



IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești

Proiect cofinanțat din Fondul Social European Operațional Capital Uman 2014-2020

TEZĂ DE DOCTORAT REZUMAT

DEZVOLTAREA UNOR NOI METODE ELECTROANALITICE PENTRU DETERMINAREA COMPUȘILOR BIOACTIVI CU PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE

Doctorand,

Irina – Georgiana BULGARU (MUNTEANU)

Conducător științific,

Prof. univ. dr. chim. habil. Constantin APETREI

**Lucrare realizată în cadrul proiectului
„Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și
postdoctorală de excelență - PROINVENT”**

Contract nr: 62487/03.06.2022 POCU/993/6/13 - Cod SMIS: 153299

Seria C: Chimie Nr. 5

GALAȚI 2023

Lider:



Parteneri:





„Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență - PROINVENT”

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT REZUMAT

DEZVOLTAREA UNOR NOI METODE ELECTROANALITICE PENTRU
DETERMINAREA COMPUȘILOR BIOACTIVI CU PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE

Doctorand

Irina – Georgiana BULGARU (MUNTEANU)

Președinte,

Prof. univ. dr. ing. Cătălin FETECĂU
Universitatea "DUNĂREA DE JOS" din Galați

Conducător științific,

Prof. univ. dr. chim. habil. Constantin APETREI
Universitatea "DUNĂREA DE JOS" din Galați

Referenți științifici,

Prof. univ. dr. chim. habil. Mihaela BADEA
Universitatea TRANSILVANIA din Brașov

Prof. univ. dr. ing. habil. Anton FICAI
Universitatea POLITEHNICA din București

Prof. univ. dr. chim. habil. Rodica - Mihaela DINICĂ
Universitatea "DUNĂREA DE JOS" din Galați

**Seria C: Chimie Nr 5
GALAȚI
2023**

MULȚUMIRI

În calitate de student-doctorand al Școlii Doctorale de Științe Fundamentale și Inginerești din cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați, doresc să îmi exprim stima și recunoștința față de întreg colectivul de specialiști cu care am colaborat pentru realizarea acestei teze de doctorat. Fundamentarea științifică și elaborarea acestei teze de doctorat ar fi fost imposibil de realizat fără susținerea, ajutorul și îndrumarea unor oameni deosebiți care, prin înalt grad profesional și dăruire, au contribuit la formarea mea ca cercetător, insuflându-mi curajul de a merge mai departe.

Cuvinte de mulțumire, aleasă prețuire și întreaga mea recunoștință se îndreaptă către domnul Profesor Dr. Habil. Constantin APETREI, conducătorului științific al acestei teze, pentru întreg sprijinul acordat în toți cei patru ani de studiu intens, pentru îndrumarea științifică excepțională, pentru îndelunga-răbdare și încrederea acordată, pentru sfaturile și ideile valoroase fără de care experimentele și analizele realizate nu ar fi căpătat profunzime și importanță, pentru optimismul neobosit care m-a determinat și încurajat să avansez în cercetare și pentru grija cu care a coordonat fiecare etapă parcursă în realizarea obiectivelor propuse spre a fi îndeplinite.

Doresc, de asemenea, să mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare: Prof. Dr. habil Cătălina Iticescu, Conf. Dr. Bianca Furdui și Lect. Dr. Dumitru Dima pentru toate sfaturile și ideile oferite cu generozitate și pentru întreaga îndrumare acordată în perioada doctoratului.

Sincere mulțumiri membrilor comisiei de doctorat: prof. dr. chim. Mihaela Badea, prof. dr. ing. Anton Ficai și prof. dr. chim. Rodica - Mihaela Dinică pentru solitudinea cu care au analizat lucrarea mea. Mulțumesc, de asemenea, domnului prof. dr. ing. Cătălin Fetecău, președintele comisiei de doctorat.

Mulțumesc domnului Academician Profesor Dr. ing. Eugen Rusu, domnului Profesor Dr. Gabriel Murariu pentru susținerea și îndrumarea oferite în cadrul stagiului de un an de zile efectuat ca membră a grupului țintă în proiectul PROINVENT prin intermediul căruia am acumulat informații utile și valoroase din variate domenii de activitate.

Doresc să adresez mulțumiri doamnei Dr. Chim. CS I Irina-Elisabeta Geană, cercetător științific la ICSI Rm. Vâlcea, pentru implicarea și ajutorul oferit în efectuarea analizelor cromatografice, contribuții însemnate aduse acestei lucrări de doctorat.

Adresez calde mulțumiri domnului Profesor Dr. Vasile Robert Grădinaru de la Facultatea de Chimie din cadrul Universității „Alexandru Iona Cuza”, Iași pentru ajutorul profesional și colaborarea științifică cu care ne-a sprijinit în realizarea studiilor de fluorescență.

Mulțumesc pentru susținerea financiară de care am beneficiat prin intermediul proiectului „Noi biosenzori și instrumente inteligente pentru detecția ultrasensibilă a falsificării uleiurilor de măsline”, PN-III-P4-ID-PCE-2020-0923.

Alese mulțumiri întregului corp profesoral de la Departamentul Chimie din cadrul Facultății de Științe și Mediu și tuturor colegilor mei pentru sprijinul profesional și moral acordat în toți acești ani.

În mod deosebit vreau să mulțumesc din suflet întregii mele familii pentru sprijinul necondiționat acordat pe parcursul stagiului de doctorat, pentru toată răbdarea și înțelegerea, pentru toate încurajările din momentele mai dificile din timpul celor patru ani și pentru acceptarea tuturor sacrificiilor impuse de implicarea mea în activitățile legate de pregătirea și elaborarea acestei teze.

Cu deosebită considerație, vă mulțumesc tuturor, încă o dată!

Drd. Irina - Georgiana Bulgaru (Munteanu)

14 iulie 2023

Dedic această teză copiilor mei...

CUPRINS

(paginația corespunde tezei de doctorat)

TITLU CAPITOL	Pag
Titlul tezei	I
Comisia	II
Seriile tezelor de doctorat	III
Mulțumiri	IV
Cuprins	VI
Introducere	XI
Lista abrevierilor	XIII
Lista figurilor	XV
Lista tabelor	XXII

PARTEA I: STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. NOȚIUNI GENERALE PRIVIND COMPUȘI BIOACTIVI CU PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE	1
I.1. Răspândire și activitate biologică	1
I.2. Clasificarea antioxidantilor	2
I.3. Compușii fenolici – structuri chimice și rolul lor în organism	4
I.4. Noțiuni generale și metode de determinare ale acidului clorogenic, catechinei, acidului rozmarinic și verbascosidei – compușii de interes ai acestei lucrări de cercetare	6
I.4.1. Acidul clorogenic	6
I.4.2. Catechina	7
I.4.3. Acidul rozmarinic	9
I.4.4. Verbascozida	10
CAPITOLUL II. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE PRIN METODE FIZICO – CHIMICE	12
II.1. Teste HAT	13
II.1.1. Testul ORAC	14
II.1.2. Testul HORAC	14
II.1.3. Testul TRAP	14
II.1.4. Testul TOSC	14
II.2. Teste SET	14
II.2.1. Testul CUPRAC	15
II.2.2. Testul FRAP	16
II.2.3. Metoda Folin – Ciocâlțeu	17
II.3. Teste mixte (HAT/SET)	19
II.3.1. Testul ABTS	19
II.3.2. Testul DPPH	20
II.4. Concluzii	22

CAPITOLUL III. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE UTILIZÂND SENZORI ȘI BIOSENZORI ELECTROCHIMICI	23
III.1. Senzori electrochimici pentru determinarea activității antioxidante	23
III.2. Biosenzori enzimatici pentru determinarea activității antioxidante	25
III.2.1. Biosenzori enzimatici pe bază de tirozinază	27
III.2.2. Biosenzori enzimatici pe bază de lacază	27
III.2.3. Biosenzori enzimatici pe bază de lacază-tirozinază	29
III.3. Concluzii	30

PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL IV. MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT	31
IV.1. Motivația și scopul	31
IV.2. Obiective generale	32
IV.3. Obiective specifice	32
CAPITOLUL V. MATERIALE ȘI METODE FOLOSITE PENTRU DEZVOLTAREA NOILOR SENZORI ȘI BIOSENZORI PENTRU DETECȚIA COMPUȘILOR FENOLICI CU PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE	34
V.1. Materiale	34
V.1.1. Electrozi de lucru	34
V.1.2. Aparatură și celule electrochimice	36
V.1.3. Soluții și reactivi	43
V.2. Metode de caracterizare a electrozilor, a mediatorilor electroactivi și a compușilor biologic activi cu proprietăți antioxidante	48
V.2.1. Metode electrochimice	48
V.2.1.1. Analiza prin CV	48
V.2.1.2. Analiza prin SWV	49
V.2.1.3. Analiza prin DPV	51
V.2.2. Analiza prin spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS)	52
V.2.3. Analiza cromatografică de lichide de înaltă performanță (HPLC)	53
V.2.4. Analiza spectrometrică în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)	54
V.2.5. Microscopia cu scanare electronică (SEM)	55
V.2.6. Tehnici spectrofotometrice de determinare a activității antioxidante	55
CAPITOLUL VI. DETERMINAREA ELECTROCHIMICĂ A ACIDULUI CLOGENIC DIN PRODUSE NUTRACEUTICE FOLOSIND SENZORI VOLTAMETRICI PE BAZĂ DE NANOMATERIALE DE CARBON	57
VI.1. Studii preliminare	57
VI.2. Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] 10^{-3} M$ – PBS $10^{-1} M$	58
VI.3. Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluție de CGA $10^{-3} M$	62
VI.4. Curba de calibrare și determinarea limitei de detecție	66
VI.5. Determinarea cantitativă a CGA în produse nutraceutice	69
VI.6. Stabilitatea, repetabilitate și studii de interferență	72
VI.7. Concluzii	77

CAPITOLUL VII. DEZVOLTAREA UNUI NOU BIOSENZOR ENZIMATIC PE BAZĂ DE GRAFEN, FTALOCIANINĂ DE MANGAN ȘI TIROZINAZĂ, CU APLICABILITATE ÎN EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A ACIDULUI CLOGENIC DIN PRODUSE NUTRACEUTICE	78
VII.1. Prepararea biosenzorului	78
VII.1.1. Tirozinaza – noțiuni generale	78
VII.1.2. Fabricarea biosenzorului enzimatic prin imobilizarea enzimei tirozinaza	80
VII.1.2.1. Prepararea senzorului GPH-MnPc/SPCE	80
VII.1.2.2. Prepararea biosenzorului GPH-MnPc-Tyr/SPCE	80
VII.2. Caracterizarea noului biosenzor enzimatic	80
VII.3. Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluție de CGA	87
VII.4. Influența vitezei de scanare asupra răspunsului voltametric	90
VII.5. Curba de calibrare și limita de detecție	92
VII.6. Determinarea calitativă și cantitativă a CGA în produse nutraceutice	95
VII.7. Stabilitatea, reproductibilitatea și repetabilitatea biosenzorului	97
VII.8. Studii de interferență	97
VII.9. Determinarea activității antioxidante a CGA prin metoda DPPH	98
VII.10. Concluzii	99
CAPITOLUL VIII. STUDIU COMPARATIV PRIVIND EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A CATECHINEI DIN PRODUSE NUTRACEUTICE UTILIZÂND O METODĂ ELECTROCHIMICĂ NOU DEZVOLTATĂ ȘI METODE SPECTROFOTOMETRICE DE ANALIZĂ	101
VIII.1. Prepararea biosenzorilor	101
VIII.1.1. Lacaza – mecanism de acțiune	101
VIII.1.2. Fabricarea biosenzorilor enzimatici prin imobilizarea enzimei lacaza	103
VIII.2. Caracterizarea biosenzorilor enzimatici	103
VIII.2.1. Studiul EIS pentru CNT-Lac/SPCE, GNP-Lac/SPCE și CNT-GNP-Lac/SPCE	104
VIII.2.2. Metoda spectrofotometrică FT-IR	105
VIII.2.3. Caracterizarea morfologică prin intermediul SEM	106
VIII.3. Influența pH-ului asupra performanței biosenzorilor	106
VIII.4. Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluție de catechină	108
VIII.5. Curba de calibrare	113
VIII.5.1. Cinetica reacției enzimatică. Calculul vitezei maxime de reacție și a constantei Michaelis-Menten	115
VIII.6. Stabilitatea, selectivitatea și reproductibilitatea biosenzorului CNT-GNP-Lac/SPCE	116
VIII.7. Determinarea cantitativă a catechinei în produse nutraceutice	117
VIII.8. Determinarea activității antioxidante prin metode spectrofotometrice	119
VIII.9. Determinarea activității antioxidante prin metode electrochimice	120
VIII.9.1. Aria de sub curba picului anodic	120
VIII.9.2. Indicele electrochimic	122
VIII.10. Concluzii	122

CAPITOLUL IX. DETECȚIA VOLTAMETRICĂ A ACIDULUI ROZMARINIC DIN PRODUSE COSMETICE CU UN NOU SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE OXID DE GRAFEN MODIFICAT CU OCTAPEPTIDĂ	124
IX.1. Prepararea senzorului	124
IX.1.1. Peptida zwitterionică – descriere	124
IX.1.2. Fabricarea senzorului prin imobilizarea peptidei zwitterionice	125
IX.2. Caracterizarea electrozilor de lucru	126
IX.2.1 Metoda spectrometrică FT-IR	126
IX.2.2. Caracterizarea morfologică prin intermediul SEM	127
IX.3. Optimizarea parametrilor experimentali	129
IX.3.1. Influența pH-ului	129
IX.3.2. Influența cantității de peptidă	131
IX.4. Proprietățile electrochimice ale GO-Peptidă/SPCE în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] 10^{-3} M$ – PBS $10^{-1} M$	131
IX.5. Răspunsurile electrochimice ale senzorilor în soluție de acid rozmarinic	134
IX.6. Influența vitezei de scanare asupra răspunsului voltametric	137
IX.7. Curba de calibrare și determinarea limitei de detecție	138
IX.8. Determinarea cantitativă a acidului rozmarinic în produse cosmetice	140
IX.9. Repetabilitatea, reproductibilitatea și stabilitatea, senzorului GO-Peptidă/SPCE	142
IX.10. Concluzii	143
CAPITOLUL X. DETERMINAREA CANTITATIVĂ ȘI EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A VERBASCOZIDEI DIN ULEIUL DE MĂSLINE PRIN INTERMEDIUL UNUI NOU SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE OXID DE GRAFEN MODIFICAT CU PENTAPEPTIDĂ	144
X.1. Fabricarea senzorului prin imobilizarea pentapeptidei	145
X.2. Caracterizarea electrozilor	146
X.2.1 Metoda spectrometrică FT-IR	146
X.2.2. Caracterizarea morfologică prin intermediul SEM	148
X.3. Proprietățile electrochimice ale SPCE/GO-Pentapeptidă în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] 10^{-3} M$ – PBS $10^{-1} M$	149
X.4. Răspunsurile electrochimice ale senzorilor în soluție de verbascoidă	152
X.5. Influența concentrației de verbascoidă asupra răspunsului voltametric al SPCE/GO-Pentapeptidă	156
X.6. Precizia metodei	157
X.7. Stabilitate, reproductibilitate, repetabilitatea și studii de interferență	158
X.8. Determinarea cantitativă a verbascoidei din EVOO	158
X.9. Determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH	160
X.10. Concluzii	161
CAPITOLUL XI. CONCLUZII GENERALE	162
CAPITOLUL XII. PERSPECTIVE VIITOARE DE CERCETARE	165

CAPITOLUL XIII. VALORIFICAREA ȘI IMPACTUL REZULTATELOR CERCETĂRII	166
XIII.1. Articole publicate în jurnale cotate ISI	166
XIII.1.1. Articole publicate din conținutul tezei de doctorat	166
XIII.1.2. Articole publicate conexe temei de cercetare	166
XIII.2. Lucrări și postere prezentate la conferințe internaționale	167
XIII.3. Premierea rezultatelor cercetării	169
XIII.4. Activități conexe desfășurate în cadrul programului individual de studii universitare de doctorat	170
BIBLIOGRAFIE	171

INTRODUCERE

În ultimii ani, utilizarea antioxidantilor a crescut considerabil în rândul populației, acest lucru datorându-se atât interesului acordat de către industria farmaceutică acestor compuși, cât și recomandărilor crescute din sfera medicală. Majoritatea reacțiilor biochimice care asigură viața sunt asociate cu producerea de radicali liberi, care la rândul lor favorizează stresul oxidativ și contribuie la deteriorarea organismului. Căile biochimice complexe din organismul uman sunt responsabile de combaterea stresului oxidativ prin asigurarea unui nivel adecvat al echilibrului dintre pro-oxidanți (radicalii liberi) și antioxidanți. Datele epidemiologice au sugerat o corelație inversă între consumul de fructe și legume, în mod natural bogate în antioxidanți, și incidența anumitor boli (tulburări cardiovasculare, boli metabolice, cancer) [1].

Progresele recente în medicină și nutriție schimbă abordarea tradițională a asistenței medicale spre medicina personalizată, care prioritizează prevenirea bolilor și promovarea sănătății, în deosebi, prin stilul de viață și abordări bazate pe dietă și nutriție [2]. În acest context, antioxidanții proveniți din plante, precum flavonoide, vitamine, hormoni, acizi fenolici și esteri sunt considerați compuși dietetici bioactivi capabili să reducă stresul oxidativ și au fost asociați cu numeroase beneficii pentru sănătate [3]. Antioxidanții joacă un rol important în menținerea unui echilibru optim în organism [4], ceea ce a determinat ca analiza acestor substanțe sau a activității antioxidante în diferite alimente și băuturi să devină un domeniu de cercetare în plină expansiune [5]. Măsurarea activității antioxidante a alimentelor și a probelor biologice este, prin urmare, nu numai esențială pentru asigurarea calității alimentelor funcționale ci, mai important, pentru eficacitatea antioxidantilor alimentari în protecția și tratamentul bolilor legate de stresul oxidativ.

Din multitudinea de metaboliți secundari prezenți în plante, compușii fenolici joacă un rol fundamental împotriva stresului oxidativ, reprezentând una dintre clasele sintetizate și studiate cel mai mult [6]. Aceștia sunt considerați antioxidanți veritabili, fiind asociați cu beneficii privind diminuarea riscurilor de apariție a unor boli cronice, după cum demonstrează numeroase recenzii prezente în literatura de specialitate cu privire la activitatea lor biologică [7], [8].

Ținând cont de aceste considerente, se apreciază a fi necesară dezvoltarea unor dispozitive ușor de utilizat pentru monitorizarea calității produselor nutraceutice având conținut declarat în astfel de compuși bioactivi sau a produselor alimentare cu rol antioxidant. Astfel, în această lucrare au fost studiați patru compuși de importanță majoră și având proprietăți antioxidante remarcabile, mai precis trei derivați ai acidului cafeic, respectiv acidul clorogenic, acidul rozmarinic și verbascosida și un derivat flavonic, respectiv catechina.

Studiile efectuate în direcția acestor patru compuși aduc originalitate prezentei lucrări de cercetare, fiind detaliate atât în partea teoretică, respectiv cea de documentare avansată în literatura de specialitate, dar mai cu seamă în cea de-a doua parte a tezei, respectiv partea experimentală. Astfel, au fost dezvoltate și caracterizate o serie de dispozitive electrochimice promițătoare și versatile, fiind ulterior utilizate pentru determinarea și cuantificarea compușilor bioactivi mai-sus enumerați, ce se regăsesc în diferite formulări nutraceutice, sub diverse forme de prezentare, în produse cosmetice și, de asemenea, în produse alimentare reprezentate de uleiuri extravirgine de măsline. Dezvoltarea unor astfel de dispozitive, respectiv senzori modificați chimic și biosenzori enzimatici, a avut la bază utilizarea de materiale de ultimă generație, printre care electrozii de carbon serigrafiați, mediatori electroactivi, enzime și peptide, ce au prezentat proprietăți excelente, contribuind la îmbunătățirea sensibilității dispozitivelor nou-create. În această lucrare s-au studiat toate

etapele incluse în procesul de fabricare a acestor senzori și biosenzori, de la preparare, modificare, optimizarea parametrilor, analiza propriu-zisă și până la validarea rezultatelor obținute la nivel de laborator atât pe probe reale, cât și prin utilizarea altor metode de determinare cunoscute. Mai mult, prin intermediul acestor dispozitive s-a reușit determinarea profilului antioxidant al compușilor studiați ținând cont de parametri electrochimici obținuți în urma determinărilor voltametrice, conturând astfel o serie de indicii despre activitatea antioxidantă presupusă a fiecărei probe analizate.

Tehnicile utilizate pentru caracterizarea dispozitivelor nou-dezvoltate au oferit o varietate de perspective pentru a înțelege și descrie proprietățile acestora. Astfel, prin metodele utilizate s-au numărat și CV, SWV, DPV, SEM, HPLC, FT-IR, spectroscopia UV-Viz. În plus față de aplicarea lor în studiile fundamentale ale proceselor de oxidare și de reducere pentru a descoperi mecanismele de reacție, aceste tehnici au fost, de asemenea, utilizate în studierea cineticii și termodinamicii proceselor de transfer de ioni și de electroni [9].

Ținând cont de toate acestea, prezenta teză de doctorat cu titlul „Dezvoltarea unor noi metode electroanalitice pentru determinarea compușilor bioactivi cu proprietăți antioxidante” și-a atins scopul și obiectivele de a dezvolta dispozitive electrochimice sensibile și selective, utilizate pentru determinarea și cuantificarea unor compuși bioactivi de importanță majoră pentru combaterea bolilor asociate stresului oxidativ, prin activitatea antioxidantă pe care acestea o manifestă în organismul uman.

Cuvinte cheie: acid clorogenic, catechina, acid rozmarinic, verbascosida, senzor, biosenzor, voltametrie ciclică, voltametrie puls-diferențială, lacază, tirozinară, ftalocianină de mangan, peptidă, activitate antioxidantă

LISTĂ DE ABREVIERI

AAPH - (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroclorură
ABS - soluție tampon acetat
ABTS - 2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină -6 – sulfonat
AFM - microscopie cu forță atomică
BHA - butilhidroxianisol
BHT - butilhidroxitoluen
BSA - albumina serică de bovină
CAT - catalază
CGA - acid clorogenic
CNT - nanotuburi de carbon
CPE - electrod de pastă de carbon
CUPRAC - testul de reducere a capacității antioxidante cuprice
CV - voltametrie ciclică
DMPD - N,N-dimetil-p-fenilendiamina dihidroclorură
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DPV - voltametrie puls-diferențială
EDTA - acid etilendiaminotetraacetic
EI - indice electrochimic
EIS - spectroscopie de impedanță electrochimică
EPR - rezonanță paramagnetică electronică
ESI - ionizare electrospray
Epa - potențialul picului anodic
Epc - potențialul picului catodic
EVOO - ulei de măsline extravirgin
FRAP - testul de reducere a ionului feric
FT-IR - spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier
GA - glutaraldehidă
GC - cromatografia de gaz
GCE - electrod de carbon vitros
GNP - nanoparticule de aur
GPH - grafen
GO - oxid de grafen
GSH-Px - glutation peroxidază
HORAC - capacitatea antioxidantă a radicalilor hidroxil
HPLC - cromatografia de lichide de înaltă performanță
HSA - albumină serică umană
Ipa - intensitatea picului anodic
Ipc - intensitatea picului catodic
IR - infraroșu
Lac - lacază
LOD - limită de detecție
LOQ - limită de cuantificare

MnPc - ftalocianină de mangan
MS - spectrometrie de masă
MWCNTs - nanotuburi de carbon cu pereți multipli
OG – galat de octil
ORAC - capacitatea de absorbție a radicalilor de oxigen
PBS - soluție tampon fosfat
PCET - transfer de electroni cuplat cu transfer de protoni
PG - galat de propil
Ppy - polipirol
PVA - alcool polivinilic
ROS - specii reactive de oxigen
Sa - aria de sub curba picului anodic
SEM - microscopie cu scanare electronică
SPCEs - electrozi serigrafiați de carbon
SWV - voltametrie de undă pătrată
TAC - capacitate antioxidantă totală
TEM - microscopie electronică de transmisie
TOSC - capacitate totală de neutralizare a oxi-radicalilor
TPC - conținut total de polifenoli
TPTZ - tripiridiltriazina
TRAP - parametrul antioxidant total de captare a radicalilor peroxil
Tyr - tirozinază
UV - ultraviolet
Viz - vizibil

PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. NOȚIUNI GENERALE PRIVIND COMPUȘI BIOACTIVI CU PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE

I.1. Răspândire și activitate biologică

Stresul oxidativ este un concept relativ nou, care a fost implicat pe scară largă în științele biomedicale în ultimii 20 de ani. Acesta participă în mod semnificativ la fiziologia bolilor foarte răspândite, cum ar fi diabetul, hipertensiunea arterială, preeclampsia, ateroscleroza, insuficiența renală acută, bolile Alzheimer și Parkinson. Metabolizarea oxigenului de către celule generează ROS, potențial dăunătoare. În condiții normale, viteza și amploarea formării oxidanților este echilibrată de viteza de eliminare a acestora. Cu toate acestea, un dezechilibru negativ între pro-oxidanți și antioxidanți duce la stresul oxidativ. Nivelurile crescute de ROS în celulă au un impact substanțial, fie ducând la funcția celulară defectă, îmbătrânire, fie la apariția unor boli [10].

Numeroase dovezi sugerează că antioxidanții joacă un rol esențial în menținerea sănătății umane, în prevenirea și tratamentul acestor boli datorită capacității lor de a reduce stresul oxidativ. Determinarea activității antioxidante a alimentelor și a probelor biologice este, prin urmare, nu numai esențială pentru asigurarea calității alimentelor funcționale ci, mai important, pentru eficacitatea antioxidanților alimentari în protecția și tratamentul bolilor legate de stresul oxidativ.

Antioxidanții sunt substanțe care, atunci când sunt prezente în alimente sau în organism la concentrații foarte mici, întârzie, controlează sau previn procesele oxidative care duc la deteriorarea calității alimentelor sau la inițierea și propagarea bolilor degenerative în organism. Aceste substanțe își exercită efectul inhibitor împotriva proceselor de oxidare prin diferite mecanisme și cu activități variate [11].

I.2. Clasificarea antioxidanților

După mecanismul de acțiune, antioxidanții pot fi clasificați în antioxidanți primari și secundari. Antioxidanții primari inhibă reacția în lanț a oxidării, acționând ca donori de hidrogen sau acceptori ai radicalilor liberi și generând radicali mai stabili. Din această categorie fac parte: acizii fenolici, flavonoide, taninuri, carotenoizi, stilbene, cumarine și lignani. Antioxidanții secundari sunt compuși fenolici care îndeplinesc funcția de captare a radicalilor liberi și oprirea reacțiilor în lanț. Compușii includ: BHA, BHT, PG și OG [12].

I.3. Compușii fenolici – structuri chimice și rolul lor în organism

Compușii fenolici sunt metaboliti frecvent întâlniți în diferite surse, în special plante, și prezintă o importanță majoră pentru sănătatea oamenilor datorită activității antioxidante pe care o dețin, alături de proprietăți antiinflamatoare, antimicrobiene și anticarcinogenice [13]. Ca antioxidanți, acești compuși pot proteja constituenții celulari împotriva deteriorării oxidative limitând astfel riscul apariției diferitelor boli degenerative asociate stresului oxidativ [14]. Aceștia sunt capabili să neutralizeze radicalii liberi prin donarea unui electron sau a unui atom de hidrogen [15]. În plus, compușii fenolici pot acționa prin creșterea activității enzimelor antioxidante endogene, cum ar fi GSH-Px, SOD sau CAT și, de asemenea, prin inhibarea activității enzimelor precum xantinoxidaza.

Din punct de vedere structural, compușii fenolici conțin unul sau mai multe inele aromatice cu grupări hidroxil, cuprinzând o mare varietate de structuri chimice, de la molecule simple până la compuși polimerici [16].

I.4. Noțiuni generale și metode de determinare ale acidului clorogenic, catechinei, acidului rozmarinic și verbascosidei – compușii de interes ai acestei lucrări de cercetare

I.4.1. Acidul clorogenic

CGA a fost studiat pe scară largă deoarece este unul dintre compușii fenolici principali ai dietei umane, având multe beneficii pentru sănătate. Compusul se găsește în alimente și plante aromatice, precum: mere [17], anghinare [18], morcovi [19], boabe de cafea [20], cartofi [21], struguri [22], frunze de tutun [23], ceai [22], pelin [24] și caprifoi [25].

Din punct de vedere chimic, CGA este un compus organic de tip acid fenolic, fiind un ester al acidului cafeic și al acidului (L)-chinic.

În ultimii ani o serie de beneficii pentru sănătate au fost asociate consumului CGA. Dintre acestea, se remarcă următoarele:

- modularea metabolismului glucozei la om. Prin urmare, CGA are efect antidiabetic [26] asupra diabetului zaharat de tip 2, îmbunătățind acțiunea insulinei.
- previne dezvoltarea cataractei ca urmare a efectului său antidiabetic. Acest aspect a fost indicat de rezultatele studiilor efectuate pe animalele de laborator.
- reduce riscul relativ al bolilor cardiovasculare, îmbunătățind vaso-reactivitatea umană. De asemenea, prezintă și proprietăți antihipertensive [27].
- reduce riscul de producere a calculilor biliari.

I.4.2. Catechina

Catechinele sau flavanol-3-olii constituie grup de compuși care conțin aproximativ 70% din totalul polifenolilor prezenți în frunzele de ceai. Catechinele prezente în frunzele de ceai verde sunt în număr de opt, după cum urmează (-) epigalocatechina (EGC), (-) galat de epigalocatechină (EGCG), (-) galat de epicatechină (ECG), (-) epicatechina (CE), (-) catechina (C), (-) galocatechina (GC), (-) galat de catechină (CG) și (-) galat de galocatechina (GCG) [28].

Catechinele au multe efecte benefice prin captarea radicalilor liberi și întârzierea degradării matricei extracelulare indusă de radiațiile ultraviolete și de poluare [29]. Catechinele au o acțiune directă de protecție asupra pielii prin activarea sintezei de colagen și inhibarea producției de enzime metaloproteinaze [30]. Datorită hidroxilului din grupul galat, EGCG și ECG sunt captatori de radicali liberi foarte eficienți în comparație cu mulți alți antioxidanți standard, cum ar fi acidul ascorbic, tocoferolul și troloxul [31], [32], [33]. Datorită acestor acțiuni utile, catechinele provenite din ceai sunt din ce în ce mai utilizate în produse medicale, farmaceutice și cosmetice și sunt studiate activ într-o varietate mare de abordări.

I.4.3. Acidul rozmarinic

Acidul rozmarinic a fost izolat pentru prima dată de Scarpati și Oriente în 1958 [34] și se găsește în compoziția unor plante medicinale din familia *Laminaceae*, printre care: rozmarinul (*Rosmarinus officinalis*), menta (*Mentha spicata*), salvia (*Salvia officinalis*), roinița (*Melissa officinalis*), șovârful (*Origanum vulgare*) și cimbrul (*Thymus*) [35], [36], [37].

Din punct de vedere chimic este un ester al acidului cafeic și al acidului 3,4-dihidroxifenil lactic [38], conținând în structura sa două fragmente catecol, având, prin urmare, două perechi

de grupări orto-hidroxil grefate pe două cicluri aromatice [39], ușor de oxidat, responsabile de electroactivitatea acestui compus [40].

Acidul rozmarinic are o valoare medicinală remarcabilă pentru organismul uman, prin acțiunile sale antioxidante [41], antiinflamatorii [42], antitumorale [43], imunomodulatoare [44], dar și antimicrobiene [45]. Totodată, compusul atenuează receptorii limfocitelor T, cu efect asupra limitării afecțiunilor alergice de tipul conjunctivitei, rinitei sau astmului alergic, dar este și un protector împotriva neurotoxicității, putând întârzia evoluția bolii Alzheimer [46].

I.4.4. Verbascozida

Verbascozida, un derivat al acidului hidroxicinamic, se găsește din abundență în uleiul de măsline, reprezentând unul dintre cei mai puternici antioxidanți din compoziția acestui produs, activitatea sa antioxidantă unică datorându-se efectului sinergic a combinației dintre cei doi constituenți difenolici, și anume acidul cafeic și hidroxitirosolul [47].

Mai concentrată în fructul măslinului, dar prezentă și în frunze, verbascozida are o activitate importantă de captare a radicalilor liberi și prin urmare are un impact direct asupra sănătății pielii, prevenind deteriorarea oxidativă asociată cu formarea ridurilor, subțierea pielii sau deshidratarea [48].

CAPITOLUL II. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE PRIN METODE FIZICO – CHIMICE

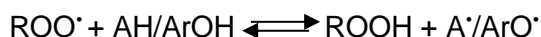
Tehnicile și instrumentele utilizate pentru măsurarea activității antioxidante au avansat remarcabil în ultimele decenii. Primele metode realizate măsoară eficacitatea antioxidanților împotriva formării anumitor specii chimice produse la oxidare și, prin urmare, se bazează pe măsurarea oxidării lipidelor [49]. Până în prezent, diverse teste chimice cuplate cu tehnologii de detectare extrem de sensibile și automatizate sunt utilizate pentru evaluarea activității antioxidante prin mecanisme speciale, de exemplu, activitatea de neutralizare a anumitor tipuri de radicali liberi sau ROS și chelarea metalelor, printre altele [50]. Substraturile de oxidare sau probele țintă au fost, de asemenea, extinse de la sistemele de modele alimentare la compuși chimici, materiale biologice, linii celulare și chiar țesuturi vii [51].

Metodele de evaluare a activității antioxidante se împart în trei categorii distincte, și anume metodele spectrofotometrice, teste electrochimice și cromatografice.

În funcție de reacțiile chimice implicate, metodele spectrometrice se încadrează în două categorii: teste de reacție bazate pe transfer de hidrogen (HAT) și teste bazate pe reacție cu un singur transfer de electroni (SET). Antioxidanții pot neutraliza radicalii sau alte ROS (de exemplu, peroxid de hidrogen și peroxizi lipidici) prin HAT și SET care să conducă la aceleași rezultate finale, indiferent de mecanismul implicat, deși cinetica și reacțiile secundare pot varia [5]. Reacțiile SET și HAT cuplate cu protoni pot apărea, de asemenea, în paralel, iar în acest caz mecanismul dominant într-un anumit sistem depinde de structura și proprietățile antioxidante, solubilitatea și coeficientul de partiție, precum și de sistemul de solvenți [52].

II.1. Teste HAT

Testele pe bază de transfer al atomului de hidrogen măsoară capacitatea unui antioxidant de a neutraliza radicalii liberi prin donarea unui atom de hidrogen. Mecanismele HAT de acțiune antioxidantă pot fi demonstrate în următoarea reacție în care atomul de hidrogen (H) al unui fenol (ArOH) este transferat la un radical peroxil:

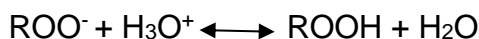


unde radicalul ariloxil (ArO^\bullet) format din reacția fenolului (ArOH , un antioxidant) cu un radical peroxil este stabilizat prin rezonanță. AH sunt biomoleculele protejate. Un antioxidant fenolic eficient trebuie să reacționeze mai repede decât biomoleculele (moleculă protejată) cu radicalii liberi pentru a avea un efect protector împotriva oxidării acestora din urmă [51].

Exemple tipice de teste bazate pe HAT includ testele ORAC, HORAC, TRAP și TOSC.

II.2. Teste SET

Testele SET detectează capacitatea unui antioxidant de a transfera un electron pentru a reduce ionii metalici, compușii carbonilici, precum și radicalii liberi [53]. Mecanismele SET de acțiune antioxidantă pot fi rezumate prin următoarele reacții:



Testele spectroscopice SET, ce includ testul Folin-Ciocalteu, testul FRAP și testul CUPRAC, măsoară capacitatea unui antioxidant de a reduce un oxidant, ce își schimbă culoarea atunci când este redus. Gradul de schimbare a culorii este corelat cu concentrația capacității antioxidante totale. În plus, metodele electrochimice și nanotehnologice aparțin, de asemenea, testelor bazate pe SET [54].

II.3. Teste mixte (HAT/SET)

Aceste teste mixte se bazează, în general, pe eliminarea unui cromofor radical stabil (cum ar fi ABTS și DPPH), în care mecanismele de transfer de electroni HAT, SET și cuplate cu protoni (PCET) pot juca roluri diferite, în proporții variate, în funcție de condițiile de reacție corespunzătoare (cum ar fi pH-ul și solventul) [55]. Testele mixte (HAT/SET) includ în principal testul ABTS/TEAC (capacitatea antioxidantă echivalentă trolox), testul de neutralizare radicală DPPH și testul de neutralizare radicală DMPD.

CAPITOLUL III. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE UTILIZÂND SENZORI ȘI BIOSENZORI ELECTROCHIMICI

În ultimii ani, o atenție deosebită a fost acordată analizei antioxidantilor, folosind senzori și/sau biosenzori enzimatici datorită unor avantaje pe care aceste metode le au, și anume o sensibilitate ridicată, simplitate în utilizare, ușurința de stocare, răspunsuri rapide, automatizare ușoară, portabilitate și ușurința de miniaturizare, făcându-le potrivite pentru diagnosticarea la fața locului, reducând riscul de interferență rezultată din destabilizarea compușilor [56], [57].

III.1. Senzori electrochimici pentru determinarea activității antioxidante

Senzorii electrochimici pentru analiza antioxidantilor au fost dezvoltați folosind diferite tipuri de electrozi, traductoare și receptori. În unele cazuri, au fost integrate nanomaterialele cu scopul de a obține performanțe îmbunătățite, mărind astfel sensibilitatea, stabilitatea și

selectivitatea acestora. Apariția și aplicarea nanomaterialelor ca parte integrantă a senzorilor a avut un impact vizibil asupra cercetării. Nanomaterialele sunt caracterizate de anumite proprietăți speciale termice, mecanice, optice, electrice și magnetice care depind de dimensiune și care pot fi reglate prin simpla ajustare a formei, dimensiunii și a gradului de aglomerare [58]. Aceste proprietăți în sine și efectele dimensiunii sunt esențiale, ceea ce se manifestă prin creșterea activității electrochimice în comparație cu cea a materialului brut corespunzător [59].

Metodele electrochimice au fost utilizate ținând cont de avantajele acestora legate de posibilitatea dovedirii rapide a capacității antioxidante a multor substanțe organice. Potențialele de oxidare măsurate prin CV au fost utilizate pentru a compara puterea antioxidantă a unor compuși, cum ar fi acizi fenolici, flavonoide, acizi cinamici, taninuri, utilizând în mod frecvent GCE [60].

III.2. Biosenzori enzimatici pentru determinarea activității antioxidante

Monitorizarea activității antioxidante prin intermediul biosenzorilor enzimatici, bazată pe principiul redox, are multe avantaje față de metodele chimice convenționale și este utilizată în mod obișnuit pentru screening-ul inițial al antioxidantilor. Această tehnologie nu necesită reactivi chimici sau solvenți sofisticăți și nici o pregătire specială a probelor, oferind informații extinse și reproductibile despre procesele electrodinamice și o realizare rapidă a determinărilor [61].

Biosenzorii pe bază de enzime prezintă mai multe avantaje legate de natura enzimei. Sunt foarte selectivi pentru un anumit substrat, iar pentru un număr mare de molecule de substrat reacțiile pot fi catalizate doar cu o singură moleculă de enzimă care are ca rezultat o amplificare a efectului și o creștere a sensibilității [62]. Enzimele utilizate în mod obișnuit la dezvoltarea biosenzorilor fac parte din categoria oxidoreductazelor, hidrolazelor sau liazelor. În prezent, o varietate de proteaze sunt utilizate pentru determinarea antioxidantilor și pentru evaluarea activității lor prin oxidare biochimică, urmată de reducere electrochimică [63]. Printre acestea se numără și tirozinaza [64], lacaza [65], peroxidaza [66] și alte proteaze care prezintă legare enzimatică simplă sau complexă [67]. Cuplarea electrică a oxidoreductazei și traductorul electrochimic prezintă caracteristici excelente, iar monitorizarea este efectuată prin controlul reacției enzimei în timp real [62]. Enzimele specifice pot fi utilizate eficient pentru identificarea selectivă a compușilor țintă importanți în controlul calității alimentelor. Lacaza și tirozinaza sunt cele două enzime cel mai des utilizate pentru monitorizarea antioxidantilor, în special în compușii fenolici [68].

PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE

SENZORI ȘI BIOSENZORI DEZVOLTAȚI PENTRU ANALIZA ACIDULUI CLOGENIC, CATECHINEI, ACIDULUI ROZMARINIC ȘI VERBASCOZIDEI

CAPITOLUL IV. MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Apariția unor procese degenerative este corelată, în biologia moleculară, cu existența unui surplus nociv de radicali liberi, promotori ai unor procese oxidative dăunătoare organismului. Existența în plante a unor compuși cu proprietăți antioxidante și conținut ridicat în compuși ce pot capta radicalii liberi (derivați carotenoidici, polifenolici, flavonici, antociani, acizi grași nesaturați, vitamine, enzime și co-factori) a stimulat și interesul pentru utilizarea acestora în fitoterapia profilactică și curativă.

Prin urmare, studiul antioxidantilor și implicațiile acestora în diferite domenii, de la domeniul alimentar până la medicină și farmacie este de un interes major pentru comunitatea științifică.

O dieta sănătoasă, bazată pe fructe și legume, este cea mai eficientă metodă de a obține antioxidanții de care are nevoie organismul. Situația este, însă, diferită atunci când vine vorba de suplimentele alimentare cu antioxidanți. În unele circumstanțe, formulările farmaceutice pe bază de antioxidanți pot provoca mai mult rău decât bine. Spre exemplu, la concentrații ridicate aceste produse pot fi dăunătoare prin:

- Acțiunea sub formă de pro-oxidanți, crescând în acest mod oxidarea;
- Protejarea atât a celulelor sănătoase, cât și a celulelor dăunătoare (precum celulele canceroase);
- Reducerea beneficiilor exercițiilor fizice;
- Apariția reacțiilor adverse nedorite, precum greața, vărsăturile, amețelile și durerile de cap, putându-se chiar ajunge la niveluri toxice ale acestora în organism.

Prin urmare, unul dintre scopurile acestei teze de doctorat a constatat, pe de o parte, în dezvoltarea și caracterizarea electrochimică a diferiților senzori și biosenzori obținuți prin modificare chimică, iar pe de altă parte, în stabilirea capacității lor de a detecta și de a cuantifica diferiți compuși bioactivi cu activitate antioxidantă. Aceste substanțe de interes în cadrul cercetării au provenit din diferite formulări nutraceutice și produse cosmetice achiziționate din farmacii comunitare și, de asemenea, din probe alimentare reprezentate de diferite uleiuri extravirgine de măsline. O parte dintre aceste produse au avut declarat conținutul cantitativ al substanțelor active din compoziție, însă pentru o parte nu erau specificate pe etichetă conținutul cantitativ sau concentrația, ci doar existența respectivelor substanțe ca principii active de bază a acelor formulări nutraceutice. S-a urmărit, astfel, și realizarea unei comparații a rezultatelor obținute cu dispozitivele nou-dezvoltate în laborator cu informațiile existente, oferite de producător, cu privire la conținutul de antioxidanți din produse.

Obiectivul general al acestei lucrări de doctorat a fost reprezentat de fabricarea și caracterizarea de noi senzori modificați chimic pe bază de nanomateriale de carbon, mediatori ai transferului de electroni sau peptide și biosenzori enzimatici având ca scop detecția unor compuși bioactivi cu proprietăți antioxidante din diverse formulări nutraceutice, cosmetice sau probe alimentare, utilizând ca tehnici de detecție metodele electrochimice.

Pornind de la obiectivele generale, au fost stabilite și o serie de **obiective specifice** care au fost atinse, dovadă făcând articolele publicate în reviste de specialitate cu un important factor de impact, după cum urmează:

- Dezvoltarea unui biosenzor pe baza electrozilor serigrafiați de carbon modificați cu grafen, ftalocianina de mangan și enzima tirozinază pentru detectarea acidului clorogenic din diferite formulări nutraceutice.
- Dezvoltarea unor noi biosenzori pe baza enzimei lacaza, având ca suport trei electrozi, după cum urmează: CNT/SPCE, GNP/SPCE și CNT-GNP/SPCE, aplicați pentru detectarea catechinei în diferite produse fitoterapeutice pe bază de extract de ceai verde.
- Cuantificarea acidului rozmarinic din produse cosmetice cu un nou senzor dezvoltat pe baza unei octapeptide, fixată prin intermediul unui agent de reticulare pe suprafața SPCE modificat cu un film compozit de GO.
- Evaluarea și cuantificarea conținutului de verbascoidă în diferite probe de uleiuri extravirgine de măsline, cu o pregătire minimă a probelor, utilizând un SPCE, modificat cu un film compozit de GO, pe suprafața căruia a fost imobilizată o pentapeptidă.

**CAPITOLUL V. MATERIALE ȘI METODE FOLOSITE PENTRU DEZVOLTAREA NOILOR
SENZORI ȘI BIOSENZORI PENTRU DETECȚIA COMPUȘILOR FENOLICI CU
PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE****V.1. Materiale****V.1.1. Electrozi de lucru**

În toate studiile s-au folosit SPCEs achiziționați de la Metrohm DropSens (www.dropsens.com) (Oviedo, Spain).

În primul studiu, respectiv cel ce a avut ca scop determinarea electrochimică a acidului clorogenic din produse nutraceutice utilizând senzori voltametrici, au fost folosiți SPCEs, modificați de producător cu GPH, respectiv cu GPH și GNP.

În cel de-al doilea studiu privind detecția acidului clorogenic din produse nutraceutice utilizând un biosenzor enzimatic nou dezvoltat în laborator pe baza enzimei tirozinaza, s-a utilizat un SPCE modificat de producător cu GPH. Modificarea electrodului în vederea preparării biosenzorului s-a realizat, într-o primă etapă cu o soluție de MnPc 10^{-5} M (în cloroform), iar în următoarea etapă cu o soluție de enzimă Tyr de concentrație 3,50 mg/mL în PBS 10^{-1} M (pH=7,0).

Pentru studiul comparativ privind evaluarea activității antioxidante a catechinei din produse nutraceutice printr-o metodă electrochimică și metode clasice analitice, au fost utilizați trei biosenzori obținuți în laborator prin modificarea a trei SPCEs, respectiv CNT/SPCE, GNP/SPCE și CNT-GNP/SPCE. Aceștia au fost modificați prin imobilizarea enzimei Lac urmată de reticulare cu glutaraldehidă, realizând astfel cei trei biosenzori: CNT-Lac/SPE, GNP-Lac/SPE și CNT-GNP-Lac/SPE.

În cel de-al patrulea studiu, respectiv detecția voltametrică a acidului rozmarinic din produse cosmetice cu un nou senzor electrochimic pe bază de C, GO, modificat cu o soluție de octapeptidă, în vederea obținerii noului senzor a fost utilizat ca suport SPCE/GO. Modificarea ulterioară în laborator a presupus adăugarea soluției de octapeptidă pe suprafața senzorului, urmată de reticulare, realizând astfel senzorul GO-Peptidă/SPCE.

În ultimul studiu realizat în vederea determinării cantitative și evaluării activității antioxidante a verbascozidei din uleiul de măsline prin utilizarea unui nou senzor electrochimic pe bază de C, GO, modificat cu o soluție de pentapeptidă, pentru obținerea senzorului nou dezvoltat (SPCE/GO-Pentapeptidă) s-a folosit SPCE cu un film de GO (SPCE/GO). Pe suprafața acestuia a fost adăugată soluția de pentapeptidă de concentrație de 10 mg/mL.

V.1.2. Aparatură și celule electrochimice

Pentru înregistrarea, caracterizarea și optimizarea semnalelor electrozilor au fost folosite două potențiostate, și anume potențiostatul/galvanostatul EG&G (Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN, SUA), model 263, controlat de software-ul EChem și potențiostatul/galvanostatul Biologic SP 150 (Bio-Logic Science Instruments SAS, Franța) cuplat cu un software EC-Lab Express care operează în Windows. În cazul ambelor potențiostate, celula electrochimică în care au fost imersați electrozii a avut capacitatea de 50 mL. Măsurătorile electrochimice au fost efectuate cu ajutorul unui sistem convențional conținând trei electrozi, și anume un electrod de referință Ag/AgCl/KCl_{3M} (Princeton, Applied Research), un electrod auxiliar format dintr-un fir de platină și un electrod de lucru, respectiv SPCEs.

Spectrele FT-IR au fost achiziționate cu un spectrometru Bruker ALPHA FT-IR (BrukerOptik GmbH, Ettlingen, Germania) folosind software-ul OPUS (BrukerOptik GmbH, Ettlingen, Germania) în domeniul de numere de undă situat între 4000 și 500 cm^{-1} (32 scanări, rezoluție 4 cm^{-1}), folosind ca mod de expunere al probelor metoda de reflectanță totală atenuată (ATR).

În cazul metodelor spectrofotometrice UV-Vis, absorbanțele au fost măsurate cu ajutorul unui Spectrofotometru Rayleigh UV2601 UV/Vis cu dublu fascicul (Beijing Beifen-Ruili Analytical Instrument, Beijing, China).

Pentru a analiza morfologia suprafeței biosenzorilor enzimatici, s-a utilizat un microscop electronic cu scanare (FlexSEM 1000 II Hitachi, Japonia).

Spectrele de fluorescență (de emisie) au fost înregistrate cu ajutorul unui Spectrofluorimetru FP-8350 (JASCO, Tokyo, Japonia).

Pentru analiza cromatografică a compușilor fenolici studiați din diferite produse nutraceutice, s-a utilizat aparatul U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS, controlat de software-ul Xcalibur, versiunea 4.1.

Pentru cântărirea substanțelor și pregătirea soluțiilor de analizat s-au folosit următoarele: balanța analitică Partner AS 220/C/2 (S.C. Partner Corporation SRL, București, România) (Figura V.16), pipete și micropipete, baloane cotate și cilindre gradate.

V.1.3. Soluții și reactivi

Reactivii utilizați în acest studiu au fost achiziționați de la Sigma-Aldrich (St. Louis, SUA) și folosiți fără purificări suplimentare. Pentru substanțele ce au necesitat dizolvare în apă ultrapură, aceasta a fost obținută de la sistemul Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, SUA).

În primul studiu de detecție a acidului clorogenic cu ajutorul senzorilor electrochimici, au fost necesari următorii reactivi: clorura de potasiu, ferocianura de potasiu, difosfat de sodiu și acid fosforic. În experimentele preliminare au fost folosite soluțiile de ferocianura de potasiu 10^{-3}M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ - PBS 10^{-1}M . Pentru obținerea soluției stoc de acid clorogenic 10^{-3}M , utilizată în studiile electroanalitice, s-au dizolvat cantități adecvate de acid clorogenic în soluție de PBS la $\text{pH} = 7,0$.

De asemenea, s-au utilizat următorii compuși pentru studiile de interferență, și anume acidul ferulic, acidul vanilic și acidul L-ascorbic (achiziționat de la Riedel-de-Haën, Seelze, Germania).

Totodată, s-au analizat trei suplimente alimentare: Green Coffee Extract (Rotta Natura), Green Coffee (Pro Natura), Green Coffee Fit (Pro Natura).

Pentru cel de-al doilea studiu de determinare a acidului clorogenic prin intermediul biosenzorilor, s-au folosit următorii reactivi: difosfatul de sodiu și acidul fosforic pentru prepararea soluției PBS 10^{-1}M , acid clorogenic, MnPc, tirozinaza din ciuperci (7164 U/mg).

Reactivul Folin-Ciocalteu și o soluție de carbonat de sodiu 15% au fost utilizate pentru validarea metodei electroanalitice prin metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu.

Soluția stoc DPPH 0,1 mM a fost preparată prin cântărirea a 0,0018g reactiv DPPH și dizolvarea în 50 mL etanol 96%.

Compușii utilizați pentru studiile de interferență au fost: acidul ferulic, acidul vanilic, acidul p-cumaric și acidul L-ascorbic.

Produsele nutraceutice utilizate în analiză au fost achiziționate din magazine naturiste, forma farmaceutică de prezentare pentru toate cele trei produse fiind capsula.

În studiul comparativ privind evaluarea activității antioxidante a catechinei din produse nutraceutice utilizând o metodă electrochimică nou dezvoltată și metode spectrofotometrice de analiză, s-au utilizat reactivii: acetat de sodiu, acid acetic glacial, acid clorhidric și catechina. Lacaza provenită din ciuperci (*Trametes versicolor*) a avut o concentrație de 0,78 U/mg, cu ajutorul căreia s-a obținut o soluție 2 mg/mL în ABS 10^{-1} M (pH=5.2).

Pentru determinarea activității antioxidante prin metode spectrofotometrice, s-au folosit următoarele soluții stoc: soluția DPPH 0,1 mM obținută prin cântărirea a 0,0036g reactiv DPPH, urmată de dizolvarea în 100 mL etanol 96%, soluția galvinoxil 0,1 mM preparată prin cântărirea a 0,0042g reactiv galvinoxil urmată de dizolvarea în 100 mL etanol 96% și soluția concentrată de radical cation ABTS⁺, obținută prin cântărirea a 0,0128g reactiv ABTS și 0,0033g K₂S₂O₈, ambele dizolvate ulterior în 50 mL apă ultrapură.

Pentru validarea rezultatelor obținute de către electrozii modificați, au fost selectate trei produse ce conțin substanța de interes, respectiv catechina.

Pentru cel de-al patrulea studiu, au fost necesari următorii reactivi: clorură de potasiu, ferocianură de potasiu, fericianură de potasiu, difosfat de sodiu, acid fosforic și acid rozmarinic. Octapeptida de puritate >95% a fost achiziționată de la compania ProteoGenix, Schiltigheim, Franța. Purity peptidă și timpul de retenție al acesteia au fost confirmate prin cromatografie de tip RP-HPLC pe un sistem cromatografic Dionex UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific, USA). Pentru a immobiliza peptida pe suprafața sensorului, s-a folosit o soluție obținută din peptidă de concentrație 10 mg/mL în PBS 10^{-1} M (pH=6.5).

Produsele cosmetice utilizate în analiză în vederea validării rezultatelor obținute prin metoda propusă, au fost achiziționate din magazine naturiste, forma farmaceutică de prezentare pentru toate cele trei produse fiind crema. Produsele au o compoziție diversă de principii active și excipienți, iar pe eticheta fiecăruia este precizată prezența extractului din frunze de rozmarin (*Rosmarinus officinalis*).

În ultimul studiu realizat în vederea determinării cantitative a verbascozidei din uleiul de măsline, au fost necesari următorii reactivi: fosfatul monosodic, fosfatul disodic, verbascozida pulbere de puritate analitică, pentapeptida, de puritate >95% și compușii similari structural cu verbascozida (oleuropeina, tirosol și hidroxitirosol), utilizați pentru studiile de interferență.

Pentru studiul proprietăților sensibile ale sensorului au fost analizate 10 extracte provenite de la diferite EVOO obținute prin extracție lichid-lichid [69].

V.2. Metode de caracterizare a electrozilor, a mediatorilor electroactivi și a compușilor biologic activi cu proprietăți antioxidante

V.2.1. Metode electrochimice

Tehnicile electrochimice cu potențial controlat (metode potențiostatice) au fost aplicate în analiza calitativă și cantitativă a compușilor polifenolici. Practic, potențialul electrodului antrenează reacții redox asupra speciilor de interes și curentul rezultat este, ulterior, măsurat [70]. Acest curent generat este proporțional cu concentrația unei specii electroactive. Printre tehnicile potențiostatice se numără CV, SWV și DPV, metode electrochimice experimentate în această lucrare.

V.2.1.1. Analiza prin CV

CV este o tehnică electroanalitică eficientă și versatilă, care permite investigarea mecanismului proprietăților redox și de transport ale unui sistem în soluție. În CV, potențialul

unui sistem electrochimic este modificat înainte și înapoi între două valori limită de potențial, iar răspunsul curentului se măsoară în raport cu potențialul. Voltamogramele sunt reprezentări grafice ale curentului electrodului de lucru în funcție de curentul contra-electrodului [71].

V.2.1.2. Analiza prin SWV

SWV este una dintre cele mai rapide și mai sensibile tehnici voltametrice pentru determinarea compușilor organici electroactivi datorită curentului non-faradaic foarte scăzut [72]. Limitele de detecție pot fi comparate cu cele ale tehnicilor cromatografice și spectroscopice. În plus, analiza parametrilor caracteristici ai acestei tehnici permite, de asemenea, evaluarea cineticii și a mecanismului procesului la electrozi studiat [73]. Totodată, picurile corespunzătoare oxidării sau reducerii speciilor electroactive la suprafața electrodului pot fi obținute în același experiment, iar reversibilitatea transferului de electroni poate fi examinată într-o singură scanare, curentul fiind măsurat atât în timpul impulsurilor negative, cât și în timpul celor pozitive [74].

V.2.1.3. Analiza prin DPV

DPV este o altă tehnică electrochimică utilizată pe scară largă, potrivită pentru caracterizarea comportamentului redox al antioxidanților [75]. În DPV, potențialul este scanat într-o formă de trepte, cu înălțimea și lățimea treptei fixe, dar cu un impuls suplimentar aplicat. În general, curentul este măsurat înainte și după aplicarea unui impuls [76]. Diferența dintre acești doi curenți minimizează curentul capacitiv, conducând la voltamograme cu rapoarte semnal/zgomot mai mari [77]. O altă caracteristică a DPV este rezoluția sa mai mare decât cea atinsă prin CV. Din acest motiv, DPV este adecvată atunci când este necesară o selectivitate mai mare [78].

V.2.2. Analiza prin spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS)

EIS este o tehnică utilizată în analiza proceselor electrochimice care au loc la interfața electrod/soluție electrolitică [79]. Aceasta este o metodă de identificare și determinare a parametrilor dintr-un model dezvoltat pe baza frecvenței răspunsului sistemului electrochimic studiat. În astfel de experimente, este utilizat un analizor al frecvenței răspunsului cuplat cu o interfață electrochimică, ce măsoară răspunsul curent al sistemului pe măsură ce schimbă frecvența unui semnal sinusoidal de intrare care este aplicat unei probe necunoscute [80]. Rezultatele acestei analize sunt exprimate prin intermediul unui grafic Bode sau al unui grafic Nyquist [81].

V.2.3. Analiza cromatografică de lichide de înaltă performanță (HPLC)

Cromatografia de lichide este o tehnică importantă de separare a substanțelor chimice aflate în amestec, având ca rezultat determinarea calitativă și cantitativă a componentelor din amestecul respectiv. Această metodă de separare are ca principiu distribuția variată între două faze, respectiv o fază staționară și o fază mobilă a componentelor amestecului [82].

V.2.4. Analiza spectrometrică în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)

Metoda FT-IR este o tehnică analitică non-invasivă utilizată des în biologie și medicină, deoarece permite obținerea rapidă a unei amprente biochimice a probei investigate, oferind informații despre conținutul de biomolecule [83]. Acest instrument spectroscopic este aplicat cu succes nu numai pentru studiul proprietăților structurale ale biomoleculilor izolate, cum ar

fi proteinele, acizii nucleici, lipidele și carbohidrații, ci și pentru caracterizarea sistemelor biologice complexe, de exemplu celulele intacte, țesuturi și organisme întregi [84].

V.2.5. Microscopia cu scanare electronică (SEM)

Microscopia electronică de scanare este o tehnică de analiză nedistructivă, care utilizează o sondă cu fascicul de electroni pentru a analiza detaliile suprafeței până la scara nano [85]. Microscopul cu scanare electronică produce imagini cu rezoluție ridicată, caracteristică ce le face instrumente potrivite pentru o gamă largă de aplicații în numeroase domenii ale științei, industriei și medicinei [86]. Astfel, cercetări recente ale morfologiei celulare, dezvoltării materialelor biocompatibile, cercetării în ingineria țesuturilor și microbiologiei se bazează pe tehnicile avansate de imagistică SEM [87].

CAPITOLUL VI. DETERMINAREA ELECTROCHIMICĂ A ACIDULUI CLOROGENIC DIN PRODUSE NUTRACEUTICE FOLOSIND SENZORI VOLTAMETRICI PE BAZĂ DE NANOMATERIALE DE CARBON

Scopul acestui studiu a fost de a dezvolta și caracteriza noi SPCEs modificate cu GPH și cu GNP și de a stabili capacitatea lor de determinare calitativă și cantitativă a CGA. De asemenea, metoda electroanalitică va fi validată pentru cuantificarea acestui compus bioactiv de interes în diferite produse nutraceutice folosind o metodă clasică, respectiv FT-IR.

VI.1. Studii preliminare

În prima etapă a fost studiat comportamentul celor trei electrozi, C-SPCE, GPH-SPCE și GPH-GNP-SPCE în soluție PBS 10^{-1} M la pH=7,0, intervalul optim de potențial fiind situat între -0,4 V și 1,3 V. În urma măsurătorilor nu s-au înregistrat picuri în domeniul de potențial studiat, ceea ce demonstrează puritatea înaltă a materialelor folosite în construcția electrozilor și lipsa contaminării suprafeței active. Se observă că electrodul GPH-GNP-SPCE are curenți de fond reduși, ceea ce reprezintă un avantaj al funcționalizării grafenului de pe suprafața senzorului.

VI.2. Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] 10^{-3}$ M – PBS 10^{-1} M

În următoarea etapă am analizat comportamentul electrochimic al SPCEs într-o soluție ce conține $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] 10^{-3}$ M dizolvată în PBS 10^{-1} M, pH = 7,0, folosind CV drept metodă de detecție [88]. Domeniul de potențial cuprins între -0,4 și 0,7 V a fost intervalul optim în care semnalul s-a demonstrat a fi stabil. Totodată, pentru a obține semnale stabile ale senzorilor, s-au înregistrat 5 cicluri în soluția de analizat.

Principalii parametri obținuți din voltamogramele ciclice sunt redați în tabelul VI.1.

Tabel VI.1. Parametri electrochimici obținuți din voltamogramele ciclice ale C-SPCE; GPH-SPCE; GPH-GNP-SPCE imersați în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] 10^{-3}$ M – PBS 10^{-1} M

Electrod	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	I_{pc}/I_{pa}	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E_{1/2}$ (V) (E_{pa} - E_{pc})	ΔE_p (V) (E_{pa} - E_{pc})
C-SPCE	23,88	-26,04	1,09	0,447	0,001	0,224	0,446
GPH-SPCE	36,59	-40,51	1,10	0,286	0,159	0,222	0,127
GPH-GNP- SPCE	81,42	-87,27	1,07	0,298	0,109	0,203	0,189

Curenții cei mai înalți au fost obținuți pentru GPH-GNP-SPCE, având valoare apropiată cu cei obținuți pentru GPH-SPCE, însă puțin diferită de cea obținută în cazul C-SPCE. Ținând cont de aceste rezultate, cea mai mare sensibilitate pentru detectarea ionului ferocianură a fost obținută în cazul GPH-GNP-SPCE (valorile pentru I_{pa} și I_{pc} sunt cele mai mari).

VI.3. Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluție de CGA 10^{-3} M

Comportamentul electrochimic al senzorilor în soluție de CGA 10^{-3} M s-a studiat prin intermediul CV, utilizând soluția PBS 10^{-1} M drept electrolit suport.

Pentru a obține un răspuns stabil al senzorului, au fost efectuate cinci cicluri în domeniul de potențial optimizat, cuprins între -0,4 V și 0,7 V. Voltamogramele ciclice prezentate în figura VI.1 sunt obținute după stabilizarea semnalelor.

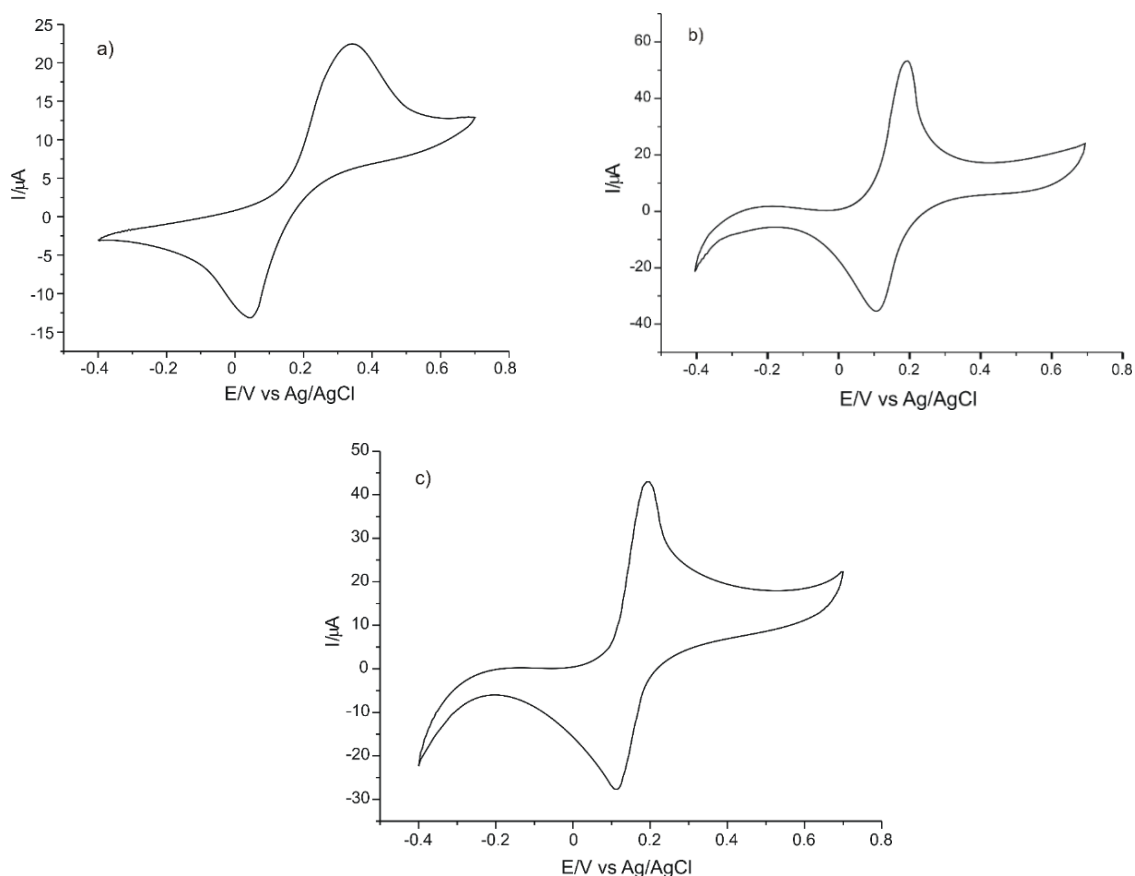


Figura VI.1. Voltamogramele ciclice ale: a) C-SPCE; b) GPH-SPCE; c) GPH-GNP-SPCE imersați în soluție de CGA 10^{-3} M (electrolit suport: PBS 10^{-1} M, pH=7,0). Viteza de scanare $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

În toate cele trei voltamograme se observă apariția unui pic anodic corespunzător procesului de oxidare, respective a unui catodic, corespunzător procesului de reducere. Deoarece CGA conține o fracțiune 1,2 – dihidroxibenzen, prin oxidarea acestui compus se formează o-chinona respectivă, eliberându-se doi electroni și doi protoni [89].

În tabelul VI.2 sunt redați parametrii cei mai importanți obținuți din voltamogramele ciclice sau calculați în funcție de parametrii experimentali.

Tabel VI.2. Valorile parametrilor obținuți din voltamogramele ciclice a celor trei electrozi imersați în soluție de CGA $10^{-3}M$ (electrolitul suport a fost PBS pH=7,0)

Senzor	Epa(V)	Ipa(μA)	Epc(V)	Ipc(μA)	Ipc/Ipa	ΔE_p (V)
C-SPCE	0,279	21,08	0,042	-13,17	0,62	0,237
GPH-SPCE	0,197	53,50	0,114	-36,69	0,68	0,083
GPH-GNP-SPCE	0,189	43,23	0,113	-28,01	0,65	0,076

Toți cei trei electrozii studiați au prezentat două picuri clare și bine-definite și un comportament cvasi-reversibil, așa cum reiese din valoare ΔE_p (V) și din raportul Ipc/Ipa.

VI.4. Curba de calibrare și determinarea limitei de detecție

S-au înregistrat voltamogramele ciclice pentru diferite concentrații ale soluției de CGA, utilizând, pe rând, C-SPCE, GPH-SPCE și GPH-GNP-SPCE. Curbele de calibrare realizate au fost realizate în intervalul de concentrație 0,1-1,20 μM . Ca electrolit suport s-a fost soluția PBS $10^{-1}M$ (pH = 7,0), iar soluția stoc de CGA a fost de concentrație $10^{-3}M$. Viteza de scanare a fost în fiecare caz, 0,1 Vs^{-1} și domeniul de potențial a fost situat între -0,4 V și 0,7 V.

Variația răspunsului senzorului GPH-GNP-SPCE în funcție de concentrația soluției de CGA analizată este prezentată în figura VI.2a.

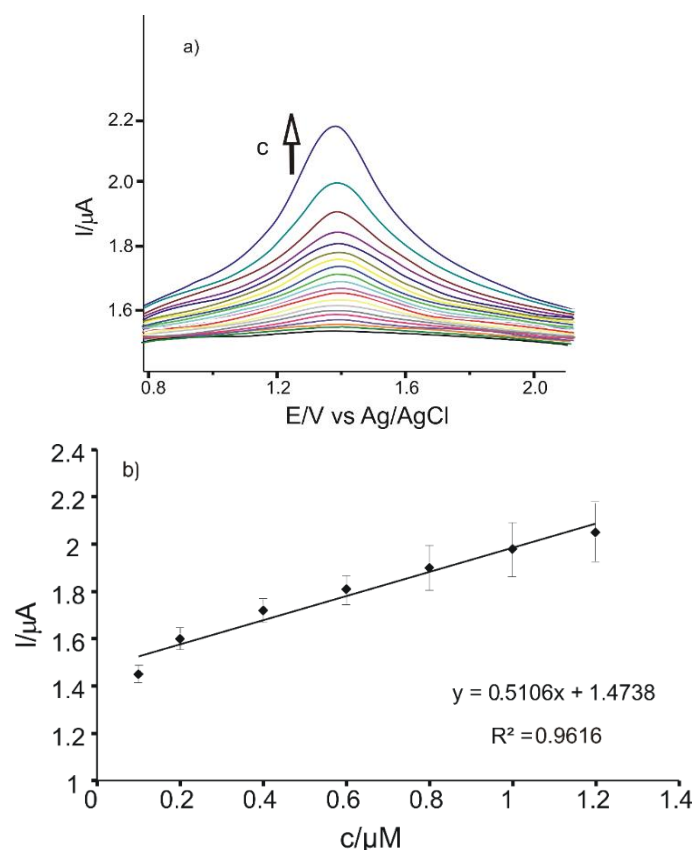


Figura VI.2. a) Vedere mărită a zonei picurilor anodice a voltamogramelor ciclice înregistrate cu GPH-GNP-SCPE imersat în soluții de CGA cu diferite concentrații, cuprinse între 0,1–1,20 μM ; b) Ajustarea liniară în intervalul 0,1-1,20 μM pentru GPH-GNP-SCPE.

În tabelul VI.3 sunt redată rezultatele obținute pentru LOD și LOQ calculate pentru cei trei senzori utilizați în studiul de față.

Tabel VI.3. Valorile LOD și LOQ ale CGA pentru cei trei senzori

Senzor	LOD (M)	LOQ (M)
C-SPCE	$6,50 \times 10^{-7}$	$2,16 \times 10^{-6}$
GPH-SPCE	$0,73 \times 10^{-7}$	$2,45 \times 10^{-6}$
GPH-GNP-SPCE	$0,62 \times 10^{-7}$	$1,94 \times 10^{-7}$

Cea mai mică limită de detecție a fost obținută în cazul GPH-GNP-SPCE. Prin urmare, sensibilitatea senzorilor crește în ordinea: GPH-GNP-SPCE > GPH-SPCE > C-SPCE.

VI.5. Determinarea cantitativă a CGA în produse nutraceutice

Pentru a valida senzorul în analiza CGA din probe reale, au fost selectate trei suplimente alimentare, și anume: Green Coffee Extract (Rotta Natura), Green Coffee (Pro Natura), Green Coffee Fit (Pro Natura). Aceste produse au fost analizate utilizând două metode: CV (metoda descrisă în acest studiu) și FT-IR (metoda standard) [90]. Prin urmare, scopul acestei analize este de a compara rezultatele obținute prin cele două metode.

În tabelul VI.4 sunt prezentate rezultatele exprimate procentual.

Tabel VI.4 Conținutul de CGA determinat în trei produse nutraceutice prin metoda voltametrică și metoda spectrofotometrică.

Produs nutraceutic	Metoda voltametrică	Metoda spectrofotometrică
	c% CGA	c% CGA
Green Coffee Extract (Rotta Natura)	4,43	4,83
Green Coffee (Pro Natura)	4,38	4,62
Green Coffee Fit (Pro Natura)	5,86	6,43

Următoarea etapă a presupus aplicarea unei alte metode de determinare a conținutului polifenolic, respective UHPLC-MS/MS cu ionizare ESI, un spectrometru de masă de înaltă rezoluție Q Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap (ThermoFisher Scientific) echipat cu HESI, cuplat la un cromatograf de lichide de înaltă performanță UltiMate 3000 UHPLC (ThermoFisher Scientific). Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană Kinetex® C18 (100 × 2,1 mm, diametrul particulelor de 1,7 μm), la o temperatură de 30 °C. Un exemplu de cromatogramă obținută cu sistemul cromatograf într-o probă reală este ilustrat în figura VI.3.

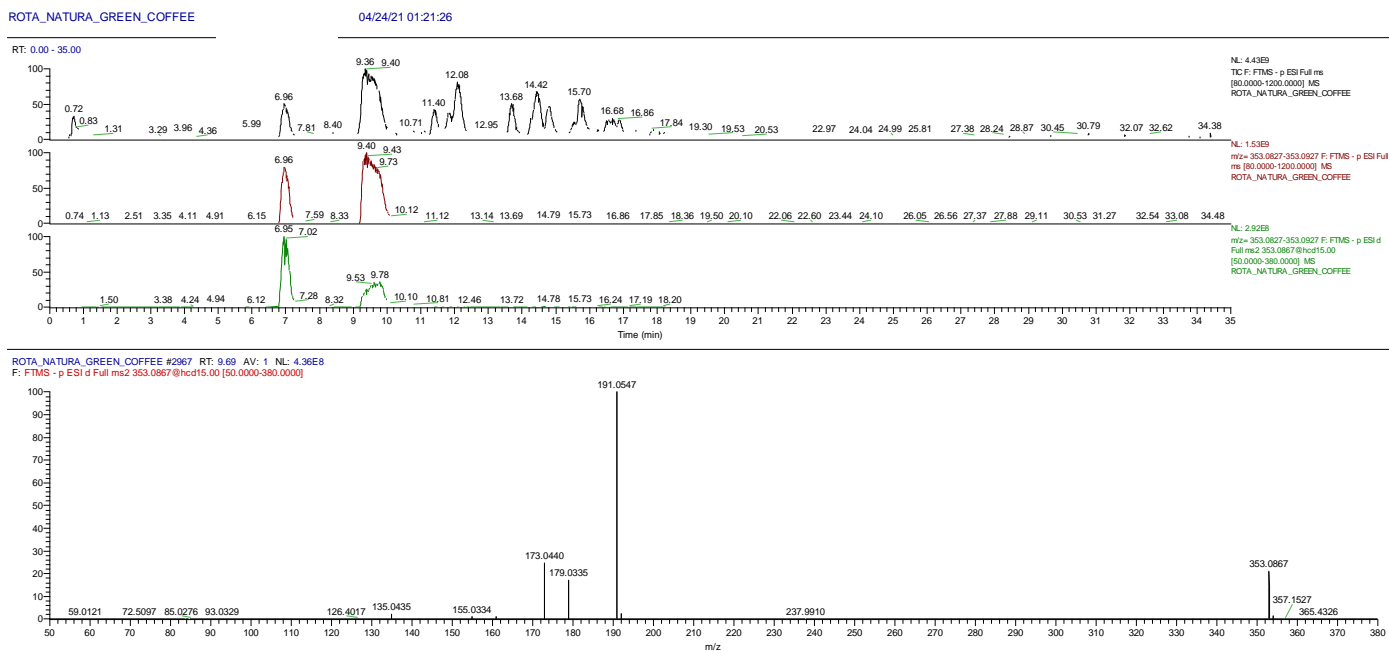


Figura VI.3. Analiza cromatografică a CGA din produsul Green Coffee Extract (Rotta Natura)

Din datele obținute s-a calculat concentrația procentuală de acid clorogenic pe capsulă, pentru fiecare produs farmaceutic studiat, rezultatele ce sunt prezentate în tabelul VI.5.

Tabel VI.5. Conținutul de acid clorogenic determinat în probele analizate prin metoda HPLC

Produs nutraceutic	Metoda HPLC c% CGA
Green Coffee Extract (Rotta Natura)	4,18
Green Coffee (Pro Natura)	3,96
Green Coffee Fit (Pro Natura)	5,96

Din tabelul VI.10 se poate observa că valorile obținute prin metoda cromatografică sunt apropiate de cele obținute prin metodele CV și FT-IR (conform tabelului VI.4), ceea ce dovedește încă o dată, precizia și sensibilitatea senzorului GPH-GNP-SPCE, dar și fezabilitatea metodei voltametrice.

VI.7. Concluzii

Dintre cei trei electrozi, GPH-GNP-SPCE s-a dovedit a avea o sensibilitate foarte bună și o limită de detecție foarte scăzută pentru detectarea CGA, metoda analitică putând fi aplicată cu succes pentru determinarea CGA din probe reale, respectiv din diferite produse nutraceutice. Rezultatele obținute cu GPH-GNP-SPCE sunt foarte apropiate de cele obținute prin metoda standard de analiză la un nivel de încredere de 99%.

CAPITOLUL VII. DEZVOLTAREA UNUI NOU BIOSENZOR ENZIMATIC PE BAZĂ DE GRAFEN, FTALOCIANINĂ DE MANGAN ȘI TIROZINAZĂ, CU APLICABILITATE ÎN EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A ACIDULUI CLOROGENIC DIN PRODUSE NUTRACEUTICE

Obiectivul acestei lucrări este de a evalua comportamentul electrochimic al unui biosenzor nou pe bază de grafen, ftalocianină de mangan și tirozinază (GPH-MnPc-Tyr/SPCE) la detectarea CGA prin intermediul diferitelor tehnici voltametrice. Totodată, metoda electroanalitică utilizată pentru cuantificarea CGA în trei produse nutraceutice diferite va fi validată prin intermediul metodei Folin-Ciocalteu. De asemenea, în acest studiu s-a urmărit determinarea capacității de reducere a radicalului DPPH în cazul celor trei produse nutraceutice analizate.

VII.1. Prepararea biosenzorului

VII.1.1. Tirozinaza – noțiuni generale

Utilizarea enzimei tirozinază cu scopul dezvoltării de biosenzori enzimatici este de mare interes în domeniul cercetării medicale, dar și în ceea ce privește biotehnologia industrială, dată fiind posibilitatea combinării unor materiale la dimensiuni micrometrice sau nanometrice cu anumite biomolecule.

VII.1.2. Fabricarea biosenzorului enzimatic prin imobilizarea enzimei tirozinaza

VII.1.2.1. Prepararea senzorului GPH-MnPc/SPCE

Pentru prepararea senzorului GPH-MnPc/SPCE au fost parcurse mai multe etape. Inițial, s-a adăugat, prin tehnica *drop-and-dry*, secvențial, cu pauze de uscare, un volum de 10 μL soluție 10^{-5} M de ftalocianină de mangan, dizolvată în cloroform, pe suprafața GPH/SPCE. Uscarea s-a realizat la temperatura camerei, timp de 30 minute.

VII.1.2.2. Prepararea biosenzorului GPH-MnPc-Tyr/SPCE

Pentru prepararea biosenzorului, s-a folosit ca suport GPH-MnPc/SPCE. Utilizând tehnica *drop-and-dry*, a fost adăugat un volum de 10 μL , secvențial, în doua etape (câte 5 μL în fiecare etapă), cu o pauză pentru uscare de 3 ore între cele două adăugări. Reticularea enzimei s-a realizat prin menținerea senzorului deasupra unui recipient cu 5 mL glutaraldehidă 2%, timp de 1 minut.

VII.2. Caracterizarea noului biosenzor enzimatic

Morfologia suprafeței biosenzorului GPH-MnPc-Tyr/SPCE a fost caracterizată prin intermediul SEM. Astfel, figura VII.1 prezintă o imagine obținută prin intermediul SEM a morfologiei suprafeței nanofilului compozit care conține grafen, ftalocianină de mangan și tirozinază, unde nanofoile de grafen și alte componente sunt bine evidențiate.

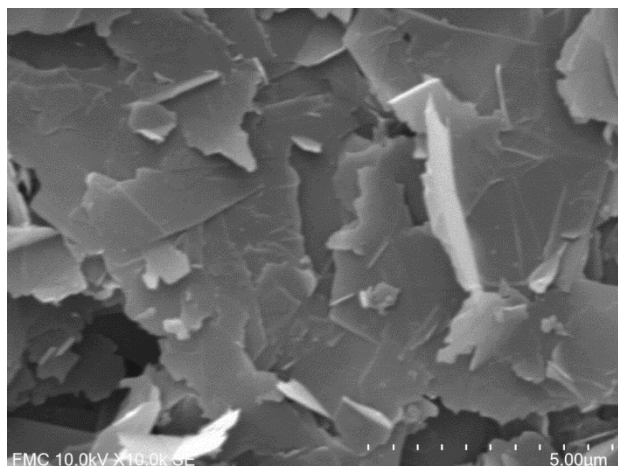


Figura VII.1. Imagine SEM a suprafeței GPH-MnPc-Tyr/SPCE

VII.3. Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluție de CGA

Determinarea calitativă și apoi cantitativă a CGA s-a realizat prin CV și prin SWV, aceste metode fiind utile pentru interpretarea proceselor ce au loc la suprafața electrozilor. Pentru această etapă a studiului s-au folosit electrozii GPH-MnPc/SPCE și GPH-MnPc-Tyr/SPCE. Viteza de scanare folosită a fost $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

În Figura VII.2 se prezintă răspunsurile stabile ale electrozilor de lucru modificat, în fiecare etapă, într-o soluție de CGA 10^{-3} M - PBS 10^{-1} M (pH= 7,0). Pentru a obține un răspuns stabil a necesitat înregistrarea de trei cicluri în domeniul de potențial optimizat, cuprins între -0,4 V și 0,7 V.

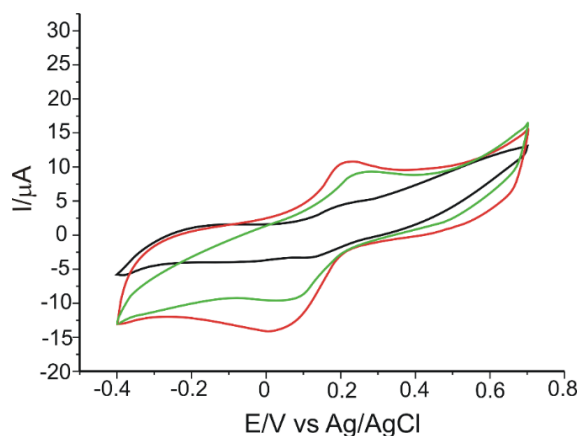


Figura VII.2. Voltamogramele ciclice ale GPH-MnPc/SPCE (linia neagră), GPH-Tyr/SPCE (linia verde) și GPH-MnPc-Tyr/SPCE (linia roșie) imersați în soluție de CGA 10^{-3} M - PBS 10^{-1} M (pH=7,0). Viteza de scanare: $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

În toate cele trei voltamograme se evidențiază câte un pic anodic și unul catodic, de intensități și potențiale diferite, corespunzătoare oxidării, respectiv reducerii CGA. În cazul GPH-MnPc-Tyr/SPE picurile sunt cele mai intense și apar la valori ale potențialului mai mici comparativ cu biosenzorul GPH-Tyr/SPE, care nu are mediator în stratul sensibil. Deci, mediatorul folosit, MnPc, facilitează schimbul de electroni și are efect electrocatalitic pozitiv accelerând oxidarea și reducerea CGA.

Comportamentul electrochimic al CGA este similar pentru cei trei electrozi folosiți, iar parametrii electrochimici obținuți sunt prezentați în tabelul VII.1.

Tabelul VII.1. Valorile parametrilor obținuți din voltamogramele ciclice ale celor trei electrozi imersați în soluție de CGA 10^{-3} M (electrolitul suport a fost PBS 10^{-1} , pH=7,0)

Senzor	Epa (V)	Ipa (μ A)	Epc (V)	Ipc (μ A)	Ipc/Ipa	ΔE (V)
GPH-MnPc/SPCE	0,190	4,30	0,117	-3,22	0,74	0,073
GPH-Tyr/SPCE	0,283	7,65	0,095	-10,20	1,33	0,188
GPH-MnPc-Tyr/SPCE	0,214	10,81	0,017	-14,14	1,30	0,197

Cei doi electrozi, GPH-MnPc/SPCE și GPH-MnPc-Tyr/SPCE au fost utilizați pentru înregistrarea voltamogramelor de undă pătrată în soluția de CGA 10^{-3} M (electrolit PBS 10^{-1} M pH=7,0). Domeniul de potențial studiat a fost situat între -0,4 și +0,7 V, înălțimea impulsului, 0,10 V, o creșterea potențialului impulsului de 7 mV și o frecvență de 15 Hz. Prin intermediul acestei metode s-au obținut rezultate similare cu cele obținute prin CV. Pentru ambii electrozi s-a evidențiat câte un pic de reducere, curentul de fond mai redus și picurile mai bine definite. Voltamogramele de undă pătrată sunt prezentate în figura VII.3.

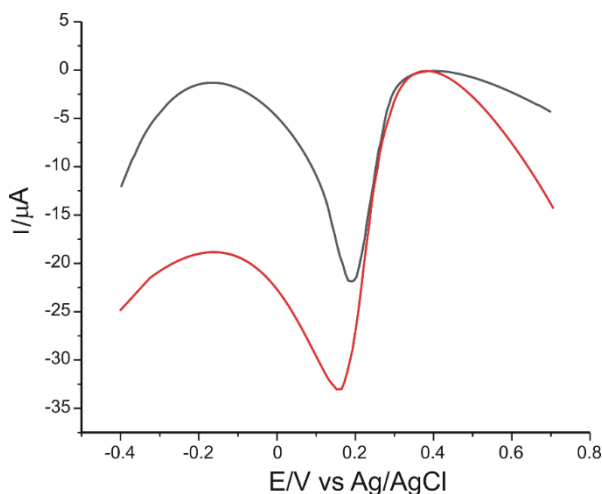


Figura VII.3. Voltamogramele de undă pătrată obținute pentru GPH-MnPc/SPCE (linia neagră) și pentru GPH-MnPc-Tyr/SPCE (linia roșie) prin imersare într-o soluție de CGA 10^{-3} M (electrolit suport: PBS 10^{-1} M, pH = 7,0). Domeniul de potențial -0,4 și + 0,7 V, înălțimea impulsului 0,10 V, o creștere a potențialului impulsului de 7 mV la o frecvență de 15 Hz.

VII.4. Influența vitezei de scanare asupra răspunsului voltametric

Următoarea etapă a constat în studiul comportamentului electrochimic al celor doi electrozi în soluție de CGA 10^{-3} M (electrolitul suport a fost PBS 10^{-1} M la pH 7,0), aplicând viteze de scanare între 0,1-1,0 V \times s $^{-1}$.

În figura VII.4 sunt prezentate voltamogramele ciclice ale celor doi electrozi modificați, înregistrate cu diferite viteze de scanare.

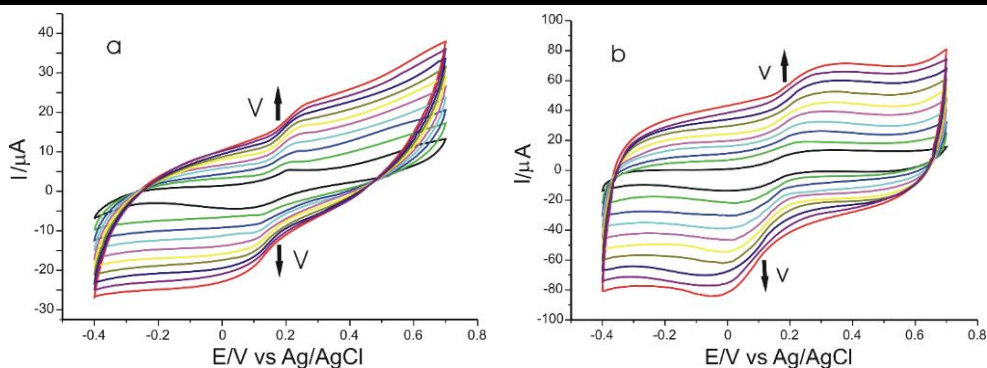


Figura VII.4. Voltamogramele ciclice ale a) GPH-MnPc/SCPE și b) GPH-MnPc-Tyr/SPCE înregistrate la diferite viteze de scanare, între 0,1 și 1,0 $V \times s^{-1}$.

În figura VII.5. sunt reprezentate dependențele liniare dintre curenții picului catodic și vitezele de scanare, în cazul celor doi electrozi modificați.

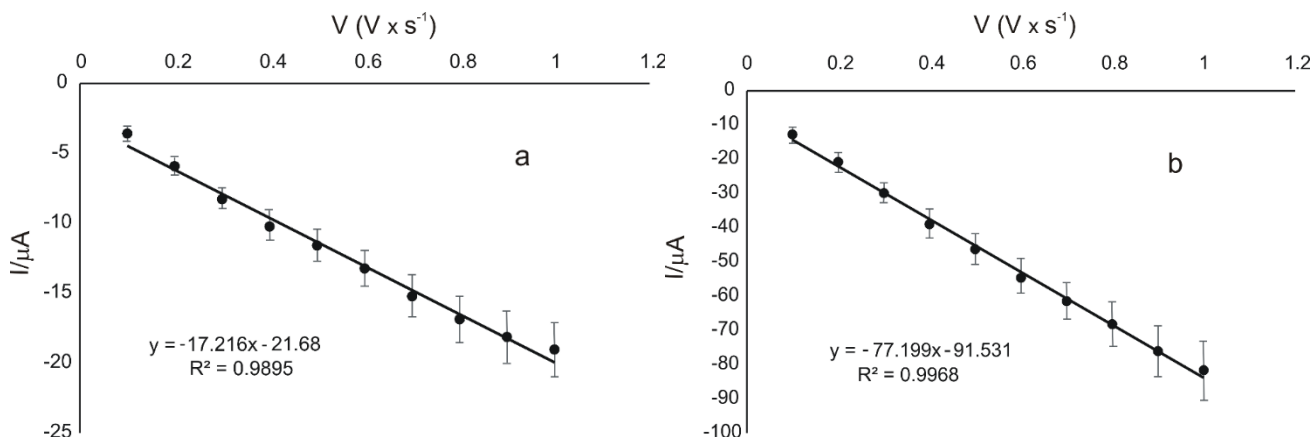


Figura VII.5. Dependența liniară între I_{pc} și viteza de scanare în cazul a) GPH-MnPc/SPCE și b) GPH-MnPc-Tyr/SPCE.

Gradul de acoperire a suprafeței electrozilor cu specia electroactivă (Γ) a fost calculat utilizând ecuația dependenței dintre intensitatea picului catodic și viteza de scanare conform ecuației Laviron [91]. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul VII.2.

Tabel VII.2. Ecuația liniară a dreptei (I_{pc} vs. v), R^2 și Γ

Electrod	Ecuația dreptei	R^2	Γ ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$)
GPH-MnPc/SPE	$I_{pc} = 17,216 \times 10^{-5} v$ ($V \times s^{-1}$) $- 21,68 \times 10^{-5}$	0,9895	$3,34 \times 10^{-11}$
GPH-MnPc-Tyr/SPE	$I_{pc} = 77,199 \times 10^{-5} v$ ($V \times s^{-1}$) $- 91,53 \times 10^{-5}$	0,9968	$1,50 \times 10^{-10}$

Valorile Γ obținute pentru CGA cu cei doi electrozi modificați sunt comparabile cu cele obținute pentru alți biosenzori pe bază de Tyr folosiți pentru detecția compușilor fenolici, raportați în literatura de specialitate [64], [92], [93], [94].

VII.5. Curba de calibrare și limita de detecție

Pentru a obține curba de calibrare, s-au înregistrat voltamogramele ciclice ale CGA, la adăugarea succesivă a unor cantități variabile, între 5 μL și 1000 μL , de soluție stoc de CGA

10^{-3} M în 50 mL PBS 10^{-1} la pH 7,0. Fiecare etapă de adăugare de volume a fost urmată de agitare. După omogenizarea soluției de analizat s-au înregistrat voltamogramele ciclice. Domeniul de concentrație studiat a fost $0,1 \mu\text{M} - 10,48 \mu\text{M}$.

În tabelul VII.3 sunt redate rezultatele obținute pentru LOD și LOQ calculate pentru biosenzorul GPH-MnPc-Tyr/SPE utilizat în studiul de față.

Tabel VII.3. Ecuația dependenței liniare între I_{pc} și c , R^2 , LOD și LOQ pentru GPH-MnPc-Tyr/SPCE

Electrod	Ecuația liniară	R^2	LOD (M)	LOQ (M)
GPH-MnPc-Tyr/SPCE	$I_{pc} = -0,0692c - 9,3141$	0,9688	$1,40 \times 10^{-6}$	$4,69 \times 10^{-6}$

Datorită prezenței Tyr, ce favorizează interacțiunea cu CGA și îi conferă biosenzorului selectivitate și sensibilitate, acesta prezintă performanțe superioare senzorului.

VII.6. Determinarea calitativă și cantitativă a CGA în produse nutraceutice

Au fost selectate trei produse farmaceutice din categoria suplimentelor alimentare, și anume Green Coffee Bean 400mg Jarrow Formulas, Green Coffee Bean Complex (Adams Vision) și Green Coffee (Biotech USA) și analizate calitativ prin metoda spectrometrică FT-IR (metoda standard) [90]. Spectrele FT-IR corespunzătoare produselor comerciale se regăsesc în figura VII.6.

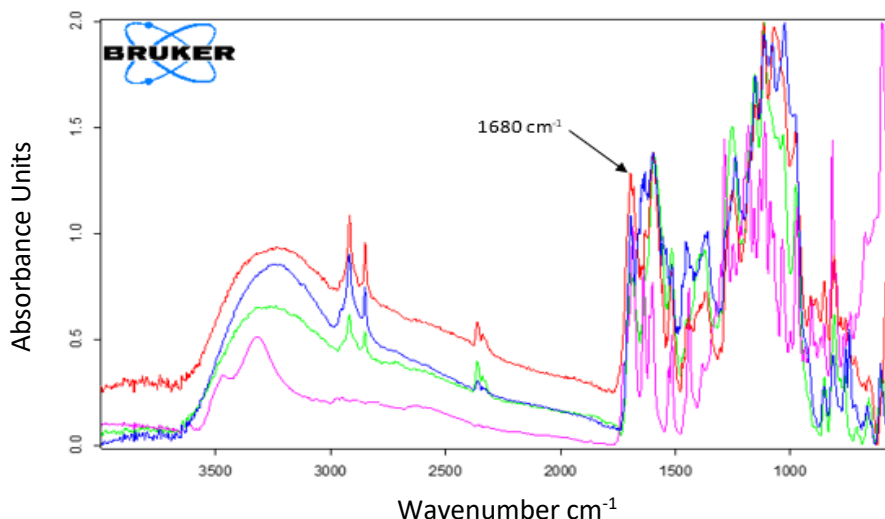


Figura VII.6. Spectrele FT-IR ale: Green Coffee Biotech USA (linia roșie), Green Coffee Bean Complex Adams Vision (linia albastră), Green Coffee Bean 400mg Jarrow Formulas (linia verde), CGA pur (linia roz)

Pentru analiza cantitativă a celor trei produse nutraceutice au fost utilizate două metode: CV (metoda realizată în acest studiu) și metoda Folin-Ciocalteu.

În cazul CV, măsurătorile s-au înregistrat în domeniul de potențial situat între -0,4 V și 0,7 V. Cinetica proceselor redox s-a realizat prin înregistrarea voltamogramelor ciclice cu viteze de scanare de $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, utilizându-se 3 cantități diferite din fiecare produs în parte: 0,0050g, 0,0070g și 0,0090g.

În cele trei voltamograme se constată apariția unui pic anodic și a unui pic catodic la aproximativ aceleași potențiale ca și în cazul soluției standard de CGA. Prin urmare, GPH-

MnPc-Tyr/SPCE are o selectivitate și o sensibilitate bună pentru detectarea CGA în produse farmaceutice, respectiv nutraceutice.

Rezultatele, exprimate sub forma de concentrație procentuală, sunt prezentate în tabelul VII.4.

Tabel VII.4. Concentrațiile de CGA din produsele nutraceutice obținute prin metoda voltametrică, respectiv metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu

Produs nutraceutic	Metoda voltametrică c% CGA	Metoda spectrofotometrică c% CGA
Green Coffee Bean Complex (Adams Vision)	83,72	87,39
Green Coffee (Biotech USA)	79,77	80,21
Green Coffee Bean 400mg Jarrow Formulas	79,72	80,11

VII.7. Stabilitatea, reproductibilitatea și repetabilitatea biosenzorului

Stabilitatea biosenzorului GPH-MnPc-Tyr/SPCE a fost evaluată prin efectuarea unui număr de 30 de măsurători, la intervale regulate (1 zi), timp de 1 lună, folosind o soluție de CGA 10^{-3} M, prin intermediul CV. În această perioadă senzorul a fost depozitat în frigider, la 4°C . Rezultatele obținute nu au evidențiat diferențe importante între curenții catodici înregistrați în zile diferite, coeficienții de variație fiind mai mici de 5%, confirmându-se astfel ca biosenzorul este stabil și poate fi utilizat în electroanaliză.

Pentru a verifica reproductibilitatea metodei de fabricare, am studiat răspunsul a trei biosenzori preparați identic, în soluții de CGA 10^{-3} M. Nu s-au observat diferențe mai mari de 2% între valorile curentului catodic măsurat pentru cei trei biosenzori.

Testele pentru studiul repetabilității au fost realizate într-o soluție $50 \mu\text{M}$ CGA - 10^{-1} M PBS. Valoarea coeficientului de variație pentru picul catodic determinat în cele 7 determinări consecutive în aceeași soluție nu a depășit valoarea de 3%. Între măsurători, GPH-MnPc-Tyr/SPCE a fost clătit cu soluție PBS 10^{-1}M de $\text{pH}=7,0$. Prin urmare, biosenzorul se poate utiliza în mod repetat pentru determinarea CGA.

VII.8. Studii de interferență

În condiții experimentale optime, a fost evaluat efectul unor posibili interferenți cum sunt acidul L-ascorbic, acidul vanilic, acidul ferulic și acidul p-cumaric asupra cuantificării CGA. Metoda de detecție utilizată a fost CV. A fost determinat semnalului biosenzorului în absența și în prezența interferentului și s-a calculat răspunsul relativ procentual. Rezultatele obținute arată că picul catodic datorat CGA nu se modifică semnificativ în prezența interferenților. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul VII.5.

Tabel VII.5. Interferența unor compuși chimici asupra determinării cantitative a CGA 10^{-5}M

Interferent	Concentrație interferent	Raport concentrație CGA:interferent	Recuperare%	RSD %
-	-	-	100	0,50
Acid L-ascorbic	10^{-5} M	1:1	97,45	1,82
Acid vanilic	10^{-5} M	1:1	99,5	0,60
Acid ferulic	10^{-5} M	1:1	97,24	1,97
Acid p-cumaric	10^{-5} M	1:1	96,81	2,28

Ținând cont de aceste rezultate se poate concluziona că biosenzorul GPH-MnPc-Tyr/SCPE are o selectivitate și o precizie corespunzătoare pentru determinarea CGA din probe reale.

VII.9. Determinarea activității antioxidante a CGA prin metoda DPPH

Capacitatea de reducere procentuală a radicalului DPPH s-a calculat conform următoarei ecuații [95]:

$$\% \text{ Reducere DPPH} = 100 \times (AD - AE / AD)$$

Unde: AE este absorbanta soluției atunci când produsul nutraceutic a fost adăugat și AD este absorbanta soluției martor de DPPH.

Valorile procentuale de reducere a DPPH au fost normalizate per tabletă pentru toate cele trei probe farmaceutice. Toate determinările au fost realizate în triplicat, rezultatele fiind raportate ca medie. S-a observat că reducerea DPPH a fost dependentă de concentrația CGA din probe. Rezultatele obținute pentru capacitatea de reducere a radicalului, exprimată procentual, sunt redată în tabelul VII.6.

Tabel VII.6. Determinarea activității antioxidante a CGA

Produs	Green Coffee Bean Complex Adams Vision	Green Coffee Biotech USA	Green Coffee Bean 400mg Jarrow Formulas
% Reducere DPPH	91,66	91,05	93,07

Se poate afirma că CGA este activ în toate cele trei produse, și este prezent în concentrație mare, așa cum este menționat pe etichetă, de către producător și cum s-a determinat prin metoda analitică din acest studiu.

VII.10. Concluzii

Electrodul serigrafat pe bază de GPH, modificat cu MnPc și cu Tyr a fost dezvoltat și utilizat pentru studierea și determinarea comportamentului electrochimic al CGA.

Utilizând ca metodă de detecție CV și SWV, s-au putut obține rezultate foarte bune, cu aplicabilitate în practica de laborator. Curba de calibrare a GPH-MnPc-Tyr/SPCE față de CGA a prezentat liniaritate în intervalul de concentrație de 0,1-10,48 μM, precum și limitele de detecție și de cuantificare scăzute, apropiate de cele obținute de alți biosenzori pe bază de tirozinază pentru detecția altor compuși fenolici.

În plus, biosenzorul a fost utilizat cu succes pentru determinarea cantitativă a CGA în trei produse nutraceutice, prin intermediul CV, utilizând pentru validarea acesteia metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu, obținându-se rezultate similare prin ambele metode.

De asemenea, prin intermediul metodei DPPH, s-a determinat activitatea antioxidantă a compusului, demonstrând astfel efectul antioxidant al CGA în cele trei produse nutraceutice studiate.

CAPITOLUL VIII. STUDIU COMPARATIV PRIVIND EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A CATECHINEI DIN PRODUSE NUTRACEUTICE UTILIZÂND O METODĂ ELECTROCHIMICĂ NOU DEZVOLTATĂ ȘI METODE SPECTROFOTOMETRICE DE ANALIZĂ

Scopul studiului de față este de a dezvolta senzori enzimatici ușor de utilizat, având un răspuns rapid și o înaltă precizie, aplicați pentru detectarea catechinei în diferite formulări nutraceutice conținând extract de ceai verde. Aceste noi dispozitive au fost obținute prin modificarea cu enzima lacază a trei electrozi, după cum urmează: electrodul serigrafiat pe bază de nanotuburi de carbon (CNT/SPCE), electrodul serigrafiat pe bază de nanoparticule de aur (GNP/SPCE) și electrodul serigrafiat pe bază de nanotuburi de carbon și nanoparticule de aur (CNT-GNP/SPCE). Dispozitivele nou-dezvoltate au fost utilizate pentru a studia conținutul de catechină al unor formulări nutraceutice care conțin extract de ceai verde folosind ca metodă de detecție DPV. În plus, prin intermediul metodelor electrochimice propuse s-a determinat activitatea antioxidantă a acestor produse, realizându-se o corelație între datele obținute prin metodele electrochimice (CV și DPV) și cele rezultate prin aplicarea metodelor spectrofotometrice de determinare a activității antioxidante, precum DPPH, ABTS și galvinoxil.

VIII.1. Prepararea biosenzorilor enzimatici prin imobilizarea enzimei lacaza

Pentru prepararea biosenzorilor, s-au folosit ca suport trei senzori, și anume: CNT/SPCE, GNP/SPCE și CNT-GNP/SPCE. Utilizând tehnica *drop-and-dry*, a fost adăugat, pe fiecare senzor, un volum de câte 10 μL soluție de enzimă lacază, secvențial, în doua etape (câte 5 μL în fiecare etapă), cu o pauză pentru uscare de 2 ore între cele două etape. Reticularea enzimei s-a realizat prin menținerea senzorilor deasupra unui recipient cu 5 mL glutaraldehidă 2%, timp de 1 minut.

VIII.2. Caracterizarea biosenzorilor enzimatici

Pentru a observa modificările celor trei biosenzori obținuți pe baza enzimei lacaza, au fost utilizate două metode, și anume spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS) și metoda spectrofotometrică FT-IR. În cazul biosenzorului CNT-GNP-Lac/SPCE, morfologia suprafeței a fost studiată și prin intermediul SEM.

VIII.2.1. Studiul EIS pentru CNT-Lac/SPCE, GNP-Lac/SPCE și CNT-GNP-Lac/SPCE

Pentru a clarifica diferențele în ceea ce privește performanța electrochimică a electrozilor modificați, EIS a fost utilizată ca tehnică pentru caracterizarea electrochimică a suprafețelor acestora, precum și a rezistenței de transfer a sarcinii pentru fiecare imobilizare, ceea ce indică interacțiunea enzimei cu substratul [96]. Impedanța (Z) reprezintă rezistența totală pe care circuitul o oferă fluxului de curent alternativ la o anumită frecvență dată [97].

În figura VIII.1 sunt redate spectrele de impedanță sub forma de grafice Nyquist în care impedanța imaginară (Z_{imp}) este prezentată ca o variație a impedanței reale (Z_{re}) pentru electrozii nemodificați (CNT/SPCE, GNP/SPCE și CNT-GNP/SPCE) și pentru cei modificați cu enzima lacaza (CNT-Lac/SPCE, GNP-Lac/SPCE și CNT-GNP-Lac/SPCE), utilizând o soluție de 10^{-1}M KCl conținând 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

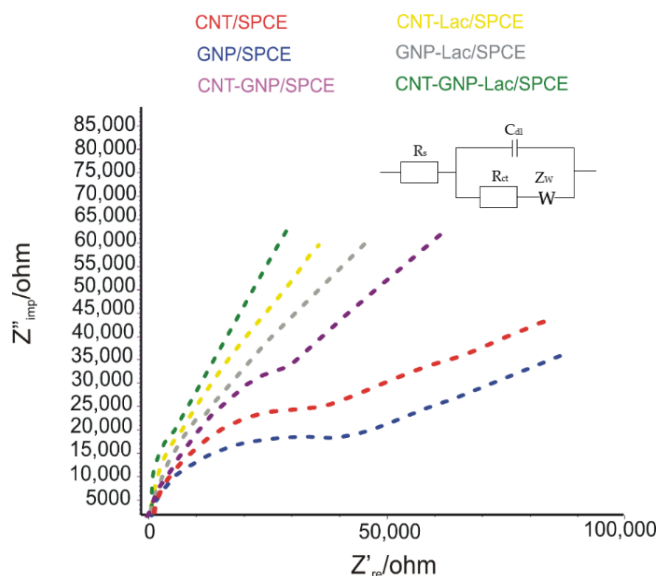


Figura VIII.1. EIS pentru CNT/SPCE, GNP/SPCE, CNT-GNP/SPCE, CNT-Lac/SPCE, GNP-Lac/SPCE și CNT-GNP-Lac/SPCE imersați într-o soluție de 10^{-1} M KCl conținând $1 \text{ mM } K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, la o frecvență între 100 kHz și 100 mHz .

Se poate aprecia că adsorbția Lac pe suprafața CNT-GNP-Lac/SPCE este direct legată de scăderea semicercului și de creșterea transferului de electroni (880 Ohm) datorită acoperirii suprafeței electrodului, confirmând astfel prezența unui nou strat conductiv, și demonstrând astfel GNP-urile prezente în filmul CNT sporesc transferul de electroni între reactant și suprafața electrodului [98].

VIII.2.2. Caracterizarea morfologică prin intermediul SEM

În figura VIII.2 este redată imaginea obținută cu ajutorul microscopului electronic cu scanare, prin intermediul căreia se evidențiază morfologia suprafeței nanofilmului compozit care conține CNT, GNP și enzima lacază.



Figura VIII.2. Imagine SEM a suprafeței biosenzorului CNT-GNP-Lac/SPCE

VIII.3. Influența pH-ului asupra performanței biosenzorilor

Pentru a stabili o valoare optimă a pH-ului la care vor fi efectuate determinările ulterioare în cadrul acestui studiu, a fost evaluat comportamentul electrochimic al celor trei biosenzori în soluție tampon acetat (ABS) 10^{-1} M având valori diferite ale pH-ului, respectiv 3,0, 4,0, 5,0,

6,0, la o viteză de scanare de $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. În cazul tuturor celor trei senzori enzimatici, voltamogramele ciclice au arătat două picuri, respectiv unul anodic de intensitate scăzută și unul catodic care este mai evident. S-a observat că pentru un pH mai mare de 6,5 răspunsul scade drastic datorat, probabil, pierderii activității enzimaticе, iar un răspuns maxim este atins la aproximativ pH 5,2. Picurile sunt relaționate cu procesul de reducere electrochimică a lacazei pe suprafața electrozilor modificați.

VIII.4. Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluție de catechină

Determinarea calitativă și apoi cantitativă a catechinei s-a realizat prin CV și prin DPV, aceste metode fiind utile pentru interpretarea proceselor ce au loc la suprafața electrozilor. În cazul CV, viteza de scanare folosită a fost $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

În figura VIII.3 se poate observa, prin comparație, răspunsul celor trei electrozi, atunci când sunt imersați într-o soluție de catechină 10^{-3} M - ABS 10^{-1} M (pH= 5,2). Pentru a obține un răspuns stabil al senzorilor, s-au înregistrat trei cicluri în domeniul de potențial optimizat, cuprins între -0,4 V și 0,7 V. Voltamogramele ciclice prezentate în figura VIII.3 sunt obținute după stabilizarea semnalelor.

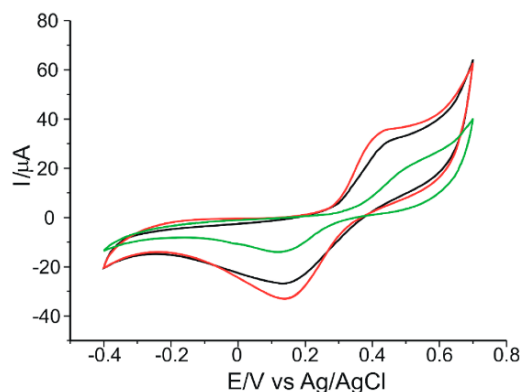


Figura VIII.3. Voltamogramele ciclice ale CNT-Lac/SPCE (linia neagră), GNP-Lac/SPCE (linia verde) și CNT-GNP-Lac/SPCE (linia roșie) imersați în soluție de catechină 10^{-3} M și ABS 10^{-1} M (pH 5,2). Viteza de scanare: $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

În figura VIII.3 se observă că intensitățile picurilor de oxidare, respectiv de reducere sunt mai mari în cazul CNT-GNP-Lac/SPCE, acest lucru putând fi atribuit efectului sinergic al asocierii CNTs cu GNPs.

Parametrii electrochimici obținuți din voltamogramele ciclice ale celor trei senzori modificați, imersați în soluție de catechină 10^{-3} M sunt prezentați în Tabelul VIII.1.

Tabelul VIII.1. Valorile parametrilor obținuți din voltamogramele ciclice ale celor trei electrozi imersați în soluție de catechină 10^{-3} M (electrolitul suport a fost ABS 10^{-1} , pH=5,2)

Senzor	Epa(V)	Ipa(μA)	Epc(V)	Ipc(μA)	Ipc/Ipa	ΔE(V)	E _{1/2}
CNT-Lac/SPCE	0,467	29,76	0,136	-26,90	0,90	0,331	0,301
GNP-Lac/SPCE	0,527	19,70	0,130	-14,08	0,71	0,397	0,328
CNT-GNP-Lac/SPCE	0,464	34,20	0,150	-34,58	1,01	0,314	0,307

Raportul I_{pc}/I_{pa} este apropiat de valoarea ideală 1 în toate cele trei cazurile, cea mai apropiată valoare fiind obținută în cazul CNT-GNP-Lac/SPCE (1,01). Ținând cont de această valoare, dar și de faptul că pentru acest senzor modificat diferența dintre potențialele picurilor anodice și catodice (ΔE) este cea mai mică, se poate afirma că CNT-GNP-Lac/SPCE prezintă cel mai mare grad de reversibilitate. De asemenea, tot pentru acest senzor au fost obținuți curenții cei mai înalți, fiind urmat de CNT-Lac/SPCE și apoi de GNP-Lac/SPCE. Din aceste rezultate se poate concluziona că cea mai mare sensibilitate la detectarea catechinei a fost obținută în cazul CNT-GNP-Lac/SPCE.

VIII.5. Curba de calibrare

Curba de calibrare pentru domeniul de concentrație 0,1 μM – 10,50 μM catechinea obținută prin DPV pentru CNT-GNP-Lac/SPCE este redată în figura VIII.4.

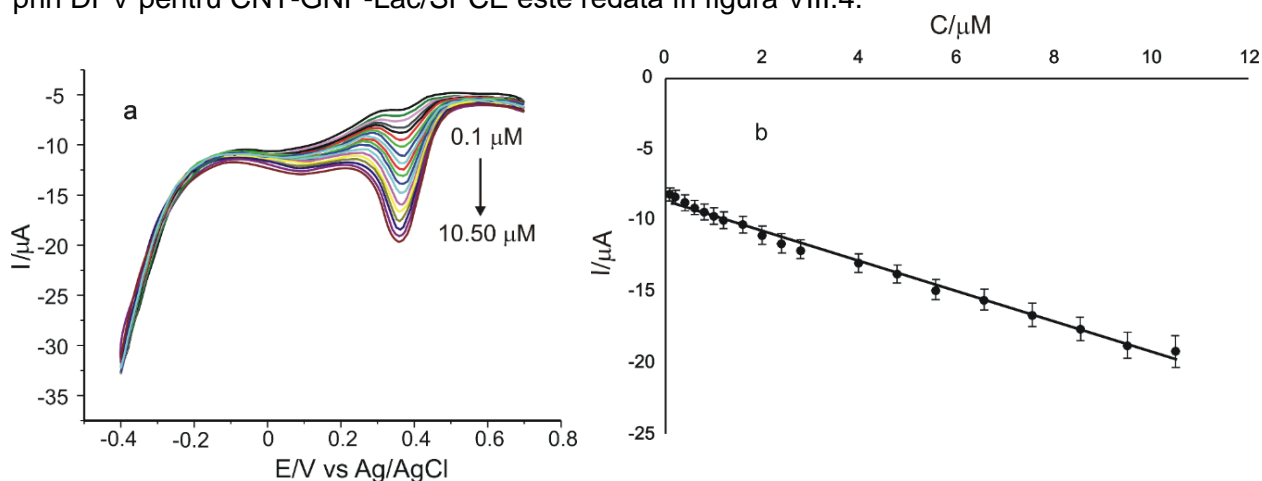


Figura VIII.4. Voltamogramele puls-diferențiale înregistrate cu CNT-GNP-Lac/SPCE pentru domeniul de concentrație 0,1 μM – 10,50 μM catechină (a); Ajustarea liniară în intervalul 0,1-10,50 μM pentru CNT-GNP-Lac/SPCE (b). Domeniul de potențial utilizat a fost de la -0,4 la 0,7 V, înălțimea impulsului a fost 0,10 V, lățimea impulsului de 0,5 V, iar creșterea potențialului impulsului de 10 mV.

Au fost calculate valorile LOD și LOQ obținute prin metoda DPV cu toți cei trei senzorii modificați, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul VIII.2.

Tabel VIII.2. Ecuațiile dependențelor liniare între I_{pc} și c , R^2 , LOD și LOQ pentru CNT-Lac/SPE, GNP-Lac/SPE, CNT-GNP-Lac/SPE obținute prin DPV

Electrod	Ecuația liniară	R^2	LOD (M)	LOQ (M)
CNT-Lac/SPCE	$I_{pc} = -1,6068x - 16,228$	0,9909	$5,58 \times 10^{-8}$	$1,86 \times 10^{-7}$
GNP-Lac/SPCE	$I_{pc} = -0,9171x - 9,6965$	0,9904	$1,29 \times 10^{-7}$	$4,30 \times 10^{-7}$
CNT-GNP-Lac/SPCE	$I_{pc} = -1,0614x - 8,6305$	0,9928	$4,89 \times 10^{-8}$	$1,63 \times 10^{-7}$

Datorită efectului sinergic al asocierii GNP cu CNT [99], este favorizată interacțiunea cu catechinea, fiind îmbunătățită selectivitate și sensibilitate biosenzorului CNT-GNP-Lac/SPCE, acesta prezentând performanțe superioare celorlalți doi biosenzori.

VIII.5.1. Cinetica reacției enzimaticе. Calculul vitezei maxime de reacție și a constantei Michaelis-Menten

Pentru a evalua caracteristicile unei enzime în soluție, modelul Michaelis-Menten este cel mai utilizat, unde vitezele de reacție sunt măsurate în funcție de concentrația substratului asemănător enzimei [100].

Constanta aparentă Michaelis-Menten (K_M^{app}), o indicație atât a afinității enzimaticе, cât și a constantelor cinetice ale substratului enzimatic, este determinată din forma electrochimică Lineweaver-Burk a ecuației Michaelis-Menten

Valorile obținute pentru cei trei biosenzori sunt prezentate în tabelul VIII.3.

Tabelul VIII.3. Parametrii caracteristici obținuți cu cei trei biosenzori

Biosenzor	$I_{max}/\mu A$	$K_M^{app}/\mu M$
CNT-Lac/SPCE	-12,61	0,281±0,007
GNP-Lac/SPCE	-14,10	0,299±0,009
CNT-GNP-Lac/SPCE	-23,47	0,269±0,004

Se constată că valorile K_M^{app} sunt apropiate pentru cei trei biosenzori, însă cea mai mică valoare a fost obținută în cazul CNT-GNP-Lac/SPE. Acest lucru sugerează că afinitatea lacazei față de substrat este mai puternică pentru acest biosenzor, conferindu-i acestuia o sensibilitate mai mare [101].

VIII.6. Determinarea cantitativă a catechinei în produse nutraceutice

Selectarea probelor pentru validarea biosenzorilor a fost efectuată în scopul controlului calității produselor nutraceutice, utilizând în acest sens trei produse diferite, de la producători diferiți și conținând catechina în diferite concentrații: Green Tea Adams Vision, Extract de Ceai verde Bio Synergie, Green Tea Extract Zenyth. Aceste produse au fost analizate cantitativ prin intermediul metodei electrochimice DPV.

Rezultatele obținute sunt exprimate în mg catechină per capsulă (tabelul VIII.4).

Tabel VIII.4. Rezultatele obținute de biosenzorul CNT-GNP-Lac/SPCE utilizând ca metodă voltametrică DPV, cu privire la cantitatea de catechina din produsele nutraceutice selectate, comparativ cu cele menționate de producător.

Produs nutraceutic	Catechina declarată de producător (mg/capsulă)	Catechina determinată prin tehnica DPV (mg/capsulă)
Green Tea Adams Vision	-	31,9±1,32
Extract de Ceai verde Bio Synergie	15	16,8±0,91
Green Tea Extract Zenyth	200	203,4±4,07

După cum se poate observa în tabelul VIII.4, rezultatele obținute prin intermediul metodei DPV, precum și cele furnizate de producători sunt similare, cu mici diferențe, ceea ce demonstrează acuratețea metodei de cuantificare a catechinei prezentată în acest studiu. Prin urmare, biosenzorul ar putea fi aplicat cu succes în practica de laborator în controlul calității produselor farmaceutice care conțin catechină.

VIII.7. Determinarea activității antioxidante prin metode spectrofotometrice

Am analizat capacitatea catechinei de a neutraliza radicalii liberi prin utilizarea testelor DPPH, ABTS și galvinoxil.

În cazul determinărilor din produsele nutraceutice studiate, rezultatele inhibiției procentuale sunt redate în tabelul VIII.5.

Tabel VIII.5. Determinarea activității antioxidante a produselor nutraceutice studiate

Produs nutraceutic	Inhibiție % - DPPH	Inhibiție % - Galvinoxil	Inhibiție % - ABTS
Green Tea Adams Vision	19,36	19,25	31,07
Extract de Ceai verde Bio Synergie	18,34	18,99	31,22
Green Tea Extract Zenyth	70,63	70,65	95,70

Pentru toate cele trei produse se poate observa că cele mai bune rezultate au fost obținute prin metoda ABTS, la fel ca în cazul determinării activității antioxidante a catechinei în stare pură la un nivel al concentrației de 10^{-3} M.

VIII.8. Determinarea activității antioxidante prin metode electrochimice

Prin intermediul metodelor voltametrice pot fi obținuți principalii parametri electrochimici, respectiv E_p și I_p , conturând astfel câteva perspective despre activitatea antioxidantă presupusă a fiecărei probe analizate.

VIII.8.1. Aria de sub curba picului anodic

Conform literaturii de specialitate, aria de sub curba picurilor anodice (S_a) poate exprima puterea totală de reducere a amestecurilor complexe de compuși antioxidanți, cum ar fi extractele de ceai verde. Prin urmare, aria de sub curba picurilor anodice a voltamogramelor ciclice înregistrate cu CNT-GNP-Lac/SPCE pentru toate cele trei produse nutraceutice poate fi corelată cu activitatea antioxidantă a respectivelor produse. În figura VIII.5 sunt ilustrate voltamogramele ciclice ale celor trei produse studiate, în domeniul de potențial -0,4 și 0,7 V, înregistrate cu viteza de scanare de $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, folosind biosenzorul CNT-GNP-Lac/SPCE. Aria de sub picul anodic corespunde sarcinii utilizate în experiment de la potențialul de 0,08 V până la 0,4 V (Q400) și este utilizată ca măsură a conținutului de antioxidanți din produse.

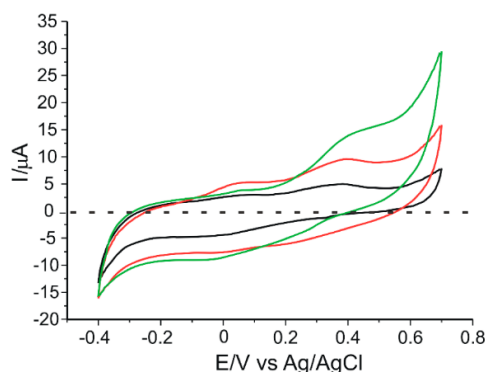


Figura VIII.5. Voltamogramele ciclice ale CNT-GNP-Lac/SPCE imersat în soluții conținând 9 mg produs/50 mL ABS obținute de la: Green Tea Adams Vision (linia roșie), Extract de Ceai verde Bio Synergie (linia neagră) și Green Tea Extract Zenyth (linia verde), la viteza de scanare de $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

În tabelul VIII.6 sunt înscrise valorile parametrilor electrochimici obținuți din voltamogramele ciclice prezentate în figura VIII.5, alături Q400 (exprimate în μC), pentru cele trei produse nutraceutice studiate. Se remarcă faptul că valoarea Q400 cea mai mare a fost obținută pentru produsul Green Tea Extract Zenyth, putând fi atribuită cantității mari de compus antioxidant, respectiv catechină, conținută per capsulă, în comparație cu celelalte două produse, așa cum a fost demonstrat anterior, în acest studiu prin metodele spectrofotometrice.

Tabel VIII.6. Valorile parametrilor obținuți din voltamogramele ciclice ale celor trei produse nutraceutice înregistrate cu CNT-GNP-Lac/SPCE, la viteza de scanare de $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Produs nutraceutic	Epa (V)	Ipa (μA)	Q400 (μC)
Green Tea Adams Vision	0,375	8,20	2,27
Extract de Ceai verde Bio Synergie	0,388	4,85	0,90
Green Tea Extract Zenyth	0,351	12,42	6,18

VIII.8.2. Indicele electrochimic

EI a fost definit ca o metodă de screening pentru a determina concentrația totală de compuși antioxidanți din diferite probe și poate fi obținut folosind tehnici electrochimice, de exemplu, CV și DPV, ținând cont de tipul de probă care va fi analizată, de potențialul maxim (EP) și de intensitatea curentului (IP).

Pentru a determina EI al celor trei produse nutraceutice studiate, s-au luat în considerare valorile intensităților și ale potențialelor obținute prin metoda electrochimică DPV. Totodată, s-a determinat EI și pentru catechinea în stare pură pentru a putea realiza o comparație între rezultate. Acestea sunt prezentate în tabelul VIII.7.

Tabel VIII.7. Rezultatele indicelui electrochimic al catechinei și al produselor nutraceutice Green Tea Adams Vision, Extract de Ceai verde Bio Synergie și Green Tea Extract Zenyth

	Catechinea	Green Tea Adams Vision	Extract de Ceai verde Bio Synergie	Green Tea Extract Zenyth
EI ($\mu\text{A}/\text{mV}$)	0,76	0,72	0,71	0,78

Din tabel reiese că cea mai mare valoare a EI a fost obținută în cazul produsului Green Tea Extract Zenyth, aproximativ egală cu cea a substanței în stare pură de concentrație 10^{-3} M. Totodată, și pentru celelalte două produse valoare EI a fost apropiată ca valoare și poate fi comparată cu valoarea EI a catechinei.

VIII.9. Concluzii

În lucrarea de față au fost dezvoltate și caracterizate trei biosenzori pe bază de lacază, și anume CNT-Lac/SPCE, GNP-Lac/SPCE și CNT-GNP-Lac/SPCE, cel din urmă prezentând cea mai bună performanță analitică, cu o limită de detecție foarte scăzută și o sensibilitate ridicată. Acest lucru poate fi atribuit asocierii CNT cu GNP ce au sporit sensibilitatea biosenzorului în mod semnificativ datorită electroactivității mai mari, precum și transportului mai ușor al electronilor la suprafața electrodului.

De asemenea, această lucrare reunește două tipuri de metode, chimice (DPPH, galvinoxil și ABTS) și electrochimice (CV și DPV), pentru a caracteriza activitatea antioxidantă a

catechinei și a celor trei produse nutraceutice studiate. Astfel, prin intermediul metodei voltametrice DPV s-a putut determina indicele electrochimic al substanței pure și al produselor nutraceutice, iar prin intermediul CV a fost calculată aria de sub curba picului anodic (corelată cu activitatea antioxidantă). Ambele metode au demonstrat că activitatea antioxidantă cea mai mare a fost obținută în cazul produsului Green Tea Extract Zenyth, fiind comparabilă cu cea a substanței în stare pură, la un nivel al concentrației de 10^{-3} M.

CAPITOLUL IX. DETECȚIA VOLTAMETRICĂ A ACIDULUI ROZMARINIC DIN PRODUSE COSMETICE CU UN NOU SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE OXID DE GRAFEN MODIFICAT CU OCTAPEPTIDĂ

Obiectivul acestui studiu a fost de a fabrica un nou senzor, folosind o peptidă zwitterionică, fixată prin intermediul unui agent de reticulare pe suprafața unui SPCE modificat cu un film compozit de GO, cu aplicabilitate pentru determinarea și cuantificarea acidului rozmarinic în produse cosmetice cu compoziție complexă. S-a urmărit, de asemenea, optimizarea condițiilor experimentale în ceea ce privește pH-ul soluției și cantitățile de peptidă folosite pentru a modifica suprafața senzorului, astfel încât performanțele analitice ale noului senzor să fie optime pentru detectarea acidului rozmarinic. Metoda FT-IR a fost utilizată pentru a valida rezultatele obținute prin aplicarea metodei voltametrice.

IX.1. Prepararea senzorului

IX.1.1. Peptida zwitterionică – descriere

În ultimii ani, peptidele au fost propuse ca elemente promițătoare și versatile pentru proiectarea și dezvoltarea senzorilor [102], [103]. Peptidele pot fi obținute cu ușurință prin metode de sinteză chimică, evitând necesitatea procedurilor *in vivo*, laborioase, ca și în cazul anticorpilor [104]. Beneficiile utilizării acestor compuși constau în principal în stabilitatea și selectivitatea lor față de un analit țintă, putând fi modificate cu grupări funcționale specifice, făcându-le astfel potrivite pentru dezvoltarea de noi platforme de bio-recunoaștere.

IX.1.2. Fabricarea senzorului prin imobilizarea peptidei zwitterionice

Pentru prepararea noului senzor, GO-Peptidă/SPCE, a fost folosit ca suport senzorul GO/SPCE. Utilizând tehnica *drop-and-dry*, a fost adăugat pe suprafața senzorului, un volum de 20 μ L soluție de peptidă, secvențial, în patru etape (câte 5 μ L în fiecare etapă), cu o pauză pentru uscare de 2 ore între etape. Reticularea s-a realizat prin intermediul glutaralhidei ca agent de reticulare.

IX.2. Caracterizarea electrozilor de lucru

Pentru a observa modificările aduse senzorului comercial pe bază de GO, suprafața activă a acestuia a fost analizată utilizând cele două metode utilizate și în studiile anterioare, respectiv metoda spectrometrică FT-IR și SEM.

IX.2.1 Metoda spectrometrică FT-IR

Prima metodă utilizată pentru caracterizarea senzorului modificat a fost metoda spectrometrică FT-IR, iar rezultatele sunt prezentate în figura IX.1.

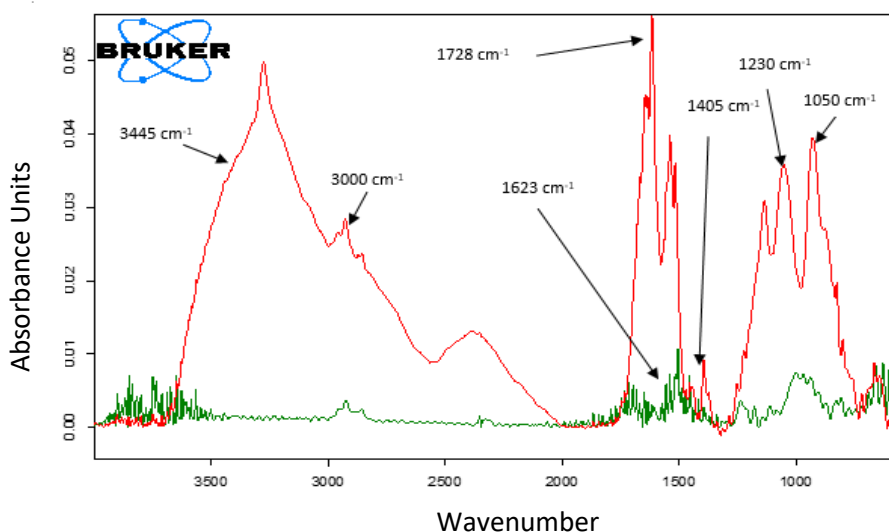


Figura IX.1. Analiza FT-IR a GO/SPCE (linia verde) și a GO-Peptidă/SPCE (linia roșie)

Se pot observa mai multe picuri reprezentative prezenței GO, în intervalul numerelor de undă 1050-1728 cm^{-1} [105]. Absorbția la aproximativ 1623 cm^{-1} este atribuită vibrației de întindere a inelului benzenic C=C [106]. Totodată, banda la 1728 cm^{-1} apare datorită vibrațiilor de întindere C=O [107], în timp ce banda la 1405 cm^{-1} poate fi atribuită vibrației de întindere carboxi C-O [108], cea la 1230 cm^{-1} – epoxi C-O [109], iar cea de la 1050 cm^{-1} – alcoxi C-O [110], situate la marginile GO.

IX.2.2. Caracterizarea morfologică prin intermediul SEM

În figura IX.2 sunt redată imaginile obținute cu ajutorul SEM, evidențiindu-se morfologia suprafeței nanofilului compozit care conține GO și peptida.

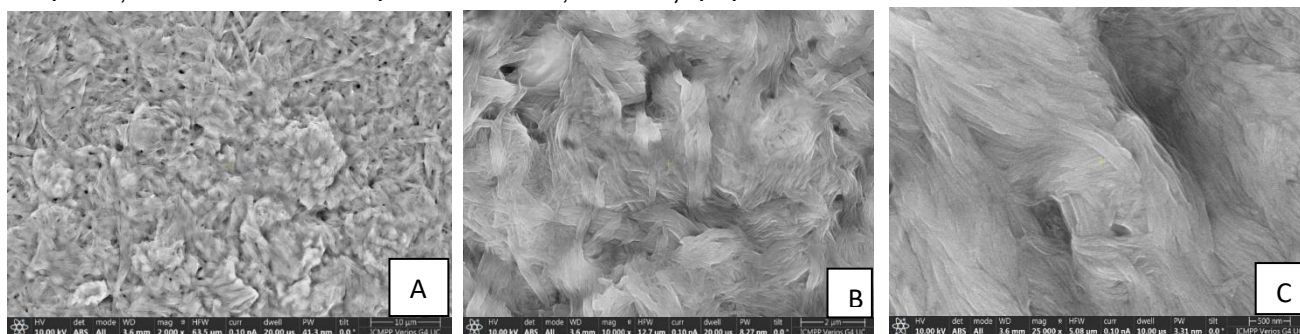


Figura IX.2. Imagini SEM la diferite grade de mărire (magnifiere x (A) 2000; (B) 10.000; (C) 25.000), reprezentând suprafața activă a GO-Peptidă/SPCE

IX.4. Proprietățile electrochimice ale GO-Peptidă/SPCE în soluție de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10^{-3} M – PBS 10^{-1} M

În următoarea etapă am analizat comportamentul electrochimic atât al senzorului modificat, cât și al celui nemodificat, într-o soluție ce conține $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10^{-3} M dizolvate în PBS 10^{-1} M, pH = 6,5, în domeniul de potențial cuprins între -0,4 și 1,0 V. În vederea stabilizării semnalelor senzorilor, s-au înregistrat 3 cicluri în soluția de analizat.

În figura IX.3 se prezintă semnalele stabile ale senzorilor și se poate observa că, în cazul senzorului a GO/SPCE este prezentă o pereche de picuri redox, unul anodic și unul catodic.

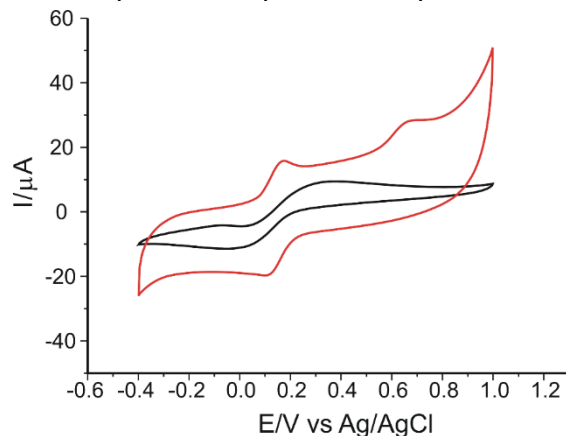


Figura IX.3. Voltamogramele ciclice ale GO/SPCE (linia neagră) și ale GO-Peptidă/SPCE (linia roșie) imersați în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] 10^{-3} M - PBS 10^{-1} M$, la viteza de scanare de $0,05 V \times s^{-1}$.

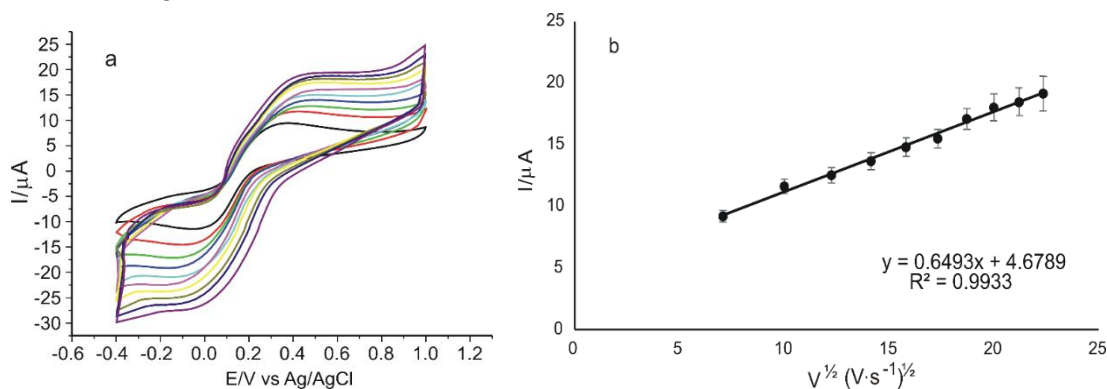
În tabelul IX.1 sunt incluși principalii parametri obținuți din voltamogramele ciclice pentru picurile relaționate cu procesele electrochimice ale cuplului $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$.

Tabel IX.1. Parametrii electrochimici obținuți din voltamogramele ciclice ale senzorilor în soluție $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] 10^{-3} M - PBS 10^{-1} M$

Senzor	$I_{pa}(\mu A)$	$I_{pc}(\mu A)$	I_{pc}/I_{pa}	$E_{pa} (V)$	$E_{pc}(V)$	$E_{1/2} (V)$	$\Delta E_p (V)$
GO/SPCE	9,34	-11,36	1,21	0,361	-0,02	0,190	0,341
GO-Peptidă/SPCE	15,58	-19,42	1,24	0,286	0,173	0,229	0,113

După cum se poate observa din tabelul IX.1, ambii senzori prezintă un raport I_{pc}/I_{pa} ce depășește valoarea ideală 1. Acest lucru demonstrează că procesul de oxido-reducere este cvasi-reversibil [111].

Pentru a studia cinetica procesului redox, au fost înregistrate voltamogramele ciclice în cazul GO/SPCE și GO-Peptidă/SPCE folosind soluția $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] 10^{-3} M - PBS 10^{-1} M$ la $pH = 6,5$ cu diferite viteze de scanare, între $0,05$ și $0,5 V \times s^{-1}$. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura IX.4.



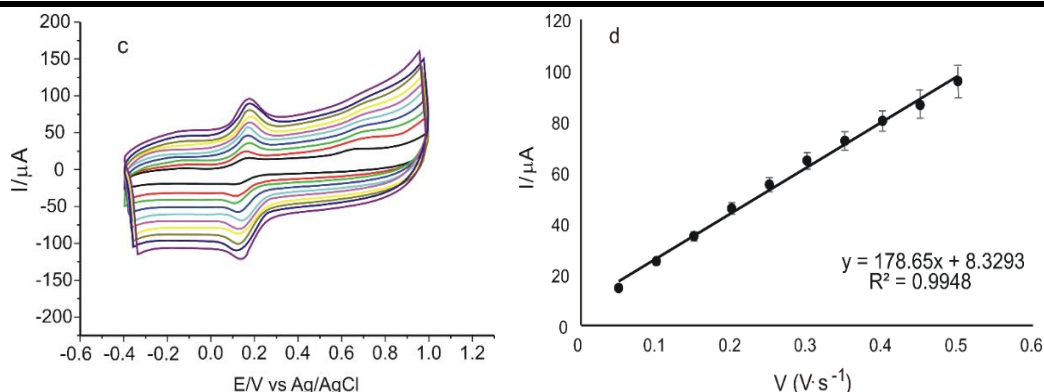


Figura IX.4. Voltamogramele ciclice ale GO/SPCE (a) și GO-Peptidă/SPCE (c) imersați în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ $10^{-3} M$ – PBS $10^{-1} M$ la $pH = 6,5$ înregistrate la viteze de scanare cuprinse în domeniul $0,05-0,5 V \times s^{-1}$. Dependența liniară dintre intensitatea picului anodic și rădăcina pătrată a vitezei de scanare în cazul GO/SPCE (b) și dependența liniară dintre intensitatea picului anodic și viteza de scanare în cazul GO-Peptidă/SPCE.

În cazul GO/SPCE se observă o dependență liniară între I_{pa} și rădăcina pătrată a vitezei de scanare, așa cum este reprezentat în figura IX.4b). Această dependență liniară sugerează faptul că oxido-reducerea ferocianurii de potasiu este controlată de difuzia speciei electroactive, aceasta fiind etapa determinantă de viteză a procesului electrochimic [112]. În cazul GO-Peptidă/SPCE se constată o dependență liniară între intensitatea picului anodic și viteza de scanare, ceea ce demonstrează că procesul electrochimic de la suprafața electrodului este controlat de adsorbția speciei electroactive [113] (figura IX.4d)). Această schimbare a factorului determinant de viteză al procesului de oxido-reducere în cazul GO-Peptidă/SPCE se datorează modificării sensorului cu peptida, având un efect major asupra cineticii reacției la suprafața electrodului și oferind un mediu adecvat pentru o interacțiune strat sensibil-analit și un transfer rapid al electronilor [114].

IX.5. Răspunsurile electrochimice ale senzorilor în soluție de acid rozmarinic

Comportamentul electrochimic al senzorilor în soluție de acid rozmarinic a fost studiat prin intermediul CV.

În figura IX.5 se poate observa răspunsul celor doi electrozi, respectiv GO/SPCE și GO-Peptidă/SPCE, atunci când sunt imersați într-o soluție de acid rozmarinic $10^{-3} M$ - PBS $10^{-1} M$ ($pH = 6,5$). Pentru a obține un răspuns stabil al senzorilor, au fost necesare trei cicluri în domeniul de potențial optimizat (de la $-0,4 V$ la $1,0 V$).

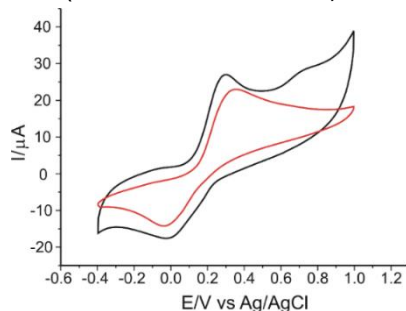


Figura IX.5. Voltamogramele ciclice ale GO/SPCE (linia roșie) și GO-Peptidă/SPCE (linia neagră) imersați în soluție de acid rozmarinic $10^{-3} M$ și PBS $10^{-1} M$ ($pH 6,5$). Viteza de scanare: $0,05 V \times s^{-1}$.

În ambele cazuri se evidențiază câte o pereche de picuri de intensități diferite, respectiv un pic anodic, reprezentând oxidarea acidului rozmarinic la o-chinona corespunzătoare și un pic catodic, corespunzător reducerii electrochimice înapoi la acidul rozmarinic. În cazul GO-Peptidă/SPCE se observă apariția celui de al doilea pic anodic la valoarea de potențial de 0,72 V datorat prezenței peptidei pe suprafața SPCE.

IX.6. Curba de calibrare și determinarea limitei de detecție

Variația răspunsului senzorului în funcție de concentrația soluției de acid rozmarinic analizată este prezentată în figura IX.6a. După cum se poate observa, intensitățile picurilor anodic și catodic cresc odată cu creșterea concentrației. În figura IX.6b se poate observa dependența liniară dintre curentul picului anodic și concentrația de acid rozmarinic în domeniul 0,1-3,20 μM , în cazul utilizării GO-Peptidă/SPCE.

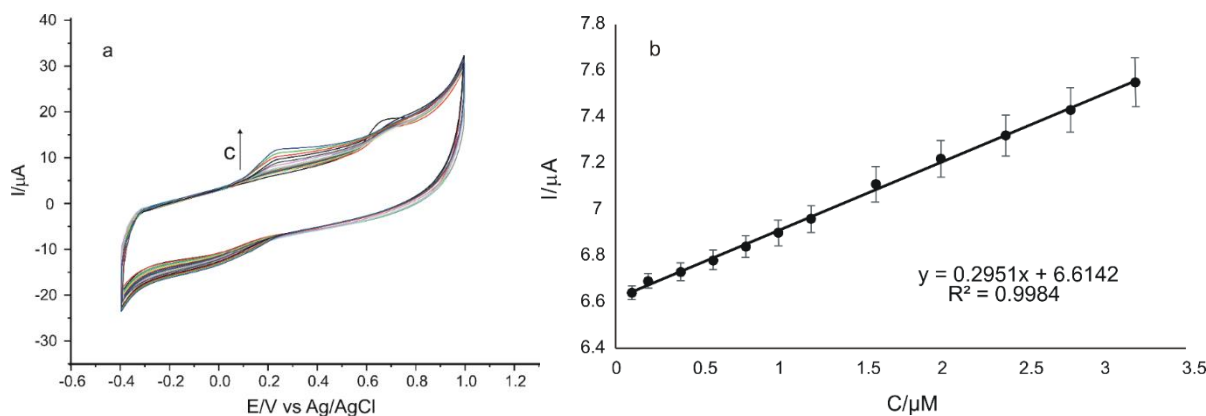


Figura IX.6. Voltamogramele ciclice înregistrate cu GO-Peptidă/SPCE pentru domeniul de concentrație 0,1 μM – 3,20 μM acid rozmarinic (a); Ajustarea liniară în intervalul 0,1-3,20 μM pentru GO-Peptidă/SPCE.

În tabelul IX.2 sunt prezentate valorile LOD și LOQ, calculate conform ecuațiilor descrise în studiile anterioare, obținute cu senzorul GO-Peptidă/SPCE.

Tabel IX.2. Ecuația dependenței liniare între I_{pa} și c , R^2 , LOD și LOQ pentru GO-Peptidă/SPCE

Electrod	Ecuația liniară	R^2	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
GO-Peptidă/SPCE	$I_{pc} = 0,2951c + 6,6142$	0,9984	0,0966	0,322

Datorită prezenței peptidei, ce favorizează interacțiunea cu acidul rozmarinic și îi conferă senzorului sensibilitate, acesta prezintă performanțe superioare altor senzori utilizați la determinarea acidului rozmarinic, descriși în literatura de specialitate [39], [115], [116], [117].

IX.7. Determinarea cantitativă a acidului rozmarinic în produse cosmetice

Senzorul GO-Peptidă/SPCE a fost utilizat pentru cuantificarea acidului rozmarinic în trei produse cosmetice, și anume: Crema anti-aging ten sensibil Apiterra, Balsam calmant și reparator cu extract de plante Sabio și Crema hidratantă matifiantă pentru ten mixt Vivanatura.

Aceste produse au fost analizate utilizând două metode: CV (metoda descrisă în acest studiu) și FT-IR [90].

În cazul CV, măsurătorile s-au înregistrat în domeniul de potențial situat între -0,4 V și 1,0 V, la viteza de scanare de $0,05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, utilizându-se 3 cantități diferite din fiecare produs: 0,1g, 0,2g și 0,3g.

Luând în considerare curentul picului anodic, ecuația dreptei de calibrare și cantitatea de produs cosmetic necesară pentru analiză, s-au calculat concentrațiile de acid rozmarinic din produsele cosmetice obținând rezultatele incluse în tabelul IX.3. Toate experimentele au fost efectuate în triplicat. Rezultatele sunt raportate ca medii a trei repetiții.

Tabel IX.3. Rezultatele cuantificării acidului rozmarinic în produse cosmetice

Produs cosmetic	c% acid rozmarinic metoda voltametrică	c% acid rozmarinic metoda spectroscopică FT-IR
Apiterra	0,288±0,03	0,321±0,05
Sabio	1,042±0,08	1,061±0,09
Vivanatura	0,081±0,01	0,076±0,01

Se observă că se obțin valori apropiate ale concentrației de acid rozmarinic în produsele cosmetice prin cele două metode. Analiza de varianță a arătat că între rezultatele obținute cu ambele metode nu există o diferență semnificativă la un nivel de încredere de 99%, ceea ce demonstrează că metoda voltametrică utilizând senzorul GO-Peptidă/SPCE este utilă pentru cuantificarea acidului rozmarinic, cu o precizie adecvată.

IX.8. Concluzii

În acest studiu, a fost dezvoltat un nou senzor prin imobilizarea unei peptide zwitterionice, conținând secvența $\text{H}_2\text{N-D-V-C-Y-Y-A-S-R-COOH}$, pe suprafața unui electrod serigrafat, modificat cu un material conductor cu proprietăți excelente, respectiv un film compozit de GO.

Utilizând ca metodă de detecție CV s-au putut obține rezultate foarte bune, cu aplicabilitate în practica de laborator. Intervalul de concentrații în care GO-Peptidă/SPCE a fost testat a fost cuprins între $0,1 \mu\text{M}$ și $3,20 \mu\text{M}$, cu o limită de detecție obținută de $9,66 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, o valoare scăzută în comparație cu alte dispozitive raportate în literatură, dezvoltate pentru determinarea aceluiași compus, respectiv acidul rozmarinic.

CAPITOLUL X. DETERMINAREA CANTITATIVĂ ȘI EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A VERBASCOZIDEI DIN ULEIUL DE MĂSLINE PRIN INTERMEDIUL UNUI NOU SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE OXID DE GRAFEN, MODIFICAT CU PENTAPEPTIDĂ

În acest studiu este descrisă o metodă electrochimică directă, capabilă să evalueze și să cuantifice conținutul de verbascoidă în diferite probe de uleiuri extravirgine de măsline, cu o pregătire minimă a eșantioanelor, utilizând un SPCE, modificat cu un film compozit de GO, pe suprafața căruia a fost imobilizată o pentapeptidă (secvența $\text{NH}_2\text{-FESNF-CO-NH}_2$) prin intermediul glutaralhidei, ca agent de reticulare. Validarea metodei electroanalitice a fost efectuată prin utilizarea metodei adaosului standard, obținându-se rezultate foarte bune.

X.1. Fabricarea senzorului prin imobilizarea pentapeptidei

În acest studiu, pentru a obține senzorul modificat chimic, am utilizat pentapeptida conținând secvența $\text{NH}_2\text{-FESNF-CO-NH}_2$, unde F este fenilalanina, E este acidul glutamic, S este serina, iar N este asparagina.

Pentru prepararea senzorului SPCE/GO-Pentapeptidă au fost parcurse aceleași etape descrise în studiul anterior.

X.2. Caracterizarea electrozilor

Pentru a evidenția modificările aduse senzorului comercial pe bază de GO, suprafața activă a acestuia a fost analizată utilizând două metode, respectiv metoda spectrometrică FT-IR cu evidențierea benzilor de absorbție corespunzătoare prezenței grupărilor funcționale ale pentapeptidei și SEM, cu evidențierea aranjamentelor tridimensionale formate din fibre continue cu o omogenitate bună, demonstrând omogenitatea suprafeței nanofilmului compozit (figura X.1).

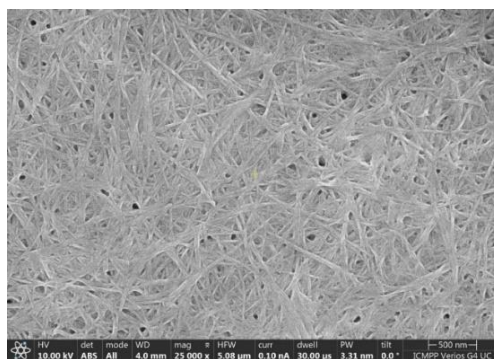


Figura X.1. Imaginea SEM a suprafeței active a SPCE/GO-Pentapeptidă

X.3. Răspunsurile electrochimice ale senzorilor în soluție de verbascoidă

Următoarea etapă a studiului de față a constat în analiza comportamentului atât a senzorului modificat, cât și a celui nemodificat în soluție de verbascoidă, prin intermediul CV.

În figura X.2 se poate observa, prin comparație, răspunsul celor doi senzori atunci când sunt imersați într-o soluție de verbascoidă 10^{-4} M - PBS 10^{-1} M (pH= 6,5). Pentru a obține un răspuns stabil al senzorilor, au fost necesare trei cicluri în domeniul de potențial optimizat (de la -0,4 V la 1,0 V). Voltamogramele ciclice prezentate în figura X.8 sunt obținute după stabilizarea semnalelor.

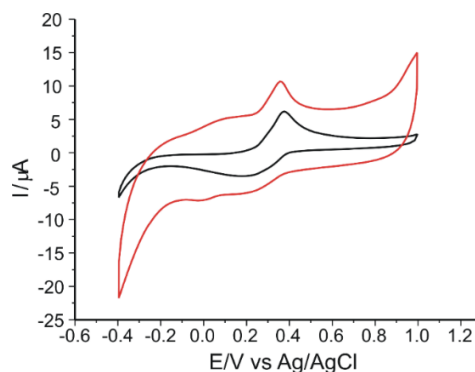


Figura X.2. Voltamogramele ciclice ale SPCE/GO (linia neagră) și SPCE/GO-Pentapeptidă (linia roșie) imersați în soluție de verbascoidă 10^{-4} M - PBS 10^{-1} M (pH 6,5).
Viteza de scanare: $0,05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

În ceea ce privește comportamentul senzorului modificat cu peptida la imersia în soluție de verbascozida, acesta este diferit față de senzorul nemodificat, lucru evident în voltamograma corespunzătoare (linia roșie) din figura X.2. Astfel, oxidarea verbascozidei are loc în două etape, evidențindu-se două picuri anodice și două picuri catodice de intensități și potențiale diferite.

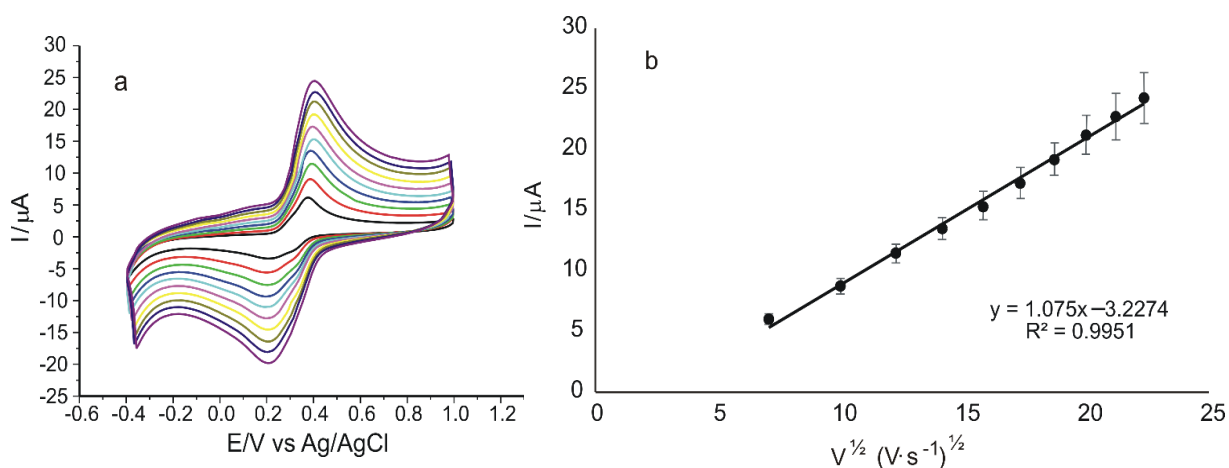
Parametrii electrochimici obținuți din voltamogramele ciclice ale celor doi senzori, imersați în soluție de verbascozida 10^{-4} M sunt prezentați în tabelul X.1.

Tabel X.1. Valorile parametrilor obținuți din voltamogramele ciclice ale celor doi electrozi imersați în soluție de verbascozidă 10^{-4} M (electrolitul suport a fost PBS 10^{-1} M, pH=6,5)

Senzor	Epa ₁ (V)	Epa ₂ (V)	Ipa ₁ (μ A)	Ipa ₂ (μ A)	Epc ₁ (V)	Epc ₂ (V)	Ipc ₁ (μ A)	Ipc ₂ (μ A)
SPCE/GO	0,38	-	6,05	-	0,21	-	-3,46	-
SPCE/GO-Pentapeptidă	0,08	0,35	4,79	10,74	0,01	0,22	-7,20	-5,22

Valoarea redusă a potențialului primului pic anodic în cazul SPCE/GO-Pentapeptidă indică o energie de activare mai redusă a procesului de oxidare, fiind influențată de adsorbția verbascozidei pe pentapeptidă preponderent prin legături de hidrogen [118] și prin interacțiuni de tip π - π [119]. Prin urmare, în cazul acestui senzor, transferul de electroni care are loc la suprafața activă este mai rapid în comparație cu senzorul nemodificat [120].

Următoarea etapă a fost dedicată studiului influenței vitezei de scanare asupra răspunsurilor voltametrice ale celor doi senzori în soluție de verbascozidă 10^{-4} M - PBS 10^{-1} M, pH = 6,5, aplicând viteze de scanare în domeniul $0,05$ - $0,5$ V \times s⁻¹. Voltamogramele obținute, precum și dependențele liniare sunt prezentate în figura X.3.



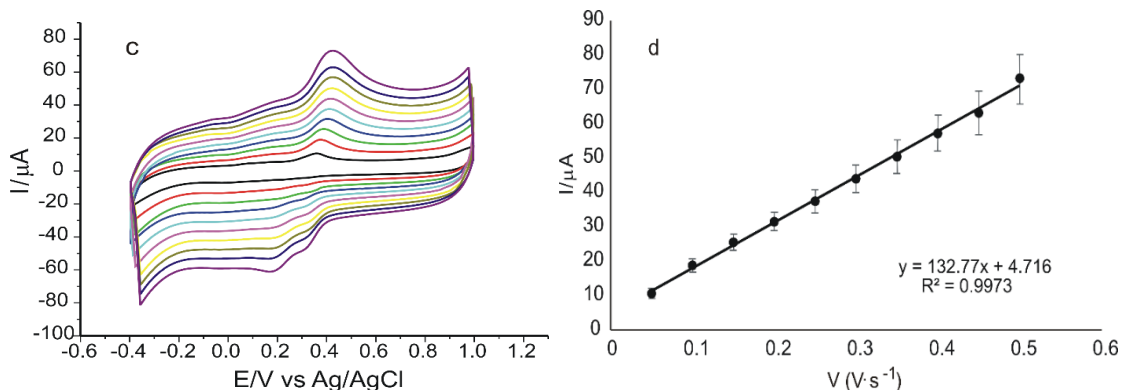


Figura X.3. Voltamogramele ciclice ale SPCE/GO (a) și SPCE/GO-Pentapeptidă (c) imersați în soluție de verbascosida 10^{-4} M – PBS 10^{-1} M la $\text{pH} = 6,5$ înregistrate la viteze de scanare cuprinse în domeniul $0,05$ - $0,5$ $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$. Dependența liniară dintre I_{pa} și rădăcina pătrată a vitezei de scanare în cazul SPCE/GO (b) și dependența liniară dintre I_{pa} și viteza de scanare în cazul și SPCE/GO-Pentapeptidă (d).

Crescând viteza de scanare, s-a observat că potențialele maxime de oxidare în cazul ambilor senzori (figura X.10a și figura X.10c) au fost deplasate spre valori mai pozitive, iar cele de reducere spre valori mai negative. Mai mult, intensitățile picurilor anodice au fost mai mari în cazul sensorului modificat, în comparație cu cele obținute cu sensorul nemodificat, prezența peptidei la suprafața sensorului îmbunătățind semnificativ sensibilitatea acestuia.

X.4. Influența concentrației de verbascosidă asupra răspunsului voltametric al SPCE/GO-Pentapeptidă

Pentru a determina influența concentrației de verbascosidă asupra răspunsului SPCE/GO-Pentapeptidă, s-au înregistrat voltamogramele ciclice în soluții de verbascosidă de diferite concentrații, obținute prin dizolvare în soluție PBS 10^{-1} M. Răspunsurile electrochimice ale sensorului, înregistrate prin CV, se prezintă în figura X.4a, iar în figura X.4b se poate observa dependența liniară dintre curentul picului anodic și concentrația de verbascosidă în domeniul de liniaritate $0,1$ μM – $10,55$ μM , în cazul utilizării SPCE/GO-Pentapeptidă.

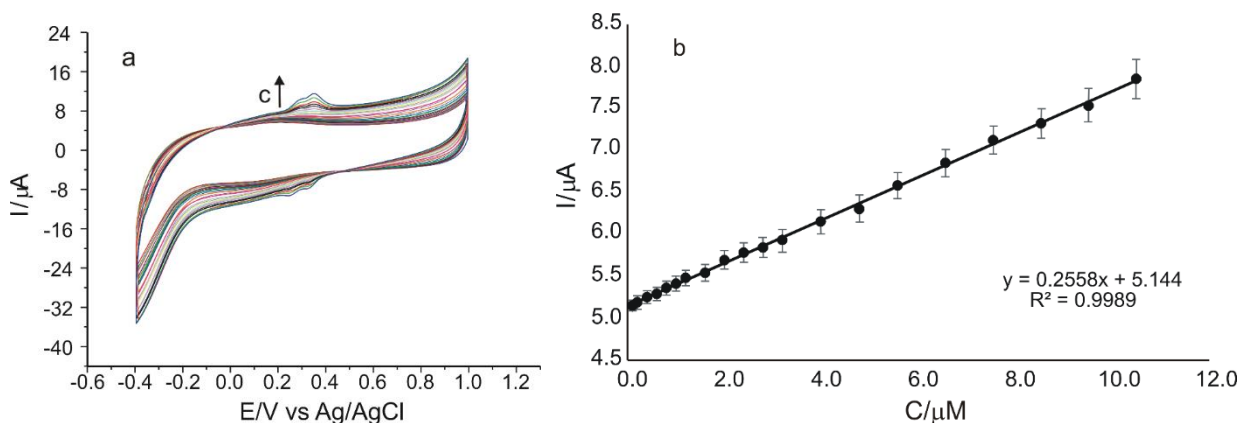


Figura X.4. Voltamogramele ciclice înregistrate cu SPCE/GO-Pentapeptidă pentru domeniul de concentrație $0,1$ μM – $10,55$ μM verbascosidă (a); Ajustarea liniară în intervalul $0,1$ - $10,55$ μM pentru SPCE/GO-Pentapeptidă.

După cum se prezintă în figura X.4a, a fost obținută o relație liniară între intensitatea picurilor și concentrația de verbascoidă în domeniul 0,1-10,55 μM . Din ecuația dreptei de calibrare s-au calculat cei doi parametri, respectiv LOD și LOQ, utilizând ecuațiile prezentate în studiile anterioare.

Valorile obținute pentru SPCE/GO-Pentapeptidă sunt: LOD = $9,38 \times 10^{-8} \text{ M}$ și LOQ = $3,12 \times 10^{-7} \text{ M}$. Ținând cont de faptul că aceste valori obținute sunt similare sau mai mici decât cele raportate în literatura de specialitate [121],[122], acest senzor s-a folosit pentru determinarea cantitativă a verbascoidelor din probe reale, respectiv probe de diferite EVOO.

X.5. Stabilitate, reproductibilitate, repetabilitatea și studii de interferență

Stabilitatea senzorului SPCE/GO-Pentapeptidă a fost evaluată prin efectuarea unui număr de 30 de măsurători, la intervale regulate (1 zi), timp de 1 lună, folosind o soluție de verbascoidă 10^{-4} M , utilizând ca metodă CV. Între determinări, senzorul a fost depozitat în frigider, la o temperatură de 4°C , într-o cutie închisă ermetic. Rezultatele obținute nu au evidențiat diferențe importante între curenții anodici înregistrați în zile diferite, coeficienții de variație fiind mai mici de 5%, confirmându-se astfel ca senzorul este stabil și poate fi utilizat în electroanaliză.

Reproductibilitatea metodei de fabricare a fost studiată prin pregătirea a cinci senzori diferiți, testele fiind efectuate în soluție de verbascoidă 10^{-4} M . Valoarea RSD calculată pentru curentul picului anodic observat pentru toți cei cinci senzori a fost de 3,5%, demonstrând reproductibilitatea bună a dezvoltării senzorului.

Testele pentru studiul repetabilității au fost realizate într-o soluție $50 \mu\text{M}$ verbascoidă - 10^{-1} M PBS. Valoarea coeficientului de variație pentru picul anodic determinat în 5 măsurători consecutive în aceeași soluție nu a depășit valoarea de 2,5%. Între măsurători, SPCE/GO-Pentapeptidă a fost clătit cu soluție PBS 10^{-1} M , pH=6,5. Prin urmare, senzorul se poate utiliza în mod repetat pentru determinarea verbascoidelor.

În condiții experimentale optime, a fost evaluat efectul unor posibili interferenți sub formă de compuși organici ce se regăsesc preponderent în EVOO, cum ar fi tirozol, hidroxitirozol și oleuropeina, asupra cuantificării verbascoidelor, utilizând pentru detecție CV. Limita de toleranță a fost definită drept concentrația maximă a compușilor de interferență care determină o eroare relativă de $\pm 5\%$ pentru determinarea cantitativă a verbascoidelor. Rezultatele obținute prezentate arată că picurile aferente prezenței compusului nostru de interes nu se modifică semnificativ la adăugarea interferenților.

X.6. Determinarea cantitativă a verbascoidelor din EVOO

Pentru validarea senzorului SPCE/GO-Pentapeptidă în analiza verbascoidelor din probe reale, au fost selectate și supuse analizei 10 probe de diferite EVOO utilizând pentru determinare metoda CV. Măsurătorile au fost efectuate în domeniul de potențial situat între -0,4 V și 1,0 V, la o viteză de scanare de $0,05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Pentru calculul cantității de verbascoidă din fiecare probă s-a utilizat panta din dreapta de calibrare obținută prin metoda voltametrică, iar rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul X.2. Toate analizele au fost realizate în triplicat.

Tabel X.2. Concentrațiile de verbascoidă ($n=3$) obținute prin metoda voltametrică în probele de EVOO.

Probă EVOO	mg/Kg verbascoidă	RSD ($\pm\%$)
Pietro Coricelli	1,36	0,02
TopSeller Oil	1,42	0,03
Regina	1,38	0,01
Mazza	1,41	0,03
Olitalia	1,49	0,04
Costa d'Oro Il Grezzo	1,54	0,04
Minerva	1,55	0,06
Costa D'Oro L'extra	1,72	0,08
Monastiri	1,36	0,02
Rivano Olio	1,39	0,03

Valorile obținute pentru cele 10 probe de EVOO privind concentrația de verbascoidă sunt apropiate, cea mai mare valoare obținându-se în cazul Costa D'Oro L'extra (Italia).

Precizia metodei exprimată ca deviație standard relativă (RSD) a fost $\pm 2\%$, indicând repetabilitatea metodei.

X.7. Determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH

Am analizat capacitatea verbascoidă de a neutraliza radicalii liberi prin utilizarea testului DPPH, capacitatea de reducere procentuală a radicalilor DPPH fiind calculată conform ecuației prezentate în studiile anterioare. Rezultatele obținute sunt raportate ca medie a valorilor inhibițiilor procentuale pentru toate soluțiile de probă analizate și sunt prezentate în tabelul X.3.

Tabel X.3. Determinarea activității antioxidante a probelor de EVOO studiate

Probă EVOO	% Inhibiție DPPH
Pietro Coricelli	10,31
TopSeller Oil	13,02
Regina	14,44
Mazza	18,67
Olitalia	21,17
Costa d'Oro Il Grezzo	16,28
Minerva	22,91
Costa D'Oro L'extra	24,64
Monastiri	20,30
Rivano Olio	20,62

Din tabelul X.3 reiese că valoarea inhibiției procentuale cea mai mare a fost obținută în cazul produsului Costa D'Oro L'extra (Italia), acest rezultat fiind în concordanță cu valoarea obținută la determinarea cantitativă a verbascoidă din probele de EVOO, unde cea mai mare cantitate de verbascoidă conținută per kilogram EVOO a fost obținută tot în cazul acestui produs.

X.8. Concluzii

În acest studiu este raportată, pentru prima dată, fabricarea unui senzor electrochimic prin modificarea unui SPCE pe bază de GO cu o pentapeptidă conținând secvența NH₂-FESNF-CO-NH₂, utilizat pentru detectarea sensibilă și selectivă a verbascozidei din probe reale cu compoziție complexă, respectiv probe de diferite EVOO. Utilizarea CV ca metodă de detecție a demonstrat performanțe analitice foarte bune cu aplicabilitate în practica de laborator. Studiile cinetice ale proceselor electrochimice au confirmat superioritatea senzorului modificat SPCE/GO-Pentapeptidă față de senzorul SPCE/GO nemodificat, obținând cu SPCE/GO-Pentapeptidă un domeniu larg de liniaritate (0,1-10,55 μM) și, respectiv, o limită de detecție scăzută (9,38 x 10⁻⁸ M). În plus, influența altor specii asupra semnalului electrochimic a fost redusă, datorită specificității favorabile a noului senzor dezvoltat. Mai mult, activitatea antioxidantă a compusului de interes a fost determinată prin metoda DPPH, demonstrând astfel efectul antioxidant al verbascozidei din probele de EVOO.

CAPITOLUL XI. CONCLUZII GENERALE

În urma studiilor efectuate în ultimii ani cu privire la importanța consumului alimentelor bogate în antioxidanți pentru buna funcționare a organismului și pentru a menține un corp sănătos, atât în interior, cât și la exterior, s-a ajuns la concluzia că modul de viață actual, stresul, sedentarismul, poluanții, precum și alți factori modifică necesarul acestor substanțe, fapt ce conduce la nevoia de a completa alimentația cu produsele ce le suplimentează aportul, respectiv suplimentele nutritive și de a utiliza produse cosmetice ce asigură protecția împotriva radicalilor liberi. Formulările nutraceutice existente pe piața farmaceutică pot fi regăsite sub diferite forme de prezentare, compoziția lor complexă în compuși biologic activi fiind, de cele mai multe ori, prezentată doar din punct de vedere calitativ, fără o detaliere și asupra cantității sau a concentrației respectivilor compuși. De asemenea, o importanță deosebită o reprezintă proporția principiilor active din formulările cosmetice, acestea din urmă oferind o gamă largă de beneficii privind sănătatea și frumusețea pielii.

Prin urmare, obiectivul principal îndeplinit al prezentei lucrări a fost de a dezvolta și de a optimiza aplicabilitatea unor noi metodologii de determinare a compușilor activi și de evaluare a activității antioxidante a unor produse nutraceutice și cosmetice, folosind senzori și biosenzori modificați chimic în laborator cu diferite nanomateriale, peptide și enzime. De asemenea, s-au realizat analize comparative a valorilor obținute prin aplicarea metodelor electrochimice și cele rezultate prin aplicarea metodelor spectrofotometrice de determinare a activității antioxidante, precum DPPH, ABTS sau galvinoxil.

Teza cuprinde un studiu teoretic de actualitate, întocmit pe baza unor documentări bibliografice amănunțite prin intermediul literaturii de specialitate, respectiv analiza realizărilor din domeniul nostru de interes, menționate în cea de-a doua parte a lucrării.

Informațiile obținute prin intermediul studiilor discutate în această primă parte a tezei au arătat că:

- Metodele analitice pentru determinarea activității antioxidante se bazează pe reacții chimice, iar evaluarea cineticii sau a atingerii stării de echilibru se realizează cu ajutorul spectrofotometriei.

- Ca metode complementare pentru astfel de studii spectrofotometrice, se pot folosi metodele pe bază de senzori și biosenzori electrochimici, fiind necesare etape de calibrare și validare. Dezvoltarea senzorilor și biosenzorilor a creat o varietate mare de posibilități noi de detecție, precum și oportunități de utilizare eficientă a electroanalizei, aceștia prezentând caracteristici analitice remarcabile, putând deveni instrumente utile în diagnosticul clinic prin determinările lor simple, selective, rapide și sensibile.

- Utilizarea metodelor chimice, împreună cu cele electrochimice poate conduce la elucidarea mecanismelor de acțiune și a cineticii proceselor în care sunt implicați antioxidanții.

- Compușii fenolici sunt considerați antioxidanți veritabili, fiind asociați cu beneficii privind diminuarea riscurilor apariției diferitelor boli degenerative asociate stresului oxidativ prin protejarea constituenților celulari împotriva deteriorării oxidative.

Cea de-a doua parte a prezentei lucrări de cercetare, respectiv partea practică, este reprezentată de contribuțiile personale concretizate în studii experimentale desfășurate în baza a tot ceea ce a fost studiat și analizat în etapa de documentare științifică. Astfel, au fost efectuate analize și determinări electrochimice asupra activității antioxidante a unor produse nutraceutice, cosmetice și alimentare selectate, având în compoziție compuși bioactivi de interes, respectiv acid clorogenic, catechina, acid rozmarinic și verbascosida. În aceste studii

experimentale au fost utilizați senzori serigrafiați pe bază de nanomateriale de carbon modificate chimic în laborator, care au dovedit proprietăți excelente, atât utilizați ca atare, cât și după modificarea cu alți mediatori chimici, enzime sau peptide. Aceste cercetări efectuate au adus originalitate tezei și au condus la următoarele concluzii:

- Studiile efectuate în vederea caracterizării și determinării compușilor bioactivi au fost realizate prin intermediul metodelor voltametrice de analiză, respectiv CV, SWV și DPV. Acestea au contribuit la obținerea unor rezultate originale remarcabile prin optimizarea unor parametri de lucru pentru un semnal cât mai stabil, respectiv viteza de scanare, domeniul de potențial, pH-ul soluțiilor, cantitatea de material modificador, precum și concentrația acestuia.

- Pentru a observa modificările senzorilor obținuți în laborator pe baza mediatorilor chimici și a peptidelor, au fost utilizate două metode, și anume SEM și metoda spectrometrică FT-IR. În cazul biosenzorilor obținuți prin imobilizarea enzimelor pe suprafața senzorilor voltametrici, a fost utilizată, în plus față de cele două tehnici, și metoda EIS. Prin intermediul acesteia au fost evaluați factorii limitativi în ceea ce privește transferul de sarcină și difuzia în sistem pentru fiecare biosenzor.

- Enzimele specifice pot fi utilizate eficient pentru identificarea selectivă a compușilor țintă importanți în controlul calității alimentelor și a produselor farmaceutice. Lacaza și tirozinaza sunt cele două enzime cel mai des utilizate pentru monitorizarea activității antioxidante, în special pentru compușii fenolici, fiind capabile să îi oxideze la compuși chinonici, care sunt electroactivi.

- Peptidele au fost utilizate drept componente sensibile pentru fabricarea de senzori noi capabili să evalueze și să cuantifice conținutul de compuși antioxidanți în probe alimentare reprezentate de uleiuri de măsline sau în produse cosmetice, cu o pregătire minimă a probelor, utilizând ca suport SPCEs, modificate cu un film compozit de GO.

- Prin intermediul metodelor electrochimice s-a reușit determinarea activității antioxidante a probelor de analizat, mai precis pe baza principalilor parametri electrochimici (Epa și Ipa) obținuți în urma măsurătorilor voltametrice, cu obținerea unor corelații foarte bune între aceste date și cele rezultate prin aplicarea metodelor spectrofotometrice pentru analiza probelor respective.

Modificările aduse dispozitivelor electrochimice în laborator au fost de un real succes în ceea ce privește performanțele crescute obținute ulterior la determinările voltametrice, dovedindu-le eficacitate pentru controlul calității formulărilor nutraceutice, a produselor alimentare, aplicabilitatea acestora putând fi extinsă, în viitor, și pe alte tipuri de probe reale, precum probele biologice sau cele de mediu.

CAPITOLUL XII. PERSPECTIVE VIITOARE DE CERCETARE

Plecând de la cercetarea realizată cu aceste dispozitive versatile, respectiv senzorii modificați chimic și biosenzorii enzimatici dezvoltați în laborator, noi direcții în dezvoltarea acestora pentru determinarea activității antioxidante pot fi legate de utilizarea de noi nanomateriale sau compuși polimerici ca mediatori, de utilizarea sistemelor multienzimatice sau a platformelor de imobilizare mai stabile și mai reduse ca dimensiune, de aplicarea dispozitivelor chemometrice în evaluarea datelor experimentale și dezvoltarea biosenzorilor portabili de unică folosință. În plus, îmbunătățirea caracteristicilor electrochimice ale dispozitivelor nou-fabricate prin etape intermediare suplimentare poate conduce la creșterea capacității de funcționare ca senzori sau biosenzori în diverse medii.

Raportându-ne la rezultatele obținute cu senzorii și biosenzorii pentru detecția acidului clorogenic, a catechinei, a acidului rozmarinic și a verbascozidei, rezultate ce sunt comparabile și, în unele cazuri, mai bune decât cele raportate în literatura de specialitate, această lucrare de doctorat elaborată deschide noi perspective legate de:

- Extinderea gamei de compuși fenolici analizați, din diferite probe și în diverse combinații, astfel încât cercetarea să se axeze în principal pe detecția simultană a acestora.
- Obținerea de noi senzori și biosenzori prin modificare cu alte materiale nanocompozite (polimeri, fibre optice) sau biologice (aptameri, ADN sau proteine) și lărgirea spectrului de analiză prin intermediul altor metode, precum voltametria cu scanare liniară sau cronoamperometria.
- Caracterizarea suprafețelor electrozilor în vederea obținerii de informații legate de modificările aduse acestora prin metode precum TEM, AFM etc.
- Aplicarea tehnicilor de analiză multidimensională a datelor ce pot fi extrem de utile pentru studierea asemănarilor și deosebirilor dintre alimente, pe de o parte, și a antioxidantilor, pe de altă parte, precum și stabilirea compușilor caracteristici fiecărei clase de alimente.

Prin urmare, există un potențial semnificativ în acest domeniu de cercetare în scopul de a dezvolta noi dispozitive sensibile, conectate la platforme electronice inteligente pentru detecția diferiților analiți în organism sau pentru efectuarea testelor de rutină în vederea controlului calității produselor farmaceutice, oferind astfel perspective importante pentru numeroase aplicații biomedicale, farmaceutice sau industriale.

CAPITOLUL XIII. VALORIFICAREA ȘI IMPACTUL REZULTATELOR CERCETĂRII

XIII.1. Articole publicate în jurnale cotate ISI

XIII.1.1. Articole publicate din teza de doctorat

➤ 2021

1. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3380, <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>, Factor de impact 4,556, **Q1**;

2. Munteanu, I.-G.; Apetrei, C. Electrochemical Determination of Chlorogenic Acid in Nutraceuticals Using Voltammetric Sensors Based on Screen-Printed Carbon Electrode Modified with Graphene and Gold Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8897. <https://doi.org/10.3390/ijms22168897>, Factor de impact 5,924, **Q1**;

3. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. A Review on Electrochemical Sensors and Biosensors Used in Chlorogenic Acid Electroanalysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13138. <https://doi.org/10.3390/ijms222313138>, Factor de impact 5,924, **Q1**;

➤ 2022

4. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. A Review on Electrochemical Sensors and Biosensors Used in Assessing Antioxidant Activity. *Antioxidants* **2022**, *11*, 584. <https://doi.org/10.3390/antiox11030584>, Factor de impact 6,313, **Q1**;

5. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Tyrosinase-Based Biosensor—A New Tool for Chlorogenic Acid Detection in Nutraceutical Formulations. *Materials* **2022**, *15*, 3221. <https://doi.org/10.3390/ma15093221>, Factor de impact 3,623, **Q1**;

6. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Assessment of the Antioxidant Activity of Catechin in Nutraceuticals: Comparison between a Newly Developed Electrochemical Method and Spectrophotometric Methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8110. <https://doi.org/10.3390/ijms23158110>, Factor de impact 6,208, **Q1**;

7. Munteanu, I.G.; Grădinaru, V.R.; Apetrei, C. Sensitive Detection of Rosmarinic Acid Using Peptide-Modified Graphene Oxide Screen-Printed Carbon Electrode. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 3292. <https://doi.org/10.3390/nano12193292>, Factor de impact 5,719, **Q1**;

8. Munteanu, I.G.; Grădinaru, V.R.; Apetrei, C. Development of a Chemically Modified Sensor Based on a Pentapeptide and Its Application for Sensitive Detection of Verbascoside in Extra Virgin Olive Oil. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15704. <https://doi.org/10.3390/ijms232415704>, Factor de impact 6,208, **Q1**.

XIII.1.2. Articole publicate conexe temei de cercetare

➤ 2023

9. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Classification and Antioxidant Activity Evaluation of Edible Oils by Using Nanomaterial-Based Electrochemical Sensors. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3010. <https://doi.org/10.3390/ijms24033010>, Factor de impact 6,208, **Q1**.

Factor de impact cumulat: 50,683 WOS

XIII.2. Lucrări și postere prezentate la conferințe internaționale

➤ **2020**

1. Irina – Georgiana Bulgaru (Munteanu), Constantin Apetrei, Detection of p-coumaric acid with electrochemical sensors, International online Conference – 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 259, Galați, România, June 18-19, 2020, **poster**;

2. Irina – Georgiana Bulgaru (Munteanu), Dorin Dăscălescu, Constantin Apetrei, Nanocomposite sensor for sensitive detection of catechol, International online Conference – 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 259, Galați, România, June 18-19, 2020, **poster**;

3. Ancuța Dinu, Dorin Dăscălescu, **Irina – Georgiana Munteanu**, Alexandra Virginia Bounegru, Ramona-Oana Roșca, Constantin Apetrei, Electrochemical sensors based on nanomaterials employed in water analysis, 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 258, Galați, România, June 18-19, 2020, **poster**;

4. Irina – Georgiana Bulgaru (Munteanu), Constantin Apetrei, Electrochemical determination of catechol based on carbon electrode modified with graphene and gold nanoparticles, The 5th International Conference „New Trends on Sensing-Monitoring-Telediagnosis for Life Science NT-SMT-LS 2020”, Book of abstracts, pp.106, Brașov, România, July 3-4, 2020, **poster**.

➤ **2021**

5. Irina – Georgiana Bulgaru (Munteanu), Constantin Apetrei, Detection of chlorogenic acid with electrochemical sensors, International online Conference – 9th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 270, Galați, România, June 10-11, 2021, **poster**;

6. Irina – Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei, Electrochemical determination of chlorogenic acid in pharmaceutical products, The 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry, July 1-15 2021, **poster**;

7. Constantin Apetrei, Alexandra Virginia Bounegru, **Irina - Georgiana Munteanu**, Irina Mirela Apetrei, Electrochemical sensors and biosensors based on polypyrrole for detection of phenolic compounds in olive oils, International online Conference – 9th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 117, Galați, România, June 10-11, 2021, **prezentare online**;

8. Constantin Apetrei, Alexandra Virginia Bounegru, **Irina - Georgiana Munteanu**, Irina Mirela Apetrei, Development of a sensitive method for the voltammetric detection of phenolic compounds in extra virgin olive oils, The 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry, July 1-15 2021, **poster**;

9. Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Dorin Dăscălescu, **Irina-Georgiana Munteanu (Bulgaru)**, Ramona-Oana Roșca (Gunache), Detection of Amino Acids L-Phenylalanine, L-Tyrosine and L-Tryptophan with Biosensors based on Polypyrrole, Exploratory Workshop NeXT-Chem III, Book of abstracts, pp. 11, May 27-28, 2021, București, România, **prezentare orală**;

10. Alexandra Virginia Bounegru (Mereșescu), Constantin Apetrei, **Irina – Georgiana Munteanu (Bulgaru)**, Ramona – Oana Roșca (Gunache), Development of biosensors for the

hydroxycinnamic acids analysis, Exploratory Workshop NeXT-Chem III, Book of abstracts, pp. 10, May 27-28, 2021, București, România, **prezentare orală**;

➤ **2022**

11. Irina – Georgiana Bulgaru (Munteanu), Constantin Apetrei, Sensitive properties of a screen printed carbon electrode modified with graphene, manganese phthalocyanine and tyrosinase for voltammetric detection of chlorogenic acid, 10th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 92, Galați, România, June 9-10, 2022, **prezentare orală**;

12. Irina – Georgiana Bulgaru (Munteanu), Constantin Apetrei, Laccase biosensors based on screen-printed electrode modified with carbon nanotubes and gold nanoparticles for catechin detection in nutraceutical formulations, 10th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 243, Galați, România, June 9-10, 2022, **poster**;

13. Alexandra Virginia Bounegru, Irina - Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei, Development of an electroanalytical method for detecting adulteration of extra virgin olive oils, 10th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 41, Galați, România, June 9-10, 2022, **prezentare orală**;

14. Irina – Georgiana Bulgaru (Munteanu), Constantin Apetrei, Comparative study on the antioxidant activity of extra virgin olive oil samples using a newly developed electrochemical method and DPPH spectrophotometric assay, The 6th International Conference „New Trends on Sensing-Monitoring-Telediagnosis for Life Science NT-SMT-LS 2022”, Book of abstracts, Brașov, România, September, 8-10, 2022, **poster**;

15. Irina – Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei, Electroanalytical method for determination of rosmarinic acid based on chemically modified sensors, The International Symposium PRIOrities of CHEMistry for a sustainable development, Priochem, Book of Abstracts, pp. 24, București, România, October, 26-28, 2022, **prezentare orală**;

16. Constantin Apetrei, Andreea Loredana Comănescu, Andrei Daniel Geman, Irina Georgiana Munteanu, Alexandra Virginia Bounegru, Irina Mirela Apetrei, Elisabeta Irina Geană, Electrochemical (bio)sensor array coupled with multivariate data analysis for the assessment of virgin olive oil quality, The International Symposium PRIOrities of CHEMistry for a sustainable development, Priochem, Book of Abstracts, pp. 11, București, România, October, 26-28, 2022, **prezentare orală**;

➤ **2023**

17. Irina Mirela Apetrei, Alexandra Virginia Bounegru, Irina Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei, Detection of olive oils adulteration with electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and enzymes, The 18th International Conference of Constructive Design and Technological Optimization in Machine Building Field, OPROTEH 2023, Book of Abstracts, pp. 79, Bacău, România, May, 11-13, 2023, **prezentare orală**.

18. Irina – Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei, Electrochemical peptide-based Sensor for direct detection and quantification of verbascoside in extra virgin olive oil, 11th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 106, Galați, România, June 8-9, 2023, **prezentare orală**;

19. Irina – Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei, Nanomaterial-based electrochemical sensors for antioxidant activity evaluation and discrimination of vegetable oils, 11th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 106, Galați, România, June 8-9, 2023, **prezentare orală**.

XIII.3. Premiarea rezultatelor cercetării

➤ **2020**

Premiul al III-lea - Irina – Georgiana Bulgaru (Munteanu), Dorin Dăscălescu, Constantin Apetrei, Nanocomposite sensor for sensitive detection of catechol, International online Conference – 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 259, Galați, România, June 18-19, 2020, **poster**.

➤ **2021**

Premiul al II-lea GALA CEREX IOSUD UDJG (Gala Cercetării de Excelență – Premiarea rezultatelor cercetării științifice doctorale – Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați) - Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 3380, <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>, Factor de impact 4,556, Review;

Mențiune I - Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Dorin Dăscălescu, Irina-Georgiana Munteanu (Bulgaru), Ramona-Oana Roșca (Gunache), Detection of Amino Acids L-Phenylalanine, L-Tyrosine and L-Tryptophan with Biosensors based on Polypyrrole, Exploratory Workshop NeXT-Chem III, Book of abstracts, pp. 11, May 27-28, 2021, București, România, **Conferință Internațională – online, prezentare orală**.

➤ **2022**

Premiul I - Irina – Georgiana Bulgaru (Munteanu), Constantin Apetrei, Sensitive properties of a screen printed carbon electrode modified with graphene, manganese phthalocyanine and tyrosinase for voltammetric detection of chlorogenic acid, 10th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 92, Galați, România, June 9-10, 2022, **prezentare orală**;

PRIOCHEM 2022 AWARD for the work entitled: "Electroanalytical Method for Determination of Rosmarinic Acid Based on Chemically Modified Sensors", **Irina – Georgiana Munteanu**, Constantin Apetrei, **prezentare orală**;

Premiul I GALA CEREX IOSUD UDJG (Gala Cercetării de Excelență – Premiarea rezultatelor cercetării științifice doctorale – Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați)- Munteanu, I.G.; Apetrei, C. A Review on Electrochemical Sensors and Biosensors Used in Assessing Antioxidant Activity. *Antioxidants* **2022**, 11, 584. <https://doi.org/10.3390/antiox11030584>, Factor de impact 6,313, Review.

➤ **2023**

Premiul I - Irina – Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei, Nanomaterial-based electrochemical sensors for antioxidant activity evaluation and discrimination of vegetable oils, 11th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos”

University of Galați, Book of abstracts, pp. 106, Galați, România, June 8-9, 2023, **prezentare orală.**

XIII.4. Activități conexe desfășurate în cadrul programului individual de studii universitare de doctorat

- ✓ **Asistent de cercetare** în cadrul proiectului „*Noi biosenzori și instrumente inteligente pentru detecția ultrasensibilă a falsificării uleiurilor de măsline*”, **PN-III-P4-ID-PCE-2020-0923**, perioada 10.03.2021-31.12.2023.
- ✓ **Membră a grupului țintă în cadrul Proiectului** „*Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență*” – **PROINVENT**, cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Capital Uman, 2014-2020, Contract nr. 62487/03.06.2022, POCU/993/6/13 – Cod SMIS: 153299.
- ✓ **Membră a echipei Centrului European de Excelență pentru Mediu (ECEE).**
- ✓ Participare la cursuri, seminarii, workshop-uri, stagii de practică organizate de Școala Doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești, precum și la cele din cadrul proiectului PROINVENT.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] B. N. Ames, L. S. Gold, and W. C. Willett, "The causes and prevention of cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 12, pp. 5258–5265, Jun. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.12.5258.
- [2] M. J. Duncan, C. E. Kline, C. Vandelanotte, C. Sargent, N. L. Rogers, and L. D. Milia, "Cross-Sectional Associations between Multiple Lifestyle Behaviors and Health-Related Quality of Life in the 10,000 Steps Cohort," *PLOS ONE*, vol. 9, no. 4, p. e94184, Apr. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094184.
- [3] M. Samtiya, R. E. Aluko, T. Dhewa, and J. M. Moreno-Rojas, "Potential Health Benefits of Plant Food-Derived Bioactive Components: An Overview," *Foods Basel Switz.*, vol. 10, no. 4, p. 839, Apr. 2021, doi: 10.3390/foods10040839.
- [4] S.-C. Litescu and G.-L. Radu, "Estimation of the antioxidative properties of tocopherols – an electrochemical approach," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 211, no. 3, pp. 218–221, Aug. 2000, doi: 10.1007/s002170050027.
- [5] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, May 2005, doi: 10.1021/jf0502698.
- [6] Y. Pang *et al.*, "Bound phenolic compounds and antioxidant properties of whole grain and bran of white, red and black rice," *Food Chem.*, vol. 240, pp. 212–221, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.095.
- [7] P. Laganà *et al.*, "Phenolic Substances in Foods and Anticarcinogenic Properties: A Public Health Perspective," *J. AOAC Int.*, vol. 103, Jun. 2020, doi: 10.1093/jaoacint/qs028.
- [8] A. M. Delgado, M. Issaoui, and N. Chammem, "Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods," *J. AOAC Int.*, vol. 102, no. 5, pp. 1356–1364, Sep. 2019, doi: 10.5740/jaoacint.19-0128.
- [9] "Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, New York: Wiley, 2001, 2nd ed.," *Russ. J. Electrochem.*, vol. 38, no. 12, pp. 1364–1365, Dec. 2002, doi: 10.1023/A:1021637209564.
- [10] O. I. Aruoma, "Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 75, no. 2, pp. 199–212, 1998, doi: 10.1007/s11746-998-0032-9.
- [11] R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, and E. Çapanoğlu, "Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 64, no. 5, pp. 997–1027, Feb. 2016, doi: 10.1021/acs.jafc.5b04739.
- [12] H. Moharram and M. Youssef, "Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review," *Alex J Fd Sci Technol*, vol. 11, pp. 31–42, Jan. 2014.
- [13] I. G. Munteanu and C. Apetrei, "Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 7, p. 3380, Mar. 2021, doi: 10.3390/ijms22073380.
- [14] A. Scalbert, C. Morand, C. Manach, and C. Rémésy, "Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 56, no. 6, pp. 276–282, Aug. 2002, doi: 10.1016/S0753-3322(02)00205-6.
- [15] N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses," *Food Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
- [16] Y. Liu *et al.*, "Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination," *Food Chem.*, vol. 186, pp. 46–53, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.122.
- [17] G. Li, X. Wang, Y. Xu, B. Zhang, and X. Xia, "Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus*," *Eur. Food Res. Technol.*, 2014, Accessed: Oct. 01, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2140-5>

-
- [18] Y. V. Vereshchagina *et al.*, "The rolC gene increases caffeoylquinic acid production in transformed artichoke cells," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 18, pp. 7773–7780, Sep. 2014, doi: 10.1007/s00253-014-5869-2.
- [19] J. Santana-Gálvez, E. Pérez-Carrillo, H. H. Velázquez-Reyes, L. Cisneros-Zevallos, and D. A. Jacobo-Velázquez, "Application of wounding stress to produce a nutraceutical-rich carrot powder ingredient and its incorporation to nixtamalized corn flour tortillas," *J. Funct. Foods*, vol. C, no. 27, pp. 655–666, 2016, doi: 10.1016/j.jff.2016.10.020.
- [20] S. Bhattacharyya, S. Majhi, B. P. Saha, and P. K. Mukherjee, "Chlorogenic acid–phospholipid complex improve protection against UVA induced oxidative stress," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 130, pp. 293–298, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.11.020.
- [21] A. M. Torres-Contreras, V. Nair, L. Cisneros-Zevallos, and D. A. Jacobo-Velázquez, "Plants as biofactories: Stress-induced production of chlorogenic acid isomers in potato tubers as affected by wounding intensity and storage time," *Ind. Crops Prod.*, vol. Complete, no. 62, pp. 61–66, 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.08.018.
- [22] A. Karunanidhi, R. Thomas, A. van Belkum, and V. Neela, "In vitro antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* including the trimethoprim/sulfamethoxazole resistant strain," *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 392058, 2013, doi: 10.1155/2013/392058.
- [23] R. Niggeweg, A. J. Michael, and C. Martin, "Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid," *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 6, pp. 746–754, Jun. 2004, doi: 10.1038/nbt966.
- [24] Y. C. Fiamegos *et al.*, "Antimicrobial and efflux pump inhibitory activity of caffeoylquinic acids from *Artemisia absinthium* against gram-positive pathogenic bacteria," *PloS One*, vol. 6, no. 4, p. e18127, Apr. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0018127.
- [25] H.-J. Luo, J.-Z. Wang, J.-F. Chen, and K. Zou, "Docking study on chlorogenic acid as a potential H5N1 influenza A virus neuraminidase inhibitor," *Med. Chem. Res.*, vol. 20, pp. 554–557, Jun. 2011, doi: 10.1007/s00044-010-9336-z.
- [26] S. Meng, J. Cao, Q. Feng, J. Peng, and Y. Hu, "Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review," *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM*, vol. 2013, p. 801457, 2013, doi: 10.1155/2013/801457.
- [27] Y. Zhao, J. Wang, O. Balleve, H. Luo, and W. Zhang, "Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids," *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.*, vol. 35, no. 4, pp. 370–374, Apr. 2012, doi: 10.1038/hr.2011.195.
- [28] J. Bae, N. Kim, Y. Shin, S.-Y. Kim, and Y.-J. Kim, "Activity of catechins and their applications," *Biomed. Dermatol.*, vol. 4, no. 1, p. 8, Feb. 2020, doi: 10.1186/s41702-020-0057-8.
- [29] M. Shi, Y. Nie, X.-Q. Zheng, J.-L. Lu, Y.-R. Liang, and J.-H. Ye, "Ultraviolet B (UVB) Photosensitivities of Tea Catechins and the Relevant Chemical Conversions," *Mol. Basel Switz.*, vol. 21, no. 10, p. 1345, Oct. 2016, doi: 10.3390/molecules21101345.
- [30] J. Arct, A. Oborska, M. Mojski, A. Binkowska, and B. Swidzikowska, "Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids," *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 24, pp. 357–66, Jan. 2003, doi: 10.1046/j.1467-2494.2002.00166.x.
- [31] A. Gulati *et al.*, "Catechin and catechin fractions as biochemical markers to study the diversity of Indian tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) germplasm," *Chem. Biodivers.*, vol. 6, no. 7, pp. 1042–1052, Jul. 2009, doi: 10.1002/cbdv.200800122.
- [32] T. Matsubara, I. Wataoka, H. Urakawa, and H. Yasunaga, "Effect of reaction pH and CuSO₄ addition on the formation of catechinone due to oxidation of (+)-catechin," *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 35, no. 4, pp. 362–367, Aug. 2013, doi: 10.1111/ics.12051.
- [33] E. Kim *et al.*, "Skin Protective Effect of Epigallocatechin Gallate," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 1, p. 173, Jan. 2018, doi: 10.3390/ijms19010173.
- [34] N. A. Al-Dhabi, M. V. Arasu, C. H. Park, and S. U. Park, "Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities," *EXCLI J.*, vol. 13, pp. 1192–1195,

- Oct. 2014, Accessed: Aug. 03, 2022. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464312/>
- [35] D. C. Costa, H. S. Costa, T. G. Albuquerque, F. Ramos, M. C. Castilho, and A. Sanches-Silva, "Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 45, no. 2, pp. 336–354, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.tifs.2015.06.009.
- [36] J. Teixeira, A. Gaspar, E. M. Garrido, J. Garrido, and F. Borges, "Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview," *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, pp. 1–11, 2013, doi: 10.1155/2013/251754.
- [37] F. Shahidi and A. Chandrasekara, "Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities," *Phytochem. Rev.*, vol. 9, no. 1, pp. 147–170, Mar. 2010, doi: 10.1007/s11101-009-9142-8.
- [38] E. F. Newair, R. Abdel-Hamid, and P. A. Kilmartin, "Mechanism of Chicoric Acid Electrochemical Oxidation and Identification of Oxidation Products by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry," *Electroanalysis*, vol. 29, no. 3, pp. 850–860, Mar. 2017, doi: 10.1002/elan.201600596.
- [39] K. V. Özdokur and Ç. C. Koçak, "Simultaneous Determination of Rosmarinic Acid and Protocatechuic Acid at Poly(o-Phenylenediamine)/Pt Nanoparticles Modified Glassy Carbon Electrode," *Electroanalysis*, vol. 31, no. 12, pp. 2359–2367, Dec. 2019, doi: 10.1002/elan.201900144.
- [40] I. G. David, D. E. Popa, M. Buleandă, and M. C. Cheregi, "Electrochemical Methods and (Bio) Sensors for Rosmarinic Acid Investigation," *Chemosensors*, vol. 8, no. 3, p. 74, Aug. 2020, doi: 10.3390/chemosensors8030074.
- [41] S. Moreno, T. Scheyer, C. S. Romano, and A. A. Vojnov, "Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition," *Free Radic. Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 223–231, Jan. 2006, doi: 10.1080/10715760500473834.
- [42] R. Sotnikova *et al.*, "Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 65, no. 5, pp. 713–723, Apr. 2013, doi: 10.1111/jphp.12037.
- [43] K. Lou *et al.*, "Rosmarinic acid stimulates liver regeneration through the mTOR pathway," *Phytomedicine*, vol. 23, no. 13, pp. 1574–1582, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.phymed.2016.09.010.
- [44] S. Nunes *et al.*, "Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid—Cytoprotective properties and pharmacokinetic profile," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 9, pp. 1799–1806, Jun. 2017, doi: 10.1080/10408398.2015.1006768.
- [45] S. Bittner Fialová *et al.*, "Derivatization of Rosmarinic Acid Enhances its in vitro Antitumor, Antimicrobial and Antiprotozoal Properties," *Molecules*, vol. 24, no. 6, p. 1078, Mar. 2019, doi: 10.3390/molecules24061078.
- [46] A. A. Fonteles *et al.*, "Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice," *Behav. Brain Res.*, vol. 297, pp. 91–103, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.bbr.2015.09.029.
- [47] R. Ciriminna, F. Meneguzzo, A. Fidalgo, L. M. Ilharco, and M. Pagliaro, "Extraction, benefits and valorization of olive polyphenols," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 118, no. 4, pp. 503–511, Apr. 2016, doi: 10.1002/ejlt.201500036.
- [48] S. Cicerale, L. Lucas, and R. Keast, "Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, no. 2, pp. 458–479, Feb. 2010, doi: 10.3390/ijms11020458.
- [49] M. Stankevičius, I. Akuņeca, I. Jākobsone, and A. Maruška, "Comparative analysis of radical scavenging and antioxidant activity of phenolic compounds present in everyday use spice plants by means of spectrophotometric and chromatographic methods," *J. Sep. Sci.*, vol. 34, no. 11, pp. 1261–1267, 2011, doi: 10.1002/jssc.201000915.
- [50] L. Magnani, E. M. Gaydou, and J. C. Hubaud, "Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion," *Anal. Chim. Acta*, vol. 411, no. 1, pp. 209–216, May 2000, doi: 10.1016/S0003-2670(00)00717-0.

-
- [51] M. C. Christodoulou *et al.*, "Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals," *Antioxidants*, vol. 11, no. 11, Art. no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/antiox11112213.
- [52] A. Benítez-Estrada, J. Villanueva-Sánchez, G. González-Rosendo, V. E. Alcántar-Rodríguez, R. Puga-Díaz, and A. G. Quintero-Gutiérrez, "Determination of the total antioxidant capacity of food and human plasma by photochemiluminescence: Correlation with spectrophotometric (FRAP) and fluorometric (ORAC) assays," *TIP Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas*, vol. 23, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2020, Accessed: Dec. 05, 2022. [Online]. Available: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=97332>
- [53] J. S. Wright, E. R. Johnson, and G. A. DiLabio, "Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 6, pp. 1173–1183, Feb. 2001, doi: 10.1021/ja002455u.
- [54] K.-M. Yoo, D.-O. Kim, and C.-Y. Lee, "Evaluation of Different Methods of Antioxidant Measurement," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 16, no. 2, pp. 177–182, 2007, Accessed: Dec. 06, 2022. [Online]. Available: <https://koreascience.kr/article/JAKO200735822363072.page>
- [55] A. Siddeeg, N. M. AlKehayez, H. A. Abu-Hiamed, E. A. Al-Sanea, and A. M. AL-Farga, "Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 28, no. 3, pp. 1633–1644, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.064.
- [56] V. Lates, J.-L. Marty, and I. C. Popescu, "Determination of Antioxidant Capacity by Using Xanthine Oxidase Bioreactor Coupled with Flow-through H₂O₂ Amperometric Biosensor," *Electroanalysis*, vol. 23, no. 3, pp. 728–736, 2011, doi: 10.1002/elan.201000544.
- [57] A. Hayat and J. L. Marty, "Disposable screen printed electrochemical sensors: tools for environmental monitoring," *Sensors*, vol. 14, no. 6, pp. 10432–10453, Jun. 2014, doi: 10.3390/s140610432.
- [58] B. Pérez-López and A. Merkoçi, "Nanomaterials based biosensors for food analysis applications," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 22, no. 11, pp. 625–639, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.tifs.2011.04.001.
- [59] K. Z. Brainina, L. G. Galperin, and A. L. Galperin, "Mathematical modeling and numerical simulation of metal nanoparticles electrooxidation," *J. Solid State Electrochem.*, vol. 6, no. 14, pp. 981–988, 2010, doi: 10.1007/s10008-009-0897-z.
- [60] J. F. Arteaga, M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado, and J. M. Rodríguez-Mellado, "Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles," *Mol. Basel Switz.*, vol. 17, no. 5, pp. 5126–5138, May 2012, doi: 10.3390/molecules17055126.
- [61] K. A. Erickson and P. Wilding, "Evaluation of a novel point-of-care system, the i-STAT portable clinical analyzer," *Clin. Chem.*, vol. 39, no. 2, pp. 283–287, Feb. 1993.
- [62] B. Serra, Á. J. Reviejo, and J. M. Pingarrón, "Chapter 13 Application of electrochemical enzyme biosensors for food quality control," in *Comprehensive Analytical Chemistry*, S. Alegret and A. Merkoçi, Eds., in *Electrochemical Sensor Analysis*, vol. 49. Elsevier, 2007, pp. 255–298. doi: 10.1016/S0166-526X(06)49013-9.
- [63] I. Y. L. de Macêdo *et al.*, "Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts," *Food Chem.*, vol. 217, pp. 326–331, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.08.082.
- [64] Y. Wee, S. Park, Y. H. Kwon, Y. Ju, K.-M. Yeon, and J. Kim, "Tyrosinase-immobilized CNT based biosensor for highly-sensitive detection of phenolic compounds," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 132, pp. 279–285, May 2019, doi: 10.1016/j.bios.2019.03.008.
- [65] M. M. Rodríguez-Delgado *et al.*, "Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 21–45, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.trac.2015.05.008.

-
- [66] N. Stasyuk, G. Gayda, A. Zakalskiy, O. Zakalska, R. Serkiz, and M. Gonchar, "N. Stasyuk, G. Gayda, A. Zakalskiy, O. Zakalska, R. Serkiza, M. Gonchar, Amperometric biosensors based on oxidases and PtRu nanoparticles as artificial peroxidase, *Food Chem.* 285 (2019) 213e220," *Food Chem.*, vol. 285, pp. 213–220, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.117.
- [67] X. Cetó, F. Céspedes, M. I. Pividori, J. M. Gutiérrez, and M. Del Valle, "Resolution of phenolic antioxidant mixtures employing a voltammetric bio-electronic tongue," vol. 137, no. 2, pp. 349–356, Jan. 2012, doi: 10.1039/c1an15456g.
- [68] Z. Zhang, J. Liu, J. Fan, Z. Wang, and L. Li, "Detection of catechol using an electrochemical biosensor based on engineered *Escherichia coli* cells that surface-display laccase," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1009, pp. 65–72, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.01.008.
- [69] A. V. Bounegru and C. Apetrei, "Sensitive Detection of Hydroxytyrosol in Extra Virgin Olive Oils with a Novel Biosensor Based on Single-Walled Carbon Nanotubes and Tyrosinase," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 16, Art. no. 16, Jan. 2022, doi: 10.3390/ijms23169132.
- [70] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Fundamentals of analytical chemistry / Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch.*, Ninth edition. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2014.
- [71] F. Harnisch and S. Freguia, "A Basic Tutorial on Cyclic Voltammetry for the Investigation of Electroactive Microbial Biofilms," *Chem. – Asian J.*, vol. 7, no. 3, pp. 466–475, 2012, doi: 10.1002/asia.201100740.
- [72] J. V. Piovesan, C. L. Jost, and A. Spinelli, "Electroanalytical determination of total phenolic compounds by square-wave voltammetry using a poly(vinylpyrrolidone)-modified carbon-paste electrode," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 216, pp. 192–197, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.snb.2015.04.031.
- [73] D. Souza, S. A. s Machado, and L. Avaca, "Square wave voltammetry. Part I: Theoretical aspects," *Quím. Nova*, vol. 26, pp. 81–89, Jan. 2003.
- [74] E. F. Newair, R. Abdel-Hamid, and P. A. Kilmartin, "Electrochemical Determination of the Antioxidant Activity in *Echinacea Purpurea* Roots Using Square Wave Voltammetry," *Electroanalysis*, vol. 29, no. 4, pp. 1131–1140, Apr. 2017, doi: 10.1002/elan.201600753.
- [75] M. A. Haque, K. Morozova, G. Ferrentino, and M. Scampicchio, "Electrochemical Methods to Evaluate the Antioxidant Activity and Capacity of Foods: A Review," *Electroanalysis*, vol. 33, no. 6, pp. 1419–1435, 2021, doi: 10.1002/elan.202060600.
- [76] J. Hoyos-Arbeláez, M. Vázquez, and J. Contreras-Calderón, "Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review," *Food Chem.*, vol. 221, pp. 1371–1381, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.017.
- [77] K. Y. H. Nagao, C. A. R. Salamanca-Neto, B. Coldibeli, and E. R. Sartori, "A differential pulse voltammetric method for submicromolar determination of antihistamine drug desloratadine using an unmodified boron-doped diamond electrode," *Anal. Methods*, vol. 12, no. 8, pp. 1115–1121, Feb. 2020, doi: 10.1039/C9AY02785H.
- [78] G. S. Vasyliiev, V. I. Vorobyova, and O. V. Linyucheva, "Evaluation of Reducing Ability and Antioxidant Activity of Fruit Pomace Extracts by Spectrophotometric and Electrochemical Methods," *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2020, p. 8869436, Dec. 2020, doi: 10.1155/2020/8869436.
- [79] S. Peng *et al.*, "Novel functional hybrid silica sol–gel coating for copper protection via in situ thiol–ene click reaction," *RSC Adv.*, vol. 4, p. 15776, Mar. 2014, doi: 10.1039/c4ra00142g.
- [80] S. Mahvidi, M. Gharagozlou, M. Mahdavian, and S. Naghibi, "Potency of ZnFe₂O₄ Nanoparticles as Corrosion Inhibitor for Stainless Steel; the Pigment Extract Study," *Mater. Res.*, vol. 20, Nov. 2017, doi: 10.1590/1980-5373-mr-2016-0772.

-
- [81] P. Letardi, "Electrochemical impedance measurements in the conservation of metals," pp. 15–39, Dec. 2000, doi: 10.1016/B978-044450487-6/50048-1.
- [82] S. Halde, A. Mungantiwar, and M. Chintamaneni, "Simple, Precise and Accurate HPLC Method of Analysis for Nevirapine Suspension from Human Plasma," *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 73, no. 4, pp. 416–421, 2011, doi: 10.4103/0250-474X.95626.
- [83] D. Üçüncüoğlu and V. A. Küçük, "A multivariate data approach for FTIR-ATR monitoring of virgin olive oils: Lipid structure during autoxidation," *OCL*, vol. 26, p. 42, 2019, doi: 10.1051/ocl/2019043.
- [84] A. Rohman, Y. bin Che Man, A. Ismail, and P. Hashim, "FTIR spectroscopy coupled with chemometrics of multivariate calibration and discriminant analysis for authentication of extra virgin olive oil," *Int. J. Food Prop.*, vol. 20, no. sup1, pp. S1173–S1181, Dec. 2017, doi: 10.1080/10942912.2017.1336718.
- [85] B. M. Simonet and M. Valcárcel, "Monitoring nanoparticles in the environment," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, no. 1, pp. 17–21, Jan. 2009, doi: 10.1007/s00216-008-2484-z.
- [86] A. C. Janaki, E. Sailatha, and S. Gunasekaran, "Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 144, pp. 17–22, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.saa.2015.02.041.
- [87] A. Abdullah and A. Mohammed, "Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review," Jan. 2019.
- [88] A. V. Bounegru and C. Apetrei, "Carbonaceous Nanomaterials Employed in the Development of Electrochemical Sensors Based on Screen-Printing Technique—A Review," *Catalysts*, vol. 10, no. 6, p. 680, Jun. 2020, doi: 10.3390/catal10060680.
- [89] W. de J. R. Santos, M. Santhiago, I. V. P. Yoshida, and L. T. Kubota, "Novel electrochemical sensor for the selective recognition of chlorogenic acid," *Anal. Chim. Acta*, vol. 695, no. 1–2, pp. 44–50, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.03.018.
- [90] Council of Europe, European Pharmacopoeia Commission, and European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, *European pharmacopoeia*. Strasbourg: Council Of Europe : European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, 2010.
- [91] A. V. Bounegru and C. Apetrei, "Development of a Novel Electrochemical Biosensor Based on Carbon Nanofibers-Gold Nanoparticles-Tyrosinase for the Detection of Ferulic Acid in Cosmetics," *Sensors*, vol. 20, no. 23, p. E6724, Nov. 2020, doi: 10.3390/s20236724.
- [92] C. Apetrei, J. A. de Saja, J. Zurro, and M. L. Rodríguez-Méndez, "Advantages of the Biomimetic Nanostructured Films as an Immobilization Method vs. the Carbon Paste Classical Method," *Catalysts*, vol. 2, no. 4, Art. no. 4, Dec. 2012, doi: 10.3390/catal2040517.
- [93] Q. Zhao, L. Guan, Z. Gu, and Q. Zhuang, "Determination of Phenolic Compounds Based on the Tyrosinase- Single Walled Carbon Nanotubes Sensor," *Electroanalysis*, vol. 17, no. 1, pp. 85–88, 2005, doi: 10.1002/elan.200403123.
- [94] K. Streffer *et al.*, "Determination of phenolic compounds using recombinant tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*," *Anal. Chim. Acta*, vol. 427, no. 2, pp. 201–210, Jan. 2001, doi: 10.1016/S0003-2670(00)01040-0.
- [95] Md. M. Rahman, Md. B. Islam, M. Biswas, and A. H. M. Khurshid Alam, "In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh," *BMC Res. Notes*, vol. 8, no. 1, p. 621, Oct. 2015, doi: 10.1186/s13104-015-1618-6.
- [96] N. Amini *et al.*, "The development of a new electrochemical sensor based on Cu₂O@C core-shell and polyalizarin/nafion polymers for determination of bisphenol A at two area potentials," *Surf. Interfaces*, vol. 23, p. 100917, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.surfin.2020.100917.
- [97] G. Manasa, R. J. Mascarenhas, A. K. Satpati, O. J. D'Souza, and A. Dhason, "Facile preparation of poly(methylene blue) modified carbon paste electrode for the detection

- and quantification of catechin,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 73, pp. 552–561, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2016.12.114.
- [98] Mohammad. Bagher. Gholivand, Mojtaba. Shamsipur, and Nader. Amini, “Nonenzymatic L-lysine amino acid detection using titanium oxide nanoparticles/multi wall carbon nanotube composite electrodes,” *Electrochimica Acta*, vol. 123, pp. 569–575, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.electacta.2013.12.190.
- [99] C. Liu *et al.*, “Construction of a Highly Selective and Sensitive Dopamine Enzyme-free Biosensor Based on Carbon Nanomaterials,” *Electroanalysis*, doi: 10.1002/elan.202100094.
- [100] E. Rodríguez-Sevilla, M.-T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, P. Ibarra-Escutia, and M. Palomar-Pardavé, “Electrochemical Quantification of the Antioxidant Capacity of Medicinal Plants Using Biosensors,” *Sensors*, vol. 14, no. 8, Art. no. 8, Aug. 2014, doi: 10.3390/s140814423.
- [101] M. Guo *et al.*, “Amperometric catechol biosensor based on laccase immobilized on nitrogen-doped ordered mesoporous carbon (N-OMC)/PVA matrix,” *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 15, no. 3, p. 035005, Jun. 2014, doi: 10.1088/1468-6996/15/3/035005.
- [102] M. Mascini, I. Palchetti, and S. Tombelli, “Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Fundamentals and Bioanalytical Aspects,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 51, no. 6, pp. 1316–1332, Feb. 2012, doi: 10.1002/anie.201006630.
- [103] M. Puiu and C. Bala, “Peptide-based biosensors: From self-assembled interfaces to molecular probes in electrochemical assays,” *Bioelectrochemistry*, vol. 120, pp. 66–75, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.bioelechem.2017.11.009.
- [104] P. S. Sfragano, G. Moro, F. Polo, and I. Palchetti, “The Role of Peptides in the Design of Electrochemical Biosensors for Clinical Diagnostics,” *Biosensors*, vol. 11, no. 8, p. 246, Jul. 2021, doi: 10.3390/bios11080246.
- [105] M. Ma *et al.*, “Graphene Oxide Modified DNA Electrochemical Biosensors,” *Appl. Mech. Mater.*, vol. 155–156, pp. 82–86, Feb. 2012, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.155-156.82.
- [106] L. Liao and C. Pan, “Enhanced Electrochemical Capacitance of Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes Synthesized from Amine Flames,” *Soft Nanosci. Lett.*, vol. 1, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2011, doi: 10.4236/snsl.2011.11004.
- [107] J. Chen, Q. Chen, and Q. Ma, “Influence of surface functionalization via chemical oxidation on the properties of carbon nanotubes,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 370, no. 1, pp. 32–38, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.jcis.2011.12.073.
- [108] Q. He *et al.*, “Centimeter-Long and Large-Scale Micropatterns of Reduced Graphene Oxide Films: Fabrication and Sensing Applications,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 6, pp. 3201–3208, Jun. 2010, doi: 10.1021/nn100780v.
- [109] S. Danielsen *et al.*, “Molecular Characterization of Polymer Networks,” *Chem. Rev.*, vol. 121, Apr. 2021, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01304.
- [110] J. Liu, S. Fu, B. Yuan, Y. Li, and Z. Deng, “Toward a Universal ‘Adhesive Nanosheet’ for the Assembly of Multiple Nanoparticles Based on a Protein-Induced Reduction/Decoration of Graphene Oxide,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 21, pp. 7279–7281, Jun. 2010, doi: 10.1021/ja100938r.
- [111] A. V. Bounegru and C. Apetrei, “Development of a Novel Electrochemical Biosensor Based on Carbon Nanofibers–Gold Nanoparticles–Tyrosinase for the Detection of Ferulic Acid in Cosmetics,” *Sensors*, vol. 20, no. 23, p. 6724, Nov. 2020, doi: 10.3390/s20236724.
- [112] A. V. Bounegru and C. Apetrei, “Development of a Novel Electrochemical Biosensor Based on Carbon Nanofibers–Cobalt Phthalocyanine–Laccase for the Detection of p-Coumaric Acid in Phytoproducts,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 17, Art. no. 17, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22179302.
- [113] I. G. Munteanu and C. Apetrei, “Assessment of the Antioxidant Activity of Catechin in Nutraceuticals: Comparison between a Newly Developed Electrochemical Method and

-
- Spectrophotometric Methods,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 15, p. 8110, Jul. 2022, doi: 10.3390/ijms23158110.
- [114] T. Abrha, R. Pal, and R. C. Saini, “A Study on Voltametric Electro-kinetic Mechanism of Catechol at L-glutamic Acid-Carbon Paste Sensor,” *J. Surf. Sci. Technol.*, vol. 33, no. 1–2, p. 1, Jul. 2017, doi: 10.18311/jsst/2017/6187.
- [115] M. Santhiago, R. A. Peralta, A. Neves, G. A. Micke, and I. C. Vieira, “Rosmarinic acid determination using biomimetic sensor based on purple acid phosphatase mimetic,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 613, no. 1, pp. 91–97, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.aca.2008.02.050.
- [116] Z. Wang *et al.*, “Electrochemical sensor based on magnetic nanohybrids of multiple phthalocyanine doped ferrites/CMWCNTs for detection of rosmarinic acid,” *Talanta*, vol. 226, p. 122165, May 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122165.
- [117] A. C. Franzoi, J. Dupont, A. Spinelli, and I. C. Vieira, “Biosensor based on laccase and an ionic liquid for determination of rosmarinic acid in plant extracts,” *Talanta*, vol. 77, no. 4, pp. 1322–1327, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.talanta.2008.09.010.
- [118] E. Gil, T. Enache, and A. Oliveira-Brett, “Redox Behaviour of Verbascoside and Rosmarinic Acid,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 16, no. 2, pp. 92–97, Jan. 2013, doi: 10.2174/1386207311316020003.
- [119] W.-R. Zhuang *et al.*, “Applications of π - π stacking interactions in the design of drug-delivery systems,” *J. Controlled Release*, vol. 294, pp. 311–326, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.12.014.
- [120] A. T. E. Vilian and S.-M. Chen, “Preparation of carbon nanotubes decorated with manganese dioxide nanoparticles for electrochemical determination of ferulic acid,” *Microchim. Acta*, vol. 182, no. 5, pp. 1103–1111, Apr. 2015, doi: 10.1007/s00604-014-1431-2.
- [121] M. T. Tran and H. V. Tran, “Verbascoside extracted from Clerodendrum inerme: A natural monomer for the fabrication of a sensitive electrochemical Cu(II) sensor,” *J. Chem. Res.*, vol. 46, no. 3, p. 17475198221096596, May 2022, doi: 10.1177/17475198221096596.
- [122] P. Matos, A. Paranhos, M. T. Batista, and A. Figueirinha, “Synergistic Effect of DIBOA and Verbascoside from *Acanthus mollis* Leaf on Tyrosinase Inhibition,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 21, Art. no. 21, Jan. 2022, doi: 10.3390/ijms232113536.

Axa prioritară 6- Educație și competențe

Titlul proiectului: „Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență - PROINVENT”

Contract nr: 62487/03.06.2022 POCU/993/6/13 - Cod SMIS: 153299

Punctele de vedere exprimate în lucrare aparțin autorului și nu angajează Comisia Europeană și Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, beneficiara proiectului.