



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00128**

(22) Data de depozit: **25/03/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**30/09/2021** BOPI nr. **9/2021**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE  
DEZVOLTARE PENTRU FIZICA  
MATERIALELOR (INCDFM),  
STR.ATOMIȘTILOR, NR.405A, CP.MG-7,  
MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:  
• **DICULESCU VICTOR CONSTANTIN,  
STR.NERVA TRAIAN, NR.16, BL.M35, SC.3,  
ET.7, AP.88, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;**

• **BRANCO LEOTE RICARDO JOSE,  
STR.FIZICIENILOR, NR.7, AP.8,  
MĂGURELE, IF, RO;**  
• **ENACHE TEODOR ADRIAN, SAT NANOV,  
COMUNA NANOV, TR, RO;**  
• **IGNAT BARSAN MĂDĂLINA MARIA,  
STR.CRIZANTEMELOR, NR.21A, ET.2,  
AP.6, MĂGURELE, IF, RO;**  
• **ENCULESCU MARIA-MONICA,  
STR.DESPINA DOAMNA NR.20,  
CURTEA DE ARGEȘ, AG, RO**

(54) **BIOSENZOR ELECTROCHIMIC PENTRU DETERMINAREA  
ACIDULUI URIC ÎN FLUIDE BIOLOGICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biosenzor electrochimic pentru detecția acidului uric în fluide biologice. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: realizare a unui electrod din fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano-metrice acoperite cu paladiu, imobilizarea de urică pe suprafața electrodului, măsurarea curentului de reducere a stra-

tului superficial de PdO format la suprafața electrodului prin reacția cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cu limite de detecție a acidului uric inferioare metodelor uzuale de analiză.

Revendicări: 2  
Figuri: 1



27

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021 128
Data depozit ..... 25-03-2021

Titlu

BIOSENZOR ELECTROCHIMIC PENTRU DETERMINAREA ACIDULUI URIC ÎN  
FLUIDE BIOLOGICE

Autori

VICTOR CONSTANTIN DICULESCU, RICARDO JOSE BRANCO LEOTE, TEODOR  
ADRIAN ENACHE, MĂDĂLINA MARIA IGNAT-BÂRSAN, MARIA-MONICA  
ENCULESCU

## DESCRIERE

Invenția se referă la un biosenzor electrochimic pentru detecția de acid uric în fluide biologice mai exact în ser, urină și transpirație și la metoda de detecție a acidului uric utilizând acest biosenzor. Biosenzorul, fabricat din fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano-metrice acoperite cu paladiu, folosește ca element de biorecunoaștere enzima uricază imobilizată pe suprafața electrodului.

Acidul uric este un produs al metabolizării bazelor purinice ale acizilor nucleici. Concentrații mari de acid uric în fluidele biologice sunt responsabile pentru diferite anomalii medicale, printre care guta și calculii renali. Intervalul normal de concentrații de acid uric pentru un individ sănătos variază în funcție de mediul de detecție/fluidul biologic astfel: în sânge între 150 și 480  $\mu\text{mol L}^{-1}$  la persoanele de sex masculin, respectiv 90 și 360  $\mu\text{mol L}^{-1}$  la persoanele de sex feminin; în urină excreția normală este situată între 1.50 și 4.50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pe zi; în transpirație concentrația de acid uric se corelează cu cea din sânge/plasmă. Astfel, cuantificarea precum și monitorizarea continuă a acidului uric în fluide biologice reprezintă o necesitate pentru evaluarea stării de sănătate a unui individ.

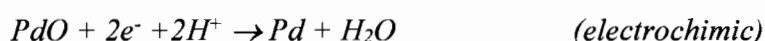
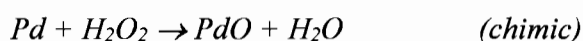
Metodele general utilizate pentru determinarea acidului uric mai ales în laboratoarele specializate sunt de tip spectrofotometric, analizele fiind efectuate în ser [1]. De asemenea, sunt descrise în literatura de specialitate și alte metode de cuantificare a acidului uric prin cromatografie lichidă de înaltă performanță [2], metode optice [3,4] dar și metode care folosesc senzorii și biosenzorii electrochimici. Sunt cunoscuți senzori electrochimici bazați pe diverse nanostructuri metalice și oxidice [5-7] dar și pe sisteme hibride metal/oxid metalic cu nanostructuri de carbon [8,9], dar care din lipsa elementului de biorecunoaștere prezintă o selectivitate redusă pentru

1  
M2

deteția acidului uric, în special în probele complexe. De asemenea, sunt cunoscuți diverși biosenzori electrochimici pentru dectia de acid uric prin intermediul enzimei uricază [10] imobilizată la suprafața electrozilor obținuți din diverse materiale [11–13]. Acești biosenzori funcționează la potențiale suficient de pozitive (> 400 mV) pentru ca răspunsul biosenzorului să fie afectat de semnalele electrochimice ale interferențelor prezenți în matricele complexe. Diminuarea potențialului de funcționare a fost de asemenea investigată, fiind propuse diverse soluții bazate pe materiale nanostructurate și/sau polimeri conductori [14,15], în arhitecturi complexe dar a căror liniaritate [14] este în afara valorilor limitelor fixate de legislația în domeniu.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în: costurile reduse de fabricare obținute prin consumul mic de reactivi chimici (de ordinul microlitrilor); costuri reduse de utilizare prin posibilitatea utilizării biosenzorului în afara laboratorului fără intervenția personalului înalt-calificat; sensibilitate și selectivitate ridicate obținute prin elementul de biorecunoaștere, respectiv prin potențialul de dectie; limită de dectie inferioară metodelor general utilizate pentru determinarea acidului uric în laboratoarele specializate; posibilitatea miniaturizării și integrării în sisteme de tip *array* pentru analiză multiplă; flexibilitatea materialului pentru aplicații în domeniul senzorilor purtabili pentru determinarea acidului uric *in situ*, în transpirație.

Conform invenției, biosenzorul de acid uric se realizează prin imobilizarea de uricază la suprafața electrodului de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu iar principiul de funcționare al biosenzorului este caracterizat prin următoarea schemă de reacții chimice:



Conform invenției, metoda de determinare e acidului uric în fluide biologice folosind biosenzorul de acid uric se bazează pe cuantificarea indirectă a  $H_2O_2$  produs la suprafața biosenzorului în urma reacției dintre acidul uric și enzima uricază, prin măsurarea curentului de reducere a stratului superficial de PdO format la suprafața electrodului de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu prin reacția cu  $H_2O_2$ .

În cele ce urmează se prezintă un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figura 1 care reprezintă etapele de fabricare a biosenzorului de acid uric și pașii necesari completării acestor etape.

Etapa 1. Fabricarea electrodului de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano-metrice acoperite cu paladiu se realizează în patru pași:

1. o soluție de 10% ( $m/v$  %) de polimetacrilat de metil în DMF este electrofilată timp de 15 min la o tensiune de 15 kV, un flux de 0.5 mL/oră, o temperatură de 23-25 °C și umiditate relativă între 30 și 40 %, fibrele polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano-metrice fiind acumulate pe un cadru de cupru cu dimensiuni de  $5 \times 5$  cm;
2. fibrele polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice astfel obținute sunt metalizate cu Au timp de 90 min prin pulverizare catodică în câmp magnetron, în atmosferă de Ar, din țintă de Au cu o puritate de 99.999%, obținându-se fibre electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu aur;
3. fibrele electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu aur sunt transferate pe folie de politereftalat de etilenă (PET) prin încălzirea întregului ansamblu la 120 °C timp de 1 min;
4. fibrele electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu aur transferate pe folie de PET sunt folosite ca electrod de lucru într-o celulă electrochimică cu volum de 50 mL, formată dintr-un electrod de referință de tip Ag/AgCl și un contra-electrod de Pt imersați într-o soluție de 3 mM PdCl<sub>2</sub> în 0.1 M HCl pentru depunerea electrochimică a stratului de Pd la un potențial aplicat de -0.10 V timp de 30 min, obținându-se astfel rodului de fibre electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu.

Etapa 2. Imobilizarea enzimei uricază pe electrodul de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu se realizează în trei pași:

1. 10 μL dintr-o soluție de 5% uricază în tampon fosfat 0.1 M pH = 7.0 este depusă prin metoda *drop-casting* pe suprafața electrodului de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu cu o suprafață activă de 0.25 cm<sup>2</sup>;
2. electrodul este introdus într-un recipient închis împreună cu o sursă de vapori de glutaraldehidă constituită dintr-un tub ce conține 500 μL soluție apoasă de 25% glutaraldehidă, unde este menținut timp de 15 min la o temperatură de 23-25 °C;
3. electrodul se usucă în aer timp de 60 min, obținându-se astfel biosenzorul de acid uric. Când nu este folosit, biosenzorul se păstrează în soluție de tampon fosfat 0.1 M pH = 7.0 la 4°C.

Prin aplicarea prezentei invenției se obțin următoarele avantaje: costurile reduse de fabricare obținute; costuri reduse de utilizare; sensibilitate și selectivitate ridicate; limită de detecție inferioară metodelor general utilizate pentru determinarea acidului uric în laboratoarele specializate; posibilitatea miniaturizării și integrării în sisteme de tip *array* pentru analiză multiplă; flexibilitatea materialului pentru aplicații în domeniul senzorilor purtabili pentru determinarea acidului uric *in situ*, în transpirație.

## REVENDICĂRI

1. Biosenzor electrochimic pentru detecția de acid uric în ser, urină și transpirație caracterizat prin aceea că enzima uricază este immobilizată la suprafața electrodului din fibre de polimetacrilat de metil electrofilate acoperite cu paladiu.
2. Principiu de funcționare a biosenzorului din revendicarea 1 caracterizat prin aceea că determinarea acidului uric se bazează pe cuantificarea de  $H_2O_2$  produs la suprafața biosenzorului în urma reacției dintre acidul uric și enzima uricază, prin măsurarea curentului de reducere a stratului superficial de PdO format la suprafața electrodului de fibre polimerice electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice acoperite cu paladiu prin reacția cu  $H_2O_2$ .

1  

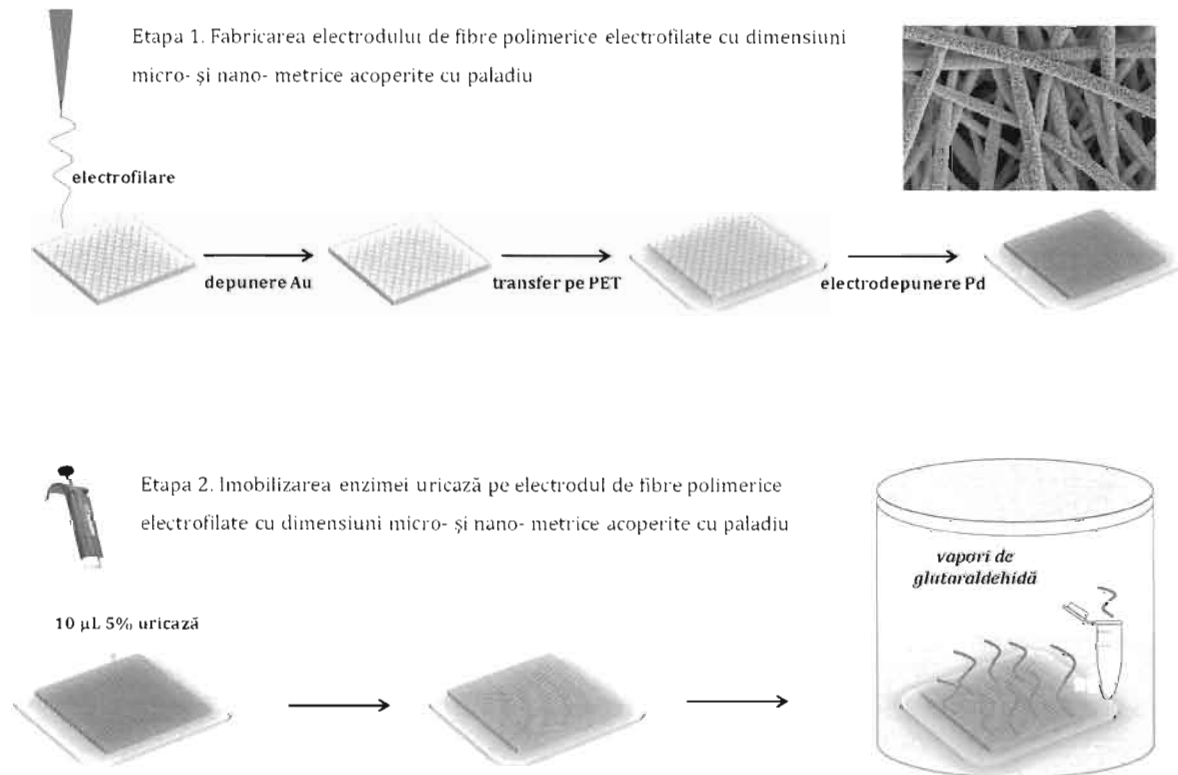



figura 1