosenzorilor cu kituri de unică utilizare este prețul acestora,
43 determinat, în cea mai mare parte, de prețul kiturilor de unică folosință și de faptul că
biosenzorii nu sunt universali, în sensul folosirii aceluiași biosenzor la mai multe tipuri de
45 specii chimice de analizat. De asemenea, biosenzorii catalitici, actuali, nu sunt de tip
combinat, în sensul că pot folosi două sau mai multe principii de măsurare concomitent,
47 pentru eliminarea dezavantajelor fiecăruia. Alte dezavantaje țin de faptul că activitatea
catalitică a enzimelor depuse pe suportul polimeric scade pronunțat, în timp, astfel încât

RO 126240 B1

precizia de determinare este diferită, pentru o determinări făcute la începutul perioadei de 1
garanție a acestora, față de una făcută la sfârșitul perioadei de garanție (de obicei un an).
Un alt dezavantaj, care ține tot de precizia determinării, constă în faptul că, la aceste tipuri 3
de biosenzori, volumul materiei lichide de analizat, aplicată pe kitul de unică utilizare, nu este
constant, din cauza imposibilității controlării precise a acestui volum și a scurgerii soluției de 5
pe kit. La biosenzorii catalitici, ceea ce trebuie precis dozată este specia chimică de analizat,
enzima trebuind să fie în exces, astfel încât aceasta să catalizeze, în timpul prescris, reacția. 7
În realitate, este exact invers, pe kit, producătorul acestuia asigură o doză bine dozată de
enzimă, în schimb, volumul speciei de analizat nu poate fi precis dozat, ceea ce se reflectă 9
în erori de măsurare, destul de mari.

La ora actuală, există cereri mari de biosenzori industriali și medicali atât pentru glu- 11
coză, cât și pentru alte specii de tipul celor arătate în reacțiile de mai sus. Profitul înregistrat
cu folosirea kitului de unică utilizare este însă atât de mare, încât producătorii de biosenzori 13
s-au orientat cu toții spre această formă de aplicație, încercând, totodată, și acreditarea ideii
că este singura posibilitate viabilă din punct de vedere tehnic. Industria și laboratoarele de 15
specialitate, unde se fac sute de analize pe zi, solicită în schimb biosenzori fără kituri de
unică utilizare, exploatarea acestora fiind mult mai economică, dar și mai bine controlabilă 17
din punct de vedere al preciziei, al sensibilității și al limitei de detecție.

Se cunosc, din stadiul tehnicii, diferite variante constructive ale senzorilor enzimatici, 19
bazate pe reacții electrochimice.

Astfel, din cererea de brevet de invenție a **2008 00285 (RO 125798)**, cu titlul "Biosenzor", 21
se cunoaște un senzor de bioluminescență, destinat convertirii valorii luminescenței unei specii
biologice, dintr-o probă, într-o tensiune proporțională cu această valoare, în scopul determinării, 23
identificării și dozării rapide a speciei. Senzorul de bioluminescență, conform invenției, este
conceput sub forma unei structuri compacte, formată dintr-un corp (1) cilindric cav, care conține 25
o lentilă (2) colectoare, un filtru de interferență (3) și un detector CCD (4) de mare sensibilitate,
la partea superioară a structurii fiind amplasat un capac (5) prevăzut cu electronica (6) de 27
interfațare cu un laptop, iar la partea inferioară fiind montat un capac (7, 8 sau 9) interschim-
babil, folosit în funcție de starea de agregare a probei de analizat. 29

Din cererea de brevet de invenție **EP 0145398 A2**, cu titlul "Senzor de maltoză", se 31
cunoaște un senzor pentru maltoză, care cuprinde o membrană enzimatică în care este
imobilizată alfa-glucozidaza și glucoz-oxidaza și un electrod, electrodul fiind un electrod de
peroxid de hidrogen, prevăzut cu un catod de paladiu. 33

Din cererea de brevet de invenție **RO 113202B (D3)**, cu titlul "Senzor chimic și 35
procedeu de obținere a acestuia", se cunoaște un senzor chimic, constituit din 1,5...2,5%
extract de colagen de tip acid, cu viscozitate intrinsecă de 12,5...18,5 dl/g, 2...4%
poliacrilamidă, cu grad de hidroliză cuprins între 20 și 40%, și masă moleculară 37
500000...1000000, și care este reticulată cu 0,2...0,8% N,N-metilenbisacrilamidă, 0,1...1%
persulfat de amoniu, 2...5% fosfat monosodic și până la 100% apă distilată. Procedeu de 39
obținere a senzorului constă în aceea că extractul în acid acetic 0,5 M se amestecă cu
soluția de poliacrilamidă în acid acetic 0,5 M, de concentrație 2...4%, se adaugă 10 vol. 41
soluție acid acetic 0,5 M, care conține N,N-metilenbisacrilamidă, 0,1...1% persulfat de
amoniu, 2...5% fosfat monosodic, amestecul obținut se menține la 30...40°C, timp de 16...24 43
h, după care se dializează contra apei distilate, timp de 72 h, și (D3) anexate, în copie,
prezentei notificări. 45

Din brevetul de invenție **RO 111626 B**, cu titlul "Senzor de oxigen electrochimic", se 47
cunoaște un senzor de oxigen electrochimic, utilizat pentru controlul concentrației de oxigen
din gazele de eșapament, la autoturisme alimentate cu benzină, prin carburator sau injecție.

RO 126240 B1

1 Senzorul conform invenției este compus dintr-un corp metalic (1), realizat dintr-o singură
bucată care comportă o parte cilindrică (1a), o parte hexagonală (1b), o parte filetată (1c) și
3 o teacă de protecție (1d), și prezintă, în interior, o porțiune conică în care se poziționează
celula de măsură (2), alcătuită din celulă ceramică electrolit, în forma unui tub cu un capăt
5 închis, realizată din material pe bază de oxid de zirconiu stabilizat cu 6 mol% oxid de ytriu,
electrozi poroși din platină (4) și un strat ceramic protector (5) din material spinel de
7 magneziu, celula de măsură (2) fiind etanșată de corpul metalic (1) cu ajutorul a două șaibe
(6) și cu pulbere din amestec de grafit coloidal cu cupru (7), și în care se introduce un
9 electrod central metalic (8), izolat față de corpul metalic (1) printr-o componentă ceramică
izolatoare (9) și care se aduce în contact ferm cu electrodul interior al celulei prin proces de
11 sertizare și de formare a capacului de protecție (10), de corpul metalic (1), cu ajutorul unor
elemente elastice (11).

13 Autorilor nu le sunt cunoscute realizări sau inițiative privind construcția de biosenzori
enzimatici, cu detecție combinată: amperometric- conductometric, utilizabili universal la mai
15 multe tipuri de specii de analizat, ce folosesc cataliza enzimatică, fără utilizarea de kituri de
unică folosință.

17 Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, constă în realizarea unui biosenzor
enzimatic, fără folosirea de kituri de unică utilizare. Biosenzorul este combinat de tip ampero-
19 metric-conductometric și totodată universal, putând fi folosit la analiza cantitativă a mai
multor specii chimice.

21 În acest scop, este folosită o structură portabilă, ce conține, în partea inferioară, o
cuvă miniaturală cu doi electrozi din platină, în care se dozează, dintr-o capsulă din plastic,
23 sigilată, folosind un sistem de pompare peristaltic cu o singură rotire, un anumit volum de
enzimă de tip oxidază lichidă, după care se dozează precis, folosind un dispenser electronic
25 manual sau o pipetă de precizie, un anumit volum prestabilit de materie lichidă de analizat.
În cuva biosenzorului, are loc reacția biochimică a speciei analizate și totodată electrolizarea
27 cantității de apă oxigenată, rezultată din reacție. Folosind ca bază legea lui Faraday și o
curbă de calibrare, memorată electronic, microprocesorul unității electronice a biosenzorului
29 convertește valoarea medie a curentului de electroliză în unități de concentrație a speciei
analizate pe care le afișează automat pe display.

31 Astfel, invenția se referă la un biosenzor enzimatic, utilizabil pentru reacții catalizate
de oxidaze și având detecție combinată de tip amperometric-conductometric, destinat deter-
33 minării rapide și *in situ* a concentrației unor specii chimice sau biologice, cu ajutorul unei
structuri de dozare-măsurare, format dintr-un corp 1, în care se găsește o unitate 2, elec-
35 tronică, de achiziție, prelucrare și afișare date, o unitate 3, electronică, amperometrică, pentru
măsurarea curentului de electroliză, o unitate 4, electronică, conductometrică, pentru măsu-
37 rarea conductivității electrice, o tastatură 5, pentru programarea aplicațiilor cu enzime diferite,
care mai cuprinde un sistem de dozare, compus dintr-o capsulă 6, din plastic, ce conține
39 soluția de oxidază, un furtun 10, siliconic, subțire, prin care se face transferul și dozarea unei
anumite cantități de oxidază, la rotația manuală a unui cilindru 11, sprijinit excentric, o tijă 13,
41 prevăzută, la partea inferioară, cu doi electrozi 14 și 15, semicirculari, din platină, pentru
măsurări concomitente amperometrice și conductometrice, o cuvă 17, miniaturală, detașabilă,
43 ce constituie camera de reacție, volumul soluției de analizat fiind introdus în cuva 17,
miniaturală, detașabilă, prin intermediul vârfului unei pipete 21, de dozare, sau a unui dozator
45 electronic, manual, datele fiind transmise la unitatea 2.

Prin aplicarea invenției. se obțin următoarele avantaje:
47 - se realizează un biosenzor economic, prin se eliminarea kiturilor de unică folosință;
- se pune baza pentru producerea unui biosenzor universal și fiabil, utilizabil pe termen
49 lung, la toate tipurile de reacții catalizate prin enzime de tip oxidaze;

RO 126240 B1

- prin folosirea concomitentă, în cadrul aceleiași determinări, atât a metodei amperometrice, cât și a celei conductometrice, crește precizia măsurătorilor, existând posibilitatea eliminării erorilor specifice fiecărei metode;	1
- soluțiile constructive ale biosenzorului permit o productivitate ridicată la analiză;	3
- crește precizia de determinare, datorită posibilității dozării volumetrică, precise, a cantității de materie lichidă de analizat, transformată de oxidază în produse de reacție;	5
- crește precizia de determinare, prin păstrarea oxidazelor în capsule din plastic sigilate și prin posibilitatea verificării periodice și rapide a activității catalitice a acestora.	7
Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1, 2 și 3, care reprezintă:	9
- fig. 1, vedere în secțiune a biosenzorului enzimatic;	11
- fig. 2, vedere laterală și din față a biosenzorului enzimatic;	
- fig. 3, schema de principiu a măsurării amperometrice și conductometrice a concentrației speciei urmărite, folosind biosenzorul conform invenției.	13
Biosenzorul enzimatic, conform invenției și a fig. 1, 2 și 3, este format dintr-un corp 1 , în care se găsește o unitate 2 , electronică, de achiziție, prelucrare și afișare date, o unitate 3 , electronică, amperometrică, pentru măsurarea curentului de electroliză, o unitate 4 , electronică, conductometrică, pentru măsurarea conductivității electrolitului, o tastatură 5 , pentru programarea aplicațiilor cu enzime diferite, un sistem de dozare peristaltică, pentru soluția ce conține o enzimă de tip oxidază, compus, la rândul lui, dintr-o capsulă 6 , din plastic, ce conține o soluție de oxidază, un șurub 7 , randalinat la partea superioară și cav la partea inferioară, un sistem 8 , de perforare, prevăzut, la partea superioară, cu un perforator p , pentru tăierea foliei f , termosudată, folosită pentru închiderea ermetică a capsulei 6 , din plastic, iar la partea inferioară, cu un con c și o piuliță 9 , pentru strângerea și etanșarea unui furtun 10 , siliconic, subțire, prin care se realizează transferul oxidazei, un cilindru 11 , acționat manual, sprijinit excentric și cu rotație excentrică, prevăzut cu un locaș conic, pentru plasarea cilindrului 11 pe poziția obturat a furtunului 10 și acționat manual cu un buton b , un clichet 12 , cu arc de compresie și bilă. În corpul 1 , se mai găsește cuplată prin apăsare o tijă 13 , prevăzută, la partea inferioară, cu doi electrozi 14 și 15 , semicirculari, din platină, pentru măsurare amperometrică și conductometrică, un con 16 , perforat, pentru fixarea și strângerea furtunului 10 , o cuvă 17 , miniaturală, polimerică, detașabilă prin desfiletare, ce constituie camera de reacție, și, la partea superioară, cu două contacte 18 și 19 , și un locaș de fixare elastică a tijeii 13 , prin intermediul unui clichet 20 , cu bilă și arc de compresie, reperul 21 este extern biosenzorului, poate fi o pipetă sau un dozator electronic de tip dispenser și folosește pentru dozarea precisă a unui anumit volum prescris din soluția de analizat în cuva 17 , miniaturală, ce constituie camera de reacție a biosenzorului.	15
Modul de lucru cu biosenzorul este următorul: se desfilează la maximum șurubul 7 , randalinat și cav, după care se întoarce aparatul cu 180° față de poziția normală de lucru, se așază capsula cu oxidază în cavitatea șurubului 7 , după care acesta se strânge cu mâna, până când este opusă o rezistență mecanică sensibilă, ceea ce înseamnă că folia termosudată a capsulei 6 a fost perforată de cuțitul p , al reperului 8 , iar gâtul capsulei 6 a realizat etanșarea cu reperul 8 . În continuare, se întoarce din nou biosenzorul în poziția de lucru și se desfilează cuva 17 , miniaturală, de pe tija 13 , se execută, prin intermediul butonului b , câteva rotații complete spre dreapta a cilindrului 11 , sprijinit excentric, până când, pe conul 16 , perforat, apare o picătură de oxidază. După aceste operații, se înfiletează la loc cuva 17 , miniaturală, se mai execută o rotație completă a cilindrului excentric, în vederea dozării, prin sistemul peristaltic, a volumului necesar de oxidază în cuva 17 , miniaturală, cu oprirea	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 126240 B1

1 cilindrului **11** pe poziția de obturare completă a furtunului siliconic, poziție sesizată prin
săgeata indicatoare de pe butonul **b**, de rotire, dar și prin clicul bilei clichetului **12**. Urmează
3 dozarea, în cuva **17**, miniaturală, a volumului prescris pentru specia de analizat, cu vârful unei
pipete **21**, de dozare, sau a unui dozator electronic manual, după care aparatul se ține în
5 poziție verticală și se urmărește afișajul digital. Declanșarea reacției catalizate duce la apariția
primelor cantități de apă oxigenată, un prag minim al concentrației acesteia provoacă inițierea
7 automată a măsurătorilor amperometrice și conductometrice, acestea desfășurându-se în
mod alternativ, prin comutare electronică, automată, de la un procedeu de măsurare la celălalt.
9 După 20 sec, este afișată valoarea concentrației, rezultată din media a zeci de măsurători
amperometrice și conductometrice, prelucrate statistic de microprocesorul biosenzorului.
11 Volumul unei capsule de oxidază ajunge pentru sute de determinări, între două determinări
cu aceeași oxidază, nu este necesară decât spălarea sub jet de apă a cuvei **17**, miniaturale.
13 La schimbarea tipului de oxidază, se spală tot traseul, folosind, în acest scop, o capsulă cu
apă bidistilată, care se fixează precum s-a descris deja, pe corpul **1**, al biosenzorului, și se
15 execută mai multe rotații complete ale cilindrului **11**, prin intermediul butonului **b**, în vederea
pompării apei de spălare prin circuitul de dozare. La aplicații specifice, unde volumul de
17 oxidaze dozat este diferit față de aplicația precedentă sau dacă furtunul este uzat, este
necesară înlocuirea furtunului **10**, siliconic și, pentru aceasta, se desface piulița de pe partea
19 opusă butonului **b**, de acționare a cilindrului **11**, după care acesta se extrage din corpul **1**,
al biosenzorului, urmează întoarcerea aparatului cu 180° față de poziția normală de lucru,
21 desfiletarea șurubului **7**, extragerea capsulei **6** și a reperului **8** din locașul lui, desfiletarea
completă a piuliței **9**, extragerea furtunului siliconic de pe reperul **8**, urmată de extragerea
23 tijei **13** din corpul **1**, extragerea conului **16** din tija **13**, scoaterea furtunului **10** de pe conul **16**.
La montarea noului furtun siliconic, operațiile se repetă în sens invers celor de la demontarea
25 furtunului **10**, siliconic, cilindrul **11** fiind înlocuit cu altul cu excentricitatea corespunzătoare
noului diametru de furtun **10**, siliconic. Din cauza faptului că o supradozare cu oxidază nu
27 este critică, la necesitatea unor volume mai mari ale acesteia, corespunzătoare unor con-
centrații mai ridicate de materie analizată, se poate apela și la mai multe dozări repetate, una
29 după alta, de oxidază, fără a înlocui furtunul existent cu altul de diametru mai mare.

RO 126240 B1

Revendicare

	1
Biosenzor enzimatic, utilizabil pentru reacții catalizate de oxidaze și având detecție combinată de tip amperometric-conductometric, destinat determinării rapide și <i>in situ</i> a concentrației unor specii chimice sau biologice, cu ajutorul unei structuri de dozare-măsurare, format dintr-un corp (1) în care se găsește o unitate (2) electronică de achiziție, prelucrare și afișare date, o unitate (3) electronică, amperometrică, pentru măsurarea curentului de electroliză, o unitate (4) electronică, conductometrică, pentru măsurarea conductivității electrice, o tastatură (5) pentru programarea aplicațiilor cu enzime diferite, caracterizat prin aceea că , mai cuprinde un sistem de dozare, compus dintr-o capsulă (6) din plastic ce conține soluția de oxidază, un furtun (10) siliconic, subțire, prin care se face transferul și dozarea unei anumite cantități de oxidază, la rotația manuală a unui cilindru (11) sprijinit excentric, o tijă (13) prevăzută la partea inferioară cu doi electrozi (14 și 15) semicirculari, din platină, pentru măsurări concomitente amperometrice și conductometrice, o cuvă (17) miniaturală, detașabilă, ce constituie camera de reacție, volumul soluției de analizat fiind introdus în cuva (17) miniaturală, detașabilă, prin intermediul vârfului unei pipete (21) de dozare sau a unui dozator electronic, manual, datele fiind transmise la unitatea (2).	3 5 7 9 11 13 15 17

(51) Int.Cl.
 G01N 25/22 (2006.01),
 G01N 27/327 (2006.01)

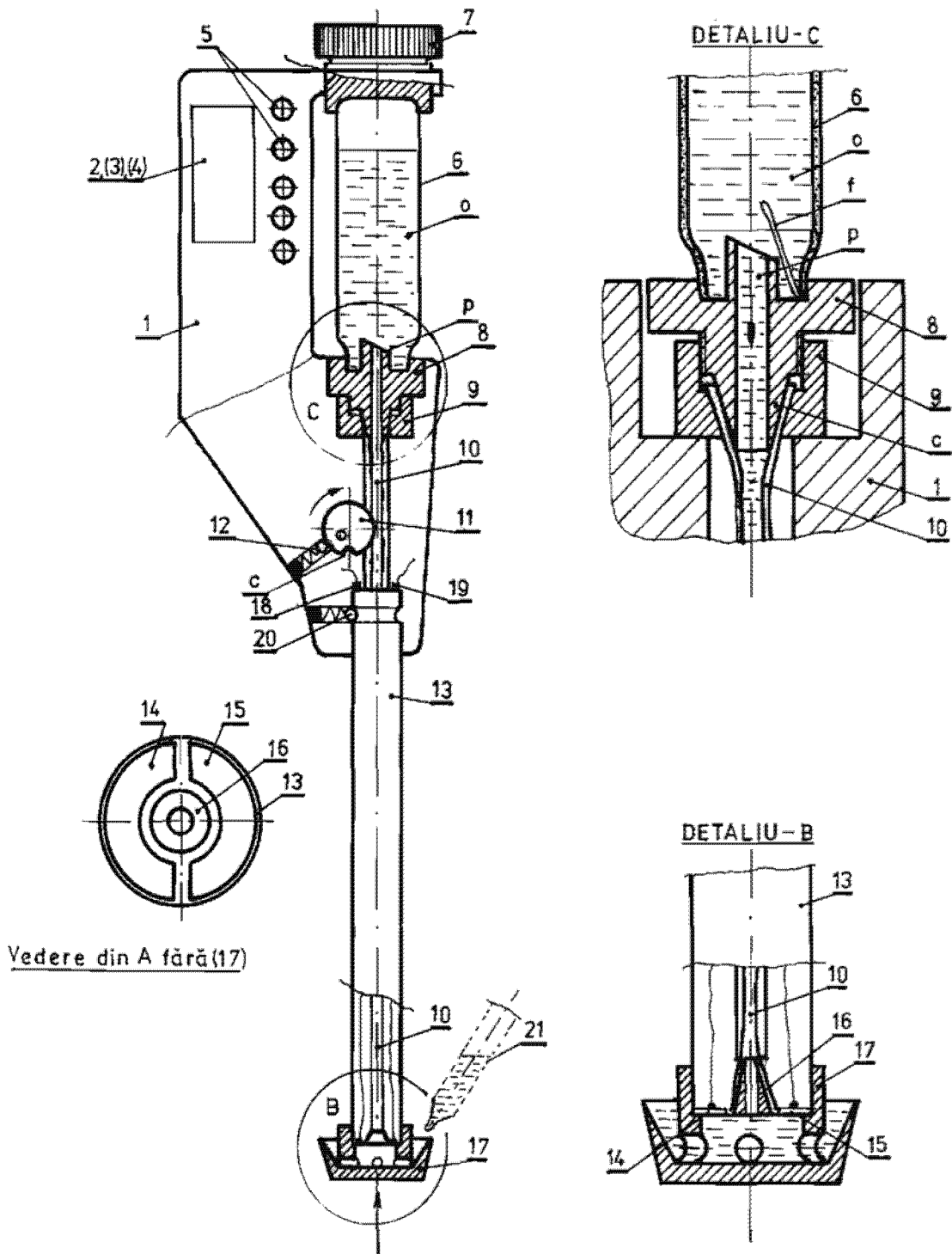


Fig. 1

(51) Int.Cl.
 G01N 25/22 (2006.01)
 G01N 27/327 (2006.01)

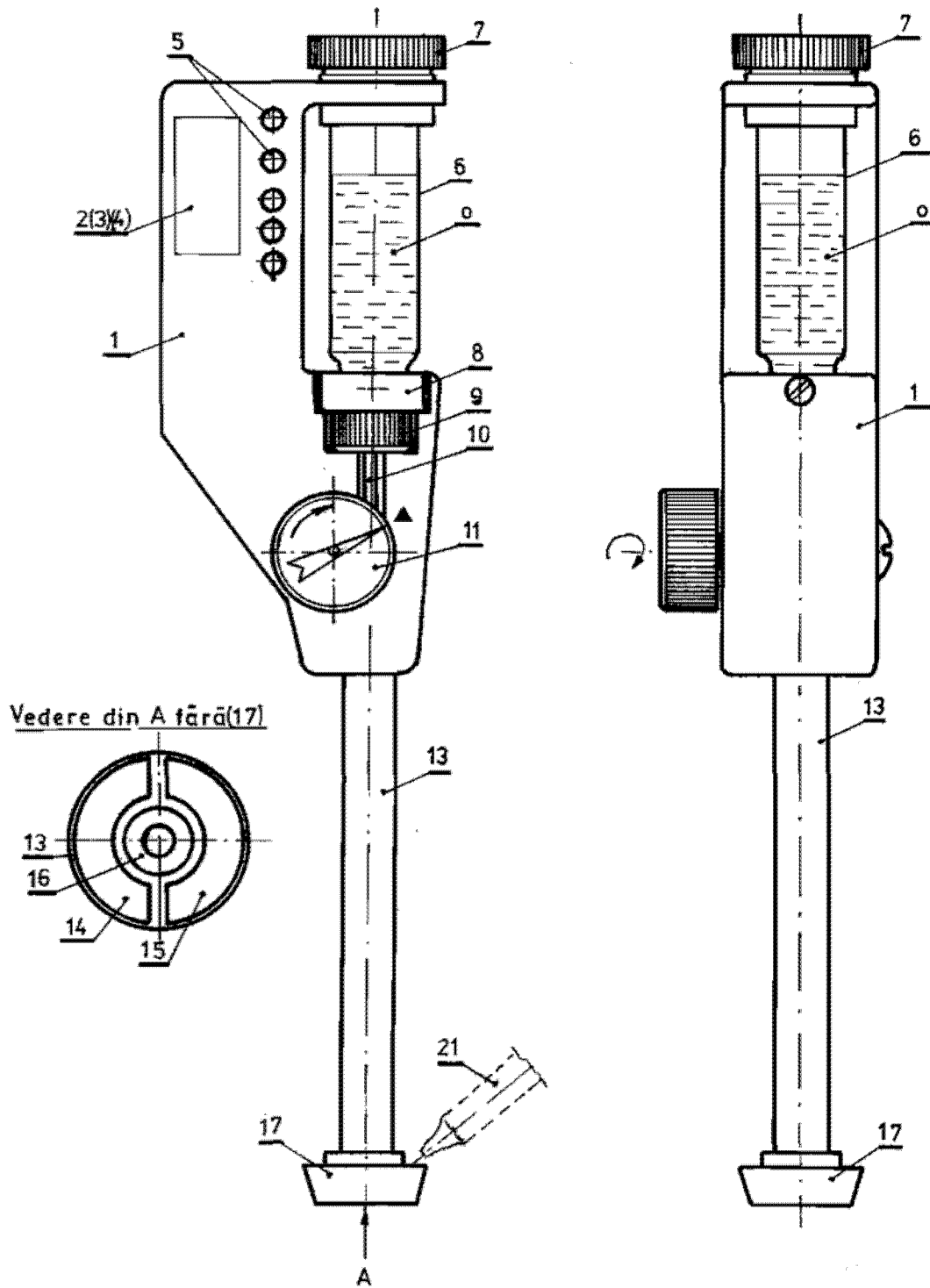


Fig. 2

(51) Int.Cl.
G01N 25/22 (2006.01),
G01N 27/327 (2006.01)

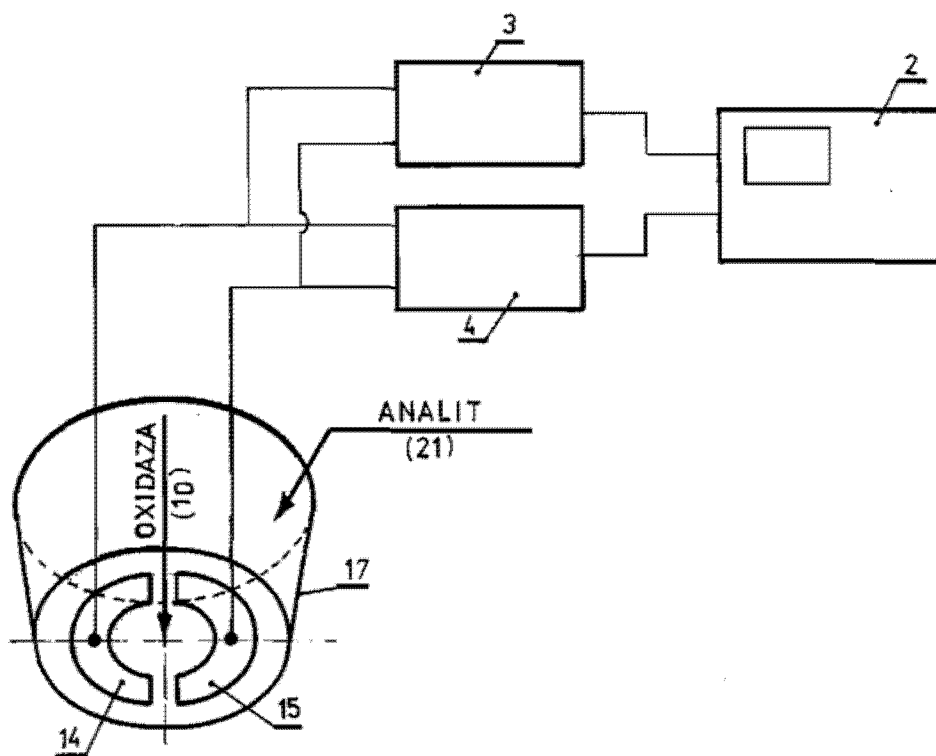


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 642/2014