

Raport stiintific

privind implementarea proiectului in perioada ianuarie 2012 – decembrie 2013

Pe parcursul **anului 2012** s-au realizat activitatile prevazute in planul de lucru pentru indeplinirea obiectivul 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.

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 produși 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 Al₂O₃ neutra utilizand ca eluent CHCl₃, 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 urmatorii 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, HNO₃, H₃PO₄, CH₃COOH, HClO₄ si H₂C₂O₄. Pentru sinteza

polipirolului s-au folosit $K_4[Fe(CN)_6]$, $Na_2[Fe(CN)_5NO]$, $H_3PW_{12}O_{40}$, H_2SO_4 , Na_2MoO_4 , 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: $LiClO_4$, $LiCF_3SO_3$, 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 $0,785mm^2$ si $12,56mm^2$ pentru electrozii sub forma de disc, $1cm^2$ pentru electrozii de ITO si de $52,5mm^2$ 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 stratului 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 polipirolului si acetonitrilul in cazul poli-3-metiltiofenului. 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 50µm. Grosimea optima pentru fabricarea de senzori este situata intre 2 si 10µm, 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 sensorului 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 monoaminooxidaza. 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 polipirol 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 polipirolului 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-ftalocianina 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.

Diseminarea rezultatelor

Diseminarea rezultatelor cercetarii s-a realizat prin publicarea de articole ISI, publicarea unui capitol intr-o monografie si participarea la conferinte internationale sau nationale.

Publicarea de articole 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; doi:10.1016/j.foodres.2012.06.010, Factor de impact al revistei 3,15; Scor relativ de influenta 2,47386.

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>, Factor de impact al revistei 3,898; Scor relativ de influenta 1,85283.

Elaborarea de capitole in monografii internationale

1. C. Apetrei, M. Ghasemi-Varnamkhasti, *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>

Participarea la conferinte internationale si articole 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, 21 Martie 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, 24-27 Aprilie 2012, Poster, <http://cisaconf.ub.ro>

Articol publicat: pag. 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, 20-23 Mai 2012, Nuremberg, Germania, Poster, <http://www.ama-science.org/home/details/1068>

Articol publicat: pag. 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*, **1st International Conference on Analytical Chemistry RO - ICAC'2012**, 18 – 21 Septembrie 2012, Targoviste, Romania, Poster, premiul **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**, 28-30 Noiembrie 2012, Iasi, Romania, Prezentare orala, <http://www.ch.tuiasi.ro/CNIC2012/index.html>

6. C. Apetrei, *Biosensors based on nanotechnologies*, **Materials Today Virtual Conference: Nanotechnology**, Elsevier, 11-13 Decembrie 2012, Poster, <http://www.materialstoday.com/virtual-conference/materials-today-virtual-conference-nanotechnology>

Participarea la conferinta nationale

1. D. Tutunaru, I.M. Apetrei, *Aplicatii ale biosenzorilor in medicina*, **Zilele Medicale Galatene**, 6-7 Noiembrie 2012, Galati, Romania, Prezentare orala

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.

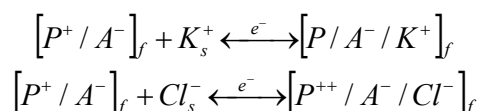
Obiectivul nr. 1. Studii fundamentale privind interactiunile dintre stratul sensibil si mostrele de analizat

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⁻ - anionul dopant;
- K⁺_s - cationul din solutia de analizat;
- Cl⁻_s - anionul din solutia de analizat;

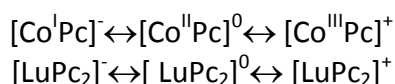
- s - solutie;
- f - filmul polimeric (stratul activ).

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 sensorului. 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, relationate 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 immobilizatoare (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 immobilizatoare 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 immobilizatoare, 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 diaminooxidaza 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 diaminooxidaza (DAO).

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 enzimaticice a biosenzorilor

Pentru studiul cineticii enzimaticice 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 enzimaticice 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 σ 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 enzimaticice. 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:

$$\lg \frac{I_{\max}}{I_{\max} - I} = -\lg K_M^{app} + h \cdot \lg[S]$$

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 centrii activi ocupați cu molecula de analit. 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 enzimaticе, viteza de reacție maximă (I_{\max}) și constanta Michaelis-Menten aparentă (K_M^{app}) utilizând ecuația Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{\max}} + \frac{K_M^{\text{app}}}{I_{\max} [S]}$$

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 baza 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 aproximații.

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 enzimaticе 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 analit 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 voltametricе (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 determinarilor amperometricе, 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

informatia globala inregistrata pentru un sistem (bio)senzor-solutie de analizat. De exemplu, dintr-o curba voltametrica se selecteaza o serie de parametri semnificativi pentru probele de analizat, cum ar fi potentialele sau intensitatile picurilor. Aceasta reducere a datelor voltametrice este utila 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 bivalorige, 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 catodice si anodice sunt complementare. Prin analiza curbei anodice se reduce timpul de calcul la jumatate 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 (ACP). 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 ACP 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 ACP.

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 ACP 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 reseaua 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 ACP. 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.

Diseminarea rezultatelor in anul 2013

La semnarea actului aditional in 2013 ne-am propus ca in aceasta etapa sa publicam minim 2 articole ISI si participarea la minim 3 manifestari stiintifice.

Diseminarea rezultatelor cercetarii s-a realizat prin publicarea de 4 articole ISI, unul trimis in vederea publicarii, publicarea unui capitol intr-o monografie internationala si participarea la 9 conferinte internationale sau nationale. Deci, obiectivele activitatii de diseminare au fost indeplinite.

Publicarea de articole ISI

1. 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>, Factor impact 0.349; Scor Relativ de Influenta 0,115.
2. 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>, Factor impact 1.475; Scor Relativ de Influenta 1,247.
3. I. M. Apetrei, C. Apetrei, *Voltammetric e-tongue for the quantification of total polyphenol content in olive oils*, **Food Research International** xxx (2013) xxx-xxx; <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.032>, Factor impact 3.15; Scor Relativ de Influenta 2,44.
4. 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.S5>, Factor impact 3,463; Scor Relativ de Influenta 1,355.
5. I. M. Apetrei, D. Tutunaru, C. V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, *Electrochemical biosensors for catecholamines*, **Revue Roumaine de Chimie**, 2013, trimis 13.09.2013, manuscris 56/2013.

Publicarea de articole BDI

1. I. M. Apetrei, D. Tutunaru, A. Nechita, C. Georgescu, *Disposable amperometric biosensor for adrenaline detection*, *Analele Universității "Dunărea De Jos" din Galați, Fascicula XVII, Medicină*, 2013, vol. 1/2013, 11-15.

Elaborarea de capitole in monografii internationale

1. I. M. Apetrei, C. Apetrei, *Capitol Characterization of Red Wines Polyphenolics Employing Sensors and Biosensors*, Carte, **Wine: Phenolic compounds, Classification and Health benefits**, 2014, Nova Science Publishers, *acceptat octombrie 2013*.

Participarea la conferinte internationale si articole publicate in volumele conferintelor

1. 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, 15-18 Mai, 2013, *Prezentare orala*, <http://cisaconf.ub.ro>
Articol publicat: pag. 180-183, Alma Mater Publishing House, Bacau, ISSN 2066-7817.
2. I.M. Apetrei, C.V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, *Disposable Biosensors Based on Carbonaceous Screen-Printed Electrodes and Diamine Oxidase*, **European Biotechnology Congress**, Bratislava, Slovacia, 16-18 Mai, *Poster*, <http://www.eurobiotech2013.eu/>.

Rezumat publicat: S65, Current Opinion in Biotechnology, ISSN 0958-1669, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.174>

3. I.M. Apetrei, C. Apetrei, Biosensors based on nanostructured layers for the detection of histamine, EuroNanoForum 2013, Dublin, Irlanda, 18-20 Iunie, 2013, Poster.

Rezumat publicat: <http://www.euronanoforum2013.eu/poster-participation/>

4. 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, 4-7 Septembrie, 2013, Prezentare orală.

Rezumat publicat: RICCE18, Papers and Abstracts, pag. S2-21, Politehnica Press, Bucuresti, ISSN 2344-1895.

5. I. M. Apetrei, D. Tutunaru, C. V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, *Electrochemical Biosensors for Catecholamines*, **International Conference of Physical Chemistry - ROMPHYSICHEM 15**, Bucuresti, 11-13 Septembrie, 2013, Prezentare orală Keynote

Rezumat publicat: Abstracts, ROMPHYSICHEM 15, pag. 78, ISSN 2286-1327.

6. I. M. Apetrei, D. Tutunaru, C. V. Popa (Ungureanu), C. Apetrei, *Biosensor array for the determination of biogenic amines in food samples*, **The 6th International Symposium Euroaliment - around food**, Galati, 3-5 Octombrie, 2013, Poster

Rezumat publicat: Papers of the International Symposium EuroAliment, pag. 28, Galati University Press, ISSN 1843-5114.

7. C. Apetrei, Expert sensory system with applicability in food industry, **The 6th International Symposium Euroaliment - around food**, Galati, 3-5 Octombrie, 2013, Prezentare orală.

Rezumat publicat: Papers of the International Symposium EuroAliment, pag. 29, Galati University Press, ISSN 1843-5114.

8. C. Apetrei, Biosensors based on based on nanostructured biomaterials, **Materials Today Virtual Conference: Biomaterials**, Elsevier, 19-21 Noiembrie 2013.

Participarea la conferinta nationale

1. C. Popa (Ungureanu), C. 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)**, 16-17 Mai, 2013, Poster, *Premiul 2nd Poster Award*, http://www.ugal.ro/stiri/conferin%C8%9Ba_%C8%98tiin%C8%9Bifica_a_%C8%98colilor_doctorale

Rezumat publicat: Book of Abstracts, Scientific Conference of Doctoral Schools from UDJ Galati, CSSD-UDJG 2013, First Edition, pag. 84, Galati University Press.

Rezultatele obtine in acest proiect de cercetare pana in acest moment sunt promitatoare si partea cea mai interesanta din punct de vedere aplicativ urmeaza sa se desfasoare in cel de al treilea an. Importanta aminelor biogene in alimente, medicamente sau probe biologice si dezvoltarea unor noi senzori si biosenzori pentru identificarea, cuantificarea si monitorizarea acestora este de interes stiintific si aplicativ. Rezultatele obtinute pana in prezent ne dau sperante ca proiectul se va indeplini in totalitate beneficiind de resursele financiare prevazute in planul initial, de aparatura achizitionata si de personalul specializat in acest domeniu.

Director de proiect,
Conf.dr. Constantin APETREI

