



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00925**

(22) Data de depozit: **03/12/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2017** BOPI nr. **8/2017**

(41) Data publicării cererii:
28/06/2013 BOPI nr. **6/2013**

(73) Titular:

- **METAV-CERCETARE DEZVOLTARE S.R.L.**, STR.C.A.ROSETTI NR.31, SC.2, ET. 2, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU METALE NEFEROASE ȘI RARE - IMNR**, BD.BIRUIŢEI NR.102, 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**, 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

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- Z. ZHANG, Y. XIE, Z. LIU, F. RONG, Y. WANG, D. FU**, "COVALENTLY IMMOBILIZED BIOSENSOR BASED ON GOLD NANOPARTICLES MODIFIED TiO₂ NANOTUBE ARRAYS", JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY, VOL. 650, PP. 241-247, 2011; **K. C. POPAT, L. LEONI, C. A. GRIMES, T. A. DESAI**, "INFLUENCE OF ENGINEERED TITANIA NANOTUBULAR SURFACES ON BONE CELLS", BIOMATERIALS, VOL. 28, PP. 3188-3197, 2007

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



RO 128556 B1

1 Invenția 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
3 serul uman.

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

Măsurarea FA se face, de aceea, pentru depistarea unor afecțiuni ale sistemului osos
7 și ale ficatului [Moss DW - "***Alkaline phosphatase isoenzymes***", ***Clin Chem.***, **28 (10)**, pp.
2007-16, 1982], FA fiind esențială pentru procesele de mineralizare, jucând un rol important
9 în creșterea și dezvoltarea oaselor și dinților [Orimo H., - "***The mechanism of
mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease***", ***J Nihon
11 Med Sch.***, **77(1)**, pp. 4-12, 2010].

În mod curent, determinarea conținutului de FA se face printr-o tehnică spectrofoto-
13 metrică, descrisă de Mc Comb, o tehnică indirectă, laborioasă și scumpă [McComb R. B.,
Bowers G. N., Posen S., - "***Alkaline phosphatase***", ***Plenum New York, USA, 1979***].

Recent au fost propuse și mai multe metode electrochimice de măsurare, bazate pe
15 reacțiile antigen - anticorp sau alte reacții ale FA în soluție [Shi-Ping RU, Jian WU, Yi-Bin
YING, Feng JI, - "***Electrochemical Detection of Alkaline Phosphatase Using Ionic
17 Liquid Modified Carbon Nanotubes Electrode***", ***Chinese Journal of Analytical
Chemistry, Volume 40, Issue 6, June***, pp. 835-840, 2012; Miao P., Ning L., Li X, Shu Y,
19 Li G., - "***An electrochemical alkaline phosphatase biosensor fabricated with two DNA
21 probes coupled with λ exonuclease***", ***Biosens Bioelectron***, Sep 15;27 (1), pp. 178-82,
2011; Pablo Fanjul-Bolado, David Hernández-Santos, Maria Begoña González-García,
23 Agustin Costa-García, - "***Alkaline phosphatase-catalyzed silver deposition for
electrochemical detection***", ***Analytical Chemistry*** 79(14), pp. 5272-7,
25 DOI:10.1021/ac070624o, 08/2007; Shuichiro Ito, Shin-ichi Yamazaki, Kenji Kano, Tokuji
Ikeda, - "***Highly sensitive electrochemical detection of alkaline phosphatase***", ***Elsevier
27 Analytica Chimica Acta***, 424, pp. 57-63, 2000; Elizabeth Kelso, John McLean, Marco F.
Cardosi, - "***Electrochemical Detection of Secreted Alkaline Phosphatase: Implications
29 to Cell Based Assays***", ***Electroanalysis, Volume 12, Issue 7***, pp. 490-494, May 2000 și
Ho WO, Athey D, McNeil CJ, - "***Amperometric detection of alkaline phosphatase
31 activity at a horseradish peroxidase enzyme electrode based on activated carbon:
potențial application to electrochemical immunoassay***", ***Biosens Bioelectron.***
33 **Fall;10(8)**, pp. 683-91, 1995], acestea sunt tot metode indirecte și, de aceea, laborioase, și
ridică probleme de conservare în timp a performanțelor analitice ale electrodului sensibil,
35 funcționalizat biologic.

În literatură au fost raportate diferite aplicații pentru suprafețele nanotubulare de
37 TiO₂. De exemplu, Z. Zhang, Y. Xie, Z. Liu, F. Rong, Y. Wang și D. Fu descriu în "***Covalently
immobilized biosensor based on gold nanoparticles modified TiO₂ nanotube arrays***",
39 ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, 2011, vol. 650, pp. 241-247, un biosenzor sensibil
la glucoză, ce are la bază o suprafață de nanotuburi de TiO₂ modificată cu nanoparticule de
41 aur, suprafață funcționalizată prin imobilizarea covalentă a glucozoxidazei. K. C. Popat, L.
Leoni, C. A. Grimes și T. A. Desai prezintă în "***Influence of engineered titania nanotubular
43 surfaces on bone cells***", ***Biomaterials***, 2007, Vol. 28, pp. 3188-3197, un studiu despre
influența suprafețelor nanotubulare de TiO₂ asupra celulelor osoase.

RO 128556 B1

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a măsura în mod direct fosfataza alcalină din soluții biologice.	1
Un prim obiect al invenției este un electrod nanostructurat, sensibil la fosfataza alcalină, constituit dintr-un film de nanotuburi de bioxid de titan, sub formă de anatas și rutil, cu diametrul de 50 nm și lungimea de 500 nm, crescute anodic pe titan, tratat termic în aer timp de 2 h la 550°C, și aurit în vid, la 2×10^{-3} Pa, timp de 30 s.	3 5
Un al doilea obiect al invenției este un senzor impedimetric, destinat măsurătorilor biomedicale directe de fosfatază alcalină, compus din electrodul sensibil amintit, un contraelectrod din platină și un electrod de referință de calomel saturat, care formează celula electrochimică, și un bloc electronic pentru spectrometrie de impedanță electrochimică, ce deservește celula și care aplică electrodului sensibil un potențial continuu de 0 mV față de electrodul saturat de calomel, și tensiuni alternative cu frecvențe între 100 kHz și 50 mHz, și amplitudinea 25 mV, și înregistrează o diagramă Nyquist, ce reflectă concentrația de fosfatază alcalină din electrolit.	7 9 11 13
Invenția prezintă următoarele avantaje:	15
- senzorul permite măsurarea electrochimică directă a conținutului de FA din soluții biologice, până la concentrații de 50 ng/ml;	17
- 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;	19
- costul analizei este redus, numai electrodul sensibil cu film de nanotuburi de bioxid de titan, de 3...4 mm ² , trebuie schimbat de fiecare dată.	21
Electrodul sensibil nanostructurat și senzorul cu trei electrozi (electrodul sensibil, un contraelectrod din platină și un electrod de referință), cuplați la un bloc electronic pentru spectrometrie de impedanță electrochimică, conform invenției, elimină neajunsurile din stadiul tehnicii prin aceea că electrodul sensibil este constituit dintr-un film de nanotuburi de bioxid de titan cu diametrul de 50 nm și lungimea de circa 500 nm, crescut anodic pe titan, care prezintă o morfologie adecvată aderenței fizice și mecanice a FA prezentă în electrolit, aderare 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 2 h, pentru cristalizarea anatasului și rutilului, și este aurit în vid timp de 30 s, pentru mărirea conductibilității electrice la interfață, și datorită proprietăților electrocatalitice ale acestui metal.	23 25 27 29 31 33
Se dau, în continuare, două exemple de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1...4, ce reprezintă electrodul sensibil nanostructurat 1 , senzorul impedimetric 9 și curbele de calibrare specifice, însoțite de diagramele Nyquist ale spectrometriei de impedanță electrochimică efectuate asupra serului uman și, respectiv, asupra unui extract proteic total, ambele cu conținut de FA.	35 37
Exemplul 1	39
Un electrod sensibil nanostructurat, constituit dintr-un film de nanotuburi de bioxid de titan (anatas și rutil) cu diametrul de 50 nm și lungimea de circa 500 nm 2 , crescut anodic pe titan 3 , tratat termic în aer la 550°C, timp de 2 h, și aurit în vid, la 2×10^{-3} Pa, timp de 30 s 4 , constituie, împreună cu un contraelectrod din platină 5 și cu un electrod de referință de calomel saturat 6 , o celulă electrochimică 7 , ce este în contact cu o soluție de ser uman ce conține FA umană, și este conectată la un bloc electronic pentru spectrometrie de impedanță electrochimică 8 , cu care formează senzorul. Blocul electronic 8 aplică electrodului sensibil 1 un potențial continuu de 0 mV față de electrodul de referință de calomel saturat, și tensiuni	41 43 45 47

RO 128556 B1

1 alternative cu frecvența între 100 kHz și 50 mHz, și amplitudinea 25 mV, înregistrând o dia-
gramă Nyquist **10**, ce reflectă cantitativ concentrația de FA din electrolit. Curba de calibrare
3 **11**, trasată pentru trei concentrații de FA în ser uman, arată o dependență liniară între con-
centrații și parametrul R_2 (fig. 3).

5 **Exemplul 2**

7 Senzorul, la fel cu cel din exemplul anterior, se pune în contact cu o soluție de extract
proteic total, ce conține FA umană. Se efectuează spectrometria de impedanță electro-
chimică, la fel ca în exemplul anterior, și se citește concentrația de FA ca R_2 de pe curba
9 specifică de calibrare **11** (fig. 4).

RO 128556 B1

Revendicări

1. Electrode nanostructurate sensibile la fosfataza alcalină (1), **caracterizat prin aceea** 3
că este constituit dintr-un film (2) de nanotuburi de bioxid de titan, sub formă de anatas și 5
rutil, cu diametrul de 50 nm și lungimea de 500 nm, crescute anodic pe titan (3), tratat termic
în aer timp de 2 h la 550°C, și aurit (4) în vid, la 2×10^{-3} Pa, timp de 30 s. 7
2. Senzor impedimetric (9), destinat măsurătorilor biomedicale directe de fosfatază 7
alcalină, compus din electrodul sensibil (1) definit în revendicarea 1, un contraelectrod din
platină (5) și un electrod de referință, de calomel saturat (6), care formează celula electro- 9
chimică (7), și un bloc electronic (8) pentru spectrometrie de impedanță electrochimică, ce
deservește celula (7) și care aplică electrodului sensibil (1) un potențial continuu de 0 mV 11
față de electrodul saturat de calomel (6), și tensiuni alternative cu frecvențe între 100 kHz
și 50 mHz, și amplitudinea 25 mV, și înregistrează o diagramă Nyquist, ce reflectă concen- 13
trația de fosfatază alcalină din electrolit.

(51) Int.Cl.

G01N 27/30 (2006.01);

G01N 33/535 (2006.01)

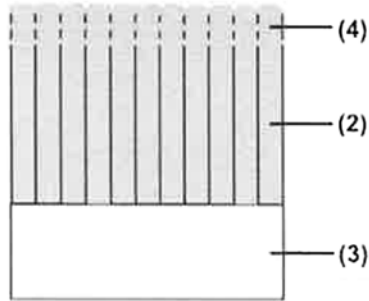


Fig. 1

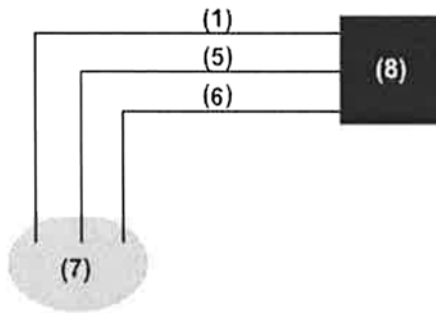


Fig. 2

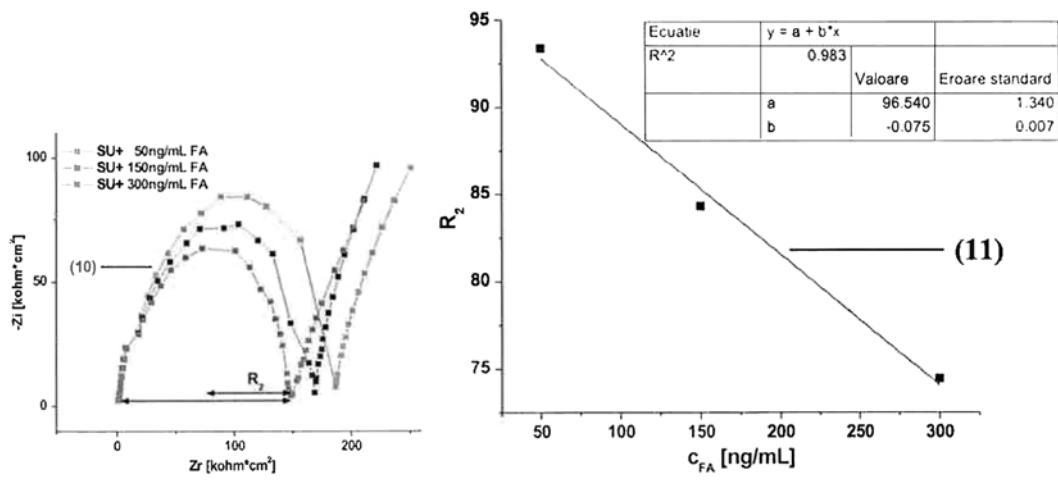


Fig. 3

(51) Int.Cl.

G01N 27/30 (2006.01),

G01N 33/535 (2006.01)

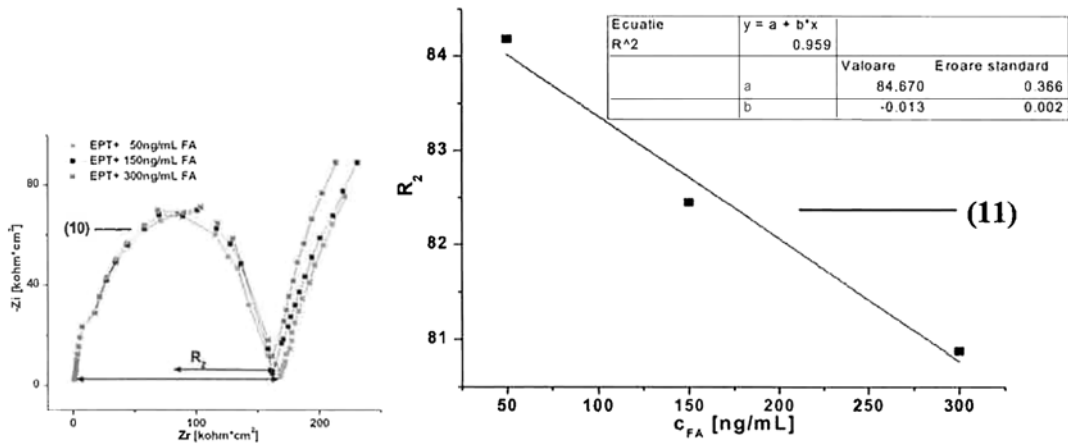


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 381/2017