



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00817

(22) Data de depozit: 18/10/2018

(41) Data publicării cererii:  
29/05/2020 BOPI nr. 5/2020

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICA LASERILOR, PLASMEI ȘI  
RADIĂȚIEI-INFLPR, STR.ATOMIȘTILOR  
NR.409, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:  
• DINCĂ VALENTINA, STR.MĂRĂȘEȘTI,  
BL.P4, ET.3, AP.22, MĂGURELE, IF, RO;  
• SCARISOREANU NICU DOINEL,  
STR.VOINICULUI NR.5, MĂGURELE, IF,  
RO;

• VIESPE CRISTIAN, STR.DORNEASCA  
NR.4, BL.P 64, SC.3, AP.86, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DINESCU MARIA, STR. BÂRCA NR.17,  
BL.M8, SC.A, ET.2, AP.17, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• BRAJNICOV SIMONA, STR.FLORILOR  
NR.23, BL.40, AP.22, MĂGURELE, IF, RO;  
• ION VALENTIN, STR.FIZICIENILOR 19,  
BL.M2, SC.A, ET.1, AP.5, MĂGURELE, IF,  
RO

(54) **PROCEDEU DE IMOBILIZARE FIZICĂ A ENZIMELOR AChE  
ÎN MEMBRANA POLIMERICĂ DE POLIETILENIMINĂ  
ÎN VEDEREA OBȚINERII DE ELEMENTE ACTIVE  
ÎMBUNĂTĂȚITE PENTRU SENZORI CHIMICI/DE GAZ**

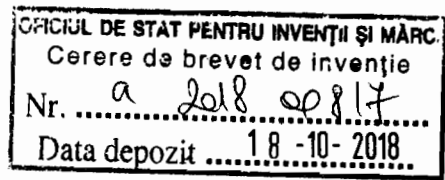
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui element activ pentru senzori de gaze. procedeu, conform invenției, constă în imobilizarea fizică a enzimei AChE în și pe suprafața unui film polimeric de polietilenimină, folosind tehnica de evaporare laser, rezultând un strat cu număr mărit de enzime legate pe unitatea de

adsorbant, de dimensiuni micronice și caracteristici controlate și stabilitate chimică îmbunătățită.

Revendicări: 3  
Figuri: 2





**DESCRIERE INVENTIE**

Inventia se refera la un procedeu de imobilizare fizica cantitativa a enzimei ACHe intr-un strat polimeric de PEI, folosind tehnica de evaporare laser, pentru a obtine un strat cu grosimi micronice folosit ca element activ imbunatatit in senzori chimici-de gaz.

Sunt cunoscute diferite procedee de imobilizare fizica a enzimelor pe un suport, fie prin adsorbție si / sau forte ionice, hidrofobe, legaturi de hidrogen, sau legaturi Van der Waals de legare dintre enzima si suport [1-6].

Aceste procedee de imobilizare fizica prezinta dezavantajul ca adsorbția se produce doar superficial, zona interioara a suportului nefiind utilizata, iar randamentul (enzima legata pe unitatea de adsorbant) este mica, alt dezavantaj fiind si faptul ca enzima este partial sau total inactivata, si ca legaturile dintre enzima si adsorbant sunt slabe si reversibile, activitate specifica redusa. Folosirea tehnicii laser MAPLE (evaporare laser asistata de o matrice) a fost folosita pentru depunerea simpla de enzima Ribonucleaza si Lipasa pe suport, fara o imobilizare in si pe un polimer, si mai ales, fara demonstrarea functionalitatii catre aplicatii de tip senzori de gaz [7,8].

Totodata, in prezent, se cunosc si metode de imobilizare covalenta a enzimelor pe suport polimeric [9-brevet EP 2011/073794, 10-brevet RO 129563 B1], care inasa prezinta dezavantajul folosirii de solventi organici (hexan, toluen, etc) ce pot afecta atat suportul polimeric cat si activitatea enzimei.

Scopul inventiei este de a obtine o imobilizare fizica a enzimei ACHe in si pe suprafata unui film de PEI, care sa permita o imbunatatire a stabilitatii chimice a enzimelor incorporate in mod controlat, implicit sa permita o imbunatatire a elementului/membranei active folosite pentru senzori de gaz.

Problema pe care o rezolva inventia consta in posibilitatea imobilizarii atat la exteriorul membranei/filmului polimeric de PEI cat si in zona interioara, crescand astfel randamentul acesteia. Astfel, prin faptul ca este marit numarul enzimelor legate pe unitatea de adsorbant, sensitivitatea senzorului este imbunatatita.

Procedeu, conform inventiei, prezinta urmatoarele avantaje:

- stabilitate chimica imbunatatita, posibilitatea de a isi pastra volumul în vapori de apa sau alte tipuri de solventi organici (previne craparea biomoleculelor icorporate)
- proces non toxic
- controlul asupra: ariei si caracteristicilor suprafetei (rugozitate, grosime)

-îmbunătățirea stabilității enzimelor încapsulate datorită straturilor de PEI

-posibilitatea miniaturizării și dispunerii și pe alt tip de suport: plastic, hârtie, metale etc.; oferă reacții de înaltă sensibilitate.

Procedeu conform invenției înlătură principalul dezavantaj menționat anterior, și anume imobilizarea instabilă și cu randament scăzut al enzimelor, prin faptul că enzimele sunt transferate prin evaporare laser concomitentă a unui strat superficial de material înghețat care conține 1% enzimă în apă și 2% PEI în alcool metilic. Datorită procesului de evaporare și a extragerii vaporilor cu ajutorul unei pompe de vid, activitatea enzimei nu este afectată de prezența solventului folosit pentru PEI.

Procedeu conform invenției constă în:

-Iradieră unei ținte compartimentate (7) cu un fascicul laser (2) provenind de la un laser (1)Nd:YAG(266 nm, 5-6 ns, 10 Hz), ținta fiind plasată într-o încălțată vidată(6). Fasciculul laser este ghidat în camera de depunere (6) cu ajutorul unui sistem de oglinzi(3) și focalizat pe suprafața țintei (7) cu ajutorul unei lentile(4) cu distanța focală de 100 mm. Aria spotului măsurată la suprafața țintei a fost de 1 mm<sup>2</sup>. În vederea preparării țintei (7), enzima ACHe (în proporție de 1 %) a fost dizolvată în apă (matrice), iar polimerul PEI a fost dizolvat 2% în alcool metilic(matrice). Soluțiile obținute au fost înghețate într-un suport de cupru (8) compartimentat 1/3 pentru PEI și restul de 2/3 pentru enzima, folosindu-se azot lichid. Datorită temperaturii diferite de înghețare a solventilor folosiți (matrice), și pentru a asigura integritatea țintelor, a fost înghețat prima dată polimerul, urmat de adăugarea enzimei în compartimentul alocat acesteia. Suportul țintei a fost răcit continuu în timpul depunerii, pentru a menține ținta înghețată, folosindu-se azot lichid. În urma iradierii cu fasciculul laser, focalizat pe țintă, materialul este evaporat; matricea este cea care absoarbe energia de la fasciculul laser, materialul dizolvat neinteracționând cu radiația.

Vaporii matricei antrenează moleculele de polimer și enzima către substratul aflat paralel, la câțiva centimetri de țintă. Moleculele antrenate în acest proces se depun pe substrat, în timp ce moleculele volatile ale solventului sunt evacuate din încălțată de depunere prin sistemul de pompaj.

Prin alegerea și optimizarea fluenței laser, a numărului de pulsuri laser, a distanței țintă-substrat și a compoziției țintei înghețate, caracteristicile straturilor depuse pot fi ajustate corespunzător, în vederea obținerii unor acoperiri omogene, aderente și cu topografie controlată.

Se da în continuare un exemplu de realizare a procedurii de obținere a stratului de PEI cu enzima ACHe imobilizată pe și în suprafața acestuia, conform invenției, în legătură cu figura 1-2, care reprezintă:

-Fig.1., schema dispozitivului experimental de evaporare a polimerului si enzimei care sa duca la imobilizarea acestora atat in stratul de PEI cat si pe suprafata acestora;

-Fig. 2 a, imaginea obtinuta cu microscopul de forta atomica a morfologiei suprafetei obtinuta prin evaporare laser; b-spectru FTIR al membranelor polimerice de PEI cu enzima ACHe imobilizata in si pe suprafata, obtinute prin evaporare laser si prin picatura.

Referitor la Fig.1, procedeul de imobilizare fizica a enzimelor ACHe in si pe stratul de PEI presupune urmatoarele etape:

-Se obtine o tinta (7) prin inghetarea într-un suport compartimentat de cupru (8) de diferite de solutii de 1, respectiv 2% solutii de enzima ACHe dizolvată în apă (matrice) în proporție de 1 % , si polimerul PEI dizolvat 2% in alcool metilic(matrice).

-Se iradiază tinta compartimentata (PEI-1/3, ACHe-2/3) (7) cu un fascicul (2) laser pulsant directionat in camera cu un sistem de oglinzi (3) si focalizat cu ajutorul unei lentile (4) ;

-Laserul are o durata a pulsurilor de ns, lungimea de unda de 266 nm, rata de repetitie 10 Hz iar fluanta folosita fiind de 450 mJ/cm<sup>2</sup>;

-In urma iradierii cu fascicul laser la fluanta de 450 mJ/cm<sup>2</sup>, are loc o evaporare a stratului superficial al tinei in camera de depunere (6) vidata;

-Vaporii rezultati poarta moleculele de ACHe si PEI catre suport(senzor)(9) unde acestea sunt colectate sub forma unui strat cu grosimea de 1 micron (atunci cand se folosesc 72 kpulsuri);

Referitor la Fig. 2, evaluarea structurii suprafețelor filmelor depuse la nivel micro si nano a fost efectuata prin investigații AFM. Acestea au fost realizate cu un sistem Park XE 100 AFM în modul non-contact, ce ne poate oferi astfel o imagine a suprafeței fără riscul inducerii de modificări asupra stratului de polimer. Scanările AFM ce au fost efectuate pe diferite zone ale filmelor depuse prin evaporare laser arată o acoperire uniformă, cu rugozitate joasa cu valori sub 5 nm (Fig2 a).

Caracterizarea chimică si confirmarea pastrarii grupurilor functionale ale enzimei ACHe in urma imobilizarii in si pe suprafata stratului polimeric de PEI a fost facuta prin Spectroscopia de infraroșu cu transformată Fourier (FTIR – Fourier Transform InfraRed). Spectrele au fost măsurate folosind modul de absorbție, în domeniul 400-7800 cm<sup>-1</sup>, cu o rezoluție de 4 cm<sup>-1</sup> prin efectuarea a 1024 scanări si folosind o funcție Rosenfeld de apodizare. Astfel, in figura 2b sunt prezentate spectrele filmelor depuse la fluanta laser de 450 mJ/cm<sup>2</sup> si ale celor obtinute ca si control, prin picatura . Benzii de absorbție (cm<sup>-1</sup>) caracteristice celor 2 compusi care se regasesc si in cazul filmelor in care enzima a fost imobilizata in si pe suprafata polimerica de PEI se observa dupa cum urmeaza:

-PEI: 3500 cm<sup>-1</sup>-intindere asimetrica NH; 3391 cm<sup>-1</sup>-intindere simetrica NH; 3365 intindere II NH; 2915 cm<sup>-1</sup>-intindere asimetrica CH; 2881 cm<sup>-1</sup>-intindere simetrica CH; 1647 cm<sup>-1</sup>- deformare N-H deformation ; 1496 cm<sup>-1</sup>- deformare C-H si 1043 cm<sup>-1</sup>- intindere C-N

-AChE : 2962 cm<sup>-1</sup>-intindere C-H; 2335 cm<sup>-1</sup> Si-H ; 1700-1600 Amida I; 1600-1500 Amida II

Este important de subliniat prezenta gruparilor Amida I si II care sunt o caracteristica a pastrarii gruparilor functionale ale enzimei.

In plus, functionalitatea enzimelor a fost testata folosind un dispozitiv bazat pe senzori cu unde acustice de suprafata, si s-a observat ca probele obtinute prin evaporare laser prezinta un raspuns optimizat al senzorului fata de DMMP (30 kHz senzorul acoperit cu PEI-ACHe fata de 11 kHz senzorul acoperit doar cu PEI).

**REVENDICARI**

1. Procedul de imobilizare a enzimei ACHe in si pe un film de PEI in vederea obtinerii unei componente active a senzorului de gaz este caracterizat prin aceea ca se utilizeaza evaporarea laser avand durata pulsurilor de ordinul nanosecundelor.
2. Metoda de obtinere conform revendicarii 1 este caracterizata prin faptul ca probele sunt obtinute prin evaporare laser folosind o fluenta fixa de 450 mJ/cm<sup>2</sup> si un sistem partajat de tinte.
3. Procedul de obtinere conform revendicarii 1 este caracterizat prin faptul ca probele obtinute prin evaporare laser prezinta un raspuns optimizat al senzorului fata de DMMP (30 kHz fata de 11 kHz senzorul acoperit cu PEI)

DESENE EXPLICATIVE

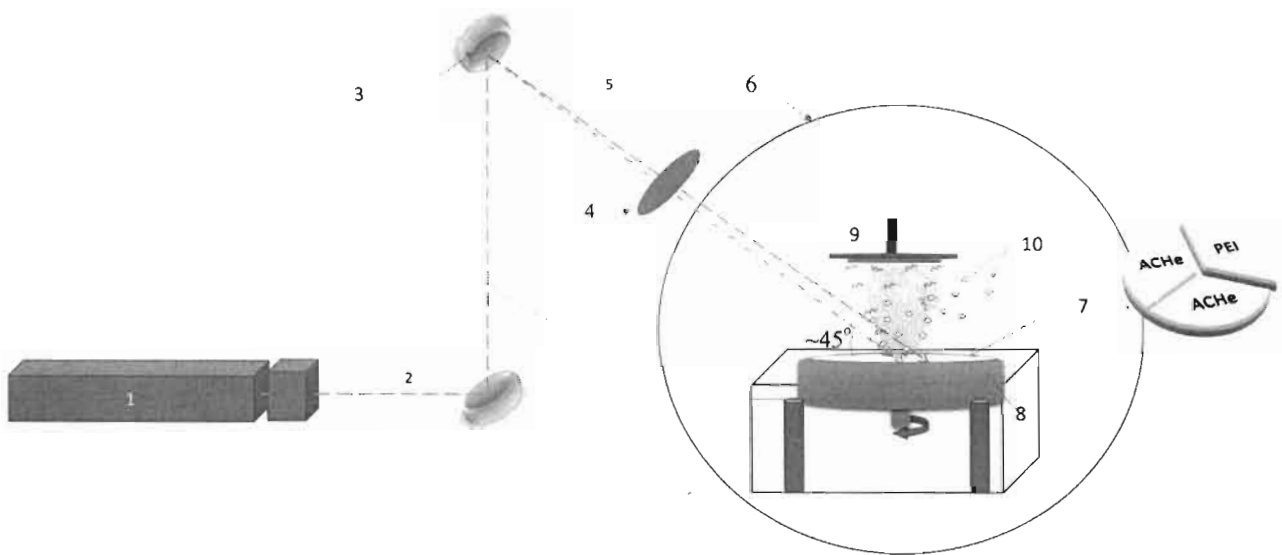
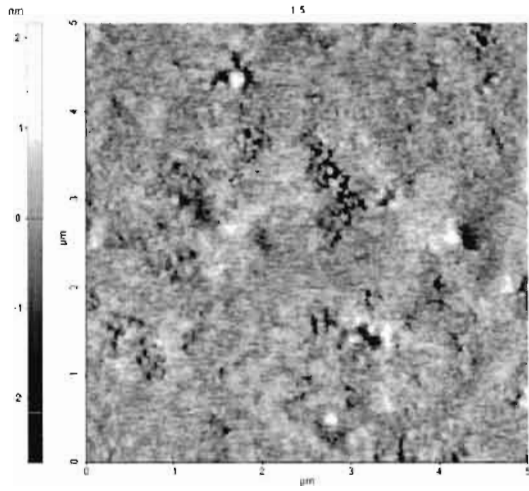
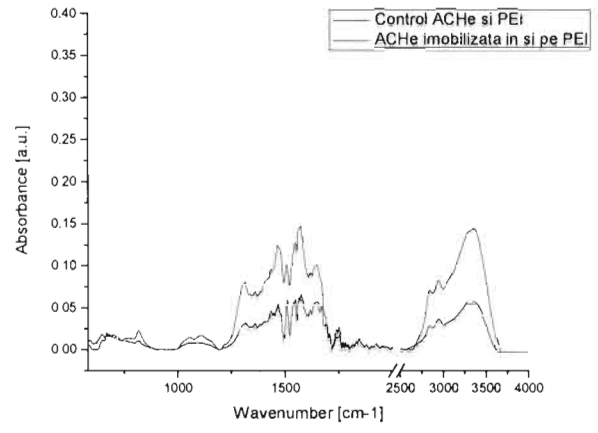


Fig. 1



a



b

Fig 2.