



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00586

(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 FIER DIN VIN

#### (57) Rezumat:

Invenția se referă la un biosenzor pentru determinarea ionilor de fier din vin. Biosenzorul, conform invenției, este format dintr-o celulă (1) electrochimică potențiometrică constând dintr-o lamelă 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 (1) fiind depuse un agent (6) de fixare și imobilizare de tip benzofenonă, precum și un material (7) biologic activ de tip deferoxamină cu rol de legare a ionilor de fier din proba de vin supusă analizei *in situ*.

Revendicări: 4  
Figuri: 7

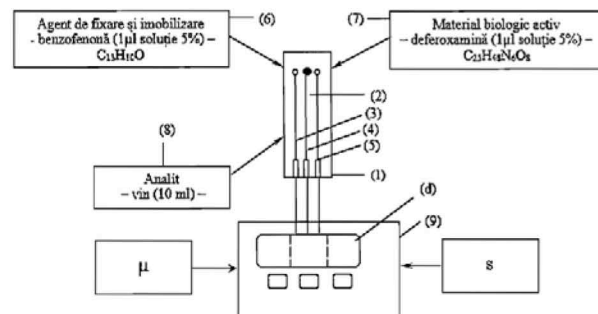


Fig. 1

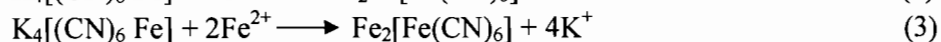
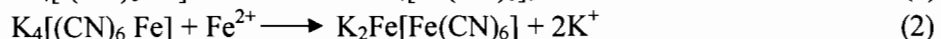
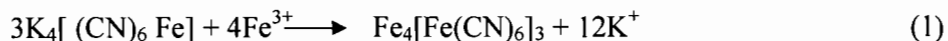


## BIOSENZOR PENTRU DETERMINAREA IONILOR DE FIER DIN VIN

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

Prezența ionilor de fier în concentrații de peste 10 mg/l duce la degradarea calității vinului, cunoscută generic sub denumirea de casare ferică. În scopul prevenirii casării ferice a vinurilor sunt folosite substanțe chimice de corecție care reacționează cu ionii de fier și dau precipitate insolubile de densitate ridicată. Substanța de corecție folosită la scara cea mai largă pentru eliminarea ionilor de fier din vin este ferocianura de potasiu. Determinarea exactă a concentrației ionilor de fier 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 fier cu ferocianură de potasiu este următoarea:



Pentru determinarea ionilor de fier 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, potențiomertia, amperometria și conductometria, precum și metode de spectrometrie moleculară sau metode volumetrice.

Dezavantajele metodelor spectrometrice enumerate mai sus constau în faptul că mijloacele care le deserveșc 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 fier 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 fier din vin.

În vederea evitării trimerii unor probe de vin la laboratorul de specialitate, pentru stabilirea concentrației ionilor de fier, 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 fier din volume mici de vin supuse analizei.

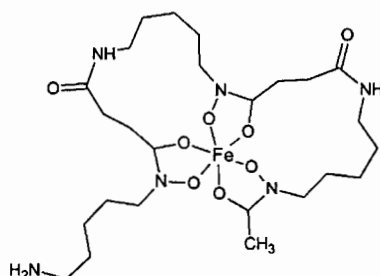
Un asemenea mijloc de analiză instrumentală îl poate constitui un biosenzor specializat pe ionul de fier. În urma achiziției și procesării datelor obținute pentru o proba de vin, pe display-ul biosenzorului apare afișată concentrația ionului de fier din acel vin și după caz și necesarul de substanță de neutralizare. În această situație, operatorului îi revine doar sarcina dozării corespunzătoare a substanței de neutralizare pentru un anumit volum de vin care prezintă concentrația de ioni de fier 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 fier. În aceste studii sunt specificați și unii biosenzori, care sunt protejați prin propuneri de invenții și brevete de invenții. În documentul (D1) este descris un biosenzor, la care concentrația ionilor de fier se determină din vin pe cale fotometrică și este bazat pe un biochip și o unitate optoelectronică portabilă, care folosește un disc poros de hârtie impregnat cu ferocianură de potasiu, iar la contactul cu 1 ml de vin dă o reacție de culoare albastră. Măsurarea intensității culorii și conversia acesteia în unități de concentrație a fierului fiind realizată de o structură fotometrică. În documentul (D2) este descris un alt biosenzor pentru determinarea ionilor de fier bazat pe utilizarea lactoferinei. Aceasta eliberează protoni atunci când fierul este izolat de lactoferină, iar modificarea potențialului cauzată de eliberarea de protoni este măsurată cu un potențiomtru sau un dispozitiv de detectare a pH-ului. În documentul (D3) este prezentată o metodă de determinare a ionilor de fier din apă pe cale fotometrică folosind un kit de detectare astfel, într-un mediu slab acid, fierul din apă reacționează cu 2-(5-brom-2-piridilazo)-5-(diethylamino) fenol care formează un complex roșu violet iar intensitatea culorii complexului este direct proporțională cu concentrația de ioni de fier. În documentul (D4) este descris un biosenzor pentru detecția ionilor de fier din probe lichide alimentare, cum ar fi vinul. Biosenzorul se bazează pe un tranzistor cu efect de câmp, unde o rețea de nanotuburi de carbon cu pereți unici acționează ca un canal conductor. În documentul (D5) este prezentat un biosenzor pentru determinarea ionilor de fier din vin pe cale potențiomtrică, bazat pe utilizarea electrozilor serigrafiați, cu element de fixare și imobilizare agaroză și cu material biologic activ proteina A, interpretarea rezultatelor se efectuează prin voltametrie ciclică. Principiul metodei din documentul D5 este similar cu al biosenzorului conform invenției însă sensibilitatea metodei, precizia, stabilitatea dar și  $R^2$  al curbei de calibrare, ca parametri de performanță analizați, sunt inferioare biosenzorului care utilizează benzofenona ca agent de fixare și imobilizare și deferoxamina ca material biologic activ.

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 fier din vin.

În acest scop este folosită o structură potențiomtrică portabilă, în compunerea căreia intră o celulă electrochimică potențiomtrică, 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 (benzofenonă) și un material biologic activ (deferoxamina), cu rol de legare a componentului (fier), din vin, pentru analiză fiind necesară o cantitate de ordinul a 10 ml.

În urma fenomenologiei electrochimice după punerea în funcțiune a potențiostatului la cei trei electrozi rezultă următorul compus:



(4)

Curentul măsurat de potențostat este o expresie a concentrației ionilor de fier 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 fier 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 fier 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 fier 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 fier din vin

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

Fig. 5. Sensibilitatea analitică a biosenzorului conform invenției ce are ca agent de fixare și imobilizare benzofenona și ca material biologic activ deferoxamina analizată la timp de imersare diferiți.

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 benzofenona și ca material biologic activ deferoxamina.

Biosenzorul conform invenției, Fig. 1, cuprinde o lamelă 1 de unică utilizare ce reprezintă o celulă electrochimică potențometrică, 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 (benzofenonă) și un material 7 biologic activ (deferoxamină) cu rol de legare a componentului urmărit (ion de fier) din proba 8 de vin analizat și o unitatea 9 electronică. Pentru analiza ionului de fier dintr-o probă de vin 8, lamela 1 de unică utilizare se introduce prin glisare în unitatea 9 electronică a biosenzorului formată dintr-un potențostat, programat pentru tensiunea de lucru specifică ionului fier. Potențostatul are în componere un microprocesor  $\mu$  pentru achiziție și prelucrare date, un soft *s* intern pentru transformarea curentului în unități de concentrație a ionilor de fier și un display *d* alfanumeric de afișare a concentrației ionilor de fier 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 fier 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 potențiomtrică plană a agentului 2 de fixare și imobilizare a 1-ului benzofenonă soluție alcoolică 5%, urmată de depunerea materialului 3 biologic activ a 1-ului deferoxamină soluție apoasă 5%, de polimerizare la UV la 350 nm 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  $\mu$  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 fier 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 fier 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 fier, raportată la un litru de vin, cât și cantitatea de ferocianură de potasiu necesară pentru neutralizarea ionului de fier 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 fier este cea determinată cu biosenzorul conform invenției.

Odată conectat la celula 1 electrochimică, se pornește potențiosatul 5, care măsoară concentrația de ioni de fier prezentă în proba 8 de vin. Dacă concentrația ionilor de fier, afișată pe display-ul *d* al potențiosatului depășește limita care ar putea induce casarea ferică, atunci operatorul adaugă substanțe chimice de corecție 6 (ferocianură de potasiu) corespunzătoare tabelului din Fig.2, tabel stabilit pe baza bilanțului de materiale pentru reacțiile chimice (1),(2),(3). În vederea stabilirii bazei de date pentru softul *s* intern se efectuează mai multe ciclovoltagrame (Fig.3) pentru diferite concentrații de ioni de fier folosind în acest scop o soluție de sulfat de fier. 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 fier 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] Amariei Sonia, Gutt Gheorghe, Poroch-Seritan Maria, Ciornei Simona Lenuța, RO129487 (A2) - 2014-05-30, Photometric Biosensor for Determining Iron in Wine.
- [D2] Kruzel Marian L, US5516697 (A) 1996-05-14, Biosensor for Detecting Iron.
- [D3] Su Beibei, Wu Xiuping, Mao Lican, Lian Guojun, CN105987907 (A) 2016-10-05, Detection kit for on-site quick detection of iron ions in water and preparing method.
- [D4] Camara-Martos, F., da Costa, J., Justino, C. I., Cardoso, S., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). Disposable biosensor for detection of iron (III) in wines. *Talanta*, 154, 80-84. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914016301849>
- [D5] Norocel, L., & Gutt G. (2018). Electrochemical biosensor based on the use of spe for the detection of iron content in wine. *Food and Environment Safety Journal*, 17(2) pag. 241 - 245. <http://www.fia.usv.ro/fiajournal/index.php/FENS/article/view/585>

## REVENDICĂRI

1. Invenția Biosenzor pentru determinarea ionilor de fier din vin, în compunerea căruia intră o unitate potențiomtrică și o lamelă (1) de unică utilizare ce reprezintă o celulă electrochimică potențiomtrică plană, de dimensiuni reduse, **caracterizat prin aceea că**, în vederea determinării cu sensibilitate ridicată și cu reproductibilitate ridicată a ionilor de fier din vin este folosit un sistem biosenzorial ce are în compunere un agent (6) de fixare și imobilizare, un material (7) biologic activ, corelarea între curentul dat de unitatea potențiomtrică și concentrația ionului de fier 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 principale nr. 1, **caracterizat prin aceea că**, substanța folosită în acest scop este o soluție alcoolică de benzofenonă 5%;
3. Materialul biologic activ (7) conform revendicării principale nr. 1, **caracterizat prin aceea că**, substanța folosită în acest scop este o soluție apoasă deferoxamină 5%;
4. Metoda potențiomtrică conform revendicării nr. 1, **caracterizată prin aceea că**, în vederea obținerii curbei de calibrare este folosită voltametria ciclică;

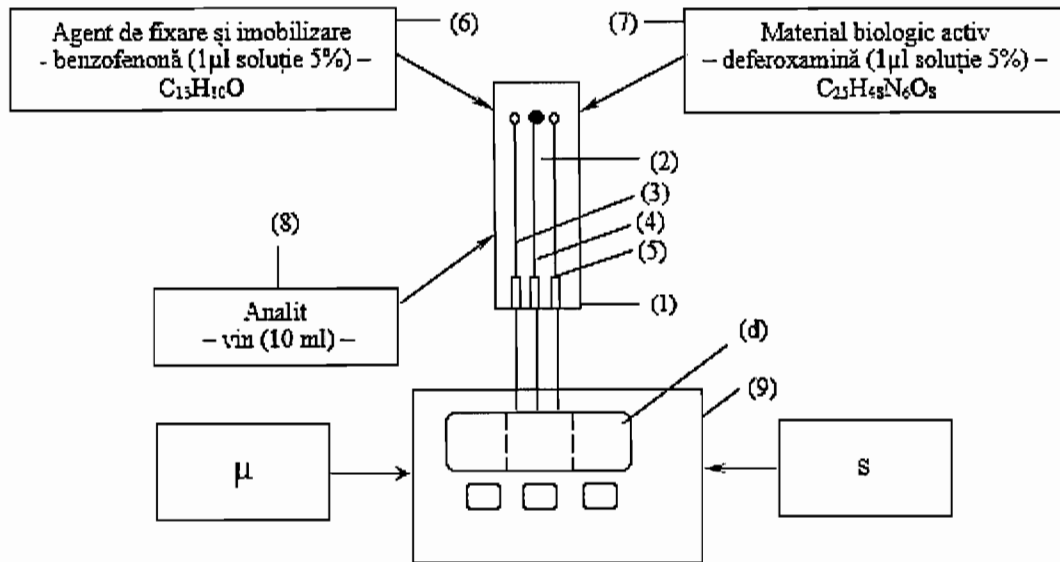


Fig. 1.



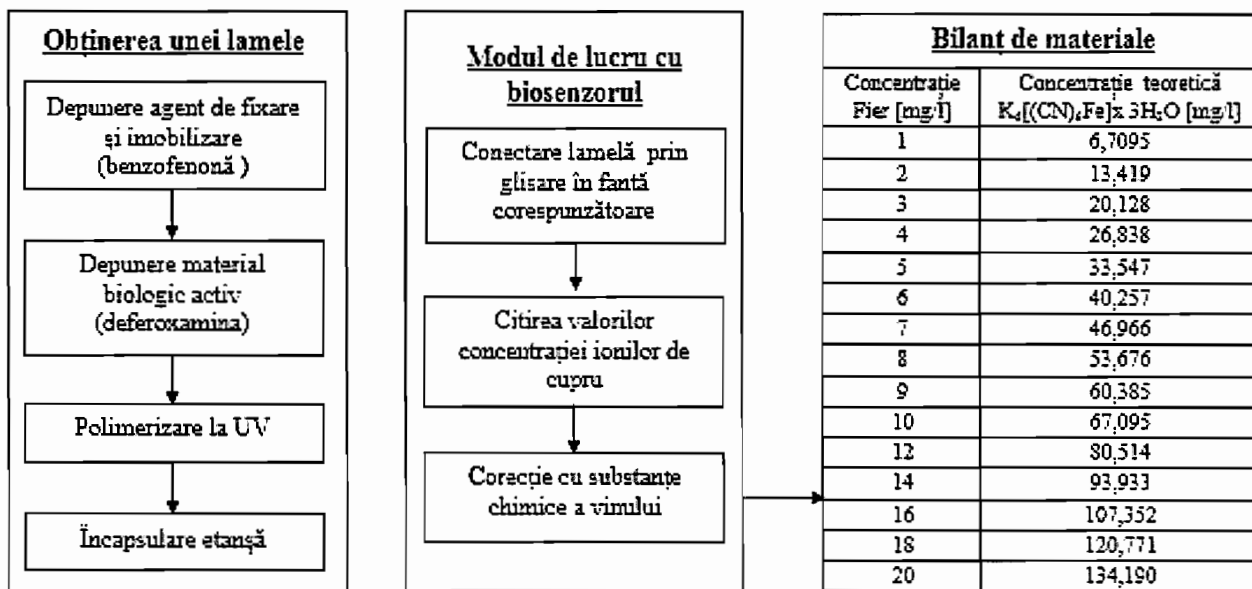


Fig. 2.

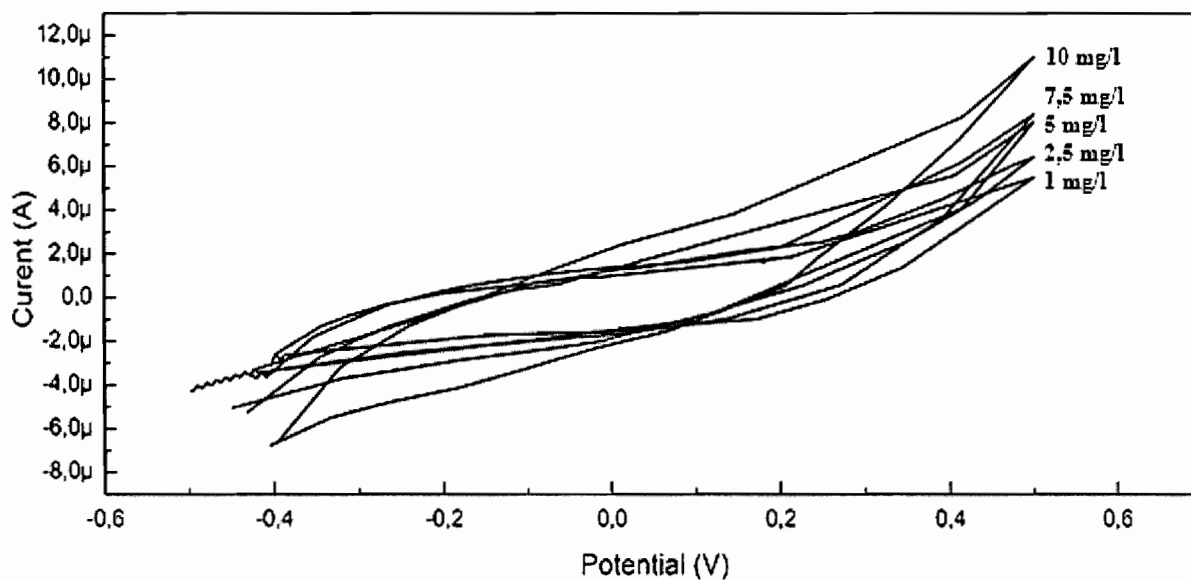


Fig. 3.

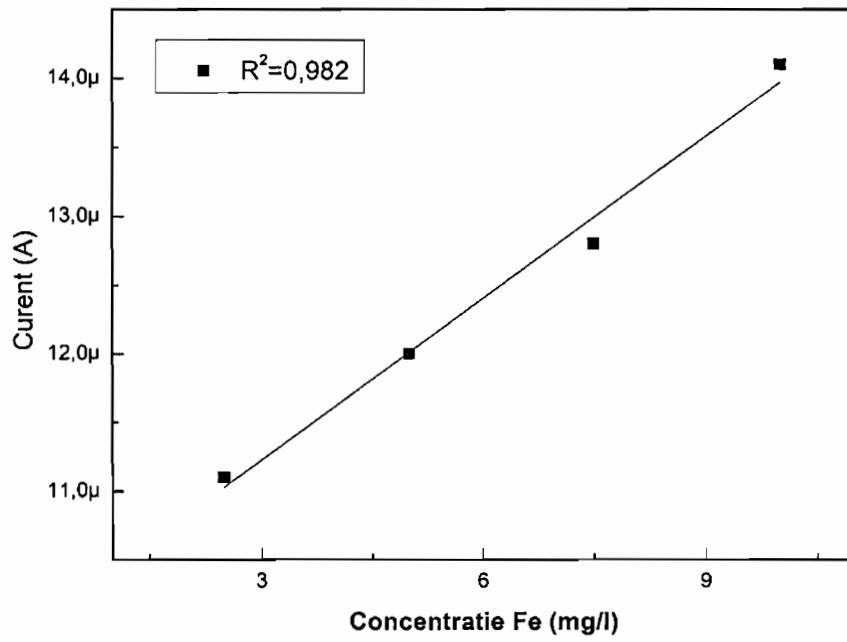
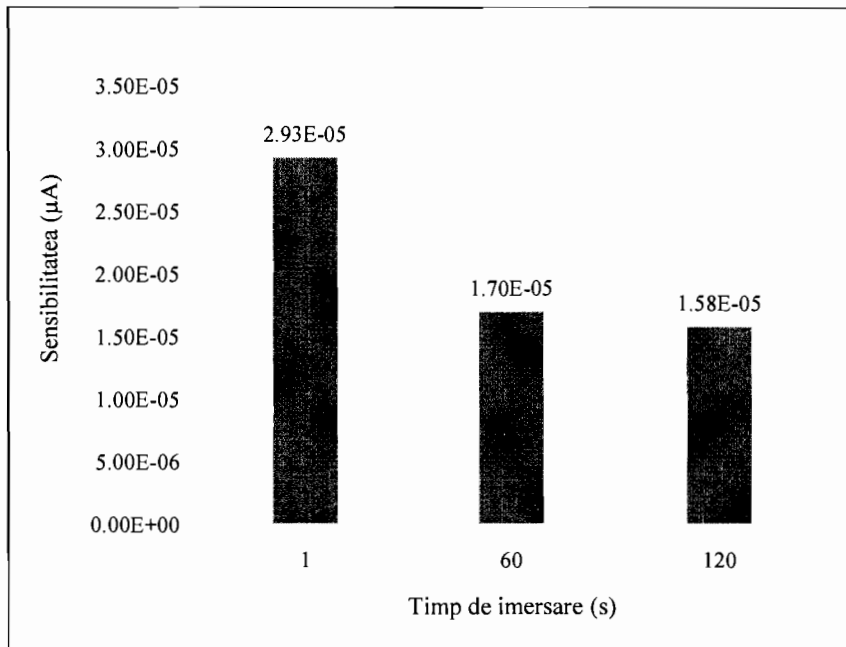
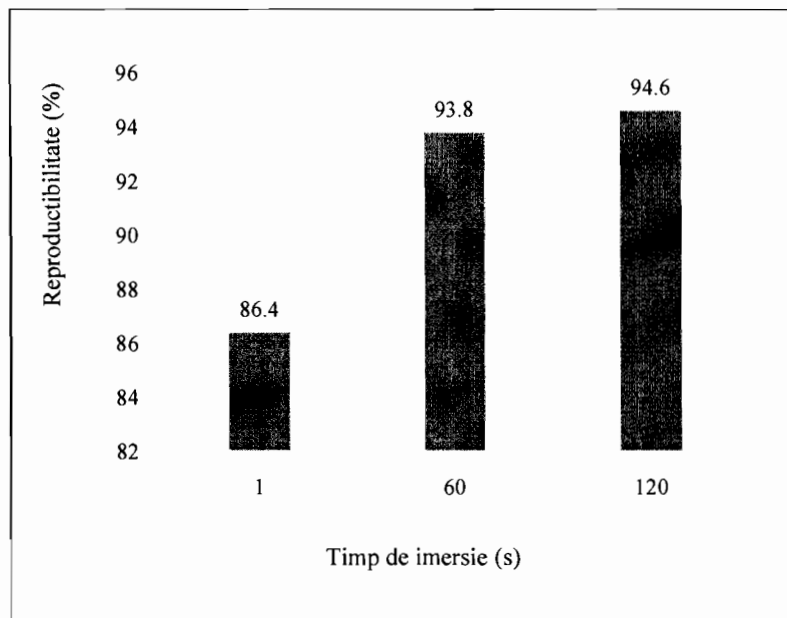


Fig. 4.

**Fig. 5.****Fig. 6.**

25

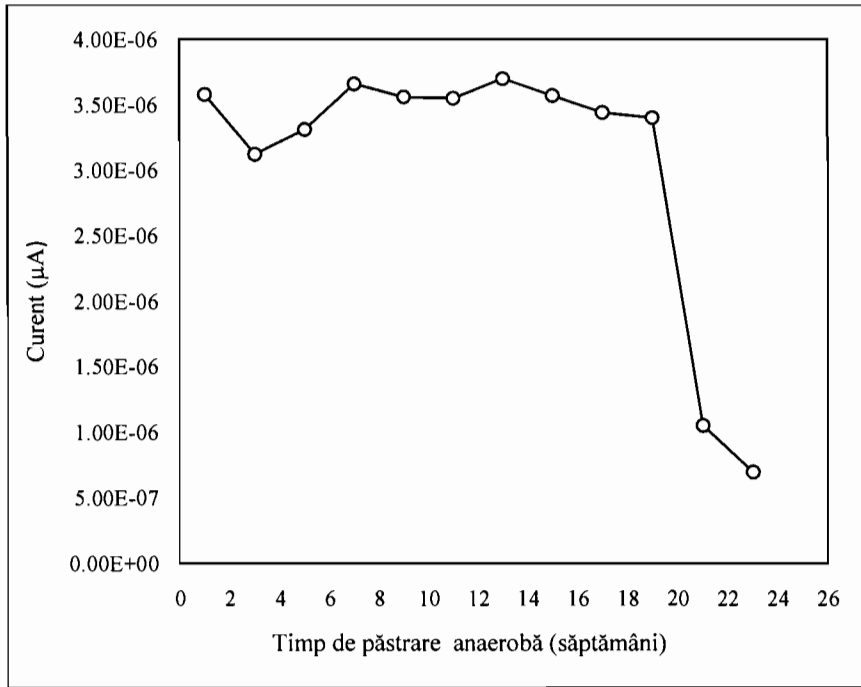


Fig. 7.