



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00585**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2023** BOPI nr. **5/2023**

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

(73) Titular:  
• **UNIVERSITATEA "ȘTEFAN CEL MARE"**  
**DIN SUCEAVA, STR.UNIVERSITĂȚII,**  
**NR.13, SUCEAVA, SV, RO**

(72) Inventatori:  
• **NOROCEL LILIANA, STR.LA ALEXA,**  
**NR.144, SAT PĂRAIE, COMUNA MĂLINI,**  
**SV, RO;**

• **GUTT GHEORGHE, STR.VICTORIEI**  
**NR.61, SAT SF.ILIE, ȘCHEIA, SV, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**CN 1016500336 A; PETER OSTAPCZUK,**  
**"PRESENT POTENTIALS AND**  
**LIMITATIONS IN THE DETERMINATION OF**  
**TRACE ELEMENTS BY POTENTIOMETRIC**  
**STRIPPING ANALYSIS", ANALYTICA**  
**CHIMICA ACTA, VOL. 273, PP. 35-40, 1993**

(54) **BIOSENZOR PENTRU DETERMINAREA IN SITU A IONILOR  
DE CUPRU DIN VIN**

Examinator: **biochimist BABALIGEA IRINA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

# RO 133892 B1

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

3 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  
5 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  
7 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  
9 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  
11 a ionilor de cupru cu ferocianura de potasiu este următoarea:



15 Pentru determinarea ionilor de cupru cu limite de detecție situate la nivelul de nano-  
grame (ppt) și de micrograme (ppb) sunt folosite metode spectrometrice precum: spectro-  
17 metria 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  
19 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  
21 analiză care includ polarografia, potențiometriă, amperometriă și conductometriă, metode  
de spectrometrie moleculară sau metode volumetrice.

23 Dezavantajele metodelor spectrometrice enumerate mai sus constau în faptul că  
mijloacele care le deserveșc sunt aparate voluminoase și extrem de scumpe, imposibil de  
25 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 spectro-  
27 metrice reclamă, atât ca timp cât și sub aspectul costului, un efort preparativ ridicat.

Dezavantajul celorlalte metode prezentate îl constituie faptul că pentru unele metode  
29 nu s-a încercat reducerea dimensională a aparatului astfel încât aceasta să devină portabilă  
și să fie ușor de utilizat de către operatorii de vinificație care nu au studii de specialitate. La  
31 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  
33 de cupru din vin.

În vederea evitării trimerii unor probe de vin la laboratorul de specialitate, pentru  
35 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  
37 să determine *in situ* și precis concentrația ionilor de cupru din volume mici de vin supuse  
analizei.

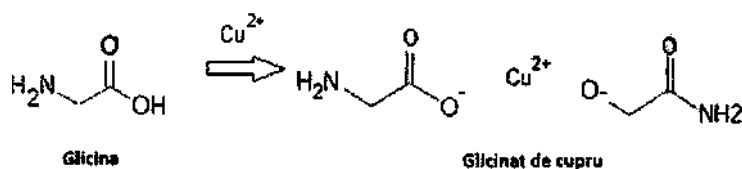
Un asemenea mijloc de analiză instrumentală îl poate constitui un biosenzor  
39 specializat pe ionul de cupru. În urma achiziției și procesării datelor obținute pentru o probă  
de vin, pe display-ul biosenzorului apare afișată concentrația ionului de cupru din acel vin și  
41 după caz și necesarul de substanță de neutralizare. În această situație, operatorului îi revine  
doar dozarea corespunzătoare a substanței de neutralizare pentru un anumit volum de vin  
43 care prezintă concentrația de ioni de cupru corespunzătoare analizei realizate cu biosenzorul  
conform invenției.  
45

Există numeroase studii și cercetări privind detecția ionilor metalici însă doar unele  
47 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  
49 cererea de brevet **CN 102928353 A (Gao Hongwen, Xu Xiawei, Yuan Yuan, Li Mingli,**

**“Preparation method and using method for developing detection piece for determining copper ions in water”, 2013-02-13)** 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 cererea de brevet **CN105987906 A (Yang Yan, Mao Lican, Chen Shaohuai, Lian Guojun, “Detection kit For on-site Quick Detection of Copper Ions in Water and Preparing Method”, 2016-10-05)** 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 cererea de brevet **CN 103627666 A (Li Pengsong, Tao Huchun , Peng Zhiwen, Su Jie, Yu Taian, “Method for Detecting Concentration of Copper by Utilizing Bacterial Wole Cell Biosensor”, 2014-03-12)** 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 **Mayer H., Marconi O., Floridi S., Montanari L., Fantozzi P., “Determination of Cu (II) in beer by derivative potentiometric stripping analysis” Journal of the Institute of Brewing, 109 (4), pp 332-336, 2003, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00606.x>** este descrisă o altă metodă pentru determinarea ionilor de cupru din bere pe cale potențiometrică. În timpul analizei ionii metalici sunt depuși pe un electrod de carbon și apoi sunt îndepărtați de un oxidant adecvat. În documentul **Yang L, Huang N, Huang L, Liu M, Li H., Zhang Y și Yao S., “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), pp. 618-624, 2017, <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ay/c6ay03006h#!divAbstract>** 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 potențiometrică portabilă, în compunerea căreia intră o celulă electrochimică potențiometrică, plană, 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 de vin. După punerea în funcțiune a biosenzorului potențiometric, 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.

# RO 133892 B1

1 Biosenzorul pentru determinarea ionilor de cupru din vin, conform invenției, are în  
2 compunere o unitate potențiomtrică și o lamelă de unică utilizare, polimerică, ce reprezintă  
3 o celulă electrochimică potențiomtrică plană, pe care este depus un agent de fixare și  
4 imobilizare, un material biologic activ cu rol de legare și stabilizare a ionului cupru din vin într-  
5 o specie chimică activă electrochimic, pentru analiza biosenzorială a ionului cupru fiind  
6 necesară o cantitate de ordinul a 10 ml de vin, corelarea între curentul dat de unitatea  
7 potențiomtrică a biosenzorului conform invenției și concentrația ionului de cupru fiind făcută  
8 prin curba de calibrare stabilită la rândul ei cu ajutorul unei familii de curbe ciclo-voltametrice.  
9 Agentul de fixare și imobilizare este o soluție apoasă de agaroză 0,5%, iar materialul biologic  
activ este o soluție apoasă de glicină 5%.

11 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  
13 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...7, care reprezintă:

15 - fig. 1, schema generală a biosenzorului destinat determinării ionilor de cupru din vin;

17 - fig. 2, succesiunea fazelor la producerea biosenzorului și la utilizarea acestuia și  
tabel pentru stabilirea cantității de substanță de corecție;

19 - fig. 3, exemplu de familie de voltamograme ciclice folosite pentru determinarea  
concentrației ionilor de cupru din vin;

21 - fig. 4, curba de calibrare folosită pentru determinarea concentrației ionilor de cupru  
din vin;

23 - 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  
25 de folosit în acest scop;

- fig. 6, reproductibilitatea analitică a biosenzorului conform invenției;

27 - 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.

29 Biosenzorul conform invenției, fig. 1, cuprinde o lamelă **1** de unică utilizare ce repre-  
zintă o celulă electrochimică potențiomtrică, plană, de dimensiuni reduse formată dintr-un  
31 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 mate-  
33 rial **7** biologic activ (glicină) cu rol de legare a componentului urmărit (ion de cupru) din proba  
**8** de vin analizat și o unitate **9** electronică. Pentru analiza ionului de cupru dintr-o probă de  
35 vin **8**, lamela **1** de unică utilizare se introduce prin glisare în unitatea **9** electronică a biosen-  
zorului formată dintr-un potențiostat, programat pentru tensiunea de lucru specifică ionului  
37 cupru. Potențiostatul are în compunere un microprocesor  $\mu$  pentru achiziție și prelucrare  
date, un soft și intern pentru transformarea curentului în unități de concentrație a ionilor de  
39 cupru și un display **d** alfanumeric de afișare a concentrației ionilor de cupru din vin în unități  
de mg/L.

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

45 Etapele de fabricare a unei lamele **1** de unică utilizare implică în primă fază depune-  
rea pe celula electrochimică potențiomtrică plană a agentului **2** de fixare și imobilizare a 1  $\mu$ l  
47 agaroză soluție apoasă 0,5%, urmată de depunerea materialului **3** biologic activ a lului glicină  
soluție apoasă 5%, de uscarea timp de 30 min la o temperatură de 25°C și de operația de  
încapsulare etanșă.

# RO 133892 B1

Modul de lucru al biosenzorului conform invenției parcurge următoarele etape succesive:	1
- conectarea lamei <b>1</b> , de unică utilizare, prin glisare în fanta corespunzătoare a unității <b>9</b> electronice a biosenzorului, ceea ce duce automat la activarea microprocesorului $\mu$ pentru achiziție și prelucrare date;	3
- manevrarea manuală a biosenzorului în sensul introducerii lamei <b>1</b> într-o cuvă polimerică cilindrică ce conține 10 ml de vin analizat;	5
- citirea de pe display-ul alfanumeric, a unității <b>9</b> electronice, a concentrației ionului de cupru din proba <b>8</b> de vin.	7
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 <i>d</i> alfanumeric să apără 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.	9
Odată conectat la celula <b>1</b> electrochimică, se pornește potențostatul <b>5</b> , care măsoară concentrația de ioni de cupru prezentă în proba <b>8</b> de vin. Dacă concentrația ionilor de cupru, afișată pe display-ul <i>d</i> al potențostatului depășește limita care ar putea induce casarea cuproasă, atunci operatorul adaugă substanțe chimice de corecție <b>6</b> (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 <i>s</i> intern se efectuează mai multe ciclovoltagrame (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 $\mu$ . 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 <i>d</i> al biosenzorului.	11
Caracteristicile de bază testate cu acest biosenzor au fost sensibilitatea analitică, fig. 5, reproductibilitatea (precizia), fig. 6 și stabilitatea în timp, fig. 7.	13
	15
	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33

# RO 133892 B1

## Revendicări

1

3

1. 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 componere o unitate potențiomtrică și o lamelă (1) de unică utilizare, polimerică, ce reprezintă o celulă electrochimică potențiomtrică plană, pe care este depus un agent (6) de fixare și imobilizare, un material (7) biologic activ cu rol de legare și stabilizare a ionului cupru din vin într-o specie chimică activă electrochimic, pentru analiza biosenzorială a ionului cupru fiind necesară o cantitate de ordinul a 10 ml de vin, corelarea între curentul dat de unitatea potențiomtrică a biosenzorului conform invenției și concentrația ionului de cupru fiind făcută prin curba de calibrare stabilită la rândul ei cu ajutorul unei familii de curbe ciclo-voltametrice.

5

7

9

11

13

2. Biosenzor conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, agentul de fixare și imobilizare (6) este o soluție apoasă de agaroză 0,5%.

15

3. Biosenzor conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, materialul biologic activ (7) este o soluție apoasă de glicină 5%.

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01);

G01N 33/20 (2006.01)

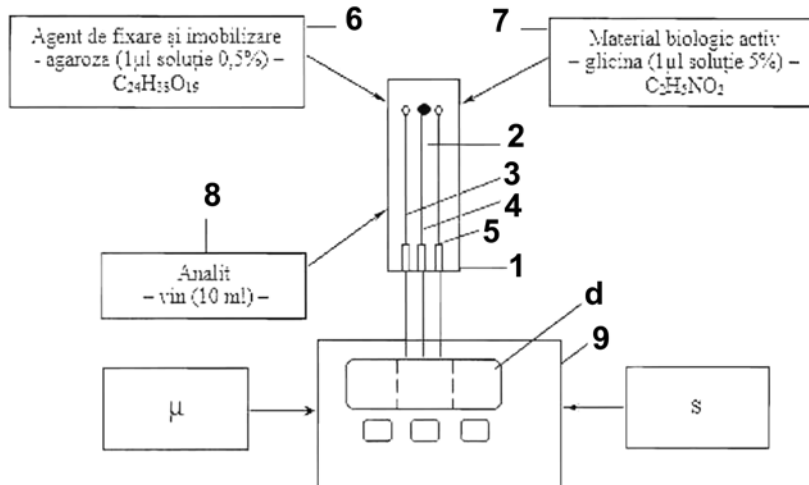


Fig. 1

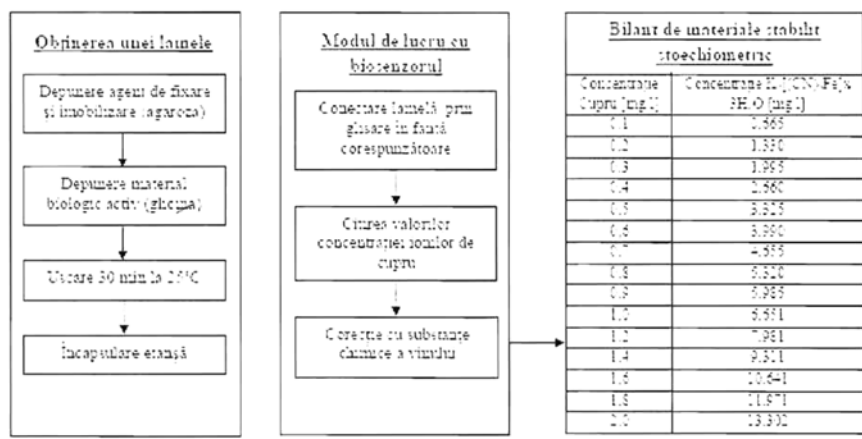


Fig. 2

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01);

G01N 33/20 (2006.01)

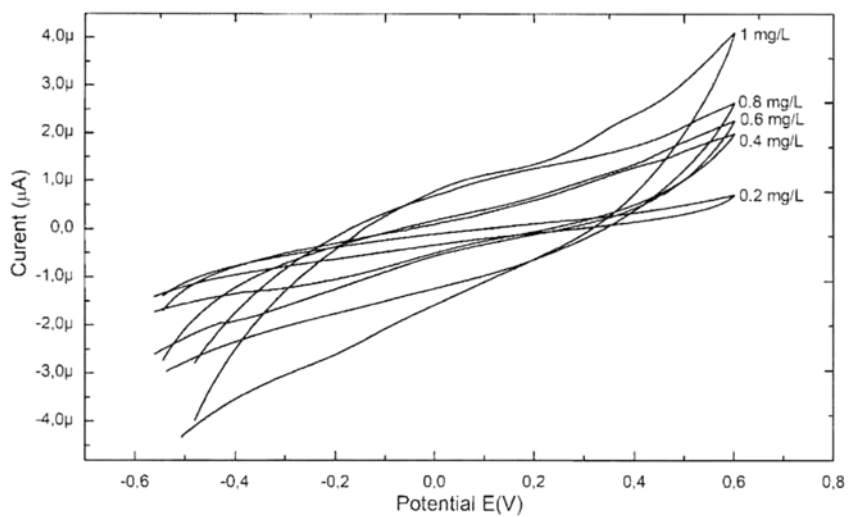


Fig. 3

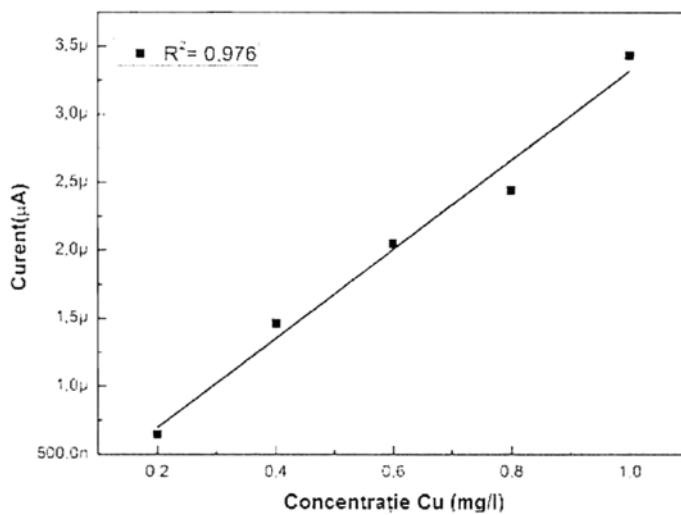


Fig. 4



(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01);

G01N 33/20 (2006.01)

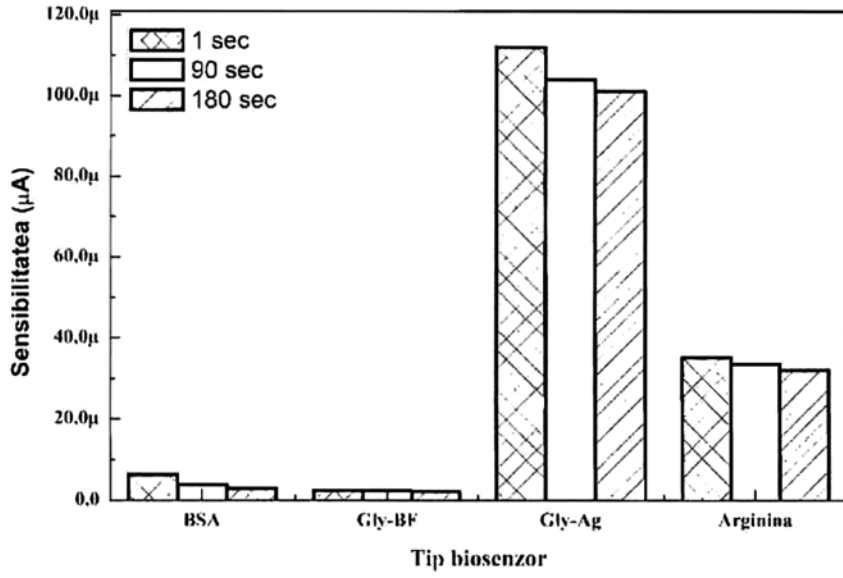


Fig. 5

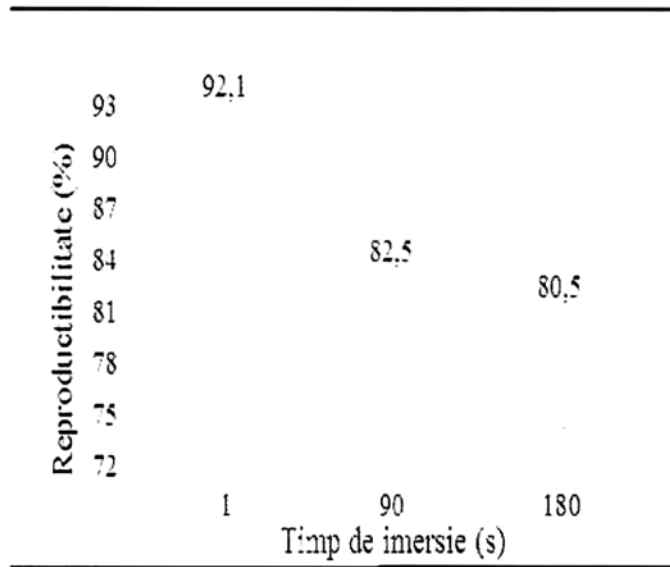


Fig. 6

(51) Int.Cl.

G01N 27/327<sup>(2006.01)</sup>,

G01N 33/20<sup>(2006.01)</sup>

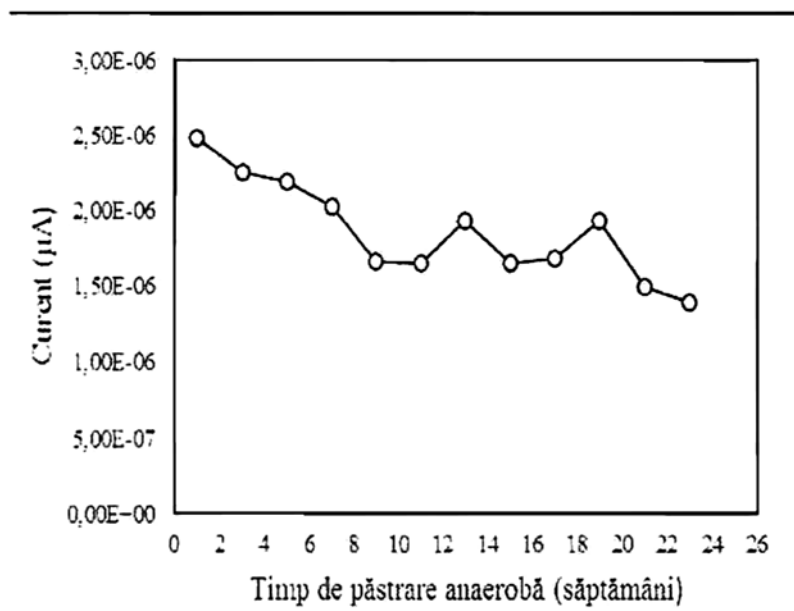


Fig. 7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 186/2023