



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00717

(22) Data de depozit: 26/11/2021

(41) Data publicării cererii:
30/05/2023 BOPI nr. 5/2023

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICA LASERILOR, PLASMEI ȘI
RADIĂȚIEI-INFLPR, STR.ATOMIȘTILOR
NR.409, MĂGURELE, IF, RO;
• CENTRUL INTERNAȚIONAL DE
BIODINAMICĂ,
INTRAREA PORTOCALOR NR.1,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• DINCĂ VALENTINA, STR. MĂRĂȘEȘTI,
NR. 12, BL.B4, SC.2, AP.22, MĂGURELE, IF,
RO;
• BONCIU ANCA, STR. TINERETULUI,
BL. D3, SC.A, AP.10, ET.2, DRĂGĂȘANI, VL,
RO;
• FILIPESCU MIHAELA,
STR.ION NEDELEANU NR.12, BL.P76, SC.4,
AP.97, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• VASILESCU ALINA,
STR.PETRE ISPIRESCU, NR.9, OTOPENI,
IF, RO

(54) SENZORI ELECTROCHIMICI BAZAȚI PE STRATURI MICRO-
ȘI NANOSTRUCTURATE DE CERIA OBTINUTE
PRIN METODE LASER PENTRU DETECȚIA DE NADH
ȘI BIOSENZORI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la senzori electrochimici bazați pe straturi micro- și nanostructurate de ceria obținute prin metode cu laser pentru detecția de NADH și biosenzori. Un senzor, conform invenției, este obținut prin depunerea unor structuri piramidale de oxid de ceriu cu latura bazei de circa 150-350 nm și înălțimea de peste 150 nm, obținute la o temperatură $T_s=500^\circ\text{C}$ pe electrozi de carbon, prin metoda depunerii cu laser pulsată, utilizând un laser cu excimer, filmele obținute pe

electrozii de carbon fiind activate ca atare sau după modificarea cu un mediator electrochimic, siringaldazina, pentru determinarea electrochimică a NADH și a diverșilor compuși care reprezintă substraturi pentru enzime din clasa dehidrogenazelor NAD^+ -dependente.

Revendicări: 6
Figuri: 7



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI Cerere de brevet de invenție Nr. <i>a 2021 00717</i> Data depozit <i>26-11-2021</i>
--

69.

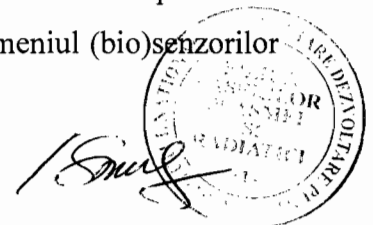
Descrierea invenției: Senzori electrochimici bazati pe straturi micro si nano-structurate de ceria obtinute prin metode laser pentru detectia de NADH si biosenzori , inventatori: Valentina Dinca, Mihaela Filipescu, Anca Bonciu, Alina Vasilescu

Prezenta inventie se refera la o metoda de obținere unor noi senzori electrochimici pentru detectia cofactorului enzimatic NADH bazati pe depunerea de straturi active micro si nanostructurate de oxid de Ceriu (CeO₂) pe electrozi de carbon, cu sau fara modificarea cu un mediator electrochimic. Senzorii au aplicatii directe in teste electrochimice si biosenzori bazati pe dehidrogenaze NAD⁺-dependente. Straturile active sunt constituite din *structuri piramidale de oxid de CeO₂* cu latura bazei de cca 150-350 nm si inaltimea de peste 150 nm, obtinute la o temperatura T_s=500°C pe electrozi de carbon, prin metoda depunerii laser pulsata utilizand un laser cu excimer (λ=193 nm, numar pulsuri laser =108.000). Pentru o sensibilitate si selectivitate marite, filmele obtinute pe electrozi de carbon sunt modificate mai departe cu mediatori electrochimici, de exemplu siringaldazina prin metode cunoscute in literatura, de exemplu, prin adsorbție dintr-o solutie. Demonstrarea utilitatii senzorilor s-a facut prin teste pentru detectia electrochimica a NADH si in plus prin detectia acetaldehidei folosind enzime NAD⁺-dependente.

Este cunoscut ca monitorizarea nivelului de compusi chimici (de ex. aldehide, acizi, alcooli, antioxidanti etc.) reprezintă un proces important în diverse domenii de precum: industria vinului (de exemplu, monitorizarea proceselor de fermentare), industria alimentară, industria chimică in domeniul medical etc [1- 5].

Alături de **metode de detecție** precum cromatografia, spectroscopia FTIR, biosenzorii reprezintă una dintre opțiunile tehnice cele mai utilizate pentru detecția și monitorizarea acestor compusi [1-7].

In acest context, **folosirea de materiale** precum oxizii de metale semiconductoare CuO, ZnO sau amestecurile, ZnO cu Pd, Au sau Mo₂O sau combinații ale acestora in componenta stratului activ în detecția și monitorizarea concentratiei compusilor de interes poate reprezenta o varianta fiabila pentru obtinerea de senzori cu stabilitate si sensibilitate adecvate diverselor aplicatii practice. Dezavantajele majore sunt constituite de clasa relativ restransa de aplicatii la care pot fi folositi [5-8] precum si de selectivitatea nesatisfacatoare. In domeniul (bio)senzorilor



electrochimici, combinarea straturilor active cu mediatori electrochimici și elemente de biorecunoaștere specifice precum enzimele sunt metode binecunoscute în literatura pentru mărirea selectivității determinărilor.

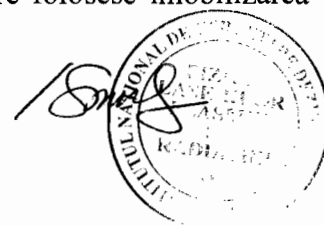
În ultimii ani, **dintre materialele folosite, oxidul de ceriu** a capatat un interes deosebit datorită multitudinii de posibile aplicații, de exemplu în celule de combustie, ca strat rezistent la coroziune, în straturi electrochromice, în microelectronica, în optoelectronica, în acoperiri antireflex dar și în biomedicina, bioanalize, pentru diagnostic clinic, dispozitive implantabile, ori industria alimentară [9-21].

Spre exemplu, brevetul de invenție US8691520B2 -cu titlul Reagentless CeO₂-based colorimetric sensor se referă la folosirea de nanoparticule de CeO₂ în soluție sau imobilizate pe un suport cu sau fără enzime pentru a obține un senzor colorimetric, a cărui intensitate de culoare se schimbă în funcție de cantitatea de analit.

CeO₂ este și un material interesant în aplicații catalitice, datorită capacității sale de absorbție și eliberare a oxigenului, prin transformarea cu ușurință de la starea redusă la cea oxidată a Ceriului (Ce³⁺ ↔ Ce⁴⁺). Proprietățile catalitice ale oxidului de CeO₂ depind de formă și mărimea nanomaterialului și de starea de oxidare prevalentă. **Nanoparticule de oxid de ceriu** cu diverse forme (nanopoliedre, cuburi nano/submicroni, nanotije) au fost utilizate cu succes în aplicații catalitice în domeniul senzorilor [8-10].

Brevetul de invenție cu titlul *Cerium oxide nanoparticle regenerative free radical sensor* (US 8172997 B2) prezintă un sistem de detecție a radicalilor liberi sau a materialelor care generează radicali liberi în soluție. Acest sistem include un electrod de lucru acoperit cu nanoparticule de oxid de ceriu și un contra-electrod. Nanoparticulele de CeO₂ cu dimensiunea medie < 20 nm, generează un procent relativ mare de stări de valență Ce³⁺ care s-a dovedit că îmbunătățește semnificativ performanța senzorilor. Stratul de CeO₂ are o grosime de între 100 și 300 nm și este poros. Sistemul de detecție bazat pe CeO₂ poate fi folosit pentru detecția apei oxigenate.

În ultimele decenii, nanoparticule de CeO₂ (nanoCeO₂) au fost dezvoltate ca potențiali înlocuitori pentru enzimele naturale, stările de valență mixte ale ceriului și modelele de vacanțe de oxigen având ca rezultat diferite activități mimetice enzimatică [8,10-12]. **Utilizarea de CeO₂ ca material biomimetic în domeniul biosenzorilor prezintă un factor cheie în diminuarea dezavantajelor acestor dispozitive analitice care folosesc imobilizarea**



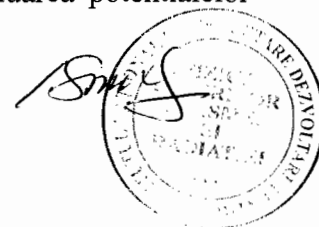
directa de compusi biologici, oferind posibilitatea unui cost mai mic, activitate catalitica « reglabila », reciclabilitate și stabilitate îmbunătățită în condiții stringente de lucru [13-16]

Sunt cunoscute diverse metode de obtinere de nanostructuri CeO_2 precum: pulverizarea, depunerea chimica din faza de vapori, depunerea sol-gel, piroliza pulverizata si ablatia cu laser [18-21]. Unele dintre ele prezinta o serie de dezavantaje precum temperaturi ridicate sau precursori costisitori si nu permit un control exact al grosimii sau implica o cantitate mare de material utilizat in timpul procesului.

Depunerea laser pulsata sau ablatie laser (PLD) este o **solutie interesanta** pentru depunerea filmelor subtiri si a nanostructurilor. Radiatia laser interactioneaza cu un material tinta (fie solid, fie lichid), producand o plasma care transporta particulele catre un substrat pe care se formeaza filmul subtire. Depunerea de piramide de CeO_2 a fost realizata cu succes pe substrat de sticla prin ablatie laser, straturile active obtinute fiind studiate in ce priveste proprietatile mecanice si efectul asupra proliferarii celulare cu celule etc. [22]. Proprietatile electrochimice ale acestor straturi si depunerea pe suport de carbon nu au fost inasa investigate pana in prezent. Pe de alta parte, este cunoscut faptul că sensibilitate marita a detectiei poate fi atinsa prin marirea suprafetei electrochimic activa/conductivitatii iar acest deziderat este atins de regula in (bio)senzori prin modificarea suprafetei electrodului cu nanomateriale. Proprietatile materialelor astfel obtinute sunt dependente de forma, marimea nanomaterialelor etc. Modificarea electrozilor de C prin drop-casting (« in picatura ») cu nanoparticule comerciale de CeO_2 duce la o scadere a suprafetei active.

Scopul inventiei este de a obtine, prin depunerea pe electrozii de carbon de straturi subtiri oxidice de CeO_2 prin ablatie laser pulsata, si de mediatori electrochimici senzori care prezinta o stabilitate adecvata in mediu lichid (acid si bazic), capabile sa genereze un raspuns imbunatatit pentru obtinerea de detectia de NADH si de biosenzori bazati pe dehidrogenaze NAD^+ -dependente.

Metoda, conform inventiei inlatura dezavantajele mentionate mai sus (selectivitate, stabilitate si sensibilitate inadecvate) prin folosirea ablatiei laser pulsata ca metoda de depunere a straturilor de CeO_2 ce duce la obtinerea straturi cu suprafete compacte si nanostructurate, grosimi controlabile pe intreaga suprafata a substratului depus, si stabilitatea ridicata in medii lichide. In acelasi timp, modificarea « in picatura » cu un mediator adecvat adsorbit puternic pe stratul de ceria, permite obtinerea unui senzor stabil, cresterea selectivitatii si diminuarea potentialelor



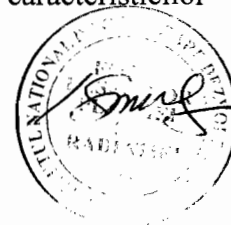
interferenti in probe reale prin diminuarea valorii potentialului necesar oxidarii compusilor de interes. Siringaldazina este aleasa ca mediator adecvat pentru adsorbția de stratul de ceria și detectia NADH.

Problema vizata de catre inventia de fata, este realizarea unui procedeu de obtinere a unor senzori cu caracteristici imbunatatite pentru detectia NADH și substraturilor dehidrogenazelor NAD^+ -dependente, cu multiple aplicatii bioanalitice, prin modificarea electrozilor de carbon cu straturi subtiri oxidice structurate nano și micropiramidal de CeO_2 prin PLD. Grupul enzimelor NAD^+ -dependente include mai mult de 300 de biocatalizatori printre care alcool dehidrogenaza, lactat dehidrogenaza, glucoz dehidrogenaza, glicerol dehidrogenaza, aldehyd dehidrogenaza etc cu aplicatii în controlul calitatii produselor alimentare și în bioanaliza.

Metoda, conform inventiei, prezinta urmatoarele avantaje:

- permite obtinerea de straturi subtiri de CeO_2 cristaline uniforme, omogene, și micro și nanostructurate piramidal, straturile de CeO_2 avand astfel un raport mare suprafata specifică /volum, și o dimensiune a piramidelor controlată prin procesul depunerii;
- îmbunătățirea proprietăților mecanice și procesabilitatea stratului senzitiv;
- prezinta caracteristici electrochimice active/ conductivitate imbunatatite comparativ cu electrozii nemodificati și cu electrozi modificati cu particule sferice de ceria ; într-un exemplu tipic intensitatea curentului anodic/catodic al ferocianurii de K masurata în voltametrie ciclica se mareste cu 35% iar distanta dintre potentialele de pic se micșoreaza cu 233 mV fata de electrozii nemodificati
- permite obtinerea straturilor active de CeO_2 și CeO_2 /mediator stabile în mediu lichid prin adsorbția puternica a mediatorului pe ceria
- efect electrocatalitic manifestat prin reducerea potentialului la oxidarea directa a NADH
- permite generarea unei intensitati mai mare a curentului la oxidarea NADH mediata de siringaldazina comparativ cu electrozii nemodificati de carbon.
- Senzorii pot fi combinati cu diverse dehidrogenaze NAD^+ dependente pentru detectia a diversi compusi în mediu lichid

Problema pe care o rezolva prezenta invenția consta în obținerea de noi straturi oxidice, cu suprafata activa marita eficiente electrochimic, care sa permita determinarea NADH la valori scazute de potential. Straturile subtiri de piramide de ceria permit imbunatirea caracteristicilor



electrochimice in paralel cu ancorarea stabila a mediatorului si confera stabilitate mecanica senzorului avand un efect sinergic cu cel al mediatorului la detectia NADH. Acestea reprezinta elementele definitorii din designul dispozitivului descris, capabil sa genereze o **intensitate mai mare a curentului la oxidarea NADH mediata de siringaldazina comparativ cu electrozii de carbon. Senzorul este compatibil cu utilizarea impreuna cu enzime in mediu de pH 6.5-10.**

Conform metodei de obtinere a dispozitivelor cu activitate si stabilitate electrochimica ridicata, bazate pe straturi oxidice de CeO_2 , acestea au fost realizate prin depunerea straturilor active electrochimic pe suporturi de tip electrozi de Carbon (Dropsens) folosind tehnica depunerii laser pulsate (PLD). Pentru aceasta, in procesul de ablatie a fost folosita o tinta ceramica comerciala de CeO_2 . Lungimea de unda folosita a fost de 193 nm (laser cu ArF), fluenta laser a fost de 3 J/cm^2 . Substratul a fost montat pe un sistem de incalzire electric, setat la temperatura de $500^\circ \text{ Celsius}$, si mentinut la distanta de 4 cm de tinta. Numarul de pulsuri a fost de 108.000. In timpul depunerilor, tinta au fost rotita si translata evitandu-se astfel ablarea consecutiva a unei singure zone si deteriorarea acesteia. Incalzirea substraturilor a fost facuta cu o viteza de 20°C/min iar racirea cu 10°C/min .

In continuare, **senzorii au fost modificati cu siringaldazina** prin depunere « in picatura » si au fost caracterizati prin cateva teste de voltametrie ciclica pentru a evidientia caracteristici generale (raspunsul fata de o proba redox tipica, ferocianura de potasiu), precum si raspunsul in prezenta NADH si la aplicarea in combinatie cu doua enzime NAD^+ -dependente, la 2 valori de pH. Pentru testele enzimaticе s-a ales ca substrat acetaldehida, folosind doua sisteme de detectie: reactia catalizata de alcool dehidrogenaza la pH 6.5 si reactia directa catalizata de aldehyd dehidrogenaza la pH 10.

In urma testelor putem concludiona:

- suprafata electrochimic activa si viteza transferului de electroni pentru un cuplu redox tipic, ferocianura de K, sunt imbunatatite semnificativ fata de electrozii de C si fata de senzori similari raportati in literatura, modificati cu particule sferice de ceria depuse « in picatura »
- stratul activ de piramide de ceria confera un efect electrocatalitic la oxidarea NADH, manifestat prin reducerea potentialului picului anodic al NADH de la 0.54 V la 0.4 V. Senzorii permit determinarea cu o mai mare selectivitate a NADH fata de electrozii nemodificati de C
- modificarea suprafetei de C cu piramide de ceria si siringaldazina are un efect sinergic in ce priveste valoarea potentialului la care are loc oxidarea NADH.



-senzorii sunt adecvati pentru utilizarea in combinatie cu dehidrogenaze NAD^+ -dependente la pH la pH slab acid si alcalin.

Se da in continuare, un exemplu de realizare a dispozitivelor cu activitate si stabilitate electrochimica ridicata, bazate pe straturi oxidice de CeO_2 , modificate sau nu cu un mediator electrochimic, cu sensibilitate si stabilitate adecvate pentru detectia NADH si a substraturilor enzimelor NAD^+ -dependente.

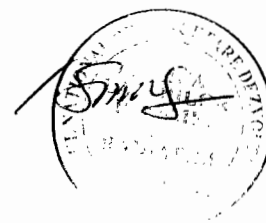
Referitor la metoda de obtinere a senzorilor cu activitate si stabilitate electrochimica ridicata pe baza de CeO_2 , utilizand sistemul de ablatie laser pulsata, descrisa in Desenul

1 (Desenul 1: Schema sistemului de obtinere de straturi subtiri CeO_2 , 1-Laser, 2-Sistem optic, 3-Substrat, 4-Țintă, 5-Camera de depunere, 6-Sistem rotație țintă), presupune urmatoarele etape:

- Substratul se monteaza in camera de ablatie, paralel cu tinta ceramica de CeO_2 ;
- se porneste sistemul de pompe de vid (presiunea finala inainte de inceperea procesului de ablatie fiind de 5×10^{-5} bar);
- se incalzeste substratul cu o viteza de 20° Celsius/minut;
- se directioneaza fasciculul laser, cu lungimea de unda de 193 nm, catre tinta ceramica de CeO_2 care se roteste si translateaza; cu o rata de repetitie de 10 Hz si un numar de 108000 de pulsuri;
- la finalul procesului de ablatie, proba se raceste cu o viteza de 10° Celsius/min;
- evaluarea calitatii suprafetei straturilor subtiri obtinute prin tehnica PLD se face prin analize de microscopie electronica de baleiaj (SEM) (Desenul 2) ;

In Desenul 3, determinarea structurii cristaline a tintelor si filmelor subtiri oxidice s-a inregistrat folosind un sistem PANalytical X'Pert MRD in geometrie Bragg-Brentano ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$), reflexiile corespunzand structurii cubice CeO_2 (JCPDS No.34-0394, group space $Fm3m$). Se observa ca picul dominant este (111), indicand o crestere preferential piramidala. Imaginile din Desenul 2 (Imagine optica a senzorului cu electrozi acoperiti cu CeO_2 si imagine SEM a depunerilor de CeO_2 pe electrozi) confirma particularitatea structurilor obtinute prin PLD, si anume nano-micro piramide.

Dupa extragerea probei din camera de ablatie si evaluarea preliminara a proprietatilor straturilor depuse, electrodul modificat obtinut a fost folosit ca atare in testele electrochimice pentru detectia NADH sau a fost modificat cu siringaldazina ca exemplu de mediator electrochimic,



Modificarea cu siringaldazina s-a realizat prin depunerea a 2 μL dintr-o solutie de siringaldazina de concentratie 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in etanol pe suprafata electrozilor, urmata de uscare la temperatura camerei. Procesul a fost repetat de 1-2 ori pentru a depune o cantitate adecvata de mediator pe electrod. Senzorul astfel obtinut a fost utilizat direct in testele electrochimice in prezenta NADH sau diverselor sisteme enzimatice.

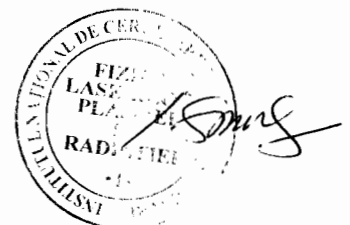
Exemplu de teste electrochimice efectuate pentru caracterizarea senzorilor si demonstrarea aplicatiei la detectia NADH si in combinatie cu enzime NAD^+ -dependente.

1. Raspunsul caracteristic al senzorului la testarea prin voltametrie ciclica cu ferocianura de potasiu.

Pentru a evalua modificarea conductivitatii si suprafetei electrochimic active in urma depunerii straturilor de nanopiramide de CeO_2 , au fost testati electrozi serigrafati de carbon inainte si dupa modificarea cu CeO_2 , prin voltametrie ciclica, folosind ca specie redox ferocianura de potasiu, de concentratie 5 mM, preparata in 0.1 M KCl. Testele au fost realizate prin baleierea potentialului aplicat intre -0.3 V si +0.7 V cu o viteza de 50 mV/s. Celula electrochimica a inclus 3 electrozi serigrafati pe un support ceramic : electrodul de lucru din carbon modificat sau nu cu CeO_2 , electrod auxiliar de C si electrod de referinta de Ag, de exemplu sistemul comercializat de Metrohm Dropsens, Spania, numar de catalog DRP C110.

Conform datelor din Desenul 4 (Voltamograme ciclice inregistrate in 5 mM ferocianura de potasiu in 0.1 M KCl, in domeniul de la -0.3 V la +0.7 V, la o viteza de baleiaj de 50 mV/s, cu electrozi de C (de ex C110 de la Metrohm Dropsens, Spania, rosu) modificati cu piramide de CeO_2 depuse prin PLD (negru)), dupa modificarea cu stratul de piramide de CeO_2 , distanta dintre potentialul picului anodic si catodic ale ferocianurii de K s-a redus semnificativ de la 384 mV la 151 mV iar inaltimea picurilor anodic si catodic a fost mai mare. Aceste modificari in voltamograma ciclica denota o crestere a conductivitatii si marimii suprafetei active a electrodului. Proprietatile electrochimice mai bune au ca rezultat o sensibilitate mai mare a masuratorilor electrochimice realizate cu acesti senzori, comparativ cu masuratori realizate cu electrozi de C nemodificati.

Oxidarea directa a NADH. Avantajele senzorului de C modificat cu straturi de piramide de CeO_2 depuse prin PLD pentru determinarea electrochimica a NADH au fost evaluate prin masuratori de voltametrie ciclica intr-o solutie de 2 mM NADH in tampon fosfat, 0.1 M pH 10 cu 0.1 M KCl. Voltamogramele au fost inregistrate in domeniul de la -0.6V la +0.6 V la o viteza



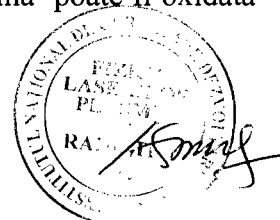
de baleiaj de 100 mV/s. Din rezultatele ilustrate in Desenul 5 (Voltamograme ciclice inregistrate in solutie de NADH 2mM in tampon fosfat 0.1 M pH 10, cu 0.1 M KCl, cu sistem de electrozi serigrafati DRP C110 (Metrohm Dropsens, Spania), nemodificati (negru) sau modificati cu nanopiramide de ceria depuse prin PLD (rosu) si respectiv particule sferice de ceria adsorbite pe suprafata electrodului de carbon. Viteza de baleiaj : 100 mV/s, domeniul de potential : de la -0.6 V la 0.6 V vs Ag/AgCl) se observa ca stratul de piramide de CeO₂ are un efect electrocatalitic la oxidarea NADH, manifestat prin reducerea potentialului picului anodic al NADH de la 0.54 V la 0.4 V. Cu cat potentialul necesar oxidarii NADH e mai mic, cu atat scade riscul interferentelor datorate compusilor usor oxidabili prezenti in probe reale. Prin comparatie, pentru un electrod similar de carbon care a fost modificat cu particule sferice de ceria disponibile comercial, adsorbite pe electrod, picul anodic corespunzator oxidarii NADH are maximul la 0.53 V. Aceasta demonstreaza caracteristicile unice electrocatalitice conferite de straturile de nanopiramide, obtinute prin depunere prin PLD.

2. Oxidarea NADH folosind ca mediator electrochimic siringaldazina. Siringaldazina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehid azina) este un compus cu structura aromatica, larg utilizat ca substrat cromogenic pentru lacaza. Sistemul siringaldazina/lacaza a fost demonstrat a fi eficient in regenerarea enzimatica a cofactorului NAD⁺, ca urmare a fost cuplat cu diverse enzime din clasa dehidrogenazelor NAD⁺-dependente [23,24].

Functionarea sistemului se bazeaza pe reactia rapida a chinonei formate in reactia siringaldazinei cu lacaza, tetrametoxi azobismetilen chinona (TMAMQ) cu NADH, avand ca rezultat (re)generarea NAD⁺ activ enzimatic. Constanta de reactie a TMAMQ cu NADH determinata la pH8.0 si 25 C este de $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [23]. Aceeasi chinona, TMAMQ poate fi produsa si electrochimic prin oxidarea siringaldazinei pe suprafata electrozilor de C, la valori de potential in jur de 0.2 V vs Ag/AgCl proces reversibil ce implica $2e^-$ si $2H^+$ [25]. In studii electrochimice, SA a fost studiata in principal in aplicatii legate de senzori de pH si ca mediator al reducerii oxigenului, in reactii catalizate de lacaza [26, 27]. Siringaldazina nu a fost studiata in mod special ca mediator pentru oxidarea electrochimica a NADH.

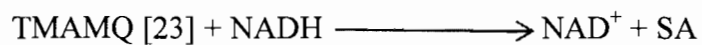
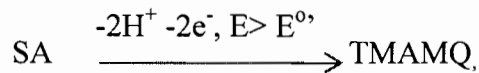
Utilizarea senzorilor cu nanopiramide de ceria si siringaldazina adsorbita pentru determinarea NADH, revendicata in aceasta aplicatie de brevet se bazeaza pe:

i) *Aplicatiile siringaldazinei adsorbite pe electrozi de C ca mediator electrochimic pentru oxidarea NADH, ilustrata prin voltamogramele din Desenul 6A. Siringaldazina poate fi oxidata*



electrochimic la un potential mai mare de 150 mV vs Ag/AgCl pe suprafata electrozilor serigrafati de C. Picurile anodic si catodic “in oglinda” (distanta intre potentialul picului anodic si catodic fiind de 4 mV) si similaritatea magnitudinii curentilor de pic anodic si catodic (Desenul 6A, inset) denota adsorbția puternică a siringaldazinei pe suprafata electrozilor de C si un procesul de oxidare electrochimica rapid si reversibil.

ii) Posibilitatea oxidării si determinării NADH, mediate de siringaldazina este ilustrata prin cresterea curentului anodic in prezenta NADH la potentiale mai mari decat potentialul formal al siringaldazinei (Desenul 6A- Voltamograme ciclice inregistrate cu electrozi de carbon cu siringaldazina adsorbita in in tampon PBS pH 7.4, la o viteza de baleiaj de 100 mV/s, in domeniul de la -0.4 V la +0.7V in absenta (rosu) si prezenta (negru) a 2 mM NADH. Inset: structura chimica a siringaldazinei si voltamograma marita, in absenta NADH). Siringaldazina functioneaza ca mediator electrochimic pentru oxidarea NADH pe baza secventei de reactii:



unde E° reprezinta potentialul formal al cuplului redox al siringaldazinei.

Astfel determinarea NADH cu electrozi modificati cu SA se poate face electrochimic la valori mici de potential, comparativ cu oxidarea directa a NADH care are loc la valori in jur de 0.54 V.

ii) Efectul sinergic al modificării electrozilor de carbon cu nanopiramide de ceria si cu siringaldazina la oxidarea electrochimica a NADH.

Proprietatile electrocatalitice ale electrozilor de C modificati cu nanopiramide de ceria depuse prin PLD si cu siringaldazina adsorbita la oxidarea cofactorului enzimatic NADH sunt demonstrate prin determinari de voltametrie ciclica. Protocolul de masura presupune adsorbția siringaldazinei pe suprafata electrozilor de carbon modificati sau nu cu ceria, prin depunerea unei picaturi de 5 μL dintr-o solutie de siringaldazina in etanol de concentratie 70 $\mu\text{g/mL}$, urmata de uscare la temperatura camerei. Procesul este repetat pentru a avea o cantitate suficienta de mediator adsorbit. Electrozii modificati cu siringaldazina sunt testati prin voltametrie ciclica, in



absenta si respectiv in prezenta a 2 mM NADH. Testele comparative realizate la o viteza de baleiaj de 100 mV/s in domeniul de la -0.6 V la +0.6 V evidentiaza efectul sinergic al modificarii electrozilor de carbon cu siringaldazina si nanopiramide de CeO₂ in ce priveste reducerea potentialului la care are loc oxidarea NADH. Astfel transferul de electroni este mai rapid pe electrozi modificati cu CeO₂ si siringaldazina (SA) fata de electrozii modificati exclusiv cu ceria sau cu SA. (Desenul 6B- Voltamograme ciclice inregistrate in solutie 2 mM NADH in tampon fosfat 0.1 M pH 10, 0.1 M KCl, la o viteza de baleiaj de 100 mV/s, in domeniul -0.6 V-0.6 V cu electrozi de carbon cu siringaldazina adsorbita (negru), respectiv cu electrozi de C cu nanopiramide de ceria depuse prin PLD, nemodificati (albastru) sau cu siringaldazina adsorbita (rosu).)

3. Aplicarea electrozilor cu nanopiramide de ceria depuse prin PLD modificati cu siringaldazina la detectia substraturilor unor enzime din clasa dehidrogenazelor NAD⁺-dependente

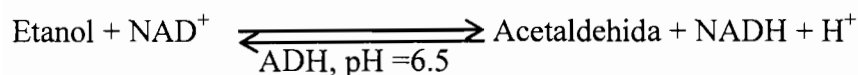
Utilitatea electrozilor modificati cu nanopiramide de ceria depuse prin PLD modificati cu siringaldazina in domeniul biosenzorilor este demonstrata prin teste electrochimice de detectie a acetaldehidei folosind doua enzime NAD⁺-dependente: alcool dehidrogenaza si aldehyd dehidrogenaza.

Alcool dehidrogenaza catalizeaza la pH alcalin acid transformarea alcoolilor in aldehidele corespunzatoare iar la pH acid catalizeaza reactia inversa de conversie a aldehydelor in alcooli.

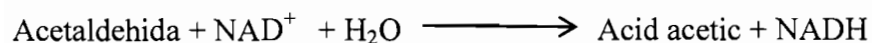
Aldehyd dehidrogenaza catalizeaza transformarea aldehydelor in acizii carboxilici corespunzatori.

Reactiile care au loc sunt urmatoarele:

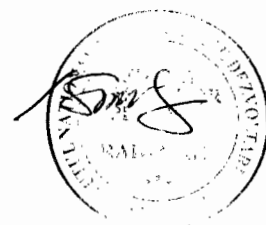
ADH, pH = 8



AIDH



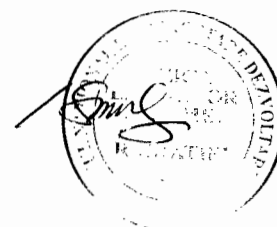
Pentru evaluarea senzorilor modificati cu nanopiramide de ceria cu siringaldazina adsorbita, electrozii au fost montati orizontal, s-a aplicat pe suprafata lor un volum de 100 μL solutie



continand enzima si cofactorul respectiv, preparati in solutia tampon de pH optim, si s-a baleiat potentialul aplicat in domeniul -0.6 V-0.6 V. Dupa obtinerea unei voltamograme stabile, s-au adaugat 5 μ L acetaldehida de concentratie 100 mM (concentratie finala 5 mM) si s-a inregistrat din nou voltamograma.

In Desenul 7 A si B(Voltamograme ciclice inregistrate in absenta (negru) si respectiv in prezenta acetaldehidei (concentratie 5 mM, rosu), la o viteza de baleiaj de 100 mV/s, in domeniul -0.6 V - 0.6 V, cu electrozi de lucru cu SA adsorbita, in sistem de 3 electrozi serigrafati (C110, Dropsens) cu electrod auxiliar de C si electrod de referinta Ag. A: electrozi de lucru cu nanopiramide de ceria depuse prin PLD si SA adsorbita. B: electrod cu nanoparticule sferice de ceria depuse in picatura (5 μ L dintr-o solutie 2% de nanoparticule de ceria, Sigma Aldrich, Germania). A, B: solutie de alcool dehidrogenaza din *Saccharomyces cerevisiae* si NADH, tampon fosfat 0.1 M pH 6.5. C: solutie de aldehyd dehidrogenaza din *Flavobacterium PL00* si NAD⁺, tampon fosfat 0.1 M pH 10 cu 0.1 M KCl.) se observa efectul catalitic al siringaldazinei adsorbite pe NP de ceria, manifestat prin aparitia curentului anodic datorat oxidarii NADH de la valori de potential superioare potentialului anodic al SA (aproximativ 0.05 V). Se observa si un al doilea pic anodic, datorat oxidarii directe (nemediate de SA) a NADH pe suprafata electrozilor cu NP de ceria la 0.35 V. In prezenta substratului enzimatic, acetaldehida, are loc conversia acesteia la etanol cu oxidarea concomitenta a cofactorului enzimatic NADH la NAD⁺. Scaderea cantitatii de NADH disponibila pentru oxidarea la suprafata electrodului duce la scaderea semnificativa a curentului anodic. Folosind acest sistem de detectie, concentratia de acetaldehida poate fi determinata pe baza proportionalitatii sale cu scaderea curentului anodic . Avantajele modificarii particulare cu nanopiramide de ceria sunt ilustate prin comparatia cu un senzor similar cu nanoparticule sferice de ceria disponibile comerciale, depuse pe suprafata unui electrod de carbon de același tip. In comparatie cu senzorii cu nanopiramide, cei cu nanoparticule sferice permit detectarea NADH si implicit a acetaldehidei sau altor substraturi enzimatice la valori de potential mai mari de 0.35 V.

Intr-o alta exemplificare a potentialelor aplicatii ale electrozilor modificati cu NP de ceria prin PLD, folosind acelasi montaj experimental, se demonstreaza conform celor ilustrate in Desenul 7 C (electrozi de lucru cu nanopiramide de ceria depuse prin PLD si SA adsorbita) posibilitatea determinarii electrochimice a acetaldehidei folosind aldehyd dehidrogenaza, in prezenta cofactorului enzimatic NAD⁺, la pH 10. Enzima utilizata in acest exemplu este o aldehyd



dehidrogenaza izolata din Flavobacterium PL002, cu optim la pH alcalin, utilizata la realizarea de biosenzori[28]. Cresterea curentului anodic la potentiale superioare potentialului anodic al siringaldazinei este corelata cu concentratia de acetaldehida din proba de analizat.

Cele 2 exemple demonstreaza utilitatea senzorilor de carbon modificati cu NP de ceria pentru determinarea electrochimica a substraturilor unor enzime din clasa dehidrogenazelor NAD⁺-dependente, senzorii functionand atat la pH slab acid cat si la pH bazic.

Domeniul tehnologic: Materiale avansate



REVEDICARI

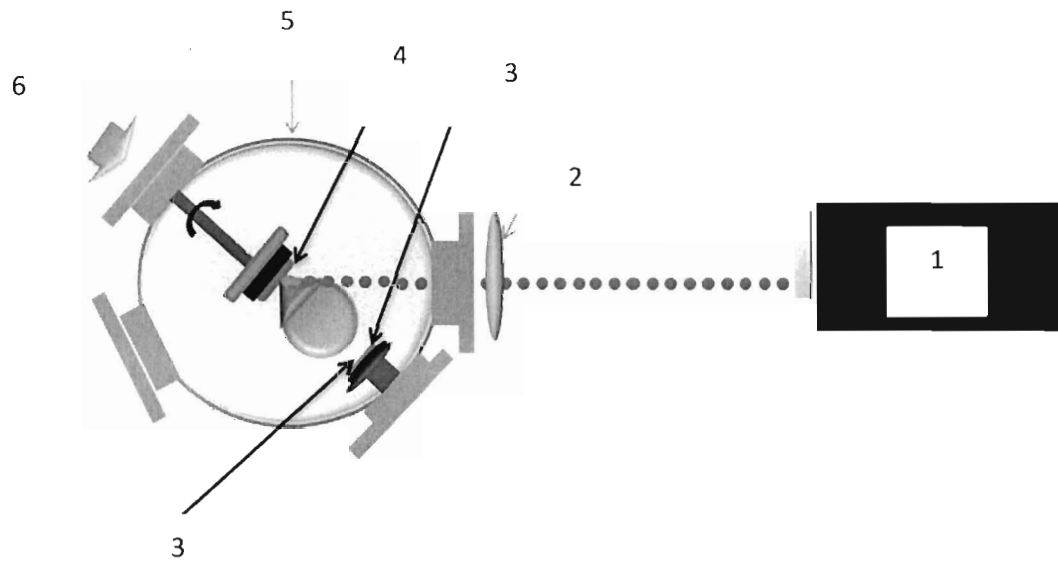
1. **Noi senzori electrochimici cu suprafata si conductivitate mare** pentru determinari in medii lichide obtinuti prin depunerea de **straturi subtiri nano si microstructurate piramidal (CeO_2)** pe electrozi de carbon ;
2. **Straturile oxidice de CeO_2 , utilizate în condițiile revendicării 1, se caracterizeaza prin aceea ca suprafata prezinta structuri piramidale de oxid de CeO_2** cu latura bazei de cca 150-300 nm si inaltime de peste 150 nm, obtinute la o temperatura $T_s=500^\circ\text{C}$ pe electrozi de Carbon.
3. **Noile straturi active obținute în condițiile revendicării 1, se caracterizeaza prin imbunătățirea proprietăților membranei active si a reproductibilitatii acestora, imbunatatirea procesabilitatii stratului senzitiv, conductivitate mai buna si suprafata electroactiva mai mare in urma depunerii straturilor de piramide de CeO_2 fata de electrozii de C nemodificati.**
4. **Senzorii obținuti în condițiile revendicării 1 se caracterizeaza prin aceea ca apare reducerea potentialului la oxidarea directa a NADH comparativ cu electrozii nemodificati**
5. **Senzorii obținuti în condițiile revendicării 1 se caracterizeaza prin aceea ca la oxidarea NADH mediata de siringaldazina creste curentul si scade potentialul de oxidare comparativ cu electrozii nemodificati sau modificati cu particule sferice de ceria, disponibile comercial depuse « in picatura ».**
6. **Senzorii obținuti în condițiile revendicării 1, modificati cu siringaldazina, pot fi utilizati ca detectori electrochimici ai NADH in combinatie cu enzime din clasa dehidrogenazelor NAD-dependente, functionand adecvat atat la pH slab acid cat si la pH alcalin.**



56

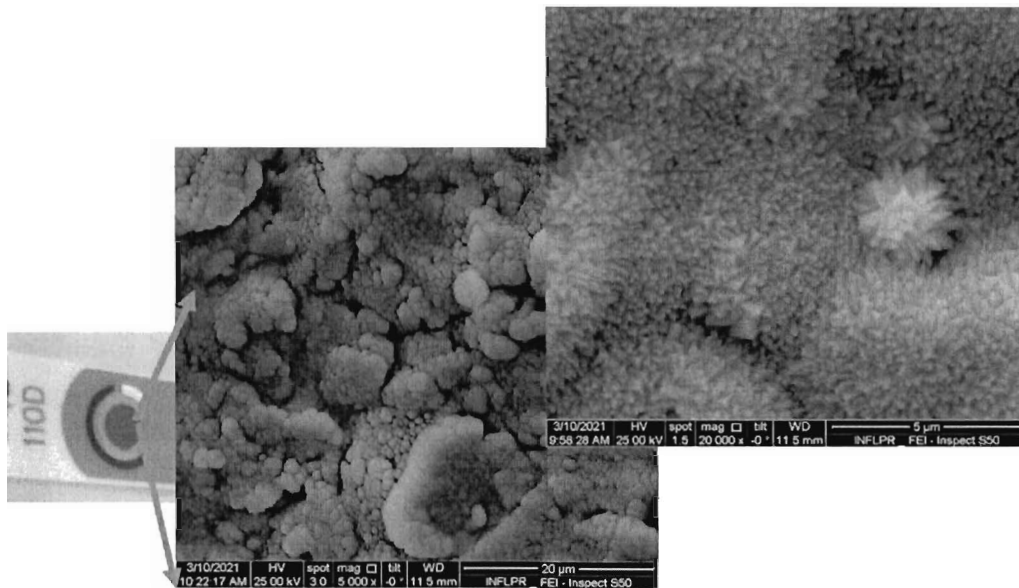
Lista Desene (7)

Desen 1

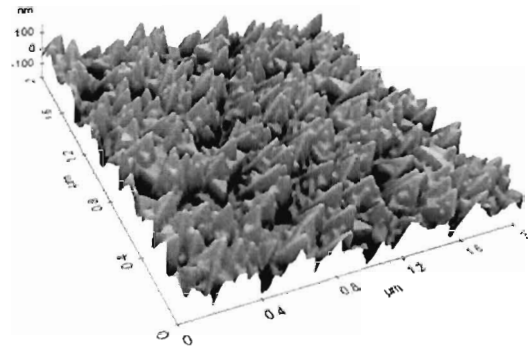
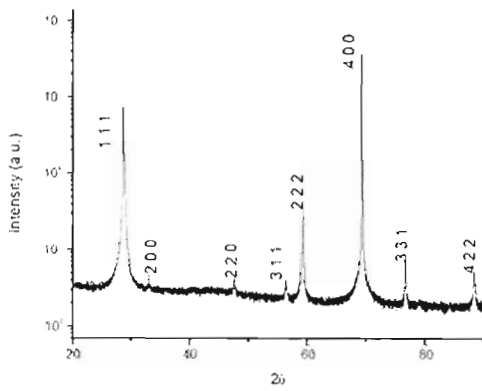


55

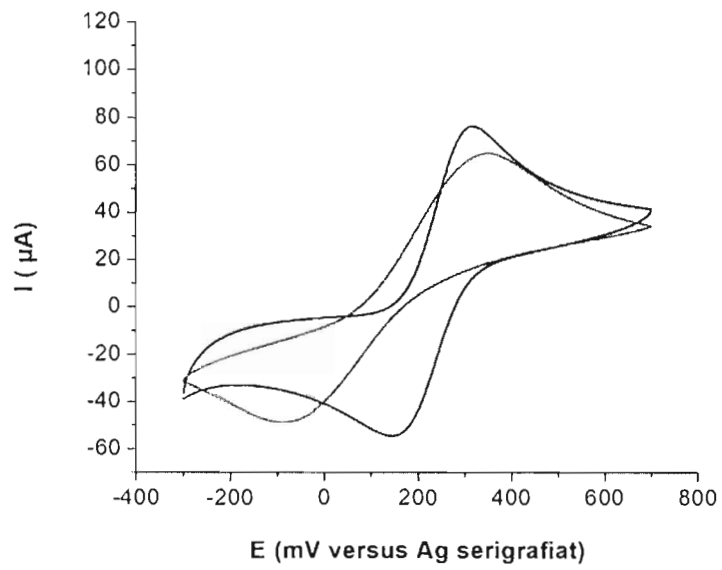
Desenul 2



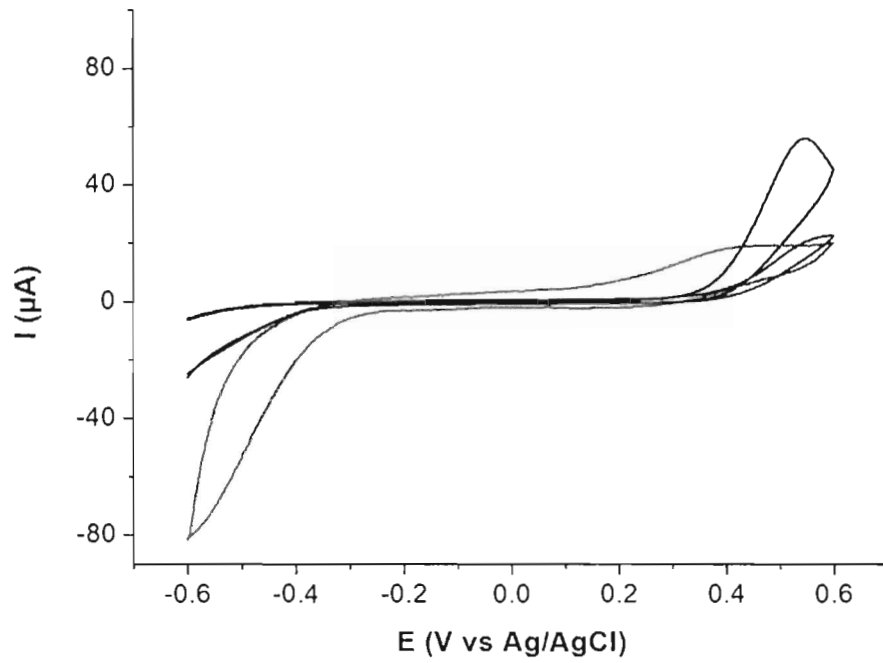
Desen 3



Desen 4

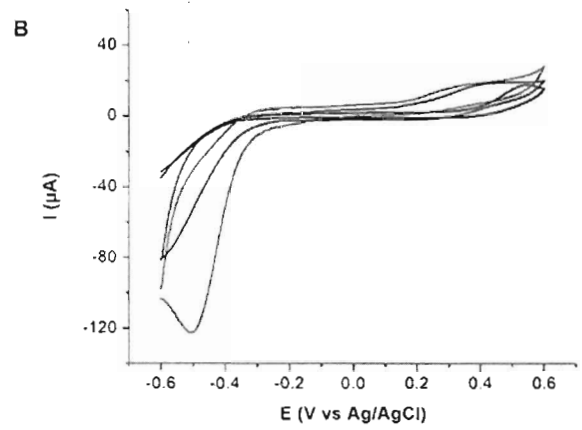
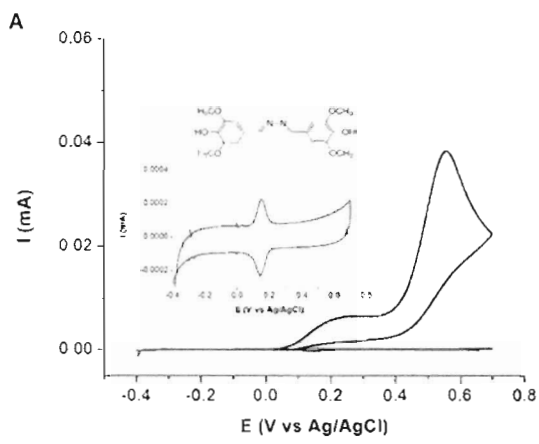


Desen 5



51

Desen 6



50

Desen 7

