



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00925

(22) Data de depozit: 03.12.2012

(41) Data publicării cererii:
28.06.2013 BOPI nr. 6/2013

(71) Solicitant:
• METAV -CERCETARE DEZVOLTARE
S.R.L., STR.C.A.ROSETTI NR.31, SC.2,
ET.2, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
METALE NEFEROASE ȘI RARE - IMNR,
BD.BIRUIŢEI NR.102,
COMUNA PANTELIMON, IF, RO;
• UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,
STR. M. KOGĂLNICEANU NR. 35-46,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• ROMAN IOAN, STR. ELENA CARAGIANI
NR. 24, BL. 8C, SC. 4, AP. 54, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;

• VASILE EUGENIU, STR. NADA FLORILOR
NR.2, BL.2, SC.2, ET.7, AP.74, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TRUȘCĂ ROXANA, CALEA DOROBANȚI
NR. 111.131, BL. 9, SC. B, AP. 45,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• SOARE MARIA LAURA, ALEEA FETEȘTI
NR. 6-12, BL. 126, SC. D, AP. 50,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• FRĂȚILĂ CORNELIU VASILE,
STR.SCHITU MĂGUREANU NR.3, ET.1,
AP.12B, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• DINISCHIOTU ANCA, CALEA MOȘILOR
NR.124 A, SC.1, ET.1, AP.2,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• STAN MIRUNA, STR. LACUL TEI NR. 113,
BL. 6B, SC. 2, AP. 64, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) ELECTROD ȘI SENZOR ELECTROCHIMIC PENTRU
MĂSURAREA DIRECTĂ A CONȚINUTULUI DE FOSFATAZĂ
ALCALINĂ DIN SOLUȚII ÎN SCOPURI BIOMEDICALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un electrod nanostructurat sensibil, și la un senzor impedimetric de măsurare directă a conținutului de fosfatază alcalină din fluide biologice, cum este serul uman, în scopuri biomedicale. Electrocul conform invenției este constituit dintr-un film (2) de nanotuburi de bioxid de titan, crescut anodic pe titan (3), tratat termic în aer la 550°C, și acoperit cu aur (4) în vid, iar senzorul conform invenției are trei electrozi (un electrod sensibil, un contraelectrod de platină și un electrod de referință) și un bloc electronic, pentru spectrometrie de impedanță electrochimică, destinat măsurării directe a conținutului de fosfatază alcalină din soluții, până la concentrații de 50 ng/mL.

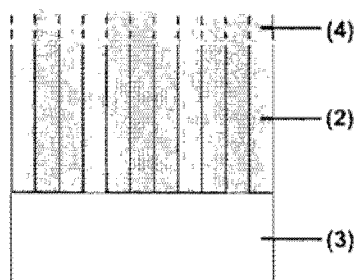


Fig. 1

Revendicări: 2
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Descrierea invenției

Invenția „Electrod și senzor electrochimic pentru măsurarea directă a conținutului de fosfatază alcalină din soluții în scopuri biomedicale” se referă la un electrod nanostructurat sensibil și la un senzor impedimetric de măsurare directă a conținutului de fosfatază alcalină (FA) din fluide biologice, cum este serul uman.

FA este un grup de enzime localizate mai ales în ficat și oase, cantități mai mici găsiindu-se de asemenea și în intestine, placenta și rinichi.

Măsurarea FA se face, de aceea, pentru depistarea unor afecțiuni ale sistemului osos și ale ficatului [1], FA fiind esențială pentru procesele de mineralizare, jucând un rol important în creșterea și dezvoltarea oaselor și dinților [2].

În mod curent determinarea conținutului de FA se face printr-o tehnică spectrofotometrică, descrisă de Mc Comb, o tehnică indirectă, laborioasă și scumpă [3].

Recent au fost propuse și mai multe metode electrochimice de măsurare, bazate pe reacțiile antigen - anticorp sau alte reacții ale FA în soluție [4, 5, 6, 7, 8 și 9], acestea sunt tot metode indirecte și de aceea laborioase și ridică probleme de conservare în timp a performanțelor analitice ale electrodului sensibil, funcționalizat biologic.

Electrodul sensibil nanostructurat și senzorul cu trei electrozi (electrodul sensibil, un contraelectrod din platina și un electrod de referință), cuplați la un bloc electronic pentru spectrometrie de impedanță electrochimică, conform invenției, elimină aceste neajunsuri prin aceea că electrodul sensibil este constituit dintr-un film de nanotuburi de bioxid de titan cu diametrul de 50nm și lungimea de cca 500nm, crescut anodic pe titan, care prezintă o morfologie adecvată aderenței fizice și mecanice a FA prezente în electrolit, aderență ce modifică specific, la concentrații mici, dublul strat electrochimic și permite spectrometriei de impedanță electrochimică să reflecte cantitativ în mod liniar aceste modificări. Filmul este tratat termic în aer la 550°C, timp de două ore, pentru cristalizarea anatasului și rutilului și este aurit în vid timp de 30s, pentru mărirea conductibilității electrice la interfață și datorită proprietăților electrocatalitice ale acestui metal.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- senzorul permite măsurarea electrochimică directă a conținutului de FA din soluții biologice, până la concentrații de 50ng/mL;
- electrodul sensibil nu necesită funcționalizare biologică, este stabil practic nelimitat în timp, nu necesită condiții speciale de stocare și poate fi supus sterilizării fără să i se altereze sensibilitatea;

- costul analizei este redus, numai electrodul sensibil cu film de nanotuburi de bioxid de titan, de 3 - 4 mm², trebuie schimbat de fiecare data;

Se dau, in continuare, doua exemple de realizare a inventiei, in legatura cu figurile 1, 2 3 si 4, care reprezinta electrodul sensibil nanostructurat (1), senzorul impedimetric (9) si curbele de calibrare specifice insotite de diagramele Nyquist ale spectrometriei de impedanta electrochimica efectuate asupra serului uman si respectiv asupra unui extract proteic total, ambele cu continut de FA.

Exemplul 1. Un electrod sensibil nanostructurat constituit dintr-un film de nanotuburi de bioxid de titan (anatas si rutil) cu diametrul de 50nm si lungimea de cca 500nm (2), crescut anodic pe titan (3), tratat termic in aer la 550⁰C, timp de doua ore si aurit in vid, la 2×10^{-3} Pa timp de 30 sec.(4), constituie impreuna cu un contraelectrod din platina (5) si cu un electrod de referinta de calomel saturat (6) o celula electrochimica (7) care este in contact cu o solutie de ser uman ce contine FA umana si este conectata la un bloc electronic pentru spectrometrie de impedanta electrochimica (8) cu care formeaza senzorul. Blocul electronic (8) aplica electrodului sensibil (1) un potential continuu de 0 mV fata de electrodul de referinta de calomel saturat si tensiuni alternative cu frecventa intre 100kHz si 50mHz si amplitudinea 25mV, inregistrand o diagrama Nyquist (10), ce reflecta cantitativ concentratia de FA din electrolit. Curba de calibrare (11), trasata pentru trei concentratii de FA in ser uman arata o dependenta liniara intre concentratii si parametrul R₂, figura 3.

Exemplul 2. Senzorul, la fel cu cel din exemplul anterior, se pune in contact cu o solutie de extract proteic total ce contine FA umana. Se efectueaza spectrometria de impedanta electrochimica, la fel ca in exemplul anterior si se citeste concentratia de FA ca R₂ de pe curba specifica de calibrare (11), figura 4.

Bibliografie

- [1] Moss DW. - *Alkaline phosphatase isoenzymes*, Clin Chem., 28(10), pp.2007-16, 1982;
- [2] Orimo H. - *The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease*, J Nihon Med Sch., 77(1), pp.4-12, 2010;
- [3] McComb, R.B., Bowers, G.N., Posen, S. - *Alkaline phosphatase*, Plenum New York, USA, 1979;
- [4] Shi-Ping RU, Jian WU, Yi-Bin YING, Feng JI - *Electrochemical Detection of Alkaline Phosphatase Using Ionic Liquid Modified Carbon Nanotubes Electrode*, Chinese Journal of Analytical Chemistry, Volume 40, Issue 6, June, pp. 835-840, 2012;
- [5] Miao P, Ning L, Li X, Shu Y, Li G - *An electrochemical alkaline phosphatase biosensor fabricated with two DNA probes coupled with λ exonuclease*, Biosens Bioelectron, Sep 15;27(1), pp.178-82, 2011;
- [6] Pablo Fanjul-Bolado, David Hernández-Santos, María Begoña González-García, Agustín Costa-García - *Alkaline phosphatase-catalyzed silver deposition for electrochemical detection*, Analytical Chemistry 79(14), pp.5272-7, DOI:10.1021/ac070624o, 08/2007;
- [7] Shuichiro Ito, Shin-ichi Yamazaki, Kenji Kano, Tokuji Ikeda - *Highly sensitive electrochemical detection of alkaline phosphatase* Elsevier Analytica Chimica Acta, 424, pp. 57-63, 2000;
- [8] Elizabeth Kelso, John McLean, Marco F. Cardosi - *Electrochemical Detection of Secreted Alkaline Phosphatase: Implications to Cell Based Assays*, Electroanalysis, Volume 12, Issue 7, pages 490-494, May 2000;
- [9] Ho WO, Athey D, McNeil CJ - *Amperometric detection of alkaline phosphatase activity at a horseradish peroxidase enzyme electrode based on activated carbon: potential application to electrochemical immunoassay*, Biosens Bioelectron. Fall;10(8), pp.683-91, 1995

Revendicari

1. Electrode nanostructurat sensibil la fosfataza alcalina, caracterizat prin aceea ca este constituit dintr-un film de nanotuburi de bioxid de titan cu diametrul de cca 50nm si lungimea de cca 500nm (anatas si rutil), crescute anodic pe titan, tratat termic in aer timp de doua ore la 550°C si aurit in vid, la 2×10^{-3} Pa, timp de 30 sec.

2. Senzor impedimetric, destinat masuratorilor biomedicale directe de fosfataza alcalina, compus din electrodul sensibil definit in revendicarea 1, un contraelectrod din platina si un electrode de referinta de calomel saturat, care formeaza celula electrochimica, si un bloc electronic pentru spectrometrie de impedanta electrochimica, care deserveste aceasta celula si care aplica electrodului sensibil un potential continuu de 0 mV fata de electrodul saturat de calomel si tensiuni alternative cu frecvente intre 100kHz si 50mHz si amplitudinea 25mV si inregistreaza o diagrama Nyquist, ce reflecta concentratia de fosfataza alcalina din electrolit.

Desene

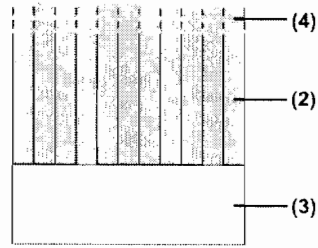


Fig.1 Electrode nanostructurat sensibil la fosfataza alcalina din solutii (1)

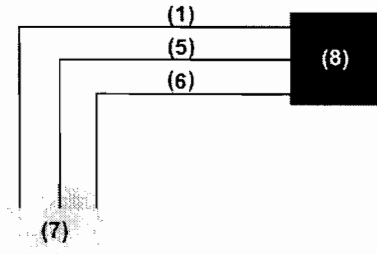


Fig.2 Senzor impedimetric pentru determinarea directa a continutului de fosfataza alcalina din solutii (9)

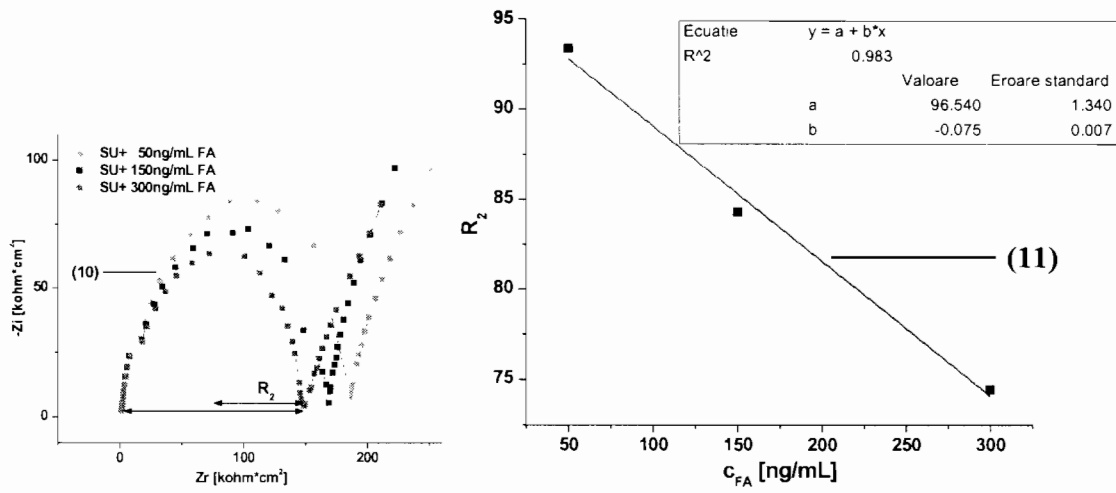


Fig.3 Diagrame Nyquist si curba de calibrare a FA in ser uman

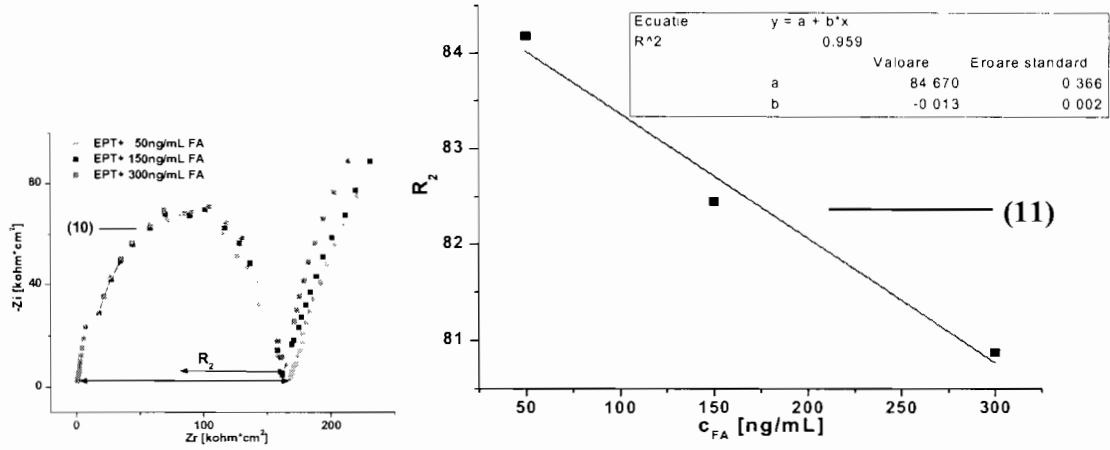


Fig.4 Diagrame Nyquist si curba de calibrare a FA in extract proteic total