

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00171

(22) Data de depozit: 01/04/2020

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

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN  
CLUJ-NAPOCA (UMF-IH),  
STR. VICTOR BABEȘ NR. 8,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• TERTIS MIHAELA CLAUDIA,  
STR. CRÂNGULUI, NR.28, BL.L4, AP.17,  
DEJ, CJ, RO;

• CRISTEA VICTORIA CECILIA,  
STR.ALEXANDRU VLAHUȚĂ, NR.21,  
BL.C1, AP.45, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• BĂBȚAN ANIDA-MARIA,  
STR.DIMITRIE GUSTI NR.5, AP.5,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• FEURDEAN NICOLETA CLAUDIA,  
STR.OȚETULUI NR.5B, AP.2,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• URICIUC WILLI- ANDREI,  
STR.C-TIN BRÂNCOVEANU, NR.35, AP.6,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• BOȘCA ADINA BIANCA, STR. VIDRARU  
NR.5-7, AP.83, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• ILEA ARANKA, STR.MĂRĂȘEȘTI, NR.45,  
CLUJ- NAPOCA, CJ, RO

(54) SENZOR ELECTROCHIMIC IMPRIMAT PE SUPORT PLANAR  
INTEGRAT PE UN DISPOZITIV INTRA-ORAL PENTRU  
DETECȚIA ELECTROCHIMICĂ DIRECTĂ ȘI SIMULTANĂ  
A UNOR AGENȚI DE GLICARE AVANSATĂ DIN SALIVĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un senzor electrochimic pentru detecția salivară simultană a doi compuși cu rol de markeri pentru afecțiuni severe, respectiv pentru detecția *in vivo* a N(6) - carboximetilizinei CML și a metilglicoxalului MGL, doi produși de glicare avansată. Senzorul conform invenției este realizat prin imprimarea unei celule (1) electrochimice pe un suport (4) flexibil și atașarea acesteia pe un dispozitiv (3) intra - oral de tip gutieră, celula electrochimică fiind amplasată pe partea frontală a mandibulei având astfel contact cu saliva care este mediul din care se face detecția, iar contactele celor trei electrozi ai celulei (1) electrochimice sunt dispuse în partea superioară unde se face legarea la cablurile (8) de alimentare ale potențiostatului (5) portabil miniaturizat prin intermediul unor fire (6) izolate pentru a nu intra în contact cu saliva, astfel încât analiții de interes dizolvați în salivă difuzează la suprafața electrodului de lucru realizat din carbon funcționalizat cu film nanostructurat de platină și la scanarea domeniului de potențial de oxidare, respectiv de reducere, suferă procese de oxidare electrochimică, respectiv de reducere electrochimică, semnalele analitice sub formă de pic de curent de oxidare al CML, și respectiv de redu-

cere al MGL, fiind înregistrate sub forma unor voltamograme puls diferențiale din care se determină valorile potențialelor de oxidare, respectiv de reducere, care sunt intersecția perpendicularelor trasate din vârful picurilor cu axa OX.

Revendicări: 4  
Figuri: 8

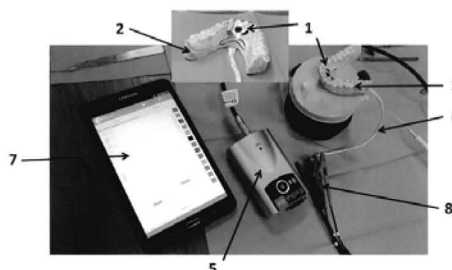


Fig. 3

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	2020 01 179
Data depozit	01-04-2020

24  
27

## **Senzor electrochimic imprimat pe suport planar integrat pe un dispozitiv intra-oral pentru detecția electrochimică directă și simultană a unor agenți de glicare avansată din salivă**

Invenția se referă la un senzor electrochimic construit cu scopul detecției salivare simultane a doi compuși din categoria agenților de glicare avansată, mai precis *N*(6)-carboximetil lizina (acidul 2-amino-6-(carboximetilamino)hexanoic) – CML și metilglioxalul (aldehida piruvică sau 2-oxopropanalul) – MGL. Producții de glicare avansată, cunoscuți sub denumirea de „advanced glycation end products” sau AGEs, sunt proteine sau lipide care devin glicate ca urmare a expunerii la zaharuri. S-a dovedit ca acești compuși pot avea rol de biomarkeri, a căror prezență în fluidele biologice cum sunt sângele, urina, lichidul lacrimal sau saliva la anumite nivele putând fi corelată direct cu unele afecțiuni grave, cum sunt bolile degenerative (diabetul, ateroscleroza, boala renală cronică, boala Parkinson și boala Alzheimer), afecțiuni cardiovasculare, boli ale articulațiilor și oaselor, îmbătrânirea celulară și stresul oxidativ.

Senzorul electrochimic salivar prezentat în cadrul acestei invenții se referă la o celulă electrochimică alcătuită din trei electrozi, această celulă fiind imprimată serigrafic împreună cu contactele corespunzătoare pe un suport planar de polietilenă. Senzorul este ulterior atașat reversibil pe un dispozitiv intra-oral – spre exemplu dar nelimitativ la o gutieră, aparat dentar, lucrare protetică, etc.

Nivelele biomarkerilor variază în funcție de natura probei biologice în care se găsesc (sânge, urină, salivă, lacrimi, transpirație, țesut etc.). Saliva umană este un fluid rezultat din secreția exocrină a glandelor salivare, reprezentând o matrice complexă care reflectă starea hormonală, emoțională, imunologică, metabolică și nutrițională a unei persoane. Mai mult, este considerat cel mai potrivit fluid biologic pentru investigațiile științifice din punct de vedere al eticii, ținând cont de faptul că se excretă în mod natural și mai ales că poate fi prelevat într-o manieră noninvazivă sau minim invazivă în funcție de pacient. O producție medie zilnică de lichid salivar nestimulat și stimulat pentru o persoană sănătoasă este cuprinsă între 0,5 și 1,5 L. Saliva este compusă în principal din apă (aproximativ 99%), electroliți (sodiu, potasiu, calciu, clorură, magneziu, bicarbonat și fosfat), glucoză, produși cu azot și diverse biocomponente (enzime, imunoglobuline, glicoproteine mucoase, albumină, polipeptide, oligopeptide, factori antimicrobieni etc.). Toate aceste componente sunt de o importanță deosebită pentru sănătatea cavității bucale și sunt responsabile pentru diverse funcții atribuite salivei. Aproximativ 2000 de proteine sunt prezente în

AS  
26

saliva umană, iar mai mult de un sfert dintre acestea se regăesc și în serul uman, ceea ce dovedește încă o dată importanța chimiei salivei ca posibil instrument de diagnostic și monitorizarea tratamentului. Principalii analiți care sunt testați în prezent din salivă cu instrumente disponibile în comerț sunt glucoza, diferiți hormoni (cortizol, estriol, estradiol, estronă, estrogen, progesteron, testosteron și sulfat de hidroepiandrosteronă), virusul papiloma uman (HPV), anticorpul HIV, diferite bacterii, sau proteine cum sunt interleukina 1 și interleukina 6. Recunoașterea din ce în ce mai mare a corelației dintre sănătatea publică orală și starea generală de sănătate, a dus la creșterea interesului pentru utilizarea salivei în scop de diagnostic, precum și pentru descoperirea de noi biomarkeri care să fie monitorizați în acest fluid.

Chimia salivară este un domeniu în curs de dezvoltare mai ales în toxicologie și medicină clegală, fiind util pentru analiza și detectarea consumului și dependenței de droguri, a consumului de alcool sau a altor substanțe interzise.

Necesitatea unor metode rapide, eficiente din punct de vedere al costurilor și fiabile pentru investigarea markerilor salivari a dus la progrese tehnologice deosebite în dezvoltarea instrumentelor de detectare. Prin urmare, un număr tot mai mare de lucrări din literatura de specialitate raportează posibilitatea diagnosticării precoce cu ajutorul biomarkerilor salivari a unor patologii locale sau sistemice precum cancerul oral, patologiiile endocrine și imunologice, boli infecțioase și neurologice etc.

Există trei condiții principale pentru ca tehnologiile avansate să fie potrivite pentru aplicații clinice:

- existența biomarkerilor specifici pentru afecțiunea urmărită și în mediul de detecție considerat;
- posibilități și mijloace de colectare /depozitare minim invazive, simple și rentabile;
- instrumente cu precizie ridicată, pretabile pentru miniaturizare și portabile, ușor de manipulat pentru diagnosticarea bolii și screeningul stării de sănătate.

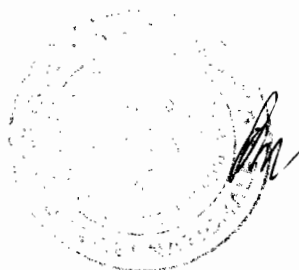
Datorită nivelului scăzut de biomarkeri în salivă, decelarea semnalului specific analitului de interes rămâne o provocare, astfel, se dorește elaborarea unor metode analitice care să ofere limite de detecție mici, sensibilitate bună și selectivitate ridicată. Metodele analitice convenționale utilizate până în prezent pentru analiza salivară pot fi aplicate doar la nivel de laborator, implicând adesea multe etape, cum ar fi prelevarea de probe, prelucrarea acestora, stocarea eșantioanelor între prelevare și testare, testarea în sine și, în final, procesarea, analiza și raportarea rezultatelor



obținute. Astfel, dezvoltarea metodelor rapide și a tehnologiilor care includ utilizarea de senzori portabili electrochimici pentru diagnosticul salivar și/sau monitorizarea bolilor, este importantă deoarece poate contribui la facilitarea accesului pacienților la servicii medicale de calitate precum și la îmbunătățirea rezultatelor asistenței medicale pentru aceștia. În prezent există mai multe dispozitive fiabile, disponibile pentru testarea unor proteine din salivă, dar toate sunt limitate la testele de laborator, datorită complexității, dimensiunilor mari și costului ridicat al echipamentelor, acestea fiind limitări serioase pentru aplicațiile privind îngrijirea la patul bolnavului (așa numita „point-of-care analysis”). Mai mult, instrumentația scumpă este accesibilă numai laboratoarelor mari, cu putere economică ridicată deoarece și întreținerea și exploatarea acestor dispozitive este foarte costisitoare.

Printre tehnicile utilizate în mod obișnuit pentru determinarea biomarkerilor salivari menționăm aici:

- Cromatografia de lichide cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS) (utilizată în special pentru determinarea nivelului de glucoză);
- Cromatografia de lichide cuplată cu spectrofotometria UV-VIS (LC-UV-VIS) (utilizată în special pentru determinarea nivelului de glucoză);
- Teste de imunoabsorbție cu enzime legate (ELISA) (utilizate în special pentru determinarea biomarkerilor proteici);
- Analiză imuno- -electroforetică (utilizată în special pentru determinarea biomarkerilor proteici);
- Analiza proteomică pe bază de spectrometrie de masă (utilizată în special pentru determinarea biomarkerilor proteici);
- Teste radio-imunologice (RIA) (utilizate în special pentru determinarea biomarkerilor proteici);
- Tehnici pe bază de ADN (utilizate în special pentru determinarea biomarkerilor genetici);
- Microcipuri și dispozitive de micro fluidică (cu multiple aplicații în detecția de biomarkeri din fluide biologice);
- Senzori și biosenzori electrochimici (cu multiple aplicații în detecția de biomarkeri din fluide biologice).



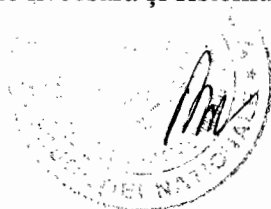
24

Senzorii electrochimici sunt obținuți prin tehnologii simple, ieftine și cu importanță practică deosebită datorită simplității de funcționare și instrumentare, integrării ușoare în dispozitivele analitice compacte potrivite pentru miniaturizare și preabilității pentru multiplexare în scopul detecției simultane și rapide de markeri cu relevanță biomedicală.

De asemenea, funcționalizarea suprafețelor electrodice cu nanomateriale pe bază de carbon (nanotuburi de carbon, grafenă și derivați de grafenă, nanoparticule de carbon, fulerene, etc.), nanoparticule metalice (de aur, platină sau din aliaj de metale nobile), sau oxizi metalici asigură îmbunătățirea conductivității electrice precum și o creștere a suprafeței active, care determină îmbunătățiri semnificative ale sensibilității de detecție. În unele cazuri, modificarea suprafeței electrodice cu nanomateriale poate contribui și la creșterea selectivității, asigurând astfel detecția preferențială a anumitor analiți din matrici complexe așa cum sunt fluidele biologice.

Diferite metode de detecție salivară au fost de asemenea raportate dintre care menționăm doar cele mai utilizate:

- Metode de detecție bazate pe procese chimice – sunt metode care se pot aplica doar pentru analiza *in vitro*, deoarece testarea presupune recoltarea unei probe de salivă și expunerea acesteia la reactivi chimici specifici detecției salivare, în afara cavității bucale. Aceste metode au avantajul obținerii unor rezultate corecte, dar au dezavantajul că detecția nu se realizează în timp real și nu se poate realiza pe teren, la patul bolnavului ci doar în condiții de laborator.
- Metode de detecție bazate pe fenomene optice și optoelectronice – sunt metode care exploatează proprietățile spectrale ale analiților care urmează să fie detectați, respectiv modificarea sub influența analiților ai parametrilor specifici luminii. Aceste metode au dezavantajul că se pot aplica doar pentru analiza *in vitro* ținând cont de faptul că echipamentele necesare pot fi operate doar în mediul de laborator sau, în cazul metodelor optoelectronice, în afara laboratorului, dar cu nivelul de miniaturizare limitat de gabaritul bateriei și ale componentelor optice și optoelectronice. Un caz particular din această categorie sunt senzori bazați pe fibră optică. Ghidul de undă este în acest caz fibra optică, iar detecția este corelată cu modificarea parametrilor de propagare a luminii prin fibră sub incidența analitului de interes. Fibră optică are avantajul considerabil al dimensiunilor reduse și pretabile pentru integrare în dispozitive miniaturizate, inclusiv cele intra-orale, dar au limitări în ceea ce privește sursa de radiație necesară și sistemul de recepție a semnalului.



20  
23

- Metode bazate pe senzori electrochimici – se bazează pe variația semnalului de curent înregistrat la transformarea redox a compușilor de interes la interfața unui electrod de lucru. În acest caz, pentru detecție se utilizează metode electrochimice, cum sunt voltametria și amperometria, dar nu sunt limitări stricte la aceste exemple. Aceste metode au avantajul faptului că, în acest caz detecția se poate face în timp real, chiar *in vivo* în unele cazuri particulare. De asemenea, proiectarea atentă a sistemului electronic care asigură operarea senzorului electrochimic poate conduce la un sistem miniaturizat și portabil. Dezavantajul îl constituie însă necesitatea alimentării circuitului electronic, iar miniaturizarea dispozitivului de detecție este limitată de gabaritul bateriei, ale componentelor electronice, ale plăcuței cu circuit imprimat și ale senzorului electrochimic propriu-zis.

Ținând cont de datele prezentate în literatura de specialitate, dintre metodele de detecție enumerate, s-a ales pentru această invenție elaborarea unui senzor electrochimic de unică folosință, imprimat serigrafic pe suport planar de polietilenă utilizat pentru detecția salivară simultană a unor markeri cu implicații biomedicale. Fiind vorba despre un sistem miniaturizat și portabil pentru integrare în dispozitivele intra-orale, pentru această invenție s-a ales un senzor imprimat pe suport planar, iar ca suport de imprimare o folie de polietilenă. Acest material este ieftin, suficient de flexibil pentru a putea fi adaptat pentru imobilizarea pe suprafețe neregulate cum sunt dispozitivele intra-orale de tip gutieră și nu pune probleme de toxicitate, fiind considerat un material biocompatibil la expunere *in vivo* un timp limitat. În plus, în această formă de prezentare, polietilena este nontoxică, putând fi utilizată și în interiorul cavității bucale.

În documentarea realizată nu a fost identificată nicio metodă electrochimică sau de altă natură, care să permită detecția salivară simultană și *in vivo* a celor doi markeri considerați: CML și MGL, sau a altor biomarkeri din categoria agenților de glicare avansată, ceea ce dovedește importanța temei propuse în cadrul invenției noastre.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției, evidențiind etapele propuse pentru fabricarea și testarea senzorului electrochimic salivar. Reprezentarea schematică a senzorului montat pe dispozitivul intra-oral, se poate observa în figura 1. Etapele de realizare a invenției sunt simple și constau în:

- imprimarea celulei electrochimice cu ajutorul unui șablon, etapă care începe cu imprimarea contactelor celor trei electrozi în aceeași etapă cu **electrodul de referință (ER)** utilizând





cerneală conductoare de argint cu clorură de argint (Ag/AgCl), urmată de uscarea pentru 15 minute la 60°C, apoi imprimarea **electrodului de lucru (EL)** în aceeași etapă cu **electrodul auxiliar (EA)** utilizând cerneală conductoare de carbon, uscarea pentru 15 minute la 60°C, imprimarea unui strat polimeric izolator peste contacte pentru evitarea scurtcircuitului și uscarea pentru 15 minute la 60°C (vezi figura 2 pentru detalii privind componentele celulei electrochimice);

- condiționarea electrochimică a electrodului de lucru prin aplicarea unui potențial de 1,2 V pentru 600 s într-o soluție de carbonat de sodiu ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) de concentrație  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , urmată de modificarea acestui electrod prin depunerea electrochimică a unui film nanostructurat de platină obținut prin baleierea potențialului electrodului de lucru între -0,3 și +1,4 V, pentru 20 cicluri cu o viteză de baleiaj de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  într-o soluție de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  de concentrație  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  preparată în HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (vezi figura 2 c);
- aplicarea **senzorului electrochimic (1)** pe suprafața **dispozitivului intra-oral (3)**, cu ajutorul unui foto-polimer utilizat pentru lucrări protetice, cu uscare rapidă prin expunere la lumină. Senzorul (1) se aplică în partea frontală a dispozitivului intra-oral (3) (vezi figura 3), pentru a avea un contact optim cu saliva pacientului după montarea în cavitatea bucală;
- conectarea senzorului (1) prin intermediul unor **fire izolate (6)** la **potențostatul (5)** echipat cu **contacte specifice (8)** (vezi figura 3);
- testarea cu ajutorul voltametriei puls diferențiale a senzorului pentru detecția CML în domeniul potențialelor de oxidare, respectiv pentru detecția MGL în domeniul potențialelor de reducere (vezi figura 4);
- evaluarea parametrilor analitici din voltamogramele înregistrate (potențial de pic – pentru identificarea compușilor, respectiv intensitatea curentului de pic – pentru determinarea cantității de analiți din probe) (vezi figura 4 pentru identificarea notațiilor specifice).

Invenția noastră se referă la posibilitatea detecției simultane, rapide, *in vivo* a CML și MGL din saliva brută, fără nicio prelucrare prealabilă, fără adaos de reactivi și folosind aceeași suprafață electrodică pentru ambii analiți testați în exemplul de invenție prezentat. Principiul de funcționare al senzorului electrochimic (1) se referă la înregistrarea curentului de oxidare electrochimică al CML ( $I_{\text{ox,CML}}$ ) respectiv de reducere electrochimică al MGL ( $I_{\text{red,MGL}}$ ), procese care au loc la suprafața electrodului de lucru de carbon modificat cu un film nanostructurat de platină. Valorile potențialelor de oxidare ( $E_{\text{p,CML}}$ ), respectiv de reducere ( $E_{\text{p,MGL}}$ ) sunt specifice compușilor de



18  
21

interes, permițând identificarea prezenței acestora în salivă, în timp ce intensitatea acestor curenți este proporțională cu concentrația celor doi markeri, permițând determinarea lor cantitativă.

Invenția noastră înlocuiește necesitatea testării separate și *ex vivo* sau *in vitro* a analiților de interes. Avantajul principal este scurtarea timpului de analiză și posibilitatea detecției simultane a variației nivelelor celor doi analiți cu perspectiva exploatării rezultatelor în interes biomedical, de diagnostic precoce sau monitorizare pe durata unui tratament.

Perspectivile invenției noastre se referă la posibilitatea integrării sensorului electrochimic în dispozitive intra-orale de tip gutieră (cum este cel exemplificat în invenția noastră la poziția (3)), la pacienții cu metainflamație (inflamație cronică de intensitate joasă), care este specifică și în sindromul metabolic. Acest senzor va permite identificarea prezenței a doi compușilor de interes biomedical, dar cu perspective de extindere a studiului asupra altor compuși prezenți în salivă.

Senzorul electrochimic (1) poate fi amplasat din timp pe dispozitivul intra-oral (3), nefiind afectat de condițiile regăsite în interiorul cavității orale și fiind nontoxic, iar conectarea acestuia la potențiostatul portabil (5) și efectuarea testelor cu privire la detecția markerilor de interes din saliva brută să se facă doar atunci când este necesar. Acest lucru dovedește aplicabilitatea practică a sensorului electrochimic (1) și scade disconfortul pacientului fiind necesare în jur de cinci minute de la conectarea celulei electrochimice la potențiostatul (5) până la înregistrarea voltamogramelor și prezentarea rezultatului obținut.

Invenția poate fi extinsă, nelimitativ, la testarea altor markeri sau biomarkeri salivari de interes biomedical, cu condiția calibrării celulei electrochimice (senzorului (1)) la noii compuși. În cazul ideal, imobilizarea unor biocomponenți (cum sunt anticorpii) sau a unor compuși biomimetici (cum sunt aptamerii), care prezintă specificitate ridicată pentru analitul țintă ar permite detectarea preferențială a acestuia și cuantificarea cu interferențe minime din partea altor compuși aflați în matricea complexă reprezentată de saliva brută. În cazul compușilor care nu prezintă transformare redox, utilizarea sensorului s-ar putea limita la detecția indirectă a acestora prin intermediul unor sonde redox care ar trebui să fie introduse în probă, sau să fie imobilizate pe suprafața electrodului de lucru (EL). Mai mult decât atât, posibilitatea realizării unei baterii de senzori (2, 4 sau 8 senzori), imprimați pe același suport, fiecare fiind funcționalizat într-un mod care să permită detecția individuală a unui singur marker, dar care să poată fi operați simultan, ar permite obținerea unei amprente pentru mai mulți markeri, ceea ce ar fi foarte benefic pentru un diagnostic precoce precis.



Limitările acestei invenții, după părerea noastră, se referă în primul rând la dimensiunile potențostatului (5) care asigură operarea celulei electrochimice (1). Acest potențostat, deși este portabil, este alimentat cu ajutorul unui acumulator cu autonomie foarte bună și este prevăzut cu sistem de transmitere a datelor înregistrate fără fir, de tip bluetooth, are dezavantajul de a necesita conectare prin fire (6) la contactele (8) electrozilor din celula electrochimică (electrodul de lucru (EL), electrodul auxiliar (EA) și electrodul de referință (ER)) pentru a permite alimentarea acestora și implicit efectuarea experimentelor de oxidare/reducere electrochimică. Poziționarea potențostatului (5) în afara cavității bucale și necesitatea conectării prin fire (6 și 8), cresc dificultatea utilizării senzorului (1) pentru monitorizarea continuă *in vivo* a nivelelor de CML și MGL din salivă. Aceste inconveniente ar putea fi eliminate dacă s-ar utiliza un potențostat miniaturizat, integrat în dispozitivul intra-oral (3), care să fie pus în contact cu senzorul (1) imediat ce acesta este atașat pe dispozitiv și care să asigure operarea celulei electrochimice. În prezent se caută soluții pentru miniaturizarea acumulatorului integrat acestui sistem, care să aibă dimensiuni suficiente de mici pentru integrarea pe gutiera (3), să aibă o durată de viață rezonabilă și un cost redus.

Efectuarea de teste individuale, în mod periodic, regulat sau la nevoie, se poate realiza în sistemul propus în cadrul acestei invenții, cu minipotențostatul (5) amplasat în exteriorul cavității bucale și interpretarea rezultatelor obținute pe un dispozitiv de tip tableta sau telefon mobil (7) (vezi figura 3). Acest ansamblu a fost testat *in vivo* cu succes pentru detecția CML și MGL (vezi figura 5).

Invenția noastră are rol preventiv, scopul nostru fiind atât de detecție precoce - estimarea prezenței unor markeri din salivă, cât și de evaluare cantitativă - determinarea nivelelor acestor compuși din salivă. Invenția poate fi considerată și metodă de monitorizare a pacienților pentru evaluarea eficienței terapiilor aplicate. Astfel, invenția noastră abordează o metodă de detecție simplă, directă, fără etichetare, bazată pe semnalele de curent obținute la transformarea redox (reducere, respectiv oxidare) a compușilor de interes la nivelul electrodului de lucru (EL) pe bază de carbon funcționalizat cu film nanostructurat de platină. Această invenție valorifică potențialul salivei brute de a conduce curentul electric datorită electroliților conținuți, ceea ce permite operarea senzorului (1) fără a fi necesară adăugarea unor electroliți sau prelucrarea probelor înainte de testare, scurtând astfel durata analizei. În invenția noastră s-a renunțat la utilizarea de biocomponente specifice analiților de interes, pentru a nu crește costul senzorului și a nu scădea

16  
19

durata de utilizare a acestuia. Acest compromis a fost posibil deoarece testele preliminare de interferență între semnalele analiților de interes au dovedit o minimă influență reciprocă, dar care nu afectează în mod semnificativ rezultatele analitice, putând fi considerată neglijabilă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este detecție salivară directă și simultană a doi markeri importanți din punct de vedere biomedical (dar nu se limitează neapărat la acești compuși), realizată prin voltametrie puls diferențială (tehnică electrochimică) și renunțarea la etapa de modificare a suprafeței electrodice cu biocomponente specifice analiților de interes, ceea ce scade semnificativ timpul necesar elaborării și testării senzorului, crește stabilitatea în timp a acestuia și menține costurile la un nivel acceptabil. Reducerea costurilor se datorează în primul rând neutilizării biocomponentelor specifice pentru analiții de interes și utilizării foliei de polietilenă (4) ca suport de imprimare. Cu toate acestea, invenția noastră poate fi extinsă prin utilizarea unor biocomponenți specifici sau a unor sisteme biomimetice, atunci când este necesar, precum și a unor sonde redox pentru detecția indirectă a analitului de interes atunci când acesta nu prezintă transformare redox. De asemenea, utilizarea unei baterii de senzori (cu 2, 4 sau 8 electrozi de lucru imprimați pe același suport) ar extinde aplicabilitatea invenției pentru detecția simultană a mai mult de doi markeri, în cazul în care aceștia prezintă interferențe de semnal și nu pot fi detectați pe același electrod.

Senzorul electrochimic salivar (1), conform invenției, este alcătuit din trei electrozi cu geometrii diferite, imprimați împreună cu contactele electrice corespunzătoare pe un suport flexibil de polietilenă (4), folosind cerneală conductoare de argint cu clorură de argint, respectiv de carbon. Electroful de lucru (EL) are suprafața sferică (cu diametrul de 4 mm), este poziționat central și alcătuit din carbon funcționalizat cu film nanostructurat de platină, generat electrochimic. Electroful auxiliar (EA) de carbon are formă de semilună și este dispus în stânga electrofului de lucru, iar electroful de referință (ER) din argint este în formă de semilună și dispus în dreapta electrofului de lucru (EL) (vezi figura 2).

Procedeul de obținere a senzorului electrochimic salivar integrat pe un dispozitiv intra-oral de tip gutieră constă în parcurgerea următoarelor etape:

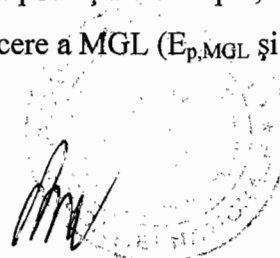
- (i) Realizarea dispozitivului intra-oral (3) după un mulaj specific pacientului (mandibulă falsă (2)).
- (ii) Imprimarea celulei electrochimice (1) pe suportul planar flexibil (5).

AS  
18

- (iii) Funcționalizarea electrodului de lucru de carbon prin depunerea electrochimică a unui film nanostructurat de platină.
- (iv) Fixarea senzorului pe suprafața dispozitivului intra-oral.
- (v) Alimentarea celulei electrochimice la sursa de curent a potențostatului prin intermediul unor fire conductoare izolate în exterior.
- (vi) Efectuarea testelor de voltametrie puls diferențială pentru oxidarea CML, respectiv reducerea MGL și înregistrarea semnalelor de curent obținute sub forma voltamogramelor, pentru teste *ex vivo* și *in vivo*.
- (vii) Prelucrarea rezultatelor experimentale și interpretarea datelor obținute.

Se prezintă în continuare doar un exemplu de realizare a invenției (acesta nefiind însă limitativ), făcând trimitere la figurile din anexă, care reprezintă:

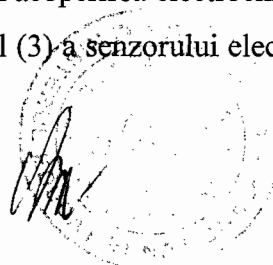
- Figura 1, care cuprinde: a - reprezentarea schematică a senzorului electrochimic salivar (1) pentru detecție simultană *in vivo*, așa cum este fixat pe dispozitivul intra-oral (3) amplasat pe o mandibulă falsă (2); b - detaliu privind geometria senzorului cu cei trei electrozi: EL, EA și ER și c - reprezentarea suprapusă a voltamogramelor puls diferențiale utilizate pentru detecția salivară a CML (negru) și MGL (roșu).
- Figura 2, cuprinde detalii privind celula electrochimică și suprafața de detecție. Comparație între celula electrochimică a - înainte și c - după funcționalizarea electrodului de lucru de carbon cu filmul de platină. EA – electrod auxiliar de carbon; EL – electrod de lucru de carbon, respectiv carbon+Pt; ER – electrod de referință Ag/AgCl. b - Voltamograma multiciclică înregistrată în timpul funcționalizării electrodului de lucru de carbon prin depunerea electrochimică a unui film nanostructurat de platină folosind o soluție de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$   $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  în  $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .
- Figura 3, cuprinde o imagine privind modul de amplasare al senzorului electrochimic (1) pe dispozitivul intra-oral (3) montat pe mandibula falsă (2) și detaliu privind cuplajul firelor izolate (6) la contactele (8) ale potențostatul portabil (5) operat prin intermediul unei tablete smart (7).
- Figura 4, cuprinde voltamogramele puls diferențiale suprapuse pentru detecția simultană a CML – negru și MGL - roșu. Notațiile se referă la potențialele de pic, respectiv curenții de pic de oxidare a CML ( $E_{p,CML}$  și  $I_{ox,CML}$ ) și de reducere a MGL ( $E_{p,MGL}$  și  $I_{red,MGL}$ ).



HY  
14

- Figura 5, cuprinde o imagine privind amplasarea dispozitivului de detecție intra-oral (3) cu senzorul electrochimic (1) atașat și cuplajul la potențiosstatul portabil (5) realizat prin intermediul unor fire izolate (6) și contacte specifice (8) și înregistrarea semnalului analitic pe o tabletă (7) în sistem „fără fir”. Potentiostatul utilizat: EmStat3 Blue (PalmSens) operat prin Bluetooth cu ajutorul unei tablete Samsung Galaxy A2 mini.
- Figura 6, cuprinde voltamogramele puls diferențiale suprapuse pentru: a - domeniul potențialului de oxidare: detecția CML (voltamogramele înregistrate cu senzorul optimizat în: tampon fosfat salin de concentrație 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – negru; CML 10 μg mL<sup>-1</sup> în PBS 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – roșu; CML 10 μg mL<sup>-1</sup> și MGL 100 μg mL<sup>-1</sup> în PBS 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – verde); b - domeniul potențialului de reducere: detecția MGL (voltamogramele înregistrat cu senzorul optimizat în: tampon fosfat salin de concentrație 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – negru; MGL 100 μg mL<sup>-1</sup> în PBS 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – roșu; MGL 100 μg mL<sup>-1</sup> și CML 10 μg mL<sup>-1</sup> în PBS 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – verde).
- Figura 7, teste efectuate cu ajutorul senzorului electrochimic salivar (1). Prezentarea comparativă a rezultatelor obținute la detecția *in vivo*, respectiv *ex vivo* ale: a - CML și b - MGL în salivă brută recoltată de la un voluntar sănătos **înainte de periajul dentar**.
- Figura 8, teste efectuate cu ajutorul senzorului electrochimic salivar (1). Prezentarea comparativă a rezultatelor obținute la detecția *in vivo*, respectiv *ex vivo* ale: a - CML și b - MGL în salivă brută recoltată de la un voluntar sănătos **după periajul dentar**.

Senzorul electrochimic salivar constă dintr-un suport planar de polietilenă (4), pe care s-au imprimat cu ajutorul unui șablon potrivit confecționat din oțel inox, contactele electrice ale celor 3 electrozi, în aceeași etapă cu electrodul de referință (ER) folosind cerneală conductoare de Ag/AgCl (Electrodag PF-410, Acheson). După uscarea la 60°C pentru 15 minute, se trece la imprimarea cu ajutorul șablonului descris anterior a electrodului auxiliar (EA) și electrodului de lucru (EL) folosind cerneală conductoare de carbon (Loctite EDAG 423SS, Henkel). După o nouă etapă de uscare la 60°C pentru 15 minute, se trece la imprimarea cu ajutorul șablonului potrivit a unui strat polimeric izolator (Fabric glue, Aleenes) peste contacte având ca scop atât izolarea celulei electrochimice de contacte cât și protejarea acestora de scurtcircuitarea accidentală. După uscarea completă se trece la funcționalizarea electrodului de lucru prin acoperirea electrochimică cu un film nanostructurat de platină. Dispunerea în dispozitivul intra-oral (3) a senzorului electrochimic (1) se



face prin lipire cu ajutorul unui fotopolimer biocompatibil (Nexcomp Flow, MetaBiomed) utilizat în lucrări protetice, care permite fixarea stabilă pe durata testelor și îndepărtarea facilă a acestuia după finalizarea testelor pentru a face loc unui nou senzor. Modul de amplasare al senzorului pe dispozitivul intra-oral se poate observa în figura 1 și figura 3. Într-un exemplu de montaj (vezi figura 1 și figura 3), senzorul electrochimic este dispus paralel cu versantul lingual și perpendicular pe planul arcadei dentare. Avantajul acestei realizări este faptul că suprafața de detecție (1), anume celula electrochimică cu cei 3 electrozi este expusă continuu salivei care se acumulează în spatele arcadei dentare.

Se prezintă în continuare descrierea detaliată a etapelor implicate în procedeul de obținere a senzorului electrochimic (1) salivar integrat pe un dispozitiv intra-oral de tip gutieră (3) montat pe o mandibulă falsă (2) pentru testele *ex-vivo*, respectiv în gura voluntarului pentru testele *in vivo*.

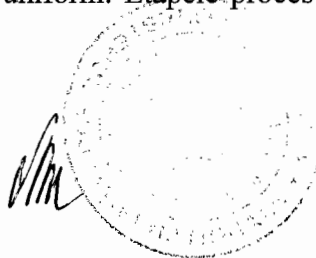
Astfel avem:

#### **(i) Realizarea dispozitivului intra-oral după un mulaj specific pacientului**

Gutiera a fost realizată utilizând un model de mandibulă realizat din ghips extradur, de clasa a IV-a, reprezentând o arcadă dentară reală (2). O folie rezistentă la căldură și transparentă cu grosimea de 1,5 mm (soft Tray Sheets) a fost introdusă în sistemul Ultradent, unde a fost încălzită până când a fost plasticizată. Rama aparatului a fost coborâtă deasupra modelului, iar prin acțiunea vidului folia a fost intim aplicată pe modelul de ghips. După răcire, folia a fost tăiată la nivelul limitelor rebordurilor alveolare, vestibulare și linguale, și îndepărtată de pe modelul de ghips obținând gutiera (3), care după curățare și sterilizare poate fi utilizată ca suport pentru fixarea unui senzor electrochimic (1) și testarea *in vivo* a CML și MGL din salivă.

#### **(ii) Imprimarea celulei electrochimice pe suportul planar**

Pentru imprimarea electrozilor pe suport planar s-a utilizat un șablon de oțel inoxidabil de 12" × 12" și 150 μm grosime produs de Metal Etch Services, San Marcos, CA, SUA. Acesta are tipare bine definite pentru contacte, electrodul de referință, electrodul auxiliar și electrodul de lucru. Înainte de utilizare, acest șablon se curăță cu acetonă pentru îndepărtarea oricăror impurități și se poziționează pe suportul dorit, curățat în prealabil cu acetonă sau etanol și perfect uscat. O cantitate potrivită de cerneală se așează deasupra decupajului ales apoi se folosește o racletă de silicon flexibilă pentru a întinde cerneala într-un strat cât mai uniform. Etapele procesului de imprimare sunt următoarele:



- imprimarea contactelor electrozilor în aceeași etapă cu electrodul de referință (ER) folosind un șablon potrivit și cerneală de Ag/AgCl;
- imprimarea electrodului auxiliar (EA) în aceeași etapă cu electrodul de lucru (EL), folosind un șablon potrivit și cerneală conductoare de carbon;
- imprimarea stratului polimeric izolator peste contactele electrozilor pentru evitarea scurtcircuitului;

Stratul de Ag/AgCl a fost imprimat în primul rând pe suportul curățat cu acetonă sau etanol, apoi cerneala a fost uscată prin expunere pentru 15 minute într-o autoclavă, la 60°C. După uscarea completă a cernelei de Ag/AgCl, s-a trecut la imprimarea electrodului auxiliar și electrodului de lucru utilizând cerneală de carbon și respectând aceeași procedură de uscare. Procesul de imprimare descris mai sus asigură o grosime a stratului de cerneală depus de aproximativ 150 μm. Pentru a evita scurtcircuitele din partea de sus a conexiunilor electrozilor, celula electrochimică (1) se izolează față de contacte prin imprimarea pe acestea din urmă a unui film izolant din polimer. Acesta se introduce la autoclavă pentru 15 minute la 60°C, etapă ce permite obținerea unui film flexibil, care asigură și separarea dielectrică a sistemului cu trei electrozi, cu expunerea zonei de detecție. Electrozii astfel imprimați pot rezista la șocuri mecanice de tip pliere, îndoire, întindere, sau răsucire datorită proprietăților elastice ale suportului de polietilenă (4), dar și datorită caracterului flexibil al adezivului izolant. Senzorii astfel obținuți nu au necesitat niciun fel de pretratare înainte de utilizare și testare.

### **(iii) Funcționalizarea electrodului de lucru de carbon prin depunerea electrochimică a unui film nanostructurat de platină**

Funcționalizarea electrodului de lucru de carbon cu film nanostructurat de platină are ca scop expandarea suprafeței electrochimic active (disponibile pentru transformarea redox electrochimică a analiților de interes) prin generarea unui strat poros, tridimensional, alcătuit din nanostructuri ordonate din metal nobil, care permite transferul rapid de electroni între compusul din soluție și suprafața electrodică, dar mai ales crește sensibilitatea de detecție a senzorului. Generarea electrochimică a nanostructurilor de platină se face prin baleierea potențialului electrodului de lucru între -0,3 și +1,4 V vs. Ag/AgCl pentru 20 cicluri cu o viteză de baleiaj de 50 mV s<sup>-1</sup> într-o soluție de H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> de concentrație 10 μmol L<sup>-1</sup> preparată în HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Voltamogramele multiciclice înregistrate în timpul procesului de generare electrochimică a nanostructurilor de platină pot fi observate în figura 2b.



H  
14**(iv) Fixarea senzorului electrochimic pe suprafața dispozitivului intra-oral**

După funcționalizare, senzorul electrochimic imprimat (1) se atașează pe suprafața gutierei mandibulare (3), în zona frontală, fiind poziționat pe incisivi, cu celula electrochimică orientată în jos, cum se poate observa în imaginea prezentată în figura 1b și în imaginea din figura 3, Partea senzorului în care sunt contactele imprimate se pliază spre exterior, unde se va realiza conexiunea cu contactele electrice ale potențostatului (8), prin intermediul unor file izolate (6). Fixarea în această poziție a senzorului s-a realizat cu ajutorul unei rășini polimerice biocompatibile utilizate în lucrări protetice, care se întărește după expunerea la lumină UV timp de 20 de secunde. Acest adeziv a facilitat imobilizarea stabilă a senzorului electrochimic pe gutieră pe toată durata testului efectuat atât *in vivo* cât și *ex vivo*, de control. După utilizare, senzorul de unică folosință poate fi îndepărtat cu ușurință de pe gutieră și înlocuit cu unul nou. Folia flexibilă, materialul din care a fost fabricată gutiera și rășina au fost alese pe baza biocompatibilității acestora, fiind non toxice și biocompatibile, potrivite pentru amplasarea în cavitatea bucală.

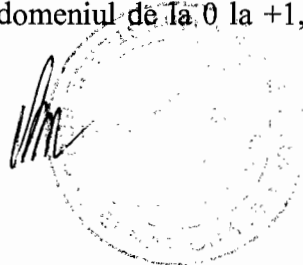
**(v) Alimentarea celulei electrochimice la sursa de curent a potențostatului prin intermediul unor fire conductoare izolate;**

Conectorii electrozilor au fost imprimați în formă șerpuită, cu lungimea de 2,50 cm, ceea ce asigură transmiterea curentului de la nivelul celulei electrochimice (1) aflate în contact cu saliva, până în afara cavității bucale. Din acest punct se folosesc conectori de tip cablu izolat (6) cu diametrul de 2,5 mm, care sunt suficienți de lungi și flexibili pentru a permite conectarea între senzor și cablurile specifice (8) ale potențostatul portabil (5). Lungimea conexiunii serpentine poate fi modificată după necesitate.

**(vi) Efectuarea testelor de voltametrie puls diferențială pentru oxidarea CML, respectiv reducerea MGL și înregistrarea semnalelor de curent obținute;**

Experimentele electrochimice au fost realizate cu ajutorul unui minipotențostat comercial de tip EmStat3 Blue (PalmSens) (5), care este alimentat cu ajutorul unui acumulator, iar transmiterea semnalului analitic înregistrat se face prin intermediul unui sistem Bluetooth integrat, la o tabletă Samsung Galaxy A2 mini (7), operată cu sistem Android și cu soft specific pentru EmStat3 Blue PS Trace. Dispozitivul de testare integral, în stare de funcțiune și montat în gura voluntarului este prezentat în figura 5.

S-a utilizat voltametria puls diferențială, voltamogramele corespunzătoare fiind înregistrate la baleierea potențialului la electrodul de lucru pe domeniul de la 0 la +1,5 V vs. Ag/AgCl, cu o





viteză de scanare de  $0,05 \text{ V s}^{-1}$  în cazul CML, respectiv de la +0,2 la -1,2 V vs. Ag/AgCl, cu o viteză de scanare de  $0,05 \text{ V s}^{-1}$  în cazul MGL (vezi figura 4). În aceste condiții experimentale, testarea pentru cei doi analiți durează în jur de 1 minut. Voltamogramele puls diferențiale obținute la testarea senzorului salivar în soluții sintetice care conțin fie un singur analit, fie ambii analiți sunt prezentate comparativ cu testele înregistrate în tampon fosfat salin (PBS) de concentrație  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  și pH 7,4 sunt prezentate în figura 6 a pentru CML, respectiv figura 6 b pentru MGL.

Testarea *in vivo* a senzorului electrochimic salivar (1) a fost de asemenea realizată pentru ambii analiți, montând dispozitivul de detecție în gura unui voluntar sănătos, înainte și după periajul dentar. Rezultatele obținute sunt prezentate comparativ cu cele obținute testând *ex vivo* senzorului cu saliva prelevată de la același voluntar, imediat după testarea *in vivo*, respectiv testele înregistrate în absența analiților, în PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Voltamogramele puls diferențiale obținute înainte de periajul dentar sunt prezentate în figura 7 a pentru CML și figura 7 b pentru MGL, iar cele obținute după periajul dentar în figura 8 a pentru CML și figura 8 b pentru MGL.

#### **(vii) Prelucrarea rezultatelor experimentale și interpretarea datelor obținute.**

Din voltamogramele puls diferențiale obținute la testarea *ex vivo*, respectiv *in vivo* a celor doi analiți din probe sintetice, respectiv salivă brută, se extrag informații care permit atât identificarea prezenței analiților în probă (potențialul de oxidare/reducere -  $E_p$ , care dă informații privind poziția picului de oxidare a CML, respectiv reducere a MGL), cât și determinarea cantitativă a acestora (înălțimea/aria picului de oxidare, respectiv reducere -  $I_{ox/red}$ , care sunt corelate cu cantitatea de analiți din probele analizate).

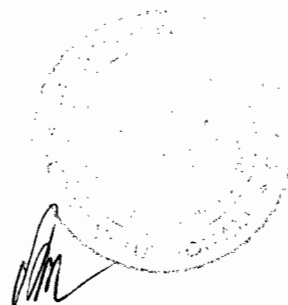
Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- Detecția în timp real a compușilor salivari de interes.
- Detecția se realizează folosind metode electrochimice simple, iar semnalele de curent care se înregistrează corespund transformării electrochimice a compușilor testați, intensitatea curentului înregistrat fiind direct proporțională cu concentrația compușilor testați. Astfel, procedura de detecție este directă și nu necesită etichetarea compușilor de interes cu sonde redox.
- Din punct de vedere constructiv, senzorul electrochimic are o dimensiune redusă ( $1 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$ ), având cei trei electrozi imprimați pe o suprafață totală ce permite integrarea facilă într-un dispozitiv intra-oral de tip gutieră. În configurația propusă în această invenție, contactele imprimate ale electrozilor ocupă o suprafață suplimentară de  $2,5 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$ , care permite

g  
12

legarea firelor conductoare carea asigura legarea la potențostatul portabil în afara cavității bucale pentru a evita scurtcircuitarea electrozilor sau curentarea subiectului testat.

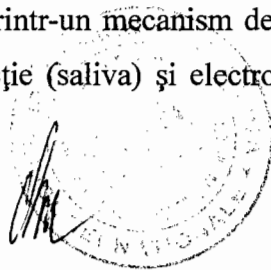
- Utilizarea prototipului elaborat în cadrul invenției creează premise optime pentru monitorizare non-invazivă a unor (bio)markeri cu implicații biomedicale care pot fi astfel detectați *in vivo* din salivă.



8  
4

## REVEDICĂRI

1. Senzor electrochimic pentru detecția salivară realizat prin imprimarea unei celule electrochimice (1) pe un suport flexibil (4) și atașarea acesteia pe un dispozitiv intra-oral de tip gutieră (3), **caracterizată prin aceea că**, celula electrochimică este amplasată pe partea frontală a mandibulei, fiind astfel în contact cu saliva, care este mediul din care se face detecția. Contactele celor trei electrozi ai celulei electrochimice (1) sunt dispuse în partea superioară, unde se face legarea la cablurile de alimentare (8) ale potentiostatului portabil și miniaturizat (5) prin intermediul firelor izolate (6), fără ca acestea să se afle în contact cu saliva.
2. Senzor electrochimic pentru detecția salivară (1), conform revendicării de la punctul 1, **caracterizată prin aceea că**, permite detecție salivară simultană a doi biomarkeri de tip AGEs, aceasta fiind posibilă ținând cont de caracterul redox opus al compușilor (unul reductibil, celălalt oxidabil) și diferența semnificativă dintre valorile potențialelor redox ale acestora (vezi figura 4).
3. Senzor electrochimic pentru detecția salivară (1), conform revendicărilor 1 și 2, **caracterizată prin aceea că**, analiții de interes dizolvați în salivă difuzează la suprafața electrodului de lucru (EL) de carbon funcționalizat cu film nanostructurat de platină și la scanarea domeniului de potențial de oxidare (pentru CML), respectiv de reducere (pentru MGL) suferă procese de oxidare electrochimică, respectiv reducere electrochimică. Semnalele analitice sub formă de pic de curent de oxidare al CML, respectiv de reducere al MGL, vor fi înregistrate sub forma unor voltamograme puls diferențiale, din care se determină valorile potențialelor de oxidare ( $E_{p,CML}$ ), respectiv reducere ( $E_{p,MGL}$ ) ca fiind intersecția perpendicularelor trasate din vârful picurilor cu axa OX. Aceste valori de potențial sunt specifice pentru analiții testați, permițând astfel identificarea prezenței acestor compuși din probe necunoscute.
4. Senzor electrochimic pentru detecția salivară (1), conform revendicărilor 1, 2 și 3, **caracterizată prin aceea că**, detecția compușilor salivari care prezintă funcțiuni cu potențial de transformare redox se realizează printr-un mecanism de transfer de electroni, care are loc la interfața dintre mediul de detecție (saliva) și electrodul de lucru (EL) de



\*  
10

carbon funcționalizat cu platină. Intensitatea curentului de pic de oxidare pentru CML ( $I_{ox,CML}$ ), respectiv de reducere pentru MGL ( $I_{red,CML}$ ), sunt direct proporționale cu concentrațiile analiților de interes din mediul de detecție, permițând astfel cuantificarea (determinarea cantitativă) simultană în mai puțin de 5 minute a compușilor de interes din salivă brută, fără adaos de reactivi, fără diluție sau alte pretratamente.



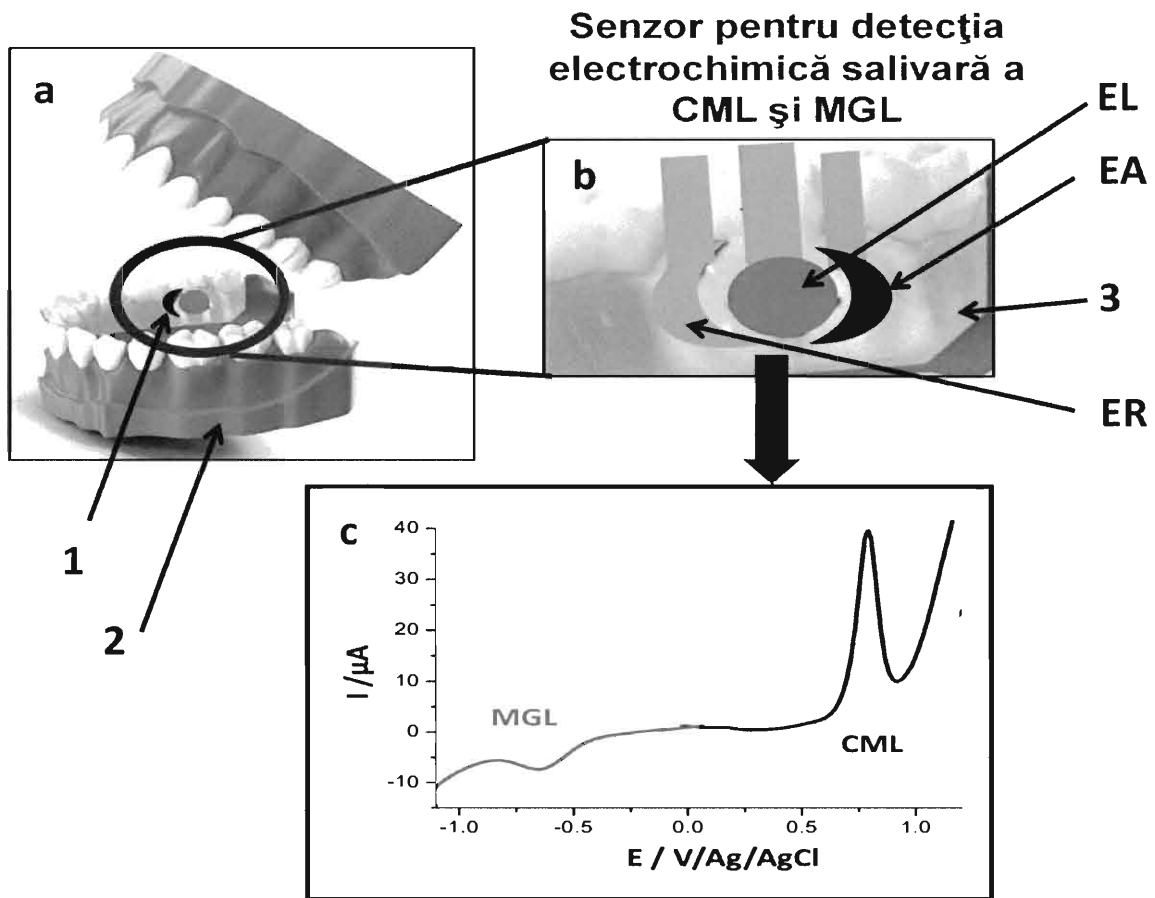


Figura 1, a - reprezentarea schematică a senzorului electrochimic salivar (1) pentru detecție simultană *in vivo*, așa cum este fixat pe dispozitivul intra-oral (3) amplasat pe o mandibulă falsă (2); b - detaliu privind geometria senzorului cu cei trei electrozi: EL, EA și ER și c - reprezentarea suprapusă a voltamogramelor puls diferențiale utilizate pentru detecția salivară a CML (negru) și MGL (roșu).



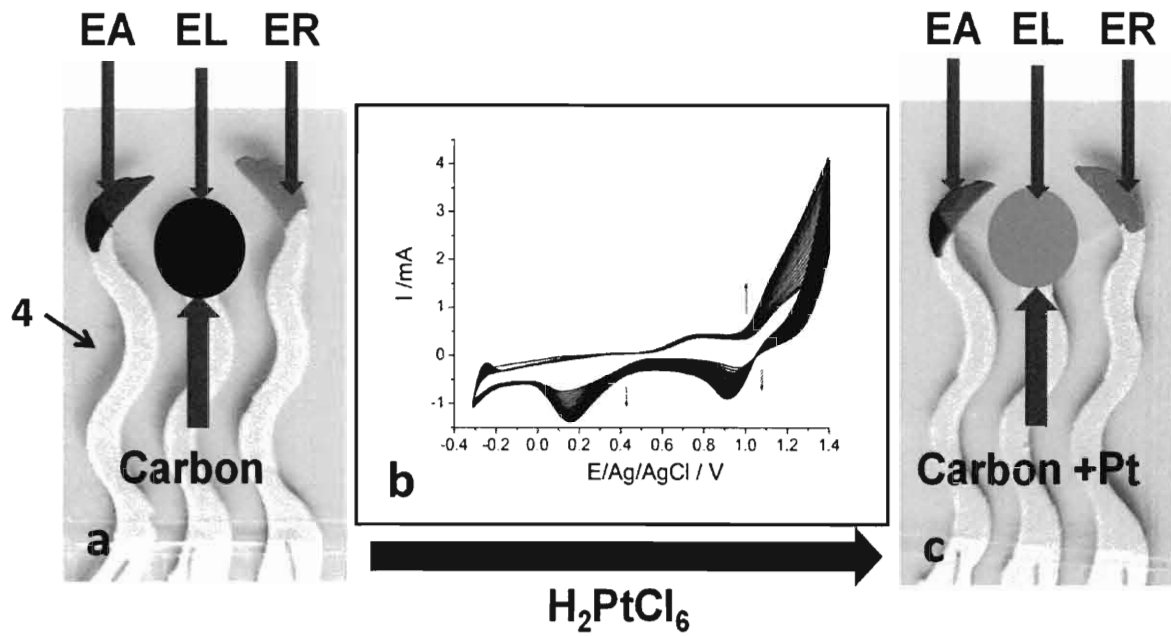


Figura 2, detalii privind celula electrochimică și suprafața de detecție. Comparație între celula electrochimică a - înainte și c - după funcționalizarea electrodului de lucru de carbon cu filmul de platină. EA – electrod auxiliar de carbon; EL – electrod de lucru de carbon, respectiv carbon+Pt; ER – electrod de referință Ag/AgCl. b - Voltamograma multiciclică înregistrată în timpul funcționării electrodului de lucru de carbon prin depunerea electrochimică a unui film nanostructurat de platină folosind o soluție de  $H_2PtCl_6$   $10 \mu mol L^{-1}$  în  $HCl$   $0,1 mol L^{-1}$ .



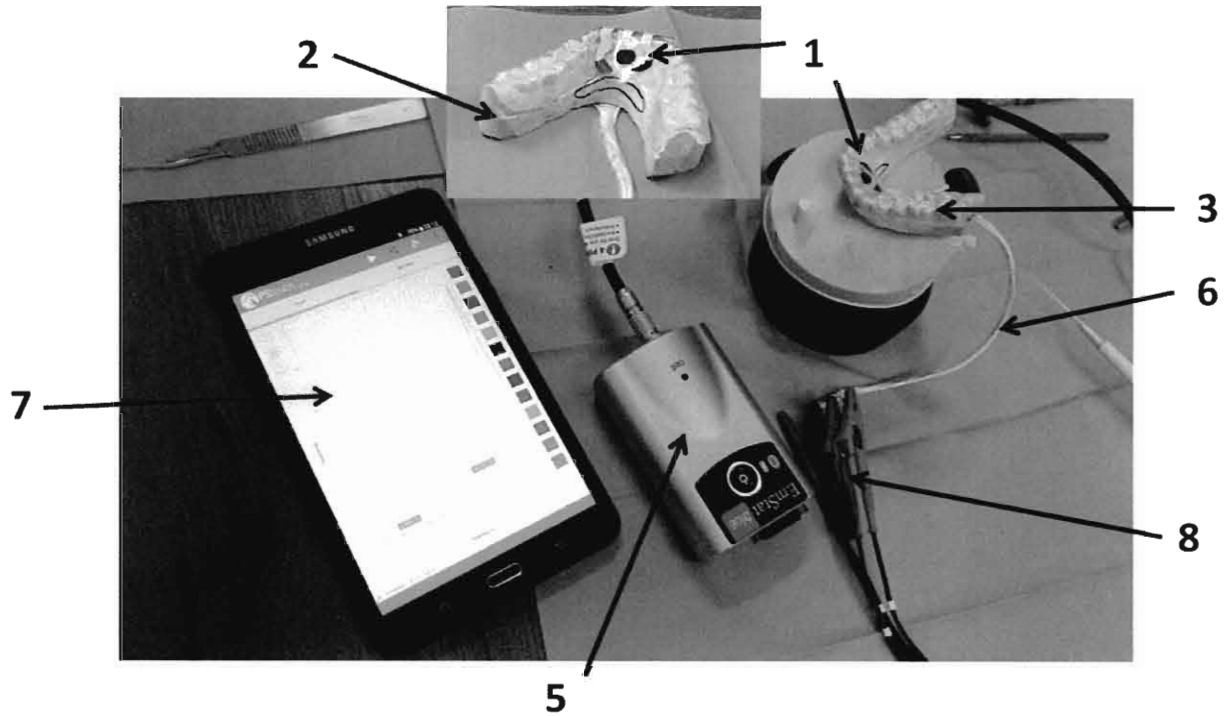


Figura 3, imagine prezentând modul de amplasare al senzorului electrochimic (1) pe dispozitivul intra-oral (3) montat pe mandibula falsă (2) și detaliu privind cuplajul firelor izolate (6) la contactele (8) ale potențiostatul portabil (5) operat prin intermediul unei tablete (7).



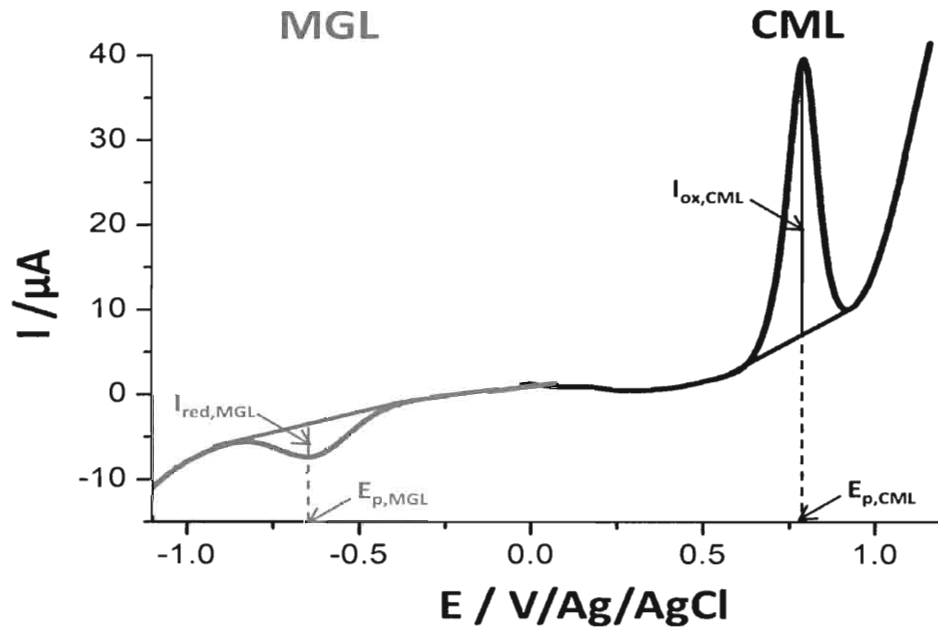


Figura 4, voltamogramele puls diferențiale suprapuse pentru detecția simultană a CML – negru și MGL - roșu. Notațiile se referă la potențialele de pic, respectiv curenții de pic de oxidare a CML ( $E_{p,CML}$  și  $I_{ox,CML}$ ) și de reducere a MGL ( $E_{p,MGL}$  și  $I_{red,MGL}$ ).





Figura 5, imagine privind amplasarea dispozitivului de detecție intra-oral (3) cu senzorul electrochimic (1) atașat și cuplajul la potențostatul portabil (5) realizat prin intermediul unor fire izolate (6) și contacte specifice (8) și înregistrarea semnalului analitic pe o tabletă (7) în sistem „fără fir”. Potentiostatul utilizat: EmStat3 Blue (PalmSens) operat prin Bluetooth cu ajutorul unei tablete Samsung Galaxy A2 mini.



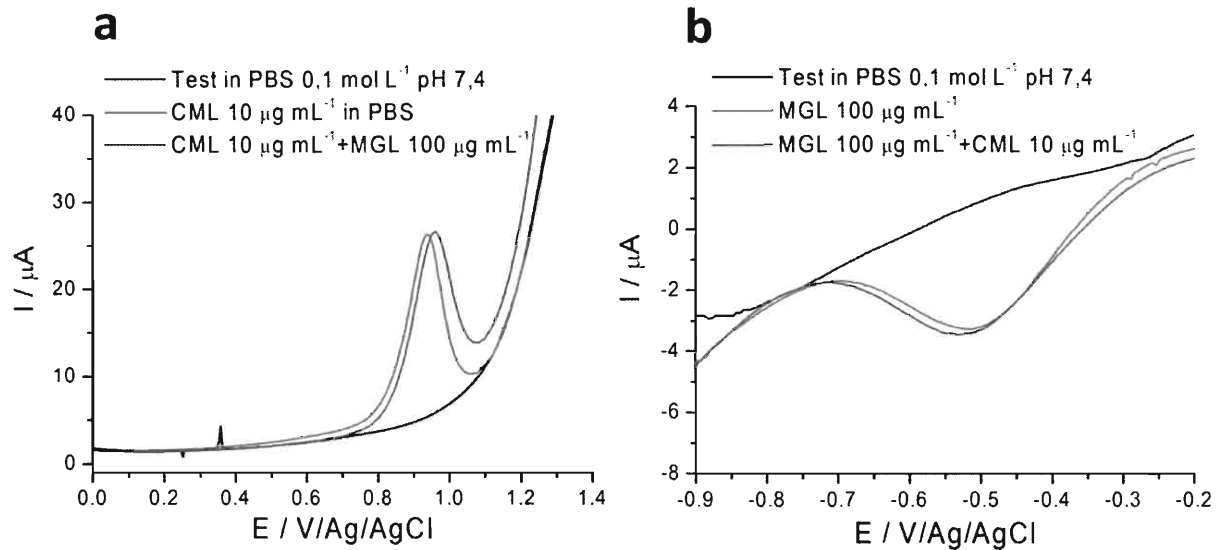


Figura 6, voltamogramele puls diferențiale suprapuse pentru: a- domeniul potențialului de oxidare: detecția CML (voltamogramele înregistrate cu senzorul optimizat în: tampon fosfat salin de concentrație 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – negru; CML 10 μg mL<sup>-1</sup> în PBS 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – roșu; CML 10 μg mL<sup>-1</sup> și MGL 100 μg mL<sup>-1</sup> în PBS 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – verde); b - domeniul potențialului de reducere: detecția MGL (voltamogramele înregistrat cu senzorul optimizat în: tampon fosfat salin de concentrație 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – negru; MGL 100 μg mL<sup>-1</sup> în PBS 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – roșu; MGL 100 μg mL<sup>-1</sup> și CML 10 μg mL<sup>-1</sup> în PBS 0,1 moli L<sup>-1</sup> și pH 7,4 – verde).



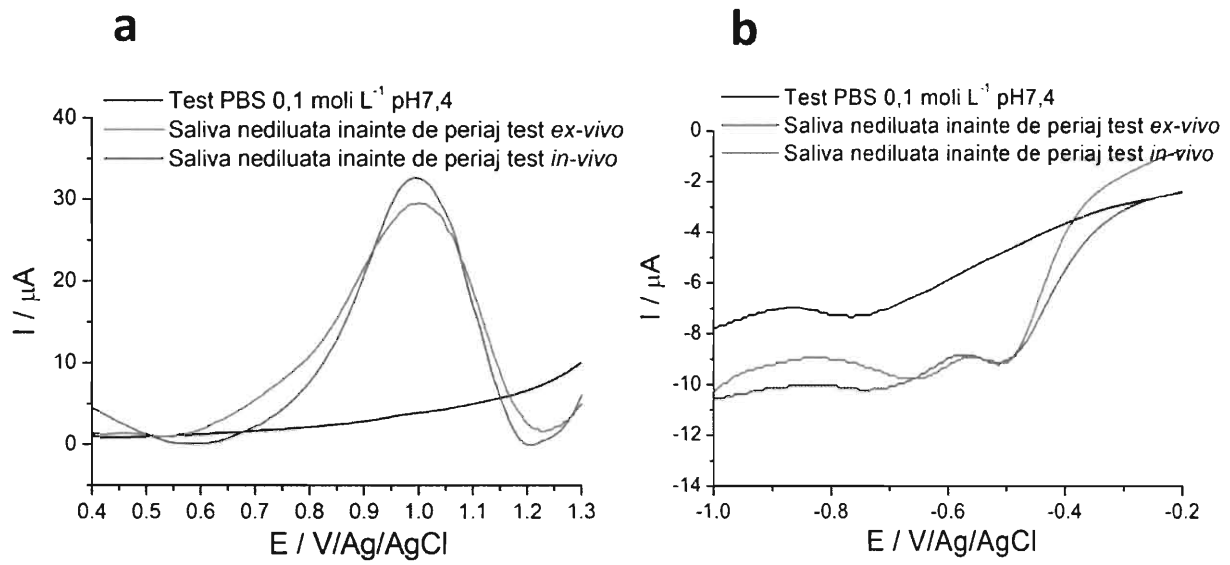


Figura 7, teste efectuate cu ajutorul senzorului electrochimic salivar (1). Prezentarea comparativă a rezultatelor obținute la detecția *in vivo*, respectiv *ex vivo* ale: a - CML și b - MGL în salivă brută recoltată de la un voluntar sănătos înainte de periajul dentar.



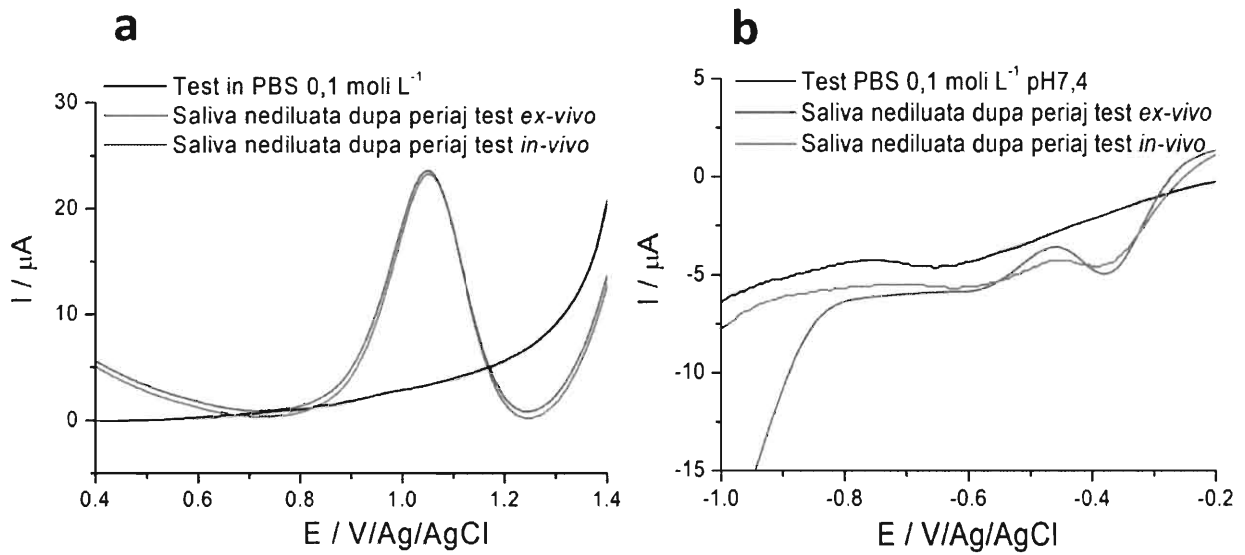


Figura 8, teste efectuate cu ajutorul senzorului electrochimic salivar (1). Prezentarea comparativă a rezultatelor obținute la detecția *in vivo*, respectiv *ex vivo* ale: a - CML și b - MGL în salivă brută recoltată de la un voluntar sănătos după periajul dentar.

