



Universitatea  
Transilvania  
din Braşov

ŞCOALA DOCTORALĂ INTERDISCIPLINARĂ

Facultatea: Medicină

Dr. Fiz. Monica MOLDOVAN (FLORESCU)

# Contribuții la dezvoltarea unor bioinstrumente și aplicațiile lor în medicină

## Contributions to the development of bioinstrumentation and their applications in medicine

REZUMAT / ABSTRACT

Conducător științific

Prof. Dr. Gheorghe Coman

BRAȘOV, 2019



D-lui (D-nei)

.....

**COMPONENȚA**  
**Comisiei de doctorat**

Numită prin ordinul Rectorului Universității Transilvania din Braşov

Nr. 4860 din 20.10.2011

PREȘEDINTE:	Prof.dr Marius Alexandru MOGA
CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:	Prof.dr. Gheorghe COMAN
REFERENȚI:	Prof.dr. Valeriu ATANASIU
	Prof.dr. Dan Florin MIHĂILESCU
	Conf.dr. Bogdana VIRGOLICI

Data, ora și locul susținerii publice a tezei de doctorat: 23.09.2019, ora 10.00, sala KP18.

Eventualele aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării vor fi transmise electronic, în timp util, pe adresa [florescum@unitbv.ro](mailto:florescum@unitbv.ro)

Totodată, vă invităm să luați parte la ședința publică de susținere a tezei de doctorat.

Vă mulțumim.



## CUPRINS

CUPRINS.....	3
PARTE TEORETICĂ .....	6
Bioinstrumentația în medicină.....	7
Scopul și obiectivele tezei de doctorat .....	9
Senzori pentru evidențierea/evaluarea interacțiunilor biomoleculare și cuantificarea unor biomolecule de interes .....	10
Senzori cu suprafață modificată.....	11
CONTRIBUȚII PERSONALE .....	13
1. Identificarea și cuantificarea experimentală a dopaminei ca biomarker al bolilor neurodegenerative .....	14
1.1. Scopul și obiectivele cercetării .....	14
1.2. Cuantificarea dopaminei .....	14
1.3. Materiale și echipamente .....	15
1.3.1. Materiale .....	15
1.3.2. Echipamente și metode .....	15
1.4. Detecția dopaminei folosind senzori de aur cu suprafață modificată .....	16
1.4.1. Senzori de aur .....	16
1.4.2. Senzori modificați cu CoP .....	17
1.4.3. Senzori de aur modificați cu CoP și tirozinază.....	18
1.5. Comportamentul electrochimic al senzorilor cu suprafață modificată.....	18
1.5.1. Voltametrie ciclică.....	18
1.5.2. Voltametrie în puls diferențial .....	19
1.6. Caracterizarea filmului de CoP.....	23
1.6.1. Microscopia de forță atomică.....	23
1.6.2. Caracterizarea reacțiilor redox la senzorul Au-CoP .....	24
1.6.3. Spectroscopia de impedanță electrochimică, EIS .....	24
1.6.4. Rolul CoP în oxidarea dopaminei.....	26
1.7. Cuantificarea dopaminei folosind senzori de aur cu suprafață modificată .....	27
1.7.1. Senzori modificați cu CoP (Au-CoP).....	27
1.7.2. Senzori modificați cu CoP și tirozinază (Au-CoP-Tyr) .....	30
1.8. Cuantificarea DA în probe reale .....	32
1.9. Concluzii .....	34
2. Identificarea și cuantificarea experimentală a glucozei ca biomarker al diabetului zaharat .....	35
2.1. Scopul și obiectivele cercetării .....	35
2.2. Senzori cu suprafață modificată cu structuri enzimice auto-ansamblate, LbL.....	36



<b>2.3. Materiale și echipamente .....</b>	<b>36</b>
2.3.1. Materiale .....	36
2.3.2. Echipamente și metode .....	37
2.3.3. Imobilizarea enzimei pe suprafața senzorilor .....	37
<b>2.4. Comportamentul electrochimic al senzorilor cu suprafață modificată.....</b>	<b>39</b>
1.4.1. Voltametrie ciclică.....	39
2.4.2. Spectroscopia de impedanță electrochimică.....	40
<b>2.5. Evaluarea optică (SPR) a interacțiunilor biomoleculare din structurile enzimatic LbL</b>	<b>43</b>
2.5.1. Structura PEI <sup>+</sup> /GOX <sup>-</sup> .....	43
2.5.2. Structura {chit <sup>+</sup> (GOx)}/PSS <sup>-</sup> .....	45
<b>2.6. Cuantificarea glucozei folosind senzori cu suprafață modificată .....</b>	<b>46</b>
3.6.1. Senzori cu structura PEI <sup>+</sup> /GOX <sup>-</sup> .....	46
3.6.2. Senzori cu structura {chit <sup>+</sup> (GOx)}/PSS <sup>-</sup> .....	48
<b>2.7. Cuantificarea glucozei în probe reale .....</b>	<b>50</b>
<b>2.8. Concluzii .....</b>	<b>50</b>
<b>3. Evidențierea și cuantificarea experimentală a capacității antioxidante totale ca marker al stresului oxidativ .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Scopul și obiectivele cercetării .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Senzori cu suprafață modificată cu enzime artificiale (nanozime).....</b>	<b>52</b>
<b>3.3 Materiale și echipamente .....</b>	<b>53</b>
3.3.1 Materiale .....	53
3.3.2. Prepararea extractelor din plante.....	54
3.3.3. Echipamente și metode.....	54
<b>3.4 Comportamentul electrochimic al senzorilor cu nanoparticule, NP-SPE .....</b>	<b>55</b>
3.4.1. Voltametrie ciclică și în puls diferențial .....	55
3.4.2. Spectroscopia de impedanță electrochimică .....	64
<b>3.5 Evaluarea electrochimică a capacității antioxidante totale a extractelor din plante</b>	<b>66</b>
3.5.1. Voltametrie ciclică – comparație între extractele din plante .....	66
3.5.2. Voltametrie ciclică – calcul AC.....	67
3.5.2. Voltametrie în puls diferențial - indicele electrochimic .....	69
<b>3.6 Cuantificarea capacității antioxidante folosind senzori cu nanozime de aur .....</b>	<b>70</b>
3.6.1. Cuantificarea capacității antioxidante totale relative (RAC) .....	70
3.6.2. Cuantificarea capacității antioxidante totale absolute (TAC).....	75
3.6.3. Estimarea activității antioxidante prin studii cinetice .....	77
<b>3.7 Estimarea capacității antioxidante relativă folosind metode spectroscopice.....</b>	<b>79</b>
3.7.1. Spectroscopia UV-VIS.....	79



3.7.2 Chemiluminescenţa .....	80
<b>3.8 Concluzii .....</b>	<b>83</b>
<b>CONCLUZII GENERALE.....</b>	<b>85</b>
<b>REZUMAT .....</b>	<b>100</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>101</b>
<b>CV (Română) .....</b>	<b>102</b>
<b>CV (Engleză).....</b>	<b>104</b>



Universitatea  
Transilvania  
din Braşov

## **PARTE TEORETICĂ**



## Bioinstrumentația în medicină

**Diagnosticul molecular** este un domeniu în plină expansiune, care utilizează **bioinstrumentația** și care permite realizarea atât a unui **diagnostic timpuriu**, cât și a unor **abordări terapeutice inovatoare** (cheia pentru tratarea cu succes a multor boli) [1].

**Bioinstrumentația** implică realizarea a **noi dispozitive și proceduri** care rezolvă **probleme medicale și de sănătate** prin combinarea cunoștințelor avansate recente în domeniul medicinei, biologiei și ingineriei moleculare în scopul îmbunătățirii sănătății umane. Bioinstrumentația, prin **activități interdisciplinare**, integrează astfel principii de medicină, biologie, biofizică și biochimie cu concepte de proiectare în inginerie pentru **îmbunătățirea stării de sănătate** (diagnostic și terapie) [2].

**Dispozitivele** ce conțin:

1. biomolecule: **proteine** (*enzime* pentru recunoașterea specifică a substraturilor, *anticorpi* pentru interacțiunea specifică cu antigenele corespunzătoare), **ADN-uri** sau **ARN-uri**, orice **alt receptor** (*artificial* sau *biologic*) **care se leagă** de molecula analizată (țintă) cu afinitate și specificitate mari sau
2. microorganisme: ciuperci, bacterii, țesut, componente biomimice,

constituie **noi generații de instrumente pentru aplicațiile de diagnostic molecular**, sunt numite **senzori** și **biosenzori**. Ambele tipuri de dispozitive au și potențialul de a **facilita testarea la punctul de îngrijire** (POCT), unde pot fi efectuate **analize moleculare** de ultimă generație (prin auto-monitorizare sau personal fără pregătire specială), fără a necesita prezența unui laborator de analize sofisticat.

Astfel, **bioinstrumentele**, ce folosesc tehnologii noi, cum sunt **(nano)senzorii și (nano)biosenzorii**, pot fi **aplicate în diagnosticul molecular** [3]: în **monitorizarea clinică** a unor substanțe de interes biologic (biomarkeri: glucoza, neurotransmițători, hormoni, lactoza, ureea, colesterolul, antioxidanți și specii reactive ai oxigenului sau azotului, medicamente, etc.), în **estimarea răspunsului** organismului la terapii specifice, dar și în **studiul interacțiunilor** dintre diverse biomolecule (interacțiuni proteine-proteine, proteine-medicamente, ADN-proteine, etc.).

Astfel, **sisteme de diagnostic molecular pe bază de senzori și biosenzori** pot fi dezvoltate pentru a viza mai multe domenii de interes medical: **teste pentru evidențierea și cuantificarea biomarkerilor** bolilor *metabolice, neurodegenerative, infecțioase, genetice, farmacogenomice* și a *stresului oxidativ* (în sportul de performanță, dieta dezechilibrată, poluare, etc.) [4].

**Metodele analitice** tradiționale sunt costisitoare, lente, au nevoie de laboranți bine pregătiți și în unele cazuri necesită pre-tratarea probelor, fapt ce determină creșterea timpului de analiză. O alternativă la aceste metode este dată de **utilizarea senzorilor și biosenzorilor** care prezintă **avantajele** de a fi **mai simple, mai rapide și mai ieftine** decât testele clasice. Avantajele (bio)senzorilor sunt date astfel de: **selectivitatea și specificitatea** mare, **costul** relativ scăzut al construcției și depozitării, potențialul de **miniaturizare**, facilitatea de **automatizare** și construcție a unui **echipament simplu și portabil/plasture atașat pe piele** pentru analize și monitorizare rapidă în afara laboratorului (*auto-monitorizare*) [3].

**Nanomedicina** este o ramură a medicinei care aplică cunoștințe și instrumente din domeniul nanotehnologiei pentru prevenirea și tratamentul bolilor. **Nanomedicina** implică utilizarea de materiale la **scală nanometrică** (nanoparticule biocompatibile și nanoroboți), **pentru diagnostic** (tehnic și substanțe de imagistică), **detectie** (biomarkeri), **transport** (medicamente) și **acționare** (ingineria țesuturilor și medicina regenerativă) **în organismele vii. Nanomedicina**

se referă, astfel, și la dezvoltarea unor dispozitive mici, nanostructurate, ușor de utilizat, care folosesc pot ajuta în **diagnosticarea timpurie** și recomandarea **terapii adecvate**. **Nanosistemele** bazate pe nanomateriale utilizează **unicitatea** proprietăților **nanomaterialelor biologice și fizice** în recunoașterea unei molecule țintă. **Nanomateriale noi**, care au o rezistență mecanică mare, o conductivitate electrică bună, dimensiuni nanometrice și care sunt compatibile cu moleculele biologice sunt ideale pentru dezvoltarea **biosenzorilor cu o limită de detecție scăzută** [5-8].

În general, avantajele **(bio)senzorilor bazați pe nanomateriale** sunt **răspunsul rapid în timp real, dimensiunile reduse, sensibilitatea, specificitatea și selectivitatea foarte mari și portabilitatea** în comparație cu electrozii și senzorii mari. Astfel, odată cu apariția nanotehnologiei, diagnosticul molecular poate fi realizat cu **nano(bio)senzori** avansați care pot detecta **concentrații de nivel scăzut ale analiților** utilizând **dispozitive portabile**.

**Nanobiologia**, cu ajutorul biologiei moleculare și biochimiei sintetice, a dezvoltat noi **elemente de recunoaștere artificială**, cum sunt **aptamerii și fragmente variabile cu lanț unic**, care recunosc **specific anumite proteine**, ce pot fi folosite împreună cu **elemente artificiale** (nanoparticule și nanofibre metalice, compuși metaloporfirinici, etc.) pentru obținerea unor **dispozitive noi, (nano)senzorii și (nano)biosenzorii**, cu grad **mare de selectivitate și specificitate** pentru biomarkeri din probe cu matrici complexe cum sunt lichidele biologice (ser, urină, salivă) **folosite în diagnosticul molecular**.

Dispozitivele mici trebuie **integrate sau ambalate** utilizând o tehnică de fabricare adecvată. Tehnologiile recente avansate ale sistemelor microelectro-mecanice (MEMS), inclusiv microelectronica, microfabricarea, fotolitografia și microprelucrarea care se aplică în domeniul cercetării biomedicale, au permis apariția **dispozitivelor BioMEMS**. Incorporarea BioMEMS într-un **canal microfluidic** permite dezvoltarea unui „**laborator pe un cip**” (*lab-on-chip*) care oferă posibilitatea realizării unei prelevări automate a unui **volum mic de probă**, o **pre-separare** sau o **detecție multi-proteică** [9].

**Interacțiunile biomoleculare** sunt unele din cele **mai prezente reacții** care au loc într-un organism viu și reprezintă **mecanismul de bază** al funcțiilor biologice. Aceste interacțiuni apar între macromolecule (ADN, ARN, proteine, lipide, carbohidrați, medicamente), receptori biologici specifici și bio(molecule). **Înțelegerea** acestor interacțiuni este esențială pentru **diagnosticarea timpurie a unei patologii și obținerea unor medicamente eficiente și pot fi studiate cu ajutorul (nano)senzorii lor și (nano)biosenzorilor**.



## Scopul și obiectivele tezei de doctorat

**Scopul** acestei teze de doctorat a constat în dezvoltarea unor **metode noi de diagnostic molecular** pentru **identificarea/evidențierea și cuantificarea** unor **biomarkeri** de interes în aplicații medicale.

În acest scop au fost urmărite următoarele **obiective**:

1. dezvoltarea unei **metode noi de identificare și cuantificare a dopaminei ca biomarker al bolilor neurodegenerative** prin realizarea și testarea **(bio)senzorilor electrochimici**.

2. dezvoltarea unei **metode noi de identificare și cuantificare a glucozei ca biomarker al diabetului zaharat** prin realizarea și testarea **biosenzorilor electrochimici și optici**.

3. dezvoltarea unei **metode noi de evidențiere și cuantificare a capacității antioxidante totale ca marker al stresului oxidativ** prin realizarea și testarea **senzorilor electrochimici cu enzime artificiale (nanozime)**.

**Senzorii electrochimici dezvoltați în această teză** au avut la bază **nanomateriale**, atât naturale (**biomolecule enzimatiche**), cât și artificiale (**nanoparticule de aur**) și reprezintă **modele demonstrative experimentale** care vor permite *realizarea și testarea unor sisteme noi*, cu *îmbunătățiri semnificative*, pentru **diagnosticarea timpurie a patologiilor corespunzătoare și elaborarea unor abordări terapeutice inovatoare**.

Cuantificarea **dopaminei (DA)** în mediul fiziologic, prezintă interes deoarece aceasta este un neurotransmițător important care este legat de **o mare varietate de afecțiuni medicale** [11]. Identificarea selectivă a DA permite **monitorizarea bolilor** Parkinson și Alzheimer, a tulburării de hiperactivitate cu deficit de atenție (ADHD) și a schizofreniei [12-15], fiind acceptat și ca **biomarker de prognostic**. Astfel, **analiza și controlul neurotransmițătorilor au o importanță deosebită în domeniul neuroștiințelor**, în care **tratamentul actual este arbitrar**, bazat în principal pe **observațiile clinice** ale pacientului. **Metodele tradiționale** cele mai utilizate pe scară largă pentru detectarea neurotransmițătorilor sunt metode *in vitro*, (cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) [16], spectroscopia de absorbție [17]), în care ambele metode necesită **setări speciale de laborator și consumă mult timp** sau *in vivo*, care sunt **foarte scumpe** (tomografie cu emisie de pozitroni) [18]. **Senzorii electrochimici** oferă un răspuns în timp real, cu sensibilitate și selectivitate mari, datorită naturii electroactive a DA, astfel aceștia **pot fi folosiți ca metodă de diagnostic molecular in vitro**.

**Diabetul zaharat** este cea mai frecventă afecțiune endocrină a metabolismului carbohidraților. În întreaga lume, este o **cauză principală de morbiditate și mortalitate** și o problemă majoră de sănătate pentru cele mai dezvoltate societăți, iar prevalența diabetului continuă să crească. **Concentrația glucozei din sânge este principalul criteriu de diagnostic pentru diabetul zaharat**, împreună cu cea al HbA1c [19], și este un instrument util pentru monitorizarea pacienților. Sunt **utilizate teste multiple de laborator** pentru diagnosticarea pacienților cu diabet zaharat ce folosesc echipamente sofisticate cu consum mare de consumabile și care necesită personal specializat. Astfel, au fost dezvoltate o serie de dispozitive adecvate pentru măsurarea glucozei. Auto-monitorizarea glicemiei reprezintă un **instrument valoros pentru gestionarea diabetului** cu scopul de a ajuta pacientul să realizeze și să mențină concentrațiile normale de glucoză din sânge **pentru a întârzia sau chiar preveni progresia microvasculară și complicații macrovasculare**. În plus, auto-monitorizarea poate fi utilă și pentru **detectarea hipoglicemiei** și furnizarea de informații în timp real pentru **ajustarea medicamentelor, a alimentației și a activității fizice** pentru a atinge obiectivele glicemice. În acest scop **piața dispozitivelor cu senzori** s-a dezvoltat rapid și poate juca un rol-cheie, oferind un **instrument**

**analitic puternic**, cu aplicații majore, în special în medicină. Astfel, **biosenzorii electrochimici enzimatici pot fi folosiți ca metodă de diagnostic molecular *in vitro*** (pentru auto-monitorizare).

**Stresul oxidativ (OS)** a beneficiat de o atenție deosebită în ultimele două decenii, datorită descoperirii faptului că statusul **oxidativ anormal evaluat de biomarkerii circulanți**, a fost asociat pacienților cu boli cronice (diabet, sindromul ovarului polichistic (PCOS), cancer și boli neurologice) [20]. **Stresul oxidativ (OS)** a fost definit ca un dezechilibru, între **speciile reactive de oxigen (ROS)** și **antioxidanți**, în favoarea ROS, conducând la o **întrerupere a semnalizării redox** și/sau la **leziuni moleculare** ale lipidelor, proteinelor și ADN-ului. ROS au atât **proprietăți fiziologice cât și patologice** [21, 22]. La nivel **fiziologic**, ROS acționează ca mesageri secundari (**semnalizare redox**) capabili să inducă supraexpunerea genelor care codifică enzimele antioxidante. Atunci când sunt produse în **cantități excesive**, ROS provoacă **leziuni ireversibile** biomoleculare care sunt potențial implicate în îmbătrânire și în patologii asociate îmbătrânirii (patologii cardiovasculare și neurodegenerative, cancer, diabet etc.). Un **stres oxidativ mare** poate rezulta dintr-o **dietă săracă în fructe și legume** cunoscute pentru bogăția lor de antioxidanți, dar și datorită unor surse endogene și exogene (fumat, poluare, expunerea excesivă la radiații ionizante, consumul excesiv de alcool și de medicamente, inflamația cronică, etc.). **Evidențierea OS *in vivo*** reprezintă o **mare provocare** [23]. Au fost dezvoltate mai multe **abordări tradiționale de investigare**: cuantificarea compușilor antioxidanți, determinarea oligoelementelor (seleniu și zinc), evidențierea daunelor oxidative mai ales ale lipidelor și ADN-ului, identificarea surselor endogene care produc ROS *in vivo* și, în final, chestionarul alimentar pentru estimarea aportului de antioxidanți [24]. Pe lângă faptul că aceste **metode tradiționale sunt invazive** (cu excepția ultimei), toate aceste abordări necesită **mult timp** și necesită **protocoale complexe, echipamente specifice și personal specializat**, ceea ce face ca majoritatea analizelor să fie **foarte costisitoare**. **Beneficiile antioxidanților** sunt demonstrate *in vitro* prin stoparea oxidării biomoleculare datorită **anihilării/captării ROS de acestea**. Gradul de anihilare poate fi **cuantificat** folosind **senzori electrochimici** și folosit pentru **evidențierea capacității totale** antioxidante, ca marker al **stresului oxidativ**, ca **metodă de diagnostic molecular *in vitro***.

## **Senzori pentru evidențierea/evaluarea interacțiunilor biomoleculare și cuantificarea unor biomolecule de interes**

Un **senzor** este definit ca fiind un dispozitiv de măsură (traductor) care, atunci când este supus unui fenomen biochimic ori biologic (ex. oxidarea glucozei, dopaminei sau a  $H_2O_2$ ), generează un semnal măsurabil sub diferite forme (ex. variația intensității unui curent electric sau a unui fascicul de unde electromagnetice). Astfel, senzorul este un instrument care transformă un tip de semnal în altul al cărui **parametrii pot fi îmbunătățiți prin modificarea suprafeței sale active**. Această modificare poate fi realizată cu ajutorul unor **componente biologice** (ex. enzime) sau **artificiale** (ex. film polimeric, nanoparticule) cu **rol de recunoaștere** (receptori) a (bio)moleculare analizate (liganzi).

**Receptorul** este ales astfel încât să interacționeze în mod **specific și selectiv** cu molecula ligand studiată. Astfel, **selectivitatea și specificitatea receptorului** sunt combinate cu **sensibilitatea tehnicii** pentru evidențierea calitativă și cantitativă a analitului (ligandul) prin **analiza interacțiunii moleculare** dintre receptor și ligand sau **electrocataliza** acestuia pe suprafața instrumentului (ex. oxidare-reducere, cataliza enzimatică). Caracteristic este faptul că performanțele analitice ale acestor dispozitive sunt obținute folosindu-se **ambele elemente** (receptor/ligand) în **cantități mici** [25-31]. **Măsurătorile sunt realizate direct, în timp real, fără a fi necesară prezența unui marker** (metoda „label-free”).

**Senzorii și biosenzorii sunt instrumente analitice** care pot fi folosite atât pentru diagnosticarea timpurie a unor boli, prin cuantificarea unor molecule cu rol de biomarker, cât și pentru studiul și caracterizarea interacțiunilor biomoleculare. **Funcționarea biosenzorilor se bazează pe modificările conformaționale sau configuraționale care au loc la nivel de (bio)moleculă.**

În **diagnosticul molecular** se pot folosi atât **senzorii** și cât **biosenzorii electrochimici**.

**Biosenzorii** electrochimici sunt utilizați pentru **identificarea și cuantificarea** compușilor biologici care **nu** sunt activi electrochimic (glucoza, ureea, acetilticolina etc.). În acest caz se folosește un **bioreceptor** (enzimă) cu ajutorul căruia compusul analizat este transformat într-un produs care este activ din punct de vedere electrochimic.

### **Senzori cu suprafață modificată**

Performanțele senzorilor (electrochimici sau optici) pot fi îmbunătățite prin **modificarea fizico-chimică** a suprafeței lor. În acest scop pot fi folosite **componente artificiale** (filme polimerice, nanoparticule), **biologice** (enzime) sau **combinația lor**.

Prin modificarea chimică a suprafeței senzorului electrochimic, cu *filme polimerice subțiri* și/sau *nanostructurate* ori prin *autoasamblarea unor monostraturi*, performanțele acestuia pot fi îmbunătățite prin:

- facilitarea transferului electronilor,
- acumularea sau difuzia selectivă a analiților,
- posibilitatea identificării unor substanțe care nu au proprietăți electroactive.

Prin modificarea suprafeței unui senzor cu o *enzimă* se obține **biosenzorul enzimatic**.

**Stabilitatea biosenzorului și performanțele** sale analitice depind atât de *procesul de imobilizare* a enzimei, dar și de *mediul folosit* pentru imobilizarea acesteia într-un sistem stabil pe suprafața senzorului. Acest sistem trebuie să păstreze cât mai aproape posibil enzima de suprafața electrodului și să permită un **transfer rapid al electronilor**, cu **conservarea activității enzimei imobilizate**. Astfel, metoda de imobilizare trebuie să *prevină denaturarea moleculei enzimatică* sau *orientările nefavorabile ale acesteia* la suprafața senzorului, iar *centrul de transfer al electronilor sa nu fie ecranat* în lanțul peptidic [69].

**Senzori și biosenzori cu tirozinază electrochimici pentru detecția dopaminei (DA)** au mai fost folosiți și prezentați în articole anterioare, dar diferiți față de cei prezentați în această teză. Până în prezent *activitatea tirozinazei în combinație cu un film de metaloporfirină și senzori de aur* nu a fost încă studiată și va fi prezentată în **primul capitol al tezei** pentru **identificarea și cuantificarea dopaminei prezentă în probe de medicamente (model biologic)**.

Majoritatea biosenzorilor pentru glucoză sunt de tip electrochimic, datorită sensibilității și reproductibilității lor mari, întreținerii ușoare, precum și a costului redus al acestora. În **al doilea capitol al tezei** este prezentată dezvoltarea și evaluarea **biosenzorilor pentru glucoză prezentă în vin (model biologic)** folosind două materiale senzoriale (film de carbon și aur) și o *combinație multistrat auto-asamblată pentru imobilizarea eficientă a enzimei (GOX) bazată pe interacțiunile slabe electrostatice*.

Pentru organismul uman, **stresul oxidativ este considerat un mecanism fiziopatologic**, prin urmare, **detecția markerilor de stres oxidativ este un real ajutor în scopuri clinice**. Când **apărarea antioxidantă a organismului este slăbită**, celulele și țesuturile organismului devin mai predispuse de a dezvolta **disfuncții și/sau boli**. În **al treilea capitol al tezei** este prezentat un **model pentru determinarea AC, ca marker de stres oxidativ**, prin studierea capacității de anihilare a  $H_2O_2$  de *antioxidanții prezenți în extractele din plante apoase (model biologic)* utilizând senzori bazați pe nanoparticule de aur (nanozime). Rezultatele au fost obținute în



cadrul proiectului TINERE ECHIPE DE CERCETARE-PN-II-RU-TE-2014 (Contract Nr. 199/01.10.2015), director de proiect Dr. Monica Florescu.

**Dispozitivele senzoriale dezvoltate în această teză** au fost caracterizate prin folosirea unor metode fizico-chimice descrise mai jos, metode care au fost folosite și pentru evaluarea interacțiunilor biomoleculare implicate în realizarea și testarea senzorilor.

**Metodele fizico-chimice folosite:**

1. metode **electrochimice**: voltametria (ciclică și în puls diferențial), amperometria, spectroscopia de impedanță electrochimică,
2. metode **optice**: rezonanța plasmonilor de suprafață,
3. **spectrofotometria UV-Vis**.

**Carbonul și aurul** sunt materiale senzoriale folosite pentru multe studii de imobilizare enzimatică, având în vedere buna lor compatibilitate cu stratul de enzimă imobilizat [65, 66]. Aceste materiale au fost folosite **în această teză** pentru obținerea **biosenzorilor electrochimici** cu glucozoxidază și tirozinază.

Pentru **imobilizarea** moleculelor de enzimă pe suprafața senzorilor, **în această teză** au fost folosite două metode, una *chimică* și una *fizică*. În ambele cazuri suprafața senzorului a fost în prealabil modificată cu un compus electrochimic activ care are rol de mediator electronic între enzimă și suprafața senzorului (pentru realizarea unui transfer rapid al electronilor).



Universitatea  
Transilvania  
din Braşov

## **CONTRIBUȚII PERSONALE**



# 1. Identificarea și cuantificarea experimentală a dopaminei ca biomarker al bolilor neurodegenerative

## 1.1. Scopul și obiectivele cercetării

Scopul acestui capitol a constat în dezvoltarea unei metode noi de diagnostic molecular pentru identificarea și cuantificarea dopaminei ca biomarker al bolilor neurodegenerative și aplicația ei pe probe reale.

Metoda nouă folosită: (bio)senzori electrochimici de aur cu suprafață modificată cu filme polimerice subțiri de metaloporfirină și tirozinază.

Obiectivele urmărite în cadrul acestui capitol au fost următoarele:

- modificarea suprafeței senzorilor electrochimici de aur cu filme polimerice subțiri de metaloporfirină și tirozinază.
- optimizarea senzorilor electrochimici în soluții standard pentru detecția selectivă a dopaminei în prezența interferențelor principali în lichidele biologice (acidul ascorbic și acidul uric).
- cuantificarea amperometrică selectivă a dopaminei în soluții standard și obținerea parametrilor curbelor de calibrare ale senzorilor electrochimici.
- detecția amperometrică a dopaminei și validarea metodei electrochimice pentru probe reale.

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în:

Revista ISI (FI = 2,677)

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

Reviste BDI:

[168] 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.

[169] 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.

## 1.2. Cuantificarea dopaminei

Dopamina (DA) este un neurotransmițător care joacă un rol foarte important în funcționarea sistemelor mamiferelor (nervos central, hormonal, renal și cardiovascular), iar deficiența acestuia are ca rezultat apariția unor boli (Parkinson și Alzheimer, sindromul picioarelor

nelineştite sau schizofrenia) [12]. Astfel, **DA** a fost larg acceptat a fi un fel de **biomarker de prognostic pentru mai multe tipuri de boli** [118].

**Acidul ascorbic (AA)** rămâne **cel mai important interferent** [179] deoarece **poate fi oxidat electrochimic la un potenţial apropiat de cel folosit pentru oxidarea DA**, iar răspunsul AA se suprapune peste cel al dopaminei, ceea ce duce la dificultăţi în diferenţierea celor doi compuşi pentru testele realizate pe probe reale. Prin urmare, obţinerea unor **sensibilităţi şi selectivităţi mari** pentru **senzorii de DA** este scopul final.

### 1.3. Materiale şi echipamente

#### 1.3.1. Materiale

Substanţele utilizate pentru aceste experimente au fost: hidroclohidrat de dopamină (DA), acid ascorbic (AA), cobalt(II)(2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfirină) (CoP), cloroform, Nafion 5% (v/v), tirozinază din ciuperci (pudră hidrolizată  $\geq 1000$  U/mg) (Tyr), glutaraldehidă 25% (GA), albumină bovină serică (BSA), etanol, care au fost cumpărate de la firma Sigma Aldrich, fără a necesita o purificare ulterioară. **Electrolitul** folosit în studiul electrochimic a fost *solutia tampon fosfat de sodiu 0.1M NaPB* ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 0.1\text{M NaH}_2\text{PO}_4$ ). Apă deionizată cu pH 8,0 de la Dajhan LabTech cu rezistenţă  $>18$  M $\Omega$ , a fost folosită pentru prepararea tuturor soluţiilor. Soluţiile de lucru, dopamină, acid ascorbic şi acid uric au fost preparate zilnic, experimentele s-au realizat la temperatura camerei (aproximativ 22°C). O soluţie de **clorhidrat de dopamină** (5 mg / ml) pentru injecţii intravenoase de 10 ml a fost utilizat ca **probă reală** şi a fost achiziţionat de la compania farmaceutică Zentiva. Soluţiile de CoP cu diferite concentraţii (v/v) au fost preparate în cloroform.

#### 1.3.2. Echipamente şi metode

Măsurătorile s-au efectuat într-o celulă electrochimică care conţine un electrod de lucru - **electrod de aur (senzorul)** cu suprafaţa de 0.00785 cm<sup>2</sup>, un *fir de platină* ca electrod auxiliar şi un *electrod de referinţă Ag/AgCl (KCl 3 M)*. Pentru experimentele electrochimice a fost folosit potenţiostatul PalmSens3 (interfaţa electrochimică) de la firma PalmSens BV, Olanda, controlat de un computer (PC) prin intermediul unui soft dedicat (PSTrace) care e capabil să preia toate informaţiile oferite de potenţiostat de la celula electrochimică şi să le redea sub formă de grafice pe PC (Fig. 1.1A şi B). Metodele de caracterizare, identificare şi cuantificare au fost electrochimice: voltametria ciclică (CV) şi voltametria în puls diferenţial (DPV), amperometria şi spectroscopia de impedanţă electrochimică (EIS).

DPV-urile au fost înregistrate între -0,40 V şi +0,40 V cu o viteză de scanare de 10 mV s<sup>-1</sup>, utilizând o amplitudine a pulsului aplicat de 50 mV şi o perioadă de 0,2 s (condiţii optimizate), cu condiţionare şi preconcentrare la un potenţial fix pentru un timp fix, toate optimizate în timpul testelor pentru a creşte răspunsul senzorului. Pentru măsurătorile de impedanţă, a fost aplicată o perturbaţie de 10 mV în intervalul de frecvenţe 50 kHz - 0,1 Hz, cu 10 frecvenţe pe decadă de frecvenţă. Spectrele au fost înregistrate la un potenţial de -0,2 V faţă de Ag/AgCl şi au fost reprezentate grafic sub forma unui plan complex (diagrame Nyquist) utilizând EIS Spectrum Analyzer 1.0 software.

Morfologia de suprafaţă a filmul subţire de CoP a fost investigat prin microscopie de forţă atomică (AFM NT-MDT model NTEGRA PRIMA EC). Imaginile au fost luate în modul semi-contact cu cantilever de siliciu "GOLDEN" (NCSG10, forţă constantă 0,15 N/m, raza vârfului 10 nm).

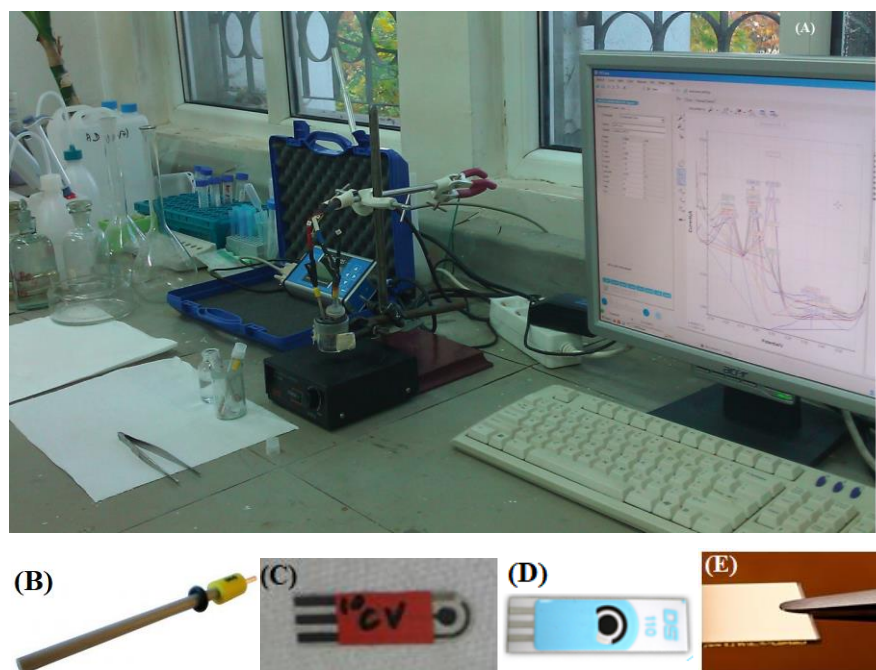


Fig. 1.1. (A) Montajul experimental format din celula electrochimică cu cei trei electrozi conectați la potenciostat controlat prin intermediul software-ului PCTrace. (B) Electrode de aur. (C) CoPC-SPE. (D) NP-SPE. (E) Disc cu film de aur.

#### 1.4. Detecția dopaminei folosind senzori de aur cu suprafață modificată

##### 1.4.1. Senzori de aur

Electrodul de aur nemodificat a fost folosit ca **senzor pentru detecția DA în prezența AA** folosind DPV în condițiile experimentale prezentate mai sus. DPV a prezentat un **singur vârf de oxidare** la potențialul de 0,09 V pentru AA fără a detecta prezența DA.

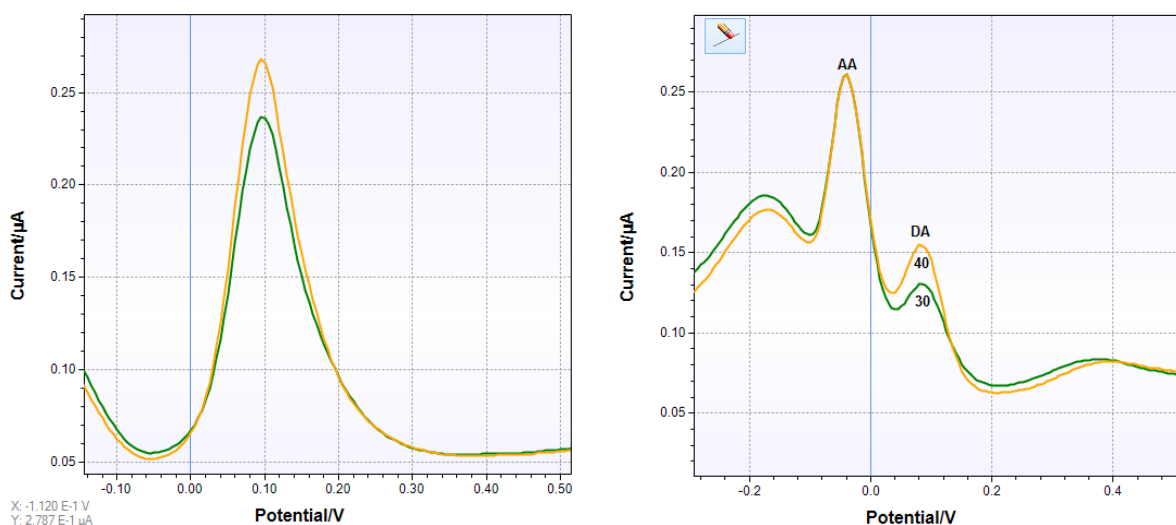


Fig. 1.2. Stânga: DPV în  $200 \mu\text{M AA} + 30 \mu\text{M DA}$  pentru electrodul de Au, nemodificat, cu lipsa vârfului de oxidare a DA. Dreapta: DPV în soluția cu concentrația de  $200 \mu\text{M AA} + 30/40 \mu\text{M DA}$ .



Datorită faptului că *in vivo* AA se găseşte în cantităţi de 1000 ori mai mari, a apărut necesitatea **modificării electrodului de lucru pentru a îmbunătăţi semnalul pentru DA** în detrimentul AA.

**Electrodul de Au modificat cu CoP** a avut ca efect apariţia celor **două vârfuri de oxidare la potenţiale mai mici şi diferite** de cele obţinute cu electrodul nemodificat (0,08V şi -0,03 V) (Fig. 1.2.).

#### 1.4.2. Senzori modificaţi cu CoP

**Porfiringa** este un *sistem tetrapirolic macrociclic*, care posedă legături  $\pi$  conjugate şi substituenţi diferiţi legaţi în jurul acestuia.

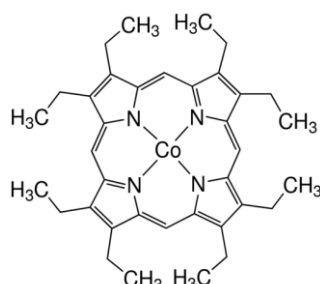


Fig.1.3. Structura compusului cobalt(II)2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfingic (CoP) [14]

Astfel, considerăm că **senzorul** sub forma **electrodului de aur modificat cu CoP (Au-CoP)** va avea o activitate electrocatalitică bună pentru oxidarea dopaminei. Combinaţia cu CoP va îmbunătăţi conductivitatea electronică şi accesibilitatea DA, îmbunătăţeste transferul de electroni între DA şi suprafaţa electrodului, generând astfel un efect de sinergie în electrocataliză.

Metoda de imobilizare aleasă în această lucrare a fost cea mai simplă, obţinută prin simpla imersare a electrodului de aur în soluţia de CoP pentru o perioadă de timp, urmată de evaporarea solventului în atmosferă de aer.

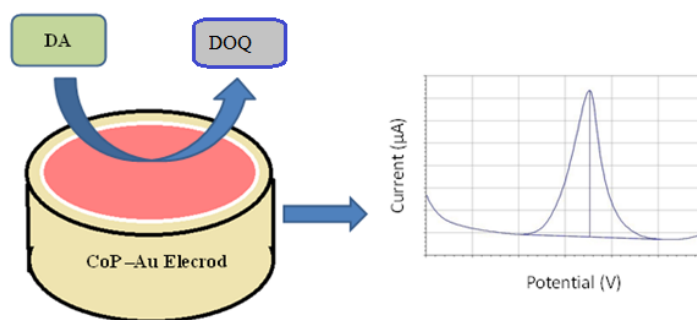


Fig. 1.4. Mecanismul pentru oxidarea electrocatalitică a dopaminei la electrodul de Au modificat cu CoP [168].

O reprezentare schematică a oxidării electrocatalitice a DA la electrodul de Au modificat cu CoP este prezentată în Figura 1.4. DA este uşor **oxidată electrocatalitic** şi formează **dopamin-o-chinonă** de (DOQ) la suprafaţa electrodului, atunci când senzorul este menţinut la un potenţial electric, după **schimbul celor 2 electroni şi 2 protoni**. Mai târziu, aceşti **electroni sunt donaţi** senzorului şi produc un **curent** electric (Faradaic).

### 1.4.3. Senzori de aur modificați cu CoP și tirozinază

Electrozii de Au curățați au fost modificați cu film de CoP prin imersie și timp depunere de 10 minute în soluție proaspătă de CoP cu concentrația de 0.5% (dizolvat în cloroform). Pentru următoarele 10 minute, filmul adsorbit a fost uscat în aer și depus în soluție tampon pentru a evita interacțiunea filmului de porfirină cu moleculele de gaz [184]. Pentru biosenzorul bazat pe tirozinază (Tyr), după modificarea suprafeței electrodului de Au cu filmul de CoP, tirozinaza a fost imobilizată pe suprafața sa prin reticulare. Pentru aceasta o soluție apoasă conținând 1% Tyr și 4% BSA (albumină serică bovină) cu agent de reticulare 2,5% GA (glutaraldehydă) a fost pipetată pe suprafața electrodului astfel încât o concentrație de 0,7% Tyr a fost imobilizată. Stratul de enzimă a fost lăsat să se usuce timp de 10 min, spălat cu apă și imersat în soluție tampon între măsurători. **Biosenzorul modificat cu filmul de CoP și Tyr (Au-CoP-Tyr)** a fost folosit pentru detecția DA.

## 1.5. Comportamentul electrochimic al senzorilor cu suprafață modificată

### 1.5.1. Voltametrie ciclică

#### 1.5.1.1. Senzori modificați cu CoP (Au-CoP)

**Selectivitatea** este un factor important al performanței sensorului. Performanțele senzorilor de Au nemodificați și modificați cu CoP 1% au fost investigate prin voltametrie ciclică (CV) în NaPB 0,1 M la pH 8,0 cu o viteză de scanare de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

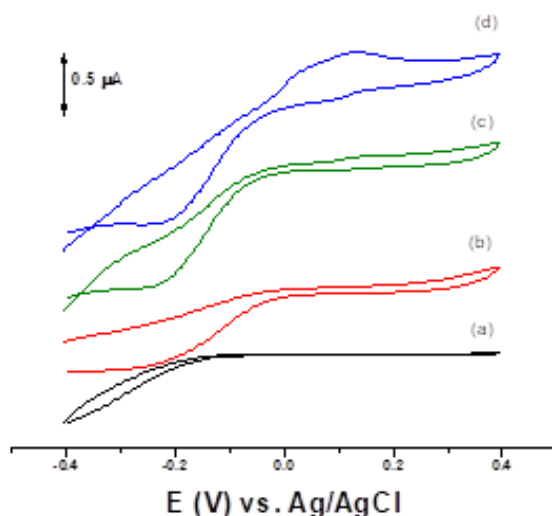


Fig. 1.5. Voltamograme ciclice în 0,1 M NaPB la pH 8,0 pentru:  
(a) electrodul Au nemodificat; (b) electrodul Au modificat cu CoP; (c) electrodul Au modificat cu CoP în 30  $\mu\text{M}$  DA; (d) electrodul Au modificat cu CoP în 30  $\mu\text{M}$  DA + 200  $\mu\text{M}$  AA.  
Viteza de scanare  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . [168]

Figura 1.5b arată (prin comparație cu figura 1.5a) că o îmbunătățire a răspunsului sensorului a fost observată când filmul de CoP a fost adăugat. Este evident că răspunsul CV al sensorului modificat este mai mare decât cel al electrodului de Au, indicând faptul că viteza de transfer a electronilor este îmbunătățită datorită filmului de CoP depus pe suprafața electrodului.

### 1.5.1.2. Senzori modificați cu CoP și tirozinază (Au-CoP-Tyr)

S-au investigat performanțele biosenzorilor cu tirozinază Au-CoP-Tyr prin voltametrie ciclică în 0.1M NaPB la pH 8,0 la o viteză de scanare de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  (Fig. 1.6.). Se poate observa comportamentul diferit în soluție tampon a electrodului cu film de CoP după imobilizarea pe suprafața sa a tirozinasei (Tyr). De asemenea se poate observa apariția unui vârf de oxidare la introducerea DA care corespunde reducerii dopamin-o-chinonei la suprafața electrodului de aur modificat cu film CoP.

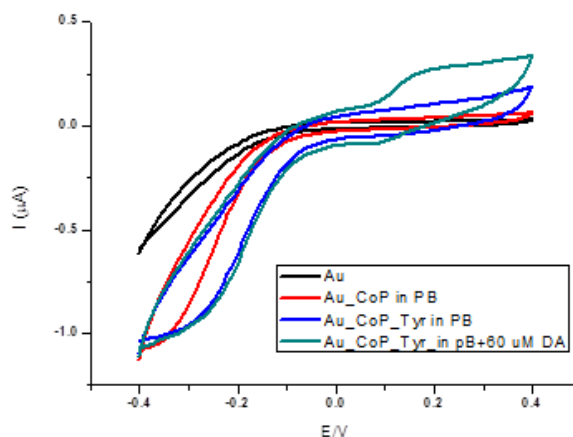


Fig. 1.6. Voltamograme ciclice în 0,1 M NaPB la pH 8,0 pentru: electrodul Au nemodificat; electrodul Au modificat cu CoP; electrodul Au modificat cu CoP și Tyr cu o adăugare de dopamină (DA) 60  $\mu\text{M}$ . Viteza de scanare  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . [167]

## 1.5.2. Voltametrie în puls diferențial

### 1.5.2.1. Senzori modificați cu CoP (Au-CoP)

Pentru a realiza o **identificare și cuantificare mai rapidă, selectivă și sensibilă a dopaminei** în prezența AA, **DPV a fost folosită**, fiind o metodă foarte sensibilă (utilizând parametrii experimentali descriși în secțiunea Echipamente și Metode), cu preconcentrare la un potențial fix. **Efectul modificării suprafeței electrodului cu CoP** poate fi observat prin **apariția atât a vârfului de oxidare al DA cât și a al AA la potențiale mai scăzute** comparativ cu cele obținute cu electrod nemodificat la 0,09 V pentru DA și -0,03 V pentru AA (comparativ cu 0,15 V pentru DA și, respectiv, 0,35 V pentru DA cu electrozii nemodificați).

#### 1.5.2.1.1. Efectul potențialului și al timpului de preconcentrare

Pentru **optimizarea potențialului și timpului de depunere** (preconcentrare) asupra vârfului de oxidare pentru 30  $\mu\text{M}$  DA și 200  $\mu\text{M}$  AA, la senzorul de Au modificat cu CoP, unul dintre parametri a fost menținut constant, în timp ce a fost variat celălalt.

#### Influența potențialului de preconcentrare

Influența potențialului de preconcentrare pentru electrodul Au modificat cu film de CoP 1% a fost studiat între -1,7 și 0,0 V față de Ag/AgCl (electrod de referință), cu un timp de preconcentrare de 60 s.

Prin urmare, valoarea **-1,2 V a fost ales pentru potențialul de preconcentrare**.

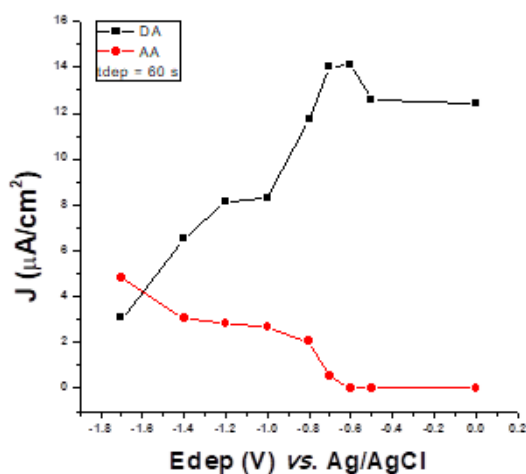


Fig. 1.7. Răspunsul senzorului de Au modificat cu 1% la CoP în NaPB, 0,1 M, pH = 8,0 ce conține 30  $\mu\text{M}$  DA + 200  $\mu\text{M}$  AA pentru diferite potențiale de preconcentrare. [168]

### Influența timpului de preconcentrare

Pentru a studia **influența timpului de preconcentrare**, acesta a fost variat între 20 și 500 s atunci când **senzorul a fost menținut la un potențial de -1.2V**. Vârful de oxidare la 30  $\mu\text{M}$  DA și 200  $\mu\text{M}$  AA **crește în primele 60s**, apoi rămâne stabil (până la 500s), **obținându-se un platou după 60s**, sugerând că toate siteurile de legare de pe suprafața filmului sunt ocupate.

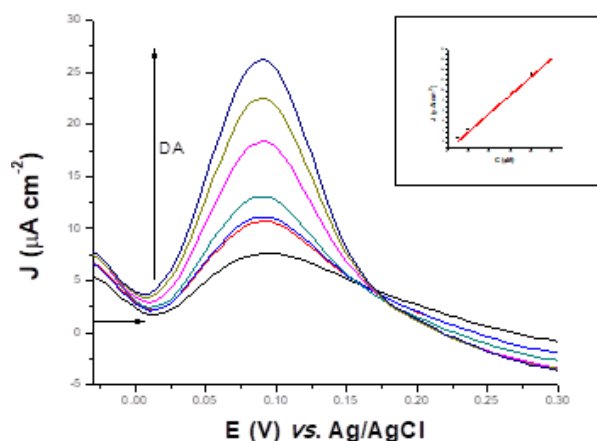


Fig. 1.8. DPV cu senzorul Au-CoP 1% în NaPB pH 8,0 ce conține DA cu concentrațiile: 5,10,15,20,30,40,50  $\mu\text{M}$ . Viteza de scanare 10  $\text{mV s}^{-1}$ . [168]

**Detecția DA s-a efectuat în condițiile optimizate** (Fig. 1.8) și s-a observat un răspuns liniar în intervalul de concentrații 0 - 50  $\mu\text{M}$ , sensibilitatea senzorului CoP-Au de **0.36  $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$**  și limita de detecție de 13  $\mu\text{M}$ .

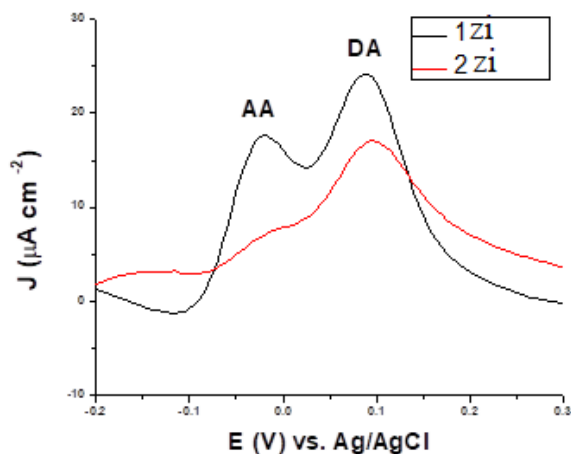


Fig. 1.9. DPV în două zile diferite cu senzorul Au-CoP 1% pentru detecția a 40  $\mu\text{M}$  DA și 200  $\mu\text{M}$  AA în NaPB pH 8,0. Viteza de scanare 10  $\text{mV s}^{-1}$ . [168]

#### 1.5.2.1.2. Efectul compoziției filmului de cobalt porfirină (II), CoP

În scopul de a evita problema menționată mai sus și pentru a studia influența metaloporfirinei s-a folosit CoP 0.5% pentru modificarea suprafeței electrodului de Au. Pentru a produce un senzor mai robust, s-a inclus Nafion (Fig. 1.10) (polimer schimbător de cationi) în soluția de CoP. Acesta ar trebui să îmbunătățească și să creeze o membrană anionică pentru a proteja suprafața împotriva altor interferenți.

Pentru a face distincția între DA și AA s-au inclus în condițiile experimentale, înainte de etapa de preconcentrare, un potențial de condiționare negativ. În aceste condiții senzorul modificat Au-CoP-Nafion a fost astfel capabil să facă distincția între DA și AA.

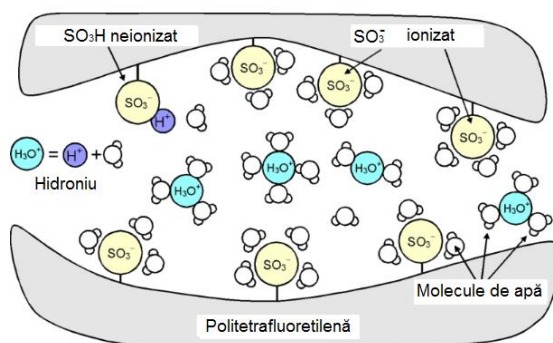


Fig. 1.10. Nafionul, structură și grupari funcționale

Prin urmare, pentru **evidențierea selectivă a oxidării DA și AA a fost ales potențialul de condiționare -1.2 V și potențialul de preconcentrare -0.5 V.**

Comportamentul electrodului de Au modificat cu 0,5% CoP+Nafion pentru o durată totală de **pretratament de 60 s** (condiționare și preconcentrare) a fost studiat, cu mai multe combinații ale celor doi pași (Tabel 1.1). Astfel, am observat că în această situație vârfurile pentru DA și AA au fost mai mari.

Tabel 1.1. Răspunsul senzorului de Au modificat cu film de CoP 0.5%+ Nafion la 50  $\mu\text{M}$  DA și 400  $\mu\text{M}$  AA pentru diferiți timpi de condiționare(  $t_c$ ) și preconcentrare (  $t_d$ ).

$t_c/t_d$ (s/s)	J ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ )	
	DA	AA
60/60	12.61	9.55
30/30	16.56	16.31
<b>20/40</b>	<b>18.22</b>	<b>12.48</b>
40/20	13.25	22.17

La un  **timp de condiționare de 20s și 40s timp de depunere**, vârful DA este net superior față de cel al AA, de unde putem deduce  **că electrodul de lucru este selectiv pentru DA**, acesta fiind și scopul lucrării.

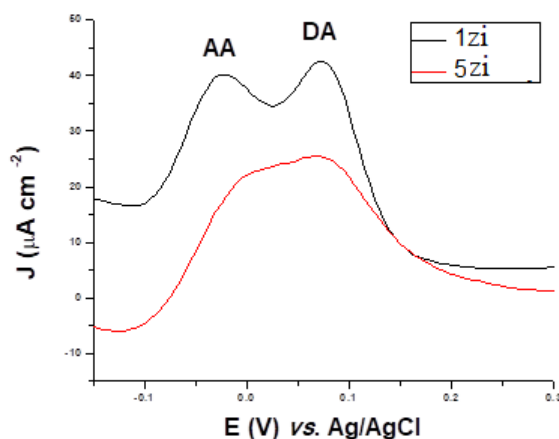


Fig. 1.11. DPV pentru electrodul modificat cu CoP 0.5%+ Nafion în NaPB pH 8, ce conține 40  $\mu\text{M}$  DA și 200  $\mu\text{M}$  AA. Viteza de scanare 10  $\text{mV s}^{-1}$ . [168]

Deoarece senzorul modificat cu Nafion îmbunătățește stabilitatea și sensibilitatea, dar acesta nu ajută foarte mult la selectivitatea DA (datorită stratului dens de film) s-a preferat utilizarea  **electrodului modificat doar cu CoP 0.5%** schimbând radical modalitatea de stocare atunci când nu este utilizat.

### 1.5.2.2. Senzori modificați cu CoP și tirozinază (Au-CoP-Tyr)

#### 1.5.2.2.1 Efectul potențialului și al timpului de preconcentrare

În prezența enzimei,  **potențialul de condiționare nu mai este necesar**, deoarece s-a observat că acesta nu influențează potențialul de vârfului de oxidare. S-a studiat  **variația potențialului de preconcentrare** și s-a ales o valoare de  **-1,3 V** pe o  **durată fixă de 40 s**, deoarece a contribuit în mod clar la  **diferențierea vârfurilor AA și DA** (Fig. 1.12).

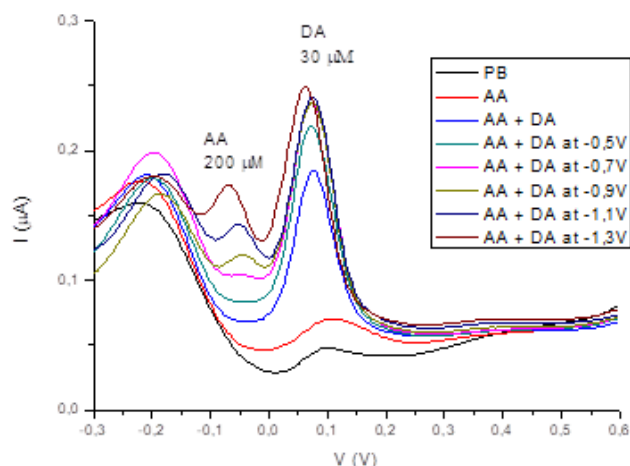


Fig. 1.12. Optimizarea potențialului de preconcentrare în DPV la detecția selectivă a DA în prezența AA folosind biosenzorul cu Au-CoP-Tyr. [167]

## 1.6. Caracterizarea filmului de CoP

### 1.6.1. Microscopia de forță atomică

A fost în interesul nostru ca **filmul subțire să ofere și un bun suport pentru imobilizarea tirozinazei**. În acest context, a fost important ca filmul să aibă un număr mare de site-uri active de adsorbție. Acest lucru poate fi estimat prin rugozitatea filmului (figura 1.13). Pentru un RMS de 12,16 nm, vârfurile și văile sunt mai pronunțate, **oferind locuri de legătură accesibile pe peliculă pentru stratul de enzimă**. Cu toate acestea, filmul CoP a fost distribuit uniform, după cum se vede din histograme.

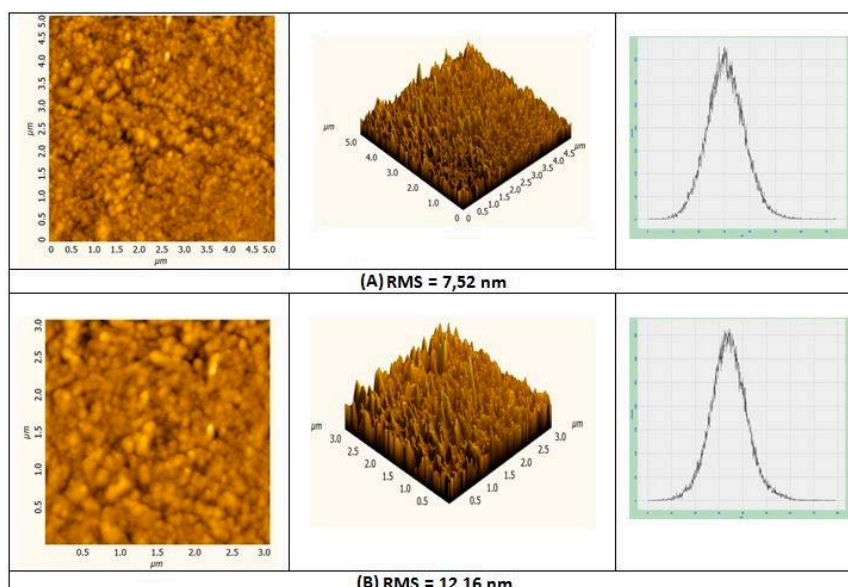


Fig. 1.13. Imaginea de microscopie de forță atomică (AFM) pentru monitorizarea filmului de 0,5% CoP după adsorbția pe substrat de Au cu RMS de la (A) 7,52 nm la (B) 12,16 nm. Sunt prezentate topografia-contrast de fază în 2D, topografia în 3D și o histogramă corespunzătoare care descrie distribuția înălțimii. [167]

### 1.6.2. Caracterizarea reacțiilor redox la senzorul Au-CoP

Pentru **caracterizarea procesului redox al dopaminei** la filmul de CoP s-au realizat CV-uri, unde parametrii experimentali au fost păstrați constanți, cu excepția vitezei de scanare (modificare a potențialului), care a fost variată. În Fig. 1.14A se remarcă **o creștere a vârfului de oxidare a DA**, odată cu **creșterea rădăcinii pătrate a vitezei de scanare**, acest lucru sugerând o creștere a ratei de transfer a electronilor (conform **ecuației Randles–Sevcik**, 1.2). Relația liniară a rădăcinii pătrate a ratei de scanare cu valorile curentului de vârf anodic ( $i_{pa}$ ) și curentul de vârf catodic ( $i_{pc}$ ) pot fi văzute în figura 1.14B. Având în vedere ecuațiile de regresie liniară de mai jos, influența ratei de scanare a explicat **procesul de electrod în termeni de reacție controlată prin difuzie (transport de masă)**.

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

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

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

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  $cm^2 s^{-1}$ ,  $C$  = concentrația în  $mol cm^{-3}$ ,  $v$  = viteza de scanare în  $mVs^{-1}$ ,  $R$  = Constanta gazului în  $J K^{-1} mol^{-1}$ ,  $T$  = temperatura în K

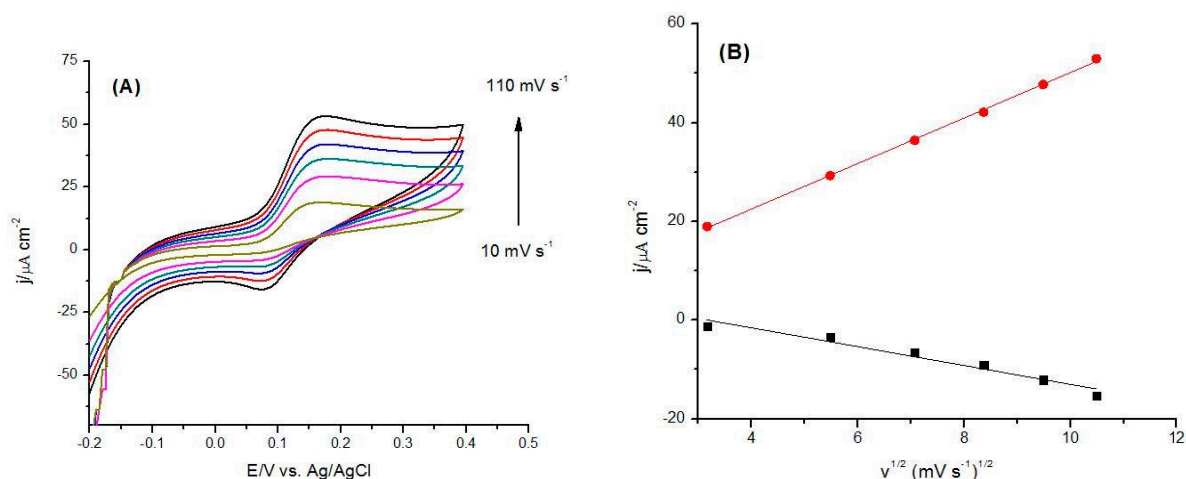


Fig. 1.14. (A) Voltamograme ciclice în NaPB 0,1 M. pH 8,0, conținând 100  $\mu M$  DA la viteze diferite de scanare: 10, 30, 50, 70, 70 și 110  $mV s^{-1}$ ; (B) graficele ambelor cureni de vârf  $I_{pa}$  și  $I_{pc}$  în funcție de rădăcina pătrată a vitezei de scanare. [167]

### 1.6.3. Spectroscopia de impedanță electrochimică, EIS

EIS a fost folosită pentru a **caracteriza fenomenele** ce se produc la **interfața electrod/electrolit** și pentru a obține **informații despre transferul de electroni și acumularea de sarcină electrică**. Astfel se pot identifica modificările interfaciale obținute după **depunerea**



filmului CoP și imobilizarea enzimei Tyr, similar cu formarea unei structuri strat-cu-strat (LbL) pe suprafața electrodului.

Figura 1.15 prezintă reprezentarea complexă a spectrelor de impedanță (grafic Nyquist) achiziționate pentru senzorii Au, Au-CoP și Au-CoP-Tyr la un potențial aplicat de -0,2 V față de Ag/AgCl. Spectrele au fost fitate cu ajutorul unui **circuit electric echivalent** prezentat în inserția din Figura 1.15 și au constat dintr-o rezistență, reprezentând rezistența electrică a celulei și soluției electrolitice ( $R_{\Omega}$ ), în serie cu două combinații paralele. **Prima combinație paralelă** a fost asociată, în toate situațiile, **cu filmul CoP sau CoP-Tyr de la interfața electrod Au/electrolit** și este constituită dintr-o rezistență a transferului de sarcină ( $R_{ct}$ ) prin această interfață și capacitatea electrică non-ideală asociată unui strat dublu de sarcină electrică ( $CPE_{dl}$ ). **Interfața electrodului de Au cu filmul CoP sau CoP-Tyr** a introdus în serie o a doua combinație paralelă ce constă din rezistența transferului de sarcină electrică ( $R_f$ ) și capacitatea electrică non-ideală ( $CPE_f$ ) ale filmului CoP sau CoP-Tyr. Ambele **capacități non-ideale** au fost reprezentate prin **elementul de fază constantă (CPE)**, conform ecuației:

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

unde C este capacitatea ideală,  $\omega$  frecvența radială și exponentul  $\alpha$ , care reflectă uniformitatea suprafeței.

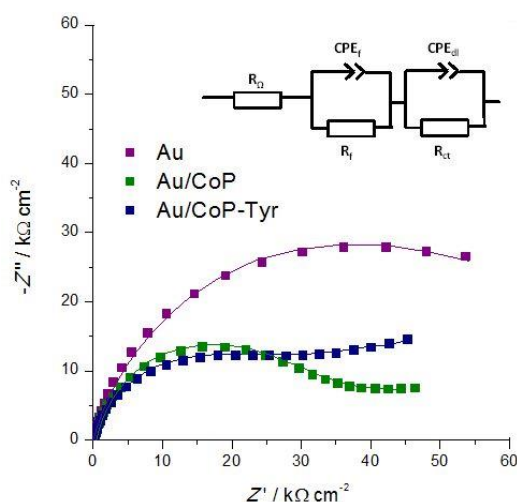


Fig.1.15. Reprezentarea complexă a spectrelor de impedanță pentru Au, Au-CoP și Au-CoP-Tyr în 0,1 M NaPB pH 8,0, la -0,2 V față Ag / AgCl cu inserția care arată circuitul electric echivalent utilizat pentru fitarea spectrelor. [167]

Tabel. 1.2. Valori ale elementelor de circuit echivalente obținute prin fitarea spectrelor de impedanță din figura 1.15 cu circuitul electric echivalent corespunzător.

Electrod	$R_f$ /kΩ·cm <sup>2</sup>	$CPE_f$ /μF·cm <sup>-2</sup> ·s <sup>α-1</sup>	$\alpha_f$	$R_{ct}$ /kΩ·cm <sup>2</sup>	$CPE_{dl}$ /μF·cm <sup>-2</sup> ·s <sup>α-1</sup>	$\alpha_{dl}$
Au	--	--	--	4,64	29,40	0,82
Au-CoP	0,785	956,3	0,98	2,09	30,07	0,87
Au-CoP-Tyr	1,420	901,6	0,96	2,00	60,43	0,80

EIS a fost, de asemenea, utilizată pentru a caracteriza fenomenele care se produc la **interfaţa electrod/electrolit, în prezenţa dopaminei**. Figura 1.16 prezintă reprezentarea complexă a spectrelor de impedanţă, la un potenţial de 0,1 V aplicat în timpul măsurărilor, a spectrelor de impedanţă achiziţionate pentru Au-CoP-Tyr în 0,1 M NAPB, pH 8,0 conţinând 30 și 60  $\mu\text{M}$  DA. Tabelul 1.3 prezintă valorile componentelor circuitului obţinute prin fitarea spectrelor experimentale cu circuitul electric echivalent corespunzătoare oxidării DA.

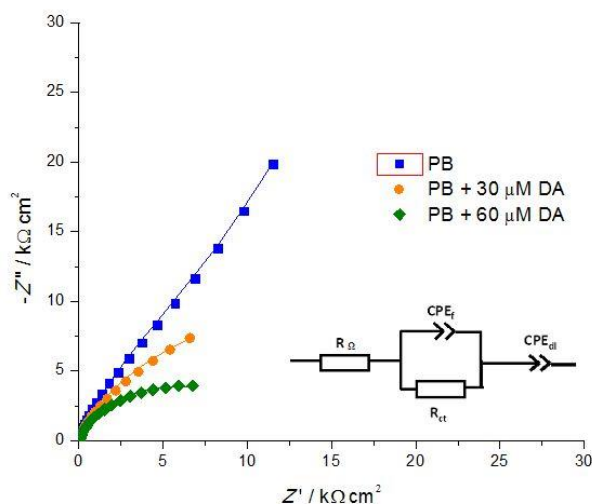


Fig. 1.16. Reprezentarea complexă a spectrelor de impedanţă pentru pentru Au-CoP-Tyr în 0,1 M NaPB pH 8,0, cu adăugarea succesivă de 30 și 60  $\mu\text{M}$  DA la 0,1 V față de Ag /AgCl, cu inserția care arată circuitul echivalent utilizat pentru fitarea spectrelor. [167]

Tabel. 1.3. Valori ale elementelor de circuit echivalent obținute prin fitarea spectrelor de impedanță cu circuitul corespunzător pentru oxidarea DA.

Electrod	$R_{ct}$ / $\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$	$CPE_f$ / $\mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{\alpha-1}$	$\alpha_{dl}$	$CPE_{dl}$ / $\mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{\alpha-1}$	$\alpha_f$
Au-CoP-Tyr	58,57	61,07	0,71	300,63	0,98
Au-CoP-Tyr 30 $\mu\text{M}$ DA	26,12	90,89	0,74	620,50	0,65
Au-CoP-Tyr 60 $\mu\text{M}$ DA	6,99	100,01	0,82	665,47	0,62

#### 1.6.4. Rolul CoP în oxidarea dopaminei

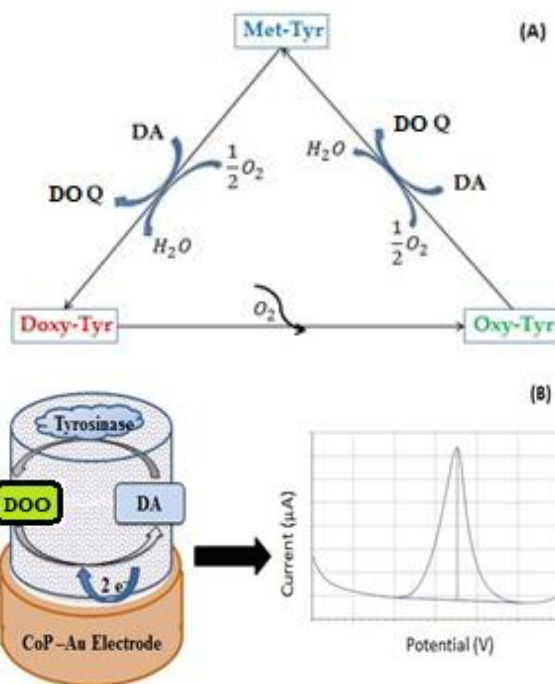
**Viteza reacțiilor electrochimice** a fost semnificativ **influențată** de **natura** suprafeței electrodului. Porfirinele sunt utilizate mai puțin ca un modificador de suprafață sau mediator electrochimic în (bio)senzori și interacțiunea lor cu diferiți analiți este mai puțin studiată.

**Utilizarea metaloporfirinei (CoP)** este recomandată de următoarele **caracteristici**:

1. **Activitatea electrocatalitică** spre oxidarea dopaminei (îmbunătățirea conductivității electronice și promovarea vitezei de transfer a electronilor între DA și suprafața electrodului);
2. **Activitatea de mediator electrochimic** în timpul oxidării enzimatică a dopaminei (îmbunătățește conductivitatea electronică și acționează ca purtători de sarcină);
3. **Suport** pentru imobilizarea enzimelor pentru dezvoltarea biosenzorului.

Cu ajutorul senzorilor **CoP**, **dopamina poate fi ușor oxidată electrocatalic** pe filmul de CoP pentru a forma **dopamin-o-chinonă (DOQ)** care poate fi **redușă** la rândul ei la suprafața electrodului, atunci când electrodul este polarizat la un anumit potențial electric, după schimbul celor doi electroni și doi protoni, pentru a produce un curent Faradaic [39].

În cazul **biosenzorilor**, în timpul etapelor de oxidare ale DA, **stările de oxidare ale atomilor de cupru ai tirozinazei se schimbă** pentru a da diferite forme ale enzimei [23] (Schema 1).



Schema 1. (A) Forme de tirozinază în timpul catalizei enzimatice a dopaminei la CoP-Tyr-biosenzor și (B) principiul de detectare la suprafața CoP-Tyr a biosenzorului. [167]

## 1.7. Cuantificarea dopaminei folosind senzori de aur cu suprafață modificată

### 1.7.1. Senzori modificați cu CoP (Au-CoP)

#### 1.7.1.1. Parametrii analitici senzorului Au-CoP

Deoarece **DPV este mai sensibilă decât CV**, ea a fost utilizată pentru a detecta DA (în absența și prezența AA).

**Setările optimizate de pretratare** a senzorilor CoP, pentru detecția DA au fost: **un potențial de condiționare de -1,2 V pentru o perioadă de 20 s, urmată de 40 s pentru o etapă de preconcentrare la -0,5 V.**

Astfel, **senzorul de Au modificat cu CoP 0.5%** în condițiile experimentale optimizate mai sus a prezentat un răspuns linear până la 50  $\mu\text{M}$ , o sensibilitate de  **$S = 0,577 \pm 0,041 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$**  cu o limită teoretică de detecție de  **$\text{LOD} = 0,98 \mu\text{M}$**  ( $\text{LOD} = 3 \cdot \text{SD}/S$ , unde SD a fost deviația standard a interceptului și S a fost sensibilitatea senzorului). Toate curbele de etalonare au fost obținute în triplicat ( $n = 3$ ).

**Procesele de electrooxidare ale DA** au fost studiate și în prezența AA, cu senzorul Au-CoP. Deoarece în condiții fiziologice (sistemul nervos central), concentrațiile AA pot fi de 100-1000 de ori mai mari decât cele ale DA [41], toate datele experimentale au fost efectuate cu un raport mai mare de AA/DA.

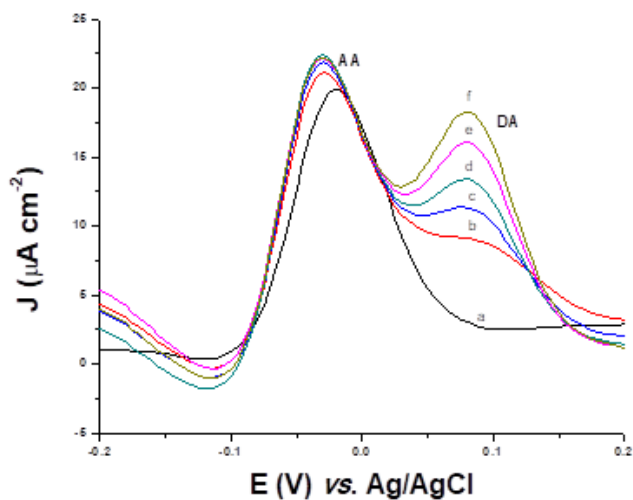


Fig. 1.17. DPV pentru senzorul Au-CoP 0.5% în prezența a 200  $\mu\text{M}$  AA în NaPB 0.1 M, pH 8,0. Concentrația DA (de la a la f): 0, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{M}$ . Viteza de scanare  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .  $t_c/t_d = 20\text{s}/40\text{s}$ . [168]

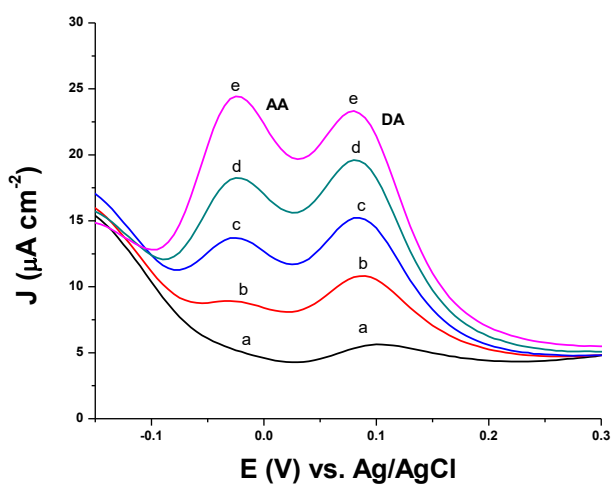


Fig. 1.18. DPV cu senzor de Au-CoP 0.5% în NaPB 0.1 M, pH 8,0. Concentrația celor doi compuși (de la a la e): 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{M}$  pentru DA și 50, 100, 150, 200, 250  $\mu\text{M}$  pentru AA. Viteza de scanare  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .  $t_c/t_d = 20\text{s}/40\text{s}$ . [168]

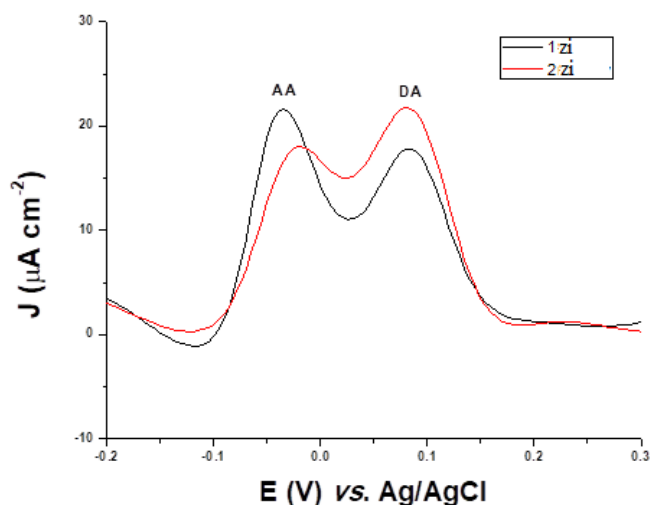


Fig. 1.19. DPV pentru senzorul de Au-CoP 0.5% pentru detecția 50  $\mu\text{M}$  DA + 200  $\mu\text{M}$  AA în două zile diferite, cu păstrarea senzorului în NaPB 0.1M pH 8,0. Viteza de scanare  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .  $t_c/t_d = 20\text{s}/40\text{s}$ . [168]

#### 1.7.1.2. Interferența acidului uric

Pentru a remarcă posibilele interferențe între acidul uric (AU) și dopamină, s-a utilizat DPV pentru a vedea la ce potențiale de oxidare apar vârfurile celor doi compuși. Grafic se înregistrează vârful DA la un potențial de 0,08V, iar pentru acid uric la 0,31V (Fig. 1.20).

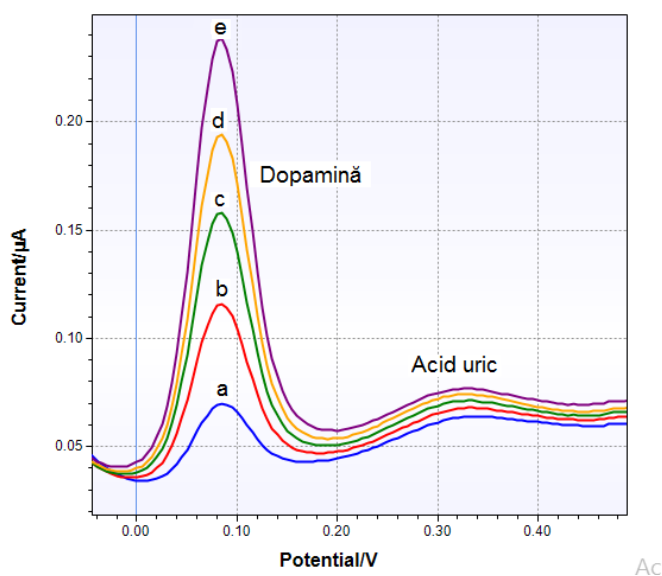


Fig. 1.20. DPV cu electrod de Au-CoP 0.5% în NaPB 0.1 M, pH 8,0. Concentrația celor doi compuși (de la a la e): 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{M}$  pentru DA și 50, 100, 150, 200, 250  $\mu\text{M}$  concentrațiile acidului uric. Viteza de scanare  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .  $t_c/t_d = 20\text{s}/40\text{s}$ .

Se poate observa o selectivitate a electrodului de Au modificat cu CoP 0.5% pentru DA și apariția un vârful mic de oxidare pentru acid uric (care nu se modifică), deși concentrațiile de acid uric au fost de cinci ori mai mari comparativ cu DA.

## 1.7.2. Senzori modificați cu CoP și tirozinază (Au-CoP-Tyr)

### 1.7.2.1. Parametrii analitici ai biosenzorului Au-CoP-Tyr vs. senzorul Au-CoP

DPV a fost, de asemenea, utilizat ca **metodă de identificare și cuantificare sensibilă și selectivă pentru DA în prezența AA** folosind biosenzorul Au-CoP-Tyr. Potențialul de vârf pentru AA a fost în regiunea negativă la  $-0,07$  V, în timp ce pentru DA era la valoarea  $0,06$  V, menținându-se o diferență de  $130$  mV între cele două vârfuri. Performanța biosenzorului a fost testată în condițiile stabilite. Figura 1.21 prezintă un **răspuns liniar al biosenzorului CoP-Tyr pentru DA** pentru domeniul 2 până la  $30$   $\mu\text{M}$ , cu o sensibilitate de  $1,22 \pm 0,02$   $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$  și o limită de detecție de  $0,43$   $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0,997$ ). Sensibilitatea medie a biosenzorului a fost considerabil mai mare comparativ cu cea a senzorului Au-CoP. Toate curbele de etalonare au fost obținute în triplicat ( $RSD = 2,48\%$ ).

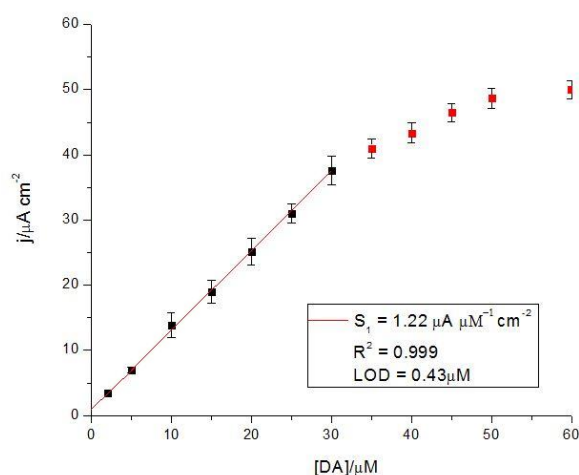


Fig. 1.21. Curba de etalonare a biosenzorului Au-CoP-Tyr pentru 2-60  $\mu\text{M}$  DA în  $0,1$  M NAPB, pH  $8,0$ ,  $v = 50$   $\text{mVs}^{-1}$ . [167]

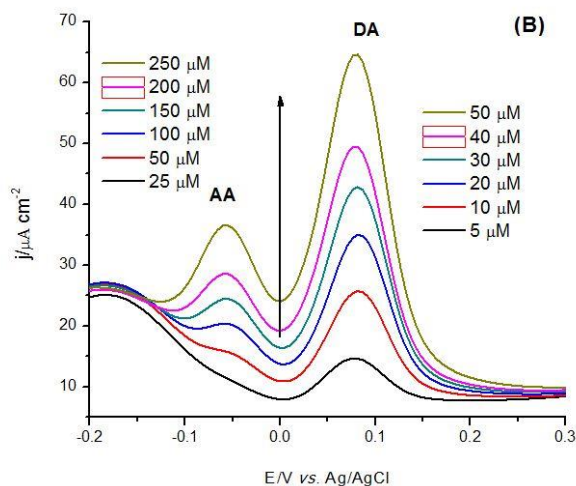


Fig. 1.22. DPV pentru variația simultană a  $5-50$   $\mu\text{M}$  DA și  $25-250$   $\mu\text{M}$  AA în  $0,1$  M NAPB, pH  $8,0$ , pentru biosenzorul Au-CoP-Tyr. [167]

**Vârfurile au fost bine separate** în ambele situații când a fost utilizat biosenzorul Au-CoP-Tyr; în jur de  $130$  mV, ceea ce este suficient pentru evitarea interferențelor nedorite. Prin comparație cu senzorul Au-CoP, **separarea dintre vârfuri este mai mare și vârfurile DA sunt mult mai**

mari. Aceste rezultate s-au reflectat în **sensibilitatea mare și LOD mai scăzută pentru biosenzorul CoP-Tyr față de DA în prezența AA**. Tabelul 1.4 rezumă performanțele analitice ale senzorilor Au-CoP și Au-CoP-Tyr.

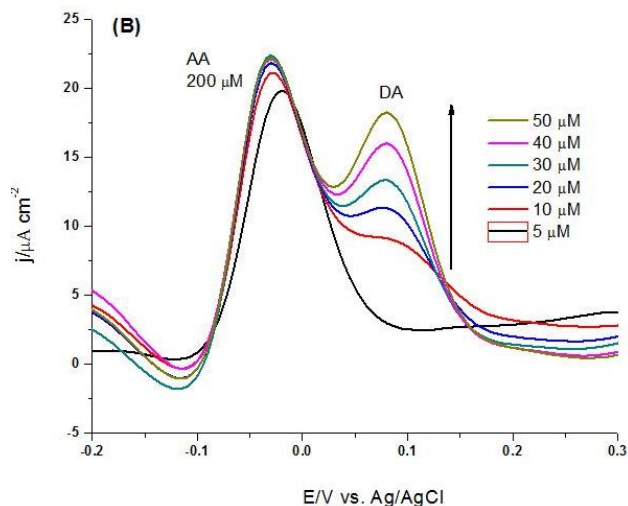


Fig. 1.23. DPV în 0,1 M NAPB, pH 8,0 pentru biosenzorul Au-CoP-Tyr pentru 200  $\mu\text{M}$  AA și 5-50  $\mu\text{M}$  DA.  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . [167]

Tabel 1.4. Performanțele analitice ale senzorilor Au-CoP și Au-CoP-Tyr pentru DA în prezența și absența AA (valori fixe și variabile)..

Analit	(Bio)sensor	Linearitate	S	LoD
		/ $\mu\text{M}$	/ $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$	/ $\mu\text{M}$
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

#### 1.7.2.2. Stabilitatea biosenzorului cu Tyr cu film de CoP

Stabilitatea pe termen lung a biosenzorilor noștri Au-CoP-Tyr a fost evaluată prin măsurători repetate pe diferite zile într-un interval de timp de două săptămâni, determinând sensibilitatea pentru detectarea DA.

Biosenzorul și-a **menținut activitatea până la 95% în prima săptămână**, scăzând la mai puțin de 50% în a 9-a zi și continuându-și scăderea ulterior. În comparație cu senzorul Au-CoP, a cărui sensibilitate a scăzut după două zile, **biosenzorul Au-CoP-Tyr a avut o stabilitate mai bună, sensibilitatea păstrând valori inițiale timp de aproape o săptămână**. Între măsurători, biosenzorul a fost păstrat în soluție tampon în frigider la temperatura de aproximativ 4°C.

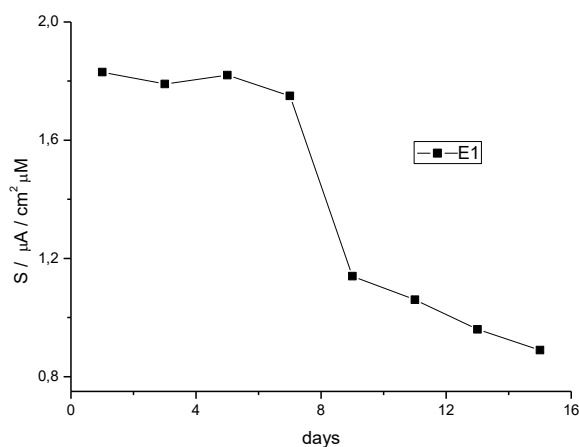


Fig. 1.24. Stabilitatea în timp a biosenzorului Au-CoP-Tyr. [167]

### 1.8. Cuantificarea DA în probe reale

Performanțele senzorilor și biosenzorilor au fost testate în prezența medicamentului **clorhidrat de dopamină** (5 mg/ml) cu un echivalent de 26,36 mM DA, care este de obicei utilizat în tratamentul tensiunii arteriale. S-au preparat diluții apoase până la 1000-100000 ori (în funcție de tipul de de senzor folosit Au-CoP, respectiv Au-CoP-Tyr). Concentrația de dopamină din flacon ( $C_x$ ) a fost determinată **utilizând metoda standard de adăugare (SAM)** și a fost calculat **gradul de recuperare** a acesteia. După adăugarea probei, s-au adăugat trei concentrații cunoscute de DA pentru a extrapola valoarea pentru  $C_x$ . Toate măsurătorile au fost efectuate în triplicat. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1.5.

Deoarece valorile **deviației standard relative (RSD) obținute pentru concentrațiile obținute cu biosenzorul au o valoare de până la 4,7%**, se recomandă o **posibilă utilizare a biosenzorului în probe reale, cum ar fi sânge sau urină. Recuperările medii** au fost de **96%** pentru biosenzorul Au-CoP-Tyr și **99,6%** pentru senzorul Au-CoP.

Valoarea mai mică a gradului de recuperare a biosenzorului Au-CoP-Tyr poate fi explicată prin modificări conformaționale induse de metoda de imobilizare prin reticulare, care afectează situsul activ al enzimei. De asemenea, difuza dopaminei și dopaminei-chinonei la suprafața electrodului, poate fi împiedicată. Metodele de imobilizare mai slabe ale enzimei ar trebui luate în considerare pentru abordările viitoare.

Tabel 1.5. Determinarea DA în clorhidratul de dopamină (n = 3) prin SAM

Senzor	DA Specificat/ $\mu\text{M}$	DA Adăugat/ $\mu\text{M}$	DA Obținut/ $\mu\text{M}$	RSD (%)	Recuperarea (%)
CoP	26.36	0	27.38 $\pm$ 0.83	5.9	103.0
	26.36	10	36.57 $\pm$ 1.02	5.2	100.5
	26.36	20	46.12 $\pm$ 0.53	2.1	99.0
	26.36	30	54.42 $\pm$ 0.97	3.2	96.0
CoP-	3.00	0	3.17 $\pm$ 0.32	2.6	105.0



Tyr	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

**Curbele de etalonare** ale senzorului Au-CoP și ale biosenzorului Au-CoP-Tyr au fost de asemenea utilizate **pentru a determina concentrația probei**. Gradul de recuperare pentru fiecare valoare găsită este prezentată în Tabelul 1.6.

Tabelul 1.6. Determinarea DA în flaconul cu clorhidrat de dopamină (n = 3) utilizând curba de etalonare din Figura 7.

Senzor	DA Specificat / $\mu\text{M}$	DA Obținut / $\mu\text{M}$	$\overline{DA_{ob\acute{t}}}$ / $\mu\text{M}$	Recuperarea (%)
Au-CoP	26.36	29.05		110
	26.36	26.18	27.50 ± 1.45	99
	26.36	27.28		103
Au-CoP-Tyr	3.00	3.43		114
	3.00	2.79	3.10 ± 0.32	93
	3.00	3.09		103

**Performanțele senzorilor au fost, de asemenea, comparate cu ale altor senzori menționați în literatura de specialitate** pentru detecția dopaminei, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1.7.

Tabelul 1.7. Comparația parametrilor analitici ai senzorilor raportate în literatura de specialitate pentru detectarea dopaminei.

Senzor	LOD / $\mu\text{M}$	Liniaritate / $\mu\text{M}$	Interferent	Recuperarea (%)	RSD (%)	Ref.
GCE-TCPP/CCG	0.010	0.1–1	AA, UA	~99.0	3.00	[41]
GCE-PPyox/graphene	0.100	25–1000	AA	-	4.30	[6]
GCE-Tyr-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CHIT	0.006	0.02–0.75	AA	~105.0	5.18	[42]
GCE-GNS-Bi	0.350	1–30	-	98.4	2.20	[43]
GCE-RGO-Pd-NPs	0.230	1–150	AA, UA	98.8	-	[44]
Au-CoP	0.750	10–50	AA	~99.6	4.10	Acum
Au-CoP-Tyr	0.430	2–30	AA	~96.0	3.50	Acum

### 1.9. Concluzii

**Scopul** acestui capitol a constat în **dezvoltarea unei metode noi de diagnostic molecular pentru identificarea și cuantificarea dopaminei ca biomarker al bolilor neurodegenerative și aplicația ei pe probe reale.**

**Metoda nouă folosită: (bio)senzori electrochimici de aur cu suprafață modificată cu filme polimerice subțiri de metaloporfirină și tirozinază și evaluarea lor.**

Astfel, senzori de aur cu suprafață modificată cu filme polimerice subțiri de **metaloporfirină (CoP) și tirozinază (Tyr)**, au fost **caracterizați și evaluați** folosind **metode electrochimice** (voltametria ciclică (CV) și în puls diferențial (DPV), spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS)) pentru optimizarea performanțele lor analitice.

Cuantificarea dopaminei a fost realizată în soluții standard și au fost obținuți **parametrii curbelor de etalonare ale senzorului și biosenzorului** (sensibilitate, domeniul de liniaritate, limită de detecție).

S-a demonstrat că CoP acționează ca **mediator electrochimic** în timpul **reacției catalizate de enzimă**, măsurătorile CV și EIS au evidențiat **transferul îmbunătățit al electronilor**.

**Sensibilitatea biosenzorului Au-CoP-Tyr a fost de  $1,22 \pm 0,02 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$** , cu o **limită de detecție de  $0,43 \mu\text{M}$**  și un interval de liniaritate **până la  $30 \mu\text{M}$** , comparabilă cu rezultatele găsite în literatură pentru senzorii pe bază de nanoparticule. În prezența acidului ascorbic (principalul interferent în probele biologice) a existat o ușoară scădere a sensibilității.

**Prin comparație** cu senzorul Au-CoP, pentru **biosenzorul Au-CoP-Tyr separarea vârfurilor** de oxidare a DA și AA a fost **mai mare**, iar vârfurile DA au fost mult mai evidențiate.

Aceste fapte sunt reflectate în **sensibilitatea mai ridicată și LOD mai scăzută pentru biosenzorul Au-CoP-Tyr față de DA în prezența AA.**

Studii ale **interferențelor** au fost realizate asupra senzorului electrochimic de dopamină. Metoda a permis o **separare a semnalului DA în prezența acidului ascorbic**, în timp ce semnalul datorat **acidului uric a fost nesemnificativ**.

**Repetabilitatea și reproductibilitatea** metodei de identificare și cuantificare a dopaminei au fost realizate prin determinări ale dopaminei cu senzori și biosenzori diferiți. **Biosenzorul Au-CoP-Tyr și-a menținut activitatea până la 95% în prima săptămână**, scăzând la mai puțin de 50% în a 9-a zi și continuându-și scăderea ulterior, în comparație cu senzorul Au-CoP, a cărui sensibilitate a scăzut după două zile, **Biosenzorul a prezentat sensibilitate mare și stabilitate bună până la șapte zile. Reproductibilitatea biosenzorului** a fost determinată prin studierea activității a trei senzori construiți în condiții identice, obținându-se un **RSD = 2,48%**.

Ambii senzori **au fost analizați în prezența medicamentelor de dopamină** disponibile în comerț, care arată o **bună recuperare și deviație standard relativă (RSD)**.

**Gradul de recuperare al concentrațiilor obținute cu biosenzorul electrochimic față de cele adevărate (adăugate) a variat între 93% și 114%. RSD au avut o valoare de până la 4,7%.**

**Se recomandă folosirea biosenzorilor de aur, Au-CoP-Tyr, pentru dozarea dopaminei in vitro (medicamente) și dezvoltarea metodei pentru probe biologice (salivă, ser, urină).**

## 2. Identificarea și cuantificarea experimentală a glucozei ca biomarker al diabetului zaharat

### 2.1. Scopul și obiectivele cercetării

Scopul capitolului a constat în dezvoltarea unei metode noi de diagnostic molecular pentru identificarea și cuantificarea glucozei ca biomarker al diabetului zaharat și aplicația ei pe probe reale.

Metoda nouă folosită: senzori electrochimici cu suprafață modificată cu structuri enzimatiche multistrat auto-ansamblate prin metoda strat-pe-strat (*Layer-by-Layer*, LbL).

Obiectivele urmărite în cadrul acestui capitol au fost următoarele:

- modificarea suprafeței senzorilor de aur cu straturi de polielectroliți auto-asamblate pentru imobilizarea glucozoxidazei pe suprafața funcționalizată a senzorilor.
- monitorizarea interacțiunilor moleculare dintre straturile ansamblului LbL pe suprafața modificată a senzorilor de aur funcționalizat prin metode electrochimice și optice.
- optimizarea senzorilor electrochimici în soluții standard pentru detecția selectivă a glucozei în prezența interferențelor principali din lichidele biologice.
- cuantificarea electrochimică a glucozei în soluții standard și obținerea parametrilor curbilor de calibrare ale senzorilor electrochimici cu suprafață modificată.
- cuantificarea glucozei și validarea metodei electrochimice pentru probe reale.

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în:

#### Revista ISI (FI = 6,393)

[188] 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.

#### Capitole de carte:

[185] 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.**

[186] 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).

[187] 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.

## 2.2. Senzori cu suprafață modificată cu structuri enzimatică auto-ansamblate, LbL

**Structurile multistrat** sunt o strategie bună pentru **fixarea biomoleculilor enzimatică**, deoarece numărul legăturilor aleatorii este redus, **creștând stabilitatea** complexului astfel format. **Metoda strat-pe-strat (Layer-by-Layer, LbL)**, bazată pe **interacțiunile electrostatice dintre monostraturi**, conduce la formarea unor **structuri auto-ansamblate cu arhitecturi moleculare foarte ordonate și reproductibile**. Mecanismul LbL facilitează **transferul direct de electroni între enzimă și senzor** în diferite sisteme biologice. O varietate de polielectrolitiți alternând cu straturi de enzime încărcate cu sarcină electrică de semn opus sunt utilizate pentru depunerea arhitecturii LbL.

**Polietilenimina (PEI)**, polication, este un polimer cu catenă scurtă și un **purtător de electroni eficient**, utilizat pentru fixarea mai multor biomoleculi în diferite configurații de biosenzori. Astfel, în **condiții fiziologice de pH enzima** (glucozoxidaza, GOX) este un **polielectrolit anionic** (este încărcată cu sarcini electrice negative) și poate fi incorporată împreună cu un **polielectrolit cationic cum este PEI în structura auto-ansamblată** a unui film nanostructurat multistrat. Structura multistrat va fi realizată pe o suprafață a unui electrod ce conține diverse grupări funcționale între care să se realizeze interacțiuni moleculare foarte puternice.

**Glucozoxidaza (GOX)** este o enzimă folosită frecvent pentru evaluarea arhitecturilor LbL a biosenzorilor nou dezvoltati, datorită costului redus și robusteții sale. GOX a fost de asemenea imobilizată folosind strategia LbL și prin **incorporarea ei în structura polimerică biocompatibilă a chitosanului, care este încărcat pozitiv, {chit<sup>+</sup>(GOx)}**, care împreună cu **poli(stiren sulfonat) încărcat negativ, PSS<sup>-</sup>** a fost folosit pentru obținerea arhitecturii LbL pentru **imobilizarea GOX pe suprafața senzorilor modificaliți cu un film de polimer conductor, PEDOT**.

Ansamblul secvențial al bistraturilor **PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup>** și **{chit<sup>+</sup>(GOx)}/PSS<sup>-</sup>** a fost monitorizat prin măsurători electrochimice de **voltametrie ciclică (CV)** și **spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS)**, și prin măsurători optice de **rezonanța plasmonilor de suprafață (SPR)**. Performanțele biosenzorului dezvoltat a fost analizat prin **măsurători de voltametrie ciclică și spectroscopie de impedanță electrochimică** care permit și selectarea biosenzorului cu un număr optim de bistraturi **PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup>**.

## 2.3. Materiale și echipamente

### 2.3.1. Materiale

Clorhidratul de cisteamină (Cys), poli(4-stirensulfonat de sodiu) (NaPSS), 3-mercapto-1-propansulfonat de sodiu (MPS), acid 11-mercaptodecanoic (MUA), polietilenimină (PEI) 50% (g / v) în soluție apoasă, 3,4-etilendioxitiofen (EDOT), albumina bovină serică (BSA) minim 98% și glucoza au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. Grafena dopată cu azot (NG) a fost preparat conform procedurii descrise în [191] și a fost un cadou de la Prof. X. Sun, Universitatea din Western Ontario, Canada. Acidul sulfuric, apa oxigenată și glucozoxidaza (GOX) din *Aspergillus niger* (24 U/mg) provin de la Fluka. Soluția apoasă de glucoză a fost preparată 24 de ore înaintea efectuării măsurătorilor, pentru a se obține forma biologic activă ( $\alpha$ -D-glucoză). Soluția tampon concentrație 0,1 M NaPB utilizată pentru toate experimentele conține un amestec de fosfat monosodic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) și fosfat disodic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), (Riedel-de Haën).

Apa deionizată ultrapură Millipore Milli-Q și reactivi analitici au fost folosiți pentru prepararea tuturor soluțiilor. Experimentele au fost toate efectuate la temperatura camerei (~ 22°C) și toți biosenzorii au fost păstrați în soluție tampon la 4 °C în frigider.

### 2.3.2. Echipamente și metode

Toate măsurătorile electrochimice au fost efectuate într-o celulă electrochimică convențională care conține trei electrozi (Fig. 1.1A). **Senzorii** (electrozii de lucru) au fost sub forma unor **electrozi de aur** (bară și film subțire) și **electrozi imprimați cu film de carbon modificați cu ftalocianină de cobalt** (CoPC-SPE) cu rol de mediator electrochimic (Fig. 1.1C). Când bara de aur a fost folosită ca senzor o plăcuță de platină a fost folosită ca electrod auxiliar și un electrod saturat de calomel (SCE) drept referință. Electroculul bară de aur este acoperit în teflon, lăsând o suprafață geometrică expusă de 0,785 mm<sup>2</sup> (Fig. 1.1B). Diametrul suprafeței electrodului de lucru SPE a fost de 4 mm, electrodul auxiliar fiind de Ag și pseudo-referința Ag/AgCl.

**Măsurătorile voltammetrice și amperometrice** au fost realiate cu ajutorul interfețelor electrochimice  $\mu$ -Autolab de tip II și Autolab controlate de calculator prin intermediul software-ului GPES 4.9 (Metrohm-Autolab, Utrecht, Olanda). Măsurătorile de **impedanță electrochimică** au fost efectuate cu un potențiostat/galvanostat/ZRA (Gamery Instruments, Reference 600) pentru electrozii de aur și potențiostat-galvanostat Autolab pentru CoPC-SPE. Pentru măsurătorile de impedanță, a fost aplicată o perturbare rms de 10 mV în intervalul de frecvențe de 100 kHz - 0,1 Hz, cu 10 frecvențe pe decadă de frecvență. Spectrele obținute au fost înregistrate la potențiale diferite, -0,2 V față de SCE pentru electrozii de Au și respectiv 0,0 V pentru electrozii CoPC-SPE, și au fost reprezentate grafic sub formă de diagrame în plan complex (Nyquist) folosind software-le ZPlot 2.4 și FRA.

Un analizor Bionavis SPR Navi 200 și discuri cu film de aur (senzori SPR) (Fig. 1.1E), de la BioNavis LTD, Finlanda, au fost utilizate pentru a evalua interacțiunile implicate în imobilizarea biomoleculilor pe suprafețe prin **rezonanța plasmonilor de suprafață**. Pentru achiziția și analiza datelor au fost folosite software-urile SPR Navi Control și SPR Navi DataViewer. Analizorul Bionavis SPR Navi 200 se bazează pe configurația Kretschmann în care un fascicul de lumină polarizată, colimată, suferă un total reflexie internă la o interfață de sticlă/film-subțire/dielectric. Aceasta este echipat cu lasere cu lungime de undă de 670 nm. Senzorul SPR este format dintr-un disc de sticlă acoperit cu un film subțire de aur cu grosimea de 50 nm care produce efectul SPR.

Suprafața celor doi electrozi de aur (bară și film), pentru ambele tipuri de măsurători, a fost funcționalizată în două moduri: 1) cu trei tipuri de molecule ce conțin grupări funcționale și 2) cu un strat subțire de polimer conductor PEDOT, urmând protocolul descris mai jos. Suprafața cu film de aur (senzor SPR) funcționalizată a fost folosită într-o celulă electrochimică Bionavis de 100  $\mu$ l ca electrod de lucru împreună cu un electrod auxiliar sub forma unui fir de platină și un electrod de referință de argint, toate conectate la interfața senzorului electrochimic PalmSens3 (Palm Instruments BV, Olanda) controlată de software-ul PStTrace 4.8. Temperatura de lucru a fost stabilită la 21 °C.

### 2.3.3. Imobilizarea enzimei pe suprafața senzorilor

**Senzorii de Au** au fost mai întâi funcționalizați:

1) prin **chemisorbția unor molecule** pe suprafața lor prin intermediul legăturilor Au-S: cu cisteamină (Cys) (senzori electrochimici și SPR); 3-mercapto-1-propansulfonat de sodiu (MPS) și acid 11-mercaptodecanoic (MUA) (senzorii SPR),

2) cu **polimer conductor** poli(3,4-etilendioxitiofen), **PEDOT** (senzorii SPR).

Aceste **funcționalizări au permis fixarea și creșterea stabilității structurii multistrat** (LbL) ulterioare. Astfel, a fost facilitată fixarea PEI prin intermediul legăturilor de hidrogen la suprafața sensorului de aur și a structurii LbL obținută prin alternarea straturilor de poli(etilenimina) PEI<sup>+</sup> cu enzima GOX<sup>-</sup> (Fig. 2.1). În cazul funcționalizării cu PEDOT au fost asamblate structurile multistrat LbL conținând enzima (GOX) dispersată în polimerul chitosan încărcat pozitiv {chit<sup>+</sup>(GOx)}, împreună cu poli(stiren sulfonat) încărcat negativ, PSS<sup>-</sup>.

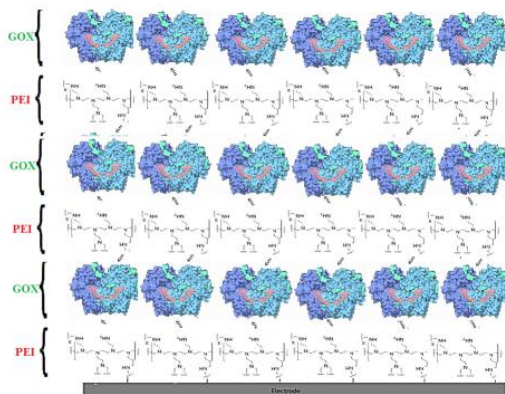


Fig. 2.1. Reprezentarea schematică a ansamblului multistrat pe suprafață unui sensor: suprafața a fost funcționalizată cu diverse tipuri de molecule (CoPC, Cys-Ga), urmată de ansamblul LBL obținut prin alternarea monostraturilor de PEI și GOX.

**Senzorii CoPC-SPE nu au avut nevoie de nici o modificare**, fiind deja electrozi cu film de carbon (care prezintă grupări carboxil și hidroxil intrinseci) funcționalizați cu ftalocianină de cobalt; pe suprafața lor au fost depuse alternativ soluții de PEI<sup>+</sup> și GOX<sup>-</sup>. La pH neutru PEI este încărcat pozitiv, permițând astfel formarea de nanostructuri LBL cu enzima, care este încărcată cu sarcină electrică negativ.

### 2.3.3.1 Senzori electrochimici

**Imobilizarea enzimei** a fost realizată prin **imersie** pentru electrozii bară de **Au**, iar pentru **CoPC-SPE** a fost obținută printr-o procedură de acoperire **în picătură** utilizând volume adecvate de soluții. În ambele cazuri, **structurile de film de nanometrice bine definite** au fost construite pe suprafețele senzorilor **prin auto-asamblare**. Straturile de polielectroliți (LbL) s-au format **prin depunerea secvențială a macromoleculor încărcate cu sarcină electrică opusă** realizată prin adsorbția alternativă a soluțiilor adecvate, **GOX<sup>-</sup>** și **PEI<sup>+</sup>**, respectiv, **chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}** și **PSS<sup>-</sup>** care s-au legat prin interacțiuni electrostatice.

**Electrozii bară de aur** au fost folosiți **în măsurători electrochimice** ca suport pentru cele două structuri auto-asamblate LBL, **PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup>** și **chit<sup>+</sup>(NG+GOx)/PSS<sup>-</sup>** și **au fost funcționalizați în prealabil astfel:**

1) au fost **imersați** în soluție apoasă de 25 mM **Cys** timp de 2,5 ore, spălați cu apă Milli-Q pentru a elimina moleculele reziduale, nelegate și uscate.

2) cu un film de **polimer conductor** poli(3,4-etilendioxitiofen), **PEDOT**, prin **electrodepoziție** dintr-o soluție apoasă conținând 0,1 M poli(stiren sulfonat) de sodiu (NaPSS) și 10 mM (3,4-etilendioxitiofen), EDOT.

Bistraturile **PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup>** au fost depuse și pe suprafața **CoPC-SPE** printr-o procedură de acoperire prin **picurare**.

### 2.3.3.2 Senzori SPR

Pentru măsurători optice, folosind rezonanță a plasmonilor de suprafață (SPR), **senzorii cu film subțire de aur curățat au fost funcționalizați:**

- 1) cu **grupări funcționale** (carboxil, sulfonat sau amino/aldehidă) prin chemisorbția unor molecule pe suprafața Au prin intermediul legăturilor Au-S:
- 2) cu un film de **polimer conductor** poli(3,4-etilendioxitiofen), **PEDOT**, prin **electrodepoziție** dintr-o soluție apoasă conținând 0,1 M poli(stiren sulfonat) de sodiu (NaPSS) și 10 mM (3,4-etilendioxitiofen), EDOT.

**Suprafețele astfel funcționalizate** au fost folosite pentru obținerea structurilor LbL prin imobilizarea bistraturilor pe diferite materiale senzoriale: 1) **PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup>** și 2) **{chit<sup>+</sup>(GOx)}/PSS<sup>-</sup>**. Structurile LbL au fost imobilizate pe suprafața senzorilor funcționalizați prin introducerea soluțiilor polielectrolitilor corespunzători în celula electrochimică Bionavis (curgere în flux, 50  $\mu\text{l min}^{-1}$ ). Odată ajunsă soluția în celulă fluxul a fost oprit timp de 20 minute pentru a permite interacțiunile moleculare electrostatice și depunerea monostraturilor.

## 2.4. Comportamentul electrochimic al senzorilor cu suprafață modificată

### 1.4.1. Voltametrie ciclică

#### 2.4.1.1 Senzori cu structura PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup>

Toate măsurătorile electrochimice s-au efectuat într-o celulă electrochimică convențională conținând trei electrozi folosind NaPB 0,1 M pH 6,9 ca electrolit, cu condițiile experimentale descrise în secțiunea Echipamente și Metode.

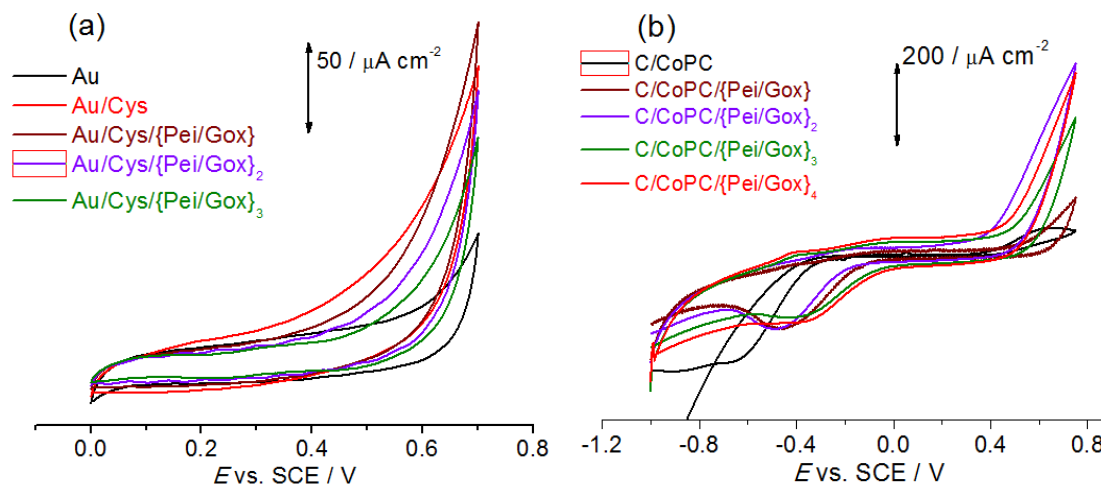


Fig. 2.2. CV în 0,1 M pH 6,9 NaPB pentru un număr diferit de bistraturi PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup> depuse pe: a) electrod de Au și b) Co-SPE. Viteza de scanare de 50  $\text{mV s}^{-1}$ . [186]

**Formele CV-urilor obținute (Figura 2.2) pentru cele două substraturi electrochimice sunt diferite.** Această diferență se datorează în primul rând proprietăților electrice diferite ale materialului de electrod și, în al doilea rând, prezenței/absenței mediatorului electrochimic.

#### 2.4.1.2 Senzori cu structura $\{\text{chit}^+(\text{NG}+\text{GOx})\}/\text{PSS}^-$

Monitorizarea CV-ului din figura 2.3 oferă o perspectivă atât asupra **adsorbției structurii LbL**, cât și asupra **modificării valorilor capacității electrice** la adăugarea fiecărei strat datorită adsorbției speciilor încărcate cu sarcină electrică.

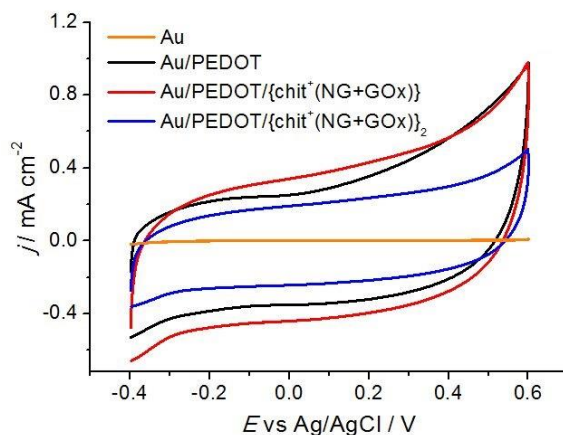
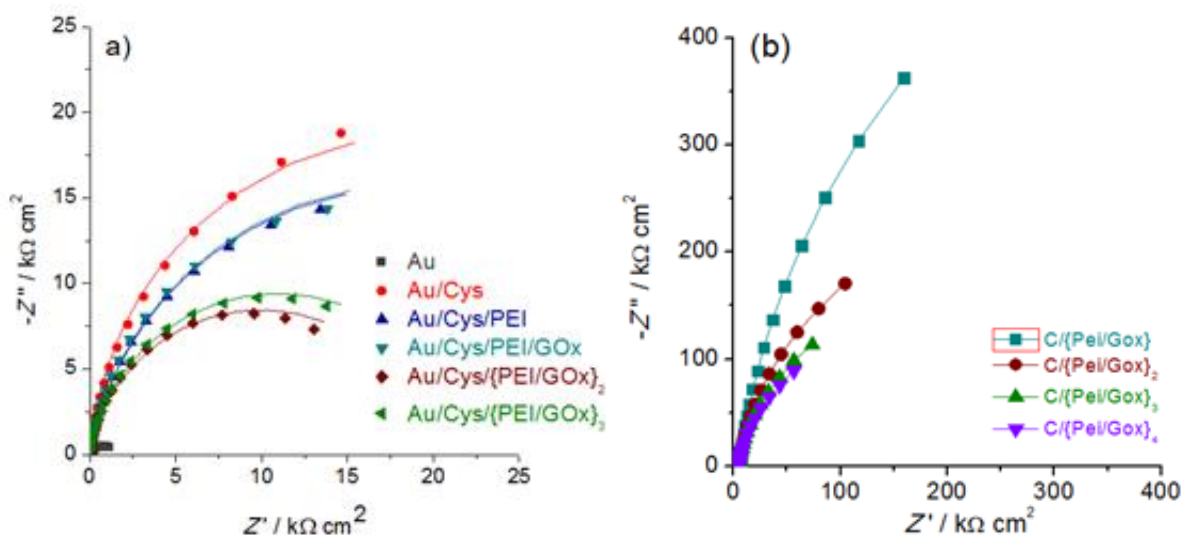


Fig. 2.3. CV pentru senzorii Au, Au/PEDOT, Au/ PEDOT/ $\{\text{chit}^+(\text{NG} + \text{GOx})\}_{n=1,2}$  în 0,1 M NaPB pH 7,0,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . [188]

#### 2.4.2. Spectroscopia de impedanță electrochimică

##### 2.4.2.1 Senzori cu structura $\text{PEI}^+/\text{GOX}^-$

**Proprietățile interfaciale ale senzorilor** au fost, de asemenea, investigate prin spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS). Spectrele de impedanță (prezentate în figura 2.4) au fost înregistrate în NaPB 0,1 M, pH 6,9 într-o celulă electrochimică convențională conținând cei trei electrozi în condițiile experimentale descrise în secțiunea Echipamente și Metode.





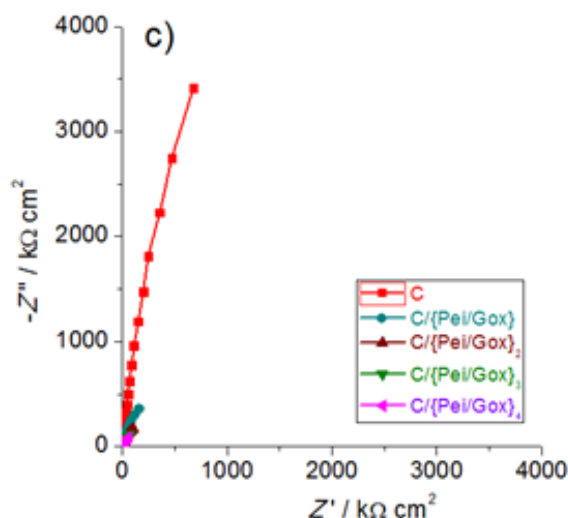
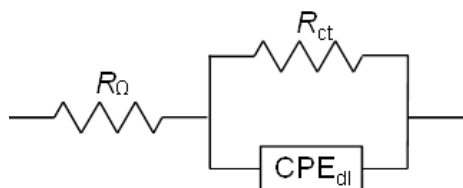


Fig. 2.4. Reprezentarea în plan complex a spectrelor de impedanță în 0,1 M NaPB pH 6,9 pentru un număr diferit de bistraturi {PEI/GOX} pe: a) electrod Au în comparație cu Au/{PEI/GOX}<sub>n</sub>, b) Co-SPE/{PEI/GOX}<sub>n</sub> și c) CoPC-SPE (roșu) în comparație cu Co-SPE/{PEI/GOX}<sub>n</sub>. [186]



Circuit echivalent utilizat pentru a se potrivește spectrelor, unde  $R_{\Omega}$  este rezistența electrolitului,  $R_{ct}$  este rezistența la transferul de sarcină și  $CPE_{dl}$  este elementul de fază constant

**Depunerea suplimentară** a bistratului  $PEI^+/GOX^-$  conduce la o **scădere continuă** a valorii  $R_{ct}$  (tabel 2.1), care arată o **îmbunătățire a transferului de electroni** prin filmul multistrat până la al treilea bistrat  $PEI^+/GOX^-$ . Se poate deduce că pentru electrodul de aur stratul Cys influențează comportamentul electrodului împreună cu numărul de bistraturi  $PEI^+/GOX^-$ . Depunerea suplimentară a altui bistrat în ambele cazuri va **crește atât grosimea, cât și  $R_{ct}$  și transferul de electroni va fi împiedicat**.

Se observă același comportament pentru **electrozi modificați CoPC**, unde o **reducere semnificativă a  $R_{ct}$**  apare la depunerea primului **bistrat  $PEI^+/GOX^-$** , urmată de o scădere mai mică pentru următoarele două bistraturi până la al patrulea, când nu se observă nici o îmbunătățire a transferului de electroni (tabel 2.2).

Atunci când prima bistrat  $PEI^+/GOX^-$  este depus pe suprafața CoPC-SPE, se produce o **scădere drastică și a capacității  $CPE_{dl}$** , dovedindu-se **adsorbția moleculelor** pe suprafața electrodului. Pe măsură ce cantitatea moleculelor  $PEI^+/GOX^-$  adsorbite crește, grosimea **structurii LbL depuse crește și capacitatea la interfața electrod-electrolit scade** cu acoperirea suprafeței.

Când **glucoza a fost adăugată** în soluția tampon  $R_{ct}$  **crește** odată cu creșterea concentrației de glucoză, fiind de asemenea **în concordanță cu rezultatele CV** (figura 2.11 A și B, secțiunea 2.6.1). Acest fapt sugerează că **procesele de transfer de sarcină controlează fenomenele de suprafață și promovează un transfer mai ușor al electronilor**.

Tabel 2.1. Valori ale componentelor circuitului electric echivalent (extrase prin fitarea spectrelor din figura 2.4a, potențial aplicat -0,2 V vs SCE, electrod Au)

Electrod	$R_{\Omega} / \Omega \text{ cm}^2$	$R_{ct} / \text{k}\Omega \text{ cm}^2$	$CPE_{dl} / \text{mF cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$	$\alpha$
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} <sub>2</sub>	428,2	25,5	71,9	0,86
Au/Cys/{PEI_GOx} <sub>3</sub>	427,3	21,8	71,2	0,87

Tabel 2.2: Valori ale componentelor circuitului electric echivalent (extrase prin fitarea spectrelor din figura 2.4b, potențial aplicat 0,0 V vs SCE, electrod Co-SPE)

Electrod	$R_{\Omega} / \Omega \text{ cm}^2$	$R_{ct} / \text{k}\Omega \text{ cm}^2$	$CPE_{dl} / \text{mF cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$	$\alpha$
CoPC-SPE	540	8600,0	16,8	0,93
CoPC-SPE /{PEI_GOx}	580	340,5	14,7	0,93
CoPC-SPE /{PEI_GOx} <sub>2</sub>	590	119,0	27,4	0,92
CoPC-SPE /{PEI_GOx} <sub>3</sub>	600	76,5	40,4	0,92
CoPC-SPE /{PEI_GOx} <sub>4</sub>	600	63,0	52,6	0,92

#### 2.4.2.2 Senzori cu structura {chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}/PSS<sup>-</sup>

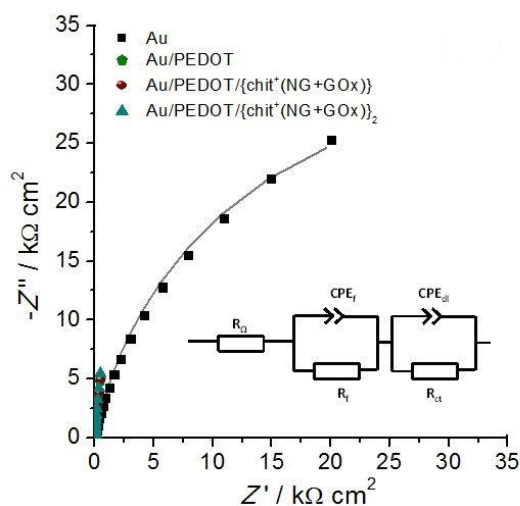


Fig. 2.5: Reprezentarea în plan complex a spectrelor de impedanță la -0,2 V vs SCE cu circuitul echivalent utilizat pentru a se potrivi spectrelor pentru Au, Au/PEDOT, Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG + GOx)}<sub>n = 1,2</sub> în pH 0,1 NaPB pH 7.0. [188]

Spectroscopia de impedanță electrochimică a fost utilizată pentru a identifica **modificările interfațiale după fiecare etapă a formării structurii LbL** {chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}/PSS<sup>-</sup> pe suprafața electrodului. Figura 2.5 prezintă reprezentarea în plană complex a spectrelor de impedanță obținute la un potențial de -0,2 V față de Ag/AgCl, inserția arătând circuitul echivalent utilizat folosit pentru fitarea spectrelor.

Tabel 2.3. Valori ale elementelor de circuit echivalent obținute prin fitarea spectrelor de impedanță din figura 2.4

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

Atât datele obținute cu EIS, cât și cu CV, indică o creștere a valorilor capacității la prima depunere a primului bistrat {chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}/PSS<sup>-</sup> și o ușoară scădere după depunerea celui de-al doilea, care începe să acționeze ca o barieră de difuzie.

## 2.5. Evaluarea optică (SPR) a interacțiunilor biomoleculare din structurile enzimatiche LbL

Măsurătorile SPR oferă o perspectivă asupra modului în care se realizează interacțiunea moleculelor încărcate cu sarcină electrică opusă și arhitectura structurii multistrat (LbL). Creșterea filmului LbL pentru imobilizarea GOX a fost monitorizată folosind două modalități experimentale SPR, scanare unghiulară (AS-SPR) și scanare la unghi fix (FA-SPR). Măsurători combinate electrochimie-SPR (EC-SPR) au fost, de asemenea, utilizate pentru caracterizarea electrodepunerii filmelor subțiri polimerice conductive de PEDOT. În măsurătorile EC-SPR, suprafața de aur a fost utilizată ca electrod de lucru într-un experiment electrochimic standard cu trei electrozi. Astfel, proprietățile electrochimice și optice sunt obținute simultan pe suprafețe și filme la scara nanometrică [195].

Senzori SPR cu film subțire de Au funcționalizați cu:

- 1) **MPS, MUA și Cys-GA**, prin **depunere statică**.
- 2) cu film de **polimer conductor PEDOT** prin **electrodepoziție**.

Funcționalizarea suprafețelor de aur a fost realizată conform descrierii din secțiunea Echipamente și Metode. **Senzorii** (discurile) **SPR** astfel obținuți au fost folosiți pentru **evaluarea interacțiunilor moleculare implicate în depunerea a doua structuri LbL**:

- 1) PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup> și
- 2) {chit<sup>+</sup>(GOx)}/PSS<sup>-</sup>.

### 2.5.1. Structura PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup>

Funcționalizarea suprafețelor de aur cu cele trei molecule prin adsorbție chimică pe suprafața

aurului prin legare Au-S a fost **evaluată calitativ prin scanare unghiulară (AS-SPR)**. Suprafața de aur modificată a fost spălată după fiecare etapă, pentru a îndepărta moleculele nelegate. Intensitatea luminii reflectate a fost înregistrată în funcție de unghiul de incidență al luminii pe suprafața sensorului și a fost determinat **unghiul incident la care are loc rezonanța** (valoarea intensității are un minim datorită faptului că o parte a energiei luminoase se va transforma într-o undă de suprafață plasmonică care se deplasează de-a lungul interfaței dintre stratul de aur și mediul său adiacent). Acest unghi de rezonanță este sensibil la orice modificare a indicelui de refracție al mediului de lângă aur. O creștere a unghiului de rezonanță în modul AS-SPR poate fi observată (Figura 2.6).

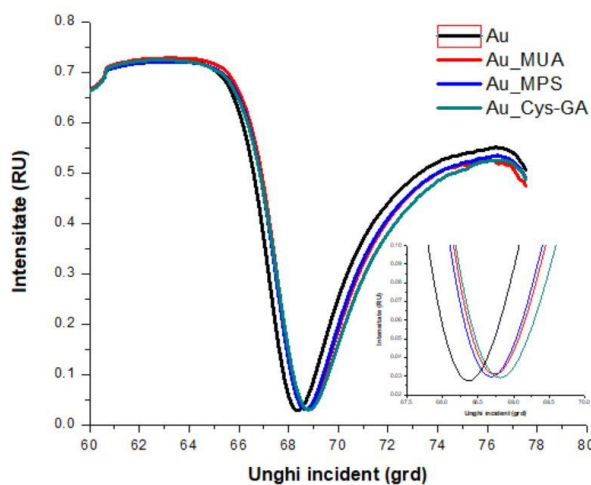


Fig. 2.6. Funcționalizarea suprafețelor de Au cu cele trei tipuri de molecule monitorizată prin AS-SPR. Inserția prezintă o mărire a curbelor în zona unghiului de rezonanță. [187]

În cazul monitorizării folosind **modul FA-SPR** unghiul de incidență s-a menținut fix și s-a înregistrat variația intensității luminii odată cu depunerea monostraturilor pe suprafața sensorului. Creșterea semnalului a avut loc odată cu introducerea în celulă a moleculelor în soluție la suprafața aurului. **Scăderea răspunsului se datorează moleculelor nelegate**, care au fost îndepărtate după faza de spălare (figura 2.7a). Astfel, **răspunsul stabilizat corespunde moleculelor legate care vor oferi o nouă platformă de depunere**.

Tabelul 2.4 prezintă procente diferite ale imobilizării GOX pe suprafețele de Au funcționalizate cu MPS, MUA și Cys-GA care evidențiază diferitele interacțiuni biomoleculare care au loc (figura 2.7b).

Tabel 2.4. Parametrii de interacțiune biomoleculară pentru diferiți senzori SPR funcționalizați

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<sup>+</sup>/GOX}** a fost monitorizată cu senzorii de Au funcționalizați cu Cys-GA utilizând și modul FA-SPR. Interacțiunile moleculare au apărut pe suprafața filmului subțire Au așa cum se arată în figura 2.8. Pentru fiecare etapă de imobilizare, răspunsul a fost calculat ca diferența dintre semnalul SPR după etapa de spălare și uscare înainte și după injectarea soluției de polielectrolit în celula Bionavis.

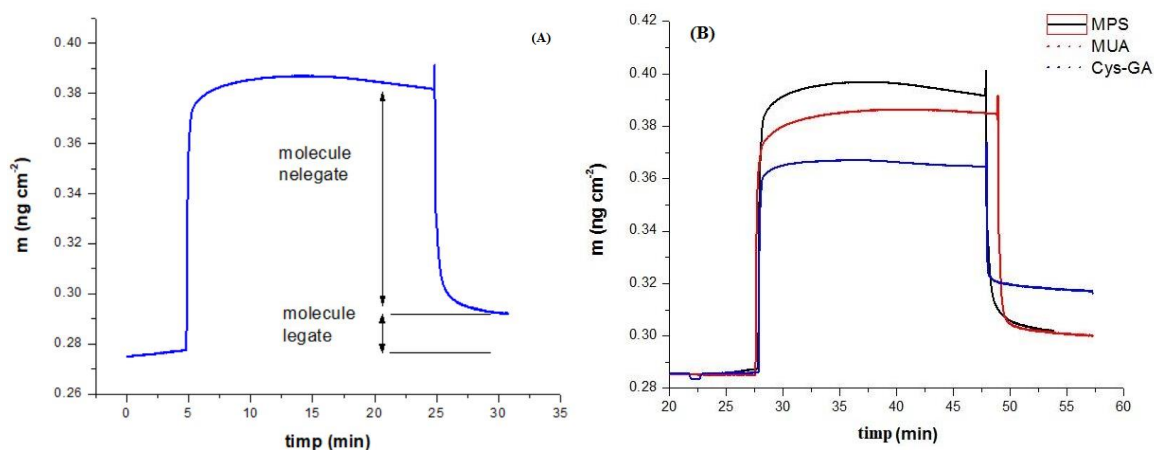


Fig. 2.7. Monitorizarea depunerii monostraturilor pe suprafața de Au folosind FA-SPR: (A) reprezentare generală, (B) reprezentarea depunerii GOX pe senzori funcționalizați cu trei tipuri de molecule. [187]

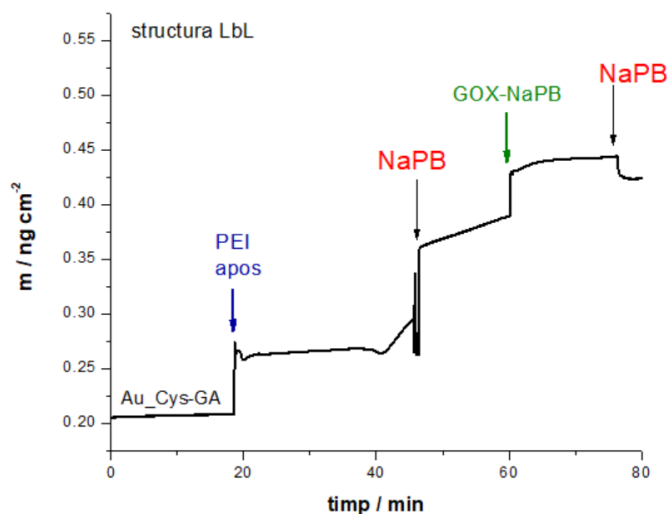


Fig. 2.8. Monitorizarea depunerii structurii LbL{PEI<sup>+</sup>/GOX} pe suprafața de Au funcționalizată cu Cys-GA folosind FA-SPR. Unghi de incidență 67,26 grd.

### 2.5.2. Structura {chit<sup>+</sup>(GOx)}/PSS<sup>-</sup>

Pentru analiza calitativă a depunerii filmului de PEDOT și a formării structurii LbL pe senzorul astfel modificat, a fost utilizat modul de scanare unghiulară a SPR (AS-SPR) (figura 2.9). În figura 2.9A curba (1) prezintă spectrul AS-SPR pentru senzorul cu film de aur în aer. Când soluția care conține EDOT a fost introdusă în celulă, indicele de refracție s-a modificat și a fost înregistrată curba (2). Depunerea filmului PEDOT poate fi observată în curba (3) atunci când atât intensitatea, cât și unghiul de rezonanță se modifică. Aceste modificări sunt importante

deoarece ele evidențiază proprietățile electrocromice ale filmului depus de PEDOT. Acest model de comportament rămâne și pentru curbele înregistrate pentru fiecare etapă de imobilizare a ansamblului LbL pe suprafața filmului subțire Au/PEDOT: curba (4) pentru primul strat de {chit<sup>+</sup>(GOx)}, (5) pentru primul strat PSS<sup>-</sup> și (6) pentru al doilea strat de {chit<sup>+</sup>(GOx)}.

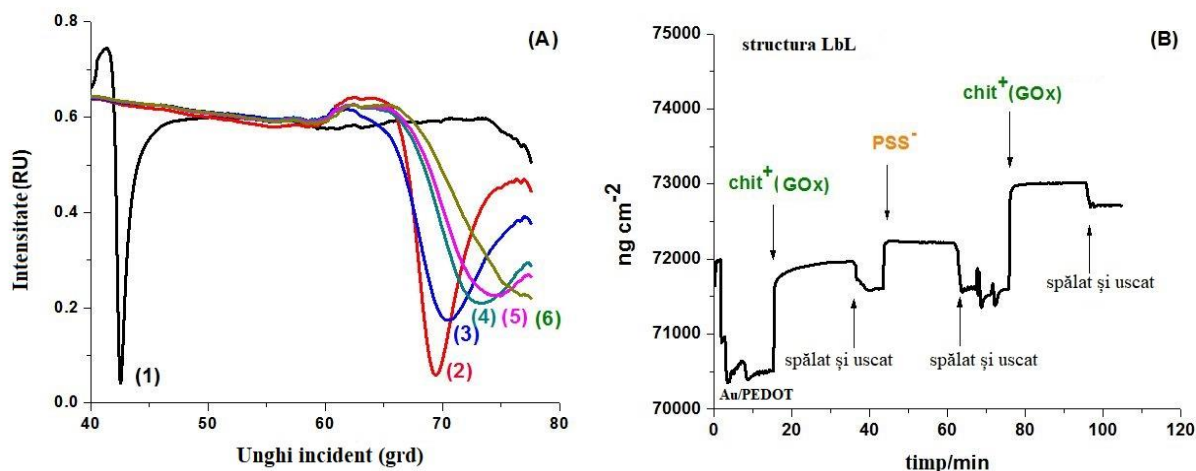


Fig. 2.9. (A) Depunerea filmului PEDOT pe suprafața Au monitorizată prin AS-SPR și (B) depunerea structurii LbL {chit<sup>+</sup>(GOx)}/PSS<sup>-</sup> pe Au/PEDOT prin FA-SPR (unghi de incidență 67.30 grd). [188]

Interacțiunile moleculare au apărut pe suprafața filmului subțire Au/PEDOT așa cum se arată în figura 2.9B. Pentru fiecare etapă de imobilizare, răspunsul a fost calculat ca diferența dintre semnalul SPR după etapa de spălare și uscare înainte și după injectarea soluției de polielectrolit în celula Bionavis. **Modificările semnalului SPR** pentru fiecare etapă de imobilizare au permis o **estimare brută a masei moleculare adsorbite** pe unitatea de suprafață corespunzătoare, (tabelul 2.5).

Tabel 2.5. Estimarea masei superficiale și a legării fiecărui monostrat în stare hidratată și uscată pe discul de Au modificat cu strat subțire PEDOT.

Strat	$m / \mu\text{g cm}^{-2}$ (hidratate)	$m / \mu\text{g cm}^{-2}$ (uscate)	Gradul de legare al moleculelor / % (uscate)
{chit <sup>+</sup> (GOx)} <sub>1</sub>	1,43±0,005	1,11±0,004	75,1
PSS <sup>-</sup>	0,50±0,010	0,01±0,005	1,61
{chit <sup>+</sup> (GOx)} <sub>2</sub>	1,14±0,004	1,11±0,002	79,1

## 2.6. Cuantificarea glucozei folosind senzori cu suprafață modificată

### 3.6.1. Senzori cu structura PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup>

**Amperometria** la potențial fix permite monitorizarea curenților electrici ce apar datorită reacției electrochimice la care participă analiții pe suprafața sensorului menținut la potențialul electric ales.

**Biosenzorul electrochimic de aur** cu structura enzimatică multistrat LBL,  $\text{PEI}^+/\text{GOX}^-$  a fost folosit pentru detecția glucozei,  $\text{Au}/\text{Cys}/\{\text{PEI}^+/\text{GOX}^-\}_n$ ,  $n=1,2,3$ .

Măsurătorile amperometrice au fost realizate la un potențial fix de **-0,2 V față de SCE**.

Pentru a determina sensibilitatea biosenzorului, a fost construită o curbă de etalonare la un potențial fix de -0,2 V față de SCE în 0,1 M NaPB pH 7,0 prin adăugarea concentrațiilor crescute de glucoză, așa cum se arată în Figura 2.9a. Deoarece nici un mediator nu este prezent în structura biosenzorului, sunt posibile două mecanisme enzimatiche:

1) Primul mecanism se bazează pe regenerarea directă a cofactorului enzimatic  $\text{FADH}_2$ , care implică oxidarea sa la suprafața electrodului,

2) Al doilea mecanism implică utilizarea  $\text{O}_2$  ca acceptor de electroni de la  $\text{FADH}_2$  pentru a forma  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Deoarece la potențialul de -0,2 V vs. SCE,  $\text{H}_2\text{O}_2$  este cel mai probabil să fie redus, iar curentul final înregistrat la suprafața electrodului este un curent de oxidare, primul mecanism enzimatic este dominant. O amperogramă tipică înregistrată cu biosenzorul  $\text{Au}/\text{Cys}/\{\text{PEI}^+/\text{GOX}^-\}_2$  este prezentată în figura 2.10a. În figura 2.10b este reprezentat graficul cu **curbele de etalonare** corespunzătoare biosenzorilor care conțin un număr diferit de bistraturi  $\text{PEI}^+/\text{GOX}^-$ . **Cea mai mare sensibilitate de  $282 \text{ nA cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$  a fost pentru biosenzorul cu 2 bistraturi LbL,  $\text{Au}/\text{Cys}/\{\text{PEI}^+/\text{GOX}^-\}_2$ .**

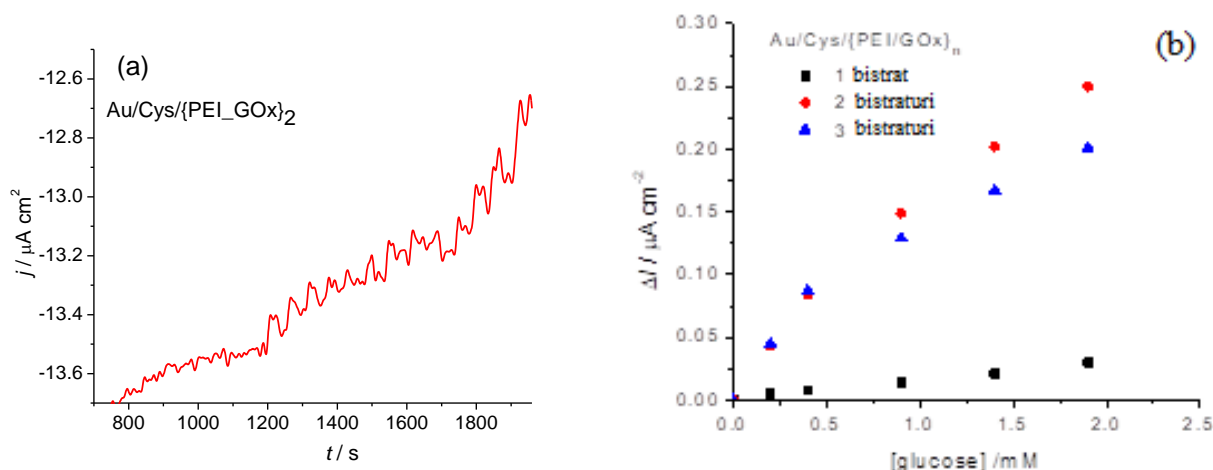


Fig. 2.10. a) Amperograma tipică înregistrată în 0,1 M NaPB pH 6,9 la -0,2 V față de SCE. cu biosenzorul  $\text{Au}/\text{Cys}/\{\text{PEI}^+/\text{GOX}^-\}_2$  și  
b) curbele de etalonare a biosenzorului  $\text{Au}/\text{Cys}/\{\text{PEI}^+/\text{GOX}^-\}_n$ ,  $n = 1, 2$  și 3. [186]

**Stabilitatea biosenzorului** a fost evaluată prin efectuarea unei calibrări de 5 puncte la fiecare două zile timp de 14 zile. Biosenzorul a fost ținut într-un frigider la 4 °C, imersat în soluție tampon între utilizări. **După 8 zile, răspunsul biosenzorului a fost de 50% din valoarea inițială**, scăzând drastic după aceea și s-a oprit din lucru după 12 zile. Stabilitatea slabă a biosenzorului LBL este unul dintre dezavantajele lor majore, datorită forțelor electrostatice slabe care acționează între straturile imobilizate.

Figura 2.11A demonstrează că **GOX imobilizat în structura LbL își păstrează activitatea catalitică**. Când se adaugă glucoză la soluția tampon, **vârful de reducere al CoPC scade odată cu creșterea concentrației de glucoză**. Scăderea curentului de reducere poate fi utilizată pentru a determina concentrația de glucoză și pentru a determina activitatea enzimatică a GOX.

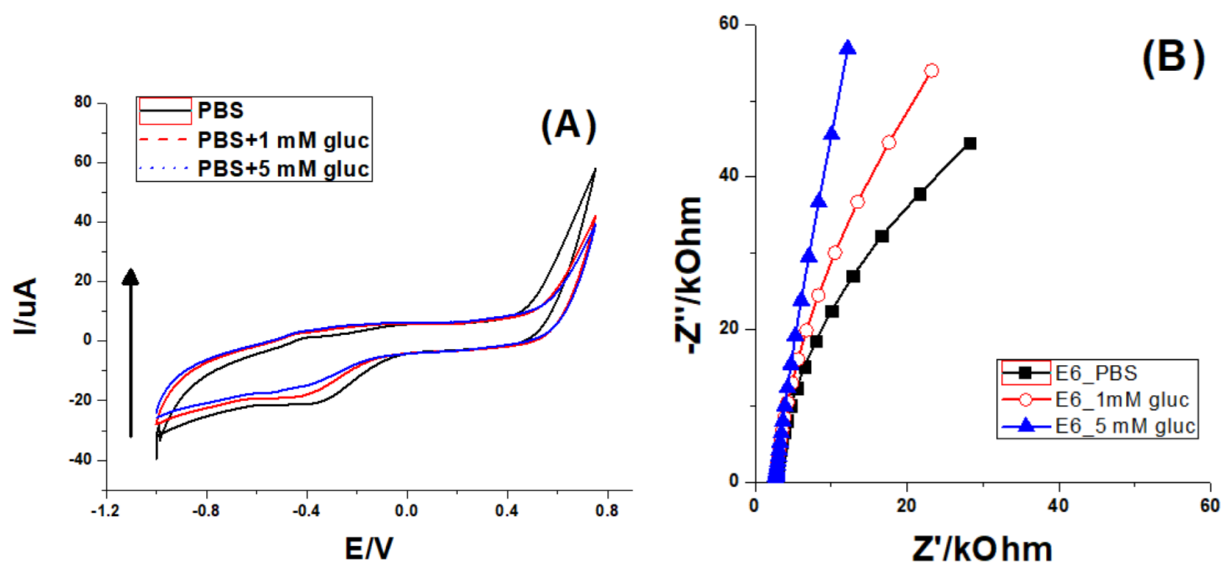


Fig. 2.11. Comportarea Co-SPE/{PEI/GOX}<sub>3</sub>: (A) Voltamograme ciclice. (B) Grafice cu spectrele în plan complex. Măsurători realizate în 0,1 M NaPB pH 6,9 și în soluții cu două concentrații de glucoză. [185]

### 3.6.2. Senzori cu structura {chit<sup>+</sup>(GOx)}/PSS<sup>-</sup>

O curbă de etalonare la un potențial fix de -0,2 V față de Ag /AgCl în 0,1 M NaPB pH 7,0 a fost construită prin adăugarea concentrațiilor crescute de glucoză, așa cum se arată în figura 2.10. O schimbare anodică a curentului catodic a fost înregistrată la fiecare injecție, indicând apariția reacțiilor de oxidare (figura 2.12A). Se observă o situație similară cu a biosenzorului Au/Cys/{PEI<sup>+</sup>/GOX}. Ținând cont de acest lucru și de cele două mecanisme enzimaticе posibile prezentate mai sus, care sunt posibile și pentru biosenzorul Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}, putem considera că și în acest caz primul mecanism enzimatic este dominant (figura 2.13).

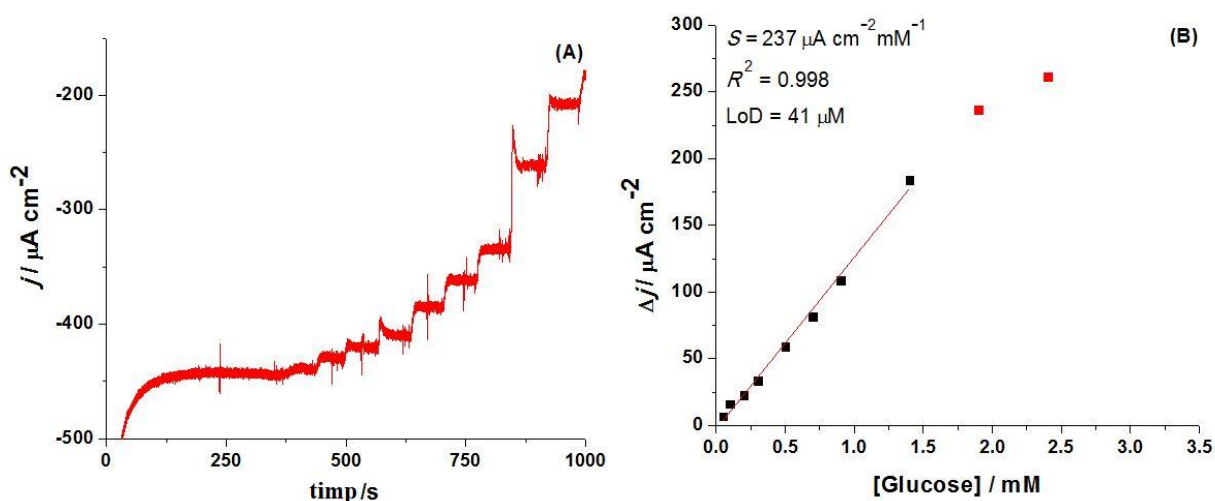


Fig. 2.12. (A) Cronoamperograma cu potențial fix pentru creșterea concentrațiilor de glucoză și (B) curba de etalonare corespunzătoare detecției glucozei la Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG + GOX)}<sub>2</sub>, în 0,1 M NaPB pH 7,0 la -0,2 V față de Ag AgCl. [188]



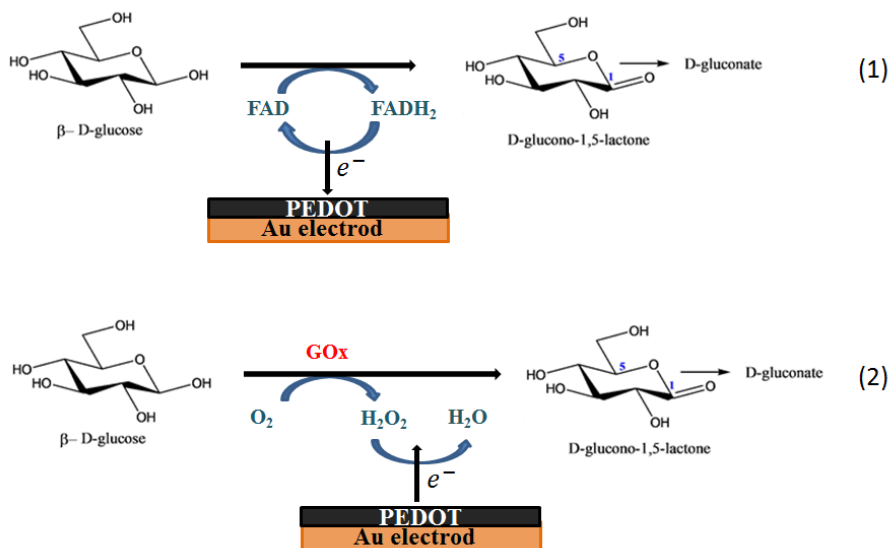


Fig. 2.13. Mecanismele de oxidare ale glucozei catalizate de GOX la suprafața senzorului Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOX)}<sub>n</sub>, în 0,1 M NaPB pH 7,0 la -0,2 V față de Ag AgCl. [188]

Această **modificare anodică** (pozitivă) a curentului catodic a **fost sporită de prezența NG și PEDOT-ului**. **Nanomaterialele prezintă sensibilitate ridicată** la potențial negativ, tendință observată și în literatură [197] și poate fi explicată prin **capacitatea lor de a regenera cofactorul enzimatic**. În **prezența polimerului PEDOT, regenerarea enzimei a fost cauzată de o reacție redox cu forma oxidată a polimerului** (figura 2.13). **Curbele de etalonare** au fost construite la un potențial în aceleași condiții experimentale pentru a evalua **efectul numărului de straturi** asupra performanțelor biosenzorului. Sensibilitățile obținute sunt prezentate în figura 2.14. O configurație a biosenzorului cu două straturi de chitosan, **Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOX)}<sub>2</sub>**, a fost considerată a fi optimă datorită sensibilității sale celei mai ridicate de **237 ± 3 μA cm<sup>-2</sup> mM<sup>-1</sup>**, o limită de detecție de **41 μM** și un răspuns a fost liniar pentru concentrații de glucoză cuprinse între 0,1 și 1,4 mM. Prezența **PEDOT a dus la o creștere a sensibilității** cu mai mult de un ordine de mărime, comparativ cu biosenzorii bazați pe structuri similare LbL dezvoltăți fără PEDOT [193].

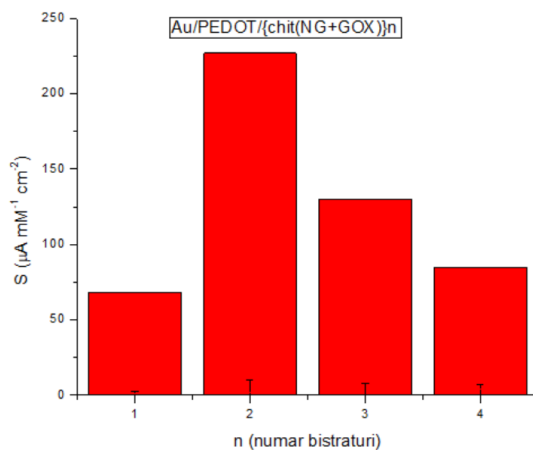


Fig. 2.14. Influența numărului de bistraturi n asupra sensibilității biosenzorului Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOX)}<sub>n</sub>.

## Studii de interferență

**Sensibilitatea biosenzorului** a fost, de asemenea, testată în **prezența interferențelor prezente în lichidele biologice**, înregistrând mai întâi răspunsul la glucoză, 0,3 mM, urmată de injectarea compușilor interferenți, fiecare cu o concentrație finală de 0,6 mM (raport 1:2): dopamină, ascorbat, catechol, acid uric, urmată de încă două injecții care corespund la 0,3 mM glucoză. În **prezența interferențelor** de mai sus, **biosenzorul a pierdut 34% din sensibilitatea sa**, ajungând la valoarea  $156 \pm 5 \text{ uA cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$  și o limită de detecție de 56  $\mu\text{M}$ . **Stabilitatea pe termen lung și stabilitatea la depozitare a biosenzorului** a fost determinată prin construirea unei curbe de etalonare la fiecare câteva zile pe parcursul unei luni. Reproducibilitatea biosenzorilor a fost determinată prin studierea activității a trei senzori construiți în condiții identice, obținându-se un **RSD de 6,7%**.

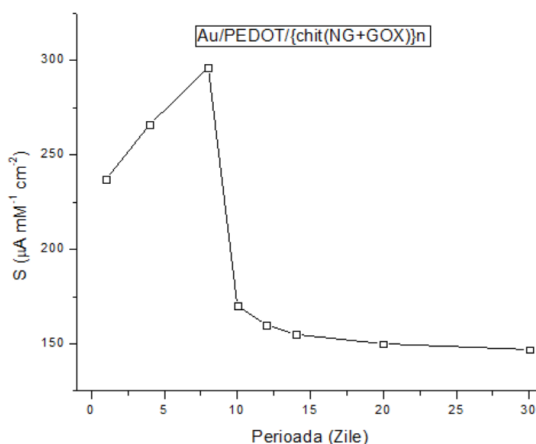


Fig. 2.15. Stabilitatea în timp a biosenzorului  $\text{Au/PEDOT}/\{\text{chit}^+(\text{NG}+\text{GOx})\}_2$

## 2.7. Cuantificarea glucozei în probe reale

Biosenzorii  $\text{Au/PEDOT}/\{\text{chit}^+(\text{NG}+\text{GOx})\}_2$  au fost testați pe vinuri preparate prin fermentarea strugurilor albi proaspeți din România (ca model biologic). **Metoda adausurilor standard** a fost utilizată pentru a determina concentrația de glucoză. Valorile calculate pentru glucoza din cele trei tipuri de vinuri sunt prezentate în tabelul 2.6.

Tabelul 2.6: Determinarea glucozei în vinuri ( $n = 3$ ) utilizând metoda adausurilor standard.

Metoda	$\text{Au/PEDOT}/\{\text{chit}^+(\text{NG}+\text{GOx})\}_2$	Metoda spectrofotometrică Böhringer	Recuperarea (%)
Glucoză /g l <sup>-1</sup>	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

## 2.8. Concluzii

Scopul capitolului a constat în **dezvoltarea unei metode noi de diagnostic molecular pentru identificare și cuantificare a glucozei ca biomarker al diabetului zaharat și aplicația ei pe probe reale**.



**Metoda nouă folosită: biosenzori electrochimici cu suprafață modificată cu structuri enzimatic multistrat auto-ansamblate prin metoda strat-pe-strat (*Layer-by-Layer*, LbL).**

Astfel, suprafețele senzorilor de aur au **fost funcționalizate** pentru a permite modificarea suprafeței senzorilor cu structuri enzimatic în structuri multistrat auto-ansamblate prin metoda strat-pe-strat (*Layer-by-Layer*, LbL) prin:

1. chemisorbția unor molecule pe suprafața senzorilor prin intermediul legăturilor Au-S;
2. depunerea electrochimică a unui film de **polimer conductor** poli(3,4-etilendioxitiofen), PEDOT.

**Senzorii** au fost sub forma unor **electrozi de aur** (bară și film subțire) și **electrozi imprimați cu film de carbon modificați cu ftalocianină de cobalt** (CoPC-SPE) cu rol de mediator electrochimic. Discuri cu film de aur (senzori SPR) au fost utilizate pentru a evalua interacțiunile implicate în imobilizarea biomoleculelor pe suprafețe prin **rezonanța plasmonilor de suprafață**.

Două structuri LbL enzimatic auto-ansamblate au fost depuse pe suprafețele de aur funcționalizate și CoPC-SPE: **PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup>** și **{chit<sup>+</sup>(GOx)}/PSS<sup>-</sup>**.

Cuantificarea amperometrică a glucozei a fost realizată în soluții standard și **parametrii curbelor de etalonare ale ambelor tipuri de biosenzori** cu suprafață modifică au fost obținuți (sensibilitate, domeniul de liniaritate, limită de detecție).

Biosenzorii în configurația cu două LbL au avut **cea mai mare sensibilitate: Au/Cys/{PEI<sup>+</sup>/GOX<sup>-</sup>}<sub>2</sub> și Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}/PSS<sup>-</sup>}<sub>2</sub>.**

**Sensibilitatea biosenzorului Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}/PSS<sup>-</sup>}<sub>2</sub> a fost cea mai mare, 237 ± 3 μA cm<sup>-2</sup> mM<sup>-1</sup>, cu o limită de detecție de 41 μM, și un interval de liniaritate 0,1 și 1,4 mM, comparabilă cu rezultatele găsite în literatură.**

Studii ale **interferențelor** au fost realizate asupra biosenzorului de glucoză. Metoda a permis o **obținerea unui semnal datorat glucozei în prezența interferențelor**, în timp ce semnalul datorat **acestora a fost nesemnificativ**. În prezența interferențelor a existat o ușoară scădere a sensibilității, **biosenzorul a pierdut 34% din sensibilitatea sa**, ajungând la valoarea 156 ± 5 uA cm<sup>-2</sup> mM<sup>-1</sup> și o limită de detecție de 56 μM.

**Stabilitatea biosenzorului Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(GOx)}/PSS<sup>-</sup>** a fost studiată în timp arătând ca **sensibilitatea sa a crescut la o valoare mai mare după 8 zile**, după care aceasta a început să **scadă și să se stabilizeze la 65% din valoare inițială**. **Reproductibilitatea biosenzorului** a fost determinată prin studierea activității a trei senzori construiți în condiții identice, obținându-se un **RSD de 6,7%**.

Biosenzorii **Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}/PSS<sup>-</sup>}<sub>2</sub> au fost testați pe probe reale pentru **cuantificarea glucozei**. Valorile obținute au fost **în acord** cu cele obținute prin metoda **spectrofotometrică standard** cu un grad bun recuperare (între 97 și 105%).**

**Se recomandă folosirea biosenzorilor electrochimici Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}/PSS<sup>-</sup>}<sub>2</sub> și dezvoltarea metodei pentru probele biologice** (salivă, ser, urină).

### 3. Evidențierea și cuantificarea experimentală a capacității antioxidante totale ca marker al stresului oxidativ

#### 3.1 Scopul și obiectivele cercetării

**Scopul** acestui capitol a constat în dezvoltarea unei metode noi de diagnostic molecular pentru evidențierea și cuantificarea capacității antioxidante totale ca marker al stresului oxidativ și aplicația ei pe probe reale.

**Metoda nouă folosită:** senzori electrochimici cu nanoparticule de aur cu rol de enzime artificiale (nanozime)

**Obiectivele** urmărite în cadrul acestui capitol au fost următoarele:

- caracterizarea și evaluarea senzorilor electrochimici cu nanozime de aur.
- caracterizarea și evaluarea capacității antioxidante probelor (soluțiilor cu compuși antioxidanți) folosind senzori electrochimici cu nanozime de aur.
- cuantificarea capacității antioxidante totale (relativă și absolută) și activității antioxidante totale a probelor folosind senzori electrochimici cu nanozime de aur.
- validarea metodei electrochimice comparativ cu metoda spectrofotometrică UV-Vis și chemiluminiscentă.

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

#### Revista BDI

[198] 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.

#### Revista ISI (FI = 3,031)

[199] 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)

[200] 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.

#### 3.2 Senzori cu suprafață modificată cu enzime artificiale (nanozime)

**Antioxidanții** reprezintă o clasă de compuși de interes real pentru rolul lor în reducerea efectelor adverse cauzate de speciile reactive ale azotului (RNS) sau oxigenului (ROS). Din categoria ROS face parte și peroxidul de hidrogen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fiind un produs secundar reactiv obținut în urma proceselor biochimice și care poate genera stres oxidativ ori leziuni celulare.

**Extracțele apoase din plante ce sunt folosite ca suplimente alimentare, în mod similar cu lichidele biologice**, au o capacitate antioxidantă totală (AC) care este datorată tuturor

**antioxidanţilor** constituenţi (vitamine, carotenoizi, polifenoli, etc.) care participă la **reacţii electrochimice de oxidare-reducere**. Extractele apoase din plante au reprezentat în acest capitol un **model biologic**, constituind o **matrice complexă, similară lichidelor biologice**.

**Metodele clasice folosite pentru determinarea AC** sunt costisitoare şi necesită mai multe operaţiuni, elimină cantităţi mari de eluenţi, nu sunt întotdeauna prietenoase cu mediul, sunt dependente de mai mulţi parametri şi necesită echipamente şi personal specializat. Astfel, pentru evaluarea şi cuantificarea AC (a extractelor din plante şi a lichidelor biologice) **sunt necesare dispozitive noi specifice**, cum sunt **senzorii, sensibile şi cu preţ mic**.

Utilizarea **senzorilor chimici şi a nanosenzorilor** ne permite să **depăşim problemele** legate de **imobilizarea enzimelor** şi de **stabilitatea pe termen lung**. **Nanoparticulele de aur (AuNP)** sunt utilizate pe scară largă deoarece au proprietăţi conductoare foarte bune [25]. Pe lângă o suprafaţă activă îmbunătăţită (raport mare dintre suprafaţă şi volum) şi o bună biocompatibilitate, AuNP au, de asemenea, proprietăţi optice şi facilitează transferul electronilor între molecule biologice electroactive şi senzor [26]. Recenzile recente arată că nanoparticulele împreună cu unii polimeri, compuşi porfirinici, complexe metalice, dendrimeri şi alţi compuşi pot **cataliza reacţii, în mod similar enzimelor**, introducând termenul "**nanozyme=nanozimă**" [205, 206]. S-a raportat că şi **nanoparticulele de aur (AuNP)** au un comportament similar enzimelor, **nanozime**, catalizând reacţii chimice de oxidare-reducere fapt ce le recomandă în dezvoltarea nanosenzorilor electrochimici.

**AuNP au fost utilizate în acest capitol ca nanozime** datorită activităţii catalitice asemănătoare cu cea a peroxidazelor naturale (de exemplu, peroxidaza de hrean).

Pentru **estimarea şi cuantificarea activităţii capacităţii antioxidante totale** absolute (TAC) şi relative (RAC) am folosit ca senzori **electrozii imprimaţi cu film de carbon modificaţi cu nanozime de aur (nanoparticule de aur) (AuNP-SPE)**.

**Senzorii cu nanozime de aur** au fost folosiţi pentru **detecţia amperometrică a  $H_2O_2$** . **Principiul de estimare şi cuantificare a TAC şi RAC** pentru extracte din plante s-a bazat pe **efectul de anihilare (captare/neutralizare) a  $H_2O_2$**  de antioxidanţii prezenţi în extractele cu capacitate antioxidantă. Astfel, scăderea semnalului electric sugerează o capacitate antioxidantă totală în creştere.

Mai întâi, **măsurătorile electrochimice (voltametria ciclică şi spectroscopia de impedanţă electrochimică)** au fost folosite pentru a **caracteriza senzorii modificaţi cu nanoparticule (carbonice şi de aur) şi extractele din plante apoase** obţinute prin diferite metode. **Cea mai bună performanţă** a fost înregistrată pentru senzorii pe bază de nanoparticule de aur, datorită **activităţii catalitice a nanoparticulelor de aur similară enzimelor (nanozime de aur)**.

**Voltametria şi amperometria** au fost folosite pentru a evidenţia **capacitatea totală antioxidantă** a fiecărui extract utilizând senzorul electrochimic cu nanozime de aur, iar rezultatele au fost comparate cu cele obţinute prin metodele clasice (spectroscopia de absorbţie în UV-Vis şi chemiluminescenţa)

### 3.3 Materiale şi echipamente

#### 3.3.1 Materiale

Toţi reactivii au fost de puritate analitică.  $H_2O_2$  (30%) a fost achiziţionat de la Merck. Acidul ascorbic şi Trolox (acid 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic) 97%, au fost achiziţionaţi de la Sigma-Aldrich, Germania. Glicerina, propilenglicolul şi etanolul au fost obţinute de la S.C. Chemical Company, România. Acidul boric şi hexahidratul de cobalt (II) au fost de la Reactivul, România. Sarea disodică a acidului etilendiaminotetraacetic ( $Na_2EDTA$ ) de

la Loba Chemie; 5-amino-2,3-dihidronaftalazin-1,4-dionă (luminol) de la Fluka BioChemie, Slovacia și monohidratul de acid gallic a fost achiziționat de la Riedel-de Haen. Măsurătorile electrochimice și spectrometrice s-au efectuat în tampon fosfat de sodiu pH 7,0 (NaPB, 0,1 M). Apa nanopură Millipore Milli-Q (rezistivitate  $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) a fost utilizată pentru prepararea tuturor soluțiilor. Toate experimentele au fost efectuate la temperatura camerei ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) și nu au fost necesare condiții speciale pentru păstrarea SPE între măsurători. Extractele din plante au fost obținute din fructe de cătină românești, flori de lavandă. Apă cu două valori diferite ale pH-ului a fost folosită și a fost obținută cu un aparat de apă Leveluk Kangen: apă "a" (pH = 2,5) și apă "b" (pH = 9,5). Étanolul, glicerina și propilenglicolul au fost de calitate farmaceutică.

### 3.3.2. 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).**

Tabelul 3.1. Solvenți și metodele de extracție folosiți penru obținerea extractelor din plante .

Solvent (1:1)	Extract fructe cătină	Extract flori lavandă
apă „a” : etanol (A)	1.Hf Aa T/ US	1.Lf Aa T/ US
apă „b” : etanol (A)	2.Hf Ab T/ US	2.Lf Ab T/ US
apă „a” : glicerină (G)	3.Hf Ga T/ US	3.Lf Ga T/ US
apă „b” : glicerină (G)	4.Hf Gb T/ US	4.Lf Gb T/ US
apă „a” : propilenglicol (Pg)	5.Hf Pga T/ US	5.Lf Pga T/ US
apă „b” : propilenglicol (Pg)	6.Hf Pgb T/ US	6.Lf Pgb T/ US

\*planta: Hf – cătină, Lf – lavandă;

\*solvenți: A – etanol, G - glicerină, Pg – propilenglicol,

\*apă: a (pH 2,5); b (pH 9,5);

\* metode de extracție: US - extracția asistată cu ultrasunete, T - extracție cu solvent la 6,7 bar

### 3.3.3. Echipamente și metode

Toate măsurătorile electrochimice au fost efectuate într-o celulă electrochimică convențională care conține trei electrozi (Fig. 1.1A). **Senzorii** au fost sub forma unor **electrozi imprimați cu film de carbon modificați cu nanoparticule (NP-SPE)** (Fig. 1.1D). Diametrul suprafeței electrodului de lucru SPE a fost de 4 mm, electrodul auxiliar fiind de Ag și pseudo-referința Ag/AgCl. NP-SPE au fost utilizați cum au fost primiți. S-au efectuat măsurători voltametrice, de impedanță și amperometrice utilizând o interfață electrochimică PalmSens3 (Palm Instruments BV, Olanda) controlată cu software PSTrace 5.5. Voltametriile în puls diferențial (DPV) s-au efectuat prin baleierea potențialului de lucru al senzorului de la 0,0 la 1,0 V cu o viteză de scanare de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  și un puls aplicat cu o amplitudine de 50 mV, un timp de acțiune al pulsului 0,1 s cu o treaptă de potențial de 2 mV. Pentru măsurătorile de impedanță, a fost aplicată o perturbare rms de 10 mV în intervalul de frecvențe de 50 kHz - 0,05 Hz, cu 10 frecvențe pe decadă de frecvențe. Spectrele obținute au fost înregistrate la un potențial de 0,1 V față de Ag/AgCl și au fost reprezentate grafic sub formă de diagrame plane complexe (diagrame Nyquist și Bode). Folosind principiile spectroscopiei electrochimice și utilizând software-ul PSTrace 5.5 cu modulul FRA, s-a dedus circuitul echivalent electric care corespunde cel mai bine datelor experimentale cu parametrii electrici corespunzători.

Măsurătorile de absorbție spectrofotometrică UV-Vis au fost înregistrate utilizând un spectrometru FLAME-S, Ocean Optics, preconfigurat pentru 200-1050 nm. Sursa de lumină halogen tungsten deuteriu echilibrată DH-2000-BAL cu iluminare pentru lungimi de undă cuprinse în intervalul 230-2500 nm. Datele au fost vizualizate și analizate prin software-ul Ocean View 1.6.3. Drumul optic pentru spectrele de absorbție a fost de 1 cm.

Toate măsurătorile de chemiluminescență (CL) au fost efectuate cu ajutorul unui luminometru Turner Biosystems 20/20<sup>n</sup> cuplat la un calculator, astfel încât software-ul "SIS pentru 2020h" a înregistrat intensitatea luminii în unități relative de luminescență (RLU) în funcție de timp (secunde). Soluția de lucru pentru determinările CL ( $10^{-3}$  M Na<sub>2</sub>EDTA,  $0,8 \times 10^{-3}$  M CoCl<sub>2</sub>,  $1,1 \times 10^{-4}$  M luminol), 350  $\mu$ L de 0,1 M, soluție tampon de borat de pH = 9,0 și 350  $\mu$ L soluție de  $3 \times 10^{-4}$  M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.4 Comportamentul electrochimic al senzorilor cu nanoparticule, NP-SPE

#### 3.4.1. Voltametrie ciclică și în puls diferențial

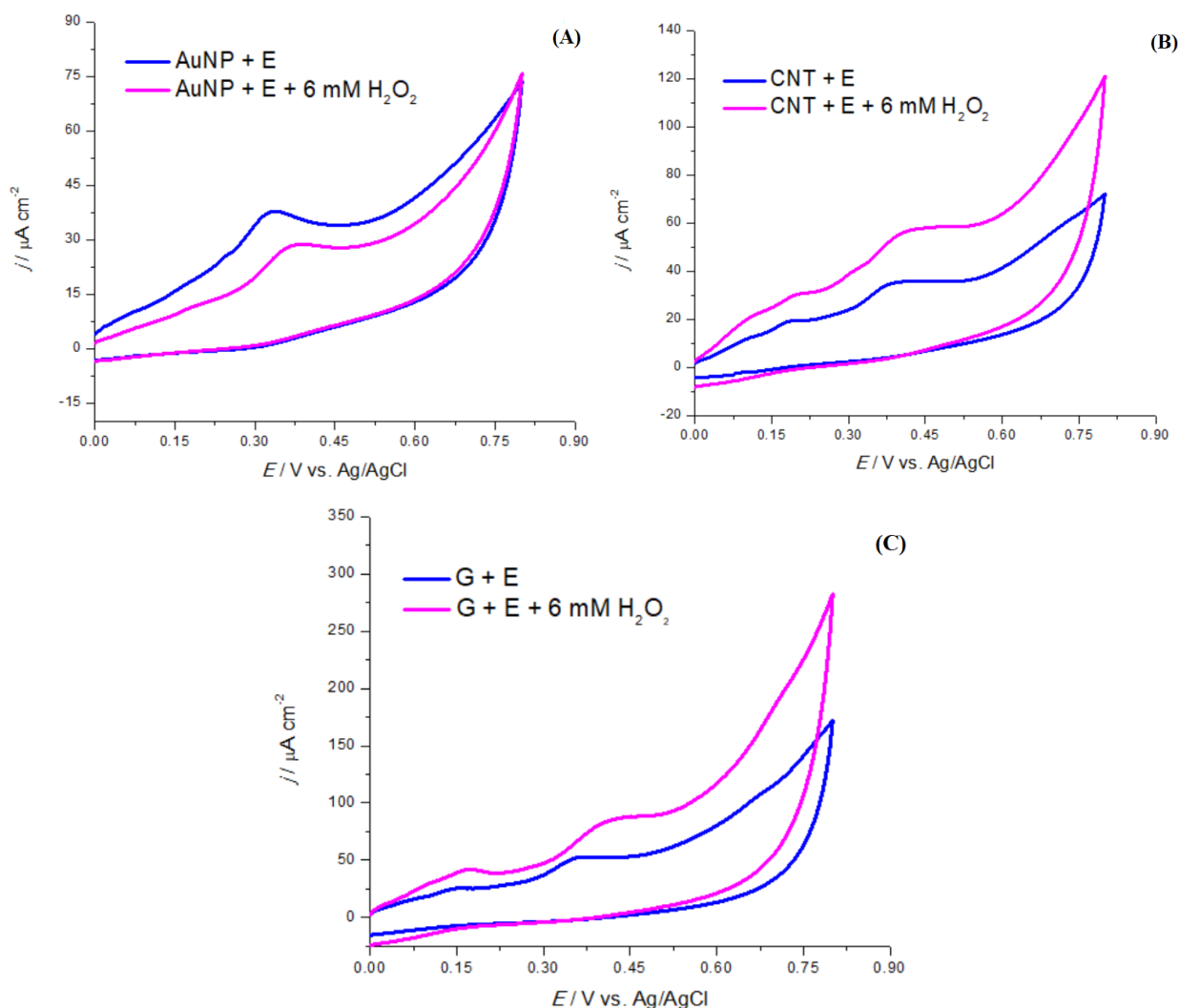


Fig. 3.1. CV în 0,1 M NaPB, pH 7,0, în prezența extractului (E), cu adăugare de 6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$  pentru: (A) AuNP, (B) CNT și (C) G.

**Măsurători electrochimice** prin voltammetrie ciclică (CV) și amperometrie au fost efectuate folosind **senzori cu film de carbon (SPE) modificați cu trei tipuri de nanoparticule (NP)**. AuNPs (nanoparticule de aur) s-au dovedit a fi cele mai adecvate pentru evidențierea și cuantificarea capacității antioxidante totale, după cum se arată mai jos.

Utilizând CV, au fost monitorizați trei parametri ai **comportamentului reducător al antioxidanților (AOx)**: *curentul anodic de vârf* ( $I_a$ ) cu *potențialul de oxidare* ( $E_{pa}$ ) și *zona anodică a CV* [210]. În acest capitol  $H_2O_2$  este folosit ca ROS; **anihilarea sa (prin captare) de către AOx** prezenți în extractele analizate este monitorizată folosind **senzori SPE cu nanoparticule**. Mai întâi, răspunsul senzorilor în prezența unui extract (E) diluat în 0,1 M NaPB pH = 7,0 (E: electrolit tampon) a fost monitorizat prin CV, rata de scanare  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . În etapa următoare s-a monitorizat **reducerea capacității antioxidante totale (reducătoare)** a extractului (E) în prezența a 6 mM  $H_2O_2$ , o **scădere a răspunsului senzorului** fiind așteptată. În prezența unui extract E, **voltamogramele ciclice prezintă vârfuri anodice la potențial redus** (sub 0,45 V) și se știe că acestea apar pentru **compușii cu activitate antioxidantă semnificativă** [211]. O comparație între SPE modificați cu nanoparticule și SPE nemodificați a fost făcută, de asemenea, prin înregistrarea CV-urilor în aceleași condiții (Figura 3.2).

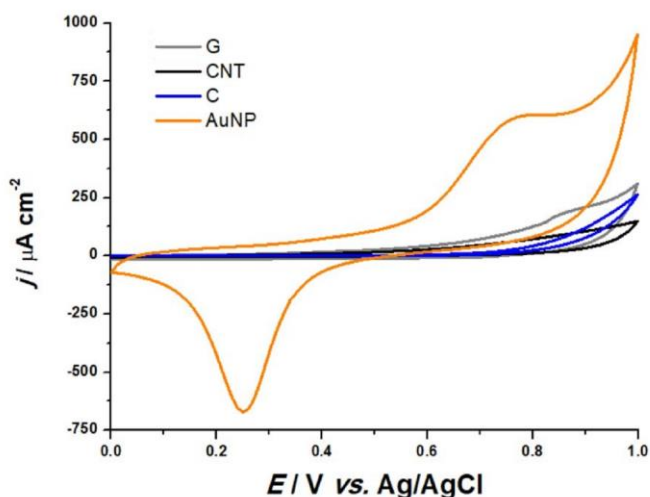


Figura 3.2. CV în 0.1 M NaPB, pH 7,0, în prezența a 6 mM  $H_2O_2$ ,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  pentru SPE nemodificat (C) și SPE modificat cu nanoparticule AuNP, CNT și G. [199]

Aceste CV-uri comparative oferă o perspectivă asupra modificărilor valorilor capacității electrice ale senzorilor pentru fiecare tip de nanoparticule. Valorile capacității au fost calculate în regiunea non-faradaică (fără vârfuri redox), la un potențialul de 0,55 V (Tabel 3.2).

Tabelul 3.2. Valorile capacității calculate pentru toate tipurile de senzori din CV-urile din figura 3.2.

Senzor (SPE)	C / $\text{mF cm}^{-2}$
C	0,06
G	0,89
CNT	0,46
AuNP	2,67



### Studiu de pH

Un studiu de pH a fost realizat, de asemenea, folosind CV și DPV, pentru a determina cel mai performant tip de nanoparticule pentru detectarea  $H_2O_2$  în prezența E. Rezultatele obținute prin CV sunt prezentate în Figura 3.3.

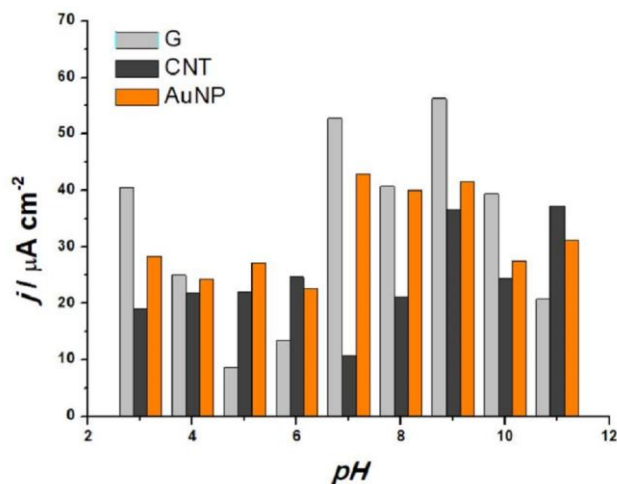


Fig. 3.3. Studiul pH-ului pentru toți senzorii cu NP (date din CV în 0,1 M NaPB cu E și 6 mM  $H_2O_2$ ),  $v = 50 mV s^{-1}$ . [199]

Figura 3.4 ilustrează voltametriile în puls diferențial (DPV-urile) realizate cu AuNP-SPE în 1,5 mM  $H_2O_2$ , pentru o variație a pH-ului între 5,5 și 8,5 a 0,1 M NaPB. Valoarea cea mai mare a curentului de vârf (cea mai mare viteză de transfer de electroni) a fost observată pentru **pH 7,0**, care a fost utilizat pentru toate măsurătorile ulterioare, fapt confirmat de rezultatele cu CV de mai sus.

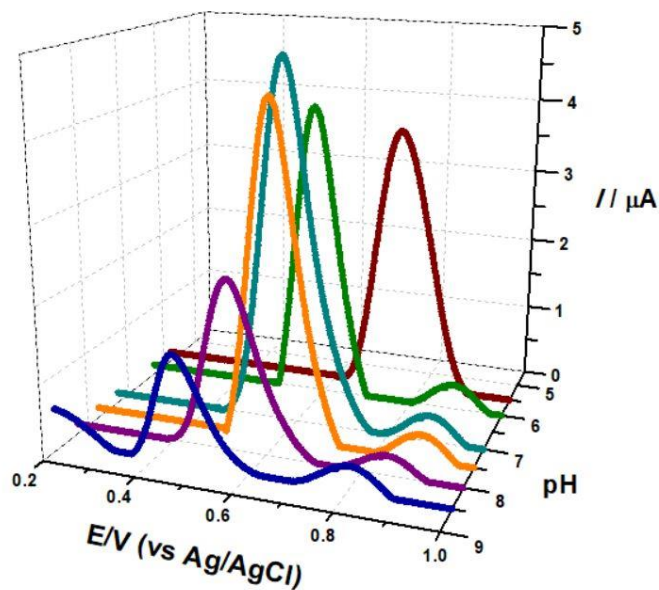


Fig. 3.4. DPV de pentru senzorul modificat cu AuNP în NaPB 0,1 M, interval de pH variind între 5,0 și 8,5 în prezența a 1,5 mM  $H_2O_2$ . [200]

### Studiul influenţei nanoparticule

**Influenţa adusă de fiecare tip de NP** la performanţele senzorilor a fost studiată şi prin amperometrie la potenţial fix, 0,55 V (Figura 3.5.). Deşi curenţii mai mari au fost înregistraţi în cazul grafenei, senzorul cu AuNPs are un comportament mai stabil, în timp ce cel cu CNT-uri prezintă cele mai slabe performanţe.

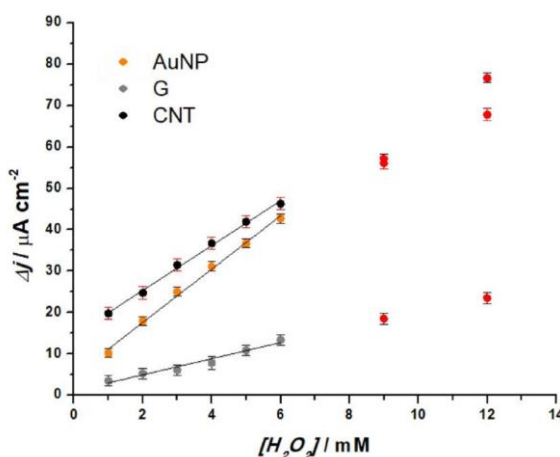


Fig. 3.5 Curbele de etalonare ale senzorilor cu NP înregistrate la 0,55 V faţă Ag/AgCl în 0,1 M NaPB ce conţine acelaşi E, pH = 7,0. [199]

Datorită dimensiunilor mici şi a suprafeţei electroactive mari, AuNP oferă oportunităţi unice de încorporare în substraturi miniaturizate pentru aplicaţii portabile la faţa locului. Conform rezultatelor de mai sus, **senzorul modificat cu AuNP (AuNP-SPE) pentru detecţia  $H_2O_2$** , care a prezentat cel mai bun comportament în prezenţa extractelor din plante, cu caracter antioxidant, **a fost folosit** pentru toate măsurătorile următoare. **AuNP** permit **estimarea şi cuantificarea indirectă a capacităţii antioxidante totale** a diferitelor extracte din plante, pe baza activităţii lor catalitice enzimatic (nanozime). Astfel, **senzorii pe bază de nanozime de aur** pentru detectarea  $H_2O_2$  ne permit să determinăm **TAC şi RAC pe bază anihilării  $H_2O_2$  cu ajutorul AOX** prezenţi în extractele din plante studiate.

### Studiu de diluţie a extratelor

Diluţia optimă a E a fost testată folosind măsurători amperometrice înregistrate cu AuNP-SPE la 0,55 V faţă de Ag/AgCl în 0,1 M NaPB (pH 7,0) şi trei diluţii ale E utilizând raportul (E:tampon) după cum urmează: (1:20), (1:40) şi (1:60). Curbele de etalonare corespunzătoare au fost reprezentate în figura 3.4, pentru diferite concentraţii crescătoare de  $H_2O_2$ , iar datele prelucrate sunt în Tabelul 3.3.

Tabelul 3.3. Parametrii de performanţă pentru cele trei diluţii diferite de (E: tampon)

Extract	S ( $\mu A mM^{-1} cm^{-2}$ )	$R^2$	LoD (mM)
1:20	8.66	0.998	0.60
1:40	11.37	0.995	0.75
1:60	17.46	0.991	1.76

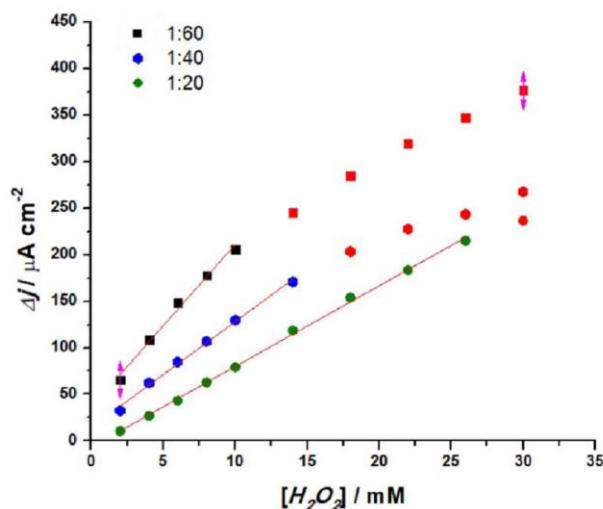


Fig. 3.4. Curbele de calibrare pentru senzor cu AuNP înregistrate la 0,55 V față de Ag/AgCl în 0,1 M NaPB cu același extract pentru diferite diluții, pH = 7,0. [199]

### Procesul de electrod – evidențierea rolului de nanozimă a AuNP

Senzorul pe bază de AuNP a fost caracterizat în continuare prin intermediul **mecanismului electrochimic al lui AuNP**, evidențiind raportul dintre viteza de scanare și curentul de vârf în timpul măsurătorilor CV în **0,1 M NaPB (pH 7,0)**, iar rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 3.5.

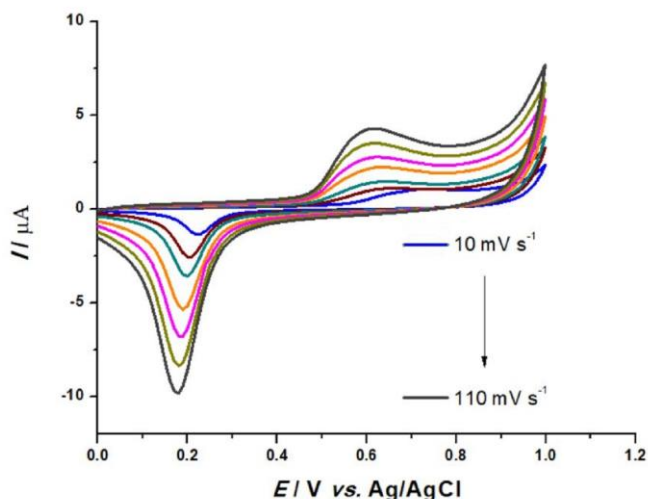


Fig. 3.5. Voltamograme ciclice în NaPB 0,1 M, pH = 7,0 pentru senzorul cu AuNP pentru diferite viteze de scanare: 10, 20, 30, 50, 70, 90 și 110  $\text{mV s}^{-1}$ . [199]

S-a dovedit că **AuNP-urile acționează ca un catalizator (nanozimă)**. Se observă reacția **reacția redox a AuNP**, cu vârfurile corespunzătoare oxidării și reducerii Au. Dependența liniară ale valorilor curentului de vârf anodic ( $I_{pa}$ ) și curentului de vârf catodic ( $I_{pc}$ ) în funcție de

radicalul vitezei de scanare a potențialului este prezentată în Figura 3.6. Luând în considerare ecuațiile de regresie liniară (3.1) și (3.2), influența vitezei de scanare explică (conform **ecuației Randles–Sevcik**, 3.3) **procesul de electrod** poate fi explicat în termenii unei **reacții controlată prin difuzie (transport de masă)**.

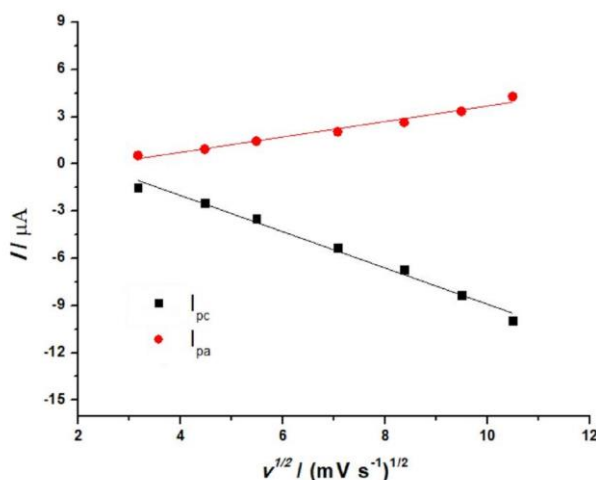


Fig. 3.6. Dependenta liniară a curentilor de vârf  $I_{pa}$  și  $I_{pc}$  (Fig. 3.5), față de rădăcina pătrată a vitezei de scanare. [199]

$$I_{pa} (\mu A) = 0.48 v^{1/2} + 1.21 (mV s^{-1})^{1/2}, R^2 = 0.969 \quad (3.1)$$

$$I_{pc} (\mu A) = -1.15 v^{1/2} - 2.59 (mV s^{-1})^{1/2}, R^2 = 0.987 \quad (3.2)$$

$$I_p = 0,4463 nFAC \left( \frac{nFvD}{RT} \right)^{1/2} \quad (3.3)$$

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  $cm^2 s^{-1}$ ,  $C$  = concentrația în  $mol cm^{-3}$ ,  $v$  = viteza de scanare în  $mVs^{-1}$ ,  $R$  = constanta gazului în  $J K^{-1} mol^{-1}$ ,  $T$  = temperatura în  $K$

Pentru caracterizarea și mai bună a **procesului de electrod (reacția redox a AuNP)**, a fost studiată relația dintre viteza de scanare și curentul de vârf în timpul CV-urilor, în prezența  **$H_2O_2$  și a unui compus antioxidant standard**, așa cum se arată în figurile 3.7 și 3.8. Ca **antioxidant standard**, a fost folosit analogul solubil în apă al vitaminei E, **Trolox**, care a fost folosit în mod obișnuit în testele clasice pentru determinarea capacității antioxidante totale [33,34].

Astfel, putem concluziona că cele **două vârfuri** din CV-uri caracterizează reacțiile **de oxidare-reducere ale AuNP**: formele de **oxid de aur se formează la 0,6 V și se reduc la 0,2V**.

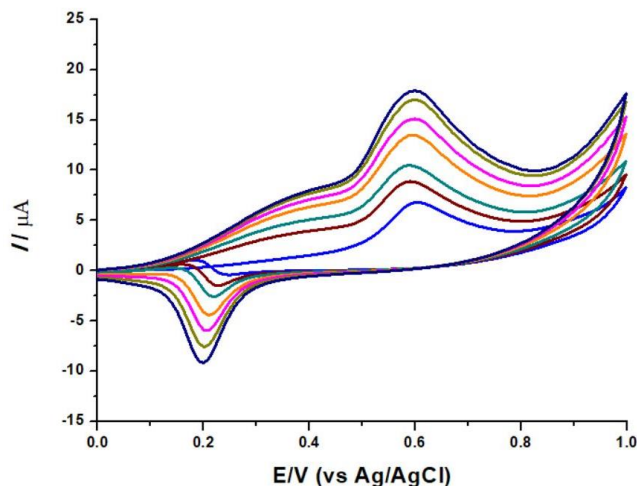


Fig. 3.7. CV-uri în 0,1 M NaPB, pH 7,0, conținând 1,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la viteze diferite de scanare 10, 20, 30, 50, 70, 90 și 110 mV s<sup>-1</sup>. [200]

Relația liniară dintre curentul de vârf anodic ( $I_{pa}$ ) și curentul de vârf catodic ( $I_{pc}$ ) ca funcție de viteza de scanare poate fi văzută în figura 3.9 (albastru), cu ecuațiile de regresie liniară corespunzătoare de mai jos:

$$I_{pa}(\mu A) = 1,59 v^{1/2} + 1,73 (mV s^{-1})^{1/2}; R^2 = 0,997 \quad (3.4)$$

$$I_{pc}(\mu A) = -1,19 v^{1/2} + 3,77 (mV s^{-1})^{1/2}; R^2 = 0,993 \quad (3.5)$$

În al doilea rând, studiul vitezei de scanare pentru **60 μM Trolox** a fost realizat (figura 3.8). S-a observat un *comportament similar* ca în cazul studiului vitezei de scanare pentru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cu un vârf de oxidare la 0,65 V și un vârf de reducere la 0,2 V.

Relația liniară dintre curentul de vârf anodic ( $I_{pa}$ ) și curentul de vârf catodic ( $I_{pc}$ ) ca funcție de viteza de scanare poate fi văzut în figura 3.8 (verde), cu ecuațiile de regresie liniară corespunzătoare de mai jos:

$$I_{pa}(\mu A) = 0,54 v^{1/2} + 0,96 (mV s^{-1})^{1/2}; R^2 = 0,982 \quad (3.6)$$

$$I_{pc}(\mu A) = -1,09 v^{1/2} + 1,99 (mV s^{-1})^{1/2}; R^2 = 0,994 \quad (3.7)$$

Având în vedere liniaritatea bună atât pentru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cât și pentru Trolox, influența vitezei de scanare indică că **procesul de electrod** poate fi explicat șă în acest caz în termenii unei **o reacții redox a AuNP controlată prin difuzie**.

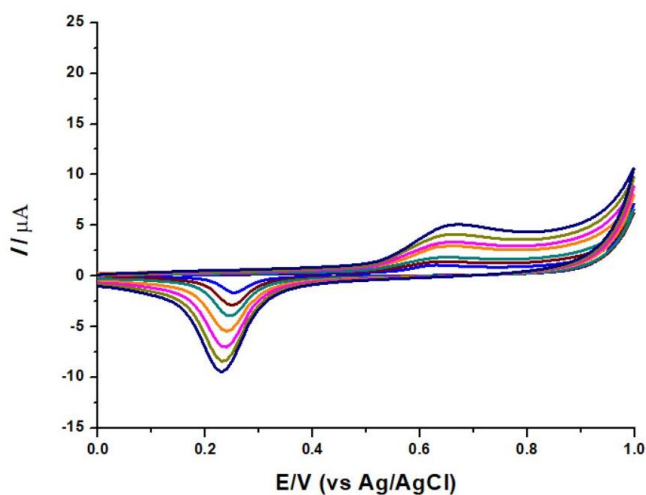


Fig. 3.8. CV în 0,1 M NaPB, pH 7,0, conţinând. 60 pM Trolox , la diferite viteze de scanare: 10, 20, 30, 50, 70, 90 şi 110  $\text{mV s}^{-1}$ . [200]

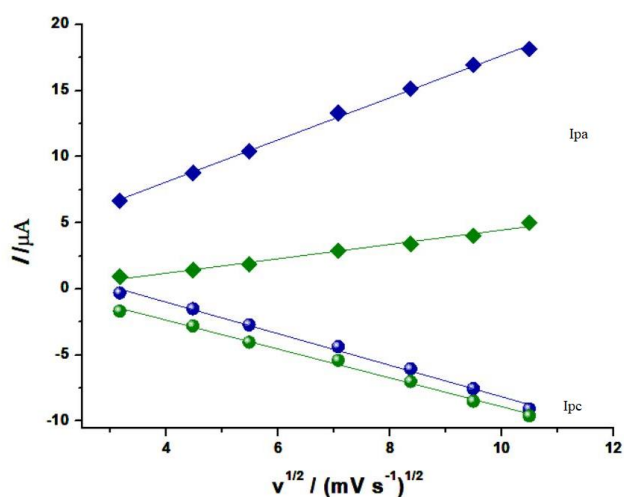


Fig. 3.9. Variaţia curenţilor de vârf ( $I_{pa}$  şi  $I_{pc}$ ) (Fig. 3.8) faţă de rădăcina pătrată a vitezei de scanare pentru  $\text{H}_2\text{O}_2$  şi Trolox. [200]

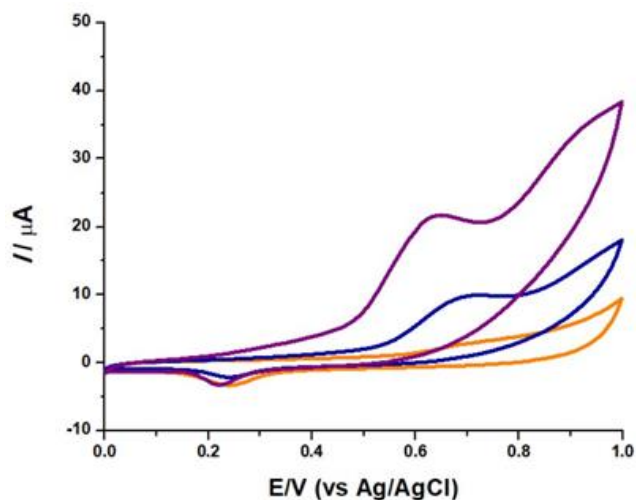


Fig. 3.10. CV-uri în NaPB 0,1 M, pH 7,0,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  pentru senzorul SPE de carbon modificat cu AuNP în **absența** (portocaliu) și **prezența** de 1,5 mM (albastru) și 3 mM (mov)  $\text{H}_2\text{O}_2$ . [200]

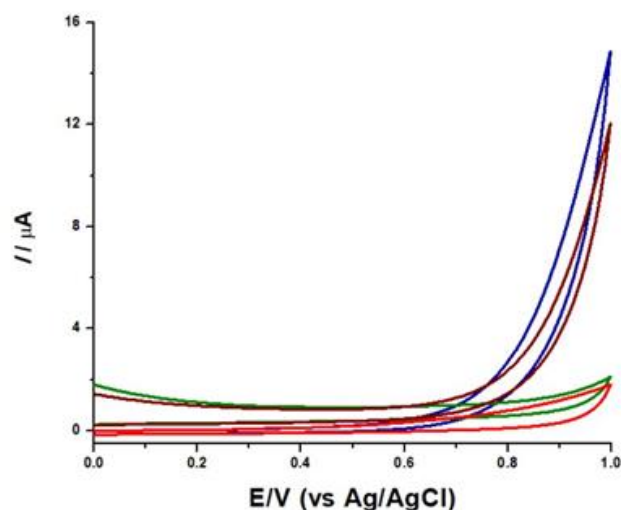


Fig. 3.11. CV-uri pentru SPE de carbon nemodificat în: NaPB 0,1 M, pH 7,0, (roșu), în prezența a 1,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (albastru), 60  $\mu\text{M}$  Trolox (verde) și 1,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 60  $\mu\text{M}$  Trolox (maro).  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . [200]

CV-uri realizate la aceeași viteză de scanare au fost folosite pentru a evidenția atât **comportarea senzorului cu nanozime de aur în absența și prezența  $\text{H}_2\text{O}_2$**  cât și **proprietățile catalitice ale AuNP** și sunt prezentate în figurile 3.10 și 3.11.

Putem **concluziona** că  $\text{H}_2\text{O}_2$  suferă o **oxidare ireversibilă catalizată de AuNP**. Această declarație este în concordanță cu constatările din figurile 3.7 și 3.8, unde pentru viteza de scanare de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , vârful de reducere a rămas neschimbat atât pentru  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cât și pentru Trolox, atribuind **vârful de reducere unei caracteristici intrinseci a AuNP**. În aceleași condiții, pentru vârful anodic, curentul crește cu valori diferite ( $13,3 \mu\text{A}$  și  $3,08 \mu\text{A}$ ). Pentru a evidenția în continuare **proprietățile catalitice ale AuNP la detecția  $\text{H}_2\text{O}_2$** , au fost realizate o serie de **CV-uri și pe electrodul de film de carbon nemodificat** (în absența AuNP). După cum se poate observa în figura 3.11, oxidarea  $\text{H}_2\text{O}_2$  are loc la potențiale mai mari (0,8 V) și a fost înregistrat

un răspuns foarte mic al senzorului față de Trolox . A fost observată o diferență semnificativă între comportamentul celor doi senzori față de detecția  $H_2O_2$ , ceea ce evidențiază avantajul utilizării senzorilor AuNP.

Se poate trage **concluzia** că **procesul de electrod se bazează pe reacțiile redox ale AuNP controlate prin difuzie și că AuNP catalizează oxidarea ireversibilă a  $H_2O_2$  (și a Trolox ului)**

### 3.4.2. Spectroscopia de impedanță electrochimică

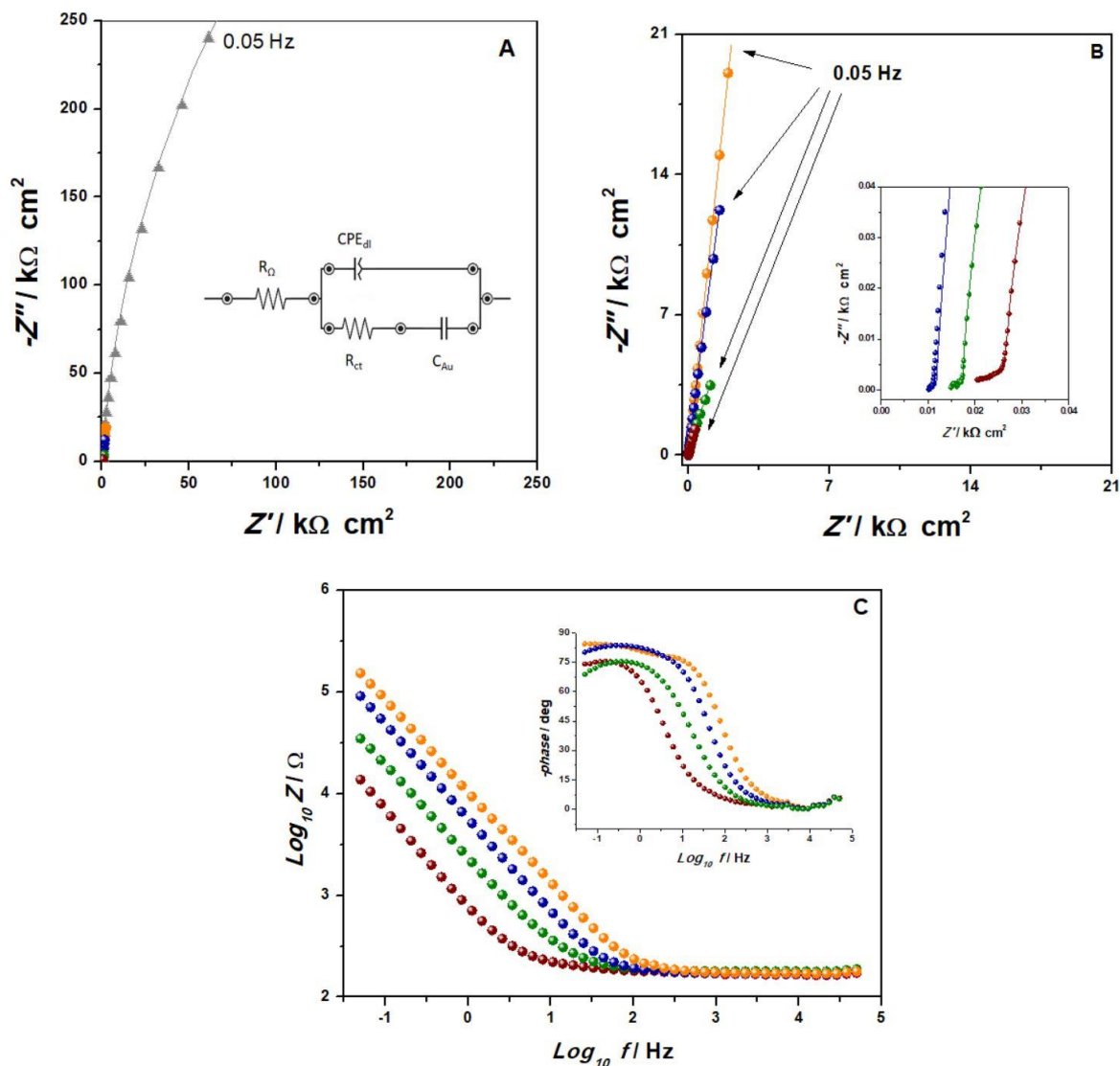


Figura 3.12. Reprezentarea în plan complex a spectrelor de impedanță în 0,1 M NaPB, pH 7,0, 0,1 V față Ag/AgCl pentru:  
 A. senzor de carbon nemodificat (gri) și **modificat** cu AuNP (portocaliu) cu inserție a circuitului electric echivalent utilizat pentru fitarea spectrelor AuNP;  
 B. Senzor cu AuNP în **NaPB** (portocaliu),  $H_2O_2$  (albastru), **Trolox** (verde) și  $H_2O_2$ +**Trolox** (maro) cu inserție a regiunii de înaltă frecvență.  
 C. Diagrama Bode cu inserție a variației fazei în condițiile din B. [200]



Spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS) a fost utilizată pentru **caracterizarea fenomenelor de la interfața senzorului cu nanozime / electrolit** în prezența  $H_2O_2$ , cu și fără antioxidantul standard Trolox. Cu ajutorul acestei metode vor putea fi adăugate noi informații despre **procesele de transfer ale electronilor și fenomenele de difuzie** evidențiate prin măsurătorile anterioare de CV.

Tabelul 3.4 împreună cu figurile 3.13 și 3.14 prezintă valorile **componentelor circuitului echivalent** obținute prin fitarea spectrelor experimentale în regiunea de **frecvențe intermediare și joase** și **variația lor în funcție de electrolitul folosit**. A fost observată o scădere semnificativă a valorilor impedanței la frecvență joasă (0,05 Hz).

Tabelul 3.4. Valorile elementelor de circuit echivalent obținute prin fitarea spectrelor de impedanță din figura 3.12

Electrod/Electrolit	$R_{ct}$ ( $k\Omega\text{ cm}^2$ )	$C_{Au}$ ( $\mu F\text{ cm}^{-2}$ )	$CPE_{dl}$ ( $\mu F\text{ cm}^{-2}\text{ s}^{-1}$ )	$\alpha_{dl}$
C /NaPB	1,360	-	9,8	0,95
AuNP / NaPB	0,830	0,4	142,6	0,91
AuNP /NaPB + $H_2O_2$	0,160	78,6	250,9	0,86
AuNP /NaPB + Trolox	0,027	203,2	648,0	0,81
AuNP /NaPB + Trolox + $H_2O_2$	0,019	557,4	1934,7	0,78

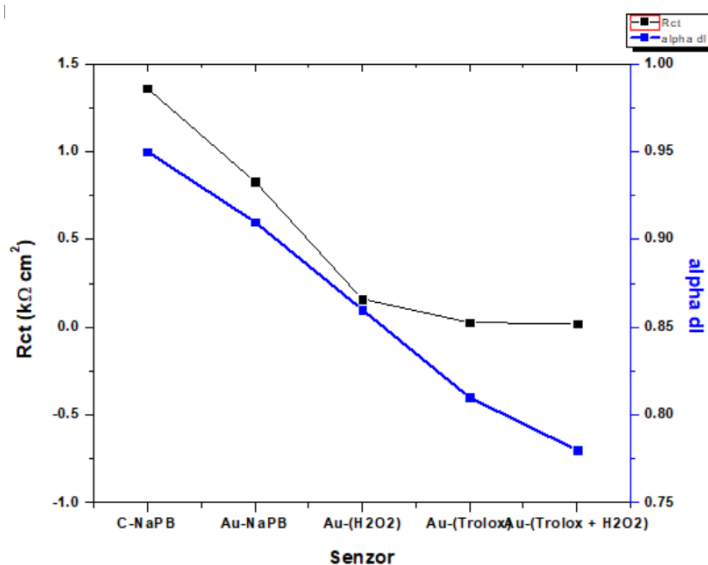


Figura 3.13. Variația valorilor  $R_{ct}$  și  $\alpha_{dl}$  din tabelul 3.4 pentru C-SPE comparativ cu AuNP-SPE în: NaPB, NaPB+ $H_2O_2$ , NaPB+Trolox, NaPB+Trolox+ $H_2O_2$

**În concluzie, în domeniul frecvențelor intermediare și joase, impedanța are un comportament capacitiv, care este, de asemenea, în conformitate cu diagramele Bode (fază între 75 - 87 °). Panta curbelor  $Z=f(\log f)$  are valoarea de aproximativ -0,85.**

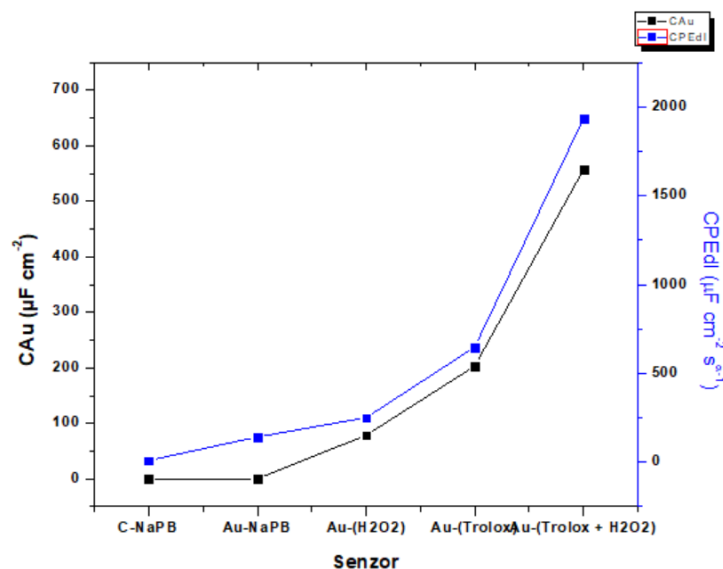


Figura 3.14. Variația valorilor  $C_{Au}$  și  $CPE_{dl}$  din tabelul 3.4 pentru C-SPE comparativ cu AuNP-SPE în: NaPB, NaPB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaPB+Trolox, NaPB+Trolox +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.5 Evaluarea electrochimică a capacității antioxidante totale a extractelor din plante

#### 3.5.1. Voltametrie ciclică – comparație între extractele din plante

Folosind AuNP, pentru modificarea senzorului cu film de carbon, care au un impact asupra răspunsului senzorului electrochimic datorită efectului sinergetic dintre nanotehnologie și detecția electrochimică, **am optimizat** cu succes în secțiunile anterioare **senzorul cu nanozime de aur pentru detecția H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. Acesta va fi folosit ca o *metodă simplă de screening* pentru **caracterizarea rapidă a extractelor din plante** prin **evaluarea și cuantificarea capacității antioxidante totale**, absolute și relative.

Măsurătorile spectroscopice au evidențiat un conținut ridicat de fenoli în *extractele din plante* analizate, E, dovedind *caracterul antioxidant al acestora*. **Metodele electrochimice voltametrice** sunt o **alternativă mai rapidă și mai simplă** față de metodele clasice pentru **evaluarea capacității antioxidante totale a extractelor**, dar și pentru a evidenția **caracterul lor antioxidant diferit**, care este funcție de solventul și metoda de extracție folosiți (figura 3.15).

Există câțiva parametri care pot fi determinați utilizând **voltammetria ciclică** (*vârfurile anodice, potențialele corespunzătoare vârfurilor de oxidare și zona sub undă anodică (pozitivă), A, a CV-ului*) care ajută la **caracterizarea caracterului antioxidant** prezenți în diferite probe [31]. Acest lucru este posibil datorită *puterii reducătoare a AOx* prezenți în extractele din plante, E, care acționează ca **donori de electroni sau protoni** în reacțiile redox, având capacitatea de a **reduce (anihila) speciile reactive cum ar fi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**.

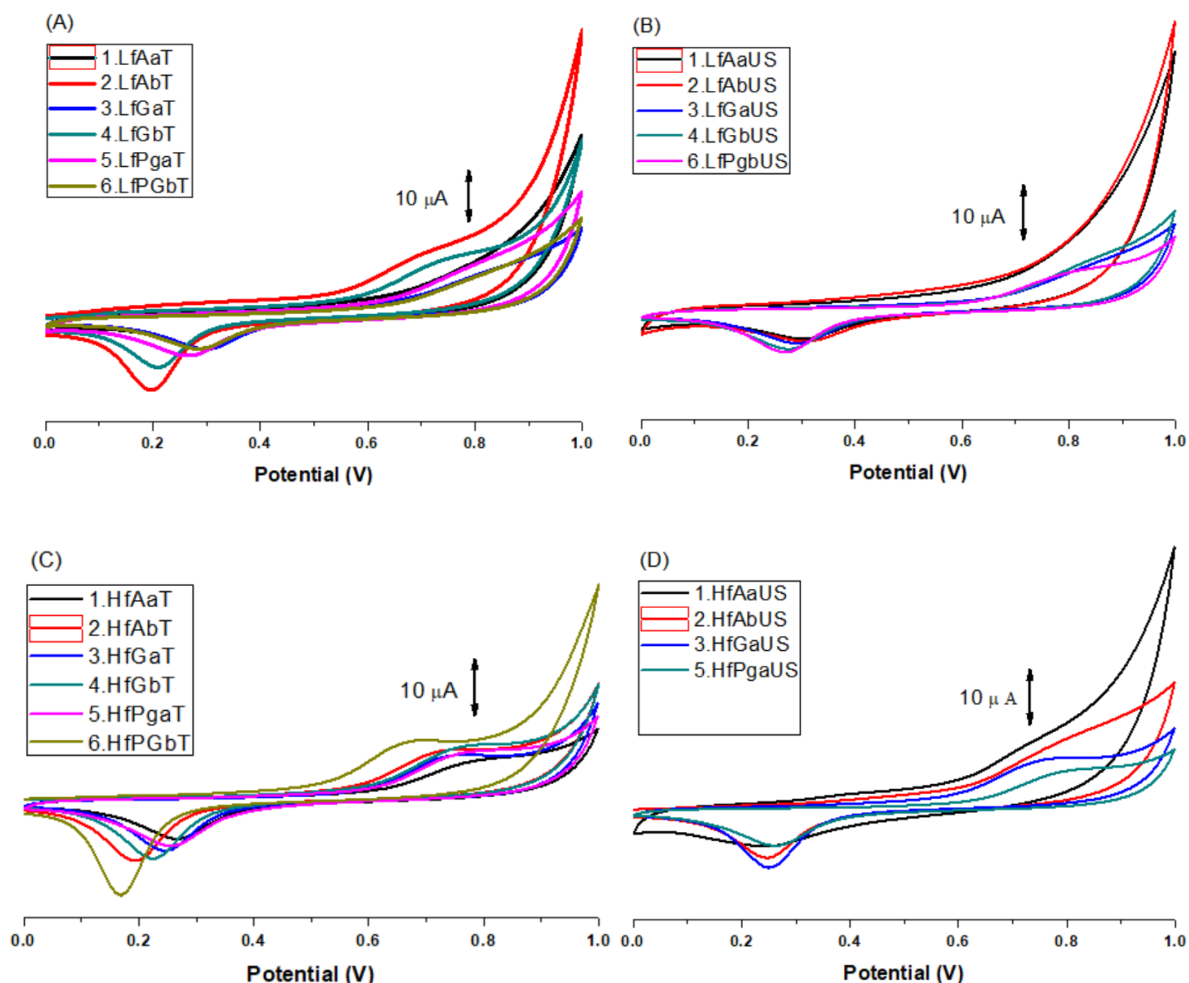


Fig. 3.15. CV-uri în 0,1 M NaPB, pH 7,0, ce conține extracte obținute prin două metode de extracție (T și US): de lavandă (A) și (B) și de cătină (C) și (D). Viteza de scanare  $50 \text{ mV s}^{-1}$

### 3.5.2. Voltametrie ciclică – calcul AC

O expresie valabilă a **capacității antioxidante totale** a unui extract este evidențiată de **profilul său redox**. Astfel, **zona anodică** a CV-urilor înregistrate cu senzorul cu nanozime de aur optimizat poate fi corelată cu **capacitatea antioxidantă** a extractelor [212].

Figura 3.16A ilustrează profilul CV realizat între 0,0 - 1,0 V,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ , înregistrat de senzorul cu nanozime de aur în 0,1 M NaPB, pH = 7,0, ce conține extracte din lavandă obținute prin metoda de extracție la presiune mare (T), descrisă în secțiunea 3.3.2.

În figura 3.16B, CV-urile au fost realizate în aceleași condiții experimentale în unele extracte de lavandă și cătină selectate, studiate în comparație cu cele efectuate în Trolox, dezvăluind diferențe în zona anodică în funcție de tipul plantei, metoda de extracție și solvenții utilizați. În cazul *extractelor de lavandă* (în special 2.Lf Ab US), un profil mai pronunțat este vizibil pentru vârfurile de oxidare. Rezultatele sunt în concordanță cu rezultatele spectroscopice care subliniază că *extractele de lavandă au compuși antioxidanți diferiți în comparație cu extractele de cătină* [100].

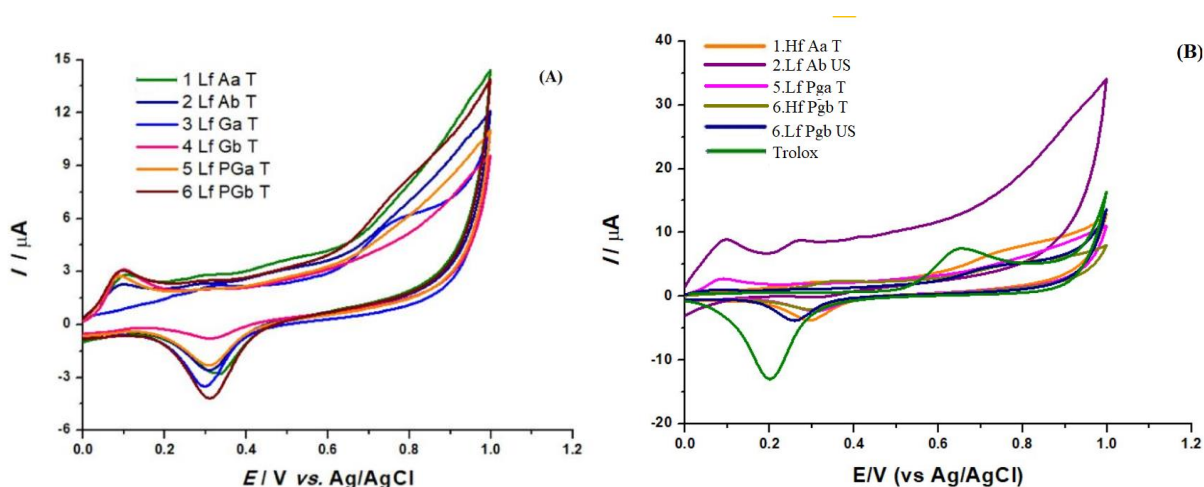


Fig. 3.16. voltamograme ciclice, în 0,1 M NaPB, pH = 7,0,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  pentru:  
 (A) toate extractele din lavanda Es obținute prin extracție sub presiune;  
 (B) 1.Hf Aa T, 2.Lf Ab US, 5.Lf Pga T, 6.Hf Pgb T, 6.Lf Pgb US și Trolox. [199, 200]

Mai mult, *aria zonei anodică a unui CV, A*, poate fi corelată cu *puterea de reducere a unui E*, și prin aceasta, cu *capacitatea antioxidantă, AC* [213]. Voltamogramele înregistrate anterior au fost utilizate pentru a calcula aria suprafețelor anodice care reprezintă AC unui extract.

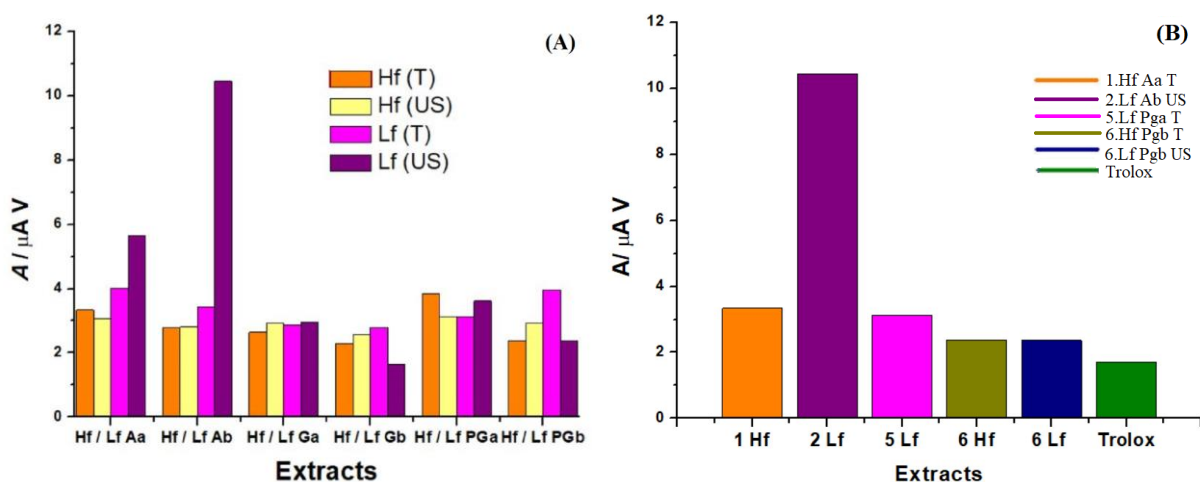


Fig. 3.17. Histograme ale suprafeței calculate din CV-urile corespunzătoare: (A) analizei tuturor extractelor de lavanda și cătină, și (B) selecția extractelor din Fig. 3.16B (comparativ cu Trolox). [199, 200]

Figura 3.17A reprezintă AC calculată din aria zona anodică, A, a voltamogramelor pentru toate extractele de lavandă și de cătină (după scăderea ariei zonei anodice corespunzătoare CV-ului electrodului în NaPB absența lui extractelor). Figura 3.17B prezintă valorile capacității antioxidante ale tuturor extractelor, calculate din voltamograme, în comparație cu valoarea obținută pentru Trolox de 60 μM.

Se poate **concluziona** astfel, că **aria anodică a CV-urilor înregistrată de senzorul cu nanozime de aur optimizat poate fi corelată cu capacitatea antioxidantă a extractelor, ceea ce permite discriminarea între diferitele extracte de plante.**

### 3.5.2. Voltametrie în puls diferențial - indicele electrochimic

Termenul de **indice electrochimic, EI**, a fost introdus cu un deceniu în urmă și se calculează pornind de la **raportul** dintre următorii parametri voltametrici: **curentul vârfului anodic** ( $I_{pa}$ ) și **potențialul vârfului anodic** ( $E_{pa}$ ) pentru toate perechile de vârfuri prezente în voltamogramă (1, 2, ..., n), după cum se arată în ecuația [214] de mai jos:

$$EI = I_{pa1}/E_{pa1} + I_{pa2}/E_{pa2} + \dots + I_{pan}/E_{pan} \quad (3.8)$$

Prin urmare, **indicele electrochimic, EI**, poate fi folosit ca o altă abordare pentru **cuantificarea "antioxidanților naturali totali"** prezenți în probele analizate, care conțin acid *ascorbic*, în cazul nostru, extractele de cătină. În absența acidului ascorbic (extractele de lavandă), **EI** poate fi exprimat prin cuantificarea *polifenolilor totali* [215].

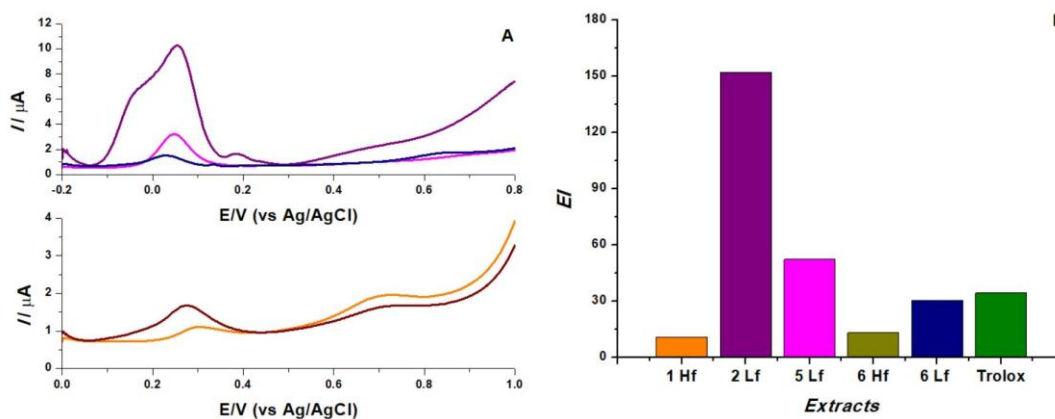


Fig. 3. 18. (A) Deasupra : DPV pentru extractele Lf: 2.Lf Ab US , 5.Lf Pga T, 6.Lf Pgb US; Jos: DPV pentru extractele Hf: 1.Hf Aa T, 6.Hf Pgb T.

B. Histograma valorilor EI corespunzătoare extractelor în comparație cu EI a 60 μM Trolox

Valorile EI pentru extractele analizate au fost calculate folosind ecuația 3.8 și sunt prezentate în histograma din figura 3.18B, comparativ cu EI obținut pentru Trolox 60 μM, utilizat ca standard. În figura 3.19 sunt prezentate variațiile EI în funcție de metoda și solventul de extracție pentru extractele de cătină (A) și de lavandă (B).

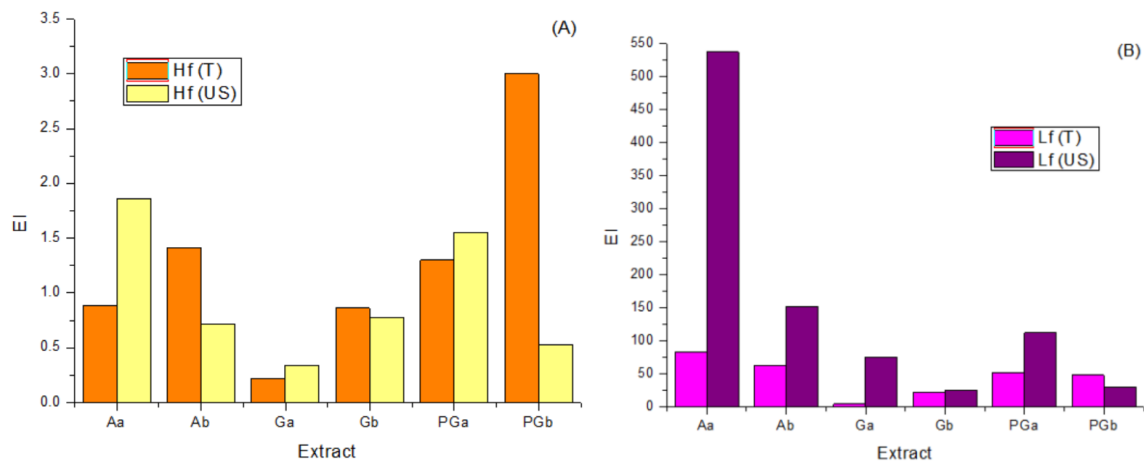


Fig. 3.19. Histograme ale valorilor indicelui electrochimic pentru cătină și lavandă.

Valorile **EI calculate** pot fi comparate cu valorile obținute din calculul **ariei zonei anodice**, A, a CV-urilor, observându-se cum acestea, inclusiv capacitatea antioxidantă totală, menține tendințe similare pentru același extract. Trebuie ținut cont de faptul că parametrii electrochimici calculați se bazează pe reacțiile redox, care diferă în cazul CV și DPV. Deoarece în cazul CV-urilor, se realizează o variație ciclică a potențialului aplicat senzorului, potențialul de oxidare al extractelor este diferit în comparație cu cel obținut în măsurătorile DPV [210].

### 3.6 Cuantificarea capacității antioxidante folosind senzori cu nanozime de aur

Pentru **cuantificarea activității** capacității antioxidante totale am introdus un parametru, capacitatea antioxidantă totală **relativă (RAC)** și **absolută (TAC)** care a fost calculat folosind sensibilitatea **senzorilor cu nanozime de aur (AuNP-SPE)**.

**Principiul de determinare a RAC/TAC** pentru extracte din plante s-a bazat astfel pe **efectul de anihilare (captare/neutralizare) a  $H_2O_2$  de antioxidanții** prezenți în extractele cu capacitate antioxidantă. Astfel, **scăderea răspunsului** senzorului de  $H_2O_2$  sugerează o **capacitate antioxidantă totală în creștere**.

Conform literaturii [216, 217], capacitatea antioxidantă totală a unui E poate fi exprimată și în funcție de concentrația a doi antioxidanți standard, cunoscuți pentru activitatea antioxidantă mare:

1. În **echivalent acid ascorbic (AAE)**: valoarea corespunzătoare RAC a unui extract vegetal care echivalează efectul antioxidant produs de concentrația corespunzătoare de acid ascorbic (AA).

2. În **echivalent Trolox (TE)**: valoarea corespunzătoare RAC a unui extract vegetal care echivalează efectul antioxidant produs de concentrația corespunzătoare de Trolox (T).

Rezultatele obținute prin metoda electrochimică amperometrică au fost comparate cu cele obținute prin metodele clasice, chemiluminescența și spectrometria UV-vis.

#### 3.6.1. Cuantificarea capacității antioxidante totale relative (RAC)

**RAC-ul unui extract vegetal apos (E)** a fost determinat folosind formula de mai jos:

$$RAC = \frac{S_0 - S_E}{S_0} * 100 \quad (3.9)$$

Unde:

- $S_0$  = sensibilitatea senzorului pentru  $H_2O_2$  în *absența* lui E și
- $S_E$  = sensibilitatea senzorului pentru  $H_2O_2$  în *prezența* E.

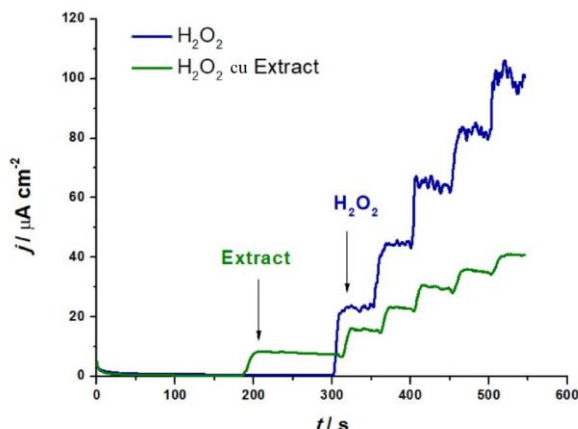


Figura 3.20 Amperometrie la potențial fix la 0,55 V față Ag/AgCl pentru senzorul de  $H_2O_2$  în prezența și absența extractului 2.Hf Ab US în 0,1 M NaPB, pH = 7,0. [199]

**După adăugarea unui E** (1:40 - diluție E: NaPB), de exemplu 2.Hf Ab US, s-a obținut o *sensibilitate mult mai scăzută*, ilustrând efectul de *aihilare al AOx prezent în E față de  $H_2O_2$* ,  $S_E = 2,71 \pm 0,2 \mu A cm^{-2} mM^{-1}$  ( $n = 3$ ), așa cum se arată în Figura 3.21.

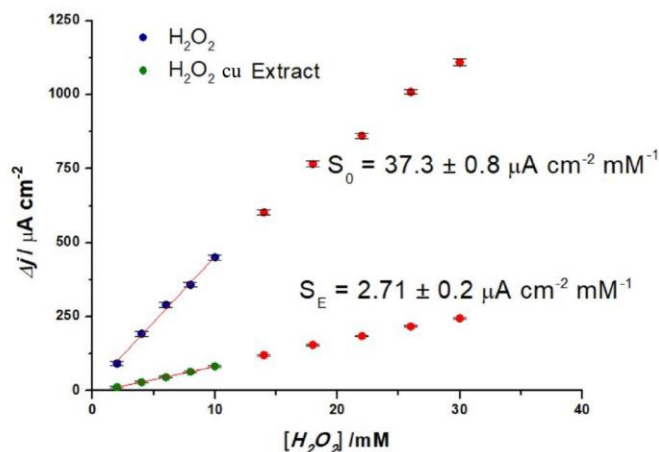


Figura 3.21. Curbele de etalonare corespunzătoare amperometriilor din Fig. 3.19. [199]

Tabele 3.5 și 3.6 prezintă valorile sensibilităților senzorilor de  $H_2O_2$  cu nanozime de aur obținute în prezența tuturor extractelor de cătină și lavandă, împreună cu RAC-urile corespunzătoare calculate cu formula (3.9) ce sunt reprezentate în figura 3.22.

**Sensibilitățile cele mai scăzute**, cele mai mari valori ale RAC, sugerează **cea mai mare capacitate antioxidantă totală**.

Tabelul 3.5. Valorile sensibilităţilor senzorilor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cu nanozime de aur şi a RAC (%) obţinute în prezenţa tuturor extractelor de cătină.

Extract	S ( $\mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ )	RAC (%)
1.Hf Aa T	8,10	81,94
2.Hf Ab T	6,98	84,44
3.Hf Ga T	8,34	81,41
4.Hf Gb T	6,67	85,12
5.Hf PGa T	4,98	88,88
6.Hf PGb T	4,47	90,02
1.Hf Aa US	7,25	83,85
2.Hf Ab US	6,36	85,83
3.Hf Ga US	9,36	79,13
4.Hf Gb US	5,92	86,80
5.Hf PGa US	4,35	90,29
6.Hf PGb US	12,64	71,84

Tabelul 3.6. Valorile sensibilităţilor senzorilor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cu nanozime de aur şi a RAC (%) obţinute în prezenţa tuturor extractelor de lavandă.

Extract	S ( $\mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ )	RAC (%)
1.Lf Aa T	5,72	87,25
2.Lf Ab T	7,80	82,61
3.Lf Ga T	4,38	90,22
4.Lf Gb T	2,74	93,88
5.Lf PGa T	4,23	90,56
6.Lf PGb T	3,85	91,40
1.Lf Aa US	4,32	90,37
2.Lf Ab US	4,09	90,88
3.Lf Ga US	3,19	92,89
4.Lf Gb US	3,00	93,30
5.Lf PGa US	8,42	81,24
6.Lf PGb US	6,27	86,01



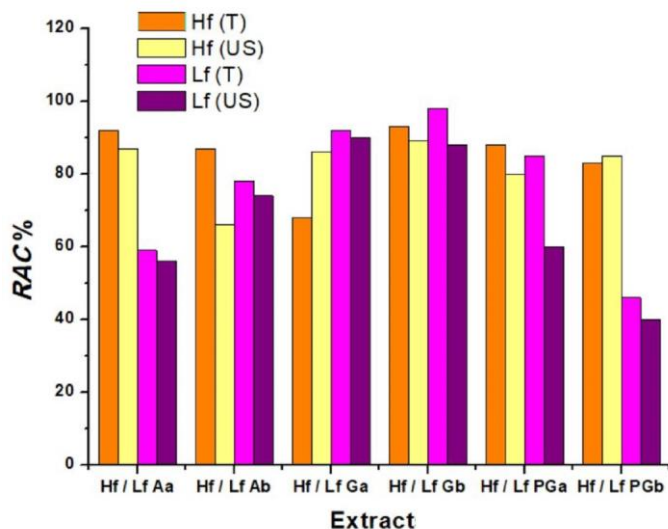
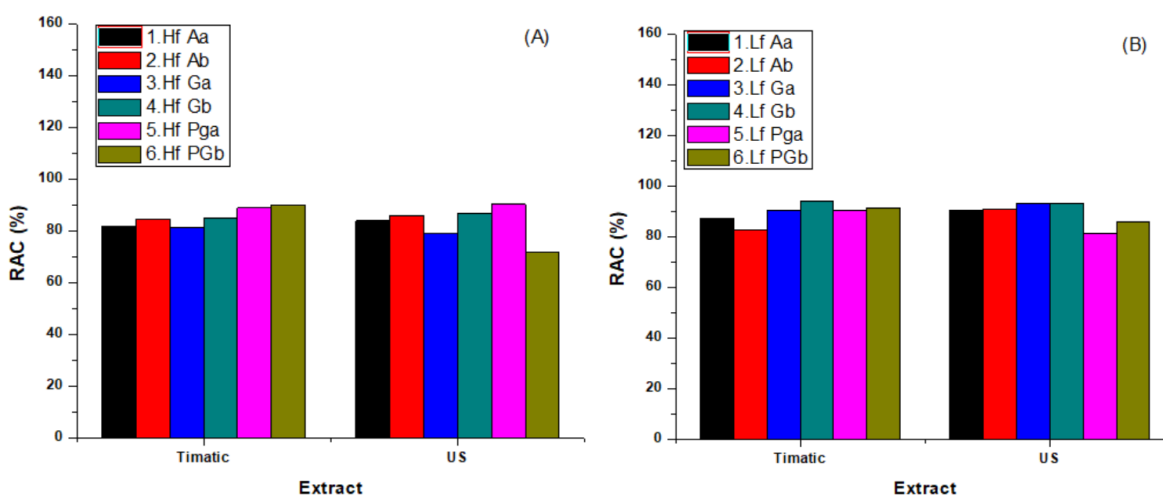


Fig. 3.22. Histograma pentru capacitatea antioxidantă totală relativă (RAC) a fiecărui extract de lavandă (Lf) și cătină (Hf) calculată utilizând formula (3.9). [199]

Putem, de asemenea, să vedem că **tipul solvenților** și a **metodei de extracție** influențează capacitatea antioxidantă totală a extractelor, conform figurii 3.23.

Din figurile 3.23A și B se observă cum pentru aceeași metodă de extracție, **extractele prezintă RAC-uri diferite**, funcție de resursa vegetală folosită. **Variația RAC-ului** se observă și în cazul extractelor atunci când, pentru aceeași resursă vegetală și aceeași sovenți, se folosește altă metodă de extracție (figurile 3.23C și D).



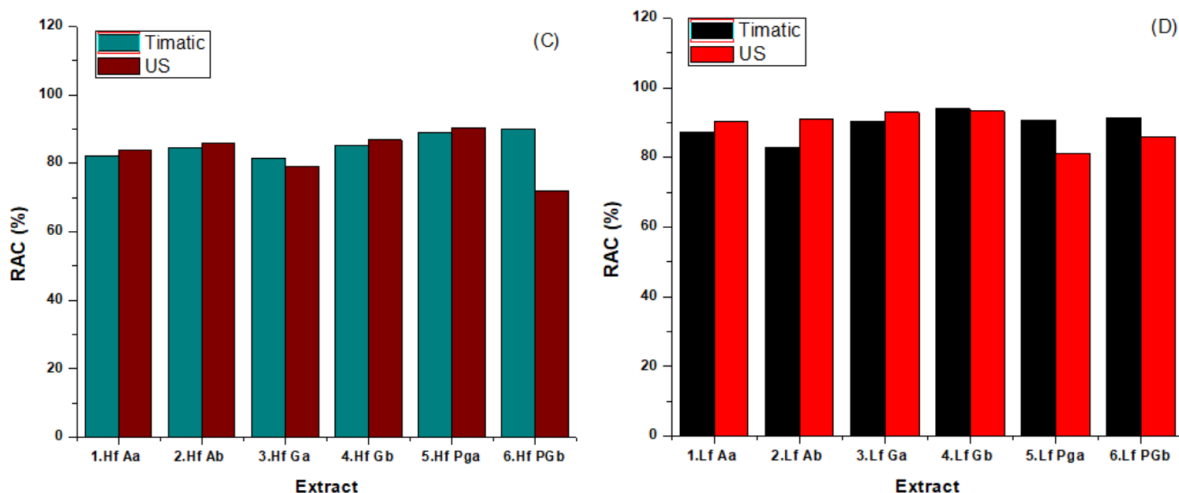


Fig. 3.23. Dependența valorilor RAC a extractelor de cătină (Hf) și lavandă (Lf) în funcție de: (A) și (B) tipul solventului pentru extractul de cătină; (C) și (D) metoda de extracție.

Pentru realizarea comparațiilor și o exprimare mai precisă a RAC-ului, valorile sale pot fi exprimate în **echivalent acid ascorbic (AAE)** și în **echivalent Trolox (TE)**.

Prin urmare, curba de etalonare pentru senzorul cu nanozime a fost realizată în **echivalent acid ascorbic (AAE)** în **echivalent Trolox (TE)** (considerând o valoare fixă 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Folosind formula 3.9, valoarea RAC-ului pentru fiecare concentrație AA/Trolox a fost calculată și rezultatele au fost reprezentate grafic ca o funcție a concentrațiilor AA/Trolox, așa cum se arată în figura 3.24 și 3.25 (A).

Regiunea liniară a fost extrapolată și valorile RAC obținute pentru fiecare E au fost identificate și asociate cu concentrațiile AA/Trolox corespunzătoare exprimate în mg/100 mL solvent, valori care permit **exprimarea RAC-ului fiecărui extract în AAE** așa cum se arată în Figura 3.24 și 3.25 (B).

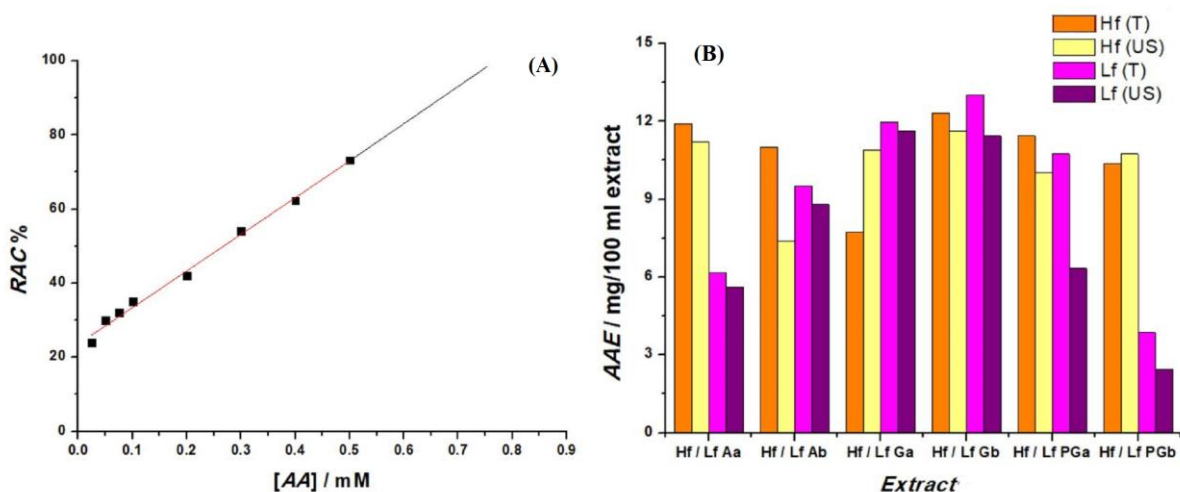


Fig. 3.24. (A) Curba de etalonare pentru creșterea concentrațiilor AA la o valoare fixă 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obținute din amperometria cu potențial fix la 0,55 V față de Ag/AgCl; (B) histograma RAC exprimată în AAE. [199]

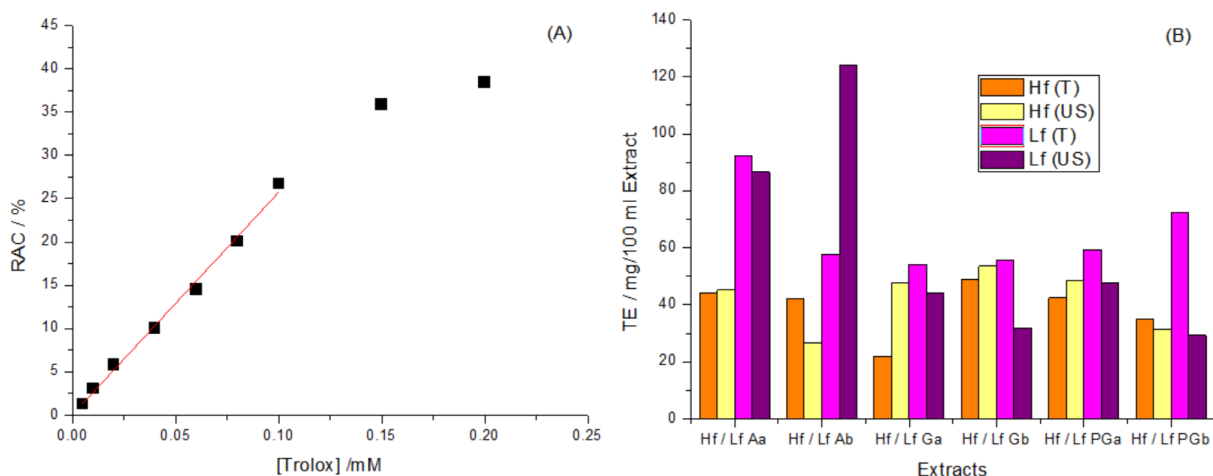


Fig. 3.25. (A) Curba de etalonare pentru creşterea concentraţiilor Trolox la o valoare fixă 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obţinute din amperometria cu potenţial fix la 0,55 V faţă de Ag/AgCl; (B) histograma RAC exprimată în TE.

### 3.6.2. Cuantificarea capacităţii antioxidante totale absolute (TAC)

Capacitatea antioxidantă totală am estimat-o folosind un alt raport, similar cu cel folosit în determinările chemiluminescente, **al curenţilor electrici obţinuţi din măsurători amperometrice,  $I_0/I$** , pe care l-am numit **capacitate antioxidantă totală absolută, TAC**.

$$TAC = \frac{I_0}{I} \quad (3.10)$$

Astfel, **TAC poate fi evaluat utilizând senzorul cu nanozime** pe baza proprietăţilor de anihilare H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a compuşilor antioxidanţi existenţi în extractele din plante .

În acest scop, pentru o concentraţie cunoscută de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, curentul electric este determinat în absenţa şi în prezenţa unui extract. Dacă extractul conţine compuşi antioxidanţi, se va observa o scădere a curentului. Aceasta evidenţiază TAC a extractelor.

Pentru potenţialul de 0,55 V faţă de Ag AgCl, în NaPB 0,1 M, curentul generat de senzorul cu nanozime de aur este înregistrat în funcţie de timp. Pentru o concentraţie fixă de 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, în absenţa extractului studiat curentul a fost înregistrat şi notat  $I_0$  (2,88 ± 0,3 µA), iar în prezenţa unor concentraţii diferite de Trolox (5 până la 200 µM) curentul a fost înregistrat şi notat  $I$ .

Raportul **TAC =  $I_0/I$**  a fost calculat şi reprezentat ca o funcţie de concentraţia Trolox, obţinând curba de etalonare din figura 3.26A.

Urmând aceeaşi procedură ca şi pentru Trolox, curentul  $I$  a fost înregistrat pentru fiecare extract în prezenţa aceleaşi concentraţii de 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Raportul  $I_0/I$  a fost calculat, pentru fiecare extract şi concentraţia corespunzătoare Troloxului care ar genera acel raport a fost citită din graficul de calibrare Trolox. Acest raport estimează capacitatea totală antioxidantă a extractului (TAC) şi a fost exprimat şi în echivalent Trolox, TE, valori prezentate în figura 3.26B şi tabelele 3.7 şi 3.8.

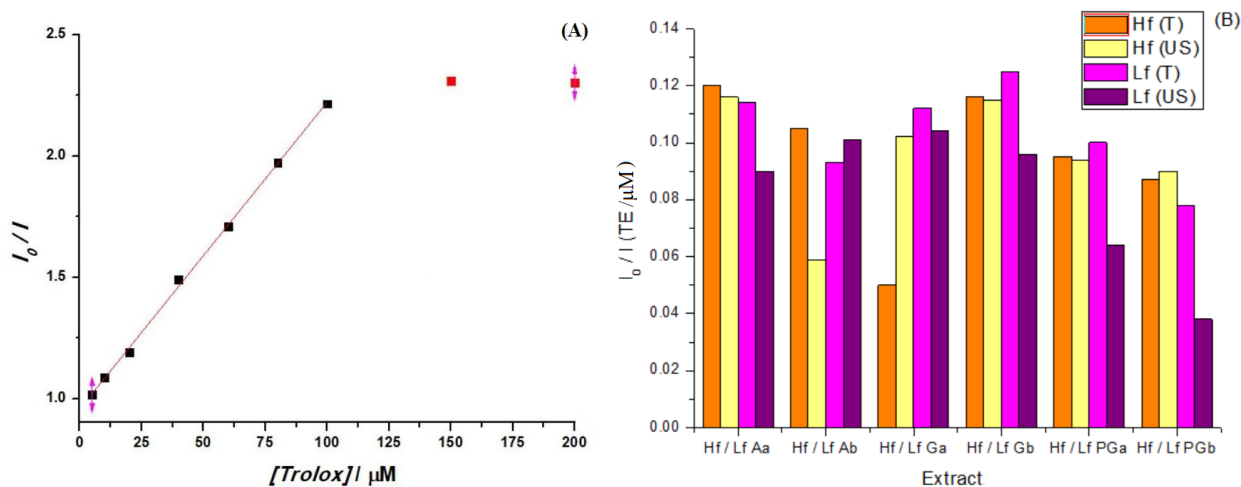


Fig. 3.26. (A) Curba de etalonare pentru TAC, obținută pentru diferite concentrații de Trolox utilizând senzorul cu AuNP amperometric la 0,55 V față de Ag AgCl în 0,1 M NaPB pentru 0,5 mM  $H_2O_2$ ,  $R^2 = 0,998$ . (B) histograma TAC exprimată în TE. [200]

Tabelul 3.7. Valorile TAC obținute în prezența tuturor extractelor de cătină prin cele două metode de extracție: T și US.

Extract/ TAC ( $\mu M$ )	Metoda de extracție	
	Timatic	Ultrasunete
1.Hf Aa	0,12	0,12
2.Hf Ab	0,11	0,06
3.Hf Ga	0,05	0,10
4.Hf Gb	0,12	0,12
5.Hf PGa	0,10	0,09
6.Hf PGb	0,09	0,09

Tabelul 3.8. Valorile TAC obținute în prezența tuturor extractelor de lavandă prin cele două metode de extracție: T și US.

Extract/ TAC ( $\mu M$ )	Metoda de extracție	
	Timatic	Ultrasunete
1. Lf Aa	0,11	0,09
2. Lf Ab	0,09	0,10
3. Lf Ga	0,11	0,10

4. Lf Gb	0,13	0,10
5. Lf PGa	0,10	0,06
6. Lf PGb	0,08	0,04

### 3.6.3. Estimarea activităţii antioxidante prin studii cinetice

Există o diferenţă între **activitatea antioxidantă** totală şi **capacitatea antioxidantă totală**. În timp ce **activitatea antioxidantă** este legată de **cinetica reacţiei dintre un oxidant şi un antioxidant**, **capacitatea antioxidantă** se referă la **eficienţa de conversie a unui radical liber** care este anihilat. Activitatea antioxidantă este echivalentă cu cantitatea, exprimată în moli, de radicali liber capturat de antioxidanţi [218, 219], în cazul nostru reprezentat de extractele din plante. **Activitatea antioxidantă** a unui extract, E, poate fi estimată studiind **cinetica reacţiei de anihilare a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** în prezenţa unui compus antioxidant din E (inhibare competitivă). Astfel, evaluarea activităţii antioxidante s-a realizat prin evaluarea constantelor cinetice ale consumului de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> în prezenţa compușilor antioxidanți (fig.3.27).

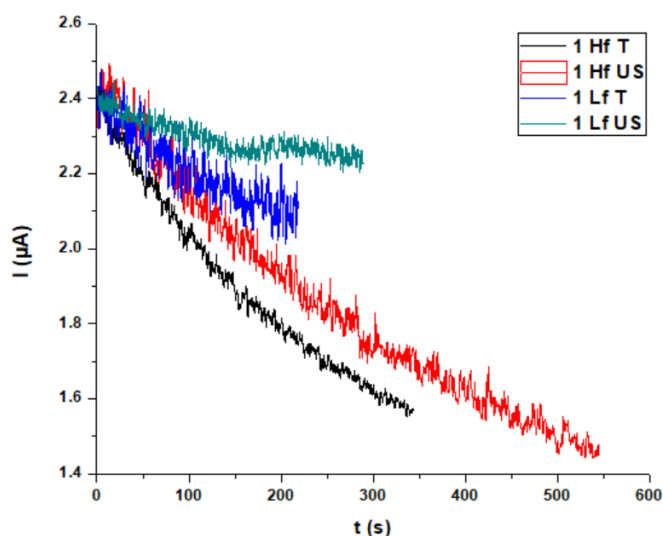


Fig. 3.27. Descreşterea curentului anodic înregistrat cu senzorul cu nanozime de aur la oxidarea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> în prezenţa extractelor din plante .

Se presupune că reacţia de anihilare a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectă un model cinetic de ordinul întâi [220]. Întrucât graficele semi-logaritmice nu prezintă o linearizare perfectă pe întreaga perioadă de timp, a fost luată în considerare prima parte a sa, pentru 300 de secunde, pentru care s-a calculat panta (figura 3.28A). **Constanta de viteză (k)** a reacţiei de anihilare a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a putut fi astfel determinată din panta graficului semi-logaritmice al raportului dintre intensitatea curentului obţinut la oxidarea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> în prezenţa (I) şi în absenţa (I<sub>0</sub>) extractului, folosind ecuaţia:

$$\ln \frac{I}{I_0} = -kt \quad (3.11)$$

Figura 3.28(B) prezintă valorile **constantei cinetice K** pentru toate extractele studiate, fiind un **indicator relativ al activității antioxidante totale** a acestora. Cu cât este **mai mare** valoarea lui **k**, cu atât există mai mulți compuși **puternic antioxidanți** în extractul studiat.

Se observă, din tabelul 3.9 și graficul 3.28(B), pentru extractele studiate o constantă **k** mai mică prin comparație cu cea a sucurilor obținute direct prin stoarcerea plantei ( $2\text{-}3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ), dar comparabilă cu a altor extracte cum sunt vinurile (aproximativ  $1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ) [212].

Tabel. 3.9. Constantele cinetice ale reacției de anihilare a  $\text{H}_2\text{O}_2$  pentru toate extractele

Extract	$k (\times 10^3 \text{ s}^{-1})$	Extract	$k (\times 10^3 \text{ s}^{-1})$
1HfAaT	1.00	1LfAaUS	0.10
1HfAaUS	1.10	1LfAaT	0.30
2HfAbT	1.20	2LfAbUS	0.20
2HfAbUS	1.20	2LfAbT	0.30
3HfGaT	0.80	3LfGaUS	0.30
3HfGaUS	0.70	3LfGaT	0.80
4HfGbT	0.60	4LfGbUS	0.40
4HfGaUS	1.10	4LfGbT	0.50
5HfPGaUS	1.00	5LfPGaUS	0.60
5HfPGaT	1.30	5LfPGaT	0.50
6HfPGbUS	0.60	6LfPGbT	0.60
6HfPGbT	1.20	6LfPGbUS	0.70

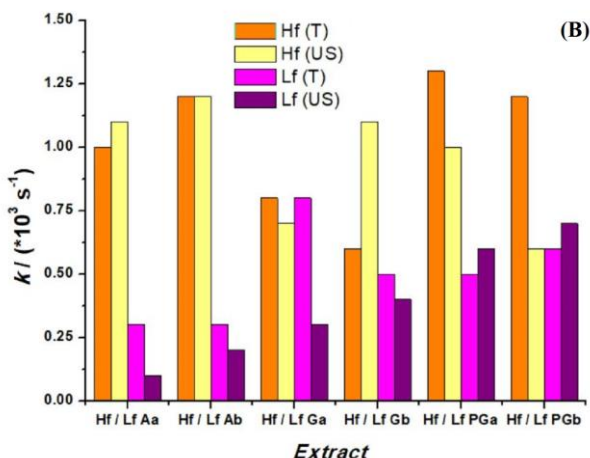
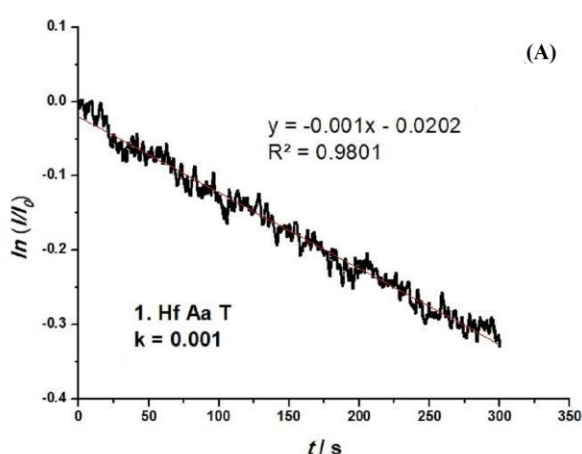


Fig. 3.28. (A) Descreșterea semi-logaritmică în timp a curentului de oxidare a  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (B) Histograma constantei cinetice a anihilării  $\text{H}_2\text{O}_2$  pentru toate extractele. [199]

### 3.7 Estimarea capacităţii antioxidante relativă folosind metode spectroscopice

#### 3.7.1. Spectroscopia UV-VIS

Similar cu cuantificarea electrochimică a RAC-ului, spectroscopia de absorbţie UV-Vis poate fi utilizată pentru caracterizarea procesului de anihilare a  $H_2O_2$ . Spectrofotometria clasică permite înregistrarea spectrelor de absorbţie ale soluţiilor de diferite concentraţii de  $H_2O_2$  şi înregistrarea extincţiei la lungimea de undă  $\lambda$  de 225 nm (corespunzătoare vârfului de absorbţie a  $H_2O_2$ ), direct sau după reacţia de anihilare a  $H_2O_2$  de compuşi antioxidanţi din extractele din plante [39].

Figura 3.29 prezintă spectrele de absorbţie pentru  $H_2O_2$ , în timp ce Figura 3.30 prezintă curbele de etalonare pentru  $H_2O_2$  în absenţa şi în prezenţa extractului 1.Hf Aa US calculată din spectrele de absorbţie la  $\lambda = 225$  nm.

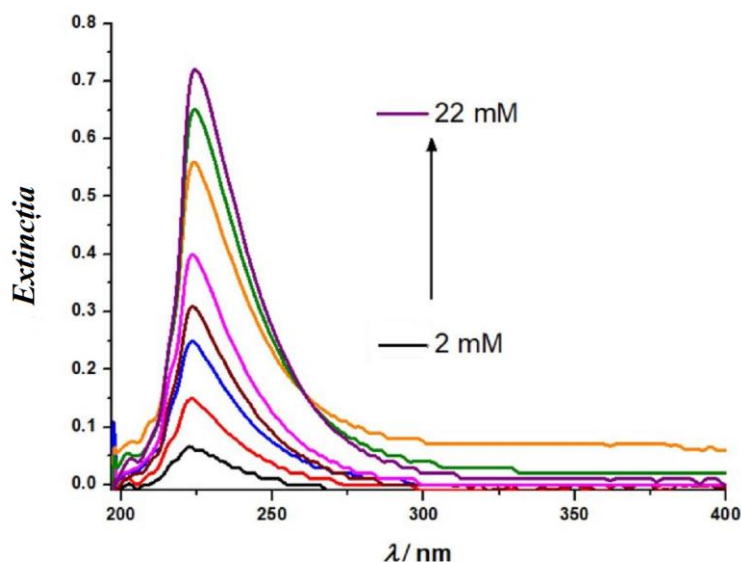


Fig. 3.29. Spectre de absorbţie la  $\lambda = 225$  nm pentru adăugarea succesivă de  $H_2O_2$  în prezenţa şi în absenţa extractului 1.Hf Aa US, în 0,1 M NaPB, pH = 7,0. [199]

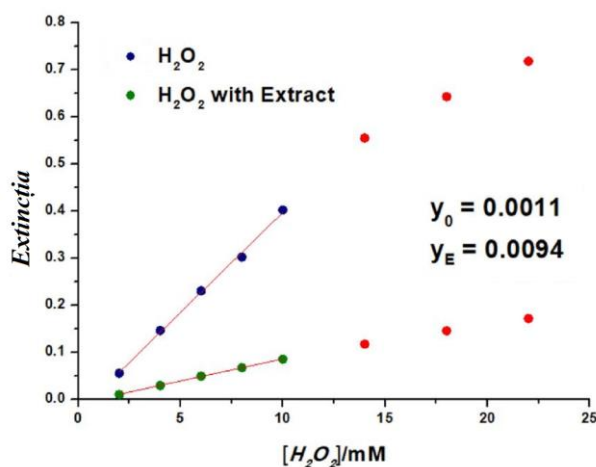


Fig. 3.30. Curbele de calibrare pentru  $H_2O_2$  în prezenţa şi în absenţa extractului 1.Hf Aa US, în 0,1 M NaPB, pH = 7,0.  $\lambda = 225$  nm. [199]

**RAC-ul spectrofotometric,  $RAC_s$** , poate fi calculat în acelaşi mod ca şi pentru metoda electrochimică, utilizând formula de mai jos:

$$RAC_s = \frac{y_0 - y_E}{y_0} * 100 \quad (3.10)$$

unde:

- $y_0$  = panta curbei de etalonare pentru  $H_2O_2$  în *absenţa* E şi
- $y_E$  = panta curbei de etalonare pentru  $H_2O_2$  în *prezenţa* E.

### 3.7.1.1 Corelarea RAC electrochimic RAC spectrofotometric

În tabelul 3.10 sunt prezentate **RAC-urile** pentru extractele de **lavandă şi cătină** obţinute prin cele două metode de extracţie, folosind acelaşi solvent de extracţie, împreună cu **gradul de recuperare** al valorilor obţinute prin metoda electrochimică **folosind senzorul cu nanozime de aur comparativ** cu cele obţinute prin **metoda spectrofotometrică**.

**Table 3.10.** Valorile RAC (%) pentru extractele de lavandă şi cătină

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

Se observă cum capacitatea antioxidantă a extractelor variază în funcţie de metoda de extracţie. În general valorile **RAC, obţinute spectrofotometric, sunt un pic mai mari decât cele electrochimice**. Diferenţele sunt explicate prin faptul că prin cele două metode caracteristici diferite sunt măsurate.

### 3.7.2 Chemiluminescenţa

**Determinarea chemiluminescenţă (CL)** a capacităţii antioxidante totale se bazează pe reacţia ROS sau RNS cu reactivi chemiluminescenţi în urma căreia se produc compuşi într-o stare energetică excitată care vor putea emite lumină. Antioxidanţii, introduşi în mediul de reacţie, interacţionează cu speciile reactive iniţiale şi inhibă emisia luminoasă, proporţional cu concentraţia AOx [164].

Pentru obţinerea **curbei de etalonare raportul  $I_0/I$**  calculat a fost apoi reprezentat în funcţie de **concentraţia Trolox** (Fig. 3.31).

**Raportul  $I_0/I$**  calculat din analiza extractelor din plante E au fost comparate cu curba de etalonare a Troloxului pentru a fi **exprimate în echivalentul Trolox (TE)**. Rezultatele sunt prezentate în Figura 3.32.



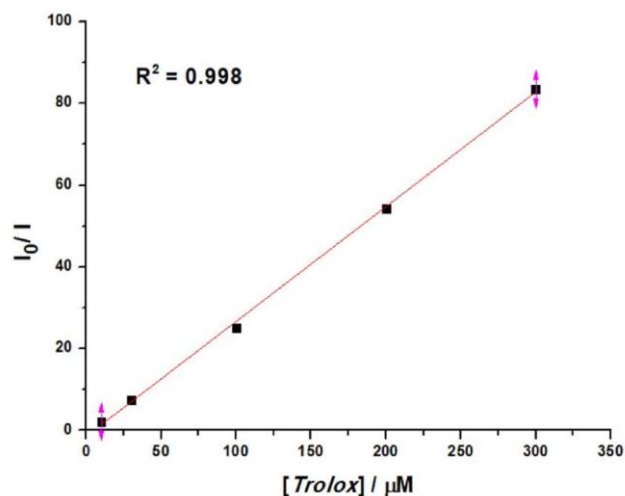


Fig. 3.31. Curba de etalonare a semnalului CL ( $I_0/I$ ) în funcție de concentrația Trolox

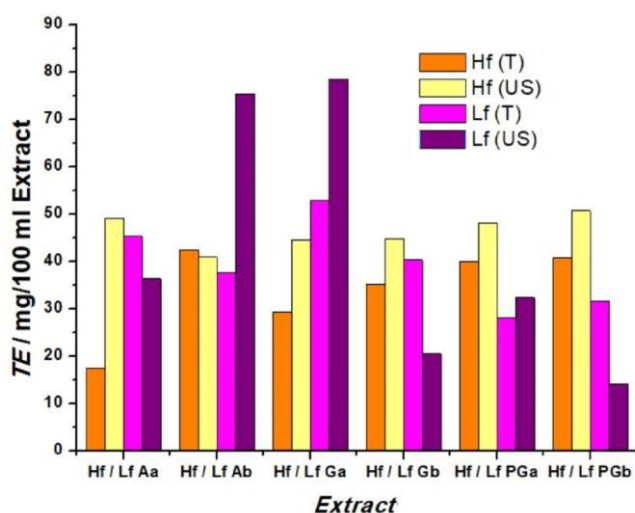


Fig. 3.32. Histograma determinărilor CL în echivalent Trolox, pentru extractele de cătină (Hf) și lavandă (Lf). [199]

### 3.7.2.1. Corelarea metodei electrochimice cu chemiluminescența

Pentru a putea **corela datele obținute prin chemiluminescență și electrochimie**, valorile RAC și TAC au fost și ele exprimate în echivalent Trolox, TE. Valorile, reprezentând RAC-urile exprimate în TE (mg/100 mL E), pentru unele extracte, prin metoda electrochimică în comparație cu TAC obținut prin chemiluminescență, pot fi văzute în Tabelul 3.10.

În funcție de tipul și activitatea componentelor antioxidante din extracte, valorile variază de la 20,5 la 54,2 mg 100 mL extract și **sunt comparabile între cele două metode**.

Folosind **corelația lui Pearson** pe același set de date, a fost obținut un coeficient de corelație  $r = 0,822$ , ceea ce indică o corelație pozitivă între cele două metode. Această valoare mai mică poate fi explicată datorită **diferențelor semnificative dintre cele două metode**, în care chemiluminescența utilizează mai multe substanțe chimice și markeri. Graficul de dispersie a

rezultatelor din Figura 3.33 arată modul în care datele pentru cele două metode urmăresc o tendință liniară, în conformitate cu valoarea coeficientului de corelație.

Table 3.11. RAC/TAC-ul exprimat în TE pentru unele extracte din cătină (Hf) și lavandă (Lf)

Extract	RAC <sub>EC</sub>	TAC <sub>CL</sub>
	TE (mg/100 mL E)	TE (mg/100 mL E)
1.Hf Aa US	45,1 ± 0,22	49,2 ± 0,90
2.Hf Ab T	42,0 ± 0,85	42,5 ± 1,40
3.Hf Ga T	22,0 ± 0,90	29,4 ± 1,00
3.Hf Ga US	47,8 ± 0,36	44,6 ± 0,82
3.Lf Ga T	54,2 ± 1,05	52,8 ± 4,60
4.Hf Gb US	53,5 ± 1,28	44,8 ± 3,90
4.Lf Gb US	31,7 ± 0,50	20,5 ± 0,84
5.Hf PGa T	42,3 ± 0,78	39,9 ± 1,50
5.Hf PGa US	48,4 ± 0,36	48,1 ± 0,80
6.Hf PGb T	35,0 ± 0,60	40,7 ± 1,50

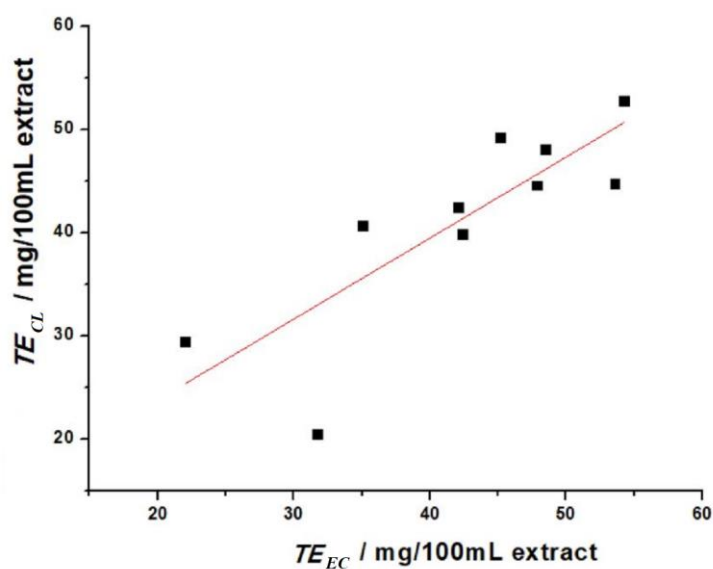


Fig. 3.33. Corelarea valorilor RAC electrochimic (EC) și TAC chemiluminescent (CL) exprimate în TE. Coeficient de corelație:  $r = 0,822$ . [199]

### 3.7.2.2 Corelarea TAC electrochimic cu TAC chemiluminescent

Extractul alcoolic de cătină (1.Hf Aa T) prezintă o capacitate antioxidantă totală mai mare când este analizat prin amperometrie (TAC = 80 mg/100 ml), spre deosebire de rezultatul obținut prin chemiluminescență (TAC = 17 mg/100 mL). La analiza extractului hidroalcoolic de cătină (2.Lf Ab US), ambele metode au o valoare similară (73 și 75,4 mg/ 100 ml). Extractele de cătină și de lavandă obținute cu glicerol și propilen glicol păstrează o tendință similară pentru ambele metode de caracterizare (figura 3.34).

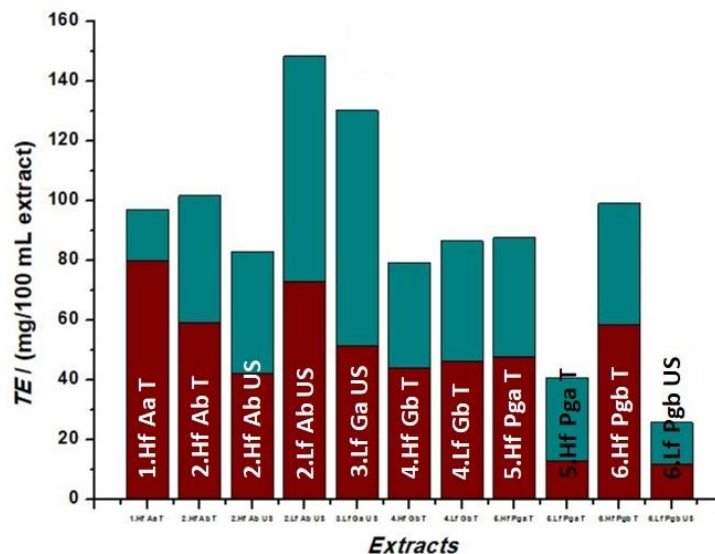


Fig. 3. 34 Histograma TAC pentru determinări CL (maro) și electrochimie (verde) în echivalent Trolox, pentru unele extracte. [200]

Folosind **corelația lui Pearson** cu același set de date ( $TAC_{EC}$  și  $TAC_{CL}$ ), s-a obținut o bună corelație pozitivă, cu un coeficient de corelație Pearson,  $r = 0.958$ . Această valoare demonstrează acuratețea unei detecții amperometrice și estimarea AC prin TAC comparativ o metodă clasică elaborată, cum este chemiluminescența.

În principal, datele obținute prin măsurătorile CV și DPV par să urmeze aceeași tendință ca și măsurătorile CL, cu excepția extractelor alcoolice comparate mai sus. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că **CV, DPV și CL** se concentrează asupra conținutului **fenolic** al extractelor, în timp ce cătina are o concentrație mare de **acid ascorbic**, prezentând diferite abilități de captare/anihilare a ROS, mai bine evidențiate prin determinări **amperometrice**.

## 3.8 Concluzii

**Scopul** acestui capitol a constat în **dezvoltarea** unei **metode noi de diagnostic molecular** pentru **evidențierea și cuantificarea capacității antioxidante totale** ca *marker al stresului oxidativ* și aplicația ei pe probe reale.

**Metoda nouă folosită:** senzori electrochimici cu nanoparticule de aur cu rol de **enzime artificiale (nanozime de aur)**

**Senzorii electrochimici cu nanozime de aur** au fost **caracterizați și evaluați** prin intermediul voltametriei ciclice (CV) și a spectroscopiei de impedanță electrochimică (EIS). S-a dovedit că **AuNP-urile acționează ca biocatalizatori (nanozime de aur)**.



**Metodele electrochimice voltametrice, CV și DPV, folosite împreună cu senzori electrochimici cu nanozime de aur, au oferit o alternativă mai rapidă și mai simplă față de metodele clasice pentru evaluarea capacității antioxidante totale.**

**Capacitatea antioxidantă totală, AC, a fost estimată și cuantificată folosind zona anodică, A, a CV-urilor și valorile indicelui electrochimic, EI, din DPV, înregistrate cu senzorul cu nanozime de aur. O bună corelare a fost obținută între metode și tipul probelor.**

**Capacitatea antioxidantă totală relativă (RAC) și absolută (TAC) împreună cu activitatea antioxidantă totală a probelor au fost estimate și cuantificate folosind senzori electrochimici cu nanozime de aur.**

**Metoda electrochimică care folosește senzori electrochimici cu nanozime de aur pentru determinarea RAC-ului și TAC-ului a fost validată comparativ cu metoda spectrofotometrică UV-Vis și chemiluminiscentă.**

**Gradul de recuperare al RAC-ului obținut electrochimic comparativ cu cel spectrofotometric a variat între 85% și 108%. Corelația lui Pearson pe același set de date, a indicat un coeficient de corelație, electrochimic comparativ chemiluminiscentă:  $r_1 = 0,822$ , pentru RAC și  $r_2 = 0,958$  pentru TAC. Valorile obținute au indicat o corelație pozitivă între cele metode.**

**Se recomandă folosirea senzorilor electrochimici cu nanozime de aur, pentru evidențierea și cuantificarea capacității antioxidante totale ca marker al stresului oxidativ și dezvoltarea metodei pentru probele biologice (salivă, ser, urină).**

## CONCLUZII GENERALE

### CONTRIBUȚII PERSONALE

**Scopul** acestei teze de doctorat a constat în dezvoltarea unor **metode de diagnostic molecular pentru** cuantificarea unor biomarkeri de interes și evidențierea/evaluarea **interacțiunilor biomoleculare** pentru aplicații medicale.

În acest scop au fost urmărite și realizate următoarele **obiective**:

1. dezvoltarea unei **metode noi de identificare și cuantificare a dopaminei ca biomarker al bolilor neurodegenerative** prin realizarea și testarea **(bio)senzorilor electrochimici**.

2. dezvoltarea unei **metode noi de identificare și cuantificare a glucozei ca biomarker al diabetului zaharat** prin realizarea și testarea **biosenzorilor electrochimici și optici**.

3. dezvoltarea unei **metode noi de evidențiere și cuantificare a capacității antioxidante totale ca marker al stresului oxidativ** prin realizarea și testarea **senzorilor electrochimici cu enzime artificiale (nanozime)**.

Cuantificarea **dopaminei (DA)** în mediul fiziologic, prezintă interes deoarece aceasta este un **neurotransmițător important** care este legat de **o mare varietate de afecțiuni medicale**. Identificarea selectivă a DA permite **monitorizarea DA ca biomarker de prognostic**. **Biosenzorii electrochimici enzimatici** au oferit un răspuns selectiv, în timp real cu sensibilitate mare.

Astfel, **cuantificarea dopaminei** a fost realizată în **soluții standard** și au fost obținuți **parametrii curbelor de etalonare ale senzorilor** cu suprafață modifică cu filme polimerice subțiri de **metaloporfirină (CoP)** și **tirozinază (Tyr)** (sensibilitate, domeniul de liniaritate, limită de detecție). S-a demonstrat că CoP acționează ca un **mediator electrochimic** în timpul **reacției catalizate de enzimă**, măsurătorile CV și EIS au evidențiat **transferul îmbunătățit al electronilor**.

**Prin comparație** cu senzorul Au-CoP, pentru **biosenzorul Au-CoP-Tyr** **separarea vârfurilor** de oxidare a DA și AA a fost **mai mare**, iar vârfurile DA au fost mult mai evidențiate. Aceste fapte sunt reflectate în **sensibilitatea mai ridicată și LOD mai scăzută pentru biosenzorul Au-CoP-Tyr față de DA în prezența AA**.

**Sensibilitatea biosenzorului Au-CoP-Tyr a fost de  $1,22 \pm 0,02 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$** , cu o **limită de detecție de  $0,43 \mu\text{M}$**  și un interval de liniaritate până la  **$30 \mu\text{M}$** , comparabilă cu rezultatele găsite în literatură pentru senzorii pe bază de nanoparticule.

Studii ale **interferențelor** au fost realizate asupra senzorului electrochimic de dopamină. Metoda a permis o **separare a semnalului DA în prezența acidului ascorbic**, în timp ce semnalul datorat **acidului uric a fost ne semnificativ**. În prezența acidului ascorbic (principalul interferent în probele biologice) a existat o ușoară scădere a sensibilității.

**Repetabilitatea și reproductibilitatea** metodei de identificare și cuantificare a dopaminei au fost realizate prin determinări ale dopaminei cu senzori și biosenzori diferiți. **Biosenzorul Au-CoP-Tyr și-a menținut activitatea până la 95% în prima săptămână**, scăzând la mai puțin de 50% în a 9-a zi și continuându-și scăderea ulterior, în comparație cu senzorul Au-CoP, a cărui sensibilitate a scăzut după două zile, **Biosenzorul a prezentat sensibilitate mare și stabilitate bună până la șapte zile**. **Reproductibilitatea biosenzorului** a fost determinată prin studierea activității a trei senzori construiți în condiții identice, obținându-se un **RSD = 2,48%**.



Ambii senzori au fost analizați în prezența medicamentelor de dopamină disponibile în comerț, și rezultatele au prezentat un grad bun de recuperare.

**Gradul de recuperare al concentrațiilor obținute cu biosenzorul electrochimic față de cele adevărate (adăugate) a variat între 93% și 114%. RSD au avut o valoare de până la 4,7%:**

#### **Concluzie 1:**

**Se recomandă folosirea biosenzorilor de aur, Au-CoP-Tyr, pentru dozarea dopaminei *in vitro* (medicamente) și dezvoltarea metodei pentru probele biologice (salivă, ser, urină) prin realizarea unui dispozitiv portabil/purtabil și ușor de utilizat.**

**Concentrația glucozei din sânge este principalul criteriu de diagnostic pentru diabetul zaharat și este un instrument util pentru monitorizarea pacienților. Auto-monitorizarea glicemiei reprezintă un instrument valoros pentru gestionarea diabetului cu scopul de a ajuta pacientul, în timp real, să realizeze și să mențină concentrațiile normale de glucoză din sânge. Astfel pacientul are nevoie să poată folosi acasă dispozitive ieftine, portabile, ușor de utilizat cum sunt biosenzorii electrochimici enzimatici (glucometre).**

Astfel, **cuantificarea glucozei a fost realizată în soluții standard și au fost obținuți parametrii curbelor de etalonare ale senzorilor (aur și imprimați cu film de carbon) cu suprafețe modificate cu structuri enzimactice multistrat auto-ansamblate (sensibilitate, domeniul de liniaritate, limită de detecție).**

Două structuri LbL enzimactice auto-ansamblate au fost depuse pe suprafețele senzorilor: **PEI<sup>+</sup>/GOx** și **{chit<sup>+</sup>(GOx)}/PSS<sup>-</sup>**. Discuri cu film de aur (senzori SPR) au fost utilizate pentru a evalua interacțiunile implicate în imobilizarea biomoleculelor pe suprafețe prin **rezonanța plasmonilor de suprafață**.

**Sensibilitatea biosenzorului Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}/PSS<sup>-</sup>}<sub>2</sub> a fost cea mai mare,  $237 \pm 3 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$  cu o limită de detecție de  $41 \mu\text{M}$  și un interval de liniaritate între 0,1 și 1,4 mM, comparabilă cu rezultatele găsite în literatură. În prezența interferențelor a existat scădere a sensibilității, biosenzorul a pierdut 34% din sensibilitatea sa, ajungând la valoarea  $156 \pm 5 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$  și o limită de detecție de  $56 \mu\text{M}$ .**

Studii ale **interferențelor** au fost realizate asupra biosenzorului de glucoză. Metoda a permis o **obținerea unui semnal datorat glucozei în prezența interferențelor**, în timp ce semnalul datorat acestora a fost nesemnificativ. În prezența interferențelor a existat o ușoară scădere a sensibilității, biosenzorul a pierdut 34% din sensibilitatea sa, ajungând la valoarea  $156 \pm 5 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$  și o limită de detecție de  $56 \mu\text{M}$ .

**Stabilitatea biosenzorului Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(GOx)}/PSS<sup>-</sup> a fost studiată în timp arătând ca sensibilitatea sa a crescut la o valoare mai mare după 8 zile, după care aceasta a început să scadă și să se stabilizeze la 65% din valoare inițială. Reproducibilitatea biosenzorului a fost determinată prin studierea activității a trei senzori construiți în condiții identice, obținându-se un RSD de 6,7%.**

Biosenzorii **Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}/PSS<sup>-</sup>}<sub>2</sub> au fost testați pe probe reale pentru **cuantificarea glucozei**. Valorile obținute au fost în acord cu cele obținute prin metoda **spectrofotometrică standard cu un grad bun de recuperare (între 97 și 105%).****

#### **Concluzie 2:**

**Se recomandă folosirea biosenzorilor electrochimici, cu structuri enzimactice multistrat auto-ansamblate, Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOx)}/PSS<sup>-</sup>}<sub>2</sub>, pentru cuantificarea glucozei și dezvoltarea metodei pentru probele biologice (salivă, ser, urină), prin realizarea unui dispozitiv portabil/purtabil și ușor de utilizat.**

**Stresul oxidativ (OS)** a beneficiat de o atenție deosebită în ultimele două decenii, datorită descoperirii faptului că statusul **oxidativ anormal evaluat de biomarkerii circulanți**, a fost asociat pacienților cu boli cronice (diabet, sindromul ovarului polichistic, cancer și boli neurologice). **Evidențierea OS *in vivo* reprezintă o mare provocare. Beneficiile antioxidantilor** sunt demonstrate *in vitro* prin stoparea oxidării biomoleculelor datorită **anihilării/captării ROS de acestea**. Gradul de anihilare al  $H_2O_2$  a fost **cuantificat** cu ajutorul **senzorilor electrochimici cu nanozime de aur** și folosit pentru **cuantificarea capacității antioxidante totale**, ca marker al stresului oxidativ.

**Senzorii electrochimici cu nanozime de aur (AuNP)** au fost **caracterizați și evaluați** prin intermediul voltametriei ciclice (CV) și a spectroscopiei de impedanță electrochimică (EIS). S-a dovedit că **AuNP-urile acționează ca biocatalizatori (nanozime de aur)**.

**Metodele electrochimice voltametrice, CV și DPV**, a folosind senzori electrochimici cu **nanozime de aur**, au oferit o **alternativă mai rapidă și mai simplă** față de metodele clasice pentru **evaluarea capacității antioxidante totale**.

**Capacitatea antioxidantă totală, AC**, a fost **estimată și cuantificată** folosind **aria zonei anodice, A**, a CV-urilor și valorile **indicelui electrochimic, EI**, din DPV, înregistrate cu senzorul cu nanozime de aur. O **bună corelare** a fost obținută între metode și tipul probelor.

**Capacitatea antioxidantă totală relativă (RAC) și absolută (TAC), împreună cu activitatea antioxidantă totală** a probelor au fost estimate și cuantificate folosind senzori electrochimici cu nanozime de aur.

**Metoda electrochimică** care folosește senzori electrochimici cu nanozime de aur a fost **validată** comparativ cu metoda **spectrofotometrică UV-Vis și chemiluminiscentă**.

**Gradul de recuperare** al **RAC-ului** obținut electrochimic **comparativ** cu cel **spectrofotometric** a variat între **85% și 108%**.

**Corelația lui Pearson** pe același set de date, a indicat un coeficient de corelație, **electrochimic comparativ chemiluminiscentă:  $r_1 = 0,822$** , pentru **RAC** și  **$r_2 = 0.958$**  pentru **TAC**. Valorile obținute au indicat o **corelație pozitivă** între cele metode.

### Concluzie 3.

**Se recomandă folosirea senzorilor electrochimici cu nanozime de aur**, pentru **evidențierea și cuantificarea capacității antioxidante totale ca marker al stresului oxidativ și dezvoltarea metodei pentru probele biologice** (salivă, ser, urină), prin realizarea unui dispozitiv **portabil și ușor de utilizat**.

**Senzorii electrochimici dezvoltați în această teză** au avut la bază **nanomaterialele**, atât naturale (**biomolecule enzimatic**), cât și artificiale (**nanoparticule de aur**) și au reprezentat **modele demonstrative experimentale** care vor permite **realizarea și testarea unor sisteme noi**, cu **îmbunătățiri semnificative**, pentru **diagnosticarea timpurie a patologiilor corespunzătoare și abordări terapeutice inovatoare**.

**Studiile viitoare** vor urmări realizarea unor **dispozitive portabile/plasturi lipiți pe piele, neinvazivi și ușor de utilizat**, pentru **auto-monitorizarea biomarkerilor în cazul pacienților cu patologii cronice**.



#### REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. **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.
2. A.A. Rajathi et al, Review on Biomedical Instrumentation/Biomedical Engineering and its Various Applications, IJAREEIE, 3(3) March 2014 7707-7719.
3. **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.
4. **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.
5. C. You, M. Bhagawati, A. Brecht, J. Piehler, Affinity capturing for targeting proteins into micro and nanostructures. Anal. Bioanal. Chem. 2009, 393, 1563-1570.
6. 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.
7. R.M. Iost, W. Cantanhede da Silva, J.M. Madurro, A.G Brito Madurro, L.F. Ferreira, F.N. Crespilho, Electrochemical nano(bio)sensors: advances, diagnosis and monitoring of diseases, Frontiers in Bioscience 2011, E3, 663-689.
8. V.K. Khanna, New-generation nano-engineered biosensors, enabling nanotechnologies and nanomaterials. Sens. Rev., 2008, 28, 39-45.
9. Y.-H.g Yun et. al., Tiny Medicine: Nanomaterial-Based Biosensors, Sensors, 2009, 9, 9275-9299.
10. G. Rocchitta et al, Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids, Sensors 2016, 16, 780-801.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. N. Ohta, A. Robertson, Colorimetry: Fundamentals and Applications; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2005, ISBN 0-470-09472-9.
18. 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.
19. E.-H. Yoo, S.-Y. Lee, Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice, Sensors 2010, 10, 4558-4576; doi:10.3390/s100504558.





20. 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>.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. T.M. Canh, *Biosensors*, Chapman & Hall, 1993, London.
26. Sang, S. Zhang, W. Zhao Y. Review on the Design Art of Biosensors, în cartea: „State of the Art in Biosensors - General Aspects”, Rinken T. (Ed.), InTech, 2013.
27. D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. *Sensors* 2008, 8(3), 1400-1458.
28. R. Buck, M. Umana, E. Bowden, eds., *Biosensor Technology: Fundamentals and applications*, Marcel Dekker Inc, New York 1990,
29. P.T. Frangopol, M. Sanduloviciu, Ed., *Current topics in biophysics*, Vol 5, *Biosensors: fundamentals*, Ed. Universităţii “Al.I. Cuza”, Iaşi, 1996,
30. F. Scheller, F. Schubert, *Biosensors*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1992,
31. J. S. Schultz, „Biosensors” în carte „*Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*”, Marcel Dekker Inc, New York, 2004, 29 – 143.
32. 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,
33. 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,
34. 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 .
35. J.Wang, *Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review*, *Journ. Of Pharm. and Biomed. Analysis*, 1999, 47, 159.
36. J.F. Liang, Y.T. Li, V.C. Yang, *Biomedical application of immobilised enzymes*, *J. Pharmaceutical Science*, 2000, 89(8), 979.
37. N. Dimcheva, E. Horozova, Z. Jordanova, *A glucose oxidase immobilized electrode based on modified electrode*. *Z. Naturforsch.* 2002, 57c, 705.
38. E.C. Nice, B. Catimel, *Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions*, *BioEssays*, 1999, 21, 339-352.
39. CY. Lin, Tai DF, Wu TZ, *Discrimination of peptides by using a molecularly imprinted piezoelectric biosensor*, *Chemistry*, 2003, 9(20), 5107-5110.
40. 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.
41. 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.
42. 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.



43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. C.P. Price, Point-of-care testing in diabetes mellitus. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003, 41, 1213–1219.
51. 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.
52. M.W. Slein, D-glucose: Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Academic Press; New York, NY, USA: 1963. p. 117.
53. A. Heller, B. Feldman, Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. *Chem. Rev.* 2008, 108, 2482–2505.
54. American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes—2010, *Diabetes Care.* 2010 Jan; 33(Suppl 1): S11–S61.
55. E.-H. Yoo, S.-Y. Lee, Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice, *Sensors (Basel).* 2010, 10(5), 4558–4576.
56. D. P. Nikolelis, G. Paraskevi Nikoleli (Editori), *Nanotechnology and Biosensors*, Elsevier Inc. All, 2018, ISBN 978-0-12-813855-7.
57. R. S. Singh, R. R. Singhanian, C. Larroche (Editori), *Advances in Enzyme Technology*, Elsevier B.V. All, 2019, ISBN 978-0-444-64114-4.
58. 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.
59. 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
60. 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
61. 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.



62. 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
63. 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
64. 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
65. S. Sotiropoulou, V. Gavalas, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, Novel Carbon Materials in Biosensor Systems, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 18, 2003, pp. 211-215.
66. 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
67. 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.
68. 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,
69. J. Wang, „Electroanalysis and biosensors”, *Analytical Chemistry*, 71, 1999, 328R-332R,
70. D. R.Thevenot, K. Toth, R. A.Durst, G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16, 121 - 131.
71. M. Yu. Vagin, E.E. 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.
72. 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.
73. E. M. Garrido; C. Delerue-Matos; J. Lima; A. Brett Electrochemical Methods in Pesticides Control, *Analytical Letters*, 2004, 37(9), 1755 – 1791.
74. 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.
75. 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.
76. F. Tian, J. Zhou, B. Jiao, Y. He, A nanozyme-based cascade colorimetric aptasensor for amplified detection of ochratoxin A, *Nanoscale*, Issue 19, 2019,
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.



81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. J. R. Macdonald, W. R. Kenan, *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems*, Wiley-Interscience, 1987.
86. J. R. Scully, D. C. Silverman, M. W. Kendig (Editor), *Electrochemical Impedance: Analysis and Interpretation*, Astm Intl, 1993.
87. 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).
88. E. Barsoukov, J. R. Macdonald (Editor), *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, Wiley-Interscience; 2 edition, 2005,
89. <http://www.cartage.org.lb/en/themes/Sciences/Chemistry/Electrochemis/Electrochemical/mainpage.htm>
90. B. C. Baker, A. C. West, Electrochemical Impedance Spectroscopy Study of Nickel-Iron Deposition, *Journal of The Electrochemical Society*, 1997, 144(1), 164,
91. 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.
92. M. Matsumiya, R. Takagia, „Electrochemical Impedance Spectroscopic Study on Eu<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup> Using Liquid Metal Cathodes in Molten Chlorides”, *Z. Naturforsch.* 2000, 55a, 673.
93. J. M. Elliott, J. R. Owen, Electrochemical impedance characterisation of a nanostructured (mesoporous) platinum film, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, 2, 5653.
94. G. Ragoisha, A. Bondarenko, Fast electrochemical impedance spectroscopy for solid state chemistry, *The 5th International Conference Solid State Chemistry*, Bratislava, 2002.
95. 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.
96. 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.
97. R.J. Green, R.A. Frazier, K.M. Shakesheff, M.C. Davies, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 2000, 21, 1823-1835.
98. 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.
99. 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.
100. 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.



101. 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.
102. V. Carralero Sanz, M. Luz Mena, A. Gonzales-Cortes, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingaron, 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.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. 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, 15354-13561.
107. 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.
108. 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
109. J. Segura-Aguilar, D. Metodiewa, C.J. Welch, Metabolic activation of dopamine oquinones 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 .
110. 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.
111. D.G. Graham, Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones, *Mol Pharmacol*, 1978, 14, 633–643.
112. 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.
113. D.C. Tse, R.L. McCreery, R.N. Adams, Potential oxidative pathways of brain catecholamines, *J Med Chem* 1976, 19, 37–40.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. 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.



118. A.A. Boulton, G.B. Baker, A.N. Bateson, In Vivo Neuromethods, Human Press Inc., Totowa, New Jersey, 1998.
119. 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.
120. ML. Dubocovich, MA. Rivera-Bermudez, MJ. Gerdin, MI. Masana, Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Frontiers of biology*. 2003, 8, d1093-108.
121. U.E. Majewska, K. Chmurski, K. Biesaga, A.R. Olszyna, R. Bilewicz, Dopamine Oxidation at Per(6-deoxy-6-thio)- $\alpha$ -Cyclodextrin Monolayer Modified Gold Electrodes, *Electroanalysis* 2006, 18,1463-1470.
122. 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.
123. H. Ernst, M. Knoll, Electrochemical characterisation of uric acid and ascorbic acid at a platinum electrode, *Anal. Chim. Acta* 2001, 449. 129-134.
124. 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.
125. C.R. Raj, T. Okajima, T. Ohsaka, Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine. *J. Electroanal. Chem.* 2003, 543, 127-133.
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. 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, 4789-4798.
130. 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.
131. 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.
132. 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
133. S. Mena, A. Ortega, J. Estrela, Oxidative Stress in Environmental-Induced Carcinogenesis. *Mutation Research*, (2009) Vol. 674, p.36-44.
134. 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
135. 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.
136. 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.



137. S.B. Nimse, D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 2015, 5, 27986-28006, DOI: 10.1039/c4ra13315c
138. 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
139. ZC. Thent, S. Das, Involvement of liver in diabetes mellitus: herbal remedies., *Clin Ter.* 2014, 165(4), 223-30.
140. 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.
141. 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.
142. SA. Ganie et al., Antioxidant and hepatoprotective effects of *Crataegus songarica* methanol extract, *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2014, 33(2), 131-43.
143. 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.
144. MH. Farzaei, SF. Ghasemi-Niri, AH. Abdolghafari, M. Baeri, 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.
145. 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.
146. 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.
147. 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.
148. 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.
149. T.K.Lim, *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*; Springer Netherlands: Dordrecht, The Netherlands, 2014, 6, 450–489.
150. B. Lorrain, I.Ky, L. Pechamat, P. Teissedre, Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines and extracts. *Molecules* 2013, 18, 1076–1100.
151. N. Cotelle, Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001, 1, 569–590.
152. 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.
153. 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.
154. S. Drăgan, T. Nicola, R. Ilina, 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.
155. 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.
156. 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.
157. 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.



158. Duke, J A. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. Boca Raton, FL. CRC Press.1992.
159. 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.
160. 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.
161. 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
162. 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
163. 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.
164. 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.
165. 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.
166. H. Schulz, M. Baranska, Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 2007, 43, 13-25.
167. **M. Florescu\***, M. David, Tyrosinase-based biosensor for selective dopamine detection, *Sensors*, 2017, 17, 1314-1329.
168. **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.
169. **M. Florescu**, A. Valceanu, Ghe. Coman, Aplicații ale tirozinazei și lacazei: biosenzori enzimatici electrochimici, *Jurnal Medical Brasovean*, 2013, 2, 16-21.
170. 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.
171. 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.
172. M. Mohammadi, S. Akhondzadeh, Advances and considerations in attention-deficit/hyperactivity disorder pharmacotherapy, *Acta med Iran*, 2011, 49, 487–498.
173. T. Obata , Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation, *J. Neural Transm*, 2002, 109, 1159–1180.
174. <https://www.psychologytoday.com/basics/dopamine>
175. 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.
176. 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.
177. 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.





178. 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.
179. Cj. Watson, Bj. Venton, Rt. Kennedy, In vivo measurements of neurotransmitters by microdialysis sampling, Anal. Chem., 2006, 78, 1391-1399.
180. 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.
181. 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.
182. G. Giancane, L. Valli, State of art in porphyrin Langmuir-Blodgett films as chemical sensors, Adv. Colloid Interface Sci., 2012, 171-172, 17-35.
183. 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.
184. 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.
185. **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.
186. 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).
187. 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.
188. 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.
189. M. Campas, B. Bucur, S.Andreescu, J.-L. Marty: “Application of oriented immobilization to enzyme sensors”. Current Topics in Biotechnology 2004, 1, 95-107.
190. 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.
191. 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.
192. 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.
193. A. Wisitsoraat, et al, , Graphene-PEDOT:PSS on screen printed carbon electrode for enzymatic biosensing, J. Electroanal. Chem. 2013, 704, 208-213.
194. 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.
195. A. Baba, P. Taranekar, R.R. Ponnepati, 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.
196. I.N. Serdyuk, N.R. Zaccai, J. Zaccai, *Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics Function*, Cambridge University Press, 2007
197. 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.
198. **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.
199. 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.
200. 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.
201. 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.
202. 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.
203. 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.
204. I.I.Suni, Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *Trends in Anal. Chem.* 2008, 27(7) 604-611.
205. H.Wei, E. K. Wang, Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 6060–6093.
206. X. Wang, Y. Hu, H. Wei, Nanozymes in bionanotechnology: From sensing to therapeutics and beyond. *Inorg. Chem. Front.*, 2016, 3, 41.
207. D.A.C. Brownson, C.E. Banks, Graphene electrochemistry: an overview of potential applications. *Analyst* 2010, 135, 2768-2778, DOI: 10.1039/C0AN00590H
208. 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
209. 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
210. 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
211. 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.
212. 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.
213. 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



214. 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.
215. 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.
216. 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.
217. A. Gliszczyńska-Świgło, 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.
218. A. A. Bunaciu, A. F. Dăneţ, Ş. 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.
219. 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.
220. 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.

## REZUMAT

**Bioinstrumentele**, cum sunt **(nano)senzorii și biosenzorii**, mai *simple*, mai *rapide* și mai *ieftine* decât testele clasice, cu răspuns *rapid în timp real*, dimensiuni *reduse*, cu sensibilitate, specificitate și selectivitate *mari*, pot fi folosite în diagnosticul molecular. **Scopul** acestei teze de doctorat, prezentat de-a lungul a trei capitole, a constat *în realizarea și testarea unor sisteme senzoriale noi, cu îmbunătățiri semnificative*, **(nano)(bio)senzori electrochimici, ca metode de diagnostic molecular** pentru cuantificarea unor **biomarkeri** de interes.

**Cuantificarea dopaminei** a fost realizată folosind **senzori de aur cu suprafață modificată cu filme polimerice subțiri de metaloporfirină (CoP) și tirozinază (Tyr)** pentru care au fost obținuți parametrii curbilor de etalonare. Biosenzorul **Au-CoP-Tyr** a prezentat sensibilitate mai mare ( $1,22 \pm 0,02 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ ) decât a senzorului **Au-CoP**, cu o limită de detecție de **0,43  $\mu\text{M}$** , comparabilă cu rezultatele găsite în literatură. Senzorii au fost analizați pe probe reale, cu un grad mare de recuperare al concentrațiilor obținute față de cele adevărate (între 93 și 114%), RSD = 4,7%. **Cuantificarea glucozei** a fost realizată folosind **senzori electrochimici (de aur și carbon) cu suprafețe modificate cu două structuri enzimice multistrat auto-ansamblate**. Discuri cu film de aur (**senzori SPR**) au fost utilizate pentru a **evalua interacțiunile implicate în imobilizarea biomoleculilor** pe suprafețe prin *rezonanța plasmonilor de suprafață*. Sensibilitatea biosenzorului Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOx)/PSS}<sub>2</sub> a fost cea mai mare, ( $237 \pm 3 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ ), cu o limită de detecție de **41  $\mu\text{M}$** , comparabilă cu rezultatele obținute în literatură. Biosenzorii au fost testați pe probe reale. Valorile obținute au fost în acord cu cele obținute prin metoda spectrofotometrică clasică cu un *grad bun de recuperare* (între 97 și 105%). **Senzorii electrochimici cu nanozime de aur, AuNP**, (enzime artificiale), caracterizați și evaluați electrochimic, au fost folosiți pentru **cuantificarea capacității antioxidante totale** (relativă, RAC, și absolută, TAC), ca markeri ai *stresului oxidativ*. Metoda electrochimică **a fost validată** comparativ cu metoda spectrofotometrică și chemiluminiscentă. Gradul de recuperare al RAC-ului obținut *electrochimic* comparativ cu cel *spectrofotometric* a variat între 85% și 108%. Valorile obținute au indicat o corelație pozitivă între metoda *electrochimică* comparativ cu *chemiluminiscenta*: coeficienți Pearson 0,822 (RAC) și 0,958 (TAC).

**În concluzie, sistemele senzoriale noi, selectivitate și specifice, cu răspuns rapid în timp real**, au fost *realizate și testate* pentru **evidențierea și cuantificarea biomarkerilor specifici (dopamină, glucoză, capacitate antioxidantă totală)**, pentru **diagnosticarea timpurie a patologiilor corespunzătoare**. **Studiile viitoare** vor urmări realizarea unui **dispozitiv portabil și ușor de utilizat pentru auto-monitorizarea biomarkerilor** în cazul pacienților cu patologii cronice.



## ABSTRACT

**Bioinstrumentation**, such as **(nano)sensors and biosensors**, *simpler, faster and cheaper* than classical tests, with *fast* response in *real time*, *small* size, with *high* sensitivity, specificity and selectivity, can be used in molecular diagnostics. The aim of this doctoral thesis, presented along with three chapters, was to in the *development and testing of new sensory systems, with significant improvements*, **(nano) (bio) electrochemical sensors as molecular diagnostic methods** for the quantification of **some biomarkers** of interest.

**Quantification of dopamine** was performed using **gold surface sensors modified with thin polymeric films of metaloporphyrin (CoP) and tyrosinase (Tyr)** for which parameters of calibration curves were obtained. The **Au-CoP-Tyr biosensor** showed higher sensitivity ( $1.22 \pm 0.02 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ ) than the Au-CoP sensor, with a detection limit of **0.43  $\mu\text{M}$** , comparable to the results found in the literature. The sensors were analyzed in the presence of real samples, with a high degree of recovery of the obtained concentrations from the real ones (between 93 and 114%), RSD = 4.7%. **The glucose quantification** was performed with the help of **electrochemical sensors (gold and carbon film) with modified surfaces with wo auto-assembled multilayer structures**. Gold film discs (**SPR sensors**) were used to evaluate the interactions involved in the immobilization of biomolecules on surfaces by *surface plasmon resonance*. The sensitivity of the **Au/PEDOT/{chit<sup>+</sup>(NG+GOx)/PSS}<sub>2</sub>** biosensor was the highest ( $237 \pm 3 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ ), with a detection limit of **41  $\mu\text{M}$**  comparable to the results found in literature. Biosensors were tested on real samples. The values obtained were consistent with those obtained by the standard spectrophotometric method with a good recovery rate (between 97 and 105%). **Electrochemical sensors with gold nanozyme (AuNP)**, electrochemically characterized and evaluated, have been used to quantify **total antioxidant capacity** (relative RAC, and absolute TAC) as markers of oxidative stress. The electrochemical method was validated compared to the spectrophotometric method and chemiluminescence. The recovery rate of the electrochemically obtained RAC compared to the spectrophotometric ranged from 85% to 108%. The obtained values indicated a positive correlation between the electrochemical method compared to the chemiluminescence: Pearson coefficients 0.822 (RAC) and 0.958 (TAC).

**In conclusion**, **new sensory, selective and specific sensor systems with fast real-time response** have been *developed and tested* to **highlight and quantitate specific biomarkers (dopamine, glucose, total antioxidant capacity)**, for **early diagnosis of appropriate pathologies**. **Future studies** will aim to develop a **portable/wearable**, and easy-to-use for **self-monitoring of biomarkers** in patients with chronic diseases.



## CV (Română)

### Informații personale

---

Nume, Prenume **Moldovan (Florescu), Monica**  
E-mail florescum@unitbv.ro

### Experiența profesională

---

Perioada	1998 - prezent
Funcția sau postul ocupat	Conferentiar Universitar, Sef De Lucrari, Asistent Universitar
Activități și responsabilități principale	Activitate didactica cu studentii, Cercetari stiintifice in domeniul biofizicii,
Numele și adresa angajatorului	Universitatea Transilvania din Brasov,
Tipul activității sau sectorul de activitate	Educatie si cercetare
Perioada	1994 - 1998
Funcția sau postul ocupat	Profesor
Activități și responsabilități principale	Activitate didactica teoretica si de laborator cu elevii.
Numele și adresa angajatorului	Liceul "N. Titulescu" din Brasov,
Tipul activității sau sectorul de activitate	Educatie

### Educație și formare

---

Perioada	2000 - 2007
Calificarea / diploma obținută	Diploma de Doctor in Fizica
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea din Bucuresti
Perioada	2000 - 2002
Calificarea / diploma obținută	Diploma de curs postuniversitar, "Monitorizarea calității mediului".
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea Transilvania din Brasov
Perioada	1988 - 1993
Calificarea / diploma obținută	Diploma de Licenta
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea din Bucuresti, Facultatea de Fizica

---



---

<b>Competențe și aptitudini organizatorice</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Responsabil de proiect de cercetare complex: SANOMAT, PNIII-P1-1.2-PCCDI-2017-0062, 2018-2020:</li><li>• Grant RO–JINR Dubna: Responsible person for Romania and Chairperson of the Organizing Committee of 8th International Student Summer School “Nuclear Physics – Science and Applications” (NUCPHYS-SC&amp;APPL), 2017, Brasov, Romania.</li><li>• Director de proiect, Tanara Echipa, VEDETAX -PN-II-RU-TE-2014-4-2801.</li><li>• Director de proiect, Parteneriate PNCDI2, TIPSARMER, No. 72-172/2008.</li><li>• MC Member from Romania to COST Action CA15126.</li><li>• Membru in European COST TD 1104 Action - EP4Bio2Med.</li><li>• Membru în comitetul de editori al revistei Journal of Clinical Medicine</li><li>• Editor Asociat al unor numere speciale ale revistelor: Journal of Clinical Medicine, Bioelectrochemistry, Analytical Letters, Sensors, dedicate "IC-ANMBES 2010-2018".</li></ul> <p>Organizare de evenimente științifice (conferințe, workshop-uri, etc.):</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences „IC-ANMBES 2018-2010”, Co-presedinte, Membru in comitetul Stiintific International</li><li>• Sesiune a actiunii COST TD 1104 in cadrul „IC-ANMBES 2014”,</li></ul>
<b>Informații suplimentare</b>	<b>Alte specializări și calificări:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• 2015: Short-Term Scientific Mission, COST TD 1104 Action - EP4Bio2Med, European network for development of electroporation-based technologies and treatments. Universiteit Twente, Institute for Nanotechnology (MESA+), Microfluidics for nanomedicine.</li><li>• 2012: Stagiul de cercetare: Nanoscale Integration Lab, Universitatea Texas-Dallas, USA (dezvoltarea de nanobiosenzori folosind SiNW-FET).</li><li>• 2012: Curs international „Electroporation for Medicine: Basic Knowledge, Applications and Technologies”, Universitatea de Medicina Carol Davila, Bucuresti, Societatea Romana de Biofizica Pura si Aplicata.</li><li>• 2007 – 2008 (12 luni): Bursa Postdoctorat, Facultatea de Medicina si Facultatea de Fizica (Laborator biofizica), Universitatea Wisconsin-Milwaukee, SUA, (studiul tesuturilor biologice (creier) in vivo prin tehnici de spectroscopie dielectrica, EEG).</li></ul>
<b>Cerere brevet</b>	Numărul de înregistrare al cererii de brevet: A/00728/27.09.2018 (OSIM)
<b>Publicații</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 30 articole and 6 rezumate publicate în reviste ISI,</li><li>• peste 500 de citări în reviste cotate ISI, 1 articol publicat în volum indexat ISI,</li><li>• 11 lucrări publicate extenso în volumele conferințelor științifice internaționale și naționale cu editori, ISBN-uri și edituri internaționale,</li><li>• 16 articole publicate în reviste BDI,</li><li>• 89 de participări la conferințe internaționale și naționale, dintre care 76 la conferințe internaționale și 13 la conferințe naționale,</li><li>• 30 de cărți / capitole de cărți, 10 ca autori în edituri internaționale și 9 în edituri naționale, 11 ca editor în edituri naționale</li></ul>

---



## CV (Engleză)

<b>PERSONAL INFORMATION</b>	<b>Florescu, Monica</b> <a href="mailto:florescum@unitbv.ro">florescum@unitbv.ro</a> ,
<b>WORK EXPERIENCE</b>	
From-To	1998 - present
Position	Assistant professor, Associate Professor
Main activities and responsibilities	Didactical activities with students, Scientific research in physics and biophysics (bioelectrochemistry, electrochemical and SPR biosensors, UV-VIS),
Employer's name and locality	Transilvania University of Brasov,
Type of business or sector	Education and research
From-To	1994 - 1998
Position	Teacher of Physics
Main activities and responsibilities	Didactical activities with students.
Employer's name and locality	"N. Titulescu" High School, Brasov,
Type of business or sector	Education
<b>Education and Training</b>	
From-To	2000 - 2007
Qualification awarded	PhD in Physics, <i>Summa cum laude</i> . Specialization Biophysics
Education or training organisation's name and locality	University of Bucharest, Bucharest, Romania
From-To	2000 - 2002
Qualification awarded	Postgraduate Diploma.
Education or training organisation's name and locality	Post-graduate specialization course. Subject: „Environmental quality monitoring” Transilvania University of Brasov, Brasov, Romania
From-To	1988 - 1993
Qualification awarded	Bachelor's (Master equivalent) degree
Education or training organisation's name and locality	University of Bucharest
<b>PERSONAL SKILLS</b>	
Communication skills	Team spirit: I have teamwork experience in educational and research projects both as coordinator and member. Ability to adapt to multicultural environments, gained through experience and research studies in abroad universities;





**Organisational /  
managerial skills**

Good experience in project management and team research projects as director and as manager of the group of students in the educational process.

- Project manager of complex research project: SANOMAT, PNIII-P1-1.2-PCCDI-2017-0062 , 2018-2020:
- Grant RO –JINR Dubna: Responsible person for Romania and Chairperson of the Organizing Committee of 8th International Student Summer School “Nuclear Physics – Science and Applications” (NUCPHYS-SC&APPL), 2017, Brasov, Romania.
- Project Director, establishment of young independent research project, VEDETAX -PN-II-RU-TE-2014-4-2801.
- Project Director, Partnerships PNCDI2 project, TIPSARMER, No. 72-172/2008.
- MC Member from Romania to COST Action CA15126
- Member in European COST TD 1104 Action
- Associate Editor of the journals Bioelectrochemistry, Analytical Letters and Sensors for volumes dedicated " IC- ANMBES 2018"," IC- ANMBES 2016"," IC- ANMBES 2014", " IC- ANMBES 2012", " IC-ANMBES 2010. Organizing scientific events (conferences, workshops, etc.)
- International Conference on Analytical Methods and Nanoanalytical for Biomedical and Environmental Sciences "IC- ANMBES 2018","IC- ANMBES 2016","IC- ANMBES 2014", " IC- ANMBES 2012", "IC-ANMBES 2010", Co-President, Member of International Scientific Committee
- Co-organizing TD 1104 COST Action Meeting Special Session on Electroporation at IC- ANMBES 2014.

**Other specializations  
and qualifications  
(selection):**

- 2015: Short-Term Scientific Mission, COST TD 1104 Action - EP4Bio2Med, European network for development of electroporation-based technologies and treatments. Universiteit Twente, Institute for Nanotechnology (MESA+), Microfluidics for nanomedicine
- 2012: Research Internship: Nanoscale Integration Lab, University of Texas-Dallas, USA (nano-biosensors development using SiNW-FET).
- 2012: International Course "Electroporation for Medicine: Basic Knowledge, Applications and Technologies" Carol Davila University of Medicine, Bucharest, Romanian Society of Pure and Applied Biophysics. October 25-27, 2012.
- 2007 - 2008 (12 months) postdoctoral fellowships, Faculty of Medicine and Faculty of Physics (Biophysics Laboratory), University of Wisconsin-Milwaukee, USA, (the study of biological tissues (brain) in vivo dielectric spectroscopy techniques, EEG)

**Patent application**

**Publications**

Registration number of the patent application: A/00728/27.09.2018 (OSIM)

- 30 articles and 6 abstracts published in ISI journals, over 500 citations in ISI rated journals, 1 article published in volume indexed ISI proceedings,
- 11 papers published extenso in the volumes of international and national scientific conferences with publishers, ISBNs and international publishing houses,
- 16 articles published in BDI-rated magazines,
- 89 participations in international and national conferences, of which 76 at international conferences and 13 at national,
- 30 books / chapters of books, 10 as authors in international publishing houses and 9 in national publishing houses, 11 as editor in national publishing houses