

**Raportul stiintific pentru intreaga perioada de implementare a proiectului**  
**"Realizarea unui sistem electronic pe baza de senzori electrochimici si biosenzori pentru**  
**controlul aminelor biogene"**  
**1 ianuarie 2012 - 30 iunie 2016**

Raportul este structurat pentru fiecare etapa a proiectului. Implementarea proiectului in ceea ce priveste activitatile si rezultatele a fost structurat in cinci etape, care corespunde fiecarui an calendaristic (din 2012 pana in 2016). Activitatile de diseminare desfasurate in perioada de implemenare a proiectului sunt prezentate pentru intreaga perioada de implementare a proiectului. In cele din urma, sunt prezentate concluziile si observatiile finale.

Planul de implementare al proiectului conform contractului de cercetare este prezentat in tabelul urmator:

<b>An</b>	<b>Obiective</b>	<b>Activitati</b>	<b>Rezultate livrate pe etapa</b>
2012	1. Studiile de modelare si simulare a interactiunilor dintre aminele biogene si receptorul senzorilor sau biosenzorilor	1.1 Modelarea mecanismului de interactiune dintre amine biogene si elementul receptor al senzorilor in absenta si la aplicarea unui potential	Publicarea a minim 2 articole ISI  Participarea la minim 3 manifestari stiintifice
		1.2 Modelarea mecanismului de interactiune dintre amine biogene si elementul receptor al biosenzorilor in absenta si la aplicarea unui potential	
		1.3 Simularea dinamicii speciilor chimice la suprafata senzorilor si biosenzorilor	
		1.4 Studiul teoretic al influentei unor parametri (pH, temperatura) asupra raspunsului biosenzorului	
	2. Selectarea design-urilor senzorilor si biosenzorilor	2.1 Studiul design-urilor senzorilor comerciali	
		Design-ul unor noi senzori	
		Utilizarea potentiometriei si voltametriei in masuratorile cu senzori si biosenzori	
	3. Imbunatatirea caracteristicilor senzorilor si design-ul unor noi senzori si biosenzori	3.1. Sinteza si caracterizarea unor materialelor moleculare	
		3.2. Sinteza si caracterizarea polimerilor conductori	
		3.3. Fabricarea de noi senzori si biosenzori: alegerea substraturilor, selectarea si aplicarea metodelor de depunere, imobilizarea enzimelor pe electrozi	

		3.4. Caracterizarea senzorilor si biosenzorilor prin tehnici spectrometrice (UV-Vis, NIR si IR) si microscopice (SEM, BAM si AFM).	
--	--	--	--

An	Obiective	Activitati	Rezultate livrate pe etapa
2013	1. Studii fundamentale privind interactiunile dintre stratul sensibil si mostrele de analizat	1.1 Studiul interactiunilor dintre aminele biogene si stratul activ al senzorilor	Publicarea a minim 2 articole ISI  Participarea la minim 3 manifestari stiintifice
		1.2 Studiul interactiunilor dintre aminele biogene si stratul activ al biosenzorilor	
		1.3 Studiul cineticii enzimaticice a biosenzorilor	
		1.4 Compararea datelor experimentale cu cele obtinute prin modelare si simulare	
	2. Prelucrarea datelor si interpretarea rezultatelor	2.1 Definirea metodelor pentru analiza datelor. Analiza exploratorie	
		2.2 Pre-procesarea datelor experimentale	
	2.3 Aplicarea metodei Analiza Componentelor Principale pentru prelucrarea datelor experimentale		
	2.4 Aplicarea metodelor de clasificare (PLS-DA si SIMCA) pentru prelucrarea datelor experimentale		
	2.5 Stabilirea corelatiilor dintre semnalele senzorilor sau biosenzorilor si rezultatele analizelor fizico-chimice sau senzoriale		

An	Obiective	Activitati	Rezultate livrate pe etapa
2014	1. Testarea performantelor sensibile a senzorilor si biosenzorilor	1.1 Studiul selectivitatii senzorilor si biosenzorilor	Publicarea a minim 2 articole ISI
		1.2 Studiul stabilitatii senzorilor si biosenzorilor	
		1.3 Studiul reproductibilitatii senzorilor si biosenzorilor	
		1.4 Studiul durabilitatii senzorilor si biosenzorilor	Participarea la minim 2 manifestari stiintifice
		1.5 Determinarea limitelor de detectie a senzorilor si biosenzorilor	
		1.6 Determinarea timpului de raspuns a senzorilor si biosenzorilor	
		1.7 Determinarea reversibilitatii si recuperarii senzorilor si biosenzorilor	

An	Obiective	Activitati	Rezultate livrate pe etapa
2015	1. Testarea senzorilor si biosenzorilor	1.1. Selectarea retelelor de senzori si biosenzori pentru aplicatii pe mostre reale	Publicarea a minim 2 articole ISI
		1.2 Selectarea metodelor pentru prelucrarea datelor	
		1.3 Analiza aminelor biogene in produse din carne, branzeturi si bauturi fermentate	Participarea la minim 2 manifestari stiintifice

An	Obiective	Activitati	Rezultate livrate pe etapa
2016	1. Testarea senzorilor si biosenzorilor	1.1 Monitorizarea prospetirii alimentelor	Publicarea a minim 2 articole ISI
		1.2 Analiza aminelor biogene in fructe	
		1.3 Analiza aminelor biogene in mostre clinice	
		1.4 Validarea sistemelor prin stabilirea de corelatii intre rezultatele obtinute cu senzori si biosenzori si rezultatele analizelor fizico-chimice, senzoriale, biochimice sau medicale	Participarea la minim 2 manifestari stiintifice

Pe parcursul **anului 2012** s-au realizat activitatile prevazute in planul de lucru pentru indeplinirea obiectivului general al proiectului, un sistem electronic pe baza de senzori chimici si biosenzori pentru analiza aminelor biogene. In cele ce urmeaza se vor descrie activitatile realizate, obiectivele atinse si activitatile de disemnare realizate in acest prim an din proiect.

Pentru indeplinirea obiectivelor s-au realizat activitatile prezentate in continuare.

**1. Studiile de modelare si simulare a interactiunilor dintre aminele biogene si receptorul senzorilor sau biosenzorilor** s-au realizat folosind programele Hyperchem si, respectiv Matlab. Din studiile de modelare s-a putut determina mecanismul de interactiune dintre aminele biogene si substantele sensibile, in cazul senzorilor, si respectiv enzimele din elementul receptor, in cazul biosenzorilor.

Astfel, in cazul peroxidazei din hrean, o enzima la care central activ este in exteriorul moleculei proteice, interactiunea nu se realizeaza direct cu molecula de amina ci cu  $H_2O_2$  generata in urma actiunii unei aminooxidaze (diaminooxidaza, de exemplu) prin intermediul ionului  $Fe(III)$  situat in centrul activ al enzimei. Prin urmare, peroxidaza poate fi utilizata pentru construirea de biosenzori bi-enzimatici, care sa contina o aminooxidaza si peroxidaza.

Aminooxidazele interactioneaza cu aminele biogene prin intermediul ionilor metalici situati in centrul activ al enzimei scindand gruparile amino. In urma reactiei enzimatice se formeaza un compus carbonilic, amoniac si  $H_2O_2$ . Monoaminooxidazele si diaminooxidazele au o selectivitate ridicata, acest lucru datorandu-se naturii si structurii chimice a centrului activ dar si structurii si conformatiei lantului proteic.

Atunci cand enzima este putrescinoxidaza reactia biocatalitica are loc prin interactiunea dintre gruparea amino din putrescina si centrul activ al enzimei cu formarea unui compus aldehyd-aminic, amoniac si  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  este detectata electrochimic prin oxidare la nivelul suprafetei biosenzorului aplicand un potential adecvat, care depinde de natura electrodului si de prezenta unor mediatori de electroni.

Tirosinaza poate fi utilizata ca biocatalizator pentru detectarea aminelor biogene care contin in molecula grupari fenolice. Mecanismul de interactiune este diferit pentru monofenoli (de exemplu tiramina) si difenoli (de exemplu). Interactia are loc intre zona din molecula unde exista gruparea fenolica si centrul activ al enzimei care contine doi ioni de  $Cu$ . In urma reactiei catalitice are loc intai o hidroxilare in pozitia orto (pentru monofenoli) urmata de oxidarea difenolului la o-chinona. Orto-chinona este redusa electrochimic la un potential care depinde de natura electrodului si a mediatorilor de electroni.

In toate cazurile studiate prin modelare mecanismul de detectie al biosenzorului este guvernat de schimbul de electroni (etapa cea mai lenta), iar aplicarea unui potential conduce la o accelerare a reactiei datorita transformarii electrochimice a produsilor de reactie rezultati in urma reactiei enzimatice.

Simularile in Matlab s-au realizat considerand ca biosenzorul electrochimic are o geometrie plana, stratul de enzima este depus pe aceasta suprafata iar apoi este acoperita cu o membrana semipermeabila pentru ioni, reactivi si produsi de reactie. S-a determinat influenta pH-ului si a temperaturii asupra raspunsului biosenzorului. Pe de alta parte s-a determinat influenta factorului limitant al vitezei de reactie, difuzia sau schimbul de electroni, asupra domeniului de liniaritate (dependenta liniara dintre raspunsul biosenzorului si concentratia analitului) si a timpului de raspuns al biosenzorului. S-a demonstrat ca difuzia are o influenta foarte mare asupra domeniului de liniaritate (variatii ale ordinului de marime) si una mai redusa asupra raspunsului biosenzorului. In cazul in care etapa determinanta de viteza este transferul de electroni influenta asupra domeniului de liniaritate este redusa in timp ce timpul de raspuns variaza semnificativ.

Din rezultatele prezentate se poate concluziona ca s-a determinat mecanismul de interactiune dintre aminele biogene si elementul receptor al senzorului sau biosenzorului prin modelare si simulare. De

asemenea, s-a determinat teoretic influenta factorului limitant al vitezei, a pH-ului si a temperaturii asupra domeniului de liniaritate si al timpului de raspuns al biosenzorului in absenta sau aplicand un potential.

## **2. Selectarea design-urilor senzorilor si biosenzorilor**

S-a realizat un studiu de piata pentru a se alege dintre variantele de electrozi disponibile cele optime pentru scopul acestui proiect. Astfel, pentru cantitati mici de mostra de analizat s-au ales senzori serigrafati pe baza de diferite materiale de la firma Dropsens. Pentru cantitati mai mari de mostra s-au achizitionat electrozi de carbon sub forma de fir. De asemenea, s-au proiectat si realizat noi design-uri de senzori. Astfel, s-au construit electrozi sub forma de disc de platina, electrozi de pasta de carbon, electrozi de ITO, electrozi serigrafati de Au sub forma unor retele de senzori, toti acestia cu dimensiuni adecvate si cu un cost redus. In cazul electrozilor de pasta de carbon s-a modificat compozitia chimica a pastei de carbon prin folosirea de diferite materiale pe baza de carbon (grafit, nanoparticule de carbon, nanotuburi de carbon, nanofibre de carbon) si diferite materiale electroactive (bis-ftalocianine de Lu, Gd si Dy, ftalocianina de Co, ftalocianina de Fe, ftalocianina de di-Li, ferocen) care sunt sensibile la amine biogene si pot fi mediatori de electroni in cazul biosenzorilor. Din masuratorile exploratorii cu tehnici potentiometrice si voltametrice s-a stabilit ca mult mai adecvate sunt metodele voltametrice datorita sensibilitatii mult mai ridicate. Potentialul de echilibru al senzorilor si biosenzorilor in mostra de analizat se va utiliza pentru stabilirea de corelatii cu alti parametri fizico-chimici ai mostrei de analizat. S-a stabilit ca pentru studiul comportamentului electrochimic al senzorilor sau biosenzorilor se va utiliza voltametria ciclica. Pentru cresterea sensibilitatii si a cresterii rezolutiei picurilor se va utiliza voltametria de unda patrata. Pentru masuratori de rutina se va utiliza cronoamperometria aplicand potentialul optim pentru oxidarea sau reducerea compusului de analizat sau a unui produs generat prin reactia enzimatica.

In concluzie, s-au ales si construit design-uri adecvate ale senzorilor si biosenzorilor, sistemul putand fi adaptat in functie de cantitatea de mostra disponibila si de caracteristicile fizico-chimice ale acesteia.

## **3. Imbunatatirea caracteristicilor senzorilor si design-ul unor noi senzori si biosenzori**

Activitatile realizate au avut ca obiectiv design-ul unor noi senzori si biosenzori prin modificarea chimica si biochimica a unor electrozi comerciali sau construiti in laborator. Materialele modificatoare au fost achizitionate dupa un studiu de piata riguros. O parte din aceste materiale comerciale (ftalocianina de Co, pirol, anilina etc.) s-au purificat prin recristalizare sau distilare. Pentru sinteza chimica sau electrochimica a altor materiale sensibile s-au achizitionat reactivii si solventii necesari. Ca si in cazul materialelor comerciale a fost necesara o purificare avansata deoarece prezenta impuritatilor in materialul sensibil poate influenta decisiv caracteristicile senzorilor sau biosenzorilor.

### **3.1. Sinteza si caracterizarea materialelor moleculare**

Pentru construirea de senzori si biosenzori sunt necesare materiale sensibile cu proprietati adecvate, care sa furnizeze un raspuns masurabil atunci cand interactioneaza cu analitul. Pe baza experintei in acest domeniu, s-au sintetizat o serie de compusi covalent-coordinativi. Bis-ftalocianinele unor metale lantanidice (Lu, Gd, Dy) s-au sintetizat folosind o metoda care nu foloseste solventi. Astfel, cantitatile corespunzatoare de acetat al lantanidului si ftalonitril sunt amestecate in stare solida si ulterior incalzite si mentinute la o temperatura de 250°C timp de 3ore. In urma reactiei se obtine un solid verde-albastru (un amestec al formei neutre si al formei reduse a bis-ftalocianinei). Solidul se raceste, se solubilizeaza in cloroform si se trece printr-o coloana cromatografica de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> neutra utilizand ca eluent CHCl<sub>3</sub>, cu scopul de a separa forma neutra a bisftalocianinei (forma „verde”). Separarea se monitorizeaza cu ajutorul cromatografiei pe strat subtire si spectroscopie UV-Vis. Produsul brut s-a purificat prin recristalizare din heptan obtinandu-se un solid de culoare verde (randamentul reactiei este de ordinul a 25% pentru cele trei bis-ftalocianine sintetizate). Bis-ftalocianinele obtinute s-au caracterizat prin spectroscopie UV-VIS, NIR si FTIR demonstrandu-se puritatea acestora si prezenta benzilor caracteristice in spectrele UV-VIS, NIR si FTIR

Deci, s-au obtinut, purificat si caracterizat fizico-chimic o serie de compusi care se vor testa ca substante sensibile in detectia aminelor biogene.

### **3.2. Sinteza si caracterizarea polimerilor conductori**

Pentru prepararea senzorilor pe baza de polimeri conductori s-au folosit urmatoorii monomeri: pirol, anilina si 3-metiltiofen. Ca agenti dopanti s-au folosit o serie de substante chimice care permit obtinerea unor filme polimerice cu morfologii, sensibilitati si proprietati redox diferite. Astfel, pentru sinteza electrochimica a polianilinei s-au folosit: HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, HClO<sub>4</sub> si H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Pentru sinteza polipirolului s-au folosit K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO], H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, sarea de sodiu a acidului 9,10-antrachinon-2-sulfonic, dodecansulfonat de sodiu, decansulfonat de sodiu, acid p-toluensulfonic si solutia tampon fosfat de pH 7. In cazul poli-3-metiltiofenului anionii dopanti utilizati au fost: LiClO<sub>4</sub>, LiCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, perclorat de tetrabutilamoniu si tetrafluoroborat de tetrabutilamoniu.

Din solutia care contine monomerul si agentul dopant s-au sintetizat filme polimerice cu diferite proprietati folosind o serie de tehnici electrochimice sum sunt cronoamperometria, cronopotentiometria, voltametria ciclica si voltametria de unda patrata. S-a demonstrat ca prin folosirea cronoamperometriei se obtin filmele polimerice optime pentru a fi utilizate in construirea de senzori si biosenzori. Aceasta tehnica permite un control strict al grosimii stratului depus si a gradului de supraoxidare.

Polimerii sintetizati au fost caracterizati prin spectroscopie IR cu scopul determinarii gradului de supraoxidare. Din analiza spectrelor IR s-au putut determina conditiile optime de polimerizare astfel incat polimerul sa nu fie supraoxidat. Un potential de maxim 0,8V folosit pentru sinteza electrochimica asigura un grad foarte redus de supraoxidare a polimerului.

Morfologia filmelor polimerice s-a determinat prin microscopie de scanare electronica (SEM) si microscopie de forta atomica (AFM). Aceste studii s-au realizat in stagiul de cercetare de la Universitatea din Valladolid (Spania). S-a demonstrat ca parametrii care au o influenta majora asupra morfologiei filmului polimeric sunt natura chimica a agentului dopant si tehnica electrochimica folosita in sinteza.

In concluzie, polimerii conductori au fost sintetizati si caracterizati spectrometric si microscopic. Din studiile spectrometrice, microscopice si electrochimice s-a demonstrat ca polipirolul este cel mai potrivit pentru construirea de senzori si biosenzori datorita compatibilitatii lui cu aminele biogene si a dublului rol, de mediator de electroni si matrice imobilizatoare, in cazul biosenzorilor. Poli-3-metiltiofenul are dezavantajul ca sinteza electrochimica se poate face doar din solutie de acetonitril crescand costurile de fabricatie. Polianilina se sintetizeaza si prezinta proprietati electrochimice adecvate doar in mediu puternic acid, mediu care nu poate fi utilizat in cazul enzimelor.

### **3.3. Fabricarea de noi senzori si biosenzori**

Pentru fabricarea senzorilor si biosenzorilor s-au folosit diferite metode care au ca scop depunerea materialelor sensibile pe un suport solid, cu un anumit design, apt pentru masuratorile electrochimice.

a) Alegerea substraturilor s-a facut in functie de materialul sensibil si de metoda optima de depunere. Pentru aceasta s-a achizitionat fir de Pt din care s-au construit electrozi sub forma de disc. Alte substraturi din care s-au construit electrozi sunt sticla acoperita cu ITO (oxid de staniu si zinc), utili si pentru masuratori de electrocromism. De asemenea, s-au folosit electrozi de aur serigrafati intr-o configuratie de retea de senzori. S-au achizitionat si folositi o serie de electrozi serigrafati care contin pe acelasi dispozitiv electrodul de lucru, contraelectrodul si electrodul de referinta. Materialele din care sunt construiti acesti electrozi serigrafati comerciali sunt carbon (C), C-nanotuburi de carbon, C-nanofibre de carbon, C-grafen, C-ftalocianina de cobalt, C-albastru de Prusia, platina, C-nanoparticule de platina si Au. Pentru masuratori de electrocromism s-au achizitionat electrozi optic-transparenti serigrafati pe baza de ITO. Un alt tip de electrozi utilizati au fost electrozii de C sub forma de fir. Area electrodului de lucru a fost intre 0,785mm<sup>2</sup> si 12,56mm<sup>2</sup> pentru electrozii sub forma de disc, 1cm<sup>2</sup> pentru electrozii de ITO si de 52,5mm<sup>2</sup> pentru electrozii cu forma de fir.

Toti electrozii s-au studiat din punct de vedere electrochimic. S-a demonstrat ca unii dintre ei pot fi utilizati ca senzori voltametrici fara alte modificari. In alte cazuri modificarea lor cu alte materiale sensibile,

comerciale sau sintetizate in laborator a fost absolut necesara. Pentru construirea de biosenzori a fost necesara modificarea receptorului cu enzime.

b) In functie de dimensiunea substratului si de cantitatea de material disponibila s-au utilizat mai multe metode pentru depunera stratului sensibil.

b.1. In cazul senzorilor pe baza de polimeri conductori s-a folosit tehnica electrodepunerii (electrosinteza) dintr-o solutie mixta monomer-agent dopant. Solventul a fost apa in cazul polianilinei si polipirrolului si acetonitrilul in cazul poli-3-metiltofenuului. Tehnica electrochimica optima pentru electrosinteza a fost cronoamperometria care asigura o depunere uniforma, un timp de depunere este scurt (30-120s), iar prin controlul potentialului se previne supraoxidarea polimerului. De asemenea, prin aceasta tehnica se controleaza foarte exact sarcina electrica folosita pentru electrosinteza, putandu-se calcula cu precizie grosimea stratului de polimer depus. S-au electrosintetizat filme polimerice cu grosimi intre 200nm si 50 $\mu$ m. Grosimea optima pentru fabricarea de senzori este situata intre 2 si 10 $\mu$ m, grosime care asigura o stabilitate mecanica si o sensibilitate foarte buna. De asemenea, aceasta grosime este ideala pentru imobilizarea enzimei in cazul fabricarii de biosenzori.

b.2. In cazul altor materiale sensibile s-au folosit alte metode de depunere care vor fi descrise in cele ce urmeaza. Cea mai performanta tehnica utilizata este tehnica Langmuir-Blodgett (folosita pe parcursul stagiului de cercetare la Universitatea din Valladolid), tehnica ce asigura controlul, la nivel molecular, al elementului receptor al senzorului sau biosenzorului. S-a folosit substrat de ITO iar ca materiale sensibile bis-ftalocianinele de Lu, Gd si Dy. Pentru a facilita depunerea monostraturilor nanostructurate s-a folosit si acid arachidic. Calitatea monostraturilor s-a studiat prin microscopie BAM. Atunci cand s-au fabricat biosenzori, enzima s-a introdus in subfaza apoasa (tampon fosfat 0,01M si NaCl 0,1M) iar mediatorul pe suprafata subfazei. Intr-o prima etapa s-au inregistrat izotermele presiunii superficiale determinandu-se presiunea superficiala la care stratul monomolecular are un grad de ordonare ridicat si poate fi transferat pe suport solid. La presiunea superficiala optima s-au depus prin cicluri de imersie-emersie, un numar variabil de straturi monomoleculare, intre 10 si 30, in functie de proprietatile sensibile ale materialelor.

Pentru electrozii serigrafati sub forma de disc s-a folosit tehnica *cast* sau *drop-and-dry* atat pentru depunerea substantei sensibile cat si a enzimei, in cazul biosenzorilor.

Substratul de ITO s-a folosit si in cazul tehnicilor *layer-by-layer* (LbL) si *spin-coating*.

Pentru fabricarea altor senzori s-a folosit tehnica electrozilor de pasta de carbon in care materialul pe baza de carbon (grafit, nanotuburi de carbon, nanopudra de C) s-a amestecat cu ulei mineral intr-o proportie care sa asigure o conductibilitate electrica si rezistenta mecanica buna (raportul masic este 1:1,3). Pentru cresterea sensibilitatii s-au folosit substante sensibile sau enzime, care s-au depus pe suprafata electrozilor de pasta de carbon. In anumite cazuri materialele sensibile s-au introdus in interiorul pastei de carbon ( de exemplu bis-ftalocianine). Procentul de ftalocianina in raport cu materialul de carbon este de 15%.

b.3. Imobilizarea enzimelor pe electrozi s-a realizat prin mai multe metode si anume: prin adsorbție fizica, prin retinere in matrice solida (pasta de carbon), prin electropolimerizare si prin tehnica Langmuir Blodgett. Pentru cresterea stabilitatii stratului de enzima, indiferent de metoda de depunere, s-a folosit reticularea (*cross-linking*) cu aldehida glutarica. Enzimele care s-au utilizat au fost tirozinaza, peroxidaza, diaminoxidaza si monoaminoxidaza. Stratul de enzima cuprinde intre 100 si 300 unitati pe biosenzor.

In cazul mediatorilor de electroni acestia s-au depus pe materialulreceptor urmand doua strategii. Astfel, stratul de mediator si enzima s-au depus separat prin aceeasi tehnica sau utilizand tehnici diferite. De exemplu, peste filmul de polipirrol obtinut prin sinteza electrochimica se adsoarbe enzima si apoi se realizeaza o reactie de reticulare. Tot in aceasta categorie se incadreaza si modificarea electrozilor de pasta de carbon, metalici sau serigrafati cu enzima prin adsorbție urmata de reticulare.

Atunci cand a existat o compatibilitate fizico-chimica intre enzima si mediator s-au depus straturi mixte printr-o metoda adecvat. Este cazul bis-ftalocianinelor care s-au depus impreuna cu enzima prin tehnica Langmuir-Blodgett, a polipirrolului electrosintetizat dintr-o solutie care contine monomer, agent dopant si enzima sau a pastelor de carbon formate din material carbonos, mediator, enzima si agent conglomerant.

### **3.4. Senzorii si biosenzorii preparati au fost caracterizati prin tehnici spectrometrice (UV-Vis, NIR si IR) si microscopice (SEM, BAM si AFM).**

Din analiza spectrelor UV-Vis, NIR si IR s-a determinat gradul de ordonare al moleculelor, orientarea moleculelor in raport cu substratul solid (perpendicular, paralel sau sub un anumit unghi), formarea de noi legaturi covalente, existenta enzimei in elementul receptor al biosenzorului etc. BAM (microscopia de unghi Brewster) a permis determinarea morfologiei stratului monomolecular inainte de transferul pe sustrat solid. Morfologia elementului receptor s-a determinat prin SEM si AFM.

In cazul senzorilor si biosenzorilor preparati prin tehnica Langmuir-Blodgett s-a determinat ca moleculele de bis-ftalocanina sunt orientate aproape perpendicular pe suprafata substratului de ITO, cele de acid arachidic perpendicular pe suprafata si sub forma de bi-strat iar moleculele de enzima sunt retinute in structurile bi-strat, similare cu membranele celulare. In plus, acest biomimetism favorizeaza activitatea enzimatica datorita modificarii structurii cuaternare si a accesibilitatii centrului activ pentru moleculele de analit, asa cum rezulta din determinarile realizate cu acest tip de biosenzori.

In cazul imobilizarii enzimei folosind reactia de reticulare s-au putut identifica legaturi covalente noi intre moleculele de enzima dar si intre enzima si matricea imobilizatoare, de exemplu polipirol. Din masuratorile realizate cu astfel de biosenzori s-a constatat ca reticularea conduce la o scadere a activitatii enzimatice dar in acelasi timp se observa o crestere a durabilitatii biosenzorilor. Acest lucru este relationat cu modificarea conformatiei enzimei. Prin urmare, trebuie sa existe un echilibru intre sensibilitatea biosenzorilor si durabilitatea acestora.

Tehnicile microscopice au aratat ca straturile mixte depuse cu ajutorul tehnicii Langmuir-Blodgett au o rugozitate foarte redusa datorita omogenitatii straturilor monomoleculare transferate pe substrat solid. In cazul polipirolului, morfologia depinde de natura agentului dopant si de tehnica electrochimica folosita.

Suplimentar fata de planul de lucru propus initial s-au realizat o serie de studii privind determinarea compusilor electroactivi din emulsii cu scopul stabilirii capacitatii senzorilor si biosenzorilor de a functiona in acest tip de mediu. Rezultatele obtinute cu senzori de polipirol au fost excelente si au fost publicate. Acest studiu a fost necesar deoarece senzorii si biosenzorii se vor utiliza pentru analiza aminelor biogene din alimente, cu o prelucrare minima a mostrelor, deci in medii eterogene complexe. De asemenea, s-a studiat incapsularea enzimelor inainte de imobilizare cu scopul cresterii sensibilitatii biosenzorilor.

Deci, in acest an s-au realizat toate activitatile prevazute in planul de lucru obtinandu-se noi senzori si biosenzori, cu design-uri noi, din diferite materiale sensibile depuse cu ajutorul nanotehnologiilor caracterizate prin metode microscopice si spectroscopice.



Pe parcursul anului 2013, al doilea an din cadrul proiectului, s-au realizat activitatile prevazute in actul aditional semnat la inceputul anului 2013. In urmatoarele pagini se vor descrie activitatile realizate, obiectivele atinse si activitatile de diseminare realizate in al doilea an din perioada de implementare a proiectului.

### **Obiectivul nr. 1. Studii fundamentale privind interactiunile dintre stratul sensibil si mostrele de analizat**

Activitatile realizate pentru indeplinirea acestui obiectiv se prezinta in continuare.

#### **1.1 Studiul interactiunilor dintre aminele biogene si stratul activ al senzorilor**

S-a determinat ca interactiunea fizico-chimica dintre stratul activ al senzorilor si aminele biogene depinde de natura substantei sensibile, de morfologia suprafetei si de particularitatile substantei de analizat. In cazul senzorilor pe baza de polipirol dopati cu diferiti anioni electroinactivi s-a determinat ca un factor foarte important este modul de electrosinteza a polimerului. Astfel, morfologia suprafetei este diferita in cazul polipirolului dopat cu acelasi agent dopant. S-a determinat ca sensibilitatea cea mai buna o prezinta senzorii preparati folosind cronopotentiometria. In general, polipirolul prezinta o structura sferica, cu numerosi centri activi care permit o interactiune eficienta intre stratul activ si substanta de analizat. In figura de mai jos se prezinta imaginea obtinuta prin SEM in cazul polipirolului dopat cu ionul antrachinon-sulfonic electrosintetizat prin cronoamperometrie (potential aplicat 0,8V si timp de depunere de 720 s).

Detectia aminelor biogene se realizeaza in doua moduri. Pe de o parte, polipirolul participa la reactii de oxido-reducere care sunt influentate de proprietatile fizico-chimice ale probei de analizat. Schema acestor procese este:

unde:

- P - polipirol;
- A<sup>-</sup> - anionul dopant;
- K<sup>+</sup><sub>s</sub> - cationul din solutia de analizat;
- Cl<sup>-</sup><sub>s</sub> - anionul din solutia de analizat;
- s - solutie;
- f - filmul polimeric (stratul activ).

Astfel, concentratia, pH-ul, taria ionica etc. influenteaza procesele redox ale polipirolului prin modificarea intensitatii curentului picurilor, modificarea formelor picurilor si deplasarea potentialelor picurilor spre valori mai mari sau mai mici. Toate aceste modificari sunt cuantificate si se folosesc pentru identificarea, discriminarea, clasificarea sau cuantificarea aminelor biogene in proba de analizat. Polipirolul dopat cu substante electroactive (ioni ferocianura, ioni nitroprusiat etc.) prezinta pe langa picurile caracteristice polipirolului si cele datorate ionului dopant.

Pe de alta parte, in cazul unor amine (de exemplu dopamina, epinefrina, histamina sau trimetilamina) se observa ca aceste substante prezinta picuri de oxido-reducere proprii in domeniul de potential studiat. Astfel, aminele biogene pot fi detectate direct sau indirect de catre senzorii pe baza de polipirol dopati cu diferiti agenti dopanti.

In cazul senzorilor pe baza de ftalocianine observatiile experimentale sunt similare. Si in acest caz, morfologia suprafetei, care este corelata cu metoda de depunere a ftalocianinei, influenteaza decisiv proprietatile senzorului. In figura de mai jos se prezinta imaginea AFM a unui film subtire de ftalocianina de lutetiu depusa prin tehnica Langmuir-Blodgett.

Ftalocianinele prezinta procese de oxido-reducere caracteristice, relateate cu structura chimica si cu natura ionului central. Astfel, ftalocianina de cobalt prezinta picuri caracteristice datorate oxido-reducerii ionului de Co, iar in cazul bis-ftalocianinelor picurile caracteristice sunt datorate proceselor redox ale inelelor de ftalocianina.

Procesele redox ale ftalocianinelor sunt influentate de proprietatile fizico-chimice ale probei de analizat. Totodata s-a determinat ca ftalocianinele prezinta efect electrocatalitic favorizand procesele redox ale diverselor specii chimice prezente in proba de analizat. Astfel, aminele biogene se oxideaza la potentiale mult mai reduse datorita actiunii catalitice a ftalocianinelor prezente in stratul sensibil al senzorilor. Efectul electrocatalitic cel mai pronuntat s-a observat in cazul bis-ftalocianinei de lutetiu. Deci, aminele biogene pot fi detectate direct sau indirect de catre senzorii pe baza de ftalocianine.

### **1.2 Studiul interactiunilor dintre aminele biogene si stratul activ al biosenzorilor**

Biosenzorii realizati pe parcursul acestui proiect au fost biosenzori enzimatici pe baza de diferite materiale ca matrice imobilizatoare (electrozi serigrafati pe baza de carbon modificati cu diferite nanomateriale, de exemplu nanotuburi de carbon, nanoparticule de Pt sau Au, electrozi serigrafati modificati cu un strat de polipirol, electrozi metalici acoperiti cu polipirol, electrozi de pasta de carbon nemodificata sau modificata cu ftalocianine etc.) si enzime capabile de a detecta amine biogene.

S-a determinat ca matricea imobilizatoare are un rol crucial in ceea ce priveste performantele analitice si caracteristicile biosenzorilor realizati.

S-a determinat ca metoda de imobilizare are un rol decisiv in mentinerea activitatii catalitice a enzimei imobilizate in substratul solid al biosenzorului. Dintre metodele de imobilizare cea mai buna este metoda reticularii (*cross-linking*) daca se realizeaza un control strict al timpului de reactie. Acest fapt se datoreaza particularitatii matricii imobilizatoare, care are o anumita porozitate si permite o adsorbție buna a enzimei si a gruparilor functionale care pot participa la reactii de reticulare cu aldehida glutarica. Punerea in evidenta a gruparilor functionale, modificarea acestora ca urmare a participarii la reactii chimice s-a realizat prin spectroscopie in IR.

Mecanismul de detectie al biosenzorilor depinde de natura enzimei imobilizate in stratul activ. Astfel, tirozinaza catalizeaza reactiile biochimice ale unei categorii particulare de amine biogene si anume catecolaminele. Mecanismul general de detectie al catecolaminelor este urmatorul:

Daca catecolamina de analizat are in structura chimica o singura grupare -OH, in prima etapa are loc hidroxilarea enzimatica a catecolaminei. In urmatoarea etapa are loc oxidarea derivatului dihidroxilic la o-chinona corespunzatoare.

Chinona formata in reactia enzimatica este redusa electrochimic la suprafata biosenzorului.

Raspunsul biosenzorului consta in aparitia unui curent catodic care se masoara prin metode voltametrice sau amperometrice.

In cazul aminooxidazelor mecanismul de reactie este similar daca in stratul sensibil al biosenzorului este imobilizata diaminoxidaza sau monoaminooxidaza. Diferentele constau in sensibilitatea diferita a biosenzorilor fata de acelasi analit atunci cand enzima este diferita. In schema se prezinta detectia histaminei cu un biosenzor pe baza de diaminoxidaza (DAO).

### Schema detectiei histaminei cu un biosenzor pe baza de diaminoxidaza

Reactia enzimatica conduce la dezaminarea histaminei iar derivatul aldehydic este oxidat electrochimic la suprafata biosenzorului. Procesul electrochimic poate fi monitorizat prin metode voltametrice sau amperometrice.

#### **1.3 Studiul cineticii enzimatic a biosenzorilor**

Pentru studiul cineticii enzimatic s-au inregistrat curbele de calibrare ale diferitelor tipuri de biosenzori atunci cand se analizeaza solutii model de amine biogene in conditii optime.

In toate cazurile s-au obtinut dependente caracteristice unei cinetici enzimatic de tip Michaelis-Menten. Astfel, in domeniul concentratiilor mici se observa o crestere liniara a raspunsului biosenzorului cu cresterea concentratiei dupa care se obtine un platou (stare stationara) care corespunde unei stari de saturare a biosenzorului. In aceasta regiune, toti centrii activi de pe suprafata biosenzorului participa la reactia enzimatica, astfel ca daca are loc o crestere a concentratiei substratului, aceasta nu poate fi detectata de biosenzor.

Din domeniul de liniaritate s-au determinat limitele de detectie folosind criteriul  $3\sigma/m$  unde  $\sigma$  este deviatia standard relativa a semnalului in solutia blank iar  $m$  este panta dreptei de calibrare, care corespunde sensibilitatii biosenzorului (cresterea intensitatii semnalului biosenzorului atunci cand concentratia creste cu o unitate).

Limitele de detectie si cuantificare ale biosenzorilor dezvoltati in acest proiect sunt in domeniul  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  M. Aceste rezultate indica faptul ca biosenzorii preparati au performante optime pentru a putea fi utilizati in aplicatii practice pe probe reale. Acesti biosenzori vor fi utilizati pentru analiza de alimente, medicamente sau mostre biologice.

Din datele obtinute la calibrare se calculeaza coeficientul Hill, cel care da informatii despre mecanismul reactiei enzimatic. In masuratorile electrochimice curentul este parametrul cinetic dependent de concentratia analitului in solutia de analizat. Din graficul ecuatiei Hill s-a determinat coeficientul  $h$ . Ecuatia cu care se calculeaza coeficientul Hill este urmatoarea:

unde:

- $I_{max}$  - viteza de reactie maxima;
- $I$  - viteza de reactie;
- $K_M^{app}$  - constanta aparenta Michaelis-Menten;
- $h$  - coeficientul Hill;
- $[S]$  - concentratia analitului.

In toate cazurile se obtin valori ale lui  $h$  in jurul valorii 1 (valoarea ideala), ceea ce demonstreaza ca cinetica reactiilor de la suprafata biosenzorului se ajusteaza la o cinetica de tip Michaelis-Menten. Atunci cand

valorile lui  $h$  sunt puțin mai mari decât 1 există un efect cooperativ pozitiv între centrul activ ocupat de molecula de analizat. Atunci când valorile sunt puțin mai mici decât 1 există un efect cooperativ negativ. Tot din datele de calibrare, prin reprezentarea grafică a  $1/I$  în funcție de  $1/c$  s-au calculat parametrii caracteristici ai reacției enzimatice, viteza de reacție maximă ( $I_{max}$ ) și constanta Michaelis-Menten aparentă ( $K_M^{app}$ ) utilizând ecuația Lineweaver-Burk:

Valorile  $K_M^{app}$  sunt mai mici sau comparabile cu cele obținute atunci când enzima este în soluție. Acest fapt demonstrează că imobilizarea enzimei în elementul sensibil al biosenzorului nu conduce la diminuarea activității biocatalitice. Din acest motiv biosenzorii dezvoltati în acest proiect prezintă caracteristici și performanțe analitice superioare comparativ cu alți biosenzori raportați în literatura de specialitate.

#### ***1.4 Compararea datelor experimentale cu cele obținute prin modelare și simulare***

Datele experimentale obținute cu senzorii și biosenzorii dezvoltati în acest proiect de cercetare s-au comparat cu datele obținute prin modelare și simulare. Corelații foarte bune s-au obținut în cazul senzorilor de polipirol dopați cu ioni fără activitate electroanalitică și a electrozilor pe bază de carbon nemodificați. În cazul sistemelor mai complexe, care implică mai multe reacții chimice și electrochimice corelațiile continuă să fie bune, însă diferențele între datele modelate și cele experimentale sunt mai mari. Acest fapt se datorează construirii modelelor la care s-au făcut unele aproximări.

În cazul biosenzorilor s-au obținut corelații foarte bune cu datele experimentale atunci când s-a folosit amperometria ca metodă de înregistrare a răspunsurilor biosenzorilor. Modelarea proceselor enzimatice și electrochimice care au loc la suprafața biosenzorilor s-a utilizat pentru explicarea mecanismului de funcționare a biosenzorilor.

În concluzie, rezultatele obținute au condus la cunoașterea mecanismului de interacțiune dintre analizat și elementul detector al senzorului sau biosenzorului. Acest lucru a permis dezvoltarea de senzori și biosenzori cu caracteristici și performanțe analitice foarte bune pentru identificarea și cuantificarea aminelor biogene.

### **Obiectivul nr. 2. Prelucrarea datelor și interpretarea rezultatelor**

Activitățile realizate pentru îndeplinirea acestui obiectiv se prezintă în continuare.

#### ***2.1 Definierea metodelor pentru analiza datelor. Analiza exploratorie***

Pentru analiza statistică a datelor experimentale s-a luat în considerare specificul datelor care rezultă din măsurătorile electrochimice. În cazul metodelor voltametrice (voltametria ciclică, voltametria de undă patrată) datele sunt sub formă perechilor de valori curent-potențial. Numărul de perechi de date este mare, de ordinul sutelor și de aceea pentru interpretarea corectă a datelor experimentale trebuie să se folosească analize de date multivariante. În cazul determinărilor amperometrice, interpretarea rezultatelor experimentale se face folosind metode statistice de bază în Excel sau Origin.

#### ***2.2 Pre-procesarea datelor experimentale***

Importanța acestei etape este foarte mare pentru o analiză corectă a datelor experimentale. Această etapă are ca scop creșterea calității și reprezentativității datelor. În această etapă se extrage informația utilă din informația globală înregistrată pentru un sistem (bio)senzor-soluție de analizat. De exemplu, dintr-o curbă voltametrică se selectează o serie de parametri semnificativi pentru probele de analizat, cum ar fi potențialele sau intensitățile picurilor. Această reducere a datelor voltametrice este utilă pentru explicarea

unor caracteristici termodinamice (de exemplu potentialul unui cuplu redox) sau cinetice (influenta vitezei de scanare asupra raspunsurilor (bio)senzorilor). Totusi, prin utilizarea acestei metode se pierde o cantitate foarte mare de informatii utile cum sunt caracteristicile dinamice ale curbelor voltametrice. Pentru cresterea cantitatii si calitatii informatiei utile s-au folosit mai multe strategii. O prima metoda este cea de reducere a variabilelor folosind functiile kernel, functii sub forma de clopot, de arie unitara. Prin multiplicarea a 10 functii kernel cu datele curbei voltametrice se obtin 10 coeficienti relationati cu caracteristicile dinamice ale curbei voltametrice. Prin aceasta metoda, curba voltametrica este divizata in 10 intervale si se calculeaza aria de sub curba (integrala) corespunzatoare fiecarui interval. Astfel, se obtin 10 valori reprezentative pentru fiecare curba voltametrica. S-a realizat un program, in Matlab, cu care se calculeaza coeficientii kernel, care se vor utiliza ca parametri de intrare pentru Analiza Componentelor Principale. In cazul curbelor obtinute prin voltametria de unda patrata, se aplica tehnica kernel la curba completa asa cum este salvata de programul potentiostatului. Programul calculeaza intervalul total de valori al axei potentialului, il divide in zece parti egale si calculeaza area de sub curba corespunzatoare fiecarui domeniu.

Curbele obtinute cu ajutorul voltametriei ciclice sunt bivalorice, fiecarei valori de potential corespunzandu-i doua valori de curent. Programul de pre-procesare dedicat analizei voltamogramelor ciclice separa partea anodica de partea catodica si aceste curbe sunt analizate in paralel. In unele cazuri se utilizeaza doar curba anodica deoarece curbele catodica si anodica sunt complementare. Prin analiza curbei anodice se reduce timpul de calcul la jumătate cu rezultate foarte bune.

Alte metode care s-au implementat si utilizat au fost folosirea algoritmilor genetici de selectare a datelor reprezentative din curbele voltametrice. Selectarea parametrilor s-a realizat folosind programul *Genetic Algorithm* in Matlab. Aceasta metoda este foarte buna atunci cand datele selectate se vor folosi pentru clasificarea mostrelor analizate.

O alta metoda implementata a fost cea care foloseste *Discrete Wavelet Transform* pentru comprimarea datelor din curbele voltametrice. Programul utilizat face parte din instrumentele *Wavelet Toolbox* din Matlab.

Metoda de pre-procesare care trebuie utilizata depinde de numarul de mostre, numarul de senzori sau biosenzori si de scopul analizei multivariate, discriminare sau clasificare. Metodele se vor folosi in cea de a treia etapa a proiectului pentru analiza alimentelor, medicamentelor sau probelor biologice.

### **2.3 Aplicarea metodei Analiza Componentelor Principale pentru prelucrarea datelor experimentale**

Voltamogramele obtinute la analiza diferitelor mostre prezinta o mare varietate de picuri relationate atat cu activitatea proprie a senzorului cat si cu cea a mostrei de analizat. In cazul biosenzorilor picurile corespund unor procese chimice, electrochimice sau enzimatic. In primele incercari de analiza a semnalelor s-a evaluat potentialul picurilor si s-au utilizat aceste date ca *input* al analizei componentelor principale (PCA). Aceasta metoda a condus la rezultate bune, avand in vedere ca potentialele la care apar picurile sunt reproductibile. Una dintre problemele utilizarii potentialului picurilor ca *input* pentru PCA consta in necesitatea ca numarul de parametri reprezentativi pentru o curba trebuie sa fie egal pentru toate curbele analizate. Insa, numarul de picuri depinde de mostra analizata si de senzorul sau biosenzorul folosit. Folosind aceasta metoda se pierde o cantitate mare de informatie continuta in curbele voltametrice. In plus, diferentele dintre curbele obtinute pentru diversele mostre de analizat nu constau doar in diferenta dintre potentialele picurilor ci si in forma curbei, forma si intensitatea relativa a picurilor etc.

Procesarea tuturor datelor care formeaza voltamograma este un proces lent si costisitor, deoarece nu este posibila utilizarea unui program care sa dea rezultatele analizei multivariante intr-un timp rezonabil. Alt inconvenient este evident in cazul retelelor de senzori mixte (senzori pe baza de polipirol, senzori pe baza de ftalocianine, biosenzori), unde domeniul de potential utilizat este diferit, deci voltamogramele contin un numar diferit de perechi de date curent-potential. Toate aceste inconveniente au condus la realizarea de

programe informatice rapide care extrag informatia utila din curba experimentală. Datele pre-procesate se vor organiza sub forma unei matrici input pentru PCA.

Matricea de date este importata in Matlab sau in The Unscrambler si se scaleaza pentru a minimiza diferentele de magnitudine dintre datele experimentale. Metoda care se foloseste este scalarea conform distributiei normale, functia *zscore* din Matlab sau normalizarea de rutina din programul The Unscrambler.

#### **2.4 Aplicarea metodelor de clasificare (PLS-DA si SIMCA) pentru prelucrarea datelor experimentale**

Programele Matlab si The Unscrambler, dupa importarea matricii cu datele experimentale, au permis realizarea a diferite modele statistice pentru analiza exploratorie, discriminare si clasificare. ACP a fost punctul de plecare al analizelor multivariante si de aceea a fost metoda cea mai folosita. Este o metoda nesupervizata, care a permis analiza si explorarea structurii datelor, gasirea de corelatii sau categorii de mostre, studiul ponderii senzorilor, precum si detectarea si eliminarea *outlier*-ilor (date cu o varianta excesiva in contextul datelor analizate).

PLS-DA si SIMCA s-au aplicat cu scopul evaluarii capacitatii de clasificare si recunoastere a retelelor de senzori si biosenzori, in acele cazuri in care existau un numar reprezentativ de mostre pentru a se putea stabili clase bine definite si reprezentative.

PLS-DA este o metoda determinista de clasificare care se bazeaza pe Analiza Discriminanta Liniara (LDA), metoda de recunoastere de patroni similara cu PCA insa este supervizata, bazandu-se pe algoritmul PLS pentru atribuirea mostrelor la una sau alta din clasele cunoscute. In PLS-DA, aceste variabile dependente cunoscute reprezinta o categorie, altfel spus, sunt de caracter calitativ. La implementarea PLS-DA se atribuie variabilelor calitative valori numerice si se construiesc modelele de regresie. Mostrele necunoscute sunt atribuite categoriilor respective sau nu, in functie de semnalele inregistrate cu retea de senzori si biosenzori. Rezultatele se prezinta sub forma diferita, de exemplu apartenenta la o categorie si eroarea de clasificare sau sensibilitatea si selectivitatea modelului.

SIMCA s-a folosit ca metoda de clasificare supervizata. Este o metoda probabilistica care se bazeaza pe construirea de modele independente pentru fiecare dintre clasele existente cu ajutorul PCA. Deoarece la ACP se determina variabilele latente si structura claselor, daca acestea sunt intr-adevar diferite, modelele matematice care definesc fiecare dintre ele vor fi obligatoriu diferite. Mostrele necunoscute s-au atribuit claselor, ale caror model se ajusteaza cel mai bine la caracteristicile lor.

Metodele de clasificare s-au definit, implementat si verificat in analiza unor date experimentale si se vor utiliza pentru analiza datelor obtinute la monitorizarea sau clasificarea mostrelor.

#### **2.5 Stabilirea corelatiilor dintre semnalele senzorilor sau biosenzorilor si rezultatele analizelor fizico-chimice sau senzoriale**

Metodele de regresie PLS1 si PLS2 s-au utilizat pentru a se stabili corelatii dintre semnalele senzorilor sau biosenzorilor obtinute la analiza mostrelor (matricea de date X, predictoare) si alt tip de valori asociate acelorasi mostre obtinute prin alte metode de analiza (matricea de date Y, de prezis) cum sunt analizele fizico-chimice sau analizele senzoriale. Astfel, in cazul senzorilor pe baza de polipirol si a biosenzorilor pe baza de carbon-DAO s-au stabilit corelatii foarte bune cu pH-ul sau cu timpul de stocare a pestelui in frigider.

Deci, activitatile desfasurate au condus la definirea unor programe capabile de a interpreta datele experimentale prin analize multivariante in functie de specificul raspunsurilor senzorilor si biosenzorilor, daca s-au folosit metode voltametrice sau amperometrice.

In concluzie, pe parcursul acestui an s-au realizat toate activitatile prevazute in planul de cercetare iar obiectivele au fost indeplinite in totalitate. Rezultatele practice obtinute au fost prelucrate, interpretate, redactate si publicate in reviste stiintifice sau prezentate la manifestari stiintifice.

Pe parcursul anului 2014, al treilea an din cadrul proiectului, s-au realizat activitatile prevazute in actul aditional semnat la inceputul anului 2014 pentru indeplinirea obiectivul general al proiectului, un sistem electronic pe baza de senzori chimici si biosenzori pentru analiza aminelor biogene. In continuare se vor descrie activitatile realizate, obiectivele atinse si activitatile de diseminare realizate in perioada ianuarie-decembrie 2014.

Obiectivul acestui an a fost **Testarea performantelor sensibile a senzorilor si biosenzorilor**, pentru indeplinirea acestuia realizandu-se activitatile prevazute pentru o caracterizare cat mai buna a senzorilor si biosenzorilor dezvoltati in anii anteriori din cadrul proiectului.

Unele dintre cele mai importante caracteristici pentru utilizarea senzorilor si biosenzorilor in practica sunt cele relationate cu timpul de viata al acestora (reproductibilitatea, stabilitatea si durabilitatea), cu selectivitatea fata de compusul de analizat precum si cu limita de detectie. Astfel, pentru toate tipurile de senzori si biosenzori dezvoltati in activitatile anterioare din cadrul proiectului s-au testat performantele sensibile cu scopul selectarii celor cu cele mai bune caracteristici pentru aplicatiile pe mostre reale.

### **1.1 Studiul selectivitatii senzorilor si biosenzorilor**

In studiile privind selectivitatea s-au utilizat senzorii si biosenzorii fabricati si caracterizati in etapele anterioare din cadrul proiectului. Rezultatele obtinute se vor prezenta in continuare.

**Senzorii pe baza de polipirol dopati cu diferiti agenti dopanti si senzorii pe baza de ftalocianine** detecteaza aminele biogene in mostrele de analizat pe baza influentei acestora asupra picurilor caracteristice ale materialelor modificatoare sau prezinta picuri proprii datorate reactiilor redox de la suprafata electrodului. Astfel, in cazul dopaminei, epinefrinei, histaminei si trimetilaminei se obtin picuri caracteristice atunci cand se utilizeaza voltametria ciclica, voltametria de unda patrata, ca metode de detectie.

Pentru determinarea selectivitatii raspunsurilor furnizate de **senzorii pe baza de pasta de carbon modificati cu ftalocianine** s-au inregistrat curbele voltametrice prin voltametrie de unda patrata in solutii apoase de KCl, solutii tampon fosfat de pH 6,7 si 8, KClO<sub>4</sub> si altele. S-a observat ca, atunci cand senzorii sunt imersati in diferite solutii de electroliti, voltamogramele inregistrate sunt stabile, depind de natura electrolitului si de concentratia acestuia. Aceste picuri sunt influentate de prezenta substantelor interferente. Astfel, daca in solutiile de electroliti se adauga substante electroactive, se pot observa modificari ale potentialelor picurilor si a curentilor acestora (relationate cu procesele redox ale ftalocianinelor, ale polipirolului etc.) dar si aparitia unor picuri datorate substantelor electroactive din solutie. Voltamogramele obtinute devin din ce in ce mai complexe cu cresterea numarului de substante active prezente in solutia de analizat. Prin urmare, senzorii sunt utili in studiile de monitorizare a prospektimii alimentelor; semnalele voltametrice sunt prelucrate folosind metode de analiza a datelor multivariate cu scopul selectarii informatiilor utile pentru astfel de tip de analiza.

In cazul solutiilor care contin doua sau mai multe amine electroactive, pentru cresterea rezolutiei picurilor, se utilizeaza voltametria de unda patrata. In aceste conditii se obtin voltamograme cu picuri bine definite si separate, care sunt utile in determinari cantitative, pe baza dreptelor de calibrare. De exemplu, cu senzorul pe baza de pasta de carbon (CPE) modificat cu LuPc<sub>2</sub> se pot detecta si cuantifica dopamina si histamina dintr-o mostra complexa care contine pe langa cele doua amine si alti compusi interferenti ca tiramina, tirozina, cisteina si diferiti ioni (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>).

Au fost studiate interferentele datorate expunerii succesive a **senzorilor pe baza de filme Langmuir-Blodgett (LB) de ftalocianine** la diferite solutii de electroliti. Pentru aceasta s-au preparat electrozi de ITO (oxid de indiu si staniu) acoperiti cu filme LB de LuPc<sub>2</sub>, GdPc<sub>2</sub> si DyPc<sub>2</sub>. Fiecare senzor a fost imersat in solutie de clorura de potasiu. Dupa inregistrarea a cinci voltamograme ciclice consecutive, electrozii au

fost scosi din solutie, spalati cu apa bidistilata si lasati sa se usuce. Ulterior, senzorii s-au imersat in solutii de tampon fosfat de pH 7 sau de amine biogene si s-au inregistrat voltamogramele ciclice. In final, electrozii s-au imersat in solutie de KCl si ciclati sase cicluri pentru a elimina eventualii interferenti adsorbiti in filmul LB. Dupa acest protocol de masurare se observa ca picurile corespunzatoare oxidarii si reducerii ftalocianinei sunt modificate si se observa picuri noi care nu au existat in voltamograma inregistrata cu senzorul nou in solutie de KCl 0,1 M. Deci semnalul initial al senzorului este modificat semnificativ si nu se poate recupera raspunsul initial. Rezultatele obtinute au demonstrat ca o parte dintre speciile chimice prezente in solutia de analizat sunt adsorbite in filmul LB in timpul ciclarii si raman in film cauzand un efect "memorie", cu alte cuvinte are loc o contaminare ireversibila a electrodului.

Studii similare s-au realizat si pentru **senzorii pe baza de pasta de carbon modificati cu ftalocianine**. In acest caz, diferentele observate intre voltamograma inregistrata in solutie de KCl 0,1 M cu un senzor nou si voltamograma aceluiasi senzor in solutie de KCl 0,1 M utilizat in analiza aminelor biogene sunt mult mai reduse decat in cazul senzorilor LB, senzorii putand fi recuperati si reutilizati prin slefuire sau ciclare in solutie de KCl.

In cazul **senzorilor de baza de polipirol** dopati cu diferiti agenti dopanti, modificarea semnalului senzorului dupa masurarea solutiilor de amine biogene este redus, si semnalul voltametric se recupereaza prin ciclare (5-6 cicluri) in solutie de KCl sau in solutie tampon fosfat de pH 7.

Studiul interferentelor in cazul biosenzorilor s-au realizat in functie de enzima utilizata si de posibilitii interferenti care ar putea fi prezenti la analiza probelor reale. Metoda de detectie folosita a fost amperometria in conditiile optime de functionare a biosenzorilor (potential aplicat, pH, tarie ionica, temperatura, agitare continua).

In cazul biosenzorului pe baza de electrozi serigrafati (SPE) modificati cu nanotuburi de carbon functionalizate cu grupari carboxil si tirosinaza, (**Ty/SWCNT-COOH/SPE**), s-a determinat interferenta diferitilor compusi din mostra asupra semnalului analitic corespunzator substantei de analizat. Rezultatul s-a exprimat sub forma limitei de toleranta care reprezinta concentratia maxima a substantelor straine, care determina o eroare relativa de aproximativ  $\pm 5\%$  in determinarea tiraminei. Concentratiile substantelor interferente au fost 0,01 M  $\text{Ca}^{2+}$  si  $\text{Cl}^-$ ; 0,001 M pentru putrescina, histamina, tirosina si glutatation. Rapoartele tolerantei la substantele interferente la determinarea unei concentratii de 100  $\mu\text{M}$  tiramina au fost 2500 pentru  $\text{Ca}^{2+}$  si  $\text{Cl}^-$ ; 300 pentru putrescina, histamina si glutatation; 20 pentru tirozina. Prin urmare, acest biosenzor este util pentru determinarea selectiva a tiraminei din probe complexe care contin diferite amine biogene. Lipsa modificarilor curentilor picurilor inregistrate in prezenta speciilor chimice interferente a demonstrat ca biosenzorul Ty-SWCNT-COOH/SPE este un biosenzor foarte bun pentru detectarea si cuantificarea tiraminei in probe complexe. Utilizarea acestui biosenzor in detectarea tiraminei in produse din peste are avantajul selectivitatii foarte ridicate pentru ca celelalte amine biogene nu interfera. Detectarea tiraminei este relationata cu prezenta gruparii fenolice prezenta in structura chimica a tiraminei.

In cazul biosenzorului pe baza de electrozi de Pt modificat cu polipirol dopat cu ioni fosfat in care s-a imobilizat enzima tirosinaza, (**Ty/PO<sub>4</sub>-Ppy/Pt**), studiile privind selectivitatea s-au realizat astfel. S-a studiat influenta diversilor compusi care ar putea interfera la determinarea a 50  $\mu\text{M}$  tiramina, in conditii experimentale optime. Rezultatul s-a exprimat ca limita de toleranta. Concentratiile substantelor interferente au fost 0,1 M pentru  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  si  $\text{Cl}^-$ ; 0,01 M pentru histamina, putrescina, triptofan, spermina, fenilalanina si glutatation. Rapoartele de toleranta la substantele interferente la detectarea a 50  $\mu\text{M}$  tiramina a fost 2000 pentru  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  si  $\text{Cl}^-$ ; 200 pentru histamina, putrescina, spermina si glutatation; 100 pentru triptofan; 20 pentru fenilalanina. Selectivitatea in cazul interferentei provocate de unii compusi fenolici s-a studiat prin voltametrie ciclica. Voltamogramele ciclice ale solutiei care contine 50  $\mu\text{M}$  catecol sau 50  $\mu\text{M}$  fenol adaugate intr-o solutie de tiramina 50  $\mu\text{M}$  prezinta doua picuri catodice, unul la -0.05 V (relationat cu fenolul sau cu catecolul) si altul la -0.250 V (relationat cu tiramina). In cazul detectarii amperometrice a tiraminei la -0.250 V s-a determinat ca fenolul si catecolul determina o eroare aditiva la



determinarea tiraminei, dar mai mica de 2%. Cu toate acestea, acest biosenzor este util pentru determinarea selectiva a tiraminei din probe complexe continand diferite amine biogene. Lipsa unor modificari semnificative a curentilor picurilor inregistrate in prezenta speciilor interferente demonstreaza ca biosenzorul Ty/PO<sub>4</sub>-PPy/Pt poate fi considerat un biosenzor optim pentru detectarea si cuantificarea tiraminei in probe complexe. Utilizarea acestui biosenzor la detectarea si cuantificarea tiraminei in alimente fermentate are avantajul unei selectivitati ridicate pentru ca ceilalti compusi aminici nu interfera. Acest fapt se datoreaza actiunii specifice a tirosinazei asupra tiraminei, care este un compus dublu functional, care contine o grupare amino si o grupare fenolica.

De asemenea, pentru biosenzorul pe baza de carbon vitros (GCE) modificat cu nanotuburi de carbon *single wall* (SWCNT) si diaminoxidaza (DAO) (**DAO/SWCNT-GCE**), a fost studiata influenta unor substante interferente la determinarea de 50 μM epinefrina pentru biosenzorul pe baza de carbon vitros modificat cu nanotuburi de carbon *single wall* si diaminoxidaza. Concentratiile substantelor interferente a fost 0,01 M pentru Na<sup>+</sup> si S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>; 0,001 M pentru uree, acid uric, si acid citric. Raportul de toleranta la substantele interferente la detectarea a 50 μM epinefrina au fost 2400 pentru Na<sup>+</sup> si pentru S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>; 800 pentru uree, 180 pentru acidul uric si 180 pentru acidul citric. Glucoza si glicina in concentratii de 0,001 M nu au nicio influenta in raspunsul biosenzorului la detectarea a 50 μM epinefrina. Aceste rezultate demonstreaza ca biosenzorul **DAO/SWCNT-GCE** este un biosenzor cu caracteristici optime pentru determinarea si cuantificarea epinefrinei.

Valori similare ale raportului de toleranta s-au obtinut si pentru **biosenzorii pe baza de diaminoxidaza (DAO)** imobilizata pe **diferite materiale carbonice** (grafit, nanotuburi de carbon, nanofibre de carbon si grafen - suportul este pasta de carbon sau electrozi de carbon vitros), **polipirol dopat cu ioni fosfat** prin metoda *casting* urmata de reticulare cu glutaraldehida la determinarea a 50 μM putresceina. Selectivitatea ridicata se datoreaza actiunii biocatalitice specifice a enzimei.

Biosenzorii fabricati prin imobilizarea **monoaminooxidazei (MAO) in filmul LB mixt de acid arahidic (AA) si disprosiu (III) bisftalocianina (DyPc<sub>2</sub>)** prezinta rapoarte de toleranta de 240-280 la substantele interferente (glucoza, acid ascorbic, acid uric, cisteina) la detectarea a 50 μM histamina. Selectivitatea ridicata se datoreaza actiunii biocatalitice specifice a enzimei si efectului mediator al ftalocianinei la transferul electronilor.

## **1.2 Studiul stabilitatii senzorilor si biosenzorilor**

Pentru a se evalua stabilitatea **senzorilor pe baza de filme subtiri Langmuir-Blodgett (LB) de ftalocianine**, s-au inregistrat mai multe cicluri consecutive in solutie 0,1 M de KCl. Prima voltamograma ciclica este usor diferita de cea de a doua. Apoi voltamogramele succesive sunt foarte reproductibile. De exemplu, un film LB de GdPc<sub>2</sub> imersat in solutie apoasa de KCl 0,1 M prezinta o reproductibilitate foarte ridicata, astfel ca dupa 100 de scanari succesive ceea ce se observa este doar o usoara scadere gradata a intensitatii picurilor sub 3.5% pentru toti senzorii studiat. Atunci cand masuratorile se opresc si senzorul pe baza de film LB este scos din solutie (chiar si pentru cateva minute), se inregistreaza schimbari importante in voltamogramele ciclice. Ireproductibilitatea cauzata prin scoaterea electrodului din solutie si pastrare a fost evaluata urmandu-se procedeul descris in continuare: dupa inregistrarea a trei cicluri in solutie de KCl 0,1 M, electrozii sunt scosi din solutie si spalati cu apa ultrapura. Apoi electrozii sunt pastrati utilizand trei metode. Unul dintre electrozi este pastrat in apa bidistilata, al doilea intr-o solutie de KCl 0,1 M si al treilea este pastrat in aer. Periodic (din 15 in 15 minute), senzorii sunt reimersati in solutie de KCl si sunt inregistrate trei voltamograme ciclice. Voltamogramele ciclice inregistrate dupa pastrare difera semnificativ fata de primele voltamograme inregistrate (atunci cand electrodul este nou), evidentiind pierderea repetabilitatii semnalului indiferent de mediul in care s-a pastrat electrodul. Schimbarile observate difera de la un material sensibil la altul si de la un electrolit la altul, si sunt relationate in principal cu scaderea intensitatii picurilor, deplasarea picurilor la valori de potential mai ridicate si aparitia unor picuri sau "umeri" ai picurilor initiale. Acest efect poate fi atribuit modificarii structurii filmelor LB (a

gradului deordonare) după imersarea în soluții de electroliți și efectuarea măsurătorilor voltametrice. Deși tehnica LB permite obținerea de electrozi cu un raport foarte ridicat suprafață/volum, care facilitează procesele electrochimice de la suprafața senzorilor, lipsa de stabilitate și reproductibilitate la măsurare sunt cele mai importante dezavantaje ale electrozilor pe baza de filme LB. Cu toate acestea, tehnica LB este foarte reproductibilă permitând fabricarea de senzori practic identici. Diferențele dintre senzorii preparați în aceleași condiții sunt mai mici de 0.5% în ceea ce privește răspunsul obținut prin voltametrie ciclică. Acest tip de senzori s-au utilizat ca senzori de unică folosință.

Cu scopul testării viabilității senzorilor pe **baza de pasta de carbon (CPE) modificați cu ftalocianine (LnPc<sub>2</sub>)** s-au realizat o serie de experimente sistematice pentru cercetarea comportamentului în timp și a capacității de utilizare. Trebuie subliniat că în toate cazurile, senzorii au nevoie de o etapă de stabilizare, care constă în înregistrarea a cinci voltamograme ciclice pentru a se putea stabili un echilibru între senzor și soluția de analizat. Pentru determinarea stabilității răspunsurilor furnizate de senzorii pe baza de pasta de carbon modificați cu ftalocianine s-au înregistrat curbele voltametrice prin voltametrie de undă patră în soluții apoase de KCl și de amine biogene (în soluție tampon fosfat de pH 7), scoțând senzorul din soluția de analizat după fiecare măsurătoare. Se observă că potențialele picurilor se mențin constante (%RSD <1%) și că variațiile intensității unor picuri cu creșterea numărului de repetiții sunt foarte reduse (%RSD <3%) pentru 100 de repetiții ale măsurătorilor. Variația întregii curbe evaluată ca %RSD a celor 10 coeficienți *kernel* este < 5% pentru toți senzorii de acest tip (GdPc<sub>2</sub>, LuPc<sub>2</sub>, DyPc<sub>2</sub>).

Din aceste date se poate afirma că senzorii voltametrici pe baza de CPE modificați cu ftalocianine prezintă o bună stabilitate și pot fi utilizați în măsurători de rutină. În plus, suprafața senzorului poate fi recuperată prin șlefuire cu o hartie de filtru și ciclare în soluție de KCl 0,1 M.

În ceea ce privește repetabilitatea **senzorilor pe baza de polipirol dopați cu diferiți agenți dopanți** trebuie menționat că primele cinci cicluri înregistrate sunt puțin diferite față de cele înregistrate ulterior, însă după această etapă de stabilizare ciclurile succesive sunt foarte reproductibile. După 100 de cicluri se observă doar o scădere ușoară și progresivă a intensității picurilor (se înregistrează o scădere globală a intensității semnalului de aproximativ 3%).

Pe de altă parte, atunci când ciclarea este oprită și senzorii sunt scoși din soluție și pastrați în aer sau în apă ultrapură timp de câteva minute, și apoi sunt reintroduși în soluție, nu se observă schimbări în semnalele electrochimice obținute (variațiile sunt sub 1% pentru senzorii studiați). Aceste rezultate dovedesc bună stabilitate pe termen scurt și repetabilitatea răspunsului senzorilor pe baza de polipirol.

În cazul biosenzorilor, în această etapă s-a studiat biosenzorul pe baza de **polipirol și tirozinază** cu scopul determinării stabilității răspunsului atunci când biosenzorul este utilizat intensiv. Astfel, s-a înregistrat un număr de 50 de cicluri în soluție de dopamina 50 μM (soluția de electroliț este tampon fosfat de concentrație 0,01 M, pH 7,0) constatându-se că are loc o scădere a curentului catodic de 2%. Biosenzorii sunt stabili și se pot utiliza pentru analiza unui număr mare de probe fără o pierdere semnificativă a sensibilității. În toate determinările cantitative, cuantificarea trebuie să se realizeze în raport cu o probă de referință (probă martor).

În condiții optime de pH, tarie ionică și temperatură, biosenzorul pe baza de electrozi serigrafiați (SPE) modificați cu nanotuburi de carbon single wall (SWCNT) și tirozinază (Ty) (**Ty-SWCNT/SPE**) are o stabilitate bună, de cel puțin două ore de utilizare continuă. Se observă că voltamogramele ciclice înregistrate în soluție de tiramina 100 μM (soluția de electroliț este tampon fosfat de concentrație 0,01 M, pH 7,0) scad puțin în intensitate după două ore de utilizare continuă. Curentul picului catodic prezintă o scădere de 3,75% după două ore de utilizare continuă. Deci, biosenzorul are o stabilitate foarte bună.

Stabilitatea semnalului biosenzorului Ty-SWCNT / SPE a fost confirmată prin înregistrarea unui număr ridicat de voltamograme ciclice (100 de cicluri) în soluție de serotonina 50 μM (soluția de electroliț este tampon fosfat de concentrație 0,01 M, pH 7,0). Curentul picului catodic scade cu 3,5% confirmând stabilitatea biosenzorului Ty-SWCNT/SPE la utilizare intensivă.

Biosenzorul **DAO/SWCNT-GCE** prezinta o stabilitate foarte buna la utilizare continua in solutie 50  $\mu\text{M}$  de epinefrina. Astfel, inregistrarea a 50 de cicluri in domeniul de potential -0,5 - 0,5V determina o scadere a semnalului voltametric de 2,5%. Scaderi similare ale semnalului voltametric s-au obtinut si pentru biosenzorii pe baza de diaminooxidaza (DAO) imobilizata pe diferite materiale carbonice (grafit, nanotuburi de carbon, nanofibre de carbon si grafen) la ciclare in 50  $\mu\text{M}$  putresceina, demonstrand buna stabilitate a biosenzorilor.

**Biosenzorii pe baza de monoaminooxidaza (MAO) imobilizata in filmul LB mixt de AA si DyPc<sub>2</sub>** prezinta o stabilitate buna la ciclare, semnalul voltametric scazand cu 8,5% dupa 30 de cicluri. Acest tip de biosenzori se vor utiliza ca biosenzori de unica folosinta. Metoda LB permite obtinerea biosenzorilor cu o reproductibilitate foarte buna.

**Senzorii si biosenzorii pe baza de SPE** prezinta stabilitate buna atunci cand se utilizeaza in analiza aminelor biogene. Inregistrarea unui numar mare de cicluri nu conduc la scaderi importante ale semnalului voltametric. Dupa ce senzorii si biosenzorii pe baza de SPE sunt scosi din solutia de analizat si pastrati un timp de cateva ore si reintrodusi in solutia de analizat, se observa o modificare a semnalului. S-a constatat ca aceasta modificare este datorata degradarii electrodului de referinta (Ag serigrafiat). Pentru a avea certitudinea unor masuratori precise, senzorii si biosenzorii pe baza de SPE trebuie sa fie utilizati ca senzori si biosenzori de unica folosinta.

### **1.3 Studiul reproductibilitatii senzorilor si biosenzorilor**

Reproductibilitatea construirii **senzorilor si biosenzorilor pe baza de filme LB** este foarte buna, diferentele dintre raspunsurile obtinute prin voltametrie fiind mai mici de 1%. Diferentele dintre raspunsurile obtinute prin amperometrie sunt mai mici de 0,8%. Acest fapt este principalul avantaj al utilizarii tehnicii LB in fabricarea de straturi sensibile pentru aplicatii in domeniul senzorilor si biosenzorilor. Aceasta tehnica este optima pentru fabricarea senzorilor si biosenzorilor de unica folosinta.

Reproductibilitatea construirii **senzorilor si biosenzorilor pe baza de CPE** modificati cu ftalocianine si enzime este buna, diferentele dintre semnale fiind mai mici de 4% pentru senzorii si biosenzorii preparati in aceleasi conditii. In pofida faptului ca prepararea acestor senzori si biosenzori este una manuala, respectarea cu strictete a cantitatilor si a protocolului de fabricare asigura obtinerea de senzori si biosenzori de buna calitate.

Reproductibilitatea construirii **senzorilor si biosenzorilor pe baza de polipirol** depinde de reproductibilitatea electrosintezei, etapa in care polipirolul este depus pe electrod prin folosirea cronoamperometriei (CA). Pentru a se testa reproductibilitatea construirii senzorilor prin cronamperometrie s-a calculat sarcina consumata la depunerea polipirolului in prezenta a diferiti agenti dopanti. S-au fabricat cinci senzori pentru fiecare agent dopant. Deviatia standard relativa procentuala (%RSD) este mai mica de 6% pentru toti agentii dopanti folositi in electrosinteza (Tabelul 1).

**Tabelul 1.** Datele de reproductibilitate utilizand tehnica CA pentru prepararea Ppy cu diferiti agenti dopanti



Aceste date confirma inalta reproductibilitate a metodei utilizate pentru prepararea senzorilor si biosenzorilor pe baza de polipirol.

De asemenea, s-a studiat reproductibilitatea construirii **biosenzorilor pe baza de SPE modificati cu enzime**. De exemplu, reproductibilitatea construirii biosenzorilor Ty-SWCNT-COOH/SPE (SWCNT-COOH - nanotuburi de carbon functionalizate cu grupari carboxil) s-a studiat utilizand voltametria ciclica. S-au fabricat trei biosenzori, s-au inregistrat raspunsurile voltamperometrice si s-au comparat aceste semnale. Rezultatele obtinute (curentul picului catodic) atunci cand biosenzorul Ty-SWCNT-COOH/SPE a fost imersat in solutie de tiramina 100  $\mu$ M (in solutie tampon fosfat 0,01 M, pH 7,0), exprimate sub forma %RSD au fost mai mici de 2%, ceea ce demonstreaza ca metoda de fabricare a biosenzorului are o reproductibilitate foarte buna. Acest test a confirmat reproductibilitatea procedurii de imobilizare a enzimei in matricea solida pe baza de nanotuburi de carbon functionalizate cu grupari carboxil.

Rezultate similare au fost obtinute si pentru alte enzime (MAO si DAO) imobilizate pe materiale de carbon nanostructurate (grafen, SWCNT, SWCNT-COOH, SWCNT-NH<sub>2</sub>). Respectarea stricta a protocolului de fabricare si a conditiilor de pastrare a substantelor sensibile sunt esentiale pentru prepararea reproductibila a senzorilor si biosenzorilor.

#### **1.4 Studiul durabilitatii senzorilor si biosenzorilor**

Asa cum s-a aratat in studiile privind stabilitatea, **senzorii pe baza de filme LB de ftalocianine** sunt senzori de unica folosinta iar posibilitatea utilizarii lor in practica este pe deplin justificata deoarece tehnica LB permite prepararea de senzori cu caracteristici identice. Acelasi lucru este valabil si pentru toate tipurile de **biosenzori fabricati cu ajutorul tehnicii LB**. Acesti senzori si biosenzori prezinta proprietati analitice foarte bune, un comportament reversibil si limite de detectie foarte mici. Prin urmare acestia se vor putea utiliza ca senzori si biosenzori de unica folosinta in analiza probelor biologice de interes in medicina.

Durabilitatea (stabilitatea pe termen lung) a senzorilor pe baza de **electrozi de pasta de carbon modificati cu ftalocianine** a fost testata prin inregistrarea semnalelor voltametrice pentru o perioada de o luna. Senzorii au fost pastrati in cutii inchise ermetic, in frigider, la 4°C. Curbele voltametrice s-au inregistrat pentru senzorii pe baza de CPE si ftalocianine in solutii apoase de electroliti (solutie de KCl, solutii tampon fosfat de pH 6, 7, 8; etc.) si de amine biogene. Variatia curbelor voltametrice au fost monitorizate in timp.

Prin cuantificarea schimbarilor observate in acest timp s-au analizat modificarile in ceea ce priveste potentialul picurilor, curentul picurilor precum si variatia intregii curbe (reprezentata prin 10 coeficienti *kernel* caracteristici). De exemplu, potentialele picurilor ftalocianinelor dupa o luna de utilizare (cinci voltamograme ciclice inregistrate pe zi) prezinta o deviatie standard relativa mai mica de 2,5% pentru toti senzorii si electrolitii analizati. Acelasi studiu realizat in cazul aminelor biogene a aratat ca potentialele picurilor senzorilor prezinta o deviatie standard relativa mai mica de 5% pentru toti senzorii si aminele analizate.

Un alt studiu realizat pentru a testa durabilitatea acestor senzori in ceea ce priveste potentialul picurilor, curentul picurilor si a curbei voltametrice s-au masurat patru solutii de amine biogene (dimetilamina, trimetilamina, histamina, putresceina) cu acelasi electrod (LuPc<sub>2</sub>-CPE) timp de o luna. Dupa imersarea in fiecare solutie de amina s-au inregistrat cateva curbe voltametrice (cinci cicluri). Intre masuratorile efectuate pentru fiecare amina, senzorii s-au spalat cu apa ultrapura si s-au pastrat intr-o cutie inchisa ermetic in frigider.

In Tabelul 2 sunt prezentate valorile deviatiei standard relative a potentialelor picurilor si a curentilor picurilor GdPc<sub>2</sub> in solutie de dimetilamina (electrolitul este KCl 0,1M).

**Tabelul 2.** Valorile deviatiei standard relative a potentialelor picurilor bisftalocianinei de Gd in solutie de dimetilamina (electrolitul este KCl 0,1M) dupa o luna


Asa cum se poate observa in Tabelul 2, valorile deviatiei standard relative pentru potentialele si curentii picurilor ftalocianinei sunt mai mici de 5%.

Valorile %RSD pentru curba voltametrica totala s-au calculat pe baza celor 10 coeficienti kernel. Valorile calculate s-au situat sub 7% pentru toate solutiile analizate. Acest rezultat demonstreaza ca senzorii pe baza de CPE modificati cu ftalocianine prezinta o buna stabilitate pe termen lung. Acest tip de senzori se pot utiliza perioade lungi de timp si, in plus, cand raspunsul senzorului este modificat acesta poate fi recuperat.

Unul dintre cele mai importante avantaje a acestor senzori este ca este posibila refacerea (curatarea) suprafetei active prin eliminarea primului strat printr-o slefuire cu o hartie de filtru. O alta metoda este regenerarea semnalului senzorului cu ajutorul voltametriei ciclice prin inregistrarea a 10 cicluri in solutie apoasa de KCl 0,1 M.

In concluzie, stabilitatea senzorilor pe baza de CPE depinde de numarul de masuratori si de tipul de mostre in care acestia sunt imersati. Un electrod mentinut in conditii adecvate, poate fi utilizat pentru o perioada de cel putin o luna dupa care este necesara o regenerare a suprafetei active.

Pentru a se verifica durabilitatea **senzorilor pe baza de polipirol** s-au inregistrat voltamogramele ciclice ale acestora in solutie de KCl 0,1 M in zile succesive, timp de 5 zile. Schimbarile observate intre voltamogramele inregistrate corespund unei usoare scaderi a curentilor picurilor. S-au calculat valorile deviatilor standard relative (%RSD) ale valorilor medii ale raspunsurilor senzorilor (masurate ca intensitati ale picurilor). In Tabelul 3 se prezinta valorile %RSD calculate pentru voltamogramele ciclice inregistrate in cinci zile consecutive cu un senzor de Ppy/DSA imersat in solutie de KCl 0,1 M.

**Tabelul 3.** Valorile %RSD calculate pentru curentii picurilor din voltametria ciclica a senzorului Ppy/DSA inregistrata in KCl 0,1 M timp de cinci zile consecutive


Aceste date indica o stabilitate pentru o perioada de cinci zile pentru toti senzorii inregistrandu-se valori ale %RSD mai mici de 20%.

In cazul utilizarii curbei integrale (10 coeficienti kernel pentru o curba) valorile %RSD sunt cu 2-3% mai mari decat cele calculate pentru curentul picurilor.

In schimb, valorile %RSD sunt mai mici decat 7% daca se iau in considerare potentialele picurilor.

Trebuie subliniat faptul ca senzorii pot fi inlocuiti cu usurinta deoarece fabricarea senzorilor pe baza de polipirol este foarte reproductibila.

In alt studiu s-a analizat biosenzorii pe baza de polipirol si tirozinaza cu scopul determinarii durabilitatii si a pastrarii activitatii enzimatice la temperatura camerei precum si in frigider. Stabilitatea enzimei s-a monitorizat in timp masurandu-se semnalul biosenzorilor intr-o solutie de dopamina de concentratie

cunoscuta (50  $\mu\text{M}$ ). La temperatura camerei (aproximativ 20°C) activitatea enzimatică s-a diminuat rapid, observându-se o scădere de aproximativ 70% din activitatea enzimatică inițială în 10 zile. O scădere mult mai mică a răspunsului biosenzorilor s-a observat atunci când electrozul este păstrat la 4°C, în frigider. S-a observat că biosenzorul menține 85% din activitatea inițială a enzimei până la o lună de zile. După această perioadă are loc o scădere accelerată a activității enzimatică. Concluzia acestui studiu a fost că pentru a se putea menține sensibilitatea biosenzorilor o perioadă relativ lungă de timp, aceștia trebuie să se păstreze în frigider.

Rezultate similare s-au obținut și în cazul în care enzima imobilizată în matrice de carbon a fost DAO, activitatea enzimei menținându-se în proporție de 77% după o lună de păstrare în frigider.

Stabilitatea biosenzorului Ty-SWCNT/GCE în timpul depozitării în frigider (la 4°C) a fost confirmată prin utilizarea biosenzorului la intervale de 24 ore, timp de o lună. Evoluția răspunsului biosenzorului în timp este următoarea. După 15 zile, răspunsul biosenzorului a început să scadă. Cu toate acestea, biosenzorul și-a menținut 89% din răspuns (curentul catodic) după o lună de depozitare. Stabilitatea biosenzorului Ty-SWCNT/GCE este bună, biosenzorul putându-se utiliza timp de cel puțin o lună, cu o corecție adecvată a drift-ului.

Studiul durabilității biosenzorilor pe baza de SPE și LB nu a fost necesar deoarece stabilitatea acestora este redusă (câteva ore).

### 1.5 Determinarea limitelor de detecție a senzorilor și biosenzorilor

Pentru determinarea limitei de detecție (LOD) s-au construit curbele de calibrare ale senzorilor și biosenzorilor. Măsurătorile s-au realizat în condiții optime de pH, temperatură, electrolit etc. LOD s-a calculat folosind relația  $LOD = 3 \times \sigma / m$  ( $\sigma$ -abaterea standard relativă a semnalului biosenzorului corespunzătoare concentrației celei mai reduse din dreapta de calibrare,  $m$ -panta dreptei de calibrare). Valorile limitelor de detecție se situează între  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ M în cazul senzorilor și  $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M pentru biosenzori. În tabelele următoare sunt prezentate o parte dintre rezultate obținute pentru o serie de senzori și biosenzori construiți și caracterizați în acest proiect de cercetare.

**Tabelul 4.** Valorile LOD pentru senzorii pe baza de CPE modificați cu ftalocianine pentru diferiți compuși aminici



**Tabelul 5.** Valorile LOD pentru senzorii pe baza de polipirol dopați cu diferiți agenți dopanți la detecția trimetilaminei


**Tabelul 6.** Valorile LOD pentru senzorii pe baza de polipirol dopați cu diferiți agenți dopanți la detecția amoniacului și putresceinei

--	--	--


**Tabelul 7.** Valorile LOD pentru senzori SPE pe baza de nanofibre de carbon, nanotuburi de carbon si grafen


**Tabelul 8.** Valorile LOD pentru o serie de biosenzori dezvoltati in acest proiect


Aceste rezultate foarte bune se datoreaza naturii si structurii elementului sensibil care contine materiale nanostructurate, compatibile cu aminele biogene si folosirea de mediatori electronici si enzime care faciliteaza schimbul de electroni crescand sensibilitatea si selectivitatea.

**1.6 Determinarea timpului de raspuns a senzorilor si biosenzorilor**

Timpul de raspuns al senzorilor si biosenzorilor depinde de tehnica folosita pentru masurare. Astfel, daca tehnica utilizata este voltametria ciclica, timpul de inregistrare al raspunsului poate varia intre 30 de

secunde si 5 minute, depinzand de viteza de scanare si domeniul de potential utilizat. Pentru senzorii pe baza de carbon modificati cu ftalocianine, voltamogramele ciclice s-au inregistrat cu o viteza de scanare de  $100 \text{ mV}\times\text{s}^{-1}$  si un domeniu de potential intre  $-1\text{V}$  si  $1,3\text{V}$ . Aceleasi conditii s-au utilizat si in cazul senzorilor LB pe baza de ftalocianine. Pentru senzorii pe baza de polipirol, voltamogramele ciclice s-au inregistrat cu o viteza de scanare de  $50 \text{ mV}\times\text{s}^{-1}$  si un domeniu de potential intre  $-1\text{V}$  si  $0,5\text{V}$ .

In cazul biosenzorilor, voltamogramele ciclice s-au inregistrat cu o viteza de scanare de  $50 \text{ mV}\times\text{s}^{-1}$  si un domeniu de potential intre  $-0,5\text{V}$  si  $0,5\text{V}$ . Pentru masuratorile amperometrice, raspunsul biosenzorilor a fost cuantificat ca fiind timpul de modificare a curentului de echilibru de la starea stationara initiala la noua stare de echilibru la care se ajunge dupa adaugarea unei cantitati cunoscute de substanta de analizat. Valorile timpului de raspuns variaza intre 3 si 10s in conditiile de functionare optime de potential aplicat, pH, tarie ionica si temperatura.

In concluzie, timpul necesar pentru analiza mostrelor este foarte redus. Prin urmare, senzorii si biosenzorii realizati in acest proiect sunt apti pentru masuratori *on-line*, *in-line* si *real-time* a mostrelor alimentare si biologice.

### **1.7 Determinarea reversibilitatii si recuperarii senzorilor si biosenzorilor**

Recuperarea senzorilor si biosenzorilor dupa ce au folositi pentru analiza mostrelor a depins de tipul mostrei si de numarul de masuratori. Astfel, senzorii pe baza de pasta de carbon s-au recuperat dupa ce au fost folositi in masuratori electrochimice, modificarile suferite fiind reversibile, prin doua metode: slefuirea suprafetei cu o hartie de filtru si prin ciclare in solutie de KCl  $0,1\text{M}$ . Ambele metode asigura o recuperare foarte buna a senzorilor.

Metoda ciclarii in solutie de KCl  $0,1\text{M}$  este cea mai buna metoda pentru recuperarea senzorilor pe baza de polipirol. Prin aceasta metoda se elimina substantele contaminante de pe suprafata senzorilor, modificarea polipirolului fiind una reversibila.

In cazul biosenzorilor, recuperarea semnalului amperometric si voltametric nu a fost posibila dupa o utilizare intensiva. Contaminarea biosenzorului a condus la modificarea ireversibila a conformatiei enzimei si nu a fost posibila revenirea la starea initiala. Pastrarea in conditii necorespunzatoare a condus la denaturarea componentei proteice a enzimei si pierderea activitatii biocatalitice.

In concluzie, cercetarile realizate pe parcursul anului 2014 au condus la obtinerea de senzori si biosenzori caracterizati complet din punct de vedere al performantelor analitice, al timpului de viata si folosire al acestora. Cunoasterea comportamentului senzorilor si biosenzorilor se va utiliza pentru alegerea senzorilor si biosenzorilor pentru aplicatiile pe probe reale.



In perioada ianuarie-decembrie 2015 s-au realizat activitatile prevazute in planul de realizare al proiectului, activitati necesare pentru indeplinirea obiectivul general al proiectului, un sistem electronic pe baza de senzori chimici si biosenzori pentru analiza aminelor biogene. In continuare se vor prezenta activitatile realizate si obiectivele atinse in 2015.

### Testarea senzorilor si biosenzorilor

#### **1. Selectarea retelelor de senzori si biosenzori pentru aplicatii pe mostre reale**

Pentru analiza mostrelor reale s-au selectat senzori si biosenzori cu proprietati corespunzatoare scopului urmarit si care sunt capabili de a detecta aminele biogene cu o suficienta sensibilitate.

Prima categorie de senzori care au fost inclusi in retea de senzori a sistemului electronic sunt **senzorii pe baza de polipirol** dopat cu diferiti anioni. Anionii dopanti si conditiile de electrosinteza sunt prezentate in Tabelul 1.

**Tabelul 1.** Conditile de electropolimerizare utilizate pentru realizarea senzorilor de polipirol



A doua categorie de senzori inclusa in retea de senzori sunt **electrozii serigrafati** pe baza de nanomateriale de carbon, comerciali, utilizati ca atare sau modificati in laborator cu ftalocianine. S-au folosit electrozi serigrafati de carbon (4 mm in diametru) achizitionati de la firma Dropsens ([www.dropsens.com](http://www.dropsens.com), modele 110 CNT, 110 GPH, 110 CNF). Acesti electrozi serigrafati sunt conceputi pentru realizarea de senzori si biosenzori cu o arie electrochimic activa cu proprietati superioare. Nanomaterialele de carbon (nanotuburi de carbon - CNT, nanofibre de carbon - CNF si grafen - GPH) au proprietati mecanice, electrice, termice excelente fiind excelenti modificatori ai matriciei de carbon pentru cresterea sensibilitatii si selectivitatii.

Din categoria biosenzorilor s-au inclus in retea o multitudine de biosenzori, dintre care cei mai importanti se prezinta in continuare.

**Biosenzor de baza de pasta de carbon pentru serotonina.** Electrozi de pasta de carbon au fost preparati prin amestecarea nanopulberii de carbon (marimea particulelor <50 nm (TEM), ≥99% pe baza cuantificarii urmelor de metale, Sigma-Aldrich) si ftalocianina de cobalt (II) - CoPC (15%, g/g). Nujolul a fost folosit ca liant al amestecului compozit multicomponent. Pasta multicomponent a fost introdusa intr-o seringă de 1 ml din PVC (policlorura de vinil) si s-a compactat. Un fir de cupru metalic s-a utilizat pentru realizarea contactului electric. Tirozinaza (Ty) a fost imobilizata pe suprafata electrodului CoPC-CPE (CPE modificat cu CoPC) prin tehnica *drop-and-dry*, urmata de reticulare cu glutaraldehida.

**Biosenzor pe baza de electrod de carbon sticlos pentru catecolamine.** Suprafata electrodului de carbon sticlos (GCE) a fost slefuita cu pasta de alumina, s-a spalat cu apa ultrapura si in final cu metanol. Partea activa a electrodului a fost un disc cu diametrul de 4 mm. Celelalte parti ale electrodului de carbon au fost acoperite cu rasina epoxidica izolatoare. Dupa procesul de curatare si slefuire, suprafata GCE a fost

acoperita cu 10  $\mu\text{L}$  suspensie de SWCNTs (1,0 mg x  $\text{ml}^{-1}$  in metanol). Solventul a fost evaporat in aer, la temperatura camerei. Enzima, Ty, a fost imobilizata pe GCE modificat cu SWCNTs (SWCNT-GCE) prin tehnica *drop-and-dry*, urmata de reticulare.

Polipirolul dopat cu anioni utilizat pentru fabricarea de senzori s-a folosit pentru imobilizarea DAO prin reticulare. Diferite tipuri de **biosenzori pe baza de polipirol si aminooxidaze** (monoaminoxidaza A, monoaminoxidaza B si respectiv diaminoxidaza) au fost inclusi in retea de senzori si biosenzori. Ei au diferite sensibilitati si selectivitati fata de aminele biogene. De exemplu biosenzorul pe baza de diaminoxidaza (DAO) din rinichi de porc, E.C. 1.4.3.6), reticulat cu glutaraldehida pe filme de polipirol electrosintetizate este foarte sensibil pentru detectia histaminei.

A fost inclusa in retea de senzori si biosenzori un biosenzor pentru determinarea dopaminei si epinefrinei folosind **tirozinaza** (din ciuperci, E.C. 1.14.18.1), reticulata cu glutaraldehida pe **electrozi serigrafati de carbon modificati cu grafen**.

De asemenea, pentru determinarea catecolaminelor a fost inclus unui biosenzor pe baza de **tirozinaza** reticulata cu glutaraldehida pe **electrozi serigrafati de carbon modificati cu nanotuburi carbon cu un singur perete functionalizate cu grupari amidice**.

Biosenzorul **Ty-SWCNT-COOH / SPE** pentru detectia tiraminei. O solutie de tirozinaza 5,0 mg x  $\text{ml}^{-1}$  a fost preparata cu solutie tampon fosfat 0,01 M cu pH 7,0. 50  $\mu\text{L}$  de tampon fosfat 0,01 M (pH 7,0) continand 5 mg x  $\text{ml}^{-1}$  de Ty a fost depusa pe suprafata de 12,56  $\text{mm}^2$  stratului de SWCNT-COOH (nanotuburi de carbon cu un singur perete functionalizate cu grupari carboxil) si s-a uscat la 4  $^{\circ}\text{C}$  timp de 10 minute. Apoi electrodul se trateaza cu vapori de glutaraldehida pentru imobilizarea Ty pe suprafata SWCNT-COOH / SPE rezultand un biosenzor Ty-SWCNT-COOH / SPE. Dupa preparare, biosenzorul a fost spalat foarte bine cu apa ultrapura pentru a elimina toate substantele chimice adsorbite fizic.

In retea s-a inclus si biosenzorul pe baza de **electrozi serigrafati de carbon modificati cu albastru de Prusia si diaminoxidaza**.

In retea s-a utilizat si biosenzorul pe baza de **filme Langmuir - Blodgett ale tirozinazei, acidului arachidic si bis-ftalocianina de disprosiu** pentru detectarea electrochimica a tiraminei si dopaminei.

In concluzie, in aceasta activitate au fost selectati senzori si biosenzori optimi pentru detectarea si/sau cuantificarea aminelor biogene. Noii senzori si biosenzori sunt pe baza de diferite tipuri de electrozi (design-uri), diferite materiale pentru imobilizare, mediatori de electroni si enzime. Sistemul pe baza de multi(bio)senzori dezvoltat este capabil sa detecteze toate categoriile de amine biogene.

## **2. Selectarea metodelor pentru prelucrarea datelor**

Obiectivul acestei activitati este de a se stabili metodele de analiza a datelor cu scopul discriminarii si clasificarii mostrelor analizate, precum si stabilirea de corelatii intre diferitele tipuri de masuratori.

Pentru prelucrarea datelor obtinute cu senzorii si biosenzorii dezvoltati in acest proiect s-au optimizat si utilizat mai multe metode de analiza a datelor multivariante: analiza componentelor principale (PCA), analiza discriminanta - rezolvata prin **metoda** celor mai mici patrute (PLS-DA), analiza de varianta (ANOVA), modelarea usoara si independenta prin analogia claselor (SIMCA), testul t, regresii multiple prin metoda celor mai mici patrute pentru un parametru sau pentru mai multi parametri (PLS1 si PLS2).

Senzorii si biosenzorii prezinta voltamograme complexe (o varietate de picuri la diferite potentiale si cu diferiti curenti). Complexitatea intrinseca si selectivitatea incrucisata a semnalelor generate de retea de senzori si biosenzori este valoroasa, deoarece setul de date contine o cantitate mare de informatii cu privire la proba. Dar, faptul ca intregul set de date contine informatii semnificative poate face dificila prelucrarea datelor. In consecinta, este necesara o etapa de pre-procesare pentru a reduce numarul de variabile (fara pierdere de informatii).

Pentru analiza datelor obtinute cu senzorii sau biosenzorii dezvoltati in acest proiect este necesara o etapa de preprocesare. Voltamogramele ciclice (CV) si voltamogramele obtinute prin voltametrie de unda patrata (SWV) sunt analizate diferit.

Folosind aceasta metoda, curba SWV este inmultita cu un numar de 10 functii kernel, si apoi se integreaza portiunile din curba in raport cu potentialul. Se obtin zece parametri pentru fiecare curba SWV. Un exemplu al aplicarii metodei kernel pentru datele obtinute prin voltametrie de unda patrata se prezinta in Figura 1.

**Figura 1.** Aplicarea metodei kernel pentru voltamograma inregistrata prin SWV

Voltamogramele ciclice au fost pre-procesate matematic si s-au folosit ca sursa de date pentru analiza datelor multidimensionale. Folosind metoda kernel, curba voltamogramei ciclice (E vs. i) este impartita in partea anodica si partea catodica. Apoi, curba anodica este inmultita cu un numar de 10 functii kernel, sub forma de clopot, si se integreaza portiunile din curba in raport cu potentialul. Prin aceasta metoda de pre-procesare a informatiilor raspunsul global este redus la 10 parametri reprezentativi pentru fiecare curba.

Un exemplu al aplicarii metodei kernel pentru datele obtinute prin voltametrie ciclica se prezinta in Figura 2.

**Figura 2.** Aplicarea metodei kernel pentru voltamogramele inregistrate prin CV

Dupa ce voltamogramele au fost pre-procesate si numarul de variabile redus, variabile obtinute sunt folosite ca intrare pentru analiza datelor multivariate folosind, de exemplu analiza componentelor principale sau Analiza discriminanta rezolvata prin metoda celor mai mici patrute pariale ca metode de discriminare si clasificare. De asemenea, au fost utilizate si alte metode asa cum se prezinta in continuare. In continuare se prezinta o parte dintre rezultatele obtinute in activitatea de cercetare desfasurata si aplicarea diferitelor metode de analiza a datelor.

### ***Reteaua de senzori pe baza de Ppy. Discriminarea aminelor biogene***

Raspunsurile obtinute prin utilizarea SPEs modificati cu polipirol prezinta un grad ridicat de complexitate, deoarece raspunsurile observate in voltamograme sunt relationate cu materialul electrodului si cu natura si concentratia aminelor prezente in solutiile de analizat (si interactiunilor electrod- solutie).

Acest lucru face posibila utilizarea senzorilor intr-o configuratie de retea. Modelul raspunsurilor generate de retea de senzori este o amprenta chimica a probei studiate. Acest model poate fi relationat cu anumite caracteristici ale probelor cu ajutorul chemometriei.

Pentru a evalua capacitatea de discriminare a retelei de senzori voltametrici, s-a realizat analiza componentelor principale utilizand informatiile obtinute cu retea de senzori formata din senzori SPE modificati cu Ppy. Figura 3 prezinta rezultatele PCA sub forma unui grafic tridimensional al componentelor principale care permite obtinerea unor grupuri bine definite si separate.

**Figura 3.** Graficul PCA al voltamogramelor ciclice pentru solutiile de amine cu retea de senzori pe baza de PPy

PCA a fost validata prin metoda de validare incrucisata total si s-au folosit un numar optim de 5 componente principale. Primele trei componente principale explica 97% din informatie (PC1 = 57%; PC2 = 24%; PC3 = 16%).

Clustersele separate indica faptul ca cele cinci solutii pot fi discriminate in mod clar unele de celelalte. In plus, pozitiile clusterelor sunt relationate cu proprietatile electrochimice ale solutiilor analizate. Se observa ca clusterul corespunzator amoniacului apare in partea stanga a diagramei, departe de restul clusterelor celorlaltor amine. Amine alifatiche apar in partea dreapta a diagramei. De asemenea, se observa o discriminare clara intre amina primara (CAD), amina secundara (DMA) si amina terciara (TMA). Amina heterociclica, HIS are un comportament electrochimic diferit care permite sa o discrimineze de aminele alifatiche si de amoniac.

### ***Monitorizarea prospechimii pestelui***

Prospetimea pestelui a fost monitorizata prin aprecierea globala a compusilor specifici alterarii (inclusiv aminele biogene) folosind o retea multisenzor pe baza de Ppy. In acest scop, pestele a fost eviscerat, spalat si depozitat la 4 °C timp de 10 zile intr-o cutie inchisa. In fiecare zi, mostre de muschi au fost procesate si masurate cu senzorii pe baza de Ppy.

Modelul de deteriorare a pestelui depozitat pe gheata cuprinde patru faze: i) pestele este proaspat si are un gust delicat si dulce caracteristic (foarte proaspat); ii) exista o pierdere a mirosului si gustului caracteristic. Carnea devine neutra, dar nu are arome neplacute (proaspat); iii) exista semne vizibile de deteriorare si apar o serie de volatile cu miros neplacut; iv) pestele este alterat si are un miros de produs putred.

Analiza componentelor principale a fost utilizata pentru a analiza procesul de degradare cu retea de senzori. Figura 4 prezinta diagrama PCA obtinuta utilizand semnalele electrochimice inregistrate in fiecare zi, folosind senzorii pe baza de Ppy.

Figura 4. Graficul PCA al monitorizarii proaspetimii pestelui cu o retea de senzori pe baza de PPy

Graficul PCA al primelor trei componente principale include 79% din varianta. O discriminare clara a grupurilor poate fi observata. Primul cluster, care apare in partea stanga a figurii corespunde probelor analizate zile 1 si 2 si corespund unui produs extrem de proaspat. Probele analizate in zile 3 si 4 nu au prezentat nici un miros neplacut si ar putea fi clasificat ca fiind un produs proaspat. Clusterelor apar in partea centrala a figurii. Probele analizate in zilele 5 si 6 prezinta miros neplacut (produs degradat). Ultimile grupuri care apare in partea dreapta a figurii corespund probelor analizate in zilele de la 7 pana la 10 (peste stricat).

PLS-DA a fost folosita pentru a determina etapa (ziua) de degradare a pestelui pe baza raspunsului retelei de senzori. Fiind o metoda supravezata, analiza discriminanta rezolvata prin metoda minimelor patrute partiale (PLS-DA) s-a utilizat pentru a evalua capacitatea de clasificare a sistemului.

Asa cum se prezinta in Tabelul 2, modelul PLS-DA validat prin metoda incrucisata total (utilizand un numar optim de 6 variabile latente), a relevat o identificare clara a fazelor de degradare a pestelui. Tabelul 2 centralizeaza datele cantitative obtinute din modelul PLS-DA.

**Tabelul 2.** Rezultatele PLS-DA la calibrare si validare



Asa cum se observa se obtine un model de buna calitate atat la calibrare cat si la validare (corelatii bune intre senzori si variabile clasificate, erorile medii patrute de calibrare si validare mici). Aceste rezultate indica faptul ca aceasta metodologie este capabila sa monitorizeze in timp real proaspetimea pestelui in timpul depozitarii.

**Senzori pe baza de materiale din carbon pentru detectarea aminelor biogene**

Pentru analiza diferitelor amine biogene in solutie s-au folosit SPE modificati cu trei materiale din carbon: CNT, GPH si CNF. Graficul PCA este prezentat in Figura 5.

**Figura 5.** Graficul PCA obtinut din CVs obtinute cu SPEs in solutii de amine

Reteaua de senzori este capabila de a discrimina solutiile aminelor biogene.

### **Aplicarea in detectia histaminei**

Au fost analizate diferite tipuri de probe de peste cu biosenzorul realizat. Scopul acestei diversitati de probe a fost de a evalua daca biosenzorul este capabil sa cuantifice cantitatea de histamina in diferite specii de pesti, cu fiabilitate buna.

Cuantificarea histaminei a fost efectuata cu biosenzorul pe baza de DAO immobilizata pe electrozi serigrafati de carbon modificati cu grafen. Cuantificarea histaminei a fost realizata prin intermediul interpolarii in dreapta de calibrare a histaminei. Metoda standardului intern a fost, de asemenea, utilizata pentru a studia influenta efectului interferentelor din mostre. In conditiile optime stabilite, masuratori amperometrice au fost efectuate intr-o celula electrochimica care contine 20 ml de solutie tampon fosfat de pH 7,4 si aplicarea unui potential de 0,4 V vs. Ag. Toate masuratorile amperometrice au fost realizate in triplicat.

Asa cum se observa in Tabelul 3, exista mici diferente intre metoda interpolarii si metoda standardului intern, concluzionand ca influenta interferentelor nu a fost semnificativa in detectarea histaminei.

**Tabelul 3.** Cantitatile de histamina din diferite probe de peste determinate cu ajutorul biosenzorului si a kit-ului ELISA. Rezultatele obtinute prin masuratorile amperometrice sunt exprimate cu un interval de incredere ( $n = 3$ , interval de incredere de 95%).



Evolutia continutului de histamina in probele de peste depozitate la 4°C a fost studiata initial si dupa 48 de ore pentru toate probele de peste. Rezultatele obtinute sunt prezentate in Figura 6.

**Figura 6.** Evolutia continutului total de histamina in probele de peste. Mostrele au fost depozitate la 4°C. Valorile concentratiei histaminei sunt media tuturor metodelor de cuantificare utilizate.

Pentru toate probele se observa o crestere a continutului de histamina, demonstrand o crestere a toxicitatii cu cresterea timpului de depozitare. Din acest motiv, valorile concentratiei histaminei pot fi folosite ca un indicator al calitatii pestelui sau prospetirii pestelui. Controlul calitatii si prospetirii este deosebit de importanta pentru a preveni sindromul scombroid, care rezulta ca urmare a consumului de peste stricat.

Ca o dovada in plus a metodei propuse, a fost realizat testul t Student pentru rezultatele obtinute cu biosenzorul amperometric si cele obtinute cu kit-ul ELISA. In cazul masuratorilor prin interpolare si aditiei standard, valoarea experimentală a lui t a fost 0,4678, in timp ce valoarea critica a lui t, tabelata, este 2,2621 (nivelul de incredere de 95% si 9 grade de libertate). Prin urmare, nu exista diferente semnificative intre concentratiile gasite prin interpolare si metoda aditiei standard. Pe de alta parte, valorile experimentale ale lui t sunt 0,1678 si respectiv 0,7263, atunci cand s-au comparat metoda de interpolare cu metoda ELISA si metoda aditiei standard cu metoda ELISA. Valorile t experimentale sunt mai mici decat valoarea critica a lui t, in ambele cazuri (2,2621 cu un nivel de incredere de 95% si 9 grade de libertate). S-a ajuns la concluzia ca nu exista diferente semnificative intre concentratiile gasite cu metoda amperometrica si metoda kit-ului ELISA.

#### **Utilizarea ANOVA in analiza datelor**

Date electrochimice au fost testate pentru semnificatia statistica folosind ANOVA cu un factor in Excel. Factorul a fost specia de peste. Valorile lui p < 0,05 au fost considerate statistic semnificative. In tabelul 4 sunt prezentate rezultatele semnificatiei metodei ANOVA. ANOVA s-a bazat pe testul diferentei onest semnificativa (testul Tukey). Acest test se bazeaza pe compararea perechilor dintre medii, asa cum se prezinta in ecuatie:

$M_i - M_j =$  diferenta dintre medii

MSE = eroarea patratica medie

$n_h =$  media armonica

Asa cum se prezinta in Tabelul 4 mediile populatiilor sunt semnificativ diferite. Probele pot fi clasificate in grupuri in raport cu tipul de peste analizat. ANOVA a aratat diferente semnificative intre aceste grupuri pe baza rezultatelor obtinute cu biosenzori.

**Tabelul 4.** Rezultatele semnificatiilor obtinute prin ANOVA


\* p < 0,05 (semnificativ)

\*\* p < 0,01 (inalt semnificativ)

### Statistica de baza

Biosenzorul Ty/PO4-PPy/Pt a fost aplicat pentru determinarea tiraminei in probe de varza murata. Continutul total de tiramina din proba, exprimata in unitati echivalente de tiramina, a fost analizata prin metoda aditiei standard.

Amperogramele au fost inregistrate in conditiile optime (potential aplicat -0,250 V, agitare constanta a probei, pH 7,0). Un volum de 100  $\mu\text{L}$  de extract de tiramina a fost introdusa in celula electrochimica, care contine 5 ml de solutie tampon fosfat 0,01 M cu pH 7,0. Dupa aceea, au fost realizate adaugari succesive de 100  $\mu\text{L}$  dintr-o solutie 10  $\mu\text{M}$  tiramina. Parametrii regresiei curent - concentratie au fost evaluate utilizand software-ul XLSTAT. Concentratia de tiramina determinata a fost  $15,56 \pm 0,42 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ,  $\alpha = 0,05$ ), cu o RSD de 2,16%.

Prin urmare, concentratia de tiramina determinata in proba de varza murata a fost de  $264,52 \pm 7,14 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ , o valoare care corespunde unui continut redus de amine biogene in proba de varza murata. Pentru a verifica viabilitatea acestei proceduri de determinare a tiraminei in probele varza murata, s-au efectuat studii de recuperare analitica. Cantitatea totala de tiramina intr-un esantion cu adaos de tiramina,  $54,78 \mu\text{M}$ , a fost determinata prin metoda aditiei standard. Au fost efectuate cinci repetitii ale determinarilor. Concentratia de tiramina cuantificata a fost  $54,51 \pm 1,60 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ,  $\alpha = 0,05$ , RSD = 2,36%), cu o medie a recuperarii analitice de 99,32%.

### Regresii multiple

Modificarile pH-ului in probele de peste pe intreaga perioada de depozitare sunt prezentate in tabelul 5. Regresia prin metoda celor mai mici patrute partiale (tip PLS1) au fost realizate pentru a modela relatiile dintre semnalele biosenzorului si valorile pH-ul probelor. pH-ul initial al carni de peste a fost aproape de 7,49, ceea ce este o valoare tipica in produse foarte proaspete. In solutia obtinuta prin procedura de procesare a pestelui pH-ul este 6,81, ceea ce indica faptul ca solutia apoasa de KCl nu influenteaza pH-ul carni de peste.

In timpul depozitarii s-a inregistrat o scadere a pH-ului ca urmare a proceselor chimice si enzimatic care au loc in primele etape post-mortem. Dupa 5 zile pH-ul solutiei incepe sa creasca ca urmare a formarii aminelor biogene. O foarte buna corelare a fost obtinuta utilizand un model cu 5 variabile latente si validate prin metoda validarii incrucisate total. Coeficientul de regresie a fost 0,973 la calibrare si 0,961 la validare. In plus, au fost obtinute valori mici ale RMSEC (0,042) si RMSEP (0,051).

**Tabelul 5.** Evolutia pH-ului in timpul depozitarii la  $4^\circ\text{C}$



### Classificarea prin SIMCA

Modelarea usoara si independenta prin analogia claselor (SIMCA) a fost, de asemenea, aplicata pentru clasificarea probelor. Aceasta metoda calculeaza mai multe modele PCA pentru fiecare clasa cu un set de date pentru antrenare (validate prin metoda incrucisata total, cu un numar optim de componente principale). In acest caz, modelele au fost construite pentru persoane sanatoase (clasa 1) si persoane bolnave (clasa 2). Apoi, probele necunoscute externe sau unele repetitii sunt comparate cu modelele de clasa si atribuite unei clase (sanatos sau bolnav) in functie de potrivirea lor cu setul de antrenament original. Pentru a afisa rezultatele obtinute cu SIMCA s-au utilizat graficele Coomans, in care datele necunoscute sunt atribuite sau nu unui model cu un nivel de incredere de 95%.

Asa cum s-a observat in graficul Coomans prezentat in Figura 7 a fost obtinuta o clasificare de 100% a probelor clinice.

**Figura 7.** Graficul Coomans al clasificarii probelor clinice

Au fost construite doua baze de date: una pentru cuantificarea unui analit specifice, iar a doua pentru clasificarea probelor in functie de caracteristicile lor.

S-au gasit corelatii bune intre semnalele obtinute cu sistemul expert de senzori si continutul de amine biogene prin intermediul modelelor de regresie PLS. Folosind modele SIMCA sau PLS-DA, s-au stabilit corelatii intre raspunsurile (bio)senzorilor si bolile de inima.

In concluzie, numeroase metode au fost realizate si aplicate pentru analiza datelor, cu rezultate bune facilitand stabilirea semnificatiei datelor obtinute cu senzorii si biosenzorii la analiza mostrelor.

### **3. Analiza aminelor biogene in produse din carne, branzeturi si bauturi fermentate**

In acest scop, am dezvoltat un sistem de multibiosenzor cuplat cu o metoda de analiza a datelor multivariate pentru detectarea si/sau cuantificarea aminelor biogene. Analizele mostrelor au fost realizate prin intermediul unor tehnici amperometrice si/sau voltametrice.

#### **Analiza aminelor biogene in produse din carne**

Acest studiu prezinta dezvoltarea unei limbi bioelectronice pentru cuantificarea aminelor biogene in produsele din carne. A doua aplicatie este monitorizarea calitatii produselor din carne in timp in conditii de degradare accelerata. Limba bioelectronica include o serie de patru biosenzori dezvoltati si optimizati in laborator. Biosenzorii sunt pe baza de electrozi serigrafati de carbon modificati cu nanotuburi de carbon cu un singur perete si enzime. Enzimele au fost tirozinaza, diaminoxidaza, peroxidaza si monoaminoxidaza. Masuratorile cu biosenzori au fost efectuate prin amperometrie si voltametrie ciclica. Voltamogramele ciclice arata procesele redox legate de activitatea electrochimica a compusilor din probe sau formate in reactiile catalizate de enzime (de exemplu amine biogene, peroxid de hidrogen, derivati de hidrochinona). Analiza datelor a fost realizata prin intermediul analizei componentelor principale, analiza discriminanta rezolvata prin metoda celor mai mici patrute partiale, regresie prin metoda celor mai mici patrute partiale si analiza de varianta.

De exemplu, in Tabelul 6 sunt prezentate caracteristicile unui biosenzor folosit in cuantificarea aminelor biogene in produse din carne.

**Tabelul 6.** Cuantificarea aminelor biogene in produse din carne




S-a constatat ca limba bioelectronica este capabila de a cuantifica continutul de amine biogene in produsele din carne (jambon italian, salam de Sibiu, salam Banatean). In Figura 8 sunt prezentate imagini ale probe utilizate in aceste studii.



**Figura 8.** Produsele din carne analizate

Valorile obtinute sunt in domeniul 380-450 mg × kg<sup>-1</sup>, valori sub limita maxima admisa pentru acest tip de produse alimentare. In conditii de degradare accelerata cresterea cantitatii de amine biogene este usor de determinat si urmarit, pe baza modelelor obtinute de la datele masuratorilor cu limba bioelectronica.

**Analiza aminelor biogene in extracte din carne de vita**

Intr-un alt studiu au fost utilizati senzori pe baza de PPy pentru detectarea si cuantificarea aminelor biogene in extracte din carne de vita. Performantele senzorilor fata de amoniac si putresceina sunt prezentate in tabelul 7.

**Tabelul 7.** Caracteristicile senzorilor pe baza de PPy


Senzorul PPy/FCN are cele mai mici limite de detectie. Recuperarea este aproape de 100% pentru toti senzorii subliniind viabilitatea senzorilor pentru detectarea putresceinei si amoniului in solutii din extract de carne de vita.

**Analiza aminelor biogene in probe de peste marinat si peste afumat**

Concentratia tiraminei in probele de peste afumat si marinat analizate au fost in domeniul de 16,7-61,8 mg x kg<sup>-1</sup> (Tabelul 8). Aceste niveluri de contaminare sunt sub nivelul acceptabil de tiramina in alimente.

**Tabelul 8.** Cuantificarea aminelor biogene in probele de peste



In alt studiu a fost cuantificat continutul de histamina in probele de crap pe parcursul a 5 zile. In tabelul 9 sunt prezentate rezultatele obtinute.

**Tabelul 9.** Continutul de histamina in probele de crap


Continutul de histamina creste in timpul depozitarii in frigider la 4 grade Celsius. Continutul de histamina dupa 4 zile poate avea influente negative asupra sanatatii omului.

**Analiza aminelor biogene in branzeturi**

Acest studiu prezinta proiectarea si optimizarea unui biosenzor electrochimic pentru determinarea aminelor biogene in probele de branza. Biosenzorul se bazeaza pe un electrod serigrafat de carbon modificat cu albastru de Prusia, care detecteaza peroxid de hidrogen produs prin reactia catalizata de diaminoxidaza imobilizata pe suprafata electrodului. Prin urmare, mecanismul de detectie al biosenzorului se bazeaza pe reducerea electrochimica a apei oxigenate.

Conditiiile experimentale care influenteaza proprietatile biosensibile ale biosenzorului au fost optimizate. In conditii optime de pH si de potential, au fost cuantificate caracteristicile biosenzorului. Masuratorile cu biosenzorul au fost efectuate prin amperometrie, curentul rezultat in biosenzor la -0.06 V a fost masurat in functie de concentratia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100 mM tampon fosfat (pH 7,4).

Biosenzorul prezinta o limita de detectie scazuta (0,045 μM), un domeniu de liniaritate de la 2×10<sup>-6</sup> M la 4×10<sup>-5</sup> M. Fabricarea biosenzorului este reproductibila, deviatia standard relativa fiind de 3,2%. In plus, biosenzorul are repetabilitate buna si de inalta afinitate pentru amine biogene gasite de obicei in branzeturi albastre.

In Figura 9 sunt prezentate imaginile probelor utilizate in aceste studiu.





**Figura 9.** Probele de branza analizate

Cuantificarea aminelor biogene in probele de branza (Gorgonzola, Brie, Danish blue si branza de burduf) a fost validata prin metoda aditiei standard.

Rezultatele obtinute sunt prezentate in tabelul 10.

**Tabelul 10.** Rezultatele cuantificarii aminelor biogene in probele de branza


Recuperarea analitica a aminelor biogene (BAs) adaugate in probele de branza sunt prezentate in tabelul 11.

**Tabelul 11.** Recuperarea analitica a aminelor biogene in probele de branza


A fost demonstrata eficienta biosenzorului pentru determinarea BAs in probele de branzeturi.

#### ***Analiza aminelor biogene in bauturi fermentate***

Vinul si berea au fost raportate ca fiind responsabile de durerile de cap la pacientii susceptibili de migrene. Histamina din bauturile alcoolice poate fi cauza reactiilor alergice si a alergiilor. Vinul este considerat o sursa de histamina mai frecventa decat berea. Principalele amine biogene care ar putea fi gasite in vinuri au fost detectate si cuantificate in vinuri rosii si bere folosind biosenzori realizati in acest proiect.

In cazul vinurilor au fost analizate mai multe mostre de vin rosu. Probele au fost analizate cu o retea de biosenzori in triplicat. Rezultatele obtinute sunt incluse in Tabelul 12.

**Tabelul 12.** Aminele biogene si cantitatea detectata in vinuri rosii


Mostrele de bere au fost analizate cu ajutorul rețelei de biosenzori și rezultatele obținute sunt incluse în Tabelul 13. RSD a detectării aminelor biogene a fost 3,4%.

**Tabelul 13.** Amine biogene în probele de bere


Alt produs alimentar fermentat analizat a fost varza murată. Recuperare (%), RSD și media (cu 95% interval de încredere) pentru tiramina extrasă din probele varza murată sunt prezentate în tabelul 14.

**Tabelul 14.** Aminele biogene în probele de varza murată

A fost demonstrată eficiența biosenzorului pentru tiramina determinată în probele de varza murată.

Biosenzorii realizați în acest proiect au demonstrat excelente caracteristici și au fost folosiți cu succes pentru detectarea aminelor biogene într-o mare varietate de probe.

În acest an au fost realizate toate activitățile din planul de lucru și rezultatele obținute au fost în acord cu obiectivele cercetării. Obiectivele propuse pentru acest an au fost realizate în totalitate.

## Raport stiintific privind implementarea proiectului in etapa V

ianuarie 2016 – iunie 2016

In perioada ianuarie-iunie 2016 s-au realizat activitatile prevazute in planul de realizare al proiectului. Aceste activitati sunt necesare pentru finalizarea proiectului si indeplinirea obiectivului general al proiectului, un sistem electronic pe baza de senzori chimici si biosenzori pentru analiza aminelor biogene. In paginile urmatoare va fi prezentat activitatile desfasurate si realizarea obiectivelor acestei etape.

Obiectivul acestei etape a fost: **Testarea senzorilor si biosenzorilor. Studii aplicative.** In acest scop, senzorii si biosenzorii realizati in cadrul acestui proiect au fost aplicate in analiza probelor reale tinand cont de cele mai multe dintre aspectele importante privind analiza produsele alimentare, farmaceutice si probe clinice.

### 1.1 Monitorizarea prosectimii alimentelor

In timpul acestei etape a proiectului au fost realizate diferite studii privind monitorizarea prosectimii produselor alimentare.

#### **Monitorizarea prosectimii pestelui de apa dulce**

In acest studiu s-a realizat un nou biosenzor pentru cuantificarea cu acuratete a histaminei. Elementul sensibil se bazeaza pe diamino oxidaza imobilizata intr-un film nanostructurat de nPt/GPH/chitosan (nPt – nanoparticule de platina, GPH-grafen) a unui electrod de carbon serigrafat modificat (CSPE). In acest sens, au fost studiatii mai multi parametri experimentali cu scopul de a identifica cele mai favorabile conditii pentru a se imbunatati caracteristicile semnalelor electrochimice. In plus, noul biosenzor a fost validat in laborator cu privire la cuantificarea cantitatii histaminei pe mai multe esantioane de peste de apa dulce cu scopul de a se evalua aplicabilitatea in practica.

Diferite probe de peste de apa dulce au fost analizate cu biosenzorul DAO/nPt/GPH/chitosan/CSPE pentru detectarea si cuantificarea histaminei. Scopul utilizarii acestei diversitati mari de probe a fost de a evalua daca cuantificarea cantitatii de histamina din diferite specii de peste de apa dulce poate fi realizata cu o buna fiabilitate.

Cuantificarea histaminei s-a realizat prin interpolarea raspunsului biosenzorului in graficul de calibrare. Metoda adaosului standard s-a utilizat pentru studiile de recuperare si de determinare a interferentelor in detectarea histaminei. In conditiile experimentale optime, masuratorile amperometrice cu biosenzori au fost efectuate in triplicat. Rezultatele sunt prezentate in Tabelul 1.

**Tabelul 1.** Cantitatile de histamina in probele de peste de apa dulce de analizat


Dupa cum se poate observa din Tabelul 1, exista diferente relativ mici între metodele de interpolare și cea a adaosului standard. Deci, interferențele nu sunt semnificative în detectia histaminei în probele de pește de apă dulce.

Evoluția proaspătării a fost monitorizată prin cuantificarea cantității de histamină în toate probele de pește de apă dulce pastrate la temperatura de 4°C. Conținutul de histamină a fost determinat inițial (probe foarte proaspete) și după 48 de ore de depozitare la temperatura de 4°C pentru toate probele de pește. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 1.

**Figura 1.** Creșterile cantităților de histamină în mostrele de pește de apă dulce. Valorile raportate sunt media tuturor metodelor de cuantificare. S1—Crap (proaspat); S2—Crap (48 h); S3—Lin (proaspat); S4—Lin (48 h); S5—Caras (proaspat); S6—Caras (48 h); S7—Biban (proaspat); S8—Biban (48 h); S9—Somn (proaspat); S10—Somn (48 h).

Pentru toate probele din studiu, conținutul de histamină a crescut semnificativ după 48 de ore de păstrare. Este bine cunoscut faptul că nivelurile concentrației de histamină pot fi considerate indicatori specifici și fiabili ai proaspătării pestelui. Calitatea pestelui este, de asemenea, relaționată cu conținutul de histamină. Controlul calității și proaspătării sunt importante pentru probele de pește, în scopul de a preveni sindromul scombroid, care este atribuit ingestiei de pește degradat. Acest tip de determinare ar putea fi pusă în aplicare cu succes cu acest nou biosenzor.

O confirmare suplimentară a metodei bazate pe biosenzorul DAO-nPt/GPH/chitosan/CSPE, se bazează pe testul t-Student aplicat valorilor medii ale concentrațiilor de histamină a mostrelor (intervalul de încredere de 95%, noua grade de libertate). Prin testul t-Student s-au comparat rezultatele obținute cu biosenzorul cu rezultatele metodei ELISA. La compararea rezultatelor obținute prin metoda interpolării și metoda adaosului standard, valoarea t experimentală are valoare 0,4678, în timp ce valoarea lui t critică, tabulată, este 2,2621. Deci, diferențele dintre concentrațiile de histamină obținute prin metoda de interpolării și metoda adaosului standard nu sunt semnificativ diferite din punct de vedere statistic. În plus, valorile lui t obținute experimental au fost 0,1678 și respectiv 0,7263, când metoda interpolării s-a comparat cu rezultatele analizei ELISA și respectiv când metoda adaosului standard s-a comparat cu rezultatele analizei ELISA. Valorile experimentale ale lui t sunt mai mici comparativ cu valoarea t teoretică, critică, de 2,2621. În consecință, diferențele dintre concentrațiile de histamină obținute prin intermediul biosenzorului și ELISA nu sunt semnificativ diferite din punct de vedere statistic, confirmând fezabilitatea biosenzorului.

#### ***Aplicarea rețelei de senzori pentru monitorizarea proaspătării carnii de vită***

Acest studiu a fost realizat folosind senzori voltametrici pe baza de pasta de carbon modificați cu bisftalocianine și polipirol dopat cu diferiți agenți dopanți, cu sensibilitate pentru detectarea și cuantificarea putresceinei și amoniacului. În condițiile experimentale optime, rețeaua de senzori s-a utilizat pentru detectarea și cuantificarea putresceinei și amoniacului în extract dehidratat de carne de vită. Un alt studiu a abordat monitorizarea proaspătării carnii de vită pastrată în condiții de refrigerare.

Prospătarea carnii de vită s-a monitorizat folosind rețeaua de senzori pe baza de polipirol și bisftalocianine. Pentru aceasta, carnea de vită (cotlet și vrăbioara) s-a tăiat în bucăți de dimensiuni mici și s-a pastrat la frigider la temperatura de 4°C timp de zece zile, într-o cutie de plastic închisă ermetic.

În fiecare zi, 5 g de carne de vită s-a triturat și s-au adăugat 45 ml soluție de KCl 0,1M. Amestecul s-a ultrasonat timp de 5 minute și apoi s-a centrifugat la 4000 rpm timp de 5 minute. Apoi s-au înregistrat voltamogramele ciclice cu rețeaua de senzori în soluția de supernatant. Protocolul experimental s-a repetat zilnic timp de 10 zile, înregistrându-se 7 repetiții pentru fiecare senzor în fiecare zi a studiului.

Schema procedurii experimentale este prezentată în Figura 2.

**Figura 2.** Etapele extractiei aminelor biogene din carne de vita

Rezultatele electrochimice au fost prelucrate si organizate intr-o matrice in care variabilele (20 valori pentru fiecare senzor) sunt ordonate pe verticala, si pe orizontala, cele 7 repetitii pentru toate probele. Matricea a avut 6 senzori × 20 coeficienti (120 variabile) si 7 repetitii x 10 zile (70 de mostre).

Analiza componentelor principale a fost aplicata pentru monitorizarea prosoptimii carnii de vita. In Figura 3 se prezinta graficul scores al PCA obtinut din semnalele electrochimice inregistrate zilnic cu reseaua de senzori.

Graficul scores al celor trei componente principale explica 81% din varianta. Se poate observa ca exista o buna separare intre clusterii corespunzatori pentru fiecare zi de monitorizare. S-au observat grupari ale clusterilor care corespund zilelor 1 si 2; 3 si 4; 5-6 si 7; 8-9 si 10. Aceste grupuri sunt corelate cu fazele de evolutie ale procesului de degradare a carnii de vita.

**Figura 3.** Graficul scores al PCA

Metoda PLS-DA s-a folosit cu scopul de a determina capacitatea de clasificare a retelei de senzori. Metoda PLS-DA este supervizata si consta in verificarea apartenentei unei probe la un grup. S-a calculat eroarea atat la calibrare cat si la validare. Modelul PLS-DA s-a realizat si s-a validat iar rezultatele cantitative sunt prezentate in Tabelul 2.

**Tabelul 2.** Rezultatele cantitative ale PLS-DA la calibrare si validare


RMSEC (Radacina patrata a erorii medii patratice la calibrare)

RMSEP (Radacina patrata a erorii medii patratice la predictie)

La calibrare, probele analizate in cele 10 zile ale studiului sunt clasificate corect 100% in cele patru grupe observate in PCA. Validarea modelului PLS-DA s-a realizat folosind metoda de validare incrucisata total lasand un element in afara modelului si apoi atribuindu-l unui grup, obtinand in toate cazurile, niveluri ale clasificarii corecte mai mari de 96%, cu sensibilitati mai mari de 97% si specificitati mai mari de 96%. Modelele PCA si PLS-DA s-au dovedit utile in discriminarea si clasificarea timpului de pastrare a carnii de vita. Prin tehnologia de serigrafiere este posibila realizarea dispozitivelor miniaturizate, care este o optiune promitatoare pentru productia in serie a senzorilor cu pret redus, de unica folosinta, cu aplicabilitate in industria alimentara.

### ***Aplicarea limbii bioelectronice in monitorizarea prospetirii carnii de porc***

Sistemul numit limba bioelectronica include o retea de biosenzori cuplati cu un software adecvat pentru analiza datelor multivariante. Acest studiu descrie dezvoltarea unei limbi bioelectronice pentru cuantificarea aminelor biogene in produsele din carne de porc. A doua aplicatie a fost monitorizarea prospetirii carnii de porc, in conditii de degradare accelerata.

S-a realizat o retea noua de biosenzori pe baza de electrozi serigrafati de carbon modificat cu nanotuburi de carbon single-walled si enzime. Enzimele au fost tirozinaza, diamino oxidaza, peroxidaza si monoaminooxidaza. Masuratorile cu biosenzori au fost realizate prin voltametrie ciclica, cu scopul de a detecta aminele biogene in produsele din carne de porc.

Monitorizarea prospetirii in timp a carnii de porc a fost realizata timp de 12 zile. Procedura de prelucrare a mostrei este similara cu cele utilizate pentru carnea de vita. Modelul PLS-DA a demonstrat ca limba bioelectronica este capabila de a urmari procesul de degradare, iar modelul poate fi folosit pentru monitorizarea prospetirii carnii de porc, determinandu-se perioada de stocare.

Acest studiu a demonstrat performantele adecvate ale unei noi retele de biosenzori cuplati cu un software adecvat pentru analiza datelor in detectarea si cuantificarea aminelor biogene. Biosenzorii pe baza de enzime immobilizate pe SWCNT-SPE au demonstrat sensibilitate ridicata si selectivitate fata de principalele amine biogene. Determinarea continutului de amine biogene prin utilizarea de biosenzori este o metoda utila, rapida si sensibila, cu aplicabilitate in industria alimentara: calitatea produselor din carne si monitorizarea prospetirii.

### ***Aplicarea unei limbi electronice hibride in monitorizarea procesului de coacere a perelor***

O retea formata din senzori si biosenzori, prezentati in Tabelul 3, a fost utilizat pentru monitorizarea coacerii perelor pe baza detectarii aminelor biogene. Metoda de detectie folosita a fost voltametrie ciclica.

**Tabelul 3.** Senzorii si biosenzorii inclusi in retea sistemului multisenzor


Tratamentul probei consta in cantarirea a 10 g de pulpa de pere, adaugarea a 40 ml de solutie tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,4 si incalzirea la 40°C timp de 10 minute. Incalzirea a fost necesara pentru a dezactiva polifenol oxidaza prezenta in pulpa de fructe. Faza lichida se separa prin filtrare.



Semnalele voltametrice ale senzorilor si biosenzorilor au fost inregistrate zilnic timp de 10 zile, pastrand fructele la 25°C in atmosfera umeda. In fiecare zi, un esantion reprezentativ a fost prelucrat si apoi au fost efectuate trei repetitii ale masuratorilor cu (bio)senzorii. Datele au fost ordonate intr-o matrice si s-au analizat folosind metode de analiza a datelor multivariante.

Graficul scores al PCA a demonstrat ca procesul de coacere poate fi urmarit si acest proces complex este relationat cu continutul de amine biogene din fruct.

In scopul de a stabili capacitatea sistemului de a clasifica esantioanele in functie de timpul de coacere parcurs s-a realizat un model PLS-DA cuprinzand etapele observate in PCA. Datele cantitative ale modelului sunt prezentate in Tabelul 4.

**Tabelul 4.** Datele cantitative rezultate din modelul PLS-DA


### 1.2. Analiza aminelor biogene in fructe

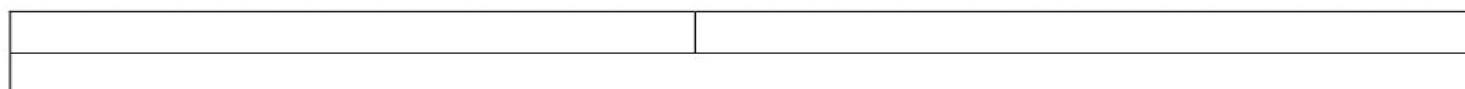
Aminele biogene sunt sintetizate si degradate in timpul metabolismului normal al animalelor, plantelor si microorganismelor. Unele fructe sunt deosebit de bogate in amine biogene, in special dopamina.

#### *Detectarea dopaminei in fructe*

S-au realizat noi biosenzori, care combina recunoasterea biologica prin intermediul specificitatii enzimei (tirosinaza) cu simplitatea constructiei (tehnologia serigrafiei). Voltametria ciclica a fost aplicata pentru a studia detectia dopaminei in o serie de fructe exotice.

In plus, au fost studiate dependenta raspunsului si caracteristicile amperometrice ale biosenzorului (electrod serigrafiat de carbon modificat cu nanotuburi de carbon functionalizate cu grupari amidice si tirosinaza) care includ sensibilitatea, cinetica, intervalul liniar, limitele de detectie si stabilitatea la detectarea dopaminei.

Imaginile probelor folosite in acest studiu sunt prezentate in Figura 6.



**Figura 6.** Imagini ale mostrelor: banane Cavendish, avocado si banane de gatit

Rezultatele obtinute cu biosenzorul sunt prezentate in Tabelul 5.

**Tabelul 5.** Rezultatele obtinute cu biosenzorul pe baza de tirosinaza si CNT-NH<sub>2</sub> la detectia dopaminei in fructe


Acest studiu a demonstrat posibilitatea realizarii unui biosenzor bazat SPE pentru determinarea dopaminei in mediu apos, in prezenta zaharurilor. In plus, acest studiu a confirmat ca materialul de carbon nanostructurat poate fi utilizat ca o matrice adecvata pentru imobilizarea enzimei (tirozinaza). Biosenzorul prezinta un raspuns rapid, o sensibilitate excelenta si stabilitate pentru detectarea amperometrica a dopaminei. A fost demonstrata aplicabilitatea metodei amperometrice pentru continutul de dopamina in mostre de fructe.

#### **Aplicarea unui nou biosenzor pentru determinarea serotoninei in nuci**

Biosenzorul realizat (Ty/CoPc-CPE – electrod de pasta de carbon modificat cu ftalocianina de cobalt si tirozinaza) a fost testat pentru determinarea serotoninei in miez de nuci. In Tabelul 6 se prezinta rezultatele obtinute cu biosenzorul la determinarea serotoninei, rezultate obtinute prin metoda adaosului standard in probele de miez de nuci.

**Tabelul 6.** Valorile concentratiei de serotonina obtinute cu noul biosenzor prin metoda adaosului standard


Pentru a evalua efectul interferentelor s-a determinat recuperarea analitica. In Tabelul 7 se prezinta rezultatele obtinute in experimentele de recuperare a cinci probe diferite. Rezultatele obtinute demonstreaza ca acest biosenzor poate fi aplicat cu succes la analiza serotoninei in probele biologice fara o influenta semnificativa a altor compusi din aliment. Recuperarile analitice obtinute au fost foarte bune rezultand o valoare medie de  $102 \pm 2\%$ .

**Tabelul 7.** Recuperarea procentuala obtinuta cu biosenzorul dupa adaugarea de serotonina ( $50\mu\text{M}$ ) in fiecare mostra de nuci


<sup>a</sup> Deviatia standard relativa a trei repetitii ale analizei

Biosenzorul a prezentat un raspuns linear fata de concentratia de serotonina in domeniul  $4 - 140 \mu\text{M}$ . Avand in vedere ca in miezul de nuca concentratia serotoninei este in jurul valorii de  $87 \pm 20 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ , este evident ca biosenzorul poate fi folosit pentru determinarea serotoninei in mostre alimentare.

### **1.3 Analiza aminelor biogene in mostre clinice**

#### **Studiul aminelor biogene din probe de saliva**

Mirosul neplacut al cavitatii bucale este o problema larg raspandita care afecteaza un procent ridicat din populatia adulta. Aceasta problema de sanatate este in mod fundamental legata de procesele de putrefactie care au loc in interiorul cavitatii bucale datorita proliferarii florei bacteriene. Procesele pornesc de la substraturi organice, cum ar fi urmele de alimente, urmele de sange, celule epiteliale etc. Existenta aminelor biogene in interiorul cavitatii bucale este relationata cu doua procedee principale. Unul dintre ele este hidroliza proteinelor, polipeptidelor si oligopeptidelor in aminoacizi, iar celalalt este decarboxilarea aminoacizilor, proces biocatalizat de enzimele rezultate din activitatea bacteriana.

Mai multe tipuri de poliamine alifactice, in principal putresceina, cadaverina, spermina si spermidina, sunt prezente intr-o forma solubila si non-volatila in mediul fizico-chimic ale cavitatii bucale; acestea sunt relationate cu halitoza. In plus, este stiut ca, concentratiile lor in saliva cresc in diferite procese patologice.

Aceasta lucrare descrie dezvoltarea si optimizarea unui biosenzor amperometric nou pentru cuantificarea aminelor biogene existente in saliva. Elementul de receptor al biosenzor este construit dintr-un electrod serigrafat de carbon modificat cu polipirol dopat cu albastru de Prusia si diamino oxidaza. Molecula detectata de biosenzor este peroxidul de hidrogen format in procesul enzimatic biocatalizat de diamino oxidaza imobilizata in polipirol.

Masuratorile cu biosenzorul au fost efectuate prin conectarea biosenzorului cu un cablu special la potentiostat / galvanostat. Tehnica de detectare a fost amperometria la potential fix folosind o picatura de proba. S-a realizat optimizarea proprietatilor electrolitului suport si ale parametrilor tehnicii de detectie. Evaluarea capacitatii biosenzorului de a detecta diferite amine biogene a demonstrat o sensibilitate mai mare pentru putresceina. Prin urmare, aceasta a fost utilizata ca amina biogena de referinta. Pentru detectarea putresceinei s-a obtinut o limita de detectie de  $7,4 \times 10^{-8}$  M si un domeniu de liniaritate mare, intre  $1 \times 10^{-6}$  si  $2 \times 10^{-4}$  M. Efectul si interferentele matricei probei biologice au fost studiate prin metoda adaosului standard obtinand o recuperare analitica medie foarte buna, de 100,4%. Validarea biosenzorului a fost realizata prin cuantificarea aminelor biogene in probele de saliva si valorile au fost comparate cu metoda standard de referinta bazata pe ELISA.

#### ***Aplicarea biosenzorului DAO-CNF/C-SP in probe farmaceutice***

Biosenzorul DAO-CNF/C-SP a fost aplicat la cuantificarea norepinefrinei in probele farmaceutice.

Un volum masurat de proba farmaceutica a fost introdusa in celula electrochimica continand PBS 100 mM pH 7,4. Semnalele amperometrice au fost inregistrate in conditii optime (potentialul aplicat -0.60 V, agitare constanta, pH 7,4). Au fost efectuate trei repetitii pentru fiecare proba. Continutul in noradrenalina a produselor farmaceutice determinate cu biosenzorul DAO-CNF/C-SP sunt prezentate in Tabelul 8.

**Tabelul 8.** Concentratiile norepinefrinei (media a trei repetitii) determinate in produsele farmaceutice prin amperometrie


Asa cum se observa in Tabelul 8, valorile obtinute cu biosenzorul au fost apropiate de continutul indicat de producator demonstrand aplicabilitatea biosenzorului in analiza farmaceutica. Interferenta excipientilor in detectarea norepinefrinei este nesemnificativa.

#### ***Analiza dopaminei in produse farmaceutice***

Metoda adaosului standard a fost utilizata pentru analiza mostrelor reale. La solutia farmaceutica s-a adaugat 50  $\mu$ M dopamina. Biosenzorul a fost imersat intr-o solutie tampon fosfat 0,01 mol x L<sup>-1</sup> (pH 7,0) si

au fost inregistrate 5 voltamograme ciclice. Dupa stabilizare, s-au adaugat volume masurate de mostre si au fost inregistrate 5 voltamograme ciclice. Cu ajutorul curbei de calibrare, a fost calculata cantitatea de dopamina adaugata luandu-se in considerare factorul de dilutie.

In Tabelul 9 se prezinta rezultatele obtinute pentru analiza unor produse farmaceutice folosind noul biosenzor pe baza de film subtire Langmuir-Blodgett ITO-AA-DyPc<sub>2</sub>/Ty. (ITO-oxid de indiu si staniu; AA – acid arachidic; DyPc<sub>2</sub>-bisftalocianina de disprosiu; Ty- tirosinaza).

Rezultatele obtinute prin voltametrie ciclica folosind biosenzorul au fost in concordanta cu valorile declarate de producator pe eticheta produselor farmaceutice analizate. In plus, biosenzorul poate detecta selectiv dopamina in prezenta unor compusi cum ar fi disulfura de sodiu, acidul maleic, clorura de sodiu, etanol si propilenglicol (excipientii din produsele farmaceutice) care nu interfera. Acest rezultat este datorat specificitatii tirosinazei fata de gruparile fenolice prezente in structura dopaminei. Se poate afirma ca exista o buna corelatie intre rezultatele obtinute cu biosenzorul si valoarea declarata. In consecinta, biosenzorul realizat in acest studiu poate fi utilizat cu succes in analiza probelor farmaceutice reale.

**Tabelul 9.** Determinarea dopaminei in produse farmaceutice prin amperometrie utilizand biosenzorul ITO-AA-DyPc<sub>2</sub>/Ty

AA-DyPc <sub>2</sub> /Ty		

#### **Capacitatea de detectare a creatininei in solutii model si analiza probelor reale**

Pentru detectarea si cuantificarea creatininei au fost folositi senzori pe baza de materiale nanostructurate de carbon. Initial s-au stabilit, prin studii de optimizare, procedurile de masurare adecvate.

S-au studiat sensibilitatea, cinetica proceselor, domeniul de liniaritate, limitele de detectie si de stabilitate a senzorilor la detectarea creatininei in solutii model si in probe reale. Raspunsurile senzorilor fata de solutia creatinina sunt prezentate in Figura 7.

**Figura 7.** Voltamogramele ciclice ale senzorilor CNF-SPE, CNT-SPE si GPH-SPE imersati in solutie de creatinina de concentratie 10<sup>-4</sup> M

Curba de calibrare pentru CNT-SPE fata de creatinina este prezentata in Figura 8.

**Figura 8.** Curba de calibrare pentru creatinina

Senzorii pe baza de materiale de carbon prezinta raspunsuri liniare fata de creatinina in domenii de concentratie de la 1  $\mu\text{M}$  pana la 500  $\mu\text{M}$  cu limite de detectie in domeniul 0,015-0,053  $\mu\text{M}$ .

Senzorul CNT-SPE a fost utilizat pentru detectarea creatininei in probe de ser, iar rezultatele sunt prezentate in Tabelul 10.

**Tabelul 10.** Valorile analizei cantitative ale creatininei in mostrele de ser


Senzorii pe baza de electrozi serigrafati au fost folositi cu succes in cuantificarea concentratiei de creatinina in probele de ser. Aceasta metoda este o metoda analitica de *screening* buna deoarece instrumentul de masura este simplu, timpul de analiza este scurt, probei i se aplica o pre-procesare minima si cantitatea de proba necesara este relativ mica.

#### **1.4 Validarea sistemelor prin stabilirea de corelatii intre rezultatele obtinute cu senzori si biosenzori si rezultatele analizelor fizico-chimice, senzoriale, biochimice sau medicale**

##### ***Aplicarea unui biosenzor pentru determinarea dopaminei si epinefrinei in produse farmaceutice***

Metodele spectrofotometrice in UV indicate in Farmacopoeia Romana X recomanda cuantificarea dopaminei la 280 nm, in 1 g x L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> si cuantificarea epinefrinei la 279 nm, in prezenta HCl 10<sup>-2</sup> M.

Curbele de calibrare au fost construite folosind dopamina pura, si respectiv adrenalina pura. Acestea au fost folosite pentru cuantificarea dopaminei si respectiv epinefrinei, in diferite probe farmaceutice.

In Tabelul 11 se prezinta rezultatele obtinute la analiza produselor farmaceutice utilizand metodele spectrofotometrica in UV si respectiv biosenzorul pe baza de electrod serigrafat de carbon modificat cu grafen si tirosinaza (Ty/GPH-C/SPE). Potentialul aplicat este 0,025 V pentru DA si -0,025 V pentru EP.

**Tabelul 11.** Determinarea DA si EP in produse farmaceutice prin spectrofotometrie UV si cu biosenzorul Ty/GPH-C/SPE


a – cantitatea de catecolamine in mostra (valoarea indicata de producator) (mg).

b – cantitatea de catecolamine obtinuta prin metoda dezvoltata in acest studiu (mg)  $\pm$  RSD (n=5).

c – cantitatea de catecolamine obtinuta prin metoda spectrofotometrica (mg)  $\pm$  RSD (n=5).

RSD - deviatia standard relativa.

Biosenzorul a fost utilizat pentru determinarea dopaminei si epinefrinei in produse farmaceutice, iar rezultatele sunt satisfacatoare, ceea ce demonstreaza ca biosenzorul poate fi o optiune viabila pentru determinarea dopaminei si epinefrinei. Rezultatele concentratiei obtinute cu biosenzorul au fost in concordanta cu metoda din Pharmacopoeia.

#### ***Analiza histaminei din probe de peste de apa dulce***

Biosenzorul DAO/nPt/GPH/chitosan/CSPE a fost utilizat pentru analiza diferitelor probe de peste de apa dulce pentru detectarea si cuantificarea histaminei. Scopul acestei varietati de probe a fost cel de a evalua daca cuantificarea cantitatii de histamina din diferite specii de peste de apa dulce ar putea fi realizata cu o buna fiabilitate.

Cuantificarea histaminei a fost realizata prin interpolarea raspunsurilor biosenzorului in curba de calibrare. Pentru studiile de recuperare analitica si pentru a studia interferentele in detectarea histaminei a fost utilizata metoda adaosului standard. Masuratorile amperometrice cu biosenzorul au fost efectuate in triplicat in conditii experimentale optime. Rezultatele sunt prezentate in Tabelul 12. Datele se bazeaza pe metoda care utilizeaza biosenzorul si metoda ELISA.

**Tabelul 12.** Cantitatile de histamina din mostrele de peste de apa dulce de analizat



<sup>1</sup> n = 3; interval de incredere 95%.

Dupa cum se poate observa din Tabelul 12, exista diferente relativ mici intre metodele de interpolare si cea a adaosului standard. Prin urmare, interferentele nu sunt semnificative in detectia histaminei in probele de peste de apa dulce.

#### ***Corelatii cu analiza senzoriala***

Corelarea rezultatelor obtinute cu (bio)senzorii si rezultatele analizei senzoriale a fost realizata in diferite studii.

Parametrii senzoriali au fost determinati de 3 persoane, folosind o scala de cinci puncte, 0 inseamna intensitatea cea mai mica a unui parametru si 5 pentru intensitatea mai mare a aceluasi parametru, in toate cazurile.

In studiul monitorizarii prospetirii mostrelor de peste de apa dulce parametrii cuantificati au fost: culoarea pielii, culoarea ochilor, culoarea branhiilor, rigiditatea carnii, mirosul de peste, mirosul de amoniac/amina si mirosul global. Rezultatele au fost corelate cu etapele de evolutie a prospetirii. Cele mai bune corelatii, cu  $R^2$  mai mari de 0,80 au fost obtinute pentru culoarea branhiilor si mirosul global. Corelatii bune, cu  $R^2$  mai mari de 0,90 s-au obtinut la corelarea datelor senzoriale cu datele de conductivitate electrica, pH si turbiditate.

In cazul monitorizarii coacerii perelor parametrii luati in considerare au fost: culoarea verde, culoarea galben, uniformitatea culorii, rigiditatea pulpei fructului, gustul dulce, astringenta si aroma de fructe. Cele mai bune corelatii, cu  $R^2$  mai mari de 0,85 s-au obtinut pentru culoarea galben, astringenta si aroma de fructe. Corelatia dintre parametrii senzoriali si continutul de zaharuri determinat prin polarimetrie a condus la valori reduse ale coeficientilor de determinare, intre 0,65 si 0,75.

### ***Analiza creatininei in mostre de ser***

Rezultatele obtinute cu senzorii pe baza de diferite materiale de carbon au fost comparate cu cele obtinute prin metoda clasica, care implica utilizarea acidului picric (reactia Jaffe) si determinarea spectrofotometrica a compusului portocaliu-rosu obtinut in solutie alcalina. Schema reactiei este prezentata in Figura 9.

**Figura 9.** Reactia Jaffe pentru determinarea spectrofotometrica a creatininei

In Tabelul 13 sunt prezentate concentratiile de creatinina obtinute pentru o serie de mostre de ser prin metoda spectrofotometrica (metoda standard) si cele obtinute cu senzorul CNT-SCPE.

**Tabelul 13.** Cantitatile de creatinina determinate in mostrele de plasma


Dupa cum se poate observa, rezultatele sunt foarte similare. Pentru a se determina daca diferentele sunt semnificative sau nu, a fost aplicata metoda ANOVA. Rezultatele au aratat ca, la un interval de incredere de 99% rezultatele nu sunt semnificativ diferite. Acest rezultat demonstreaza ca senzorii realizati reprezinta o metoda viabila pentru detectarea creatininei in probele de ser.

### ***Modele de diagnostic bazate pe detectarea aminelor biogene***

Aminele biogene sunt compusi de importanta fundamentala in functionarea corpului uman. In plus, relatia dintre continutul total de amine biogene in fluidele corpului este relevanta pentru diagnostic. In acest scop, s-a dezvoltat un sistem multibiosensor cuplat cu analiza datelor multivariante pentru detectarea si/sau cuantificarea aminelor biogene. In plus, a fost inregistrat raspunsul global electrochimic al probelor clinice cu ajutorul metodei voltametrice diferentiale de puls. Noii biosenzori realizati sunt pe baza de electrozi serigrafati modificati cu nanotuburi de carbon *single-walled* functionalizate cu grupari carboxil si

diferite enzime oxidazice: tirozinaza, diamino oxidaza si monoaminoxidaza. Sistemul multibiosenzor este capabil sa detecteze toate categoriile de amine biogene. Biosenzorii au fost realizati prin metoda *drop-and-dry*. In primul rand, nanotuburile carbon *single-walled* functionalizate cu grupari carboxil au fost depuse pe electrozii serigrafati comerciali de carbon. Apoi, a fost depusa enzima. Prezenta gruparilor carboxil faciliteaza interactiunea dintre electrod si enzima prin legaturi de hidrogen crescand stabilitatea stratului sensibil. Elementul sensibil al biosenzorilor a fost caracterizat prin spectrometrie FT-IR, microscopie de forta atomica si electrochimie.

Efectul combinat al materialului nanostructurat si al metodei de detectie folosite favorizeaza imbunatatirea caracteristicilor de performanta a biosenzorilor. Sistemul multibiosenzor este capabil de a detecta dopamina, epinefrina, norepinefrina, serotonina, putresceina, cadaverina si histamina, la niveluri ale concentratiei intalnite in probele clinice. Limitele de detectie sunt in intervalul 10-50 ng x mL<sup>-1</sup>.

Semnalele inregistrate prin intermediul voltametriei diferentiale de puls au fost folosite ca matrice de intrare pentru analiza datelor multivariante. S-a realizat un model de clasificare pe baza analizei discriminante rezolvata prin minime patrute partiale si s-a utilizat in diagnosticul medical. Modelul a fost validat cu metodele de diagnostic clasice, iar rezultatele au fost in concordanta in 99% din cazuri.

**Modele de diagnostic bazate pe detectarea catecolaminelor si creatininei in probe biologice**

Acest studiu se bazeaza pe principalii biomarkeri ai insuficientei cardiace care se gasesc in plasma (catecolamine si creatinina) si in urina (creatinina).

Senzorii si biosenzorii folositi in acest studiu sunt prezentati in Tabelul 14.

Tabelul 14. Senzorii si biosenzorii utilizati pentru realizarea modelelor


Au fost construite doua tipuri de baze de date: una pentru cuantificarea unui analit specific, iar al doilea pentru clasificarea probelor in functie de caracteristicile lor.

Folosind modelul cantitativ (PLS), se stabileste cantitatea de catecolamina si creatinina. Valorile prezise de model nu prezinta diferente semnificative fata de cele obtinute prin metodele clasice (spectrofotometrie, cromatografie sau ELISA). Corelatia dintre valorile masurate si cele estimate sunt bune, cu valori ale R<sup>2</sup> mai mari de 0,98. In concluzie, au fost gasite corelatii bune intre semnalele obtinute de sistemul multi(bio)senzor si continutul de amine biogene, validate prin intermediul modelelor de regresie PLS.

Cu ajutorul modelului SIMCA, s-au stabilit corelatii intre raspunsurile (bio)senzorilor si existenta/absenta bolilor de inima.

Modelul SIMCA a demonstrat ca o mostra poate fi atribuita cu precizie unui grup cu caracteristici similare, care este asociata cu un diagnostic medical. Corectitudinea de atribuire este de 99,5% demonstrand aplicabilitatea sistemului de senzori si biosenzori in diagnostic.



Senzorii si biosenzorii realizati in acest proiect au demonstrat excelente caracteristici si au fost folositi cu succes pentru detectarea aminelor biogene intr-o mare varietate de probe reale. In aceasta etapa (etapa V, 2016) s-au efectuat toate activitatile incluse in planul de cercetare si rezultatele obtinute au fost in acord cu planul de cercetare. Obiectivele propuse in acest an au fost realizate in totalitate.

## Diseminarea rezultatelor

Diseminarea rezultatelor cercetarii din proiectul de cercetare s-a realizat prin publicarea de articole in reviste ISI, publicarea de articole in reviste BDI, publicarea de capitole in monografii publicate in edituri de renume din strainatate si participarea cu lucrari la conferinte internationale sau nationale, articole in alte reviste si teza de abilitare a directorului de proiect.

### **Publicarea de articole in reviste ISI**

1. C. Apetrei, *Novel method based on polypyrrole-modified sensors and emulsions for the evaluation of bitterness in extra virgin olive oils*, **Food Research International** 48 (2012) 673-680; <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.010>
2. I.M. Apetrei, C. Apetrei, *Amperometric biosensor based on polypyrrole and tyrosinase for the detection of tyramine in food samples*, **Sensors & Actuators: B, Chemical** 178 (2013) 40-46; <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.064>
3. I. M. Apetrei, C. Apetrei, *Amperometric tyrosinase based biosensors for serotonin detection*, **Romanian Biotechnological Letters** 18(3) (2013) 8253-8262; <http://www.rombio.eu/vol18nr3/Content.html>
4. I. M. Apetrei, M. L. Rodriguez-Mendez, C. Apetrei, J. A. de Saja, *Fish Freshness Monitoring Using an E-tongue Based on Polypyrrole Modified Screen-Printed Electrodes*, **IEEE Sensors Journal** 13 (2013) 2548-2554; <http://dx.doi.org/10.1109/JSEN.2013.2253317>
5. I. M. Apetrei, C. Apetrei, *Voltammetric e-tongue for the quantification of total polyphenol content in olive oils*, **Food Research International** 54 (2013) 2075-2082; <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.032>
6. I. M. Apetrei, C. Apetrei, *Biosensor based on tyrosinase immobilized in single-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for epinephrine detection*, **International Journal of Nanomedicine** 8 (2013) 4391-4398; <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S52760>
7. I. M. Apetrei, C. V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, D. Tutunaru, *Biosensors based on graphene modified screen-printed electrodes for the detection of catecholamines*, **Romanian Biotechnological Letters** 19(5) (2014) 9801-9809, <http://www.rombio.eu/vol19nr5/19.pdf>
8. I. M. Apetrei, C. Apetrei, *Study of Different Carbonaceous Materials as Modifiers of Screen-Printed Electrodes for Detection of Catecholamines*, **IEEE Sensors Journal** 15 (2015) 3094 - 3101, <http://dx.doi.org/10.1109/JSEN.2014.2335534>

9. I.M. Apetrei, C. Apetrei, *Detection of virgin olive oil adulteration using a voltammetric e-tongue*, **Computers and Electronics in Agriculture** 108 (2014) 148–154, <http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2014.08.002>

10. I.M. Apetrei, C. Apetrei, The biocomposite screen-printed biosensor based on immobilization of tyrosinase onto the carboxyl functionalised carbon nanotube for assaying tyramine in fish products, **Journal of Food Engineering** 149 (2015) 1-8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.036>

11. I.M. Apetrei, C. Apetrei, Biosensing Application of Hybrid Thin Film Layers Based Biosensors, **IEEE Sensors Journal** 15 (2015), 6926 - 6932, <http://dx.doi.org/10.1109/JSEN.2015.2473796>

12. I. M. Apetrei, C. Diaconu, C. Apetrei, C. Georgescu, Electrochemical biosensor based on carbon nanofibers and diamine oxidase for detection of norepinephrine, **Romanian Biotechnological Letters** 21(1) (2016) 11092-11102. <http://www.rombio.eu/vol21nr1/2.%20A4.pdf>

13. I. M. Apetrei, C. Apetrei, Amperometric Biosensor Based on Diamine Oxidase/Platinum Nanoparticles/Graphene/Chitosan Modified Screen-Printed Carbon Electrode for Histamine Detection, **Sensors** 2016, 16(4), 422; doi:[10.3390/s16040422](https://doi.org/10.3390/s16040422)

14. I.M. Apetrei, C. Apetrei, Application of voltammetric e-tongue for the detection of ammonia and putrescine in beef products, **Sensors and Actuators B: Chemical**, 234 (2016) 371–379, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.005>

### **Capitole in carti / monografii**

1. C. Apetrei, M. Ghasemi-Varnamkhashti, **Biosensors in food PDO authentication**, Chapter 11, in **Comprehensive Analytical Chemistry**, Volume 60 , 2013, Pages 279-297, **Food Protected Designation of Origin - Methodologies and Applications**, Ed. A. Gonzalez and M. de la Guardia, Elsevier, ISBN: 9780444595621, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59562-1.00011-6>, <http://store.elsevier.com/Food-Protected-Designation-of-Origin/isbn-9780444595621/>

2. I. M. Apetrei, C. Apetrei, Y. El Rayess, **Characterization of Red Wines Polyphenolics Employing Sensors and Biosensors** (Chapter 2), pp. 41-70. in **Wine: Phenolic Composition, Classification and Health Benefits**, Editor Youssef El Rayess, 2014, ISBN: 978-1-63321-059-2, Nova Publishers, [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=50003&osCsid=647a25d9d412d07c8690696cea0ed681](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=50003&osCsid=647a25d9d412d07c8690696cea0ed681)

3. I. M. Apetrei, C. Apetrei, **Biosensor Based on Nanostructured Sensitive Material for the Detection of Epinephrine** (Chapter 5), pp. 55-74. in **SENSING - MONITORING - TELEDIAGNOSIS FOR LIFE SCIENCES, Vol. II, FOOD AND ENVIRONMENT** (e-book), Editors: L. Floroian, M. Badea, M. Moga, 2014, Editura Universitatii Transilvania din Brasov, ISBN: 978-606-19-0388-7 gen, ISBN: 978-606-19-0390-0 Vol. II

4. C. Apetrei, I. M. Apetrei, **Chemical composition of corn oil**, In **Corn and Coconut Oil: Antioxidant Properties, Uses and Health Benefits**, Editor C. Apetrei, ISBN: 978-1-63483-420-9, Nova Publishers, 2015, pp. 1-28. [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=55691&osCsid=a58c860a7ae1f4d5f714272f3d819203](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=55691&osCsid=a58c860a7ae1f4d5f714272f3d819203)

5. I. M. Apetrei, C. Apetrei, *Quality analyses and authentication of coconut oil*, In **Corn and Coconut Oil: Antioxidant Properties, Uses and Health Benefits**, Editor C. Apetrei, ISBN: 978-1-63483-420-9, Nova Publishers, 2015, pp. 131-158. [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=55691&osCsid=a58c860a7ae1f4d5f714272f3d819203](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=55691&osCsid=a58c860a7ae1f4d5f714272f3d819203)

6. C. Apetrei, M. Ghasemi-Varnamkhasi, I. M. Apetrei, *Olive oil and combined electronic nose and tongue* (Chapter 27), in **Electronic Nose and Tongue in Food Science**, Editor M.L. Rodriguez-Mendez, Oxford: Academic Press; ISBN: 978-0-12-800243-8, 2016, pp. 265-274. <https://www.elsevier.com/books/electronic-noses-and-tongues-in-food-science/preedy/978-0-12-800402-9>

7. Constantin Apetrei, *Wine: Biologic Active Compounds and Health Benefits* (Chapter 2), in **Bioactive compounds: natural sources, physicochemical characterization, applications**, Editor C. Apetrei, Bentham Science Publishers, 2016, accepted, *in press*

#### **Publicarea de articole in reviste BDI**

1. I. M. Apetrei, D. Tutunaru, A. Nechita, C. Georgescu, Disposable amperometric biosensor for adrenaline detection, *Analele Universitatii "Dunarea De Jos" din Galati, Fascicula XVII, Medicina*, 2013, vol. 1/2013, 11-15, [http://www.med.ugal.ro/annals\\_files/1%202013/art%202.pdf](http://www.med.ugal.ro/annals_files/1%202013/art%202.pdf)

#### **Publicarea altor articole**

1. Constantin Apetrei, Senzori voltametrici pe baza de polimeri organici electroconductori, *Buletinul S. Ch. R.*, nr. 3, 2015, 16-37. <http://www.schr.org.ro/doc/BSCR-2015-3.pdf>

2. Constantin Apetrei, Senzori voltametrici pe baza de ftalocianine, *Buletinul S. Ch. R.*, Nr. XXIII, 1/2016, 39-56, <http://www.schr.org.ro/doc/BSCR-2016-1.pdf>

#### **Participarea la conferinte internationale si nationale si rezumate publicate in volumele conferintelor**

1. I.M. Apetrei, C.V. Popa (Ungureanu), D. Tutunaru, C. Apetrei, Biosensors based on different carbonaceous materials for the analysis of biogenic amines, *The Frontiers of Microscopy Virtual Conference*, Elsevier, March 21, 2012, Poster, <http://www.materialstoday.com/virtualconference/the-frontiers-of-microscopy>

2. I.M. Apetrei, D. Tutunaru, C.V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, Electrochemical study of biogenic amines with conducting polymer sensors, *International Conference of Applied Sciences, Chemistry and Chemical Engineering (CISA), Sixth Edition, Bacau*, April 24-27, 2012, Poster, <http://cisaconf.ub.ro>. Published paper: pages 16-20, ISSN 2066-7817

3. I.M. Apetrei, D. Tutunaru, C.V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, Development of amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized in phosphate-doped polypyrrole film for detection of biogenic amines, *14th International Meeting on Chemical Sensors - IMCS 2012*, May 20-23, 2012, Nuremberg, Germany, Poster, page 146, <http://www.ama-science.org/home/details/1068>. Published paper: pages 855-858, ISBN 978-3-9813484-1-5, DOI 10.5162/IMCS2012/P1.1.16

4. C.V. Popa (Ungureanu), I.M. Apetrei, D. Tutunaru, C. Apetrei, Biosensing properties of novel biosensors towards biogenic amines, 1<sup>st</sup> International Conference on Analytical Chemistry RO - ICAC'2012, September 18-21, 2012, Targoviste, Romania, Poster, page 193, Best Poster Award, <http://www.icstm.ro/ICAC2012>
5. I.M. Apetrei, D. Tutunaru, C.V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, Fish freshness monitoring using chemical modified voltammetric electrodes, Centenary Of Education in Chemical Engineering, November 28-30, 2012, Iasi, Romania, Oral presentation, page 49, <http://www.ch.tuiasi.ro/CNIC2012/index.html>
6. C. Apetrei, Biosensors based on nanotechnologies, Materials Today Virtual Conference: Nanotechnology, Elsevier, December 11-13, 2012, Poster, <http://www.materialstoday.com/virtualconference/materials-today-virtual-conference-nanotechnology>
7. D. Tutunaru, I.M. Apetrei, C.V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, Biosensors based in tyrosinase and electron mediators for determination of adrenaline, Priorichem, Bucharest, October 25-26, 2012, Oral presentation, page 51, [http://www.icechim.ro/priochem/2012\\_Volum\\_rezumate.pdf](http://www.icechim.ro/priochem/2012_Volum_rezumate.pdf)
8. C.V. Popa (Ungureanu), I.M. Apetrei, D. Tutunaru, C. Apetrei, Disposable biosensors for determination of dopamine, Priorichem, Bucharest, October 25-26, 2012, Poster, page 72, [http://www.icechim.ro/priochem/2012\\_Volum\\_rezumate.pdf](http://www.icechim.ro/priochem/2012_Volum_rezumate.pdf)
9. I.M. Apetrei, C.V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, Amperometric biosensor for the detection of histamine in food products, International Conference of Applied Sciences, Chemistry and Chemical Engineering (CISA), Seventh Edition, Bacau, May 15-18, 2013, Oral presentation, <http://cisaconf.ub.ro>, Article published: page 180-183, Alma Mater Publishing House, Bacau, ISSN 2066-7817
10. I.M. Apetrei, C.V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, Disposable Biosensors Based on Carbonaceous Screen-Printed Electrodes and Diamine Oxidase, European Biotechnology Congress, Bratislava, Slovakia, May 16-18, 2013, Poster, <http://www.eurobiotech2013.eu/>. Abstract published in: Current Opinion in Biotechnology, page S65, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.174>
11. I.M. Apetrei, C. Apetrei, Biosensors based on nanostructured layers for the detection of histamine, EuroNanoForum 2013, Dublin, Ireland, June 18-20, 2013, Poster, <http://www.euronanoforum2013.eu/poster-participation/>
12. I.M. Apetrei, C. Apetrei, Biosensor based on tyrosinase immobilized in single-walled carbon nanotubes screen-printed electrode for tyramine detection, 18th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Sinaia, September 4-7, 2013, Oral presentation. <http://www.riccce18.upb.ro/>. Abstract published in: RICCCE18, Papers and Abstracts, page S2-21, Politehnica Press, Bucuresti, ISSN 2344-1895.
13. I. M. Apetrei, D. Tutunaru, C. V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, Electrochemical Biosensors for Catecholamines, International Conference of Physical Chemistry - ROMPHYSICHEM 15, Bucharest, September 11-13, 2013, Keynote presentation. <http://gw-chimie.math.unibuc.ro/romphyschem/index.php/organizers15>. Abstract published in: Abstracts, ROMPHYSICHEM 15, page 78, ISSN 2286-1327.
14. I. M. Apetrei, D. Tutunaru, C. V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, Biosensor array for the determination of biogenic amines in food samples, The 6<sup>th</sup> International Symposium Euroalimint - around food, Galati,

October 3-5 , 2013, Poster. [http://www.euroaliment.ugal.ro/euro-aliment\\_2013.htm](http://www.euroaliment.ugal.ro/euro-aliment_2013.htm) . Abstract published in: Papers of the International Symposium EuroAliment, page 28, Galati University Press, ISSN 1843-5114.

15. C. Apetrei, Expert sensory system with applicability in food industry, The 6th International Symposium Euroaliment - around food, Galati, October 3-5, 2013, Oral presentation. [http://www.euroaliment.ugal.ro/euro-aliment\\_2013.htm](http://www.euroaliment.ugal.ro/euro-aliment_2013.htm) . Abstract published in: Papers of the International Symposium EuroAliment, page 29, Galati University Press, ISSN 1843-5114.

16. C. Apetrei, Biosensors based on nanostructured biomaterials, Materials Today Virtual Conference: Biomaterials, Elsevier, November 19-21, 2013, Poster, <http://www.materialstoday.com/biomaterials/webinars/materials-today-virtual-conference-biomaterials/>

17. I.M. Apetrei, C. Apetrei, Disposable biosensor for the detection of catecholamines in biological samples, International Conference of Applied Sciences, Chemistry and Chemical Engineering (CISA 2014), Bacau, May 7-9, 2014, Oral presentation, <http://www.ub.ro/33-romanian/universitate> , Abstract published in: Book of Abstracts, page 10, Alma Mater - Bacau, 2014, ISSN 2066-7817

18. C. Apetrei, I. M. Apetrei, Sensors based on carbonaceous materials for detection of biogenic amines, Chimia 2014, Constanta, May 23-24, 2014, Oral presentation, [http://chimia2014.univ-ovidius.ro/images/Book\\_of\\_Abstracts\\_2014.pdf](http://chimia2014.univ-ovidius.ro/images/Book_of_Abstracts_2014.pdf)

19. I.M. Apetrei, C. Apetrei, Expert sensory system for the determination of catecholamines in biological samples, Industrial Technologies 2014, Athens, April 9-11, 2014, Poster, <http://www.b2match.eu/industrialtechnologies2014/participants/210>

20. I.M. Apetrei, C.V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, Determination of ammonia and putrescine in beef extract powder using voltammetric sensors, New Trends on Sensing- Monitoring - Telediagnosis for Life Sciences, Brasov, Romania - July 24-26, 2014, Oral presentation, [http://maternologie.ro/envirpubhealth/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13&Itemid=8](http://maternologie.ro/envirpubhealth/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=8) , Abstract published in: Book of Abstracts, page 26, Lux Libris Publishing House, 2014, ISBN 978-973-131-280-4.

21. I.M. Apetrei, C. Apetrei, D. Tutunaru, Biosensor based on nanostructured sensitive material for the detection of epinephrine and norepinephrine, New Trends on Sensing- Monitoring - Telediagnosis for Life Sciences, Brasov, Romania - July 24-26, 2014, Poster, [http://maternologie.ro/envirpubhealth/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13&Itemid=8](http://maternologie.ro/envirpubhealth/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=8) , C. Apetrei - Young Scientist Paper Award, Abstract published in: Book of Abstracts, page 101, Lux Libris Publishing House, 2014, ISBN 978-973-131-280-4.

22. C. Apetrei, I. M. Apetrei, Development of voltammetric sensors based on screen-printing technology for detection of creatinine, Euronanoforum 2015, Riga, Latvia June 10-12, 2015, poster, [http://euronanoforum2015.eu/wp-content/uploads/2015/03/Abstract\\_Apetrei.pdf](http://euronanoforum2015.eu/wp-content/uploads/2015/03/Abstract_Apetrei.pdf)

23. C. Apetrei, I. M. Apetrei, Biosensor based on hybrid Langmuir-Blodgett thin films for detection of tyramine in foods, New Trends on Sensing- Monitoring- Telediagnosis for Life Sciences, Brasov, Romania - September 3-5, 2015, Invited Oral Presentation, <http://healthfoodenviron.unitbv.ro/2015/>

24. C. Apetrei, Biosensor based on Prussian Blue and diamine oxidase for detection of biogenic amines in chesses, The 7<sup>th</sup> International Symposium Euroaliment - around food, September 24-26, 2015, Galati, Romania, Oral, [http://www.euroaliment.ugal.ro/euro-aliment\\_2015.htm](http://www.euroaliment.ugal.ro/euro-aliment_2015.htm)

25. C. Apetrei, Bioelectronic tongue for meat products quality analysis, The 7th International Symposium Euroaliment - around food, September 24-26, 2015, Galati, Romania, Poster, [http://www.euroaliment.ugal.ro/euro-aliment\\_2015.htm](http://www.euroaliment.ugal.ro/euro-aliment_2015.htm)

26. Apetrei, C.V. Ungureanu, I.M. Apetrei, Biosensors for dopamine determination in foods of plant origin, "Alexandru Ioan Cuza" University Days, Faculty of Chemistry Conference, October 29 – 31, 2015, Iasi, Plenary Conference, <http://www.chem.uaic.ro/ro/manifestari/program-zu2015.html>

27. I. M. Apetrei, C. Apetrei, Development of a multibiosensor system for detection of biogenic amines, Biosensors 2016, 25-27 May 2016, Gothenburg, Sweden, poster, <https://elsevier.conference-services.net/viewsecurePDF.asp?conferenceID=3928&abstractID=900130>

28. C. Apetrei, Development of a novel biosensor for detection of dopamine in fruits, International Conference of Applied Sciences, Chemistry and Chemical Engineering (CISA 2016), Bacau, June 2-4, 2016, poster. Abstract published in: Conference Proceedings Abstracts, page 95, Editura "Alma Mater" Bacau, 2016, ISSN 2457-3388.

### ***Participarea la conferinte nationale***

1. D. Tutunaru, I.M. Apetrei, Aplicatii ale biosenzorilor in medicina, Zilele Medicale Galatene, November 6-7, 2012, Galati, Romania, Oral presentation

2. Claudia Popa (Ungureanu), Constantin Apetrei, Biosensors based on carbonaceous screen-printed electrodes and diamine oxidase, Conferinta Stiintifica a Scolilor Doctorale din Universitatea „Dunarea de Jos” din Galati (CSSD-UDJG), May 16-17, 2013, Poster, 2<sup>nd</sup> Poster Award, [http://www.ugal.ro/stiri/conferin%C8%9Ba\\_%C8%98tiin%C8%9Bifica\\_a\\_%C8%98colilor\\_doctorale](http://www.ugal.ro/stiri/conferin%C8%9Ba_%C8%98tiin%C8%9Bifica_a_%C8%98colilor_doctorale), Abstract published in: Book of Abstracts, Scientific Conference of Doctoral Schools from UDJ Galati, CSSD-UDJG 2013, First Edition, page 84, Galati University Press.

3. Ana Nicoleta Bratu, Constantin Apetrei, Development of chemically modified sensors for detection of neurohormones, Scientific Conference of Doctoral Schools, CSSD-UDJG 2016 Fourth Edition, Galati, 2<sup>nd</sup>-3<sup>rd</sup> of June 2016, poster, Abstract published in: Book of Abstracts, Scientific Conference of Doctoral Schools from UDJ Galati, 2016, page 102, <http://www.cssd-udjg.ugal.ro/index.php/abstracts> .

### ***Teza de abilitare in Chimie***

C. Apetrei, *Development of novel sensors and biosensors with applications in food analysis*, 2015

## **Concluzii**

In acest proiect de cercetare s-au realizat integral toate activitatile cuprinse in planul de implementare, rezultatele obtinute fiind foarte bune ceea ce a permis o activitate de diseminare vasta. Astfel, s-au realizat o varietate mare de senzori si biosenzori cu sensibilitate si selectivitate pentru amine biogene pe baza de diferite materiale sensibile si enzime. Analiza datelor s-a realizat folosind o mare varietate de metode statistice, incepand de la statistica descriptiva pana la analiza datelor multivariante. Senzorii si biosenzorii

s-au utilizat cu success pentru analiza aminelor biogene in produse alimentare, produse farmaceutice si mostre biologice.

Activitatea de diseminare a cuprins publicarea a 14 articole in reviste ISI, 7 capitole in carti/monografii, 1 articol in reviste BDI, 2 articole in alte reviste, participarea cu 28 de lucrari la conferinte internationale si 3 conferinte nationale. Au fost publicate 7 articole in reviste din primul sfert al domeniului din care face parte revista (zona rosie), 4 articole in reviste din al doilea sfert al categoriei din care face parte revista (zona galbena). Capitolele din monografii, la care autorii au fost invitati, au fost publicate de catre edituri de prestigiu: Elsevier, Academic Press, Nova Publishers, Bentham Science Publishers. Se poate afirma ca activitatea de diseminare a fost foarte buna depasindu-se in mod semnificativ ceea ce s-a prevazut in propunerea de proiect si in actele aditionale.

Director de proiect,  
Prof.dr. Constantin APETREI