



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00586**

(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:  
**L. NOROCEL, G. GUTT,**  
**"ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS**  
**BASED ON THE USE OF SPE FOR THE**  
**DETECTION OF IRON CONTENT IN WINE",**  
**FOOD AND ENVIRONMENT SAFETY,**  
**NR. 2, VOL. 17, PP. 241-245, 2018;**  
**US 5516697 A**

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

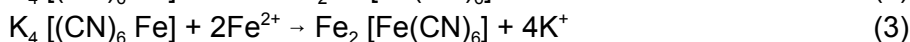
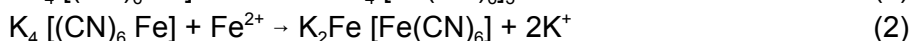


# RO 133893 B1

1 Biosenzorul conform invenției reprezintă o unitate analitică portabilă destinată  
determinării rapide și precise, la fața locului (*in situ*) a ionilor de fier din vin.

3 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  
5 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  
7 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  
9 a substanței de corecție, iar pe de altă parte duce și la evitarea supradozării substanței de  
corecție (ferocianura de potasiu).

11 Reacția chimică de precipitare a ionilor de fier cu ferocianura de potasiu este  
următoarea:



17 Pentru determinarea ionilor de fier cu limite de detecție situate la nivelul de nano-  
grame (ppt) și de micrograme (ppb) sunt folosite metode spectrometrice precum: spec-  
19 trometria 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  
21 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  
23 analiză care includ polarografia, potențiomtria, amperometria și conductometria, precum  
și metode de spectrometrie moleculară sau metode volumetrice.

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

Dezavantajul celorlalte metode prezentate îl constituie faptul că pentru unele metode  
31 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  
33 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  
35 de fier din vin.

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

41 Un asemenea mijloc de analiză instrumentală îl poate constitui un biosenzor speciali-  
zat pe ionul de fier. În urma achiziției și procesării datelor obținute pentru o probă de vin, pe  
43 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  
45 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  
47 conform invenției.

# RO 133893 B1

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 **cererea de brevet RO 129487 (A2) - Amariei Sonia, Gutt Gheorghe, Poroch-Seritan Maria, Ciornei Simona Lenuța, 2014-05-30, *Photometric Biosensor for Determining Iron in Wine*** 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 cererea de brevet **US 5516697 (A), Kruzel Marian L., 1996-05-14, *Biosensor for Detecting Iron*** 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 cererea de brevet **CN 105987907 (A), Su Beibei, Wu Xiuping, Mao Lican, Lian Guojun, 2016-10-05, *Detection kit for on-site quick detection of iron ions in water and preparing method*** 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-(dietilamino) fenol care formează un complex roșu violet iar intensitatea culorii complexului este direct proporțională cu concentrația de ioni de fier. În documentul **Camara-Martos, F., da Costa, J., Justino, C. L, 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>** 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 **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>** 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 acest document 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 benzofenonă ca agent de fixare și imobilizare și deferoxamina ca material biologic activ.

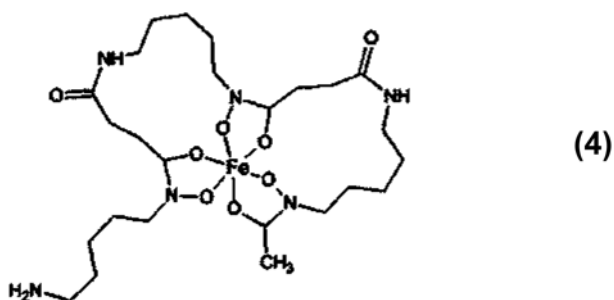
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui biosenzor portabil, cu sensibilitate și precizie ridicată, folosit pentru determinarea *in situ* a ionilor de fier din vin.

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 de vin.

# RO 133893 B1

1 Biosenzorul portabil pentru determinarea *in situ* a ionilor de fier din vin, conform  
2 invenției, se compune dintr-o unitate potențiometrică și o lamelă de unică utilizare, în care  
3 lamela de unică utilizare este formată la rândul ei dintr-un material polimeric suport, izolator  
4 electric, pe care sunt lipiți trei electrozi metalici sau din pulbere de grafit pur, peste care se  
5 depune un agent de fixare și imobilizare reprezentat de o soluție alcoolică de benzofenonă  
6 5% împreună cu un material biologic activ reprezentat de o soluție apoasă de feroxamină 5%  
7 cu rol de legare a ionului de fier dintr-o probă de 10 ml de vin analizat, iar unitatea  
8 potențiometrică reprezentată de o unitate electronică de procesare și afișare date este  
9 formată dintr-un potențiostat programat pentru tensiunea specifică de lucru a ionului de fier,  
10 corelarea între curentul dat de unitatea potențiometrică a biosenzorului și concentrația ionilor  
11 de fier fiind realizată prin curba de calibrare stabilită la rândul ei cu ajutorul unei familii de  
12 curbe ciclo-voltametrice.

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



15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24 Curentul măsurat de potențiostat este o expresie a concentrației ionilor de fier din  
25 proba de vin analizată. Ca urmare a conversiei, cu ajutorul soft-ului intern ce are la bază  
26 curba de calibrare realizată în coordonate curent-concentrație, concentrația ionilor de fier  
27 apare afișată pe display-ul biosenzorului în unități de miligrame pe litru.

28 Avantajul utilizării unui biosenzor conform invenției constă în faptul că acesta are un  
29 preț de cost scăzut, este portabil, nu necesită personal de specialitate, poate fi utilizat la  
30 analize *in situ* în vederea determinării concentrației ionului de fier din volume mici de vin. Se  
31 dă în continuare un exemplu de realizare, în legătură cu fig. 1...7, care reprezintă:

- 32 - fig. 1, schema generală a biosenzorului destinat determinării ionilor de fier din vin;
- 33 - fig. 2, succesiunea fazelor la producerea biosenzorului și la utilizarea acestuia și  
tabel pentru stabilirea cantității de substanță de corecție;
- 34 - fig. 3, exemplu de familie de voltamograme ciclice folosite pentru determinarea  
35 concentrației de ionilor de fier din vin;
- 36 - fig. 4, curba de calibrare folosită pentru determinarea concentrație ionilor de fier din  
37 vin;
- 38 - 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 timpi  
39 de imersare diferiți;
- 40 - fig. 6, reproductibilitatea analitică a biosenzorului conform invenției;
- 41 - 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.

42 Biosenzorul conform invenției, fig. 1, cuprinde o lamelă **1** de unică utilizare ce repre-  
43 zintă o celulă electrochimică potențiometrică, plană, de dimensiuni reduse formată dintr-un  
44 material **2** polimeric suport, izolator electric, niște electrozi **3**, **4** și **5** metalici sau din pulbere  
45 de grafit pur, peste care se depune un agent **6** de fixare și imobilizare (benzofenona) și un  
46  
47

# RO 133893 B1

material **7** biologic activ (deferroxamina) cu rol de legare a componentului urmărit (ion de fier) din proba **8** de vin analizat și o unitate **9** electronică de procesare și afișare date. 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 potențiostat, programat pentru tensiunea de lucru specifică ionului fier. Potențiostatul are în compunere 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** alfa numeric de afișare a concentrației ionilor de fier din vin în unități de mg/L.

Sucesiunea 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 potențiometrică plană a agentului **2** de fixare și imobilizare a 1  $\mu$ l benzofenonă soluție alcoolică 5%, urmată de depunerea materialului **3** biologic activ a 1  $\mu$ l deferroxamină 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 de procesare și afișare date 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 alfa numeric, a unității **9** electronice de procesare și afișare date, 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** alfa numeric să apără 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 potențiostatul **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 potențiostatului 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.

# RO 133893 B1

## Revendicare

1

3

5

7

9

11

13

Biosenzor portabil pentru determinarea *in situ* a ionilor de fier din vin, în compunerea căruia intră o unitate potențiometrică și o lamelă de unică utilizare, **caracterizat prin aceea că lamela (1)** de unică utilizare este formată la rândul ei dintr-un material **(2)** polimeric suport, izolator electric, pe care sunt lipiți niște electrozi **(3)**, **(4)** și **(5)** metalici sau din pulbere de grafit pur, peste care se depune un agent **(6)** de fixare și imobilizare reprezentat de o soluție alcoolică de benzofenonă 5% împreună cu un material **(7)** biologic activ reprezentat de o soluție apoasă de feroxamină 5% cu rol de legare a ionului de fier din proba **(8)** de 10 ml de vin analizat, iar unitatea potențiometrică reprezentată de unitatea **(9)** electronică de procesare și afișare date este formată dintr-un potențiostat programat pentru tensiunea specifică de lucru a ionului de fier, corelarea între curentul dat de unitatea potențiometrică a biosenzorului și concentrația ionilor de fier fiind realizată prin curba de calibrare stabilită la rândul ei cu ajutorul unei familii de curbe ciclo-voltametrice.

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01);

G01N 33/20 (2006.01)

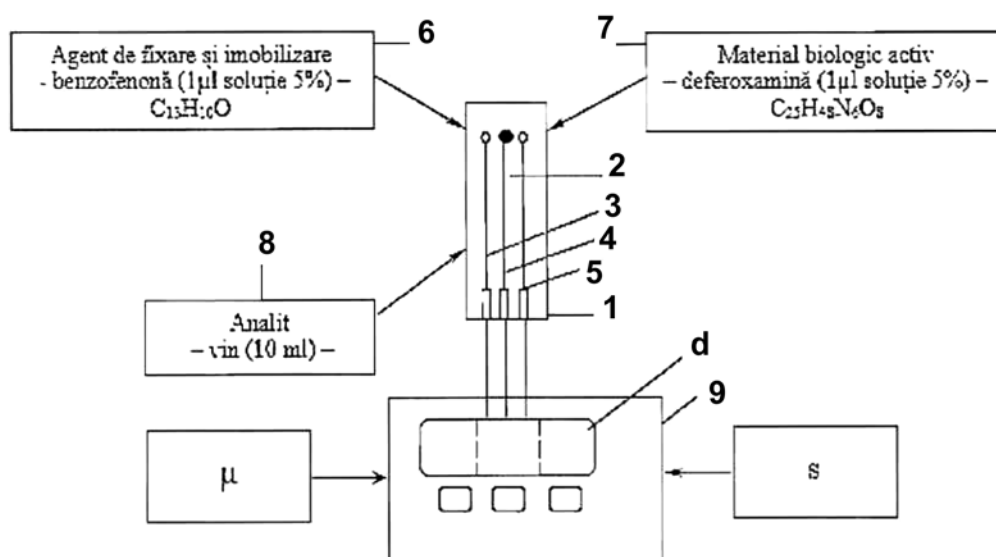


Fig. 1

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01),

G01N 33/20 (2006.01)

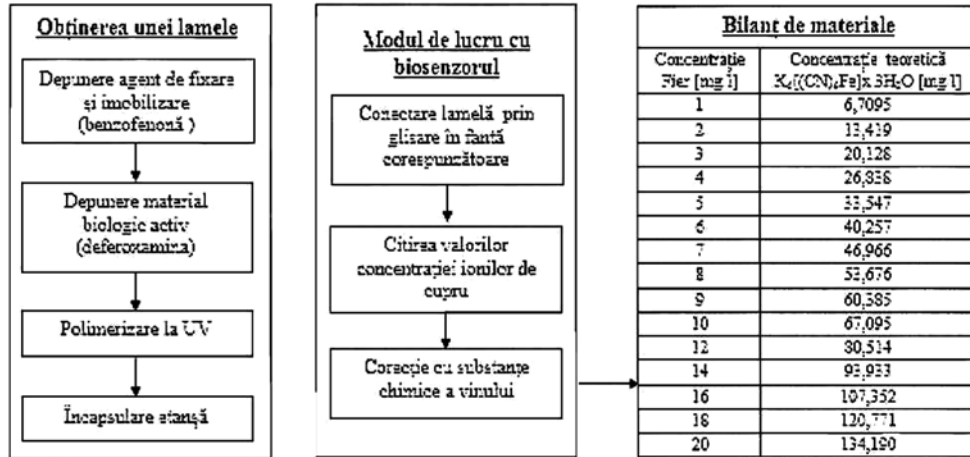


Fig. 2

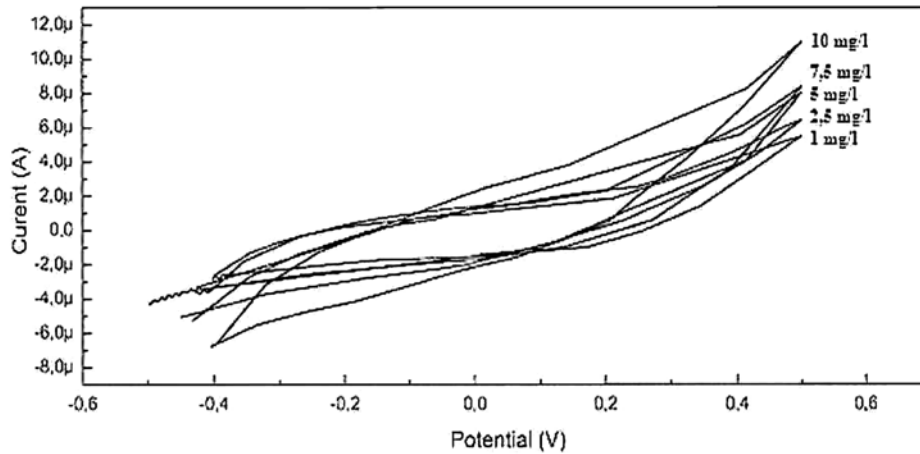


Fig. 3



(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01);

G01N 33/20 (2006.01)

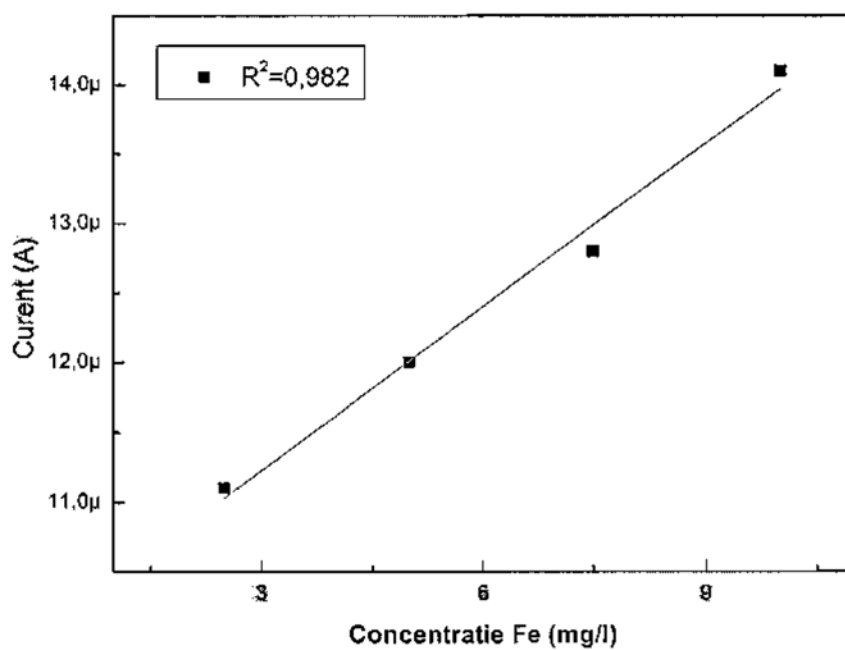


Fig. 4

(51) Int.Cl.

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

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

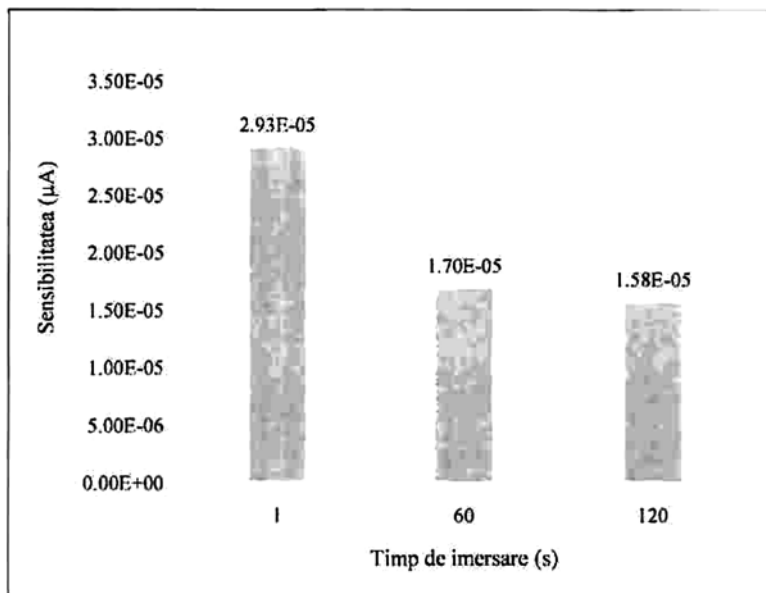


Fig. 5

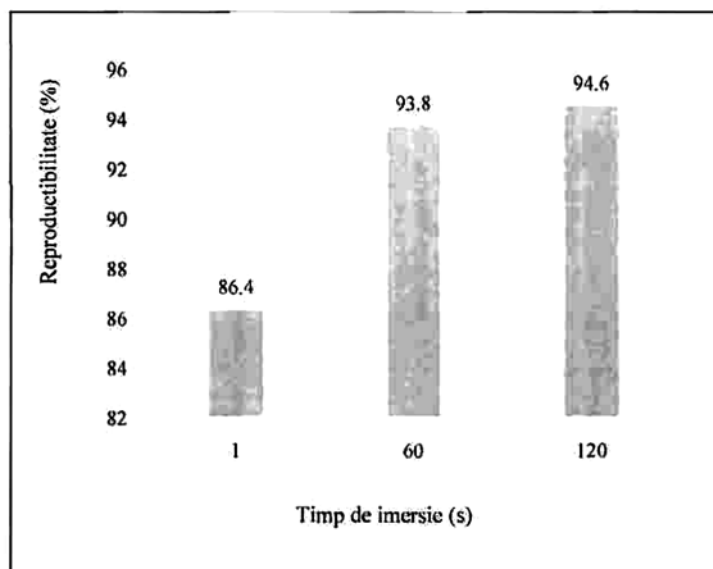


Fig. 6

(51) Int.Cl.

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

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

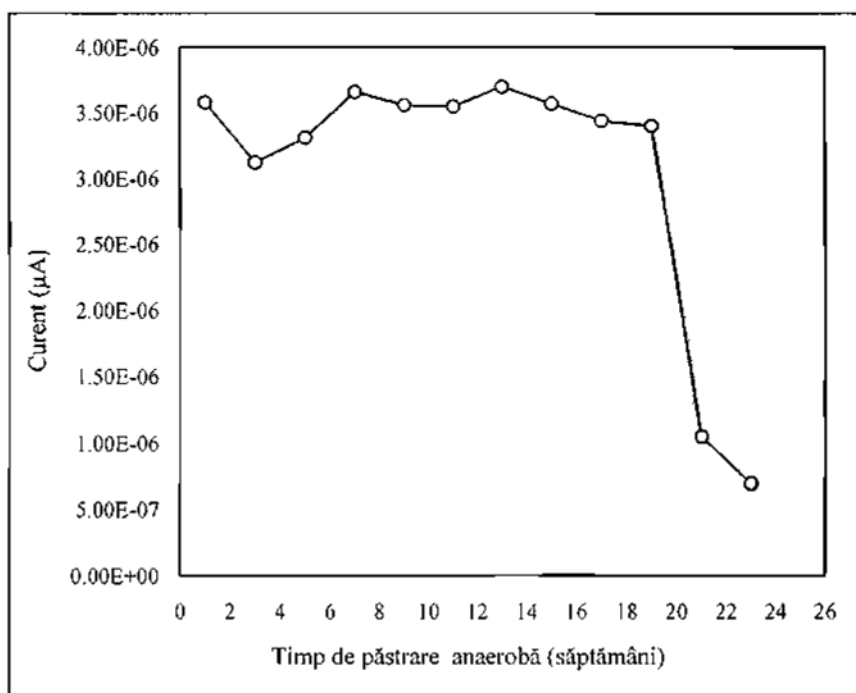


Fig. 7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 187/2023