

(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00239**

(22) Data de depozit: **11/05/2021**

(41) Data publicării cererii:
29/10/2021 BOPI nr. **10/2021**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "TRANSILVANIA" DIN
BRAȘOV, BD.EROILOR NR.29, BRAȘOV,
BV, RO

(72) Inventatori:
• FLORESCU MONICA,
STR. BRÂNDUȘELOR NR.41, BL.112,
AP.29, BRAȘOV, BV, RO;
• DAVID MELINDA, STR.CARPAȚILOR
NR.37, BL.R1, SC.A, AP.10, BRAȘOV, BV,
RO;
• ȘERBAN ADRIAN, STR.VICTORIEI NR.1,
BL.D2, AP.16, PLOPENI, PH, RO

(54) **PLATFORMĂ SENZORIALĂ ELECTROCHIMICĂ
NANOSTRUCTURATĂ, METODA DE ETALONARE
A PLATFORMEI ȘI PROCEDEU DE UTILIZARE
PENTRU DETECȚIA PORTABILĂ, SENSIBILĂ ȘI SELECTIVĂ
A CONȚINUTULUI DE TIROXINĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o platformă senzorială electrochimică nanostructurată (PSEN) bazată pe senzori serigrafiați cu film de carbon modificat cu nanotuburi de carbon funcționalizate cu grupări carboxil și la un procedeu de utilizare a acesteia, platforma având aplicabilitate în domeniul medicinei de laborator și a studiilor clinice pentru detecția concentrației hormonului tiroidian tiroxină (T4). Platforma conform invenției este constituită dintr-un suport cu trei electrozi serigrafiați: electrodul de lucru care este senzorul cu film de carbon modificat cu nanotuburi de C cu pereți unici funcționalizați cu grupări carboxil (SWCNT - COOH), electrodul auxiliar și pseudo - electrodul de referință de Ag, electrozii fiind introduși cu un capăt în recipientul destinat soluției de lucru, iar cu celălalt capăt sunt conectați la o interfață electrochimică portabilă, potențiostat, care este la rândul ei conectată la un laptop, tabletă sau telefon mobil, pe care este instalat un software dedicat care va prelua și prelucra semnalul de la interfața electrochimică și va permite determinarea și vizualizarea valorii concentrației T4. Procedeu conform invenției constă în asigurarea condițiilor funcționale de temperatură ale electrolitului și a probei, care trebuie să fie între 20...25°C, diluarea probei de analizat în electrolitul aflat în recipientul furnizat cu agitare ușoară pentru omogenizare, după care se realizează măsurarea parametrilor de funcționare ai PSEN folosind metoda voltametrică în puls diferențial (DPV) prin imersarea doar a suprafeței suportului care conține cei trei electrozi,

realizându-se măsurătoarea folosind PSEN pentru a înregistra intensitatea curentului I corespunzătoare vârfului de oxidare O₂, iar în final, folosind software - ul dedicat se calculează densitatea de curent J și se afișază pe ecranul electronic al PSEN concentrația T4 obținută prin raportarea valorii J măsurată la curba de etalonare.

Revendicări: 3
Figuri: 2

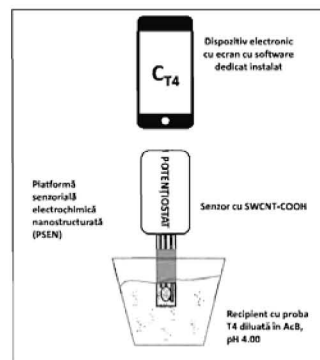


Fig. 1

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021/0239
Data depozit 11-05-2021

13

1

Platforma senzorială electrochimică nanostructurată, metoda de etalonare a platformei și procedeu de utilizare pentru detecția portabilă, sensibilă și selectivă a conținutului de tiroxină

Invenția se referă la o **platformă senzorială electrochimică nanostructurată** (PSEN) bazată pe senzori serigrafiați cu film de carbon modificat cu **nanotuburi de carbon** funcționalizate cu grupări carboxil (SWCNT-COOH) și la un **procedeu de utilizare** a platformei senzoriale pentru detecția electrochimică portabilă, sensibilă și selectivă a concentrației **hormonului tiroidian tiroxină (T4)** cu aplicabilitate în domeniul medicinei de laborator și al studiilor clinice.

Este cunoscut faptul că afecțiuni precum hipotiroidismul, cauzat de deficitul de hormoni tiroidieni, necesită tratament medicamentos bazat pe **substituentul artificial** al hormonului tiroxină, numit **levotiroxină (LT4)** [V. Neu, C. Bielow, P. Schneider, K. Reinert, H. Stuppner, C.G. Huber, Investigation of reaction mechanisms of drug degradation in the solid state: A kinetic study implementing ultrahigh-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry for thermally stressed thyroxine. Anal Chem. 85(4) (2013) 2385, doi: 10.1021/ac303404e]. Pentru că levotiroxina este o versiune sintetică (artificială) a tiroxinei, este importantă monitorizarea nivelului de T4 obținut în sânge ca efect al administrării medicamentului LT4 (cu aceeași structură chimică, dar produs de diferite companii); chiar și o mică diferență în puterea de dozare poate provoca simptome, care trebuie să fie luate în considerare. În consecință este necesară dezvoltarea unei metode simple, rapide și portabile care să fie folosită în optimizarea și monitorizarea nivelului de T4 pe parcursul tratamentului.

Sunt cunoscute observațiile clinice și metodele clasice ce urmăresc efectul administrării LT4. Aceste metode clasice presupun teste serice de laborator, cum ar fi imunoanalizele chemiluminescente [M. Ito, A. Miyauchi, M. Hisakado, W. Yoshioka, A. Ide, T. Kudo, E. Nishihara, M. Kihara, Y. Ito, K. Kobayashi, A. Miya, S. Fukata, M. Nishikawa, H. Nakamura, N. Amino, Biochemical Markers Reflecting Thyroid Function in Athyreotic Patients on Levothyroxine Monotherapy, Thyroid, 27(4) (2017) 484, doi: 10.1089/thy.2016.0426], analiza radioimunologică [R.C.I. Mateo, J.V. Hennessey, Thyroxine and treatment of



hypothyroidism: seven decades of experience. *Endocrine* 66, (2019) 10, doi: 10.1007/s12020-019-02006-8] sau cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) [S. Yong, Y. Chen, T.K. Lee, H.K. Lee, Determination of total thyroxine in human serum by hollow fiber liquid-phase microextraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta*, 126 (2014) 163, doi: 10.1016/j.talanta.2014.03.058].

Soluțiile cunoscute prezintă următoarele dezavantaje: necesită aparatură scumpă de laborator, procedee laborioase, consumatoare de timp, kituri reactive dedicate și personal calificat.

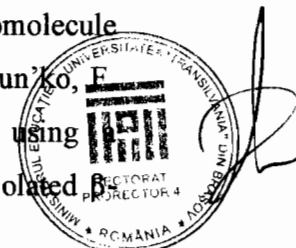
Este cunoscut că metoda electrochimică este foarte sensibilă, prezintă o *eficiență mare* în cuantificarea și transformarea evenimentelor biochimice în semnale electrice măsurabile [Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnology Advances*, 2012, 30, 489-511, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003; M. David, M. M. Barsan, C.M.A. Brett, M. Florescu, Improved glucose label-free biosensor with layer-by-layer architecture and conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Sensors and Actuators B* 255, 2018, 3227–3234 doi: 10.1016/j.snb.2017.09.149] și reprezintă o *alternativă simplă și avantajoasă* față de metodele de laborator clasice. Adesea, pentru a obține **rezultate mai performante, se folosesc nanoparticule** ce prezintă proprietăți fizico-chimice, structurale și morfologice specifice precum conductivitate electrică mare, suprafață activă îmbunătățită prin funcționalizare, biocompatibilitate sau proprietăți electrocatalitice [C. Dhand, N. Dwivedi, X. Jun Loh, A. Ng Jie Ying, N.K. Verma, R.W. Beuerman, R. Lakshminarayanan, S. Ramakrishna, Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview, *RSC Advances*, 127, 2015, 105003-105037, doi: 10.1039/C5RA19388E]. **Nanotuburile de carbon**, cu pereți simpli și unici, (SWCNT) sunt foarte versatile datorită conductivității lor electrice mari. *Electrozii modificați cu aceste nanotuburi de carbon* prezintă, în cazul măsurătorilor electrochimice, un *transfer de electroni mai bun* decât electrozii convenționali (nemodificați) serigrafiați și păstrează *proprietățile electrocatalitice ale nanotuburilor de carbon* [A. Astefanei, O. Núñez, M.T. Galceran, Characterisation and determination of fullerenes: a critical review. *Anal. Chim. Acta.* 882 (2015) 1, doi: 10.1016/j.aca.2015.03.025].

Literatura de specialitate prezintă studii ale comportamentului electrochimic al LT4 care se concentrează pe determinarea sa în tablete comerciale prin oxidarea electrocatalitică a



Handwritten signature and the number 2.

în medii foarte acide (0.1 M HCl) cu o limită de detecție de 2.5 μ M [S. Chitravathi, B.E. Kumara Swamy, U. Chandra, G.P. Mamatha, B.S. Sherigara, Electrocatalytic oxidation of sodium levothyroxine with phenyl hydrazine as a mediator at carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *J. Electroanal. Chem.* 645(1) (2010) 10, doi: 10.1016/j.jelechem.2010.03.004] sau prin cuantificarea indirectă a LT4 prin detecția iodului constitutiv cu ajutorul unui electrod selectiv de ioni [M. Foster Mesko, A. Cortes Teotonio, D.T. Teixeira Oliveira, D. LaRosa Novo, V. Caldeira Costa, A feasible method for indirect quantification of L-T4 in drugs by iodine determination. *Talanta*, 166(1) (2017) 223, doi: 10.1016/j.talanta.2017.01.039]. Există o varietate de senzori și biosenzori electrochimici ce se bazează pe detecția de LT4. Senzorii electrochimici, de regulă electrozi simpli, nemodificați, deși ating limite de detecție mult mai joase (3 nM), se bazează pe detecția unui vârf de oxidare ireversibil, caracteristic grupării fenol atât a lui LT4, cât și a lui T4, grupare prezentă și în alți compuși. Astfel de senzori sunt din grafit „edge plane pyrolytic graphite” [M. Khafaji, S. Shahrokhian, M. Ghalkhani, Electrochemistry of Levo-Thyroxin on Edge-Plane Pyrolytic Graphite Electrode: Application to Sensitive Analytical Determinations. *Electroanalysis* 23(8) (2011) 1875, doi: 10.1002/elan.201100204] sau carbon nemodificat [Das, M.V. Sangaranarayanan, Electroanalytical Sensor Based on Unmodified Screen-Printed Carbon Electrode for the Determination of Levo- Thyroxine, 27(2) (2015) 360, doi: 10.1002/elan.201400395]. Un alt electrod simplu, din film de mercur [J. Smajdor, R. Piech, M. Rumin, B. Paczosa-Bator, Z. Smajdor, High Sensitive Voltammetric Levothyroxine Sodium Determination on Renewable Mercury Film Silver Based Electrode. *J. Electrochem. Soc.* 163(7) (2016) H605, doi: 10.1149/2.1431607jes] funcționează pe același principiu, folosind însă o tehnică mai puțin cunoscută: „differential pulse adsorptive stripping voltammetry = voltametrie de stripare adsorbivă în puls diferențial”. Fabricarea nano(bio)senzorilor presupune imobilizarea unor arhitecturi complexe ce utilizează o serie de nanomateriale și substanțe chimice [S. Lotfi, H. Veisi, Synthesis and characterization of novel nanocomposite (MWCNTs/CC-SH/Au) and its use as a modifier for construction of a sensitive sensor for determination of low concentration of levothyroxine in real samples. *Chem. Phys. Lett.* 716 (2019) 177, doi: 10.1016/j.cplett.2018.12.029] sau conțin biomoleculă precum β -ciclodextrina tiolată [J. Muñoz, M. Riba-Moliner, L.J. Brennan, Y.K. Gun'ko, E. Céspedes, A. González-Campo, M. Baeza, Amperometric thyroxine sensor using nanocomposite based on graphene modified with gold nanoparticles carrying a thiolated β -



Handwritten signatures at the bottom of the page.

cyclodextrin. Microchim. Acta. 183 (2016) 1579, doi: 10.1007/s00604-016-1783-x] care implică mulți pași, procedee fizico-chimice complexe și timpi îndelungați.

Este cunoscut faptul că **mecanismul de oxidare al LT4/T4 (utilizând metoda voltametriei ciclice)** prezintă după prima scanare a domeniului anodic un vârf de oxidare pronunțat (O1), caracteristic grupării fenol la potențialul de $E_p = 0.45$ V [A. Safavi, N. Maleki, F. Tajabadi, Highly stable electrochemical oxidation of phenolic compounds at carbon ionic liquid electrode, Analyst 132 (2007) 54, doi: 10.1039/B612672C]. Inversând direcția de scanare, apare un vârf de reducere (R2) la potențialul $E_p = 0.02$ V, ce este asociat cu reducerea speciilor orto-chinonice ale LT4/T4 (obținute prin oxidarea LT4/T4), la orto-fenoli (specii asemănătoare cu catecolul). La a doua scanare, înregistrată în aceleași condiții și fără a curăța suprafața electrodului, apare un nou *vârf de oxidare (O2)*, la $E_p = 0.07$ V, corespunzător oxidării grupării catecol al LT4/T4, indicând reversibilitatea perechii redox R2 - O2, în timp ce O1 scade ireversibil. Astfel, se sugerează că **vârful O2 este caracteristic LT4/T4**, pe când vârful O1 poate apărea la orice compus care are în componență o grupare fenol. **În prezența SWCNT-urilor funcționalizate cu grupări carboxil, (SWCNT-COOH), detecția T4 s-a dovedit a fi mult mai sensibilă și selectivă față de alte tipuri de nanoparticule.**

Scopul invenției este de a realiza o **platformă senzorială** electrochimică nanostructurată (PSEN) bazată pe senzori serigrafiați cu film de carbon modificat cu SWCNT funcționalizați cu grupări carboxil (SWCNT-COOH) și de a stabili un **procedeu de utilizare** a platformei senzoriale pentru determinarea electrochimică portabilă, sensibilă și selectivă a concentrației de T4.

Problema pe care o rezolvă procedeul împreună cu PSEN este evitarea metodelor laborioase, consumatoare de timp și personalul calificat impuse de metodele clasice, înlocuindu-le pe acestea cu metoda electrochimică portabilă, ce oferă rezultate simple, rapide, pe înțelesul tuturor și pot fi plasate la fața locului.

Procedeul se definește ca o succesiune de etape și constă în determinarea electrochimică, simplă și rapidă folosind metoda voltametrică în puls diferențial a concentrațiilor de T4 *in situ*, prin înregistrarea directă a răspunsului platformei senzoriale nanostructurate portabile și compararea valorii densității de curent corespunzătoare vârfului de oxidare O2 al T4 cu o curbă de etalonare prestabilită pentru determinarea T4. Astfel, se obține o soluție tehnică bazată pe metoda electrochimică ce poate fi efectuată cu ajutorul unei platforme senzoriale nanostructurate portabile, ce încorporează nanoparticule de carbon



Handwritten signatures and initials at the bottom right of the page.

funcționalizate cu grupări carboxil și o interfață electrochimică portabilă care oferă posibilitatea efectuării unor analize de screening.

Se realizează **platforma senzorială electrochimică nanostructurată** portabilă (PSEN) ce constă din (Fig. 1): un suport cu trei electrozi serigrafiați "screen printed": electrodul de lucru, senzorul nanostructurat cu SWCNT-COOH, electrodul auxiliar și pseudo-electrodul de referință Ag conectați la o interfață electrochimică portabilă (potențostat) controlată prin intermediul unui software dedicat. PSEN se va conecta la un dispozitiv electronic cu ecran (laptop/tabletă sau telefonul utilizatorului) pe care se va instala software-ul dedicat ce va permite determinarea și vizualizarea valorii concentrației T4.

Etalonarea platformei senzoriale electrochimice nanostructurate (PSEN) este o operațiune preliminară utilizării efective a platformei și constă din următoarele etape:

a) Se fac măsurători de optimizare a pH-ului electrolitului (soluție tampon acetat de sodiu de concentrație 0.1 M AcB) folosit la măsurătorile electrochimice pentru detecția LT4, cele mai bune rezultate fiind obținute pentru pH 4,0.

b) Se determină **parametrii de funcționare ai PSEN** folosind *metoda voltametrică în puls diferențial* (DPV) a concentrațiilor de LT4 și s-au stabilit *următoarele valori*: intervalul de scanare cuprins între $E_{min} = -0,4$ V și $E_{max} = +0,6$ V vs. Ag, cu o viteză de scanare de 10 mV s⁻¹ și puls aplicat de amplitudine de 50 mV, durată de 0,2 s. Pentru evidențierea vârfului de oxidare O₂, specific LT4, s-a efectuat un tratament de preconcentrare prin aplicarea unui potențial de +0,7 V timp de 300 s.

c) Se înregistrează răspunsul senzorului (intensitatea curentului I corespunzător vârfului de oxidare a LT4) pentru concentrații crescătoare de LT4 (levothyroxine sodium pentahydrate, Sigma-Aldrich) între 0.1 și 6 μM, obținute prin diluarea unei soluții stoc de LT4 dizolvat în DMSO în electrolitul și condițiile mai sus menționate. Măsurătorile s-au realizat în triplicat. Densitatea de curent (J) a fost calculată (folosind software-ul dedicat) prin împărțirea intensității curentului electric (răspunsul senzorului) la aria geometrică a electrodului (0,1256 cm²) ($J = I/0,1256$).

d) Se reprezintă curba de calibrare a PSEN (folosind valorile medii ale lui J) pentru LT4 în funcție de concentrația acestuia C_{LT4} , cu densitățile de curent corespunzătoare vârfului O₂, $J = f(C_{LT4})$, ce va fi folosită ca referință pentru raportarea LT4 în proba analizată (Fig 2). Din curba de calibrare se pot determina: o regiune liniară de până la 1 μM LT4; o sensibilitate de $S = 4.0 \pm 0.06 \mu A cm^{-2} \mu M^{-1}$ (determinată din panta graficului) și o limita de detecție de 30



Handwritten signatures and initials at the bottom right of the page.

nM (calculată din ecuația $3 \cdot SD / S$; unde SD este deviația standard a interceptului și S sensibilitatea senzorului). Curba de calibrare LT4 este prezentată în desen (Fig. 2).

Pentru folosirea platformei senzoriale electrochimice nanostructurate (PSEN) se parcurg următoarele etape:

a) Se diluează proba analizată în recipientul ce conține electrolitul furnizat și se realizează măsurătoarea DPV folosind PSEN pentru determinarea intensității curentului I. Se calculează folosind formula implementată în software-ul dedicat ($(J = I/0,1256)$) ce a fost încărcat pe dispozitivul electronic cu ecran al utilizatorului.

b) Se calculează și se afișează pe ecranul electronic al PSEN concentrația T4 prin raportarea J la curba de etalonare (folosind software-ul dedicat). Exemplu din Fig. 2: valorii $J = 0.5 \mu A \text{ cm}^{-2}$ îi este corespunzătoare $C_{T4} = 0.58 \mu M$.

Procedeul prezintă următoarele avantaje: obținerea concentrației de T4 cu ajutorul platformei senzoriale electrochimice nanostructurate (PSEN) portabile într-un mod simplu, rapid, la fața locului și pe înțelesul tuturor cu înlăturarea dezavantajelor identificate impuse de metodele clasice.

Nanostructurarea platformei senzoriale electrochimice cu SWCNT-COOH îmbunătățește performanțele acesteia prin mărirea suprafeței efective de detecție și crește viteza reacțiilor de reducere - oxidare datorită proprietăților electrocatalitice ale SWCNT. Optimizarea parametrilor metodei de detecție electrochimică îmbunătățesc semnificativ sensibilitatea și selectivitatea senzorului cu SWCNT-COOH față de T4.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătură cu Fig1 și Fig 2, care reprezintă:

Fig. 1. Schema structurala a PSEN

Fig. 2. Curba de calibrare pentru LT4 în 0.1 M tampon acetat, pH = 4.0

Folosind platforma portabilă senzorială electrochimică nanostructurată cu SWCNT-COOH (PSEN) se efectuează măsurători *voltametrice în puls diferențial* (DPV) și se înregistrează intensitatea curentului obținut corespunzătoare concentrației T4 a unei probe, diluate în electrolit, prin imersarea celor trei electrozi serigrafiați după optimizarea **parametrilor de funcționare ai PSEN**: electrolit pentru diluție 0.1 M tampon acetat (AcB), pH = 4.0, intervalul de scanare cuprins între $E_{\min} = -0,4 \text{ V}$ și $E_{\max} = + 0,6 \text{ V}$ vs. Ag, viteză de scanare de



Handwritten signatures and initials at the bottom right of the page.

10 mV s⁻¹, puls aplicat de amplitudine de 50 mV și durată de 0,2 s; tratament de preconcentrare prin aplicarea unui potențial de +0,7 V timp de 300 s.

Procedeul de utilizare a platformei senzoriale nanostructurate pentru detecția electrochimică portabilă, sensibilă și selectivă a T4, se realizează respectând succesiunea următoare a operațiilor:

Etapele procedurii urmat de către utilizator pentru determinarea T4 dintr-o probă folosind PSEN sunt:

- a) Se verifică următoarele: nu se utilizează componentele electronice sub temperatura de îngheț (0°C) sau în condiții meteorologice extreme; temperatura recomandată a soluțiilor (electrolit și probă) este între 20-25 °C; electrolitul este furnizat;
- b) Se diluează proba analizată în electrolitul aflat în recipientul furnizat și se agită ușor. Se realizează măsurătoarea DPV folosind PSEN prin imersarea doar a suprafeței suportului ce conține cei trei electrozi (furnizat) și se realizează măsurătoarea folosind PSEN pentru înregistrarea intensității curentului I corespunzătoare vârfului de oxidare O₂.
- c) Se calculează densitatea de curent J și se afișează pe ecranul electronic al PSEN concentrația T4 obținută prin raportarea valorii J măsurată la curba de etalonare (folosind software-ul dedicat) (exemplul din Fig. 2).

Ca urmare a prezentului procedeu se obțin următoarele avantaje: (i) îmbunătățirea sensibilității și specificității detecției de LT4/T4, (ii) înlăturarea celor mai cunoscuți interferenți prin aplicarea potențialului de preconcentrare, (iii) o analiză rapidă, (iv) posibilitatea realizării analizelor de screening.



Bibliografie

1. V. Neu, C. Bielow, P. Schneider, K. Reinert, H. Stuppner, C.G. Huber, Investigation of reaction mechanisms of drug degradation in the solid state: A kinetic study implementing ultrahigh-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry for thermally stressed thyroxine. *Anal Chem.* 85(4) (2013) 2385, doi: 10.1021/ac303404e
2. M. Ito, A. Miyauchi, M. Hisakado, W. Yoshioka, A. Ide, T. Kudo, E. Nishihara, M. Kihara, Y. Ito, K. Kobayashi, A. Miya, S. Fukata, M. Nishikawa, H. Nakamura, N. Amino, Biochemical Markers Reflecting Thyroid Function in Athyreotic Patients on Levothyroxine Monotherapy, *Thyroid*, 27(4) (2017) 484, doi: 10.1089/thy.2016.0426
3. R.C.I. Mateo, J.V. Hennessey, Thyroxine and treatment of hypothyroidism: seven decades of experience. *Endocrine* 66, (2019) 10, doi: 10.1007/s12020-019-02006-8
4. S. Yong, Y. Chen, T.K. Lee, H.K. Lee, Determination of total thyroxine in human serum by hollow fiber liquid-phase microextraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta*, 126 (2014) 163, doi: 10.1016/j.talanta.2014.03.058
5. Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnology Advances*, 2012, 30, 489-511 DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003
6. M. David, M. M. Barsan, C.M.A. Brett, M. Florescu, Improved glucose label-free biosensor with layer-by-layer architecture and conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Sensors and Actuators B* 255, 2018, 3227–3234 DOI: 10.1016/j.snb.2017.09.149
7. C Dhand, N. Dwivedi, X. Jun Loh, A. Ng Jie Ying, N.K. Verma, R.W. Beuerman, R. Lakshminarayanan, S. Ramakrishna, Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview, *RSC Advances*, 127, 2015, 105003-105037, DOI:10.1039/C5RA19388E
8. A. Astefanei, O. Núñez, M.T. Galceran, Characterisation and determination of fullerenes: a critical review. *Anal. Chim. Acta.* 882 (2015) 1, doi: 10.1016/j.aca.2015.03.025
9. S. Chitravathi, B.E. Kumara Swamy, U. Chandra, G.P. Mamatha, B.S. Sherigara, Electrocatalytic oxidation of sodium levothyroxine with phenyl hydrazine as a mediator at carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *J. Electroanal. Chem.* 645(1) (2010) 10, doi: 10.1016/j.jelechem.2010.03.004



Handwritten signatures and initials, including a large signature and the initials 'PDR' and '2'.

10. M. Foster Mesko, A. Cortes Teotonio, D.T. Teixeira Oliveira, D. LaRosa Novo, V. Caldeira Costa, A feasible method for indirect quantification of L-T4 in drugs by iodine determination. *Talanta*, 166(1) (2017) 223, doi: 10.1016/j.talanta.2017.01.039
11. M. Khafaji, S. Shahrokhian, M. Ghalkhani, Electrochemistry of Levo-Thyroxin on Edge-Plane Pyrolytic Graphite Electrode: Application to Sensitive Analytical Determinations. *Electroanalysis* 23(8) (2011) 1875, doi: 10.1002/elan.201100204
12. A. Das, M.V. Sangaranarayanan, Electroanalytical Sensor Based on Unmodified Screen- Printed Carbon Electrode for the Determination of Levo- Thyroxine, 27(2) (2015) 360, doi: 10.1002/elan.201400395J. Smajdor, R. Piech, M. Rumin, B. Paczosa-Bator, Z. Smajdor, High Sensitive Voltammetric Levothyroxine Sodium Determination on Renewable Mercury Film Silver Based Electrode. *J. Electrochem. Soc.* 163(7) (2016) H605, doi: 10.1149/2.1431607jes
13. J. Smajdor, R. Piech, M. Rumin, B. Paczosa-Bator, Z. Smajdor, High Sensitive Voltammetric Levothyroxine Sodium Determination on Renewable Mercury Film Silver Based Electrode. *J. Electrochem. Soc.* 163(7) (2016) H605, doi: 10.1149/2.1431607jes
14. S. Lotfi, H. Veisi, Synthesis and characterization of novel nanocomposite (MWCNTs/CC-SH/Au) and its use as a modifier for construction of a sensitive sensor for determination of low concentration of levothyroxine in real samples. *Chem. Phys. Lett.* 716 (2019) 177, doi: 10.1016/j.cplett.2018.12.029
15. J. Muñoz, M. Riba-Moliner, L.J. Brennan, Y.K. Gun'ko, F. Céspedes, A. González-Campo, M. Baeza, Amperometric thyroxine sensor using a nanocomposite based on graphene modified with gold nanoparticles carrying a thiolated β -cyclodextrin. *Microchim. Acta.* 183 (2016) 1579, doi: 10.1007/s00604-016-1783-x
16. A. Safavi, N. Maleki, F. Tajabadi, Highly stable electrochemical oxidation of phenolic compounds at carbon ionic liquid electrode, *Analyst* 132 (2007) 54, doi: 10.1039/B612672C



Handwritten signature and initials, possibly 'B. L. 2'.

Revendicări

1. **Platforma senzorială electrochimică nanostructurată portabilă (PSEN) dedicată determinării rapide a hormonului tiroidian tiroxină T4, conform invenției**, se compune din (Fig. 1): un suport cu trei electrozi serigrafiați “screen printed”: electrodul de lucru care este senzorul cu film de carbon modificat cu nanoparticule de carbon cu pereți unici funcționalizați cu grupări carboxil (SWCNT-COOH), electrodul auxiliar și pseudo-electrodul de referință de Ag. Acești electrozi sunt introduși cu un capăt în recipientul destinat soluției ai căror parametri urmează a fi determinați, și sunt conectați la celălalt capăt la o interfață electrochimică portabilă (potențostat) care este la rândul ei conectată la un dispozitiv electronic cu ecran (laptop/tabletă sau telefonul utilizatorului), pe care dispozitiv este instalat un software dedicat cu care se va prelua și prelucra semnalul de la interfața electrochimică și va permite determinarea și vizualizarea valorii concentrației T4.

2. **Metoda de etalonare a platformei senzoriale electrochimice nanostructurate (PSEN): caracterizată prin aceea că se compune din următoarele etape: în prima etapă se asigură pH-ul electrolitului (soluție tampon acetat de sodiu de concentrație 0.1 M AcB) destinat măsurătorilor electrochimice pentru detecția LT4, la valoarea optima de pH 4,0 după care în etapa a doua se determină parametrii de funcționare ai PSEN folosind metoda de detecție voltametrică în puls diferențial (DPV) a concentrațiilor de LT4 folosind următoarelor valori: intervalul de scanare cuprins între $E_{min} = -0,4$ V și $E_{max} = +0,6$ V vs. Ag, cu o viteză de scanare de 10 mV s^{-1} și puls aplicat de amplitudine de 50 mV, durată de 0,2 s, unde pentru evidențierea vârfului de oxidare O₂, specific LT4, se va efectua un tratament de preconcentrare prin aplicarea unui potențial de +0,7 V timp de 300 s după care în etapa a treia se urmărește răspunsul senzorului (intensitatea curentului I corespunzător vârfului de oxidare a LT4) pentru concentrații crescătoare de LT4 (levothyroxine sodium pentahydrate, Sigma-Aldrich) între 0.1 și 6 μM , valori obținute prin diluarea unei soluții stoc de LT4 dizolvat în DMSO în electrolitul și condițiile mai sus menționate, măsurătorile se vor realiza în regim triplicat după care în etapa a patra folosind software-ul dedicat se calculează densitatea de curent (J) prin împărțirea intensității curentului electric (răspunsul senzorului) la aria geometrică a electrodului ($0,1256 \text{ cm}^2$) ($J = I/0,1256$) urmata de etapa a cincea în care se reprezintă curba de calibrare a PSEN (folosind valorile medii ale lui J) pentru LT4 în funcție de concentrația acestuia C_{LT4} , cu densitățile de curent corespunzătoare vârfului O₂, $J =$**



Handwritten signatures and initials at the bottom of the page, including a large signature on the left and several smaller ones on the right.

5

$f(C_{LT4})$, ce va fi folosită ca **referință** pentru raportarea LT4 în proba analizată (Fig 2), din care se pot determina: o regiune liniară de până la $1 \mu\text{M}$ LT4; o sensibilitate de $S = 4.0 \pm 0.06 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ (determinată din panta graficului) și o limita de detecție de 30 nM (calculată din ecuația $3 \cdot SD / S$; unde SD este deviația standard a interceptului și S sensibilitatea senzorului).

3. Procedeu de determinare electrochimică portabilă, rapidă a hormonului tiroidian tiroxină, T4, folosind o platformă senzorială electrochimică nanostructurată (PSEN) conform revendicării 1, procedeu urmărind îmbunătățirea sensibilității și specificității detecției de LT4/T4, înlăturarea celor mai cunoscuți interferenți prin aplicarea potențialului de preconcentrare, o analiză rapidă, și asigurând posibilitatea realizării analizelor de screening, procedeu aplicat de către utilizator caracterizat prin aceea că sunt parcurse următoarele etape: in **prima etapă se asigura condițiile funcționale - nu se utilizează componentele electronice sub temperatura de îngheț (0°C), temperatura recomandată a soluțiilor (electrolit și probă) fiind între $20\text{-}25^\circ\text{C}$; după care in **a doua etapa** se diluează proba de analizat în electrolitul aflat in recipientul furnizat și se agită ușor pentru omogenizare după care in **etapa a treia** se realizează măsurătoarea DPV folosind PSEN prin imersarea doar a suprafeței suportului ce conține cei trei electrozi și se realizează măsurătoarea folosind PSEN pentru înregistrarea intensității curentului I corespunzătoare vârfului de oxidare O_2 , după care în **etapa a patra** folosind software-ul dedicat se calculează densitatea de curent J și se afișează pe ecranul electronic al PSEN concentrația T4 obținută prin raportarea valorii J măsurată la curba de etalonare. (Fig. 2).**



A handwritten signature in black ink, consisting of stylized letters, located below the stamp.

Desene

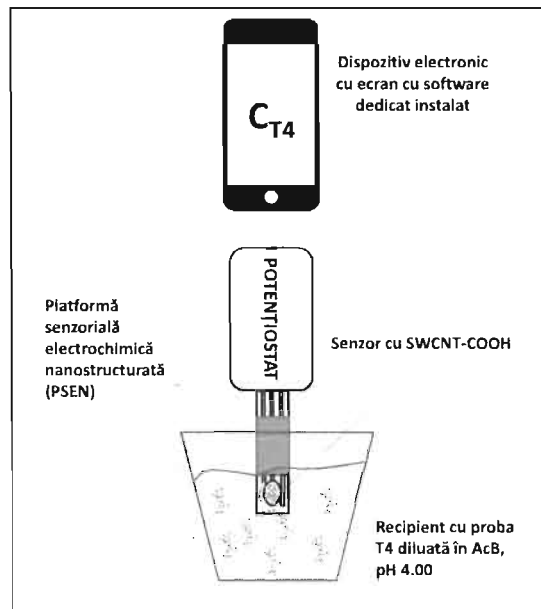


Fig. 1. Schema PSEN

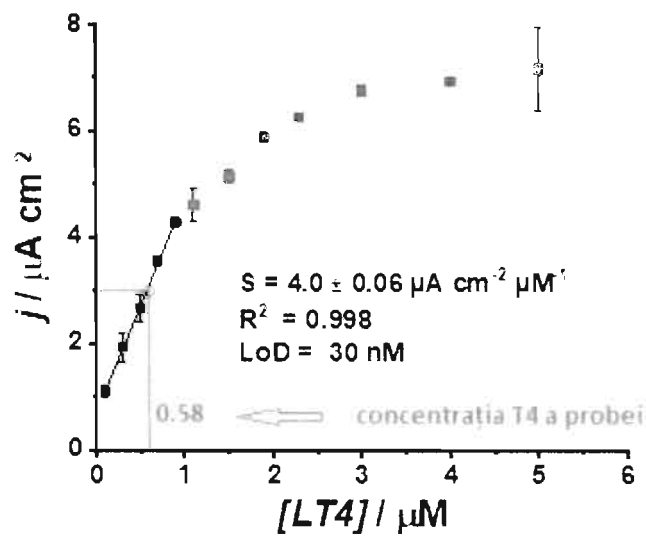


Fig. 2. Curba de calibrare pentru LT4 în 0,1 M tampon acetat, pH = 4,0

