



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00804

(22) Data de depozit: 27/11/2019

(41) Data publicării cererii:  
28/05/2021 BOPI nr. 5/2021

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• IORDACHE TANȚA-VERONA,  
ALEEA DOLINA NR.6, BL.70, SC.1, ET.1,  
AP.4, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• STOICA ELENA BIANCA,  
SAT ȘERBĂNEASA NR.23,  
COMUNA VALEA LUNGĂ, DB, RO;  
• SÂRBU ANDREI, STR.VALEA OLTULUI  
NR. 16, BL.A28, SC.C, ET.2, AP.37,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• GAVRILĂ ANA-MIHAELA,  
BD. ALEXANDRU OBREGIA NR.50, BL.R11,  
SC.B, AP.69, ET.6, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• CIURLICA ANA- LORENA, STR.BUZEȘTI,  
NR.42, SAT BORDENII MARI,  
COMUNA SCORȚENI, PH, RO;  
• CHIRIAC ANITA LAURA,  
INTRAREA CUCURUZULUI NR.20,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ZAHARIA ANAMARIA,  
BD. ALEXANDRU OBREGIA NR.20 BIS,  
BL.20 BIS, SC.A, ET.3, AP.14, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• SANDU TEODOR, STR. PARÂNGULUI  
NR. 43A, ET. 1, AP. 4, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) SUPRAFEȚE HIBRIDE PENTRU DETECȚIA  
ELECTROCHIMICĂ A ENDOTOXINELOR MICROBIENE  
ȘI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA ACESTORA

(57) Rezumat:

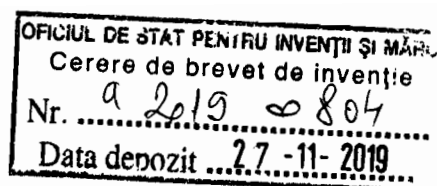
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor suprafețe hibride pentru detecția electrochimică a endotoxinelor microbiene din alimente, mediu și unități medicale. Procedeu, conform invenției, constă în reacția dintre 3-(2-trimetoxisilil)-propilmetacrilat și tetraetoxisilan, în mediu bazic de hidroxid de amoniu, conținând granule macrometrice de polipirol având dimensiuni de 1...5 μm, imprimarea moleculară a filmului cu lipopoli-

zaharidă, rezultând o matrice sol-gel având conținut de polipirol care se depune pe un electrod de carbon al unui senzor electrochimic, rezultând o suprafață hibridă polimerică având capacitatea de detecție a endotoxinei prin voltametrie ciclică.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





## SUPRAFETE HIBRIDE PENTRU DETECTIA ELECTROCHIMICA A ENDOTOXINELOR MICROBIENE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA ACESTORA

Invenția se referă la suprafețe hibride pentru detecția electrochimică a endotoxinelor microbiene și la un procedeu pentru obținerea acestora, cu aplicații în controlul prezenței endotoxinelor în alimente, mediu și unități medicale.

Endotoxinele sunt din punct de vedere chimic lipopolizaharide (LPZ) și se pot găsi în alimente, mediu sau în clinici, în calitate de microcontaminanți. Ele se găsesc în membrana externă a bacteriilor gram negative, cum ar fi *Escherichia coli* sau *Salmonella* și reprezintă riscuri serioase pentru sănătatea umană, putând conduce până la moarte. De aceea este esențial să se dezvolte metode sensibile, precise și rapide pentru detecția lor.

Dintre numeroasele metode de detecție a endotoxinelor microbiene cea mai folosită și dezvoltată în multe variante, dintre care unele brevetate, este metoda „*Limulus amoebocyte lysate*” (LAL) care se bazează pe folosirea sângelui unei vietăți marine : crabul potcoavă conform: **Norman Wainwright, Thomas Novitsky, WO 1989/12644, 1989, Norman Wainwright, Thomas Novitsky EP0687911A2, 1989, Shuji Matuura Kawanishi, Masakazu Tsuchiya Itami, US 5179006, 1993, Christian Alexander, Sven Deutschmann, Pierre Lang, Friedrich Von Wintzin- Gerode, Ulrich Zaehring, WO 2017/017135, 2017.** Cea mai simplă variantă a metodei LAL este încercarea gel-cheag, în care o bucată de gel LAL formează un cheag cu o anumită cantitate de LPZ conform: **Wenqiong Su, Xianting Ding, Methods of Endotoxin detection, Journal of the Association for Laboratory Automation, 1–11, DOI: 10.1177/2211068215572136, 2015** și **Gna Ahn, Simranjeet Singh Sekhon, Yae-Eun Jeon, Myung-Su Kim, Kyungho Won, Yang-Hoon Kim, Ji-Young Ahn, Detection of Endotoxins using Nanomaterials, Toxicol. Environ. Health. Sci. 9(5), 259-268, 2017.** Metoda are dezavantajul că prepararea probei este un proces complex, durează mult timp până la confirmarea prezenței endotoxinei și necesită un loc de muncă special amenajat. În plus s-a dovedit că metoda LAL este influențată de prezența unor polizaharide, așa cum este  $\beta$ -(1,3)-D-glucanul, care se găsește în celulele de ciuperci, drojzii și alge.

A fost dezvoltată și o metodă de cromatografie pe hârtie, similară cu cromatografia în strat subțire prezentată în invenția **CN105116142A, 2017.** Metoda are dezavantajul că e foarte imprecisă și necesită un aparat de cromatografie, care este destul de scump. Metoda necesită aducerea probelor la laborator și nu se poate aplica pe teren.

În ultimul timp au apărut diferite tipuri de biosenzori. Se cunosc multe tipuri de biosenzori, bazați pe afinitatea LPZ cu proteine și cu peptide, biosenzori bazați pe anticorpi, biosenzori bazați pe aptameri și biosenzori cu celule descrise în „**Wenqiong Su, Xianting Ding, Methods of Endotoxin detection, Journal of the Association for Laboratory Automation, 1–11, DOI: 10.1177/2211068215572136, 2017**”. Toate aceste tipuri de biosenzori pentru determinarea endotoxinelor au dezavantajul că utilizează materiale de tipul peptidelor și proteinelor și care prin urmare sunt biodegradabile rapid și deci au o foarte slabă rezistență în timp, presupun

procedee foarte laborioase de preparare a componentului biologic și sunt scumpe. Multe dintre ele, cum ar fi metoda bazată pe anticorpi implică probleme de etică, întrucât anticorpii se extrag prin omorârea animalului. Ca variante ale biosenzorilor, s-au dezvoltat senzorii biomimetici, bazați pe polimeri imprențați molecular, cu capacitate de recunoaștere moleculară similară cu anticorpii naturali, motiv pentru care polimerii imprențați molecular se mai numesc și anticorpi sintetici. Astfel se cunoaște un senzor optic conform: **M.J. Abdin, Z.Altintas,I.E.Tothill, In silico designed nanoMIP based optical sensor for endotoxins monitoring, Biosensors and Bioelectronics 67, 177–183, 2015**, bazat pe MIP și pe metoda de detecție Rezonanță Plasmonică de Suprafață -SPR. Suprafața de detecție este preparată prin polimerizare pe suprafață. Mai întâi endotoxina este legată covalent pe suprafața unor bile de sticlă, tratate în prealabil cu o soluție de 3-aminopropil- trimetiloxisilan (APTMS) în toluen. Apoi bilele de sticlă sunt spălate cu acetonă și incubate cu o soluție de glutardialdehidă în tampon fosfat de pH 7,4. Endotoxina este imobilizată pe suprafață prin incubare din soluție de tampon fosfat 7,4. Urmează spălarea pentru îndepărtarea endotoxinei nelegate. Urmează crearea matricei polimere în jurul templatului endotoxină, care se face folosind ca monomer funcțional acidul itaconic și ca reticulanți un amestec de trimetilol propan trimetacrilat (TRIM) și etileneglicoldimetacrilat (EDGMA) dizolvați în dimetilformamidă și cu inițiere cu pentaeritritoltetrakis(3-mercaptopropionat) (PETMP), ca agent de transfer și esterul benzilic al acidului N,N-dietilditiocarbamic ca fotoinițiator și agent de transfer. Fotopolimerizarea se realizează cu o lampă de UV. După multe alte faze complicate, cum ar fi cea de post polimerizare are loc în final extracția endotoxinei, prin ruperea legăturilor covalente, și se adaugă nanoparticule de aur pentru a se putea aplica metoda SPR. După cum se vede din cele de mai sus, metoda prezintă dezavantaje importante: prepararea suprafeței este extrem de laborioasă, se folosesc multe substanțe scumpe iar metoda SPR implică folosirea unei surse de laser și a unui detector special. Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în aceea că suprafețele hibride se prepară printr-un procedeu sol-gel utilizând un amestec de silani: 3-(2-trimetoxisilil)-propilmetacrilat (MAPTES) și tetraetoxisilan (TEOS), cu adăugarea de particule de polimer electroconductiv, mai precis de polipirol (PPY), filmele fiind preparate direct pe suprafața electrodului de carbon a unui senzor electrochimic. Suprafețele hibride sub forma de filme și procedeul conform invenției înlătură dezavantajele materialelor și procedeele menționate anterior prin aceea că suprafața hibridă se prepară prin reacția MAPTES cu TEOS, în rapoarte molare de 0,8...1,2: 1, în mediu de NH<sub>4</sub>OH conținând 40...60 % masic, față de silani, particule de polipirol de dimensiune 1...5 μm, prepararea făcându-se direct pe suprafața electrodului de carbon al unui senzor electrochimic, filmul obținut fiind imprențat molecular cu lipopolizaharidă și posedând capacitatea de a detecta prezența endotoxinei prin voltametrie ciclică, iar procedeul de obținere a suprafețelor hibride constă în prepararea unei soluții formată din MAPTES și TEOS, în raport molar 0,8...1,2: 1 în alcool etilic absolut, raportul volumetric între amestecul de silani și alcool etilic fiind de 0,15...0,25:1, se prepară o altă soluție cu concentrația de 0,4...0,6 g/L de lipopolizaharidă în apă, prin dizolvarea lipopolizaharidei având 250000 UE/mg, unități de endotoxină, în apă distilată și se amestecă cu prima soluție într-un raport volumetric de 0,4...0,6: 1 față de alcoolul etilic,

obținându-se soluția precursoră A și în paralel se prepară mediul catalitic B care constă din soluție de  $\text{NH}_4\text{OH}$  25%, conținând 40... 60% masic, față de amestecul de silani existent în soluția A, particule de polipirol cu dimensiunea de 2...7  $\mu\text{m}$  cu rol de agent de dopare, apoi soluția precursoră A este adăugată treptat, timp de 5...15 minute, la temperatura de 20...30  $^\circ\text{C}$ , în mediul catalitic B, la un raport între volumul soluției A și volumul de soluție de  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% din mediul catalitic B de 1: 0,3...0,4, sub agitare continuă, cu viteza de 150...250 rot/min, după care amestecul se menține sub aceeași agitare și la aceeași temperatură încă 1,5...2,5 ore pentru hidroliza parțială a grupurilor -OR ale monomerilor, rezultând o matrice sol-gel cu conținut de polipirol, din care se ia cu o pipetă o cantitate și se depune sub formă de picătură pe electrodul de carbon al senzorului electrochimic, raportul masă de carbon: volum picătură fiind de 1:2...4, se lasă la maturat la temperatura de 20...30  $^\circ\text{C}$ , timp de 40-54 ore și apoi încă 40... 54 ore la temperatura de 45...60  $^\circ\text{C}$ , apoi electrodul este spălat pentru extracția LPZ în 3 reprize prin simpla imersare la temperatura camerei de 20  $^\circ\text{C}$  timp de câte 10...15 minute în apă distilată la un raport volumetric între picătura inițială sol-gel și apa de spălare de 1: 800...1200 și apoi este lăsat să se usuce timp de 20-28 ore la temperatura de 20...30  $^\circ\text{C}$ .

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Suprafețele hibride obținute sunt sensibile la prezența endotoxinelor;
- Filmele impregnate molecular au o bună aderență la substratul de carbon al electrocului;
- Procedul propus este simplu și nu necesită aparatură complicată;
- Se folosesc materii prime ieftine;
- Se lucrează la temperatura camerei sau apropiată de aceasta, deci cu consumuri energetice reduse;
- Suprafețele sunt destinate pentru metoda de detecție electrochimică, care este simplă, are detectori ieftini, cum ar fi cei serigrafiați, se poate aplica pe aparate portabile, se poate automatiza și poate fi aplicată pentru monitorizarea continuă la distanță a prezenței endotoxinelor;
- Suprafețele hibride polimerice pot fi depozitate în condiții normale și pot fi reutilizate după spălări succesive;
- Nu se folosesc substanțe toxice și nu sunt probleme deosebite de toxicitate la locul de lucru sau în mediul înconjurător.

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției:

Exemplul 1. Într-un flacon de sticlă de 10 mL se introduc pe rând 1 mL etanol absolut, 0,07 mL MAPTES și 0,08 mL TEOS, raportul molar între silani fiind de 0,8: 1, iar raportul volumetric între amestecul de silani și etanol fiind de 0,15:1. Se amestecă pentru omogenizare. Separat, se prepară o soluție de 0,4 g/L de LPZ prin dizolvarea LPZ (250000 UE/g) în apă distilată. Se iau 0,6 mL din aceasta soluție și se adaugă peste soluția de etanol cu silani și se agită pentru omogenizare, obținându-se astfel soluția precursoră A. Într-un alt flacon de 10 mL se introduc 0,48 mL soluție de  $\text{NH}_4\text{OH}$  25%. Se introduce un agitator magnetic teflonat și flaconul se pune pe plita unui agitator magnetic, aflată la temperatura de 20  $^\circ\text{C}$ . Se pornește agitarea, se reglează la 150 rot/minși se adaugă 0,06 g particule de polipirol cu dimensiunea de 1  $\mu\text{m}$ , preparându-se

astfel mediul catalitic B. După circa 3 minute, se începe adăugarea soluției A peste mediul catalitic B. Adăugarea durează 5 minute. Se continuă agitarea la temperatura de 20 °C timp de 2,5 ore. Se iau 3 μL din solul preparat și se depun pe electrodul de carbon al senzorului electrochimic, ceea ce corespunde la un raport masă carbon: volum picătură de 1: 2. Se lasă la maturat la temperatura de 20 °C, timp de 54 ore. Apoi senzorul se introduce într-o etuvă unde se ține la maturat încă 54 ore la temperatura de 45 °C. Senzorul se lasă apoi să se răcească în atmosferă liberă și se spală de 3 ori prin imersare în câte 3,6 mL apă distilată la temperatura camerei de 20 °C, timp de câte 12 minute, la un raport apă distilată: picătură sol-gel inițială de 1: 1200 și apoi este lăsat să se usuce timp de 28 ore în aer liber cu temperatura de 20 °C. Se obțin senzori electrochimici care prin voltametrie ciclică prezintă deplasarea picului de oxidare în funcție de cantitatea de endotoxina și care se pot folosi pentru detecție electrochimică.

Exemplul 2. Într-un flacon de sticlă de 10 mL se introduc pe rând 1 mL etanol absolut, 0,14 mL MAPTES și 0,11 mL TEOS, raportul molar între silani fiind de 1.2: 1, iar raportul volumetric între amestecul de silani și etanol fiind de 0,25: 1. Se amestecă pentru omogenizare. Separat, se prepară o soluție de 0,6 g/L de LPZ prin dizolvarea LPZ (250000 UE/g) în apă distilată. Se iau 0,4 mL din aceasta soluție și se adaugă peste soluția de etanol cu silani și se agită pentru omogenizare, obținându-se astfel soluția precursoră A. Într-un alt flacon de 10 mL se introduc 0,52 mL soluție de NH<sub>4</sub>OH 25% . Se introduce un agitator magnetic teflonat și flaconul se pune pe plita unui agitator magnetic, aflată la temperatura de 30 °C . Se pornește agitarea, se reglează la 250 rot/min și se adaugă 0,15 g particule de polipirol cu dimensiunea de 5 μm, preparându-se astfel mediul catalitic B. După circa 3 minute, se începe adăugarea soluției A peste mediul catalitic B. Adăugarea durează 12 minute. Se continuă agitarea la temperatura de 30 °C timp de 1,5 ore. Se iau 6 μL din solul preparat și se depun pe electrodul de carbon al senzorului electrochimic, ceea ce corespunde la un raport masă carbon: volum picătură de 1: 4. Se lasă la maturat, pe plita agitatorului, la temperatura de 30°C, timp de 40 ore. Apoi senzorul se introduce într-o etuvă unde se ține la maturat încă 40 ore la temperatura de 60°C. Senzorul se lasă apoi să se răcească în atmosferă liberă și se spală de 3 ori prin imersare în câte 4,8 mL apă distilată, aflată într-un flacon pe plita agitatorului, la temperatura de 30 °C, timp de câte 10 minute, la un raport apă distilată: picătură sol-gel inițială de 1: 800 și apoi este lăsat să se usuce pe plita agitatorului timp de 20 ore la temperatura de 30 °C. Se obțin senzori electrochimici care prin voltametrie ciclică prezintă deplasarea picului de oxidare în funcție de cantitatea de endotoxina și care se pot folosi pentru detecție electrochimică

Exemplul 3. Într-un flacon de sticlă de 10 mL se introduc pe rând 1 mL etanol absolut, 0,1 mL MAPTES și 0,095 mL TEOS, raportul molar între silani fiind de 1: 1, iar raportul volumetric între amestecul de silani și etanol fiind de 0,195: 1. Se amestecă pentru omogenizare. Separat, se prepară o soluție de 0,5 g/L de LPZ prin dizolvarea LPZ (250000 UE/g) în apă distilată. Se iau 0,45 mL din aceasta soluție și se adaugă peste soluția de etanol cu silani și se agită pentru omogenizare, obținându-se astfel soluția precursoră A. Într-un alt flacon de 10 mL se introduc 0,58 mL soluție de NH<sub>4</sub>OH 25% . Se introduce un agitator magnetic teflonat și flaconul se pune pe plita unui agitator magnetic, aflată la temperatura de 25 °C . Se pornește agitarea, se reglează

la 200 rot/min și se adaugă 0,10 g particule de polipirol cu dimensiunea de 4  $\mu\text{m}$ , preparându-se astfel mediul catalitic B. După circa 3 minute, se începe adăugarea soluției A peste mediul catalitic B. Adăugarea durează 8 minute. Se continuă agitarea la temperatura de 25 °C timp de 2 ore. Se iau 4,5  $\mu\text{L}$  din solul preparat și se depun pe electrodul de carbon al senzorului electrochimic, ceea ce corespunde la un raport masă carbon: volum picatură de 1: 3. Se lasă la maturat, pe plita agitatorului, la temperatura de 27 °C, timp de 48 ore. Apoi senzorul se introduce într-o etuvă unde se ține la maturat încă 48 ore la temperatura de 55 °C. Senzorul se lasă apoi să se răcească în atmosferă liberă și se spală de 3 ori prin imersare în câte 4,5 mL apă distilată, aflată într-un flacon pe plita agitatorului, la temperatura de 23°C, timp de câte 10, 12 și respectiv 15 minute, la un raport apă distilată: picatură sol-gel inițială de 1: 1000 și apoi este lăsat să se usuce pe plita agitatorului timp de 24 ore la temperatura de 25°C. Se obțin senzori electrochimici care prin voltametrie ciclică prezintă deplasarea picului de oxidare în funcție de cantitatea de endotoxina și care se pot folosi pentru detecție electrochimică.

Exemplul 4. Într-un flacon de sticlă de 10 mL se introduc pe rând 1 mL etanol absolut, 0,107 mL MAPTES și 0,113 mL TEOS, raportul molar între silani fiind de 0,9: 1, iar raportul volumetric între amestecul de silani și etanol fiind de 0,22: 1. Se amestecă pentru omogenizare. Separat, se prepară o soluție de 0,45 g/L de LPZ prin dizolvarea LPZ (250000 UE/g) în apă distilată. Se iau 0,5 mL din aceasta soluție și se adaugă peste soluția de etanol cu silani și se agită pentru omogenizare, obținându-se astfel soluția precursoră A. Într-un alt flacon de 10 mL se introduc 0,55 mL soluție de  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% . Se introduce un agitator magnetic teflonat și flaconul se pune pe plita unui agitator magnetic, aflată la temperatura de 23°C . Se pornește agitarea, se reglează la 220 rot/min și se adaugă 0,12 g particule de polipirol cu dimensiunea de 2  $\mu\text{m}$ , preparându-se astfel mediul catalitic B. După circa 3 minute, se începe adăugarea soluției A peste mediul catalitic B. Adăugarea durează 10 minute. Se continuă agitarea la temperatura de 27°C timp de 1,8 ore. Se iau 5  $\mu\text{L}$  din solul preparat și se depun pe electrodul de carbon al senzorului electrochimic, ceea ce corespunde la un raport masă carbon: volum picatură de 1: 3,33. Se lasă la maturat, pe plita agitatorului, la temperatura de 23°C, timp de 44 ore. Apoi senzorul se introduce într-o etuvă unde se ține la maturat încă 46 ore la temperatura de 50°C. Senzorul se lasă apoi să se răcească în atmosferă liberă și se spală de 3 ori prin imersare în câte 4,5 mL apă distilată, aflată într-un flacon pe plita agitatorului, la temperatura de 26°C, timp de câte 15, 12 și respectiv 10 minute, la un raport apă distilată: picatură sol-gel inițială de 1: 900 și apoi este lăsat să se usuce pe plita agitatorului timp de 22 ore la temperatura de 27°C. Se obțin senzori electrochimici care prin voltametrie ciclică prezintă deplasarea picului de oxidare în funcție de cantitatea de endotoxina și care se pot folosi pentru detecție electrochimică.

## SUPRAFETE HIBRIDE PENTRU DETECTIA ELECTROCHIMICA A ENDOTOXINELOR MICROBIENE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA ACESTORA

### REVEDICARI

1. Suprafețe hibride pentru detectia electrochimica a endotoxinelor microbiene, caracterizate prin aceea că se prepară prin reactia 3-(2-trimetoxisilil)-propilmetacrilatului- MAPTES și tetraetoxisilanului- TEOS, în rapoarte molare de 0,8...1,2: 1, în mediu de NH<sub>4</sub>OH conținând 40...60 % masic față de silani particule de polipirolde dimensiune 1...5 μm, prepararea făcându-se direct pe suprafața electrodului de carbon al unui senzor electrochimic, filmul obținut fiind impreatat molecular cu lipopolizaharidă și posedând capacitatea de a detecta prezența endotoxinei prin voltametrie ciclică

2. Procedeu de obținere a suprafețelor hibride pentru detectia electrochimică a endotoxinelor microbiene conform revendicarii 1, caracterizat prin aceea că se prepară soluție formată din MAPTES și TEOS, în raport molar 0,8...1,2: 1 în alcool etilic absolut, raportul volumetric între amestecul de silani și alcool etilic fiind de 0,15...0,25:1, se prepară o altă soluție cu concentrația de 0,4...0,6 g/L de lipopolizaharidă în apă, prin dizolvarea lipopolizaharidei având 250000 UE/mg, unități de endotoxină, în apă distilată și se amestecă cu prima soluție într-un raport volumetric de 0,4...0,6: 1 față de alcoolul etilic, obținându-se soluția precursoră A și în paralel se prepară mediul catalitic B care constă din soluție de NH<sub>4</sub>OH 25%, conținând 40...60% masic, față de amestecul de silani existent în soluția A, particule de polipirol cu dimensiunea de 2...7 μm cu rol de agent de dopare, apoi soluția precursoră A este adăugată treptat, timp de 5...15 minute, la temperatura de 20...30 °C în mediul catalitic B, la un raport între volumul soluției A și volumul de soluție de NH<sub>4</sub>OH 25% din mediul catalitic B de 1: 0,3...0,4, sub agitare continuă, cu viteza de 150...250 rot/min, după care amestecul se menține sub aceeași agitare și la aceeași temperatură încă 1,5...2,5 ore pentru hidroliza parțială a gruparilor -OR ale monomerilor, rezultând o matrice sol-gel cu conținut de polipirol, din care se ia cu o pipetă o cantitate și se depune sub formă de picătură pe electrodul de carbon al senzorului electrochimic, raportul masă de carbon: volum picătură fiind de 1:2...4, se lasă la maturat la temperatura de 20...30 °C, timp de 40-54 ore și apoi încă 40... 54 ore la temperatura de 45...60 °C, apoi electrodul este spălat pentru extracția LPZ în 3 reprize prin simpla imersare la temperatura camerei de 20 °C timp de câte 10...15 minute în apă distilată la un raport volumetric între picătura inițială sol-gel și apa de spălare de 1: 800...1200 și apoi este lăsat să se usuce timp de 20-28 ore la temperatura de 20...30 °C.