



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00585

(22) Data de depozit: 13/08/2018

(41) Data publicării cererii:
28/02/2020 BOPI nr. 2/2020

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "ȘTEFAN CEL MARE"
DIN SUCEAVA, STR.UNIVERSITĂȚII,
NR.13, SUCEAVA, SV, RO

(72) Inventatori:
• NOROCEL LILIANA, STR.LA ALEXA,
NR.144, SAT PÂRAIE, MĂLINI, SV, RO;
• GUTT GHEORGHE, STR.VICTORIEI
NR.61, SAT SF.ILIE - ȘCHEIA, SV, RO

(54) BIOSENZOR PENTRU DETERMINAREA IONILOR DE CUPRU
DIN VIN

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biosenzor pentru determinarea ionilor de cupru din vin. Biosenzorul, conform invenției, este format dintr-o celulă electrochimică potențimetrică constând dintr-o lamelă (1) de unică utilizare, confecționată dintr-un material (2) polimeric suport, izolator electric, niște electrozi (3, 4 și 5) metalici sau din pulbere de grafit pur, pe celulă fiind depus un agent (6) de fixare și imobilizare de tip agaroză, precum și un material (7) biologic activ de tip glicină cu rol de legare a ionilor de cupru dintr-o probă de vin supusă analizei *in situ*.

Revendicări: 4
Figuri: 7

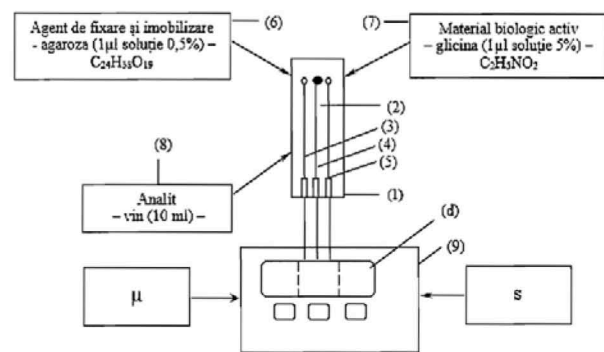


Fig. 1



BIOSENZOR PENTRU DETERMINAREA IONILOR DE CUPRU DIN VIN

Biosenzorul conform invenției este destinat determinării rapide, la fața locului (in situ) și precise a ionilor de cupru din vin.

Prezența ionilor de cupru în concentrații de peste 0,5 mg/l duce la degradarea calității vinului, cunoscută generic sub denumirea de casare cuproasă. În scopul prevenirii casării cuproase a vinurilor sunt folosite substanțe chimice de corecție care reacționează cu ionii de cupru și dau precipitate insolubile de densitate ridicată. Substanța de corecție folosită la scara cea mai largă pentru eliminarea ionilor de cupru din vin este ferocianura de potasiu.

Determinarea exactă a concentrației ionilor de cupru duce, pe de-o parte, la dozarea stoechiometrică corectă a substanței de corecție, iar pe de altă parte duce și la evitarea supradozării substanței de corecție (ferocianura de potasiu).

Reacția chimică de precipitare a ionilor de cupru cu ferocianură de potasiu este următoarea:



Pentru determinarea ionilor de cupru cu limite de detecție situate la nivelul de nanograme (ppt) și de micrograme (ppb) sunt folosite metode spectrometrice precum: spectrometria de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv având ca detector un spectrometru de masă (ICP-MS), spectrometria de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv având ca detector un fotomultiplicator (ICP-AES), spectrometria de absorbție atomică (AAS), iar pentru limite de detecție situate la nivelul de miligrame sunt folosite metode electrochimice de analiză care includ polarografia, potențiomtria, amperometria și conductometria, metode de spectrometrie moleculară sau metode volumetrice.

Dezavantajele metodelor spectrometrice enumerate mai sus constau în faptul că mijloacele care le deservește sunt aparate voluminoase și extrem de scumpe, imposibil de transformat din punct de vedere tehnic în mijloace portabile de analiză, care să permită analiza in situ a ionilor de cupru din vin. Afară de aceste dezavantaje, analizele spectrometrice reclamă, atât ca timp cât și sub aspectul costului, un efort preparativ ridicat.

Dezavantajul celorlalte metode prezentate îl constituie faptul că pentru unele metode nu s-a încercat reducerea dimensională a aparaturii astfel încât aceasta să devină portabilă și să fie ușor de utilizat de către operatorii de vinificație care nu au studii de specialitate. La alte metode aparatura corespunzătoare nu poate fi redusă dimensional, din punct de vedere constructiv și tehnic, la nivel de aparatură portabilă care să permită analiza in situ a ionilor de cupru din vin.

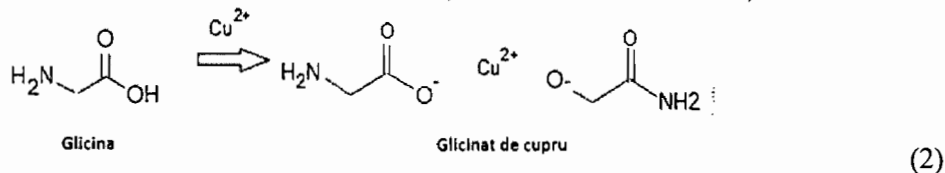
În vederea evitării trimerii unor probe de vin la laboratorul de specialitate, pentru stabilirea concentrației ionilor de cupru, este nevoie de un mijloc de analiză instrumentală performant, de dimensiuni mici, care să permită operatorului de vinificație ca în timp scurt să determine in situ și precis concentrația ionilor de cupru din volume mici de vin supuse analizei.

Un asemenea mijloc de analiză instrumentală îl poate constitui un biosenzor specializat pe ionul de cupru. În urma achiziției și procesării datelor obținute pentru o proba

de vin, pe display-ul biosenzorului apare afișată concentrația ionului de cupru din acel vin și după caz și necesarul de substanță de neutralizare. În această situație, operatorului îi revine doar dozarea corespunzătoare a substanței de neutralizare pentru un anumit volum de vin care prezintă concentrația de ioni de cupru corespunzătoare analizei realizate cu biosenzorul conform invenției.

Există numeroase studii și cercetări privind detecția ionilor metalici însă doar unele dintre acestea sunt destinate determinării ionilor de cupru. În aceste studii sunt specificați și unii biosenzori, care sunt protejați prin propuneri de invenții și brevete de invenții. În documentul (D1) este descrisă o metodă, la care concentrația ionilor de cupru se determină din apă pe cale fotometrică și este bazată pe un comprimat de clorhidrat de hidroxilamină, citrat de sodiu, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolină și acid sulfamic, care în timpul utilizării este adăugat direct în proba de apă și dizolvat prin agitare, apoi se măsoară concentrația. În documentul (D2) este descrisă o altă metodă pentru determinarea ionilor de cupru din apă pe cale fotometrică folosind un kit de detectare astfel, într-un mediu slab acid, cuprul din apă reacționează cu 2-(5-brom-2-piridilazo)-5-(dietilamino) fenol care formează un complex roșu violet iar intensitatea culorii complexului este direct proporțională cu concentrația de ioni de cupru. În documentul (D3) este descris un biosenzor utilizat pentru detectarea concentrației de ioni de cupru din soluții apoase și este bazat pe fluorescența emisă de fluoresceină ca semnal de detectare. Astfel, intensitatea fluorescenței se convertește într-un semnal de concentrație al ionilor de cupru. În documentul (D4) este descrisă o altă metodă pentru determinarea ionilor de cupru din bere pe cale potențiochimică. În timpul analizei ionii metalici sunt depuși pe un electrod de carbon și apoi sunt îndepărtați de un oxidant adecvat. În documentul (D5) este prezentat un senzor electrochimic bazat pe un electrod de carbon sticlos modificat cu oxid de grafen redus, pentru detecția ionilor de cupru din apă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui biosenzor, cu sensibilitate și precizie ridicată, folosit pentru determinarea in situ a ionilor de cupru din vin. În acest scop este folosită o structură potențiochimică portabilă, în compunerea căreia intră o celulă electrochimică potențiochimică, plană, de dimensiuni reduse, denumită în continuare descrierii lamelă de unică utilizare formată din trei electrozi metalici lamelari, sau din pulbere de grafit pur depus tot lamelar, pe un suport polimeric, neconducător electric, peste care se depune un agent de fixare și imobilizare (agaroză) și un material biologic activ (glicina), cu rol de legare a componentului (cupru), din vin, pentru analiză fiind necesară o cantitate de ordinul a 10 ml. După punerea în funcțiune a biosenzorului potențiochimic, în urma fenomenologiei electrochimice de la cei trei electrozi, are loc următoarea reacție:



Curentul măsurat de potențiostat este o expresie a concentrației ionilor de cupru din proba de vin analizată. Ca urmare a conversiei, cu ajutorul soft-ului intern ce are la bază curba de calibrare realizată în coordonate curent-concentrație, concentrația ionilor de cupru apare afișată pe display-ul biosenzorului în unități de miligrame pe litru.

Avantajul utilizării unui biosenzor conform invenției constă în faptul că acesta are un preț de cost scăzut, este portabil, nu necesită personal de specialitate, poate fi utilizat la analize in situ în vederea determinării concentrației ionului de cupru din volume mici de vin. Se dă în continuare un exemplu de realizare, în legătură cu Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 și Fig. 7, figuri care reprezintă:

Fig. 1. Schema generală a biosenzorului destinat determinării ionilor de cupru din vin

Fig. 2. Succesiunea fazelor la producerea biosenzorului și la utilizarea acestuia și tabel pentru stabilirea cantității de substanță de corecție

Fig. 3. Exemplu de familie de voltamograme ciclice folosite pentru determinarea concentrației de ionilor de cupru din vin

Fig. 4. Curba de calibrare folosită pentru determinarea concentrație ionilor de cupru din vin

Fig. 5. Comparație între sensibilitatea analitică a biosenzorului conform invenției ce are ca agent de fixare și imobilizare agaroză și ca material biologic activ glicina și alți trei biosenzori testați care au ca agent de fixare și ca material biologic activ alte substanțe posibil de folosit în acest scop.

Fig. 6. Reproducibilitatea analitică a biosenzorului conform invenției

Fig. 7. Stabilitatea în timp a electrozilor biosenzorului conform invenției, ce are ca agent de fixare și imobilizare agaroză și ca material biologic activ glicina

Biosenzorul conform invenției, Fig.1, cuprinde o lamelă **1** de unică utilizare ce reprezintă o celulă electrochimică potențiometrică, plană, de dimensiuni reduse formată dintr-un material **2** polimeric suport, izolator electric, niște electrozi **3,4**și**5** metalici sau din pulbere de grafit pur, peste care se depune un agent **6** de fixare și imobilizare (agaroză) și un material **7** biologic activ (glicină) cu rol de legare a componentului urmărit (ion de cupru) din proba **8** de vin analizat și o unitatea **9** electronică. Pentru analiza ionului de cupru dintr-o probă de vin **8**, lamela **1** de unică utilizare se introduce prin glisare în unitatea **9** electronică a biosenzorului formată dintr-un potențiostat, programat pentru tensiunea de lucru specifică ionului cupru. Potențiostatul are în componere un microprocesor μ pentru achiziție și prelucrare date, un soft *s* intern pentru transformarea curentului în unități de concentrație a ionilor de cupru și un display *d* alfanumeric de afișare a concentrației ionilor de cupru din vin în unități de mg/l.

Succesiunea fazelor pentru obținerea structurii analitice a biosenzorului descrisă în Fig. 2, indică modul de utilizare a biosenzorului pentru determinarea concentrației ionilor de cupru din vin și a stabilirii cantității de substanță de corecție adăugată.

Etapele de fabricare a unei lamele **1** de unică utilizare implică în primă fază depunerea pe celula electrochimică potențiometrică plană a agentului **2** de fixare și imobilizare a 1 μ l agaroză soluție apoasă 0,5%, urmată de depunerea materialului **3** biologic activ a 1 μ l glicină soluție apoasă 5%, de uscare timp de 30 minute la o temperatură de 25°C și de operația de încapsulare etanșă.

Modul de lucru al biosenzorului conform invenției parcurge următoarele etape succesive:

-conectarea lamelei **1**, de unică utilizare, prin glisare în fanta corespunzătoare a unității **9** electronice a biosenzorului, ceea ce duce automat la activarea microprocesorului μ pentru achiziție și prelucrare date.

- manevrarea manuală a biosenzorului în sensul introducerii lamelei **1** într-o cuvă polimerică cilindrică ce conține 10 ml de vin analizat.

- citirea de pe display-ul alfanumeric, a unității 9 electronice, a concentrației ionului de cupru din proba 8 de vin. În continuare, pe baza acestei concentrații, operatorul citește din tabelul din Fig.2 cantitatea de ferocianură de potasiu necesară precipitării ionului de cupru pentru un volum de 1 litru de vin. Într-o variantă constructivă mai evoluată a biosenzorului, acest tabel poate fi introdus în memoria RAM a microprocesorului astfel încât pe display-ul *d* alfanumeric să apară afișată atât concentrația ionului de cupru, raportată la un litru de vin, cât și cantitatea de ferocianură de potasiu necesară pentru neutralizarea ionului de cupru dintr-un litru de vin. Prin înmulțirea acestei cantități de ferocianură de potasiu cu volumul de vin supus corectării se obține cantitatea totală de ferocianură necesară corecției volumului de vin la care concentrația ionilor de cupru este cea determinată cu biosenzorul conform invenției.

Odată conectat la celula 1 electrochimică, se pornește potențostatul 5, care măsoară concentrația de ioni de cupru prezentă în proba 8 de vin. Dacă concentrația ionilor de cupru, afișată pe display-ul *d* al potențostatului depășește limita care ar putea induce casarea cuproasă, atunci operatorul adaugă substanțe chimice de corecție 6 (ferocianură de potasiu) corespunzătoare tabelului din Fig.2, tabel stabilit pe baza bilanțului de materiale stoichiometric pentru reacția chimică (1). În vederea stabilirii bazei de date pentru softul *s* intern se efectuează mai multe ciclovoltage (Fig.3) pentru diferite concentrații de ioni de cupru folosind în acest scop o soluție de sulfat de cupru. Cu ajutorul intensităților maxime ale peak-urilor voltagramelor se realizează curba de calibrare în coordonate Curent - Concentrație, Fig.4, iar perechile de valori ale punctelor de pe curba de calibrare se introduc în memoria RAM a microprocesorului μ . În continuare orice măsurătoare de curent efectuată pentru o probă de vin este convertită automat pe baza curbei de calibrare din memorie în unități de concentrație de ioni de cupru pe litru de vin care sunt afișate ca atare pe display-ul *d* al biosenzorului.

Caracteristicile de bază testate cu acest biosenzor au fost sensibilitatea analitică, Fig. 5, reproductibilitatea (precizia), Fig. 6 și stabilitatea în timp, Fig.7.

Bibliografie

[D1] Gao Hongwen; Xu Xiawei; Yuan Yuan; Li Mingli, CN102928353 (A) 2013-02-13, Preparation method and using method for developing detection piece for determining copper ions in water.

[D2] Yang Yan; Mao Lican; Chen Shaohuai; Lian Guojun, CN105987906 (A) 2016-10-05- Detection Kit For on-site Quick Detection of Copper Ions in Water and Preparing Method.

[D3] Li Pengsong; Tao Huchun; Peng Zhiwen; Su Jie; Yu Taian, CN103627666 (A) 2014-03-12- Method for Detecting Concentration of Copper by Utilizing Bacterial Whole Cell Biosensor.

[D4] Mayer, H., Marconi, O., Floridi, S., Montanari, L., & Fantozzi, P. (2003). Determination of Cu (II) in beer by derivative potentiometric stripping analysis. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(4), 332-336.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00606.x>

[D5] Yang, L., Huang, N., Huang, L., Liu, M., Li, H., Zhang, Y., & Yao, S. (2017). An electrochemical sensor for highly sensitive detection of copper ions based on a new molecular probe Pi-A decorated on graphene. *Analytical Methods*, 9(4), 618-624.

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ay/c6ay03006h#!divAbstract>

REVENDICĂRI

1. Invenția Biosenzor pentru determinarea ionilor de cupru din vin, **caracterizat prin aceea că**, în vederea determinării ionilor de cupru din vin este folosit un sistem biosenzorial ce are în compunere o unitate potențiomtrică și o lamelă (1) de unică utilizare ce reprezintă o celulă electrochimică potențiomtrică plană, de dimensiuni reduse, un agent (6) de fixare și imobilizare, un material (7) biologic activ, corelarea între curentul dat de unitatea potențiomtrică și concentrația ionului de cupru fiind făcută prin curba de calibrare stabilită la rândul ei cu ajutorul unei familii de curbe ciclo-voltametrice.
2. Agent de fixare și imobilizare (6), conform revendicării nr. 1, **caracterizat prin aceea că**, substanța folosită în acest scop este o soluție apoasă de agaroză 0,5%;
3. Materialul biologic activ (7) conform revendicării nr. 1, **caracterizat prin aceea că**, substanța folosită în acest scop este o soluție apoasă glicină 5%;
4. Metoda potențiomtrică conform revendicării nr. 1, **caracterizată prin aceea că**, în vederea obținerii curbei de calibrare este folosită voltametria ciclică;

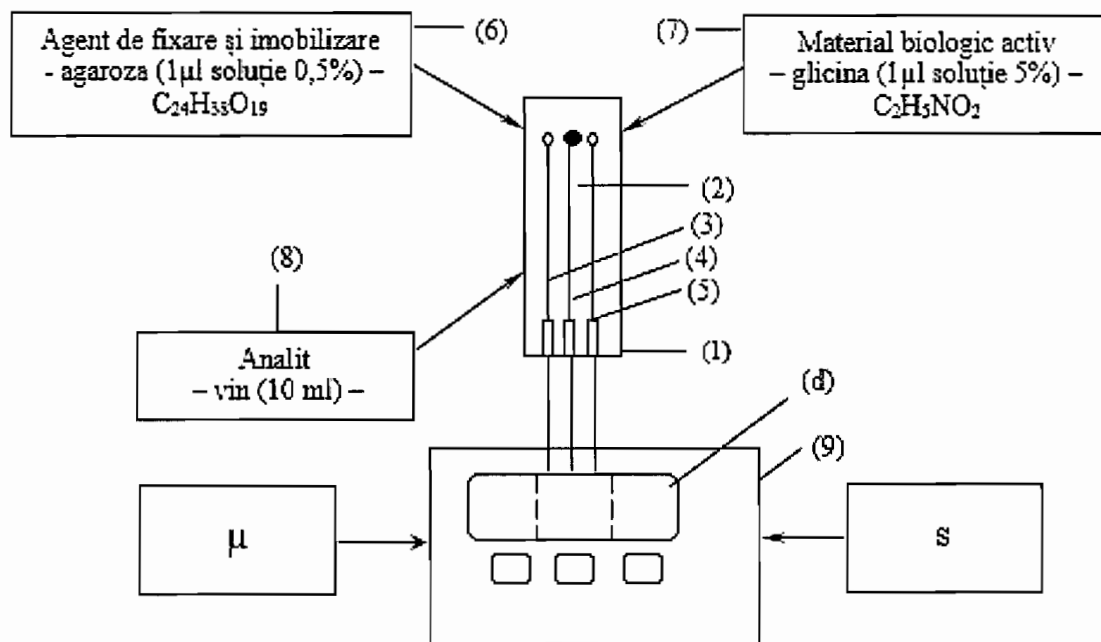


Fig. 1.

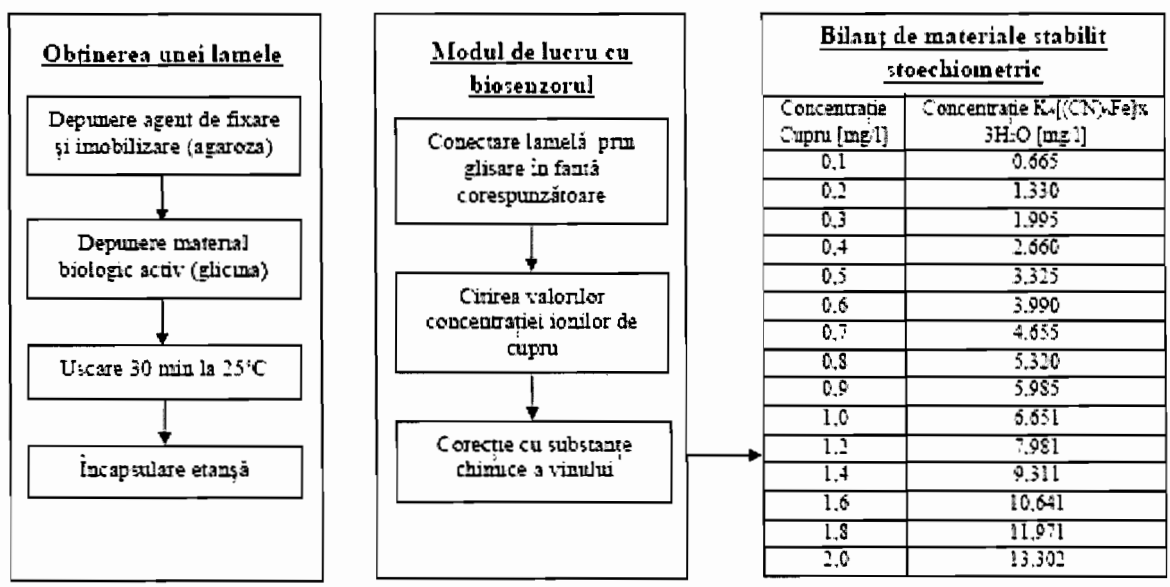


Fig. 2.

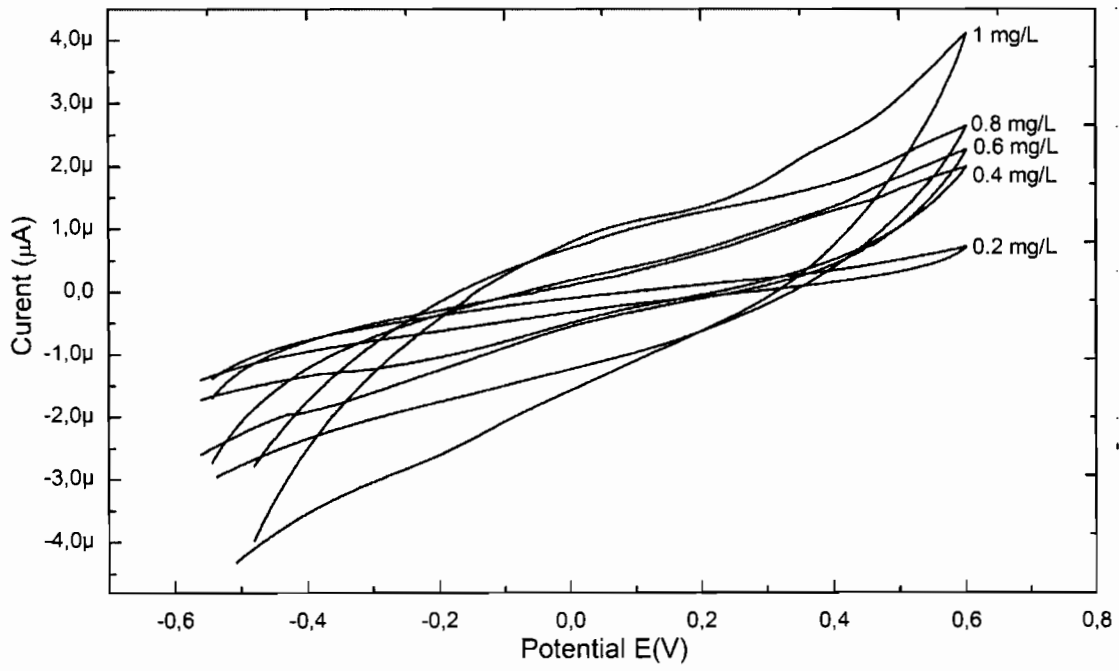


Fig. 3.

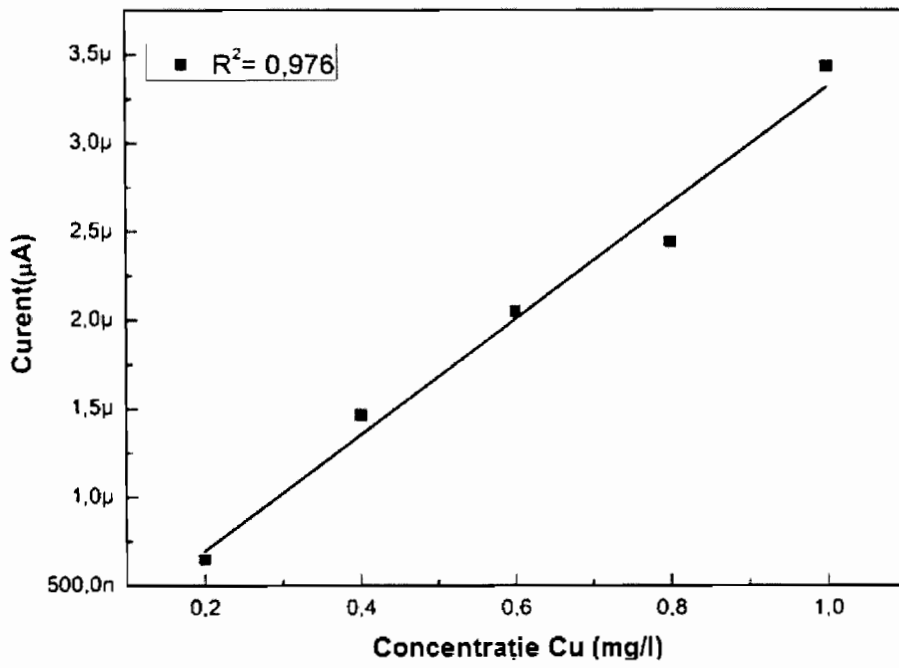


Fig. 4.

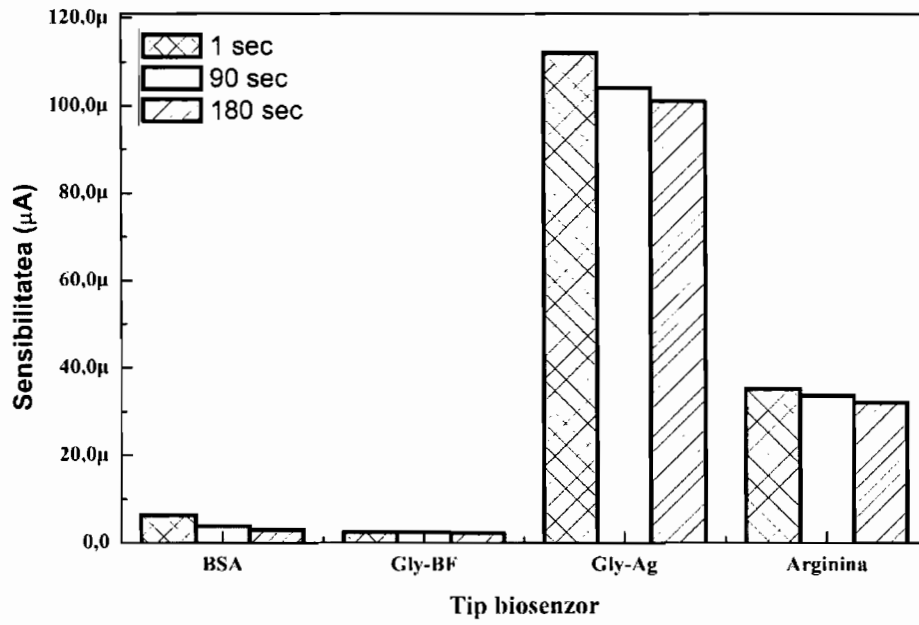


Fig. 5.

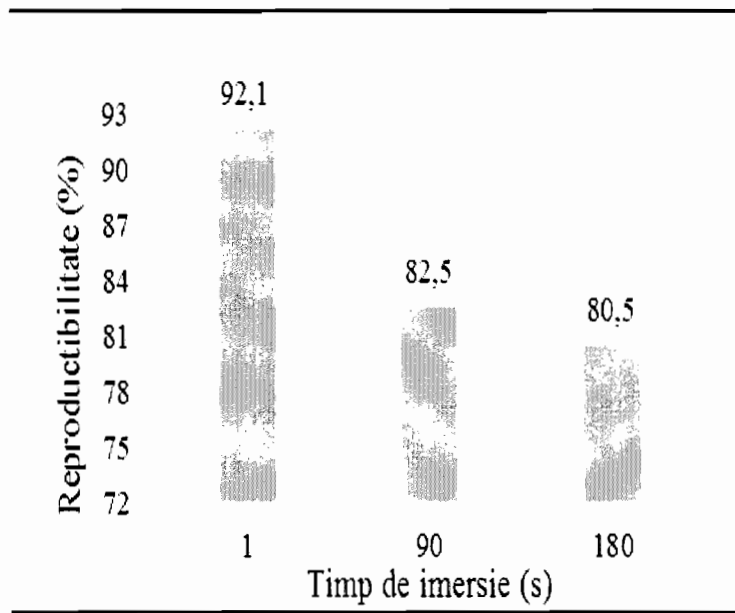
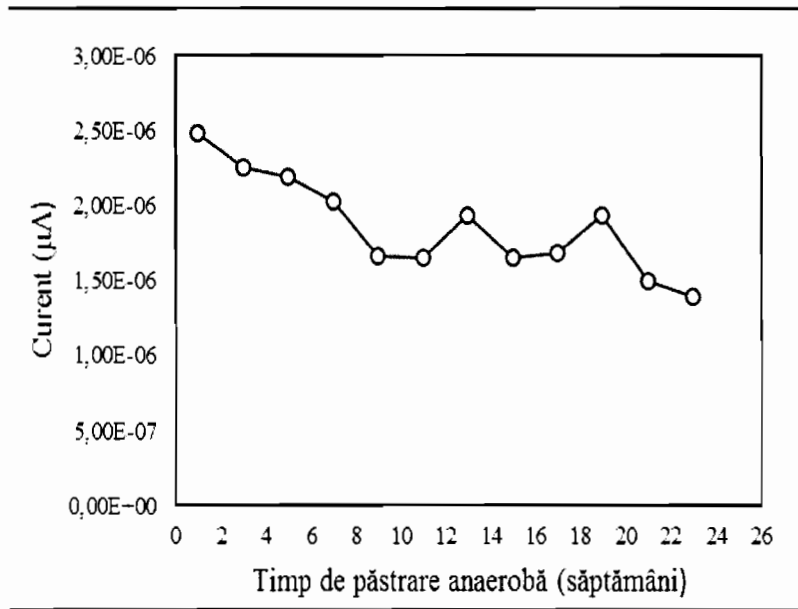


Fig. 6.

**Fig. 7.**