



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00380

(22) Data de depozit: 30/06/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/12/2022 BOPI nr. 12/2022

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
MICROTEHNOLOGIE-IMT BUCUREȘTI,  
STR.EROU IANCU NICOLAE 126A,  
VOLUNTARI, IF, RO

(72) Inventatori:  
• MIHAILESCU CARMEN MARINELA,  
STR.ARMASUL MARCU NR.11, BL.24,  
SC.1, ET.7, AP.48, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MOLDOVAN CARMEN AURA,  
BD. ION MIHALACHE NR.166, BL.2, SC.B,  
AP.35, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• SAVIN MIHAELA, STR.EROILOR, NR.14A,  
PANTELIMON, IF, RO;  
• BRAȘOVEANU COSTIN, BD.UVERTURII  
NR.43, BL.1, SC.1, ET.1, AP.6, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DINULESCU SILVIU,  
BD.ION C.BRĂȚIANU NR.5, BL.D6, SC.C,  
ET.1, AP.2, PITEȘTI, AG, RO;  
• FÎRTAT BOGDAN IONUȚ,  
STR. DRUMUL TABEREI NR.74, BL.M37,  
AP.52, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ION MARIAN, STR.DOBRUN, NR.2,  
BL.M58, SC.1, AP.38, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO

Această publicație include și modificările descrierii,  
revendicărilor și desenelor depuse conform art. 35 alin.  
(2) din HG nr. 547/2008

(54) PROCEDU DE OBTINERE CIPURI CU FILM ȘENZITIV  
PENTRU DETECȚIE CONTINUĂ DE GLUCOZĂ DIN SALIVA  
UMANĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor cipuri utilizate pentru detecția rapidă și continuă a glucozei din salivă. Procedeu conform invenției are etapele:

a) realizarea designului cipului pe o plachetă de ceramică prin litografierea cu laser de mare rezoluție,

b) realizarea a 55 de cipuri pe suport de ceramică care conțin 3 electrozi, unul de lucru din Pt, electrozodul de referință din Ag și contraelectrodul din Pt,

c) tăierea cipurilor la dimensiuni de 20 x 4,1...5 mm,

d) sinteza a 25 mL soluție S1 care conține 140 μm anilină în acid sulfuric 0,5 M, între 0,009...0,014% SWCNT în apă deionizată și 0,1% PSS,

e) omogenizarea soluției S1 prin ultrasonare puternică,

f) introducerea a 4 cipuri într-o casetă special realizată, compatibilă cu un minipotentiostat,

g) pipetarea a 30 μL de S1 pe electrozodul de lucru al fiecărui cip și electrodepunerea a 10 cicluri prin CV a soluției S1,

h) formarea unui film compozit cu structură poroasă și nanotubulară de PANI/SWCNT pe platina cu grosimi cuprinse între 324, 2...332 nm,

i) prepararea a 6 mL de soluție S2 formată din 15 mg/mL de GO<sub>x</sub> în PBS cu Ph = 7,1,

j) adăugarea peste soluția S2 a 1 mL de 150 mM clorură de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidă și a 1 mL de 150 mM N-hidroxisuccinimidă NHS rezultând soluția S3,

k) incubarea S3 la temperatura camerei timp de 30 minute,

l) sinteza soluției S4 formată din amestec volumic egal de CS de 0, 5...1% în 50 mM acid acetic și 15 mM de 1, 2-Dimetilferocen în etanol,

m) sinteza soluției S5 formată prin amestecarea soluțiilor S3 și S4 în volume egale,

n) incubarea soluției S5 la 4°C pentru 16...18 ore,

o) pipetarea de trei ori a soluției S5 pe electrozii de lucru în volume repetate de câte 15 μL cu uscare, între pipetări la frigider la 4°C,

p) verificarea prezenței ferocenului în film,

r) adăugare a câte 10 μL din fiecare șapte concentrații standard de glucoză,

s) formarea unui gel pe electrozodul de lucru și

t) după uscare se păstrează la 4°C.

Revendicări inițiale: 1

Revendicări amendate: 1

Figuri: 12

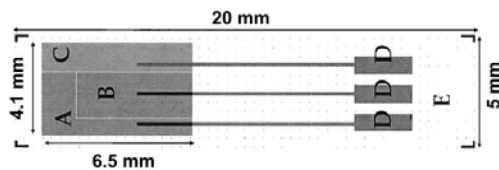


Fig. 1

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).



## PROCEDEU DE OBTINERE CIPURI CU FILM SENZITIV PENTRU DETECTIE CONTINUA DE GLUCOZA DIN SALIVA UMANA

### DESCRIEREA INVENTIEI

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI	
Cerere de brevet de inventie	
Nr.	a 20 00 380
Data depozit	30-06-2021

Inventia se refera la procedeul de obtinere a unui cip de dimensiuni mici ce contine un film senzitiv pentru detectia rapida, continua, cronoamperometrică a glucozei din saliva umană. Cipul este format dintr-un suport de ceramica pe care au fost configurati prin tehnica litografica 3 electrozi contraelectrodul din platina, electrodul de referință din argint si electrodul de lucru, din platina. Electrodul de lucru este acoperit de un film sensibil subtire pentru determinarea rapida a glucozei din probe de saliva, format din nanotuburi de carbon cu un singur perete ( SWCNT) si polianilina (PANI) depuse prin 10 cicluri de electropolimerizare vs Ag/AgCl pe care s-a imobilizat prin imersie enzima glucooxidaza (GOx) si un mediatorul chimic incorporat in chitosan.

Federația Internațională pentru Diabet estimează o creștere de 55% a numărului de persoane cu diabet până în 2035 [1].

Monitorizarea nivelului glicemiei (prin determinarea glucozei) este în prezent singura metodă recunoscută și utilizată pe scară largă pentru diagnosticul și controlul diabetului. Diagnostic rapid, tratamentul la timp și monitorizarea continuă sunt deosebit de importante pentru calitatea vieții pacienților și pentru a evita complicații care pot apărea precum probleme circulatorii, insuficiență renală, boli de inimă, accident vascular cerebral și orbire [2,3].

Exista numeroase teste pe piata, unele cu testare minim invaziva sau invazive :

- glucometrele care utilizeaza probe de sange din deget de mai multe ori pe zi pentru pacientii diabetici (Accu-Check, compania Roche );
- dispozitiv portabil care masoara glucoza extrasa electroosmotoc din piele (GlucoWatch)[4]
- detectia glucozei printr-o metoda optica numita "Spectroscopia de ocluzie"(OrSense NBM furnizat de OrSense Ltd.)[5]

Fiecare din aceste dispozitive prezinta dezavantaje prin disconfortul pe care le provoaca, mai ales in cazul senzorilor care necesita prelevare de sange prin intepare periodica. Alte dezavantaje sunt legate de partea tehnica, de exemplu cel care masoara glucoza cu ajutorul electroosmozei prezinta dificultate in utilizare datorita procesului de colectare a transpiratiei la locul senzorului ceea ce a dus la un nivel de precizie scazut. Totodata, senzorii subcutanati de glucoza trebuie indepartati dupa trei pana la sapte zile pentru a preveni inflamatiile si incapsularea ulterioara a unor impuritati pune in pericol fiabilitatea senzorului. Metodele care îmbunătățesc transportul analitului (glucoză, oxigen) către senzorii interiori ar putea permite senzorilor să măsoare în mod fiabil concentrațiile de glucoză interstițială timp de câteva săptămâni, spre deosebire de zile [6]. Astfel, senzorul de glucoză implantabil de la GlySens este un implant pe termen lung care durează 1 an sau mai mult și nu necesită calibrări continue. Implantul constă dintr-un senzor de glucoză integrat cu circuite de condiționare a semnalului, un circuit de telemetrie fără fir și o baterie cu o durată de viață de 1 an, toate adăpostite într-o carcasă de titan închisă ermetic. Legătura fără frecvență radio (RF) comunică cu un receptor extern care asigură monitorizarea continuă a glucozei [6].

Cercetarile in domeniu si studiile clinice au demonstrat ca noile Sisteme de Monitorizare Continuu a Glicemiei (Continuous Glucose Monitoring - CGM) reprezinta candidatul ideal pentru următoarea generație de dispozitive care vor înlocui clasicele *Glucometre portabile* utilizate pe scara larga în prezent [7]. Ele au revolutionat efectiv monitorizarea bolnavilor de diabet prin functiile pe care le au si usurinta utilizarii in ambulatoriu [8]. In prezent, pe piata exista urmatoarele produse reprezentative: Medtronic Minimed 530G, 640G [<https://www.medtronicdiabetes.com/home>]; Dexcom G4, G5 [<https://www.dexcom.com/g6-cgm-system>]; Freestyle Navigator II [<https://freestylediabetes.co.uk>].

Majoritatea biosenzorilor pentru glucoză comerciali sunt de tip electrochimic, cu detectie amperometrica datorită sensibilității și reproductibilității lor dovedite, întreținerii ușoare, precum și a costului redus al acestora. Gama de probe studiate pentru a efectua o măsurare neinvazivă este, de asemenea, foarte larga. Detectarea nivelului de glucoză la nivelul pielii sau al vaselor de sânge sunt cele mai cercetate. Dar recent tehnicile care permit o detectare la nivelul ochiului sau din saliva sunt, de asemenea, luate în considerare atunci cand se urmareste dezvoltarea unui senzor neinvaziv de monitorizare a glucozei. Printre firmele care detin patente amintim : Abbott, Animas Technologies, Bayer Healthcare, Cercacor, Cygnus, Futrex, Google, Hitachi, InLight Solutions, Integrity Applications, Masimo Laboratories, Olympus, Omron, OptiScan, OrSense, Panasonic, Philips, Roche Diagnostic, Samsung Electronics, Sensys Medical.

Este cunoscut primul exemplu de senzor subcutanat realizat in patentul **US005593852 (A)** in care s-a validat detectia glucozei din tesut subcutanat cu ajutorul unui senzor amperometric enzimatic care este bazat pe un fir de aur pe care se pun 3 sau 4 (optional), doua dintre stratul cu rol de eliminare a interferentelor si unul format dintr-un hidrogel in care se afla GOx. Stratul de detectare a glucozei a fost realizat prin reticulare si este format din glucoză oxidază modificată genetic (rGOX) (35% puritate, Chiron Corp., Emeryville, California) impreuna cu un polimer derivat din poli (vinilimidazol) (PVI) legat de complexul de osmiu (PVI-Os).

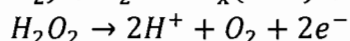
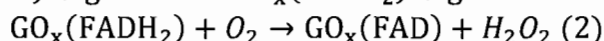
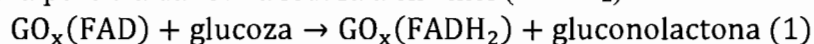
In ceea ce priveste senzorii neinvazivi, este cunoscut patentul mai recent **US 2017 / 0325724 (A1)** in care autorii au dezvoltat un senzor pentru detectia glucozei care se ataseaza pe piele. Stratul senzitiv contine GOx stabilizata in BSA si chitosan pentru protectia stratului enzimatic si este depus pe electrozi iontoforetici. Acestia provoaca transpiratia si o data cu ea analitii specifici precum, acidul lactic si glucoza. Glucoza poate fi detectata selectiv cu GOx iar acidul lactic cu o alta enzima lactaza.

Este cunoscut si patentul **US 2010/0288633 A1** care a realizat un electrod (sau optod) sensibil pentru detectia glucozei acoperit cu membrane polianionice saau policationice pentru a inlatura eventualele interferente din proba(urati, ascorbat si paracetamol) depuse prin tehnica layer-by-layer (LbL). Scopul acestor membrane este de a preveni fluxul de current interferent datorata unor conosciuti compusi care ar putea interfera cum este vitamina C sau paracetamolul. De asemenea este cunoscut si patentul chinez **CN102920465A** care utilizeaza membrane exterioare biocompatibile de incapsulare pentru senzorii enzimatici subcutanati care pot preveni formarea tesutului fibros care s-ar forma in jurul electrodului de lucru si astfel maresc durata de viata a senzorului cu monitorizare continua.

Au existat mai multe incercari de catre diverse companii de a realiza senzori cat mai putini invazivi, incercari care au dus la comercializarea unor astfel de dispozitive. Astfel, in 2019 WaveForm Technologies Inc. si A. Menarini Diagnostics au facut un parteneriat pentru a comercializa un senzor amperometric transdermic bazat pe GOx care comparat cu senzorul Dexcom G5 CGM a demonstrat o medie a deviatiei relative absolute (MARD) de 11%

[https://www.menarinidiagnostics.com/Portals/20/immagini\\_contenuti/News/WaveForm\\_Menarini\\_agreement\\_PR\\_01April2019.pdf](https://www.menarinidiagnostics.com/Portals/20/immagini_contenuti/News/WaveForm_Menarini_agreement_PR_01April2019.pdf)

Din punctul de vedere al principiului de detectie al glucozei, de la senzorul enzimatic amperometric, comercializat de Yellow Spring Instrument Inc. (YSI Inc.), au fost dezvoltate mai multe generatii de senzori in care performanta lor a fost mult îmbunătățita mai ales datorita utilizării mediatorilor si nanomaterialelor care au ajutat la transferul electronilor la substrat dupa reacția GO<sub>x</sub> cu glucoza. Utilizarea glucozei oxidazei a devenit standardul de aur pentru detectarea glucozei [9,10]. Biosenzorii de glucoză de primă generație se bazează pe utilizarea cosubstratului natural de oxigen și generarea peroxidului de hidrogen care poate fi detectat așa cum se poate vedea in ecuatia (1-3). Reacția biocatalitică implică reducerea grupului flavină (FAD) în enzimă prin reacție cu glucoză pentru a da forma redusă a enzimei (FADH<sub>2</sub>)

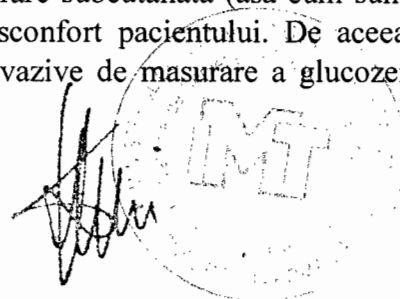


Peroxidul de hidrogen este oxidat la electrodul de platina (anod) care recunoaste numarul de electroni transferati dupa reactia cu enzima a glucozei iar fluxul de electroni transferati este proportional cu numarul de molecule de glucoza prezente in sange

In general, aceasta reactie se poate masura pe un electrod de platina la +0.6 V (vs Ag/AgCl) ceea ce poate duce la citirea interferentelor din probe precum acidul citric, uric si anumite medicamente care prezinta activitate electrochimica in aceasta regiune. Totusi marele dezavantaj a fost ca masurarea amperometrica a formarii peroxidului necesita potentiale crescute de operare pentru a obtine o selectivitate inalta.

Biosenzorii de glucoza de a doua generatie utilizeaza pentru imbunatatirea semnalului mediatori artificiali redox (nefiziologici), acceptori de electroni, capabili de a scoate electronii din centrul redox al enzimei si sa-i trimita catre suprafata electrodului. Filmul enzimatic poate impiedica acesta reactie si de aceea s-au realizat straturi conductoare electrice in care sa fie immobilizata enzima si cu ajutorul carora electronii mediatorului redox sa poata transfera electronii proveniti din reactia enzimatica catre suprafata electrodului. Dar folosirea unor mediatori precum derivatii de ferocen ar putea fi toxici atunci cand senzorii sunt utilizati pentru detectia in vivo. In acest sens, autorii studiului realizat de Eloïse Bihar si echipa sa in revista Nature au demonstrat ca incorporarea lor in chitosan scade toxicitate, acestia obtinand un senzor ink-jet printat pe hartie deosebit de ieftin, cu sensibilitate buna <sup>11</sup>. Studiile urmatoare au acordat un efort considerabil testelor de autotestare pentru glucoza, teste care pot fi utilizate usor acasa intr-un format prietenos, usor de utilizat de catre persoane nespecializate. Astfel, primii senzori amperometrici de autotestare pentru glucoza au fost de marimea unui pix si au fost comercializati de Medisense Inc (ExacTech, 1987)[12]. Acestia sunt bazati pe principiul senzorilor de generatia a doua si detecteaza glucoza cu ajutorul glucometrelor iar in compozitia stratului sensibil intra glucozooxidaza si mediatori derivati de la feroceni. Din acel an au tot fost introduse pe piata si alte teste de autotestare dar majoritatea au fost comercializate de companii mari cum ar fi Life Scan, Roche Diagnostics, Abbott și Bayer. Tot majoritatea se bazeaza pe mediatori pe baza de derivati de la feroceni cu exceptia dispozitivelor Abbot care se bazeaza pe polimer redox pe baza de Osmiu. În toate cazurile, pacientul diabetic înțeapă degetul, așează o picătură de sânge mică pe suprafata de depunere proba a senzorului și se obtine concentrația de glucoză (pe un ecran LC) în decurs de 5-30 s.

Deși auto-testarea este considerată un progres major în monitorizarea glucozei, este limitată de numărul de teste permis pe zi deoarece pacientii pentru a fi monitorizati frecvent trebuie sa fie intepati in deget de mai multe ori ceea ce poate crea evident un disconfort pacientului. De asemenea si folosirea senzorilor de glucoza invazivi cu inserare subcutanata (asa cum sunt sistemele CGM disponibile in prezent pe piata) creeaza disconfort pacientului. De aceea cercetarile recente s-au axat pe elaborarea unor tehnici neinvazive de masurare a glucozei



[13,14,15]. Exista numeroase studii clinice [16,17] care propun determinarea glucozei din saliva ca metoda neinvaziva de monitorizare a bolnavilor de diabet, unele demonstrand si existenta unei corelatii bune a nivelului de glucoza salivara cu cel al glucozei serice si capilare [18].

**Avantajele utilizarii** acestui cip pentru detectia glucozei sunt legate de faptul ca atunci cand se utilizeaza in conditii *in vitro* poate detecta in timp real si continuu mai multe probe de saliva pe acelasi cip, el putand fi spalata, uscat si refolosita. Aceasta proprietate este deosebit de importanta mai ales pentru eventualitatea aplicabilitatii lui in detectia *in vivo* a glucozei din saliva. Este de mici dimensiuni, poate fi usor de manevrat, este stabil chiar si la temperatura camerei timp de mai mult de 30 zile. Acest cip este realizat pe substrat de ceramica si acoperit cu polimeri biocompatibili, fara toxicitate, putand fi usor atasati de dantura pacientilor pentru a monitoriza in continuu glucoza din saliva. Chiar daca biocompatibilitatea unor polimeri conductivi precum PANI, polipirol, PEDOT poate fi buna totusi exista studii care pot demonstra o anumita citotoxicitate a lor. Aceasta citotoxicitate poate proveni de la sinteza acestor polimeri in prezenta agentilor oxidanti (in cazul polianilinei adaugarea de persulfati de amoniu, permanganat). Dar tehnica depunerii acestor polimeri prin electropolimerizare indeparteaza eventuala toxicitate a acestora. Avand in vedere ca senzorii dezvoltati in acest studiu vizeaza eventuala functionare *in vivo* prin atasarea lui pe un dinte, materialul suport pentru depunerea stratului senzitiv a fost ceramica, un material bine cunoscut ca fiind folosit de mult timp in retetele stomatologice pentru realizarea unor coroane dentare de exemplu Procera® AllCeram comercializat de Nobel Biocare si In-Ceram® AL (VITA Zahnfabrik) sunt doar cateva din materialele ceramice reprezentative.

Din punct de vedere medical senzorul poate monitoriza neinvaziv, deocamdata *in vitro* (dar cu potentiala aplicabilitate *in vivo*), pe parcursul unei zile, concentratia glucozei din saliva la pacientii care traiesc cu diabet zaharat si care poate varia semnificativ. Variatia zilnica in sange la astfel de pacienti este intre valori foarte mici (hipoglicemie) si valori foarte mari (hiperglicemie) care pot conduce la coma hipoglicemica, cetoacidoza sau coma hiperosmolara. De aceea se recomanda monitorizarea glicemiei pentru mentinerea glucozei in limitele admise terapeutic prin administrarea tratamentului. Monitorizarea permanenta a glicemiei consta cel putin in determinarea de doua ori pe zi a glicemiei pentru pacientii cu T2D (diabet de tip 2) si de patru ori pe zi pentru pacientii cu TD1 (diabet de tip 2)<sup>19</sup>. Totusi, majoritatea CGMS-urilor disponibile in prezent pe piata utilizeaza senzori de glucoza invazivi, cu aplicare subcutanata care pe langa faptul ca provoaca disconfort si au un timp de utilizare relativ scurt (pana la 7 zile) pot produce iritarea, inflamarea tesuturilor avand chiar riscul aparitiei infectarii la locul injectarii. In cazul bolnavilor aflati in situatii speciale, cum este sarcina la femei, aceste inconveniente pot deveni chiar periculoase. Utilizarea acestui senzor chiar si "in vitro" presupune folosirea probelor de saliva si nu de sange, probe mai usor de prelevat si care nu provoaca niciun disconfort pacientilor.

**Problema tehnica** pe care o rezolva inventia de fata este realizarea unui cip stabil, biocompatibil si un strat sensibil care sa poata fi utilizat pentru detectia *in vitro* a glucozei din saliva. Acesta poate fi utilizat si in mod continuu, pe o perioada de timp, glucoza din saliva umana. Rezultatele pe probe testate de pacienti au prezentat corelare buna, pozitiva cu metoda alternativa ELISA de detectia a glucozei din saliva umana. Avantajul tehnic al metodei amperometrice de detectie (utilizand senzorul dezvoltat) vs ELISA este rapiditatea si detectarea directa a glucozei fara utilizarea unor reactivi adiacenti de detectie (anticorpi primari, secundari marcati) si a unor timpi lungi de incubare asa cum se intampla in cazul metodei comerciale ELISA. Acest senzor ar putea avea aplicabilitate *in vivo* prin atasarea lui de dintele pacientului si cu un sistem de transmitere We-fi sa poata trimite datele direct pe telefon. Dupa folosire, se poate clati cu apa deionizata si se poate refolosi. Domeniul de concentratii pe care le determina este foarte larg putand determina concentratii in saliva mici <10 µM/L dar si concentratii mari

de pana la 10 mM. Un alt avantaj al acestui senzor este ca detecteaza glucoza din probele de saliva ale pacientilor diabetici (sau nondiabetici) si nu din probe de sange avantaj care duce la inlaturarea disconfortului pacientului cauzat de inteparea repetata in degete (si limitata la maxim 7 ori pe zi) pentru determinarea glucozei din sangele capilar. Studiile recente au demonstrat ca utilizarea senzorilor sau metodelor invazive de determinare a glucozei din sange duce si la cresterea de 2,85 ori a riscului de infectare cu COVID-19 al pacientilor diabetici [20]. Realizarea de metode non-invazive pentru detectia glucozei a persoanelor cu diabet ar putea inlatura sau minimiza acest risc.

Procedeul conform inventiei, consta in realizarea design-ului cipului pe placheta de ceramica (conform **exemplului 1, Fig.1a**) cu cei trei electrozi utilizand litografia cu laser de mare rezolutie care realizeaza masca unei plachete de ceramica cu 55 cipuri conform **exemplului 1** (Fig.1b) si apoi urmeaza procedeul tehnologic de fabricare prin litografie (conform **exemplului 2, Fig.1a**) a 55 cipuri, taierea in cipuri de dimensiuni de 20 mm × 4.1mm ... 5 mm conform **exemplului 2, Fig.2 (a b,c)** si procedeul de sinteza a filmului compozit folosit pentru detectia glucozei care consta in sinteza a 25 mL de Solutie 1 (S1) ce contine 140 µL anilina in acid sulfuric 0.5 M la care se adauga intre 0.009 %... 0.014% SWCNT in apa deionizata (Figura 3 a, solutia A) urmeaza apoi adaugarea de 0.1 % PSS si solutia se omogenizeaza (conform **exemplului 3, Fig.3 a, solutia B**), urmata de introducerea cipului in caseta special realizata a platformei formata din cipuri, caseta si minipotentiostat (**exemplul 4, Figura 3b- A, B, C**) apoi pipetarea S1 in volum de 30µL pe electrodul de lucru al cipului si electrodepunerea a 10 cicluri prin voltametrie ciclica (CV) a solutiei S1 (**exemplul 4, Figura 4-A**) urmata de formarea unui film compozit de culoare verde inchis PANI/SWCNT (**exemplul 4, Figura 4-B**) pe platina cu grosimea cuprinsa intre 324.2 nm.....332nm cu structura poroasa si nanotubulara verificata prin tehnica SEM (conform exemplului 4, Figura 5) **dupa care** prepararea a 6 mL de **solutie S1** formata din 15mg/mL de GOx in PBS cu pH=7.1 si **apoi** adaugarea a 1mL de 150 mM clorura de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) si a 1 mL de 150 mM N-hidroxisuccinimida ( NHS) **urmata de** incubarea pentru 30 de minute la temperatura camerei si **apoi** prepararea unei solutii S2 formata din amestec volumetric egal intre CS de 0.5%...1% in 50mM acid acetic si 15mM de 1,2-Dimetilferocen (Fc) in etanol **urmata de** sinteza solutiei S3 formata prin amestecarea solutiei S1 si solutiei S2 (v:v), conform exemplului 5 **apoi** incubarea solutiei S3 la 4°C pentru 16-18h **urmata de** pipetarea solutiei S3 pe electrodul de lucru a cipului in volume repetate de cate 15µL, pipetate de 3 ori, cu uscare, intre pipetari la frigider la 4°C si **mai departe**, dupa uscare (Figura 6, exemplul 5), verificarea prezentei ferocenului in film demonstrata prin procesul redox aparut in voltametria ciclica (CV) versus curbe voltametrie ciclica ale electrodului de lucru inainte de imobilizarea ferocenului inregistrata prin baleierea potentialului intre...vs Ag/AgCl in apa deionizata (**exemplul 5, Figura 7**), **apoi** verificare functionalitatii filmului pentru a detecta glucoza in concentratii cunoscute, in apa deionizata, (**conform exemplului 6, Figura 8**) demonstrata prin cresterea rapida a curentului senzorului la contactul cu concentratiile standard de glucoza in apa deionizata puse fiecare pe senzor in volum de 10µL in ordine crescatoare, crestere de curent detectata cu minipotentiostatul *MultiEmStat*<sup>3</sup>, prin inregistrarea continua a secventei "Multi Step Amperometry" timp total de 600s...800 s (exemplul 6, Figura 8a), iar dupa un numar de sapte determinari consecutive de concentratii de glucoza (exemplul 6) are loc formarea unui gel pe electrodul de lucru (**exemplul 6, Figura 8b**) care dupa uscare si pastrare la frigider la 4°C urmeaza re folosirea lui pentru detecta din nou glucoza din apa pana la concentratia de 10mM cand are loc saturarea (**exemplul 6, Figura 8c**), **urmeaza apoi** trasarea curbelor de calibrare utilizand concentratii de glucoza standard realizate in apa deionizata in domeniul 0 -1000µM si 1000µM- 10000µM (conform **exemplului 7, Figuri 9 a, b**) **urmata de** detectia glucozei utilizand 80 de probe de saliva de pacienti testate cu metoda amperometrica (**exemplul 8**) si cu metoda standard ELISA (**exemplul 8**) dupa care verificarea existentei unei corelari a rezultatelor standardelor obtinute prin cele doua metode utilizand probele de saliva recoltate de la pacienti si apoi verificarea existentei unei corelari intre valorile de glucoza obtinute pe probele de saliva/ probele de sange venos si probe de sange capilar (**exemplul 9**).





**În continuare**, se dau exemple de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1...16, care reprezintă:

- fig. 1.a, design cip format conform cu **exemplul 1** din : A. contraelectrod, B. electrodul (sau aria) de lucru din platina, C. electrod de referință din argint, D. paduri conectare aparat de masura din aur, E. substrat de ceramica, F. dimensiune cip întreg  $\approx L \times l = 5\text{mm} \times 20\text{mm}$ ;

b. placheta configurată cu 55 de cipuri;

- fig. 2.a, shema formare straturi cipuri după litografie (conform cu exemplul 2, procedeu tehnologic de fabricare cipuri) în care: 1.strat argint, 2. strat platina; 3.strat crom; 4. placheta ceramica; b. placheta cu 55 cipuri pe suport de ceramica; c.cip final tăiat din placheta

- fig. 3.a, soluția S1 după sinteza conform **exemplului 3** : a. aspect soluție cu SWCNT-COOH nedispersate în apa fără PSS (A) și cu PSS (B). aspect soluție S1 după adăugarea de PSS (B, omogena); b. platforma senzori, caseta și aparat: minipotentostat multi-Chanel „Multi EmStat<sup>3</sup>”(A); caseta adaptată senzorilor pentru a fi conectați la Minipotentostat (B); senzori cu soluția S1 pregătiți pentru electrodepunere introduși în caseta (C).

- fig. 4a. curbe de voltametrie ciclică (CV) în timpul electropolimerizării anilinei și formării materialului compozit format din polianilina și SWCNT funcționalizate cu grupe carboxil (PANI/SWCNT), număr de cicluri 10, viteza de scanare 50mV/sec, baleiere potențial între -0,2V și 0,9V vs Ag/AgCl; b. material compozit PANI/SWCNT depus pe electrodul de platina după electropolimerizare în soluția S1 (exemplul 4)

- fig. 5.a, imaginea SEM cu filmul compozit format din PANI și SWCNT funcționalizate cu grupe carboxil (SWCNT-COOH) după electropolimerizare; b imagine SEM în transversala a suprafeței cu filmul compozit cu grosimea cuprinsă între 324.2 nm.....332nm

- fig. 6. , Cip după pipetarea și uscarea a  $15 \times 3 \mu\text{L}$  din S3 depusă pe electrodul de lucru conform exemplului...

- fig. 7, curbe de voltametrie ciclică (CV) pentru verificarea prezentei Fc pe electrodul de lucru Pt/PANI/SWCNT/GOx/CS/Fc în apă (A) și Pt/PANI/SWCNT/GOx/CS în apă (B); (a) direcția procesului de oxidare la electrod vs Ag/AgCl; (b) direcția procesului de reducere la electrod vs Ag/AgCl

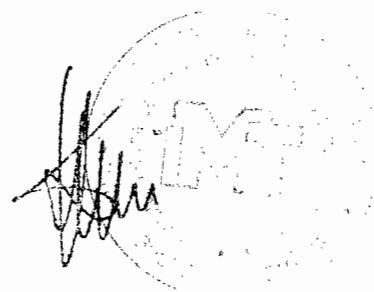
- fig. 8.a, răspunsul cronoamperometric al senzorului pentru detectia glucoza utilizând următoarele standarde de la  $0 \mu\text{M}$  la  $3000 \mu\text{M}$  realizate în apă deionizată; (b) senzorul cu gel pe electrodul de lucru după utilizare; (c) răspunsul cronoamperometric al senzorului reutilizat pentru detectia glucozei utilizând următoarele standarde de la  $0 \mu\text{M}$  la  $10000 \mu\text{M}$  realizate în apă deionizată;

- fig. 9.a, curbe semnal curent sensor amperometric în domeniul de concentrații mari  $0-10000 \mu\text{M}$  și b. curba calibrare în domeniul de concentrații mici  $0 \mu\text{M}-1000 \mu\text{M}$ ;

- fig. 10.a, curba calibrare standarde pe metoda ELISA (A) vs metoda cronoamperometrică (B) și determinarea existenței unei ecuații de corelare între cele două mărimi măsurate prin cele două metode; b. curba calibrare sensor pentru detectia glucozei din apă pentru concentrații mari  $1000 \mu\text{M}-10000 \mu\text{M}$ ; c.grafic corelare semnal optic prin ELISA versus semnal current (sensor) utilizând standard în domeniul  $0-1000 \mu\text{M}$ ;

- fig. 11, valori glucoza determinate cu metoda amperometrică (verde) versus metoda ELISA (rosu) pe 80 de probe de salivă de la pacienți

-fig.12,



**Exemplul 1**

Aceste masti au fost obtinute cu ajutorul echipamentului DWL 66fs. Acesta este un sistem de litografie cu laser de mare rezolutie, economic, ce poate realiza prin scriere directa a unui volum redus de masti si plachete.

Procesul de obtinere a mastilor de lucru are la baza procesul de realizare a layout-ului dorit a fi obtinut. Layout-ul in cazul proiectului MIMOSA s-a realizat cu ajutorul unui program de design dedicat, si anume CleWin. In cadrul programului s-a construit un fisier cu extensia “\*.cif” in care au fost definite dimensiunile si ariile senzorului nostru. Layout-ul obtinut pentru sensor si placheta cu senzori, realizat in programul CleWin, a fost prezentat in Figura 1a si b.

**Exemplul 2. Etapele tehnologice de fabricare a senzorului pe suport de ceramica sunt:**

Plachete ceramica rotunde: dimensiuni 100 mm, 4” (Figura 2a, 4)

Curatire initiala:  $H_2SO_4:H_2O_2$ , 10 minute, spalare apa DI, 10 minute, uscare 5 minute

Etalare FR: 2500 rpm HPR

Tratament plita: 90° C, 1 min

Fotolitografie M1 (Pt)

Depunere Cr/Pt : 20/200 nm (strat 2,3, Figura 2a )

Lift-off

Curatire chimica: acetona

Tratament etuva : 150° C, 30 min

Etalare FR: 2500 rpm HPR

Tratament plita: 90° C, 1 min

Fotolitografie M2 (Au)

Depunere Ti/Au : 20/200 nm

Lift-off

Curatire chimica: acetona

Tratament etuva : 150° C, 30 min

Etalare FR: 2500 rpm HPR

Tratament plita: 90° C, 1 min

Fotolitografie M3 (Ag)

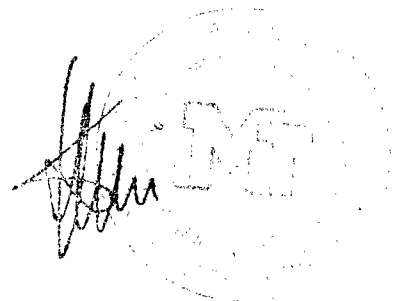
Depunere Cr/Ag : 20/200 nm (strat 1, Figura 2a)

Lift-off

Curatire chimica: acetona

Control dimensional, de aliniere si de defecte

Separare cipuri pentru taiere





Formare 55 de cipuri/placheta (Figura 2b)

Taiere in cipuri individuale (Figura 2c)

### Exemplul 3

**Sinteza solutie S1:** 140  $\mu\text{L}$  anilina in acid sulfuric 0.5 M la care se adauga intre 0.009 %... 0.014% SWCNT in 25 mL apa deionizata (Figura 3a) urmeaza apoi adaugarea de 0.1 % PSS si solutia se omogenizeaza prin ultrasonicare timp de 3-4 ore la temperatura camerei obtinandu-se solutia prezentata in Figura 3b.

### Exemplul 4

Se introduc cipurile in minipotentiostat (A) prin intermediul unei casete B adaptata pentru conectarea cu acesta. Pe suprafata cipului se adauga aproximativ 30  $\mu\text{L}$ /cip din solutia S1 si se baleiaza potentialul intre -0.2V si 0.9 V, viteza de scanare 50mV/secunda, 10 cicluri si se pornesc secventele pentru electropolimerizare iar dupa electropolimerizare se obtin voltamogramele din Figura 4 care confirma prezenta a 3 picuri de oxidare si 3 de reducere conform Figurii 4 iar in Figura 4b se observa si formarea unui strat compozit de culoare verde inchis pe electrodul de lucru al senzorului. Picurile redox au fost indicate din literatura astfel: primul pic cvasi-reversibil, la aproximativ +0,15 V, indica oxidarea a formei polianilinei de leucoemeraldina la emeraldina protonată iar ultimul pic care este reversibil situat la aproximativ+ 0,6 V rezulta din oxidarea emeraldinei si deprotonarea polimerului. Introducerea de SWCNT in strat duce la o crestere a curentului in momentul depunerii polianilinei iar prezenta acestora dupa unii autori pot fi atribuite picului mic de oxidare de la aproximativ 0.3 V situat intre cele doua picuri de oxidare ale polianilinei. Aceste pic mic poate fi datorat formarii structurii ramificate, poroase si nanotubulare PANI:PSS/SWCNT-COOH conforme si cu datele din literature, prezentata in Figura 5a. Stratul masurat de nanocompozit a fost cuprins intre 324.2 nm.....332nm (Fig.5b).

### Exemplul 5.

**Sinteza stratului senzitiv pentru detectia glucozei presupune urmatoarele etape:**

**solutie S1:** 6 mL solutie formata din 15mg/mL de GOx in PBS cu pH=7.1 peste care se adauga 1mL de 150 mM clorura de 1-Etil-3-(3- dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) si a 1 mL de 150 mM N-hidroxisuccinimida ( NHS) **urmata de** incubarea pentru 30 de minute la temperatura camerei;

**solutia S2:** amestec volumetric egal intre CS de 0.5%....1% in 50mM acid acetic si 15mM de 1,2-Dimetilferocen (Fc) in etanol;

**solutia S3:** formata prin amestecarea solutiei S1 si solutiei S2 (v:v) si incubarea la 4°C pentru 16-18h.

**Pentru aplicatie** se pipeteaza solutia S3 pe electrodul de lucru a cipului in volume repetate de cate 15 $\mu\text{L}$ , pipetate de 3 ori, cu uscare, intre pipetari la frigider la 4°C si se usuca (conform Figurii 6). Cipurile au fost introduse in potentiostatul din Figura 3 si peste cipurile cu material compozit format din Pt/PANI/SWCNT/GOx/CS/Fc si Pt/PANI/SWCNT/GOx/CS fara Fc si s-a pipetat 10  $\mu\text{L}$  de apa deionizata. S-a dat drumul la secventa de masurare prin CV formata din baleierea potentialului -0.3V-0.9V cu viteza de scanare 100mV/s , numar de cicluri 3-5. Se poate vedea din figura 7 formarea picului de oxidare reversibil datorate activitatii redox caracteristice prezentei Fc in materialul compozit in cazul materialului compozit Pt/PANI/SWCNT/GOx/CS/Fc.



**Exemplul 6.**

**Senzorii dupa uscare sunt folositi pentru constructia curbei de calibrare astfel:**

se prepara urmatoarele standarde de glucoza in apa deionizata  $0\mu\text{M}$  (I),  $10\mu\text{M}$ (II),  $90\mu\text{M}$ (III),  $300\mu\text{M}$ (IV),  $500\mu\text{M}$  (V),  $1000\mu\text{M}$  (VI) si  $3000\mu\text{M}$ ;

se pipeteaza pe sensor in mod crescator cate  $10\mu\text{L}$  din fiecare standard si se inregistreaza secventa de cronoamperometrie (Figura 8a, B) pe perioada a  $80\text{s} \dots 100\text{s}$  (Figura 8a, A);

dupa inregistrarea tuturor standardelor stratul se hidrateaza si are loc formarea unui gel pe electrodul de lucru (Figura 8b);

intre pipetari electrodul de lucru nu se spala ci doar se extrag cei  $10\mu\text{L}$  de standard anterior si se adauga urmatorul standard;

dupa prima folosire gelul se usuca si cipul se poate refolosi iar la o noua determinare de glucoza dupa adugarea a  $10000\mu\text{M}$  are loc saturarea, adica scaderea curentului (Figura 8c, senzorul dupa refolosire);

**Exemplul 7.**

Trasarea curbelor de calibrare se realizeaza cu ajutorul programului ORIGINI 9.0 in care pe axa x se trec concentratiile de standarde si pe axa y sunt trecute semnalul maxim de curent dupa fiecare adaugare de standard. Semnalul maxim este obtinut pentru fiecare standard in timpul a  $80 \dots 100\text{s}$  de la pipetarea lui pe electrodul de lucru. Realizand plotarea datelor de curent versus concentratia corespunzatoare pentru fiecare standard s-au obtinut curbe de regresie liniara cu coeficienti de liniaritate foarte buni ( $R^2=0.980$ ) intre  $0$  si  $1000\mu\text{M}$  (Fig.10a) dar si intre  $1000\mu\text{M}$  si  $10000\mu\text{M}$  (Fig.10b).

**Exemplul 8.**

Corelarea semnalului amperometric cu cel optic obtinut prin tehnica ELISA s-a realizat tot in ORIGINI 9.0 utilizand pe axa X , valorile de curent pentru standardele de glucoza cuprinse intre  $0$  si  $1000\mu\text{M}$  determinate pe senzor si valorile densitatii optice ale acelorasi standarde determinate prin ELISA. Astfel, s-a obtinut o corelatie Pearson liniara intre cele doua marimi de  $r^2 = 0.991$  demonstrand astfel acuratetea inalta a determinarii glucozei cu ajutorul senzorului (Fig. 10 c).

**Exemplul 9.**

s-au recoltat 80 de probe de saliva de la paciente insarcinate (cu consimtamant informat) carora li s-au facut testele de toleranta la glucoza, li s-a determinat glucoza din sange venos si din sange capilar

probele de saliva s-au prelevat inainte de testare cu testul de toleranta la glucoza si apoi dupa administrarea la aceeasi pacienta a  $75\text{g}$  glucoza, la o ora de la administrare si dupa doua ore de la administrare;

intervalul normal, de atentionare si patologice de glucoza din probele de saliva a fost prezentat in Figura 11(a).

Valorile obtinute pentru probele de saliva cu senzorul s-au corelat foarte bine cu cele determinate cu metoda ELISA (asa cum a fost determinat si anterior in exemplul 8 si pentru standardele de glucoza) asa cum se poate vedea in Figura 11 unde punctele cu rosu reprezinta valorile de glucoza obtinute prin ELISA iar cele cu verde valorile de glucoza obtinute pe senzor.



**Exemplul 10.**

Valorile de glucoza obtinute de la probele de pacienti din sange venos (40 de probe) s-au reprezentat in functie de valorile de glucoza obtinute cu ajutorul senzorului. S-a obtinut o corelare liniara moderata intre valorile glucoza determinate in sange venos si in saliva cu o valoare a coeficientului Pearson de 0.4 asa cum se poate vedea din Fig. 12 a. Valorile din sangele capilar prezentate in Figura 12 a (probe prelevate odata cu probele de saliva) au aratat ca aceleasi 5 probe sunt patologice (vezi punctele aflate peste linia portocalie) la fel ca si in cazul determinarii glucozei cu ajutorul senzorului asa cum se poate vedea in Fig. 12 c (vezi punctele >8.77mg/dL).

<sup>1</sup>Rowley, W. R., Bezold, C., Arikian, Y., Byrne, E., & Krohe, S. (2017). Diabetes 2030: Insights from Yesterday, Today, and Future Trends. *Population health management*, 20(1), 6–12. <https://doi.org/10.1089/pop.2015.0181>

<sup>2</sup>Pecoits-Filho, R., Abensur, H., Betônico, C. C., Machado, A. D., Parente, E. B., Queiroz, M., Salles, J. E., Titan, S., & Vencio, S. (2016). Interactions between kidney disease and diabetes: dangerous liaisons. *Diabetology & metabolic syndrome*, 8, 50. <https://doi.org/10.1186/s13098-016-0159-z>.

<sup>3</sup>American Diabetes Association. (2013). Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 20(2).

<sup>4</sup>Tierney, M. J., Tamada, J. A., Potts, R. O., Eastman, R. C., Pitzer, K., Ackerman, N. R., & Fermi, S. J. (2000). The GlucoWatch® biographer: a frequent, automatic and noninvasive glucose monitor. *Annals of Medicine*, 32(9), 632-641.

<sup>5</sup>Lin, T., Gal, A., Mayzel, Y., Horman, K., & Bahartan, K. (2017). Non-invasive glucose monitoring: a review of challenges and recent advances. *Curr. Trends Biomed. Eng. Biosci*, 6(5), 1-8.

<sup>6</sup>Gough, D. A., Kumosa, L. S., Routh, T. L., Lin, J. T., & Lucisano, J. Y. (2010). Function of an implanted tissue glucose sensor for more than 1 year in animals. *Science Translational Medicine*, 2(42), 42ra53-42ra53.

<sup>7</sup>Dovč, K., Bratina, N., & Battelino, T. (2015). A new horizon for glucose monitoring. *Hormone research in paediatrics*, 83(3), 149-156.

<sup>8</sup>Sparacino, G., Facchinetti, A., & Cobelli, C. (2010). “Smart” continuous glucose monitoring sensors: On-line signal processing issues. *Sensors*, 10(7), 6751-6772.

<sup>9</sup>Prasad, S. N., Weerathunge, P., Karim, M. N., Anderson, S., Hashmi, S., Mariathomas, P. D., ... & Ramanathan, R. (2021). Non-invasive detection of glucose in human urine using a color-generating copper NanoZyme. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(5), 1279-1291.

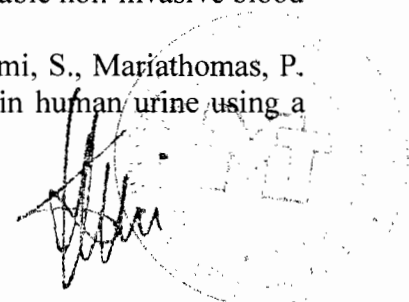
<sup>10</sup>Lee, I., Probst, D., Klonoff, D., & Sode, K. (2021). Continuous glucose monitoring systems- Current status and future perspectives of the flagship technologies in biosensor research. *Biosensors and Bioelectronics*, 181, 113054.

<sup>11</sup>Bihar, E., Wustoni, S., Pappa, A. M., Salama, K. N., Baran, D., & Inal, S. (2018). A fully inkjet-printed disposable glucose sensor on paper. *npj Flexible Electronics*, 2(1), 1-8.

<sup>12</sup>Clarke, S. F., & Foster, J. R. (2012). A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. *British journal of biomedical science*, 69(2), 83-93.

<sup>13</sup>Yao, Y., Chen, J., Guo, Y., Lv, T., Chen, Z., Li, N., ... & Chen, T. (2021). Integration of interstitial fluid extraction and glucose detection in one device for wearable non-invasive blood glucose sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 179, 113078.

<sup>14</sup>Prasad, S. N., Weerathunge, P., Karim, M. N., Anderson, S., Hashmi, S., Mariathomas, P. D., ... & Ramanathan, R. (2021). Non-invasive detection of glucose in human urine using a



color-generating copper NanoZyme. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(5), 1279-1291.

<sup>15</sup> Zidane, M. A., Rouane, A., Hamouda, C., & Amar, H. (2021). Hyper-sensitive microwave sensor based on split ring resonator (SRR) for glucose measurement in water. *Sensors and Actuators A: Physical*, 321, 112601.

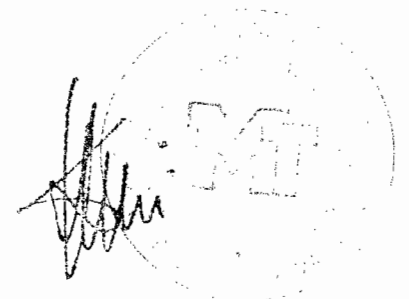
<sup>16</sup> Chen C, Zhao XL, Li ZH, Zhu ZG, Qian SH, Flewitt AJ. Current and Emerging Technology for Continuous Glucose Monitoring. *Sensors (Basel)*. 2017 Jan 19;17(1):182. doi: 10.3390/s17010182. PMID: 28106820; PMCID: PMC5298755.

<sup>17</sup> Beardsall, K., Thomson, L., Guy, C., Iglesias-Platas, I., van Weissenbruch, M. M., Bond, S., ... & de Lange, A. (2021). Real-time continuous glucose monitoring in preterm infants (REACT): an international, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet Child & Adolescent Health*, 5(4), 265-273.

<sup>18</sup> Abikshyeet, P., Ramesh, V., & Oza, N. (2012). Glucose estimation in the salivary secretion of diabetes mellitus patients. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 5, 149–154. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S32112>

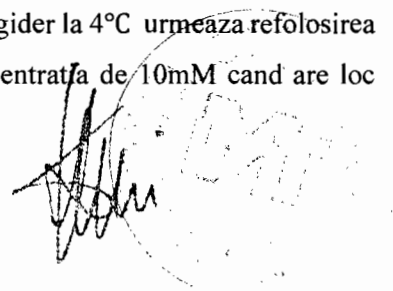
<sup>19</sup> Vigersky, R.A. The benefits, limitations, and cost-effectiveness of advanced technologies in the management of patients with diabetes mellitus. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2015, 9:320–330.

<sup>20</sup> Phan, L. M. T., Vo, T. A. T., Hoang, T. X., Selvam, S. P., Pham, H. L., Kim, J. Y., & Cho, S. (2021). Trending Technology of Glucose Monitoring during COVID-19 Pandemic: Challenges in Personalized Healthcare. *Advanced Materials Technologies*, 2100020.



## REVENDICARI

1. Revendicarea se refera procedeul de obtinere a unui senzor pentru detectia glucozei din saliva care consta in realizarea design-ului cipului pe placheta de ceramica cu cei trei electrozi utilizand litografia cu laser de mare rezolutie care realizeaza masca unei plachete de ceramica cu 55 cipuri **si apoi** urmeaza procedeul tehnologic de fabricare prin litografie a 55 cipuri, taierea in cipuri de dimensiuni de 20 mm × 4.1mm ... 5 mm si procedeul de sinteza a filmului compozit folosit pentru detectia glucozei care consta in sinteza a 25 mL de Solutie 1 (S1) ce contine 140 μL anilina in acid sulfuric 0.5 M la care se adauga intre 0.009 %... 0.014% SWCNT in apa deionizata urmeaza apoi adaugarea de 0.1 % PSS si solutia se omogenizeaza urmata de introducerea cipului in caseta special realizata a platformei formata din cipuri, caseta si minipotentiostat apoi pipetarea S1 in volum de 30μL pe electrodul de lucru al cipului si electrodepunerea a 10 cicluri prin voltametrie ciclica (CV) a solutiei S1 **urmata de** formarea unui film compozit de culoare verde inchis PANI/SWCNT pe platina cu grosimea cuprinsa intre 324.2 nm.....332nm cu structura poroasa si nanotubulara verificata prin tehnica SEM (conform exemplului 4, Figura 5) **dupa care** prepararea a 6 mL de **solutie S1** formata din 15mg/mL de GOx in PBS cu pH=7.1 **si apoi** adaugarea a 1mL de 150 mM clorura de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) si a 1 mL de 150 mM N-hidroxisuccinimida (NHS) **urmata de** incubarea pentru 30 de minute la temperatura camerei si **apoi** prepararea unei solutii S2 formata din amestec volumetric egal intre CS de 0.5%....1% in 50mM acid acetic si 15mM de 1,2-Dimetilferocen (Fc) in etanol **urmata de** sinteza solutiei S3 formata prin amestecarea solutiei S1 si solutiei S2 (v:v), conform exemplului 5 **apoi** incubarea solutiei S3 la 4°C pentru 16-18h **urmata de** pipetarea solutiei S3 pe electrodul de lucru a cipului in volume repetate de cate 15μL, pipetate de 3 ori, cu uscare, intre pipetari la frigider la 4°C **si mai departe**, dupa uscare, verificarea prezentei ferocenului in film demonstrata prin procesul redox aparut in voltametrie ciclica (CV) versus curbe voltametrie ciclica ale electrodului de lucru inainte de imobilizarea ferocenului inregistrata prin baleierea potentialului intre....vs Ag/AgCl in apa deionizata, **apoi** verificare functionalitatii filmului pentru a detecta glucoza in concentratii cunoscute, in apa deionizata, demonstrata prin cresterea rapida a curentului senzorului la contactul cu concentratiile standard de glucoza in apa deionizata puse fiecare pe senzor in volum de 10μL in ordine crescatoare, crestere de curent detectata cu minipotentiostatul *MultiEmStat*<sup>3</sup>, prin inregistrarea continua a secventei "Multi Step Amperometry" timp total de 600s...800 s, **iar dupa** un numar de sapte determinari consecutive de concentratii de glucoza (exemplul 6) are loc formarea unui gel pe electrodul de lucru care dupa uscare si pastrare la frigider la 4°C urmeaza refolosirea lui pentru detecta din nou glucoza din apa pana la concentratia de 10mM cand are loc



saturarea **urmeaza apoi** trasarea curbelor de calibrare utilizand concentratii de glucoza standard realizate in apa deionizata in domeniul 0 -1000 $\mu$ M si 1000 $\mu$ M- 10000 $\mu$ M **urmata de** detectia glucozei utilizand 80 de probe de saliva de pacienti testate cu metoda amperometrica si cu metoda standard ELISA **dupa care** verificarea existentei unei corelari a rezultatelor standardelor obtinute prin cele doua metode utilizand probele de saliva recoltate de la pacienti **si apoi** verificarea existentei unei corelari intre valorile de glucoza obtinute pe probele de saliva/ probele de sange venos si probe de sange capilar.

### **Figuri**

**Fig.1 (a, b)**

**Fig.2 (a,b,c)**

**Fig.3 (a,b)**

**Fig.4**

**Fig.5**

**Fig.6**

**Fig.7**

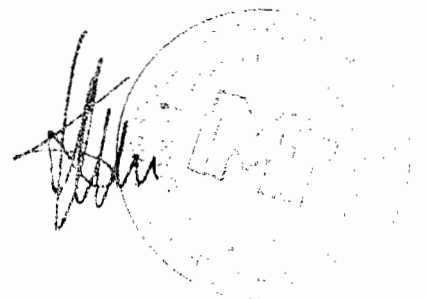
**Fig.8 (a, b, c)**

**Fig.9 (a, b)**

**Fig.10 (a,b,c)**

**Fig.11**

**Fig.12 (a,b,c)**





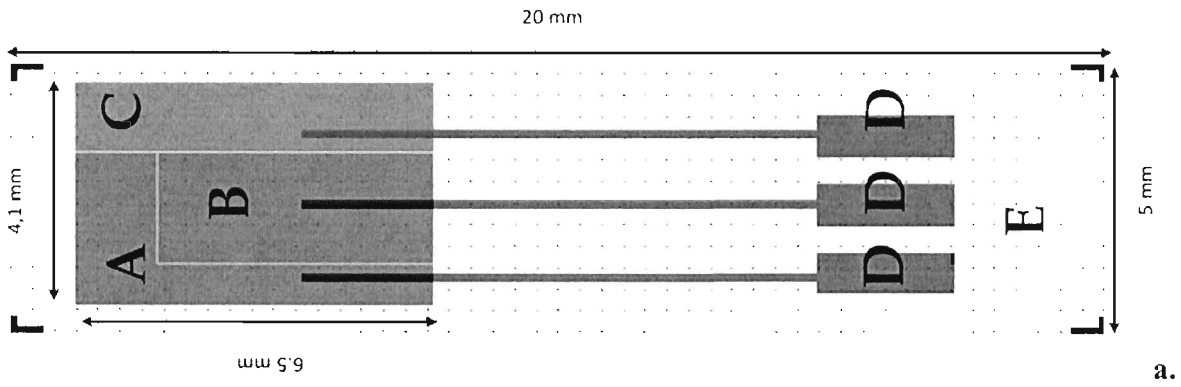
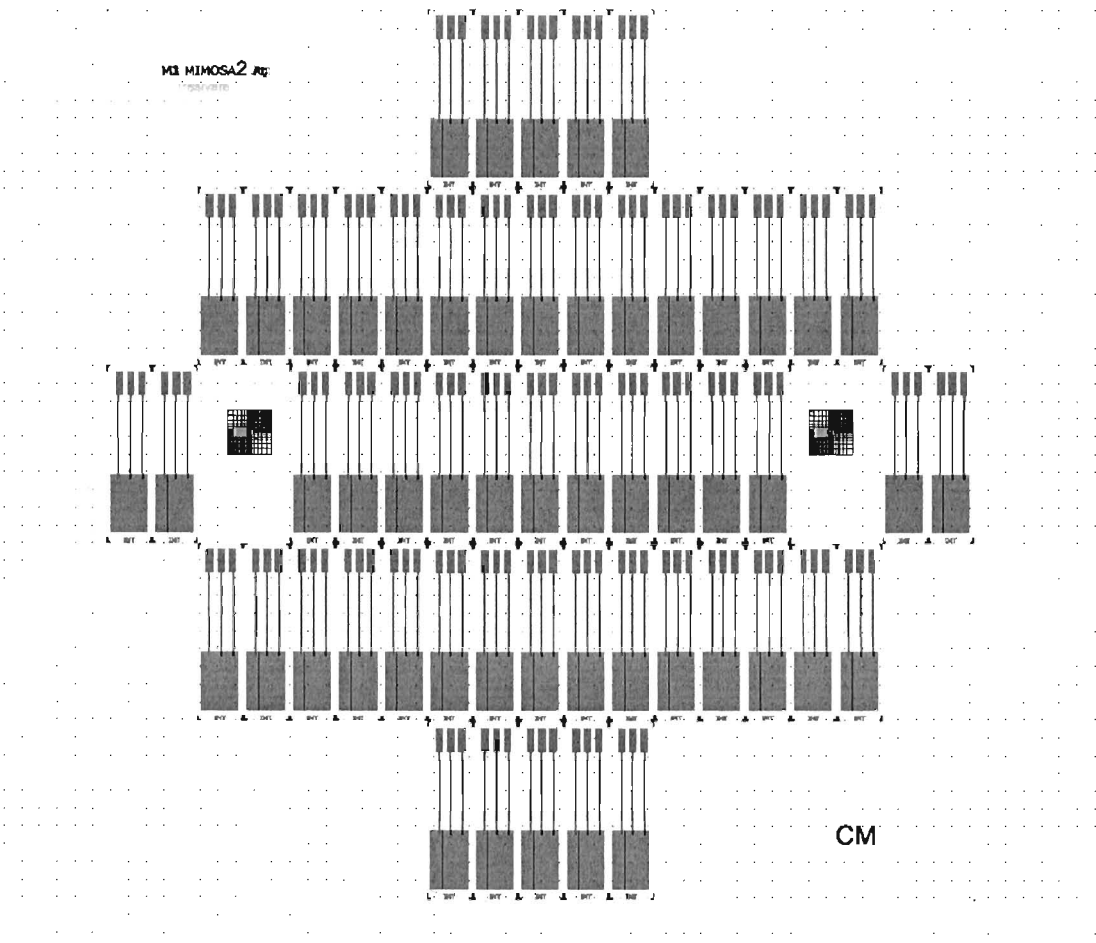


Fig.1a





b.

Fig.1b

Fig.1 (a,b)



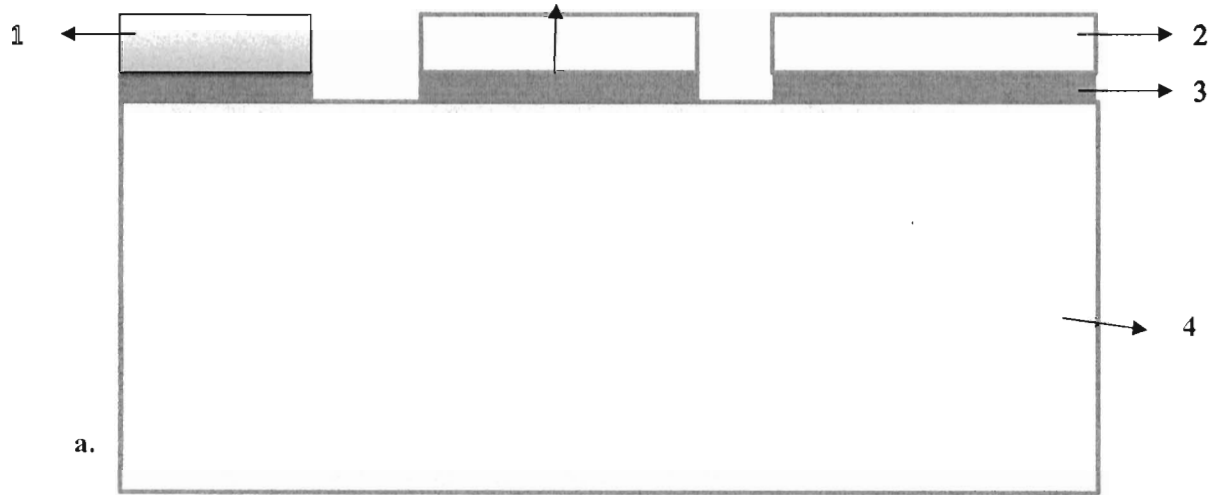
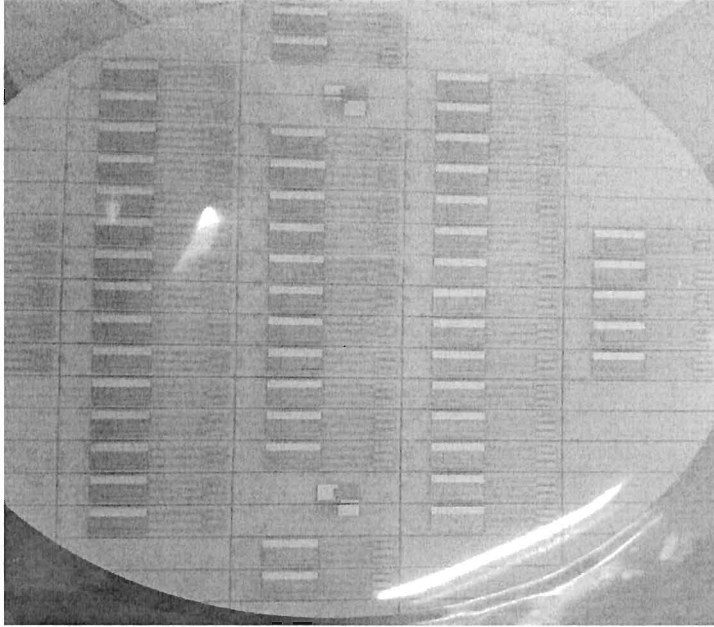


Fig.2 a



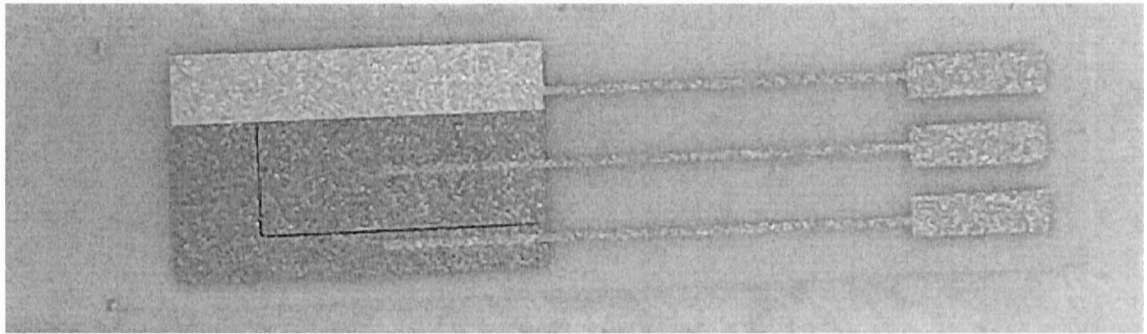
22



b.

Fig.2 b



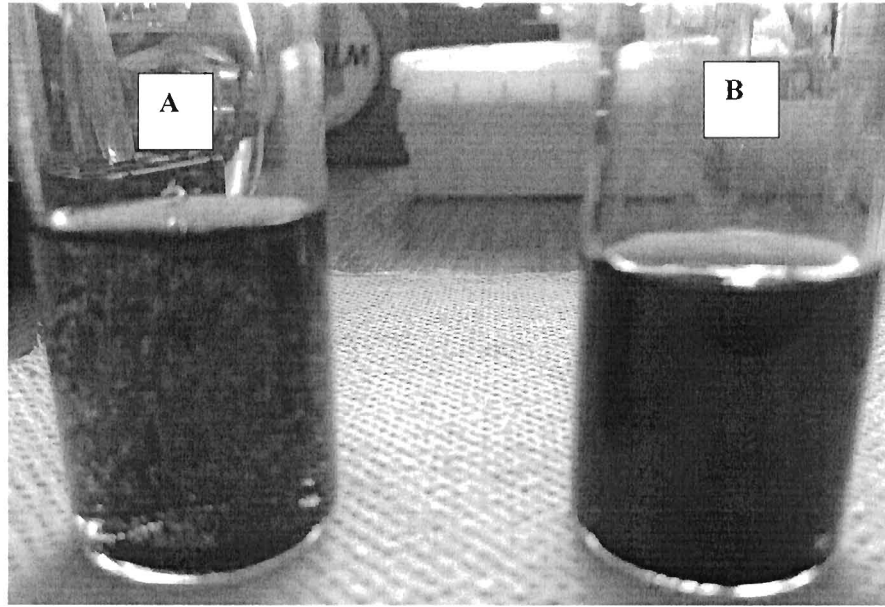


c.

Fig.2 c

Fig. 2 (a, b, c)



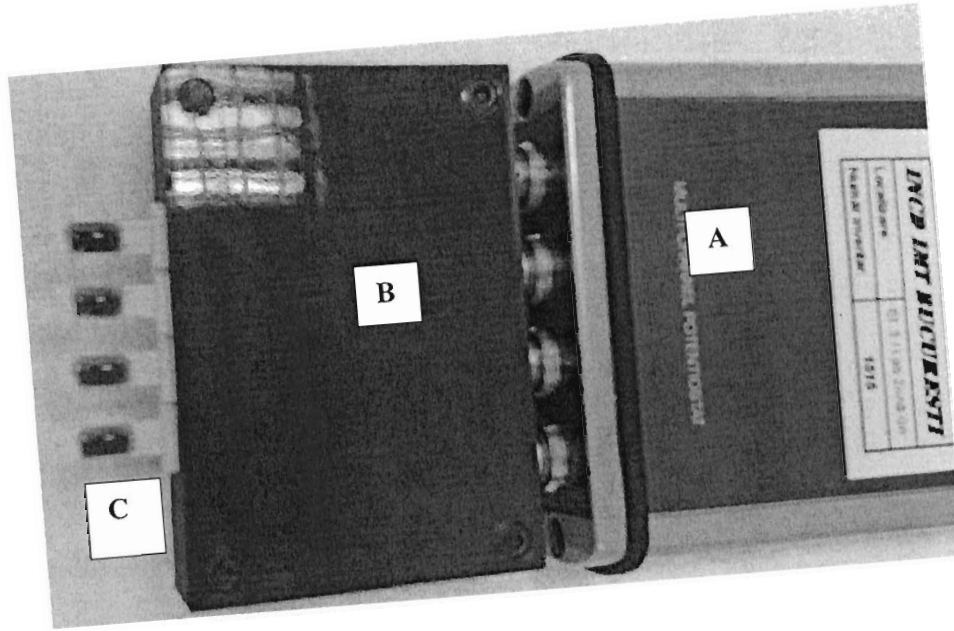


a.

Fig.3a







b.

Fig.3b

Fig.3 (a,b)



18

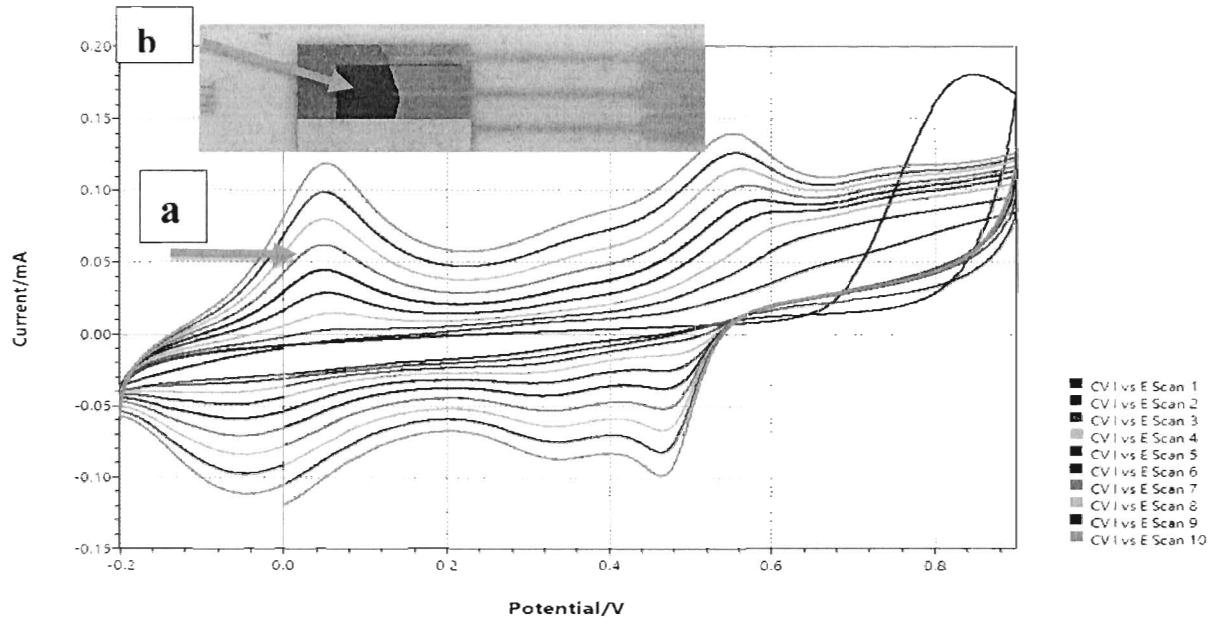


Fig. 4.

*[Handwritten signature]*  
CENTRE FOR NANOTECHNOLOGY RESEARCH AND INNOVATION  
NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE

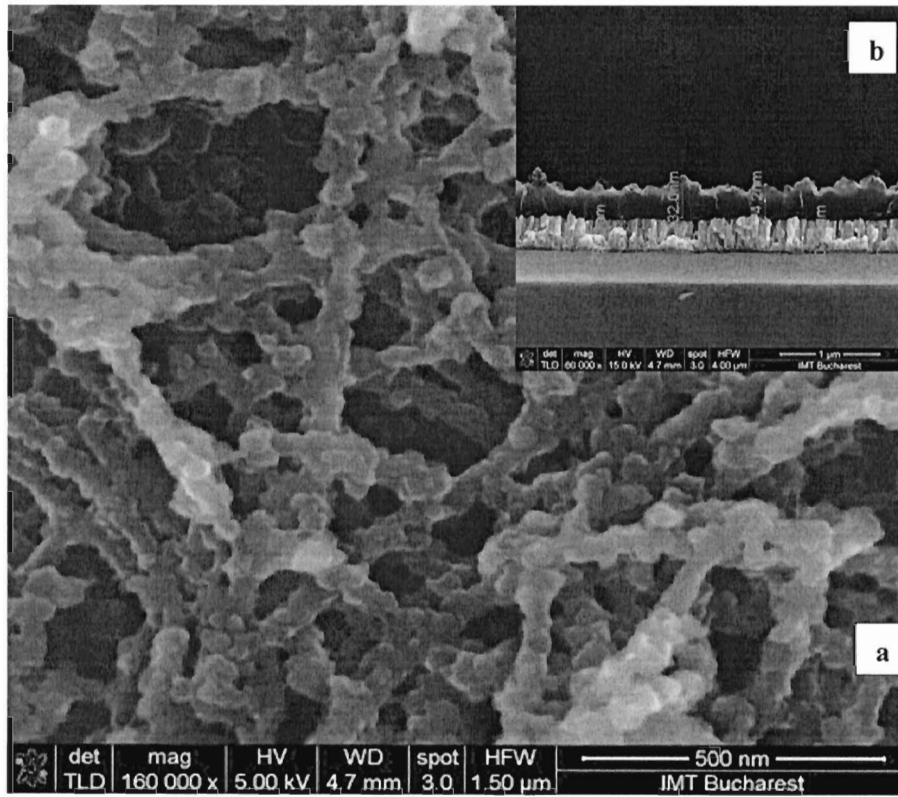


Fig. 5

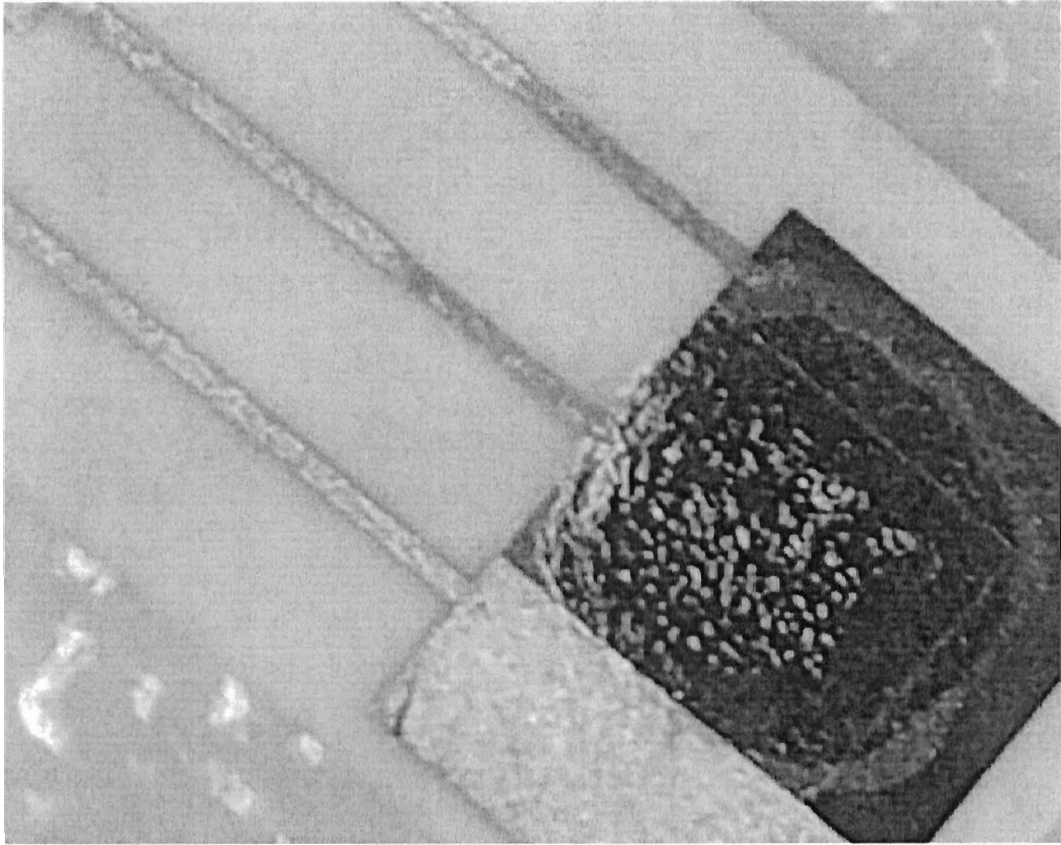


Fig. 6



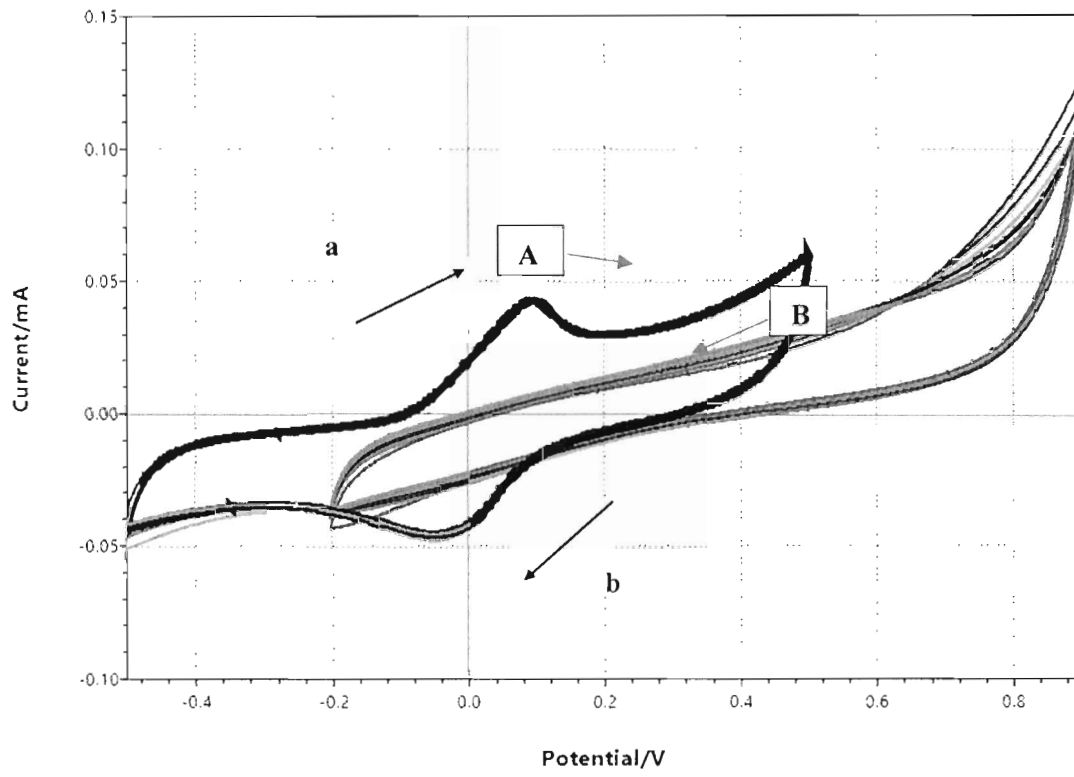
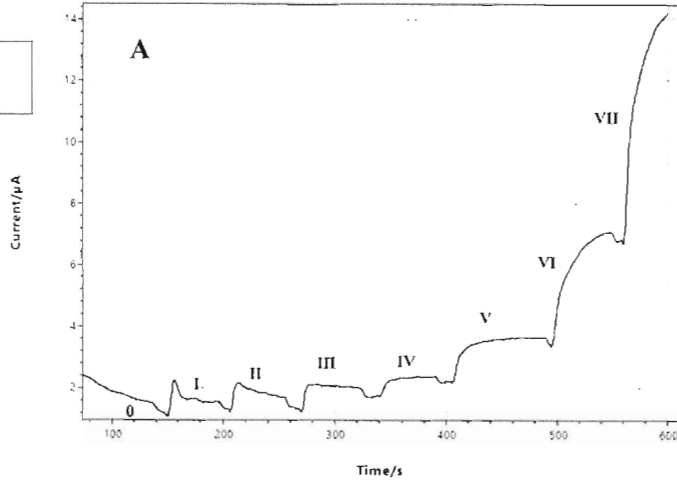


Fig. 7



a.



Method Data Script B

Clipboard Expression

Technique: MultiStep Amperometry

Measurement Levels BPot

Notes:  
[Click here to add notes...](#)

Select current range(s):

100 pA 1 nA 10 nA 100 nA 1 µA 10 µA 100 µA 1 mA 10 mA 100 mA

▸ Pretreatment Settings

▾ MultiStep Amperometry Settings

t equilibration: 0 s

t interval: 0.5 s

Cycles: 1

Levels: 1

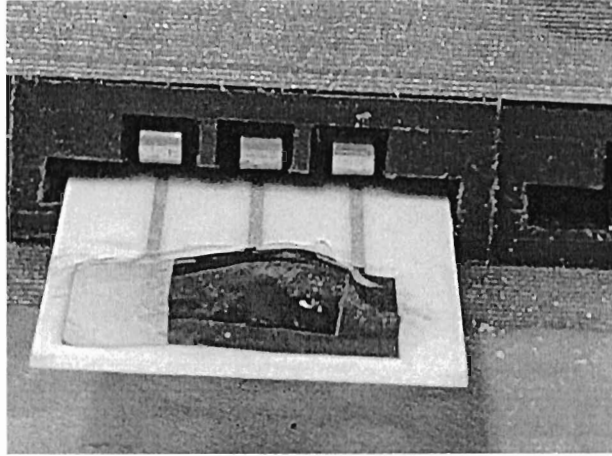
E level 1: 0.6 V

t 1: 600.0 s

Figura 8a







b.

Figura 8 b



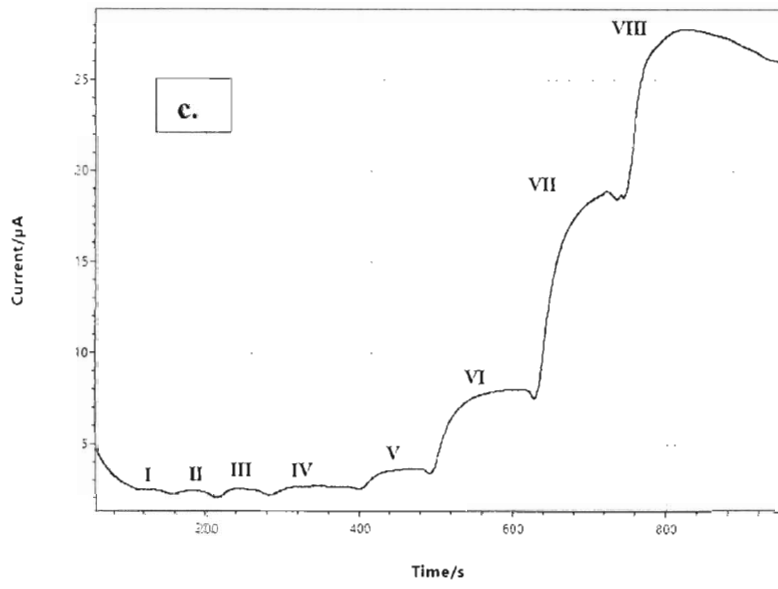


Figura 8 a, b,c

Figura 8c



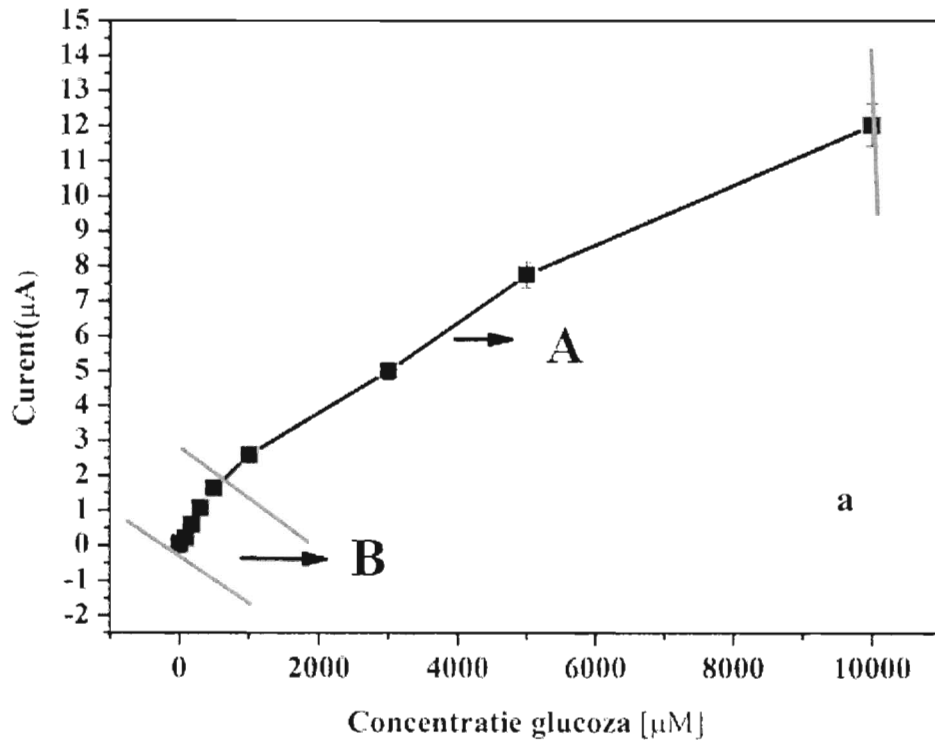


Figura 9a

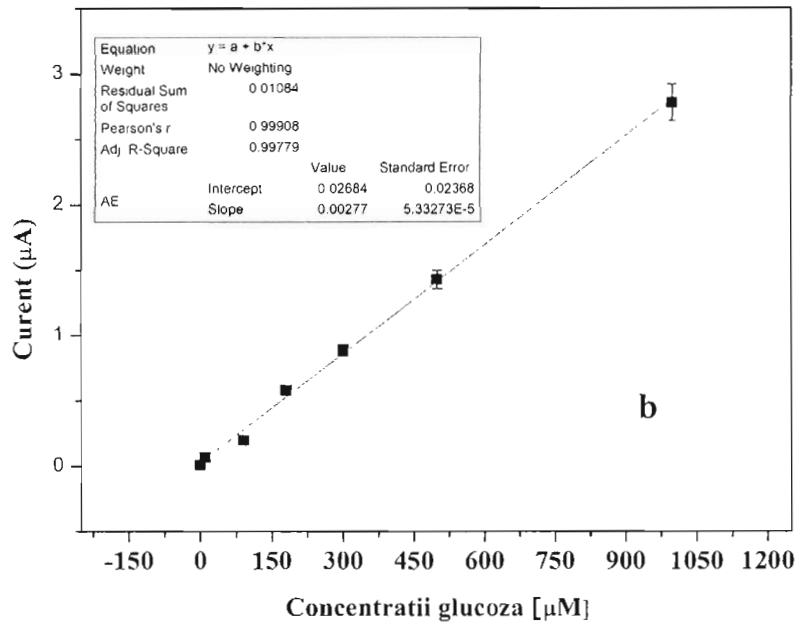


Figura 9 a,b



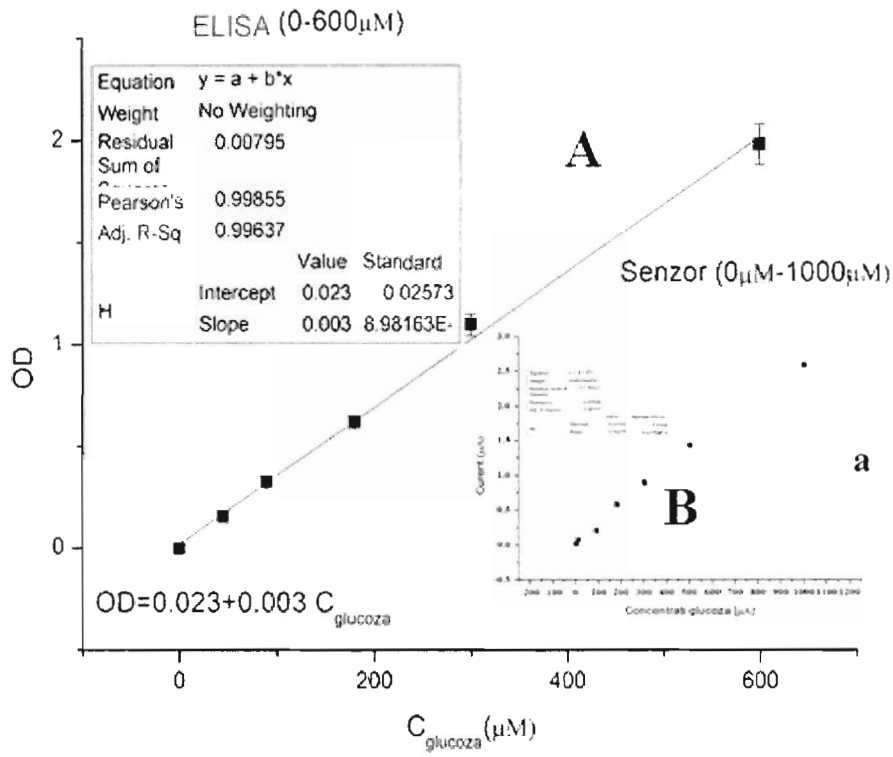


Figura 10a



8

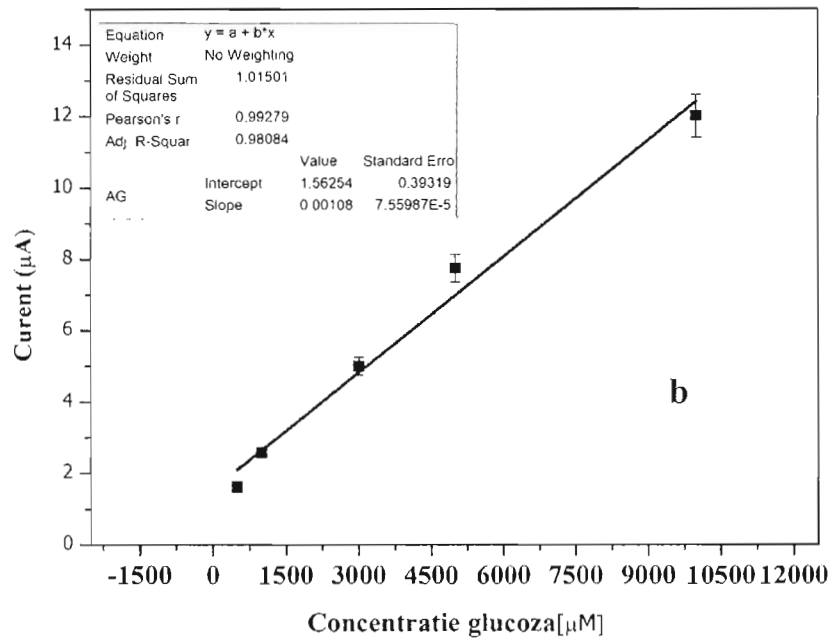


Figura 10b





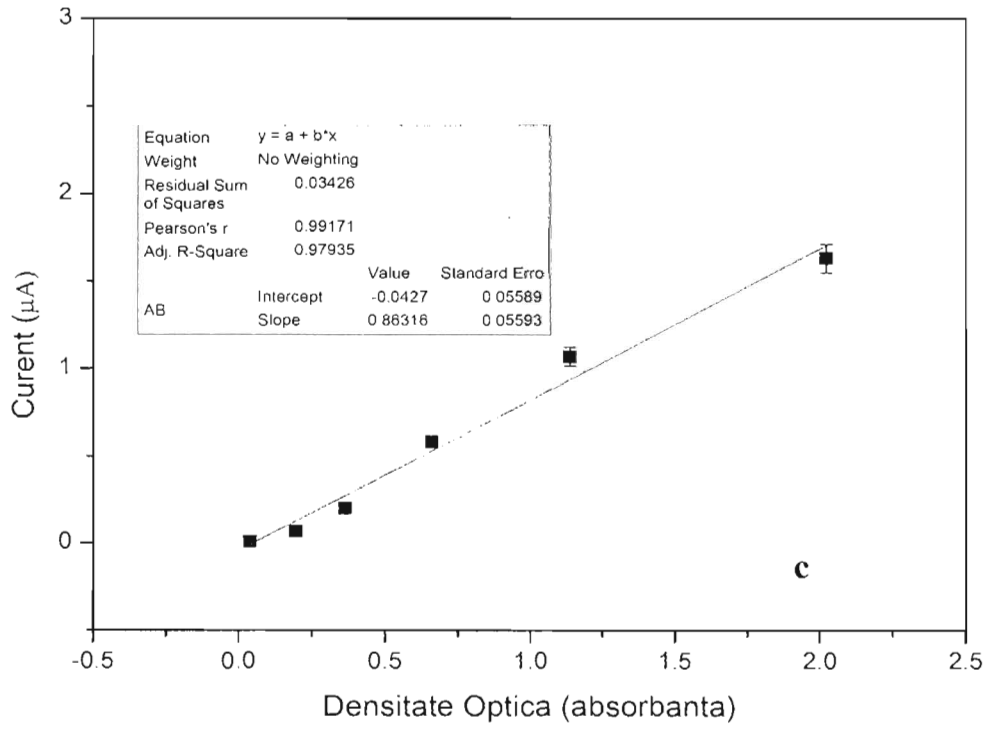


Figura 10 c

Figura 10 (a,b,c)

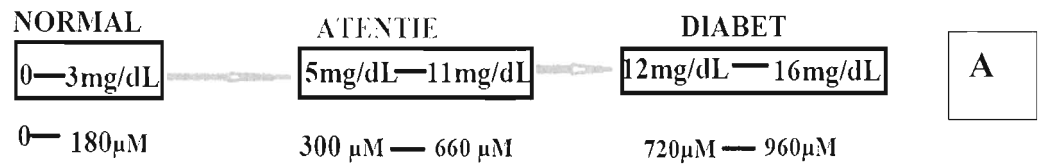
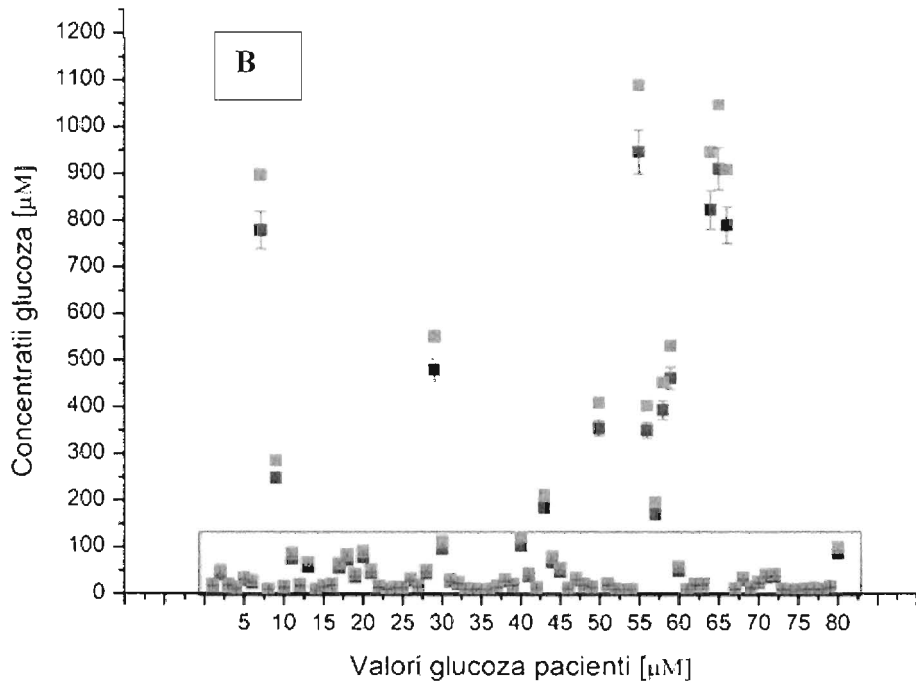


Figura 11



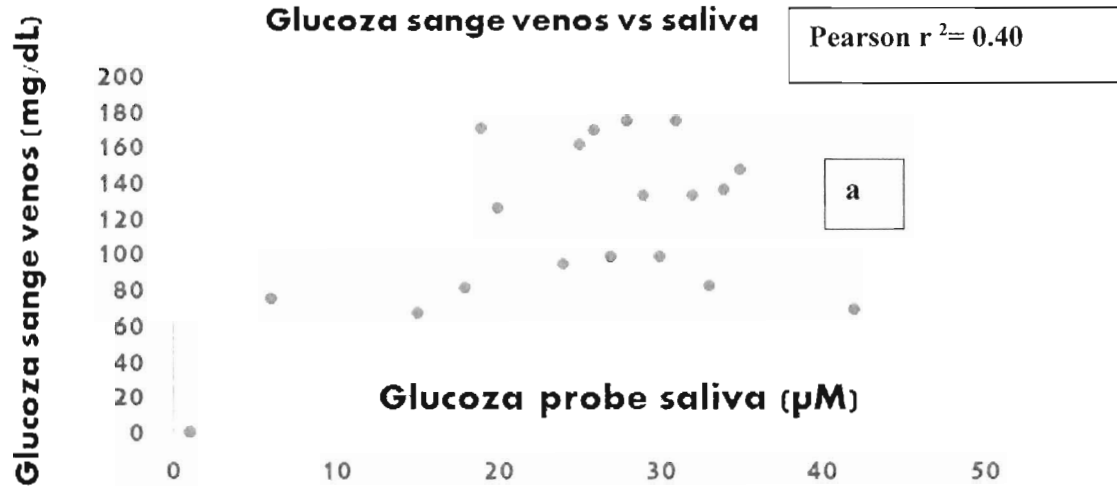


Fig.12a



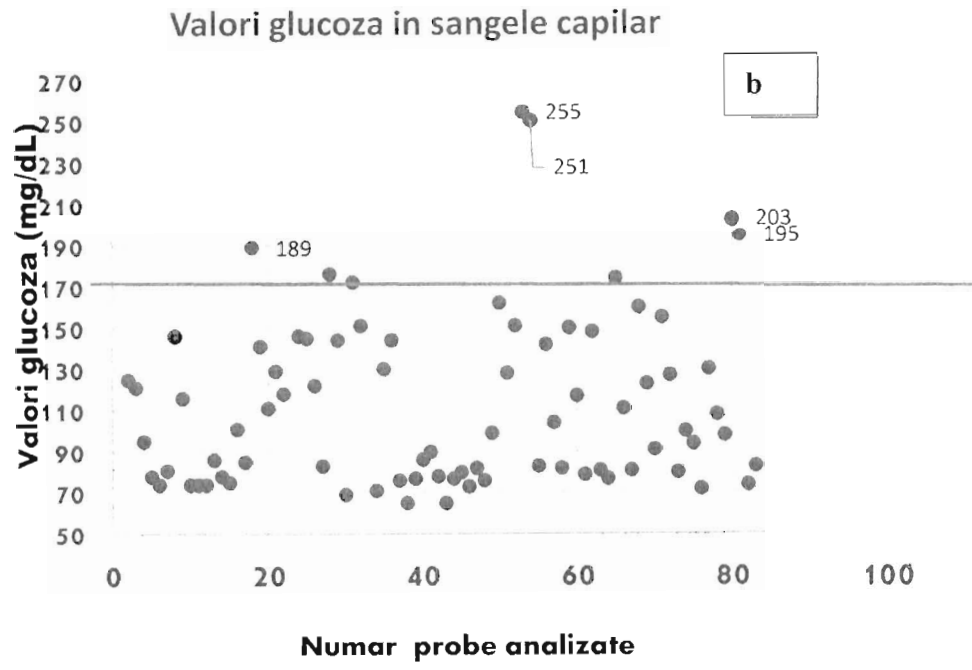


Fig.12b



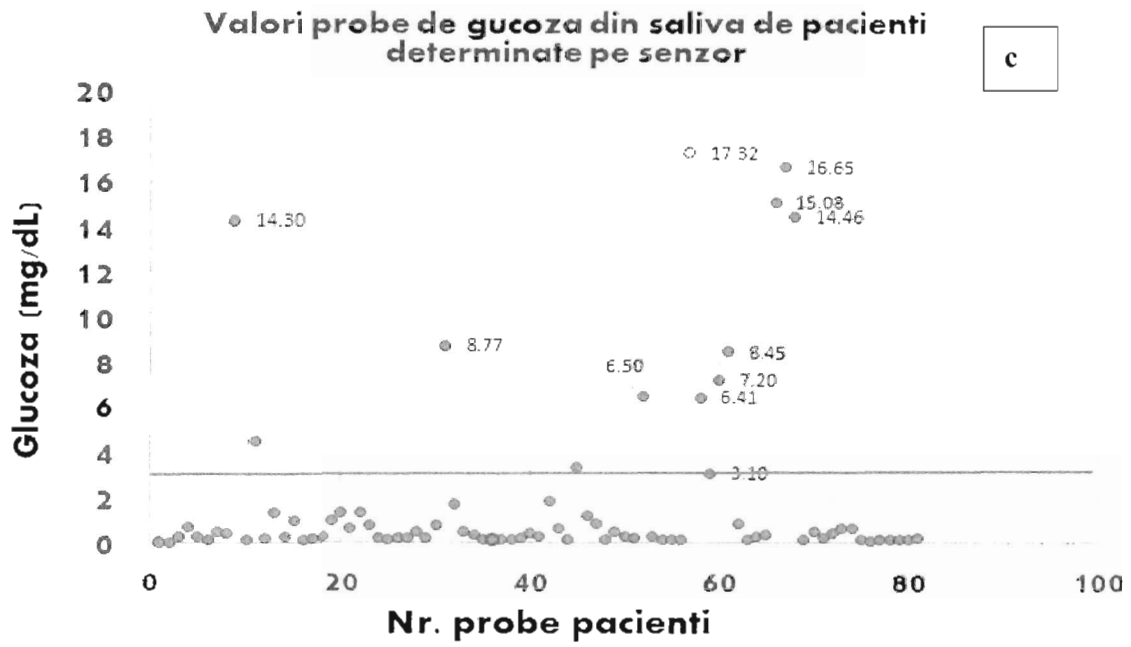


Figura 12(a,b, c)



**REVENDICARE**

1. Procedeu de obtinere a unor cipuri pentru detectia glucozei din saliva, **caracterizat prin aceea ca** are urmatoarele etape:

**1/a)** realizarea design-ului cipului pe placheta de ceramica cu cei trei electrozi utilizand litografia cu laser de mare rezolutie rezultand masca unei plachete de ceramica cu 55 cipuri;**1/b)** fabricarea prin litografie a 55 de cipuri pe suport de ceramica ce contin 3 electrozi, electrodul de lucru, din platina, electrodul de referinta din argint si contraelectrodul din platina; **1/c)** taierea cipurilor de pe suport in dimensiuni de 20 mm × 4.1mm ... 5 mm; **1/d)** sinteza a 25 mL Solutie S1 ce contine : 140 μL anilina in acid sulfuric 0.5 M la care se adauga intre 0.009 %... 0.014% SWCNT in apa deionizata si 0.1 % PSS ; **1/e)** ultrasonicare puternica a solutiei S1 pana la formarea unei solutii omogene **1/f)** introducerea a 4 cipuri in caseta special realizata pentru a fi compatibila cu un minipotentiostat (Multicanal) MultiEmStat<sup>3</sup>; **1/g)** pipetarea S1 in volum de 30μL pe electrodul de lucru al fiecarui cip si electrodepunerea a 10 cicluri prin voltametrie ciclica (CV) a solutiei S1 cu un potential baleiat intre -0.2V si 0.9 V, viteza de scanare 50mV/secunda; **1/h)** formarea unui film compozit de culoare verde inchis cu structura poroasa si nanotubulara de PANI/SWCNT pe platina cu grosimi cuprinse intre 324.2 nm.....332nm verificata prin SEM **1/g)** prepararea a 6 mL de solutie S2 formata din 15mg/mL de GOx in PBS cu pH=7.1;**1/i)** peste solutia S2 se adauga 1mL de 150 mM clorura de 1-Etil-3-(3- dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) si a 1 mL de 150 mM N-hidroxisuccinimida ( NHS) rezultand solutia S3 **1/j)** incubarea S3 pentru 30 de minute la temperatura camerei;**1/k)** sinteza solutiei S4 formata din amestec volumetric egal intre CS de 0.5%...1% in 50mM acid acetic si 15mM de 1,2-Dimetilferocen (Fc) in etanol;**1/l)** sinteza solutiei S5 formata din amestecarea solutiilor S3 si S4 in volume egale;**1/m)** incubarea solutiei S5 la 4°C pentru 16-18h;**1/n)** pipetarea solutiei S5 pe electrozii de lucru a cipurilor in volume repetate de cate 15μL, pipetate de 3 ori, cu uscare, intre pipetari la frigider la 4°C;**1/o)** dupa uscare, verificarea prezentei ferocenuului in film demonstrata prin procesul redox aparut in voltametria ciclica (CV) versus curbe voltametrie ciclica ale electrodului de lucru inainte de imobilizarea ferocenuului inregistrata prin baleierea potentialului intre -0.3V si 0.5 V, viteza de scanare 50mV/secunda Ag/AgCl in apa deionizata **1/p)** adaugare in ordine crescatoare a cate 10μL din fiecare sapte concentratii standard de glucoza realizate in apa deionizata: I. 0 μM; II.90 μM; III.180 μM;IV. 300 μM;V. 500 μM; VI. 1000 μM; VII. 3000 μM; **1/r)** crestere de curent detectata (dupa fiecare concentratie adaugata) cu minipotentiostatul MultiEmStat<sup>3</sup>, prin inregistrarea continua a secventei "Multi Step Amperometry" timp total de 600s...800 s;**1/s)** formarea unui gel pe electrodul de lucru dupa terminarea secventei **1/t)** dupa uscare si pastrare la frigider la 4°C

1/u) re folosirea lui pentru a detecta din nou glucoza din apa pana la concentratia de 1000  $\mu\text{M}$  (VIII concentratii) pana cand are loc saturarea, adica scaderea curentului; 1/v) trasarea curbelor de calibrare in programul Origin 8.0, utilizand concentratii de glucoza standard realizate in apa deionizata in domeniul 0 -1000 $\mu\text{M}$  si 1000 $\mu\text{M}$ - 10000 $\mu\text{M}$  pe axa X si Intensitatea curentului dupa fiecare concentratie, pe axa Y; 1/w) verificarea matematica (regresie liniara) a existentei unei corelari a rezultatelor standardelor obtinute prin cele doua metode, ELISA (metoda optica) si Cronoamperometrica (curent); 1/x) verificare corelare Pearson intre valorile de glucoza determinate prin ELISA si prin metoda cronoamperometrica cu o valoare obtinuta de 0,991; 1/y) determinarea valorilor de glucoza din sange capilar/venos si verificarea corelarii lor cu glucoza salivara

**Figuri**

**Fig.1 (a, b)**

**Fig.2 (a,b,c)**

**Fig.3 (a,b)**

**Fig.4**

**Fig.5**

**Fig.6**

**Fig.7**

**Fig.8 (a, b, c)**

**Fig.9 (a, b)**

**Fig.10 (a,b,c)**

**Fig.11**

**Fig.12 (a,b,c)**