

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

CERCETĂRI PRIVIND REALIZAREA DE NOI SENZORI VOLTAMETRICI PENTRU ANALIZA SUBSTANȚELOR ACTIVE FARMACOLOGIC

Doctorand,

Ramona-Oana Gunache (Roșca)

Conducător științific,

Prof. dr. habil Constantin APETREI

Seria C: Chimie Nr 2

GALAȚI

2021

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**CERCETĂRI PRIVIND REALIZAREA DE NOI SENZORI
VOLTAMETRICI PENTRU ANALIZA SUBSTANȚELOR ACTIVE
FARMACOLOGIC**

Doctorand

Ramona-Oana GUNACHE (ROȘCA)

Președinte

Prof univ.dr.ing. Eugen Victor Cristian RUSU

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Conducător științific,

Prof univ.dr.chim. Constantin APETREI

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Referenți științifici

Prof.univ.dr.ing.Eleonora–Mihaela UNGUREANU

Universitatea Politehnica din București

Prof.univ.dr. farmacist Cecilia CRISTEA

Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca

Conf univ.dr.chim. Aurel TĂBĂCARU

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Seria C: Chimie Nr 2

GALAȚI

2021

MULȚUMIRI

“Nimic nu este prea dificil dacă împarți în pași mici ceea ce ai de făcut.”

Henry Ford

Doresc să îmi exprim gratitudinea și să aduc mulțumiri cu această ocazie coordonatorului meu științific Prof. dr. habil. Apetrei Constantin, pentru că m-a învățat, m-a încurajat, m-a sprijinit și m-a coordonat. Pentru exemplul existenței sale umaniste, științifice, profesionale și culturale. Pentru înțelepciune și înțelegere și mai ales pentru încrederea pe care mi-a acordat-o pe toată perioada studiului. Mulțumesc pentru crearea condițiilor din cadrul Laboratorului de Senzori și Biosenzori din cadrul Facultății Științe și Mediu, deoarece am realizat în bune condiții partea practică din această teză.

Au fost multe momente pe parcursul elaborării acestei teze de doctorat când am simțit că este imposibil de realizat, dar cu toate acestea am avut parte de a colabora cu oameni cu calitate profesională și umane de excepție.

Țin să mulțumesc și să îmi exprim recunoștința față de membrii comisiei de îndrumare a tezei de doctorat pentru sugestiile și pentru sfaturile oferite: doamnei Prof. dr. Iticescu Cătălina, domnului Prof. dr. Dima Ștefan și domnului Ș.I. dr. Dima Dumitru.

Mulțumesc domnului Prof dr. Rusu Eugen, domnului Prof. dr. Murariu Gabriel pentru susținerea, implicarea și onoarea implicării și efectuării unui stagiului de un an în proiectul ANTEPRENORDOC, unde m-am dezvoltat pe plan personal, am acumulat informații din multiple domenii și am realizat planuri de afaceri.

Mulțumirile mele se îndreaptă și către soțul meu pentru sprijinul moral și pentru fiecare clipă de curaj pentru a continua ori de câte ori simțeam că îmi este imposibil să înaintez. Vreau să îi mulțumesc și fiicei mele pentru fiecare îmbrățișare și pentru fiecare zâmbet, au reprezentat un imbold pentru a continua această cercetare.

Cu deosebită considerație, vă mulțumesc încă o dată !

Ramona Oana Gunache (Roșca)

Cuprins

(Numerotarea paginilor corespunde cu teza de doctorat)

MULȚUMIRI.....	III
INTRODUCERE	1
ABREVIERI	Error! Bookmark not defined.
LISTA DE FIGURI	Error! Bookmark not defined.
LISTA DE TABELE.....	Error! Bookmark not defined.
PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	3
CAPITOLUL I. Senzori electrochimici modificați	3
I.1. Senzori electrochimici – generalități, principiu de funcționare, design	3
I.2. Clasificarea senzorilor electrochimici	3
I.3. Nanomateriale utilizate pentru modificarea senzorilor	3
I.3.1. Nanomateriale de carbon	3
I.3.2. Nanoparticule metalice	4
I.3.3. Nanocompozite	4
I.3.4. Hexacianoferați metalici	4
CAPITOLUL II. Determinarea electrochimică a unor compuși cu acțiune farmacologică	4
II.1. Prođuși farmaceutici pe bază de <i>Ginkgo biloba</i> – generalități, proprietăți, importanță.....	4
II.1.1. Metode de determinare a compușilor activi din <i>Ginkgo biloba</i>	4
II.1.2. Senzori modificați pentru determinarea capacității antioxidante a <i>Ginkgo biloba</i>	5
II.2. Diosmina – generalități, proprietăți, importanță.....	5
II.2.1. Metode de determinare a diosminei.....	5
II.2.2. Senzori modificați pentru determinarea diosminei.....	5
II.3. Statine - generalități, proprietăți, importanță	6
II.3.1. Metode de determinare a statinelor	6
II.3.2. Senzori modificați pentru determinarea statinelor	6
PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE	8
OBIECTIVUL GENERAL.....	8
OBIECTIVE SPECIFICE:.....	8
CAPITOLUL III. Estimarea conținutului de compuși activi din produse farmaceutice pe bază de <i>Ginkgo biloba</i>	9
III.1. Materiale și metode.....	9
III.1.1. Produse chimice și soluții	9
III.1.2. Măsurători electrochimice	9
III.1.3. Analiza electrochimică a produselor farmaceutice	9
III.1.4 Determinarea activității antioxidante (DPPH)	10
III.2. Rezultate și discuții	10

III.3. Concluzii.....	13
CAPITOLUL IV. Determinarea diosminei din produse farmaceutice folosind senzori voltametrici modificați chimic	14
IV.1. Materiale și metode	14
IV.1.1. Reactivi și soluții.....	14
IV.1.2. Măsurătorile electrochimice	14
IV.1.3. Analiza substanțelor active din produse farmaceutice	15
IV.2. Rezultate și discuții.....	15
IV.2.1. Comportamentul voltametric al electrozilor în soluția de KCl.....	15
IV.2.2. Studiul detecției voltametrică a diosminei.....	17
IV.2.3. Detecția voltametrică a diosminei în produsul farmaceutic Fluxiv	19
IV.2.4. Realizarea curbei de calibrare a substanței active din produsul farmaceutic Fluxiv	20
IV.2.5. Repetabilitatea și reproductibilitatea senzorilor	21
IV.2.6. Cuantificarea diosminei în produsele farmaceutice	21
IV.3. Concluzii	22
CAPITOLUL V. Determinarea electrochimică a statinelor din produse farmaceutice	23
V.1. Materiale și metode	23
V.1.1 Reactivi și soluții.....	23
V.1.2. Măsurători electrochimice	23
V.1.3. Analiza probelor farmaceutice	23
V.2. Rezultate și discuții.....	24
V.2.1. Studiul comportamentului electrochimic al senzorilor în soluție de KCl și în soluție de ferocianură de potasiu și KCl	24
V.2.2. Studiul comportamentului electrochimic al senzorilor în soluții de atorvastatină, rosuvastatină și simvastatină	26
V.2.3. Influența vitezei de scanare asupra răspunsurilor senzorilor	26
V.2.4. Curba de calibrare și limita de detecție	28
V.2.5. Cuantificarea substanțelor active din produsele farmaceutice analizate	29
V.2.6. Studii de recuperare	29
V.3. Concluzii	29
CONCLUZII GENERALE. CONTRIBUȚII PROPRII. PERSPECTIVE VIITOARE DE CERCETARE	30
CONCLUZII GENERALE	30
CONTRIBUȚII PERSONALE	31
PERSPECTIVE DE CERCETARE VIITOARE	33

INTRODUCERE

“Nici un efect a cărui exactitate are o valoare mai slabă de 10% nu merită a fi cercetat.”
Walther Nernst

Cercetarea fundamentală în domeniul chimic și farmaceutic are drept scop dezvoltarea medicamentelor prin obținerea unor molecule noi, care oferă posibilitatea atât a tratării bolilor, cât și în obținerea unor forme farmaceutice adecvate, care să permită substanței active să fie eliberată la locul acțiunii în organism. Senzorii și biosenzorii pot fi utilizați pentru detectarea și cuantificarea acestor substanțe active în produsele farmaceutice comerciale precum și a transformărilor farmacocinetice a substanțelor în organism.

Principalul obiectiv al cercetării la nivel internațional este îmbunătățirea calității vieții. Aceasta este strâns corelată cu procesul de a controla orice boală, calitatea alimentației, a mediului înconjurător și a calității și siguranței medicamentelor. Pentru a putea controla parametrii cheie este nevoie de o monitorizare continuă, sensibilă, rapidă și desigur precisă. Astfel, în ultimele decenii a fost dezvoltată o metodă analitică inovativă bazată pe senzori și biosenzori, care sunt dispozitive promițătoare.

Controlul medicamentelor este esențial în domeniul farmaceutic întrucât alegerea unei metodologii eficiente oferă noțiuni necesare pentru o pregătire cât mai apropiată de condițiile practice și teoretice în care se desfășoară etapele de verificare a medicamentului în diferite unități de profil: fabrici, laboratoare, farmacii, cabinet medicale, clinici particulare, spitale.

Substanțele biologic active au o activitate farmacologică și fiziologică importantă, la concentrații scăzute în raport cu organismele vii. Printre diferitele proprietăți ale compușilor chimici, activitățile farmacologice joacă un rol crucial, acești compuși fiind utilizați și asociați cu diferite substanțe auxiliare în formele farmaceutice medicamentoase.

Metodele de preconcentrare și extracția substanțelor medicamentoase în vederea analizei calitative și cantitative sunt principalele deficiențe ale metodelor uzuale de analiză: volumetrică, spectrofotometrică și cromatografică. Aceste metode sunt sensibile și precise fiind adesea folosite pentru controlul calității produselor. Cu toate acestea, realizarea unor sisteme mai simple, ieftine și portabile pentru analiza produșilor activi farmacologic este de interes. Dintre acestea, senzorii electrochimici, în special cei voltametrici, au fost studiați și perfecționați considerabil în ultimii ani.

Utilizarea senzorilor electrochimici este o soluție simplă, rapidă, accesibilă deoarece pot fi utilizați pentru diferite tipuri de analiți. Cei pe bază de nanomateriale prezintă numeroase avantaje: au o stabilitate bună, o sensibilitate și o selectivitate ridicată.

Verificarea și controlul acestor medicamente cu senzori electrochimici modificăți deschide noi orizonturi de cercetare în acest domeniu. În această lucrare s-au realizat și utilizat senzori serigrafiați pe bază de carbon modificați cu diferite tipuri de materiale sensibile pentru detectarea și cuantificarea substanțelor active din produse farmaceutice folosind ca tehnică de detecție voltametria ciclică.

Teza de doctorat „*Cercetări privind realizarea de noi senzori voltametrici pentru analiza substanțelor active farmacologic*” face parte din interesele de cercetare ale Laboratorului de Senzori și Biosenzori, Departamentului de Chimie, Fizică și Mediu, Facultatea de Științe și

Mediu din cadrul Universității “Dunărea de Jos” din Galați. Această lucrare conține contribuții originale prin dezvoltarea unor senzori electrochimici modificați pentru detectarea unor flavonoide și a unor inhibitori ai HMG-CoA reductazei (statine) precum și pentru cuantificarea acestor substanțe active farmacologic din diferite produse farmaceutice.

Lucrarea este structurată în două părți și cinci capitole. În partea teoretică sunt prezentate studiile realizate până în prezent privind detecția unor flavonoide de interes și a statinelor, care sunt inhibitori ai HMG-CoA reductazei. Această parte conține studiile actuale în ceea ce privește senzorii electrochimici, tehnicile voltametrice, proprietățile nanomaterialelor folosite pentru modificarea senzorilor și performanțele electroanalitice ale acestor dispozitive.

Partea a doua a tezei constă în cercetări originale bazate pe studii experimentale privind evaluarea comportamentului electrochimic al unor noi senzori electrochimici modificați la detecția de diferite substanțe active din mai multe medicamente. În fiecare studiu s-a calculat aria suprafeței active a senzorilor modificați, coeficienții de difuzie ai analiților, s-a realizat curba de calibrare și s-a calculat limita de detecție și limita de cuantificare. Metoda electroanalitică a fost validată folosind indicațiile producătorilor, metoda UV-Vis sau FTIR, cu rezultate foarte bune.

Cuvinte cheie: Ginkgo Biloba, diosmina, statine, senzor, voltametrie ciclică, nanotuburi de carbon, flavonoid, HMG-CoA reductază

PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. Senzori electrochimici modificați

I.1. Senzori electrochimici

Electrochimia implică transferul de sarcină de la electrod la proba de analizat care poate fi solidă sau lichidă. În timpul acestui proces, schimbările chimice au loc la suprafața electrodului, iar sarcina este transmisă în toată cantitatea probei. Atât reacțiile de la electrod, cât și transferul de sarcină pot fi modulate chimic și stau la baza procesului de detecție[1].

Senzorii sunt dispozitive care sesizează variația unui parametru din sistem prin emiterea semnalului corespunzător, corelat cu mărimea (intensitatea) parametrului respectiv. Receptorul dispozitivului este cuplat la un traductor electrochimic. Traductorul transformă informații analitice provenite din interacțiunea electrochimică analit-electrod într-un semnal electric măsurabil. Senzorii electrochimici sunt instrumente compacte, portabile și ușor de manevrat, capabile să furnizeze informații în timp real, fără a fi necesare etape de pretratare a probelor[2].

I.2. Clasificarea senzorilor electrochimici

Senzorii electrochimici se bazează pe măsurători potențiometrice, amperometrice sau de conductivitate, în funcție de modul de transducție electrochimică. Diferitele principii necesită întotdeauna un design specific al celulei electrochimice

Senzorii electrochimici pot fi potențiometrici, voltametrici și conductometrici.

I.3. Nanomateriale utilizate pentru modificarea senzorilor

Tehnicile electroanalitice pot fi adoptate cu ușurință pentru a rezolva multe probleme de importanță fundamentală cu un grad ridicat de precizie, sensibilitate și selectivitate. Suprafața electrodului în sine, este un instrument puternic pentru cuantificarea unui analit. Controlând potențialul, electrodul poate fi utilizat ca sursă de energie liberă variabilă a electronilor. În plus, electronii care traversează interfața electrod-soluție pot fi determinați cu o sensibilitate mare prin măsurarea intensității curentului[9]. Tehnicile voltametrice, cum ar fi voltametria ciclică (CV), voltametria puls diferențială (DPV) și voltametria de undă pătrată (SWV) etc., s-au dovedit a fi fezabile și sensibile pentru determinarea moleculelor organice, din medicamente sau fluide biologice[10,11].

I.3.1. Nanomateriale de carbon

Atomii de carbon, au capacitatea de a forma legături covalente simple, duble și triple între ei sau cu alte elemente. Aceștia au capacitatea de a forma structuri lungi de atomi, prezentând astfel fenomenul de polimerizare. Atomii de carbon au o astfel de structură electronică și o dimensiune atomică care îi face capabili să prezinte structuri fizice distincte cu proprietăți fizice distincte, având aceeași compoziție chimică. Atomii de carbon pot fi hibridizați sp, sp², sp³ cu o distanță mică între benzile lor electronice 2s și 2p [18,19].

I.3.2. Nanoparticule metalice

Nanoparticulele metalice (MNP) sunt utilizate pe scară largă pentru modificarea senzorilor electrochimici[26]. Nanoparticulele metalice, în special cele nobile, prezintă de obicei o activitate electrocatalitică ridicată mai ales în cazul unor compuși cu proces de oxido-reducere lent[27,28]. Incorporarea MNP-urilor în polimeri conductori favorizează o interacțiune electronică puternică între cele două nanomateriale.

I.3.3. Nanocompozite

Nanocompozitul este un material solid multifazic în care una dintre faze are dimensiuni mai mici de 100 nm sau prezintă dimensiuni diferite (în domeniul nanometrilor) ale fazelor care alcătuiesc materialul[38]. Dimensiunile în domeniul nanometrilor prezintă avantaje privind procesarea, caracterizarea și analiza / modelarea acestei noi generații de materiale compozite. Pentru a realiza nanocompozite și diverse dispozitive modificate este esențială studierea și caracterizarea comportamentului materialului de la nivel atomic la cel macroscopic[39]. În literatură au fost descrise nanocompozite precum NiO₂ / CNT[40], grafen și CoFe₂O₄[41] dar și cele pe bază de lichide ionice sau pe bază de polimeri.

I.3.4. Hexacianoferati metalici

Hexacianoferatul feric sau albastrul de Prussia (PB) a fost denumit „peroxidază artificială”, deoarece forma redusă a PB - Alb de Prussia - este capabilă să catalizeze reducerea H₂O₂ la potențiale reduse (-50 mV (vs. Ag / AgCl)) precum peroxidazele[56].

CAPITOLUL II. Determinarea electrochimică a unor compuși cu acțiune farmacologică

II.1. Produși farmaceutici pe bază de *Ginkgo biloba* – generalități, proprietăți, importanță

Ginkgo biloba este una dintre principalele surse de substanțe active, cum ar fi flavonoide și compuși fenolici [76]. Principalii constituenți ai extractului de frunze de *Ginkgo biloba* contin flavonoide, terpenoide, poliprenoli și acizi organici. Ginkgolidele sunt terpenozii primari care prezintă activități farmacologice atribuite preparatelor *Ginkgo biloba*[77]. Extractul standard de *Ginkgo biloba* include aproape 6% lactone terpenice (2,8-3,4% ginkgolide A, B și C și 2,6-3,2% bilobalide) și 24% glicozide flavonice (isorhamnetină, quercetină și kampferol) [78].

Ginkgo biloba este bine tolerată în studiile clinice. Totuși, consumul abuziv de *Ginkgo biloba*, la persoanele în vârstă care suferă de unele boli precum diabetul, reumatismul sau hipertensiunea poate interacționa cu alte tratamente prescrise[87]. Mai mult, administrarea suplimentelor cu *Ginkgo biloba* poate prelungi timpul de sângerare la pacienți[88]

II.1.1. Metode de determinare a compușilor activi din *Ginkgo biloba*

Datorită importanței sale în practica farmaceutică, a fost căutată o metodă calitativă și cantitativă pentru identificarea și cuantificarea compușilor activi din produsele pe bază de *Ginkgo biloba*[89]. În urmărirea acestui obiectiv, au fost dezvoltate numeroase metode analitice

pentru determinarea capacității antioxidante, cum ar fi metodele chimice, spectrofotometrice (metoda Folin-Ciocalteu, determinarea capacității antiradicalice utilizând 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) sau acid 2,2'-azino-bis (acid 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic (ABTS)) și metode electrochimice bazate pe voltametrie ciclică[90].

II.1.2. Senzori modificați pentru determinarea capacității antioxidante a *Ginkgo biloba*

Senzorii electrochimici serigrafiați au o mare importanță în domeniul electroanalizei datorită avantajelor lor în comparație cu electrozii clasici. Cele mai importante avantaje sunt posibilitatea miniaturizării, reproductibilitatea procesului de fabricație și sensibilitatea senzorului[95]. S-au dezvoltat metode voltametrice pentru determinarea capacității antioxidante a *Ginkgo biloba* utilizând electrozi pe bază de carbon

II.2. Diosmina – generalități, proprietăți, importanță

Diosmina, sau 3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona-7-rutinosidă (Figura 1), este un flavonoid prezent în mod obișnuit în majoritatea plantelor și fructelor, în principal în cele aparținând *Citrus spp.* [105].

Diosmina diferă structural de hesperidină prin prezența unei duble legături între doi atomi de carbon din inelul C al moleculei, care conține o moleculă de glucoza legată de structura flavonoidă tri-inelară. În Europa, diosmina a fost utilizată pe scară largă de mult timp ca protector flebotonic și vascular, administrată oral în diferite tipuri de produse farmaceutice și suplimente alimentare.

II.2.1. Metode de determinare a diosminei

Printre cele mai utilizate metode se numără cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) conectată la un detector UV [120,121], HPLC ce utilizează lichide ionice ca modificatori ai fazei mobile [122], HPLC și cromatografie lichidă și spectrometrie de masă (HPLC-MS)[123], cromatografie în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC)[124], cromatografie cu strat subțire de înaltă performanță în fază inversă (RP-HPTLC)[125].

Aceste metode sunt des folosite și au o precizie foarte bună dar sunt dificil de aplicat întrucât implică proceduri extinse pentru procesare, purificare/extracție urmate de analiza propriu-zisă [125]. Unele metode HPLC implică utilizarea acizilor sau a alcaliilor puternice sau a altor solvenți și / sau amestecuri terțiare sau cuaternare în faza mobilă[126], necesită evaluare cu gradient ce durează mult timp și poate fi incomodă [126], sau implică folosirea unui standard intern [127], toate aceste caracteristici putând reprezenta dezavantaje a acestor tehnici convenționale[128].

II.2.2. Senzori modificați pentru determinarea diosminei

În tabelul II.1. sunt prezentate principalele tipuri de senzori electrochimici, metodele voltametrice folosite și performanțele analitice ale acestora, identificate în studiile de specialitate la determinarea diosminei.

Tabelul II.1. Principalii senzori voltametrici utilizați în detectarea diosminei

ASV – Voltametrie de redizolvare prin adsorbție; SWV – Voltametrie de undă pătrată; DPV – Voltametrie puls diferențial; ZrO₂-NPs – Nanoparticule de zirconiu; GONRs – Nano panglici de oxid de grafen.

Senzor	Tehnica de detecție	LOQ	LOD	Referințe
Electrod de carbon sticlos	ASV	$5,0 \times 10^{-8}$ - $9,0 \times 10^{-6}$ M	$3,5 \times 10^{-8}$ M	[134]
Electrod de pastă de carbon	SWV	12,5 – 200 μ M	$2,663 \times 10^{-6}$ M	[135]
Electrod modificat cu grafen funcționalizat poli(clorură de dialildimetilamoniu) acoperit cu ZrO ₂ -NPs	DPV	5×10^{-9} - 2×10^{-6} M	2×10^{-9} M	[136]
GONR-uri preparate prin dezarhivarea nanotuburilor de carbon <i>multiwalled</i>	DPV	51,01–39,21 μ M	0,015 μ M	[137]
	SWV	25–3,48 μ M	0,049 μ M	

II.3. Statine - generalități, proprietăți, importanță

Statinele reprezintă clasa de medicamente ce se utilizează pentru inhibarea competitivă a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductază (HMG-CoA reductază) la scară largă. HMG-CoA este enzima ce catalizează etapa de limitare a vitezei în biosinteza colesterolului.

Atorvastatina face parte din această clasă de substanțe și este un inhibitor al HMG-CoA reductazei (enzimă indispensabilă pentru biosinteza colesterolului în ficat) cu importante efecte hipolipemiante[138].

Structural, atorvastatina este o amidă aromatică, un derivat monofluorobenzenic, un acid dihidroxi monocarboxilic și un derivat pirol. Atorvastatina este, de asemenea, un derivat al acidului heptanoic [142].

Simvastatina (SV), o lactonă inactivă, este hidrolizată în *vivo* la acidul β , δ -dihidroxiil corespunzător (acid simvastatină, SVA) după administrare orală[143].

Rosuvastatina prezintă similarități structurale cu atorvastatina, dar conține sulf datorită grupării funcționale sulfonil[146].

II.3.1. Metode de determinare a statinelor

Analiza publicațiilor privind metodele analitice de identificare a statinelor arată că metodele cromatografice și optice constituie o pondere semnificativă .

II.3.2. Senzori modificați pentru determinarea statinelor

Una dintre primele lucrări care au luat în considerare determinarea electrochimică a atorvastatinei în produse farmaceutice și plasmă umană ia fost publicată de *Nevin Erk* în 2004 [25]. Autorii au folosit un electrod de carbon vitros și metoda voltametriei adsorptivă de puls diferențial și metoda voltametrică de redizolvare adsorptivă cu undă pătrată

În lucrarea lui *J.C. Abbar* și *S.T. Nandibewoor*[153] atorvastatina a fost studiată și determinată cu un electrod de pastă de carbon (CPE) în prezența bromurii de cetiltrimetil amoniu (CTAB) utilizând voltametria puls-diferențială.

Z. Kamalzadeh și *S. Shahrokhian* au ales voltametria liniară pentru a studia comportamentul electrochimic al atorvastatinei de pe suprafața unui electrod modificat cu nanotuburi de carbon și polipirol (PPY / CNT) [41].

În ceea ce privește determinarea voltametrică a rosuvastatinei, *T.A. Silva* și colab. a prezentat doi electrozi, unul modificat cu un compozit format din oxid de grafen și nanotuburi de carbon aliniate vertical (VACNT-GO)[157] și un electrod de diamant dopat cu bor (BDD)[158].

Într-o altă lucrare, a fost construit un nanocompozit inovator pentru analiza rosuvastatinei (ROS). Nanocompozitul sintetizat este compus din nanoparticule de CuFeO_2 (p- CuFeO_2 NPs) susținute pe nanofoi de oxid de grafen redus (RGO) în sulfat de acid dietilamoniu (DEAAS) cu rol de lichid ionic și agent anti-contaminare.

Pentru cuantificarea simvastatinei s-a utilizat un electrod de carbon vitros modificat cu un compozit format din nanotuburi de carbon și dihexadecil hidrogen fosfat (MWCNTs-DHP / GCE).

Simvastatina a fost studiată și determinată folosind electrozi de mercur de cercetătorul *B. Nigović* și colaboratorii săi. [161–163]. Caracteristicile electrochimice ale simvastatinei investigate prin CV și SWV cu ajutorul electrodului de grafit impregnat cu parafină (PIGE) și SMDE.

Microparticulele solide de simvastatină au fost immobilizate mecanic pe suprafața electrodului de grafit și imersate într-un electrolit apos. Microparticulele au fost oxidate la 1,1 V obținându-se un proces ireversibil al electrodului. Simvastatina dizolvată în acetonitril și amestecată cu soluție tampon $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M la pH 7 este puternic adsorbită pe suprafața electrodului de mercur. Simvastatina adsorbită a fost redusă la -1,45 V într-o reacție reversibilă a electrodului urmată de o reacție chimică[161].

PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE

OBIECTIVUL GENERAL

Obiectivul general al lucrării a fost dezvoltarea și caracterizarea unor noi senzori pe bază de nanomateriale de carbon și mediatori ai transferului de electroni pentru determinarea unor substanțe din produse farmaceutice utilizând voltametria ciclică.

OBIECTIVE SPECIFICE:

- Realizarea de noi senzori pe bază de electrozi de carbon serigrafiați, modificați cu nanotuburi de carbon, grafen și nanoparticule de aur sau *Prussian blue*;
- Studiul proprietăților electrochimice ale senzorilor în soluția de clorură de potasiu, ferocianură de potasiu și catecol prin voltametrie ciclică;
- Studiul influenței vitezei de scanare asupra comportamentului electrochimic al senzorilor în soluția de clorură de potasiu, ferocianură de potasiu și catecol și determinarea etapei determinante de viteză;
- Calcularea ariei suprafeței electroactive a senzorilor modificați cu nanotuburi de carbon, nanoparticule cu grafen nanoparticule de aur și *Prussian blue*;
- Optimizarea pH-ului și al parametrilor de lucru pentru analiza soluțiilor ce conțin substanțe farmacologic active;
- Determinarea calitativă și cantitativă a unor substanțelor active farmacologic utilizând electrozi serigrafiați pe bază de carbon modificați;
- Determinarea activității antioxidante a substanțelor active din produse farmaceutice;
- Realizarea curbelor de calibrare și calcularea limitei de detecție și de cuantificare;
- Cuantificarea substanței active din produse farmaceutice;
- Studiul repetabilității și reproductibilității senzorilor;
- Validarea rezultatelor privind concentrațiile de substanță activă din produsele farmaceutice prin diferite metode de analiză;
- Estimarea capacității antioxidante a produselor farmaceutice pe bază de *Ginkgo biloba* utilizând metoda DPPH;
- Corelarea dintre activitatea antioxidantă determinată prin metoda DPPH și rezultatele obținute folosind voltametria ciclică;
- Validarea rezultatelor voltametrice privind cuantificarea diosminei și a statinelor cu metoda spectrometrică FTIR.

CAPITOLUL III. Estimarea conținutului de compuși activi din produse farmaceutice pe bază de *Ginkgo biloba*

Obiectivul acestui studiu a fost de a estima capacitatea antioxidantă a produselor farmaceutice pe bază de *Ginkgo biloba* utilizând electrozi de carbon serigrafiați modificați cu nanotuburi de carbon, utilizând voltametria ciclică ca tehnică de detecție. Corelarea cu activitatea antioxidantă determinată prin metoda DPPH va fi utilizată pentru validarea metodei electrochimice.

III.1. Materiale și metode

III.1.1. Produse chimice și soluții

Toți compușii chimici sunt de înaltă puritate și au fost utilizați fără purificare suplimentară. Studiile privind optimizarea parametrilor experimentali s-au realizat în soluții etalon de ferocianură de potasiu și catecol obținute de la *Sigma - Aldrich* (St. Louis, SUA). Electroliții folosiți pentru analizele electrochimice au fost clorura de potasiu 0,1 mol/L, ferocianura de potasiu 0,001 mol/L și catecol 0,001 mol/L.

Toate soluțiile au fost preparate cu apă ultra pură *MilliQwater* (rezistivitate 18,2 MΩ×cm) obținută de la un sistem de purificare a apei *Milli-Q Simplicity®*. 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) și etanol (96%) au fost achiziționate de la *Sigma-Aldrich* (St Louis, SUA).

III.1.2. Măsurători electrochimice

Toate măsurătorile electrochimice (voltametria ciclică) au fost realizate utilizând un potențostat / galvanostat EG&G (*Princeton Applied Research*, Oak Ridge, TN, USA) controlat de un computer cu software ECHEM care operează în Windows. Acesta a fost folosit pentru a caracteriza semnalele electrozilor și pentru electroanaliza celor două produse cu o concentrație crescută de *Ginkgo biloba*. A fost utilizat un sistem cu trei electrozi. Electrocul de lucru este electrocul serigrafiat de carbon (SPCE) modificat cu nanotuburi de carbon (SPCE-CNT). Electrocul de referință a fost electrocul de argint / clorura de argint (KCl 3M) și contra-electrocul a fost un fir de platină. Toate potențialele indicate în acest studiu sunt raportate la electrocul de referință Ag/AgCl (KCl 3M).

Voltamogramele ciclice au fost înregistrate la un potențial cuprins între -0,4 și +0,7 V. În general, viteza de scanare poate fi cuprinsă într-un domeniu vast de valori, de obicei, între 0,1 și 1.0 V×s⁻¹. În acest studiu, pentru stabilizarea semnelor electrochimice s-au înregistrat cu ajutorul voltametriei ciclice 3 cicluri succesive cu viteza de scanare de 0,1 V×s⁻¹. Urmând o înregistrare de 2 cicluri succesive cu aceeași viteză de scanare. Pentru studiul influenței vitezei de scanare asupra semnalului s-au folosit diverse viteze de scanare cuprinse între 0,1 și 1.0 V×s⁻¹.

III.1.3. Analiza electrochimică a produselor farmaceutice

Aplicabilitatea senzorului a fost studiată prin analiza unor produse comerciale pe bază de *Ginkgo biloba*. În condiții experimentale optime s-au analizat două produse farmaceutice ce conțin *Ginkgo biloba*, un medicament care se eliberează pe baza de prescripție medicală și un

supliment alimentar. Cele două produse farmaceutice au fost achiziționate din farmaciile locale. Au fost analizate produsele farmaceutice TANAKAN® cu un conținut de 40 mg extract uscat de *Ginkgo biloba* rafinat și cuantificat și Ginkoprim Max având o cantitate de 120 mg de *Ginkgo biloba* extract standardizat dar și 150 mg Mg și 15 mg Zn. Un comprimat a fost triturat și apoi a fost dizolvat în 100 ml KCl de concentrație 0,1 M. Soluția a fost ultrasonată folosind aparatul *Elma S10H Elmasonic* pentru dizolvare și omogenizare. Soluția astfel obținută a fost introdusă în celula electrochimică și au fost conectați cei 3 electrozi (electrodul de lucru, electrodul de referință și contra-electrodul). Toate probele farmaceutice au fost analizate în triplicat.

III.1.4 Determinarea activității antioxidante (DPPH)

Testul DPPH este o metodă rapidă, simplă și frecvent utilizată pentru a evalua proprietățile antioxidante ale compușilor sau extractelor vegetale și se știe că este sensibilă la diferite clase de compuși antioxidanți, cum ar fi compușii fenolici[166]. Capacitatea de capturare a radicalilor liberi DPPH este cuantificată prin scăderea absorbanței la 517 nm [22]. Această analiză oferă informații despre capacitatea antioxidantilor de a dona electroni sau atomi de hidrogen care elimină radicalul liber DPPH[167].

Rezultatul capacității de eliminare a radicalilor DPPH este decolorarea și calculată ca reducere procentuală. Absorbția mai mică a amestecului de reacție prezintă o activitate mai mare de eliminare a radicalilor liberi a DPPH în conformitate cu următoarea ecuație[166]:

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

Pentru ambele tipuri de probe farmaceutice au fost determinate valorile procentului de reducere a reactivului DPPH. Toate testele au fost efectuate în trei serii și rezultatele sunt raportate ca medie. Abaterea standard relativă a rezultatelor a fost aproximativ 1%.

III.2. Rezultate și discuții

Măsurătorile de voltametrie ciclică pot fi folosite pentru determinarea proprietăților antioxidante a unei game variate de compuși. Aceste proprietăți depind de structura chimică a compușilor și a proprietăților redox. Prin urmare în acest studiu se va analiza prin voltametrie ciclică o serie de produse farmaceutice pe bază de *Ginkgo biloba*.

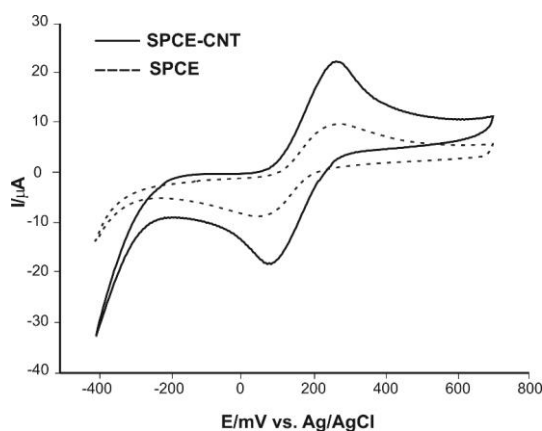


Figura III.3. Voltamograma ciclică a SPCE-CNT(linia continuă) și SPCE(linia discontinuă) în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]$ de concentrație 0,001 M înregistrată cu viteza de scanare de $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Studiile preliminare s-au realizat folosind compuși standard cu proprietăți redox cum sunt ferocianura de potasiu și catecolul.

Picul de oxidare (anodic) apare la $E_{pa}=265,65$ mV, iar picul de reducere (catodic) la $E_{pc}= -81,15$ mV. Curenții care corespund celor două picuri sunt $I_{pa}=22,12$ μ A și $I_{pc}=18,41$ μ A. Potențialul formal redox (E_0') al cuplului reversibil este egal cu: $E_0'=(E_{pa}+E_{pc})/2$ și anume 173.4 mV, valoare în conformitate cu alte rezultate publicate în literatura de specialitate. Din valorile $\Delta E= E_{pa}-E_{pc}=184,5$ mV și a raportului $I_{pc}/I_{pa}=0,83$ rezultă că procesul electrochimic al ionului ferocianură la suprafața electrodului de lucru este cvasireversibil[95].

Așa cum se poate observa în Figura III.3., SPCE nemodificat a arătat picuri redox corespunzătoare cuplului ferocianură-fericianură. Cu toate acestea, intensitățile curenților sunt mai reduse, în comparație cu picurile observate la SPCE-CNT. Aceste rezultate demonstrează creșterea sensibilității sensorului SPCE atunci când este modificat cu nanotuburi de carbon.

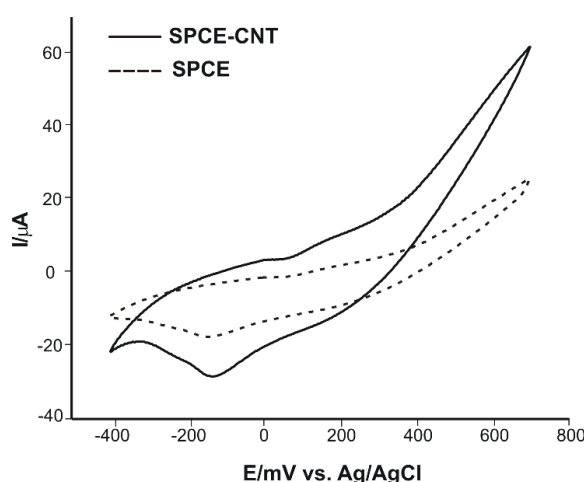


Figura III. 4. Voltamograma ciclică a SPCE-CNT(linia continuă) și SPCE(linia discontinuă) în soluție de catecol de concentrație 0,001 M înregistrată cu viteza de scanare de $0,1V \times s^{-1}$

În voltamograma ciclică, în soluție de catecol se observă prezența a două picuri redox ce implică transferul a doi electroni și doi protoni la transformarea catecolului în derivatul orto-chinonic. Picul de oxidare (anodic) apare la $E_{pa}=282,02$ mV, iar picul de reducere (catodic) la $E_{pc}= -128,06$ mV. Potențialul formal redox (E_0') al cuplului reversibil este egal cu 205,04 mV. Curenții care corespund celor două picuri sunt $I_{pa}=13,29$ μ A și $I_{pc}=-28,87$ μ A. Din valorile $\Delta E=410,08$ mV și a raportului $I_{pc}/I_{pa}= 2,17$ rezultă că procesul electrochimic este cvasireversibil [9]. Răspunsul SPCE în soluția de catecol este mai mic față de intensitatea curentului, indicând creșterea sensibilității datorită CNT imobilizat pe suprafața sensorului.

Din aceste rezultate se poate aprecia că electrodul serigrafiat modificat cu nanotuburi de carbon este util pentru electroanaliza compușilor redox activi, de natură anorganică sau organică, cu o sensibilitate foarte bună.

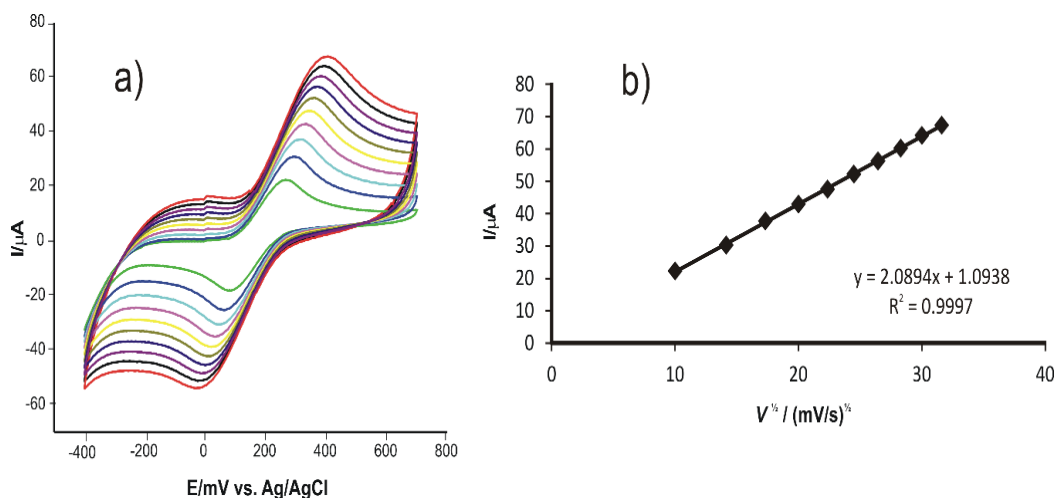


Figura III.5. a) Voltamograma ciclică a SPCE-CNT în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]$ de concentrație 0,001 M cu viteza de scanare între 0,1-1,0 $V \times s^{-1}$
b) Dependența dintre valoarea curentului picului anodic și rădăcina pătrată din viteza de scanare

În Figura III.5. a) se observă creșterea curenților picurilor odată cu creșterea vitezei de scanare.

Conform ecuației *Randles-Sevcik* curentul picului este direct proporțional cu concentrația de analit și de asemenea depinde de viteza de scanare.

Reprezentând grafic curentul picului anodic în funcție de radicalul din viteza de scanare se obține o dependență liniară cu un coeficient de determinare R^2 este 0,9997. Din această dependență și ținând cont de ecuația *Randles-Sevcik*[170], se poate aprecia că procesul de oxidare electrochimică este controlat de procesul de difuzie a ferocianurii de potasiu din soluție la suprafața electrodului de lucru.

Pentru înregistrarea răspunsurilor voltametrice ale senzorului în soluțiile produselor farmaceutice s-a folosit voltametria ciclica în domeniul de potențial de la -0,4 V la +0,7 V. În Figura III.6. se prezintă voltamogramele ciclice ale SPCE-CNT imersat în soluție de TANAKAN® și în soluție de GINKOPRIM MAX înregistrate cu o viteză de scanare de 0,1 $V \times s^{-1}$.

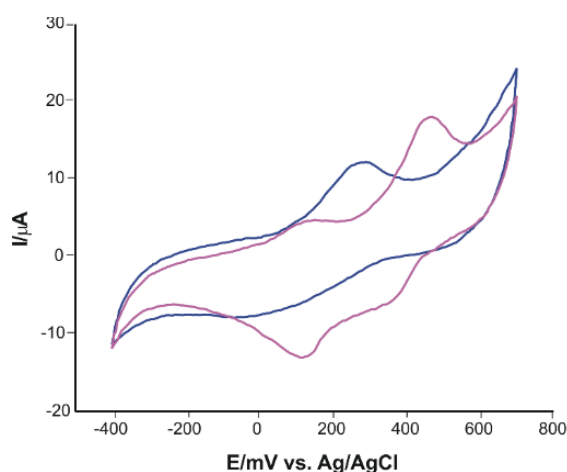


Figura III. 6. Voltamogramele ciclice ale SPCE/CNT imersat în soluție de Tanakan (linia violet) și Ginkoprim-max (linia albastră)

În cazul ambelor produse farmaceutice se observă două perechi de picuri, mai bine evidențiate și mai intense, în cazul produsului farmaceutic Tanakan. Aceste picuri sunt relaționate cu prezența compușilor cu proprietăți antioxidante din produsele farmaceutice. În conformitate cu datele din literatura de specialitate principalele clase de compuși cu proprietăți antioxidante din *Ginkgo biloba* sunt terpenoidele și flavonoidele[171].

Valorile curenților picului anodic sunt în concordanță cu valorile de reducere a DPPH. Prin urmare, compușii din probele Ginkgo Biloba detectate prin ambele metode sunt cei responsabili pentru proprietățile antioxidante ale acestei surse naturale valoroase.

III.3. Concluzii

Metoda voltametrică care utilizează electrozi serigrafiați de carbon modificați cu nanotuburi de carbon este utilă pentru determinarea activității antioxidante a produselor farmaceutice pe bază de *Ginkgo biloba*. Tehnica oferă măsurători rapide ce pot fi obținute în doar câteva minute, cu costuri reduse. De asemenea, poate fi utilizată și pentru probe biologice sau extracte alimentare la orice pH de interes. Alte avantajele ale metodei voltametrice sunt sensibilitatea și faptul că nu se folosesc reactivi chimici. Tanakan-ul are proprietăți antioxidante superioare produsului GinkoPrim max datorită numeroaselor etape de extracție și purificare suferite pentru eliminarea fracțiunilor din plante, responsabile de efectele nocive. OTC-urile nu suferă la fel de multe etape de extracție și purificare ceea ce poate duce la un efect de competiție metabolică și enzimatică (citocromul P450) și din acest motiv scade eficiența substanței active. În cazul produselor Rx prin metode de purificare și extracție se obțin întotdeauna aceleași cantități de produs finit spre deosebire de OTC. S-a obținut o bună corelație între rezultatele testului DPPH și voltametria ciclică.

CAPITOLUL IV. Determinarea diosminei din produse farmaceutice folosind senzori voltametrici modificați chimic

Scopul studiului este de a analiza comportamentul electrochimic precum și determinarea calitativă și cantitativă a diosminei cu un nou senzor voltametric realizat plecând de la două tipuri de electrozi: un electrod serigrafat pe bază de carbon (SPCE) și un electrod serigrafat pe bază de carbon modificat cu Prussian Blue (PB/SPCE). După caracterizarea senzorilor și studiile privind detectarea diosminei a fost dezvoltată o metodă electroanalitică. Metoda voltametrică pe baza senzorului PB/SPCE va fi validată pentru determinarea cantitativă a diosminei folosind metoda FTIR.

IV.1. Materiale și metode

IV.1.1. Reactivi și soluții

Clorura de potasiu și ferocianura de potasiu folosite în studiile preliminare au fost achiziționate de la Sigma- Aldrich (St. Louis, SUA), având cea mai înaltă puritate analitică. Toate experimentele au fost efectuate în condiții aerobe la temperatura camerei. Toate soluțiile au fost preparate utilizând apa ultrapură, MilliQ water (rezistivitate 18.2 M Ω ·cm) obținută cu un sistem de purificare a apei Milli-Q Simplicity®.

Diosmina utilizată ca standard în acest studiu a fost extrasă din produsul farmaceutic Detralex. Extracția de diosmină a fost efectuată din pulberea obținută din produsul farmaceutic Detralex, care conține 90% diosmină (450 mg) și 10% hesperidină (50 mg) ca principii active farmacologice, cu apă ultra-pură prin extracție solid-lichid folosind o coloană cromatografică din sticlă. Extracția s-a bazat pe diferența de solubilitate în apă a acestor compuși. Extracția totală a diosminei a fost verificată prin înregistrarea spectrului UV al soluției de efluent. Extractul lichid a fost uscat într-un sistem de evaporare rotativ și pulberea solidă obținută a fost caracterizată prin spectroscopie UV, determinarea punctului de topire și spectrometrie FTIR. λ_{\max} obținut a fost de 268 nm, punctual de topire a fost de 276-277⁰ C . Aceste rezultate sunt în acord cu cele raportate în literatură de specialitate pentru diosmina pură [184,185].

V.1.2. Măsurătorile electrochimice

Măsurătorile electrochimice au fost realizate cu un potențostat EG&G (*Princeton Applied Research*, Oak Ridge, TN, USA) conectat la softul specializat *Echem* pentru achiziția datelor, stabilirea parametrilor experimentali și interpretarea voltamogramelor ciclice. Soluțiile de analizat s-au introdus într-o celulă electrochimică cu volum de 50 mL, cu trei electrozi. Electrodele de referință a fost electrodul de argint/clorura de argint (KCl 3 M) și contraelectrodul a fost un fir de platină.

Valorile potențialelor obținute în urma analizei voltamogramelor ciclice s-au raportat la potențialul electrodului de referință Ag/AgCl (KCl 3M). Voltamogramele ciclice au fost înregistrate într-un domeniu de potențial optim pentru acești electrozi cuprins între -0,4 V și +0,7 V. Pentru stabilizarea semnalelor senzorilor s-au înregistrat 6 cicluri succesive prin voltametrie ciclică cu o viteză de scanare la 0,1 V·s⁻¹.

Spectrele FTIR au fost obținute cu un spectrometru *Bruker ALPHA FT-IR (BrukerOptik GmbH, Ettlingen, Germania)* care utilizează software-ul *OPUS (BrukerOptik GmbH, Ettlingen, Germania)* în domeniul $4000-500\text{ cm}^{-1}$ (32 scanări, rezoluție 4 cm^{-1}) în metoda de reflectanță totală atenuată (ATR). Între măsurători, cristalul ATR ZnSe a fost curățat cu apă ultrapură și isopropanol. Spectrele au fost înregistrate față de aer.

IV.1.3. Analiza substanțelor active din produse farmaceutice

Produsele farmaceutice alese pentru analiza au fost achiziționate din farmacii locale, având forma farmaceutică de comprimat și substanța activă, diosmină.

Fluxiv este o combinație de trei flavonoide ce conține 180 mg diosmină, 20 mg hesperidonă, 300 mg troxerutină și 100 mg vitamină C. Toate aceste componente acționează sinergic, potențându-și reciproc acțiunea antioxidantă și vasoprotectoare. Este un supliment alimentar.

Produsul Detralex conține 500 mg fracțiune flavonoidică purificată micronizată, echivalent cu 450 mg diosmină și 50 mg hesperidonă. Detralex-ul este un produs care se poate elibera doar cu prescripție medicală (P-6L). Acesta este recomandat în afecțiuni vasculare precum insuficiența veno-limfatică sau boala hemoroidală.

IV.2. Rezultate și discuții

IV.2.1. Comportamentul voltametric al electrozilor în soluția de KCl

În prima etapă s-a investigat comportamentul electrochimic a celor doi senzori serigrafiați SPCE (pe bază de carbon) și PB/SPCE (pe bază de carbon modificat cu Prussian Blue) într-o soluție fără activitate redox, $\text{KCl } 10^{-1}\text{ M}$. Domeniul de potențial a fost situat între $-0,4\text{ V}$ și $+0,7\text{ V}$. Voltamogramele ciclice obținute cu SPCE nu prezintă picuri în domeniul de potențial studiat, ceea ce reflectă lipsa contaminării suprafeței electrozilor și o puritate ridicată a materialelor din care sunt confecționați aceștia. În cazul electrodului PB/SPCE se observă un pic anodic la $0,196\text{ V}$ și un pic catodic la $0,087\text{ V}$, corespunzător procesului de redox de PB imobilizat pe suprafața activă a electrodului. Se observă un pic anodic și un pic catodic relaționate cu procesul de oxidoreducere a ionului ferocianură la suprafața activă a senzorului [186,187].

Tabel IV.1. Parametrii electrochimici ai senzorilor imersați în soluție de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] 10^{-3}\text{ M} - \text{KCl } 10^{-1}\text{ M}$

Senzor	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E^{1/2}$ (V)	ΔE (V)	I_a (μA)	I_c (μA)	I_c/I_a
SPCE	0,541	-0,169	0,355	0,370	73,158	-40,727	0,556
PB/SPCE	0,245	0,025	0,135	0,221	24,422	-38,93	1,592
	0,451	-	-	-	30,112	-	-

Abrevieri: E_{pa} - potențialul picului anodic; E_{pc} - potențialul picului catodic; I_a – curentul picului anodic; I_c – curentul picului catodic; $E^{1/2}$ – potențialul de semiundă, $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$.

Evaluând valorile principalilor parametri, se poate afirma că procesul de oxidoreducere a ionului ferocianură este cvasireversibil [182], iar PB/SPCE prezintă o sensibilitate mai mare. În cazul PB/SPCE picurile sunt mai clare, de intensitate mai mare și reversibilitate mai bună (ΔE și $E^{1/2}$ au valori mai mici). Pentru a calcula aria activă a celor doi senzori, au fost înregistrate voltamogramele ciclice în soluție de ferocianură de potasiu 10^{-3} M și clorură de potasiu 10^{-1} M cu diferite viteze de scanare situate în domeniul $0,1-1,0$ V·s $^{-1}$. Rezultatele obținute în cazul celor doi senzori se prezintă în Figura IV.4.

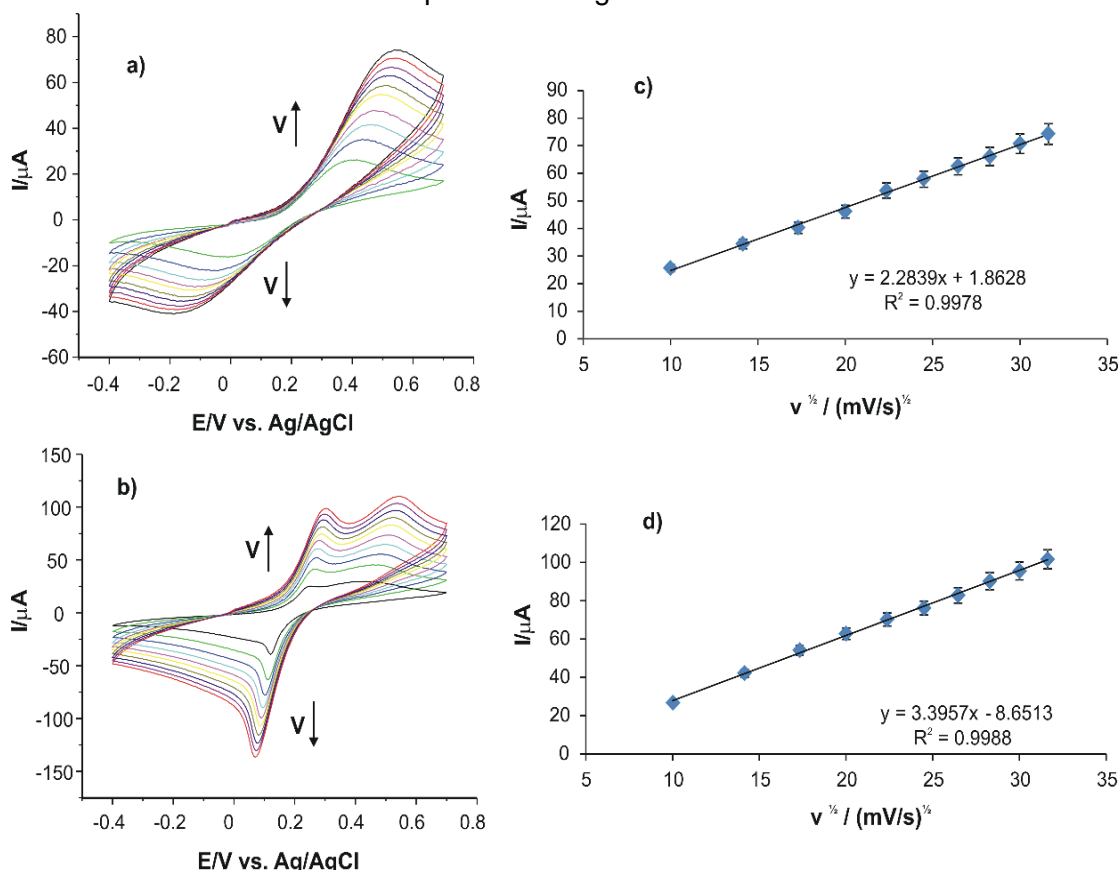


Figura IV.4. Voltamogramele ciclice ale senzorilor imersați în soluție dublă ferocianură de potasiu 10^{-3} M - clorură de potasiu 10^{-1} M la viteze de scanare între $0,1-1,0$ V·s $^{-1}$

a) senzorul SPCE

b) senzorul PB/SPCE

c) Dependența dintre curentul picului anodic și rădăcina pătrată a vitezei de scanare pentru SPCE

d) Dependența dintre curentul picului anodic și rădăcina pătrată a vitezei de scanare PB/SPCE

În cazul proceselor redox ale cuplului ferocianură/ferocianură, se constată că intensitatea curentului crește o dată cu creșterea vitezei de scanare. Pentru a se stabili care este etapa care limitează viteza procesului electrochimic de oxidare s-au determinat dependențele dintre I_{pa} și viteza de scanare, respectiv rădăcina pătrată a vitezei de scanare. În ambele cazuri s-au obținut relații de liniaritate foarte bună între I_{pa} și rădăcina pătrată a vitezei de scanare (Figura IV b,d) având coeficientul de determinare aproape de valoarea ideală 1.

Conform ecuației *Randles-Sevcik* curentul picului este direct proporțional cu concentrația de analit, cu rădăcina pătrată a coeficientului de difuzie și cu rădăcina pătrată a vitezei de scanare. În cazul studiat, relația liniară dintre I și $v^{1/2}$, dovedește că procesul redox este controlat de procesul de difuzie a speciei electroactive [189].

Pentru calculul ariei active a electrozilor a fost utilizată ecuația lui *Randles-Sevcik* datorita dependentei liniare dintre I_p și $v^{1/2}$.

Tabelul IV.2. Ecuația pantei liniare (I_{pa} vs. $v^{1/2}$), aria suprafeței active și factorul de rugozitate

Senzor	Ecuația	R ²	Aria activă (cm ²)	R
SPCE	$I_{pa} = 2,2839 v^{1/2} + 1,8628$	0,9978	0,315	2,52
PB/SPCE	$I_{pa} = 3,3957 v^{1/2} - 8,6513$	0,9988	0,469	3,75

Ambii electrozi prezintă o valoare mai mare a ariei suprafeței active decât aria geometrică, ceea ce arată că ambii prezintă o sensibilitate bună și se pot folosi cu succes pentru detecția bioflavonoidelor, respectiv a diosminei, compusul de interes în acest studiu. Totuși PB/SPCE s-a dovedit a fi superior, având un coeficient de rugozitate de 3,75 și o arie a suprafeței active de aproximativ 4 ori mai mare decât aria geometrică. Aceste rezultate sunt în concordanță cu valorile curenților picurilor.

Această sensibilitate ridicată a PB/SPCE se datorează modificărilor aduse pe suprafața senzorului, care favorizează transferul de electroni și acumularea sau difuzia selectivă a analiților. Literatura de specialitate oferă multiple studii în care senzorii modificați cu Prussian Blue prezintă caracteristici, respectiv rezultate mai bune în detecția substanțelor antioxidante[56,191].

IV.2.2. Studiul detecției voltametrice a diosminei

Pentru determinarea cantitativa a diosminei în două produse farmaceutice (Detralex și Fluxiv) s-au utilizat electrozii SPCE și PB/SPCE. Rezultatele au fost comparate cu cele obținute prin metoda clasică, FTIR.

Pentru analiza electrochimică s-a realizat o extracție a diosminei prin metoda solid-lichid din produsul farmaceutic Detralex și s-a preparat o soluție dublă 10^{-3} M diosmină / KCl 10^{-1} M. Soluția obținută s-a adăugată în celula electrochimică pentru electroanaliză. Domeniul de potențial folosit este de asemenea între -0,4 și +0,7 V·s⁻¹ iar viteza de scanare de 0,1 V·s⁻¹. Cei doi electrozi de lucru au fost utilizați pe rând și s-au măsurat intensitățile și potențialele picurilor evidențiate (figura IV.5.).

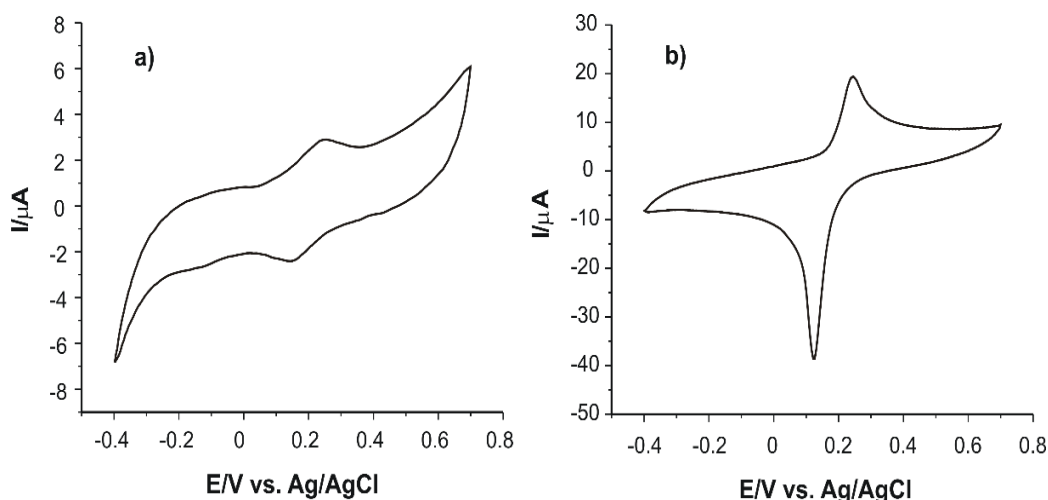


Figura IV.5. CV a CSPE(a), PB/CSPE(b) imersați în soluție dublă 10^{-3} M diosmină / KCl 10^{-1} M.

În ambele cazuri se observă câte un pic anodic și un pic catodic, datorate diosminei în cazul SPCE[136]. În cazul PB/SPCE picurile observate corespund suprapunerii proceselor redox ale diosminei și PB[192]. Se constată că la utilizarea PB/SPCE, picurile sunt mult mai intense, cu curenți ai picurilor mai mari și cu o reversibilitate mai bună. Așa cum se observă în Figura IV.6., în cazul PB/SPCE potențialele picurilor au valori mai mici, ceea ce arată că procesul redox este catalizat de PB, ceea ce face ca senzorul PB/SPCE să fie mai sensibil decât SPCE[193].

În următoarea etapă s-a studiat cinetica procesului redox prin înregistrarea voltamogramelor ciclice cu viteze de scanare diferite situate între $0.1-1.0 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Pentru ambii senzori intensitățile picurilor anodic și catodic cresc odată cu creșterea vitezei de scanare.

În figura IV.6. se prezintă dependența dintre intensitatea picului anodic în funcție de viteza de scanare obținându-se o dependență liniară între I_{pa} și $v^{1/2}$. Acest fapt demonstrează că procesul redox este controlat de fenomenul de difuzie al diosminei.

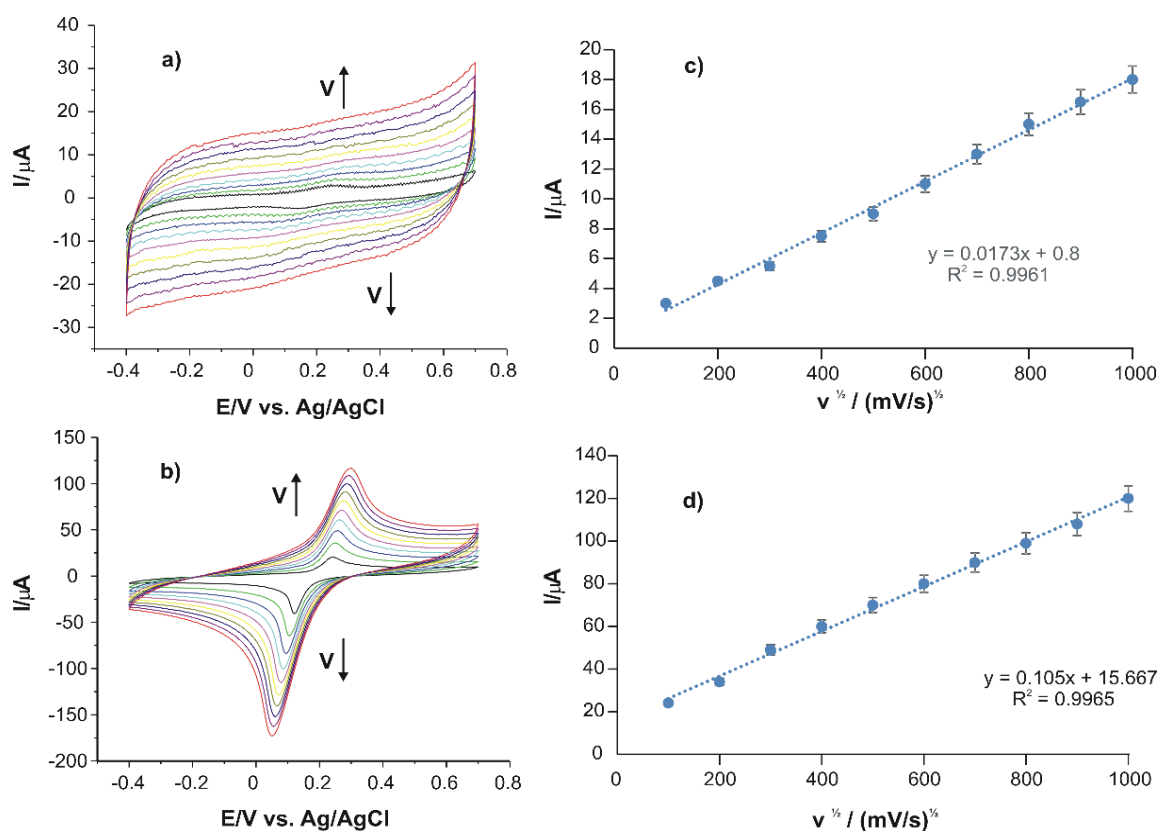


Figura IV.6. Voltamogramele ciclice ale senzorilor imersați într-o soluție dublă 10^{-3} M diosmină / $\text{KCl } 10^{-1}$ M înregistrate cu diferite viteze de scanare cuprinse între 0,1 și $1,0 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

a) SPCE

b) PB/SPCE

c) Dependența liniară dintre valorile curentului picului anodic și vitezele de scanare pentru SPCE

d) Dependența liniară dintre valorile curentului picului anodic și vitezele de scanare pentru SPCE PB/SPCE

Valorile lui Γ obținute sunt în concordanță cu cele raportate în literatura de specialitate pentru senzori voltametrici, fiind $7,14 \times 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ pentru SPCE și $2,1 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ pentru PB/SPCE[188,196]. Se poate observa că valoarea obținută pentru PB/SPCE este mult mai mare, un ordin de mărime, decât cea obținută pentru SPCE, ceea ce justifică sensibilitatea mai mare a PB/SPCE la detecția voltametrică a diosminei[197].

IV.2.3. Detecția voltametrică a diosminei în produsul farmaceutic Fluxiv

Pentru a se studia detecția diosminei în cazul produsului Fluxiv s-au triturat comprimatele, apoi o cantitate s-a dizolvat în soluția de $\text{KCl } 10^{-1}$ M. Amestecul a fost omogenizat cu ajutorul unei băi de ultrasunete și filtrat. Soluția obținută s-a analizat cu cei doi senzori, SPCE și PB/SPCE. Domeniul de potențial și viteza de scanare au fost aceleași ca în cazul analizei diosminei. Voltamogramele ciclice obținute se prezintă în figura IV.7.

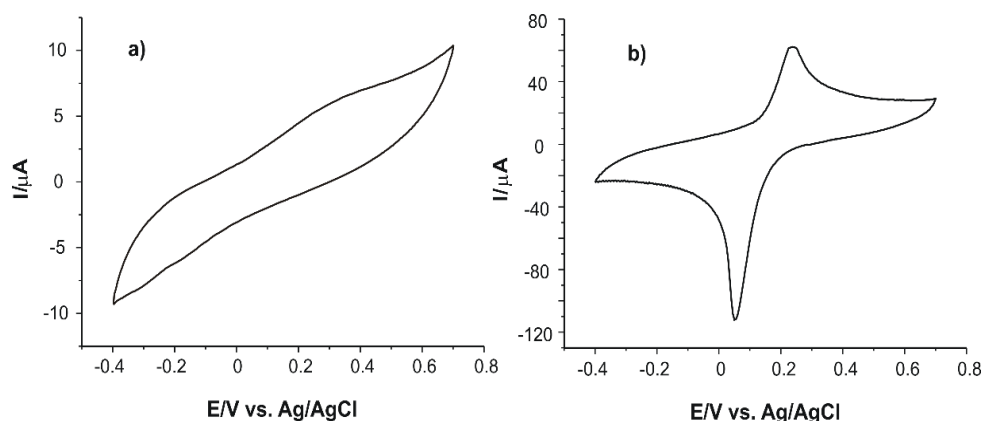


Figura IV.7. Voltamogramele ciclice ale senzorilor SPCE a) și PB/SPCE b) imersați într-o soluție de diosmina provenită de la produsul farmaceutic Fluxiv înregistrate la viteza de scanare de $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

În cazul SPCE se observă un pic anodic larg ($E_{pa}=0,285\text{V}$, $I_{pa}= 5,66 \mu\text{A}$). Senzorul PB/SPCE prezintă un pic anodic ($E_{pa}=0,235 \text{ V}$; $I_{pa}=61,9 \mu\text{A}$) și unul catodic ($E_{pc}=0,050\text{V}$; $I_{pc}= -111,78 \mu\text{A}$). În ambele cazuri picurile sunt relaționate cu prezența diosminei, dar cu celelalte substanțe active din produsul farmaceutic. Din aceste date se poate concluziona că senzorul PB/SPCE are o sensibilitate superioară față de SPCE, curentul picului anodic fiind de 10 ori mai mare.

IV.2.4. Realizarea curbei de calibrare a substanței active din produsul farmaceutic Fluxiv

Curba de calibrare pentru senzorul PB/SPCE s-a realizat prin înregistrarea voltamogramelor ciclice în soluții de diosmina de concentrații diferite în soluție KCl 10^{-1} M , adăugând pe rând volume măsurate din soluția stoc 10^{-3} M diosmina / KCl 10^{-1} M în soluția blank de KCl 10^{-1} M de volum exact măsurat.

Răspunsurile senzorului PB/SPCE în soluții de diosmină de concentrații diferite se prezintă în figura IV.8. Se poate observa odată cu creșterea concentrației diosminei cresc intensitățile picului anodic și catodic.

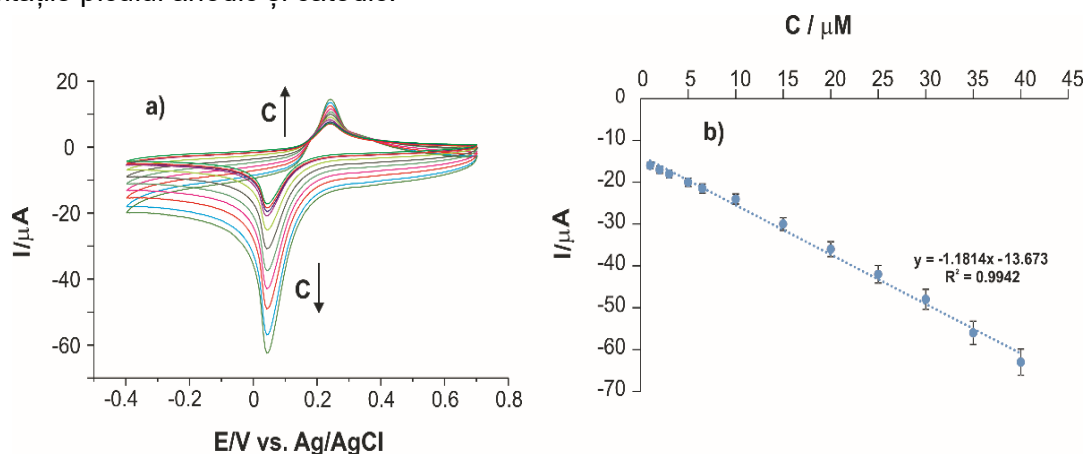


Figura IV.8. CV ale PB/SPCE imersat în soluții de diosmină cu concentrații diferite (în domeniul $1\text{-}40 \mu\text{M}$)

b) Curba de calibrare al picului catodic

Pentru realizarea curbei de calibrare s-a reprezentat grafic dependența dintre curenții picului catodic și concentrațiile de diosmină din soluțiile de analizat.

Se observă o dependență liniară între intensitatea picului catodic și concentrația de diosmina în domeniul de concentrații situat între 1-40 μM . Ecuația drepte de calibrare și R^2 sunt prezentate în Figura IV.8. b). Cu ajutorul ecuației drepte de calibrare s-au calculat valorile limitei de detecție (LOD) și de cuantificare (LOQ) [198]:

Limita de detecție și limita de cuantificare pentru senzorul PB/SPCE la detecția diosminei au valorile $5,22 \times 10^{-8}$ M (LOD) și $1,74 \times 10^{-7}$ M (LOQ).

Senzorul PB/SPCE prezintă valori mici ale LOD și LOQ, ceea ce indică sensibilitatea ridicată a senzorului realizat în acest studiu și demonstrează fezabilitatea metodei voltametrice pentru analiza diosminei din produse farmaceutice. Valorile obținute sunt similare cu cele raportate în literatura de specialitate, ceea ce demonstrează că senzorul PB/SPCE are performanțe electroanalitice adecvate pentru detecția diosminei din probe reale.

IV.2.5. Repetabilitatea și reproductibilitatea senzorilor

Repetabilitatea răspunsului senzorului a fost studiată. Voltamogramele ciclice au fost înregistrate într-o soluție de diosmină 10^{-4} M. Dintre voltamogramele ciclice replicate, senzorul a fost clătit cu apă ultrapură. Abaterea standard relativ (RSD) a 7 măsurători replicate luând în considerare curentul picului catodic a fost de 2,7%.

Reproductibilitatea fabricării senzorului a fost studiată prin pregătirea a cinci senzori în aceleași condiții (soluție stoc, volum adăugat, timp de uscare, condiții de depozitare) și înregistrarea voltamogramelor ciclice într-o soluție de diosmină 10^{-4} M. RSD al curenților cu picuri catodici corespunzător diosminei a fost de 3,5%, demonstrând controlul preparării senzorului.

IV.2.6. Cuantificarea diosminei în produsele farmaceutice

În vederea determinării diosminei din produsele farmaceutice, s-a folosit senzorul PB/CSPE și s-au înregistrat voltamogramele ciclice în soluții care conțin produsele farmaceutice menționate anterior. Ținând cont de curentul picului anodic, de cantitatea de comprimat dizolvată în soluția de KCl 0.1 M și de ecuația drepte de calibrare s-a calculat cantitatea de diosmină din produsele farmaceutice analizate, iar rezultatele sunt incluse în tabelul IV.4.

Rezultatele obținute sunt în concordanță cu valorile raportate de producători ceea ce demonstrează acuratețea senzorului PB/CSPE și lipsa interferențelor.

Pentru validarea metodei voltametrice, au fost analizate cele două produse farmaceutice prin metoda spectrometrică în domeniul infraroșu. Metoda FTIR prezintă un potențial enorm în controlul calității medicamentelor deoarece poate identifica structura chimică și identitatea substanței active din medicamente [199,200]. Spectrele FTIR ale produselor farmaceutice analizate se prezintă în figura IV.9. În comparație cu spectrul FTIR al diosminei pure, cele ale produselor farmaceutice sunt mai complexe datorită prezenței și a altor substanțe active sau excipienți.

Pentru cuantificare s-au preparat 5 standarde solide diosmină-KBr de concentrații diferite, în domeniul 100-500 mg/g, și s-a construit dreapta de calibrare pe baza absorbanțelor picului de la $1097,64 \text{ cm}^{-1}$. Din absorbanțele picului de la $1097,64 \text{ cm}^{-1}$ obținute pentru

produsele farmaceutice și folosind ecuația dreptei de calibrare s-a calculat cantitatea de diosmină. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul IV.4.

Tabelul IV.4. Rezultatele cuantificării diosminei din cele doua produse farmaceutice

Produs farmaceutic	Cantitatea Diosmină / mg per tabletă		
	Metoda senzor	Metoda FTIR	Indicațiile producătorului
<i>Detralex</i>	454±2	458±5	450
<i>Fluxiv</i>	183±1	184±2	180

Din Tabelul IV.4. se poate aprecia că între rezultatele obținute prin cele două metode și indicațiile producătorului există o corelație foarte bună. Deci, se poate concluziona că rezultatele obținute cu senzorul PB/SPCE la cuantificarea diosminei sunt validate la nivel de laborator.

IV.3. Concluzii

Această lucrare a demonstrat viabilitatea unui senzor pe bază de electrod serigrafat de carbon modificat cu Prussian blue pentru determinarea și cuantificarea diosminei. Procesul redox al diosminei la suprafața senzorului modificat chimic este electrocatalizat de PB obținându-se o sensibilitate în domeniul sub-micromolar. Pentru validarea metodei voltametrice au fost analizate produse farmaceutice cu senzorul și cu metoda spectrometrică în domeniul infraroșu și rezultatele obținute pentru ambii senzori au fost în concordanță și corelate cu cantitățile de diosmina indicate de producător. Senzorul dezvoltat în acest studiu este adecvat pentru detecția diosminei în produse farmaceutice iar metoda poate fi extinsă și pentru alte produse ce conțin diosmină. Metoda este ușor de implementat, are o sensibilitate adecvată, necesita un volum mic de proba de analizat și are un cost redus.

CAPITOLUL V. Determinarea electrochimică a statinelor din produse farmaceutice

Prezentul studiu își propune evaluarea comportamentului electrochimic a doi senzori serigrafiați, unul pe bază de carbon (SPCE) și al doilea pe baza de nanotuburi de carbon și nanoparticule de aur (AuNP-CNT/SPCE) pentru determinarea metodelor calitativă și cantitativă a unor statine din produse farmaceutice. Metoda electrochimică aplicată pentru detecție va fi voltametria ciclică. Rezultatele cantitative obținute cu senzorul AuNP-CNT/SPCE prin metoda voltametrică vor fi comparate cu cele obținute cu metoda FTIR.

V.1. Materiale și metode

V.1.1 Reactivi și soluții

Toate substanțele au fost utilizate fără o purificare suplimentară, întrucât au fost de puritate analitică. Studiile privind caracterizarea electrozilor și optimizarea parametrilor experimentali s-au realizat în soluții de clorura de potasiu 10^{-1} M și ferocianura de potasiu 10^{-3} M. Toate soluțiile au fost preparate cu apă ultra pură. Pentru studiile de detecție a atorvastatinei, s-au utilizat medicamente cu această substanță activă, achiziționată din farmacii.

V.1.2. Măsurători electrochimice

Electrozii serigrafiați pe bază de carbon SPCE și AuNP-CNT/SPCE (diametrul electrodului de lucru este de 4 mm) au fost achiziționați de la Dropsens Ltd (Llanera, Spania).

Toate determinările electrochimice folosind voltametria ciclică au fost realizate utilizând un potențostat / galvanostat EG&G (*Princeton Applied Research*, Oak Ridge, TN, USA) controlat de un computer cu software *ECHM* care operează în *Windows*. Acesta a fost folosit pentru a caracteriza semnalele electrozilor și pentru electroanaliza atorvastatinei. A fost utilizat un sistem clasic cu trei electrozi. Electrodele de lucru este electroda serigrafiată de carbon (SPCE) sau cea modificată cu nanotuburi de carbon și nanoparticule de aur (AuNP-CNT/SPCE). Electrodele de referință a fost electroda de argint / clorura de argint și contraelectrodele a fost un fir de platină. Toate potențialele indicate în acest studiu sunt raportate la electroda de referință Ag/AgCl.

Metoda electrochimică folosită în toate analizele experimentale a fost voltametria ciclică. Voltamogramele ciclice au fost înregistrate într-un domeniu de potențial cuprins între -0.4 și +0.7 V.

Spectrele FTIR au fost obținute cu un spectrometru *Bruker ALPHA FT-IR* (*BrukerOptik GmbH*, Ettlingen, Germania) care utilizează software-ul *OPUS* (*BrukerOptik GmbH*, Ettlingen, Germania) în domeniul $4000-500\text{ cm}^{-1}$ (32 scanări, rezoluție 4 cm^{-1}) în modul de reflectanță totală atenuată (ATR). Între măsurători, cristalul ATR ZnSe a fost curățat cu apă ultrapură și isopropanol. Spectrele au fost înregistrate față de aer (*background*).

V.1.3. Analiza probelor farmaceutice

Aplicabilitatea senzorilor a fost studiată prin substanțele active din cele trei statine de aceeași concentrație din trei produse farmaceutice (Sortis 20 mg, Crestor 20 mg și Simvacard

20 mg) cu regim de eliberare PRF (medicamente care se eliberează cu prescripție medicală care se reține în farmacie).

V.2. Rezultate și discuții

V.2.1. Studiul comportamentului electrochimic al senzorilor în soluție de KCl și în soluție de ferocianură de potasiu și KCl

Scopul analizelor preliminare a fost evaluarea comportamentului electrochimic a celor doi senzori serigrafiați, primul pe bază de carbon (SPCE) și al doilea pe bază de carbon modificat cu nanotuburi de carbon și nanoparticule de aur (AuNP-CNT/SPCE).

În prima etapă a analizelor s-a folosit o soluție KCl 0,1 M, inactivă electrochimic, în vederea evaluării suprafeței active a celor doi senzori. Domeniul de potențial a fost optimizat, iar semnalul stabil a fost obținut la -0,4 V și +0,7 V. Prin urmare, acest domeniu de potențial s-a folosit pentru toate experimentele. În voltamogramele ciclice înregistrate nu s-au evidențiat picuri, care ar fi putut să sugereze o eventuală contaminare a suprafeței senzorilor. Senzorii prezintă un curent de fond redus, fapt ce ne asigură că sunt potriviți pentru a fi utilizați în următoarele experimente.

În următoarea etapa electrozii SPCE și AuNP-CNT/SPCE au fost imersați într-o soluție cu activitate electrochimică, obținută din ferocianura de potasiu 10^{-3} M și KCl 10^{-1} M în vederea analizării comportamentului electrochimic al senzorilor. Voltamogramele ciclice au fost înregistrate la o viteză de scanare 0,1 V/s, în domeniul de potențial cuprins între -0.4 V și +0.7 V. Acest domeniu de potențial s-a dovedit a fi stabil și optim și în cazul ferocianurii de potasiu, fiind aplicat și în alte studii [190].

Parametrii de interes obținuți dar și cei calculați în urma analizei voltametrice se prezintă în Tabelul V.1.

Tabel V.1. Parametrii electrochimici obținuți din voltamogramele ciclice ale senzorilor imersați în soluție de $K_4[Fe(CN)_6] 10^{-3}$ M- KCl 10^{-1} M

Senzor	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E_{1/2}$ (V)	ΔE (V)	I_a (μA)	I_c (μA)	I_c/I_a
SPCE	0,334	0,118	0,226	0,216	25,95	-21,94	0,84
AuNP-CNT/SPCE	0,272	0,156	0,214	0,116	31,31	-28,02	0,89

Abrevieri: E_{pa} - potențialul picului anodic; E_{pc} - potențialul picului catodic; I_a – curentul picului anodic; I_c – curentul picului catodic; $E_{1/2}$ – potențialul de semiundă, $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$.

În cazul AuNP-CNT/SPCE picurile sunt mai bine definite, cu intensitate mai mare și reversibilitate mai bună (ΔE și $E_{1/2}$ au valori mai mici). Evaluând valorile principalilor parametri din tabel, se poate afirma că procesul de oxido-reducere a ionului ferocianură este cvasireversibil în ambele cazuri, iar senzorii prezintă o sensibilitate bună.

Pentru a calcula aria activă a celor doi senzori, au fost înregistrate voltamogramele ciclice în soluție de ferocianură de potasiu 10^{-3} M și clorură de potasiu 10^{-1} M la diferite viteze de scanare situate în domeniul $0.05-1.0 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Rezultatele obținute în cazul AuNP-CNT/SPCE se prezintă în Figura V.4.

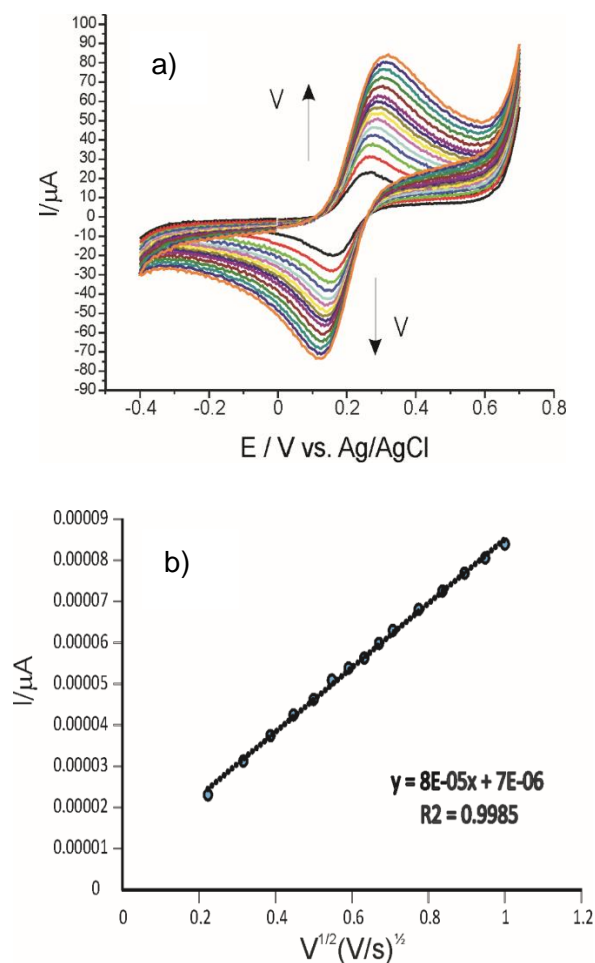


Figura V.4. a) Voltamogramele ciclice ale electrodului AuNP-CNT/SPCE în soluție 10^{-3} M $K_4[Fe(CN)_6]$ - 10^{-1} M KCl la diferite viteze de scanare (0,1-1,0 V/s)
b) Dependența I_{pa} vs. rădăcina pătrată a vitezei de scanare.

În urma înregistrării voltamogramelor ciclice se constată că intensitatea curenților care corespund procesului redox al ferocianurii de potasiu crește odată cu creșterea vitezei de scanare. Realizând regresia liniară între intensitatea curentului anodic și viteza de scanare respectiv rădăcina pătrată a vitezei de scanare, se poate determina etapa determinant de viteză a procesului de oxidare.

Figura V.4. b arată o liniaritate foarte buna între I_{pa} și rădăcina pătrată a vitezei de scanare cu un coeficient de determinare (R^2) de 0.9985. Acest rezultat demonstrează ca procesul electrochimic de la nivelul electrodului de lucru este controlat de difuzia speciei electroactive, fiind în concordanță cu literatura de specialitate[202]. Același tip de liniaritate a fost obținut și de SPCE.

Tabel V.2. Aria geometrică, aria suprafeței active și factorul de rugozitate pentru SPCE și AuNP-CNT/SPCE

Electrod	Aria geometrică (cm ²)	Aria activă (cm ²)	Factorul de rugozitate
SPCE	0,1256	0,2836	2,25

AuNP-CNT/SPCE

0,9842

7,84

AuNP-CNT/SPCE prezintă o suprafață activă de aprox 8 ori mai mare decât aria sa geometrică și de aproximativ 4 ori mai mare decât aria suprafeței active a SPCE. Sensibilitatea ridicată a senzorului modificat AuNP-CNT/SPCE se explică prin prezența nanotuburilor de carbon și a nanoparticulelor de aur care datorită formei, dimensiunii și structurii lor, prezintă proprietăți electrice și mecanice foarte bune, favorizând un transfer rapid de electroni [203,204], necesar în cazul senzorilor electrochimici.

De asemenea, asocierea nanotuburilor de carbon cu nanoparticulele de aur determină o bună conductibilitate și capacitate electrocatalitică, crescând astfel, selectivitatea, sensibilitatea și reproductibilitatea senzorului [187,205].

V.2.2. Studiul comportamentului electrochimic al senzorilor în soluții de atorvastatină, rosuvastatină și simvastatină

În următoarea etapă s-a studiat răspunsul celor doi senzori într-o soluție de atorvastatină 3×10^{-5} M și KCl 10^{-1} M.

Pentru stabilizarea răspunsurilor senzorilor au fost necesare 6 cicluri în domeniul de potențial situat între -0,4 V și +0,7 V. Astfel, rezultatele prezentate sunt cele obținute după stabilizarea semnalului electrochimic.

Am analizat separat ambii electrozi serigrafiați în aceeași soluție, se observă un comportament electrochimic similar. Voltamogramele ciclice înregistrate, pun în evidență două picuri anodice și unul catodic. Al doilea pic anodic ($E_{pa} = 1,004$ V, $I_{pa} = 34,208$ μ A pentru SPCE și $E_{pa} = 1,004$ V, $I_{pa} = 51,82$ μ A pentru AuNP-CNT/SPCE) este relaționat cu procesul de oxidare al atorvastatinei. Se constată că procesul electrochimic este ireversibil, întrucât nu se observă un pic catodic asociat reducerii atorvastatinei.

Ulterior am analizat comportamentul redox al fiecărei substanțe active din statine, utilizând cei doi electrozi de lucru. S-au înregistrat voltamogramele ciclice de SPCE și AuNP-CNT/SPCE în fiecare soluție de statină. Procesul de reducere corespunzător este puțin vizibil, iar potențialul pic observat în cazul AuNP-CNT/SPCE ar putea fi datorat prezenței nanoparticulelor metalice. Conform altor studii de specialitate procesul de oxidare al rosuvastatinei este ireversibil [157,160].

Observând, aspectul voltamogramelor înregistrate cu cei doi electrozi în soluțiile statinelor, putem afirma că aceste trei substanțe au un comportament electrochimic similar, numit proces de oxidare ireversibil. Diferențele apărute la intensitatea picurilor, respectiv deplasarea potențialului picurilor este datorat modificărilor aduse electrodului serigrafiat suport (nanotuburile de carbon și nanoparticulele de aur).

V.2.3. Influența vitezei de scanare asupra răspunsurilor senzorilor

În această secțiune a fost studiată influența vitezei de scanare asupra intensității și potențialului picului anodic relaționat cu procesul oxidării atorvastatinei, utilizând senzorii serigrafiați SPCE și AuNP-CNT/SPCE. Vitezele de scanare au variat în domeniu cuprins între 0,1 și 1,0 V/s, modificând viteza de scanare gradual la fiecare înregistrare cu 0.1 V/s.

Intensitatea picului anodic crește iar potențialul se deplasează la valori mai mari odată cu creșterea vitezei de scanare (Figura V.12.). Acest comportament se explică prin natura ireversibilă a procesului de oxidare, fapt confirmat și în alte studii[209]. De asemenea a fost evaluată dependența liniară a curentului anodic față de viteza de scanare dar și față de rădăcina pătrată a vitezei de scanare, pentru a stabili dacă procesul este controlat de difuzie sau de adsorbție.

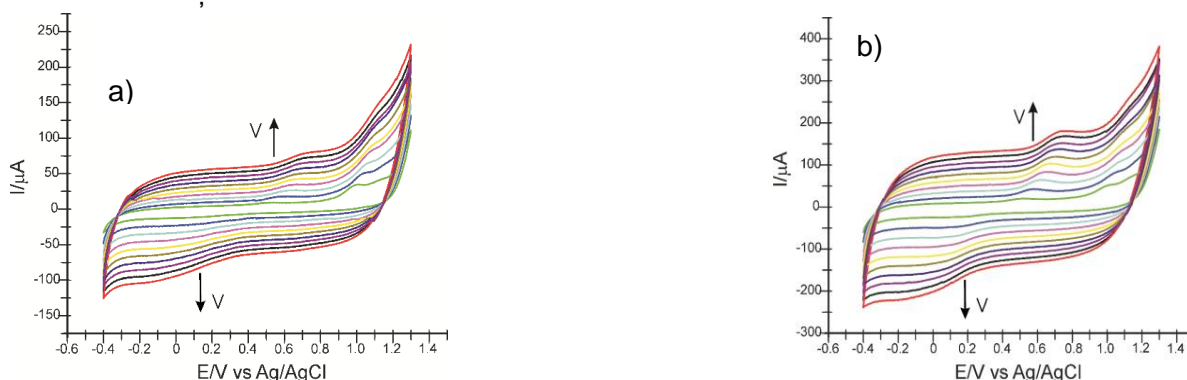


Figura V.12. Voltamogramele ciclice înregistrate în soluția de atorvastatină 3×10^{-5} M (electrolit soluția de KCl 10^{-1} M) la viteze de scanare între 0,1 V/s și 1,0 V/s a) SPCE b) AuNP-CNT/SPCE

Evaluând cele două dependențe liniare, s-a constatat că o liniaritate mai bună, și un factor de determinare (R^2) mai aproape de valoarea unitară, s-a obținut între intensitatea curentului anodic și viteza de scanare, așa cum se poate observa în figura V.13. Această tendință a fost valabilă pentru ambii senzori.

Tabelul V.3. Ecuația dreptei I_p vs. v , R^2 și Γ corespunzătoare celor doi senzori.

Electrod	Ecuația	R^2	Γ ($\text{mol} \times \text{cm}^{-2}$)
SPCE	$I_p = 1,32 \times 10^{-4} v + 2,53 \times 10^{-5}$	0,9956	$1,11 \times 10^{-11}$
AuNP-CNT/SPCE	$I_p = 2,39 \times 10^{-4} v + 3,65 \times 10^{-5}$	0,9950	$4,94 \times 10^{-10}$

Valorile obținute pentru gradul de acoperire al suprafeței cu specii electroactive sunt în concordanță cu cele raportate în alte studii [209].

Se poate aprecia AuNP-CNT/SPCE are proprietăți electroanalitice superioare comparativ cu SPCE la detecția atorvastatinei. Prezența nanotuburilor de carbon și a nanoparticulelor de aur asigura o conductibilitate și o selectivitate superioara senzorului în probe reale.

Influența vitezei de scanare a fost studiată și în cazul rosuvastatinei, folosind cei doi senzori SPCE și AuNP-CNT/SPCE. Vitezele de scanare au variat în domeniu cuprins între 0.1 și 1,0 V/s, modificând viteza de scanare gradual la fiecare înregistrare cu 0,1 V/s. Odată cu creșterea vitezei de scanare, intensitatea picului anodic crește așa cum se poate observa în figura V.14.

Similar atorvastatinei, în cazul rosuvastatinei și simvastatinei exista o dependență liniară între intensitatea curentului anodic și viteza de scanare, obținându-se un coeficient de determinare de aproximativ 0,995 pentru ambii electrozi.

În toate cazurile AuNP-CNT/SPCE a demonstrat o selectivitate superioară comparativ cu SPCE, fapt datorat modificărilor aduse la suprafața electrodului serigrafiat folosit ca suport.

V.2.4. Curba de calibrare și limita de detecție

În condițiile experimentale optimizate, electrozii SPCE și AuNP-CNT/SPCE au fost utilizați pentru determinarea voltametrică a atorvastatinei, iar rezultatele sunt prezentate în Figura V.17

Pentru realizarea curbei de calibrare s-a folosit o soluție stoc de atorvastatină (6×10^{-4} M), din care s-a adăugat volume bine stabilite din soluția stoc, în soluția electrolit de KCl 10^{-1} M. Domeniul de concentrație studiat a fost 1,2 – 606,25 μ M. S-a obținut o liniaritate bună în domeniul 1,2-53,33 μ M pentru ambii senzori.

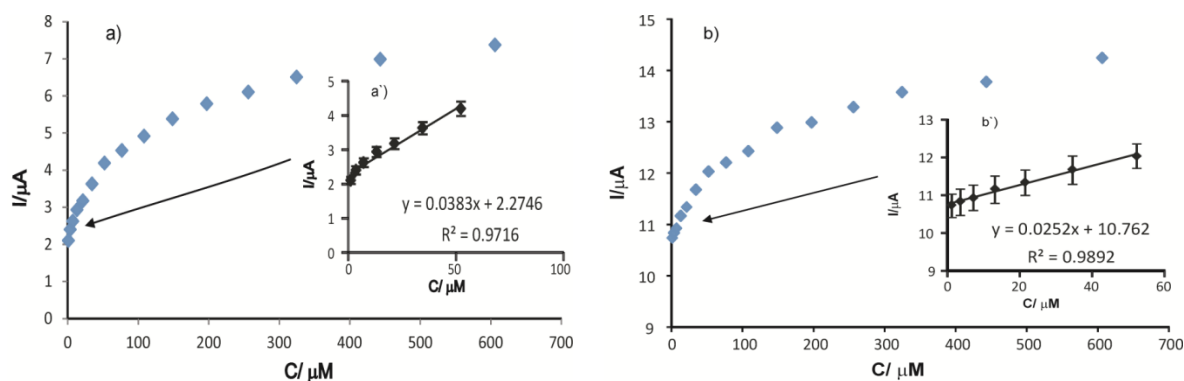


Figura V.17. Ajustarea liniară între I_{pa} și concentrația atorvastatinei în domeniul de concentrație 1,2 – 606,25 μ M; Figurile din dreapta prezintă dependența liniară între I_{pa} și C pentru în domeniul de concentrație 1,2-53,33 μ M a) SPCE b) AuNP-CNT/SPCE

Cu ajutorul ecuației drepte de calibrare și a deviației standard, s-au calculat valorile limitei de detecție ($LOD=3\sigma/m$) și de cuantificare ($LOQ=10\sigma/m$) [52] (Tabel V.7).

Table V.7. Ecuațiile de ajustare liniară I_{pa} vs. C, R^2 , LOD și valori LOQ pentru cei doi senzori de detectare a atorvastatinei

Senzor	Ecuația de calibrare	R^2	LOD (μ M)	LOQ (μ M)
SPCE	$I_{pa} = 0.0383c + 2,2746$	0,9716	$6,75 \times 10^{-7}$	$2,25 \times 10^{-6}$
AuNP-CNT/SPCE	$I_{pa} = 0.0252c + 10,762$	0,9892	$1,92 \times 10^{-7}$	$6,39 \times 10^{-7}$

Senzorul SPCE/CNT-AuNP prezintă valori mici ale LOD și LOQ, ceea ce indică o sensibilitate ridicată. Prin urmare, metoda voltametrică este precisă și fezabilă pentru determinarea calitativă și cantitativă a atorvastatinei. Valorile obținute sunt chiar mai reduse decât cele raportate în literatura de specialitate ceea ce demonstrează că senzorul SPCE/CNT-AuNP are performanțe electroanalitice foarte bune pentru detecția atorvastatinei.

Se poate observa faptul că senzorul AuNP-CNT/SPCE a avut o sensibilitate și selectivitate mai mare pentru detecția statinelor. Limitele de detecție și cuantificare au avut

valori reduse, dovedind că senzorii pot fi folosiți cu succes pentru cuantificarea substanțelor active cu acțiune hepatică din produse farmaceutice.

V.2.5. Cuantificarea substanțelor active din produsele farmaceutice analizate

În vederea determinării statinelor din produsele farmaceutice s-a folosit senzorul AuNP-CNT/SPCE, aplicându-se voltametria ciclică. Domeniul de potențial a fost -0.4 V și $+0.7$ și viteza de scanare $0,1\text{ V/s}$. Voltamograma ciclică relevă în fiecare caz picul corespunzător prezenței statinei (atorvastatinei, rosuvastatinei, respectiv simvastatinei) în produsul comercial selectat pentru analiză. Luând în considerare intensitatea picului anodic, cantitatea de produs luat în analiză și ecuația dreptei de calibrare, s-a calculat cantitatea de substanță existentă în produsul testat.

Validarea metodei voltametrice s-a realizat prin metoda spectrometrică FTIR. Metoda FTIR prezintă un potențial considerabil în controlul calității medicamentelor deoarece poate identifica structura chimică și identitatea substanței active din diferite tipuri de probe, obținându-se valori similare.

V.2.6. Studii de recuperare

Recuperările analitice s-au situat între $99,4\%$ și $106,1\%$ cu RSD (deviația standard relativă) de aproximativ 1% pentru toate cele trei statine. Valorile recuperării analitice obținute sunt relaționate cu prezenta în probele analizate a unor excipienți care pot interfera în răspunsul electrochimic. Rezultatele obținute sunt foarte bune, senzorul AuNP-CNT/SPCE, putând fi utilizat în practica farmaceutică.

V.3. Concluzii

În acest studiu au fost caracterizați senzorii SPCE și AuNP-CNT/SPCE în vederea determinării a trei statine din produse farmaceutice. AuNP-CNT/SPCE a prezentat un comportament electrochimic superior comparativ cu SPCE, încă din experimentele preliminare. Având o arie a suprafeței active mai mare, AuNP-CNT/SPCE a înregistrat picuri mai intense și bine definite, în soluțiile de statine, procesul fiind controlat de adsorbția speciei electroactive pe suprafața electrodului. În vederea cuantificării atorvastatinei, rosuvastatinei și simvastatinei s-au realizat curbe de calibrare, iar valorile calculate ale LOD și LOQ au demonstrat o sensibilitate mai ridicată în cazul AuNP-CNT/SPCE.

La analiza cantitativă concentrațiile de statine obținute cu AuNP-CNT/SPCE sunt foarte apropiate de cele obținute prin metoda spectrometrică dar și cu cele raportate de fiecare producător. Astfel, se poate concluziona că metoda folosită este simplă, versatilă, precisă, cu un cost redus. De asemenea, AuNP-CNT/SPCE se pretează utilizării pentru analiza de tip *screening* a unor probe complexe care conțin statine.

CONCLUZII GENERALE. CONTRIBUȚII PROPRII. PERSPECTIVE VIITOARE DE CERCETARE

CONCLUZII GENERALE

Teza cu titlul CERCETĂRI PRIVIND REALIZAREA DE NOI SENZORI VOLTAMETRICI PENTRU ANALIZA SUBSTANȚELOR ACTIVE FARMACOLOGIC este structurată în două părți. În partea teoretică au fost abordate noțiuni generale despre senzorii electrochimici și metodele de determinare a unor substanțe de interes farmaceutic, precum substanțele active din Ginkgo biloba, diosmina și o parte dintre statinele cu rol în reducerea colesterolului și a trigliceridelor în sânge.

- Senzorii dezvoltăți în aceste studii s-au dovedit a fi preciși și fezabili pentru a fi utilizați în analiza de rutină în controlul calității produselor farmaceutice.
- Senzorii au sensibilitate adecvată pentru detecția substanțelor active farmacologic, astfel că prin voltametrie ciclică se poate realiza analiza calitativă și cantitativă a substanțelor active farmacologic.
- S-a constatat că Tanakan-ul are proprietăți antioxidante superioare produsului GinkoPrim max în urma analizei substanțelor active din produsele farmaceutice pe bază de Ginkgo biloba. Aceasta poate fi datorată faptului că în Tanakan principiul activ este standardizat.
- În cazul senzorului serigrafiat pe bază de Prussian blue, mediatorul transferului de electroni catalizează procesul de oxido-reducere a diosminei, obținându-se o limită de detecție în domeniul micromolar.
- Senzorii utilizați pentru studiul electrochimic al statinelor au fost electrozi modificați cu carbon, nanotuburi de carbon și nanoparticule de aur. Cele trei statine au prezentat un proces de oxidare ireversibil, util pentru cuantificarea acestor compuși în produse farmaceutice.
- Concentrația speciei active adsorbite pe suprafața senzorilor a fost în concordanță cu valorile raportate în alte studii de specialitate, demonstrându-se astfel acuratețea și precizia metodei voltametrice aplicate dar și influența redusă a interferențelor la detecția compușilor activi.
- Valorile obținute ale LOD și LOQ în urma cuantificării atorvastatinei, rosuvastatinei și simvastatinei au demonstrat o sensibilitate mai ridicată în cazul senzorului AuNP-CNT/SPCE.
- Rezultatele determinărilor cantitative a substanțelor active din probele analizate obținute cu senzorii voltametrici au fost validate prin metode clasice de analiză UV-Vis și FTIR obținând valori similare, apropiate de cele raportate de producători

CONTRIBUȚII PERSONALE

Pentru studiile experimentale am selectat compuși flavonoidici întâlniți adesea în suplimentele alimentare și în produse standardizate care se eliberează doar pe bază de prescripție medicală dar și inhibitori ai hidroximetilglutaril-coenzima A reductazei, având concentrații bine stabilite.

Prima etapă constă în achiziția din farmaciile locale ale unui medicament Rx și un supliment alimentar pe bază de *Ginkgo biloba* de concentrații diferite. Analiza acestor probe a fost studiată prin folosind doi senzori serigrafiați pe bază de carbon și senzori serigrafiați de carbon modificați cu nanotuburi de carbon, aplicând metoda voltametriei ciclice și metoda spectrofotometrică DPPH.

Studiile preliminare s-au realizat folosind compuși standard cu proprietăți redox cum este catecolul și ferocianura de potasiu. În toate cazurile senzorii serigrafiați au fost folosiți pentru determinarea comportamentului electrochimic, unde s-a observat prezența a două picuri redox, ce implică transferul de electroni și protoni.

Altă evaluare pentru determinarea proprietăților antioxidante a compușilor fenolici a fost realizată prin metoda DPPH. Aceasta este o metodă standard, simplă, rapidă și frecvent utilizată, având ca scop evaluarea capacității de eliminare a radicalilor DPPH. Valorile procentuale de reducere ale DPPH au fost calculate folosind ca probe, comprimatele fiecărui medicament, iar testele au fost efectuate în triplicat, iar rezultatele raportate ca medie. Abaterea standard relativă a prezentat un procent de aproximativ 1%.

Următorul studiu constă în determinarea diosminei, investigând comportamentul electrochimic al acesteia, cu un electrod serigrafiat pe bază de carbon și un electrod serigrafiat pe bază de carbon modificat cu *Prussian Blue*. Metoda voltametrică utilizată a fost validată în scopul determinării cantitative și calitative a diosminei prin metoda FTIR.

Senzorii utilizați au fost modificați în laborator, iar produsele farmaceutice Detralex și Fluxiv au fost achiziționate din farmaciile locale. Cele două produse farmaceutice au aceeași substanță activă dar substanțe auxiliare diferite, care pot influența procesul de detecție.

Proprietățile electrochimice ale celor doi electrozi au fost studiate prin voltametrie ciclică, în soluții electroactive, iar forma picurilor, potențialul și curentul distribuit în celula de analizat, au fost în funcție de natura materialelor sensibile.

În urma analizei voltamogramelor ciclice, valorile potențialelor s-au raportat la potențialul electrodului de referință Ag/AgCl (KCl 3M). Potențialul optim pentru acești electrozi a fost între -0,4 V și + 0,7V, înregistrând 6 cicluri succesive pentru stabilizarea semnalelor senzorilor.

Comparând voltamogramele ciclice am evaluat valorile principalilor parametri și am observat procesul de oxido-reducere a ionului ferocianură este cvasireversibil și PB/SPCE prezintă o sensibilitate ridicată.

Conform ecuației *Randles-Sevcik* se dovedește că procesul redox este controlat de procesul de difuzie. Pentru fiecare senzor au fost realizate curbe de calibrare, au fost calculate limitele de detecție (LOD) și limitele de cuantificare (LOQ). Prezența valorilor mici ale LOD și LOQ au fost determinate la senzorul PB/SPCE, cu valori cuprinse între 10^{-7} și 10^{-8} M ceea ce a demonstrat fezabilitatea metodei.

Metoda FTIR a fost utilizată în validarea rezultatelor. Rezultate obișnuite au fost în concordanță cu cele obținute prin metoda voltametrică. Singurele diferențe au apărut la

validarea rezultatelor datorită interferențelor cu celelalte substanțe auxiliare prezente în medicamentul Fluxiv. Se poate concluziona ca rezultatele obținute de senzorul modificat cu Prussian blue la cuantificarea diosminei sunt reale, fezabile și validate la nivel de laborator.

Al treilea experiment, constă în analiza a trei statine importante din punct de vedere farmacologic. Aceste substanțe sunt inhibitori ai 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductază, și catalizează etapa de limitare a ratei în biosinteza colesterolului. Aceste enzime indispensabile au efecte importante hipolipemiante.

Am folosit doi senzori serigrafiați, unul pe bază de carbon și unul pe bază de nanotuburi de carbon modificat cu nanoparticule de aur. Scopul acestui studiu este determinarea cantitativă și calitativă a statinelor prin metoda voltametrică și comparate cu rezultatele din metoda FTIR.

Voltamogramele ciclice înregistrate relevă intensitatea curenților care corespund unui proces redox al ferocianurii de potasiu. Acesta crește o dată cu creșterea vitezei de scanare, obținând-se o regresie liniară între intensitatea curentului anodic și rădăcina pătrată a vitezei de scanare.

Din punct de vedere al ariei AuNP-CNT/SPCE prezintă o arie a suprafeței active de aproximativ 8 ori mai mare față de aria sa geometrică și de 4 ori mai mare față de aria senzorului SPCE.

Senzorul modificat AuNP-CNT/SPCE prezintă o sensibilitate destul de mare datorită, proprietăților electrice, mecanice, structurii sale, favorizând un transfer rapid de electroni.

În următoarea etapă au fost studiați cei doi senzori prin imersia fiecăruia în soluțiile stoc pregătite cu atorvastatină, simvastatină și rosuvastatină. Rezultate înregistrate de cei doi senzori în soluțiile statinelor prin metoda voltametrică arată ca substanțele prezintă un comportament electrochimic similar, reprezentat printr-un proces de oxidare ireversibil. Diferențele care apar la intensitatea picurilor sunt datorate modificărilor aduse electrozilor serigrafiați.

Am utilizat viteze de scanare diferite în urma cărora se observă o creștere succesivă a picurilor o dată cu viteza de scanare. S-a constatat o creștere a intensității picului anodic, odată cu creșterea concentrației de atorvastatină, rosuvastatină, respectiv simvastatină, pentru ambii electrozi de lucru.

Valorile calculate LOD și LOQ au demonstrat o sensibilitate mai ridicată în cazul AuNP-CNT/SPCE. Prin urmare concentrațiile de statine obținute cu AuNP-CNT/SPCE sunt foarte apropiate de cele obținute prin metoda spectrometrică dar și cu cele raportate de producători.

Având în vedere rezultatele obținute, putem spune că metoda folosită este simplă, versatilă, precisă, cu un cost avantajos. De asemenea, atât SPCE, cât și AuNP-CNT/SPCE se pretează utilizării pentru analiza de rutină a unor produse farmaceutice.

PERSPECTIVE DE CERCETARE VIITOARE

Pornind de la dezvoltarea acestui concept abordat în ultimele decenii, bazat pe dezvoltarea unor senzori și biosenzori, am realizat un plan de afaceri în corelație cu teza de cercetare în cadrul proiectului ANTREPRENORDOC perspectivele de cercetare viitoare sunt:

- ❖ Crearea testelor rapide pe bază de senzori pentru o detecție rapidă a nivelului HDL, LDL, cât și dezvoltarea altor teste rapide cu rolul de depistare a virusurilor, bolile intestinale, infecțiile tractului urinar, sau alte tipuri de testări precum testarea covid. *Realizând această abordare inovativă din punct de vedere chimic aduce plus valoare serviciilor de consultanță* în domeniul farmaceutic și extindere pe partea medicală, proiectul fiind axat pe optimizarea serviciilor în sănătate, cât și pe inovarea asistenței farmaceutice personalizate.
- ❖ Producerea unor kit-uri de autotestare rapidă pentru diosmina și rosuvastatina pe baza unor biosenzori. Oferirea acestor servicii de consultanță atât pentru pacienți cât și pentru firmele care activează în domeniul chimic, laboratoare farmaceutice, și mai ales cele care produc hepatoprotectoare, suplimente alimentare sau produse farmaceutice de tip RX ar putea fi o oportunitate pentru optimizarea asistenței medicale.

LUCRĂRI PUBLICATE

Articole publicate

1. **R. O. Gunache (Roșca)**, C. Apetrei, "Estimation of Active Compounds Quantity from Pharmaceuticals Based on *Ginkgo biloba*," Chemosensors, vol. 8, no. 4, p. 110, Nov. 2020, doi: 10.3390/chemosensors8040110. FI 3,398
2. **R. O. Gunache (Roșca)**, C. Apetrei, "Determination of Diosmin in Pharmaceutical Products with Chemically Modified Voltammetric Sensors," Int. J. Mol. Sci., vol. 22, no. 14, p. 7315, Jul. 2021, doi: 10.3390/ijms22147315. FI 5,923
3. **R. O. Gunache (Roșca)**, A. V. Bounegru, C. Apetrei, "Determination of Atorvastatin with Voltammetric Sensors Based on Nanomaterials," Inventions, vol. 6, no. 3, p. 57, Aug. 2021, doi: 10.3390/inventions6030057. Emerging Sources Citation Index Journal

Lucrări prezentate la conferințe și manifestări științifice

1. Poster / **Ramona Oana Gunache (Roșca)**, Constantin Apetrei. Development of Sensors Based on Screen-Printed Electrodes Modified with Carbon Nanofibers for the Electrochemical Detection of L-Dopamine, Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG 2018 The Sixth Edition GALAȚI, 7th-8th of June 2018
2. Poster / **Ramona Oana Gunache (Roșca)**, C. Apetrei., Graphene based sensor for the analysis of catechol derivatives.. The 4th International Conference New Trends on Sensing - Monitoring - Telediagnosis for Life Sciences NT-SMT-LS 2018, August 30 - September 1, 2018, Brașov, România
3. Poster / **Ramona Oana Gunache (Roșca)**, C. Apetrei, Voltammetric sensor for the analysis of electroactive compounds from ginkgo biloba based pharmaceutical products, 22nd Conference "New Cryogenic and Isotope Technologies for Energy and Environment" - EnergEn 2018, Băile Govora, Romania, October 24 – 26, 2018
4. Oral / **Ramona-Oana Gunache (Roșca)**, Constantin Apetrei. Voltammetric Sensor for the Analysis of Diosmin in Pharmaceuticals, SCDS-UDJG 2019, The Seventh Edition, Galați, 13th-14th of June 2019
5. Poster / **Ramona Oana Gunache (Roșca)**, Constantin Apetrei. Voltammetric sensors for the analysis of three types of statins in pharmaceuticals. RICCCE 21, 21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, September 4-7 2019, Constanta – Mamaia, ROMANIA.
6. Oral / **Gunache (Roșca) Ramona-Oana**, Constantin Apetrei. Rapid determination of Rosuvastatin at screen printed electrodes in pharmaceuticals, SCDS-UDJG 2020; The Eighth Edition, GALAȚI, 18th-19th of June 2020
7. Oral / Dinu Ancuta, Dăscălescu Dorin, Munteanu Irina, Bounegru Alexandra, **Gunache (Roșca) Ramona-Oana**, Constantin Apetrei "Electrochemical sensors based on nanomaterials employed in water analysis", SCDS-UDJG 2020; The Eighth Edition, GALAȚI, 18th-19th of June 2020
8. Oral / **Ramona Oana Gunache (Roșca)**, Constantin Apetrei. Voltammetric sensor for the analysis of atorvastatin in pharmaceuticals, The 5th International Conference New Trends on Sensing - Monitoring – Telediagnosis for Life Sciences NT-SMT-LS 2020 ONLINE July 3-4, 2020

-
9. Poster / **Gunache (Roșca) Ramona-Oana**, Constantin Apetrei. Detection of Atorvastatin with a Voltammetric Sensor Based on Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles, SCDS-UDJG 2021; The Eighth Edition, GALAȚI, 10th-11th of June 2021

Alte lucrări științifice

10. Poster / Cristina Oana Daciana Teodorescu, Andrei Teodorescu, Amarin Remus Popac , Andreea- Iuliana Mirond*, Horia-Dan Lișcuc,**Ramona Oana Gunache (Roșca)** , Ștefan Roșcag. Pregnancy and blood pressure SCDS-UDJG 2021; The Eighth Edition, GALAȚI, 10th-11th of June 2021
11. Oral / Alexandra Virginia BOUNEGRU(MEREȘESCU), Constantin APETREI, Irina Georgiana (BULGARU) MUNTEANU, **Ramona-Oana(GUNACHE) ROȘCA**, DEVELOPMENT BIOSENSORS FOR THE HYDROXYCINNAMIC ACIDS ANALYSIS, The III th edition of the exploratory workshop NEXT-Chem, Innovative Cross-Sectoral Tehnologies,27-28 May 2021

BIBLIOGRAFIE

1. Wang, Y.; Xu, H.; Zhang, J.; Li, G. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors* **2008**, *8*, 2043–2081, doi:10.3390/s8042043.
2. Stoytcheva, M. Electrochemical Sensors for Environmental Analysis. In; 2011.
3. Jadon, N.; Jain, R.; Sharma, S.; Singh, K. Recent Trends in Electrochemical Sensors for Multianalyte Detection – A Review. *Talanta* **2016**, *161*, 894–916, doi:10.1016/j.talanta.2016.08.084.
4. Nigović, B. Electrochemical Properties and Square-Wave Voltammetric Determination of Pravastatin. *Anal Bioanal Chem* **2005**, *384*, 431–437, doi:10.1007/s00216-005-0188-1.
5. Liu, C.; Yao, J.; Tang, H.; Zhu, S.; Hu, J. The Electrochemical Behavior of P-Benzenediol on a Self-Assembled Monolayers Pt Electrode Modified with N-(2-Mercapto-1,3,4-Thiadiazol-5-Yl)-N'-(4-Substituted-Arylacetyl) Urea. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *386*, 1905–1911, doi:10.1007/s00216-006-0725-6.
6. Chatterjee, S.; Chen, A. Functionalization of Carbon Buckypaper for the Sensitive Determination of Hydrogen Peroxide in Human Urine. *Biosensors and Bioelectronics* **2012**, *35*, 302–307, doi:10.1016/j.bios.2012.03.005.
7. Chatterjee, S.; Chen, A. Voltammetric Detection of the α -Dicarbonyl Compound: Methylglyoxal as a Flavoring Agent in Wine and Beer. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *751*, 66–70, doi:10.1016/j.aca.2012.09.011.
8. Gao, H.; Qi, X.; Chen, Y.; Sun, W. Electrochemical Deoxyribonucleic Acid Biosensor Based on the Self-Assembly Film with Nanogold Decorated on Ionic Liquid Modified Carbon Paste Electrode. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *704*, 133–138, doi:10.1016/j.aca.2011.07.044.
9. Meng, F.; Shi, W.; Sun, Y.; Zhu, X.; Wu, G.; Ruan, C.; Liu, X.; Ge, D. Nonenzymatic Biosensor Based on CuxO Nanoparticles Deposited on Polypyrrole Nanowires for Improving Detectionrange. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *42*, 141–147, doi:10.1016/j.bios.2012.10.051.
10. Linting, Z.; Ruiyi, L.; Zaijun, L.; Qianfang, X.; Yinjun, F.; Junkang, L. An Immunosensor for Ultrasensitive Detection of Aflatoxin B1 with an Enhanced Electrochemical Performance Based on Graphene/Conducting Polymer/Gold Nanoparticles/the Ionic Liquid Composite Film on Modified Gold Electrode with Electrodeposition. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *174*, 359–365, doi:10.1016/j.snb.2012.06.051.
11. Davim, J.P.; Charitidis, C.A. Nanocomposites: Materials, Manufacturing and Engineering. **2013**.
12. Thostenson, E.T.; Li, C.; Chou, T.-W. Nanocomposites in Context. *Composites Science and Technology* **2005**, *65*, 491–516, doi:10.1016/j.compscitech.2004.11.003.
13. Karimi-Maleh, H.; Biparva, P.; Hatami, M. A Novel Modified Carbon Paste Electrode Based on NiO/CNTs Nanocomposite and (9, 10-Dihydro-9, 10-Ethanoanthracene-11, 12-Dicarboximido)-4-Ethylbenzene-1, 2-Diol as a Mediator for Simultaneous Determination of Cysteamine, Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Folic Acid. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *48*, 270–275, doi:10.1016/j.bios.2013.04.029.
14. Afkhami, A.; Khoshsafar, H.; Bagheri, H.; Madrakian, T. Facile Simultaneous Electrochemical Determination of Codeine and Acetaminophen in Pharmaceutical Samples and Biological Fluids by Graphene–CoFe₂O₄ Nanocomposite Modified Carbon Paste Electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *203*, 909–918, doi:10.1016/j.snb.2014.07.031.

15. Karyakin, A.A. Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 813–819, doi:https://doi.org/10.1002/1521-4109(200106)13:10<813::AID-ELAN813>3.0.CO;2-Z.
16. Cao, Y.; Chu, Q.; Fang, Y.; Ye, J. Analysis of Flavonoids in Ginkgo Biloba L. and Its Phytopharmaceuticals by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Anal Bioanal Chem* **2002**, *374*, 294–299, doi:10.1007/s00216-002-1436-2.
17. Belwal, T.; Giri, L.; Bahukhandi, A.; Tariq, Mohd.; Kewlani, P.; Bhatt, I.D.; Rawal, R.S. Chapter 3.19 - Ginkgo biloba. In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*; Nabavi, S.M., Silva, A.S., Eds.; Academic Press, 2019; pp. 241–250 ISBN 978-0-12-812491-8.
18. Unger, M. Pharmacokinetic Drug Interactions Involving Ginkgo Biloba. *Drug Metabolism Reviews* **2013**, *45*, 353–385, doi:10.3109/03602532.2013.815200.
19. Herrschaft, H.; Nacu, A.; Likhachev, S.; Sholomov, I.; Hoerr, R.; Schlaefke, S. Ginkgo Biloba Extract EGb 761® in Dementia with Neuropsychiatric Features: A Randomised, Placebo-Controlled Trial to Confirm the Efficacy and Safety of a Daily Dose of 240 Mg. *Journal of Psychiatric Research* **2012**, *46*, 716–723, doi:10.1016/j.jpsychires.2012.03.003.
20. Eisvand, F.; Razavi, B.M.; Hosseinzadeh, H. The Effects of *Ginkgo Biloba* on Metabolic Syndrome: A Review. *Phytotherapy Research* **2020**, *34*, 1798–1811, doi:10.1002/ptr.6646.
21. Wang, Y.; Wang, L.; Zeng, S.; Yang, Y.; Tang, Y. Analysis and determination of the flavonoids from Ginkgo biloba extract by high performance liquid chromatograph.
22. He, X.; Bernart, M.W.; Nolan, G.S.; Lin, L.; Lindenmaier, M.P. High-Performance Liquid Chromatography—Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Study of Ginkgolic Acid in the Leaves and Fruits of the Ginkgo Tree (Ginkgo Biloba). *Journal of Chromatographic Science* **2000**, *38*, 169–173, doi:10.1093/chromsci/38.4.169.
23. Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; 2nd ed.; Wiley: New York, 2001; ISBN 978-0-471-04372-0.
24. Russo, R.; Chandradhara, D.; De Tommasi, N. Comparative Bioavailability of Two Diosmin Formulations after Oral Administration to Healthy Volunteers. *Molecules* **2018**, *23*, 2174, doi:10.3390/molecules23092174.
25. Sammani, M.S.; Clavijo, S.; Portugal, L.; Suárez, R.; Seddik, H.; Cerdà, V. Use of Multiresponse Statistical Techniques to Optimize the Separation of Diosmin, Hesperidin, Diosmetin and Hesperitin in Different Pharmaceutical Preparations by High Performance Liquid Chromatography with UV-DAD. *Talanta* **2017**, *167*, 695–702, doi:10.1016/j.talanta.2017.02.069.
26. Piponski, M.; Stoimenova, T.B.; Topkoska, M.; Stefov, S.; Piponska, M.; Serafimovska, G.T. Development and Validation of a Fast and Simple RP-HPLC Method for the Determination of Diosmin and Hesperidin in Combined Tablet Dosage Form. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* **2018**, *37*, 127–134, doi:10.20450/mjccce.2018.1448.
27. Szymański, M.; Mlynarek, D.; Szymański, A.; Matławska, I. Simultaneous Determination of Diosmin and Hesperidin in Pharmaceuticals by RPLC Using Ionic Liquids as Mobile Phase Modifiers. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* **2016**, *15*, 141.
28. Adouani, I.; Du, M.; Hang, T.-J. Identification and Determination of Related Substances in Diosmin Bulk Drug and Pharmaceutical Formulations by HPLC and HPLC–MS. *Chromatographia* **2013**, *76*, 499–508, doi:10.1007/s10337-013-2404-z.
29. Shawky, E. Development and Validation of an HPTLC Method for the Simultaneous Determination of Diosmin and Hesperidin in Different Citrus Fruit Extracts and Pharmaceutical Formulations. *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* **2012**, *25*, 138–144, doi:10.1556/jpc.25.2012.2.9.

30. Foudah, A.I.; Alam, P.; Anwer, Md.K.; Yusufoglu, H.S.; Abdel-Kader, M.S.; Shakeel, F. A Green RP-HPTLC-Densitometry Method for the Determination of Diosmin in Pharmaceutical Formulations. *Processes* **2020**, *8*, 817, doi:10.3390/pr8070817.
31. Chang, C.W.; Hsiu, S.L.; Wu, P.P.; Kuo, S.C.; Chao, P.D.L. HPLC Assays of Naringin and Hesperidin in Chinese Herbs and Serum. *Journal of Food and Drug Analysis* **1997**, *5*.
32. Cova, D.; De Angelis, L.; Giavarini, F.; Palladini, G.; Perego, R. Pharmacokinetics and Metabolism of Oral Diosmin in Healthy Volunteers. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology* **1992**, *30*, 29–33.
33. El-Shafae, A.M.; El-Domiaty, M.M. Improved LC Methods for the Determination of Diosmin and/or Hesperidin in Plant Extracts and Pharmaceutical Formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2001**, *26*, 539–545, doi:10.1016/S0731-7085(01)00476-9.
34. El-Shahawi, M.S.; Bashammakh, A.S.; El-Mogy, T. Determination of Trace Levels of Diosmin in a Pharmaceutical Preparation by Adsorptive Stripping Voltammetry at a Glassy Carbon Electrode. *Analytical Sciences* **2006**, *22*, 1351–1354, doi:10.2116/analsci.22.1351.
35. Adam, V.; Mikelova, R.; Hubalek, J.; Hanustiak, P.; Beklova, M.; Hodek, P.; Horna, A.; Trnkova, L.; Stiborova, M.; Zeman, L.; et al. Utilizing of Square Wave Voltammetry to Detect Flavonoids in the Presence of Human Urine. *Sensors* **2007**, *7*, 2402–2418, doi:10.3390/s7102402.
36. Li, H.; Liu, Y.; Wang, L.; Sheng, K.; Zou, L.; Ye, B. Electrochemical Behavior of Diosmin and Its Sensitive Determination on ZrO₂-NPs-Coated Poly(Diallyldimethylammonium Chloride)-Functionalized Graphene Modified Electrode. *Microchemical Journal* **2018**, *143*, 430–440, doi:10.1016/j.microc.2018.08.023.
37. Teradal, N.L.; Seetharamappa, J.; Satpati, A.K. Unzipped Carbon Nanotubes: Analytical and Binding Applications of Semisynthetic Phlebotropic Flavonoid, Diosmin. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 55550–55560, doi:10.1039/C5RA07497E.
38. Tsoukas, M.A.; Mantzoros, C.S. Lipodystrophy Syndromes. In *Endocrinology: Adult and Pediatric*; Elsevier, 2016; pp. 648-661. e5 ISBN 978-0-323-18907-1.
39. Atorvastatin (CHEBI:39548) Available online: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:39548> (accessed on 31 July 2021).
40. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Inhibitors. 4. Side-Chain Ester Derivatives of Mevinolin | Journal of Medicinal Chemistry Available online: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jm00155a040> (accessed on 4 August 2021).
41. ABRAMOWICZ, M. Choice of Lipid Lowering Drugs. *Medical Lett* **1988**, *40*, 117–122.
42. Abbar, J.C.; Nandibewoor, S.T. Voltammetric Oxidation and Determination of Atorvastatin Based on the Enhancement Effect of Cetyltrimethyl Ammonium Bromide at a Carbon Paste Electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *106*, 158–164, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.01.045.
43. Silva, T.A.; Zanin, H.; Vicentini, F.C.; Corat, E.J.; Fatibello-Filho, O. Electrochemical Determination of Rosuvastatin Calcium in Pharmaceutical and Human Body Fluid Samples Using a Composite of Vertically Aligned Carbon Nanotubes and Graphene Oxide as the Electrode Material. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *218*, 51–59, doi:10.1016/j.snb.2015.04.085.
44. Silva, T.A.; Pereira, G.F.; Fatibello-Filho, O.; Eguiluz, K.I.B.; Salazar-Banda, G.R. Square-Wave Voltammetric Determination of Rosuvastatin Calcium in Pharmaceutical and Biological Fluid Samples Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. *Diamond and Related Materials* **2015**, *58*, 103–109, doi:10.1016/j.diamond.2015.06.013.

45. Komorsky-Lovrić, Š.; Nigović, B. Electrochemical Characterization of Simvastatin by Abrasive Stripping and Square-Wave Voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2006**, *593*, 125–130, doi:10.1016/j.jelechem.2006.03.026.
46. Al-Ghamdi, A.F.; Hefnawy, M.M.; El-Shabrawy, Y. NON-EXTRACTIVE ULTRA-TRACE DETERMINATION OF SIMVASTATIN IN BIOLOGICAL FLUIDS BY VOLTAMMETRIC METHOD VIA COMPLEXATION WITH CADMIUM. *14*.
47. Nigović, B.; Komorsky-Lovrić, Š.; Devčić, D. Rapid Voltammetric Identification and Determination of Simvastatin at Trace Levels in Pharmaceuticals and Biological Fluid. *Croatica Chemica Acta (CCA@chem.pmf.hr)*; Vol.81 No.3 **2008**, *81*.
48. Ahmad, N.; Fazal, H.; Abbasi, B.H.; Farooq, S. Efficient Free Radical Scavenging Activity of Ginkgo Biloba, Stevia Rebaudiana and Parthenium Hysterophorous Leaves through DPPH (2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl). **2010**, *10*.
49. SciELO - Brazil - Antioxidant Activity Evaluation of Dried Herbal Extracts: An Electroanalytical Approach. Available online: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/7ybvqYtVMMPHXp5WkNHkksH/?lang=en&format=html> (accessed on 30 August 2021).
50. Tsierkezos, N.G. Cyclic Voltammetric Studies of Ferrocene in Nonaqueous Solvents in the Temperature Range from 248.15 to 298.15 K. *J Solution Chem* **2007**, *36*, 289–302, doi:10.1007/s10953-006-9119-9.
51. Mantle, D.; Wilkins, R.M.; Asim Gok, M. Comparison of Antioxidant Activity in Commercial Ginkgo Biloba Preparations. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* **2003**, *9*, 625–629, doi:10.1089/107555303322524472.
52. Zakaria, M.B.; Chikyow, T. Recent Advances in Prussian Blue and Prussian Blue Analogues: Synthesis and Thermal Treatments. *Coordination Chemistry Reviews* **2017**, *352*, 328–345, doi:10.1016/j.ccr.2017.09.014.
53. Qin, Z.; Li, Y.; Gu, N. Progress in Applications of Prussian Blue Nanoparticles in Biomedicine. *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, *7*, 1800347, doi:10.1002/adhm.201800347.
54. Wei, X.; Xia, G.-G.; Kirby, B.; Thomsen, E.; Li, B.; Nie, Z.; Graff, G.G.; Liu, J.; Sprenkle, V.; Wang, W. An Aqueous Redox Flow Battery Based on Neutral Alkali Metal Ferri/Ferrocyanide and Polysulfide Electrolytes. *J. Electrochem. Soc.* **2016**, *163*, A5150–A5153, doi:10.1149/2.0221601jes.
55. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Development of a Novel Electrochemical Biosensor Based on Carbon Nanofibers–Gold Nanoparticles–Tyrosinase for the Detection of Ferulic Acid in Cosmetics. *Sensors* **2020**, *20*, 6724.
56. Apetrei, I.M.; Apetrei, C. A Modified Nanostructured Graphene-Gold Nanoparticle Carbon Screen-Printed Electrode for the Sensitive Voltammetric Detection of Rutin. *Measurement* **2018**, *114*, 37–43, doi:10.1016/j.measurement.2017.09.020.
57. Gewirth, A.A. Inorganic Electrochemistry: Theory, Practice and Application By Piero Zanello (University of Siena, Italy). Royal Society of Chemistry: Cambridge. 2003. Xiv + 616 Pp. \$199.00. ISBN 0-85404-661-5. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4743–4744, doi:10.1021/ja0336022.
58. Akal, Z.Ü.; Alpsoy, L.; Baykal, A. Superparamagnetic Iron Oxide Conjugated with Folic Acid and Carboxylated Quercetin for Chemotherapy Applications. *Ceramics International* **2016**, *42*, 9065–9072, doi:10.1016/j.ceramint.2016.02.166.
59. Díaz, P.; González, Z.; Santamaría, R.; Granda, M.; Menéndez, R.; Blanco, C. Enhancing Energy Density of Carbon-Based Supercapacitors Using Prussian Blue Modified Positive Electrodes. *Electrochimica Acta* **2016**, *212*, 848–855, doi:10.1016/j.electacta.2016.07.057.
60. Bonacin, J.A.; Dos Santos, P.L.; Katic, V.; Foster, C.W.; Banks, C.E. Use of Screen-Printed Electrodes Modified by Prussian Blue and Analogues in Sensing of Cysteine. *Electroanalysis* **2018**, *30*, 170–179, doi:10.1002/elan.201700628.

61. Dinu, A.; Apetrei, C. Voltammetric Determination of Phenylalanine Using Chemically Modified Screen-Printed Based Sensors. *Chemosensors* **2020**, *8*, 113, doi:10.3390/chemosensors8040113.
62. Brubaker, J.P. A Diffusion Model for Cyclic Voltammetry with Nanostructured Electrode Surfaces, University of Dayton, 2014.
63. Karim-Nezhad, G.; Hasanzadeh, M.; Saghatforoush, L.; Shadjou, N.; Earshad, S.; Khalilzadeh, B. Kinetic Study of Electrocatalytic Oxidation of Carbohydrates on Cobalt Hydroxide Modified Glassy Carbon Electrode. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 141–151, doi:10.1590/S0103-50532009000100022.
64. Şengül, Ü. Comparing Determination Methods of Detection and Quantification Limits for Aflatoxin Analysis in Hazelnut. *Journal of Food and Drug Analysis* **2016**, *24*, 56–62, doi:10.1016/j.jfda.2015.04.009.
65. Mallah, M.A.; Sherazi, S.T.H.; Bhangar, M.I.; Mahesar, S.A.; Bajeer, M.A. A Rapid Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Method for Direct Quantification of Paracetamol Content in Solid Pharmaceutical Formulations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *141*, 64–70, doi:10.1016/j.saa.2015.01.036.
66. Fale, P.L.; Altharawi, A.; Chan, K.L.A. In Situ Fourier Transform Infrared Analysis of Live Cells' Response to Doxorubicin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2015**, *1853*, 2640–2648, doi:10.1016/j.bbamcr.2015.07.018.
67. Apetrei, I.M.; Apetrei, C. Voltammetric Determination of Melatonin Using a Graphene-Based Sensor in Pharmaceutical Products. *Int J Nanomedicine* **2016**, *11*, 1859–1866, doi:10.2147/IJN.S104941.
68. Bounegru, A.; Apetrei, C. Voltammetric Sensors Based on Nanomaterials for Detection of Caffeic Acid in Food Supplements. *Chemosensors* **2020**, *8*, 41, doi:10.3390/chemosensors8020041.
69. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Carbonaceous Nanomaterials Employed in the Development of Electrochemical Sensors Based on Screen-Printing Technique—A Review. *Catalysts* **2020**, *10*, 680, doi:10.3390/catal10060680.
70. García-Carmona, L.; Moreno-Guzmán, M.; Sierra, T.; González, M.C.; Escarpa, A. Filtered Carbon Nanotubes-Based Electrodes for Rapid Sensing and Monitoring of L-Tyrosine in Plasma and Whole Blood Samples. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *259*, 762–767, doi:10.1016/j.snb.2017.12.090.
71. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Voltamperometric Sensors and Biosensors Based on Carbon Nanomaterials Used for Detecting Caffeic Acid—A Review. *IJMS* **2020**, *21*, 9275, doi:10.3390/ijms21239275.
72. El-Wakil, M.M.; Abdelhady, K.K.; Abdel Salam, R.A.; Hadad, G.M.; Ali, R. Facile Synthesis of Novel Nanocomposite Prepared from Spinel Copper Ferrite and Reduced Graphene Oxide in the Presence of Anti-Fouling Agent Diethyl Ammonium Acid Sulphate for Ultrasensitive Detection of Rosuvastatin in Human Plasma. *Microchemical Journal* **2019**, *147*, 1133–1140, doi:10.1016/j.microc.2019.04.035.
73. Eskiköy, D.; Durmuş, Z.; Kiliç, E. Electrochemical Oxidation of Atorvastatin and Its Adsorptive Stripping Determination in Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Fluids. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2011**, *76*, 1633–1649, doi:10.1135/cccc2011117.