

Raport stiintific

privind implementarea proiectului in perioada ianuarie 2014 – decembrie 2014

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, prevazute pentru anul 2015.

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_4 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 voltmetria 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_2 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^+ , Ca^{2+} , Cl^-).

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_2 , GdPc_2 si DyPc_2 . 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 electrozului.

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 posibiliti 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 tirozinaza, (**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 Ca^{2+} si Cl^- ; 0,001 M pentru putrescina, histamina, tirozina si glutatation. Rapoartele tolerantei la substantele interferente la determinarea unei concentratii de 100 μM tiramina au fost 2500 pentru Ca^{2+} si 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.

În cazul biosenzorului pe baza de electrozi de Pt modificat cu polipirol dopat cu ioni fosfat în care s-a imobilizat enzima tirozinaza, (**Ty/PO₄-PPy/Pt**), studiile privind selectivitatea s-au realizat astfel. S-a studiat influența diversilor compuși care ar putea interfera la determinarea a 50 μM tiramina, în condiții experimentale optime. Rezultatul s-a exprimat ca limită de toleranță. Concentrația substanțelor interferente au fost 0,1 M pentru Mg²⁺, Ca²⁺ și Cl⁻; 0,01 M pentru histamina, putrescina, triptofan, spermina, fenilalanina și glutatión. Rapoartele de toleranță la substanțele interferente la detectarea a 50 μM tiramina a fost 2000 pentru Mg²⁺, Ca²⁺ și Cl⁻; 200 pentru histamina, putrescina, spermina și glutatión; 100 pentru triptofan; 20 pentru fenilalanina. Selectivitatea în cazul interferenței provocate de unii compuși fenolici s-a studiat prin voltametrie ciclică. Voltamogramele ciclice ale soluției care conține 50 μM catecol sau 50 μM fenol adăugate într-o soluție de tiramina 50 μM prezintă două picuri catodice, unul la -0,05 V (relaționat cu fenolul sau cu catecolul) și altul la -0,250 V (relaționat cu tiramina). În cazul detectării amperometrică a tiraminei la -0,250 V s-a determinat că fenolul și catecolul determină o eroare aditivă la determinarea tiraminei, dar mai mică de 2%. Cu toate acestea, acest biosenzor este util pentru determinarea selectivă a tiraminei din probe complexe continuând diferite amine biogene. Lipsa unor modificări semnificative a curenților picurilor înregistrate în prezența speciilor interferente demonstrează că biosenzorul Ty/PO₄-PPy/Pt poate fi considerat un biosenzor optim pentru detectarea și cuantificarea tiraminei în probe complexe. Utilizarea acestui biosenzor la detectarea și cuantificarea tiraminei în alimente fermentate are avantajul unei selectivități ridicate pentru că ceilalți compuși aminici nu interferă. Acest fapt se datorează acțiunii specifice a tirosinazei asupra tiraminei, care este un compus dublu funcțional, care conține o grupare amino și o grupare fenolică.

De asemenea, pentru biosenzorul pe baza de carbon vitros (GCE) modificat cu nanotuburi de carbon *single wall* (SWCNT) și diaminoxidază (DAO) (**DAO/SWCNT-GCE**), a fost studiată influența unor substanțe interferente la determinarea de 50 μM epinefrina pentru biosenzorul pe baza de carbon vitros modificat cu nanotuburi de carbon *single wall* și diaminoxidază. Concentrațiile substanțelor interferente au fost 0,01 M pentru Na⁺ și S₂O₅²⁻; 0,001 M pentru uree, acid uric, și acid citric. Raportul de toleranță la substanțele interferente la detectarea a 50 μM epinefrina au fost 2400 pentru Na⁺ și pentru S₂O₅²⁻; 800 pentru uree, 180 pentru acidul uric și 180 pentru acidul citric. Glucoza și glicina în concentrații de 0,001 M nu au nicio influență în răspunsul biosenzorului la detectarea a 50 μM epinefrina. Aceste rezultate demonstrează că biosenzorul **DAO/SWCNT-GCE** este un biosenzor cu caracteristici optime pentru determinarea și cuantificarea epinefrinei.

Valori similare ale raportului de toleranță s-au obținut și pentru **biosenzorii pe baza de diaminoxidază (DAO)** imobilizată pe **diferite materiale carbonice** (grafit, nanotuburi de carbon, nanofibre de carbon și grafen - suportul este pasta de carbon sau electrozi de carbon vitros), **polipirol dopat cu ioni fosfat** prin metoda *casting* urmată de reticulare cu glutaraldehida la determinarea a 50 μM putrescina. Selectivitatea ridicată se datorează acțiunii biocatalitice specifice a enzimei.

Biosenzorii fabricați prin imobilizarea **monoaminoxidazei (MAO) în filmul LB mixt de acid arahidic (AA) și disprosiu (III) bisftalocianina (DyPc₂)** prezintă rapoarte de toleranță de 240-280 la substanțele interferente (glucoza, acid ascorbic, acid uric, cisteina) la detectarea a 50 μM histamina. Selectivitatea ridicată se datorează acțiunii biocatalitice specifice a enzimei și efectului mediator al ftalocianinei la transferul electronilor.

1.2 Studiul stabilității senzorilor și biosenzorilor

Pentru a se evalua stabilitatea **senzorilor pe baza de filme subțiri Langmuir-Blodgett (LB) de ftalocianine**, s-au înregistrat mai multe cicluri consecutive în soluție 0,1 M de KCl. Prima voltamogramă ciclică este ușor diferită de cea de a doua. Apoi voltamogramele succesive sunt foarte reproductibile. De exemplu, un film LB de GdPc₂ imersat în soluție apoasă de KCl 0,1 M prezintă o reproductibilitate foarte ridicată, astfel că după 100 de scanări succesive ceea ce se observă este doar o ușoară scădere gradată a intensității picurilor sub 3,5% pentru toți senzorii studiați. Atunci când măsurătorile se opresc și 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 procedeu 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 de ordonare) dupa imersarea in solutii de electroliti si efectuarea masuratorilor voltametrice. Desi tehnica LB permite obtinerea de electrozi cu un raport foarte ridicat suprafata/volum, care faciliteaza procesele electrochimice de la suprafata senzorilor, lipsa de stabilitate si reproductibilitate la masurare sunt cele mai importante dezavantaje ale electrozilor pe baza de filme LB. Cu toate acestea, tehnica LB este foarte reproductibila permitand fabricarea de senzori practic identici. Diferentele dintre senzorii preparati in aceleasi conditii sunt mai mici de 0.5% in ceea ce priveste raspunsul obtinut prin voltametrie ciclica. Acest tip de senzori s-au utilizat ca senzori de unica folosinta.

Cu scopul testarii viabilitatii senzorilor pe **baza de pasta de carbon (CPE) modificati cu ftalocianine (LnPc₂)** s-au realizat o serie de experimente sistematice pentru cercetarea comportamentului in timp si a capacitatii de utilizare. Trebuie subliniat ca in toate cazurile, senzorii au nevoie de o etapa de stabilizare, care consta in inregistrarea a cinci voltamograme ciclice pentru a se putea stabili un echilibru intre senzor si solutia de analizat. Pentru determinarea stabilitatii 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 si de amine biogene (in solutie tampon fosfat de pH 7), scotand senzorul din solutia de analizat dupa fiecare masuratoare. Se observa ca potentialele picurilor se mentin constante (%RSD <1%) si ca variatiile intensitatii unor picuri cu cresterea numarului de repetitii sunt foarte reduse (%RSD <3%) pentru 100 de repetitii ale masuratorilor. Variatia intregii curbe evaluata ca %RSD a celor 10 coeficienti *kernel* este < 5% pentru toti senzorii de acest tip (GdPc₂, LuPc₂, DyPc₂).

Din aceste date se poate afirma ca senzorii voltametrici pe baza de CPE modificati cu ftalocianine prezinta o buna stabilitate si pot fi utilizati in masuratori de rutina. In plus, suprafata senzorului poate fi recuperata prin slefuire cu o hartie de filtru si ciclare in solutie de KCl 0,1 M.

In ceea ce priveste repetabilitatea **senzorilor pe baza de polipirol dopati cu diferiti agenti dopanti** trebuie mentionat ca primele cinci cicluri inregistrate sunt putin diferite fata de cele inregistrate ulterior, insa dupa aceasta etapa de stabilizare ciclurile succesive sunt foarte reproductibile. Dupa 100 de cicluri se observa doar o scadere usoara si progresiva a intensitatii picurilor (se inregistreaza o scadere globala a intensitatii semnalului de aproximativ 3%).

Pe de alta parte, atunci cand ciclarea este oprita si senzorii sunt scosi din solutie si pastrati in aer sau in apa ultrapura timp de cateva minute, si apoi sunt reintrodusi in solutie, nu se observa schimbari in semnalele electrochimice obtinute (variatiile sunt sub 1% pentru senzorii studiatii). Aceste rezultate dovedesc buna stabilitate pe termen scurt si repetabilitatea raspunsului senzorilor pe baza de polipirol.

In cazul biosenzorilor, in aceasta etapa s-a studiat biosenzorul pe baza de **polipirol si tirozinaza** cu scopul determinarii stabilitatii raspunsului atunci cand biosenzorul este utilizat intensiv. Astfel, s-a inregistrat un numar de 50 de cicluri in solutie de dopamina 50 μ M (solutia de electrolit este tampon fosfat de concentratie 0,01 M, pH 7,0) constatandu-se ca are loc o scadere a curentului catodic de 2%. Biosenzorii sunt stabili si se pot utiliza pentru analiza unui numar mare de probe fara o pierdere semnificativa a sensibilitatii. In toate determinarile cantitative, cuantificarea trebuie sa se realizeze in raport cu o proba de referinta (proba martor).

In conditii optime de pH, tarie ionica si temperatura, biosenzorul pe baza de electrozi serigrafati (SPE) modificati cu nanotuburi de carbon single wall (SWCNT) si tirozinaza (Ty) (**Ty-SWCNT/SPE**) are o stabilitate buna, de cel putin doua ore de utilizare continua. Se observa ca voltamogramele ciclice inregistrate in solutie de tiramina 100 μM (solutia de electrolit este tampon fosfat de concentratie 0,01 M, pH 7,0) scad putin in intensitate dupa doua ore de utilizare continua. Curentul picului catodic prezinta o scadere de 3,75% dupa doua ore de utilizare continua. Deci, biosenzorul are o stabilitate foarte buna.

Stabilitatea semnalului biosenzorului Ty-SWCNT / SPE a fost confirmata prin inregistrarea unui numar ridicat de voltamograme ciclice (100 de cicluri) in solutie de serotonina 50 μM (solutia de electrolit este tampon fosfat de concentratie 0,01 M, pH 7,0). Curentul picului catodic scade cu 3,5% confirmand stabilitatea biosenzorului Ty-SWCNT/SPE la utilizare intensiva.

Biosenzorul **DAO/SWCNT-GCE** prezinta o stabilitate foarte buna la utilizare continua in solutie 50 μM 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 diaminoxidaza (DAO) imobilizata pe diferite materiale carbonice (grafit, nanotuburi de carbon, nanofibre de carbon și grafen) la ciclare in 50 μM putresceina, demonstrand buna stabilitate a biosenzorilor.

Biosenzorii pe baza de monoaminoxidaza (MAO) imobilizata in filmul LB mixt de AA și DyPc₂ 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 electrozului 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

Senzor	Agent dopant	%RSD
PPy/SO ₄	Acid sulfuric	1,83
PPy/DSA	Dodecilsulfonat de sodiu	1,35
PPy/FCN	Ferocianura de potasiu	4,34
PPy/AQS	Sarea disodica a acidului antrachinonsulfonic	1,43
PPy/PWA	Acid fosfotungstic	5,70
PPy/TSA	Toluensulfonat de sodiu	4,76
Ppy/NiPcTs	Ftalocianina de nichel tetrasulfonata	5,9
Ppy/NP	Nitroprusiat de sodiu	2,05
Ppy/Mo	Molibdat de sodiu	3,24

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 μ 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-NH₂). 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 ($\text{LuPc}_2\text{-CPE}$) 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_2 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

Picurile GdPc_2	Potential (% RSD)	Curent (% RSD)
Picul I	2,3	2,5
Picul II	2,4	2,9
Picul III	3,1	4,3
Picul IV	4,6	5,0

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 deviatiiilor 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 curenții picurilor din voltametria ciclica a senzorului Ppy/DSA înregistrată în KCl 0,1 M timp de cinci zile consecutive

		%RSD ziua 1	%RSD ziua 2	%RSD ziua 3	%RSD ziua 4	%RSD ziua 5
Sistemul redox I	I_{pa}	2%	8%	13%	15%	16%
	I_{pc}	4%	4%	7%	10%	11%
Sistemul redox II	I_{pa}	8%	9%	11%	12%	14%
	I_{pc}	3%	10%	13%	18%	20%

Aceste date indică o stabilitate pentru o perioadă de cinci zile pentru toți senzorii înregistrându-se valori ale %RSD mai mici de 20%.

În cazul utilizării curbei integrale (10 coeficienți kernel pentru o curbă) valorile %RSD sunt cu 2-3% mai mari decât cele calculate pentru curentul picurilor.

În schimb, valorile %RSD sunt mai mici decât 7% dacă se iau în considerare potențialele picurilor.

Trebuie subliniat faptul că senzorii pot fi înlocuiți cu ușurință deoarece fabricarea senzorilor pe baza de polipirol este foarte reproductibilă.

În alt studiu s-a analizat biosenzorii pe baza de polipirol și tirozinază cu scopul determinării durabilității și a păstrării activității enzimice la temperatura camerei precum și în frigider. Stabilitatea enzimei s-a monitorizat în timp măsurându-se semnalul biosenzorilor într-o soluție de dopamina de concentrație cunoscută (50 μ M). La temperatura camerei (aproximativ 20°C) activitatea enzimică s-a diminuat rapid, observându-se o scădere de aproximativ 70% din activitatea enzimică inițială în 10 zile. O scădere mult mai mică a răspunsului biosenzorilor s-a observat atunci când electrozodul 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 enzimice. 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 $LOD=3\times\sigma/m$ (σ -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 modificati cu ftalocianine pentru diferiti compusi aminici

Senzor	Limita de detectie (M)	Limita de detectie (M)
LuPC ₂ -CPE	5.0×10 ⁻⁵ (dimetilamina)	7.3×10 ⁻⁵ (amoniac)
GdPC ₂ -CPE	6.4×10 ⁻⁵ (dimetilamina)	8.6×10 ⁻⁵ (amoniac)
DyPC ₂ -CPE	7.8×10 ⁻⁵ (dimetilamina)	8.8×10 ⁻⁵ (amoniac)

Tabelul 5. Valorile LOD pentru senzorii pe baza de polipirol dopati cu diferiti agenti dopanti la detectia trimetilaminei

Senzor	Limita de detectie (M)
Ppy/FCN	2.32×10 ⁻⁵
Ppy/NP	1.58×10 ⁻⁵
Ppy/PWA	8.44×10 ⁻⁵
Ppy/H ₂ SO ₄	4.57×10 ⁻⁵
Ppy/Mo	6.33×10 ⁻⁵
Ppy/AQS	9.21×10 ⁻⁵

Tabelul 6. Valorile LOD pentru senzorii pe baza de polipirol dopati cu diferiti agenti dopanti la detectia amoniacului si putresceinei

Senzor	Compus	LOD/ μM
Ppy/FCN	Amoniac	0.74
	Putresceina	1.36
Ppy/NP	Amoniac	1.84
	Putresceina	2.44
Ppy/PWA	Amoniac	4.84
	Putresceina	5.32
Ppy/H ₂ SO ₄	Amoniac	2.35
	Putresceina	2.62
Ppy/Mo	Amoniac	1.35
	Putresceina	2.34
Ppy/AQS	Amoniac	4.98
	Putresceina	5.05

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

Senzor	Compus	Limita de detectie / μM
CNF-SPE	Dopamina	0.84
	Epinefrina	1.06
CNT-SPE	Dopamina	1.42
	Epinefrina	1.98
GPH-SPE	Dopamina	2.31
	Epinefrina	3.52

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

Biosenzor	Limita de detectie
Ty/SWCNT-GCE	2.54 μM (epinefrina)
Ty/CoPc-CPE	0.84 μM (serotonina)
Ty/PO4-Ppy/Pt	5.7×10^{-7} M (tiramina)
Ty/GPH-C/SPE	2.42×10^{-7} (dopamina)
Ty/GPH-C/SPE	6.56×10^{-7} (epinefrina)
Ty/SWCNT-COOH/SPE	0.62 μM (tiramina)
DAO/SWCNT-GCE	2.42×10^{-7} (dopamina)
DAO/SWCNT-GCE	6.56×10^{-7} (epinefrina)
MAO/ AA-DyPc ₂	1.32×10^{-7} (histamina)
MAO/ AA-DyPc ₂	5.46×10^{-7} (histamina)
DAO/SWCNT-SPE	8.72×10^{-8} (histamina)
DAO/SWCNT-SPE	1.56×10^{-7} (putresceina)

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 -1V si 1,3V. 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 -1V si 0,5V.

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 -0,5V si 0,5V. 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 0,1M. Ambele metode asigura o recuperare foarte buna a senzorilor.

Metoda ciclarii in solutie de KCl 0,1M 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.

Diseminarea rezultatelor in anul 2014

La semnarea actului aditional in 2014 ne-am propus ca in aceasta etapa sa publicam minim 2 articole ISI si participarea la minim 2 manifestari stiintifice. Diseminarea rezultatelor cercetarii s-a realizat prin publicarea a 4 articole ISI, publicarea unui capitol intr-o monografie internationala, publicarea unui capitol intr-o monografie nationala (e-Book) si participarea cu 5 lucrari la conferinte internationale. De asemenea, s-a trimis un rezumat in vederea participarii la o conferinta internationala si s-au trimis 2 capitole de carte in vederea publicarii in monografii internationale (capitole in curs de revizare). Deci, obiectivele activitatii de diseminare au fost indeplinite in proportie de 100%.

Diseminarea rezultatelor cercetarii s-a realizat prin publicarea de articole ISI, publicarea unor capitole in monografii si participarea la conferinte internationale.

Articole ISI

1. 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>, Factor de impact (FI) 0,363; Scorul relativ de influenta (SRI) 0,127.
2. I. M. Apetrei, C. Apetrei, Study of Different Carbonaceous Materials as Modifiers of Screen-Printed Electrodes for Detection of Catecholamines, *IEEE Sensors Journal*, *IEEE Sensors Journal*, Published online 11 July 2014, <http://dx.doi.org/10.1109/JSEN.2014.2335534>, FI 1,852; SRI 1,368.
3. 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>, FI 1,486; SRI 2,889.
4. 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>, FI 2,576; SRI 1,934.

Capitole in monografii

1. 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
2. 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
3. C. Apetrei, M. Ghasemi-Varnamkhasti, I. M. Apetrei, *Olive oil and combined electronic nose and tongue*, Elsevier, 2015 (*under review*)
4. C. Apetrei, I. M. Apetrei, *Chemical composition of corn oil*, Nova Publishers, 2015 (*under review*)

Participari la conferinte internationale si articole publicate in volumele conferintelor

1. 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
2. C. Apetrei, I. M. Apetrei, Sensors based on carbonaceous materials for detection of biogenic amines, International Conference Chimia 2014 "New Trends In Applied Chemistry", Constanta, May 23-24, 2014, Oral presentation, Abstract published in: Book of Abstracts, page 40, http://chimia2014.univ-ovidius.ro/images/Book_of_Abstracts_2014.pdf
3. 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, Abstract published online: <http://www.b2match.eu/industrialtechnologies2014/participants/210>
4. 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, Abstract published in: Book of Abstracts, page 26, Lux Libris Publishing House, 2014, ISBN 978-973-131-280-4.
5. 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, Premiu: 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.
6. C. Apetrei, I. M. Apetrei, Nanostructured biocomposite materials for biosensing applications, MESIC 2015, Barcelona, 22nd to 24th July 2015, *under review*

Concluzii

Rezultatele practice obtinute in acest proiect de cercetare sunt corespunzatoare obiectivelor propuse, activitatile prevazute in plan au fost realizate in proportie de 100% iar rezultatele diseminarii sunt superioare celor angajate la inceputul anului 2014. In acest an au fost publicate 4 articole ISI, suma scorurilor relativ de influenta fiind 6,318 unul dintre articole fiind publicat in revista *Computers and Electronics in Agriculture* care are scorul relativ de influenta de 2,889 dovedind relevanta rezultatelor obtinute in acest proiect. Cercetarea desfasurata este interdisciplinara, multidisciplinara si transdisciplinara, ceea ce a permis ca lucrarile sa fie publicate in reviste din prima treime a clasamentului din domeniile Agriculture - multidisciplinary, Food Science & Technology si Instruments & Instrumentation. De asemenea, s-au publicat sau sunt in evaluare capitole in edituri internationale de prestigiu, ceea ce demonstreaza competenta si recunoasterea internationala a membrilor echipei de cercetare.

Cercetarile realizate pe toata durata proiectului (2012-2014) sunt foarte bune, fapt dovedit prin calitatea si cantitatea de rezultate publicate sau prezentate la conferinte stiintifice internationale. Exista premise clare ca aplicarea senzorilor si biosenzorilor pe probe reale (alimente, probe biologice si farmaceutice) va conduce la rezultate importante din punct de vedere stiintific si aplicativ avand in vedere dotarea tehnica si experienta membrilor echipei proiectului in domeniul senzorilor si biosenzorilor.

Director de proiect,
Conf.dr. Constantin APETREI

