



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00680**

(22) Data de depozit: **21/09/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2020** BOPI nr. **3/2020**

(41) Data publicării cererii:  
**30/05/2016** BOPI nr. **5/2016**

(73) Titular:

- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE BIOLOGICE BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ "ILIE MURGULESCU" AL ACADEMIEI ROMÂNE, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 202, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **LITESCU SIMONA CARMEN, STR. AZURULUI 1, 113B, SC. 1, ET. 7, AP. 45, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **VASILESCU IOANA IULIANA MIHAELA, STR. MĂRGEANULUI NR. 8, BL. M68, SC. 2, ET. 6, AP. 62, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **RADU GABRIEL LUCIAN, ALEEA ROTUNDĂ NR.4, BL.H6, SC.D, AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

- **BALINT IOAN, STR. BĂBEȘTI NR. 8, AP.2, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **PAPA FLORICA, CALEA FLOREASCA NR. 94, AP.2, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **STATE RAZVAN NICOLAE, BD. UVERTURII NR. 85, BL. O14, AP. 60, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- AFSANEH SAFAVI, FATEMEH FARJAMI, "ELECTRODEPOSITION OF GOLD-PLATINUM ALLOY NANOPARTICLES ON IONIC LIQUID-CHITOSAN COMPOSITE FILM AND ITS APPLICATION IN FABRICATING AN AMPEROMETRIC CHOLESTEROL BIOSENSOR", JOURNALS & BOOKS, BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, NR. 5, VOL. 26, PP. 2547-2552, 2011;**
- MARIA T. GIARDI, MICHAL KOBLIZEK, JIRI MASOJIDEK, "PHOTOSYSTEM II-BASED BIOSENSORS FOR THE DETECTION OF POLLUTANTS", JOURNALS & BOOKS, BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, NR. 9-12, VOL. 16, PP. 1027-1033, 2001**

(54) **BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE TETRAKLORETENĂ DIN APĂ, ȘI METODĂ DE ANALIZĂ UTILIZÂND ACEST BIOSENZOR**



1 Inventția se referă la un biosenzor amperometric utilizat pentru determinarea conținutului de tetracloretenă (PCE) din ape și a metodei de analiză a tetracloretenei utilizând  
3 acest biosenzor. Biosenzorul are ca element de recunoaștere moleculară fotosistemul II, PSII, din celule întregi imobilizate pe suprafețe conductive serigrafiate modificate cu nanoparticule bimetalice de Pt-Au.  
5

Sunt cunoscuți, din articolul **"Electrodeposition of gold–platinum alloy nanoparticles on ionic liquid–chitosan composite film and its application in fabricating an amperometric cholesterol biosensor"**- Afsaneh Safavi, Fatemeh Farjamia- **Biosensors and Bioelectronics**, Vol. 26, 15 January 2011, pp. 2547-2552, biosenzori amperometrici care utilizează nanoparticule bimetalice Pt-Au ca sisteme de modificare a suprafeței conductive cu diferite aplicații potențiale.  
7  
9  
11

De asemenea, este cunoscut, din articolul **"Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants"**- Maria T Giardi, Michal Koblizek, Jiri Masojidek- **Biosensors and Bioelectronics**, Vol 16, 2001, pp. 1027-1033, un complex supramolecular pigment-proteină la nivelul căruia este catalizat fotochimic transferul de electroni de la apa la plastoquinonă (PQ) într-un proces care generează evoluția oxigenului; este cunoscut, de asemenea, faptul ca la nivelul complexului PSII activitatea fotosintetică este inhibată de legarea unor contaminanți ca: ierbicide, metale grele și alte substanțe chimice care afectează activitatea complexului PSII. Este cunoscut ca există sisteme disponibile pentru bio-analiza poluanților care utilizează biosenzori și se bazează pe inhibiția activității fotochimice a PSII.  
13  
15  
17  
19

Se cunosc biosenzori utilizând PS II din diverse surse ca sistem de recunoaștere moleculară pentru diverși poluanți organici: diuron, atrazina, simazine etc. [González-Naranjo, V., Boltes, K., de Bustamante, L, Palacios-Diaz, P., **Environmental Science and Pollution Research**, 22 (9), 2015, 6920-6931, Scognamiglio, V., Stano, P., Polticelli, F., Antonacci, A., Lambreva, M.D., Pochetti, G., Giardi, M.T., Rea, G., **Design and biophysical characterization of atrazine-sensing peptides mimicking the Chlamydomonas reinhardtii plastoquinone binding niche**, **Physical Chemistry Chemical Physics**, 15 (31), 2013, pp. 13108-13115]. Nu au fost niciodată utilizați pentru compuși clorurați cu catenă simplă.  
21  
23  
25  
27

Se cunosc biosenzori fluorimetrici pe bază de PSII pentru determinarea ierbicidelor [Nguyen-Ngoc H, Tran-Minh C. **Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix**. **Analytica Chimica Acta**, Elsevier Masson, 583 (1), 2007, pag. 161-165, Chalifour, A., Spear, P.A., Boily, M.H., DeBlois, C, Giroux, I., Dassylva, N., Juneau, P., **Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll a fluorescence**, **Toxicological and Environmental Chemistry**, 91(7), 2009, pag. 1315-1329]. Nu au fost niciodată utilizați pentru compuși clorurați cu catenă simplă.  
29  
31  
33  
35  
37

Se cunosc biosenzori amperometrici pe bază de fotosistem II, utilizând electrozi serigrafiați (screen-printați) ca suport pentru imobilizare, pentru determinarea ierbicidelor [Kobhzeck M., Maly J, Masojidek J., Komenda J., Kucera T., Giardi M. T, Mattoo A. K., Pilloton R., **A Biosensor for the Detection of Triazine and Phenylurea Herbicides Designed Using Photosystem II Coupled to a Screen-Printed Electrode**, **Biotechnology and Bioengineering**, 78 (1), 2002, 110-116, Husu, I., Rodio, G., Touloupakis, E., Lambreva, M.D., Buonasera, K., Litescu, S.C., Giardi, M.T., Rea, G., **Insights into photoelectrochemical sensing of herbicides driven by Chlamydomonas reinhardtii cells**, **Sensors and Actuators, B: Chemical**, 185, 2013, pp. 321-330]. Nu au fost niciodată utilizați pentru compuși clorurați cu catenă simplă.  
39  
41  
43  
45  
47

# RO 131151 B1

Se cunosc biosenzori amperometrici ce utilizează nanoparticule bimetalice Pt/Au ca sisteme de modificare a suprafețelor conductive cu diferite aplicații potențiale, dar care au la bază alte sisteme de biorecunoaștere moleculară (enzime, ADN, anticorp/antigen etc.) și sunt utilizate în determinarea altor compuși de interes [Cao X., Wang N., Jia S., Guo L., Li K., **Bimetallic AuPt nanochains: Synthesis and their application in electrochemical immunosensor for the detection of carcinoembryonic antigen**, *Biosensors and Bioelectronics*, 39 (1), 2013, pp. 226-230, Hong-Xuan R., Xing-Jiu H., Ju-Hyun K., Yang-Kyu C., Ning G., **Pt/Au bimetallic hierarchical structure with micro/nano-array via photolithography and electrochemical synthesis: From design to GOT and GPT biosensors**, *Talanta*, 78, 2009, pp. 1371-1377].

De asemenea, sunt cunoscute metode de caracterizare electrochimică a tetracloretenei (PCE), fără a se raporta determinarea cantitativă [Sáez V., Esclapez M. D., Frías-Ferrer A., Bonete P., González-García J., **Electrochemical Reduction of Perchloroethylene in Aqueous Media: Influence of the Electrode Material**, *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*, 11, 2008, pp. 287-295].

Se cunosc metode de cuantificare a PCE prin cromatografie de gaz cu detecție mass-spectrometrică [Cheikh Rouhou M., Rheault, I., Haddad, S. **Modulation of trichloroethylene in vitro metabolism by different drugs in rats**, *Toxicology in Vitro* 27 (1), 2013, pp. 34-43], respectiv cu detecție cu ionizare în flacără [Zheng F., Gao B., Sun Y., Shi X., Xu H., Wu J., Gao Y., **Removal of tetrachloroethylene from homogeneous and heterogeneous porous media: Combined effects of surfactant solubilization and oxidant degradation**, *Chemical Engineering Journal*, 283, 2016, pp. 595-603]. Aceste metode pentru caracterizare și, respectiv, determinarea cantitativă a PCE prezintă următoarele dezavantaje:

- metodele electrochimice raportate nu pot fi utilizate în determinarea cantitativă specifică din probe de apă datorită potențialului la care are loc procesul redox, -2,10 V, care conduce la multiple interferențe (de exemplu metale, inclusiv metale grele; antibiotice - cloramfenicolul, compuși fenolici etc.);

- metodele de analiză cromatografice cu detecție specifică implică: durată mare a timpului total de analiză; costurile analizei, care sunt ridicate (echipamentul propriu-zis, consumabile: reactivi, coloane, gaz purtător); aplicabilitate în screening dificilă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în determinarea specifică, rapidă, a tetracloretenei cu consum mic de reactivi.

Rezolvarea determinării specifice, rapide (maximum 10 min timp total de analiză) a tetracloretenei conform invenției se realizează cu un cost redus, cu consum foarte mic de reactivi (sub 50  $\mu$ L) și cu evitarea efectelor de memorie deoarece biosenzorul este de unică determinare (folosință).

Biosenzorul (figura) conform invenției se realizează prin imobilizarea unei cantități specifice, optime, de nanoparticule bimetalice Pt-Au, pe electrodul de lucru din carbon al unei celule electrochimice serigrafiate, urmată de imobilizarea unei cantități de celule întregi de algă care să asigure un conținut de clorofilă A de circa 17 ng pe electrodul de lucru.

Nanoparticulele bimetalice de Pt-Au au fost sintetizate printr-o metodă polioli alcalină modificată. Precursorii de Pt ( $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ ,  $3,8 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ ) și Au ( $\text{HAuCl}_4$ ,  $3,8 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ ), dizolvați în etilen glicol, au fost reduși în două etape succesive în prezența PVP (polivinil pirolidon) la 120 și, respectiv, la 140°C. Raportul molar dintre Pt și Au a fost de 1:1.

# RO 131151 B1

1 Obținerea biosenzorului conform invenției este: 4,2 mg nanoparticulele de Pt-Au au  
fost sonicate timp de 60 min, depuși câte 10  $\mu\text{L}$  pe electrozii de lucru C-SPE și uscați rapid.  
3 Stratul ulterior a fost obținut prin depunerea de 10  $\mu\text{L}$  de celulele de algă (în cazul prezentei  
invenții *Chlamydomonas reinherdti*) asigurându-se o cantitate de clorofilă A de 17 ng/electro-  
5 dul de lucru.

7 Metoda de analiză a tetracloretenei din probe de ape utilizând biosenzorul construit  
se bazează pe măsurarea cantității de oxigen produse de către fotosistemul II în absența  
PCE (când are un maxim) și în prezența PCE (când are o valoare mai mică datorită inhibiției  
9 activității fotosintetice a PSII prin participarea în lanțul de transfer electronic). Cu cât cantita-  
tea de compus clorurat este mai mare, cu atât cantitatea de oxigen produs de către foto-  
11 sistem este mai mică.

13 Metoda de analiză a tetracloretenei utilizând biosenzorul amperometric pe bază de  
nanoparticule bimetalice Pt-Au - algă pentru determinarea PCE, are următoarele caracteristici:

- 15 - tehnică de lucru: cronoamperometrie la potențial controlat;
- 17 - potențial de lucru: - 0,80 V ( $\pm 0,05$ ) vs. pseudoelectrod de referință Ag/AgCl (elec-  
trod de referință printat);
- 19 - mediul de lucru: tampon TAP, pH = 7,40;
- volum de soluție: 30  $\mu\text{L}$  pe electrod;
- echilibrare biosenzor la întuneric 210 s, excitare luminoasă element de biorecunoaș-  
tere 20 s, măsurare răspuns cu citire la 60 s.

21 Domeniu de aplicabilitate: analiza PCE din probe de ape pentru concentrații de PCE  
cuprinse între  $2,4 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$  -  $10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ .

23 Caracteristici de performanță:

- 25 - specificitate: PCE;
- domeniul de curent măsurat corespunzător răspunsului: 2...20  $\mu\text{A}$ ; sensibilitate:  
12,8  $\mu\text{A}/\text{mmol}$ ;
- 27 - limita de detecție:  $1,38 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ .

29 Metoda de măsură a PCE conform invenției elimină dezavantajele menționate prin:  
- deplasarea potențialului de lucru (caracteristic procesului redox al PCE) către un  
domeniu care reduce numărul de interferenți-creșterea specificității răspunsului prin utilizarea  
31 fotosistemului II ca element de biorecunoaștere moleculară, care conduce implicit și la  
reducerea interferențelor;

33 - posibilitatea unor analize de screening *in situ* (prin portabilitatea sistemului de  
analiză față de analiza GC);

35 - scăderea timpului de analiză, la 5 min de la 10 min raportate în general prin tehnicile  
convenționale;

37 - eliminarea etapei de tratament al probei întrucât măsurările electrochimice se pot  
face pe soluții tulburi etc.

39 Ca urmare a prezentei invenții se obțin următoarele avantaje: îmbunătățirea sensibili-  
tății și specificității răspunsului la PCE; o analiză rapidă; reducerea costurilor de analiză;  
41 posibilitatea realizării analizelor de screening; impact redus asupra mediului (reducerea  
amprentei de mediu a analizei) prin utilizarea unor volume foarte mici de reactivi.

# RO 131151 B1

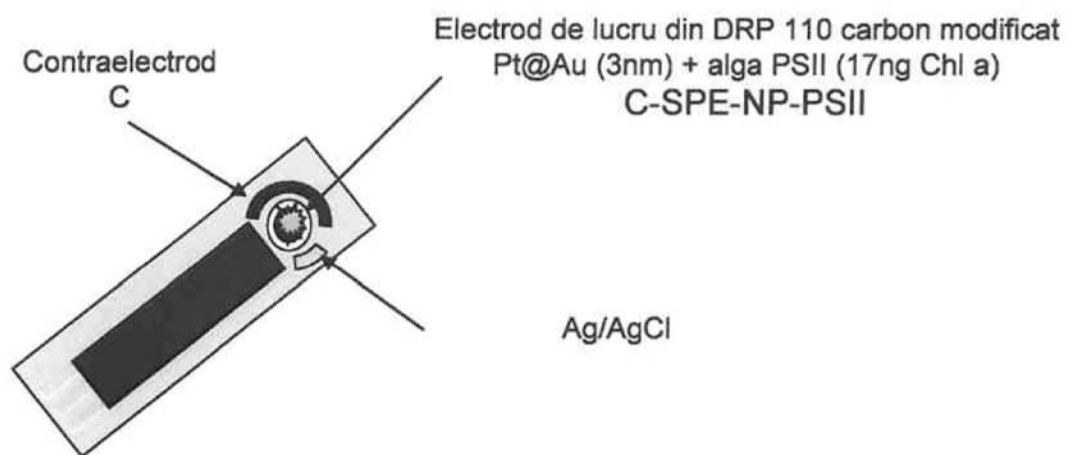
## Revendicări

	1
1. Biosenzor amperometric pentru determinarea conținutului de tetracloretenă din ape, <b>caracterizat prin aceea că</b> este constituit din:	3
- un electrod de lucru printat din C cu suprafață conductivă modificată prin adsorbția de nanoparticule bimetalice Pt-Au cu dimensiunea medie de 3 nm, cu un conținut de particule pe electrod de 21 ppb, adsorbția de celule întregi de alge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> care să asigure 17 ng clorofila A pe electrod;	5
- un pseudo-electrod printat de referință Ag/AgCl;	7
- un electrod auxiliar printat din C.	9
2. Metoda de analiză a tetracloretenei utilizând biosenzorul definit în revendicarea 1, <b>caracterizată prin aceea că</b> se măsoară intensitatea curentului de reducere a cantității de oxigen rezultată ca urmare a activității fotochimice a fotosistemului II în absența tetracloretenei, în 30 $\mu$ L soluție tampon la potențialul de lucru de $0,80 \text{ V} \pm 0,05$ vs Ag/AgCl, și apoi se măsoară intensitatea curentului de reducere a cantității de oxigen rezultată ca urmare a activității fotochimice a fotosistemului II în prezența tetracloretenei/proba de apă, în 25 $\mu$ L soluție tampon și 5 $\mu$ L tetracloretenei/proba de apă, determinând concentrația de tetracloretenei/ din proba de apă prin interpolarea semnalului analitic măsurat pentru biosenzorul de bază într-o curbă de calibrare prestabilită.	11
	13
	15
	17
	19

(51) Int.Cl.

**G01N 25/22** (2006.01),

**B82B 1/00** (2006.01)



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 126/2020