



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00680

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

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

(71) Solicitant:  
• 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

(54) BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA  
CONȚINUTULUI DE TETRAKLORETENĂ (PCE) DIN APE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biosenzor pentru determinarea conținutului de tetracloretenă din ape. Procedeu conform invenției constă în depunerea strat cu strat a 4,2 mg nanoparticule bimetalice de Pt@Au sonicate timp de 60 min pe electrodul de lucru din carbon al unei celule electrochimice serigrafiate, urmată de depunerea a 10 μl celule întregi

de alge *Chlamydomonas reinhardtii*, astfel încât să se asigure o cantitate de clorofilă A de 17 ng/electrodul de lucru.

Revendicări: 2  
Figuri: 1



## BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA CONTINUTULUI DE TETRACLORETENA (PCE) DIN APE

### DESCRIERE INVENTIE

Domeniul Tehnic: Biotehnologii

Prezenta invenție se referă la o metoda de construire a unui biosenzor amperometric pentru determinarea conținutului de tetracloretena (PCE) din ape și a protocolului de măsură. Biosenzorul are ca și element de biorecunoaștere moleculară fotosistemul II, PSII, din celule întregi imobilizate pe suprafețe conductive serigrafiate modificate cu nanoparticule bimetalice de Pt@Au.

Se cunosc biosenzori utilizând PS II din diverse surse, ca sistem de biorecunoaștere moleculară pentru diversi poluanți organici: diuron, atrazina, simazine etc [1-3]. Nu au fost niciodată utilizați pentru compuși clorurați cu catena simplă.

Se cunosc biosenzori fluorimetrice pe baza de PSII pentru determinarea ierbicidelor [4,5]. Nu au fost niciodată utilizați pentru compuși clorurați cu catena simplă.

Se cunosc biosenzori amperometrici pe baza de fotosistem II, utilizând electrozi serigrafiați (screen-printați) ca suport pentru imobilizare, pentru determinarea ierbicidelor [6,7]. Nu au fost niciodată utilizați pentru compuși clorurați cu catena simplă.

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 baza alte sisteme de biorecunoaștere moleculară (enzime, ADN, anticorp/antigen etc) și sunt utilizate în determinarea altor compuși de interes [8-10]. Sunt publicate metode de caracterizare electrochimică a tetracloretenei (PCE), fără a se raporta determinarea cantitativă [11].

Se cunosc metode de cuantificare a PCE prin cromatografie de gaz cu detecție mass-spectrometrică [12], respectiv cu detecție cu ionizare în flacăra [13]. Aceste metode pentru caracterizare și, respectiv, determinarea cantitativă a PCE prezintă următoarele dezavantaje:

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

Prezenta invenție încearcă rezolvarea determinării specifice, rapide (maximum 10 minute timp total de analiză) a tetracloretenei cu un cost redus, cu consum foarte mic de reactivi (sub 50 microlitri) și cu evitarea efectelor de memorie deoarece biosenzorul este de unică determinare (folosință).

Metoda de construire a biosenzorului constă în imobilizarea unei cantități specifice, optime, de nanoparticule bimetalice Pt @ Au, pe electrodul de lucru din carbon al unei celule electrochimice serigrafiate de tip DRP110 (comercializată de Dropsens Spania), urmată de imobilizarea unei cantități de celule întregi de algă care să asigure un conținut de clorofilă A de cca 17 ng pe electrodul de lucru. Nanoparticulele bimetalice de Pt@Au au fost sintetizate printr-o metodă polioli alcalină modificată [14]. Precursorii de Pt ( $H_2PtCl_6$ ,  $3.8 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ ) și Au ( $HAuCl_4$ ,  $3.8 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ ), 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.

Protocolul optim de obținere a biosenzorului este: 4,2 mg nanoparticulele de Pt @ Au au fost sonicate timp de 60 minute, depuși câte 10 μL pe electrozii de lucru C-SPE și uscați rapid. Stratul ulterior a fost obținut prin depunerea de 10 μL de celulele de algă (în cazul prezentei invenției *Chamydomonas reinherdti*) asigurându-se o cantitate de clorofilă A de 17 ng/electrodul de lucru.

Protocolul de măsură a cantității de PCE din probe de apă 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 prin participarea în lanțul de transfer electronic generat ca urmare a activității fotosintetice a PSII în celula întreaga de algă). Cu cât cantitatea de compus clorurat este mai mare, cu atât cantitatea de oxigen produs de către fotosistem este mai mică.

**Protocol de măsură utilizând biosenzorul amperometric pe baza de nanoparticule bimetalice Pt@Au – algă pentru determinarea PCE:**

- Tehnică de lucru: cronoamperometrie la potențial controlat;
- Potențial de lucru: -0.80 V ( $\pm 0.05$ ) vs. pseudoelectrod de referință Ag/AgCl (electrod de referință printat)
- Mediul de lucru: tampon TAP, pH=7.40
- Volum de soluție: 30 μL pe electrod
- Echilibrare biosenzor la întuneric 210 secunde, excitație luminoasă element de biorecunoaștere 20 secunde,

masurare raspuns cu citire la 60 secunde

Domeniu de aplicabilitate: analiza PCE din probe de ape pentru concentratii de PCE cuprinse intre  $2.4 \times 10^{-6}$  molL<sup>-1</sup> –  $10^{-5}$  molL<sup>-1</sup>

**Caracteristici de performanta:**

- specificitate: PCE
- domeniul de curent masurat corespunzator raspunsului: 2-20 microamperi; sensibilitate: 12.8 microAmperi/mmol;
- limita de detectie:  $1.38 \times 10^{-6}$  molL<sup>-1</sup>

Metoda de masura a PCE conform inventiei elimina dezavantajele mentionate prin:

- deplasarea potentialului de lucru (caracteristic procesului redox al PCE) catre un domeniu care reduce numarul de interferenti-cresterea specificitatii raspunsului prin utilizarea fotosistemului II ca element de biorecunopastere moleculara, care conduce implicit si la reducerea interferentelor
- posibilitatea unor analize de screening in situ (prin portabilitatea sistemului de analiza fata de analiza GC)
- scaderea timpului de analiza, la 5 minute de la 10 minute raportate in general prin tehnicile conventionale.
- eliminarea etapei de tratament al probei intrucat masurarile electrochimice se pot face pe solutii turburi etc.

Ca urmare a prezentei inventiei se obtin urmatoarele avantaje: imbunatatirea sensibilitatii si specificitatii raspunsului la PCE; o analiza rapida; reducerea costurilor de analiza; posibilitatea realizarii analizelor de screening; impact redus asupra mediului (reducerea amprentei de mediu a analizei) prin utilizarea unor volume foarte mici de reactivi

1. González-Naranjo, V., Boltes, K., de Bustamante, I., Palacios-Diaz, P., Environmental Science and Pollution Research, 22 (9), 2015, 6920-6931
2. Scognamiglio, V., Stano, P., Polticelli, F., Antonacci, A., Lambrea, 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, 13108-13115
3. Giardi M T., Koblizek M, Jiri M, Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants, Biosensors & Bioelectronics, 16, 2001, 1027–1033
4. Nguyen-Ngoc H, Tran-Minh C.. Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix. Analytica Chimica Acta, Elsevier Masson, 583 (1), 2007, 161-165
5. 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, 1315-1329
6. Koblizek 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
7. Husu, I., Rodio, G., Touloupakis, E., Lambrea, M.D., Buonasera, K., Litescu, S.C., Giardi, M.T., Rea, G., Insights into photo-electrochemical sensing of herbicides driven by Chlamydomonas reinhardtii cells, Sensors and Actuators, B: Chemical, 185, 2013, 321-330
8. 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, 226–230
9. 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, 1371–1377
10. Safavi A., Farjami F, Electrodeposition of gold–platinum alloy nanoparticles on ionic liquid–chitosan composite film and its application in fabricating an amperometric cholesterol biosensor, Biosensors and Bioelectronics, 26, 2011, 2547–2552
11. 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, 287-295.
12. Cheikh Rouhou M., Rheault, I., Haddad, S. Modulation of trichloroethylene in vitro metabolism by different drugs in rats, Toxicology in Vitro 27 (1), 2013, 34-43
13. 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, 595–603
14. Papa F., Negrila C., Miyazaki A., Balint I., "Morphology and chemical state of PVP-protected Pt, Pt-Cu and Pt-Ag nanoparticles prepared by alkaline polyol method", J. Nanoparticle Res., 13, 2011, 5057-5064

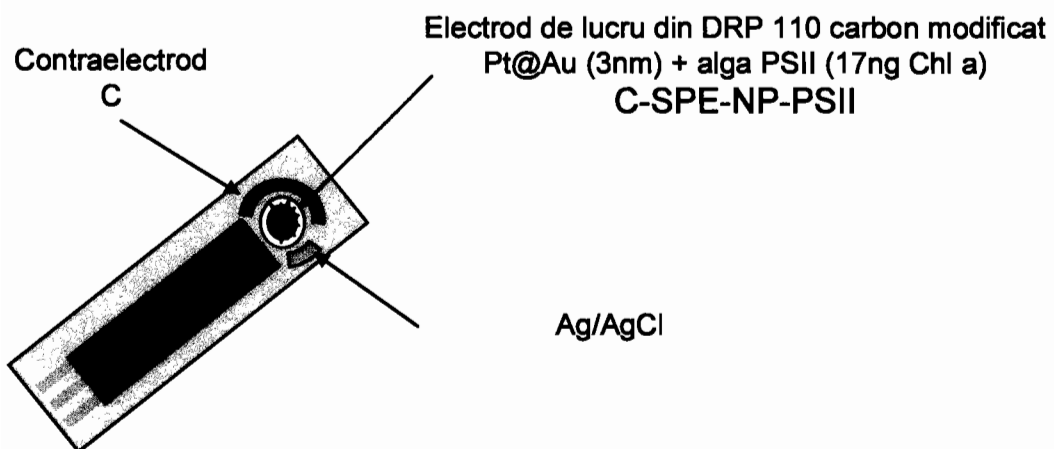
## BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA CONTINUTULUI DE TETRACLORETENA (PCE) DIN APE

### REVEDICARI

1. Procedeu de obtinere al biosenzorului caracterizat prin aceea ca:  
- este constituit din: a. Electrode de lucru obtinut prin modificarea suprafetei conductive printate de C prin adsorbția de nanoparticule bimetalice Pt@Au cu dimensiunea medie de cca 3 nm, care sa asigure 21ppb solid nanoparticula pe electrod, urmata de adsorbția ulterioara a unor celule intregi de alge *Chlamidomonas reinherdti*, care sa asigure 17 ng clorofila A pe electrod; b. Pseudo-electrod printat de referinta Ag/AgCl; c. Electrode auxiliar printat din C
2. Metoda de analiza a tetracloretilenei utilizand biosenzorul construit conform revendicarii 1, caracterizata prin aceea ca:  
-se masoara intensitatea curentului de reducere a cantitatii de oxigen rezultata ca urmare a activitatii fotochimice a fotosistemului II in absenta PCE, in 30 microlitri tampon TAP la potentialul de lucru de -0.80 V ( $\pm 0.05$ ) vs. Ag/AgCl  
-se masoara cantitatea intensitatea curentului de reducere a cantitatii de oxigen rezultata ca urmare a activitatii fotochimice a fotosistemului II in prezenta PCE/proba de apa , in 25 microlitri tampon TAP si 5 microlitri PCE/proba de apa. - se determina concentratia de PCE din proba de apa prin interpolarea semnalului analitic masurat pentru biosenzorul pe baza de PSII intr-o curba de calibrare prestabilita.

**BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA CONTINUTULUI DE  
TETRACLORETENA (PCE) DIN APE**

**DESEN**



*[Handwritten signature]*