



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00553

(22) Data de depozit: 09/09/2022

(41) Data publicării cererii:  
29/03/2024 BOPI nr. 3/2024

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICA MATERIALELOR,  
STR.ATOMIȘTILOR NR.405 A, MĂGURELE,  
IF, RO;  
• INTELECTRO IAȘI S.R.L.,  
STR.IANCU BACALU, NR.5, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:  
• BAIBARAC MIHAELA,  
ALEEA BARAJUL DUNĂRII, NR.1, BL.M35,  
SC.5, ET.10, AP.217, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• TRANDABAT ALEXANDRU,  
BD.INDEPENDENȚEI, NR.11, BL.D1, SC.B,  
ET.6, AP.16, IAȘI, IS, RO

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

### (54) METODĂ DE EVALUARE A ASAMBLĂRII SENZORILOR DE PEPSINĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de asamblare a senzorului pentru detecția pepsinei din probele de salivă în cazul bolii de reflux laringo - faringian și la o metodă de evaluare a acestui senzor. Procedeu conform invenției are următoarele etape:

1) polimerizarea electrochimică a 3,4-etilendioxitofenului ( $2 \times 10^{-3}$  M în prezența soluției tampon fosfat cu  $\text{pH} = 6,8$  și a unei sări de sodiu a bis(2-etil hexil) sulfosuccinatului ( $10^{-3}$  M), prin volumetrie ciclică, când prin înregistrarea primelor 5 voltamograme ciclice în domeniul de potențial (-1...+2) V vs. Ag/AgCl rezultă poli(3,4-etilendioxitofen) PEDOT pe suprafața SPACE-GO,

2) sinteza electrochimică a nanoparticulelor de Au pe suprafața electrodului de SPACE- GO/PEDOT, care în prezența soluției apoase de 0,1 M KCl și 0,5 mM  $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  rezultă nanoparticule de Au pe suprafața SPACE- GO/ PEDOT,

3) interacția SPACE-GO/PEDOT/Au cu o soluție 1 mM cisteamină (CA), timp de 2 ore,

4) interacția SPACE-GO/PEDOT/Au/CA cu 2 mM 1-etil-3(3-dimetil amino propil) carbodiimidă (EDC) și 5 mM N-hidroxi succinimidă (NHS) în prezența a 1  $\mu\text{g/ml}$  de anti-pepsină, timp de 1 oră, urmată de adsorbția pepsinei pe suprafața senzorului. Metoda conform invenției constă în evidențierea liniilor Raman la GO și PEDOT la 1283 și 1426  $\text{cm}^{-1}$  din SPACE-GO/PEDOT pe care au fost sintetizate nanoparticulele de Au, evidențierea creșterii intensității liniei Raman de la 1364  $\text{cm}^{-1}$  a PEDOT prin interacțiunea SPACE-GO/PEDOT/Au cu o soluție 1 mM CA, apoi SPACE-GO/PEDOT/Au/CA interacționat cu 2 mM EDC și 5 mM NHS în prezența 1  $\mu\text{g/ml}$  de anti - pepsină, induce observarea liniilor Raman ale GO și PEDOT la 1259 și 1419  $\text{cm}^{-1}$ , iar adsorbția pepsinei pe suprafața senzorului induce observarea liniei Raman a GO la 1257  $\text{cm}^{-1}$ .

Revendicări inițiale: 1  
Revendicări amendate: 2  
Figuri: 2

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).



9

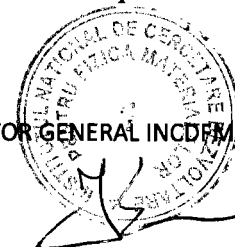
**METODA DE EVALUARE A ASAMBLARII SENZORILOR DE PEPSINA**

Detectia pepsinei in probe de saliva a primit o atenție deosebita in ultimii trei ani, dezvoltarea a noi sensori conducand la noi instrumente de diagnosticare in cazul bolii de reflux laringo-faringian. Avantajele senzorilor electrochimici in cazul colectarii probelor de saliva este ca operatia de colectare a salivei este neinvazivă și relativ confortabila. Refluxul laringo-faringian este atribuit atat refluxului acid cat si refluxului indus de pepsina [Johnston, N.; Knight, J.; Dettmar, P.W.; Lively, M.O.; Koufman, J. Pepsin and carbonic anhydrase isoenzyme III as diagnostic markers for laryngopharyngeal reflux disease. *Laryngoscope* 2004, 114, 2129–2134; Johnston, N.; Wells, C.W.; Blumin, J.H.; Toohill, R.J.; Merati, A.L. Receptor-mediated uptake of pepsin by laryngeal epithelial cells. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2007, 116, 934–938]. Prezența pepsinei poate deteriora țesutul laringelui, atat în condiții acide cat si bazice. Un prim senzor pentru detectia pepsinei din probe de saliva a fost raportata in 2018, cand s-au utilizat electrozi serigrafiați modificati cu polimer conductor de tip polipirol si nanoparticule de Au, care prezinta un domeniu liniar intre 6.25 – 100 ng/ml, o limita de detectie de 2.2 ng/ml, nivelul pepsinei in probele reale variind intre 4.3 si 10.3 ng/ml [D. Lee, Y. J. Lee, Y. G. Eun, G.J. Lee, Label-free deection of salivary pepsin using gold nanoparticle/polypyrrole nanocoral modified screen-printed electrode, *Sensors* 18, 1685, 2018]. Informatii despre procesul de asamblare al unor astfel de senzori au fost raportate doar prin microscopie electronica de baleiaj.

Dezavantajul ilustrarii procesului de asamblare al senzorilor pentru detectia pepsinei utilizand ca metoda de analiza microscopia electronica de baleiaj este ca aceasta metoda nu poate confirma existenta polimerului conductor si a adsorbției diferitilor compusi utilizati in procesul de asamblare.

Conform invenției, o metoda care permite confirmarea tuturor etapelor in procesul de asamblare este spectroscopia Raman. În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției. În acest scop, vom prezenta pe scurt principalele etape care au loc in procesul de asamblare al senzorilor bazati pe electrozi serigrafiați modificati cu polimerul conductor poli(3, 4-etilen dioxitiofen) (PEDOT) pentru detectia pepsinei. Principalele etape de asamblare a senzorilor pentru detectia pepsinei implica: i) functionalizarea electrozului serigrafiat modificat cu oxid de grafena (SPCE-GO) cu PEDOT, prin polimerizarea electrochimica; ii) electrodepunerea nanoparticulelor de Au;

DIRECTOR GENERAL INCDFM DR. IONUT ENCULESCI



iii) interactia ulterioara cu cisteamina (CA), 1-etil-3(3-dimetil amino propil) carbo diimida (EDC), N-hidroxi succinimida (NHS), acid citric si anti-pepsina si iv) legarea pepsinei. Procesul electrochimic de sinteza a PEDOT pe suprafata electrodului SPCE-GO, implica prepararea unei solutii tampon fosfat cu  $\text{pH} = 6.8$  continand  $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  3, 4-etilendioxi tiofen (EDOT),  $10^{-3} \text{ M}$  sarea de sodiu a bis(2-etil hexil) sulfosuccinat (compus comercializat de firma Sigma Aldrich sub abrevierea AOT). Celula electrochimica continand atat SPCE-GO cat si solutia preparata mai sus a fost conectata la un potentiostat/galvanostat Voltalab 80, de la firma Radiometer Analytical. Viteza de scanare a potentialului a fost de  $100 \text{ mV/s}$ . In cele ce urmeaza va fi evidentiat rolul spectroscopiei Raman in procesul de asamblare a senzorului utilizat la detectia pepsinei. Conform Figurii 1, voltamograma ciclica inregistrata in timpul electropolimerizarii EDOT evidentiaza la baleierea anodica a potentialului un maxim de oxidare la cca.  $1.047 \text{ V vs. Ag}$  care pe masura ce numarul de voltamograme ciclice creste pana la 5, se deplaseaza la  $+ 1.114 \text{ V}$ , simultan cu cresterea densitatii curentului anodic. Aceste variatii indica formarea polimerului pe suprafata electrodului SPCE-GO. Utilizand spectroscopia Raman, o confirmare a acestei ipoteze este prezentata in Figura 2a. Spectrele Raman prezentate in Figura 2 au fost inregistrate cu spectrofotometrul FTRaman, model MultiRam, de la Bruker, care este echipat cu un laser YAG :Nd, care permite inregistrarea spectrelor Raman la lungimea de unda de  $1064 \text{ nm}$ . Liniile Raman cele mai intense observate in Figura 2a sunt acelea avand maximele la : a)  $1292$  si  $1593 \text{ cm}^{-1}$ , apartinand GO, acestea fiind atribuite modurilor vibrationale ale atomilor de carbon cu hibridizarea  $\text{sp}^3$  (modului  $\text{E}_{2g}$ ) si respectiv  $\text{sp}^2$  [Eigler, S.; Dotzer, C.; Hirsch, A. Visualization of defect densities in reduced graphene oxide. *Carbon* 2002, 50, 3666–3673]; si b)  $1429 \text{ cm}^{-1}$ , linie Raman acompaniata de alte linii de intensitate mai mica situate la cca.  $465, 704, 856$  si  $989 \text{ cm}^{-1}$ , toate apartinand PEDOT. Liniile Raman de la  $465, 707, 856, 989$  si  $1429 \text{ cm}^{-1}$  apartin modurilor vibrationale de deformare a inelului oxietilen, de deformare simetrica a legaturii C-S-C, de deformare asimetrica a legaturii C-S-C, de deformare a inelului oxietilen si de intindere simetrica a legaturii C-C [S. Garreau, G. Louarn, J. P. Buisson, G. Froyer, S. Lefrant, *Macromolecules* 32, 6807, 1999]. Metoda de sinteza electrochimica a nanoparticulelor de Au pe suprafata electrozilor de SPCE-GO/PEDOT este aceea publicata in 2018 [D. Lee, Y. J. Lee, Y. G. Eun, G.J. Lee, *Sensors* 18, 1685, 2018], care implica generarea nanoparticulelor metalice in prezenta unei solutii apoase continand  $0.1 \text{ M KCl}$  si  $0.5 \text{ mM HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , domeniul de scanare al potentialului in timpul inregistrarii voltamogramelor ciclice fiind  $(-1; +2) \text{ V vs. Ag}$ . Modificarile vibrationale induse de depunerea electrochimica a

DIRECTOR GENERAL INCDFM: DR. IONUT ENCULESCL



5

nanoparticulelor de Au pe suprafața electrodului SPCE-GO/PEDOT sunt prezentate în Figura 2b. Conform Figurii 2b, se observă variații importante care pot fi evidențiate după cum urmează: i) linia Raman de la 1292 și 1429  $\text{cm}^{-1}$  sunt deplasate la cca. 1283 și 1426  $\text{cm}^{-1}$ ; ii) linia Raman de la 1283  $\text{cm}^{-1}$  prezintă un umăr care corespunde unei linii Raman având maximumul la 1266  $\text{cm}^{-1}$ , variație acompaniată de apariția a noi linii Raman la cca. 1358, 1527, 1757  $\text{cm}^{-1}$ ; și iii) creșterea intensității liniilor Raman de la 989 și 1595  $\text{cm}^{-1}$ . Aceste modificări își au originea în procesul de exaltare al liniilor Raman ale PEDOT, indus de generarea plasmonilor de suprafață generați la interfața PEDOT/nanoparticule de Au. Interacția SPCE-GO/PEDOT/Au cu o soluție de 1mM CA timp de 2 ore, induce următoarele modificări ale spectrului Raman (Figura 2c): i) o deplasare suplimentară a benzii complexe de la 1265-1283  $\text{cm}^{-1}$  la cca. 1261  $\text{cm}^{-1}$ , ii) scăderea intensității relative a liniei Raman de la 1585  $\text{cm}^{-1}$ ; iii) deplasare a liniei Raman de la 1356  $\text{cm}^{-1}$  la 1364  $\text{cm}^{-1}$  simultan cu creșterea intensității relative a liniei Raman de la 1364  $\text{cm}^{-1}$ . Aceste variații indică că CA a interacționat cu SPCE-GO/PEDOT/Au, fiind adsorbit pe suprafața acestuia (SPCE-GO/PEDOT/Au/CA). Interacția succesivă a SPCE-GO/PEDOT/Au/CA cu 2mM EDC și 5mM NHS în prezența 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anti-pepsină, timp de o oră, induce ca principală variație modificarea maximumului liniilor Raman de la 1261 și 1426  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 2c) la 1419 și 1259  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 2d). Adsorbția pepsinei pe suprafața senzorului este observată a induce în spectrul Raman prezentat în Figura 2e o modificare a poziției liniei Raman de la 1259  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 2d) la 1257  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 2d). Luând în considerare toate aceste variații putem spune că metoda de evaluare a asamblării senzorilor pentru detectia pepsinei, conform invenției prezintă următoarele avantaje: i) metoda de monitorizare a asamblării senzorilor electrochimici pentru detectia pepsinei poate fi efectuată cu succes prin spectroscopie Raman; ii) monitorizarea prin spectroscopie Raman a asamblării senzorilor electrochimici pentru detectia pepsinei permite o evaluare rapidă a suprafeței platformei senzoriale; iii) metoda de monitorizare a asamblării senzorilor pentru detectia pepsinei nu necesită consum de alți reactanți și poate fi folosită și în cazul altor senzori și biosenzori .

DIRECTOR GENERAL INCDFM: DR. IONUT ENCULESCU



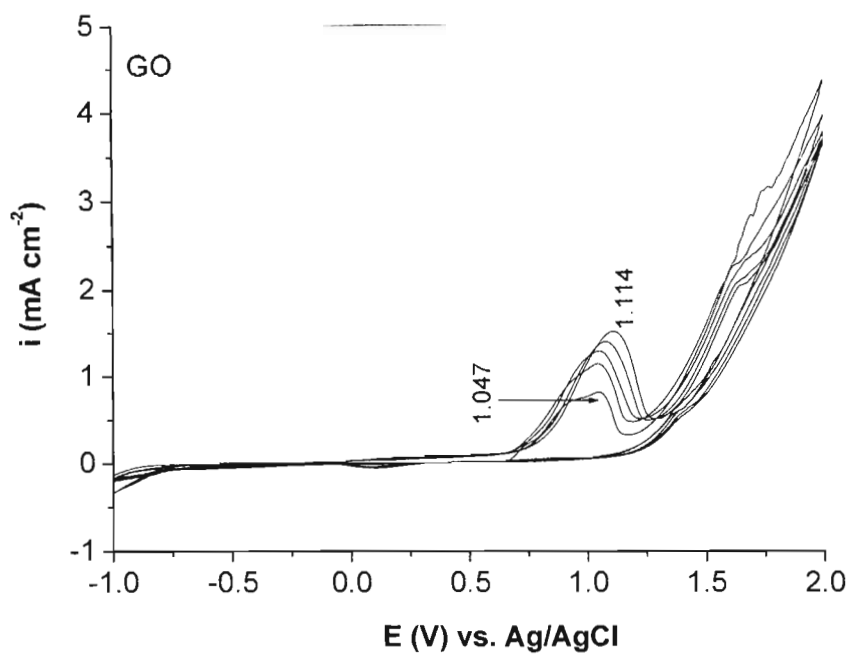
4

**METODA DE EVALUARE A ASAMBLARII SENZORILOR DE PEPSINA****RE V E N D I C A R E**

1. Invenția se referă la metoda de evaluarea a senzorilor electrochimici pentru detectia pepsinei, prin spectroscopie Raman, aceasta fiind caracterizată prin aceea că permite o evaluare o evaluare rapida a modificarilor induce suprafetei platformei senzoriale, in timpul procesului de asamblare prin metode electrochimice si chimice precum si in timpul legarii pepsinei pe suprafata platformei senzoriale.

DIRECTOR GENERAL INCDFM: DR. IONUT ENCULESCU

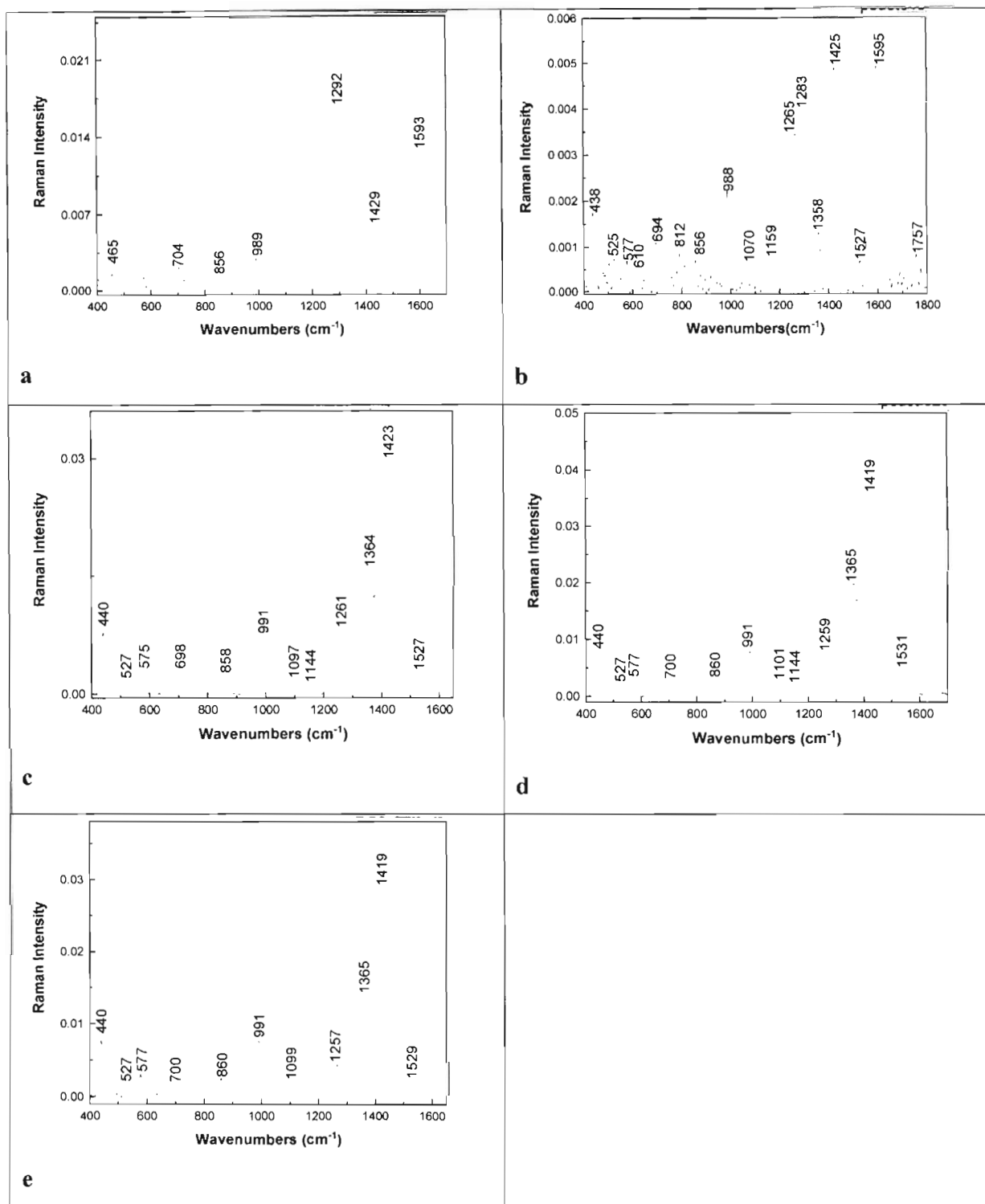




**Figura 1.** Primele 5 voltamograme ciclice inregistrate pe electrodul SPCE-GO imersat intr-o solutie tampon fosfat cu  $\text{pH} = 6.8$  continand  $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  3, 4-etilendioxi tiofen si  $10^{-3} \text{ M}$  AOT. Viteza de scanare a potentialului a fost de  $100 \text{ mV/s}$ .

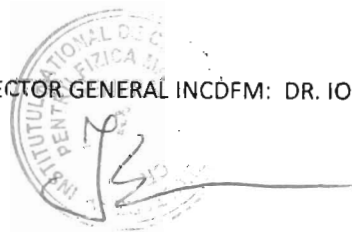
DIRECTOR GENERAL INCDFM: DR. IONUT ENCULESCI





**Figura 2.** Spectrele Raman ale SPCE-GO/PEDOT (a), SPCE-GO/PEDOT/Au (b), SPCE-GO/PEDOT/Au/CA (c), SPCE-GO/PEDOT/Au/CA/EDC (d) si SPCE-GO/PEDOT/Au/CA/EDC/anti-pepsina (e).

DIRECTOR GENERAL INCDFM: DR. IONUT ENCULESCL



PROCEDU DE ASAMBLARE A SENZORILOR PENTRU DETECȚIA PEPSINEI ȘI  
METODĂ DE EVALUARE A ACESTUI SENZOR

## RE V E N D I C A R E

1. Procedu de asamblare a senzorului bazat pe electrodul serigrafat modificat cu oxid de grafenă (SPCE-GO) și polimerul conductor poli(3, 4-etilen dioxitiofen) (PEDOT) pentru detecția pepsinei, **caracterizat prin aceea că**, are următoarele etape de realizare: **i)** polimerizarea electrochimică a 3, 4-etilendioxitiofenului ( $2 \times 10^{-3}$  M) în prezența soluției tampon fosfat cu pH = 6.8 și a unei sări de sodiu a bis(2-etil hexil) sulfosuccinatului ( $10^{-3}$  M), prin voltametrie ciclică, când prin înregistrarea primele 5 voltamograme ciclice în domeniul de potențial (-1 ; +2) V vs. Ag/AgCl rezultă poli(3, 4-etilendioxitiofen) (PEDOT) pe suprafața SPCE-GO; **ii)** sinteza electrochimică a nanoparticulelor de Au pe suprafața electrodului de SPCE-GO/PEDOT, care în prezența soluției apoase conținând 0.1M KCl și 0.5 mM  $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ , rezultă nanoparticule de Au pe suprafața SPCE-GO/PEDOT, **iii)** interacția SPCE-GO/PEDOT/Au cu o soluție 1mM cisteamina (CA), timp de 2 ore; **iv)** interacția SPCE-GO/PEDOT/Au/CA cu 2 mM 1-etil-3(3-dimetil amino propil) carbo-diimidă (EDC) și 5 mM N-hidroxi succinimidă (NHS) în prezența 1  $\mu\text{g/ml}$  de anti-pepsina, timp de o oră; și **v)** adsorbția pepsinei pe suprafața senzorului.
2. Metoda de evaluare a asamblării senzorului bazat pe SPCE-GO și PEDOT, pentru detecția pepsinei, corespunde spectroscopiei Raman, înregistrarea spectrelor Raman având loc după fiecare etapă de asamblare a senzorului, **caracterizat prin aceea că**: **i)** SPCE-GO pe care a fost sintetizat electrochimic PEDOT prezintă atât liniile Raman aparținând GO situate la 1292 și 1593  $\text{cm}^{-1}$  cât și o linie Raman intensă la 1429  $\text{cm}^{-1}$ , aparținând PEDOT; **ii)** SPCE-GO/PEDOT pe care au fost sintetizate nanoparticulele de Au evidențiază linii Raman ale GO și PEDOT la 1283 și 1426  $\text{cm}^{-1}$ ; **iii)** SPCE-GO/PEDOT/Au interacționat cu o soluție 1mM CA evidențiază creșterea intensității liniei Raman de la 1364  $\text{cm}^{-1}$  a PEDOT; **iv)** SPCE-GO/PEDOT/Au/CA interacționat cu 2 mM EDC și 5 mM NHS în prezența 1  $\mu\text{g/ml}$  de anti-pepsina, induce observarea liniilor Raman ale GO și PEDOT la 1259 și 1419  $\text{cm}^{-1}$ ; și **v)** adsorbția pepsinei pe suprafața senzorului, induce observarea liniei Raman a GO la 1257  $\text{cm}^{-1}$ .

DIRECTOR GENERAL INCUBATORUL DR. IONUȚ IONCULESCU

