



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00644

(22) Data de depozit: 25/10/2021

(41) Data publicării cererii:  
28/02/2022 BOPI nr. 2/2022

(71) Solicitant:  
• DDS DIAGNOSTIC S.R.L., STR.SEGOVIA  
NR.1, BL.C8, SC.3, AP.39, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• STAN DANA, STR. SEGOVIA NR. 1,  
BL. C8, SC. 3, AP. 39, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MATEESCU LORENA-ANDREEA,  
STR.RAUL VEDEA, NR.13C, AP.2,  
BRAGADIRU, IF, RO;  
• IOSUB RODICA, ȘOS.MIHAI BRAVU  
NR.42-62, BL.P8, SC.4, ET.8, AP.166,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU DE OBTINERE MICROSENZOR  
PENTRU DETECȚIA ELECTROCHIMICĂ A MORFINEI  
DIN PROBE BIOLOGICE UMANE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui microsenzor utilizat pentru detecția electrochimică a morfinei din probele biologice umane. Procedeu conform invenției constă în curățarea electrochimică a suprafeței electrodului de lucru prin metoda voltametriei ciclice CV, prin baleierea potențialului între -0,7...0 V cu viteza de scanare 10 mV câte 3 cicluri în soluția formată din tampon fosfat (pH = 7,4),  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  și  $K_3[Fe(CN)_6]$  de concentrație 5 mM, urmată de verificarea comportării electrochimice a suprafeței curățate prin înregistrarea CV cu baleierea potențialului între 0,2...0,6 V, 3 cicluri, EIS (Nyquist) între 100 kHz și 0,1 Hz, cu amplitudinea de 10 mV și SWV în intervalul - 0,05...0, 4 V, în soluție tampon fosfat cu 5 mM  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  și  $K_3[Fe(CN)_6]$ , după care are loc electropolimerizarea suprafeței electrodului de Au cu 0,1 mM de pirol și 1 mg/mL morfină în soluție tampon fosfat pe domeniul de baleiaj al potențialului cuprins între 0...0,7 mV cu viteza de scanare 100 mV/s timp de 3 cicluri, urmată de caracterizarea suprafeței electrodului de lucru prin CV, EIS și SWV și excizarea morfinei cu soluție de metanol 70%, care în final duce la obținerea biosenzorului și apoi folosirea lui prin depunerea cu câte 3  $\mu$ L de concentrații cunoscute progresive și seriale de morfină de la 5 la 25 ng/mL, urmată de verificarea electrochimică prin SWV, după care se

construiește curba de calibrare raportând intensitatea picului obținut prin SWV la concentrația morfinei depuse pe suprafața electrodului de lucru.

Revendicări: 1  
Figuri: 11

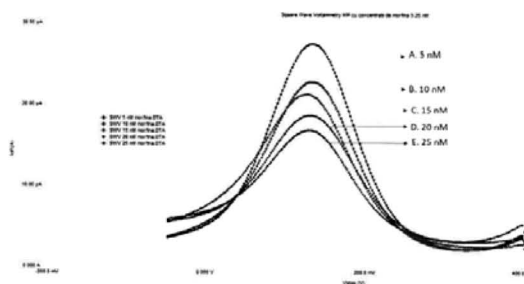


Fig. 10

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 20644	.....
Data depozit 25-10-2021	.....

## PROCEDEU DE OBTINERE MICROSENZOR PENTRU DETECȚIA ELECTROCHIMICĂ A MORFINEI DIN PROBE BIOLOGICE UMANE

### DESCRIERE INVENȚIE

Invenția se referă la procedeul de obținere ale electrozilor serigrafiați pentru detecția electrochimică a morfinei, pe suprafața de aur care este folosită ca electrod de lucru al microsenzorului.

Consumul de droguri precum și consumul abuziv al unor medicamente (precum morfina) creează dependență, efectele asupra sănătății persoanelor consumatoare, precum și cele socio-economice fiind de multe ori devastatoare.

Metodele electroanalitice sunt preferate pentru analiza compușilor farmaceutici activi și a probelor biologice datorită sensibilității și selectivității ridicate. Tehnicile electrochimice sunt versatile și au sensibilitate, acuratețe și precizie ridicată, precum și un domeniu larg de detecție și presupun costuri relativ scăzute.

Utilizarea unor metode de separare pentru izolarea, identificarea și analiza cantitativă a opiaceelor naturale și sintetice prezintă un larg interes. Strict vorbind, termenul de opiaceu se referă la produsele derivate din opiu de mac. În cazul de față, atenția este acordată morfinei (Smith et al., 2012). Morfina face parte din grupa alcaloizilor morfinanici propriu-zisă alături de codeină și tebaină. Morfina este un analgezic foarte puternic, utilizat pentru ameliorarea durerii în bolile maligne și are adesea acțiuni suplimentare pentru ameliorarea anxietății și producerea somnolenței (Cooper et al., 2017). Cu toate acestea, toate analgezicele opioide au potențialul de a produce efecte adverse, inclusiv deprimare respiratorie, greață și vărsături, constipație, retenție urinară, tulburări cognitive și mâncărime. În timpul terapiei cu opioide cronice, pot fi necesare doze progresiv mai mari pentru a susține efectul analgezic (toleranță), iar persoanele pot fi expuse riscului de sindrom de sevraj la opioide la încetarea bruscă al opioidului sau administrarea unui antagonist (dependență fiziologică).

În prezent tehnicile pentru analiza opiaceelor sunt cromatografia în strat subțire (TLC), gazcromatografia (GC), cromatografia de lichid de înaltă performanță (HPLC) și electroforeza capilară (CE), combinate cu diferite metode de detecție. De asemenea, unul dintre cele mai folosite teste pentru detecția morfinei este testul UDC (Urine testing drug). Primele metode sunt performante din punct de vedere analitic, dar prezintă dezavantajele unui timp mare de lucru, au costuri ridicate și necesită un personal specializat pentru a le folosi. Testul UDC, este un test rapid, ușor de utilizat dar are limitări în ceea ce privește performanțele analitice (limita de detecție, sensibilitate, specificitate și repetabilitate scăzute). În ultimii ani, la nivel mondial, s-au înregistrat studii ce se axează pe dezvoltarea de dispozitive electrochimice de tip biosenzori, rapide, sensibile, selective și cu un preț scăzut pentru detecția și monitorizarea opiaceelor. În România această tehnologie nu a fost disponibilă până în prezent.

Funcționalizarea bio-chimică a electrozilor serigrafiați este procesul cheie de construcție a unui viitor senzor electrochimic. În funcție de acest proces, suprafața electrozilor va fi capabilă să rețină exclusiv molecula de interes și să fie specifică.

Avantajul utilizării tehnicii imprimării moleculare în polimeri (MIP) constă în faptul că metoda de pregătire a microsenzorului nu este laborioasă, prezintă stabilitate ridicată, conferă specificitate ridicată prin prezența șabloanelor specifice antigenului țintă și presupune costuri reduse de producție, monomerul utilizat fiind mai ieftin decât anticorpii specifici.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă invenția de față constă în aceea că suprafața funcționalizată chimic formează cavități tridimensionale, complementare (ca formă, dimensiune

și grupări funcționale) cu morfina care permite detecția cantitativă și directă a morfinei din proba biologică, fără a necesita un anticorp biologic (predispus la reacții încrucișate) și nici molecule folosite pentru detecție.

Biosenzorul selectiv pentru morfină realizat prin tehnica de imprimare moleculară în polimeri (MIP) prin electropolimerizarea pirolului și imprimarea moleculei de morfină în filmul format face obiectul prezentei invenții. Cavitățile tridimensionale create în polimerul format pe aur, complementare ca dimensiune, formă și grupări funcționale cu morfina din proba biologică, permite determinarea selectivă a acesteia cu ajutorul metodelor electrochimice. Această procedură este extrem de importantă deoarece se obțin suprafețe de aur cu elemente de recunoaștere artificiale specifice și selective pentru morfină care pot fi utilizate în detecția electrochimică a morfinei din probe umane.

Formarea **microsenzorului**, presupune în general parcurgerea următoarelor etape:

- curățarea electrozilor serigrafiați și verificarea gradului de curățare prin metoda voltametriei ciclice (CV), spectrometriei de impedanță electrochimică (EIS) și voltametriei în unde pătratice (SWV);
- procesul de electropolimerizare al electrodului cu soluția care conține 0,1 M monomer pirol și 1 mg/mL morfină în soluție tampon fosfat PBS (pH~7) prin metoda voltametriei ciclice pe domeniul de potențial 0/+0,7 V, viteza de scanare 100 mV, 3 cicluri;
- caracterizarea electropolimerizării prin metodele electrochimice CV: domeniul de potențial +0,6/-0,2 V, rata de scanare 100 mV, EIS și Voltametria în Unde Pătratice (SWV);
- excizarea morfinei din polipirol cu soluție 70 % metanol;
- caracterizarea excizării morfinei din polimer prin metodele electrochimice CV, EIS și SWV.

Pentru aplicație, biosenzorul este incubat progresiv cu concentrații cunoscute de morfină introduse în serul uman după care se verifică electrochimic modificarea rezistenței la transferul electronic (în soluția electrolit: tampon fosfat cu pH=7,4 împreună cu mediatori chimici) după fiecare concentrație adăugată și incubată.

Concentrațiile cunoscute de morfină au fost introduse în ser uman de control și au fost următoarele: 5 nM (A); 10 nM (B); 15 nM (C); 20 nM (D); 25 nM (E); citirea s-a realizat utilizând potențostatul Interface 1010E (Gamry), cu ajutorul metodei voltametriei în unde pătratice (SWV) deoarece această este o metodă sensibilă prin care se determină concentrații de ordin nanometric ale moleculelor mici precum morfina.

Molecula de morfină este adsorbită prin adsorbție fizică și prin interacții hidrofobice între aceasta și suprafața electropolimerizată. Excizarea desface legăturile fizice prin care morfina este ținută pe suprafața aurului lăsând în urmă situsuri, grupări funcționale și forma caracteristică numai morfinei.

Avantajele utilizării tehnicii MIP pe electrozi serigrafiați comparativ cu tehnicile care utilizează anticorpi biologici sunt: reducerea legăturilor nespecifice, a reacțiilor încrucișate și selectivitatea; electropolimerizarea realizează o acoperire omogenă a suprafeței de aur și mai multe situsuri de legare.

Figurile reprezentative realizării microsenzorului conform invenției sunt următoarele:

**Fig. 1.** Modelul experimental – electrodul serigrafiat care prezintă: A. electrod de lucru cu suprafață de aur; B. contra-electrod cu suprafață de aur; C. electrod de referință de argint.

**Fig. 2.** Electrocul serigrafiat conectat la Potențiosatul Interface 1010E (Gamry).

**Fig. 3.** Verificare prin CV, EIS (plotare Nyquist) și SWV a etapei de curățare a suprafeței electrocului de lucru în soluție tampon fosfat (pH=7,4) cu 5 mM  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  și 5 mM de  $K_3[Fe(CN)_6]$ : A. Voltamograma ciclică a electrocului înainte și după curățare; B. Grafic Nyquist a electrocului înainte și după curățare; C. Grafic SWV înainte și după curățare.

**Fig. 4.** Voltamograme ciclice ale electrocului electropolimerizat: A. înainte de electropolimerizare; B. după formarea filmului de polipirol cu morfină.

**Fig. 5.** Plotări Nyquist ale electrocului electropolimerizat: A. înainte de electropolimerizare; B. după formarea filmului de polipirol cu morfină.

**Fig. 6.** Grafice SWV ale electrocului electropolimerizat: A. înainte de electropolimerizare; B. după formarea filmului de polipirol cu morfină.

**Fig. 7.** Voltamograme ciclice ale electrocului după excizarea morfinei: A. după formarea filmului de polipirol cu morfină; B. după excizarea morfinei;

**Fig. 8.** Plotari Nyquist ale electrocului după excizarea morfinei: A. după formarea filmului de polipirol cu morfină; B. după excizarea morfinei;

**Fig. 9.** Grafice SWV ale electrocului după excizarea morfinei: A. înainte de electropolimerizare; B. după formarea filmului de polipirol cu morfină.

**Fig. 10.** Graficele SWV ale electrocului după depunerea concentrațiilor de morfină: 5 nM (A); 10 nM (B); 15 nM (C); 20 nM (D); 25 nM (E);

**Fig. 11.** Curba de calibrare în funcție de concentrația de morfină ( $R^2=0,9603$ ).

## Exemplu:

### 1. Etapa de curățare electrod serigrafiat

Metoda de curățare a electrozilor serigrafiați cu electrocul de lucru din aur s-a realizat prin metoda electrochimică voltmetria ciclică (CV) în soluție de feri/fero cianură de potasiu 5 mM:

- interval de baleiere: -0,7/ 0 V;
- viteza de scanare: 10 mV;
- numărul de cicluri: 3 cicluri.
- se schimbă soluția redox feri/fero 5 mM și se caracterizează suprafața electrocului prin metodele electrochimice CV, EIS și SWV.

### 2. Procesul de electropolimerizare (MIP)

Soluția de electropolimerizare constă în următoarele:

- soluție pirol 0,1 M;
- morfină 1 mg/ml;
- soluție PBS pH=7.

Electropolimerizarea electrodului se realizează prin metoda electrochimică CV în soluția de electropolimerizare:

- interval de baleiere: 0/ +0,7 V;
- viteza de scanare: 100 mV;
- numărul de cicluri: 3 cicluri.
- se spală electrodul de lucru cu soluție PBS, se schimbă soluția de electropolimerizare cu soluție redox feri/fero 5 mM și se caracterizează suprafața electrodului prin metodele electrochimice CV, EIS și SWV.

### 3. Etapa de excizare a morfinei de pe suprafața electrodului de lucru

Excizarea morfinei din stratul de polipirol format pe suprafața senzorului se realizează cu soluție de metanol 70 %.

După ce excizarea a avut loc se caracterizează electrochimic suprafața electrodului de lucru prin CV, EIS și SWV.

### 4. Etapa de depunere a concentrațiilor de morfină pe suprafața electrodului de lucru

S-au realizat cinci soluții în ser uman cu următoarele concentrații de morfină:

- 5 nM;
- 10 nM;
- 15 nM;
- 20 nM;
- 25 nM.

Fiecare concentrație se depune prin acoperirea suprafeței electrodului de lucru cu 3  $\mu$ L timp de 10 min, după care se spală cu PBS, se caracterizează prin SWV și se realizează curba de calibrare.

## REVEDICĂRI

1. Revendicarea se referă la procedeul prin care se realizează un microsenzor selectiv pentru detecția electrochimică a morfinei din serul uman, **microsenzor caracterizat prin aceea că se realizează astfel**: curățarea electrochimică a suprafețelor prin metoda electrochimică voltametria ciclică (CV), baleierea potențialului între -0,7 și 0 V câte 3 cicluri în soluție tampon fosfat (pH=7,4) cu 5 mM  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  și  $K_3[Fe(CN)_6]$ , **urmată de** verificarea comportării electrochimice a suprafeței curățate prin înregistrarea CV prin baleierea potențialului între 0,2 și - 0,6 V câte 3 cicluri, EIS (Nyquist) între 100 kHz și 0,1 Hz, amplitudine 10 mV și SWV în intervalul -0,05 și 0,4 V în soluție tampon fosfat (pH=7,4) cu 5 mM  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  și  $K_3[Fe(CN)_6]$ , apoi spălare cu tampon fosfat (pH=7,4), **în continuare** are loc electropolimerizarea suprafeței electrodului de aur cu 0,1 mM de pirol și 1 mg/mL morfină în soluție tampon fosfat (pH=7,4) pe domeniul de baleiaj al potențialului între 0 și 0,7 mV cu viteza de scanare 100 mV/s, 3 cicluri, **urmând** caracterizarea electrochimică a suprafeței cu mediatori chimici în PBS 7,4 prin CV, EIS și SWV **apoi** excizarea morfinei de pe suprafața electrodului cu soluție de metanol 70 % **urmată de** caracterizarea suprafeței electrodului de lucru prin CV, EIS și SWV care în final duce la obținerea biosenzorului și **apoi** folosirea lui prin depunerea cu cate 3  $\mu$ L de concentrații cunoscute (introduse în serul uman normal de control) progresive și seriale de morfină de la 5 la 25 ng/mL, **urmând** verificarea electrochimică prin SWV după incubarea cu fiecare concentrație și **apoi** se construiește curba de calibrare, raportând intensitatea picului obținut prin SWV la concentrația morfinei depuse pe suprafața electrodului de lucru.

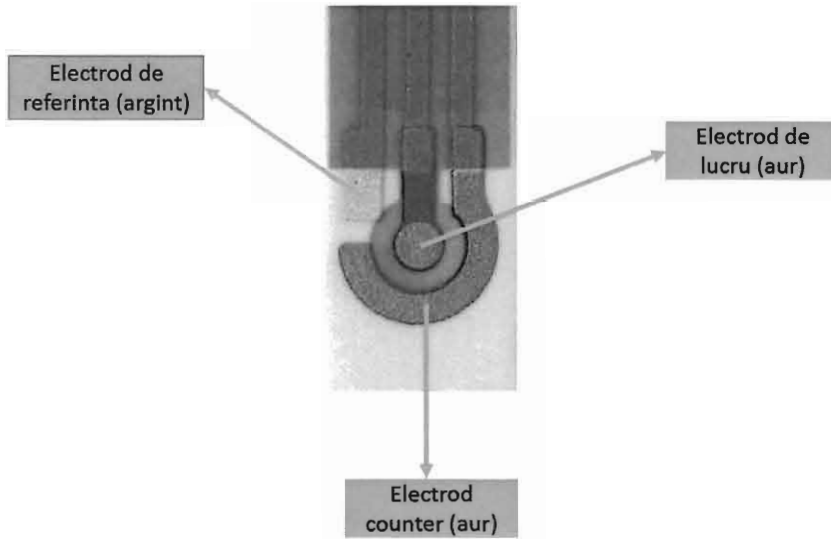


Fig. 1

12

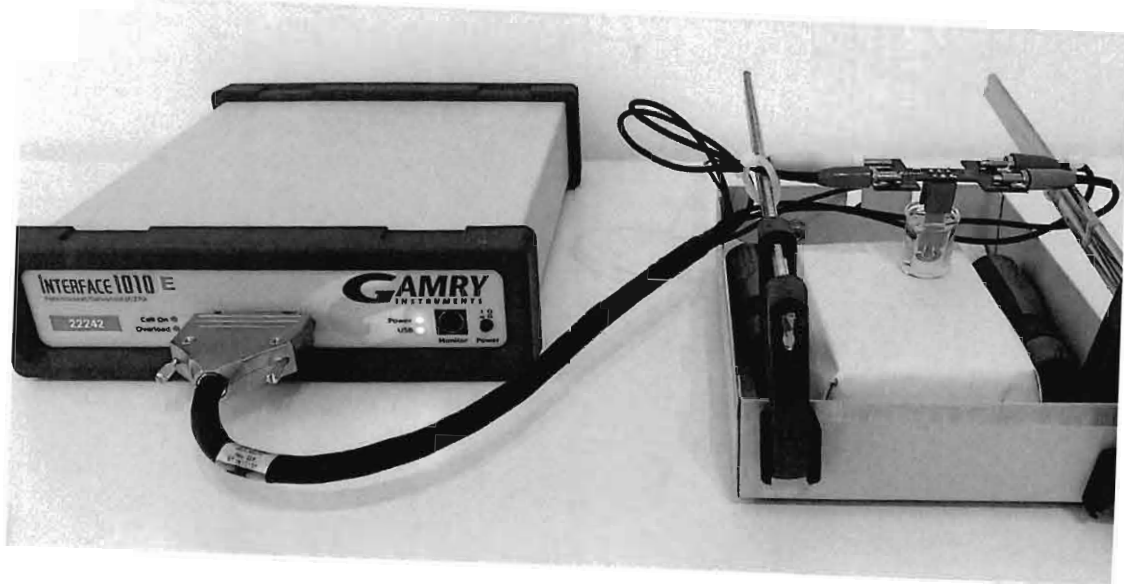


Fig. 2

*Handwritten signature*



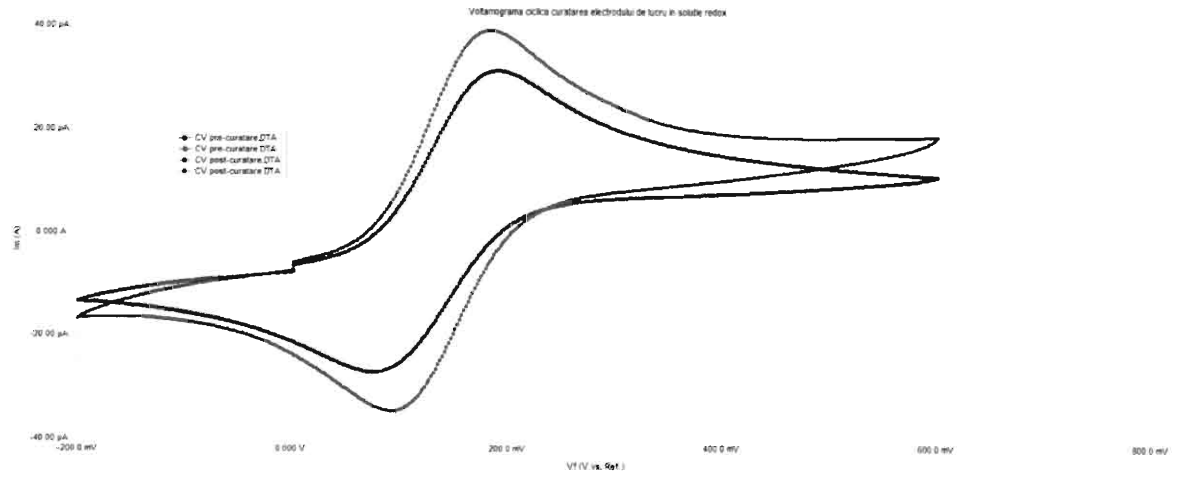


Fig. 3 A

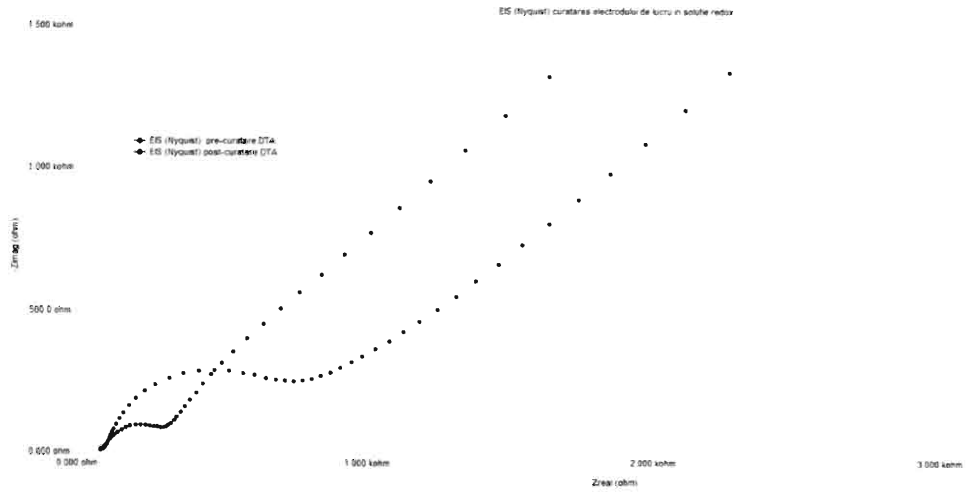


Fig. 3 B

*Handwritten signature*

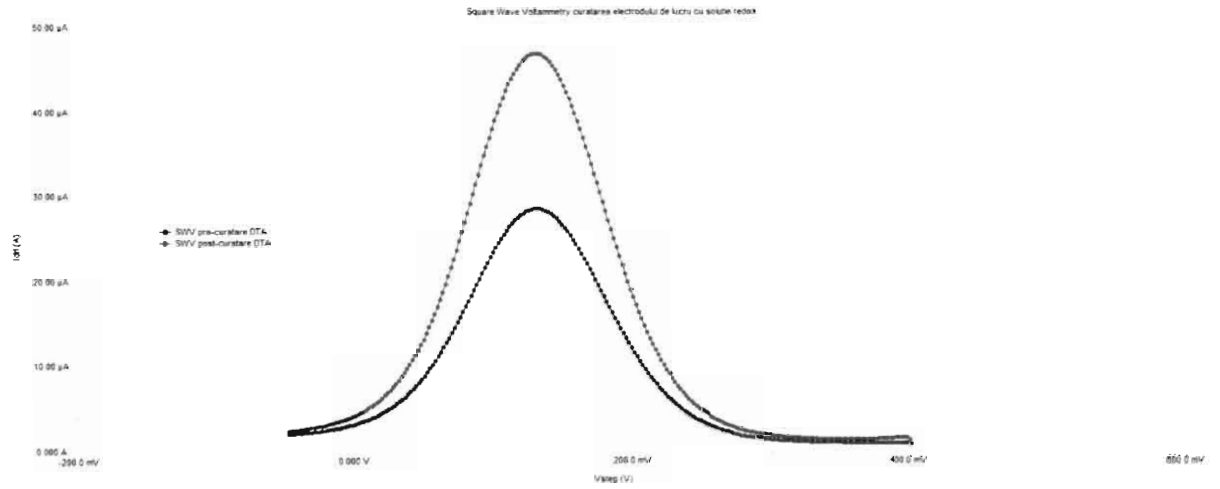


Fig. 3 C

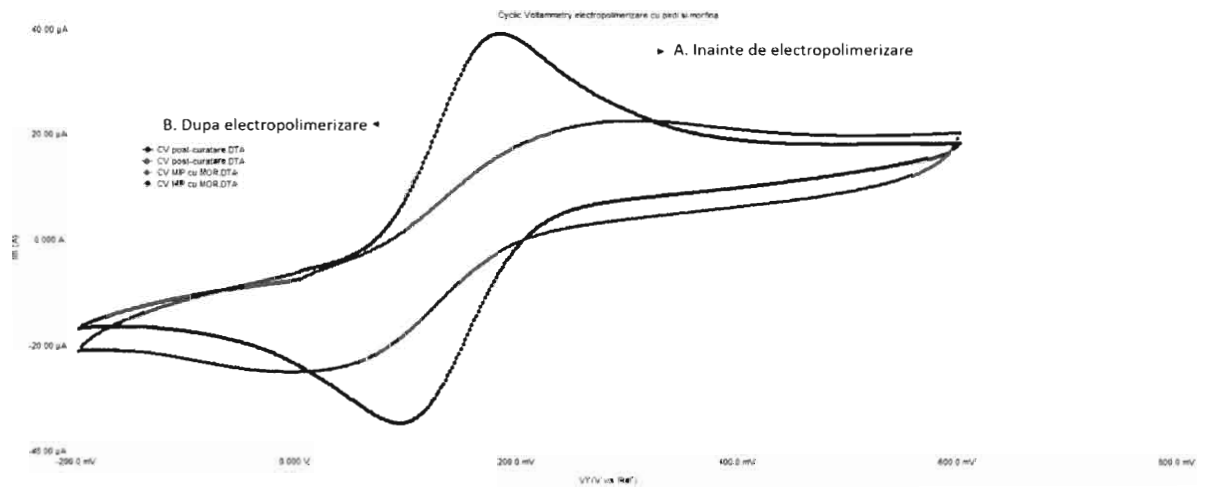


Fig. 4

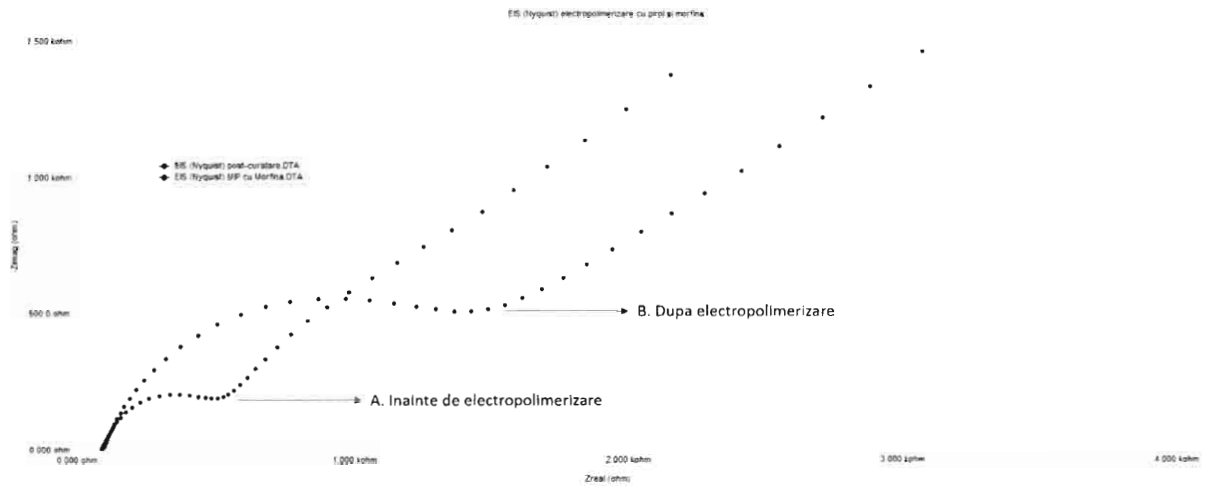


Fig. 5

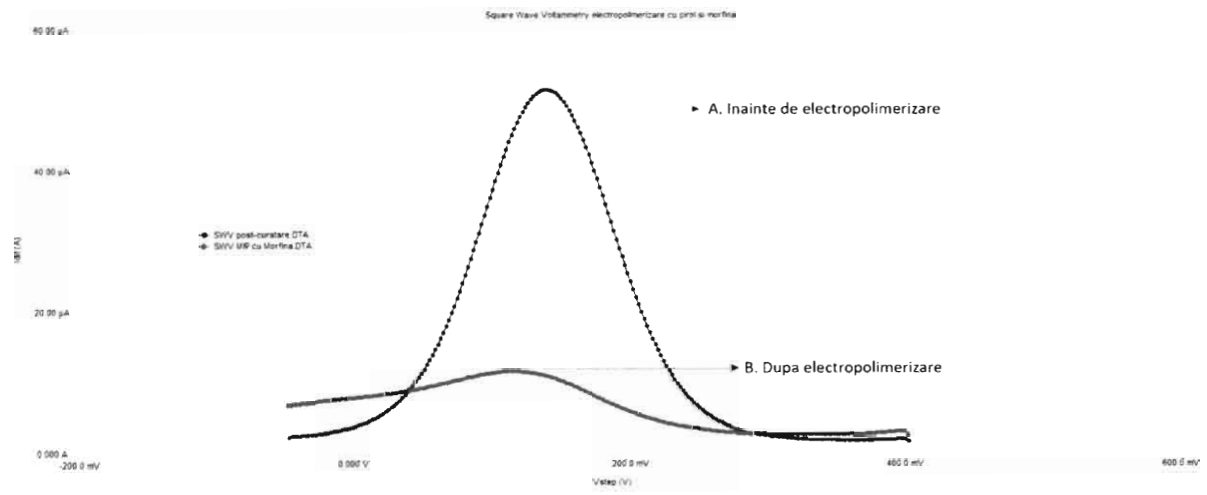
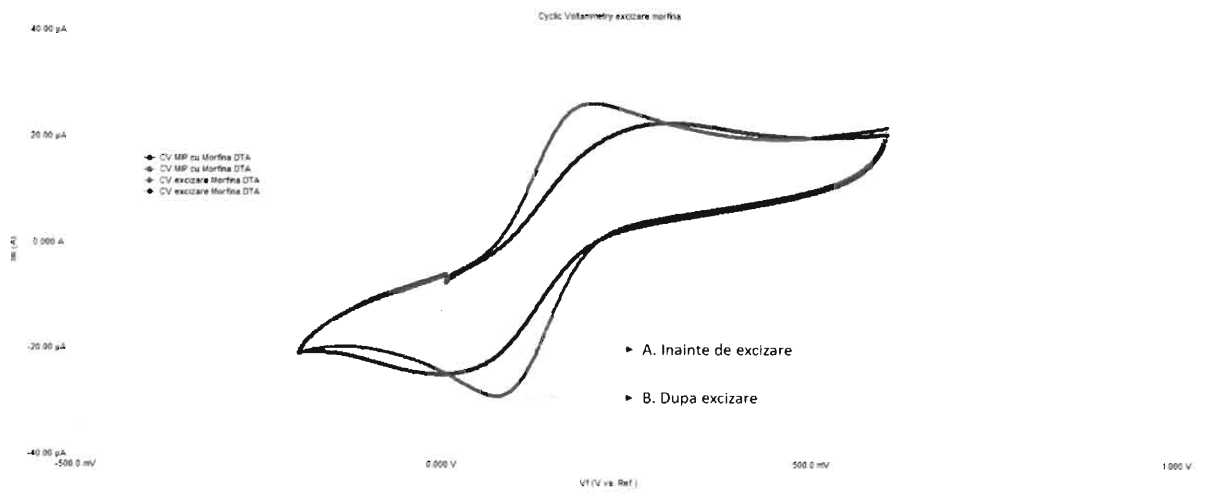


Fig. 6

Angelis



**Fig. 7**

*Handwritten signature*

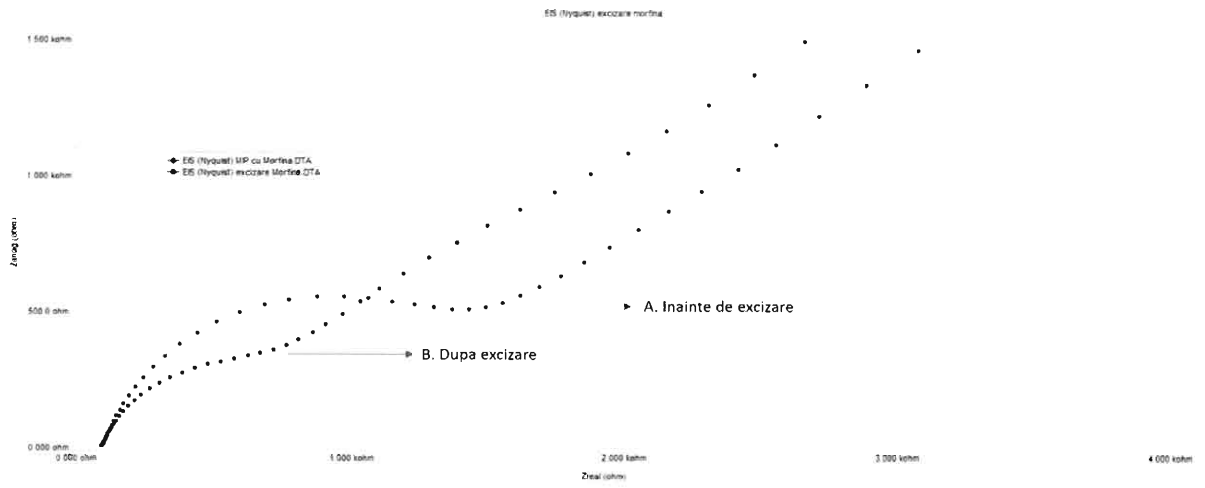


Fig. 8

*Handwritten signature*



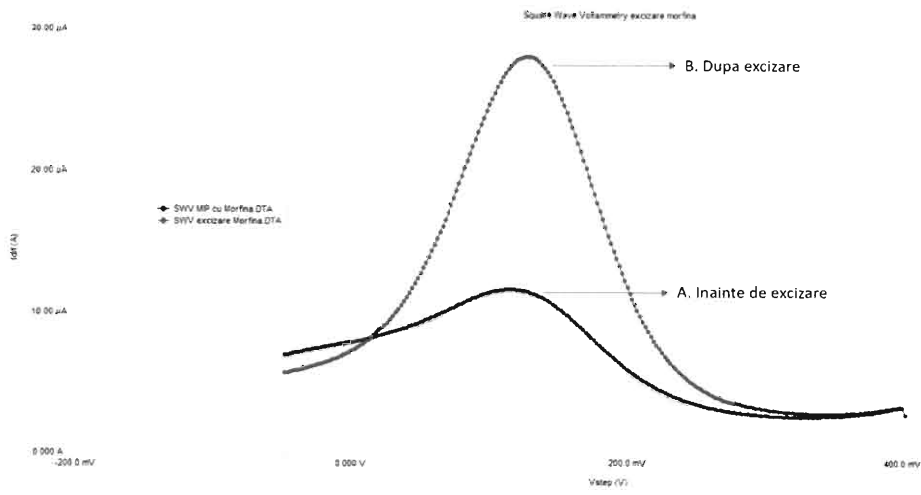


Fig. 9

*Handwritten signature*

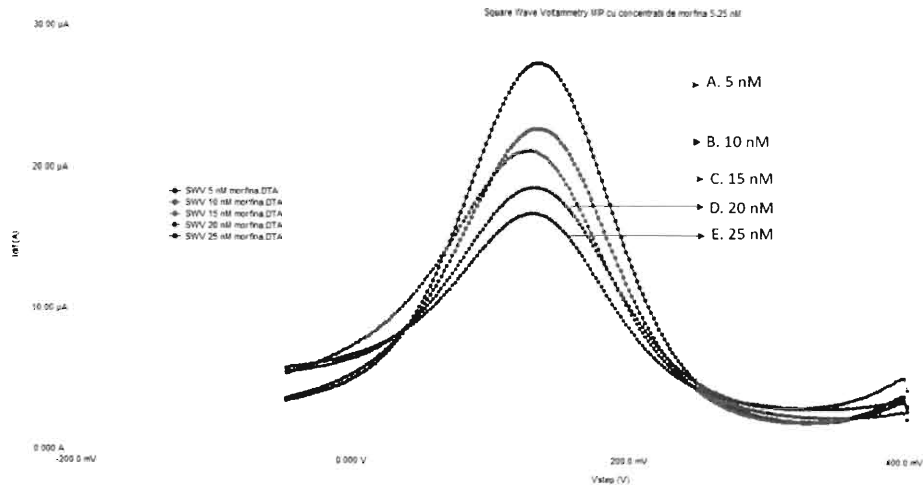


Fig. 10

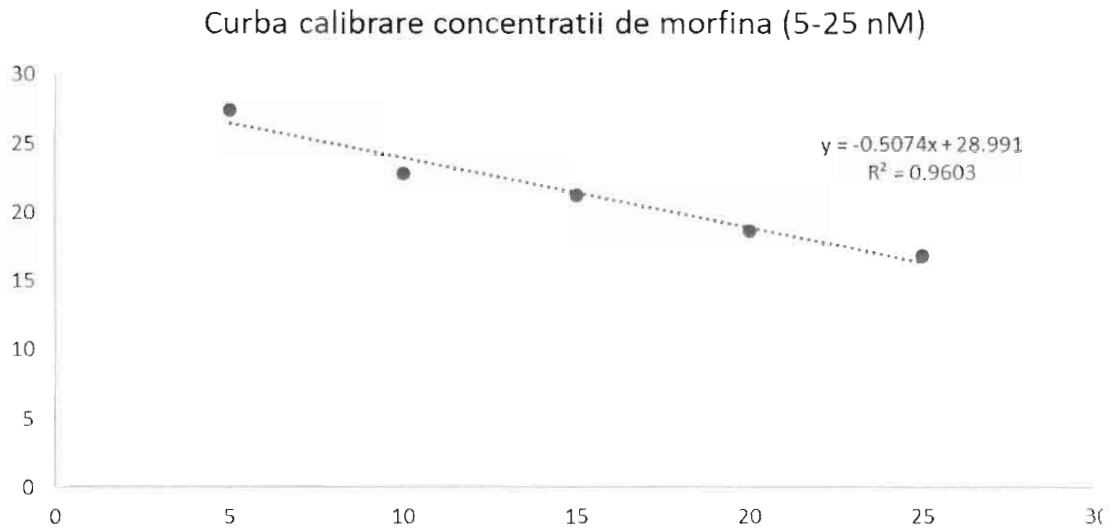


Fig. 11