



**Universitatea
Transilvania
din Brașov**

TEZĂ DE ABILITARE

Titlu:

Abordări inovatoare pentru noi metodologii de diagnostic și terapie

Domeniul: Medicină

**Autor: Conf. Univ. Dr. Dr. Fiz. Monica FLORESCU
Universitatea Transilvania din Brașov**

Brașov, 2023

CUPRINS

CUPRINS.....	2
REZUMAT	4
ABSTRACT	8
PARTEA I. PRINCIPALELE REALIZĂRI PROFESIONALE, ACADEMICE ȘI ȘTIINȚIFICE... 11	
I.1 PRINCIPALELE REALIZĂRI PROFESIONALE ȘI ACADEMICE	11
Istoric	11
Activitatea didactică.....	16
Activitatea științifică.....	17
I.2 PRINCIPALELE REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE.....	18
Domenii de cercetare abordate în această teză:	26
I.3 CONTEXTUL ȘTIINȚIFIC ACTUAL PRIVIND IMPORTANȚA DOMENIILOR DE CERCETARE ABORDATE.....	28
Abordări spectro-electrochimice pentru studiul interacțiunilor biomoleculare și noi metodologii de diagnostic și terapie în medicină	28
Materiale și echipamente	29
Materiale	29
Echipamente și metode.....	30
1. Studiul interacțiunilor și reacțiilor (bio)moleculare	32
1.1. Optimizarea modificării suprafețelor.....	32
1.1.1. Caracterizarea electrochimică a modificării suprafețelor.....	35
A. Suprafețe modificate cu CoP și Tyr.	35
B. Suprafețe modificate cu structuri moleculare stratificate (LbL)	42
C. Suprafețe modificate cu nanoparticule (NP).....	46
1.1.2. Caracterizarea optică (SPR) a interacțiunilor biomoleculare din structurile enzimatiche LbL	57
➤ Suprafețe cu bistraturi PEI ⁺ /GOX ⁻	58
➤ Suprafețe cu bistraturi {chit ⁺ (GOx)} ⁻ /PSS ⁻	60
1.1.3. Concluzie parțială.....	62
1.2 Sisteme de administrare a medicamentelor. Studiu biofizic	63
1.2.1 Caracterizarea electrochimică a interacțiunii albumine – medicamente	65
A. Interacțiuni dintre albumine (HSA/BSA) și acid folic (FA)	65
1.2.2 Caracterizarea optică (SPR) a interacțiunii albumine – medicamente	69
B. Interacțiuni dintre HSA/BSA și FA.....	69
C. Interacțiuni dintre BSA și LT4	71
1.2.3. Caracterizarea spectroscopică a stabilității complexului BSA-LT4.....	73
1.2.4. Concluzie parțială.....	74
1.3 Concluzie.....	75

2. Dezvoltarea platformelor senzoriale	75
2.1 Senzori cu film de cobalt-porfirină	76
2.1.1 Deteția dopaminei cu CoP (S-CoP și S-CoP-Tyr)	77
2.1.2. Deteția DA în probe reale	79
2.1.3 Concluzie parțială	80
2.2. Senzori cu structuri enzimatic multistrat (LbL)	80
2.2.1. Deteția glucozei cu structuri enzimatic LbL	81
2.2.2. Deteția glucozei în probe reale	84
2.2.3. Concluzie parțială	84
2.3 Senzori electrochimici cu nanomateriale	85
2.3.1. Senzori cu nanoparticule carbonice și de aur	86
A. Cuantificarea LT4 cu nanoparticule carbonice.....	86
B. Cuantificarea LT4 în probe reale cu nanoparticule carbonice	87
2.3.2. Senzori cu nanozime (enzime artificiale)	88
C. Cuantificarea capacității antioxidante totale relative (RAC).....	89
D. Validarea RAC electrochimic folosind metode spectroscopice	91
E. Estimarea activității antioxidante prin studii cinetice	92
2.4 Concluzii	94
PARTEA A II-A. PLANURI DE EVOLUȚIE ȘI DEZVOLTARE A CARIEREI	95
Planuri de evoluție și dezvoltare a carierei profesionale și științifice	96
Domenii de cercetare viitoare:	96
A. Dezvoltarea sistemelor de biodeteție non-invazivă	96
B. Dezvoltarea sistemelor de administrare țintită a factorilor terapeutici (nanoterapii) ..	98
C. Evidențierea interacțiunilor care implică proteine și nanoparticule	100
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	102

REZUMAT

Teza de abilitare „**Abordări inovatoare pentru noi metodologii de diagnostic și terapie**” este structurată în trei părți. În prima parte am prezentat rezultatele activităților de cercetare desfășurate ulterior obținerii titlului de **Doctor în Fizică cu distincția Summa cum laude** în anul 2007. În a doua parte am prezentat planurile de cercetări viitoare, după susținerea tezei de abilitare, iar în partea a treia sunt prezentate referințele bibliografice folosite în prima parte a tezei.

Prima parte este împărțită în 3 secțiuni. Astfel, în **prima secțiune a tezei (I.1)** am descris principalele realizări profesionale și academice, detaliind parcursul meu în cadrul Universității Transilvania din Brașov din **1998, ca asistent universitar** pentru disciplinele de biofizică și fizică generală, și până în prezent când sunt **conferențiar universitar titular** al cursurilor de **biofizică și fizică generală**. În **perioada 2007-2008** (1 an) am activat și ca **cercetător asociat la Universitatea din Wisconsin-Milwaukee, Laboratorul de Biofizică, WI, SUA**, în cadrul unui **stagiul post-doctoral** unde am făcut cercetări științifice pentru corelarea proprietăților biofizice ale creierului de șobolan și starea de conștiență când acesta se afla sub acțiunea diferitelor substanțe anestezice.

În **secțiunea a doua (I.2)** am detaliat **principalele realizări științifice** axate pe două domenii principale, interconectate, cu un puternic caracter inter- și transdisciplinar, obținute după susținerea doctoratului în fizică, care au condus și la obținerea titlului de **Doctor în Medicină cu distincția Summa cum laude** în anul 2020: 1. Studiul interacțiunilor și a reacțiilor (bio)moleculare 2. Dezvoltarea platformelor senzoriale pentru detecția biomoleculilor.

Am publicat 54 de articole științifice în reviste de specialitate incluse în **Web of Science's (WoS) (ISI)**, cu **peste 100** de participări la **conferințe internaționale și naționale** (din care 10 au fost **invitate, keynote sau plenare**), **30 cărți/capitole de cărți** din care **10** ca autor în edituri internaționale și 9 în edituri naționale, 11 ca editor în edituri naționale.

În perioada **2007-2023**, am publicat **45 lucrări indexate în Web of Science's (WoS) (ISI)**, din care **33 în calitate de autor principal** (prim autor și autor de corespondență) și 1 teză de doctorat. **Index H = 16**, iar articolele au primit **835 citări fără autocitări** (27.07.2023), factor cumulat de impact autor principal **FCIAP de 58.875**. Rezultatele activităților de cercetare s-au concretizat și în depunerea a două **cereri de brevet**.

Publicațiile au fost obținute, atât ca rezultat al unor **teme de cercetare proprii**, cât și în cadrul **proiectelor de cercetare obținute prin competiție ca director**, dar și ca **membru al echipelor de cercetare** în alte proiecte naționale și internaționale.

Sunt **membru în colectivul editorial** al revistelor **WoS, recenzor (peer reviewer)** pentru reviste **WoS** (verificabile pe Publons, cu factor de impact în WoS între 2.0 și 7.392) și **recenzor pentru competiții de proiecte naționale și internaționale**.

Activitatea mea didactică și de cercetare a fost completată de **coordonare și organizare evenimente științifice:**

1. **Conferința Internațională „Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - IC-ANMBES” (co-presedinte și presedinte al comitetului de organizare a 6 ediții în perioada 2010 - 2022)** (icanmbes.unitbv.ro) și

2. **Școala de vară „8th International Student Summer School “Nuclear Physics – Science and Applications”** (NUCPHYS-SC&APPL), 2017, Brasov, Romania (**responsabil pentru Romania si Presedinte al Comitetului de Organizare**).

În prezent sunt **membru al asociațiilor profesionale:** Romanian Society of Pure and Applied Biophysics (vice-președinte), European Biophysical Societies Association, Biophysical Society, Bioelectrochemical Society, Romanian Society of Physics.

În **secțiunea a treia (I.3)** am prezentat, în contextul științific actual, **rezultatele cercetărilor** mele realizate în cadrul laboratorului de biofizică pentru **studiul interacțiunilor biomoleculare și dezvoltarea unor noi metodologii de diagnostic și terapie în medicină**. În continuare voi prezenta succint temele abordate în această secțiune.

Am plecat de la **studiile publicate la nivel național și internațional** legate de **detectarea timpurie** a patologiilor importante și **monitorizarea terapierilor**. **Noi modalități de detecție** au fost luate considerare, ca **metode de diagnostic molecular *in vitro***, cu ajutorul cărora să se obțină într-un mod **facil, dar cât mai sensibil și precis detecția și monitorizarea biomoleculilor (biomarkeri sau medicamente)**. **Monitorizarea facilă sau auto-monitorizarea** oricărui medicament administrat reprezintă **un instrument valoros pentru diagnosticarea timpurie**, dar poate furniza și informații în timp real **pentru ajustarea terapiei, a alimentației și a activității fizice** în scopul atingerii unei biodisponibilități cât mai mari.

În **subsecțiunea (1)** am prezentat **evaluarea interacțiunilor și reacțiilor (bio)moleculare** care au permis, atât **optimizarea modificării suprafețelor și a parametrilor de detecție** pentru dezvoltarea ulterioară a **noi platforme senzoriale** (pentru detecția moleculară specifică), cât și **studierea mecanismului de legare a medicamentelor de transportori** (ex. albuminele serice) și **a stabilității complexului albumină-medicament** pentru **abordări terapeutice inovatoare**. Suprafețe senzoriale diferite au fost modificate cu filme subțiri de **polimeri, enzime și nanoparticule de aur** care **mimază activitatea enzimelor biologice (nanozime de aur)**.

În cazul dezvoltării **sistemelor de transport și livrare a medicamentelor bazate pe albumine serice**, studiarea mecanismului de interacțiune a acestora cu fiecare medicament este foarte importantă. Modul de **realizare a imobilizării** moleculelor proteice (*hidrodinamic vs. static*) a **influențat**, atât **conformația** proteinei, cât și **expunerea siturilor de legare** către medicament, spre deosebire de cazul când moleculele se află libere în soluție. **Alți compuși aflați în circulație pot, de asemenea, au influențat stabilitatea complexului proteină transportatoare - medicament**. O **interacțiune puternică este benefică pentru transportul complexului în circulația**

sistemică, dar **scade concentrația medicamentului liber** (forma activă a medicamentului în celulă), de aceea aceste studii trebuie corelate cu cele de eliberare și livrare controlată a medicamentelor în mod țintit.

În **subsecțiunea (2)** am prezentat **dezvoltarea și optimizarea procedeelelor de detecție** cu ajutorul platformelor senzoriale cu suprafețe modificate optimizate în subsecțiunea (1) și **validarea platformelor senzoriale** pentru detecția substanțelor. **Senzori** de aur modificați cu **filme polimerice subțiri și enzimă** au fost folosiți pentru **detecția și cuantificarea dopaminei (DA) in vitro**. **Biosenzori** electrochimici cu suprafață modificată cu **structuri enzimatică** au fost optimizați și folosiți pentru **detecția glucozei in vitro**. **Senzorii** electrochimici cu **nanoparticule de aur (AuNP)** au evidențiat rolul de catalizator al AuNP pentru specia reactivă H_2O_2 , prin **mimarea activității enzimei peroxidază**, având astfel rol de **enzimă artificială (nanozimă de aur)**. Astfel, acești **nanosenzori** au oferit o **alternativă mai rapidă și mai simplă** pentru dozarea H_2O_2 , față de metodele clasice, dar și **evaluarea capacității antioxidante totale** a unor probe biologice (exemplificate prin extracte de plante obținute de noi). **Validarea platformelor senzoriale** a fost realizată **in vitro pe probe reale** (soluții de medicament). Din cercetările efectuate reiese că dezvoltarea **platformelor de detecție cu nanomateriale** a biomarkerilor și/sau medicamentelor deschide posibilitatea **dezvoltării unor dispozitive noi și inovatoare**, care să permită **detecția și monitorizarea terapiei la punctul de îngrijire (POC)**.

În **partea a doua** a tezei, am expus **planurile de evoluție și dezvoltare a carierei profesionale și științifice**. **Planul** de dezvoltare al carierei mele universitare **vizează împlinirea cu succes a activităților didactice și de cercetare științifică interdisciplinară în domeniul cercetărilor biomedicale și translatarea rezultatelor cercetării în medicină**. Îmi propun să realizez cât mai multe din obiectivele didactice și științifice ce îmi revin atât din rolul de cadru didactic, cât și de cercetător, și să **promovez menținerea și creșterea standardelor** de excelență academică și profesională, dar și **colaborarea** cu colegii și studenții.

Pentru viitor îmi propun **continuarea** activității științifice desfășurată până acum, dar și deschiderea unor **noi direcții de cercetare**. **Scopul principal** al cercetărilor viitoare se încadrează în domeniul **cercetărilor științelor nano- și biomedicale**, care implică **îmbinarea cunoștințelor de biofizică, bionanotehnologie, nanomedicină și medicină preclinică**, luând în considerare starea actuală pe plan național și internațional a cercetărilor și obiectivele realizabile în viitorul apropiat și lung. Pe măsură ce **interacțiunile biologice apar la scară nanometrică**, nanotehnologia deschide numeroase oportunități. **Nanomedicina** este **aplicația medicală a nanotehnologiei**. Aceasta variază de la **aplicații medicale ale nanomaterialelor și dispozitivelor biologice până la posibile aplicații viitoare ale nanotehnologiei moleculare**, cum ar fi **mașinile moleculare = nanomașini** (motoare moleculare, comutatoare și porți logice).

Planul de cercetare propus va fi împărțit în **trei direcții principale, interdisciplinare**, ținând cont de experiența și expertiza anterioare, dar și proiectele aflate în derulare:

A. Dezvoltarea sistemelor de biodetecție non-invazivă;

- B.** Dezvoltarea sistemelor de administrare țintită a factorilor terapeutici (nanoterapii) și
- C.** Evidențierea interacțiunilor care implică proteine și nanoparticule.

În **partea treia** a tezei sunt prezentate referințele bibliografice folosite în prima parte.

ABSTRACT

The thesis of habilitation "**Innovative approaches for new diagnostic and therapy methodologies**" is structured in three parts. In **the first part** I presented the results of the research activities carried out after obtaining the title of **Doctor in Physics** with the ***Summa cum laude*** distinction in 2007. In **the second part** I presented the future research plans, after defending the thesis, and in **the third part** are presented the bibliographic references used in the first part of the thesis.

The first part is divided into 3 sections. Thus, in **the first section of thesis (I.1)** I described the main professional and academic achievements, detailing my course within the Transylvania University of Brasov in **1998, as a university assistant** for the disciplines of general biophysics and physics, and until now when I am an associate professor of general biophysics and physics courses. **Between 2007-2008 (1 year)** I also worked as an **associated researcher** at the **University of Wisconsin-Milwaukee, the biophysical laboratory, Wi, USA**, in a **post-doctoral internship** where we did scientific research to correlate the biophysical properties of the rat brain and the state of consciousness when it was under the action of different anaesthetic substances.

In **the second section (I.2)** I detailed the **main scientific achievements** focused on two main fields, interconnected, with a strong inter- and transdisciplinary character, obtained after the PhD in Physics, which also led to the title of **doctor in medicine with the *Summa cum laude*** distinction in 2020: 1.Study of interactions and (bio) molecular reactions 2.Development of sensory platforms for detection of biomolecules.

I have published 54 publications published in journals included in the **Web of Science's (WOS) (ISI)**, with **over 100 participations** in international and national conferences (of which 10 were **invited, Keynote or plenary**), **30 books/chapters** of books, of which **10** as an author in international publishers and 9 in national publishers, **11** as an editor in national publishers.

Between **2007-2023**, I published **45 publications** indexed on the Web of Science's (WOS) (ISI), of which **33 as the main author** (first author and correspondence author) and **1 doctoral thesis. Index h = 16 (WoS)**, and the articles received **835 citations without self-citations** (27.07.2023), cumulative factor of the main author **FCIAP of 58,875**. The results of the research activities also materialized in the submission of two **patent applications**.

The publications were obtained, both as a result of **my own research topics**, as well as within the **research projects obtained through competition** as a director, but also as a **member of the research teams** in other national and international projects.

I am a **member of the Editorial of WoS Journals, Reviewer (Peer Reviewer) for WoS Journals** (verified on Publons, with WOS Impact Factor between 2.0 and 7,392) **and reviewer for competitions of national and international projects**.

My didactic and research activity has been completed by **coordination and organization** of scientific events:

1. **International Conference "Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - IC-ANMBES"** (**co-president and chairman** of the Committee for organizing 6 editions during 2010 - 2022) (icanmbes.unitbv.ro).

2. **Summer School "8th International Student Summer School" Nuclear Physics-Science and Applications "(NUCPHYS-SC & APPL)**, 2017, Brasov, Romania (**responsible for Romania and chairman of the Organization Committee**).

I am currently I am a **member of the professional associations**: Romanian Society of Pure and Applied Biophysics (Vice-President), European Biophytes Societies Association, Biophysical Society, Bioelectrochemical Society, Romanian Society of Physics.

In the third section (I.3) I presented, in the current scientific context, **the results of my research** within the biophysical laboratory for **the study of biomolecular interactions and the development of new diagnostic and therapy methodologies**. Below I will briefly present the topics addressed in this section.

I started from **studies published at national and international level** related to the **early detection** of important pathologies and the **monitoring of therapies**. **New methods of detection** are taken to be considered, as *in vitro* **molecular diagnosis**, with which to obtain it in an **easy, but more sensitive and precise way, identifying, quantifying, and monitoring biomolecules (biomarkers or drugs)**. **Easy monitoring or self-monitoring** of any administered drug is a **valuable tool for both early diagnoses**, but it can also provide real-time information to **adjust the therapy, nutrition, and physical activity** to achieve the highest bioavailability.

In **subsection (1)** I presented an **assessment** of *interactions and (bio) molecular reactions* that allowed **the optimization of both the modification of the surfaces and the detection parameters** for the subsequent development of *new sensory platforms* (for specific molecular detection), as well as **studying the mechanism of binding of drugs to carriers** (serum albumin) and the **stability of the albumin-drug complex** for **innovative therapeutic approaches**. Different sensory surfaces have been modified with thin layers of **polymers, enzymes** and **gold nanoparticles** that **mimic the activity of biological enzymes (gold nanozyme)**.

In the case of developing the **systems of transport and delivery of drugs based on serum albumin**, studying their interaction mechanism with each drug is very important. The way of **achieving the immobilization of protein molecules (hydrodynamic vs. static)** influenced both the **conformation** of the protein and the **exposure of the binding sites to the drug**, unlike the molecules are free in the solution. **Other compounds** in circulation can also **influence the stability of the transporting protein – drug complex**. A **strong interaction** is **beneficial for the transport** of the complex in the systemic circulation, but **the concentration of the free drug** (the active form of the drug in the cell) **decreases**, therefore these studies should be correlated with studies of controlled release and delivery of drugs in a targeted manner.

In **subsection (2)** I presented **the development and optimization of sensing methods** using the surface-modified sensor platforms optimized in subsection (1) and **the validation of sensor platforms** for substance detection. Gold **sensors** surface modified with **thin polymeric films** and enzyme, were used for **the detection and quantification of dopamine (DA) in vitro**. Surface-modified electrochemical **biosensors** with **enzyme structures** have been optimized and used for **in vitro glucose detection**. Electrochemical **sensors** with **gold nanoparticles (AuNPs)** highlighted the catalytic role of AuNPs for the reactive species H_2O_2 , by **mimicking the activity of the**

peroxidase enzyme, thus acting as an **artificial enzyme**, named **gold nanozyme**. Thus, these nanosensors offered **a faster and simpler alternative** for H₂O₂ dosing, compared to classical methods, but also **the evaluation of the total antioxidant capacity** of some biological samples (exemplified by plant extracts obtained by us). **Validation of sensory platforms was done *in vitro* on real samples** (drug solutions). The research shows that the development of **electrochemical sensors and biosensors with nanomaterials as detection and quantification platforms** for biomarkers and/or drugs can open the possibility of **developing new and innovative devices** that allow **the detection and monitoring of therapy at the point of care (POC)**.

In **the second part** of the thesis, I presented **the plans for the evolution and development of the professional and scientific career**. The development plan of my university career aims at the **successful interweaving of didactic activities and interdisciplinary scientific research in the field of biomedical research and the translation of research results into medicine**. I propose to achieve as many of the didactic and scientific objectives that fall to me both from the role of teacher and researcher, and to **promote the maintenance and increase of standards** of academic and professional excellence, as well as **collaboration** with colleagues and students.

For the future, I propose the **continuation** of the scientific activity carried out so far, but also **the opening of new research directions**. **The main goal** of future research is in **the field of nano- and biomedical science research**, which involves **combining the knowledge of *biophysics, bionanotechnology, nanomedicine and preclinical medicine***, considering the current national and international state of research and the achievable goals in the near and long future. As **biological interactions occur at the nanoscale**, nanotechnology opens numerous opportunities. **Nanomedicine** is the medical application of nanotechnology. This ranges from ***medical applications of nanomaterials and biological devices*** to possible future applications of ***molecular nanotechnology*** such as ***molecular machines = nanomachines*** (molecular motors, switches, and logic gates).

The proposed research plan will be divided into **three main, interdisciplinary directions**, considering previous experience and expertise, but also ongoing projects:

- A.** Development of non-invasive biodetection systems.
- B.** Development of systems for targeted administration of therapeutic factors (nanotherapeutics) and
- C.** Highlighting of interactions involving proteins and nanoparticles.

In **the third part** of the thesis, the bibliographic references used in the first part are presented.

PARTEA I. PRINCIPALELE REALIZĂRI PROFESIONALE, ACADEMICE ȘI ȘTIINȚIFICE

I.1 PRINCIPALELE REALIZĂRI PROFESIONALE ȘI ACADEMICE

Istoric

Teza de abilitare „*Abordări inovatoare pentru noi metodologii de diagnostic și terapie*” prezintă sintetic rezultatele activităților de cercetare desfășurate ulterior obținerii titlului de **Doctor în Fizică cu distincția *Summa cum laude*** în anul 2007.

Activitatea mea academică a început în **1998 ca asistent universitar** în cadrul *Catedrei de Fizică a Universității Transilvania din Brașov*. În perioada **2000-2002** am urmat **Studii Postuniversitare de Specializare** în domeniul *Monitorizarea Calității Mediului*.

În perioada **2000 – 2007** am fost *doctorand fără frecvență în domeniul fizică, specialitatea biofizică*, sub îndrumarea Prof. Univ. Dr. Victor Gheorghe în cadrul Facultății de Fizică, Universitatea din București. Susținerea tezei a fost în 30 martie 2007, confirmată prin ordinul 1418/29.06.2007. **Teza de doctorat în fizică** a vizat **dezvoltarea unor metode de detecție a substanțelor biologice active folosind senzorii cu fibră optică și electrochimici** cu aplicații în industria alimentelor (pentru monitorizarea și controlul calității alimentelor și a băuturilor). Principalele **competențe științifice dobândite** în perioada doctoratului în fizică au fost **obținerea** unor membrane polimerice și enzimatică, **optimizarea și caracterizarea lor pentru dezvoltarea senzorilor cu fibră optică și electrochimici**, precum și **aprofundarea teoretică și practică a metodelor spectroscopice, de fluorescență și electrochimice**.

În perioada doctoratului am beneficiat de **burse de studiu** cu ajutorul cărora am avut posibilitatea colaborării cu **echipe de cercetare de prestigiu din Germania și Portugalia** pentru realizarea părții experimentale a tezei.

Astfel, în **anul 2002** am obținut o *bursă de doctorat pe termen scurt* (3 luni) din partea *Serviciul German de Schimb Academic (DAAD)* la „Institut für Chemo- und Biosensorik”, Münster, Germania, unde am făcut cercetări pentru dezvoltarea senzorilor cu fibră optică pentru detectarea viabilității celulare.

În perioada **2002-2003** (10 luni) am beneficiat de *burse de doctorat* în cadrul programului *Erasmus* și a altor proiecte finanțate de *Uniunea Europeană* la „Universitatea din Coimbra”, Coimbra, Portugalia pentru caracterizarea electrochimică și dezvoltarea biosenzorilor pentru glucoză în vin sub îndrumarea Prof. dr. Christopher M.A. Brett.

În **perioada octombrie 2004 – octombrie 2018** am ocupat postul de *șef de lucrări*, în cadrul Catedrei de Fizică, Facultatea de Inginerie Tehnologică și din **2011** în cadrul Departamentului Disciplinelor Fundamentale, Profilactice și Clinice, Facultatea de Medicină, ca titular al disciplinelor Fizică și Biofizică, iar **din octombrie 2018 până în prezent** postul de *conferențiar universitar* pentru Fizică și Biofizică, Chimie Analitică,

Managementul Deșeurilor Medicale, seminarii pentru Translatarea Cercetării Științifice în Domeniul Sănătății.

În **perioada 2007-2008** (1 an) am activat și ca *cercetător asociat* la Universitatea din Wisconsin-Milwaukee, Departamentul de Fizică, Laboratorul de Biofizică, WI, SUA, sub îndrumarea Prof. Dr. Valerică Raicu, în cadrul unui *stagiu post-doctoral* unde am făcut cercetări științifice pentru corelarea proprietăților biofizice ale creierului de șobolan și starea de conștiență când acesta se afla sub acțiunea diferitelor substanțe anestezice.

După susținerea tezei de doctorat în fizică, specialitatea biofizică, activitatea de cercetare științifică a fost orientată în două direcții mari, interconectate, cu un puternic caracter inter- și transdisciplinar, care au condus și la obținerea titlului de **Doctor în Medicină cu distincția *Summa cum laude*** în anul 2020 (susținerea tezei a fost în 23 septembrie 2019, confirmată prin ordinul 4021/07.04.2020). În **perioada 2011 – 2019** am fost **doctorand în domeniul medicină**, sub îndrumarea Prof. Dr. Gheorghe Coman.

În această perioadă, am participat în calitate de prim autor sau coautor la publicarea unor cărți și capitole de cărți:

Cărți:

a) M. Florescu (Editor), Biophysics for Biomedical and Environmental Sciences, Transilvania University Press, Brasov, 2016, ISBN 978-606-19-0768-7.

Capitole de cărți:

1. M. David, **M. Florescu**, Biomolecular interaction evaluation using surface plasmon resonance. SPR biosensors, in: Biophysics for Biomedical and Environmental Sciences (Edited by Monica Florescu), pp. 211-223, Transilvania University Press, Brasov, 2016, ISBN 978-606-19-0768-7.

2. **M. Florescu**, Biosensors as molecular diagnostic tool for early detection of cancer protein biomarkers, in: Methods for Diseases Diagnostic with Applicability in Practice, Edited by Antonella Chesca, LAP Lambert Academic Publishing, 2014, ISBN 3847345028, 978-3-8473-4502-2.

3. M. David, **M. Florescu**, M. M. Barsan, L. Tugulea and C. M.A. Brett, Development and Characterization of Layer-by-Layer Biosensors Based on PEI(+)/GOx(-) Layers Using Label-Free Methods, in Sensing in Electroanalysis, Vol. 8 (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas; Eds.), pp. 329-346. 2013/2014 University Press Centre, Pardubice, Czech Republic. ISBN 978-80-7395-782-7 (printed); 78-80-7395-783-4 (pdf).

4. V. Veregut, **M. Florescu**, M. Badea, Classic and modern methods for detection of serotonin, in Sensing in Electroanalysis. Volume 7 (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas; Eds.). pp. 97–106, 2012, University Press Centre, Pardubice, Czech Republic. ISBN 978-80-7395-563-2 (printed); 978-80-7395-564-9 (on-line).

5. V Buzea, **M Florescu**, M Badea, Detection of heavy metals in biological samples through anodic stripping voltammetry, in Sensing in Electroanalysis. Volume 7 (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas; Eds.). pp. 97–106, 2012, University Press Centre, Pardubice, Czech Republic. ISBN 978-80-7395-563-2 (printed); 978-80-7395-564-9 (on-line).

6. **M. Florescu**, Label free biosensors in human molecular diagnostics of diseases, pag. 135-147, in Diagnostic Methods in Human Pathology, Edited by Antonella Chesca, Transilvania University Press, Brasov, ISBN 978-606-19-0059-6, 2012.

7. M. David, M. Badea, **M. Florescu**, Performance evaluation of acetylcholinesterase-based biosensors for heavy metal detection, in: Sensing in Electroanalysis, Vol. 6 (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas; Eds.), pp. 337-346. 2011 University Press Centre, Pardubice, Czech Republic. ISBN 978-80-7395-434-5 (printed); 978-80-7395-435-2 (on-line).

8. M. Badea, M. Idomir, **M. Florescu**, L. Rogozea, Electrochemical sensing in telemedicine, in Sensing in Electroanalysis, in: Sensing in Electroanalysis, Vol. 6 (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas; Eds.), pp. 337-346. 2011 University Press Centre, Pardubice, Czech Republic. ISBN 978-80-7395-434-5 (printed); 978-80-7395-435-2 (on-line).

9. **M. Florescu**, Biophysical methods used for molecular diagnostics in human pathology, in Methods for Cellular and Molecular Diagnostics in Human Pathology, Eds. A. Chesca si M. Ozturk, Istanbul University Press House, 2011. ISBN 978-975-404-895-7.

10. **M. Florescu**, Mass sensitive sensors and EQCM application in life sciences in Bioanalytical Methods for Life Sciences. Chromathography. Sensors and Biosensors, Eds. M. Badea, M. Florescu, Transilvania University Press, 2010. ISBN 978-973-598-723-7.

11. I. Švancara, **M. Florescu**, L. Baldrianová, E. Svobodová, M. Stočes, M. Badea, Carbon Paste Electrodes Modified with a Hydrolytic Product Obtained from an Antimony(III) Salt, in: Sensing in Electroanalysis, Vol. 5, Eds: K. Vytřas, K. Kalcher, I. Svancara, University Press Centre, Pardubice, Czech Republic, 2010. ISBN 978-80-7395-348-5 (printed); 978-80-7395-349-2 (on-line).

12. **M. Florescu**, Dielectric spectroscopy and dielectrophoretic separation methods used in biomedical applications, in Bioanalytical Methods for Life Sciences. Chromathography. Sensors and Biosensors, Eds. M. Badea, M. Florescu, Transilvania University Press, 2010. ISBN 978-973-598-723-7.

13. M. Badea, **M. Florescu**, Gh. Coman, N. Taus, J.-L. Marty, Characterisation of electrochemical sensors and enzymatic methods used for ascorbic acid detection, in: Sensing in Electroanalysis, Vol. 4, Eds: K. Vytřas, K. Kalcher, I. Svancara, University Press Centre, Pardubice, Czech Republic, 2009. ISBN 978-80-7395-9.

14.M. Badea, **M. Florescu**, Gh. Coman, A. Chesca, J.-L. Marty, Comparative Studies for Pollutants Detection Using Electrochemical Sensors and Enzyme-Based Biosensors in: Sensing in Electroanalysis, Vol. 4, Eds: K. Vytras, K. Ka;lcher, I. Svancara, University of Pardubice, 2009. ISBN 978-80-7395-9.

Scopul tezei de doctorat în fizică a fost de **construire și evaluare a senzorilor optici și electrochimici** pentru detectarea oxigenului în medii celulare (detectarea bacteriilor vii) și a glucozei din vin.

Scopul propus a fost atins prin atingerea următoarelor **obiective**:

1. **optimizarea** compoziției unei membrane polimerice fluorescente care a reprezentat stratul sensibil al unui **senzor din fibră optică** utilizat pentru determinarea concentrației de oxigen într-un mediu celular (viabilitatea unei culturi celulare poate fi observată prin cantitatea de oxigen consumată de aceasta). Principiul de funcționare s-a bazat pe fenomenul de stingere a fluorescenței a unui fluorofor încorporat în membrana polimerică datorită prezenței oxigenului în mediul lichid analizat. Cercetarea a fost finanțată de guvernul german prin Serviciu German de Schimb Academic (DAAD) de la Institut für Chemo- und Biosensorik (Institut für Chemo- und Biosensorik), Münster, Germania.

2. **modificarea suprafeței și optimizarea** unui nou tip de electrod ceramic cu film de carbon pentru a produce biosenzori electrochimici enzimatici utili în detectarea glucozei în vin. Au fost testate **mai multe metode de imobilizare a enzimei** pe suprafața electrozilor pentru a obține biosenzorul cu cele mai bune performanțe (sensibilitate, stabilitate în timp și reproductibilitate cât mai mari). Cercetarea a fost finanțată de Comunitatea Europeană printr-o bursă Socrates/Erasmus, dar și în cadrul proiectelor europene QLK3-2000-01311 și HPRN-CT-2002-0018 la Departamentul de Chimie al Universității din Coimbra, Portugalia.

Teza de doctorat a fost publicată ca și monografie cu ISBN în editură națională:

- **Monica Florescu**, *Metode Biofizice de Analiză - Senzori și Biosenzori*, Editura Universității "Transilvania" din Brașov, 2008, ISBN 978-973-598-270-6, 114 pagini.

Scopul tezei de doctorat în medicină a fost de **dezvoltare a bioinstrumentelor** și aplicarea lor în medicină (aplicații de diagnostic molecular) folosind (nano)(bio)biosenzorii pe bază de **nanoparticule** (*biomolecule* sau *molecule artificiale*) pentru diagnosticarea timpurie și abordări terapeutice inovatoare.

Scopul propus a fost atins prin atingerea următoarelor **obiective**:

1. **dezvoltarea biosenzorilor enzimatici** pentru identificarea și cuantificarea biomarkerilor pentru *diagnosticarea timpurie și abordări terapeutice inovatoare* (dopamina și glucoza) și validarea lor pe probe reale.

2. **dezvoltarea senzorilor cu nanozime de aur** (nanoparticule de aur care mimează activitatea peroxidazelor) pentru *evidențierea și cuantificarea capacității antioxidante totale* ca marker al stresului oxidativ și validarea lor pe probe reale.

Activitatea didactică

Pe întreg parcursul carierei universitare (1998 - prezent), m-am preocupat continuu de perfecționarea activității didactice, implicându-mă activ. **Activitatea mea didactică** în cadrul Universității Transilvania din Brașov, s-a concretizat în principal prin:

1. **predare** cursuri: Biofizica, Biofizica și Fizica Medicală, Biofizica Alimentului, Fizica Moleculară și Căldură, Fizică generală, Managementul Deșeurilor medicale.
2. **predare** laboratoare și seminarii: Fizica, Biofizica, Chimie analitică, Translatarea cercetării științifice în domeniul sănătății,
3. **îndrumare** lucrări de diploma și cercuri științifice pentru participare la diferite sesiuni de comunicări științifice a studenților și,
4. **crearea și întreținerea** unei platforme elearning pentru o comunicare interactivă cu studenții (postare materiale didactice scrise și video, examinare online), (<http://biofiz.unitbv.ro/moodle/>) din 2010 până în 2020. Din 2020 activitatea a continuat pe platforma furnizată de Universitatea Transilvania din Brașov (elearning.unitbv.ro).
5. **publicarea** în edituri recunoscute CNCSIS a cursurilor, cărți și capitole în cărți, conform listei de publicații anexate,
6. **dezvoltarea** unor noi lucrări de laborator și instrumente de predare în domeniul biofizicii (crearea laboratorului de biofizica). În acest sens am creat împreună cu Dna. Conf. Natalia Dihoiu încă din 1998 Laboratorul didactic de Biofizica, corp C, sala CI30 în care și în prezent se desfășoară activități didactice și de cercetare legate de probleme specifice biofizicii.

În cadrul procesului educațional, **prezentarea cursurilor** o realizez folosind **metode moderne și tehnologii noi** (calculator, videoproiector și prezentări PowerPoint). Am încercat să îmbin într-un mod armonios, **metodele clasice de expunere și prezentarea directă** cu **metodele de prezentare interactive și multimedia** ce implică folosirea calculatorului, a internetului și a **platformei elearning**, cu o cât mai înaltă ținută academică. **Pentru o actualizare continuă a metodelor de predare am participat la cursuri de specializare pedagogică** organizate în cadrul Universității Transilvania din Brașov (*“Interactive methods for teaching-learning-evaluation process”, „Web Based Trainers – Wide Open Resource for Learning and Development”*), a altor Instituții (*VI Online e-learning seminar for university professors, The Catholic University of Ávila, Spain*), sau în cadrul schimburilor prin intermediul programului de mobilități Erasmus/ErasmusPlus (Germania, Portugalia, Turcia). Am participat, atât ca student, cât și ca profesor la diverse **scoli de vară și cursuri internaționale** (în cadrul Acțiunii COST TD 1104, LLP-Erasmus și programelor CEEPUS).

Am **îndrumat** în calitate de *coordonator/îndrumător* realizarea tezelor de licență, de disertație și de doctorat în aria de cercetare a fizicii, chimiei analitice și medicinei preclinice, dintre care prezint o selecție:

a. Simone Romano, (2009/2010), Dezvoltarea de metode bazate pe senzori electrochimici de analiză calitativă și cantitativă a metalelor grele din probele biologice. UNIVERSITA "DEGLI STUDI DI MILANO (programul Socrates), (licenta).

b. Melinda David, (2010/2011), Elaborarea biosenzorilor enzimatici amperometrici: obținerea și caracterizarea acestora, Universitatea din București și Universitatea Transilvania din Brașov, (master).

c. Alice Panerati (2013/2014), Elaborarea de metode bazate pe biosenzori electrochimici pentru analiza mico-toxinelor din suplimentele alimentare din plante, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO (activități în cadrul proiectului FP7 PlantLIBRA), (licenta).

d. Pavel Barko (2016/2017), Stresul oxidativ si beta carotenu. Detecția si evaluarea selectiva a compușilor antioxidanți, Universitatea Transilvania din Brașov, (licenta).

e. Melinda David, (2016/2017), Capitle Teza Doctorat: The characterization of biosensors by optical and electrochemical methods, Universitatea din Bucuresti (doctorat).

f. Nicoleta Sandu (Cazacu), Interacțiuni moleculare și celulare ale hormonilor tiroidieni, Universitatea din București, (doctorat).

Activitatea științifică

Activitatea mea științifică de cercetare este legata de *specializările și competențele mele* în *biofizică, electrochimie, chimie analitică, biosenzori și bionanotehnologie* obținute în urma studiilor universitare și post-universitare, școli de vară (conform CV-ului anexat). Activitatea de cercetare științifică am desfășurat-o atât in laboratorul de Biofizică al Facultății de Medicină, prin colaborări cu colegi de la *Facultatea de Medicină, Facultatea de Alimentație si Turism, dar si din Facultățile de Inginerie Electrica si Știința Calculatoarelor și de Știința și Ingineria Materialelor* din Universitatea Transilvania din Brașov, dar si cu colegi din *Universități din România și internaționale* (Europa si SUA) prin intermediul contractelor de cercetare, burselor doctorale, postdoctorale și stagiilor de cercetare.

Cercetările științifice au implicat **studenți** masteranzi și doctoranzi, dar și studenți la licență, ai Facultății de Medicină și internaționali, care au continuat colaborarea prin implicarea lor în activitatea de cercetare în domeniul biofizicii și chimiei analitice cu aplicații în domenii medicale. Ei au participat cu activitate de diseminare a rezultatelor obținute la *Sesiunile de Comunicări Științifice* ale Universității Transilvania și la *Conferințe Naționale și Internaționale* (ca membri ai echipelor proiectelor de cercetare coordonate de mine).

Parte din cercetările legate de detectarea substanțelor biologic active si a substanțelor poluante sunt realizate in cadrul unor **contracte de cercetare** împreuna cu **colaboratori din România** cum sunt Universitatea Valahia din Târgoviște, Universitatea

din București, Universitatea de Medicină și Farmacie-Carol Davila București, Institutul Național de Fizica Materialelor (INFM) și Institutul de Microtehnologie (IMT) București, Institutul Național de Tehnologii Izotopice și Moleculare (ITIM), Cluj-Napoca. Activitatea de cercetare am realizat-o în urma colaborării cu colegi și din universități *din străinătate* (SUA, Portugalia, Germania), în proiecte și stagii de cercetare, atât membru, cât și în calitate de coordonator (conform listei cu proiecte).

Stagiile de cercetare internațională au fost realizate în cadrul:

1. **Institutului pentru Nanotehnologie (MESA+)**, Universitatea din Twente, Țările de Jos, (Microfluidică pentru nanomedicină). Misiune științifică pe termen scurt, Acțiune COST TD 1104 - EP4Bio2Med, (2015).

2. **Laboratorului „Nanoscale Integration Lab”, University Texas-Dallas, Dallas, USA** (Bursa Universității Transilvania), pentru dezvoltarea nano-biosenzorilor folosind nanofire de siliciu depuse pe tranzistori cu efect de câmp (SiNW-FET), în colectivul Prof. Dr. Walter Hu (2012).

3. **Laboratorului de Biofizică, Facultatea de Fizică, Universitatea Wisconsin-Milwaukee (UWM) și Laboratorul de anesteziologie, Facultatea de Medicină, Milwaukee, Wisconsin, SUA**, în colectivele Prof. Valerică Raicu și Prof. Anthony Hudetz (stagiu postdoctoral) pentru studiul țesuturilor biologice (creier) *in vivo* și acțiunea anestezicelor prin tehnici de spectroscopie dielectrică și EEG (2007 -2008).

4. **Laboratorului de Electrochimie, Universitatea din Coimbra, Portugalia**, în colectivul Prof. Christopher Brett (bursa Erasmus) pentru construirea, caracterizarea și optimizarea biosenzorilor amperometrici pentru detecția glucozei (2002-2003, 2005-2006).

5. **Institut für Chemo- und Biosensorik, Muenster, Germania** (bursă DAAD) pentru construirea și optimizarea senzorilor optici pentru detecția celulelor vii (2002).

I.2 PRINCIPALELE REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE

După obținerea titlului de doctor în fizică în 2007, am continuat și dezvoltat activitatea de cercetare în domeniul interdisciplinar al biofizicii, după următoarele direcții:

- **dezvoltarea de platforme inovatoare de detecție moleculară și livrare, bazate pe senzori electrochimici și nanostructuri**, pentru compuși de interes în medicină, în monitorizarea mediului sau a calității alimentelor. În acest scop a fost urmărită și **reglarea proprietăților suprafețelor pentru a interacționa specific cu un sistem (bio)molecular țintă** prin: funcționalizarea și modificarea suprafețelor solide, optimizarea suprafețelor prin asamblare strat cu strat, imobilizarea biomoleculelor pe suprafețe funcționalizate.

- **analiza interacțiunilor biomoleculare** (proteine-medicament, lipozomi-medicament, nanoparticule-biomolecule) folosind *metodele electrochimice și rezonanța*

plasmonilor de suprafață (SPR) în combinație cu metodele standard de spectroscopie UV-Vis și fluorescență.

- **caracterizarea electrochimică și testarea rezistenței la coroziune a materialelor și biomaterialelor cu aplicații în implanturi medicale.**

Prima direcție de cercetare a vizat activități începute în timpul doctoratului în fizică, iar celelalte două au fost dezvoltate ca cercetări noi, ulterioare obținerii titlului de doctor. Cele 3 direcții în care mi-am desfășurat activitatea au un caracter interdisciplinar, fapt care s-a remarcat și în publicarea rezultatelor.

Activitatea de cercetare științifică s-a concretizat sub forma:

1. Publicarea articolelor științifice

În reviste de specialitate naționale și internaționale: **54 lucrări** publicate în reviste incluse în **Web of Science's (WoS) Science Citation Index Expanded (ISI)**, **11 lucrări** publicate în extenso în volumele unor *conferințe științifice internaționale și naționale cu editori*, ISBN și edituri internaționale, **16 articole** publicate în reviste cotate *BDI*, **peste 100** de participări la *conferințe internaționale și naționale*, **30 cărți/capitole de cărți** din care 10 ca autor în edituri internaționale și 9 în edituri naționale, 11 ca editor în edituri naționale (conform secțiunilor de mai jos generate de căutările în trei baze de date și a anexelor).

În perioada **2007-2023**, am publicat **45 lucrări** indexate în *Web of Science's (WoS) Science Citation Index Expanded (ISI)*, WoS din care **33 în calitate de autor principal** (prim autor și autor de corespondență), 1 teză de doctorat.

Informații din baza de date Clarivate Web of Science (WoS)

Până în prezent am publicat ca autor principal sau coautor **52 de publicații** (42 de articole publicate în jurnale, 2 articole publicate în Proceedings-urile conferințelor internaționale și 8 rezumate indexate WoS)(Fig. 1).

Index H = 16, iar articolele au primit **835 citări fără autocitări**. În Fig. 1 este prezentat graficul distribuției publicațiilor și citărilor pe ani din 2004 până în prezent

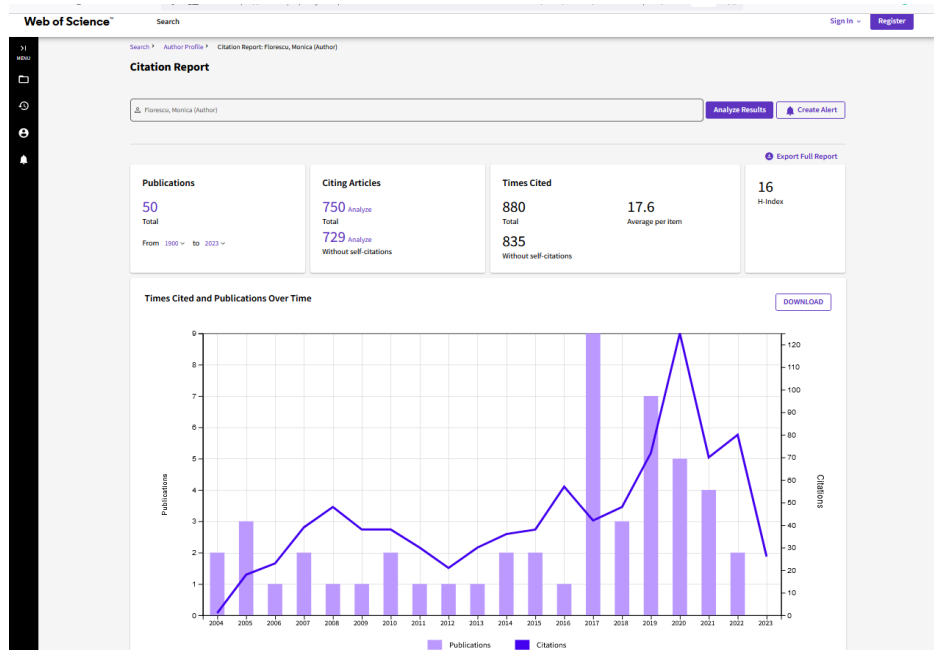


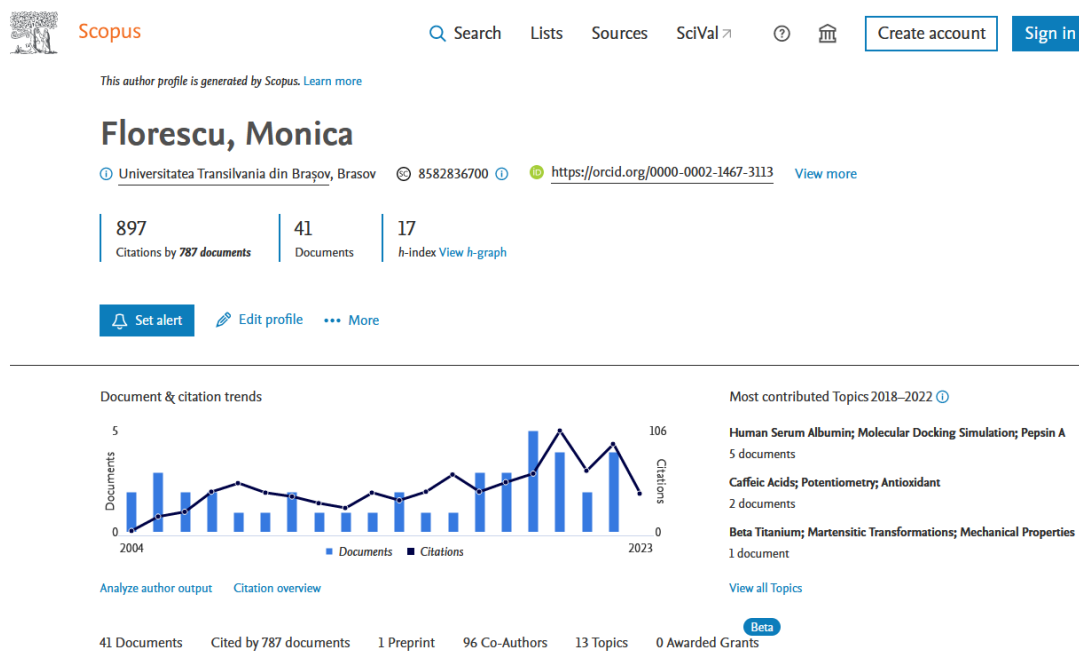
Fig. 1. Rezultatul căutării în WoS după: „Florescu Monica” ResearchID: B-5022-2008 (27.07.2023)

(27.07.2023).

Informații din baza de date Scopus

Căutarea în baza de date Scopus a generat **41 documente** care au fost **citate de 897 de ori** și un **h-index =17** conform Fig. 2 (27.07.2023).

Dintre acestea **80,5%** au fost încadrate la categoria *Article*, **9,8 %** în categoria *Conference Paper*, **4,9 %** ca *Editorial*.



41 documents

Fig. 2. Rezultatul căutării în Scopus după: „Florescu Monica” Author ID: 8582836700 (27.07.2023)

Din punct de vedere a tematicilor 30,1 % au fost publicate în domeniul *Chemistry*, 16,1% în *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* și *Physics and Astronomy*, 6% în domeniul *Medicine*, restul fiind în diferite domenii de *inginerie*.

Informații din baza de date Google Scholar

Această bază de date indică **1229 de citări** în WoS și diverse baze de date BDI, din care 602 în perioada 2008 – 2023, **h-index = 18** și **i10-index = 25** (Fig. 3) (27.07.2023).

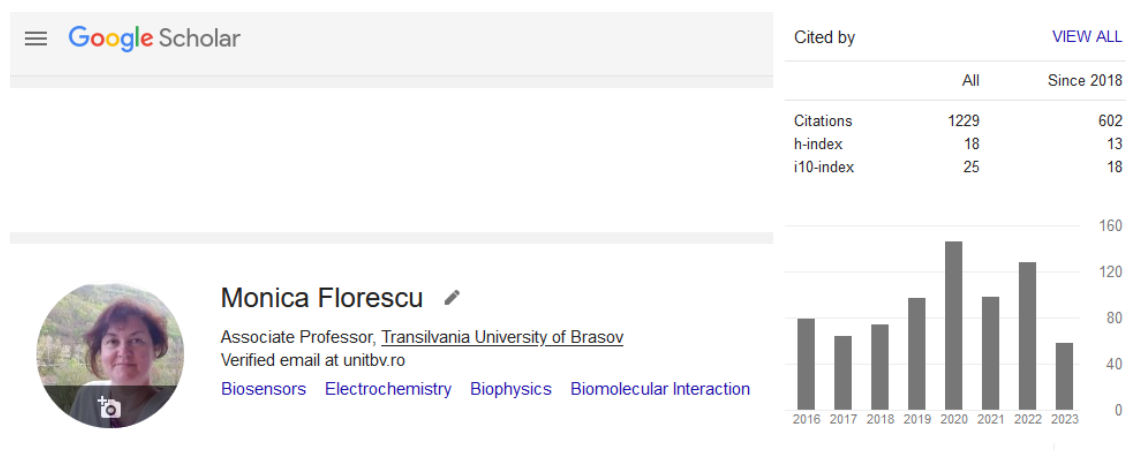


Fig. 3. Rezultatul căutării în Google Scholar după: „Florescu Monica” (27.07.2023)

Distribuția articolelor publicate în perioada 2007 – 2022 după **tipul de autor** (autor principal – coautor) și **factorul de impact cumulat** sunt prezentate în Tabelul 1.

Anul publicării	Total lucrări	Autor principal	Coautor	Total IF	IF Autor principal
2007	2	2	0	3,211	3,211
2008	1	1	0	0,577	0,577
2009	1	0	1	3,757	0,000
2010	2	0	2	4,225	0,000
2011	1	1	0	1,150	1,150
2012	1	0	1	2,404	0,000
2013	1	1	0	2,474	2,474
2014	2	0	2	5,117	5,117
2015	2	1	1	2,854	0,383
2016	1	1	0	1,150	1,150
2017	10	9	1	19,166	14,086
2018	3	3	0	7,579	7,579
2019	7	5	2	20,155	15,500
2020	4	2	2	10,990	5,903
2021	3	3	0	3,828	3,828
2022	4	4	0	18,080	18,080
Total	45	33	12	106,717	79,038

2. Coordonarea proiectelor de cercetare

Publicațiile au fost obținute atât ca rezultat al unor teme de cercetare proprii, cât și în cadrul proiectelor de cercetare obținute prin competiție, ca director, dar și ca membru al echipelor de cercetare în alte proiecte naționale și internaționale.

Proiecte de cercetare-dezvoltare ca **director/responsabil de proiect** din partea Universității Transilvania din Brașov:

- 2.1. **2022-2024: Responsabil de proiect pentru UTBV** al proiectului de cercetare experimental demonstrativ (PED), PN-III-P2-2.1-PED-2021-1323: *Noi nanostructuri proteice hibride pentru direcționarea specifică în celulele tumorale ale colonului - Prot-Col-Target*, **Grant Nr. 582PED/2022.**
- 2.2. **2018-2021: Responsabil de proiect pentru UTBV al proiectului de cercetare complex** (6 parteneri): PNIII-P1-1.2-PCCDI-2017-0062, *Noi metodologii de diagnostic și tratament: provocări actuale și soluții tehnologice bazate pe nanomaterial și biomaterial - SANOMAT.* **Grant No. 58PCCDI/2018.**
- 2.3. **2018-2020: Responsabil pentru România în cadrul comitetului de conducere al COST Action CA15126:** *Between Atom and Cell: Integrating Molecular Biophysics Approaches for Biology and Healthcare (MOBIEU).*
- 2.4. **2015 -2017: Director al proiectului de cercetare Tinere Echipe** PN-II-RU-TE-2014-4-2801: *Cercetări privind detectarea substanțelor bioactive din extracte de resurse vegetale cu capacități antioxidante - VEDETAX.* **Grant Nr. 199/2015.**
- 2.5. **2010-2018: Director pentru 4 proiecte de cercetare** pentru organizarea de întâlniri științifice. **Grants No: 10M/2018, 48M/2016, 18M/2014, 48M/2010.**
- 2.6. **2008 -2011: Responsabil de proiect pentru UTBV al proiectului de cercetare complex (4 parteneri):** *Tehnici de înaltă precizie și sensibilitate aplicate în rețelele de biomonitorizare de poluare a mediului cu factori de poluare din regiunile de dezvoltare de sud, sud-est și centrale din România – TIPSARMER.* **Grant No. 72-172/2008.**

3. Cereri pentru brevet

Rezultatele activităților de cercetare s-au concretizat și în de punerea a două cereri de brevet:

- 6.1. **M. Florescu, M. David, A. Serban,** "RO135256A0 *Platforma senzorială electrochimică nanostructurată, metoda de calibrare a platformei și metoda de utilizare pentru detectarea portabilă, sensibilă și selectivă a conținutului de tiroxină*". A 00239/11.05.2021 (OSIM).
- 6.2. **M. Florescu, M. David, A. Serban,** "Procesul RO133102A0 *pentru determinarea electrochimică rapidă a capacității antioxidante totale a extractelor vegetale solubile în apă folosind o platformă electrochimică portabilă cu nanoparticule de aur*". A/00728/27.09.2018 (OSIM).

4. Participare la conferințe

Diseminarea rezultatelor de cercetare am realizat-o și prin participarea la conferințe naționale (16) și internaționale (91). Acestea au fost prezentate sub formă de postere și prezentări orale, din care 10 au fost invitate, keynote sau plenare:

- 7.1. **M. Florescu***, M. David, Functional nanostructured materials: A biophysical insights for molecular detection and delivery systems, 14th International Conference on Processes in Isotopes and Molecules, 19 - 22 September 2023, Cluj-Napoca, Romania. **Plenary Presentation.**
- 7.2. M. David, **M. Florescu**, Electrochemical (bio)sensors for label-free analysis of biomolecules: from proof of concept to medical applications, The 8th Annual Conference of AnalytiX, July 12-14, 2023, Amsterdam, The Netherlands. **Invited Presentation.**
- 7.3. **M. Florescu***, C. G. Chilom, M. David, Spectroelectrochemical evaluation of the interaction of pharmaceutical compounds with serum proteins and liposomes for drug delivery systems, The 8th Annual Conference of AnalytiX-2023, May 17-19, 2023, Osaka, Japonia. **Invited Presentation.**
- 7.4. **M. Florescu***, M. David, Nanomaterials and green synthesized nanocomposites for nano-biosensors, World Conference on Advanced Materials, Nanoscience and Nanotechnology (WCAMNN-2022), October 27-28, 2022, Valencia, Spain. **Keynote presentation.**
- 7.5. **M. Florescu***, M. David, Development and Evaluation of Composite Nanomaterials used in Medical and Biosensing Applications, 3rd Global Webinar on Materials Science and Engineering, GWMSE – 2022, 14-15 March, 2022. **Plenary Presentation.**
- 7.6. **M. Florescu***, I. Milosan, M. David, Evaluation of corrosion behaviour of stainless steel treated with solar energy to be used as implant biomaterial, 5th International Symposium on Nanoparticles and Nanomaterials and Applications, ISN2A 2022, 24 – 27 January 2022, Caparica. Portugal. **Invited Presentation.**
- 7.7. M. David, **M. Florescu***, Electrochemical biotransducers for label-free analysis of biomolecules: from proof of concept to medical applications, 6th International Conference on Biomaterials and Biosensors, BIOMATSEN 2021, 17 – 23 October 2021, Muğla, Turkey. **Invited Presentation.**
- 7.8. **M. Florescu***, Spectroscopic evaluation of vitamins effect on the BSA - LT4 complex, 13th International Conference Processes in Isotopes and Molecules, 22-24 September 2021, Cluj-Napoca, Romania. **Invited Presentation.**
- 7.9. **M. Florescu***, M. David, Label-free analysis of biomolecules: enzyme vs. nanozyme-based sensors, 12th International Conference on Processes in

Isotopes and Molecules, 25-27 September 2019, Cluj-Napoca, Romania. **Plenary Presentation.**

7.10. **M. Florescu***, M. David, Madalina M. Barsan and C. M.A. Brett, Layer-by-layer biosensors based on electrostatic adsorption: development and characterization using label-free methods, 2nd International Conference on Analytical Chemistry – Analytical Chemistry for a Better Life, 17-21 Septembrie, 2014, Targoviste, Romania. **Keynote Presentation.**

5. **Membru în colectivul editorial** al revistelor: *Journal of Clinical Medicine, Analytical Letters, Medicines.*

6. Recunoaștere științifică

6.1. Referent pentru reviste WoS:

Până în prezent, am fost invitată să fiu recenzor pentru manuscrise trimise spre publicare la mai multe jurnale indexate WoS, enumerate mai jos (cu factor de impact în WoS între 2.0 și 7.392): *ACS Biomaterials Science & Engineering, Analytica Chimica Acta, Analytical Letters, Antioxidants Applied Surface Science, Bioelectrochemistry, Bioengineering, Biomolecules, Catalysis Today, Catalyst, Current Analytical Chemistry, Current Pharmaceutical Analysis, Diseases, Electroanalysis, Electrochimica Acta, Food Analytical Methods, IEEE Transactions on Electron Devices, Instrumentation Science & Technology, International Journal of Biological Macromolecules, International Journal of Molecular Sciences, Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, Journal of Electroanalytical Chemistry, Journal of Functional Biomaterials, Journal of Molecular Structure, Journal of Non-Crystalline Solids, Langmuir, Materials, Materials Research Bulletin, Materials Today Communications, Metals, Microchemical Journal, Molecules, Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, Sensors and Actuators B, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Surface Review and Letters.*

6.2. Referent pentru competiții de proiecte naționale și internaționale.

Am fost recenzor pentru evaluarea propunerilor de proiecte:

- naționale: *PNIII-UEFISCDI, Romania,*
- internaționale: *M-ERA.NET, EU and Romania, FWO, Belgium*

6.3. Premii și burse

- 2022: The best poster, 5th International Symposium on Nanoparticles, Nanomaterials and Applications, ISN2A 2022, Caparica, Portugal.
- 2019: Biophysical Society Travel Award for 63rd Annual Meeting, March, 2019, Baltimore, USA.
- 2015: Short-Term Scientific Mission, COST TD 1104 Action - EP4Bio2Med, Institute for Nanotechnology (MESA+), University of Twente, The Netherlands,

- 2012: Research Internship: Nanoscale Integration Lab, University of Texas-Dallas, USA.
- 2005-2006: PhD Research Internship at "University of Coimbra", Coimbra, Portugal,
- 2002-2003: Erasmus PhD Scholarship at "University of Coimbra", Coimbra, Portugal.
- 2002: PhD Short-term scholarship DAAD (German Academic Exchange Service) at "Institut für Chemo- und Biosensorik", Münster, German).

7. Activitate de editare.

Am coordonat editarea unor numere speciale ale unor jurnale științifice ca **editor asociat/invitat** al revistelor cotate WoS: *Journal of Clinical Medicine*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Bioelectrochemistry*, *Sensors*, *Analytical Letters*, *Biosensors*, *Frontiers In Molecular Biosciences*,.

8. Organizarea manifestărilor științifice:

- 8.1. **Conferința Internațională** „*Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences - IC-ANMBES*”. **Co-presedinte și presedinte al comitetului de organizare** a 6 ediții (2010, 2012, 2014, 2016, 2018, 2022) (icanmbes.unitbv.ro).
- 8.2. Școală de vară „*8th International Student Summer School “Nuclear Physics – Science and Applications”* (NUCPHYS-SC&APPL), 2017, Brasov, Romania. **Responsabil pentru Romania si Presedinte al Comitetului de Organizare.** Organizat împreună cu Institutul Comun de Cercetare Nucleară (JINR), Dubna, Federația Rusă.

9. Membru al asociațiilor profesionale:

- Romanian Society of Pure and Applied Biophysics,
- European Biophysical Societies Association,
- Biophysical Society,
- Bioelectrochemical Society,
- Romanian Society of Physics.

Domenii de cercetare abordate în această teză:

1 Studiul interacțiunilor și a reacțiilor (bio)moleculare

Obiective:

- a. *modificarea suprafețelor* (cu enzime naturale și artificiale, nanostructuri și filme polimerice) și *optimizarea parametrilor* de imobilizare.

- b. *evaluarea interacțiunilor moleculare* dintre straturile moleculare folosite la modificarea suprafețelor senzoriale (filme subțiri, stratificate și nanostructurate, biomolecule).
- c. *studiul interacțiunilor biomoleculare* implicate în sistemele de transportul al medicamentelor (proteine–medicamente, nanofibre-biomolecule),

2 Dezvoltarea platformelor senzoriale pentru detecția biomoleculor

Obiective:

- a. *identificarea și optimizarea metodelor* de detecție (microscopie, spectroscopia UV-VIS și spectroscopia plasmonilor de rezonanță - SPR, fluorescență și stingerea fluorescenței), de electrochimie (voltametrie și spectroscopia de impedanță electrochimică).
- b. *dezvoltarea și optimizarea platformelor cu senzori și biosenzori* pentru utilizarea lor în detecția substanțelor biologic active, a medicamentelor, vitaminelor hidro- și liposolubile și a ionilor metalelor grele,
- c. *identificarea și optimizarea metodelor* pentru determinarea caracterului antioxidant total al extractelor din plante.

I.3 CONTEXTUL ȘTIINȚIFIC ACTUAL PRIVIND IMPORTANȚA DOMENIILOR DE CERCETARE ABORDATE

Abordări spectro-electrochimice pentru studiul interacțiunilor biomoleculare și noi metodologii de diagnostic și terapie în medicină

Pentru **detectarea timpurie** a afecțiunilor importante sau **monitorizarea terapierilor** sunt luate considerare **noi modalități de detecție** cu ajutorul cărora să se obțină într-un mod facil, dar cât mai sensibil și precis, **identificarea, cuantificarea și monitorizarea biomoleculilor (biomarkeri sau medicamente)**. Studii au demonstrat ca **patologia și alimentația pacienților influențează și interacțiunea dintre proteinele transportoare și medicamente** administrate care ajung în circulația sistemică, respectiv **biodisponibilitatea lor și abordările terapeutice**.

Platformele senzoriale sunt potrivite pentru **dezvoltarea metodelor de diagnostic molecular *in vitro***. Răspunsul acestora se obține în timp real, cu o foarte mare sensibilitate și selectivitate. *Monitorizarea facilă sau auto-monitorizarea* oricărui medicament administrat reprezintă un **instrument valoros atât pentru diagnosticarea timpurie**, dar poate furniza și informații în timp real pentru **ajustarea terapiei, a alimentației și a activității fizice** în scopul atingerii unei biodisponibilități cât mai mari.

Stabilitatea sistemelor senzoriale și de administrare a medicamentelor, dar și **performanțele** lor, depind atât de *procedeul de fixare/imobilizare* a moleculelor **receptor**, cât și de *matricea folosită* pentru imobilizarea lor pe suprafața senzorilor, care să le **conserve activitatea** (ex. să se *prevină denaturarea biomoleculilor, orientările nefavorabile să fie cât mai puține, iar centrul activ sa nu fie ascuns sau ecranat*).

Pentru obținerea și optimizarea **acestor sisteme** este necesară, **evaluarea interacțiunilor (bio)moleculare**, atât implicate în modificarea suprafețelor senzorilor, cât și între **straturile moleculare imobilizate/transportatoare și moleculele detectate/medicament**.

Materialele folosite, atât cele senzoriale, cât și transportoare au rol foarte important. **Carbonul și aurul** sunt materiale senzoriale biocompatibile și au fost folosite **în această teză** pentru obținerea **platformelor senzoriale electrochimice** pentru detecția moleculară și evaluarea lor prin **studiul interacțiunilor biomoleculare**.

Interesul pe plan internațional pentru dezvoltarea acestor tipuri de sisteme este dat de numărul mare de publicații în aceste două direcții de cercetare. Până în luna **august 2023** baza de date **Clarivate Web of Science** a indexat după cuvântul cheie „**electrochemical sensors**” 65896 publicații, din care se remarcă: 4139 pentru „**electrochemical sensors AND diagnosis or diagnostic**” cu 2550 publicate în *ultimii 5 ani*. Când căutările sunt realizate după „**electrochemical sensors AND therapy**” 576 de publicații au fost indexate, din care 334 în *ultimii 5 ani*. Cele mai multe studii sunt publicate pe acest topic de cercetători din China (21071), SUA (7492), India (6675), Iran (4328) și Coreea de Sud (3005).

Pentru căutarea similară au fost indexate *8589 publicații* după *cuvântul cheie în Topic „biomolecular interactions”*, din care *2461* au fost publicate *în ultimii 5 ani*. Cele mai multe studii sunt publicate de colective de cercetare din SUA (3060), China (1000), Germania (894), Marea Britanie (604) și India (546).

Există interes și la **nivel național** pentru cercetarea științifică în ambele domenii. Pentru *cuvântul cheie în Topic „electrochemical sensors”* au fost regăsite *820* de publicații în domeniul *„electrochemical sensors”*, cele mai multe (*90*) fiind publicate în colectivul de la Universitatea de Medicină și Farmacie, Cluj Napoca al Prof. C. Cristea și Prof. R. Săndulescu (*50*) și Universitatea Politehnica din București (colectivul Prof. R.I. Stefan van Staden cu *65* de publicații). Pentru cuvântul cheie *„biomolecular interactions”* cercetările științifice sunt mai reduse, căutarea generând *30* de publicații, din care *4* au fost sub coordonarea mea (M. Florescu), iar câte *3* în colectivele din București (M. Gheorghiu la Institutul de Biodinamică și Conf. C. G. Chilom la Facultatea de Fizică).

În scopul dezvoltării și optimizării sistemelor senzoriale suprafața senzorilor a fost modificată prin diferite strategii. În unele cazuri suprafața senzorului a fost în prealabil pre-tratată pentru *introducerea unor grupări funcționale* sau a unui compus cu rol de *mediator electronic*. În cazul biosenzorilor, biomoleculele au fost fixate pe suprafața senzorilor prin *imobilizare chimică sau fizică*. **Imobilizarea biomoleculelor**, indiferent de metoda folosită, influențează performanțele acestora inducând *modificări ale conformației și activității lor biologice*. Aceste *inconveniente* pot fi **depășite** prin folosirea unor **nanomateriale care pot îmbunătăți performanțele de detecție sau administrare a sistemelor discutate și nu necesită condiții speciale**.

Obiectivele specifice ale activității mele științifice au fost realizate prin **continuarea activității începută în cadrul doctoratului în fizică**, dar și prin dezvoltarea unor **noi direcții de cercetare**. Acestea vor fi prezentate mai jos în cadrul afirmațiilor enumerate mai sus.

Materiale și echipamente

Materiale

Toți reactivii au fost de puritate analitică.

Electroliti folosiți au fost soluții tampon, cu pH-ul corespunzător fiecărei situații experimentale. Apă deionizată cu rezistență $>18 \text{ M}\Omega$, a fost folosită pentru prepararea tuturor soluțiilor. Soluțiile de lucru pentru dopamină, acid ascorbic, acid uric, acid folic, vitamine, levotiroxină au fost preparate zilnic, experimentele s-au realizat la temperatura camerei (aproximativ 22°C).

Probe reale: soluție de clorhidrat de dopamină (5 mg / ml) pentru injecții intravenoase de 10 ml (Zentiva). Soluția apoasă de glucoză a fost preparată 24 de ore înaintea efectuării măsurătorilor, pentru a se obține forma biologic activă ($\alpha\text{-D-glucoză}$).

Prepararea extractelor din plante: Două metode de extracție au fost utilizate: extracția asistată cu ultrasunete (US) și extracția cu solvent la presiune crescută, 6,7 bar (T). Florile de lavandă (Lf) și boabele de cătină (Hf) au fost uscate, sfărâmate și cernute. Pentru toate extracțiile, plantele uscate și solventul de extracție au fost amestecate într-o proporție de 1 g/100 ml. Soluțiile apoase ale solventului de extracție s-au preparat prin amestecarea cu apă în raport 1: 1 a etanolului (A), glicerinei (G) sau propilenglicolului (Pg). Pentru prepararea solventilor de extracție au fost utilizate două tipuri de apă cu valori diferite ale pH: apă "a" (pH 2,5) și apă "b" (pH 9,5).

Echipeamente și metode

Platforma senzorială pentru experimentele electrochimice a constat din interfața electrochimică (potențiostate PalmSens3, PalmSens BV, Olanda; μ -Autolab de tip II și Autolab, Metrohm-Autolab, Utrecht, Olanda) conectată la o celulă electrochimică cu trei electrozi și controlată de un computer prin intermediul unui soft dedicat (Fig. 1A).

Celula electrochimică conține trei electrozi imersați într-un electrolit:

- un *fir de platină* ca electrod auxiliar și
- un *electrod de referință*: Ag/AgCl (KCl 3 M), Ag, Ag/AgCl.
- un *electrod de lucru* = **senzorul** (Fig. 1B-E) care a constat din:
 - electrod tip **bară de aur învelit** cu strat de teflon, cu suprafața de 0.00785 cm²
 - plăcuțe de **sticlă acoperite cu film de aur** (senzori SPR), cu suprafața de 2,0 cm², împreună cu un fir de Pt și un electrod de referință de Ag, folosiți într-o celulă electrochimică Bionavis de 100 μ l.
 - electrozi **tipăriți cu filme de carbon cu CoPC și aur**, cu suprafața de 0,5024 cm²; electrodul auxiliar a fost Ag și pseudo-referința Ag/AgCl.
 - electrozi **tipăriți de aur** (DRP-220AT, DropSens, Asturias, Spania), cu suprafața de 0,1256 cm²; electrodul auxiliar a fost Ag și pseudo-referința Ag/AgCl.
 - electrozi **tipăriți cu film de carbon modificați cu nanoparticule** (DropSens, Asturias, Spania), (NP-SPE). cu suprafața de 0,1256 cm²; electrodul auxiliar a fost Ag și pseudo-referința Ag/AgCl.

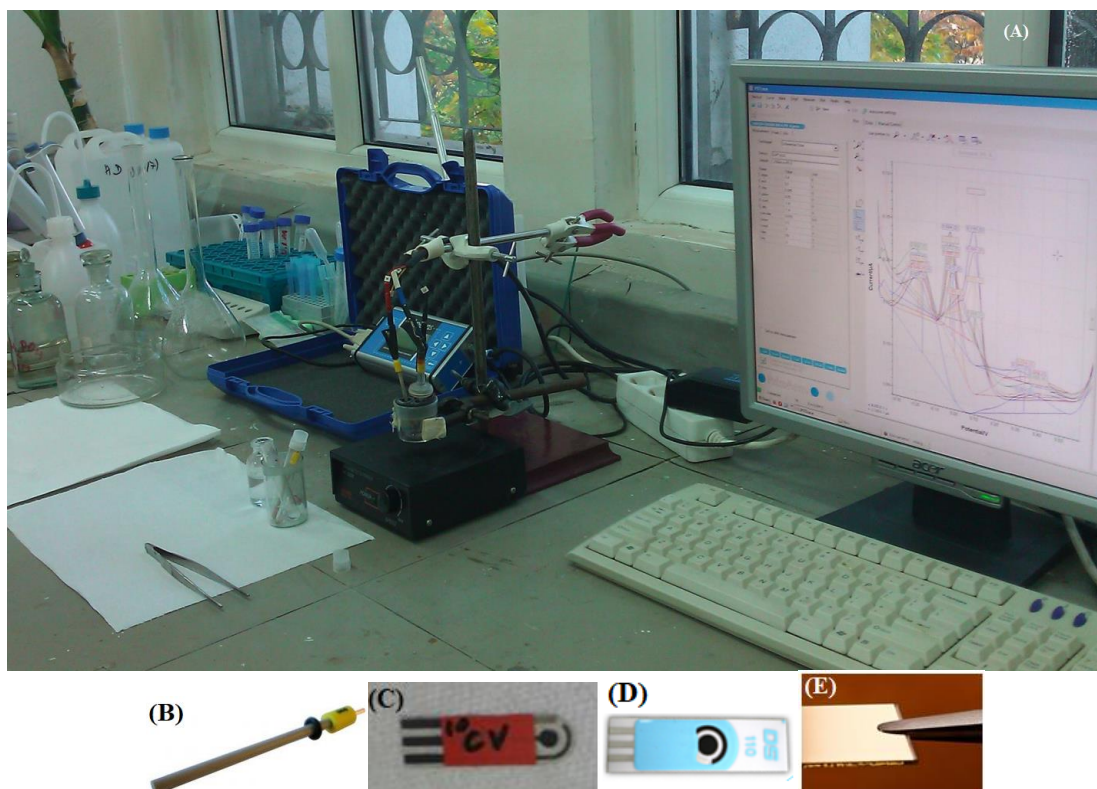


Fig. 1. (A) Montajul experimental format din celula electrochimică cu cei trei electrozi. Senzori: (B) Electrode bară de aur. (C) CoPC-SPE. (D) NP-SPE. (E) Disc cu film de aur.

Electrozii, de aur (**bară și film subțire**) și **tipăriți sau cu film de carbon modificați cu CoPC**, au fost folosiți atât **simpli**, cât și cu **suprafețe funcționalizate**:

Funcționalizarea s-a realizat prin:

- (i) **chemosorbția moleculelor** pe suprafața de Au prin intermediul legăturilor Au-S: cu Cys (senzori SPR și electrochimici),
- (ii) **depunerea** pe suprafața de Au a unor **filme subțiri de polimer redox** (CoP) (senzori electrochimici) și **conductor** (PEDOT) (senzori SPR).
- (iii) **Senzorii CoPC-SPE** au fost utilizați fără **nicio funcționalizare**, filmul de carbon prezentând grupări carboxil și hidroxil intrinseci funcționalizați cu CoPC care a avut și rol de mediator electrochimic.

Metodele de caracterizare, identificare și cuantificare au fost:

Electrochimice: voltametrie ciclică (CV) și voltametrie în puls diferențial (DPV), spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS),

Optice: rezonanța plasmonilor de suprafață (SPR).

Spectrofotometrice: Absorbție UV-Vis.

Detalii se află în publicațiile corespunzătoare.

1. Studiul interacțiunilor și reacțiilor (bio)moleculare

Pentru dezvoltarea unor **noi modalități de diagnostic și terapie**, din ce în ce mai mult noi **platforme senzoriale** și noi **sisteme de administrare a medicamentelor** sunt luate în considerare cu ajutorul cărora se obțin **identificarea și monitorizarea biomarkerilor**, dar și **abordări terapeutice inovatoare**.

Obiective:

Pentru toate acestea este nevoie de o **evaluare** foarte amănunțită a **interacțiunilor** și a reacțiilor **(bio)moleculare** care permit:

- **optimizarea modificării suprafețelor** pentru dezvoltarea ulterioară a *noi platformelor senzoriale (detecția moleculară specifică)*, și
- **studierea mecanismului de legare a medicamentelor de transportori** (ex. *albuminele serice*) și a **stabilității complexului transportor-medicament** pentru obținerea ulterioară a *noi sisteme de administrare a medicamentelor (abordări terapeutice inovatoare)*.

1.1. Optimizarea modificării suprafețelor

Parametrii platformelor senzoriale și de transport a medicamentelor pot fi îmbunătățiți prin **modificarea suprafețelor lor active** cu ajutorul unor **componente biologice, artificiale sau combinația lor**, cu rol de **recunoaștere (receptori)** a moleculelor țintă (**liganzi**).

O **modificarea a suprafeței active** poate fi realizată prin:

- *filme polimerice subțiri și/sau nanostructurate* ori prin
- *auto-asamblarea* monostraturilor biomoleculare (arhitecturi strat-pe-strat (Layer-by-Layer, LbL))

Aurul și carbonul (sub diferite forme) sunt **materiale senzoriale** des folosite, dar s-a dovedit ca ele nu prezintă selectivitate atunci când sunt folosite pentru identificarea și cuantificarea electrochimică a moleculelor de interes medical, cum sunt dopamina (DA) și glucoza în prezența interferentului acid ascorbic (AA), sau levotiroxina (LT4) în prezența altor fenoli (tirozina). Pentru că **selectivitatea** este un factor important al performanței unei platforme senzoriale, s-a impus **necesitatea modificării suprafeței senzorilor** din aceste materiale.

Astfel, modificările au fost realizate cu filme subțiri ai unei metaloporfirine, *cobalt(II)2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfinic (CoP)*, cu structuri moleculare stratificate (LbL), nanoparticule carbonice (*nanotuburi de carbon (CNT) și grafenă (G)*) și de aur (*AuNP*), dar și enzime (*tirozinaza (Tyr), glucozoxidaza (GOX)*).

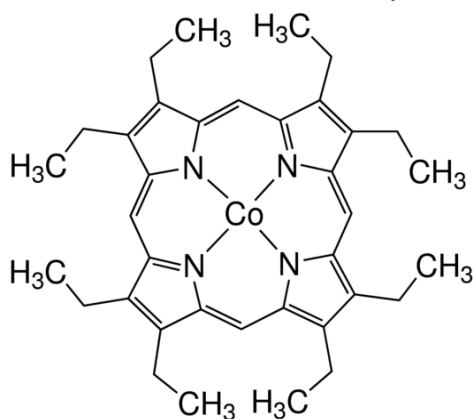
Porfirina este un *compus chimic* care posedă legături π conjugate și substituenți diferiți legați în jurul acestuia. Există situația în care porfirina poate **ceda doi ioni de hidrogen**, conducând la sisteme de **porfirină cu ioni metalici** (*metaloportirine*), cum este **cobalt(II)2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfinic (CoP)**, care are caracteristici ce le permite să fie folosite în dezvoltarea platformelor senzoriale: *excitații energetice scăzute în regiunea spectrală vizibilă, acceptă sau cedează cu ușurință electroni*. Acesta poate fi folosit pentru modificarea suprafețelor de aur sub forma unui **film polimeric redox** subțire.

Un alt compus cu cobalt a **fost ftalocianină de cobalt (II) (CoPC)**, care este un membru al ftalocianinelor metalice (MPcs) și este frecvent utilizat în senzorii chimici ca mediator care facilitează transportul sarcinii electrice, fiind un material semiconductor de tip p.

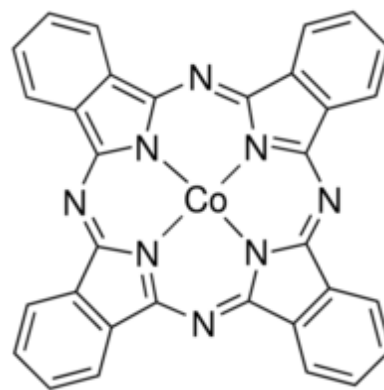
Suprafețele pot fi modificate și prin **arhitecturi LbL** obținute prin depunerea straturilor moleculare de polielectroliti (bistraturi). Suprafețele pot fi de aur simplu sau modificat cu un film polimeric subțire de **poli(3,4-etilendioxitiofen) (PEDOT)** sau filme de carbon modificate cu **ftalocianină de cobalt (II) (CoPC)**. **Polielectroliti** folosiți:

- polietilenimina (PEI)* = polication și *glucozoxidaza (GOX)* = polianion
- GOX** incorporată în *chitosan*, **{chit⁺(GOx)}** = polication, și *poli(stiren sulfonat) (PSS⁻)* = polianion.

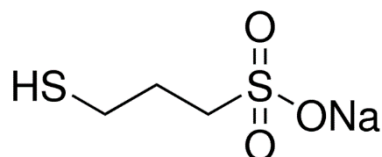
2. Moleculele folosite sunt prezentate mai jos (<https://www.sigmaaldrich.com/>):



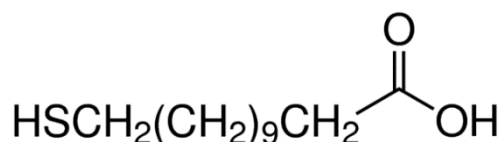
cobalt(II)2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-
21H,23H-porfinic (CoP)



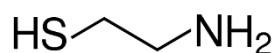
ftalocianină de cobalt (II) (CoPC)



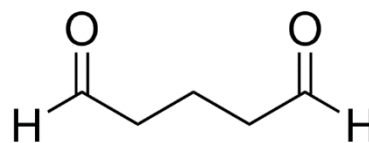
3-mercupto-1-propansulfonat de sodiu (MPS)



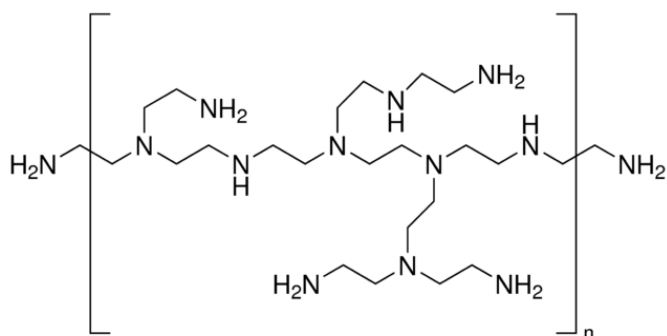
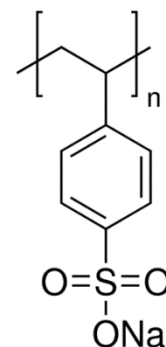
acid 11-mercuptodecanoic (MUA)



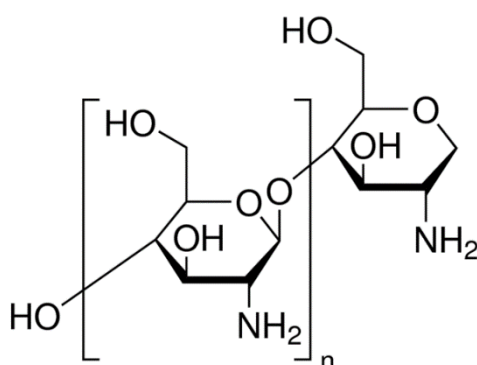
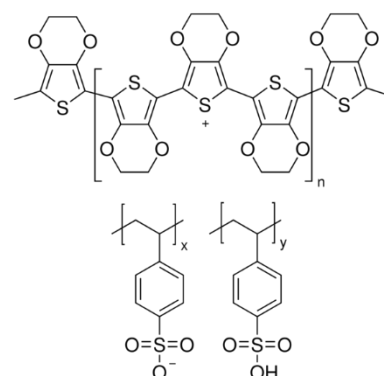
cisteamină (Cys)



glutaraldehidă (GA)

polietilenimină (PEI)
(NaPSS)

poli(4-stirensulfonat de sodiu)

Chitosan (chit)
(PEDOT)

poli(3,4-etilendioxitiofen)

Implicarea unei **enzime** pentru oxidarea catalitică a biomarkerilor (dopamina, glucoza) permite diminuarea potențialului de oxidare relativ mare (energia de activare) a detecției oxidative directe la suprafața senzorului.

Tirozinaza (Tyr) este o metaloenzimă, care la nivelul sitului activ enzimatic posedă doi ioni de cupru, făcând posibilă astfel acțiunea oxido-reducătoare asupra substratului enzimatic (ex. dopamina) prin transferul reversibil al electronilor folosind ionii de cupru (Cu^+ ; Cu^{2+}).

Glucozoxidaza (GOX) este o enzimă din clasa oxireductazelor care catalizează reacțiile de oxidare ale glucozei prin transferul hidrogenului preluat de la substrat pe oxigenul molecular.

Metodele de caracterizare au fost:

Electrochimice: CV, DPV, EIS,

Optice: SPR.

1.1.1. Caracterizarea electrochimică a modificării suprafețelor.

A. Suprafețe modificate cu CoP și Tyr.

Detecția și cuantificarea neurotransmițătorilor sunt foarte importante în domeniul neuroștiințelor, tratamentul actual fiind arbitrar, bazat pe observațiile clinice ale pacientului. Dopamina (DA), este un neurotransmițător legat de o varietate mare de afecțiuni medicale, fiind acceptat și ca biomarker de prognostic. Astfel, cuantificarea ei prezintă un interes foarte mare.

Suprafețele de aur modificate (S-CoP și S-CoP-Tyr) au fost folosite pentru detecția dopaminei (DA) prin integrarea lor în platforme senzoriale electrochimice (secțiunea 2.1).

Pentru obținerea senzorului S-CoP suprafețele de aur au fost modificate prin fenomenul fizic de adsorbție cu film de CoP prin imersie în soluție proaspătă de CoP dizolvat în cloroform. După uscare în aer filmul adsorbit a fost păstrat în soluție tampon fosfat (NaPB) pentru a evita interacțiunea filmului de porfirină cu moleculele de gaz.

Pentru biosenzorul bazat pe tirozinază (Tyr), după modificarea suprafeței de Au cu filmul de CoP, Tyr a fost fixată pe suprafața sa prin reticulare chimică cu glutaraldehidă și albumină serică bovină. Suprafața modificată cu CoP și Tyr (S-CoP _Tyr) a fost păstrată în soluție tampon fosfat (NaPB) între măsurători.

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în:

Revistă ISI (FI = 2,677)

[1] **M. Florescu***, M. David, *Tyrosinase-based biosensor for selective dopamine detection*, **Sensors**, 2017, 17, 1314-1329.

Abstract în revistă ISI (FI = 2,527)

[2] M. David, **M. Florescu***, Novel tyrosinase-based biosensor for real sample dopamine, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2017, 46(1), S328-S328.

Reviste BDI:

[3] **M. Florescu***, A. Baicu, I. Capan, Gh. Coman, *Selective determination of dopamine using modified electrodes by differential pulse voltammetry*, **Romanian Journal of Biophysics**, 25(2), 2015, print / ISSN: 1220-515X, electronic / ISSN: 1843-424X.

[4] **M. Florescu**, A. Valceanu, Ghe. Coman, *Aplicații ale tirozinazei și lacazei: biosenzori enzimatici electrochimici*, **Jurnal Medical Brasovean**, Nr. 2, 2013, ISSN 1841-0782, e-ISSN 2247 – 4706.

A.1 Caracterizarea suprafețelor modificate prin CV

Ansamblul filmelor **CoP** și **CoP-Tyr** a a fost monitorizat prin măsurători electrochimice: CV și DPV și EIS.

Interacțiunile moleculare care se petrec la **modificarea suprafeței de Au cu CoP (S-CoP)** și **CoP cu Tyr (S-CoP-Tyr)** au fost investigate prin **voltametrii ciclice (CV)** în NaPB 0,1 M la pH 8,0 cu o viteză de scanare de 50 mV s^{-1} (Fig. 1.1). **Fiecare modificare a suprafeței de Au este evidențiată de formele diferite ale CV-urilor** corespunzătoare. Se observă apariția vârfurilor redox după *modificarea suprafețelor de Au cu CoP și Tyr*, creșterea intensității curentului de oxidare la adăugarea DA, dar și **separarea acestor vârfuri** la adăugarea AA odată cu DA.

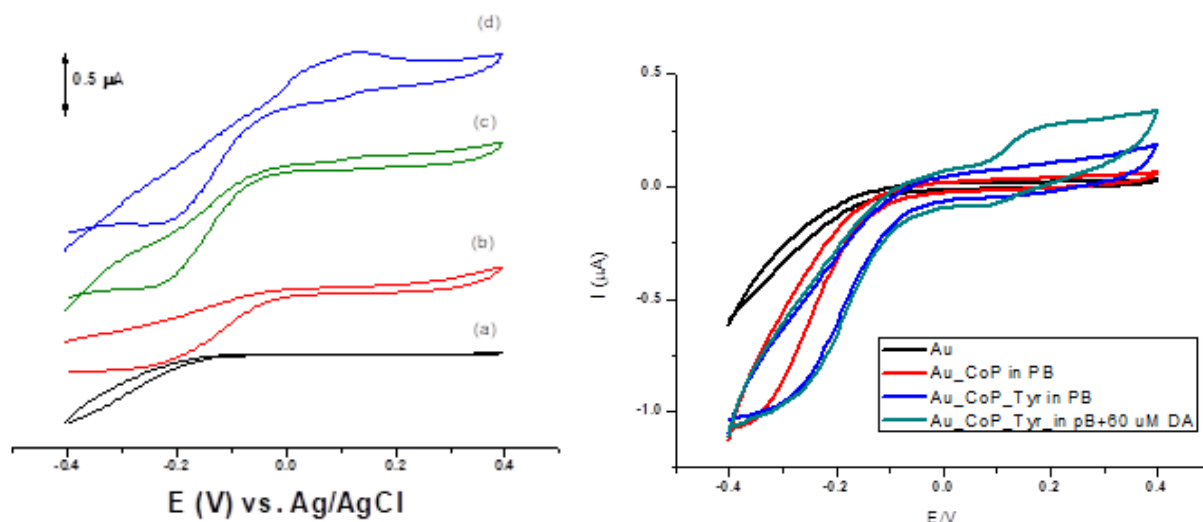


Fig. 1.1. Voltamograme ciclice în 0,1 M NaPB la pH 8,0 pentru: Stânga: (a) Au; (b) S-CoP ; (c) S-CoP în 30 μM DA; (d) S-CoP în 30 μM DA + 200 μM AA și Dreapta: S-CoP-Tyr. Viteza de scanare 50 mV s^{-1} .

A.2 Optimizarea parametrilor de detecție prin DPV.

Voltametria în puls diferențial (**DPV**), fiind o metodă foarte sensibilă, a fost folosită cu preconcentrare la un potențial fix pentru a obține parametri de modificare a suprafețelor de Au.

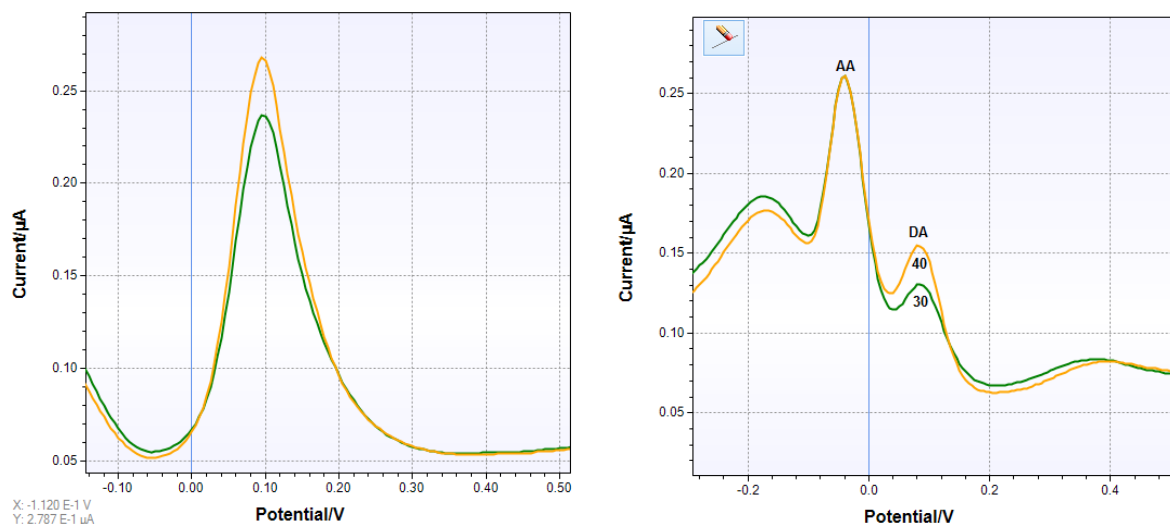


Fig. 1.2. Stânga: DPV pentru senzorul de Au nemodificat. Dreapta: DPV pentru senzorul de S-CoP . Soluții de electrolit cu concentrația de 200 μM AA +30/40 μM DA.

Modificarea suprafeței de Au cu CoP (S-CoP) a determinat apariția a două vârfuri de oxidare corespunzătoare DA și acidului ascorbic AA (cel mai important interferent), la valori ale potențialelor mai mici și diferite (0,08V și -0,03 V) (Fig. 1.2).

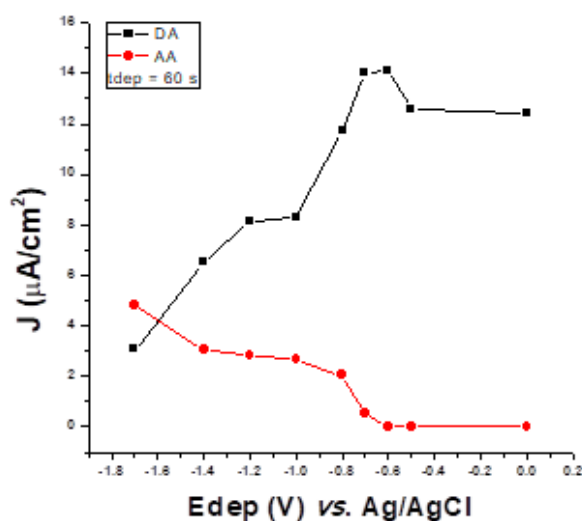


Fig. 1.3. Răspunsul senzorului de S-CoP 1% în NaPB, 0,1 M, pH = 8,0 ce conține 30 μM DA + 200 μM AA pentru diferite potențiale de preconcentrare.

Potențialul și timpul de depunere (preconcentrare) au fost optimizați: unul dintre parametri a fost menținut constant, în timp ce a fost variat celălalt (Fig. 1.3 și 1.4).

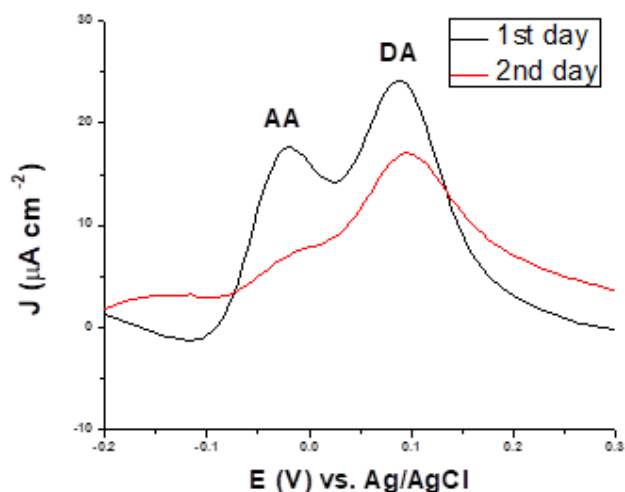


Fig. 1.4. DPV în două zile diferite cu senzorul S-CoP 1% pentru detecția a 40 μM DA și 200 μM AA în NaPB pH 8,0. Viteza de scanare 10 mV s⁻¹.

Un inconvenient al suprafeței S-CoP este dat de *repetabilitatea scăzută*, performanța senzorului folosind această suprafață fiind limitată pentru ziua de producție, sensibilitatea sa scăzând foarte mult în timp. Se observă o scădere a vârfurilor de oxidare a acidului ascorbic cu 97%, în timp ce pentru DA scade cu 50% (Fig. 1.5).

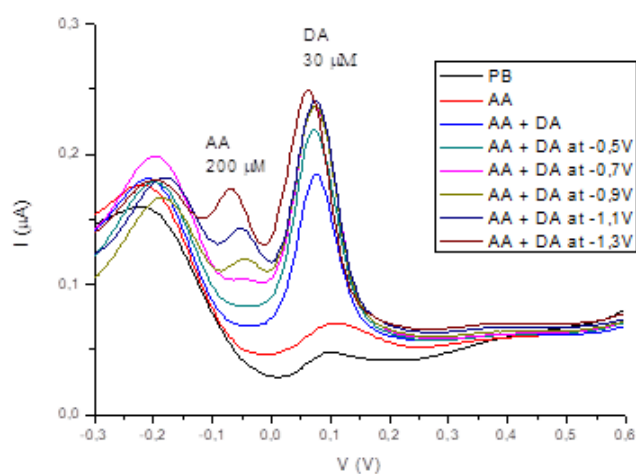


Fig. 1.5. Optimizarea potențialului de preconcentrare în DPV la detecția selectivă a DA în prezența AA folosind biosenzorul cu S-CoP -Tyr.

În prezența enzimei Tyr pe suprafața S-CoP **potențialul de condiționare nu a mai fost necesar**. Potențialul de preconcentrare a fost de **-1,3 V** timp de **40 s** au ajutat la **diferențierea vârfurilor AA și DA** (Fig. 1.5). Deoarece AA (care nu este un substrat al tirozinazei) poate difuza pe suprafața electrodului, putem concluziona că **utilizarea potențialelor negative în etapele de pretratare** a fost necesară pentru o **mai bună diferențiere între vârfurile AA și DA**, atât pentru suprafața CoP, cât și pentru suprafața CoP-Tyr.

A.3 Caracterizarea reacțiilor redox la suprafețele S-CoP

Procesul redox al dopaminei la suprafața de S-CoP a fost caracterizat prin CV-uri, cu viteză de scanare a potențialului variată.

Odată cu creșterea rădăcinii pătrate a vitezei de scanare, s-a observat o creștere a vârfului de oxidare a DA (Fig. 1.6A). Conform ecuației Randles–Sevcik (1.2), putem concluziona că are loc creșterea ratei de transfer a electronilor, dovedită și de Fig. 1.6B. Se poate concluziona că la suprafețele S-CoP se petrec reacții controlate prin difuzie (transport de masă).

$$I_{pa} (\mu\text{A}) = 0.036 v^{\frac{1}{2}} + 0.032 \left(\text{mV s}^{-1} \right)^{1/2}; R^2 = 0.998$$

$$I_{pc} (\mu\text{A}) = -0.014 v^{\frac{1}{2}} - 0.047 \left(\text{mV s}^{-1} \right)^{1/2}; R^2 = 0.946 \quad (1.1)$$

$$I_p = 0,4463 nFAC \left(\frac{nFvD}{RT} \right)^{1/2} \quad (1.2)$$

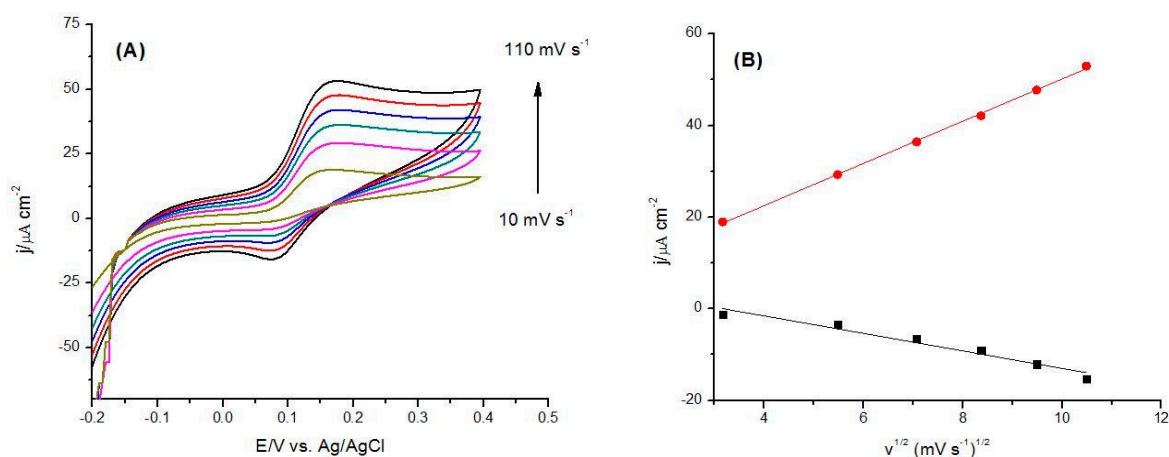


Fig. 1.6. (A) CV pentru 100 μM DA, v : 10, 30, 50, 70, 70 și 110 mV s^{-1} ; (B) variația I_{pa} și I_{pc} . Electrolit: NaPB 0,1 M, pH 8,0.

unde,

I_p = curent vârfului în amperi, n = numărul de electroni transferați în evenimentul redox (1),

A = suprafața electrodului în cm^2 , F = constanta Faraday în C mol^{-1} , D = coeficientul de difuzie în $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, C = concentrația în mol cm^{-3} , v = viteza de scanare în mVs^{-1} , R = constanta gazului în $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$, T = temperatura în K

A.4 Caracterizarea suprafețelor modificate prin EIS

EIS este folosită pentru **caracterizarea fenomenelor la interfața senzor/electrolit** și obținerea **informațiilor despre transferul și acumularea de sarcină electrică**.

Figura 1.7 prezintă reprezentarea complexă a spectrelor de impedanță (*grafice Nyquist*) achiziționate pentru toate suprafețele.

Graficele au fost fitate folosind **circuitul electric echivalent** din Figura 1.8 (insertia) alcătuit dintr-un rezistor a cărei rezistență electrică caracterizează celula și soluția electrolitică (R_{Ω}), în serie cu două **combinații paralele**:

➤ constituită dintr-un rezistor ce definește rezistența transferului de sarcină (R_{ct}) prin această interfață și un element capacitiv non-ideal (CPE_{dl}) asociat unui strat dublu de sarcină electrică (pentru **filmele CoP sau CoP-Tyr**).

➤ caracterizează filmul CoP sau CoP-Tyr (**interfața electrodului de Au cu filmul CoP sau cu filmul CoP-Tyr**) prin rezistorul ce caracterizează transferul de sarcină electrică (R_f) și elementul capacitiv non-ideal (CPE_f).

Elementul capacitiv non-ideal (de fază constantă - CPE), este caracterizat de impedanță electrică dată de ecuația:

$$Z_{CPE} = [(Q\omega)^{\alpha}]^{-1}$$

unde,

Q = capacitatea ideală,

ω = frecvența radială și

α = exponentul care caracterizează gradul de uniformitate/rugozitate al suprafeței.

Impedanța Z_{CPE} este a unui element de circuit care *caracterizează distribuția timpilor fenomenelor de relaxare* la suprafața de aur modificată ca urmare a aplicării stimulului alternativ și a neomogenităților prezente. *Comportamentul CPE* este, în general, atribuit *reactivității suprafeței distribuite, neomogenității suprafeței, rugozității sau geometriei fractale, porozității electrodului și distribuțiilor de curent și potențial asociate cu geometria electrodului*. Depinde de asemenea și de *capacitatea electrică a stratului format de acumularea de sarcină, Q*.

Valorile parametrilor elementelor de circuit echivalent devin astfel un **indicator** al modului cum se **acumulează sarcina electrică (CPE)** la interfața **Au/film CoP-Tyr** și **film /electrolit**, a **transferului de electroni prin interfață (R)**, și respectiv al **gradului de neuniformitate moleculară (α)**.

EIS a fost folosită pentru caracterizarea fenomenelor **în prezența dopaminei** produse la **interfața senzor/electrolit**. Figura 1.8 arată diagramele Nyquist și circuit electric echivalent în insertie, la un potențial de 0,1 V aplicat în timpul măsurătorilor, achiziționate pentru S-CoP-Tyr în prezența a 30 și 60 μ M DA.

Parametrii circuitului electric echivalent au fost determinați. Se observă că R_{ct} **scade** atunci când **concentrația DA crește**, evidențiind **activitatea bio-catalitică a Tyr** la suprafața S-CoP-Tyr față de oxidarea DA și **proprietățile conductive ale filmului S-CoP**.

Impedanța CPE a senzorilor modificați cu filmul CoP electrocatalitic depinde în principal de suprafața accesibilă ionilor din electrolit și speciilor redox, adică de suprafața specifică, de gradul de neuniformitate a filmului (distribuția dimensiunilor și a formei porilor).

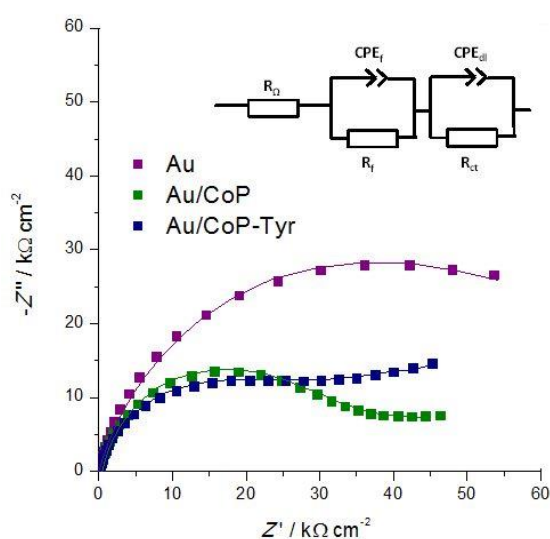


Fig.1.7. Graficele Nyquist pentru suprafețele Au, S-CoP și S-CoP-Tyr la -0,2 V. Inserția: circuitul electric echivalent utilizat pentru fitarea graficelor. Electrolit: 0,1 M NaPB pH 8,0

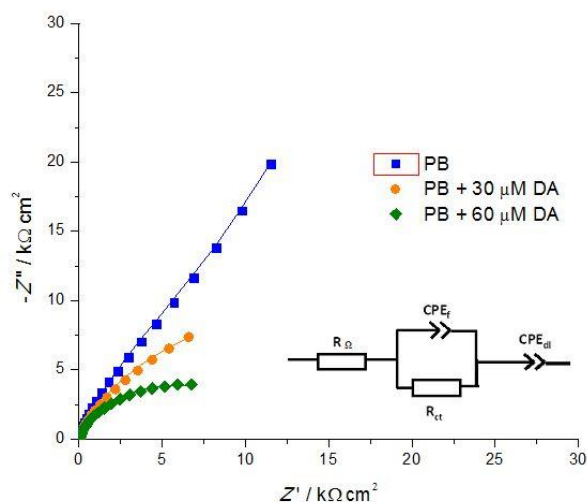


Fig. 1.8. Grafice Nuyquist pentru S-CoP-Tyr pentru 30 și 60 μM DA. 0,1 V față de Ag /AgCl. Inserția: circuitul echivalent utilizat pentru fitarea spectrelor. Electrolit: 0,1 M NaPB pH 8,0.

Au fost evidențiate **creșterile Q_f și Q_{dl} , dar și ale valorilor α_{dl}** , fapt care indică o **acumulare de sarcină** electrică la interfața cu S-CoP /Tyr, influențată de oxidarea DA. **Valorile α_f au scăzut** odată cu acumularea la interfața suprafață/film a moleculelelor de DA și dopa-chinonă.

B. Suprafețe modificate cu structuri moleculare stratificate (LbL)

Diabetul zaharat reprezintă la nivel mondial, o **cauză principală de morbiditate și mortalitate**, prevalența diabetului continuând să crească. **Dozarea glucozei** din sânge, împreună cu cea al HbA1c, fac parte din **diagnosticul diabetului zaharat**, fiind un instrument util pentru monitorizarea pacienților.

Suprafețele de aur modificate cu (PEI⁺/GOX⁻ și {chit⁺(NG+GOx)}⁻/PSS⁻) au fost folosite pentru **detecția glucozei** prin integrarea lor în platforme senzoriale electrochimice (secțiunea 2.2).

Structurile multistrat cresc stabilitatea complexului format și ajută la **fixarea biomoleculelor enzimatiche** (numărul legăturilor aleatorii este redus).

Metoda strat-pe-strat (Layer-by-Layer, LbL), permite formarea **structurilor cu arhitecturi moleculare ordonate și reproductibile**, care îmbunătățește **transferul direct al electronilor între molecule și suprafață**.

Arhitecturile moleculare auto-asamblate au fost depuse pe suprafața senzorilor de aur și carbon nemodificată, dar și modificată cu un filme de polimeri redox și conductori sau cu diverse grupări funcționale. Pentru depunerea arhitecturii LbL sunt utilizate straturi moleculare de polielectroliti (bistraturi).

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în:

Revista ISI (FI = 6,393)

[5] M. David, M. M. Barsan, C. M.A. Brett, **M. Florescu***, *Improved glucose label-free biosensor with layer-by-layer architecture and conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene)*, **Sensors and Actuators B**, 255 (2018) 3227–3234.

Proceedings ISI

[6] M. David, **M. Florescu***, M. M. Barsan, C. M.A. Brett, *Label-free evaluation of carbon nanoparticles in Layer-by-Layer self-assembled enzyme-based biosensors*, **Procedia Technology** 27 (2017) 304 – 305; DOI: 10.1016/j.protcy.2017.04.125.

[7] **M. Florescu**, *Evaluation of Functional Features of Immobilized Enzymes Using Electrochemical Label-Free Methods*, Advances In Biomedicine And Health Science, Recent Advances in Biology and Biomedicine Series, **Proceedings of 2nd WSEAS ISI International Conference on Biomedicine and Health Engineering (BIHE '13)**, June 1-3, 2013, Brasov, Romania. ISBN: 978-1-61804-190-6, ISSN: 1790-5125, **Proceedings of the International Conferences ISBN: 978-1-61804-196-8, WSEAS Press.**

Capitol de carte:

[8] M. David, **M. Florescu**, M. M. Barsan, L. Tugulea and C. M.A. Brett, *Development and Characterization of Layer-by-Layer Biosensors Based on PEI(+)/GOx(-) Layers Using Label-Free Methods*, in **Sensing in Electroanalysis, Vol. 8** (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytrás; Eds.), pp. 329-346. 2013/2014 University Press Centre, Pardubice, Czech Republic. ISBN 978-80-7395-782-7 (printed); 78-80-7395-783-4 (pdf).

Ansamblul secvențial al bistraturilor **PEI⁺/GOX⁻** și **{chit⁺(GOx)}/PSS⁻** a fost monitorizat prin măsurători:

- i. Electrochimice: CV și EIS,
- ii. Optice: SPR.

B.1 Caracterizarea suprafețelor modificate prin CV

Electrozii bară de aur p(entrul măsurători electrochimice) și **plăcuțele de sticlă cu film de aur (senzori SPR)**, au fost folosiți ca suport pentru cele *două structuri auto-asamblate LBL*, și **au fost funcționalizați în prealabil** astfel:

- cu un monostrat de cisteamină (**Cys**) prin chemosorbție care funcționalizează **suprafața de aur** cu gruparea -NH₂. Au fost depuse patru bistraturi **PEI⁺/GOX⁻**. Bistraturile **PEI⁺/GOX⁻** au fost depuse pe suprafața electrozilor bară de aur prin imersare.
- cu un film subțire de **polimer conductor** poli(3,4-etilendioxitiofen) (**PEDOT:PSS⁻**), încărcat negativ (datorită SO³⁻) (depus prin **electrodepoziție** pe **suprafața de aur**), peste are au fost **depuse electrostatic** patru bistraturi **chit⁺(NG+GOx)}/PSS⁻**. Pentru primul strat, **chit⁺(NG+GOx)}**, **grafena dopată cu azot (NG)** a fost amestecată cu **GOX**, iar amestecul a fost incorporat în soluție de chitosan (încărcat pozitiv). Al doilea strat a fost **PSS⁻** (încărcat cu sarcina negativă).

Interacțiunile moleculare care se petrec la **modificarea suprafețelor senzorilor** cu bistraturile **PEI⁺/GOX⁻** și **{chit⁺(NG+GOx)}/PSS⁻** au fost investigate prin **voltametria ciclică (CV)** (Fig. 1.9).

Fiecare modificare a suprafeței de Au este evidențiată de formele diferite ale CV-urilor corespunzătoare.

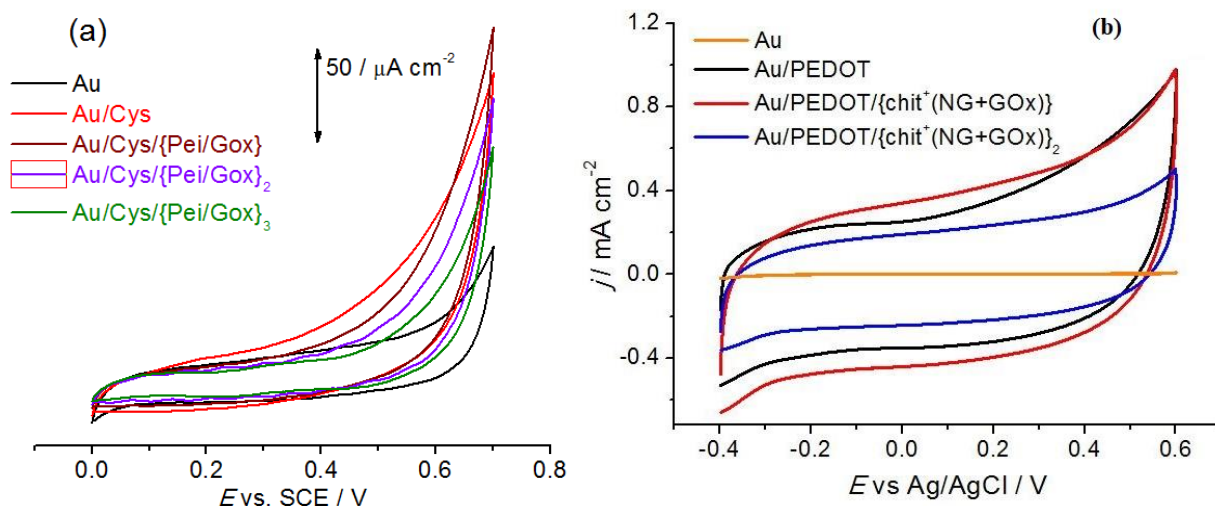


Fig. 1.9. CV pentru un număr diferit de bistraturi depuse pe: (a) Au-Cys, (b) Au-PEDOT. Electrolit: 0,1 M pH 6,9 NaPB.

CV-urile senzorilor sunt diferite pentru că materialele și suprafețele senzorilor au proprietăți electrice diferite. Acestea se lărgesc în domeniul potențialelor pozitive, până la cel de-al treilea bistrat, după care se stabilizează. Astfel, **conducția electronică se mărește** odată cu **creșterea grosimii filmului LbL** la 3 bistraturi, urmând ca bistraturile **suplimentare să mărească doar grosimea filmului**, care înseamnă un **transfer mai lent** al electronilor prin acest film.

B.2 Caracterizarea suprafețelor modificate prin EIS

Figura 1.10 prezintă spectrele de impedanță pentru ambele suprafețe de aur, inserția arătând circuitul echivalent utilizat folosit pentru fitarea graficelor. Valoarea de -0,2 V a potențialului aplicat a fost aleasă în funcție de proprietățile electrice ale aurului și de forma CV-urilor, care devin mai largi (indică depunerea straturilor și creșterea transferului de sarcină).

Parametrii elementelor circuitului electric echivalent (Tabele 1.1 și 1.2) au fost obținuți din prelucrarea datelor înregistrate în măsurătorile de impedanță electrochimică. Prin *evidențierea modului de variație* a valorilor acestora (R și $Z_{CPE} = [(Qi\omega)^\alpha]^{-1}$) au fost caracterizate *interacțiunile moleculare dintre straturile LbL* și ale acestora cu suprafața pe care au fost immobilizate.

Astfel, este remarcată funcționalizarea suprafețele de Au cu Cys prin obținerea unei **valori mai mari a R_{ct}** , fapt datorat **încetării transferului sarcinilor electrice** prin interfața suprafață/electrolit. **Depunerea bistraturilor {PEI/GOx}** a determinat o **micșorare continuă** a valorii R_{ct} , evidențiind o **creștere a transferului sarcinilor electrice** până la al treilea bistrat. O **scădere foarte mare a Q_{dl}** , a fost observată în aceleași condiții.

Depunerea ulterioară a altui bistrat determină o creștere **atât a grosimii filmului**,

cât și micșorarea transferul de electroni. Acest comportament a fost prezent pentru ambele structuri LbL, fapt care *confirmă* rezultatele voltametriei ciclice.

În cazul *suprafeței modificată cu filmul de polimer PEDOT* circuitul electric echivalent conține *două combinații în paralel R-CPE grupate în serie*:

A. prima combinație care caracterizează comportamentul *interfeței Au/(PEDOT + {chit+(NG+GOx)}/PSS⁻)* la *frecvențe mari* compusă din: rezistor ce caracterizează transferul, R_f , și capacitorul non-ideal (CPE_f) pentru acumularea de sarcină, și

B. a doua combinație care caracterizează comportamentul *interfeței (suprafață modificată)/electrolit*, R_{ct} , și capacitorul non-ideal a stratului dublu electric (CPE_{dl}).

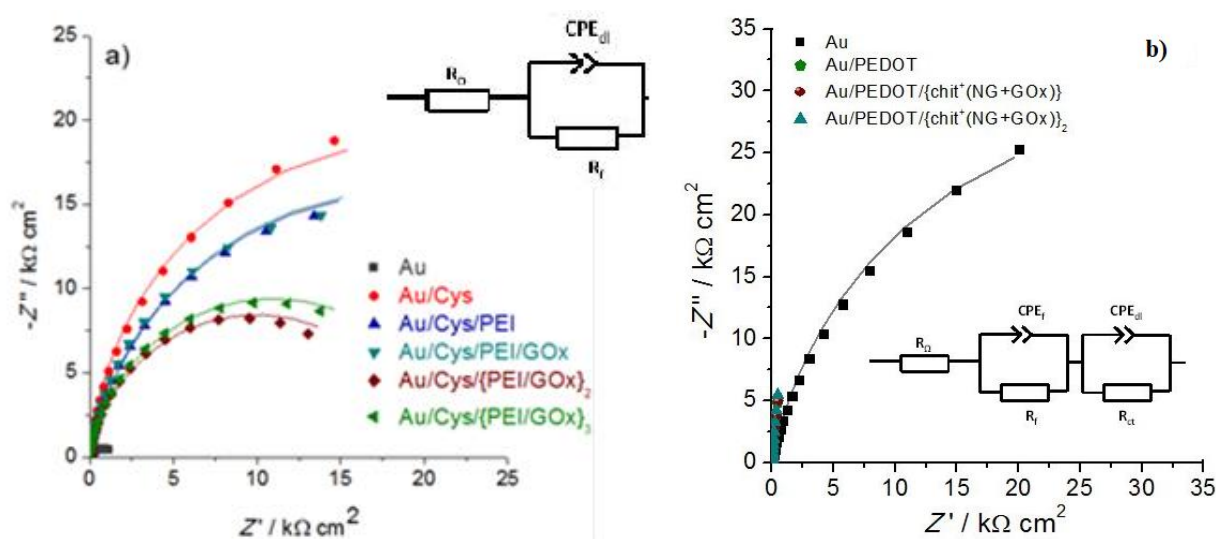


Fig. 1.10. Diagramele Nuyquit pentru un număr diferit de: a) $\{PEI/GOx\}_{n=0-3}$ depuse pe Au-Cys, $E = -0,2$ V vs SCE. b) $\{chit+(NG+GOx)\}_{n=0-2}$ depuse pe Au/PEDOT. $E = -0,2$ V vs Ag/AgCl. Electrolit: 0,1 M pH 6,9 NaPB.

Tabel 1.1. Parametrii circuitului electric echivalent (din Fig. 1.10a)

Electrod	$R_{\Omega} / \Omega \text{ cm}^2$	$R_{ct} / \text{k}\Omega \text{ cm}^2$	$Q_{dl} / \text{mF cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$	α
Au	425,9	1,4	126,8	0,85
Au/Cys	430,4	68,0	68,2	0,88
Au/Cys/{PEI_GOx}	423,2	47,2	71,0	0,87
Au/Cys/{PEI_GOx} ₂	428,2	25,5	71,9	0,86
Au/Cys/{PEI_GOx} ₃	427,3	21,8	71,2	0,87

Tabel 1.2. Parametrii circuitului electric echivalent (din Fig. 1.10b)

Electrod	$R_f /$ $\Omega \text{ cm}^2$	$Q_f /$ $\text{mF cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha_f}$ 1	α_f	$R_{ct} /$ $\text{k}\Omega$ cm^2	$Q_{dl} /$ $\mu\text{F cm}^{-2}$ $\text{s}^{\alpha_{dl}}$	α_{dl}
Au	--	--	--	54.4	38.2	0.85
Au/PEDOT	690	4.0	0.77	79.5	345.5	1.00
Au/PEDOT/{chit ⁺ (NG+GOx)}	200	4.0	0.78	70.0	320.1	0.99
Au/PEDOT/{chit ⁺ (NG+GOx)} ₂	220	3.9	0.77	90.3	293.7	0.99

Valorile ridicate ale Q_f care rămân neschimbate, evidențiază că **acumularea de sarcină** s-a realizat la interfața **Au/(PEDOT+{chit⁺(NG+GOx)}/PSS⁻)** (adsorbția straturilor de chitosan este contrabalansată de proprietățile conductoare ale PEDOT și NG). Pe de altă parte, **valorile rezistenței filmului R_f** scad pentru primul strat {chit⁺(NG+GOx)}, cu o ușoară creștere pentru cel de-al doilea strat. Prima scădere a fost atribuită prezenței NG, care îmbunătățește considerabil transferul de electroni prin filmul de chitosan, în timp ce a doua creștere ușoară poate fi explicată ținând cont de proprietățile izolatoare ale chitosanului.

Conform tabelului 1.2 variația parametrilor R_{ct} și Q_{dl} pentru suprafețele Au/PEDOT/{chit⁺(NG+GOx)}/PSS⁻ sunt influențate de asemenea de proprietățile conductoare bune ale NG și izolatoare ale chitosanului.

Datele obținute cu prin cele două metode electrochimice, sugerează o creștere a capacității la prima depunere a primului bistrat și o scădere ușoară după depunerea celui de-al doilea bistrat, care începe să acționeze ca o barieră de difuzie.

C. Suprafețe modificate cu nanoparticule (NP)

Nanomaterialele au fost utilizate pe scară largă pentru a îmbunătăți performanța senzorilor, în special a celor electrochimici. Aceste materiale posedă **proprietăți unice** care le permit să modifice suprafața electrodului, rezultând o **cinetică rapidă** a reacțiilor, o **suprafață electroactivă mare**, o **conductivitate îmbunătățită** și o **activitate catalitică crescută**.

În funcție de tipul lor, nanoparticulele (NP), pot fi utilizate în diverse aplicații. **Nanoparticulele metalice**, cum sunt cele de aur (AuNPs) sunt utilizate pe scară largă în aplicațiile de detecție electrochimică, datorită capacității lor de a transfera electroni între speciile biologice electroactive și senzor. **Nanotuburile de carbon** (CNT) sunt versatile datorită rezistenței mecanice, conductivității lor electrice, dar și afinității lor electronice.

Grafena (G) este utilizată în principal pentru îmbunătățirea proprietăților materialului electrodului și creșterea suprafeței sale active.

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în următoarele reviste:

Revista ISI (FI = 3,031)

[9] M. David, A. Serban, C. V. Popa, **M. Florescu***, *Nanoparticle-based label-free sensors for screening the relative antioxidant capacity of hydro-soluble plant extracts*, **Sensors**, 2019, 19(3), 590.

Revista ISI (FI = 4,474)

[10] M. David, A. Serban, C. Radulescu, A. F. Danet, **M. Florescu***, *Bioelectrochemical evaluation of plant extracts and gold nanozyme-based sensors for total antioxidant capacity determination*, **Bioelectrochemistry**, 2019, 129, 124-134.

Revista ISI (FI = 4,464)

[11] M. David, A. Serban, T.A. Enache, **M. Florescu***, Electrochemical quantification of levothyroxine at disposable screen-printed electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2022, 911, 116240. DOI: 10.1016/j.jelechem.2022.116240. FI. 4.464.

Abstract în revistă ISI (FI = 2,527)

[12] M. Florescu* M. David, **A. Serban, C. Radulescu, C. Stihi, D. Lazurca**, Nanoparticle-based electrochemical sensor for antioxidant activity monitoring in plant extracts, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2017, 46(1), S137-S137.

Abstract în revistă ISI (FI = 3,854)

[13] M. Florescu, M. David, A. Serban, Nanozyme modified electrochemical biosensors as rapid screening tools for biomolecules, *Biophysical Journal*, 2019, 116(3), 148A.

Proceedings ISI

[14] M. David, A. C. Chebac, M.G. Chirita, M.J. Carezim, C. Santos, **M. Florescu***, An impedimetric sensor for levothyroxine detection towards point of care applications, *2021 IEEE International Workshop on Impedance Spectroscopy (IWIS)*, 2021, 99-103, DOI: 10.1109/IWIS54661.2021.9711839.

Revista BDI

[15] **M. Florescu**, Ghe. Coman, *Label-free methods for real-time analysis used in oxidative stress biomarkers detection*, **Bulletin of the Transilvania University of Braşov**, Vol. 6 (55) No. 1, pp. 9-18, 2013, Series VI: Medical Sciences. Transilvania University Press, Brasov.

Ansamblul secvenţial al **suprafeţelor modificate cu NP** și a capacităţii antioxidante totale a fost monitorizat prin măsurători **electrochimice**: CV, DPV și EIS.

C.1 Suprafeţe modificate cu nanoparticule de aur și carbonice

Hormonii tiroidieni se leagă de receptorii proteici localizaţi pe suprafaţa membranelor celulare sau de membranele mitocondriilor și nucleului. Ca urmare, sunt activate unele procese biochimice specifice care produc **efecte metabolice importante** la nivel celular și de țesuturi. **Levotiroxina (LT4)**, reprezintă forma sintetică a hormonului tiroxină, T4, utilizată pentru a trata hipotiroidismul și alte afecţiuni legate de glanda tiroidă. În prezent, *efectul administrării LT4 poate fi monitorizat în principal prin observaţii clinice și teste de laborator* care prezintă multe dezavantaje.

Pentru obţinerea unor senzori electrochimici performanţi care să fie folosiţi la detecţia rapidă în scopul monitorizării eficiente a terapiei cu LT4 s-au folosit **electrozi tipăriţi (SPE) cu suprafaţă modificată cu nanoparticule (SPE-NP)**.

C.1.1 Caracterizarea suprafeţelor modificate prin CV și DPV

Pentru selectarea **celor mai potrivite nanoparticule (NP)** care să fie utilizate împreună cu SPE pentru detectarea LT4, au fost evaluate performanţele electrochimice ale senzorilor nanostructuraţi folosind CV în electrolit de tampon acetat (AcB) pH 4,0. Voltamogramele obţinute au fost comparate cu cele ale SPE nemodificat. Au fost folosiţi electrozi cu filme de carbon care conţin NP comerciale amintite mai sus (SPE-NP) (Fig. 1.11).

În Fig. 1.11A se poate observa **comportarea CV a fiecărui SPE-NP în electrolit**. CV-urile au diferite lărgimi, caracterizate prin *diferite valori ale capacităţii electrice* (calculate în regiunea non-faradică la 0,5 V, unde curentul are natură capacitivă și este direct proporţional cu viteza de scanare, v) și *arii electroactive*.

În Fig. 1.11B este *prezentat comportamentul redox al LT4 la SPE-C+AuNP* (similar pentru celelalte NP). S-a observat că apar comportamente diferite pentru scanări multiple:

1.1.1. La *prima scanare pozitivă*, apare un **vârf de oxidare ascuţit (O1)**, la 0,45 V, (caracteristic grupării fenolice). Inversând direcţia de scanare, la un potenţial mai scăzut, 0,02 V, a apărut un **vârf de reducere (R2)**, asociat cu *reducerea speciilor de orto-chinonă de LT4 format la O1 la orto-fenoli*.

1.1.2. La a *doua scanare*, (în aceleași condiții și fără curățarea suprafeței electrodului), un **nou vârf de oxidare (O2)**, la 0,07 V, corespunzător *oxidării formei catecol a LT4 format*, indicând **reversibilitatea perechii redox R2/O2**, în timp ce **O1 scade ireversibil**.

1.1.3. De la a doua scanare, curenții redox ai perechii O₂-R₂ se stabilizează.

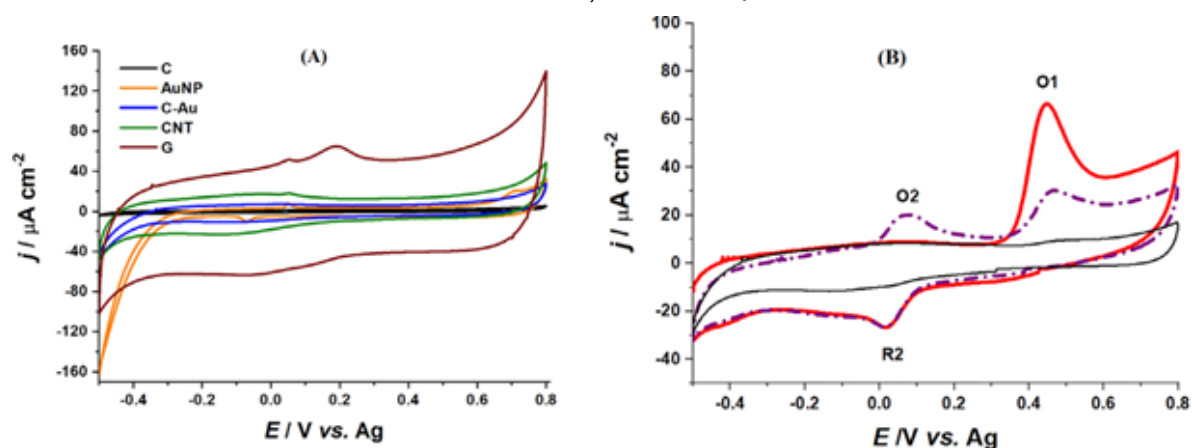


Fig. 1.11. CV pentru: (A) toți SPE-NP, (B) SPE-C+AuNP în absența (—) și în prezența a 20 μM LT4: (—) scan 1 și (---) scan 2; Electrolit: în 0,1 M AcB, pH = 4,0, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

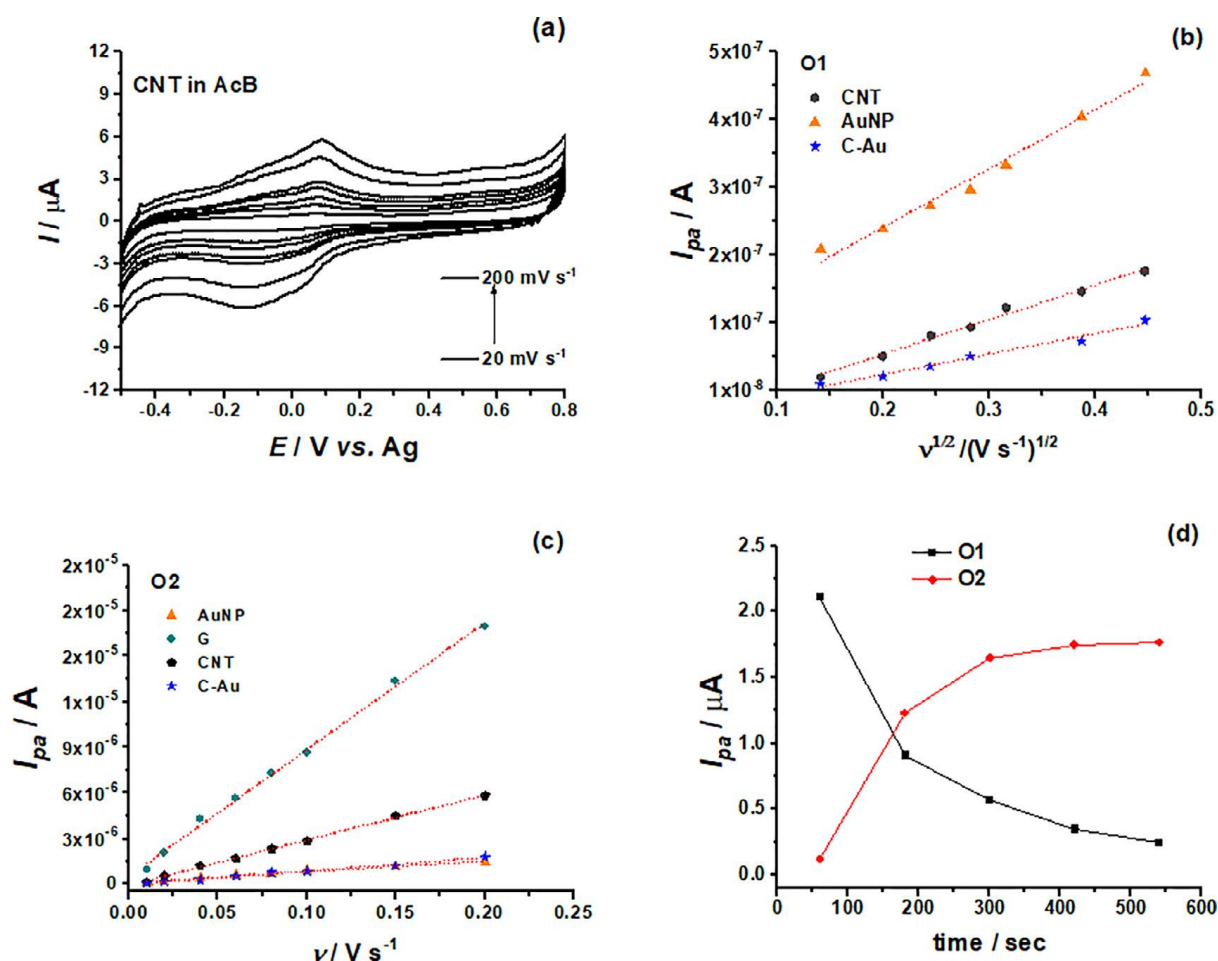


Fig. 1.12. SPE-CNT în prezența a 20 μM LT4: (a) CV pentru diferite v : 20- 200 mV s^{-1} , (b) Variația I_{pa} pentru O1, (c) Variația I_{pa} pentru O2, (d) Variația I_{pa} pentru O1, O2 în funcție de timp. Electrolit: AcB 0,1 M, pH 4,0.

Efectul vitezei de scanare asupra O1 și a cuplului redox al grupelor orto-chinonă (O2) – catecol (R2) a fost de asemenea examinat în doi electroliți: AcB, pH 4,0 și NaPB, pH 7,0. Am concluzionat că pentru toți SPE-NP (Fig. 1.12a):

- viteza de oxidare a O1 variază în funcție de electroliț, fiind mai lentă în medii acide. A fost obținută o liniaritate între intensitatea curentului de vârf anodic (I_{pa}) și radicalul vitezei de scanare, concluzionând că pentru O1 avem un sistem ireversibil controlat prin difuzie (Fig. 1.12b).

- pentru perechea redox O2-R2, a fost obținută o liniaritate între intensitatea curentului de vârf anodic (I_{pa}) și viteza de scanare (Fig. 1.12c). Sistemul redox este perturbat de o reacție chimică (adsorbția speciilor pe suprafața sensorului). Astfel, produsul de oxidare al grupării fenol din LT4 (O1) a format un strat pe suprafața electrodului, fapt care a permis în continuare redox-ul perechii O2-R2. Aceeași concluzie o putem trage dacă monitorizăm în timp modificările de intensitate ale O1 și O2 (Fig. 1.12d).

Comparând toate rezultatele, am remarcat că cele mai bune performanțe în prezența LT4 au fost obținute pentru senzorii SPE-CNT și SPE-G și de aceea, aceștia au fost caracterizați mai departe, iar parametrii lor au fost optimizați pentru detecția sensibilă a LT4.

C.1.2 Optimizarea parametrilor de detecție

Optimizarea pH-ului

Un studiu de pH pentru valori cuprinse între 2,0 și 10,0 a fost realizat prin DPV și a fost înregistrat în electroliți diferiți care conțineau 20 μ M LT4. Pentru că prin CV s-a dovedit că doar la a doua scanare este vizibilă formarea celui de-al doilea vârf de oxidare O2, la fel s-a procedat și cu DPV (Fig. 1.13).

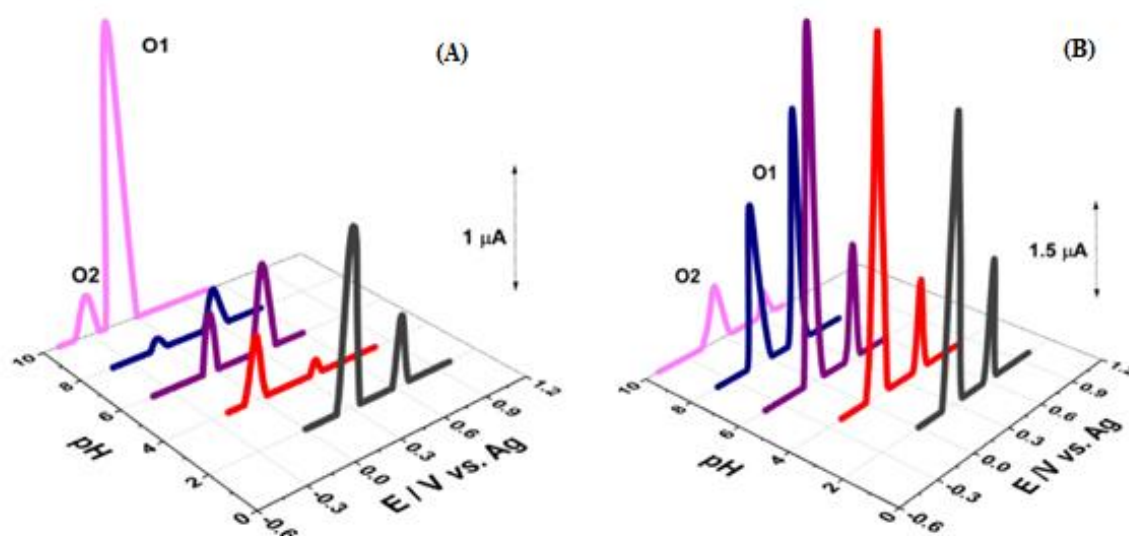


Fig. 1.13. Scan 2 al DPV în 20 μ M LT4 în funcție de pH, pentru: (A) SPE-CNT și (B) SPE-G.

Deoarece grupul fenol este caracteristic mai multor molecule, **în scopul creșterii specificității detecției LT4, am ales să studiem comportarea lui O2 din scan-ul 2, evidențiind pH-ul la care Ipa corespunzătoare O2:**

- are valoarea cea mai mare, și
- este mai mare în comparație cu intensitatea O1.

Prin urmare, sa constatat că pentru **SPE-CNT** curentul de O2 este mai mare decât cel al O1 la pH 4,0 și 5,0, dar diferența dintre cele două vârfuri este mai mare pentru pH 4,0. Un comportament similar a fost remarcat și în cazul senzorilor **SPE-G**.

În urma analizei tuturor rezultatelor, electrolitul AcB **pH 4.0** a fost ales potrivit pentru **SPE-CNT**, în timp ce pentru **SPE-G**, NaPB **pH 7.0** generează o densitate de curent mai mare pentru O2 față de O1.

C.1.3 Caracterizarea suprafețelor modificate prin EIS

Spectrele EIS au fost înregistrate pentru SPE-CNT (la -0,02 V vs. Ag) și SPE-G (la -0,15 V) în AcB, pH 4,0 și NaPB, pH 7,0 (Fig. 1.14). Două **circuite electrice echivalente diferite** au fost folosite pentru fitarea curbelor care sunt prezentate în Fig. 1.13A.

Din analiza, la cele două valori ale pH-ului, a variației parametrilor circuitelor electrice echivalente și a diagramelor Bode (Fig. 1.14B), au rezultat următoarele:

i. Pentru **SPE-CNT**, la pH 4,00, valorile Rct au scăzut foarte mult (~92%). Scăderea caracterului rezistiv (care indică un transfer de electroni mai bun) a fost direct proporțională cu creșterea celor două valori ale Q (CPE). Astfel, **AcB pH 4,00 a fost dovedit și prin EIS ca electrolitul optim să fie utilizat cu SPE-CNT în prezența LT4**. CNT fiind funcționalizați cu grupări COO⁻ aceștia au interacționat electrostatic cu LT4 care era încărcat pozitiv (pH izoelectric al LT4 este 7,6). Prin urmare, presupunem că între *CNT funcționalizat cu COO⁻* și *LT4 oxidat* apar **interacțiuni biomoleculare de natură electrostatică**, care justifică *acumularea de sarcină electrică* la suprafața SPE-CNT și *caracterul neomogen al suprafeței* odată cu creșterea concentrației LT4.

ii. comportamentul mai capacitiv al lui **SPE-G** a fost evidențiat la adăugarea LT4, atât Cdl cât și Qe au crescut; la pH 7,00, creșterea a fost mai pronunțată în comparație cu AcB. Valorile α_e au crescut, sugerând *formarea unui strat omogen la suprafața senzorului*. Grafena are o structură asemănătoare unei foi, astfel la pH 7,00 moleculele mici de LT4 oxidate pot acoperi cu ușurință micile neregularități de pe suprafața electrodului, sugerând **adsorbția moleculară pe suprafață**.

Astfel, evidențiem **proprietățile crescute față de LT4** prin utilizarea **SPE-CNT la pH 4,00** și a **SPE-G la pH 7,0**.

C.2 Suprafețe modificate cu nanozime (enzime artificiale)

C.2.1 Caracterizarea suprafețelor modificate prin CV, DPV și amperometrie

În urma proceselor biochimice sunt generate **specii reactive ale azotului (RNS)** sau **ale oxigenului (ROS)** care pot genera **stres oxidativ (SO)** ori **leziuni moleculare**

și celulare. Un exemplu din categoria ROS este H_2O_2 . **Antioxidanții aduc beneficii prin anihilarea/captarea ROS** și stoparea oxidării biomoleculelor, proprietate care poate fi folosită și *in vitro*. **Gradul de anihilare al H_2O_2** poate fi **cuantificat** utilizând platforme **senzoriale** și folosit pentru **evidențierea capacității totale** antioxidante.

Măsurători electrochimice au fost efectuate folosind **senzori tipăriți cu film de carbon (SPE) nemodificați (C) și modificați cu cele trei tipuri de nanoparticule (NP)** în prezența H_2O_2 . Pentru a determina care tip de nanoparticule este cel mai performant pentru detecția H_2O_2 am comparat CV-urile (și amperometriile la potențial fix, 0,55 V, înregistrate în aceleași condiții (Figura 1.14A și B). **SPE-AuNPs** s-au dovedit a fi **cele mai potrivite**, cu un răspuns mai mare și mai stabil, evidențiindu-se **rolul AuNP de nanozime (enzime artificiale)**.

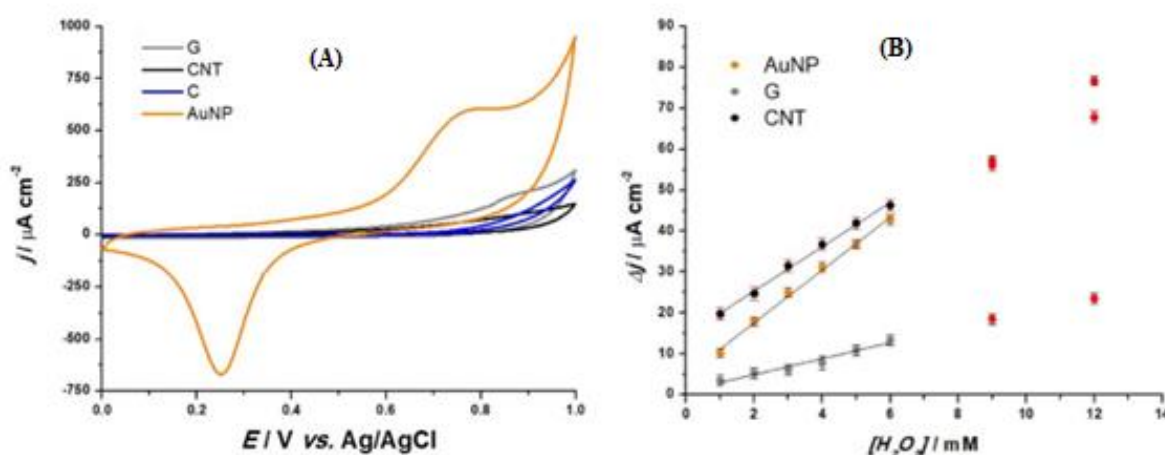


Figura 1.14. (A). CV SPE-NP în 6 mM H_2O_2 , $v = 50 mV s^{-1}$ pentru SPE nemodificat (C) și SPE-NP. (B) Amperometrii SPE-NP la 0,55 V. Electrolit: 0.1 M NaPB, pH 7,0.

C.2.2 Caracterizarea suprafețelor modificate prin EIS

Pentru a obține noi informații despre **procesele de transfer ale electronilor și fenomenele de difuzie** la suprafața modificată cu nanozime AuNP, EIS a fost folosită în prezența H_2O_2 cu și fără *antioxidantul standard Trolox*.

Fig. 1.15A prezintă diagramele Nyquist ale spectrelor de impedanță (0,1 V vs. Ag/AgCl), circuitul electric echivalent folosit pentru fitarea spectrelor SPE nemodificat și modificat cu AuNP.

Circuitul electric echivalent utilizat conține:

1. un *rezistor electric (pentru caracterizarea celulei și electrolitului)*, R_{Ω} , în serie cu
2. o *combinație în paralel formată dintr-un element de fază constantă, CPE_{dl} (capacitor non-uniform caracteristic stratului dublu electric de la interfață) și un rezistor ce caracterizează transferul de sarcină electrică prin interfață, R_{ct} .*
3. Pentru fitarea spectrelor **SPE-AuNP**, R_{ct} a fost conectat în serie cu un condensator cu *capacitatea intrinsecă, C_{Au} , corespunzătoare AuNP.*

Interfața senzorului cu nanozime/electrolit a fost caracterizată folosind acest circuit la *frecvențe joase și intermediare*. La *frecvențe înalte*, efectul condensatorului asupra impedanței totale a circuitului și a fazei devine neglijabil, *circuitul comportându-se ca un rezistor*, evidențiat în figura 1.15B de diagramele Bode. **Impedanța totală scade odată cu creșterea frecvenței**, fapt ce poate fi atribuit **lipsei de penetrare a ionilor din electrolit în materialul electrodului**. În inserție, cea de-a doua **diagramă Bode** ilustrează cum încărcarea cu sarcină electrică a stratului dublu electrochimic nu mai ține pasul cu creșterea frecvenței, impedanța și faza apropiindu-se de 0°.

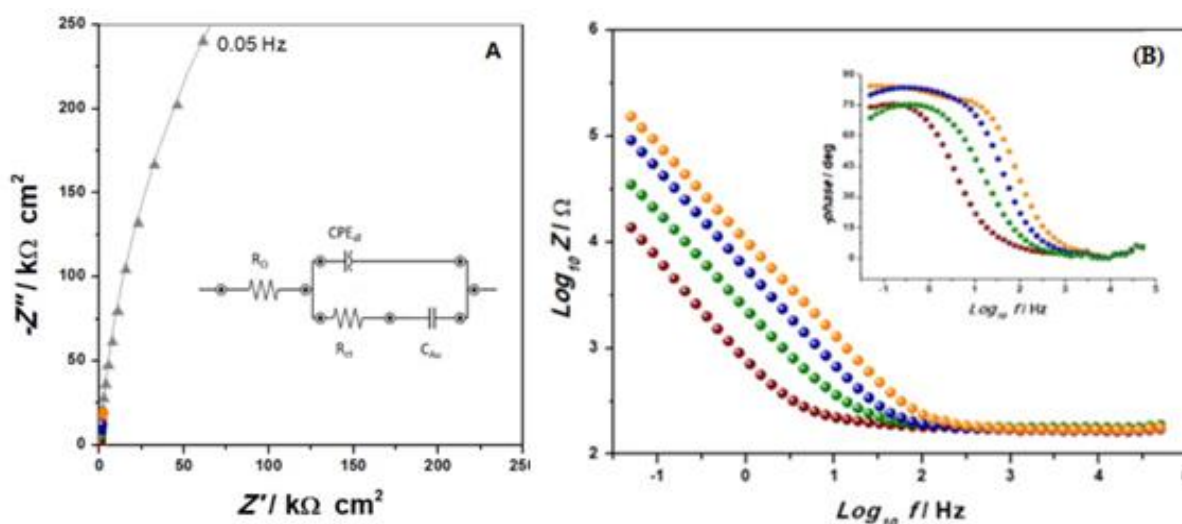


Figura 1.15. (A) Diagramele Nyquist pentru senzor de carbon nemodificat și modificat cu AuNP (inserție a circuitului electric echivalent pentru spectrele SPE-AuNP). (B) Diagrama Bode cu inserție a variației fazei pentru SPE-AuNP în NaPB, H₂O₂, Trolox și H₂O₂+Trolox.

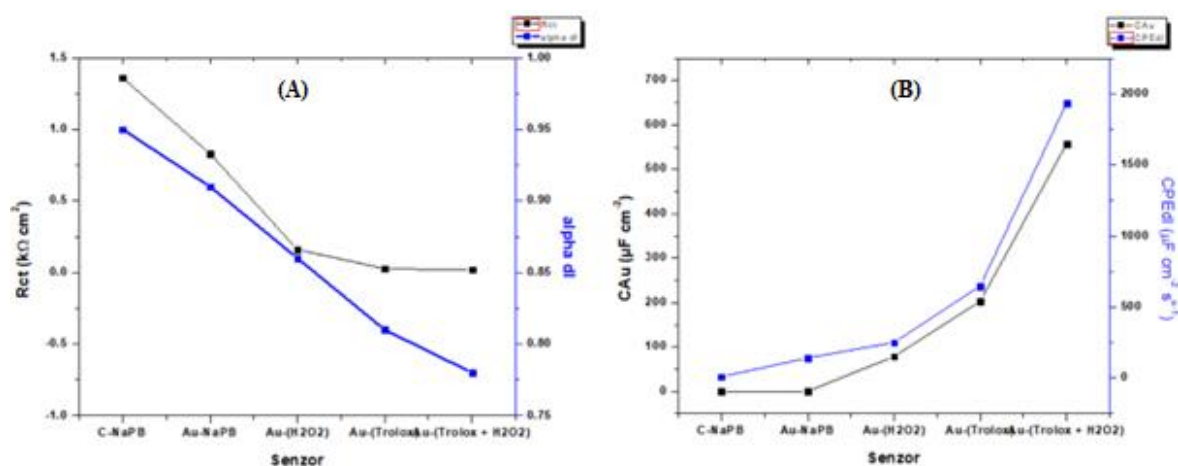


Fig. 1.16. Variația: (A) R_{ct} și α_{dl} și (B) C_{Au} și CPE_{dl} , pentru SPE nemodificat comparativ cu SPE-AuNP. Electrolizi: NaPB, NaPB+H₂O₂, NaPB+Trolox, NaPB+Trolox+H₂O₂

Figurile 1.16 A și B prezintă **variația parametrilor circuitului echivalent în funcție de electrolitul folosit**.

C.2.3 Optimizarea parametrilor de detecție

Optimizarea pH-ului

Antioxidanții au rolul de a reduce efectele adverse cauzate de RNS și ROS prin **reacții electrochimice de oxidare-reducere**. Aceștia sunt generați de organism sau pot fi obținuți din alimentație sau suplimente alimentare. **Extractele vegetale**, au o **capacitate antioxidantă totală (AC)** datorată **varietății de antioxidanți** (vitamine, carotenoizi, polifenoli, etc.) corespunzătoare resursei vegetale, dar și metodei de extracție folosite. Ele au fost folosite în aceste cercetări ca **model biologic**. Astfel, folosind **senzorii** pentru H_2O_2 vom putea să determinăm **TAC și RAC, datorită anihilării H_2O_2 de AOx** prezenți în extractele vegetale apoase studiate (Ext).

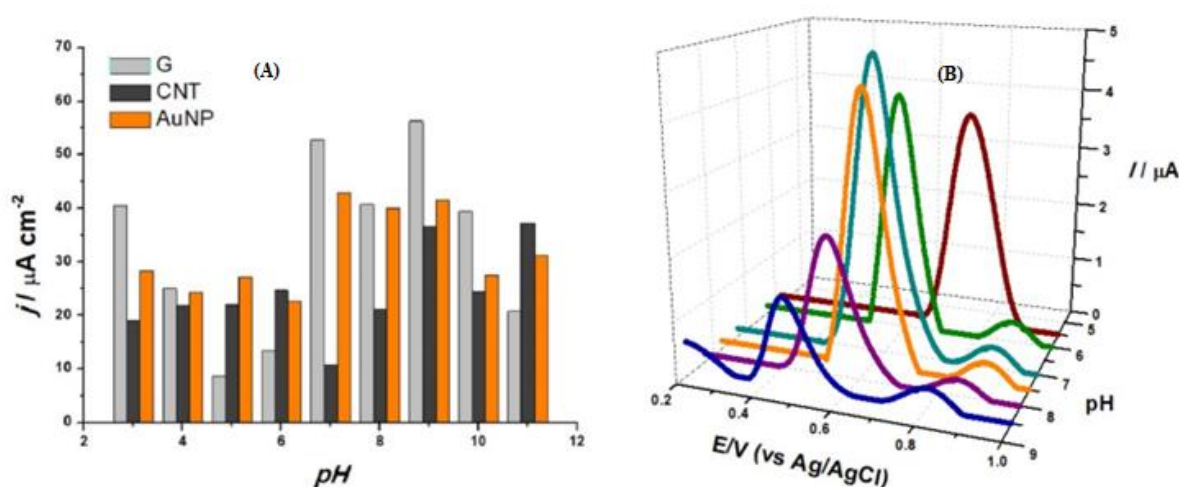


Fig. 1.17. (A) Studiu de pH pentru SPE-NP (din CV în Ext. +6 mM H_2O_2), $v = 50$ mV s^{-1} , (B) DPV pentru SPE-AuNP în prezența a 1,5 mM H_2O_2 . Electrolit: 0,1 M NaPB.

Un studiu de pH a fost realizat folosind CV și DPV, pentru a **determina cel mai performant tip de nanoparticule care să fie folosit la modificarea SPE pentru detecția H_2O_2 în prezența Ext.** În Figura 1.17A este reprezentată histograma valorilor intensității (normalizată pe unitatea de suprafață) pentru potențialul de oxidare a H_2O_2 de 0,55 V, din regiunea anodică a CV-urilor. Deși la pH = 7,00, grafena pare să furnizeze cel mai mare răspuns, am ținut cont de rezultatele măsurătorilor de CV și amperometrie unde pentru G nu a fost reproductibile. Figura 1.17B ilustrează DPV-urile realizate cu **SPE-AuNP** în 1,5 mM H_2O_2 în 0,1 M NaPB la diferite pH-uri (5,5 - 8,5) unde se poate observa că valoarea cea **mai mare a curentului de vârf** a fost observată pentru **pH 7,0**.

Evidențierea rolului de nanozimă a AuNP

Mecanismul electrochimic al lui AuNP, datorat **reacțiilor redox la care participă AuNP**, a fost studiat prin CV-uri în 0,1 M NaPB (pH 7,0), fără și cu H_2O_2 (Fig. 1.18A și B).

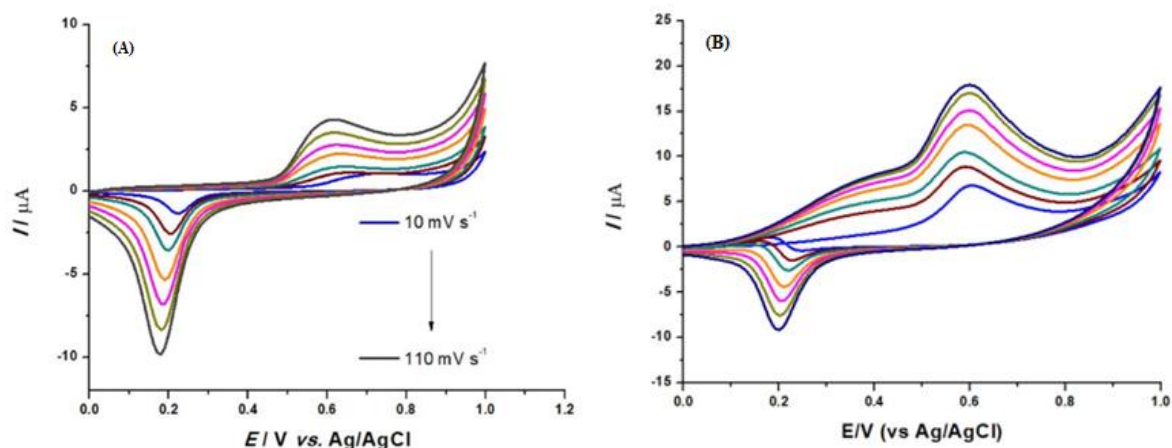


Fig. 1.18. CV pentru SPE-AuNP în (A) NaPB 0,1 M, pH = 7,0. (B) 0,1 M NaPB, pH 7,0 + 1,5 mM H₂O₂. v: 10, 20, 30, 50, 70, 90 și 110 mV s⁻¹.

S-a remarcat o **creștere a intensității** curentului odată cu **creșterea vitezei de scanare**, fapt ce sugerează o **creștere a vitezei de transfer a electronilor**, evidențiind astfel reacția **reacția redox la care participă AuNP**. H₂O₂ suferă o **oxidare ireversibilă catalizată de AuNP**.

Am putut **concluziona** că **reacțiile redox ale AuNP sunt controlate prin difuzie și AuNP catalizează oxidarea ireversibilă a H₂O₂**.

C.2.4 Evaluarea electrochimică a capacității antioxidante totale

Voltametrie ciclică – comparație între extractele vegetale apoase

Senzorul cu nanozime de aur, SPE-AuNP, optimizat în secțiunile anterioare pentru **detecria H₂O₂** a fost folosit pentru **evaluarea și cuantificarea capacității antioxidante totale, absolute și relative** și pentru evidențierea **caracterului lor antioxidant diferit** (figura 1.19).

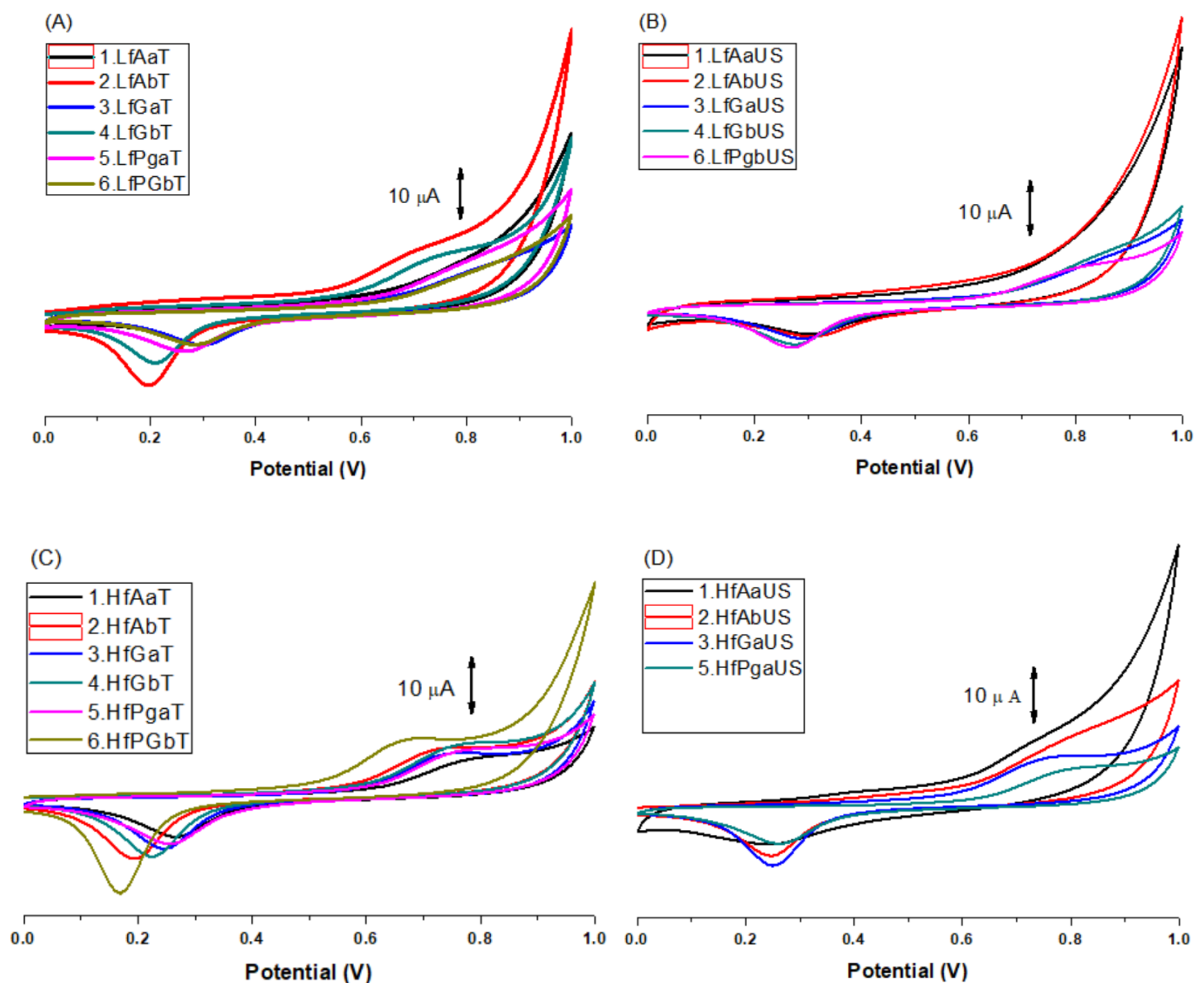


Fig. 1.19. CV-uri ale SPE-AuNP în diferite extracte vegetale (Ext.) obținute prin două metode de extracție (T și US): de lavandă (A) și (B) și de cătină (C) și (D). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Electrolit: $0,1 \text{ M NaPB}$, pH 7,0

Voltametrie în puls diferențial - indicele electrochimic

Indicele electrochimic, IE, este calculat ca **raportul** dintre **curentul anodic** (I_{pa}) și **potențialul anodic** (E_{pa}) pentru toate vârfurile prezente în voltamogramă. Acesta este folosit pentru **cuantificarea "antioxidanților naturali totali"** prezenți în probele analizate, (Fig. 1.20), **care conțin acid ascorbic**. În **absența acidului ascorbic**, IE poate fi exprimat prin **cuantificarea polifenolilor totali**.

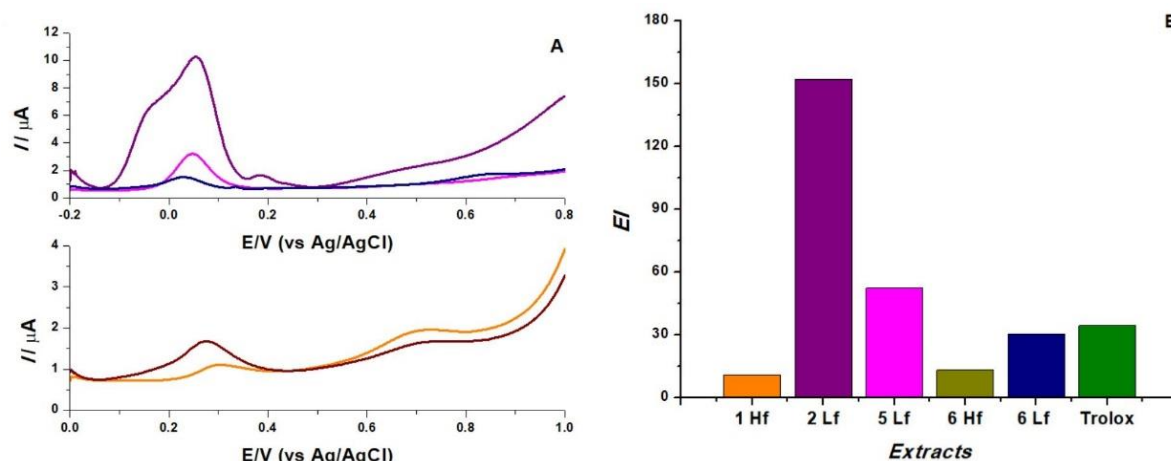


Fig. 1.20. (A) DPV pentru extractele Lf (2.Lf Ab US , 5.Lf Pga T, 6.Lf Pgb US) și Hf (1.Hf Aa T, 6.Hf Pgb T). B. Histograma valorilor IE extractelor în comparație cu cel al 60 μ M Trolox. Electrolit: 0,1 M NaPB, pH 7,0

1.1.2. Caracterizarea optică (SPR) a interacțiunilor biomoleculare din structurile enzimatiche LbL

Spectroscopia plasmonilor de rezonanță (SPR) este o metodă sensibilă de analiză fenomenelor moleculare deoarece permite **analiza fără etichete (label-free)** și în timp real a **interacțiunilor (bio)moleculare la suprafețele funcționalizate**. Legarea moleculelor țintă de molecule cu rol de recunoaștere imobilizate pe suprafața metalică (exemplu: aur) determină **creșterea concentrației de suprafață** a acestora cu **modificarea indicelui de refracție** în timpul evenimentelor de legare. Această modificare va determina o **scădere a intensității unui fascicul laser** atunci când este reflectat de suprafața de aur modificată și o **creștere a unghiului său de reflexie** (unghi SPR) **proporțional cu concentrația de molecule țintă legate**.

Astfel, pentru **evaluarea interacțiunilor dintre moleculelor încărcate cu sarcină electrică opusă și evidențierea structurii multistrat (LbL) metoda SPR** a fost folosită în două modalități: scanare unghiulară (**AS-SPR**) și scanare la unghi fix (**FA-SPR**).

Prin combinarea **SPR cu metodele electrochimice (EC-SPR)** au fost electrodepeuse pe suprafața de aur și caracterizate filmele subțiri polimerice conductoare. În măsurătorile EC-SPR, într-o celulă electrochimic specială, suprafața de aur a fost utilizată ca electrod de lucru împreună cu alți doi electrozi de platină. Astfel, au fost **evaluate simultan proprietățile electrochimice și optice ale suprafețelor și filmelor la scara nanometrică**.

Suprafețele de Au ale senzorilor SPR au funcționalizate conform descrierii din Secțiunea B.1 cu structurile LbL: **(PEI⁺/GOx⁻ și {chit⁺(NG+GOx)}/PSS⁻)**.

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în:

Revista ISI (FI = 6,393)

[5] M. David, M. M. Barsan, C. M.A. Brett, **M. Florescu***, *Improved glucose label-free biosensor with layer-by-layer architecture and conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene)*, **Sensors and Actuators B**, 255 (2018) 3227–3234.

Proceedings ISI

[6] M. David, **M. Florescu***, M. M. Barsan, C. M.A. Brett, Label-free evaluation of carbon nanoparticles in Layer-by-Layer self-assembled enzyme-based biosensors, *Procedia Technology* 27 (2017) 304 – 305; DOI: 10.1016/j.protcy.2017.04.125.

Capitole de carte:

[16] M. David, **M. Florescu**, *Biomolecular interaction evaluation using surface plasmon resonance. SPR biosensors*, in: **Biophysics for Biomedical and Environmental Sciences (Edited by Monica Florescu)**, pp. 211-223, Transilvania University Press, Brasov, 2016, ISBN 978-606-19-0768-7.

➤ Suprafețe cu bistraturi PEI⁺/GOX⁻

În cazul structurii LBL {PEI⁺/GOX⁻} funcționalizarea suprafețelor de aur a fost realizată prin adsorbție chimică (chemosorbție prin Au-S) a trei molecule diferite:

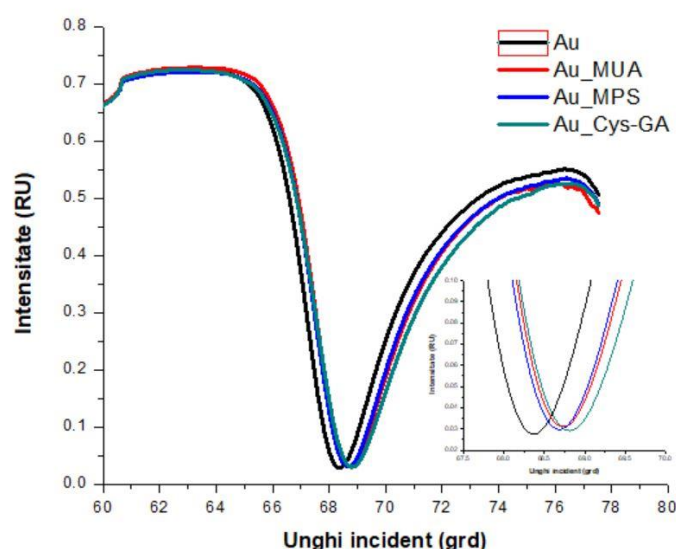


Fig. 1.21. AS-SPR: Monitorizarea funcționării suprafețelor de Au cu MPS, MUA, Cys-GA.

- 3-mercapto-1-propansulfonat (MPS),
- acid 1-mercaptodecanoic (MUA),
- cisteamină (Cys) urmată de modificarea cu glutaraldehidă (GA) (Cys-GA)).

În Figura 1.21 funcționalizarea a fost **evaluată calitativ prin scanare unghiulară (AS-SPR)** unde au fost **remarcate unghiuri de rezonanță SPR diferite** corespunzătoare funcționalizării suprafeței cu **grupări chimice diferite**.

Informații similare au fost evidențiate folosind **modul FA-SPR** (conform figurii 1.22). Tabelul 1.3 prezintă gradul de imobilizare al GOX pe suprafețele funcționalizate cu MPS, MUA și Cys-GA. Se pot astfel evidenția interacțiunile biomoleculare care au loc (figura 1.12 B).

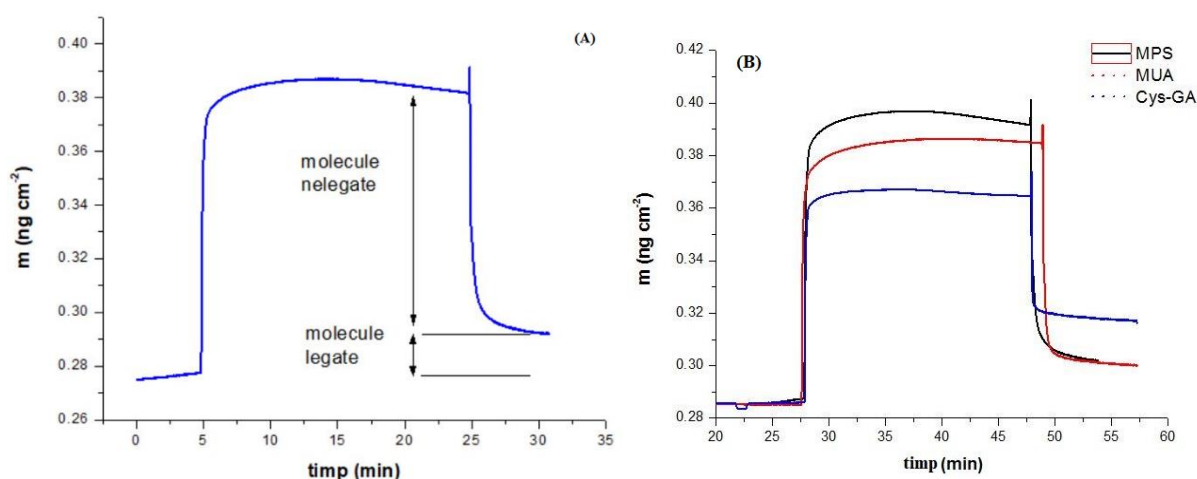


Fig. 1.22. FA-SPR: (A) reprezentare generală, (B) imobilizarea GOX pe suprafațe de Au funcționalizate cu trei molecule.

Tabel 1.3. Imobilizarea enzimei GOX pe suprafața de Au cu trei funcționalități

Senzor	Grad de legare al moleculelor	Grad de diminuare a semnalului SPR
	%	%
Au_MPS	14,29	85,21
Au_MUA	14,00	86,00
Au_Cys-GA	40,51	59,50

Imobilizarea GOX prin structura LBL {PEI⁺/GOX} a fost monitorizată pe suprafața de Au funcționalizată cu Cys-GA utilizând și modul FA-SPR. (figura 1.23).

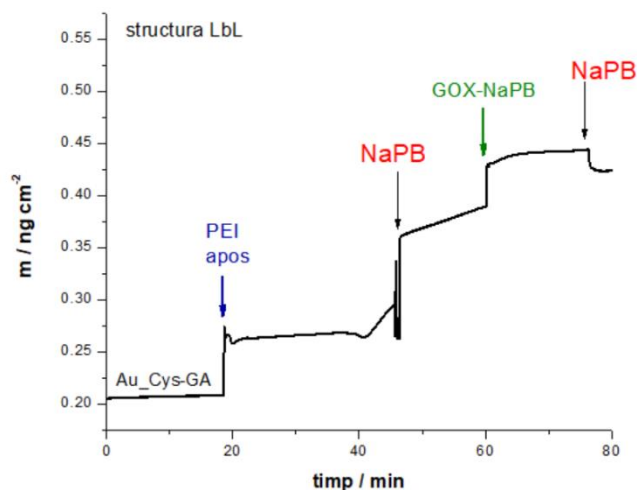


Fig. 1.23. FA-SPR: Depunerea pe Au -Cys-GA a structurii LbL: {PEI⁺/GOX⁻}.
Unghi de incidență: 67,26 grd.

Modificările diferite ale semnalului SPR pentru diverse soluții sunt datorate modificării diferite a indicelui de refracție din apropierea suprafeței de Au în funcție de natura moleculelor de solvent (concentrație diferită a ionilor din NaPB comparativ cu apa), fapt care sugerează o modificare a încărcării ionice.

➤ Suprafețe cu bistraturi {chit⁺(GOx)}/PSS⁻

În cazul structurii acestei structuri LbL funcționalizarea suprafețelor de aur a fost realizată prin depunerea electrochimică (CV) a filmului PEDOT pe suprafața de aur. Formarea structurii LbL a fost monitorizată prin ambele moduri SPR.

Figura 1.24A conține suprapunerea mai multor spectre AS-SPR pentru suprafața de aur:

- în aer.
- în soluția ce conține EDOT.
- după depunerea electrochimică prin CV a filmului PEDOT.
- depunerea primului strat de {chit⁺(GOx)},
- depunerea primului strat PSS⁻ și
- depunerea celui de-al doilea strat de {chit⁺(GOx)}.

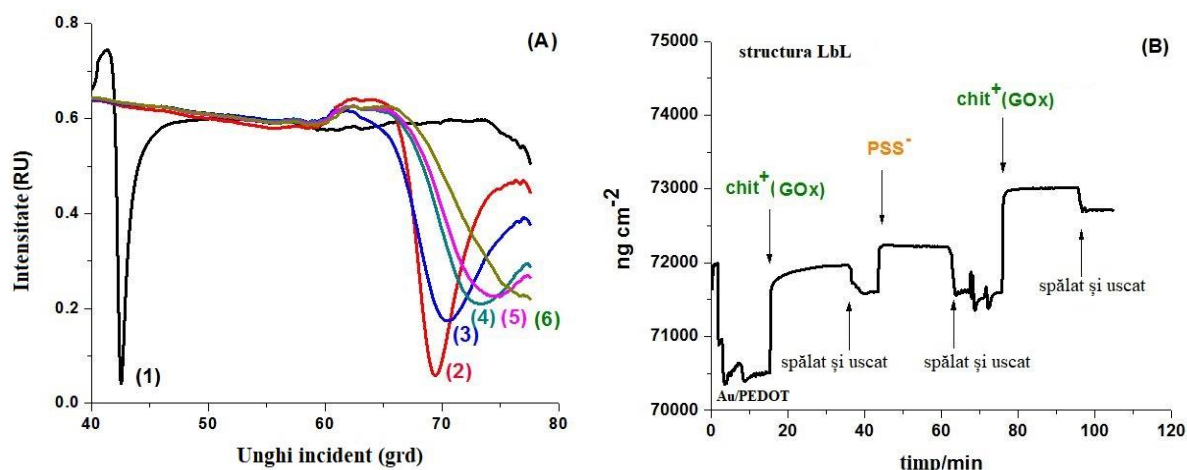


Fig. 1.24. Monitorizarea depunerii filmului PEDOT și a structurii LbL {chit⁺(GOx)}₁/PSS⁻ pe Au/PEDOT prin: (A) AS-SPR și (B) FA-SPR (unghi de incidență 67.30 grd).

Interacțiunile moleculare au fost evidențiate pe suprafața filmului subțire Au/PEDOT (figura 1.24 B). Răspunsul a fost calculat pentru fiecare etapă de imobilizare ca diferența dintre semnalul SPR după spălare și uscare, înainte și după injectarea soluției de polielectrolit. În acest fel, a fost posibilă **estimarea masei moleculare adsorbite** pe unitatea de suprafață corespunzătoare fiecărei etape de imobilizare (tabelul 1.4).

Tabel 1.4. Estimarea masei superficiale și a legării fiecărui monostrat în stare hidratată și uscată pe suprafața de Au - PEDOT.

Strat	m ($\mu\text{g cm}^{-2}$) (hidratat)	m ($\mu\text{g cm}^{-2}$) (uscat)	Capacitatea maximă de legare (%) (uscat)
{chit ⁺ (GOx)} ₁	1,43±0,005	1,11±0,004	75,1
PSS ⁻	0,50±0,010	0,01±0,005	1,61
{chit ⁺ (GOx)} ₂	1,14±0,004	1,11±0,002	79,1

Semnalul obținut după etapa de spălare a fost utilizat pentru a estima depunerea de masă moleculară **în stare hidratată**, în timp ce semnalul obținut după uscare a fost utilizat pentru a estima depunerea de **masă în stare uscată**. Masa depusă pentru stratul PSS în stare hidratată a fost de aproape 3 ori mai mică decât cea a stratului de enzimă. Pentru fiecare strat chit⁺(GOx) și PSS⁻, etapa de clătire îndepărtează moleculele nelegate, permițând calcularea valorilor procentului de legare, prezentate în tabelul 1.4.

1.1.3. Concluzie parțială

Studiul biofizic al modificărilor suprafețelor realizat cu ajutorul metodelor electrochimice și optice a permis atât **evaluarea interacțiunilor moleculare dintre straturile moleculare** folosite la modificarea suprafețelor, dar și **optimizarea parametrilor de detecție**. Această caracterizare prezintă un prim pas foarte important pentru dezvoltarea unor **noi platforme senzoriale ca bază** pentru o **detecție moleculară specifică a dopaminei, glucozei, și a H₂O₂, ca biomarkeri cu rol predictiv (secțiunea 2)**.

Astfel, **modificarea și optimizarea parametrilor de modificare a suprafețelor senzorilor:**

(1)de aur *cu filme subțiri ale unui polimer cu proprietăți conductoare și redox (CoP), și cu enzima tirozinază (Tyr),*

(2)*cu film de carbon modificat cu nanozime de aur,*

(3)de aur și de carbon, *cu structuri moleculare bazate pe arhitecturi strat-pe-strat (Layer-by-Layer, LbL) obținute prin auto-asamblarea mono-straturilor de polimeri (PEI⁺, PSS⁻), enzime (GOX⁻), dar și nanoparticule (grafenă și nanotuburi de carbon),*

au permis creșterea stabilității și a selectivității de detecție, dar și **creșterea sensibilității de detecție** (creșterea intensității semnalului).

1.2 Sisteme de administrare a medicamentelor. Studiu biofizic

Sistemele de administrare bazate pe polimeri, cum sunt proteinele, care captează moleculele de interes au fost dezvoltate pe scară largă pentru sectoarele biomedicale și farmaceutice pentru a proteja și transporta compușii bioactivi. **Încapsularea** este o metodă foarte bună pentru păstrarea caracteristicilor în timp a biomoleculelor. Acest proces include **acoperirea sau capturarea unui biomaterial sau a unei combinații într-un element transportabil**. În acest context, **nano-complexe solubile** sau **transportatorii** proteici a compușilor bioactivi și a medicamentelor s-a dovedit că întârzie degradarea acestor substanțe.

Legarea biomoleculelor (**liganzi**) are loc datorită prezenței în proteină (**receptor**) a unor situsuri specifice capabile să lege, prin forțe mai mult sau mai puțin slabe și deseori reversibil, ligandul. *Forțele dintre proteină și ligand aparțin astfel interacțiunilor slabe ale moleculelor, cum sunt interacțiunea Van der Waals, legătura de hidrogen, forța hidrofobă și interacțiunea electrostatică* sau proceselor care implică formarea unor substanțe chimice tranzitorii care se leagă de suprafață, și intervin în procesul de *adsorbție fizică sau chimică* a liganzilor pe suprafețe.

Albuminele serice sunt **proteine model** pentru studiile de **legare și transport a substanțelor** endogene și exogene pentru ca pot să *îmbunătățească efectul de permeabilitate membranară și reținere a medicamentului* în țesutul țintă. **Interacțiunea dintre proteinele serice și diverse substanțe**, în mod special **medicamente**, este studiată intens pentru a înțelege mai bine modul în care **proprietățile farmacocinetice și farmacodinamice** sunt **afectate de legarea medicamentului de proteine**, dar și cum se poate accelera implementarea complexelor albumină-medicament ca **sisteme de transport și livrare a medicamentelor**.

Albumina serică umană (HSA), cea mai abundentă albumină serică din corpul uman, este sintetizată în ficat și apoi eliberată în sistemul circulator. **Albumina serică bovină (BSA)** este cea mai abundentă proteină plasmatică din circulația bovină, având o **structură foarte asemănătoare cu cea a HSA**, iar datorită unui set de **reziduuri hidrofobe de la suprafață permit legarea cu alți liganzi**. Având în vedere omologia sa structurală cu HSA, dar și prețul mai mic și stabilitatea mai mare a BSA, această proteină este una dintre cele mai utilizate pe scară largă în **studiile de legare proteină-ligand**.

Parametrii **sistemelor de transport al medicamentelor** pot fi îmbunătățiți prin *studierea mecanismului de interacțiune a medicamentelor de interes cu BSA și HSA constrânse la o mișcare limitată la suprafața unor substraturi fixe (imobilizate)*. Limitarea **albuminelor** a fost obținută prin aplicarea **metodelor de imobilizare** (*statice și hidrodinamice*) **pe suprafețe de aur**, inducând **modificări conformaționale** ale acestora care au influențat **orientarea situsurilor de legare** a proteinelor către medicamentele libere. Astfel, **mecanismele de interacțiune sunt diferite pentru că proteina imobilizată este constrânsă lângă suprafață**.

Mecanismul de legare al HSA/BSA aflate libere în soluție cu medicamentele sunt cunoscute din studiile de fluorescență anterioare (neprezentate aici). În aceste cercetări, măsurătorile au fost realizate pentru a evidenția proprietățile **interacțiunilor biomoleculare care au loc la o suprafață de suport (senzor de aur) la care HSA/BSA au fost constrânse (imobilizate)**.

În acest fel, o cantitate mică de albumine (HSA/BSA) a fost folosită pentru a investiga **interacțiunile HSA/BSA-ligand**. Liganzii studiați au fost acidul folic (FA), levotiroxina (LT4), vitaminele C și B12.

Electrozii tipăriți de aur, pentru măsurători electrochimice, și plăcuțe de sticlă cu film de aur (senzori SPR), au fost folosiți ca suport pentru *studiul interacțiunilor biomoleculare fără și cu funcționalizare prealabilă*.

Filmele de proteine serice, HSA/BSA, s-au format pe suprafața de Au prin:

- **adsorbție statică** în urma depunerii unei picături de soluție proteică pe suprafața sa (30 de minute), urmată de spălare pentru a îndepărta albuminele nelegate (Au-HSA/BSA).
- **adsorbție hidrodinamică** în timpul în care soluția s-a deplasat cu viteză mică, cu un debit de 30 mL/min.

Pentru formarea complexului **HSA/BSA – medicament**, soluțiile de medicament în concentrații crescătoare au fost menținute în contact cu suprafața de Au-HSA/BSA înainte de măsurători (3 minute).

Studierea mecanismului de legare a medicamentelor de interes la BSA/HSA și a echilibrului complexului proteină-medicament au fost monitorizate prin măsurători:

Electrochimice: CV și EIS

Optice: SPR

Spectrofotometrice: absorbție UV-Vis.

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în:

Revista ISI (FI = 2,931)

[17] C. G. Chilom, M. David, **M. Florescu***, Monitoring biomolecular interaction between folic acid and bovine serum albumin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 230, 118074. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118074. FI. 2.931

Revista ISI (FI = 4,098)

[18] N. Sandu, C. G. Chilom, **M. Florescu***, Molecular insights into binding mechanism of rutin to bovine serum albumin–Levothyroxine complex: Spectroscopic and molecular docking approaches, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2022, 264, 120261. DOI: 10.1016/j.saa.2021.120261. FI. 4.098.

Revista ISI (FI = 6,208)

[19] N. Cazacu, C. G. Chilom, M. David, **M. Florescu***, Conformational changes in the BSA-LT4 complex induced by the presence of vitamins: spectroscopic approach and molecular docking, *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 4215. DOI: 10.3390/ijms23084215. FI. 6.208.

Abstract în revistă ISI (FI = 2,095)

[20] N. Sandu, C. G. Chilom, M. David, M. Florescu, Influence of vitamins on the binding of levothyroxine to bovine serum albumin, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2021, 50(1), 104.

1.2.1 Caracterizarea electrochimică a interacțiunii albumine – medicamente

În literatura de specialitate, **nu există** multe studii care utilizează **metode electrochimice pentru a investiga proprietățile de interacțiune a proteinelor cu medicamente**. Am utilizat aceste metode, în combinație cu cele standard (spectroscopia de stingerea a fluorescenței, UV-Vis), ca instrumente analitice pentru a înțelege mecanismul de interacțiune al proteinelor imobilizate pe suprafețele de Au, evaluând comportarea unui compus redox și variația parametrilor circuitului electric echivalent.

Voltametriile ciclice oferă o perspectivă asupra *caracteristicilor generale ale suprafeței modificate*, în timp ce **spectroscopia de impedanță electrochimică** oferă informații despre *fenomenele de interfață* (legarea HSA/BSA de suprafața unui senzor și interacțiunea proteinei cu medicamentul).

Măsurătorile electrochimice (CV și EIS) au fost efectuate în **electrolitul** (0,1 M HEPES, la pH 7,25) ce a conținut 1 mM **ferocianură de potasiu** la electrodul cu suprafață de aur modificată cu HSA/BSA (Au-HSA/BSA), înainte și după interacțiunea cu medicamentul. Prezența unei specii redox este foarte importantă datorită caracterului izolator al HSA/BSA.

A. Interacțiuni dintre albumine (HSA/BSA) și acid folic (FA)

Acidul folic (FA), cunoscut și sub denumirea de folat, este un aliment bioactiv hidrosolubil din complexul de vitamine B (B9). FA joacă un rol în creșterea și repararea celulelor, unele studii arătând că el blochează cancerul în stadiile incipiente. Deci, **deficiența** FA poate duce la o varietate de probleme de sănătate umană (anemie sau defecte ale tubului neural, cum ar fi spina bifida), dar unele studii au subliniat apariția unor probleme legate de **aportul ridicat** de folat (determinând creșterea mai ușor a celulelor canceroase). Astfel, administrarea FA are o foarte mare importanță și poate fi folosit ca **vector** pentru diagnosticul și tratamentul specific al terapiei cancerului.

A.1 Caracterizarea prin CV a interacțiunii HSA/BSA - FA

Albuminele conțin o grupări -SH libere, fapt care permite chemosorbția lor directă pe suprafața de aur, metodă folosită în cazul măsurărilor electrochimice. În Fig. 1.25 prin CV-uri au fost evidențiate, atât imobilizarea **filmului de HSA** pe suprafața de aur prin adsorbția chimică (**Au-HSA**), cât și **interacțiunile dintre Au-HSA și FA**. **Scăderea intensității** vârfului de oxidare al ionilor $[Fe(CN)_6]^{3-}$ la suprafața de Au și **lărgirea separării** dintre acest vârf și cel de reducere (Fig. 1. 25A) dovedește depunerea unui film continuu de HSA pe suprafața de Au care **îngreunează transferul sarcinilor electrice prin interfața Au-HSA /electrolit**. O scădere similară a evidențiat **interacțiunea dintre HSA legat pe suprafața de aur (Au-HSA) și FA** în urma căreia **grosimea filmului de la suprafața Au a crescut și a încetinit transferul electronilor** (Fig. 1. 25B).

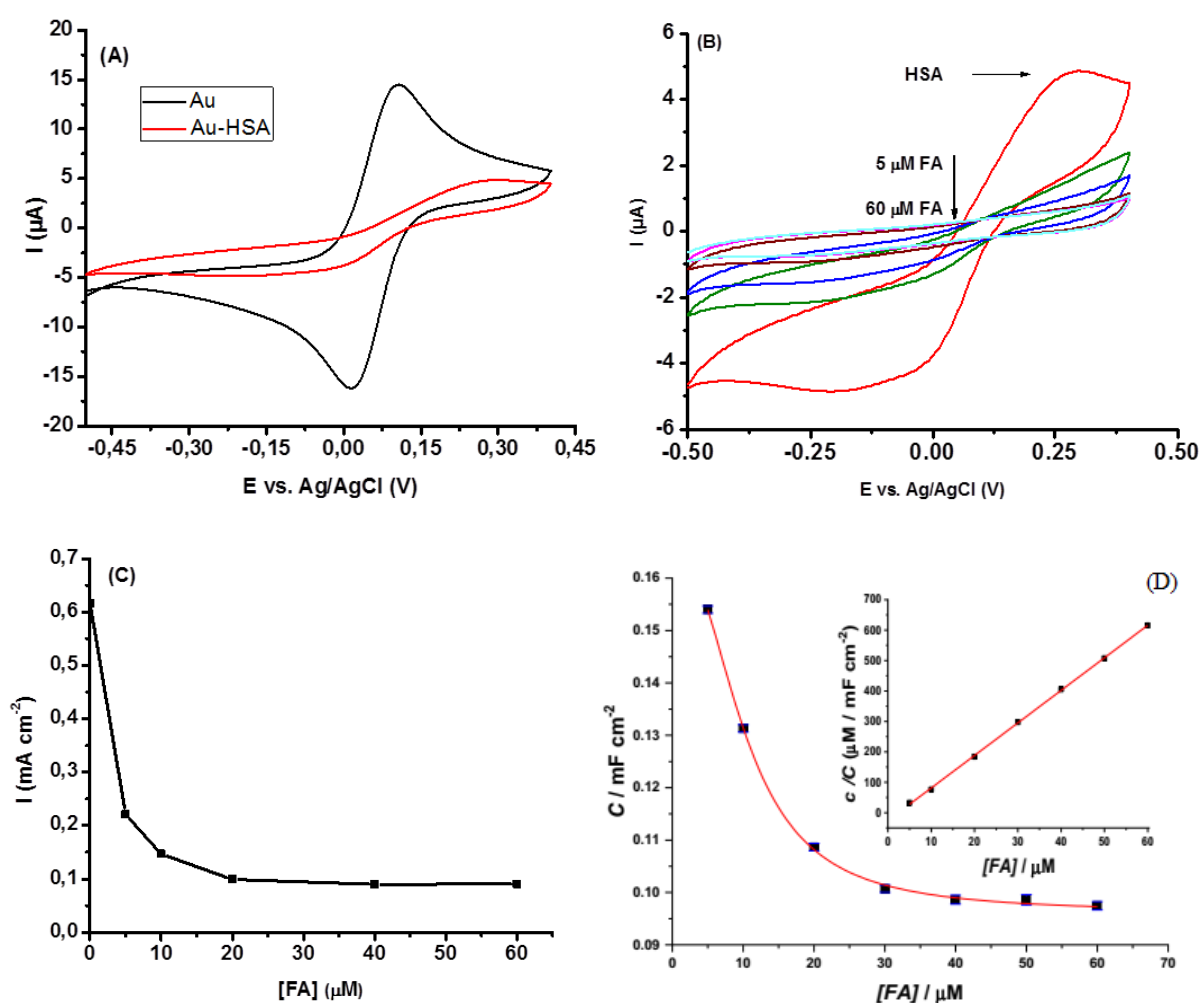


Fig. 1.25. CV ($v = 50\ mV\ s^{-1}$) pentru: (A) Au și Au-HSA, (B) interacțiunea Au-HSA cu FA. Izoterma Langmuir pentru: (C) I_p care descrie interacțiunea Au-HSA cu FA și (D) variația capacității electrice pentru interacțiunea Au-BSA cu FA și inserarea analizei de regresie liniară. Electrolit: 0,1 M HEPES, pH 7,25 +1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$

Interacțiunea dintre FA și Au-HSA a putut fi descrisă cu ajutorul **modelului izotermei Langmuir** (Fig. 1. 25C) care descrie cantitatea de FA adsorbită de pe Au-HSA

la o temperatură constantă prin **reprezentarea grafică** a intensității curentului anodic de oxidare (I_{pa}) din Fig. 1.25B în funcție de concentrația FA. Modelul de izotermă Langmuir presupune că *adsorbția FA din soluție este monostrat, distribuția situsurilor reactive de pe suprafața adsorbantă (Au-HSA) este omogenă și nu există o interacțiune laterală între proteine (Fig. 1.21C). Forma liniarizată a modelului de izotermă Langmuir care descrie echilibrul dinamic în procesul fizic de adsorbție este prezentată în ecuația (1).*

$$\frac{c}{I} = \frac{c}{I_{max}} + \frac{1}{K \cdot I_{max}} \quad (1)$$

unde:

I = intensitatea curentului de vârf anodic (I_{pa}),

I_{max} = intensitatea la echilibru (valoarea maximă obținută la saturație) a curentului de vârf anodic (corespunzător fracției situsurilor accesibile pentru FA în proteina HSA),

C = concentrația de FA,

K = constanta aparentă de legare dintre Au-HSA și FA (=constantă de adsorbție Langmuir și este legată de energia aparentă de sorbție).

În urma prelucrării datelor din **CV** a rezultat o constantă de legare $K_{CV-HSA-FA} = 4,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, care arată că **Au-HSA** are o **afinitate mare pentru FA** (indicator pentru o interacțiune puternică între FA și Au-HSA).

O **comportare similară** a fost obținută în cazul **interacțiunii Au-BSA și FA**. Modelul de izoterma Langmuir a fost de asemenea valabil și descris cu ajutorul ecuației (2) care corespunde formei liniarizate a modelului:

$$\frac{c}{C} = \frac{c}{C_{max}} + \frac{1}{K \cdot C_{max}} \quad (2)$$

În acest caz, **capacitatea electrică, C**, corespunzătoare suprafeței de aur modificată cu BSA pentru un potențial electric de 0,2 V a fost reprezentată în funcție de concentrația FA (Fig. 1. 21D),. Aceasta a fost calculată din CV-urile corespunzătoare fiecărei concentrații de FA cu formula $C = \Delta I/v$, unde:

ΔI = diferența dintre densitatea de curent citită pe scanarea directă și inversă a CV-ului și

v = viteza de scanare a potențialului electric.

În urma prelucrării datelor din **CV** a rezultat $K_{CV-BSA-FA} = 4,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, care arată că și BSA imobilizat pe suprafața, **Au-BSA**, are o **afinitate mare pentru FA** (similară cu cea dintre FA și Au-HSA).

A.2 Caracterizarea prin EIS a interacțiunii HSA/BSA - FA

Fig. 1.26A prezintă spectrele de impedanță electrochimică (diagrama Nyquist) realizate la 0,1 V față de Ag/AgCl, atât pentru electrozii de Au nemodificați, cât și cu Au-HSA, cu circuitul electric echivalent utilizat pentru a se potrivi spectrelor în inserție.

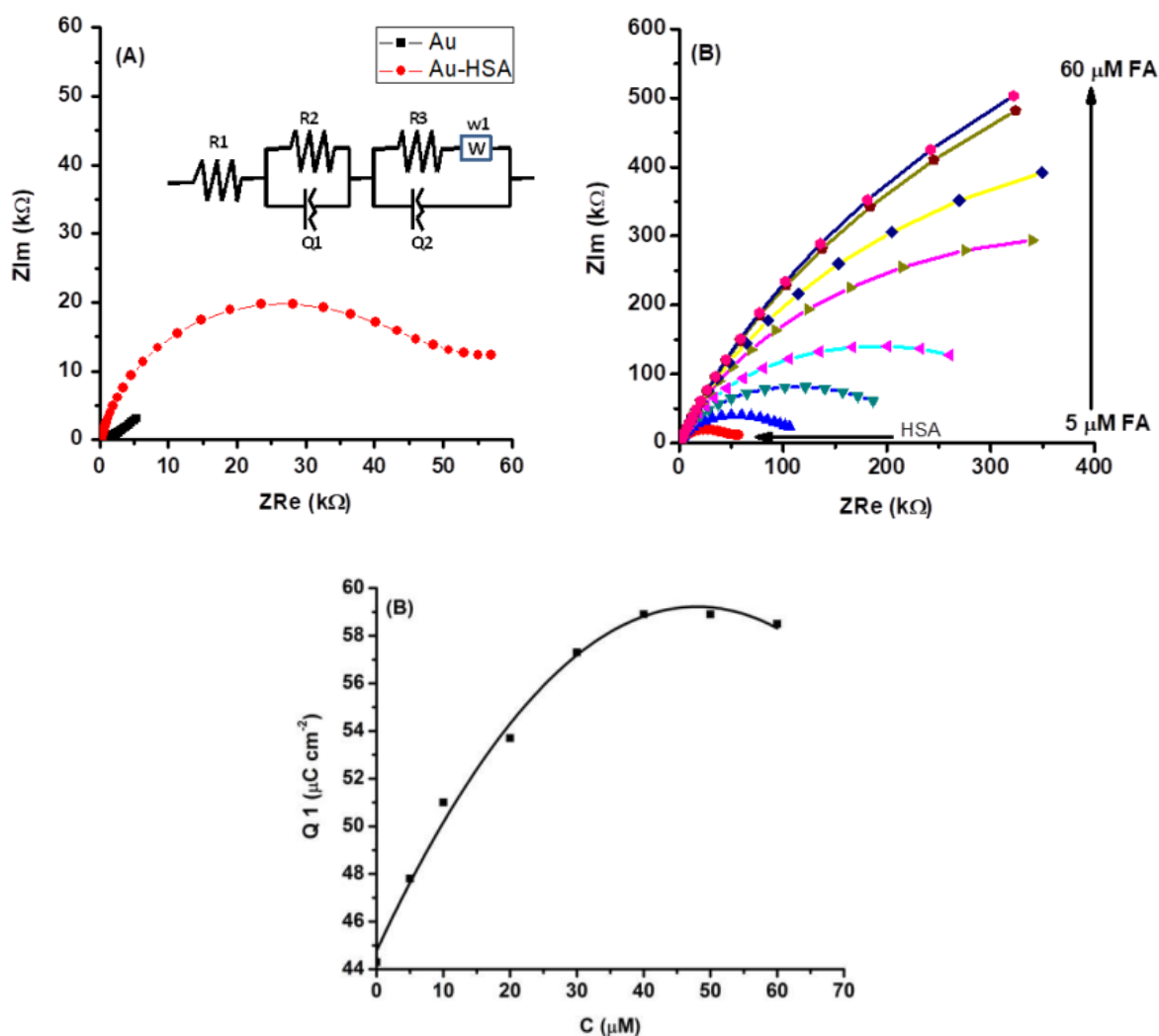


Fig.1.26. Graficele Nuyquist pentru: (A) suprafețele Au, Au-HSA, (B) interacțiunea Au-HSA cu FA și (C) izoterma Langmuir pentru Q_1 , care descrie interacțiunea Au-HSA cu FA. Inserție în (A): circuitul electric echivalent utilizat pentru fitarea graficelor. Electrolit: 0,1 M HEPES, pH 7,25 +1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$

Diagramele din Fig. 1. 26A și B au fost descrise ca *două semicercuri*, unul descriind **comportarea sarcinilor electrice și transferul lor** în regiunea de *frecvențe intermediare* ale potențialului electric alternativ aplicat și al doilea în *zona de frecvențe joase*. **Difuzia semi-infinită a ionilor $[Fe(CN)_6]^{3-}$ prin interfață** este descrisă de *coada liniară cu pantă aproape unitară la frecvențe foarte joase*.

Elementele circuitului electric echivalent, pentru cele două regiuni de frecvențe, au aceeași semnificație cu descrierea din Secțiunea 1.1.1, A4:

- combinația R_2 -CPE₁ pentru **filmul Au-HSA-FA la frecvențe intermediare** și
- combinația R_3 -CPE₂ pentru **interfața complex HSA-FA/electrolit, la frecvențe joase**.

Astfel, Q1 și Q2, care indică o măsură a **formării complexului Au-HSA-FA**, prin acumularea de sarcină la suprafața aurului, **urmează cinetica de adsorbție Langmuir** (Fig. 1. 26 C) conform **formeii liniarizate a ecuației Langmuir** de tip (2).

În urma prelucrării datelor **EIS** au rezultat constante de legare aparentă la echilibru similare, $K_{EIS-HSA-FA} = (10 \pm 0,5) \cdot 10^5 M^{-1}$ care arată că **Au-HSA** are o **afinitate mare pentru FA** (indicator pentru o interacțiune puternică între FA și Au-HSA).

Aceste valori sunt **similare cu cea obținută prin CV** și de zece ori mai mare decât valoarea obținută prin măsurătorile standard de stingere a fluorescenței HSA (liberă în soluție) în prezența FA, $K_{F-HSA-FA} = 9,78 \cdot 10^4 M^{-1}$.

În cazul **interacțiunii Au-BSA și FA**, modelul de **izoterma Langmuir** a fost de asemenea valabil și descris cu ajutorul ecuației (2), dar doar pentru Q2. Astfel, constanta de legare aparentă la echilibru în acest caz a fost $K_{EIS-BSA-FA} = 3,70 \cdot 10^5 M^{-1}$, un pic mai mică decât $K_{EIS-HSA}$, similară cu $K_{CV-BSA-FA}$, dar de 5 ori mai mare decât constanta de legare obținută prin stingerea fluorescenței BSA, $K_{F-BSA-FA} = 8,70 \cdot 10^4 M^{-1}$.

1.2.2 Caracterizarea optică (SPR) a interacțiunii albumine – medicamente

B. Interacțiuni dintre HSA/BSA și FA

Măsurătorile SPR au fost efectuate într-o celulă cu două canale (1 μ L per canal), într-un flux continuu de **electrolit** (0,1 M HEPES, pH 7,4), cu un debit de 30 μ L/min. **Imobilizarea HSA/BSA pe suprafața de aur a senzorilor SPR** a fost optimizată prin realizarea unui studiu de concentrație a soluțiilor stoc de HSA/BSA. Senzorii SPR au fost folosiți ca atare sau funcționalizați cu grupări amino ($-NH_2$) la 25 °C.

Reproductibilitatea măsurătorilor SPR pentru studiul interacțiunilor BSA-FA la suprafața de aur depinde de mai mulți factori. Funcționalizarea suprafețelor de aur și a interacțiunilor biomoleculare la acele suprafețe au fost **evaluate calitativ prin scanare unghiulară (AS-SPR)**. Pentru **optimizarea condițiilor de imobilizare a BSA** pe suprafața de aur, au fost folosite soluții de BSA de două concentrații.

În ambele situații, există o mică modificare a intensității fasciculului la rezonanță, mai pronunțată pentru concentrația mai mare. La **adăugarea a 60 μ M FA**, pot fi observate **schimbări ale unghiului de rezonanță SPR, dar și ale intensității reflectate**, mai mici în comparație cu cele datorate legării BSA, ceea ce indică atașarea moleculelor mici la stratul BSA. În cazul concentrației mai mari de BSA, după adăugarea FA, schimbarea rezonanței către unghiuri mai mari este foarte mică, dar intensitatea corespunzătoare scade (variație negativă) conform Fig. 1.27 A și B. Considerăm că o concentrație mare de BSA provoacă aglomerarea moleculelor, care nu au fost îndepărtate în timpul etapei de spălare și absoarbe mai multă lumină. Aceste molecule în exces s-au legat de molecule de FA libere și au fost îndepărtate în timpul procesului de transport în masă, în timp ce următoarele molecule FA se leagă de moleculele de BSA stabile, adsorbite pe suprafața de aur. Acest lucru ne-a condiționat **să folosim în măsurătorile SPR cea mai**

mică concentrație a soluției de BSA (1 mg mL^{-1}) pentru legarea stratului de albumină pe suprafață.

Din analiza datelor (Fig. 1.27 C și D) a rezultat că **interacțiunea SPR dintre FA și Au-BSA** urmează **modelul Langmuir de legare**, permițându-ne să determinăm constanta aparentă de legare, folosind ecuația 3 pentru intensitatea I a luminii reflectate, $K_{\text{SPR-BSA-FA}} = 19 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, care este mai mare cu două ordine de mărime față de constanta de legare obținută prin metoda standard de stingere a fluorescenței, $K_{\text{F-BSA-FA}} = 8,72 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

$$\frac{c}{I} = \frac{c}{I_{\max}} + \frac{1}{K \cdot I_{\max}} \quad (3)$$

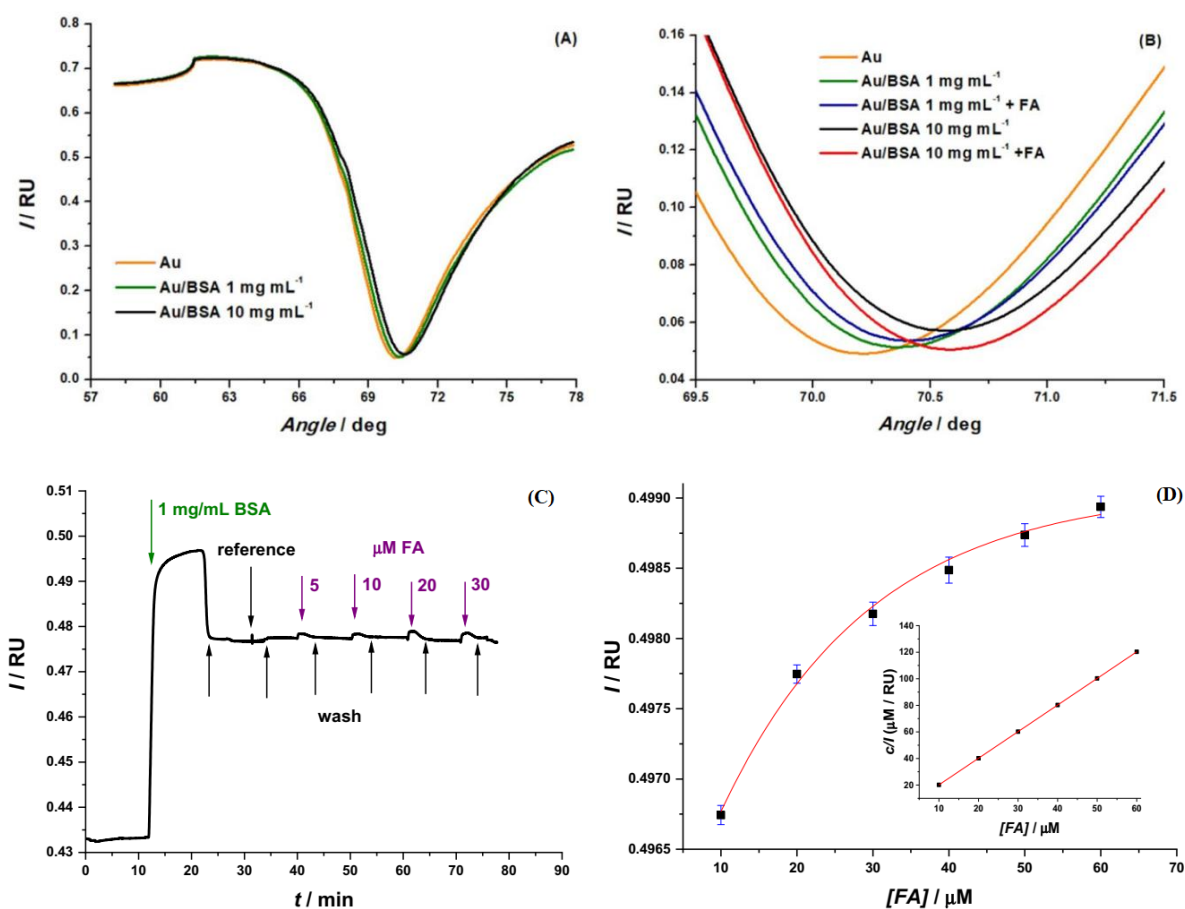


Fig. 1.27. Monitorizarea prin AS-SPR a adsorbției BSA (1 și 10 mg mL^{-1}) pe Au: (A) evidențierea variației unghiului SPR (B). Senzogramme FA-SPR pentru imobilizarea 1 mg mL^{-1} BSA pe Au urmată de titrarea FA (C), variația intensității SPR pentru interacțiunea Au-BSA cu FA și (D) inserarea analizei de regresie liniară.

Astfel, **constrângerea albuminelor** la suprafața de aur a **influențat orientarea situsurilor de legare a HSA/BSA către FA**, determinând **formarea unui complex proteic mai puternic decât cel format în soluție cu HSA/BSA liberă**.

În urma analizei **modului de imobilizare ale BSA pe aur**, concluzionăm că interacțiunea nespecifică, prin **chemosorbția directă** a BSA pe Au, pare a fi potrivită pentru o **formare a unui complex puternic** între Au-BSA și FA liberă.

Întrucât pentru măsurătorile SPR, BSA a fost **adsorbită pe suprafața aurului mod hidrodinamic** (în timp ce soluția s-a deplasat cu viteză mică, cu un debit de 30 mL/min), legarea sa poate duce la **formarea a mai multe straturi de proteine care interacționează prin grupări hidrofobe**.

Pentru măsurătorile electrochimice, moleculele BSA au fost **adsorbite într-un mod static**, după depunerea unei picături de soluție pe suprafața de aur.

Astfel, concluzionăm că **imobilizarea hidrodinamică prin chemosorbție** a BSA, permite **orientarea siturilor de legare** ale moleculelor proteice astfel încât să **favorizeze legarea moleculelor libere de FA printr-o interacțiune puternică**.

C. Interacțiuni dintre BSA și LT4

Capacitatea **proteinei serice (BSA) constrânsă la suprafața de a interacționa cu LT4** depinde de metoda de imobilizare. **Pentru fixarea BSA** pe suprafața de aur (Au-BSA) au fost folosite două metode:

- adsorbția directă prin **chemosorbție** și
- imobilizarea **covalentă** pe suprafețe de aur funcționalizate cu grupări amino.

Toate măsurătorile SPR au fost efectuate într-un flux continuu (**imobilizare hidrodinamică**) de 0,1 M HEPES, pH 7,4, cu un debit de 30 mL/min, cu excepția funcționalizării suprafeței de aur, prin adsorbție cu Cys, când curgerea a fost oprită timp de 20 min (**imobilizare statică**).

Funcționalizarea suprafețelor de aur și interacțiunile biomoleculare la acele suprafețe au fost **evaluate calitativ prin SPR cu scanare la unghi fix (FA-SPR)**.

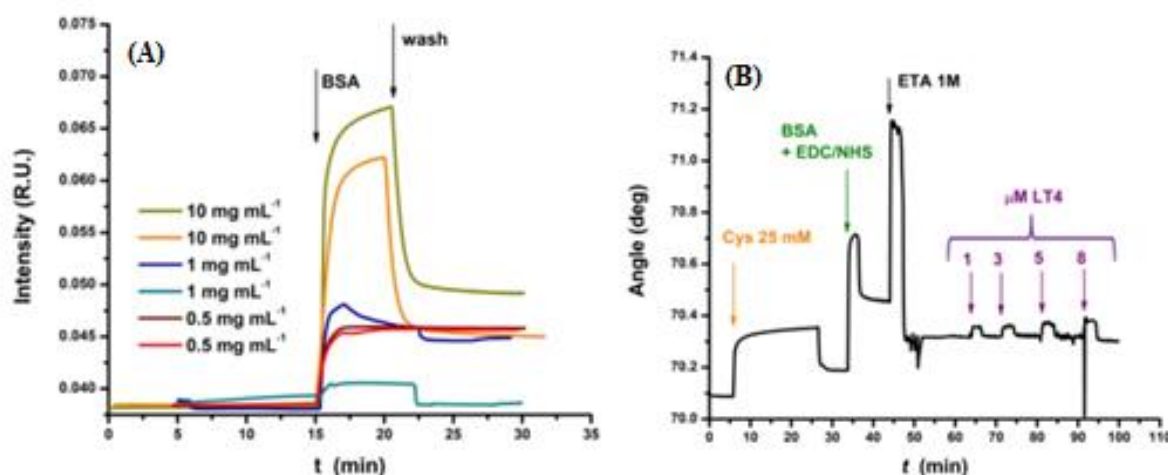


Fig. 1.28. Senzograme pentru imobilizarea BSA pe: (A) suprafață de Au, (B) suprafață de Au-Cys urmată de titrarea LT4. Electrolit: 0,1 M HEPES, pH 7,4.

Reproductibilitatea măsurătorilor SPR pentru studiul interacțiunilor BSA-LT4 la suprafața de aur depinde de mai mulți factori. Pentru **optimizarea condițiilor de imobilizare a BSA prin chemosorbție** pe suprafața de aur, au fost folosite soluții de BSA de concentrații diferite. **Cea mai bună reproductibilitate** a măsurătorilor SPR a fost găsită pentru concentrația soluției de BSA de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (Fig. 1.28 A).

Pentru a doua metodă, de imobilizare a BSA, suprafața de aur a fost funcționalizată cu gruparea $-\text{NH}_2$, folosind o soluție de cisteină (Cys). **Legarea covalentă a BSA de suprafața** sensorului (Au-Cys) s-a realizat în **mod hidrodinamic** (Fig. 1.28 B).

După optimizarea imobilizării BSA pe suprafețele de aur, interacțiunea acestora cu diferite concentrații de LT4 (prin titrare) a fost studiată (Fig. 1.28 B). **Ecuția Hill-Langmuir**, care este folosită pentru a **cuantifica interacțiunea** din punct de vedere farmacologic și biochimic a **liganzilor la macromolecule** în funcție de concentrația ligandului, este bine descrisă de ecuația 4 și de forma ei liniarizată (ecuația 5).

$$\frac{[L_n R_0]}{[R_0]} = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} = \frac{[L]^n}{[L]^n + (K_A)^n} \quad (4)$$

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n_H \log[L] - \log K_d \quad (5)$$

Unde:

$$\frac{[L_n R]}{[R_0]} = \theta = \text{fracțiunea situsurilor proteinei receptorului legate de ligand,}$$

$[R_0]$ = concentrația totală a receptorului,

$[L]$ și $[L_n R]$ = concentrațiile ligandului liber și a receptorilor legați de ligand,

$K_d = \frac{1}{K} = \text{constanta aparentă de disociere la echilibru (inversul constantei aparentă de legare),}$

$K_A = \text{constanta de disociere microscopică (este concentrația ligandului la jumătate de ocupare a locurilor receptorului) și}$

$n (= n_H) = \text{coeficientul Hill ce reprezintă numărul de situri de legare al proteinei (dacă } n_H = 1, K_A \text{ este egal cu } K_d).$

În urma prelucrării datelor obținute prin măsurătorile SPR a rezultat:

1. interacțiunea Au-BSA și LT4: $K_d = 74,1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $K_{\text{SPR-BSA-LT4}} = 1,35 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ și $n_H = 1,05$,

2. interacțiunea Au-Cys-BSA și LT4 a rezultat $K_d = 67,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $K_{\text{SPR-Cys-BSA-LT4}} = 1,47 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$,

Astfel, **constanta aparentă de legare a LT4 de Au-BSA**, măsurată prin SPR pentru ambele metode de imobilizare a BSA, a fost **mai mică** cu două ordine de mărime decât cea obținută prin **măsurători standard de stingere a fluorescenței, când BSA a fost liberă** în soluție ($K_{\text{F-BSA-LT4}} = 5,12 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, 25°).

1.2.3. Caracterizarea spectroscopică a stabilității complexului BSA-LT4

Spectroscopia de **absorbție UV-Vis** a fost utilizată pentru a monitoriza atât **formarea complexului BSA-LT4** (Fig. 1.29 A), cât și pentru a evidenția **influența vitaminelor** asupra stabilității complexului BSA-LT4 (Fig. 1.29 B-D). Din spectrul de **absorbție UV-Vis al LT4**, absorbanta maximă a fost găsită la lungimea de undă de **240 nm**, cu un al doilea maxim obținut în jurul valorii de **320 nm** (Fig. 1.29A). Formarea **complexului BSA-LT4** este pus în evidență de un maxim al absorbantei la **280 nm**, caracteristic albuminei **BSA** (datorită rezidului Trp).

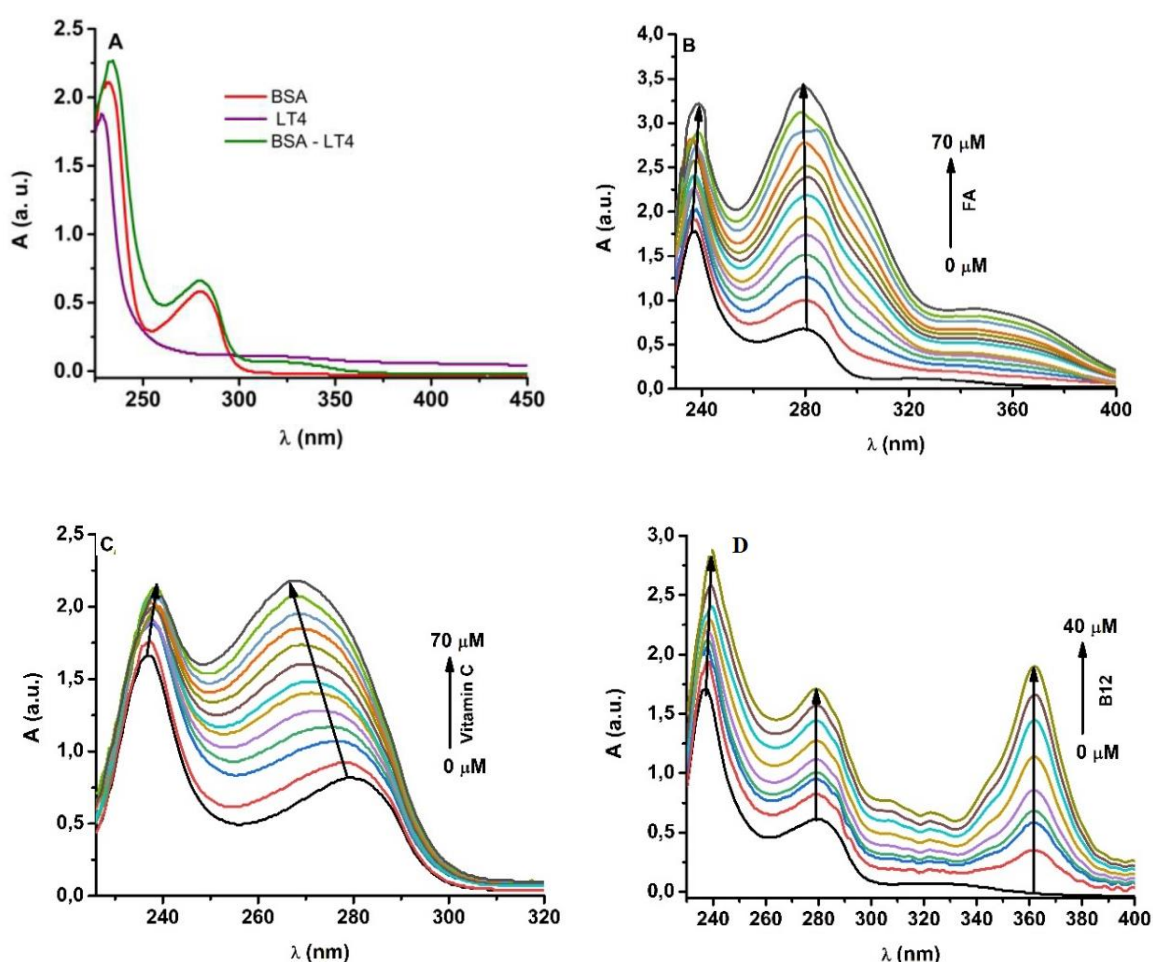


Fig. 1.29. Spectrele de absorbție UV: (A) ale BSA, LT4 și BSA-LT4; ale BSA-LT4 în prezența: (B) acid folic, (C) vitamina C și (D) vitamina B12.

Modul în care trei **vitamine**, care pot fi întâlnite în alimente, **acționează asupra complexului BSA-LT4** a fost studiat prin înregistrarea spectrelor UV-Vis în urma titrării cu soluții de concentrații crescătoare de vitamina C, acid folic (FA) și vitamina B12. Concentrația de LT4 a fost aleasă pentru a asigura saturația sitului de legare a proteinei cu LT4.

În cazul **FA** (Fig. 1.29B) nu există *nicio schimbare pentru absorbția maximă a BSA*, în timp ce *absorbția maximă a LT4* se schimbă puțin, către lungimi de undă mai mari (*batocromic*). Cu toate acestea, *un umăr apare pe vârful BSA, la ~ 300 nm*, pentru o concentrație mai mare de 20 μM FA, sugerând *aparitia unui sistem conjugat*. Atât FA, cât și LT4 au o grupare amino și din măsurători de fluorescență se știe că formarea complexului BSA-LT4 are loc prin intermediul acestei grupări.

Odată cu creșterea concentrației de **vitamina C**, *absorbția maximă a BSA* se deplasează către lungimi de undă mai mici (efect *hipsocromic*), în timp ce *absorbția maximă a LT4* se comportă ca *batocromic*, ca în cazul interacțiunii cu FA (Fig. 1.29C).

În prezența **vitaminei B12** (Fig. 1.29D) *vârful de absorbție al BSA rămâne neschimbat*, în timp ce începând cu prima concentrație a vitaminei B12, *apare un umăr la 287 nm*. Vârful de absorbție specific al B12 (caracteristic în apă) *apare la 362 nm*, iar pentru LT4, *a fost observată o schimbare batocromică*, sugerând o interacțiune mai puternică a complexului BSA-LT4 cu vitamina B12.

Rezultatele obținute confirmă rezultatele obținute prin studii de fluorescență. **Interacțiunile vitaminei C și ale FA cu BSA-LT4 au fost moderate**, în timp ce **legarea vitaminei B12 a fost mult mai puternică, prelungind timpul de depozitare al LT4 legat de BSA** (de exemplu în plasma sanguină). **Vitamina B12 stabilizează complexul BSA-LT4, dar scade concentrația de LT4 liber**, care este forma activă a medicamentului în celulă.

1.2.4. Concluzie parțială

Se observă că în cazul dezvoltării **sistemelor de transport și livrare a medicamentelor bazate pe albumine serice**, studierea mecanismului de interacțiune a acestora cu fiecare medicament, este foarte importantă. Modul de **realizare a imobilizării** moleculelor proteice (*hidrodinamic vs. static*) **influențează atât conformația** proteinei, cât și **expunerea siturilor de legare** cu medicamentul, spre deosebire de cazul când moleculele se află libere în soluție (măsurători de fluorescență).

Astfel, studiile in vitro arată că **interacțiunea dintre albumină și FA** este mai puternică când albumina este **constrânsă la suprafață** prin **chemosorbția directă**. Pentru substituentul hormonului tiroidian, **complexul mai stabil** este obținut printr-o interacțiune foarte puternică dintre **albumina și LT4, liberi în soluție**.

Alți compuși aflați în circulație pot, de asemenea, **influența stabilitatea complexului**. O **interacțiune puternică este benefică pentru transportul** complexului albumină – medicament în circulația sistemică, dar **scade concentrația medicamentului liber** (forma activă a medicamentului în celulă), de aceea aceste studii trebuie corelate cu cele de eliberare și livrare controlată a medicamentelor în mod țintit.

În concluzie, **formarea unui complex între medicamentul liber și albumina legată** reprezintă o bază pentru **dezvoltarea sistemelor eficiente de administrare a medicamentelor, conjugate cu molecule transportoare: nanoparticule de aur conjugate cu albumină sau nanoparticule de albumină**. Aceste structuri sunt de **mare interes pentru medicină**, pentru că contribuie la o mai bună **înțelegere** a interfeței dintre

nanotehnologie și medicină, dar și la **cunoașterea** interacțiunii dintre alte medicamente sau constituenți alimentari bioactivi și complexul care transportă aceste molecule în sistemul circulator.

1.3 Concluzie

Optimizarea *modificării și funcționalizării suprafețelor* ne-a permis dezvoltarea ulterioară a **noi platformelor senzoriale** pentru o **deteție moleculară specifică**, iar studierea *mecanismului de legare a medicamentelor de albuminele serice, ca molecule transportoare, dar și a stabilității complexului transportor-medicament* de reprezintă o bază pentru obținerea unor **sisteme administrare a medicamentelor** pentru **abordări terapeutice inovatoare**.

2. Dezvoltarea platformelor senzoriale

Pentru dezvoltarea unor **noi modalități de diagnostic**, din ce în ce mai mult noi *platforme senzoriale* sunt luate considerare cu ajutorul cărora se obțin într-un mod facil, dar precis, **identificarea, cuantificarea și monitorizarea biomarkerilor**.

Un astfel de dispozitiv poate fi sub forma unei *platforme senzoriale* care constă din:

- 1 un aparat (ex. potențostat, spectrofotometru) conectat la
- 2 senzori sau biosenzori și
- 3 controlat prin intermediul unui software de calculator.

Un **senzor**, sub acțiunea **unui fenomen** (fizic, biochimic sau biologic), furnizează un **semnal** sub diferite forme (variația intensității unui curent electric sau a intensității unui fascicul de unde electromagnetice) care poate fi măsurat. **Parametrii** sensorului **pot fi îmbunătățiți prin modificarea suprafeței sale active** cu ajutorul unor **componente biologice, artificiale sau combinația lor, cu rol de recunoaștere (receptori)** a moleculelor **țintă (liganzi)** (conform secțiunii 1).

Biomoleculele, datorită rolului lor de mediatori, transportori sau senzori biologici, pot fi utilizate împreună cu *filme polimerice subțiri și/sau nanostructurate* pentru modificarea suprafețelor senzorilor și dezvoltarea unor **noi modalități de diagnosticare**, (*biosenzori sau lab-on-chip*) sau de **terapie (drug delivery)**. **Nanosistemele** bazate pe nanostructuri utilizează în recunoașterea unei molecule țintă **unicitatea** proprietăților **nanomaterialelor**. Astfel, este posibil **diagnosticul molecular** cu **nano(bio)senzori avansați** care pot detecta **concentrații foarte mici (nM și fM)**.

Obiective:

Pentru toate acestea este nevoie de **o evaluare** foarte amănunțită care permit:

- a. **dezvoltarea și optimizarea procedeelelor de detecție** cu ajutorul *platformelor senzoriale cu suprafețe modificate optimizate*.
- b. **validarea platformelor senzoriale pentru detecția substanțelor**.

2.1 Senzori cu film de cobalt-porfirină

Scopul acestei cercetări a constat în **dezvoltarea unor platforme noi de detecție a dopaminei. Platforma s-a bazat pe senzori și biosenzori** electrochimici optimizați în secțiunea 1.

Obiective urmărite:

1. **optimizarea parametrilor de detecție și cuantificare a dopaminei *in vitro***.
2. **validarea detecției dopaminei în probe reale**.

Metode de detecție:

- A. **măsurători electrochimice de voltametrie în puls diferențial (DPV)**.

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în:

Revistă ISI (FI = 2,677)

[1] **M. Florescu***, M. David, *Tyrosinase-based biosensor for selective dopamine detection*, **Sensors**, 2017, 17, 1314-1329.

Abstract în revistă ISI (FI = 2,527)

[2] M. David, M. Florescu*, *Novel tyrosinase-based biosensor for real sample dopamine*, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2017, 46(1), S328-S328.

Reviste BDI:

[3] **M. Florescu***, A. Baicu, I. Capan, Gh. Coman, *Selective determination of dopamine using modified electrodes by differential pulse voltammetry*, **Romanian Journal of Biophysics**, 25(2), 2015, print / ISSN: 1220-515X, electronic / ISSN: 1843-424X.

[4] **M. Florescu**, A. Valceanu, Ghe. Coman, *Aplicații ale tirozinazei și lacazei: biosenzori enzimatici electrochimici*, **Jurnal Medical Brasovean**, Nr. 2, 2013, ISSN 1841-0782, e-ISSN 2247 – 4706.

2.1.1 Detecția dopaminei cu CoP (S-CoP și S-CoP-Tyr)

Oxidarea dopaminei la dopaquinonă poate fi efectuată utilizând atât **metale tranziționale**, cât și **cataliza prin enzime (tirozinază)**. De aceea, în cazul folosirii metaloporfirinelor, **metalul central afectează sensibilitatea senzorului**.

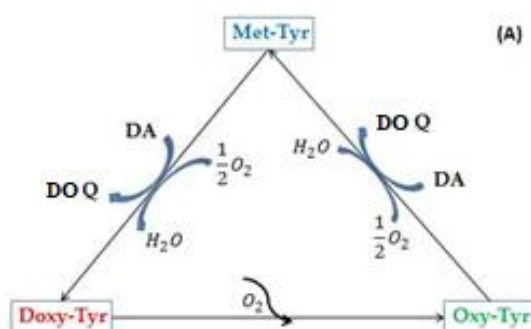
Senzorii cu suprafață de aur modificată, S-CoP și S-CoP-Tyr, au fost folosiți pentru cuantificarea DA, în absența și prezența interferentului AA.

La pH 8,0, în cazul **S-CoP**, atracția electrostatică dintre DA (încărcată pozitiv) și porfirina (încărcată negativ) **accelerează transferul de electroni**.

Pentru **S-CoP-Tyr**, **CoP** acționează ca un **mediator** care **îmbunătățește transferul direct de electroni** între Tyr și electrozii de Au.

DA poate fi ușor oxidată electrocatalic de CoP pentru a forma **dopamin-o-chinonă (DOQ)** care va fi **redușă** la suprafața electrodului.

În cazul **S-CoP-Tyr**, **stările de oxidare ale atomilor de cupru ai tirozinazei se schimbă** pentru a da diferite forme ale enzimei (Schema 1).



Schema 1. Cataliza enzimatică a dopaminei cu ajutorul S-CoP-Tyr.

Detecția **rapidă, selectivă și sensibilă a DA** în prezența AA, a fost obținută prin **DPV**.

Efectul modificării suprafeței cu CoP poate fi observat prin **aparitia atât a vârfului de oxidare al DA, cât și al AA la potențiale mai scăzute**.

Parametrii optimizați ai procedurii DPV de detecție și cuantificare a DA au fost determinați pentru **detecția DA selectivă și sensibilă**, precum și pentru **evitarea pasivizării suprafeței** senzorului prin radicalii fenoxi (dopachrom).

Folosind **setările optimizate de pretratare** senzorul de Au modificat cu CoP a avut un răspuns liniar până la 50 μM DA, o sensibilitate **$S = 0,577 \pm 0,041 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$** cu o limită teoretică de detecție de **$\text{LOD} = 0,98 \mu\text{M}$** .

Procesele de detecție și cuantificare ale DA au fost studiate și în prezența interferentului principal, AA.

La o concentrație constantă de $200 \mu\text{M}$ AA (similară cu cea aflată în sânge) **sensibilitatea senzorului S-CoP** pentru DA a fost $0,561 \pm 0,01 \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ și **LOD = $2,46 \mu\text{M}$** ($R^2 = 0,997$) (Fig. 2.1A). Figura 2.2 prezintă răspunsul biosenzorului **S-CoP-Tyr** pentru DA la **schimbarea concentrației AA** (A), respectiv la **menținerea constantă de $200 \mu\text{M}$ AA** (B).

Pentru **concentrații simultane crescătoare** pentru AA și DA, (Fig. 2.1B) detecția DA s-a făcut cu o **sensibilitate de $0,443 \pm 0,01 \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$** și **LOD = $3,13 \mu\text{M}$** ($R^2 = 0,996$). Biosenzorul **S-CoP-Tyr** a prezentat cea mai mare sensibilitate **pentru DA de $1,22 \pm 0,02 \mu\text{A} \text{cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$** și **LOD = $0,43 \mu\text{M}$** ($R^2 = 0,997$) în domeniul $2 - 30 \mu\text{M}$, (o creștere simultană a concentrațiilor de AA și DA) conform tabelului 2.1.

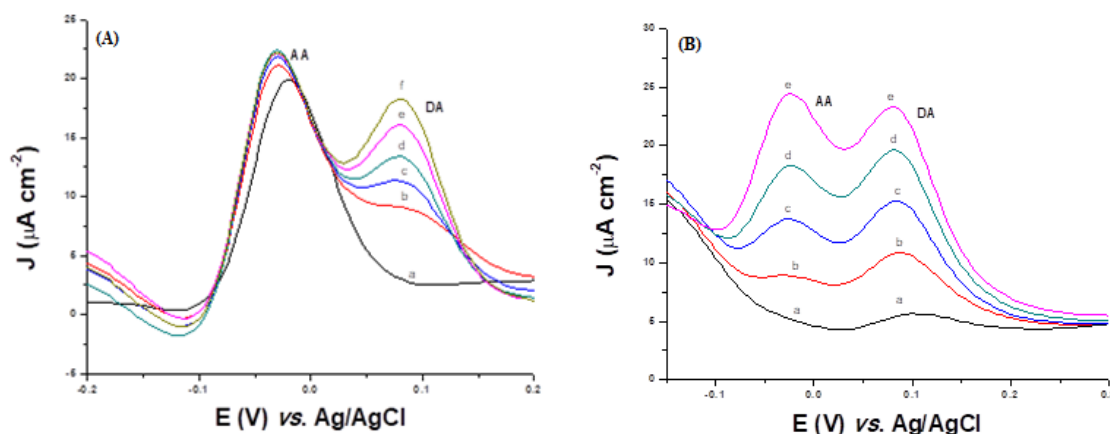


Fig. 2.1 Răspunsul senzorului S-CoP: (A) în prezența a $200 \mu\text{M}$ AA. Concentrația DA: $0 - 50 \mu\text{M}$ (a - f). (B) Concentrația DA: $10 - 50 \mu\text{M}$ (a - e) și AA: $50 - 250 \mu\text{M}$. Electrolit: NaPB 0.1 M , pH $8,0$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$. $t_c/t_d = 20\text{s}/40\text{s}$.

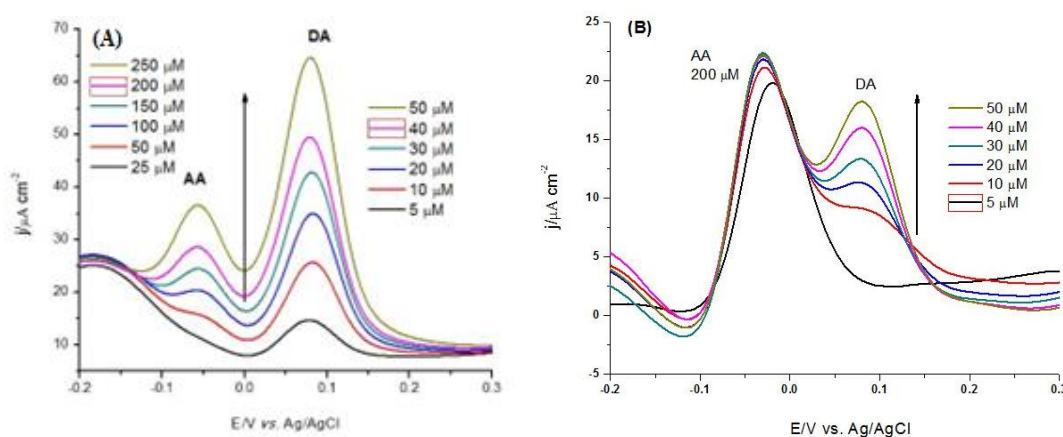


Fig. 2.2. Răspunsul biosenzorului S-CoP-Tyr la: (A) variația simultană a DA și AA. (B) $200 \mu\text{M}$ AA și DA variabil. Electrolit: $0,1 \text{ M}$ NAPB, pH $8,0$ $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabel 2.1. Parametrii senzilor S-CoP și S-CoP -Tyr pentru detecția DA în prezența și absența AA (valori fixe și variabile).

Analit	Bio/sensor	Linearitate		S	LoD
		/μM	/μA·cm ⁻² ·mM ⁻¹		/μM
DA	CoP	10–50		0,57	0,98
	CoP-Tyr	2–30		1,22	0,43
DA și AA fix	CoP	20–50		0,56	2,46
	CoP-Tyr	10–30		1,21	0,52
DA și AA var.	CoP	20–50		0,43	3,13
	CoP-Tyr	10–30		1,21	0,55

2.1.2. Detecția DA în probe reale

Performanțele senzilor și biosenzilor au fost testate pentru detecția medicamentului (clorhidrat de dopamină) folosind metoda adărilor standard (SAM) și calculul **gradului de recuperare** a concentrației (tabelul 2.2).

Tabel 2.2. Concentrația DA în probe reale de medicament (n = 3) prin SAM

Senzor	DA Specificat/μM	DA Adăugat/μM	DA Obținut/μM	RSD (%)	Recuperarea (%)
S-CoP	26.36	0	27.38 ± 0.83	5.9	103.0
	26.36	10	36.57 ± 1.02	5.2	100.5
	26.36	20	46.12 ± 0.53	2.1	99.0
	26.36	30	54.42 ± 0.97	3.2	96.0
S-CoP-Tyr	3.00	0	3.17 ± 0.32	2.6	105.0
	3.00	2	5.07 ± 0.28	4.0	101.0
	3.00	4	6.24 ± 0.25	2.7	89.0
	3.00	6	8.07 ± 0.59	4.7	89.0

După analiza datelor se recomandă **utilizarea biosenzorului în probe reale de medicamente (RSD = 4,7%)**. **Recuperarea medii** a fost de **96%** pentru biosenzorul S-CoP -Tyr și **99,6%** pentru senzorul S-CoP . **Determinarea concentrației DA** a fost realizată folosind și **curbele de calibrare** ale senzilor S-CoP și S-CoP-Tyr. Gradul de recuperare pentru fiecare valoare găsită este prezentată în Tabelul 2.3.

Tabelul 2.3. Determinarea DA în probe reale de medicament (n = 3) cu curba de calibrare

Senzor	DA Specificat / μM	DA Obținut / μM	$\overline{\text{DA found}}$ / μM	Recuperarea (%)
S-CoP	26.36	29.05		110
	26.36	26.18	27.50 ± 1.45	99
	26.36	27.28		103
S-CoP-Tyr	3.00	3.43		114
	3.00	2.79	3.10 ± 0.32	93
	3.00	3.09		103

2.1.3 Concluzie parțială

Senzori de aur cu suprafață modificată cu cobalt-porfirină (CoP) și tirozinază (Tyr), au fost folosiți pentru **detecția și cuantificarea dopaminei *in vitro***.

Sensibilitatea biosenzorului S-CoP-Tyr a fost mai mare (LOD mai scăzut) față de DA în prezența AA. În acest caz, CoP acționează ca mediator electrochimic, facilitând un transfer îmbunătățit al electronilor, iar Tyr a ajutat la creșterea sensibilității și selectivității senzorilor pentru DA.

Astfel, biosenzorii cu suprafețe de aur, S-CoP-Tyr, dezvoltați de noi și-au dovedit utilitatea pentru dozarea dopaminei *in vitro* (medicamente) și constituie o bază pentru dezvoltarea ulterioară a metodei de detecție sensibilă și selectivă a dopaminei în probele biologice (salivă, ser, urină).

2.2. Senzori cu structuri enzimatic multistrat (LbL)

Strategiile curente de dozare a glucozei sunt utilizate în special *in vitro*. Pe lângă metodele standard folosite în laboratoarele de analiză, analiza electrochimică prezintă o sensibilitate mare, un răspuns rapid și este ușor de folosit. Biosenzorii enzimatici electrochimici folosesc o anumită enzimă care catalizează o reacție biochimică, urmată de oxidarea sau reducerea unui produs electroactiv al reacției enzimatic.

Scopul acestei cercetări a constat în dezvoltarea unei platforme pentru cuantificarea glucozei. Platforma s-a bazat pe biosenzori electrochimici cu suprafață modificată cu structuri enzimatic multistrat auto-asamblate prin metoda strat-pe-strat (*Layer-by-Layer*, LbL) (optimizați în secțiunea 1).

Obiective urmărite:

1. **optimizarea parametrilor de detecție și cuantificare a glucozei *in vitro*.**
2. **validarea detecției în probe reale.**

Metode de detecție: **măsurători de amperometrie.**

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în:

Revista ISI (FI = 6,393)

[5] M. David, M. M. Barsan, C. M.A. Brett, **M. Florescu***, *Improved glucose label-free biosensor with layer-by-layer architecture and conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene)*, **Sensors and Actuators B**, 255 (2018) 3227–3234.

Proceedings ISI

[6] M. David, **M. Florescu***, M. M. Barsan, C. M.A. Brett, *Label-free evaluation of carbon nanoparticles in Layer-by-Layer self-assembled enzyme-based biosensors*, **Procedia Technology** 27 (2017) 304 – 305; DOI: 10.1016/j.protcy.2017.04.125.

[7] **M. Florescu**, *Evaluation of Functional Features of Immobilized Enzymes Using Electrochemical Label-Free Methods*, Advances In Biomedicine And Health Science, Recent Advances in Biology and Biomedicine Series, **Proceedings of 2nd WSEAS ISI International Conference on Biomedicine and Health Engineering (BIHE '13)**, June 1-3, 2013, Brasov, Romania. ISBN: 978-1-61804-190-6, ISSN: 1790-5125, **Proceedings of the International Conferences ISBN: 978-1-61804-196-8, WSEAS Press.**

Capitol de carte:

[8] M. David, **M. Florescu**, M. M. Barsan, L. Tugulea and C. M.A. Brett, *Development and Characterization of Layer-by-Layer Biosensors Based on PEI(+)/GOx(-) Layers Using Label-Free Methods*, in **Sensing in Electroanalysis, Vol. 8** (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytrás; Eds.), pp. 329-346. 2013/2014 University Press Centre, Pardubice, Czech Republic. ISBN 978-80-7395-782-7 (printed); 78-80-7395-783-4 (pdf).

2.2.1. Detecția glucozei cu structuri enzimatică LbL

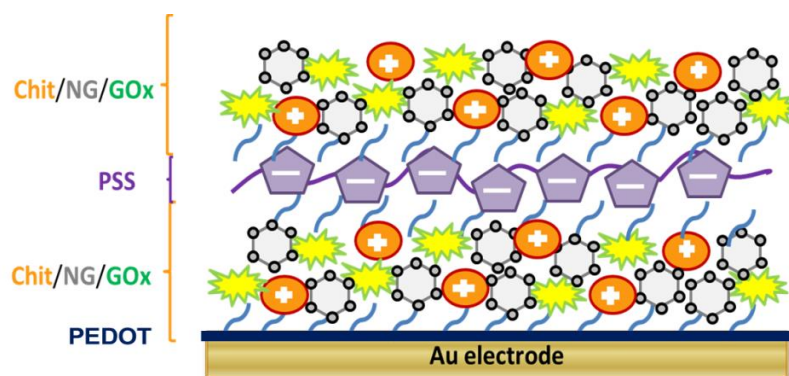
Detecția glucozei s-a realizat prin imobilizarea pe suprafața senzorului de aur a **enzimei GOX** al cărei rol a fost de a **cataliza oxidarea glucozei la acid glucuronic și H₂O₂** (apă oxigenată)

Senzori folosiți ca bază pentru arhitecturile LbL au de două tipuri:

1. electrod **bară de aur** și

2. electrozi imprimați cu film de carbon modificați cu CoPC (**CoPC-SPE**).

Structurile LbL de filme nanometrice au fost construite pe suprafețele senzorilor prin auto-asamblarea *moleculor încărcate cu sarcină electrică opusă* (prin interacțiuni electrostatice din soluții de polielectroliti). Un model este prezentat în Schema 2:



Schema 2. Arhitectura LBL a ansamblului multistrat

Astfel, două **arhitecturi LbL cu GOX** au fost obținute pe senzorii funcționalizați conform secțiunii 1.1.1:

- **Au/Cys/{PEI⁺/GOX}_n**, n= 1,2,3.
- **Au//PEDOT/{chit⁺(NG+GOX)/PSS⁻}**_n, n=1,2,3,4

Metoda de detecție a glucozei a fost **amperometria** la potențial fix de **-0,2 V**. Valoarea potențialului aplicat ajută la **micșorarea efectelor datorate interferențelor**, fiind aproape de *potențialul formal al cofactorului FAD/FADH₂* al enzimei GOX.

După adăugarea unor concentrații crescătoare de glucoză, s-au remarcat creșteri corespunzătoare ale intensității curentului catodic datorate reacțiilor de oxidare înregistrate la suprafața ambilor biosenzori. **Două mecanisme enzimatice** au fost luate în considerare pentru explicarea fenomenelor, ținând cont că *niciun mediator* nu a fost prezent în structura biosenzorilor:

- 1) Are loc **regenerarea directă a cofactorului enzimatic FADH₂** prin oxidarea sa la suprafața electrodului,
- 2) **O₂ a fost utilizat ca acceptor de electroni** de la FADH₂ pentru a forma H₂O₂.

Am concluzionat că **dominant pentru ambii biosenzori este primul mecanism enzimatic** (Fig. 2.3).

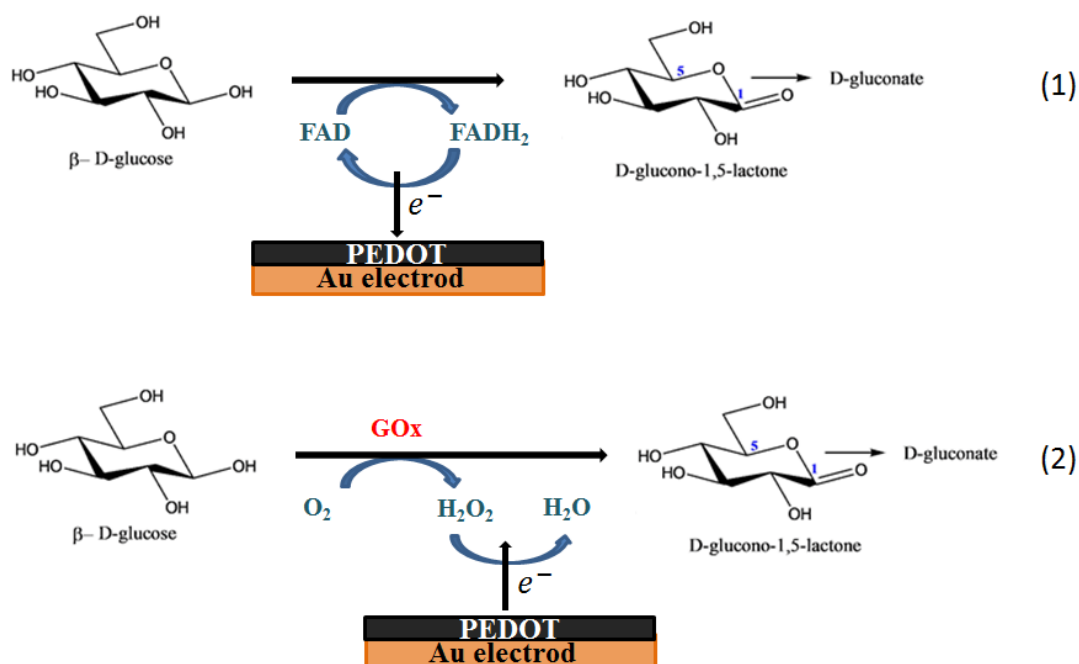


Fig. 2.3. Mecanismele de oxidare ale glucozei catalizate de GOx la suprafața senzorului Au/PEDOT/{chit⁺(NG+GOX)}_n, în 0,1 M NaPB pH 7,0 la -0,2 V vs. Ag AgCl.

Modificarea curentului catodic a fost mai mare în cazul nanobiosenzorului datorită prezenței NG și PEDOT-ului.

În Fig. 2.4 sunt reprezentate **curbele de calibrare** corespunzătoare celor doi biosenzori. În ambele cazuri s-a observat că există o **creștere semnificativă** a sensibilității de la primul bistrat Lb, dar **al treilea** a condus la o **scădere** a sensibilității biosenzorilor (difuzie îngreunată a moleculelor printre straturi). **Cea mai mare sensibilitate a fost pentru biosenzorii cu 2 bistraturi LbL:**

- **282 nA cm⁻² mM⁻¹** pentru **Au/Cys/{PEI⁺/GOX}**₂.
- **237 ± 3 μA cm⁻² mM⁻¹** pentru **Au/PEDOT/{chit⁺(NG+GOX)/PSS}**₂.

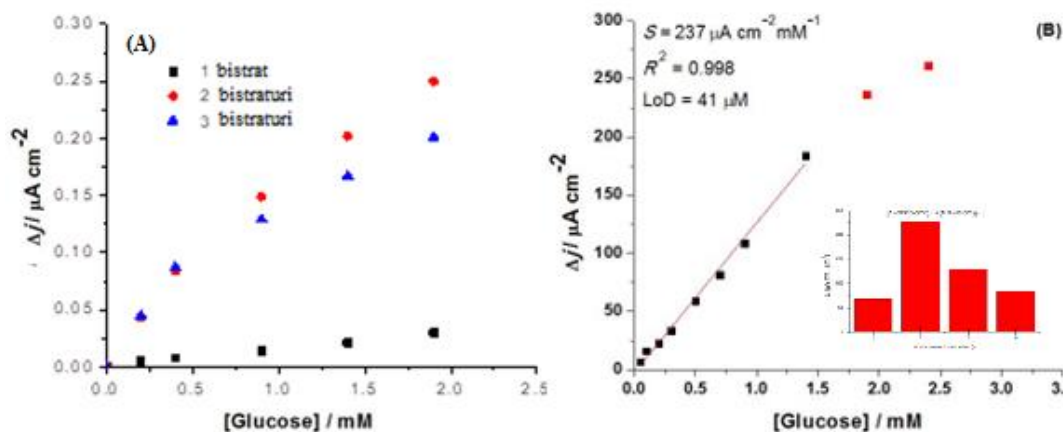


Fig. 2.4. Curbe de calibrare ale biosenzorilor: (A) Au/Cys/{PEI⁺/GOX}_n,

Prezența *nanoparticulelor*, **NG**, și a *polimerului conductor PEDOT* a dus la o **creștere a sensibilității** cu *trei ordine de mărime*, comparativ cu biosenzorii bazați pe structuri similare LbL dezvoltate fără PEDOT.

2.2.2. Detecția glucozei în probe reale

Biosenzorii **Au/PEDOT/{chit⁺(NG+GOX)/PSS⁻}₂** au fost testați pe probe reale (trei tipuri vinuri preparate din struguri albi). Pentru determinarea concentrației de glucoză **metoda adărilor standard** (SAM) a fost utilizată, iar valorile calculate sunt prezentate în tabelul 2.4.

Tabelul 2.4: Concentrația glucozei în vinuri (n = 3) utilizând SAM.

Metoda	Au/PEDOT/{chit ⁺ (NG+GOX)} ₂	Metoda spectrofotometri că Böhringer	Recuperarea (%)
Glucoză (g l ⁻¹)	2,69± 0,30	2,83± 0,34	105
	2,35± 0,24	2,29 ± 0,17	97
	2,25± 0,14	2,27 ± 0,12	101

2.2.3. Concluzie parțială

Biosenzori electrochimici au fost optimizați și folosiți pentru detecția **glucozei**.

Modificarea suprafețelor funcționalizate ale senzorilor a fost realizată cu structuri enzimatică LbL depuse cu ajutorul bistraturilor: **{PEI⁺/GOX⁻}₁₋₃**, și **{chit⁺(NG+GOX)/PSS⁻}₁₋₄**.

Cea mai mare sensibilitate a fost remarcată pentru biosenzorii în configurația cu două bistraturi LbL, **Au/PEDOT/{chit⁺(NG+GOX)/PSS⁻}₂**, **S = 237 ± 3 μA cm⁻² mM⁻¹**, cu o **LOD = 41 μM**.

Biosenzorii **obținuți** au fost testați **pe probe reale pentru detecția glucozei** în vin.

Rezultatele obținute recomandă dezvoltarea biosenzorilor electrochimici de aur modificați cu nanoparticule și filme de polimer conductor pentru detecția viitoare a glucozei în probe biologice (salivă, ser, urină).

2.3 Senzori electrochimici cu nanomateriale

Nanomaterialele au dimensiuni care variază de la 1 la 100 nm și datorită raportului mare suprafață-volum posedă proprietățile unice care favorizează **fabricarea senzorilor și biosenzorilor electrochimici cu selectivitate și limită de detecție (LOD) îmbunătățite.**

Scopul acestor cercetări a constat în **dezvoltarea și optimizarea unor platforme noi bazate pe nanomateriale** pentru detecție rapidă. **Platformele s-au bazat pe senzori electrochimici cu suprafață modificată cu nanostructuri de carbon și de aur** (optimizați în secțiunea 1).

Obiective urmărite:

3. **optimizarea parametrilor de detecție și cuantificare a levotiroxinei (LT4) *in vitro*.**
4. **optimizarea parametrilor de cuantificare a capacității antioxidante totale *in vitro*.**
5. **validarea detecției în probe reale.**

Metode folosite:

- Senzori electrochimici cu **nanostructuri de carbon** (CNT și G).
- Senzori electrochimici cu **nanozime de aur.**

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în următoarele reviste:

Revista ISI (FI = 3,031)

[9] M. David, A. Serban, C. V. Popa, **M. Florescu***, *Nanoparticle-based label-free sensors for screening the relative antioxidant capacity of hydro-soluble plant extracts*, **Sensors**, 2019, 19(3), 590.

Revista ISI (FI = 4,474)

[10] M. David, A. Serban, C. Radulescu, A. F. Danet, **M. Florescu***, *Bioelectrochemical evaluation of plant extracts and gold nanozyme-based sensors for total antioxidant capacity determination*, **Bioelectrochemistry**, 2019, 129, 124-134.

Revista ISI (FI = 4,464)

[11] M. David, A. Serban, T.A. Enache, **M. Florescu***, *Electrochemical quantification of levothyroxine at disposable screen-printed electrodes*, *Journal of*

Electroanalytical Chemistry, 2022, 911, 116240. DOI: 10.1016/j.jelechem.2022.116240. Fl. 4.464.

Abstract în revistă ISI (FI = 2,527)

[12] M. Florescu* M. David, A. Serban, C. Radulescu, C. Stih, D. Lazurca, Nanoparticle-based electrochemical sensor for antioxidant activity monitoring in plant extracts, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2017, 46(1), S137-S137.

Abstract în revistă ISI (FI = 3,854)

[13] M. Florescu, M. David, A. Serban, Nanozyme modified electrochemical biosensors as rapid screening tools for biomolecules, *Biophysical Journal*, 2019, 116(3), 148A.

Proceedings ISI

[14] M. David, A. C. Chebac, M.G. Chirita, M.J. Carezim, C. Santos, M. Florescu*, An impedimetric sensor for levothyroxine detection towards point of care applications, *2021 IEEE International Workshop on Impedance Spectroscopy (IWIS)*, 2021, 99-103, DOI: 10.1109/IWIS54661.2021.9711839.

Revista BDI

[15] M. Florescu, Ghe. Coman, *Label-free methods for real-time analysis used in oxidative stress biomarkers detection*, **Bulletin of the Transilvania University of Braşov**, Vol. 6 (55) No. 1, pp. 9-18, 2013, Series VI: Medical Sciences. Transilvania University Press, Brasov.

2.3.1. Senzori cu nanoparticule carbonice și de aur

Folosirea nanoparticulelor prezintă avantaje care oferă senzorilor **selectivitate și sensibilitate crescute**, precum și o **performanță generală superioară** potrivite pentru dezvoltarea unei **platforme senzoriale pentru detecția LT4**.

În urma optimizării parametrilor de detecție (secțiunea 1), s-au evidențiat **proprietățile crescute față de LT4** prin utilizarea senzorilor cu film de carbon și modificați cu nanoparticule carbonice: **SPE-CNT la pH 4,00** și a **SPE-G la pH 7,0**.

A. Cuantificarea LT4 cu nanoparticule carbonice

Pentru a realiza **identificarea și cuantificarea mai rapidă, selectivă și sensibilă a LT4** a fost folosită **DPV**, cu preconcentrare la un potențial fix.

De asemenea, în etapele anterioare de optimizare, am observat din CV că există două vârfuri de oxidare (O1 și O2) care pot fi monitorizate. O1 este caracteristic oricărui compus care conține o grupă *fenol*, ceea ce ne permite să **creștem specificitatea** senzorilor prin **monitorizarea vârfului de oxidare O2 care este al produsului de oxidare LT4**.

- Au fost realizate două scanări DPV succesive. **Scan 1** a generat :
Scan 1 a generat :

- A. pentru **SPE-CNT la pH 4,00**: regiune liniară între $0,5 \div 3,0 \mu\text{M}$ LT4, cu $S = 1,76 \pm 0,2 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ și $\text{LoD} = 0,15 \mu\text{M}$,
- B. pentru **SPE-G la pH 7,00**, au fost observate două regiuni liniare: Primul între $0,5 \div 1,5 \mu\text{M}$ LT4, cu $S = 5,41 \pm 0,3 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, și $\text{LoD} = 0,14 \mu\text{M}$ și un al doilea între $2,0 \div 11 \mu\text{M}$ LT4, cu $S = 1,59 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ și $\text{LoD} = 1,47 \mu\text{M}$.

Scan 2 a generat **răspunsuri mult mai mari** ale ambilor nanosenzori, prin urmare, a fost introdusă o etapă de pretratament în măsurătorile DPV **prin aplicarea unui potențial de pre-concentrare** apropiat de potențialul de oxidare al O1. În acest fel, gruparea fenol a LT4 este oxidată și a putut fi **monitorizat vârful O2, caracteristic LT4**, care a apărut mai pronunțat.

Măsurătorile DPV efectuate în condițiile menționate mai sus, au evidențiat că **performanța analitică a senzorilor s-a îmbunătățit semnificativ** (Fig. 2.5A).

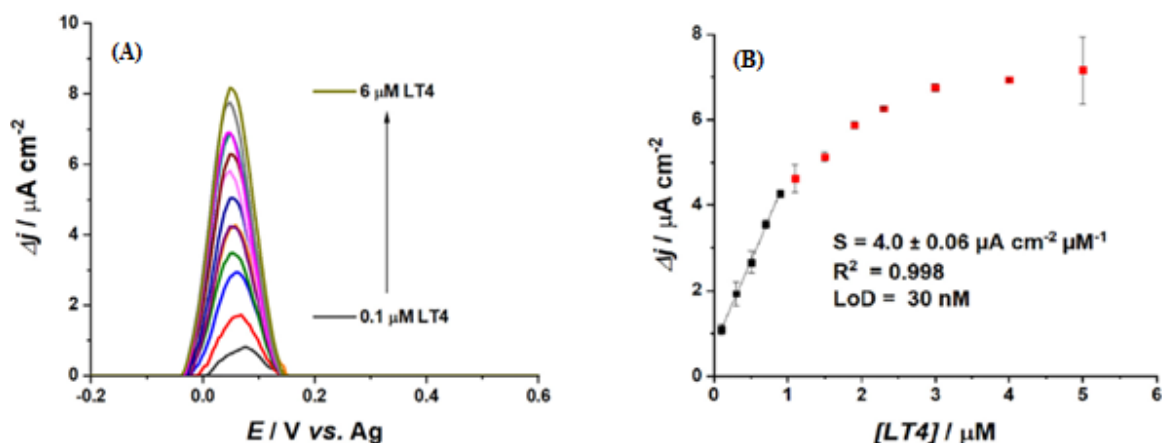


Fig. 2.5. (A) Răspunsul DPV pentru SPE-CNT la creșterea concentrației de LT4, și (B) Curba de calibrare corespunzătoare, $n = 3$. Electrolit: 0.1 M AcB , $\text{pH } 4.0$.

Fig. 2.5B prezintă curba de calibrare corespunzătoare, cu o *regiune liniară de până la $1 \mu\text{M}$ LT4*. Prin aplicarea unui potențial de pre-concentrare, **sensibilitatea SPE-CNT** a crescut de **mai mult de două ori**, la $S = 4,0 \pm 0,06 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, în timp ce LoD a fost de 3 ori mai mic, **LOD = 30 nM**. În cazul **SPE-G**, performanțele analitice au fost de asemenea îmbunătățite cu $S = 86,64 \pm 11,5 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, $\text{LoD} = 48 \text{ nM}$, dar a fost **dificil de obținut rezultate reproductibile**.

Astfel, în medii acide CNT-urile (care erau *funcționalizate cu gruparea carboxil*) au favorizat interacțiunea cu gruparea amino din structura LT4 evidențiind proprietățile **electrocatalitice** crescute ale **SPE-CNT** față de LT4.

B. Cuantificarea LT4 în probe reale cu nanoparticule carbonice

Senzorul **SPE-CNT** a fost utilizat în continuare pentru **analiza probelor reale**. În acest scop, **serul fetal bovin (FBS)** a fost ca a fost folosit ca **matrice reală** diluat într-un

raport de 1:99 în **AcB, pH 4.0**. Folosind aceleași condiții din secțiunea de mai sus, DPV-urile au fost înregistrate în diluția FBS pentru diferite concentrații de LT4 din domeniul fiziologic pentru organismul uman (Fig. 2.6A). Fig. 2.6B prezintă curba de calibrare corespunzătoare, cu o regiune liniară de până la 250 nM LT4 și LOD ~23 nM.

Acestea **rezultate sunt promițătoare** pentru **dezvoltarea unui POC** pentru analiza probelelor biologice reale care să permită **monitorizarea tratamentului afecțiunilor tiroidiene**.

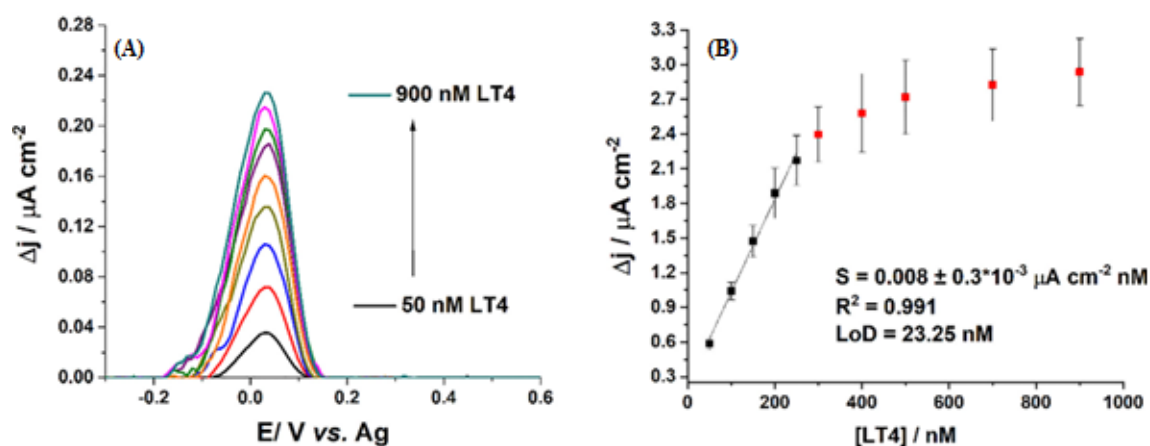


Fig. 2.6. (A) Răspunsul DPV pentru SPE-CNT la creșterea concentrației de LT4, și (B) Curba de calibrare corespunzătoare, $n = 3$. Electrolit: FBS în 0.1 M AcB, pH 4.0.

2.3.2. Senzori cu nanozime (enzime artificiale)

Nanoparticulele de aur (AuNP) au proprietăți *conductoare* foarte bune, o *suprafață activă îmbunătățită*, sunt *biocompatibile* și *facilitează transferul electronilor* între molecule biologice electroactive și senzor.

AuNP au fost utilizate în aceste cercetări ca **nanozime** datorită **activității catalitice** lor asemănătoare cu cea a enzimelor naturale. Astfel, *problemele legate de imobilizarea enzimelor și de stabilitatea lor pe termen lung* pot fi depășite.

Senzorii **imprimați cu film de carbon și nanozime de aur (SPE-AuNP)** au fost optimizați pentru **estimarea și cuantificarea activității și capacității antioxidante totale** (secțiunea 1). **Principiul de funcționare** s-a bazat pe **anihilarea/captarea/neutralizarea H_2O_2** de antioxidanții prezenți în probele *cu capacitate antioxidantă*.

Folosind sensibilitatea **SPE-AuNP** am reușit să calculăm doi parametri, **capacitatea antioxidantă totală relativă (RAC)** și **absolută (TAC)** care să ne ajute la **caracterizarea proprietăților antioxidante** ale probelor biologice, în particular a extractelor vegetale.

Capacitatea antioxidantă totală a fost fi exprimată în funcție de **concentrația antioxidanților standard**:

3.1 în echivalent de acid ascorbic (AAE).

3.2 în echivalent Trolox (TE).

Validarea metodei electrochimice a Din compararea rezultatele obținute prin metoda amperometrică cu cele obținute prin metodele clasice, am obținut

C. Cuantificarea capacității antioxidante totale relative (RAC)

RAC a fost determinat prin formula de mai jos:

$$RAC = \frac{S_0 - S_E}{S_0} * 100 (\%)$$

În funcție de sensibilitățile senzorilor pentru H_2O_2 :

S_0 = în *absența* lui Ext. și

S_E = în *prezența* Ext.

Pentru a putea calcula RAC-ul fiecărui extract, (Ext):

➤ a fost construită **curba de calibrare pentru H_2O_2** a SPE-AuNP *în absența Extractelor* (Fig. 2.7A) cu sensibilitatea: $S_0 = 37,29 \pm 0,87 \mu A cm^{-2} mM^{-1}$ ($n = 3$).

➤ a fost construită **curba de calibrare pentru H_2O_2** a SPE-AuNP *în prezența unui extract E* (Fig. 2.7B) cu sensibilitatea: $S_E = 2,71 \pm 0,2 \mu A cm^{-2} mM^{-1}$ ($n = 3$).

➤ Au fost calculate valorile RAC pentru mai multe extracte.

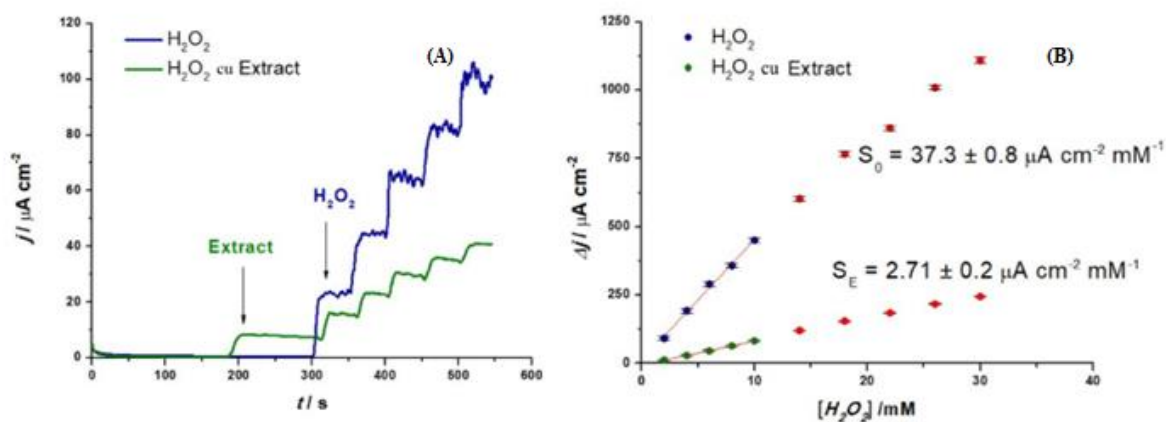


Figura 2.7. (A) Răspunsul amperometric al SPE-AuNP la adăugarea de H_2O_2 cu și fără extract. (B) Curbele de calibrare. Electrolit: 0,1 M NaPB, pH 7,0. la 0,55 V vs. Ag/AgCl.

Cu ajutorul **RAC** se pot determina extractul cu **cea mai mare capacitate antioxidantă totală** (Fig. 2.8).

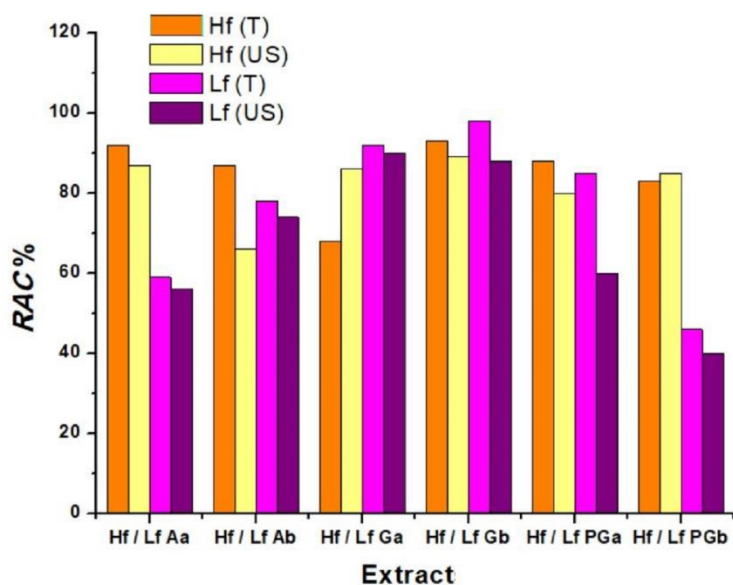


Fig. 2.8. Histograma cu valorile RAC calculate pentru toate extractele vegetale

Curbele de calibrare pentru SPE-AuNP au fost realizate în AAE și în TE (pentru o valoare fixă 0,5 mM H_2O_2). Extrapolând regiunea lineară a curbelor de calibrare, valorile RAC obținute pentru fiecare Ext. au fost asociate cu concentrațiile AA/Troxolox (Fig. 2.9 și 2.10).

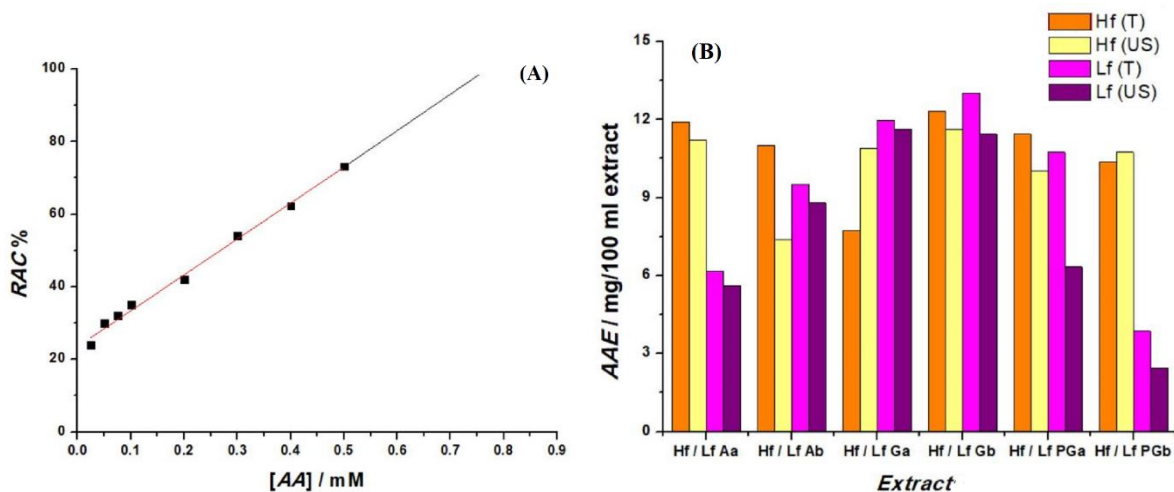


Fig. 2.9. (A) Curba de calibrare a SPE-AuNP pentru AA. (B) RAC exprimate în AAE. Electrolit: 0,1 M NaPB, pH 7,0 + 0,5 mM H_2O_2 , la 0,55 V vs. Ag/AgCl.

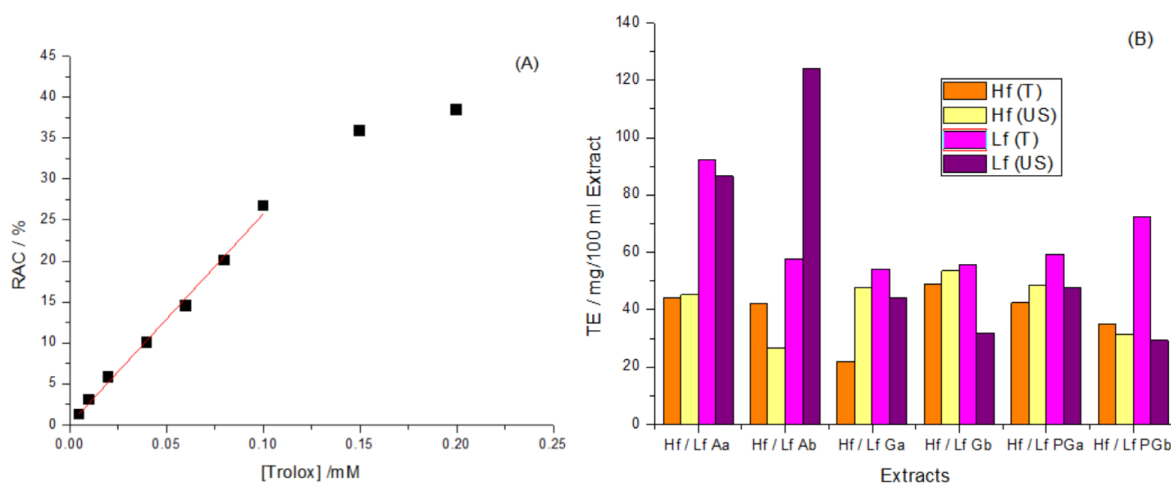


Fig. 2.10. (A) Curba de calibrare a SPE-AuNP pentru Trolox. (B) RAC exprimate în TE. Electrolit: 0,1 M NaPB, pH 7,0 +0,5 mM H₂O₂, la 0,55 V vs. Ag/AgCl.

D. Validarea RAC electrochimic folosind metode spectroscopice

Spectroscopia de absorbție UV-Vis este folosită pentru caracterizarea proprietăților **antioxidante** ale unei probe biologice prin urmărirea **procesului de anihilare a H₂O₂**. În Fig. 2.11A sunt prezentate spectrele de absorbție UV-Vis pentru H₂O₂, iar curbele de calibrare corespunzătoare pentru H₂O₂ în absența și în prezența unui extract la $\lambda = 225$ nm sunt în Fig. 2.11B.

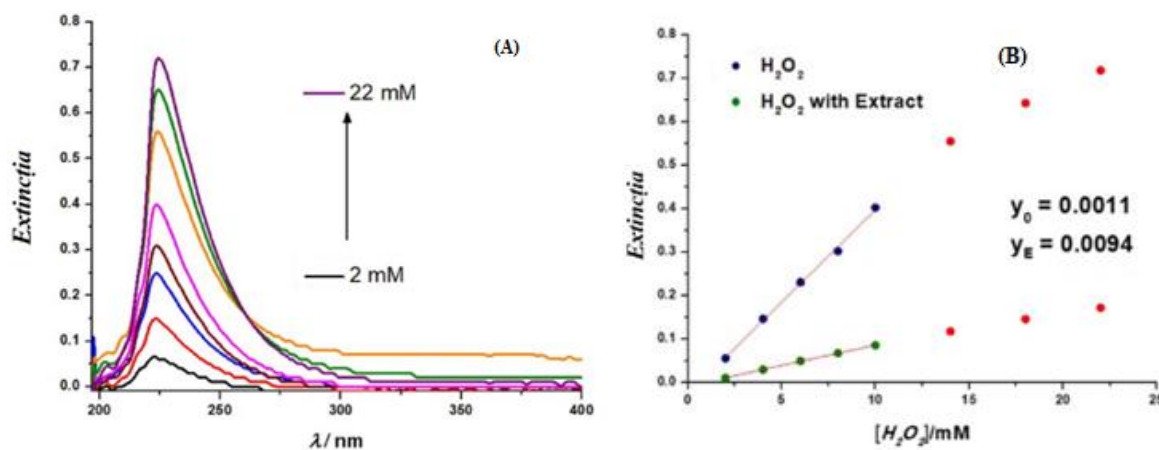


Fig. 2.11. (A) Spectrele de absorbție UV-Vis la adăugarea de H₂O₂ în prezența și în absența extractului. (B) Curbele de calibrare. Electrolit: 0,1 M NaPB, pH = 7,0. $\lambda = 225$ nm.

RACs, a fost calculat în același mod cu cel prin metoda electrochimică (SPE-AuNP):

$$RAC_s = \frac{y_0 - y_E}{y_0} * 100$$

În funcție de panta curbei de etalonare pentru H₂O₂:

y_0 = în *absența* Ext. și

y_E = în *prezența* Ext.

În tabelul 2.5 sunt prezentate valorile **RAC** obținute prin cele două metode pentru extracte de **lavandă și cătină**.

Table 2.5. RAC (%) pentru extracte de lavandă și cătină

Extract	RAC Electrochimic (%)	RAC Spectrofotometric (%)	Recuperarea (%)
Lf Aa US	83,8 ± 0,04	77,6 ± 0,11	107,99
Hf Aa US	72,8 ± 0,22	79,0 ± 0,09	92,15
Lf Aa T	78,5 ± 0,03	84,5 ± 0,07	92,90
Hf Aa T	69,6 ± 0,20	81,9 ± 0,24	84,98

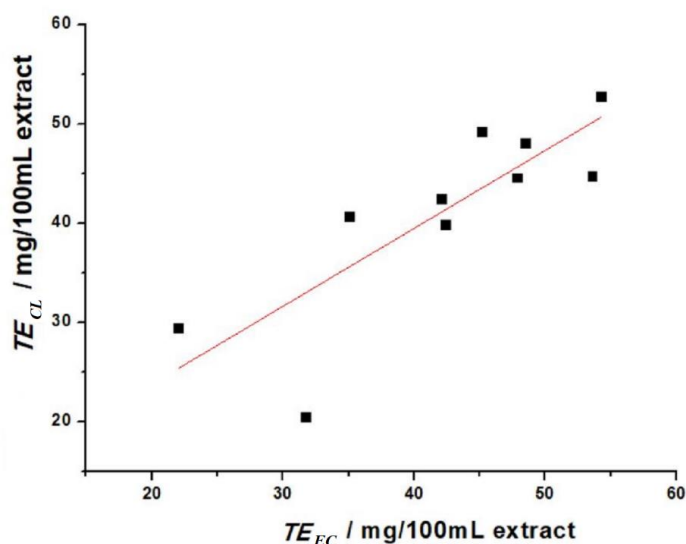


Fig. 2.12. Corelarea dintre electrochimie (EC) și chemoluminescență (CL). Coeficient de corelație: $r = 0,822$.

Diferențele dintre valorile **RAC** pot fi explicate dacă se ține cont de faptul că cele două metode măsoară proprietăți diferite ale soluțiilor.

Corelația lui Pearson, valoarea $r = 0,822$, a fost obținută, indicând o corelație pozitivă între cele două metode. În Fig. 2.12 este prezentat graficul de dispersie a rezultatelor, din care reiese o tendință liniară modul pentru cele două metode, în conformitate cu valoarea lui r .

E. Estimarea activității antioxidante prin studii cinetice

Capacitatea antioxidantă (CA) reprezintă **eficiența de conversie a unui radical liber** prin anihilarea cu un **antioxidant**, iar **activitatea antioxidantă (AA)** este corelată

cu **cinetica reacției dintre radicalul liber (oxidant) și antioxidant**, fiind echivalentă cu cantitatea de radicali liberi capturat de antioxidanți (exprimată în moli). Pentru o probă (un extract, Ext.) AA a fost estimată prin studierea **cineticii reacției de anihilare a H₂O₂ în prezența unui singur antioxidant din E (inhibare competitivă)**.

Constantele cinetice ale consumului de H₂O₂, în prezența antioxidantilor, au fost calculate cu ajutorul senzorului amperometric SPE-AuNP. În Fig. 2.13A este reprezentată **descreșterea curentului de oxidare a H₂O₂ în funcție de timp**. După adăugarea H₂O₂ în electrolitul de lucru, curentul a **scăzut exponențial în timp, cu înclinări diferite în funcție de activitatea antioxidantă totală a fiecărui tip de extract**.

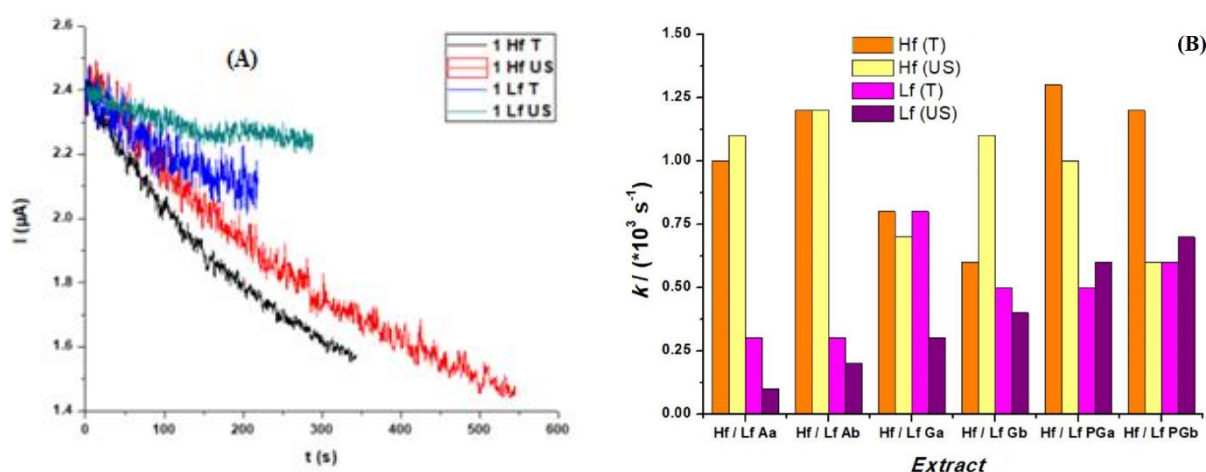


Fig. 2.13. (A) Descreșterea curentului anodic înregistrat cu SPE-AuNP la oxidarea H₂O₂ în prezența extractelor de lavandă și cătină hidroalcoolice. (B) Histograma constantei cinetice, k , pentru reacția de anihilare a H₂O₂.

Un **model cinetic de ordinul întâi** a fost folosit pentru **reacția de anihilare a H₂O₂**. S-au luat în considerare primele 300 de secunde ale curbelor din Fig. 2.13A. **Constanta vitezei (k)** a fost determinată din panta graficului fitat cu ecuația modelului:

$$\ln \frac{I}{I_0} = -kt$$

În Fig. 2.13B sunt prezentate valorile **constantei K** ca un **indicator relativ al activității antioxidante totale**. Cu cât există mai mulți compuși **puternic antioxidanți** în extractul studiat, cu atât este **mai mare** valoarea lui **k**.

2.4 Concluzii

Scopul acestor cercetări a constat în **dezvoltarea** și optimizarea unor **platforme noi, bazate pe nanomateriale**, cu *performanțe îmbunătățite*, ca instrumente de screening rapid pentru diverse molecule cu rol de biomarker, pentru obținerea unui **diagnostic rapid**, sau medicament, pentru **monitorizarea tratamentului în timp real** și obținerea unei terapii eficiente.

Platformele s-au bazat **pe senzori electrochimici, cu suprafață modificată cu nanostructuri de carbon** (nanotuburi de carbon, CNT, sau grafena, G) **și metalice** (nanoparticulele de aur, AuNP). Acestea au fost utilizate **pentru detecția** substituentului hormonal **LT4** și a **H₂O₂**, ca model de ROS stabil, și pentru determinarea indirectă a **capacității antioxidante totale în vitro**. Rezultatele au fost validate pe probe reale.

În urma evaluării performanțelor a reieșit că senzorii electrochimici cu *film de carbon și CNT*, **SPE-CNT**, pot fi folosiți pentru a identifica și cuantifica **LT4**, prin DPV la pH 4.0, cu o *sensibilitate mare* și o *limită de detecție scăzută*, potrivită valorilor fiziologice de 23 nM.

Senzorii electrochimici SPE-AuNP au evidențiat **rolul de catalizator** al **AuNP** pentru **H₂O₂**, prin **mimarea peroxidazei (nanozime de aur)** și, folosiți împreună cu **CV** și **DPV** pentru **evaluarea capacității antioxidante totale**.

Se recomandă folosirea **senzorilor electrochimici cu nanomateriale**, pentru probe biologice reale pentru a deschide **posibilitatea dezvoltării unor dispozitive noi** care să permită *detecția și monitorizarea terapiei la punctul de îngrijire*: pentru **pacienții cu boli cronice** aflați în tratament cu **LT4 sau alte medicamente**, pentru estimarea **creșterea cantității de ROS** stres oxidativ).

PARTEA A II-A. PLANURI DE EVOLUȚIE ȘI DEZVOLTARE A CARIEREI

Planul de dezvoltare al carierei mele universitare vizează împletirea cu succes a activităților didactice și de cercetare **științifică interdisciplinară în domeniul cercetărilor biomedicale și translatarea rezultatelor cercetării în medicină**. Îmi propun să realizez cât mai multe din obiectivele didactice și științifice ce îmi revin atât din rolul de cadru didactic, cât și de cercetător, și să promovez standarde ridicate de excelență academică și profesională și colaborarea cu colegii și studenții.

Pentru viitor îmi propun continuarea activității științifice desfășurată până acum, dar și deschiderea unor noi direcții de cercetare. **Scopul principal** al cercetărilor viitoare se încadrează în domeniul **cercetărilor științelor nano- și biomedicale**, care implică îmbinarea cunoștințelor de *biofizică, bionanotehnologie, nanomedicină și medicină preclinică*, luând în considerare starea actuală pe plan național și internațional a cercetărilor și obiectivele realizabile în viitorul apropiat și lung.

Pe măsură ce **interacțiunile biologice apar la scară nanometrică**, nanotehnologia deschide numeroase oportunități. **Nanomedicina este aplicația medicală a nanotehnologiei**. Aceasta variază de la aplicații medicale ale nanomaterialelor și dispozitivelor biologice până la posibile aplicații viitoare ale nanotehnologiei moleculare, cum ar fi mașinile biologice.

Cancerul este una dintre bolile cu cea mai mare incidență și mortalitate din lume și, în ciuda tuturor progreselor înregistrate în **terapia cancerului** în ultimii ani, **există limitări ale medicamentelor chimioterapeutice convenționale**, care includ solubilitatea scăzută în apă, livrarea incorectă a medicamentului în tumoră și apariția reacțiilor adverse la administrarea repetată. Mai mult, medicamentele chimioterapice utilizate în prezent oferă adesea o **selectivitate insuficientă** pentru a diferenția celulele canceroase de celulele normale, ceea ce duce la o varietate de **efecte secundare și în cele din urmă la toxicitate sistemică**. Ca răspuns la aceste limitări, **nanoterapiile bazate pe nanomateriale**, în special pe **nanoparticulele bio-sintetizate**, au apărut ca o **alternativă promițătoare la terapiile convenționale**, sporind stabilitatea, solubilitatea și timpul de înjumătățire în circulație a compușilor terapeutici, oferind astfel **instrumente noi pentru detectarea avansată, diagnosticul și tratamentul cancerului**.

Prin urmare, **nanoparticulele (NP)** versatile, cum *NP de aur (AuNP)*, *NP proteice (de albumine serice - SANP)* și *NP lipidice (liposomi)*, au atras o **atenție mărită** în ultimele decenii în multe domenii, printre care și **în domeniul biomedical**. **NP pot fi proiectate** în diferite forme și mărimi, cu **proprietăți fizice și chimice diferite și ajustabile**. Astfel, NP-urile pot fi utilizate atât în **diagnostic**, ca **etichete** în metodele de imagistică sau biodetecție (AuNP) și pentru **creșterea performanțelor** acestora, cât și în **terapie** pentru obținerea **sistemelor de administrare controlată a medicamentelor**, terapiilor **fotodinamice** și **sonodinamice** sau a **terapiilor combinate** (AuNP, SANP, LipN).

Planuri de evoluție și dezvoltare a carierei profesionale și științifice

Planul de cercetare propus va fi împărțit în următoarele direcții principale, ținând cont de metodologia folosită și domeniile de aplicare. Acestea țin cont de experiența și expertiza anterioare și proiectele aflate în derulare.

Domenii de cercetare viitoare:

A. Dezvoltarea sistemelor de biodetecție non-invazivă

Este esențială **monitorizarea constantă a nivelurilor unor compuși de interes clinic** (*biomarkeri și medicamente prescrise în timpul terapiei*) sau a unor parametri biofizici (*vâscozitatea*). Cu toate acestea, până în prezent, sunt disponibile puține sisteme de monitorizare ușor de folosit. **Testarea la punctul de îngrijire (POCT)** permite identificarea compusului **în apropierea pacientului, cu un timp de răspuns rapid și are potențialul de a face schimbări imediate în managementul sănătății**. În timp ce termenul POCT este folosit pentru pacienți și probe umane, **testarea la punctul de necesitate (PONT)** are un înțeles mai larg și include **testarea la fața locului a probelor de mediu, animale și alimente**. Conform OMS *POCT și PONT* sunt *accesibile, sensibile, specifice, ușor de utilizat, robuste și rapide, fără echipamente sofisticate și care pot transmite rezultatele într-un timp scurt celor care au nevoie de ele*.

Nanoparticulele și nanosistemele discutate mai sus vor fi folosite și **pentru dezvoltarea unor sisteme de biodetecție simple, robuste și cu răspuns rapid**, de genul **POC și PON**. Acestea vor fi folosite pentru **monitorizarea non-invazivă a compușilor relevanți clinic în probe biologice**, cum ar fi ser, salivă, transpirație și urină, în scopul îmbunătățirii calității vieții oamenilor.

Nanoparticulele sau nanomaterialele compozite sunt un substrat adecvat pentru legarea unor biomolecule receptoare în scopul obținerii unei nanostructuri (Bio-NS) care va lega selectiv și specific un compus de interes clinic. Prin depunerea Bio-NS pe suprafața unui senzor putem **dezvolta o platformă de detecție sensibilă și selectivă de tip POC sau PON pentru detecția fie a unui biomarker** (ca indicator al unei situații patologice), fie a unui **medicament** sau a unui parametru biofizic (pentru monitorizarea terapiei).

Nanomaterialele compozite verzi (GCM) au fost *obținute în laboratorul de biofizică* și se bazează pe **nanofibre** electrofilate prin „electrospinning” (**NF**) (Fig. II.1) folosind soluții apoase de **polimeri biocompatibili**. Aceste compozite pot incorpora Bio-AuNP (**Bio-AuNP-GCM**) și/sau **medicamente anti-cancer și folosite ca matrice pentru obținerea unor sisteme de livrare non-invazive**.

Pentru o dezvoltare a unor sisteme de detecție sau de livrare **țintită a unor compuși** suprafața GCM trebuie modificată cu biomolecule receptor care să permită legarea în mod specific cu compusul (ligandul) aflat la locul țintit. Astfel, nanocompozitul **Bio-AuNP-GCM**, obținut în laboratorul de biofizică, a fost **modificat cu Concanavalin A (ConA)** (Fig. II.1), care este o lectină, pentru a **lega specific o glicoproteină**, cum este glucoz-oxidaza (Gox), și de pe suprafața unui senzor de aur (Au).

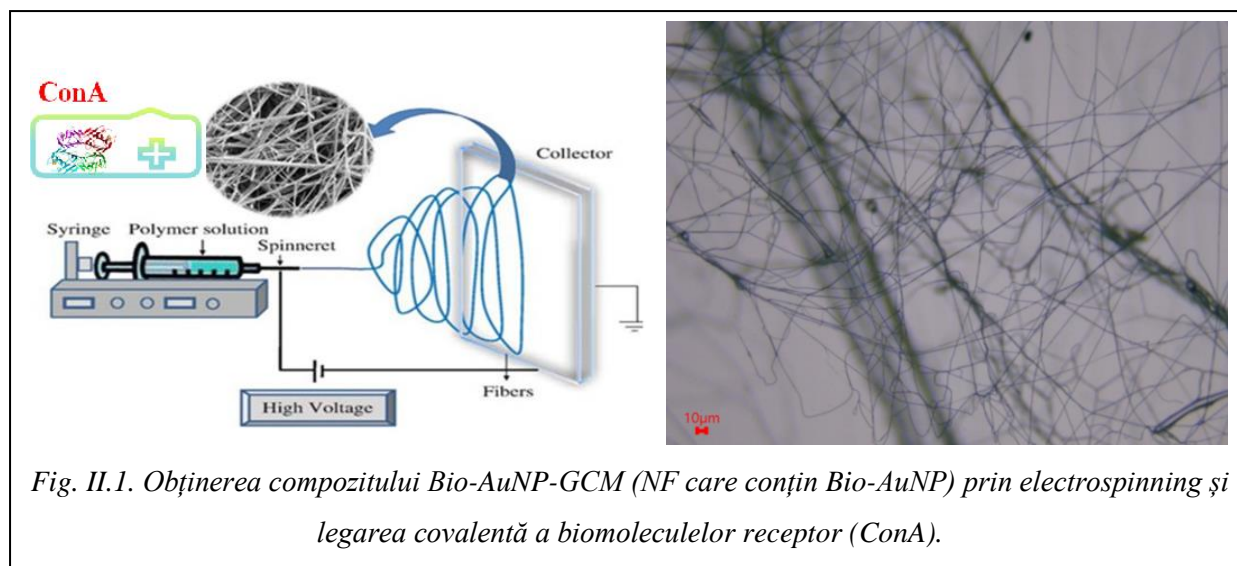


Fig. II.1. Obținerea compozitului Bio-AuNP-GCM (NF care conține Bio-AuNP) prin electrospinning și legarea covalentă a biomoleculelor receptor (ConA).

Caracterizarea interacțiunilor biomoleculare dintre straturile moleculare (Au și GCM, respectiv imobilizarea receptorului ConA), dar și parametrii detecției Gox au fost obținuți prin studii electrochimice și optice (SPR) așa cum este prezentat în Fig. II.2.

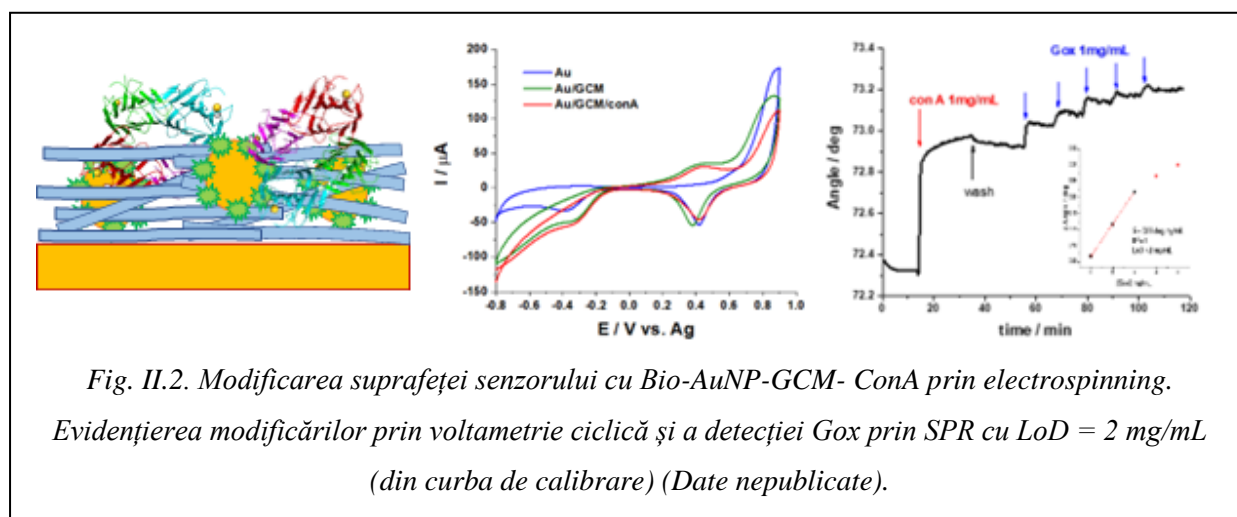


Fig. II.2. Modificarea suprafeței senzorului cu Bio-AuNP-GCM-ConA prin electrospinning. Evidențierea modificărilor prin voltametrie ciclică și a detecției Gox prin SPR cu LoD = 2 mg/mL (din curba de calibrare) (Date nepublicate).

Cercetările viitoare în această direcție vor fi legate de dezvoltarea unor **platforme portabile de detecție** pentru testarea de tip POC sau *portabile* (de gen *plastery*), care să **monitorizeze continuu răspunsurile** la intervenția terapeutică. Acestea vor permite o **personalizare a terapiei** prin **ajustarea concentrației medicamentelor în timp real**. Pentru realizarea acestui obiectiv avem în vedere ca cercetările obținute să ofere **noi perspective** pentru **detecția continuă, minim invazivă**

și transmiterea rezultatelor la telefonul mobil care face posibilă **analizarea lor în timp real** de către medicul curant.

B. Dezvoltarea sistemelor de administrare țintită a factorilor terapeutici (nanoterapii)

Nanoparticulele sunt investigate pe larg **pentru livrarea medicamentelor** din ce în ce mai mult în ultimul timp. **NP** au capacitatea de a **crește acumularea de medicamente intracelulare** datorită **capacității lor de a ținti specific** și de a **furniza diverse medicamente (ex. anti-cancer)**. **Biocompatibilitatea nanoparticulelor** este însă una dintre proprietățile importante pentru folosirea lor în domeniul biomedical. Într-adevăr, *NP de aur (AuNP)*, *NP proteice (de albumine serice - SANP)* și *NP lipidice (liposomi)* îndeplinesc această condiție. SANP-urile sunt însă instabile, trebuie folosite imediat după ce obținerea lor, dar AuNP-urile sunt relativ stabile în organism datorită potențialului lor ridicat de electro-reducere, având o probabilitate mai mică să ionizeze comparativ cu alte metale. LipN sunt vezicule fosfolipidice non-toxice, biocompatibile și biodegradabile, fiind inspirate din membrane lipidice biologice.

O modalitate de a **crește stabilitatea și biocompatibilitatea NP** este **incorporarea sau legarea în diferite sisteme de livrare**. Numeroase sisteme de administrare a medicamentelor au fost dezvoltate pentru **protejarea ingredientelor active, îmbunătățirea eficacității medicamentului și direcționarea administrării medicamentului la locul specific**. Astfel, livrarea medicamentului anti-cancer mediată de NP poate îmbunătăți indicele terapeutic al acestuia, permițând țintirea pasivă și/sau activă către țesuturile tumorale in vivo.

Țesuturile plantelor conțin metaboliți secundari, care sunt purificați pentru sarcini specifice de nano-inginerie, astfel, **extractele de plante** au proprietăți antioxidante, antifungice, antiinflamatorii, antivirale și antibacteriene, făcându-le **candidați excelenți pentru sinteza AuNP biocompatibile și stabile în timp**. Mai multe tipuri de *extracte naturale* care au fost deja *produse și caracterizate în laboratorul de biofizică* au fost folosite pentru prepararea (Fig. II.3). Acestea au fost folosite pentru sinteza **Bio-AuNP** cu dimensiuni și forme diferite, **dovedind proprietăți catalitice și antioxidante performante** ce pot fi utilizate în aplicații biomedicale.

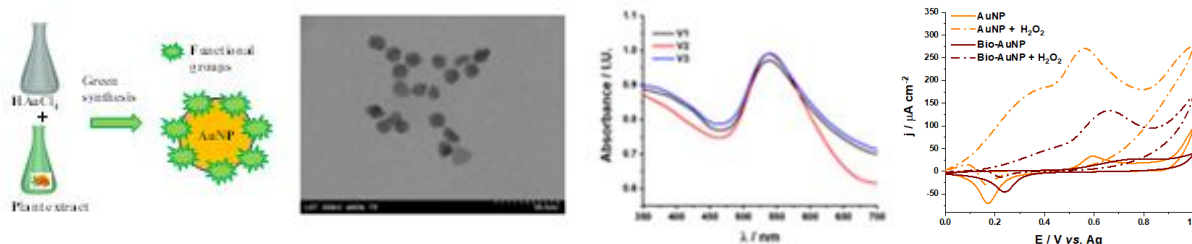


Fig. II.3. Sinteza biologică a AuNP-urilor: formarea Bio-AuNP a avut loc în prezența extractului de cătină evidențiată de TEM și spectroscopia UV-Vis. AuNP comerciale catalizează doar oxidarea H_2O_2 , unde Bio-AuNP își păstrează efectul electrocatalitic, dar are și un efect de anihilare a H_2O_2 datorită grupurilor lor biologic active. (Date nepublicate)

Sistemul de livrare lipozomal oferă mai multe beneficii, inclusiv cardiotoxicitate redusă dramatic, timp prelungit de retenție în plasma umană și livrare țintită pasiv către tumori, profitând de efectul de permeabilitate și retenție îmbunătățită (EPR). LipN au fost produși și caracterizați în **laboratorul de biofizică** (Fig. II.4). Stabilitatea lor și a sistemelor LipN formate în prezența unor NP (Bio-AuNP și BSANP) a fost studiată în scopul optimizării lor.

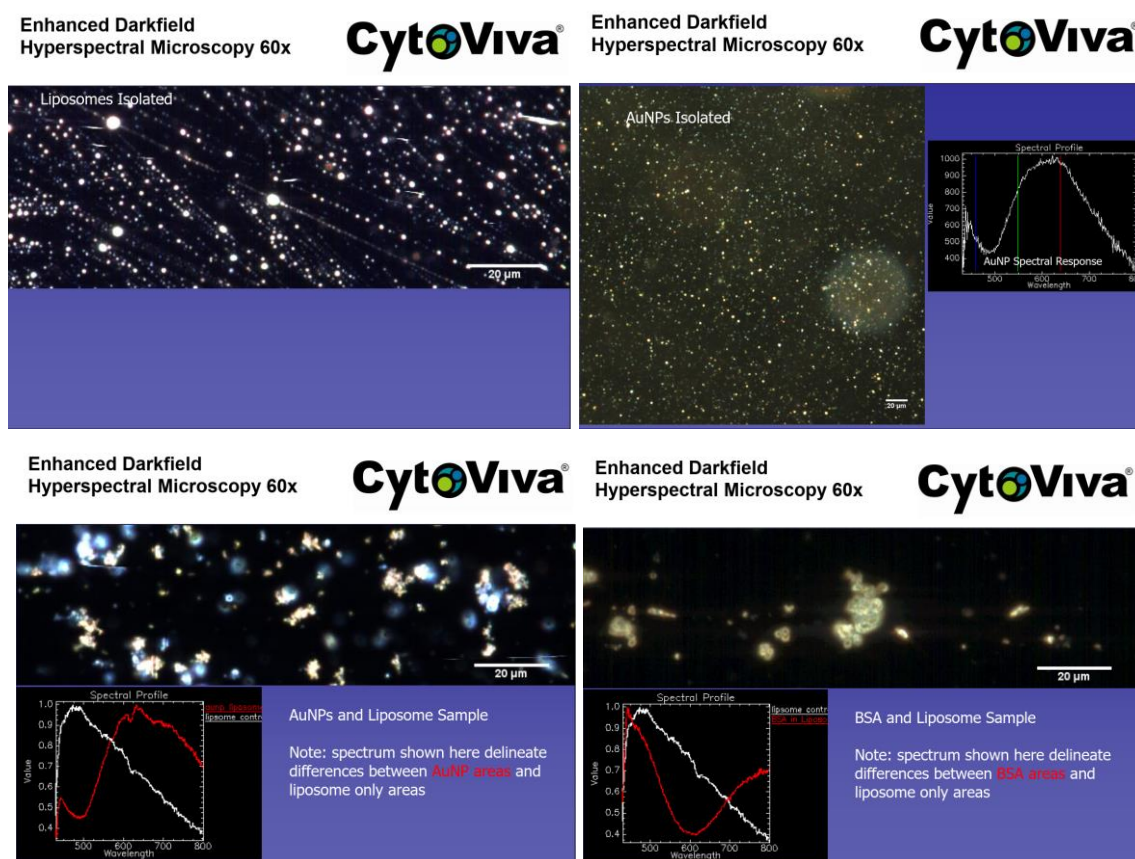


Fig. II.4. Imagini microscopice în camp întunecat îmbunătățit și hyperspectrale ale LipN, LipN-Bio-AuNP și LipN-Bio-BSANP. (Date nepublicate)

Viitoare studii vor fi în direcția de obținere a unor **noi NP, cu proprietăți îmbunătățite, și dezvoltarea unor sisteme de livrare a medicamentelor** bazate pe **GCM și LipN, stabile în timp și biocompatibile**. Vor fi utilizate **metode biologice de sinteză a nanoparticulelor, LipN și a nanofibrelor** (pe bază de polimeri care sunt degradabili în mediile relevante din punct de vedere biologic) care folosesc procesele de chimie verde și agenți netoxici, materiale regenerabile (resurse vegetale), costuri reduse cu energie și siguranța mediului. **Studiile *in vitro* de eliberare a medicamentelor care simulează eliberarea *in vivo* a medicamentelor** vor fi efectuate și optimizate în soluții saline tampon (PBS) sau fluide biologice simulate, și vor viza stabilitatea sistemelor de livrare, existența unui mecanism declanșator de eliberare și/sau activare a medicamentului și difuzia medicamentelor. **Testarea *in vivo* a efectelor sistemelor de livrare a medicamentelor va fi realizată în condițiile optimizate pe culturi celulare** (fibroblaste L-929 și canceroase HeLa). Cercetările vor putea oferi noi **perspective pentru proiectarea viitoare a nanoterapiilor** pentru cancer mai eficiente și mai puțin toxice, ar putea contribui **la limitarea efectelor secundare** potențiale ale medicamentelor convenționale și la **atenuarea dezvoltării rezistenței la medicamente**.

C. Evidențierea interacțiunilor care implică proteine și nanoparticule

Proteinele nu funcționează izolate, ele *interacționează* între ele, dar și cu alte *biomolecule* (de exemplu, ADN, ARN) sau *particule* (de exemplu NP), mediază procese metabolice și de semnalizare. Pentru majoritatea proteinelor din corpul nostru *interacțiunea dinamică* (legarea și dezlegarea) cu molecule ligand reprezintă un *proces fundamental critic*. În cazul **terapiilor medicamentoase** aceasta prezintă o importanță majoră pentru că unele **medicamente interacționează dinamic cu anumite proteine**, determinând **modificări conformaționale ulterioare** ale proteinei.

Astfel, **interacțiunile proteice controlează** mecanismele care duc la **stări fiziologice** normale sau diverse **patologii** în organisme. Multe boli neurodegenerative ale căror simptome apar tardiv, sunt asociate cu formarea de *agregate intracelulare de către proteine toxice*. Aceste boli (proteinopatii) includ afecțiuni în care proteinele sunt fie predominant citosolice (boala Parkinson și boala Huntington la adulți), fie predominant intranucleare, agregate în reticulul endoplasmatic și secretate extracelular (boala Alzheimer). Se pare că **capacitatea de agregare** (nu neapărat agregatul în sine) este **corelată cu toxicitatea și bolile sunt cauzate de multe ori de mutații care afectează situl de legare al proteinelor** sau duc la **modificări alosterice disfuncționale**. Dacă proteina în cauză este degradată ea nu va putea să își îndeplinească funcția, iar proteinele pliate greșit formează plăci, depozite insolubile cunoscute sub numele de amiloizi, perturbând structura normală a țesutului (de exemplu, amiloid-β în boala Alzheimer).

Aplicațiile *in vivo* ale NP-urilor sunt de foarte multe ori limitate datorită mai multor factori: pot apărea răspunsuri inflamatorii și legate de toxicitate celulară, distribuirea lor neuniformă și eliminarea lor de către organism înainte de atingerea țintei sau livrarea

insuficientă. Aceste fenomene nefavorabile pot fi în mare parte **datorate adsorbției *in vivo* a proteinelor pe suprafața NP-urilor (coroană de proteine)** schimbându-le funcționalitatea. Proteinele pot suferi modificări structurale după adsorbția lor pe suprafețele NP-urilor fapt care influențează puternic funcțiile atât a NP-urilor, cât și a proteinelor. Astfel, **înțelegerea modificărilor conformaționale ale proteinelor** este foarte importantă pentru a **accelera aplicațiile biomedicale ale NP -urilor**.

Prin urmare **cercetările interacțiunilor care implică proteinele** pot ajuta la **promovarea înțelegerii mecanismului de legare** între un ligand (medicament sau NP) și proteine, **vor contribui la elucidarea mecanismelor moleculare ale unor boli** (ex. Alzheimer), cunoștințe care sunt importante pentru **proiectarea terapeutică mai eficientă**, în final contribuind la **dezvoltarea metodelor de prevenire, diagnostic și tratament**. Există cinci aminoacizi electrochimic activi bine cunoscuți (cisteină, tirozină, triptofan, metionină și histidină). Detectarea electrochimică a unei proteine poate fi asociată cu numărul și plasarea acestor aminoacizi în secvența proteinei, și este completată de studiile de spectroscopie de absorbție și emisie (fluorescență). Ne vom concentra astfel în mod specific **pe studiul fluctuațiilor conformaționale ale proteinelor** folosind metodele **spectroscopice și electrochimice**, existente în laboratorul de biofizică, corelate cu metode specifice din alte laboratoare colaboratoare.

Cercetările avute în vedere în planul de cercetare descris mai sus vor fi corelate cu următoarele activități:

- Inițierea de proiecte de cercetare cu parteneri din țară și străinătate, care îmi vor permite, pe lângă obținerea de fonduri pentru susținerea materială a activității de cercetare, și extinderea echipei de cercetare prin angajarea de personal calificat;
- Publicarea de articole științifice de cercetare în reviste de specialitate cu vizibilitate internațională ridicată (ISI) și brevete de invenții.
- Participarea în cadrul conferințelor naționale și internaționale, ce asigură, pe lângă diseminarea rezultatelor, posibilitatea de a face schimb de experiență și informații cu alți cercetători din domeniu.
- Continuarea dezvoltării competențelor științifice ale studenților prin implicarea lor din ce în ce mai mult în activitatea de cercetare, atât prin participarea ca membri în echipa proiectelor de cercetare ale proiectelor coordonate de mine, dar și prin participări la conferințe naționale și internaționale.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- **M. Florescu**, Label-free biosensors in human molecular diagnostics of diseases, în cartea „Diagnostic Methods in Human Pathology”. Editor A. Chesca, 2012, Editura Transilvania University Press, Brasov. ISBN: 978-606-19-0059-6.
- A.A. Rajathi et al, Review on Biomedical Instrumentation/Biomedical Engineering and its Various Applications, IJAREEIE, 3(3) March 2014 7707-7719.
- **M. Florescu**, Biophysical methods used for molecular diagnostics in human pathology, în cartea „Methods for Cellular and Molecular Diagnostics in Human Pathology”, Editori: A. Chesca si M. Ozturk, 2011, Istanbul University Press House. ISBN 978-975-404-895-7.
- **M. Florescu**, Biosensors as molecular diagnostic tool for early detection of cancer protein biomarkers, în cartea: „Methods for Diseases Diagnostic with Applicability in Practice”, Editor A. Chesca, 2014, LAP Lambert Academic Publishing, ISBN 3847345028, 978-3-8473-4502-2.
- C. You, M. Bhagawati, A. Brecht, J. Piehler, Affinity capturing for targeting proteins into micro and nanostructures. Anal. Bioanal. Chem. 2009, 393, 1563-1570.
- M.N. Velasco, Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. Semin. Cell Dev. Biol., 2009, 20, 27-33.
- X. Fan, I.M. White, S.I. Shopova, H. Zhu, J.D. Suter, Y. Sun, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. Anal. Chim. Acta, 2008, 620, 8-26.
- V.K. Khanna, New-generation nano-engineered biosensors, enabling nanotechnologies and nanomaterials. Sens. Rev., 2008, 28, 39-45.
- Y.-H.g Yun et. al., Tiny Medicine: Nanomaterial-Based Biosensors, Sensors, 2009, 9, 9275-9299.
- G. Rocchitta et al, Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids, Sensors 2016, 16, 780-801.
- I. Paris et al, Aminochrome as a preclinical experimental model to study degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson’s disease, Neurotox. Res. 2007, 12, 125–134.
- G. Lunard et al. Correlation between changes in CSF dopamine turnover and development of dyskinesia in Parkinson’s disease. Parkinsonism Relat. Disord. 2009, 15, 383–389.
- A.J. Cross, T.J. Crow, E.K. Periy, R.H. Perry, G. Blessed, B.E. Tomlinson, Reduced dopamine-4-hydroxylase activity in Alzheimer’s disease. Br. Med. J. 1981, 282, 93–94.
- H. John, M.D. Ferguson, National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry 2000, 39, 182–193 în cartea: „Textbook of Pediatric Emergency Medicine”, Fleisher, G.R., Ludwig, S., Eds. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, PA, USA, 2010.
- K.L. Davis, R.S. Kahn, G. Ko, Davidson, M. Dopamine in schizophrenia: A review and reconceptualization. Am. J. Psychiatry 1991, 148, 1474–1486, doi:10.1176/ajp.148.11.1474.

- A.D. Jerkovich, J.S. Mellors, J.W. Jorgenson, The Use of Micrometer-Sized Particles in Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography, în cartea: The Column Watch; Majors, R.E., Ed.; LCGC Asia Pacific: Iselin, NJ, USA, 2003; Volume 6.
- N. Ohta, A. Robertson, Colorimetry: Fundamentals and Applications; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2005, ISBN 0-470-09472-9.
- T.J. Spencer et al., PET Study Examining Pharmacokinetics, Detection and Likeability, and Dopamine Transporter Receptor Occupancy of Short- and Long-Acting Oral Methylphenidate. *Am. J. Psychiatry* 2006, 163, 387–395, doi:10.1176/appi.ajp.163.3.387.
- E.-H. Yoo, S.-Y. Lee, Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice, *Sensors* 2010, 10, 4558-4576; doi:10.3390/s100504558.
- T. Zuo, M. Zhu, W. Xu, Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, Article ID 8589318, 14 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8589318>.
- M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007, 39, 44–84.
- S. Di Meo, T.T. Reed, P. Venditti, V.M. Victor, Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2016.
- E. Ho, K.K. Galougahi, C.-C. Liu, R. Bhindi, G.A. Figtree, Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.* 2013, 1, 483–491.
- A. Hoge et al., Validation of a food frequency questionnaire assessing dietary polyphenol exposure using the 387 method of triads. *Free Radic. Biol. Med.* 2019, 130, 189–195.
- T.M. Canh, *Biosensors*, Chapman & Hall, 1993, London.
- Sang, S. Zhang, W. Zhao Y. Review on the Design Art of Biosensors, în cartea: „State of the Art in Biosensors - General Aspects”, Rincken T. (Ed.), InTech, 2013.
- D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. *Sensors* 2008, 8(3), 1400-1458.
- R. Buck, M. Umana, E. Bowden, eds., *Biosensor Technology: Fundamentals and applications*, Marcel Dekker Inc, New York 1990,
- P.T. Frangopol, M. Sanduloviciu, Ed., *Current topics in biophysics*, Vol 5, *Biosensors: fundamentals*, Ed. Universității “Al.I. Cuza”, Iași, 1996,
- F. Scheller, F. Schubert, *Biosensors*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1992,
- J. S. Schultz, „Biosensors” în carte „Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering”, Marcel Dekker Inc, New York, 2004, 29 – 143.
- J. I. R. De Corcuera; R. P. Cavalieri, „Biosensors”, Published in *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*, Marcel Dekker Inc, New York, 2004, 119 – 123,

- J. L. Rickus, „Biosensors: Harnessing Biology for the Detection of Biological Agents”, Published in Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering, Marcel Dekker Inc, New York , 2004, 1 – 4,
- A. B.Gavrilov, A.F Zueva, O. N. Efimov, V. A Bogdanovskaya, M. R Tarasevitch, New enzyme biosensor for determination of glucose, Synthetic metals, 1993, 60 .
- J.Wang, Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review, Journ. Of Pharm. and Biomed. Analysis, 1999, 47, 159.
- J.F. Liang, Y.T. Li, V.C. Yang, Biomedical application of immobilised enzymes, J. Pharmaceutical Science, 2000, 89(8), 979.
- N. Dimcheva, E. Horozova, Z. Jordanova, A glucose oxidase immobilized electrode based on modified electrode. Z. Naturforsch. 2002, 57c, 705.
- E.C. Nice, B. Catimel, Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions, BioEssays, 1999, 21, 339-352.
- CY. Lin, Tai DF, Wu TZ, Discrimination of peptides by using a molecularly imprinted piezoelectric biosensor, Chemistry, 2003, 9(20), 5107-5110.
- Y. Liu, Yu X, Zhao R, Shangguan DH, Bo Z, Liu G., „Quartz crystal biosensor for real-time monitoring of molecular recognition between protein and small molecular medicinal agents”, Biosens Bioelectron. 2003, 19(1), 9-19.
- C. Dincer, R. Ktaich, E. Laubender, J.J. Hees, J. Kieninger, C.E. Nebel, J. Heinze, G.A. Urban, Nanocrystalline boron-doped diamond nanoelectrode arrays for ultrasensitive dopamine detection. Electrochim. Acta 2015, 185, 101–106, doi:10.1016/j.electacta.2015.10.113.
- L. Jiang, G.W. Nelson, J. Abda, J.S. Foord, Novel Modifications to Carbon-Based Electrodes to Improve the Electrochemical Detection of Dopamine. ACS Appl. Mater. Interfaces 2016, 8, 28338–28348, doi:10.1021/acsami.6b03879.
- L. Kong, S. Z. Huang, B. Yue, M. Peng, J. Li, Sensitive mediator-free Tyrosinase biosensor for the determination of 2,4-dichlorophenol. Microchim. Acta 2009, 165, 203–209, doi:10.1007/s00604-008-0121-3.
- L. Wu, D. Deng, J. Jin, X. Lu, J. Chen, Nanographene-based Tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A. Biosens. Bioelectron. 2012, 35, 193–199, doi:10.1016/j.bios.2012.02.045.
- Z.A. Mangombo, D. Key, E.I. Iwuoha, P.G.L. Baker, Development of L-phenylalanine biosensor and its application to real sample analysis. Insci. J. 2013, 3, 1–23, doi:10.5640/insc.030101.
- S.F. Rahman, K. Min, S.-H. Park, J.-H. Park, J.C. Yoo, D.-H. Park, Selective determination of dopamine with an amperometric biosensor using electrochemically pretreated and activated carbon/tyrosinase /Nafion®-modified glassy carbon electrode. Biotechnol. Bioprocess Eng. 2016, 21, 627–633, doi:10.1007/s12257-016-0382-3.
- S. Lupu, C. Lete, P.C. Balaure, D.I. Caval, C. Mihailciuc, Development of Amperometric Biosensors Based on Nanostructured Tyrosinase-Conducting Polymer Composite Electrodes. Sensors 2013, 13, 6759–6774, doi:10.3390/s130506759.
- S. Lupu, C. Lete, M. Marin, N. Totir, P.C. Balaure, Electrochemical sensors based on platinum electrodes modified with hybrid inorganic–organic coatings for determination

of 4-nitrophenol and dopamine. *Electrochim. Acta* 2009, 54, 1932–1938, doi:10.1016/j.electacta.2008.07.051.

- J. Maciejewska, K. Pisarek, I. Bartosiewicz, P. Krysinski, K. Jackowska, A.T. Bieganski, Selective detection of dopamine on poly(indole-5-carboxylic acid)/Tyrosinase Electrode. *Electrochim. Acta* 2011, 56, 3700–3706, doi:10.1016/j.electacta.2011.01.043.
- C.P. Price, Point-of-care testing in diabetes mellitus. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003, 41, 1213–1219.
- E.J. D'Costa, I.J. Higgins, A.P. Turner, Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. *Biosensors*. 1986, 2, 71–87.
- M.W. Slein, D-glucose: Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Academic Press; New York, NY, USA: 1963. p. 117.
- A. Heller, B. Feldman, Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. *Chem. Rev.* 2008, 108, 2482–2505.
- American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes—2010, *Diabetes Care*. 2010 Jan; 33(Suppl 1): S11–S61.
- E.-H. Yoo, S.-Y. Lee, Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice, *Sensors (Basel)*. 2010, 10(5), 4558–4576.
- D. P. Nikolelis, G. Paraskevi Nikoleli (Editori), *Nanotechnology and Biosensors*, Elsevier Inc. All, 2018, ISBN 978-0-12-813855-7.
- R. S. Singh, R. R. Singhanian, C. Larroche (Editori), *Advances in Enzyme Technology*, Elsevier B.V. All, 2019, ISBN 978-0-444-64114-4.
- C. Kusano, C. K. B. Ferrari, Total antioxidant capacity: A biomarker in biomedical and nutritional studies, 2008, *Journal of Cell and Molecular Biology* 7(1):5407-2.
- E. Torac et al., PP40 - Total Antioxidant Capacity (TEAC) is decreased despite high levels of uric acid in patient with atherosclerosis, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 86, Supplement 1, September 2015, Pages S32-S33
- K. Zargoosh, Y. Ghayeb, N. Aeineh, M. Qandalee, Evaluation of Antioxidant Capacity of Hydrophilic and Hydrophobic Antioxidants Using Peroxyoxalate Chemiluminescence Reaction of the Novel Furandicarboxylate Derivative. *Food Anal Methods* 2014, 7(2), 283–290, DOI: 10.1007/s12161-013-9625-5
- A. C. Moț, R. Silaghi-Dumitrescu, C. Sârbu, Rapid and Effective Evaluation of the Antioxidant Capacity of Propolis Extracts Using DPPH Bleaching Kinetic Profiles; FT-IR and UV-vis Spectroscopic Data. *J Food Compos Anal.* 2011, 24(4-5), 516-522.
- Kh. Z. Brainina, D. P. Varzakova, E. L. Gerasimova, A chronoamperometric method for determining total antioxidant activity. *J of Anal Chem.* 2012, 67(4), 364–369, DOI: 10.1134/S1061934812020050
- M. P. Bucur, M. C. Rădulescu, B. Bucur, G. L. Radu, Low-interferences Determination of the Antioxidant Capacity in Fruits Juices Based on Xanthine Oxidase and Mediated Amperometric Measurements in the Reduction Mode. *Anal Sciences* 2016, 32(2), 135-140, DOI: 10.2116/analsci.32.135
- Q. Ge et al., A novel and simple cell-based electrochemical biosensor for evaluating the antioxidant capacity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from

Chinese dry-cured ham. *Biosens Bioelectron.* 2018, 99, 555-563, DOI: 10.1016/j.bios.2017.08.037

- S. Sotiropoulou, V. Gavalas, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, Novel Carbon Materials in Biosensor Systems, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 18, 2003, pp. 211-215.
- S.A. Miscoria, J. Desbrieres, G.D. Barrera, P. Labbé, G.A. Rivas, Glucose biosensor based on the layer-by-layer self-assembling of glucose oxidase and chitosan derivatives on a thiolated gold surface. *Analytica Chimica Acta* 2006, 578, 137-144
- L. Betancourt, F. López-Gallego, N. Alonso-Morales, G. Dellamora, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, Glutaraldehyde in Protein Immobilization. A Versatile Reagent, *Methods in Biotechnology*, 2006, 22, 57-64.
- J. P. Hart, Wring S. A., „Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses”, *Trends Anal. Chem.*, 1997, 16(2), 89–103,
- J. Wang, „Electroanalysis and biosensors”, *Analytical Chemistry*, 71, 1999, 328R-332R,
- D. R.Thevenot, K. Toth, R. A.Durst, G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16, 121 - 131.
- M. Yu. Vagin, EE. Karyakina, T. Hianik, A. A. Karyakin, Electrochemical transducers based on surfactant bilayers for the direct detection of affinity interactions, *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 18, 1031-1037.
- J. P. Hart; A. Crew; E. Crouch; K. C. Honeychurch; R. M. Pemberton, „Some Recent Designs and Developments of Screen-Printed Carbon Electrochemical Sensors/Biosensors for Biomedical, Environmental, and Industrial Analyses”, *Analytical Letters*, 2004, 37(5), 789 – 830.
- E. M. Garrido; C. Delerue-Matos; J. Lima; A. Brett Electrochemical Methods in Pesticides Control, *Analytical Letters*, 2004, 37(9), 1755 – 1791.
- P. Weerathunge et al, Nanozyme-Based Environmental Monitoring, în cartea: „Advanced Environmental Analysis: Applications of Nanomaterials”, Volume 2, Editori C. Mustansar Hussain și B. Kharisov, 2017, The Royal Society of Chemistry.
- K. N. Han, J.g-S. Choi, J. Kwon, Gold nanozyme-based paper chip for colorimetric detection of mercury ions, *Scientific Reports*, 2017, 7, Article number 2806.
- F. Tian, J. Zhou, B. Jiao, Y. He, A nanozyme-based cascade colorimetric aptasensor for amplified detection of ochratoxin A, *Nanoscale*, Issue 19, 2019,
- L. Tian et al, Copper (II) oxide nanozyme based electrochemical cytosensor for high sensitive detection of circulating tumor cells in breast cancer, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2018, 812, 1-9.
- T.F. Tseng, Y.L. Yang, M.C. Chuang, S.L. Lou, M.Galik, G.U. Flechsig, J. Wang, Thermally Stable Improved First-Generation Glucose Biosensors based on Nafion/Glucose-Oxidase Modified Heated Electrodes, *Electrochemistry Communications*, 2009, 11, 1819-1822.

- Y. Tan, W. Deng, C. Chen, Q. Xie, L. Lei, Y. Li, Z. Fang, M. Ma, J. Chen, S. Yao, Immobilization of enzymes at high load/activity by aqueous electrodeposition of enzyme-tethered chitosan for highly sensitive amperometric biosensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25, 2644-50.
- D. Jayasri, S. Sriman Narayanan, Amperometric determination of hydrazine at manganese hexacyanoferrate modified graphite-wax composite electrode, *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 144, 348–354.
- R. Pauliukaite, A. Malinauskas, G. Zhylyak, Spichiger-Keller U.E., Conductive organic complex salt TTF-TCNQ as a mediator for biosensors. An Overview, *Electroanalysis* 2007, 19, 2491-2498.
- Y. Sameenoi, M.M. Mensack, K. Boonsong, R. Ewing, W. Dungchai, O. Chailapakul, D.M. Crokek, C.S. Henry, Poly(dimethylsiloxane) cross-linked carbon paste electrodes for microfluidic electrochemical sensing, *Analyst*, 2011, 136, 3177-84.
- X. Wang, M. Han, J. Bao, W. Tu, Z. Dai, A superoxide anion biosensor based on direct electron transfer of superoxide dismutase on sodium alginate sol-gel film and its application to monitoring of living cells, *Analytica Chimica Acta*, 2012, 717, 61-66.
- J. Yan, V.A. Pedrosa, J. Enomoto, A. L. Simonian, A. Revzin, Electrochemical biosensors for on-chip detection of oxidative stress from immune cells, *Biomicrofluidics*. 2011, 5, 032008–032011.
- J. R. Macdonald, W. R. Kenan, *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems*, Wiley-Interscience, 1987.
- J. R. Scully, D. C. Silverman, M. W. Kendig (Editor), *Electrochemical Impedance: Analysis and Interpretation*, Astm Intl, 1993.
- D. Loveday, „Evaluation of organic coatings with Electrochemical Impedance Spectroscopy; Part 1: fundamentals of Electrochemical Impedance Spectroscopy”, *JCT CoatingsTech Journal*, 2004, 1 (8), 46(7).
- E. Barsoukov, J. R. Macdonald (Editor), *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, Wiley-Interscience; 2 edition, 2005,
- <http://www.cartage.org.lb/en/themes/Sciences/Chemistry/Electrochemis/Electrochemical/mainpage.htm>
- B. C. Baker, A. C. West, Electrochemical Impedance Spectroscopy Study of Nickel-Iron Deposition, *Journal of The Electrochemical Society*, 1997,144(1), 164,
- G.D. Davis, L.A. Krebs, and C.M. Dacres, Detection of moisture in composites using an electrochemical impedance spectroscopy sensor, *Proc. 3rd Joint FAA/DOD/NASA Conference on Aging Aircraft*, Albuquerque, NM, 1999.
- M. Matsumiya, R. Takagia, „Electrochemical Impedance Spectroscopic Study on Eu²⁺ and Sr²⁺ Using Liquid Metal Cathodes in Molten Chlorides”, *Z. Naturforsch.* 2000, 55a, 673.
- J. M. Elliott, J. R. Owen, Electrochemical impedance characterisation of a nanostructured (mesoporous) platinum film, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, 2, 5653.
- G. Ragoisha, A. Bondarenko, Fast electrochemical impedance spectroscopy for solid state chemistry, *The 5th International Conference Solid State Chemistry*, Bratislava, 2002.

- A. Abbas, M.J. Linman, Q. Cheng, New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26, 1815-1824.
- S. Zeng, D. Baillargeat, H.P. Ho, K.T. Yong, Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(10), 3426–3452.
- R.J. Green, R.A. Frazier, K.M. Shakesheff, M.C. Davies, C.J. Roberts, S.J.B. Tandler, Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 2000, 21, 1823-1835.
- L. Lu, L. Zhang, X. Zhang, S. Huan, G. Shen, R. Yu, A novel Tyrosinase biosensor based on hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the detection of phenolic compounds. *Anal. Chim. Acta*. 2010, 665, 146–151, doi:10.1016/j.aca.2010.03.033.
- C.A. Ramsden, P.A. Riley, Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22, 2388–2395, doi:10.1016/j.bmc.2014.02.048.
- J.L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbe, Polyphenol oxidase-catechol: an electroenzymatic model system for characterizing the performance of matrices for biosensors, *Talanta* 1996, 43, 1615.
- S. Campuzano, H. Serra, M. Pedrero, F.J. Manuel de Villena, J.M. Pingarron, Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer-based tyrosinase biosensors, *Anal. Chim. Acta* 2003, 494, 187.
- V. Carralero Sanz, M. Luz Mena, A. Gonzales-Cortes, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarron, Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines, *Anal. Chim. Acta*, 52005, 28, 1.
- L. Caseli, D.S. dos Santos Jr., M. Foschini, D. Goncalves, O.N. Oliveira Jr.: “Control of catalytic activity of glucose oxidase in layer-by-layer films of chitosan and glucose oxidase”. *Materials Science and Engineering C*, 2007, 27, 1108-1110.
- W. Zhang, Y. Huang, H. Dai, X. Wang, C. Fan, G. Li: Tuning the redox and enzymatic activity of glucose oxidase in layered organic films and its application in glucose biosensors. *Analytical Biochemistry* 2004, 329, 85-90.
- L. Caseli, D.S. dos Santos Jr., R.F. Aroca, O.N. Oliveira Jr.: Controlled fabrication of gold nanoparticles biomediated by glucose oxidase immobilized on chitosan layer-by-layer films. *Material Science and Engineering C*, 2009, 29, 1687-1690.
- E.M. Pinto, M.M. Barsan, C.M.A. Brett: Mechanism of Formation and Construction of Self-Assembled Myoglobin/Hyaluronic Acid Multilayer Films: An Electrochemical QCM, Impedance, and AFM Study. *Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114, 15354-15361.
- Z. Zhuang, J. Li, R. Xu, D. Xiao, Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using overoxidized polypyrrole/graphene modified electrodes. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2011, 6, 2149–2161.
- I. Paris et al., Aminochrome as a preclinical experimental model to study degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson’s disease, *Neurotox Res* 2007, 12, 125. doi:10.1007/BF03033921

- J. Segura-Aguilar, D. Metodiewa, C.J. Welch, Metabolic activation of dopamine quinones to o-semiquinones by NADPH cytochrome P450 reductase may play an important role in oxidative stress and apoptotic effects. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1381, 1-6 .
- M. Bisaglia, S. Mammi, L. Bubacco, Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine: analysis of the interactions with alphasynuclein, *J Biol Chem* 282, 2007, 15597–15605.
- D.G. Graham, Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones, *Mol Pharmacol*, 1978, 14, 633–643.
- G.V. Polanczyk, E.G. Willcutt, G.A. Salum, C. Kieling, L.A. Rohde, ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis. *Int J Epidemiol*. 2014, 43, 434–435.
- D.C. Tse, R.L. McCreery, R.N. Adams, Potential oxidative pathways of brain catecholamines, *J Med Chem* 1976, 19, 37–40.
- S.B. Berman, T.G. Hastings, Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease, *J Neurochem* 1999, 73, 1127–1137.
- M.R. Gluck, G.D. Zeevalk, Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine and its metabolites: implications for Parkinson's disease and catecholamine-associated diseases, *J Neurochem* 2004, 91, 788–795.
- F.H. Khan, T. Sen, A.K. Maiti, S. Jana, U. Chatterjee, S. Chakrabarti, Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: implications for Parkinson's disease, *Biochim Biophys Acta* 2005, 1741, 65–74.
- S. Jana, A.K. Maiti, M.B. Bagh, K. Banerjee, A. Das, A. Roy, S. Chakrabarti, Dopamine but not 3,4-dihydroxy phenylacetic acid (DOPAC) inhibits brain respiratory chain activity by autoxidation and mitochondria catalyzed oxidation to quinone products: implications in Parkinson's disease, *Brain Res* 2007, 1139, 195–200.
- A.A. Boulton, G.B. Baker, A.N. Bateson, *In Vivo Neuromethods*, Human Press Inc., Totowa, New Jersey, 1998.
- M.E. Ghica, C.M.A. Brett, Simple and efficient epinephrine sensor based on carbon nanotube modified carbon film electrodes, *Anal. Lett.*, 2013, 46, 1379–1393.
- M.L. Dubocovich, M.A. Rivera-Bermudez, M.J. Gerdin, M.I. Masana, Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Frontiers of biology*. 2003, 8, d1093-108.
- U.E. Majewska, K. Chmurski, K. Biesaga, A.R. Olszyna, R. Bilewicz, Dopamine Oxidation at Per(6-deoxy-6-thio)- α -Cyclodextrin Monolayer Modified Gold Electrodes, *Electroanalysis* 2006, 18, 1463-1470.
- M. Deyton, A.G. Ewing, M. Wightman, Response of microvoltammetric electrodes to homogeneous catalytic and slow heterogeneous charge-transfer reactions, *Anal. Chem.* 1980, 52, 2392-2396.
- H. Ernst, M. Knoll, Electrochemical characterisation of uric acid and ascorbic acid at a platinum electrode, *Anal. Chim. Acta* 2001, 449, 129-134.

- D. Sopchak, B. Miller, Determination of the Second-Order Rate Constant for the Reduction of Dopamine Quinone with Ascorbic Acid, *J. Phys. Chem. A*, 2000, 104 (32), 7545–7548.
- C.R. Raj, T. Okajima, T. Ohsaka, Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine *J. Electroanal. Chem.* 2003, 543, 127-133.
- J.F. Cabrita, L.M. Abrantes, A.S. Viana, N-Hydroxysuccinimide-terminated self-assembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation, *Electrochim. Acta* 2005, 50. 2117-2124.
- H. Zhao, Y.Z. Zhang, Z.B. Yuan, Determination of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid Using Poly(hippuric acid) Modified Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis* 2002, 14, 1031-1034.
- P.R. Roy, M.S. Saha, T. Okajama, S.-G. Park, A. Fujishima, T. Ohsaka, Selective Detection of Dopamine and Its Metabolite, DOPAC, in the Presence of Ascorbic Acid Using Diamond Electrode Modified by the Polymer Film, *Electroanalysis* 2004, 16, 1777-1784.
- M. Zheng, Y. Zhou, Y. Chen, Y. Tang, T. Lu, Electrochemical behavior of dopamine in the presence of phosphonate and the determination of dopamine at phosphonate modified zirconia films electrode with highly antifouling capability, *Electrochim. Acta* 2010, 55, 4789-47-98.
- X. Lin, Y. Zhang, W. Chen, P. Wu, Electrocatalytic oxidation and determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid at a poly (p-nitrobenzenazo resorcinol) modified glassy carbon electrode, *Sens. Actuators B* 2007, 122, 309-314.
- P.R. Roy, T. Okajima, T. Ohsaka, Simultaneous electroanalysis of dopamine and ascorbic acid using poly (N,N-dimethylaniline)-modified electrodes, *Bioelectrochemistry* 2003, 59,11-19.
- V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010, 4(8), 118–126, DOI: 10.4103/0973-7847.70902
- S. Mena, A. Ortega, J. Estrela, Oxidative Stress in Environmental-Induced Carcinogenesis. *Mutation Research*, (2009) Vol. 674, p.36-44.
- E.B. Kurutas, The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, 2016, 15(71) 1-22, DOI: 10.1186/s12937-016-0186-5
- B. Halliwell, Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem Biophys* 2008, 476(2), 107–112.
- Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, D. Offen, Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 2001, 40, 959-975.
- S.B. Nimse, D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 2015, 5, 27986-28006, DOI: 10.1039/c4ra13315c
- R. de Guzman, H. Tang, S. Salley, K.Y. Simon Ng, Synergistic Effects of Antioxidants on the Oxidative Stability of Soybean Oil- and Poultry Fat-Based Biodiesel. *J Am Oil Chem Soc.* 2009, 86(5), 459-467, DOI: 10.1007/s11746-009-1373-8

- ZC. Thent, S. Das, Involvement of liver in diabetes mellitus: herbal remedies., *Clin Ter.* 2014, 165(4), 223-30.
- J. Kolodziejczyk-Czepas, P. Nowak, I. Kowalska, A. Stochmal, Biological activity of clovers - free radical scavenging ability and antioxidant action of six *Trifolium* species., *Pharm Biol.* 2014, 52(10), 1308-14.
- R. Jadeja, RV. Devkar, S. Nammi, Herbal medicines for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: current scenario and future prospects, *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014, 2014, 648308.
- SA. Ganie et al., Antioxidant and hepatoprotective effects of *Crataegus songarica* methanol extract, *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2014, 33(2), 131-43.
- E. Solowey, M. Lichtenstein, S. Sallon, H. Paavilainen, E. Solowey, H. Lorberboum-Galski, Evaluating medicinal plants for anticancer activity, *Scientific World Journal.* 2014, 2014, 721402.
- MH. Farzaei, SF. Ghasemi-Niri, AH. Abdolghafari, M. Baeeri, M. Khanavi, M. Navaei-Nigjeh, M. Abdollahi, R. Rahimi, Biochemical and histopathological evidence on the beneficial effects of *Tragopogon graminifolius* in TNBS-induced colitis, *Pharm Biol.* 2014, 4, 1-8.
- G. Taner et al., Modulating effects of pycnogenol® on oxidative stress and DNA damage induced by sepsis in rats, *Phytother Res.* 2014, 28(11), 1692-700.
- M. Karonen et al., Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2004, 522, 105–112.
- JH. Lee et al., Investigation on antibacterial and antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of some Thai edible plants as an alternative for antibiotics., *Asian-Australas J Anim Sci.* 2014, 27(10),1461-8.
- D. Bagchi, M. Bagchi, S. Stohs, D. Das, Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000, 148, 187–97.
- T.K.Lim, *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*; Springer Netherlands: Dordrecht, The Netherlands, 2014, 6, 450–489.
- B. Lorrain, I.Ky, L. Pechamat, P. Teissedre, Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines and extracts. *Molecules* 2013, 18, 1076–1100.
- N. Cotelle, Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001, 1, 569–590.
- M. de la Luz Cádiz-Gurrea, S. Fernández-Arroyo, A. Segura-Carretero, Pine Bark and Green Tea Concentrated Extracts: Antioxidant Activity and Comprehensive Characterization of Bioactive Compounds by HPLC-ESI-QTOF-MS, *Int J Mol Sci.* 2014, 15(11), 20382-402.
- L. Subedi, S. Timalseña, P. Duwadi, R. Thapa, A. Paudel, K. Parajuli, Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal, *J Tradit Chin Med.* 2014, 34(5), 584-90.

- S. Drăgan, T. Nicola, R. Iliina, S. Ursoniu, A. Kimar, S. Nimade, T. Nicola, Role of multi-component functional foods in the complex treatment of patients with advanced breast cancer, *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2007, 111(4), 877-84.
- SY. Al-Okbi, DA. Mohamed, TE. Hamed, RSh. Esmail, SM. Donya, Prevention of renal dysfunction by nutraceuticals prepared from oil rich plant foods, *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014, 4(8), 618-27.
- D. Bagchi, M. Bagchi, S. Stohs, D. Das, Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000, 148, 187–97.
- SK. Shukla, Protection from radiation-induced mitochondrial and genomic DNA damage by an extract of *Hippophae rhamnoides*, *Environ Mol Mutagen*. 2006, 47(9), 647-56.
- Duke, J A. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. Boca Raton, FL. CRC Press.1992.
- Z. Rabiei, M. Rafieian-Kopaei, Neuroprotective effect of pretreatment with *Lavandula officinalis* ethanolic extract on blood-brain barrier permeability in a rat stroke model, *Asian Pac J Trop Med*. 2014, 7S1, S421-6.
- I. Spiridon, S. Colceru, N. Anghel, CA. Teaca, R. Bodirlau, A. Armatu, Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania, *Nat Prod Res*. 2011, 25(17),1657-61.
- SA. Yang, SK. Jeon, EJ. Lee, CH. Shim, IS. Lee, Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components, *Nat Prod Res*. 2010, 24(2), 140-51
- H. Sebai, S. Selmi, K. Rtibi, A. Souli, N. Gharbi, M. Sakly, Lavender (*Lavandula stoechas* L.) essential oils attenuate hyperglycemia and protect against oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats., *Lipids Health Dis*. 2013, 12, 189
- R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanoglu, Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *J. Agric. Food Chem*. 2016, 64, 997–1027.
- A. A. Bunaciu, A. F. Danet, Ş. Fleschin, H. Y. Aboul-Enein, Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2016, 46(5), 389-399.
- V.B. Guliyev, M. Gul, A. Yildirim, *Hippophae rhamnoides* L.: Chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. *J. Chromatogr. B*. 2004, 812(1-2), 291-307.
- H. Schulz, M. Baranska, Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc*. 2007, 43, 13-25.
- **M. Florescu***, M. David, Tyrosinase-based biosensor for selective dopamine detection, *Sensors*, 2017, 17, 1314-1329.
- **M. Florescu***, A. Baicu, I. Capan, Gh. Coman, Selective determination of dopamine using modified electrodes by differential pulse voltammetry, *Romanian Journal of Biophysics*, 2015, 25(2), 101–116.

- **M. Florescu**, A. Valceanu, Ghe. Coman, Aplicații ale tirozinazei și lacazei: biosenzori enzimatici electrochimici, Jurnal Medical Brasovean, 2013, 2, 16-21.
- G. Di Chiara, V. Bassareo, S. Fenu, Ma. De Luca, L. Spina et. al., Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection, Neuropharmacology, 2004, 47, 227–241.
- J.-W. Mo, B. Ogorevc, Simultaneous measurement of dopamine and ascorbate at their physiological levels using voltammetric microprobe based on overoxidized poly(1,2-phenylenediamine)-coated carbon fiber, Anal. Chem., 2001, 73, 1196–1202.
- M. Mohammadi, S. Akhondzadeh, Advances and considerations in attention-deficit/hyperactivity disorder pharmacotherapy, Acta med Iran, 2011, 49, 487–498.
- T. Obata, Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation, J. Neural Transm, 2002, 109, 1159–1180.
- <https://www.psychologytoday.com/basics/dopamine>
- W. Cai, T. Lai, H. Du And J. Ye, Electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on an exfoliated graphite paper electrode: A high performance flexible sensor, Sens. Actuators, B, 2014, 193, 492–500.
- D-Q. Huang, C. Cheng, Y.-M. Wu, H. Zhang, L.-Q. Shenget et al., The determination of dopamine using glassy carbon electrode pretreated by a simple electrochemical method, Int. J. Electrochem. Sci., 2012, 7, 5510 – 5520.
- Palanisam S., S. Ku, S.-M. Chen, Dopamine sensor based on a glassy carbon electrode modified with a reduced graphene oxide and palladium nanoparticles composite, Microchim. Acta, 2013, 180, 1037–1042.
- A. Pandikumar, G. T. Soon How, T.P. See, F. Saiha Omar, S. Jayabal et al., Graphene and its nanocomposite material based electrochemical sensor platform for dopamine, RSC Advances, 2014, 4, 63296-63323.
- Cj. Watson, Bj. Venton, Rt. Kennedy, In vivo measurements of neurotransmitters by microdialysis sampling, Anal. Chem., 2006, 78, 1391-1399.
- E. Rand, A. Periyakaruppan, Z. Tanaka, D. Zhang, M. P. Marsh et al., A carbon nanofiber based biosensor for simultaneous detection of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid, Biosens. Bioelectron., 2013, 42, 434–438.
- J.A. Stamford, J.G., JustICE, Voltammetry has been solving the mysteries of the brain and its functions for 21 years, Anal. Chem., 1996, 68, 359A–363A.
- G. Giancane, L. Valli, State of art in porphyrin Langmuir–Blodgett films as chemical sensors, Adv. Colloid Interface Sci., 2012, 171–172, 17-35.
- A. D'amico, C. Di Natale, R. Paolesse, A. Macagnano, A. Mantini, Metalloporphyrins as basic material for volatile sensitive sensors, Sens. Actuators, B, 2000, 65, 209.
- G.S.H. Thien, A.Pandikumar, N.M.Huang, H.N. Lim, Highly exposed {001} facets of titanium dioxide modified with reduced graphene oxide for dopamine sensing, Sci. Rep., 2014, 4, 5044.
- **M. Florescu**, Evaluation of Functional Features of Immobilized Enzymes Using Electrochemical Label-Free Methods, Advances In Biomedicine And Health Science, Recent Advances in Biology and Biomedicine Series, Proceedings of 2nd WSEAS ISI

International Conference on Biomedicine and Health Engineering (BIHE '13), June 1-3, 2013, Brasov, Romania. ISBN: 978-1-61804-190-6, ISSN: 1790-5125, Proceedings of the International Conferences ISBN: 978-1-61804-196-8, WSEAS Press.

- M. David, **M. Florescu**, M. M. Barsan, L. Tugulea and C. M.A. Brett, Development and Characterization of Layer-by-Layer Biosensors Based on PEI(+)/GOx(-) Layers Using Label-Free Methods, in Sensing in Electroanalysis, Vol. 8 (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas; Eds.), pp. 329-346. 2013/2014 University Press Centre, Pardubice, Czech Republic. ISBN 978-80-7395-782-7 (printed); 78-80-7395-783-4 (pdf).

- M. David, **M. Florescu**, Biomolecular interaction evaluation using surface plasmon resonance. SPR biosensors, în cartea: „Biophysics for Biomedical and Environmental Sciences” (Edited by Monica Florescu), pp. 211-223, Transilvania University Press, Brasov, 2016, ISBN 978-606-19-0768-7.

- M. David, M. M. Barsan, C. M.A. Brett, **M. Florescu***, Improved glucose label-free biosensor with layer-by-layer architecture and conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene), Sensors and Actuators B, 2018, 255, 3227–3234.

- M. Campas, B. Bucur, S.Andreescu, J.-L. Marty: “Application of oriented immobilization to enzyme sensors”. Current Topics in Biotechnology 2004, 1, 95-107.

- S. Ren, S. Yang, Y. Zhao: “Preparation and Tribological Studies of C60 Thin Film Chemisorbed on a Functional Polymer Surface”. Langmuir 2004, 20, 3601-3605.

- D. Geng, S. Yang, Y. Zhang, J. Yana, J. Liu, R. Li, et al., Nitrogen doping effects on the structure of graphene, Appl. Surf. Sci. 2011, 257, 9193–9198.

- M.E. Ghica, R. Pauliukaite, O. Fatibello-Filho, C.M.A. Brett, Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors, Sens. Actuator B-Chem. 2009, 142, 308–315.

- A. Wisitsoraat, et al, , Graphene-PEDOT:PSS on screen printed carbon electrode for enzymatic biosensing, J. Electroanal. Chem. 2013, 704, 208–213.

- V. Pifferi, M.M. Barsan, M.E. Ghica, L. Falciola, C.M.A. Brett, Synthesis characterization and influence of poly(brilliant green) on the performance of different electrode architectures based on carbon nanotubes and poly(3,4-ethylenedioxythiophene), Electrochim. Acta 2013, 98, 199–207.

- A. Baba, P. Taranekar, R.R. Ponnappati, W. Knoll, R.C. Advincula, Electrochemical surface plasmon resonance (EC-SPR) and waveguide enhanced glucose biosensing with N-alkylaminated polypyrrole/glucose oxidase multilayers, ACS Appl. Mater. Interfaces 2010, 2, 2347–2354.

- I.N. Serdyuk, N.R. Zaccai, J. Zaccai, Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics Function, Cambridge University Press, 2007

- M.M. Barsan, K.P. Prathish, X. Sun, C.M.A. Brett, Nitrogen doped graphene and its derivatives as sensors and efficient direct electron transfer platform for enzyme biosensors, Sens. Actuator B-Chem. 2014, 203, 579–587.

- **M. Florescu**, Ghe. Coman, Label-free methods for real-time analysis used in oxidative stress biomarkers detection, Bulletin of the Transilvania University of Braşov, Series VI: Medical Sciences. 2013, 6(55) 1, 9-18.

- M. David, A. Serban, C. V. Popa, **M. Florescu***, Nanoparticle-based label-free sensors for screening the relative antioxidant capacity of hydro-soluble plant extracts, *Sensors*, 2019, 19(3), 590.
- M. David, A. Serban, C. Radulescu, A. F. Danet, **M. Florescu***, Bioelectrochemical evaluation of plant extracts and gold nanozyme-based sensors for total antioxidant capacity determination, *Bioelectrochemistry*, 2019, 129, 124-134.
- L. Campanella, A. Bonanni, E. Finotti, M. Tomassetti, Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: a comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. *Biosens & Bioelectron.* 2004, 19, 641-651.
- E. Rodriguez-Sevilla, M-T. Ramirez-Silva, M. Romero-Romo, P. Ibarra-Escutia, M. Palomar-Pardave, Electrochemical quantification of the antioxidant capacity of medicinal plants using biosensors. *Sensors*, 2014, 14, 14423-14439.
- M. Di Fusco, C. Tortolini, D. Deriu, F. Mazzei, Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta*, 2010, 14, 235-240.
- I.I.Suni, Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *Trends in Anal. Chem.* 2008, 27(7) 604-611.
- H.Weil, E. K. Wang, Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 6060–6093.
- X. Wang , Y. Hu, H. Wei, Nanozymes in bionanotechnology: From sensing to therapeutics and beyond. *Inorg. Chem. Front.*, 2016, 3, 41.
- D.A.C. Brownson, C.E. Banks, Graphene electrochemistry: an overview of potential applications. *Analyst* 2010, 135, 2768-2778, DOI: 10.1039/C0AN00590H
- N. M. Memana, M. Pourkhalil, A. Rashidi, B. Z. Nezhad, Synthesis, characterization and operation of a functionalized multi-walled CNT supported MnOx nanocatalyst for deep oxidative desulfurization of sour petroleum fractions. *J. Ind. Eng. Chem.* 2014, 20(6), 4054-4058, DOI: 10.1016/j.jiec.2014.01.004
- G. Doria, J. Conde, B. Veigas, L. Giestas, C. Almeida, M. Assunção, J.Rosa, P.V. Baptista, Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. *Sensors* 2012, 12(2), 1657-1687, DOI: 10.3390/s120201657
- D. Zhang, L. Chu, Y. Liu, A. Wang, B. Ji, W. Wu, F. Zhou, Y. Wei, Q. Cheng, S. Cai, L. Xie, G. Jia, Analysis of the Antioxidant Capacities of Flavonoids under Different Spectrophotometric Assays Using Cyclic Voltammetry and Density Functional Theory. *J Agric Food Chem.* 2011, 59(18), 10277–10285, DOI: 10.1021/jf201773q
- J. Sochor, J. Dobes, O. Krystofova, B. Ruttkay-Nedecky, P. Babula, M. Pohanka, T. Jurikova, O. Zitka, V. Adam, B. Klejdus, R. Kizek, Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013, 8, 8464-8489.
- E.E. Karyakina, D.V. Vokhmyanina, N.V. Sizova, A.N. Sabitov, A.V. Borisova, T.G. Sazontova, Y.V. Arkhipenko, V.A. Tkachuk, Y.A. Zolotov, A.A. Karyakin, Kinetic approach for evaluation of total antioxidant activity. *Talanta* 2009, 80(2), 749-753, DOI: 10.1016/j.talanta.2009.07.059.
- L. Campanella, E. Martini, M. Tomassetti, Antioxidant capacity of the algae using a biosensor method. *Talanta* 2005, 66(4), 902-911, DOI: 10.1016/j.talanta.2004.12.052

- J. Hoyos-Arbeláez, M. Vázquez, J. Contreras-Calderón, Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. *Food Chem.* 2017, 221,1371-1381, DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.017.
- A.J. Blasco, M.C. Rogerio, M.C. González, A. Escarpa, "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: A proposal. *Anal. Chim. Acta* 2005, 539(1), 237-244, DOI: 10.1016/j.aca.2005.02.056.
- V.M. Annapandian, S. S. Rajagopal, Phytochemical Evaluation and In vitro Antioxidant Activity of Various Solvent Extracts of *Leucas aspera* (Willd.) Link Leaves. *Free Rad Antiox.* 2017, 7(2), 166-171, DOI: 10.5530/fra.2017.2.25.
- A. Gliszczyńska-Świątło, Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chem.* 2006, 96(1), 131-136, DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.02.018.
- A. A. Bunaciu, A. F. Dăneț, Ș. Fleschin, H. Y. Aboul-Enein, Recent applications for in vitro antioxidant assay. *Crit Rev Anal Chem.* 2016, 46(5), 389-399, DOI: 10.1080/10408347.2015.1101369.
- R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanoğlu, Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64(5), 997-1027, DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04739.
- M. Oktay, I. Gülçin, Ö. I. Küfrevioğlu, Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT Food Sci Technol.* 2003, 36(2), 263-271, DOI: 10.1016/S0023-6438(02)00226-8.
- E. Krashin, A. Piekietko-Witkowska, M. Ellis, O. Ashur-Fabian, Thyroid Hormones and Cancer: A Comprehensive Review of Preclinical and Clinical Studies, *Front Endocrinol.* 10 (2019) 59, DOI: 10.3389/fendo.2019.00059.
- V. Neu, C. Bielow, P. Schneider, K. Reinert, H. Stuppner, C.G. Huber, Investigation of reaction mechanisms of drug degradation in the solid state: A kinetic study implementing ultrahigh-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry for thermally stressed thyroxine, *Anal Chem.* 85 (4) (2013) 2385, DOI: 10.1021/ac303404e.
- G.J.M. Kuiper, M.H.A. Kester, R.P. Peeters, T.J. Visser, Biochemical Mechanisms of Thyroid Hormone Deiodination, *Thyroid* 15 (8) (2005) 787, DOI: 10.1089/thy.2005.15.787.
- P.V.V. Romanholo, C.A. Razzino, P.A. Raymundo-Pereira, T.M. Prado, S.A.S. Machado, L.F. Sgobbi, Biomimetic electrochemical sensors: New horizons and challenges in biosensing applications, *Biosens. Bioelectron.* 185 (2021), DOI: 10.1016/j.bios.2021.113242 113242.
- Q. Wang, H. Wei, Z. Zhang, E. Wang, S. Dong, Nanozyme: an emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay, *TrAC* 105 (2018) 218, DOI: 10.1016/j.trac.2018.05.012.
- M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, Nanomaterials for biosensing applications: a review, *Front. Chem.* 2 (63) (2014) 1, DOI: 10.3389/fchem.2014.00063.

- S. Lotfi, H. Veisi, Synthesis and characterization of novel nanocomposite (MWCNTs/CC-SH/Au) and its use as a modifier for construction of a sensitive sensor for determination of low concentration of levothyroxine in real samples, *Chem. Phys. Lett.* 716 (2019) 177, DOI: 10.1016/j.cplett.2018.12.029.
- M. David, A. Serban, T.A. Enache, **M. Florescu***, Electrochemical quantification of levothyroxine at disposable screen-printed electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2022, 911, 116240. DOI: 10.1016/j.jelechem.2022.116240.
- N. Cazacu, C. G. Chilom, M. David, **M. Florescu***, Conformational changes in the BSA-LT4 complex induced by the presence of vitamins: spectroscopic approach and molecular docking, *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 4215. DOI: 10.3390/ijms23084215.
- N. Sandu, C. G. Chilom, **M. Florescu***, Molecular insights into binding mechanism of rutin to bovine serum albumin-Levothyroxine complex: Spectroscopic and molecular docking approaches, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2022, 264, 120261. DOI: 10.1016/j.saa.2021.120261.
- N. Sandu, C. G. Chilom, M. David, **M. Florescu***, Evaluation of the interaction of levothyroxine with bovine serum albumin using spectroscopic and molecular docking studies, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2022, 40(3) 1139-1151. DOI: 10.1080/07391102.2020.1822919.
- M. David, **M. Florescu**, C. Bala, Biosensors for Antioxidants Detection: Trends and Perspectives, *Biosensors*, 2020, 10, 112; DOI:10.3390/bios10090112.
- C. G. Chilom, M. David, **M. Florescu***, Monitoring biomolecular interaction between folic acid and bovine serum albumin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 230, 118074. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118074.
- D.C. Rubinsztein, The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration, *Nature*, 2006, 443(7113),780-6. DOI: 10.1038/nature05291.
- V. Tõugu, P. Palumaa. Coordination of zinc ions to the key proteins of neurodegenerative diseases: A β , APP, α -synuclein and PrP. *Coordination Chemistry Reviews*. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.12.008.