



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00715**

(22) Data de depozit: **10/10/2016**

(41) Data publicării cererii:  
**30/06/2017** BOPI nr. **6/2017**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
ȘTIINȚE BIOLOGICE (INCDSB),  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,  
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**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI BIOSENZOR  
AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA  
MERCURULUI (II)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biosenzor amperometric pentru determinarea contaminării cu Hg (II) a mediului. Procedeu conform invenției constă în imobilizarea pe suprafața unei celule electrochimice screen-printate a unui volum de 5 μl soluție fosfatază alcalină, astfel încât să se asigure pe

electrod 150 mUI enzimă, uscarea timp de 6 h la temperatura de 20...24°C și stocarea la 4°C până la utilizare.

Revendicări: 2  
Figuri: 1



## PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA MERCURULUI (II)

### DESCRIERE INVENȚIE

Domeniul Tehnic: Mediu – controlul poluării

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui biosenzor amperometric pentru determinarea Hg (II) și a metodei de măsurare cu acesta. Biosenzorul are ca și element de biorecunoaștere enzima fosfataza alcalină, ALP (din intestin de bovină, mucoasă).

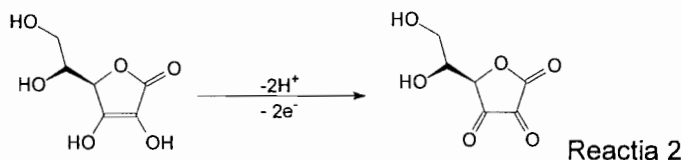
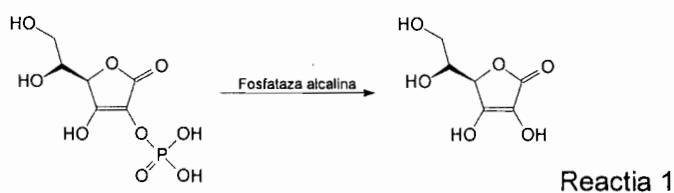
Determinările de contaminanți efectuate utilizând biosenzori cu ALP–imobilizată se bazează pe reacția de inhibiție a activității enzimatice a ALP indusă de către contaminant (metale, pesticide etc.). Se cunosc biosenzori utilizând fosfataza alcalină, ca sistem de biorecunoaștere moleculară pentru diverse metale: V (V), W(VI), Cr (III). Aceștia au fost obținuți prin imobilizarea ALP pe diferite suporturi conductive: electrozi serigrafiați (pe baza de carbune, nanoparticule conductive, modificați cu grafene, etc) [1-2]. Până la acest moment, în conformitate cu datele accesate de noi, nu a fost raportată aplicabilitatea biosenzorilor amperometrici pe baza de fosfataza alcalină în determinarea ionilor de mercur (II).

Se cunosc metode de determinare a Hg (II) utilizând tehnici de analiză prin spectrometrie de masă (spectrometri de masă cu plasmă cuplată inductiv) [3-5], spectrometrie de absorbție atomică cu vapori reci [6, 7], respectiv spectrometrie în domeniu vizibil [8]. Pentru determinarea cantitativă a Hg(II) aceste metode prezintă următoarele dezavantaje: interferențe majore și selectivitate redusă, uneori sensibilitate neadecvată, costuri pentru echipamentele de măsură destul de ridicate, impact negativ asupra mediului prin utilizarea unor cantități relativ mari de reactivi.

Prezenta invenție rezolvă problema determinării rapide a mercurului (maximum 20 minute timp total de analiză) și prin mijloace foarte simple, cu consum foarte mic de reactivi (până la un volum total de maxim 120  $\mu$ L).

**Procedeu de obținere a biosenzorului** constă în imobilizarea pe suprafața conductivă a unei celule electrochimice screen-printate, Au-SPE DRP 220AT (comercializată de Dropsens Spania) a unui volum de 5  $\mu$ L soluție fosfataza alcalină astfel încât să se asigure pe electrod 150 mUI enzima, uscarea timp de 6 ore la 20°-24°C, stocarea la frigider la 4 °C până la utilizare. Biosenzorii realizați prin acest procedeu sunt notați Au-SPE/ALP și sunt biosenzori de unică folosință, stratul de enzima ALP nefiind stabilizat cu un agent de reticulare.

**Principiul de funcționare al biosenzorului pe baza de fosfataza alcalină** este același ca pentru orice biosenzor de inhibiție, prezenta contaminantului reduce activitatea enzimei, și, ca urmare, și cantitatea de produs de reacție enzimatică format. În prezenta substratului, acid ascorbic fosfat, ALP catalizează hidroliza (reacția 1) generând un produs de reacție a cărui oxidare electrochimică (reacția 2) generează o valoare măsurabilă, inițială,  $I_0$  a intensității curentului; valoarea intensității curentului de oxidare măsurat fiind proporțională cu concentrația substratului.



Orice compus care acționează asupra situsului activ al enzimei ALP inhibă activitatea acesteia și deci diminuează și cantitatea de produs de reacție format. Drept consecință valoarea intensității curentului măsurat în prezenta inhibitorului (poluantului) -  $I_{inh}(A)$ , scade, scăderea fiind proporțională cu cantitatea de poluant din probă.

**Metoda masurare utilizand biosenzorul amperometric pe baza de fosfataza alcalina pentru determinarea contaminarii cu Hg (II):**

- Tehnica de lucru: cronoamperometrie la potential controlat;
- Potential de lucru: +0,430 V ( $\pm 0,05$ ) vs. pseudoelectrod de referinta Ag/AgCl (electrod de referinta serigrafiat);
- Mediu de lucru: tampon TRIS 0,05 molL<sup>-1</sup>, pH=8,10;
- Volum de solutie tampon: 80  $\mu$ L pe electrod;
- Secventa de masura:

1. incubare enzima imobilizata cu inhibitor in solutie tampon TRIS: 350 secunde;

2. echilibrare biosenzor: 120 secunde;

3. aditie substrat, masurare raspuns cu citire la 20 secunde;

- Calcul valori concentratie de contaminant se face in functie de nivelul asteptat de concentratie de poluant:

a. prin interpolare pe ecuatia de raspuns, daca valoarea obtinuta se incadreaza in domeniul dinamic de raspuns, cuprins intre  $4,5 \times 10^{-6}$  molL<sup>-1</sup> –  $2,1 \times 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup> (fata de substratul specific acid ascorbic fosfat);

b. aplicarea metodei aditiilor standard in cazul in care concentratiile de contaminant se incadreaza pe domeniul de concentratii  $10^{-9}$  molL<sup>-1</sup> –  $10^{-7}$  molL<sup>-1</sup>;

- Domeniu de aplicabilitate: determinarea mercurului din probe de mediu si/sau alimentare.

**Caracteristici de performanta analitica ale biosenzorului:**

- specificitate: medie (poate suferi interferente ale ionilor V, W, Cr (III), As, Zn) etc.;
- domeniu de curent masurat corespunzator raspunsului: 4 nA - 1  $\mu$ A;
- sensibilitate: 4,78  $\mu$ A mmol<sup>-1</sup>;
- limita de detectie:  $4,55 \times 10^{-7}$  molL<sup>-1</sup>;
- constanta de inhibitie:  $2,76 \times 10^{-6}$  molL<sup>-1</sup>.

Metoda de masurare conform inventiei elimina dezavantajele mentionate prin:

- posibilitatea unor analize de screening rapide, cu o sensibilitate compatibila cu doza maxima admisibila stabilita ( $5 \times 10^{-6}$  molL<sup>-1</sup>);

- realizarea unor analize cu cost redus (reducerea costurilor de analiza datorita utilizarii unor echipamente de masura care au preturi reduse comparativ cu spectrometrele AAS; respectiv ICP-MS).

Ca urmare a prezentei inventii se obtin urmatoarele avantaje: posibilitatea de analiza rapida a Hg (II) cu impact redus asupra mediului (reducerea amprentei de mediu a analizei) prin utilizarea unor volume foarte mici de reactivi.

1. A.L. Alvarado-Gómez, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *A disposable alkaline phosphatase-based biosensor for vanadium chronoamperometric determination*, Sensors (Basel), 2014, 14(2):3756–3767;
2. A.L. Alvarado-Gómez, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *A chronoamperometric screen printed carbon biosensor based on alkaline phosphatase inhibition for W(VI) determination in water, using 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt as a substrate*, Sensors, 2015, 15:2232-2243;
3. Metoda agentiei de protectie a mediului a Statelor Unite, EPA 200.8 Metals in Water using ICP/MS;
4. J. Allibone, E. Fatemian, P.J. Walker, *Determination of mercury in potable water by ICP-MS using gold as a stabilising agent*, J. Anal. At. Spectrom., 1999, 14(2): 235-239;
5. B. Passariello, M. Barbaro, S. Quaresima, A. Casciello, A. Marabini, *Determination of Mercury by Inductively Coupled Plasma—Mass Spectrometry*, Microchem. J., 1996, 54(4):348-354;
6. EPA 245.1; EPA 245.2, EPA 7470 A si EPA 7471A si B;
7. A. Manova, E. Beinrohr, L. Jurica, *Preconcentration of Hg (II) and total Hg in Waters for flame AAS in a Flow-through electrochemical cell*, Chem. Pap. 2003, 57(3) : 197-200;
8. V.A. Lemos, L.O. dos Santos, S. Silva Edos, E.V. Vieira, *Spectrophotometric determination of mercury in water samples after preconcentration using dispersive liquid-liquid microextraction*, J AOAC Int., 2012, 95(1):227-231.

## PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA MERCURULUI (II)

### REVENDICARI

1. Procedeu de obtinere al biosenzorului caracterizat prin aceea ca:
  - este constituit din:
    - a. Electrode de lucru obtinut prin modificarea suprafetei conductive serigrafiate de aur prin imobilizare pe suprafata, prin adsorbtie a fosfatazei alcaline. Protocolul de modificare a electrozului este original si consta in depunerea uniforma pe suprafata de aur a electrozului de lucru a 5  $\mu\text{L}$  fosfataza alcalina, care sa asigure pe electroz 150 mUI ALP. Toate protocoalele se desfasoara la o temperatura de 26°C;
    - b. Pseudo-electroz serigrafiat de referinta Ag/AgCl;
    - c. Contraelectroz serigrafiat din aur.

Celula electrochimica astfel obtinuta este lasata sa se stabilizeze la 20 - 24°C timp de sase ore, apoi stocata la 4°C este stabila timp de 30 zile.

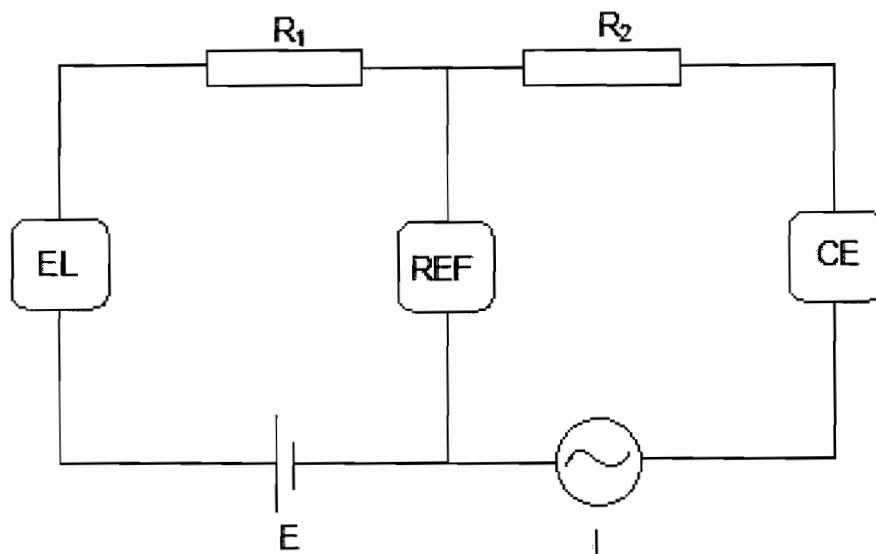
2. Metoda de analiza a mercurului utilizand biosenzorul construit conform revendicarii 1, caracterizata prin aceea ca:

Se masoara intensitatea curentului de oxidare a produsului de reactie rezultat prin hidroliza enzimatica a substratului-acid ascorbic fosfat, in absenta si in prezenta inhibitorului. Echilibrarea biosenzorului Au-SPE/ALP, timp de 120 secunde, se face in 80  $\mu\text{L}$  tampon TRIS pH=8,00, se adauga 10,5  $\mu\text{L}$  substrat de concentratie cunoscuta, se echilibreaza semnalul si se citeste la 20 secunde dupa ce ating valoarea maxima a curentului, valoare notata  $I_0$ . Pentru determinarea concentratiei de mercur, biosenzorul Au-SPE/ALP se incubeaza in 80  $\mu\text{L}$  tampon TRIS cu 3  $\mu\text{L}$  sare de mercur de concentratie cunoscuta, timp de 350 secunde, dupa care se adauga volumul corectat de substrat, astfel incat sa se asigure aceeasi valoare a concentratiei de substrat pe electroz de lucru, se echilibreaza semnalul si se citeste la 20 secunde intensitatea curentului, de inhibitie, valoare notata  $I_{inh}$  ( $I_{inh} < I_0$ ).

Calculul valorii de concentratie a mercurului se face in functie de nivelul asteptat de concentratie de poluant utilizand una dintre cele doua variante:
  - a. prin interpolare pe ecuatia de raspuns, daca valoarea obtinuta se incadreaza in domeniul dinamic de raspuns, cuprins intre  $4,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$  –  $2,1 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  (fata de substratul specific acid ascorbic fosfat);
  - b. aplicarea metodei aditilor standard in cazul in care concentratiile de contaminant se incadreaza pe domeniul de concentratii  $10^{-9} \text{ molL}^{-1}$  –  $10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ .

PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI BIOSENZOR AMPEROMETRIC PENTRU DETERMINAREA  
MERCURULUI (II)

DESEN



$R_1, R_2$  – Rezistențe interne ale celulei de masura

E – Tensiune aplicată

I – Ampermetru

EL – Electrode de lucru, aur screen-printat modificat cu fosfataza alcalina

REF – Referință, Ag/AgCl

CE – Contraelectrod