

Raport stiintific

privind implementarea proiectului in perioada ianuarie 2015 – decembrie 2015

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

Testarea senzorilor si biosenzorilor

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

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

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

Tabelul 1. Condiitiile de electropolimerizare utilizate pentru realizarea senzorilor de polipirol

Agent dopant	Concentratia (mol×L ⁻¹)	Tehnica electrochimica	Parametrii

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

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

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

Biosenzor pe baza de electrod de carbon sticlos pentru catecolamine. Suprafata electrodului de carbon sticlos (GCE) a fost slefuita cu pasta de alumina, s-a spalat cu apa ultrapura si in final cu metanol. Partea activa a electrodului a fost un disc cu diametrul de 4 mm. Celelalte parti ale electrodului de carbon au fost acoperite cu rasina epoxidica izolatoare. Dupa procesul de curatare si slefuire, suprafata GCE a fost acoperita cu 10 µL suspensie de SWCNTs (1,0 mg x ml⁻¹ in metanol). Solventul a fost evaporat in aer, la

temperatura camerei. Enzima, Ty, a fost imobilizata pe GCE modificat cu SWCNTs (SWCNT-GCE) prin tehnica *drop-and-dry*, urmata de reticulare.

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

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

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

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

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

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

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

2. Selectarea metodelor pentru prelucrarea datelor

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

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

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

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

Folosind aceasta metoda, curba SWV este inmultita cu un numar de 10 functii kernel, si apoi se integreaza portiunile din curba in raport cu potentialul. Se obtin zece parametri pentru fiecare curba SWV. Un

exemplu al aplicarii metodei kernel pentru datele obtinute prin voltametrie de unda patrata se prezinta in Figura 1.

Figura 1. Aplicarea metodei kernel pentru voltamograma inregistrata prin SWV

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

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

Figura 2. Aplicarea metodei kernel pentru voltamogramele inregistrate prin CV

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

Reteaua de senzori pe baza de Ppy. Discriminarea aminelor biogene

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

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

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

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

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

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

Monitorizarea prospetirii pestelui

Prospetimea pestelui a fost monitorizata prin aprecierea globala a compusilor specifici alterarii (inclusiv

aminele biogene) folosind o retea multisenzor pe baza de Ppy. In acest scop, pestele a fost eviscerat, spalat si depozitat la 4 °C timp de 10 zile intr-o cutie inchisa. In fiecare zi, mostre de muschi au fost procesate si masurate cu senzorii pe baza de Ppy.

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

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

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

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

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

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

Tabelul 2. Rezultatele PLS-DA la calibrare si validare

Grup	Coeficienti de corelatie		Eroarea medie patratica	
	Calibrare	Validare	Calibrare	Validare

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

Senzori pe baza de materiale din carbon pentru detectarea aminelor biogene

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

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

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

Utilizarea ANOVA in analiza datelor

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

$$M_i - M_j = \text{diferenta dintre medii}$$

$$MSE = \text{eroarea patratica medie}$$

$$n_h = \text{media armonica}$$

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

Tabelul 4. Rezultatele semnificatiilor obtinute prin ANOVA

Comparare	Semnificatia

- * p < 0,05 (semnificativ)
- ** p < 0,01 (inalt semnificativ)
- *** p < 0,0001 (foarte semnificativ).

Statistica de baza

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

original. Pentru a afisa rezultatele obtinute cu SIMCA s-au utilizat graficele Coomans, in care datele necunoscute sunt atribuite sau nu unui model cu un nivel de incredere de 95%.

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

Figura 7. Graficul Coomans al clasificarii probelor clinice

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

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

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

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

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

Analiza aminelor biogene in produse din carne

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

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

Tabelul 6. Cuantificarea aminelor biogene in produse din carne

Compus	Biosenzor pe baza de DAO/CNT-SPE		
	LOD / μM	I_{max} / μA	K_M / μM

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

--	--	--

Figura 8. Produsele din carne analizate

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

Analiza aminelor biogene in extracte din carne de vita

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

Tabelul 7. Caracteristicile senzorilor pe baza de PPy

Senzor	Compus	LOD/ mM	Recuperare analitica / %
Ppy/FCN			
Ppy/NP			
Ppy/PWA			
Ppy/H ₂ SO ₄			
Ppy/Mo			
Ppy/AQS			

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

Analiza aminelor biogene in probe de peste marinat si peste afumat

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

Tabelul 8. Cuantificarea aminelor biogene in probele de peste

Proba	Tiramina (mg×kg ⁻¹) 5 repetitii				Media (mg×kg ⁻¹)	RSD (%)	Interval de incredere 95%

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

Tabelul 9. Continutul de histamina in probele de crap

Numarul de zile de depozitare	Rezultatele obtinute cu biosenzorul (mg/kg)	Media (mg/kg)	RSD (%)

la 4°C							

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

Analiza aminelor biogene in branzeturi

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

Conditiiile experimentale care influenteaza proprietatile biosensibile ale biosenzorului au fost optimizate. In conditii optime de pH si de potential, au fost cuantificate caracteristicile biosenzorului. Masuratorile cu biosenzorul au fost efectuate prin amperometrie, curentul rezultat in biosenzor la -0.06 V a fost masurat in functie de concentratia H₂O₂ in 100 mM tampon fosfat (pH 7,4).

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

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



Figura 9. Probele de branza analizate

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

Rezultatele obtinute sunt prezentate in tabelul 10.

Tabelul 10. Rezultatele cuantificarii aminelor biogene in probele de branza

Mostra	Concentratia (mg× kg⁻¹)

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

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

BAs (mg) adaugate	BAs (mg)	Recuperarea analitica (%)

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

Analiza aminelor biogene in bauturi fermentate

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

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

Tabelul 12. Aminele biogene si cantitatea detectata in vinuri rosii

Amine biogene (mg/L)	Merlot	Cabernet	Pinot Noir	Syrah	Feteasca Neagra	Nero D'Avola
Tiramina						
Putresceina						
Amine totale						

Mostrele de bere au fost analizate cu ajutorul retelei de biosenzori si rezultatele obtinute sunt incluse in Tabelul 13. RSD a detectarii aminelor biogene a fost 3,4%.

Tabelul 13. Amine biogene in probele de bere

Amine biogene (mg/L)	Noroc	Bergenbier	Timisoreana	Bucegi	Ciucas
Tiramina					
Histamina					
Putresceina					
Cadaverina					

Alt produs alimentar fermentat analizat a fost varza murata. Recuperare (%), RSD si media (cu 95% interval de incredere) pentru tiramina extrasa din probele varza murata sunt prezentate in tabelul 14.

Tabelul 14. Aminele biogene in probele de varza murata

A fost demonstrata eficienta biosenzorului pentru tiramina determinata in probele de varza murata.

Biosenzorii realizati in acest proiect au demonstrat excelente caracteristici si au fost folositi cu succes pentru detectarea aminelor biogene intr-o mare varietate de probe.

In acest an au fost realizate toate activitatile din planul de lucru si rezultatele obtinute au fost in acord cu obiectivele cercetarii. Obiectivele propuse pentru acest an au fost realizate in totalitate.

Diseminarea rezultatelor

Diseminarea rezultatelor cercetarii s-a realizat prin publicarea a 2 articole ISI, publicarea a 2 capitole intr-o monografie publicata intr-o editura de renume din strainatate, participarea cu 5 lucrari la conferinte internationale sau nationale, un articol in Buletinul Societatii de Chimie din Romania si teza de abilitare in domeniul chimie.

Publicarea de articole ISI

1. I. M. Apetrei, C. Diaconu, C. Apetrei, C. Georgescu, Electrochemical biosensor based on carbon nanofibers and diamine oxidase for detection of norepinephrine, *Romanian Biotechnological Letters* 21(1) (2016), acceptat, *va fi publicat in nr. 21, vol. 1, 2016.*
2. I.M. Apetrei, C. Apetrei, Biosensing Application of Hybrid Thin Film Layers Based Biosensors, *IEEE Sensors Journal* 15 (2015), 6926 - 6932, <http://dx.doi.org/10.1109/JSEN.2015.2473796>

Publicarea de articole in alte reviste

Constantin Apetrei. *Senzori voltametrici pe baza de polimeri organici electroconductori*, Buletinul Societatii de Chimie din Romania, nr. 1, 2015.

Teza de abilitare

Constantin Apetrei. *Development of novel sensors and biosensors with applications in food analysis*, Universitatea Dunarea de Jos din Galati, 2015.

Elaborarea de capitole in monografii internationale

1. C. Apetrei, I. M. Apetrei, *Chemical composition of corn oil*, In **Corn and Coconut Oil: Antioxidant Properties, Uses and Health Benefits**, Editor C. Apetrei, ISBN: 978-1-63483-420-9, Nova Publishers, 2015, pp. 1-28.
https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=55691&osCsid=a58c860a7ae1f4d5f714272f3d819203
2. I. M. Apetrei, C. Apetrei, *Quality analyses and authentication of coconut oil*, In **Corn and Coconut Oil: Antioxidant Properties, Uses and Health Benefits**, Editor C. Apetrei, ISBN: 978-1-63483-420-9, Nova Publishers, 2015, pp. 131-158.
https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=55691&osCsid=a58c860a7ae1f4d5f714272f3d819203

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

1. C. Apetrei, I. M. Apetrei, Development of voltammetric sensors based on screen-printing technology for detection of creatinine, **Euronanoforum 2015**, Riga, Latvia June 10-12, 2015, poster, http://euronanoforum2015.eu/wp-content/uploads/2015/03/Abstract_Apetrei.pdf
2. C. Apetrei, I. M. Apetrei, Biosensor based on hybrid Langmuir-Blodgett thin films for detection of tyramine in foods, **New Trends on Sensing- Monitoring- Teliagnosis for Life Sciences**, Brasov, Romania - September 3-5, 2015, Invited Oral Presentation, <http://healthfoodenviron.unitbv.ro/2015/>
3. C. Apetrei, Biosensor based on Prussian Blue and diamine oxidase for detection of biogenic amines in chesses, **The 7th International Symposium Euroaliment - around food**, September 24-26, 2015, Galati, Romania, Oral, http://www.euroaliment.ugal.ro/euro-aliment_2015.htm
4. C. Apetrei, Bioelectronic tongue for meat products quality analysis, **The 7th International Symposium Euroaliment - around food**, September 24-26, 2015, Galati, Romania, Poster, http://www.euroaliment.ugal.ro/euro-aliment_2015.htm
5. Apetrei, C.V. Ungureanu, I.M. Apetrei, Biosensors for dopamine determination in foods of plant origin, **"Alexandru Ioan Cuza" University Days, Faculty of Chemistry Conference**, October 29 – 31, 2015, Iasi, Plenary Conference, <http://www.chem.uaic.ro/ro/manifestari/program-zu2015.html>

Director de proiect,
Prof.dr. Constantin APETREI