



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00738

(22) Data de depozit: 06/12/2021

(41) Data publicării cererii:
30/06/2023 BOPI nr. 6/2023

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA " ȘTEFAN CEL MARE "
DIN SUCEAVA, STR. UNIVERSITĂȚII
NR. 13, SUCEAVA, SV, RO

(72) Inventatori:
• ANCHIDIN-NOROCEL LILIANA,
STR.EMIL CIORAN, NR.7, BL.7, AP.27,
SC.B, SUCEAVA, SV, RO;
• AMARIEI SONIA, STR.VICTORIEI NR.61,
SAT SFÂNTU ILIE - ȘCHEIA, SV, RO;
• GUTT GHEORGHE, STR.VICTORIEI
NR.61, SAT SF.ILIE, ȘCHEIA, SV, RO

(54) BIOSENZOR PENTRU DETERMINAREA IONILOR DE NICHEL

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biosenzor folosit pentru determinarea rapidă și precisă în situ a ionilor de Ni din produse alimentare de origine vegetală, în scopul prevenirii apariției simptomelor de alergie la persoanele sensibilizate. Senzorul conform invenției este constituit dintr-o unitate potențiomtrică și un electrod (1) de unică utilizare format dintr-un material (2) polimeric suport cu rol de izolator electric, niște electrozi (3, 4 și 5) metalici lamelari sau modificați cu nanoparticule de Ag, peste care se depune, ca agent (6) de fixare și imobilizare, o soluție apoasă de 1% alginat și ca material (7) biologic activ, o soluție de urează 0,1%, care are rol de legare a ionului de Ni din proba (8) alimentară analizată, corelarea dintre curentul faradic dat de unitatea potențiomtrică și concentrația ionului de Ni realizându-se printr-o curbă de calibrare stabilită prin intermediul unei familii de curbe ciclo - voltametrice.

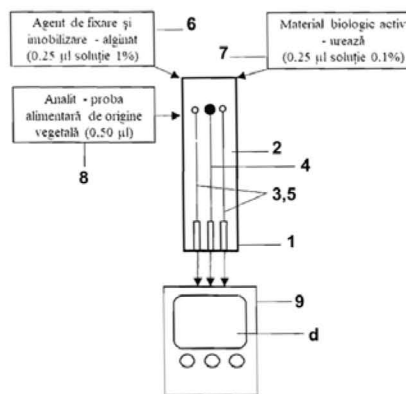


Fig. 1

Revendicări: 4
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021 ep 738
Data depozit 06-12-2021

BIOSENZOR PENTRU DETERMINAREA IONILOR DE NICHEL

Biosenzorul conform invenției este destinat determinării rapide, *in situ* și precise a ionilor de nichel din produse alimentare de origine vegetală.

Importanța determinării concentrației ionilor de nichel în materiile prime alimentare și alimente este reprezentată de toxicitatea acestora asupra sănătății populației. Se estimează că aproximativ 8-10% dintre femei și 1-2% dintre bărbați sunt sensibili la nichel.

S-a raportat că expunerea la nichel de până la 500 $\mu\text{g}/\text{zi}$ agravează eczema pielii de contact la persoanele sensibilizate la nichel. Un aport zilnic mediu total a fost estimat la 0,1–0,3 mg. Pe lângă aceste efecte, concentrații mai mari de nichel pot provoca fibroză pulmonară, boli cardiovasculare și renale și cancer pulmonar și nazal. Având în vedere efectele menționate, determinarea exactă și precisă a acestui element din materii prime alimentare și alimente devine o necesitate majoră.

Metodele de referință care măsoară conținutul total de nichel, cu limite de detecție situate la nivelul de nanograme (ppt) și de micrograme (ppb), includ spectrometria de absorbție atomică cu flacără (FAAS), spectrometria de absorbție atomică în cuptor cu grafit (GFAAS), spectrometria de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES) sau spectrometria de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS), iar pentru limite de detecție situate la nivelul de miligrame sunt folosite metode electrochimice de analiză care includ potențiomertia, amperometria, polarografia și conductometria, spectrometria moleculară sau metodele volumetrice.

Dezavantajele metodelor spectrometrice enumerate mai sus constau în faptul că mijloacele care le deservește sunt aparate voluminoase care nu permit analiza *in situ* a ionilor de nichel din produse alimentare de origine vegetală. Afară de aceste dezavantaje, analizele spectrometrice reclamă, un efort preparativ ridicat precum și un personal specializat pentru analize și pentru interpretarea rezultatelor.

În vederea evitării trimerii în mod frecvent a probelor de alimente de origine vegetală la laboratoarele de specialitate, pentru stabilirea concentrației ionilor de nichel, este nevoie de un mijloc de analiză instrumentală performant, de dimensiuni mici, care să permită consumatorilor ca în timp scurt să determine *in situ* și precis concentrația ionilor de nichel.



Un asemenea mijloc de analiză instrumentală îl poate constitui un biosenzor specializat pe ionul de nichel. În urma achiziției și procesării datelor obținute pentru o proba alimentară de origine vegetală, pe display-ul biosenzorului apare afișată concentrația ionului de nichel din acel produs. Ca mod de lucru se reclama doar folosirea unei singure picături de proba lichidă, obținută prin stoarcere sau tăiere pentru probe cu concentrații cuprinse între 0,1-10 mg/kg, iar pentru probele cu concentrații mai mari este necesară și o diluție a acestora, urmată de citirea concentrației ionului de nichel pe displayul alfanumeric.

Există numeroase studii și cercetări privind detecția ionilor metalici însă doar unele dintre acestea sunt destinate determinării ionilor de nichel și foarte puține sunt destinate determinării din produse alimentare. Astfel, în documentul [D1] „*Mettakoonpitak, J., Miller-Lionberg, D., Reilly, T., Volckens, J., & Henry, C. S. (2017). Low-cost reusable sensor for cobalt and nickel detection in aerosols using adsorptive cathodic square-wave stripping voltammetry. J. Electroanal. Chem, 805, 75-82*”, este descrisă o metodă, la care concentrația ionilor de nichel este determinată cu dimetilglioxima (DMG), care este și cel mai utilizat receptor pentru biosenzorii destinați detecției ionilor de nichel, prin tehnica voltametrie adsorbivă cu stripping catodic cu domeniul de liniaritate între 5-175 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

În documentul [D2] „*Ochab, M., Geça, I., & Korolczuk, M. (2019). The new Micro-set for Adsorptive Stripping Voltammetric Simultaneous Determination of Nickel and Cobalt Traces in Aqueous Media. Electroanalysis, 31(9), 1769-1774*”, este descrisă o altă metodă pentru determinarea ionilor de nichel prin altă tehnică voltametrică și utilizarea de nioximă, rezultând un domeniu de liniaritate de 0,11-0,58 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

În documentul [D3] „*Yang, Y., Yuan, Z., Liu, X. P., Liu, Q., Mao, C. J., Niu, H. L., ... & Zhang, S. Y. (2016). Electrochemical biosensor for Ni^{2+} detection based on a DNAzyme-CdSe nanocomposite. Biosens, Bioelectron, 77, 13-18*”, este descris un biosenzor utilizat pentru detectarea concentrației de ioni de nichel utilizând un bioreceptor denumit DNAzyme-CdSe nanocompozit și tehnica voltametrie de stripping anodic cu puls diferențial, obținând un domeniu de liniaritate mai larg 1,173 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – 11,73 mg/kg și o limită de detecție mai scăzută (6,67 nM).

În documentul [D4] „*Verma, N., & Singh, M. (2006). A Bacillus sphaericus based biosensor for monitoring nickel ions in industrial effluents and foods. J Autom Methods Manag Chem., 2006*”, autorii au dezvoltat un senzor pentru ionii de nichel din alimente, dar nu au specificat sensibilitatea; au raportat doar intervalul de detecție Ni (II): 0,002–0,04 ppb cu un timp de răspuns de 1,5 minute și o fiabilitate de 91,5% și 90,6%.



În documentul [D5] „Padilla, V., Serrano, N., & Díaz-Cruz, J. M. (2021). *Determination of Trace Levels of Nickel (II) by Adsorptive Stripping Voltammetry Using a Disposable and Low-Cost Carbon Screen-Printed Electrode. Chemosensors, 9(5), 94*”, este descris un biosenzor destinat detecției nichelului prin voltametrie de stripping cu puls diferențial cu utilizarea dimetilglioximei ca bioreceptor, un domeniu de liniaritate de 1,7 - 150 $\mu\text{g/l}$ și o limită de detecție de 0,5 $\mu\text{g/L}$.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui biosenzor cu sensibilitate și precizie ridicată, folosit pentru determinarea *in situ* a ionilor de nichel din produse alimentare de origine vegetală, astfel încât se poate preveni apariția efectelor toxice asupra organismului uman.

În acest scop este folosită o structură potențiomtrică portabilă, în compunerea căreia intră un electrod serigrafiat, format din trei electrozi metalici, din care electrodul de lucru este modificat cu nanoparticule de argint, pe un suport polimeric, neconducător electric, peste care se depune un agent de fixare și imobilizare (alginat) și un material biologic activ (ureaza), cu rol de legare a componentului (nichel), din produse alimentare de origine vegetală, pentru analiză fiind necesară o cantitate de ordinul a unei singure picături (50 μl).

Curentul faradaic măsurat de potențostat este o expresie a concentrației ionilor de nichel din proba alimentară analizată. Ca urmare a conversiei, cu ajutorul soft-ului intern ce are la bază curba de calibrare realizată în coordonate curent faradic-concentrație, concentrația ionilor de nichel apare afișată pe display-ul biosenzorului în unități de miligrame pe litru.

Avantajul utilizării unui biosenzor conform invenției constă în faptul că acesta nu necesită personal specializat, este portabil și poate fi utilizat la analize *in situ* în vederea determinării concentrației ionului de nichel din cantități mici de probă.

Se dă în continuare un exemplu de realizare, în legătură cu Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4 și Tab. 1, care reprezintă:

Fig. 1. Schema generală a biosenzorului destinat determinării ionilor de nichel din produse alimentare de origine vegetală

Fig. 2. Obținerea electrodului serigrafiat și modul de lucru cu biosenzorul

Fig. 3. Exemplu de familie de voltamograme ciclice folosite pentru determinarea concentrației de ionilor de nichel din produse alimentare de origine vegetală

Fig. 4. Curba de calibrare folosită pentru determinarea concentrație ionilor de nichel din produse alimentare de origine vegetală

Tabel 1. Caracteristicile de performanță analitica a biosenzorului folosită pentru determinarea concentrație ionilor de nichel din produse alimentare de origine vegetală



Biosenzorul conform invenției, Fig. 1, cuprinde un electrod serigrafiat 1 de unică utilizare, cu electrod de lucru modificat cu nanoparticule de argint, plan, de dimensiuni reduse format dintr-un material 2 polimeric suport, izolator electric, niște electrozi 3, 5 metalici și 4 din pulbere de nanoparticule de argint, peste care se depune un agent 6 de fixare și imobilizare (alginat) și un material 7 biologic activ (urează) cu rol de legare a componentului urmărit (ioni de nichel) din proba 8 alimentară de origine vegetală și o unitatea 9 electronică. Pentru analiza ionului de nichel dintr-o probă alimentară de origine vegetală 8, electrodul 1 de unică utilizare introduce prin glisare în unitatea 9 electronică a biosenzorului formată dintr-un potențiostat, programat pentru tensiunea de lucru specifică ionului nichel. Potențiostatul are în compunere un microprocesor pentru achiziție și prelucrare date, un soft intern pentru transformarea curentului faradic în unități de concentrație a ionilor de nichel și un display *d* alfanumeric de afișare a concentrației ionilor de nichel din produse alimentare de origine vegetală în unități de mg/kg.

Sucesiunea fazelor pentru obținerea structurii analitice a biosenzorului descrisă în Fig. 2, indică modul de utilizare a biosenzorului pentru determinarea concentrației ionilor de nichel din produse alimentare de origine vegetală.

Etapile de obținere a unui electrod serigrafiat de unică utilizare implică în primă fază depunerea pe celula electrochimică potențiometrică plană a agentului de fixare și imobilizare a 0,25 μ l alginat soluție apoasă 1%, urmată de depunerea materialului biologic activ a 0,25 μ l soluție apoasă de urează 0,1%, de uscare timp de 60 minute la o temperatură de 25°C și de operația de încapsulare etanșă.

Modul de lucru al biosenzorului conform invenției parcurge următoarele etape succesive:

-conectarea electrodului, de unică utilizare, prin glisare în fanta corespunzătoare a unității 9 electronice a biosenzorului, ceea ce duce automat la activarea microprocesorului pentru achiziție și prelucrare date.

- depunerea unei picături (50 μ l) de proba pe electrodul de lucru și apăsarea butonului start pentru realizarea analizei voltametrice.

- citirea de pe display-ul alfanumeric, a unității 9 electronice, a concentrației ionului de nichel din proba 8 alimentară de origine vegetală.

Odată conectat la celula 1 electrochimică, se pornește potențiostatul 9, care măsoară concentrația de ioni de nichel prezentă în proba 8 de produs alimentar analizat. În vederea stabilirii bazei de date pentru softul intern se efectuează mai multe ciclovoltagrame (Fig. 3)



pentru diferite concentrații de ioni de nichel folosind în acest scop o soluție de sulfat de nichel. Cu ajutorul intensităților maxime ale peak-urilor redox din voltagrame se realizează curba de calibrare în coordonate curent faradic- concentrație, Fig.4, iar perechile de valori ale punctelor de pe curba de calibrare se introduc în memoria RAM a microprocesorului. În continuare orice măsurătoare de curent faradic efectuată pentru o probă alimentară de origine vegetală este convertită automat pe baza curbei de calibrare din memorie în unități de concentrație de ioni de nichel pe kg produs alimentar care sunt afișate ca atare pe display-ul *d* al biosenzorului.

Caracteristicile de performanță testate cu acest biosenzor au fost sensibilitatea analitică și limita de detecție, Tabel 1.



REVENDICĂRI

1. Invenția Biosenzor pentru determinarea ionilor de nichel din produse alimentare de origine vegetală, **caracterizat prin aceea că**, este folosit un sistem biosenzorial ce are în compunere o unitate potențimetrică și un electrod serigrafiat (1) de unică utilizare, un agent (6) de fixare și imobilizare, un material (7) biologic activ, corelarea între curentului faradic și concentrația ionului de nichel fiind făcută printr-o metoda potentiometrica cu ajutorul unei curbe de calibrare care la rândul ei are la baza o familie de curbe ciclo-voltametrice.
2. Electrod serigrafiat (1) de unică utilizare, conform revendicării principale nr. 1, **caracterizat prin aceea că**, pulberea folosită în acest scop este formată din nanoparticule de argint;
3. Agent de fixare și imobilizare (6), conform revendicării principale nr.1 , **caracterizat prin aceea că**, substanța folosită în acest scop este o soluție apoasă de alginat 1%;
4. Materialul biologic activ (7) conform revendicării principale nr.1, **caracterizat prin aceea că**, substanța folosită în acest scop este o soluție apoasă urează 0,1%;



DESENE

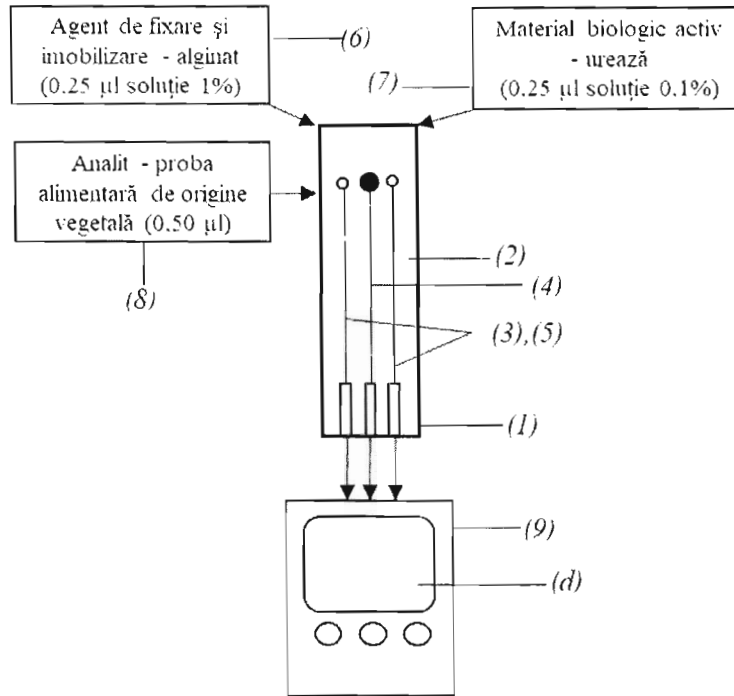


Fig. 1.

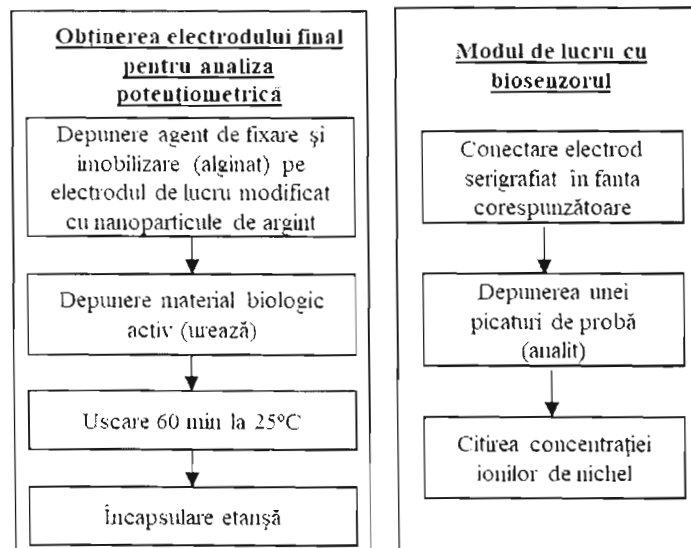


Fig. 2.



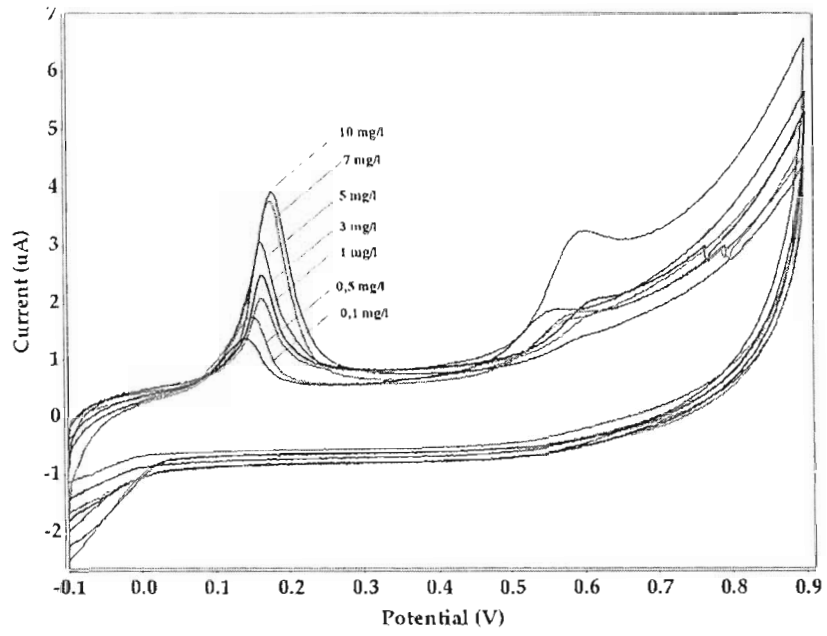


Fig. 3.

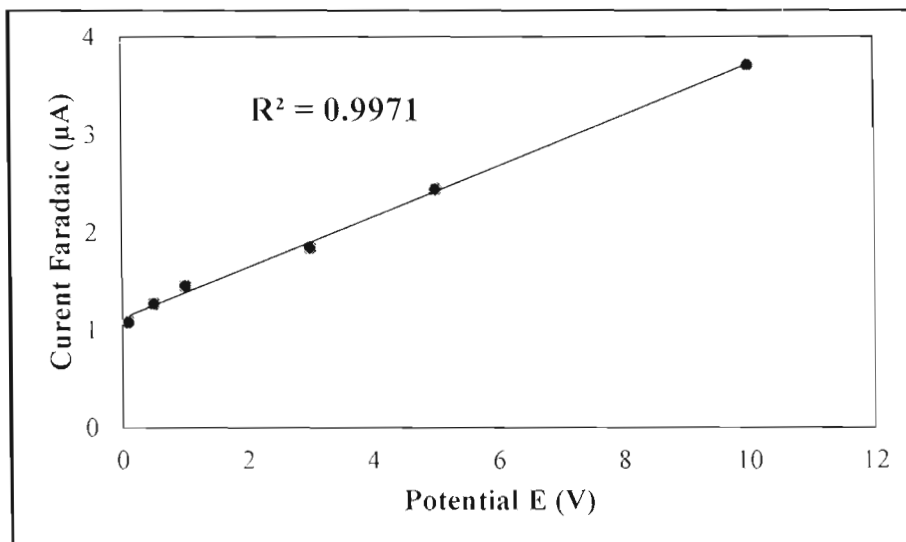


Fig. 4.



Tab. 1

Biosensor Nichel	Electrod	R ²	Sensibilitate [μ A/mM]	Limita de detecție[mg/L]
Urease - alginate	Carbon	0.8569	0.1725	0.050
	Bismuth	0.9782	0.8737	0.020
	<u>Silver</u>	<u>0.9971</u>	<u>2.1921</u>	<u>0.005</u>

