

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

REALIZAREA UNOR NOI SENZORI ȘI BIOSENZORI VOLTAMPEROMETRICI PENTRU DETERMINAREA ACIZILOR HIDROXICINAMICI

Doctorand,

Alexandra Virginia MEREȘESCU (BOUNEGRU)

Conducător științific,

Prof. dr. habil Constantin APETREI

Seria C: Chimie Nr 1

GALAȚI

2021

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**REALIZAREA UNOR NOI SENZORI ȘI BIOSENZORI VOLTAMPEROMETRICI PENTRU
DETERMINAREA ACIZILOR HIDROXICINAMICI**

Doctorand

Alexandra Virginia MEREȘESCU (BOUNEGRU)

Președinte

Prof univ.dr.ing. Puiu Lucian GEORGESCU
Rector- 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.chim. Raluca-Ioana VAN STADEN
Universitatea "Politehnică" din București

Cercetător științific Gr. 1, dr.biochim Mihaela DONI
*Director General-Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare
pentru Chimie și Petrochimie – ICECHIM (INCDPCICECHIM)*

Prof univ.dr.chim. Rodica Mihaela DINICĂ
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Seria C: Chimie Nr 1

GALAȚI

2021

Mulțumiri

Doresc sa îmi exprim mulțumirile și profunda recunoștință, conducătorului științific al tezei, domnului **Prof. Dr. habil. Constantin Apetrei**, pentru încrederea și sprijinul acordat, pentru îndrumarea științifică extrem de valoroasă precum și pentru răbdarea cu care mi-a răspuns la fiecare întrebare sau incertitudine. Mulțumesc pentru implicarea și orietarea atentă pe care mi-a oferit-o în parcurgerea fiecărei etape de cercetare.

De asemenea, sincere mulțumiri adresez membrilor comisiei de îndrumare: Prof. Dr. habil Catalina Iticescu, Conf. Dr. Bianca Furdui și Lect. Dr. Dumitru Dima pentru tot sprijinul acordat, motivația insuflată și sugestiile oferite în perioada doctoratului dar și pentru elaborarea tezei.

Mulțumesc doamnei Dr. Chim Irina-Elisabeta Geană, cercetător științific Gr.1 la ICSI Rm. Valcea, pentru sprijinul acordat în realizarea analizelor cromatografice, experimente ce au contribuit la validarea rezultatelor electrochimice.

De asemenea, doresc să mulțumesc și membrilor comisiei de evaluare: Prof. Dr. habil Rodica Dinică, Prof. Dr. habil. Raluca-Ioana van Staden, Dr. Biochim. Mihaela Doni.

Aduc mulțumiri întregului corp profesoral de la Facultatea de Științe și Mediu, Departamentul Chimie dar și colegilor mei pentru sprijinul și înțelegerea acordată.

Nu în ultimul rând, aș vrea să îi mulțumesc bunicii mele pentru susținerea morală și sprijinul necondiționat pe parcursul întregii mele evoluții personale și profesionale și mai ales, fetiței mele, Mădălina Nicoleta Bounegru pentru înțelegerea și răbdarea de care a dat dovadă, permanent, în perioada stagiului meu de doctorat.

Mereșescu (Bounegru) Alexandra Virginia

Cuprins

(numerotarea paginilor corespunde cu teza de doctorat)

Mulțumiri	I
Cuprins.....	II
INTRODUCERE	1
Lista de figuri.....	5
Lista de tabele.....	9
PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	11
CAPITOLUL 1. Considerații generale privind compușii fenolici.....	11
1.1. Răspândire și activitate biologică.....	11
1.2. Clasificare și particularități structurale.....	12
1.3. Acizii hidroxicinamici, structura chimică și rolul lor în organismul uman	14
1.3.1. Acidul cafeic, biosinteză, acțiuni terapeutice, metode de determinare	16
1.3.2. Acidul ferulic, biosinteză, acțiuni terapeutice, metode de determinare	17
1.3.3. Acidul p-cumaric, biosinteză, acțiuni terapeutice, metode de determinare	18
CAPITOLUL 2. Tehnici voltametrice utilizate în analiza compușilor fenolici	20
2.1. Voltametrie puls diferențială (DPV).....	20
2.2. Voltametrie de undă pătrată (SWV).....	21
2.3. Voltametrie de adsorbție.....	21
2.4. Voltametrie ciclică (CV)	22
CAPITOLUL 3. Nanomateriale folosite pentru realizarea senzorilor electrochimici	24
3.1. Utilizarea nanomaterialor de carbon pentru realizarea senzorilor	24
3.2. Electrozi serigrafiați	24
3.2.1. Avantaje și limitări în fabricarea și funcționalizarea senzorilor serigrafiați	25
3.3. Senzori modificați pe bază de nanomateriale de carbon pentru detecția acizilor hidroxicinamici.....	26
3.3.1. Electrozi modificați cu grafen	26
3.3.2. Electrozi modificați cu fuleren	28
3.3.3. Electrozi modificați cu nanoconuri de carbon.....	29
3.3.4. Electrozi modificați cu nanotuburi de carbon.....	29
3.3.5. Electrozi modificați cu nanoparticule cuantice.....	31
3.3.6. Electrozi modificați cu nanofibre de carbon.....	32
CAPITOLUL 4. Biosenzori enzimatici pentru determinarea acizilor hidroxicinamici	33
4.1. Noțiuni generale despre biosenzori enzimatici – tipuri și clasificări	33
4.2. Strategii de imobilizare pentru dezvoltarea senzorilor enzimatici	34
4.3. Biosenzori enzimatici pentru detecția acizilor hidroxicinamici	36
4.3.1. Biosenzori enzimatici bazați pe tirozinază.....	36
4.3.2. Biosenzori enzimatici pe bază de lacază	38
4.4. Concluzii.....	41
PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	42
OBIECTIVELE TEZEI.....	42
CAPITOLUL 5. Dezvoltarea senzorilor electrochimici pe bază de nanomateriale de carbon pentru determinarea acidului cafeic din suplimente alimentare.....	43
Introducere.....	43
5.1. Materiale și metode	44
5.1.1. Reactivi și soluții.....	44
5.1.2. Aparatură utilizată în analiză.....	45
5.1.3. Analiza eșantioanelor din suplimente alimentare	50
5.1.4. Tehnica voltametrică	51
5.1.5. Tehnica spectrofotometrică – Metoda Folin-Ciocalteu	51
5.1.6. Tehnica cromatografică – Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC).....	52
5.2. Rezultate și discuții.....	53

5.2.1. Studii preliminare.....	53
5.2.2. Calculul suprafeței active a electrozilor.....	58
5.2.3. Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluție pură de acid cafeic.....	60
5.2.4. Studiul cinetic și calculul coeficientului de difuzie a acidului cafeic.....	62
5.2.5. Curba de calibrare și determinarea limitei de detecție.....	65
5.2.6. Studiul determinării acidului cafeic din suplimente alimentare cu ajutorul C/SPE, CNF/C-SPE și MWCNT/C-SPE.....	68
5.2.7. Validarea metodei voltametrice.....	76
5.2.8. Studii de stabilitate.....	80
5.2.9. Studii de interferență.....	81
5.3. Concluzii.....	81
CAPITOLUL 6. Dezvoltarea senzorilor și biosenzorilor serigrafiați pentru determinarea acidului ferulic din produse cosmetice.....	83
Introducere.....	83
6.1. Materiale și metode.....	84
6.1.1. Reactivi și soluții folosite.....	84
6.1.2. Electrozi și aparatură.....	85
6.1.3. Prepararea biosenzorului.....	85
6.1.4. Metode de analiză.....	86
6.1.5. Produsele cosmetice analizate.....	86
6.2. Rezultate și discuții.....	87
6.2.1. Comportamentul voltametric al electrozilor în PBS și ferocianură de potasiu.....	87
6.2.2. Aria suprafeței active a electrozilor.....	90
6.2.3. Răspunsul voltametric al electrozilor în soluția de acid ferulic.....	92
6.2.4. Răspunsul biosenzorului la diferite concentrații de acid ferulic.....	96
6.2.5. Stabilitate, reproductibilitate, repetabilitate. Studii de interferență.....	97
6.2.6. Determinarea FA în produse cosmetice.....	97
6.3. Concluzii.....	104
CAPITOLUL 7. Determinarea simultană a acidului cafeic și a acidului ferulic dintr-un supliment alimentar, utilizând un senzor serigrafiat pe bază de nanofibre de carbon.....	105
Introducere.....	105
7.1. Materiale și metode.....	106
7.1.1. Reactivi și soluții folosite.....	106
7.1.2. Aparatură și determinări.....	106
7.1.3. Produsul farmaceutic și pregătirea probei de analizat.....	107
7.2. Rezultate și discuții.....	107
7.2.1. Studiile preliminare în vederea caracterizării electrozilor.....	107
7.2.2. Comportamentul voltametric al CNF/SPE în soluții de acid ferulic și acid cafeic.....	107
7.2.3. Influența concentrației de FA și CA asupra răspunsului electrochimic.....	111
7.2.4. Studii de interferență.....	114
7.2.5. Stabilitatea și repetabilitatea senzorului.....	115
7.2.6. Determinarea simultană a CA și FA în produsul Eye Blend.....	115
7.2.7. Determinarea capacității antioxidante a CA și FA prin metoda DPPH.....	116
7.3. Concluzii.....	117
CAPITOLUL 8. Dezvoltarea unui nou biosenzor electrochimic pe bază de nanofibre de carbon, ftalocianină de cobalt și lacază pentru detecția acidului p-cumaric în fitopreparate.....	118
Introducere.....	118
8.1. Materiale și metode.....	119
8.1.1. Reactivii și soluțiile preparate.....	119
8.1.2. Electrozii și aparatura folosită.....	120
8.1.3. Prepararea senzorului CNF-CoPc/SPE.....	120
8.1.4. Prepararea biosenzorului CNF-CoPc-Lac/SPE.....	120
8.1.5. Metode de analiză.....	121
8.1.6. Probele reale și prepararea soluțiilor de analizat.....	121
8.2. Rezultate și discuții.....	124
8.2.1. Studii preliminare în vederea caracterizării electrozilor.....	124

8.2.2. Răspunsul voltametric al electrozilor în soluția de acid p-cumaric.....	127
8.2.3. Influența vitezei de scanare asupra răspunsul voltametric	130
8.2.4. Curba de calibrare	133
8.2.5. Stabilitatea, reproductibilitatea și repetabilitatea biosenzorului.	136
8.2.6. Studii de interferență	136
8.2.7. Determinarea PCA in fitopreparate	137
8.3. Concluzii.....	141
CONCLUZII GENERALE, CONTRIBUȚII PERSONALE, PERSPECTIVE DE CERCETARE VIITOARE	142
CONCLUZII GENERALE.....	142
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	143
PERSPECTIVE DE CERCETARE VIITOARE	145
Listă de lucrări.....	146
Bibliografie	149

INTRODUCERE

Substanțele biologic active au proprietatea de a interacționa prin mecanisme fizice, fizico-chimice sau chimice cu moleculele, atomii sau ionii din care este alcătuită materia vie, declanșând o succesiune de reacții la nivelul organismului.

Acizii hidroxicinamici sunt o clasă de compuși organici care derivă de la acidul cinamic, și conțin în moleculă un nucleu aromatic, cel puțin o grupare hidroxil fenolică, o dublă legătură alifatică, și o grupare carboxil.

Acești compuși prezintă multiple funcții fiziologice, cum ar fi activitatea antioxidantă, antiinflamatorie, anti-microbiană și anti-melanogenă. Aceste proprietăți stau la baza utilizării din ce în ce mai frecventă a acizilor hidroxicinamici și a derivaților acestora în formulări farmaceutice, suplimente alimentare dar și produse cosmetice. Potențialul farmacologic al acestor compuși se explică prin prezența uneia sau mai multor grupări hidroxil în structura lor chimică, conferindu-le, astfel, capacitatea de eliminare a radicalilor liberi[1].

În prezenta lucrare, am ales să studiez o parte dintre compușii hidroxicinamici, mai exact, acidul cafeic, acidul ferulic și acidul p-cumaric.

Acidul cafeic este unul dintre cei mai comuni acizi fenolici care se găsesc în fructe, legume, ciuperci și ierburi. Este biosintetizat prin hidroxilarea acidului p-cumaric. Acidul cafeic se găsește adesea în suplimente alimentare în diferite proporții, tocmai pentru acțiunile sale antioxidantă, antitumorală, antiinflamatoare, antimicrobiană și antidiabetică[2].

Acidul ferulic este un acid hidroxicinamic, prezent în multe fructe și sucuri, legume, orez și unele plante medicinale. Acest compus fenolic are un rol important în corpul uman și este absorbit în intestinul subțire ca un metabolit major al acidului clorogenic. Acidul ferulic este adesea utilizat în diverse tipuri de produse cosmetice, precum produse pentru protecție solară, produse demachiante, creme hidratante sau antirid, întrucât este capabil să stimuleze sistemele de apărare intracelulară. Acidul ferulic poate fi util și în produse topice cu rol farmacologic. În funcție de concentrație, el poate fi un adjuvant în tratamentul dermatitei atopice. Prin urmare, determinarea concentrației de acid ferulic este importantă în industria nutraceutică și cosmetică[3].

Acidul p-cumaric este un acid fenolic sintetizat în principal din tirozină și fenilalanină. Este un precursor major în sinteza altor acizi fenolici, cum ar fi acidul cafeic, clorogenic, rozmarinic și ferulic. Este larg distribuit în fructe, legume, cereale și ciuperci[4]. Studiile privind acidul p-cumaric au evidențiat multiple beneficii pentru sănătate datorate proprietăților antioxidante, antimicrobiene, antitumorale, antiinflamatoare, antiagregante plachetare și cicatrizante[5,6].

Suplimentele alimentare, formulările fito-homeopate, produsele nutraceutice, dispozitivele medicale și mare parte din produsele cosmetice și de îngrijire nu beneficiază de prospecte foarte detaliate privind concentrațiile de principii active. În anumite situații, cuantificarea acestor compuși și raportul dintre ei poate avea relevanță în vederea optimizării tratamentelor sau menținerii unei sănătăți corespunzătoare.

În ultimii ani, analizele electrochimice s-au dovedit promițătoare pentru diverse domenii precum controlul calității în industria alimentară, farmaceutică sau cosmetică, datorită sensibilității ridicate, limitei de detecție scăzute și costuri relativ mici. În aplicarea acestor metode, concentrația analitului este determinată prin măsurarea semnalului analitic (potențial electric sau curent).

Una dintre cele mai utilizate tehnici electrochimice este voltametria ciclică. Aceasta constă în aplicarea unui potențial și înregistrarea în timp a răspunsului sistemului, respectiv a curentului datorat proceselor electrochimice care au loc în sistem.

În această lucrare, voltametria ciclică a fost utilizată cel mai des, pentru obținerea informațiilor, cu privire la mecanismul reacției electrochimice, identificarea speciilor prezente în soluție și determinarea coeficienților de difuzie a speciilor electroactive. De asemenea, în unele studii au fost folosite voltametria de undă pătrată și cronoamperometria.

Teza cu titlul: REALIZAREA UNOR NOI SENZORI ȘI BIOSENZORI VOLTAMPEROMETRICI PENTRU DETERMINAREA ACIZILOR HIDROXICINAMICI are ca scop evidențierea eficacității metodelor voltametrice cât și a instrumentelor pentru detecție (senzori sau biosenzori) în vederea analizei calitative și cantitative a unor suplimente alimentare, fitopreparate sau produse cosmetice.

Lucrarea este structurată în două părți și opt capitole. În partea teoretică sunt prezentate recenzii actuale privind acizii hidroxicinamici, construirea senzorilor serigrafiați, modalități de funcționalizare în vederea creșterii performanțelor analitice, nanomateriale utilizate pentru modificarea electrozilor serigrafiați, particularități și avantaje ale nanomaterialelor pe bază de carbon, tehnici voltametrice, noțiuni despre biosenzori enzimatici și strategii de imobilizare a lacazei și tirozinazei, enzime folosite pentru studiile experimentale din această lucrare.

Originalitatea tezei constă în studiile experimentale privind evaluarea comportamentului electrochimic al unor noi senzori și biosenzori în diferite tipuri de soluții electroactive, optimizarea parametrilor pentru soluții cu diferite valori ale pH-ului, modificarea unor senzori în vederea creșterii sensibilității și selectivității, determinarea unor parametri precum aria suprafeței active a electrodului, coeficienții de difuzie ai analiților de interes, concentrația speciilor active de pe suprafața electrodului, limitele de detecție și cuantificare și determinarea analitică a unor acizi hidroxicinamici din diferite formulări fito-farmaceutice și cosmetice.

Imobilizarea enzimelor (lacaza și tirozinaza) pe suprafețe, în prealabil modificate cu diferite nanomateriale sau compuși organici s-a dovedit a fi un succes privind creșterea selectivității în detecția unor acizi hidroxicinamici.

Fezabilitatea metodelor voltametrice și performanțele senzorilor și biosenzorilor enzimatici dezvoltați au fost validate prin rezultate similare obținute cu metode spectrometrice și cromatografice.

Rezultatele au arătat că produsele testate beneficiază de cantități semnificative de compuși antioxidanți, cu predilecție acizi hidroxicinamici, în concordanță cu specificațiile producătorilor.

Instrumentele dezvoltate și optimizate în acest studiu, ar putea fi utilizate pentru testarea de rutină a unor astfel de analiți în produse, cu forme de prezentare diverse, aducând un plus de inovație în cercetările curente și viitoare.

Cuvinte cheie: acizi hidroxicinamici, senzor, biosenzor, voltametrie, enzimă, nanomateriale, nanofibre de carbon.

PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. Considerații generale privind compușii fenolici

1.1. Răspândire și activitate biologică

Compușii fenolici sunt o clasă principală de metaboliți secundari în plante și sunt clasificați în fenoli simpli și polifenoli. Acești compuși se găsesc combinați cu mono- și polizaharide, legate de una sau mai multe grupări fenolice, sau pot apărea ca derivați, cum ar fi esterii metilici[1].

1.2. Clasificare și particularități structurale

Acizii hidroxicinamici (HC) prezintă un schelet de bază, fenilpropanoid. HC principali sunt acidul p-cumaric, acidul cafeic, iar formele metilate formează acizi ferulic și sinapic. Cu toate acestea, ca și pentru alți acizi fenolici, HC sunt aproape întotdeauna legați de molecule mici sau mari. Cel mai abundent derivat al acidului hidroxicinamic în alimentele vegetale este un ester al acizilor cafeic și chinic, denumit acid clorogenic.

1.3. Acizii hidroxicinamici, structura chimică și rolul lor în organismul uman

Acizii hidroxicinamici (HC) sunt compuși fenolici ce se găsesc în fructe, legume și băuturi (cafea, ceai, vin, etc.). HC sunt o clasă de compuși polifenolici cu multiple activități biologice. Testele *in vitro* și *in vivo*, au arătat că HC au o importantă activitate antioxidantă, antimicrobiană, antiinflamatoare, antidiabetică și chiar antineoplazică[7]. Mai mult, HC sunt neuro și cardioprotectori și prezintă, de asemenea, un rol în prevenția osteoporozei.

Familia HC include acizii cumarici (CoA), acidul cafeic (CA), acidul ferulic (FA), acidul cinamic (CnA), acidul sinapic (SA) dar și compușii derivați ai acestora. CA este prezent în plante, în principal sub forma de ester al acidului chinic, care se numește acid clorogenic (ChA). Acidul rosmarinic (RA) este un ester al CA și al acidului 3,4-dihidroxifenilacetic.

1.3.1. Acidul cafeic, biosinteza, acțiuni terapeutice, metode de determinare

Acidul cafeic se găsește sub forma de monomer, ca esteri cu acizi organici, amide și glicozide[8] sau în forme mai complexe, cum ar fi dimeri, trimeri și derivați flavonoidici, sau poate fi, de asemenea, legat de proteine și alți polimeri în peretele celular al produselor vegetale [9].

Au fost efectuate experimente *in vitro* și *in vivo*, dovedindu-se ca CA și derivații săi au numeroase efecte fiziologice benefice, cum ar fi activitatea antibacteriană [10–12], antivirală [13–16], antioxidantă [17–20], antiinflamatoare [21–24], anti-aterosclerotică [25–27], imunostimulatoare [28–30], antidiabetică [86],[87], cardioprotectoare [33,34], antiproliferativă [35], hepatoprotectoare [36,37], anticancerigenă [52],[87],[90]–[92] etc.

1.3.2. Acidul ferulic, biosinteza, acțiuni terapeutice, metode de determinare

FA și precursorii săi, acidul p-cumaric (acid p-hidroxicinamic) și acidul cafeic (acid 3,4-dihidroxicinamic), sunt metaboliți în biosinteza ligninelor. Proprietățile sale antioxidante, se datorează nucleului său fenolic și posibilității formării radicalului delocalizat. Deoarece mulți compuși naturali care poartă unul sau mai multe grupări feruloil în scheletul lor se prezintă bioactivități interesante, este relevant să se ia în considerare și să se compare atât formulele structurale, cât și bioactivitățile compușilor naturali ferulați deja publicați în literatură[42].

1.3.3. Acidul p-cumaric, biosinteza, acțiuni terapeutice, metode de determinare

Acizii cumarici sunt derivați ai acidului cinamic mono-hidroxilați la gruparea fenil, iar acidul p-cumaric (PCA) este cel mai abundent izomer [5,43]. Acest compus are un număr mare de aplicații importante în industriile nutraceutice, farmaceutice și chimice. Acidul p-cumaric prezintă proprietăți antioxidante, antibacteriene și antiinflamatorii și servește ca un precursor pentru producerea de arome și parfumuri utilizate în produse chimice sau comestibile. PCA

este, de asemenea, o materie primă pentru prepararea de materiale termoplastice biodegradabile [44]. Recent, s-a descoperit că PCA are și un efect antiproliferativ [45], anxiolitic [46], neuroprotector [47], un rol nefroprotector [45] și poate inhiba melanogeneza [48].

CAPITOLUL 2. Tehnici voltametrice utilizate în analiza compușilor fenolici

Metodele electrochimice sunt metode robuste și sensibile utilizate atât pentru analiza calitativă și cantitativă pentru o gamă largă de analiți cu concentrații diferite. Utilitatea metodelor electrochimice nu provine numai din sensibilitatea lor la cantități cât mai mici de analit și la simplitatea instrumentelor, dar și din faptul că pot fi utilizate pentru separarea speciilor ionice, nu doar pentru detecția lor[49].

2.1. Voltametrie ciclică (CV)

Voltametrie ciclică a devenit o tehnică foarte populară pentru studiile electrochimice de caracterizare a unor noi sisteme și s-a dovedit a fi foarte utilă în obținerea informațiilor cu privire la reacțiile complexe de la electrod. CV este folosită pentru a studia comportamentul la interfață, a speciilor electroactive. Prin CV se pot obține informații privind mecanismul de desfășurare a reacției electrochimice, identificarea speciilor prezente în soluție sau determinarea coeficienților de difuzie a speciilor electroactive. În CV, potențialul unui sistem electrochimic este modificat înainte și înapoi între cele două limite de potențial și răspunsul curentului se măsoară în raport cu potențialul. Voltamogramele sunt reprezentări grafice ale curentului electrodului de lucru în funcție de curentul contra-electrodului[50].

CAPITOLUL 3. Nanomateriale folosite pentru realizarea senzorilor electrochimici

3.1. Utilizarea nanomaterialor de carbon pentru realizarea senzorilor

Senzorii electrochimici pe bază de materiale din carbon sunt adesea utilizați datorită sensibilității lor ridicate, costului redus, stabilității bune și biocompatibilității [51,52]. Cei mai comuni senzori electrochimici pe bază de carbon includ electrozi de carbon vitros, grafit, nanoparticule de carbon, fibre de carbon, microsfele de carbon etc. [53–57]. Nanomaterialele de carbon, cum ar fi grafenul, oxidul de grafen, fulerenul, nanoconurile de carbon, nanoparticulele cuantice de carbon, nanofibrele de carbon, nanotuburile de carbon oferă avantaje precum un raport suprafață-volum ridicat și o suprafață specifică mare, caracteristici importante pentru detecția analiților[58]. De obicei, încorporarea nanomaterialor de carbon, ca parte componentă a stratului sensibil al unui senzor electrochimic se face prin depunere pe un suport solid. Acest proces poate fi realizat prin diferite tehnici, cum ar fi: *dispersia în solvent*, *pasta din nanomateriale de carbon*, *serigrafiera*.

3.2. Electrozi serigrafiați

În ultimii ani, utilizarea electrozilor serigrafiați (SPE) ca detectori electrochimici sau ca traductori pentru fabricarea senzorilor electrochimici a cunoscut un interes deosebit datorită caracteristicilor și avantajelor pe care le prezintă în comparație cu alte instrumente analitice, permițând astfel utilizarea acestora într-o varietate de aplicații electrochimice din diferite domenii. Dintre avantajele și caracteristicile electrozilor serigrafiați se pot menționa următoarele: *cost redus*, *de unică folosință*, *dimensiune redusă*, *portabilitate*, *flexibilitatea design-ului*, *integrare ușoară în circuite electronice*, *posibilitatea de a realiza pretratări și modificări*.

Nanomaterialele pe bază de carbon oferă posibilitatea de a se combina cu alte nanomateriale pentru a realiza compozite care își măresc sinergic proprietățile. Sinergismul nanomaterialor asociate pot influența pozitiv sensibilitatea și selectivitatea suprafețelor modificate[59].

3.2.1. Electrozi modificați cu grafen

Grafenul (GPH) se obține prin diferite metode, cum ar fi exfolierea mecanică a grafitului, tratarea grafitului cu agenți oxidativi, depunerea chimică în fază de vapori etc.[60–62]. GPH este o rețea extinsă de carbon 2D, cu o structură hexagonală asemănătoare unui fagure de miere, cu sensibilitate ridicată, selectivitate ridicată, stabilitate bună, potențial de acțiune scăzut și activitate electrocatalitică excelentă [63]. Prezintă numeroase proprietăți interesante, cum ar fi o suprafață specifică foarte mare, conductibilitate și transparentă optimă, rezistență mecanică și flexibilitate excelentă, conductibilitate termică și electrică bună și proprietăți electronice excelente[64,65].

3.2.2. Electrozi modificați cu fuleren

Fulerenul sau "C60" reprezintă o clasă de compuși de carbon, care prezintă per ansamblu structuri fie cu forme sferice de tip dom geodezic (C60, C40), fie cu forme cilindrice de "tip cușcă" (nanotuburile)[59]. Senzorii electrochimici pe bază de fuleren se folosesc, în principal, pentru răspunsurilor lor catalitice reproductibile și a stabilității chimice ridicate. Comportamentul electrochimic al fulerenului poate fi îmbunătățit prin modificări asupra structurii acesteia. Sensibilitatea poate fi îmbunătățită suplimentar prin depunerea diferitelor nanoparticule metalice pe fuleren activat. Caracterul hidrofil al fulerenului poate fi indus prin funcționalizarea cu grupări polare [66].

3.2.3. Electrozi modificați cu nanoconuri de carbon

Nanoconurile de carbon (CNHs) sunt nanostructurile conice care au de obicei 30 - 50 nm lungime și 2-5 nm diametru. Datorită structurii închise, ele pot fi considerate asemănătoare fulerenului. CNH-urile au anumite avantaje față de CNT. Sunt produse cu un randament mare la temperatura camerei și fără impurități metalice toxice, fapt ce le face sigure pentru mediu [67]. Oxidarea CNHs produce o funcționalizare extinsă care conține oxigen, care facilitează adsorbția sau imobilizarea a numeroși electrocatalizatori și enzime.

3.2.4. Electrozi modificați cu nanotuburi de carbon

Nanotuburile de carbon (CNT) sunt tuburi cilindrice unidimensionale de atomi de carbon hibridizați sp^2 . Au un diametru de până la zeci de nanometri, iar lungimea lor poate fi de până la câțiva centimetri[68,69]. CNT-urile se clasifică în funcție de numărul de straturi de grafen laminate astfel că putem avea nanotuburi de carbon cu un singur strat (SWCNTs), nanotuburi de carbon în strat dublu (DWCNTs) și nanotuburi de carbon cu mai multe straturi (MWCNTs). CNT-urile prezintă câteva proprietăți electrice, mecanice și termice de adsorbție uimitoare, ceea ce le face să fie optime pentru fabricarea de senzori electrochimici [70]. CNT-urile îmbunătățesc în mod substanțial transferul de electroni și pot fi funcționalizate în mod adecvat cu anumite biomoleculele pentru fabricarea unui biosenzor.

3.2.5. Electrozi modificați cu nanoparticule cuantice

Nanoparticulele cuantice de carbon (CD) și nanoparticule cuantice de grafen (GQD) au fost prezentate de curând ca materiale superioare, cu multiple proprietăți, care includ o fotostabilitate excelentă, dimensiuni reduse, biocompatibilitate, fotoluminescență reglabilă, capacitate excepțională de excitație multi-foton, electrochemiluminiscentă, funcționalizare facilă cu biomolecule și inerție chimică [71–74]. Datorită dimensiunilor mici și a biocompatibilității lor, acestea pot servi, de asemenea, ca transportori eficienți pentru administrarea de medicamente. Mai mult, proprietățile lor unice catalitice și fizico-chimice fac posibile diverse aplicații biomedicale [75]. Nano-particulele cuantice de grafen (GQD) pot fi recunoscute ca un fel de nano-particule cuantice de carbon, care de obicei posedă o cristalinitate mai bună [76].

3.2.6. Electrozi modificați cu nanofibre de carbon

Nanofibrele se caracterizează prin prezența unui număr mare de margini, care asigură o suprafață adaptată și disponibilă pentru interacțiunea cu gaze, lichide sau alte solide[77]. În ultimii ani, structurile de tip nanofibră au devenit tot mai atrăgătoare din cauza numeroaselor avantaje, și anume creșterea vitezei de reacție și a sensibilității biosenzorului, [78] posibilitatea de a fi sintetizate dintr-o mare varietate de materiale, o barieră optimă pentru difuzia

materialelor datorită porozității ridicate și a interconectivității nanofibrelor [79], activitate ridicată a elementelor biologice imobilizate pe suprafața nanofibrelor [80] și proprietăți mecanice structurale excelente[81][82].

CAPITOLUL 4. Biosenzori enzimatici pentru determinarea acizilor hidroxicinamici

4.1. Noțiuni generale despre biosenzori enzimatici – tipuri și clasificări

Biosenzorii electrochimici sunt dispozitive analitice similare cu senzorii electrochimici, care, însă încorporează molecule biologice pentru detectarea rapidă și precisă a speciilor țintă [83,84]. Mai exact, biosenzorii sunt practic senzori chimici care utilizează proprietățile de recunoaștere a biomoleculelor de la suprafața electrodului și au fost utilizați pe larg pentru determinarea moleculelor biologice, agenți patogeni sau markeri tumorali, foarte necesari în domeniul medical[85].

4.2. Strategii de imobilizare pentru dezvoltarea senzorilor enzimatici

Alegerea unei tehnici adecvate de imobilizare este esențială pentru fabricarea biosenzorilor[86]. Una dintre cele mai simple metode de imobilizare a enzimei se face prin adsorbție fizică. Enzimele pot fi, de asemenea, imobilizate prin încorporarea în matrici tridimensionale, precum un film electropolimerizat[87,88], un silicagel[89] sau o pastă de carbon[90]. O altă tehnică de imobilizare foarte des folosită este reticularea, însă aceasta implică utilizarea unui reactiv, cum ar fi glutaraldehida[3,91]. Acesta este toxic și poate diminua activitatea enzimei. Legarea covalentă a enzimelor este o altă metodă convențională de imobilizare care se realizează prin activarea inițială a suportului folosind un agent de cuplare, urmată de legarea enzimei de suprafața activată. Enzimele pot fi, de asemenea, imobilizate prin legături de afinitate între un grup funcțional al suportului și o moleculă specifică (de exemplu, biotină, carbohidrați, histidină)[92] prezentă în mod natural sau modificată genetic, într-o secvență enzimatică care nu afectează activitatea[93].

4.3. Biosenzori enzimatici pentru detecția acizilor hidroxicinamici

Determinarea HC se face, adesea, folosind enzimele tirozinază și lacază pentru modificarea electrozilor, datorită capacității lor de a oxida acești compuși[94]. Mecanismele de oxidare sunt diferite și în urma acestora se produc fie chinone, provenite din oxidarea simplă, fie compuși care conțin mai mulți atomi de oxigen. Rolul catalitic al enzimelor permite amplificarea semnalelor electrochimice obținute prin reducerea produșilor de oxidare ai analiților fenolici.

4.3.1. Biosenzori enzimatici bazați pe tirozinază

Tirozinaza (Ty) este o metaloenzimă, care posedă la nivelul situsului activ enzimatic, doi ioni de cupru, care sunt coordinați fiecare prin intermediul unui număr de trei resturi histidinice din lanțul polipeptidic enzimatic[95]. Tirozinaza, datorită capacității sale de a reacționa cu fenolii, are utilitate pentru diferite aplicații în: industria alimentară, biomedicală și farmaceutică. Biosenzorii electrochimici pe bază de Ty pot fi considerați „clasici”, deoarece Tyr este o enzimă potrivită pentru a evalua proprietățile electrochimice a materialelor, cu ajutorul cărora se dezvoltă noi electrozi nanostructurați [96–98].

4.3.2. Biosenzori enzimatici pe bază de lacază

Lacaza a fost folosită în biosenzori pe bază de nanoparticule metalice, nanomateriale din carbon, polimeri și biopolimeri (chitosan) sau diferite membrane precum Nafion. O importanță deosebită prezintă combinația sinergică de nanomateriale și lacază care sporește performanța biosenzorilor electrochimici[99]. Pentru a îmbunătăți stabilitatea biosenzorilor se poate realiza o matrice adecvată formată din nanomateriale/ nanoparticule metalice și albumină serică bovină/β-ciclodextrină/celuloză bacteriană [100–102]. Acești biosenzori au fost folosiți cu succes pentru determinări de rutină în probe farmaceutice[100] precum și determinarea hidrochinonei în probe de apă [101,103].

PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE

OBIECTIVELE TEZEI

Obiectivul general al lucrării a constat în dezvoltarea și caracterizarea unor noi senzori și biosenzori pe bază de nanomateriale de carbon, mediatori ai transferului de electroni și enzime pentru determinarea unor acizi hidroxicinamici din produse nutraceutice și cosmetice cu forme de prezentare diferite, utilizând pentru detecție metode voltametrice.

Obiective specifice:

- Caracterizarea unor electrozi serigrafiați pe bază de nanomateriale de carbon în diferiți electroliți cu ajutorul voltametriei ciclice
- Aplicare tehnicii *drop-and-dry*, urmată de reticulare pentru pregătirea biosenzorilor enzimatici, folosind ca suport electrozii serigrafiați pe bază de nanomateriale de carbon
- Optimizarea parametrilor de lucru ai senzorilor în soluții model
- Analizarea comportamentului electrochimic al senzorilor și biosenzorilor în soluții electroactive
- Optimizarea pH-ului și a altor parametri experimentali caracteristici tehnicii voltametrice pentru obținerea unui răspuns electrochimic stabil și reproductibil
- Studiul cineticii reacțiilor de la nivelul electrodului de lucru
- Realizarea curbelor de calibrare și calcularea limitelor de detecție și cuantificare pentru fiecare senzor sau biosenzor folosit
- Studiul determinării individuale sau simultane a acizilor hidroxicinamici prin voltametrie ciclică sau voltametrie de undă pătrată, din diferite formulări farmaceutice sau produse cosmetice
- Studiul interferențelor datorate altor substanțe existente în compoziția produselor analizate
- Studiul repetabilității și reproductibilității semnalelor senzorilor și biosenzorilor
- Validarea rezultatelor cu alte metode de analiză, precum metoda spectrofotometrică Folin Ciocalteu, FTIR sau UHPLC
- Determinarea capacității antioxidante a acizilor hidroxicinamici în produsul Eye Blend, prin metoda DPPH.

CAPITOLUL 5. Dezvoltarea senzorilor electrochimici pe bază de nanomateriale de carbon pentru determinarea acidului cafeic din suplimente alimentare

Introducere

Scopul acestui studiu a fost caracterizarea electrochimică a unor noi electrozi serigrafiați de bază de carbon modificați cu nanofibre de carbon și respectiv nanotuburi de carbon multistrat, precum și dezvoltarea și validarea unei metode electroanalitice pentru determinarea cantitativă a acidului cafeic în suplimente alimentare.

5.1. Rezultate și discuții

5.1.1. Studii preliminare

În studiile preliminare s-au evaluat proprietățile electrochimice a 3 tipuri de electrozi serigrafiați (SPCE) de carbon, unul nemodificat, și doi modificați chimic cu următoarele nanomateriale din carbon: nanofibre de carbon (CNF) și nanotuburi de carbon multistrat (MWCNT). Soluțiile electrolitice au fost: o soluție de clorură de potasiu, o soluție compusă din ferocianură de potasiu și clorură de potasiu și o soluție de catecol și clorură de potasiu.

S-a obținut un semnal stabil al senzorilor atunci când potențialul este situat în domeniul situat între -0,4 și +1,3 V în cazul acidului cafeic. În cazul ferocianurii de potasiu domeniul de potențial optim a fost situat între -0,6 și +1,0 V.

5.1.1.1. *Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluții inactive*

În prima etapă s-a studiat comportamentul voltametric al electrozilor C-SPE, CNF/C-SPE și MWCNT/C-SPE în soluție de KCl 0,1 M (substanță inactivă redox) în domeniul de potențial situat între -0,6 și +1,3 V. În voltamogramele ciclice nu s-au observat picuri în domeniul de potențial studiat. Acest fapt demonstrează că materialele folosite pentru construirea electrozilor au o puritate ridicată, și de asemenea, electrozii utilizați nu prezintă contaminări ale suprafeței active, ce ar putea influența răspunsurile electrochimice. Se remarcă, totuși, curenți de fond mai mici atunci când se folosește CNF/C-SPE în comparație cu ceilalți electrozi folosiți.

5.1.1.2. *Comportamentul electrochimic C-SPE, CNF/C-SPE și MWCNT/C-SPE în soluții electroactive*

În următoarea etapă a lucrării, s-a studiat comportamentul electrochimic al electrozilor atunci când aceștia sunt imersați într-o soluție ce conține ferocianură de potasiu 10^{-3} M și clorură de potasiu 0,1 M.

Fiecare electrod prezintă două picuri, unul anodic și unul catodic, care sunt relaționate cu procesele de oxido-reducere ale ionului ferocianură la suprafața electrodului de lucru. Se pot observa picuri bine definite și reversibile în toate cele trei cazuri.

Potențialul de semiundă ($E_{1/2}$) este o caracteristică calitativă pentru specia electroactivă analizată și reprezintă valoarea potențialului pentru care intensitatea curentului este jumătate din valoarea maximă [104]. În cazul de față acest parametru are aproximativ aceeași valoare pentru CNF/C-SPE (0,163 V) și CNT/C-SPE (0,166 V) și o valoare mai mare pentru C-SPE (0,179 V). Raportul I_c / I_a este apropiat de valoarea ideală 1 în toate cele trei cazuri, cea mai apropiată valoare de cea ideală fiind obținută în cazul CNF/C-SPE (0,854 V). Din aceste rezultate se poate afirma că CNF/C-SPE a arătat cea mai mare sensibilitate la detectarea ionului ferocianură (I_a și I_c au valorile cele mai mari). De asemenea, CNF/C-SPE prezintă cel mai mare grad de reversibilitate, diferența dintre potențialele picurilor anodice și catodice (ΔE) este cea mai mică, iar raportul I_c / I_a are valoarea cea mai mare.

5.1.2. Calculul suprafeței active a electrozilor

Suprafața electrozilor a fost determinată, pe rând prin voltametrie ciclică, folosind soluția dublă de ferocianură de potasiu 10^{-3} M și clorură de potasiu 10^{-1} M. Răspunsurile de voltametrie ciclică s-au înregistrat cu viteze de scanare între 0,1-1,0 V/s.

Pentru CNF/C-SPE, s-a obținut o liniaritate foarte bună între I_{pa} și rădăcina pătrată a vitezei de scanare (Figura 5.12 a) cu un coeficient de determinare (R^2) de 0,9905. În conformitate literatura de specialitate, acest rezultat demonstrează că procesul electrochimic de la nivelul electrodului de lucru este controlat de difuzia speciei electroactive, difuzia fiind etapa determinantă de viteză.

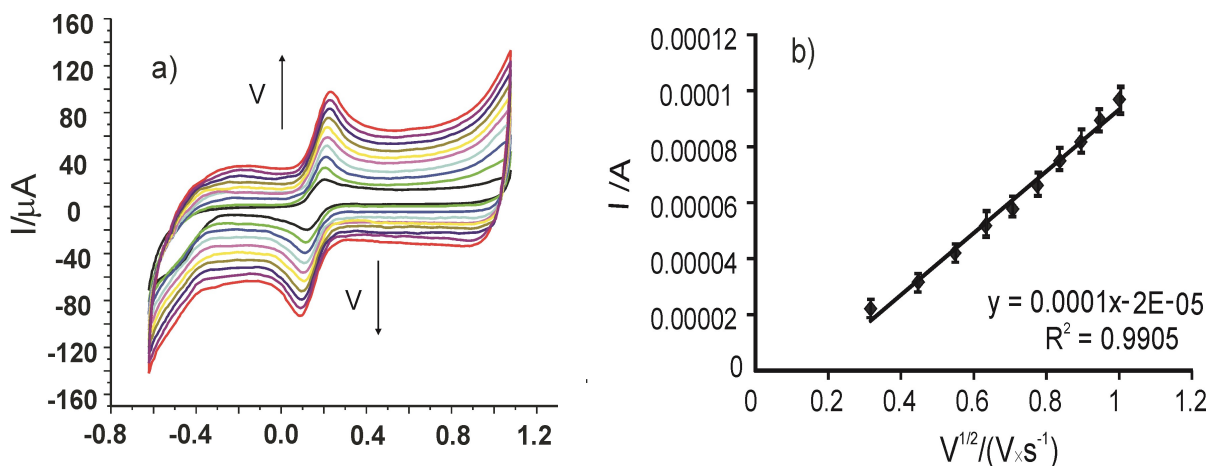


Figura 5.1. Variația semnalului electrochimic al sensorului CNF/C-SPE la viteze de scanare între 0,1-1,0 V/s (a); dependența intensității curentului anodic de rădăcina pătrată a vitezei de scanare (b)

Cea mai mare valoare a ariei active a fost obținută pentru electrodul CNF/C-SPE ($0,1524 \text{ cm}^2$), urmată de CNT/C-SPE ($0,0514 \text{ cm}^2$) și C-SPE ($0,0500 \text{ cm}^2$). Aceste rezultate sunt în concordanță cu intensitatea picurilor. Din aceste valori rezultă că sensibilitatea senzorilor scade în ordinea CNF/C-SPE, MWCNT/C-SPE, C-SPE. Această sensibilitate ridicată a CNF/C-SPE se datorează nanofibrelor de carbon de la suprafața electrodului, care prin dimensiunile lor mici dar cu o arie specifică mare, favorizează transferul de electroni și acumularea sau difuzia selectivă a analiților.

Aceste rezultate sunt în concordanță cu diferite studii publicate în literatura de specialitate care consideră că în general CNF-urile prezintă un comportament electrochimic superior comparativ cu celelalte nanomateriale deoarece au conductibilitate foarte bună și stabilitate chimică ridicată [82,105,106]. Totuși, toți cei trei electrozi se pot folosi cu succes pentru determinarea acidului cafeic, compusul fenolic de interes în această lucrare.

5.1.3. Proprietățile electrochimice ale electrozilor în soluție pură de acid cafeic

Determinarea calitativă și apoi cantitativă a acidului cafeic s-a realizat prin voltametrie ciclică, aceasta fiind o metodă ce prezintă multiple avantaje (sensibilitate, selectivitate, aparatură ușor de utilizat) și utilă pentru interpretarea proceselor ce au loc la suprafața electrozilor. Voltamogramele ciclice s-au înregistrat în soluție de acid cafeic 10^{-3} M soluția electrolit suport fiind cea de tampon fosfat 0,1 M (pH= 3,6). Această valoare a pH-ului este optimă pentru determinarea acidului cafeic cu o sensibilitate și o selectivitate foarte bună [107]. Pentru stabilizarea răspunsurilor senzorilor sunt necesare 5 cicluri în domeniul de potențial optimizat (de la -0,4 la +1,3 V). Astfel că, rezultatele prezentate sunt cele obținute după stabilizarea semnalului voltametric.

În Figura 5.13 se prezintă voltamogramele ciclice ale tuturor electrozilor în soluție de acid cafeic 10^{-3} M (electrolit suport tampon fosfat 0,1 M, pH= 3,6).

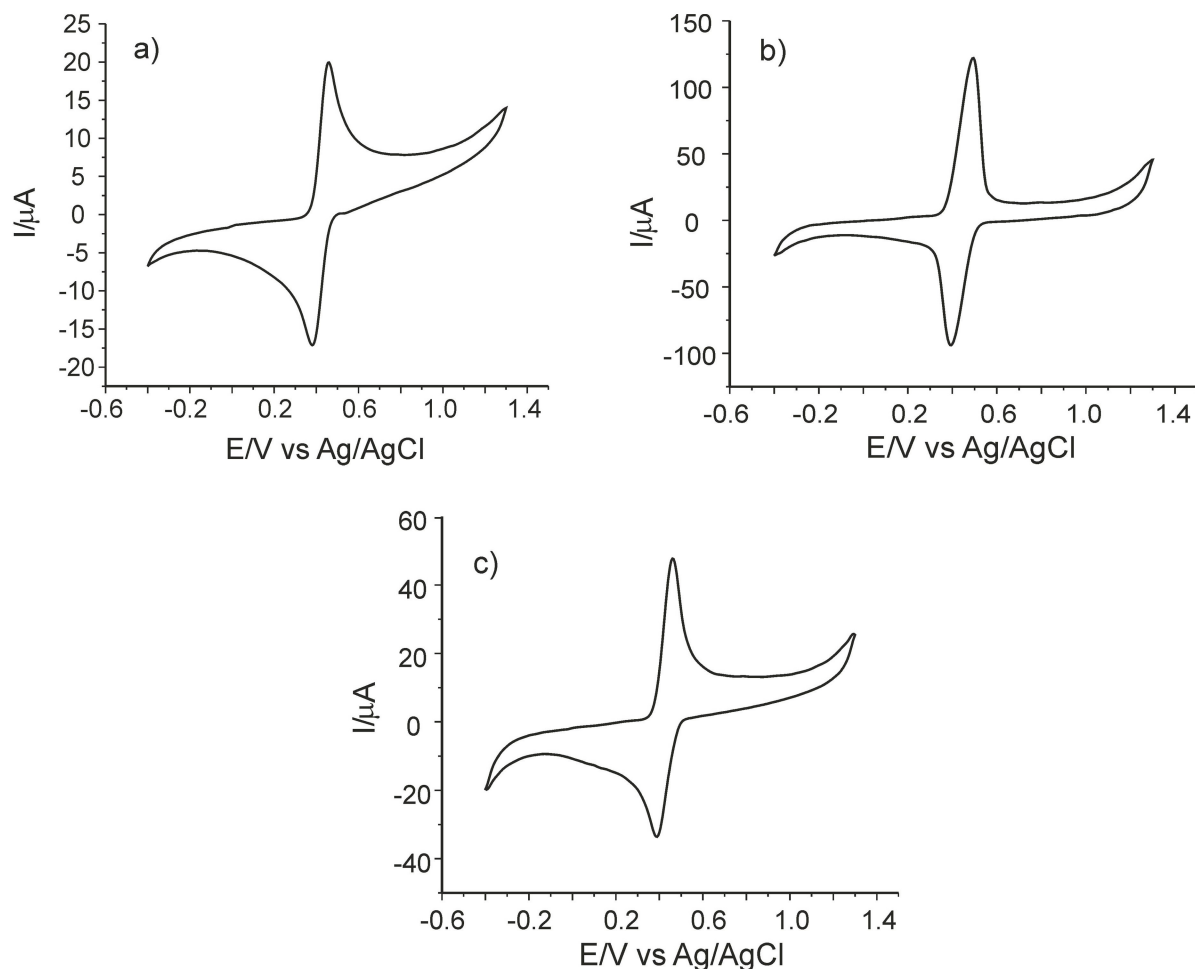


Figura 5.2. CV a (a) C-SPE, (b) CNF/C-SPE, (c) MWCNT/C-SPE imersați în soluție 10^{-3} M acid cafeic (0,1 M soluție tampon fosfat, pH= 3,6).

În voltamograma ciclică se observă un pic anodic și un pic catodic, care corespund reacțiilor de oxidare și respectiv reducere a acidului cafeic la suprafața electrodului de lucru. În conformitate cu literatura de specialitate, procesele redox constau în oxidarea acidului cafeic la derivatul o-chinonic corespunzător, urmată în scanarea catodică de reducerea o-chinonei la compusul inițial, procese care presupun transferul a doi electroni și doi protoni.

Toți electrozii studiați au prezentat două picuri clare și bine definite și un comportament cvasi-reversibil, așa cum rezultă din valorile ΔE și I_c/I_a . CNF/C-SPE are un comportament reversibil mai apropiat de ideal decât MWCNT/C-SPE și C-SPE. Electrocul modificat cu CNF prezintă picurile anodic și catodic mai intense, demonstrând că are sensibilitatea cea mai bună la detecția acidului cafeic. Picurile observate în cazul MWCNT-SPE sunt mai intense decât în cazul C-SPE ceea ce demonstrează facilitarea proceselor electrochimice de către nanomaterialul modificador. Sensibilitatea electrozilor crește în ordinea: C-SPE < MWCNT/C-SPE < CNF/C-SPE.

5.1.4. Studiul cineticii și calculul coeficientului de difuzie a acidului cafeic

Pentru studiul influenței vitezei de scanare asupra răspunsului voltametric, s-au înregistrat voltamogramele ciclice ale CNF/C-SPE, MWCNT/C-SPE și C-SPE la diferite viteze de scanare situate între 0,1 V/s și 1,0 V/s, crescând viteza de scanare de fiecare dată câte 0,1 V/s. Pentru a se determina factorul care controlează cinetica proceselor de electrod s-a reprezentat grafic picurile anodice în funcție de viteza de scanare și de rădăcina pătrată a vitezei de scanare.

Valorile D obținute pentru acidul cafeic cu electrozii serigrafiați sunt comparabile cu cele obținute cu alți electrozi pe bază de carbon raportați în literatura de specialitate [108–

110],[111] Se cunoaște faptul că nanomaterialele din carbon îmbunătățesc semnificativ absorbția analitului pe suprafața electrodului și de asemenea măresc suprafața electroactivă a senzorului ceea ce accelerează reacțiile electrochimice [59], [82,105,112].

Aceste rezultate dovedesc că electrozii serigrafiați modificați cu nanomateriale de carbon sunt sensibili și utili pentru detecția acidului cafeic.

5.1.5. Curba de calibrare și determinarea limitei de detecție

S-au realizat curbele de calibrare pentru fiecare senzor, C-SPE, CNF/C-SPE și MWCNT/C-SPE prin înregistrarea voltamogramelor ciclice în soluții obținute din acid cafeic dizolvat în soluție tampon fosfat 0,1 M de pH 3,6 de diferite concentrații situate între 0,1 și 40 μM . Viteza de scanare a fost 0,1 V/s și domeniul de potențial a fost situate între -0,4 V și 1,3 V.

În cazul senzorului CNF/C-SPE, curba de calibrare, care reprezintă dependența dintre curentul picului anodic și concentrația de acid cafeic (I_{pa} vs. c) se prezintă în Figura 5.19.

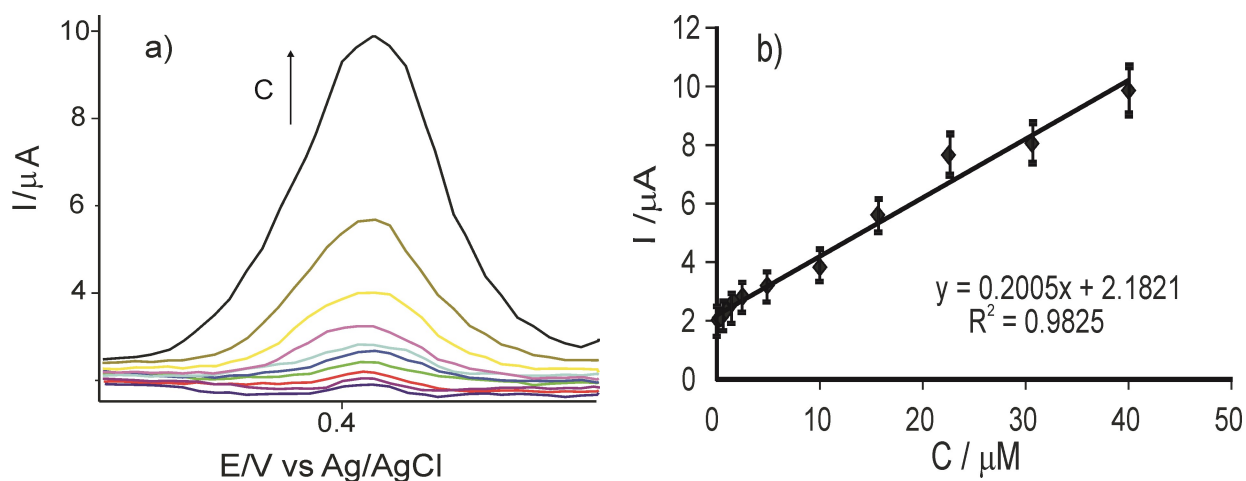


Figura 5.3. (a) CV ale CNF-SPE imersat în soluție de acid cafeic în intervalul de concentrație 0,1-40 μM (zoom al picului anodic); (b) Dependența picului anodic în funcție de concentrația de acid cafeic.

Se observă o dependență liniară între intensitatea picului și concentrația în domeniul 0.1-40 μM . Ecuația dreptei de calibrare este $I = 0,2005c + 2,1821$.

Prin urmare, calculul LOD se efectuează cu informațiile colectate de la primele concentrații utilizate, unde se observă o dependență liniară, iar coeficientul de corelație este mai aproape de unu.

Rezultatele obținute pentru limita de detecție și limita de cuantificare pentru cei trei senzori sunt prezentate în Tabelul 5.8.

Tabel 5.1. Valorile LOD și LOQ a celor trei senzori pentru detecția acidului cafeic

Senzor	LOD (M)	LOQ (M)
C-SPE	$1,27 \times 10^{-7}$	$4,23 \times 10^{-7}$
CNF/C-SPE	$3,23 \times 10^{-9}$	$1,077 \times 10^{-8}$
MWCNT/C-SPE	$6,1 \times 10^{-8}$	$2,02 \times 10^{-7}$

Valorile mici ale LOD și LOQ, mai mici sau comparabile cu cele raportate în literatura de specialitate se datorează sensibilității ridicate ale senzorilor testați în acest studiu, ceea ce demonstrează fezabilitatea metodei voltametrică pentru analiza CA din mostre reale, cum sunt diferitele formulări comerciale, de exemplu suplimente alimentare. Toți cei trei senzori pot fi folosiți cu succes în analiza unor probe reale pentru detecția CA, însă CNF/C-SPE, care are cele mai mici limite de detecție și cuantificare. În următoarele analize se va determina cantitatea de acid cafeic din suplimente alimentare cu ajutorul celor trei electrozi studiați până acum.

5.1.6. Studiul determinării acidului cafeic din suplimente alimentare cu ajutorul C/SPE, CNF/C-SPE și MWCNT/C-SPE

Pentru determinarea acidului cafeic în trei suplimente alimentare nestandardizate (Detox Activ-Herbagetica, DVR-Stem Glicemo-DVR Pharm și Ceai Verde-Alevia) s-au utilizat C-SPE, CNF/C-SPE și MWCNT/C-SPE, comparând rezultatele acestora cu cele obținute prin metoda spectrofotometrică. Măsurătorile s-au înregistrat prin voltametrie ciclică în domeniul de potențial situat între -0,4 V și 1,3 V cu viteze de scanare diferite situate între 0,1-1,0 V/s.

În concluzie, analizând fiecare probă, se observă o pereche de picuri redox relaționată cu prezența acidului. Se observă în fiecare caz, picuri mai puțin definite, care corespund altor compuși activi care se găsesc în aceste suplimente alimentare. Intensitățile picurilor anodic și catodic cresc odată cu creșterea vitezei de scanare, în fiecare situație. Reprezentând grafic, intensitatea picului anodic în funcție de viteza de scanare se obține o dependență liniară cu $v^{1/2}$, ceea ce demonstrează că procesul electrochimic este controlat de difuzie, în fiecare caz.

Senzorul CNF/C-SPE a demonstrat o limită de detecție mai bună, picuri de intensitate mai mare și mai bine definite dar și un zgomot de fond mai redus, în comparație cu C-SPE și MWCNT/C-SPE. Prin urmare, cuantificarea acidului cafeic din suplimentele alimentare analizate se va realiza cu ajutorul dreptei de calibrare obținute de CNF/C-SPE. Rezultatele se vor compara cu cele obținute prin metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu. De asemenea studiile de stabilitate și interferență vor fi realizate pentru CNF/C-SPE.

5.1.7. Validarea metodei voltametrice

Metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu a fost utilizat pentru validarea noii metode electroanalitice bazată pe C-SPE modificat. Soluțiile preparate cu acid cafeic de diferite concentrații au reprezentat soluțiile standard[113].

Conținutul unei capsule din fiecare supliment alimentar a fost dispersat în 50 mL soluție de PBS (pH = 3,6) pentru analiza electrochimică. Pentru a pregăti corespunzător probele pentru analiză, s-au utilizat ultrasonizarea urmată de filtrare.

Cantitățile de acid cafeic din suplimentele alimentare s-au calculat din dreptele de calibrare care corespund celor două metode de determinare, spectrofotometrică și voltametrică (CNF/C-SPE), luând în considerare diluțiile și cantitatea de supliment alimentar luat în analiză. Rezultatele, exprimate în mg acid cafeic pe comprimat/ capsulă, se prezintă în Tabelul 5.12.

Tabel 5.2. Conținutul de acid cafeic determinat în probele analizate prin metoda spectrofotometrică și cea voltametrică

Supliment alimentar	Metoda voltametrică Acid cafeic (mg / capsulă)	Metoda spectrofotometrică Acid cafeic (mg / capsulă)
Detox-Activ	101,5 ± 4,1	102,4 ± 3,9
DVR Stem Glicemo	190,5 ± 7,2	202,1 ± 8,1
Ceai Verde (Green Tea)	177,6 ± 5,6	177,7 ± 4,8

Se poate observa că valorile conținutului de acid cafeic obținute prin cele 2 metode sunt apropiate. Analiza de varianță (ANOVA) a arătat că nu există o diferență semnificativă între cele trei seturi de valori la un nivel de încredere de 95%. Aceasta demonstrează că metoda voltametrică este o metodă sensibilă, validă și precisă pentru determinarea acidului cafeic din suplimente alimentare.

În următoarea etapă s-a determinat conținutul de polifenoli prin metoda UHPLC-MS/MS cu ionizare ESI, folosind un spectrometru de masa de înaltă rezoluție Q Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole–Orbitrap (ThermoFisher Scientific) echipat cu HESI, cuplat la un cromatograf de lichide de înaltă performanță Ultimate 3000 UHPLC (ThermoFisher Scientific)

Calibrarea s-a realizat în intervalul de concentrație 50 - 2000 $\mu\text{g} / \text{L}$ pentru fiecare dintre acizii fenolici și flavonoizi, prin diluarea în serie cu metanol a amestecului standard de concentrație 10 mg/L. Din datele obținute, s-a calculat cantitatea de acid cafeic existentă pe capsulă, pentru fiecare produs. Rezultatele se regăsesc în Tabelul 5.14.

Tabel 5.3. Conținutul de acid cafeic determinat în probele analizate prin metoda HPLC

Supliment alimentar	Metoda HPLC Acid cafeic (mg / capsulă)
Detox-Activ	99,84
DVR Stem Glicemo	197,9
Ceai Verde (Green Tea)	185,58

Din Tabelul 5.14 se poate observa că valorile obținute prin metoda cromatografică sunt apropiate de cele obținute prin CV și IR, ceea ce dovedește încă o dată, precizia, selectivitatea și sensibilitatea senzorului CNF/C-SPE dar și fezabilitatea metodei voltametrice.

5.1.8. Studii de stabilitate

Senzorul CNF/C-SPE poate fi utilizat în mod repetat în condițiile de măsurare prevăzute în acest studiu, fără a-și modifica voltamograma ciclică cu mai mult de 5% pentru cel puțin 100 de măsurători. Cu toate acestea, abaterea standard relativă (RSD) a 10 voltamograme ciclice replicate înregistrate în soluția de acid cafeic 10^{-5} M este de 3,02%. Timpul de contact cu soluția de analizat trebuie să fie cât mai scurt posibil, iar senzorul trebuie spălat cu soluție de susținere a electroliților (PBS cu pH 3,6 în acest caz) și cu apă ultrapură după fiecare măsurare.

5.1.9. Studii de interferență

Pentru a evalua selectivitatea senzorului CNF/C-SPE pentru detectarea acidului cafeic în probe complexe, a fost studiată influența unor specii înrudite chimic, care ar putea interfera în cuantificarea acidului cafeic 10^{-5} M în condiții optime.

Determinarea acidului cafeic este influențată mai mult de prezența catecolului, în timp ce acidul galic, acidul L-ascorbic, acidul uric, acidul ferulic și acidul vanilic au o influență mică în determinarea cantitativă a acidului cafeic. Acest lucru este legat de potențialele de oxidare ale catecolului și ale acidului galic, care sunt apropiate de cel al acidului cafeic.

Ceilalți compuși care interferează apar în voltamogramele ciclice ca picuri noi, care nu influențează picurile anodice sau catodice ale acidului cafeic. Din aceste rezultate, se poate concluziona că senzorul CNF / C-SPE este selectiv pentru acidul cafeic în probe reale și are o precizie și o selectivitate bună.

5.2. Concluzii

În urma analizei electrozilor imersați în soluție dublă de ferocianura de potasiu și clorură de potasiu, s-au înregistrat picuri bine definite și reproductibile, putând fi folosiți pentru analizele unor probe reale. Întâlnim caracteristici similare a celor trei electrozi și în cazul analizei soluției de acid cafeic pur. Acest lucru dovedește că toți cei trei senzori pot da, ulterior, răspunsuri satisfăcătoare.

Ulterior s-a putut calcula și coeficientul de difuzie al acidului cafeic, în cazul utilizării fiecărui electrod. Rezultat mai bun s-a obținut în cazul folosirii CNF/C-SPE. După această analiză am folosit cei trei senzori pentru formarea curbelor de calibrare, utile pentru identificările ulterioare. Se observă o dependență liniară între intensitatea picului și concentrația soluției în domeniul folosit (0,1-40 μ M) pentru toți cei trei senzori folosiți.

La concentrații mai mari, semnalul electrochimic crește mai lent, datorită saturării centrilor active de pe suprafața electrodului de lucru. În urma calculelor, limitele de detecție au valori mici, ceea ce dovedește încă o dată că senzorii au o sensibilitate bună. Valoarea cea mai redusă a LOD s-a obținut în cazul CNF/C-SPE. În ultima parte a lucrării, am ales detecția acidului cafeic în trei suplimente alimentare (Detox Activ, DVR Stem Glicemo, Ceai verde).

În toate cele trei cazuri s-au evidențiat picurile caracteristice substanțelor de analizat, picuri care corespund reacțiilor de oxido-reducere de la nivelul electrodului de lucru. Fiind formulări farmaceutice complexe, pe lângă picurile caracteristice acidului cafeic existent, s-au evidențiat și picuri datorate excipienților sau altor principii farmacologice electroactive, prezente

în mostra de analizat. Pentru validarea rezultatelor s-a folosit metoda spectrofotometrică Folin Ciocâlteu dar și metoda HPLC prin care s-au obținut rezultate similare.

Astfel, s-a dovedit că metoda voltametrică este utilă și valabilă pentru determinarea conținutului de acid cafeic din suplimentele alimentare. Proba analizată necesită un tratament minim înainte de analiză, iar echipamentul este simplu, portabil și sensibil. Această metodă analitică este utilă ca metodă de *screening* pentru a determina conținutul de acid cafeic al suplimentelor nutritive sau al probelor farmaceutice. Cantitatea mică de eșantion necesară, timpul redus necesar pentru analiza eșantionului și portabilitatea sunt avantajele care fac această metodă electroanalitică potrivită pentru controlul calității suplimentelor alimentare.

În viitor, se așteaptă ca nanotehnologia să fie utilizată tot mai frecvent pentru modificarea senzorilor cu nanomateriale, în vederea creșterii proprietăților de detecție.

CAPITOLUL 6. Dezvoltarea senzorilor și biosenzorilor serigrafiați pentru determinarea acidului ferulic din produse cosmetice

Introducere

Scopul acestei lucrări este de a studia comportamentul electrochimic și determinarea calitativă și cantitativă a acidului ferulic cu trei tipuri de electrozi: un electrod serigrafiat pe bază de nanofibre de carbon (CNF/SPE), un electrod serigrafiat pe bază de nanofibre de carbon modificat cu nanoparticule de aur (CNF-GNP/SPE) și un biosenzor obținut în urma modificării CNF-GNP/SPE prin imobilizarea tirozinazei pe suprafața acestuia. De asemenea, metoda electroanalitică va fi validată pentru cuantificarea acidului ferulic în diferite produse cosmetice folosind o metodă clasică, spectrometria în domeniul infraroșu.

6.1. Rezultate și discuții

6.1.1. Comportamentul voltametric al electrozilor în PBS și ferocianură de potasiu

Analiza preliminară a evaluat comportamentul electrochimic ale CNF/SPE, CNF-GNP/SPE și CNF-GNP-Ty/SPE. Soluțiile electrolitice utilizate au fost: soluție de tampon fosfat (PBS pH 7,0) și soluție de ferocianură de potasiu 10^{-3} M – PBS 10^{-1} M.

Primul interval de potențial folosit a fost -1,0 V și +1,3 V, în care semnalul nu a fost stabil, cu nici unul dintre electrozi. Astfel că, treptat potențialul vertexului negativ a fost crescut, până când s-a obținut un semnal stabil, atât în cazul soluției PBS, ferocianură de potasiu-PBS și acid ferulic-PBS. S-a obținut un semnal stabil pentru toate soluțiile analizate în domeniul de potențial situat între -0,4 și +1,3 V.

Acest domeniu de potențial a fost folosit inițial pentru studiul comportamentului electrochimic a CNF/SPE, CNF-GNP/SPE și CNF-GNP-Ty/SPE imersați în PBS 10^{-1} M (pH 7,0). Viteza de scanare a fost $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. S-au observat un pic catodic, în cazul CNF-GNP/SPE și CNF-GNP-Ty/SPE la $E = 0,440 \text{ V}$ (curentul $-13,361 \mu\text{A}$) și respectiv $E = 0,455 \text{ V}$ (curentul $-11,286 \mu\text{A}$). Aceste picuri apar datorită modificării electrozilor serigrafiați cu nanoparticule de aur, respectiv tirozinază, în cazul biosenzorului. Curentul de fond a fost redus pentru toți cei trei electrozi utilizați.

Următoarea analiză s-a desfășurat imersând, pe rând, cei trei electrozi, într-o soluție de ferocianură de potasiu 10^{-3} M-PBS 10^{-1} M (pH 7,0). Domeniul de potențial a fost între -0,4 și +1,3 V, iar viteza de scanare de $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. În voltamogramele ciclice obținute cu cei trei electrozi se observă un pic anodic și unul catodic. Aceste picuri sunt datorate procesului de oxido-reducere a ferocianurii care are loc la suprafața electrodului.

În urma parametrilor înregistrați și calculați se poate afirma că $E_{1/2}$ are valori apropiate pentru CNF/SPE și CNF-GNP/SPE și o valoare mai mică în cazul CNF-GNP-Ty/SPE. Toți cei trei electrozi prezintă un raport I_{pc}/I_{pa} ce depășește valoarea 1. Din valorile I_{pc}/I_{pa} și ΔE , mai mari decât valorile teoretice, se poate aprecia ca procesele redox sunt cvasireversibile [114].

Cele mai înalte picuri sunt observate în cazul CNF-GNP/SPE, ceea ce arată o sensibilitate superioară la detectia ferocianurii de potasiu și efectul sinergic al

nanoparticulelor de aur în electrodetecție. Prezența Ty pe suprafața biosenzorului este clar evidențiată prin diferențele observate între comportamentul electrochimic al CNF-GNP/SPE și cel al CNF-GNP-Ty/SPE.

6.1.2. Aria suprafeței active a electrozilor

În etapa următoare s-au înregistrat voltamogramele ciclice la diferite viteze de scanare ($0.1-1.0 \text{ V}\times\text{s}^{-1}$), folosind soluția de ferocianură de potasiu $10^{-3} \text{ M}-10^{-1} \text{ M}$ PBS (pH 7,0). În Figura 6,5 (a,c,e) se poate observa că intensitatea picurilor corespunzătoare proceselor de oxidoreducere a ferocianurii crește odată cu creșterea vitezei de scanare.

Pentru toți electrozii, se constată o dependență liniară între curentul picului anodic și rădăcina pătrată a vitezei de scanare care demonstrează că procesul electrochimic este controlat de difuzia speciilor electroactive [115]. Pentru a calcula aria activă a electrozilor s-a folosit ecuația Randles-Sevcik [116].

Rezultatele obținute se prezintă în Tabelul 6.3.

Tabel 6.1. Aria suprafeței active a electrozilor utilizați în analiză

Electrod	Aria suprafeței active (cm^2)
CNF/SPE	$0,1819 \pm 0,0036$
CNF-GNP/SPE	$0,1868 \pm 0,0037$
CNF-GNP-Ty/SPE	$0,1774 \pm 0,0035$

Biosenzorul CNF-GNP-Ty/SPE prezintă cea mai mică valoare a suprafeței active deoarece Ty immobilizată pe suprafața electrodului nu participă la procesul de oxidoreducere a ferocianurii demonstrând selectivitate. Cei doi senzori serigrafiați au o suprafață activă apropiată ca valoare, însă modificarea suprafeței electrodului cu nanoparticulele de aur explică aria activă mai mare a CNF-GNP/SPE.

6.1.3. Răspunsul voltametric al electrozilor în soluția de acid ferulic

Pentru studiile de detecție a acidului ferulic cu sensibilitate mai mare și cu o selectivitate mai bună s-au folosit electrozii CNF-GNP/SPE și CNF-GNP-Ty/SPE. În Figura 6.6 se poate observa, prin comparație, răspunsul evident al celor doi electrozi, atunci când sunt imersați într-o soluție de acid ferulic 10^{-3} M - PBS 10^{-1} M (pH 7,0) b).

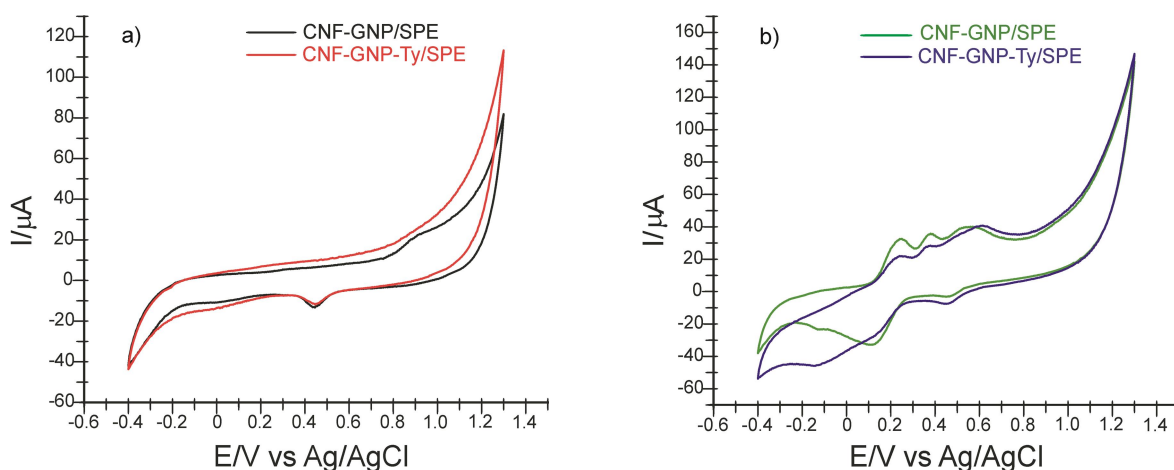


Figura 6.1. a) Voltamogramele ciclice ale CNF-GNP/SPE (linia neagră) și CNF-GNP-Ty/SPE (linia roșie) imersați în soluția de PBS 10^{-1} M (pH 7,0). b) Voltamogramele ciclice ale CNF-GNP/SPE (linia verde) și CNF-GNP-Ty/SPE (linia albastră) imersați în soluție de acid ferulic 10^{-3} M și PBS 10^{-1} M (pH 7,0). Viteza de scanare: $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

În prezența acidului ferulic, se evidențiază trei picuri anodice și două catodice de intensități și potențiale diferite, relaționate cu oxidarea, respectiv reducerea acidului ferulic la

nivelul elementului sensibil. Acest comportament electrochimic este similar cu cel observat în alte studii publicate anterior [117].

În cazul CNF-GNP-Ty/SPE potențialul picului catodic I are o valoare mai redusă, aceasta deplasare spre valori negative ale potențialului indicând faptul ca procesul de reducere este puternic influențat de prezenta enzimei [118,119]. Această detecție la un potențial mai redus indica faptul ca procesul de reducere are nevoie de o energie de activare mai mica în cazul biosenzorului [120].

Prin urmare, biosenzorul are sensibilitate și selectivitate mai bună comparativ cu senzorul la detecția FA. Procesele de reducere sunt cele ale compușilor chinonici formați prin oxidare anodică, procese care au loc în două etape rezultând două picuri catodice bine definite.

Imobilizarea enzimei a fost confirmată prin analiza voltametrică, așa cum se observă în Figura 6.6. Se constată că enzima imobilizată în biosenzor catalizează reacțiile de hidroxilare a nucleului benzenic și de oxidare a derivatului orto-difenolic la chinona corespunzătoare [121]. Din acest motiv picul de reducere I este modificat substanțial, fiind principala diferență observată între senzor și biosenzor.

Obținerea unor valori mai mici ale potențialului picului sugerează un proces rapid de transfer de electroni în procesul redox al acidului ferulic la nivelul suprafeței active [122]. La analiza semnalului obținut cu CNF-GNP-Ty/SPE, potențialul picului catodic I are o valoare mult mai mică decât în cazul CNF-GNP/SPE ceea ce înseamnă că procesul de reducere al produsului de oxidare electrochimică al acidului ferulic necesită o energie de activare mai redusă în cazul biosenzorului [123]. În plus, valoarea curentului catodic al CNF-GNP-Ty/SPE este mai mare decât în cazul CNF-GNP/SPE, ceea ce demonstrează că biosenzorul este mai sensibil la detecția electrochimică a produsului de oxidare a acidului ferulic. De asemenea, raportul I_{pc}/I_{pa} este mai mare în cazul biosenzorului. Această creștere a curentului catodic în cazul biosenzorului se datorează enzimei tirozinază care catalizează procesul de oxidare a acidului ferulic [124].

În consecință, în cazul CNF-GNP-Ty/SPE are loc oxidarea acidului ferulic printr-un mecanism ce implică transferul a doi protoni și doi electroni [125]. În urma oxidării acidului ferulic, principalul produs obținut este derivatul o-quinonic al acidului ferulic [125]. Tirozinaza imobilizată pe suprafața senzorului crește selectivitatea biosenzorului, fapt confirmat, în special de creșterea curentului picului catodic și deplasarea picului catodic la un potențial mai negativ comparativ cu cel observat pentru CNF-GNP/SPE.

În etapa următoare, s-a studiat comportamentul electrochimic a celor doi electrozi la scanare cu diferite viteze (în domeniul situat între $0,1 \text{ V}\times\text{s}^{-1}$ and $1,0 \text{ V}\times\text{s}^{-1}$), crescând viteza de scanare de fiecare dată cu $0,1 \text{ V}\times\text{s}^{-1}$, în soluție de acid ferulic 10^{-3}M (electrolitul suport a fost soluție PBS 10^{-1} M la pH 7,0). Dependența liniară dintre I_c și v confirmă faptul ca procesul redox al acidului ferulic este controlat de procesul de transfer de electroni [126]. Prin urmare procesul de reducere este guvernat de ecuația lui Laviron [127].

Comparând rezultatele obținute cu CNF-GNP-Ty/SPE și CNF-GNP/SPE, se poate afirma că în ambele cazuri procesul de reducere este controlat de transferul de electroni, procesul fiind mai rapid în cazul biosenzorului (comparând pantele celor două ecuații de ajustare liniară prezentate în Tabelul 6.5). Cu ajutorul ecuației Laviron au fost calculate valorile concentrației speciei oxidate (Γ), iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 6.5.

Tabel 6.2. Ecuația liniară a dreptei (I_c vs. v), R^2 și Γ .

Electrod	Ecuația dreptei	R^2	Γ ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$)
CNF-GNP/SPE	$y = -2,585 \times 10^{-5} x - 2,348 \times 10^{-5}$	0,9994	$5,02 \times 10^{-11}$
CNF-GNP-Ty/SPE	$y = -3,1137 \times 10^{-5} x - 3,4962 \times 10^{-5}$	0,9996	$6,05 \times 10^{-11}$

$y = I_{pc}$; $x = v$.

Din aceste rezultate se poate aprecia ca biosenzorul are proprietati electroanalitice superioare la detectia acidului ferulic. În plus, prezența tirozinazei asigură o selectivitate superioară biosenzorului în probe complexe. Imobilizarea tirozinazei împreună cu nanofibrele de carbon și nanoparticulele de aur duce la o biosensibilitate și conductibilitate mai bună,

aceste nanomateriale având efect sinergic în biodetecție. Prin urmare, pentru analizele cantitative s-a folosit biosenzorul realizat în acest studiu.

6.1.4. Răspunsul biosenzorului la diferite concentrații de acid ferulic

Înterior, voltametria ciclică a fost utilizată pentru detecția acidului ferulic în diferite concentrații folosind CNF-GNP-Ty/SPE. Se observa că intensitatea picului de reducere I crește odată cu creșterea concentrației de acid ferulic în domeniul de concentrație studiat, de la 0,1 la 129,6 μM (Figura 6.9).

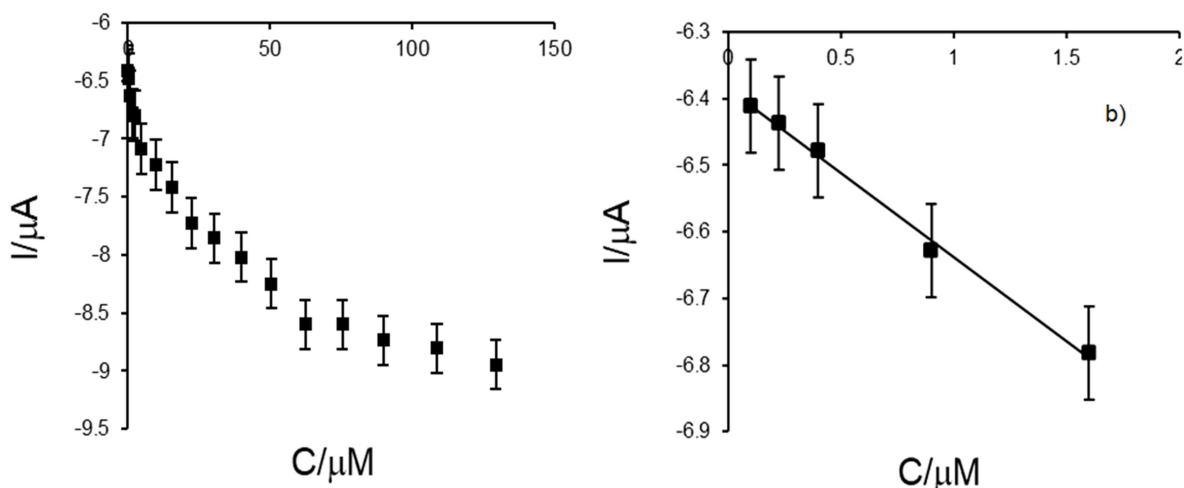


Figura 6.2. Curba de calibrare a biosenzorului în domeniul de concentrație 0,1–129,6 μM (a) și 0,1–1,6 μM (b).

Creșterea curentului de reducere este liniară cu concentrația în domeniul de la 0,1 până la 1,6 μM , iar ecuația de regresie liniară este $y = -0,2529x - 6,3845$ ($R^2 = 0,9961$, $n = 5$) cu limita de detecție (LOD) de $2,89 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ și o limită de cuantificare (LOQ) de $9,64 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.

6.1.5. Stabilitate, reproducibilitate, repetabilitate. Studii de interferență

Biosenzorul este stabil și poate fi folosit pentru mai mult de 50 de măsurători prin voltametrie ciclică în soluții ce conțin FA. În ceea ce privește reproductibilitatea metodei de fabricare, nu s-au obținut diferențe mai mari de 2% între biosenzori preparați identic imersați în soluții de FA de aceeași concentrație. De asemenea, variația răspunsului biosenzorului la determinarea FA în soluție de aceeași concentrație, la scoaterea din soluție, clătire și repetarea voltamogrammei ciclice nu a depășit 3%. Biosenzorul a dovedit o selectivitate foarte bună potențialul și curentul picului catodic rămânând practic nemodificat la adăosuri de compuși care se găsesc în produsele cosmetice, de exemplu propandiol, glicerina, vitamina E etc.

6.1.6. Determinarea FA în produse cosmetice

Pentru a verifica practicabilitatea și fezabilitatea metodei propuse, CNF-GNP-Ty/SPE a fost folosit pentru detecția acidului ferulic din produse cosmetice cu forma de prezentare și consistența diferită: ser, cremă și emulsie.

În Figura 6.11 se prezintă voltamogrammele ciclice ale CNF-GNP-Ty/SPE imersat în soluții de Ser antioxidant Ordinary de diferite concentrații. Se pot observa picurile reprezentative proceselor electrochimice ale acidului ferulic, iar picul de reducere I s-a folosit pentru cuantificare.

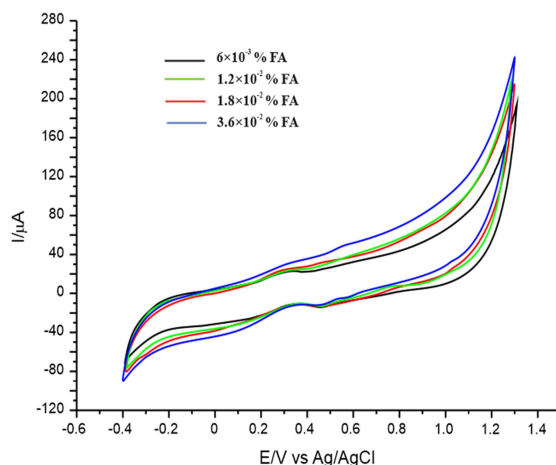


Figura 6.3. Voltamogramele ciclice ale CNF-GNP-Ty/SPE imersat în soluții obținute din serul antioxidant Ordinary de concentrații diferite: 6×10^{-3} % FA (linia neagră); $1,2 \times 10^{-2}$ % FA (linia verde), $1,8 \times 10^{-2}$ % FA (linia roșie), $3,6 \times 10^{-2}$ % FA (linia albastră).

Ținând cont de curentul picului catodic, de cantitatea de produs cosmetic luat în analiză și de ecuația drepte de calibrare s-au calculat concentrațiile de acid ferulic din produsele cosmetice obținând rezultatele incluse în Tabelul 6.6.

Pentru validarea metodei voltametrică, produsele cosmetice au fost analizate și prin metoda spectrometrică în domeniul infraroșu.

Cantitățile de acid ferulic din produsele cosmetice au fost calculate din ecuația de calibrare corespunzătoare picului de la 1050 cm^{-1} , pic relaționat cu vibrația de alungire (stretch) a grupării C-O fenolice [128] Toate experimentele au fost realizate în triplicat iar rezultatele se prezintă în Tabelul 6.6.

Tabel 6.3. Rezultatele cuantificării acidului ferulic în produse cosmetice

Produsul cosmetic	c% FA	c% FA
	Metoda FTIR	Metoda voltametrică
ORDINARY	2,932	3,114
EMULSIE	0,090	0,104
SABIO	0,096	0,112

RSD= 2%

Se observă că se obțin valori apropiate ale concentrației de FA în produsele cosmetice prin cele două metode, ceea ce demonstrează că metoda cu biosenzorul CNF-GNP-Ty/SPE este utilă pentru cuantificarea FA cu o precizie adecvată.

În cazul produsului ORDINARY, la care producatorul indică o concentrație de 3% FA, se poate observa că rezultatele obținute prin ambele metode sunt apropiate de cele indicate, demonstrând acuratețea și precizia celor două metode la detecția FA. Pentru separarea, identificarea și cuantificarea acidului ferulic din probele cosmetice s-a utilizat cromatografie lichidă de înaltă performanță în tandem cu spectrometria de masă cu ionizare *electrospray*.

Din datele obținute, s-a calculat concentrația de acid ferulic, pentru fiecare produs. Rezultatele se regăsesc în Tabelul 6.9.

Tabel 6.4. Conținutul de acid cafeic determinat în probele analizate prin metoda UHPLC

Supliment alimentar	Metoda UHPLC Acid ferulic %c
ORDINARY	3,147
GEROVITAL	0,082
SABIO	0,0504

Din rezultatele obținute prin cuantificarea FA cu ajutorul UHPLC, putem observa că valorile sunt mai apropiate de cele obținute prin metoda voltametrică în cazul serului antioxidant Ordinary și a emulsiei demachiante Gerovital.

În cazul produsului Sabio există o diferență mai mare între valori. Această diferență ar putea fi cauzată de influența celorlalți compuși fenolici cu structură apropiată, existenți în probă.

6.2. Concluzii

S-au realizat și caracterizat trei (bio)senzori pe bază de nanomateriale și tirozinază pentru detecția electrochimică a acidului ferulic. Biosenzorul CNF-GNP-Ty/SPE a fost construit prin tehnica *drop-and-dry*, urmată de reticularea tirozinazei cu ajutorul glutaraldehidei. CNF-GNP-Ty/SPE s-a dovedit a fi util în analiza acidului ferulic în produse cosmetice. Cuantificarea pe baza picului catodic a permis detectarea selectivă a FA din matrici complexe. Utilizarea voltametriei ciclice ca metoda de detecție a permis studiul detecției FA și atingerea unor performanțe analitice excelente cu aplicabilitate în electroanaliza.

Concentrațiile de FA obținute cu biosenzorul CNF-GNP-Ty/SPE sunt similare cu rezultatele obținute prin metoda standard de analiză FTIR sau cu cele indicate de producător. De asemenea, analiza UHPLC a arătat cantități apropiate de acid ferulic precum metoda voltametrică.

Metoda realizată în acest studiu are o serie de avantaje, cum ar fi precizie bună, simplitate și cost redus. În plus, metoda are o precizie foarte bună și este versatilă putând fi folosită în analiza de rutină în controlul calității produselor cosmetice, farmaceutice, suplimente alimentare și alte tipuri de probe.

CAPITOLUL 7. Determinarea simultană a acidului cafeic și a acidului ferulic dintr-un supliment alimentar, utilizând un senzor serigrafiat pe bază de nanofibre de carbon

În lucrarea de față, am ales un electrod serigrafiat pe bază de nanofibre de carbon (CNF/SPE) pentru cuantificarea simultană a doi acizi hidroxicinamici (acidul cafeic și acidul ferulic) dintr-un produs cu o formulă complexă, fito-homeopată, cu rol în reducerea apariției tulburărilor aparatului vizual. CNF/SPE a fost ales pe baza studiilor precedente, în care a demonstrat o sensibilitate și reproductibilitate ridicată. Și în acest studiu CNF/SPE s-a dovedit a fi potrivit și eficient, cu o limită de detecție scăzută pentru determinarea ambilor compuși electroactivi. Tehnica electrochimică utilizată a fost voltametria ciclică.

De asemenea, s-a urmărit determinarea capacității antioxidante al acestor compuși în produsul Eye Blend prin metoda DPPH.

7.1. Rezultate și discuții

7.1.1. Studiile preliminare în vederea caracterizării electrozoului

Studiile preliminare ce caracterizează senzorul CNF/SPE au fost realizate atât în soluție de PBS pH= 7,0 (Figura 6.3 a), cât și în soluție de ferocianură de potasiu 10^{-3} M (Figura 6.4 a) și descrise amănunțit, în lucrarea anterioară. În urma calculelor aria suprafeței active a senzorului are valoarea $0,1819 \text{ cm}^2$, fiind superioară ariei geometrice, ceea ce arată o sensibilitate optimă a senzorului.

7.1.2. Comportamentul voltametric al CNF/SPE în soluții de acid ferulic și acid cafeic

În următoarea etapă, s-au analizat soluțiile de acid ferulic, respectiv acid cafeic 10^{-3} M (electrolit suport PBS 10^{-1} M, pH 7,0) cu senzorul CNF/SPE, folosind voltametria ciclică.

În Figura 7.1. este prezentată voltamograma ciclică obținută de CNF/SPE prin imersie în soluție de acid ferulic 10^{-3} M (electrolit PBS pH=7,0), la a doua scanare. Se pot observa trei picuri anodice și două picuri catodice bine evidențiate.

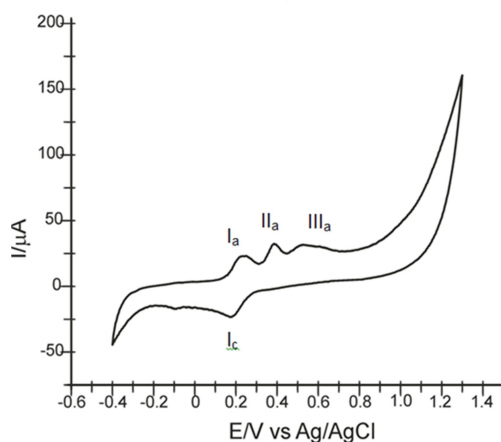


Figura 7.1. Voltamograma ciclică CNF/SPE imersat în în soluția de acid ferulic 10^{-3} M și PBS 10^{-1} M (a doua scanare) la 0,1 V/s

Inițial, voltamograma ciclică înregistrată, afișa două picuri de oxidare ireversibile II_a la $E=0,388$ V și III_a la $E=0,552$ V, aferente cu începutul procesului de electropolimerizare. Valoarea potențialului măsurat este apropiat cu cel obținut în alte studii[125]. La a doua scanare (Figura 7.1), picurile II_a și III_a scad în intensitate și se evidențiază perechea de picuri, I_a/I_c , indicând depunerea unui film electroactiv pe suprafața electrodului.

Perechea de picuri I_a ($I_a=23,308 \mu\text{A}$, $E=0,235$ V) / I_c ($I_c=-23,87 \mu\text{A}$, $E=0,179$ V), corespunde unui proces redox cvasi-reversibil (mecanismul de oxido-reducere a sistemului o-quinonă/o-hidrochinonă). Se poate observa și un pic II_c suplimentar, fără un omolog anodic.

Picurile II_a și III_a sunt relaționate de oxidarea FA, eliminându-se un electron și un proton, conducând la un radical stabil, urmată de o a doua eliminare de electroni, prin scindarea grupării metoxi, care duce la formarea o-chinonei, reacție ce explică sistemul reversibil I_c / I_a [125].

De asemenea, s-a studiat comportamentul electrochimic al CNF/SPE într-o soluție de acid cafeic 10^{-3} M-PBS 0,1 M pH 7,0. În Figura 7.2. se observă un pic anodic și unul catodic, relaționate cu procesul de oxido-reducere al acidului cafeic. Mecanismul a fost explicat în detaliu în secțiunea 5.2.3. Picul anodic este înregistrat la $E=0,242$ V având $I_{pa}= 64,055 \mu\text{A}$ iar picul catodic la $E= 0,160$ V și $I_{pc}=-36,461 \mu\text{A}$.

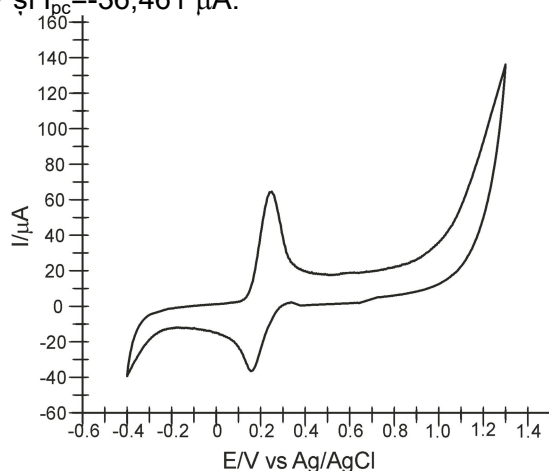


Figura 7.2. Voltamograma ciclică a CNF/SPE imersat în soluție 10^{-3} M acid cafeic (soluție PBS 10^{-1} M pH = 7,0) la 0,1 V/s.

În continuare s-a studiat influența vitezei de scanare asupra răspunsului voltametric al sensorului CNF/SPE în soluție de CA, respectiv FA 10^{-3} M (electrolit suport PBS 0,1 M pH 7,0, la diferite viteze de scanare situate între 0,1 V/s și 1,0 V/s, crescând viteza de scanare de fiecare dată câte 0,1 V/s.

În urma reprezentării grafice a curenților picurilor anodice în funcție de rădăcina pătrată a vitezei de scanare s-a constatat o dependență liniară între cei doi parametri, ceea ce demonstrează că procesul redox este controlat de fenomenul de difuzie. Rezultatele obținute se prezintă în Tabelul :

Tabel 7.1. Ecuatiile liniare, R^2 și coeficienții de difuzie ai CA și FA

Compus fenolic	Ecuatia linară	R^2	D ($\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$)
CA	$y = 1,793 \times 10^{-5} - 3,266 \times 10^{-5}$	0,9969	$3,48 \times 10^{-6}$
FA	$y = 2,725 \times 10^{-5} - 2,942 \times 10^{-5}$	0,9999	$7,24 \times 10^{-6}$

Valorile coeficienților de difuzie ale CA și FA sunt mai mici decât alte valori obținute în literatură[30,129–131].

De asemenea, pentru acidul cafeic, se constată o ușoară diferență între valoarea obținută acum, față de cea obținută în studiul anterior ($4.13 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \times \text{s}^{-1}$), deși s-a utilizat același tip de electrod. Aceste diferențe ale valorii lui D s-ar putea explica prin utilizarea soluției electrolit cu un pH mai mare[108].

7.1.3. Influența concentrației de FA și CA asupra răspunsului electrochimic

Următoarele experimente urmăresc determinarea simultană a celor doi acizi hidroxicinamici folosind CNF/SPE. Pentru acest lucru s-au folosit pe rând soluții de concentrație 10^{-3} M de CA, respectiv FA. Pentru fiecare caz s-a realizat o curbă de calibrare aferentă celuilalt compus fenolic adăugat în intervalul de concentrație 10-1000 μM .

În Figura 7.5. sunt prezentate voltamogramele ciclice obținute în urma imersiei CNF/SPE într-o soluție de acid cafeic 10^{-3} M (electrolit suport PBS pH= 7,0) care conține concentrații crescânde de acid ferulic.

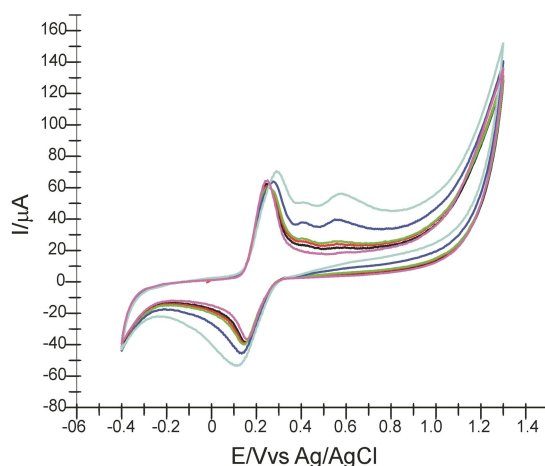


Figura 7.3. Voltamogramele ciclice ale CNF/SPE în soluție de acid cafeic 10^{-3} M (linia mov), apoi conținând concentrații diferite de acid ferulic: 10 μM (linia neagră), 50 μM (linia rosie), 100 μM (linia verde), 500 μM (linia albastră) și 1000 μM (linia bleu).

Se poate observa un pic anodic și unul catodic de intensități mai mari, corespunzătoare prezenței acidului cafeic, iar pe măsură ce se adaugă cantitățile crescânde de acid ferulic, se evidențiază mai bine, picurile IIa și IIIa ireversibile aferente electropolimerizării FA. Depunerea FA pe suprafața electrodului ce ar corespunde unei perechi de picuri Ia/Ic se suprapune cu picurile corespunzătoare procesul de oxido-reducere al CA.

La adăugarea primelor concentrații de FA, primul pic anodic suferă o ușoară scădere a intensității, ceea ce înseamnă că procesul de oxidare al CA este inhibat de depunerea și oxidarea FA. În schimb, atunci când concentrația de FA adăugată în soluție este egală cu concentrația de CA, atât intensitatea picului anodic ($I_{pa} = 70,394 \mu\text{A}$) cât și potențialul ($E_a = 0,287\text{V}$) prezintă valori mai mari. Acest lucru se poate explica prin faptul că FA este mai activ electrochimic decât CA.

Comparativ cu picul anodic, picul catodic crește în intensitate proporțional cu creșterea concentrației de FA din soluție, concomitent cu deplasarea potențialului către valori mai reduse. Acest lucru arată că ambii compuși suferă concomitent un proces de reducere.

Similar determinărilor precedente, Figura 7.4 prezintă voltamogramele ciclice obținute de CNF/SPE înregistrate pe rând într-o soluție de FA 10^{-3}M , concentrație ce rămâne constantă, crescând exponențial concentrația de CA (10-1000 μM). Pe măsură ce concentrația de CA din soluție crește, se evidențiază o intensitate mai mare a primului pic anodic, aferent oxidării acidului cafeic. Prezența CA în soluție nu împiedică oxidarea FA. Creșterea constantă a intensității picului anodic se explică prin sinergia proceselor de oxidare a celor doi compuși.

La fel ca în Figura 7.5, atunci când în soluție avem aceeași concentrație de CA și FA, potențialul primului pic anodic se deplasează spre o valoare mai mare. În ceea ce privește picul catodic, atunci când în soluția cu o concentrație constantă de FA, se adaugă progresiv cantități de CA, intensitatea picului crește într-un ritm mai rapid, iar potențialul se deplasează spre valori mai mici.

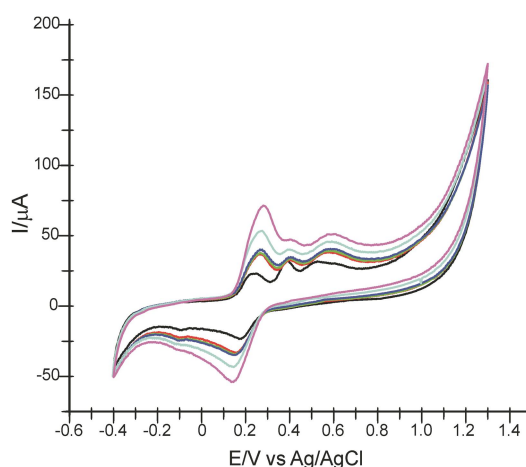


Figura 7.4. Voltamogramele ciclice ale CNF/SPE în soluție de FA 10^{-3}M (linia neagră), apoi conținând concentrații diferite de CA: 10 μM (linia roșie), 50 μM (linia verde), 100 μM (linia albastră), 500 μM (linia bleu) și 1000 μM (linia violet).

Pe baza voltamogramelor ciclice obținute mai sus, a fost studiată relația dintre concentrațiile adăugate și intensitatea picurilor catodice pentru CA și FA. Picurile catodice au avut o creștere constantă în ambele situații, ceea ce arată că procesul de reducere a fost influențat de prezența ambilor antioxidanți. Intervalul de concentrație studiat a fost 10-1000 μM pentru compusul fenolic studiat, în timp ce concentrația celuilalt era constantă.

Există o dependență liniară între concentrația de FA (a), respectiv CA (b) și intensitatea picului catodic înregistrat. Ecuațiile dreptelor de calibrare, dar și valorile LOD și LOQ obținute sunt notate în Tabelul 7.2.

Tabel 7.2. Valorile LOD și LOQ, ecuația dreptei și R^2 a senzorului CNF/SPE pentru detecția simultană a CA și FA

CNF/SPE	LOD (M)	LOQ (M)	R^2	Ecuația dreptei
Detecția FA	$2,33 \times 10^{-7}$	$7,78 \times 10^{-7}$	0,9961	$I(\mu\text{A}) = -0,0143 \mu\text{g} / \mu\text{L} - 38,436$
Detecția CA	$2,39 \times 10^{-7}$	$7,97 \times 10^{-7}$	0,9981	$I(\mu\text{A}) = -0,0205 \mu\text{g} / \mu\text{L} - 33,148$

Valorile reduse ale limitei de detecție și cuantificare demonstrează o sensibilitate sporită a senzorului de a determina simultan FA și CA dar și fezabilitatea metodei voltametrice folosite. Valorile LOD și LOQ obținute în prezentul studiu sunt similare cu cele prezentate în alte cercetări[132–134].

7.1.4. Studii de interferență

Pentru investigarea diverselor interferențe asupra determinării simultane a CA și FA au fost adăugate, pe rând, în soluție, substanțele acid vanilic, acid galic și quercetină. Inițial s-au adăugat pe rând, concentrații de 5×10^{-4} , din fiecare interferent. Modificările semnalului au fost insesizabile. Apoi s-au adăugat concentrații mai mari din fiecare compus (10^{-3} M) pentru a testa limita de toleranță. Quercetina este cea care a influențat mai mult aspectul picurilor, datorită structurii chimice asemănătoare cu cea a CA și FA. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 7.3.

Tabel 7.3. Interferența unor specii înrudite chimic asupra determinării simultane a CA și FA (10^{-3} M).

Compusul interferet	Raport concentrații	Recuperare / %	Raport concentrații	Recuperare / %
Quercetină	1:0,5	100 ± 4,6	1:1	96 ± 2,1
Acid vanilic	1:0,5	102 ± 1,9	1:1	98 ± 3,1
Acid galic	1:0,5	102 ± 4,1	1:1	99 ± 3,5

7.1.5. Stabilitatea și repetabilitatea senzorului

Pentru a investiga repetabilitatea senzorului, măsurătorile voltametrice au fost efectuate într-o soluție de CA și FA 10^{-3} M (din ambii compuși), cu același senzor de 10 ori. Abaterea standard relativă (RSD) a măsurătorilor a fost de 4,5%. Între măsurători, CNF/C-SPE a fost clătit cu 0,01 M PBS de pH 7,0. Prin urmare, CNF/C-SPE se poate utiliza în mod repetat.

Stabilitatea senzorului a fost verificată prin monitorizarea răspunsului voltametric într-o soluție cu concentrație egală de CA și FA (10^{-3} M) la intervale regulate (1 zi) pentru o perioadă de o lună. În toată această perioadă senzorul a fost depozitat la 4° C într-un frigider. Răspunsul electrochimic s-a păstrat în proporție de 90%.

7.1.6. Determinarea simultană a CA și FA în produsul Eye Blend

Pentru confirmarea fezabilității metodei, s-a ales produsul Eye Blend în vederea detecției CA și FA în compoziția acestuia, folosind CNF/SPE. În Figura 7.8. se prezintă primele 5 scanări ale CV, înregistrate cu CNF/SPE imersat în soluția obținută prin dizolvarea capsule de Eye Blend în PBS 10^{-1} M, pH 7,0.

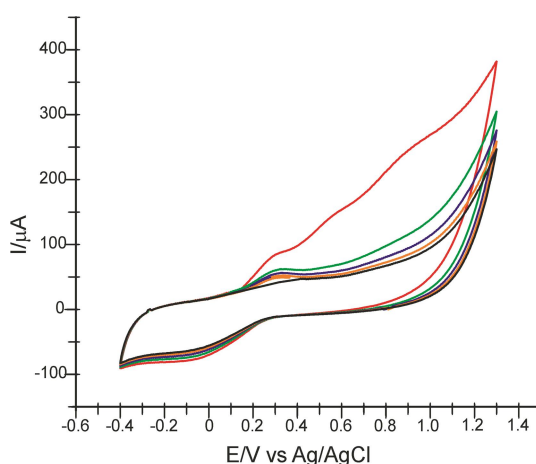


Figura 7.5. Voltamogramele ciclice înregistrate cu CNF/C-SPE imersat în soluția de Eye Blend (1 cps / 50 mL PBS 0,1M, pH 7,0): prima scanare-linia roșie, a doua scanare-linia verde, a treia scanare-linia albastră, a patra scanare-linia portocalie, a cincea scanare-linia neagră

Se remarcă aspectul picurilor anodice de la prima scanare a CV, ce reflectă prezența acidului ferulic. La următoarele scanări, al doilea și al treilea pic scând în intensitate, ca urmare a procesului de depunere a FA pe suprafața electrodului. Scăderea în intensitate a celor două picuri s-ar putea datora și prezenței în compoziție unor alți compuși electroactivi, ce inhibă activitatea FA. Cuantificarea FA și CA se va face cu ajutorul picului catodic. Potențialul picului catodic aferent prezenței CA este apropiat de cel al FA, astfel că este dificil de determinat concentrația exactă a compușilor. Totuși au fost estimate cantitățile de FA și CA, după cum se poate vedea în Tabelul 7.3.

Tabel 7.4. Datele cantitative ale determinării CA și FA din produsul Eye Blend folosind CNF/C-SPE

Compus fenolic detectat	Metoda voltametrică	
	% c	mg/caps
CA	6,021	21,076
FA	7,516	26,306

7.1.7. Determinarea capacității antioxidante a CA și FA prin metoda DPPH

Metoda DPPH se bazează pe reacția cu donori de electroni sau radicali de hidrogen (H^*) ce produc compuși antioxidanți. Reducerea DPPH este direct proporțională cu cantitatea de antioxidant prezentă în proba analizată[135].

S-a observat că reducerea DPPH a fost dependentă de concentrația compusului fenolic din probă. Atunci când în soluția de DPPH s-au adăugat concentrații egale de FA și CA (50 μ L), s-a constatat că procesul de reducere a reactivului a fost mai intens, obținându-se o valoare mai mică a absorbanței. Acest lucru demonstrează că existența ambilor compuși fenolici în preparat (deși într-o concentrație mai mică decât cea în care sunt luați separați), favorizează un efect antioxidant mai mare.

Activitatea de eliminare a radicalului a fost exprimată ca procent și a fost calculată folosind următoarea formulă:

$$\%C = (A_{\text{control}} - A_{\text{probă}}) / A_{\text{probă}} \times 100$$

Rezultatele se regăsesc în Tabelul 7.4.

Tabel 7.5. Determinarea activității antioxidante a compușilor CA și FA

Volum probă	$3,22 \times 10^{-5}$ M CA	$6,25 \times 10^{-5}$ M CA	$3,22 \times 10^{-5}$ M FA	$6,25 \times 10^{-5}$ M FA	$1,63 \times 10^{-5}$ M CA + $1,63 \times 10^{-5}$ M FA	100 μ L Eye Blend
% c act. antiox	0,971922	1,523395	0,873362	1,898188	9,67391304	14,55767

Se poate afirma că CA și FA sunt prezenți în compoziția produsului Eye Blend în cantități apropiate. Metoda studiată poate fi considerată un instrument ieftin și simplu de manipulat ce ar putea fi aplicată pentru diverse alte produse farmaceutice.

7.2. Concluzii

Studiul a avut ca scop determinarea simultană a doi compuși fenolici, acidul cafeic și acidul ferulic, dintr-o formulă fito-homeopată. În analizele experimentale s-a folosit un electrod serigrafat modificat cu nanofibre de carbon. Metoda electrochimică folosită a fost voltametrica ciclică. Comportamentul electrochimic al CNF/C-SPE a fost analizat în secțiunea anterioară.

Senzorul a dovedit o sensibilitate bună pentru detecția ambilor analiți în soluția de analizat. S-a determinat cantitativ FA și CA din produsul Eye Blend cu CNF/C-SPE prin voltametrie ciclică. De asemenea, influența altor specii asupra semnalului electrochimic a fost redusă, senzorul având specificitate favorabilă. Ulterior s-a determinat activitatea antioxidantă a compușilor, prin metoda DPPH, demonstrând astfel, efectul antioxidant, sinergic al celor doi compuși fenolici în produsul Eye Blend.

Prin urmare, atât senzorul cât și metoda voltametrică utilizată s-au dovedit a fi potrivite pentru determinarea simultană a celor doi compuși fenolici dintr-un produs cu o compoziție complexă. Se poate afirma că această metodă de detecție este sensibilă, precisă, ușor de aplicat și ar putea fi folosită și pentru determinări simultane a altor compuși fenolici.

CAPITOLUL 8. Dezvoltarea unui nou biosenzor electrochimic pe bază de nanofibre de carbon, ftalocianină de cobalt și lacază pentru detecția acidului p-cumaric în fitopreparate

Introducere

Scopul acestei lucrări este evaluarea comportamentului electrochimic al unui nou biosenzor pe bază de nanofibre de carbon, ftalocianină de cobalt și lacază (CNF-CoPc-Lac-SPE) la detecția PCA utilizând diferite tehnici voltametrice. De asemenea, metoda electroanalitică va fi validată, pentru cuantificarea PCA în diferite produse fitopreparate folosind metoda spectrometrică FTIR.

8.1. Materiale și metode

8.1.1. Prepararea senzorului CNF-CoPc/SPE

Pentru prepararea senzorului modificat CNF-CoPc/SPE am procedat astfel: pe suprafața electrodului serigrafat modificat cu nanofibre de carbon s-a adăugat, prin tehnica *drop-and-dry*, o cantitate de 10 μ L soluție de ftalocianină de cobalt 10^{-5} M în cloroform, secvențial, cu pauze pentru uscare. Uscarea s-a realizat la temperatura camerei, timp de 30 minute. Adăugarea soluției de ftalocianină de cobalt s-a realizat cu ajutorul unei micropipete Eppendorf.

8.1.2. Prepararea biosenzorului CNF-CoPc-Lac/SPE

Pentru prepararea biosenzorului, s-a folosit ca suport CNF-CoPc/SPE. Prin tehnica turnării a fost adăugat un volum de 10 μ L, secvențial, în doua etape, cu o pauză pentru uscare între cele două adăugări, de 3 ore. Reticularea enzimei s-a realizat prin poziționarea senzorului deasupra unui recipient cu 2 mL glutaraldehidă 2%, timp de 1 minut.

Vaporii de glutaraldehidă au asigurat imobilizarea lacazei pe suprafața electrodului. Biosenzorii au fost păstrați la 4° C până la utilizare, maxim 72 ore [98]. În Figura 8.2 este prezentat procesul de preparare al biosenzorului (a) și mecanismul de oxidare enzimatică al PCA în prezența lacazei (b).

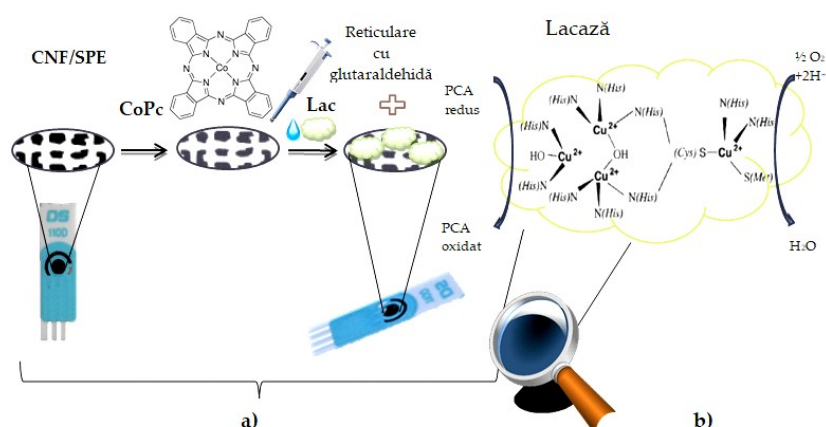


Figura 8.1. a) Procesul de preparare a biosenzorului pe bază de lacază având ca suport un electrod serigrafat pe bază de nanofibre de carbon modificat cu ftalocianină de cobalt. b) mecanismul de oxidare enzimatică al PCA în prezența lacazei

8.2. Rezultate și discuții

8.2.1. Studii preliminare în vederea caracterizării electrozilor

Pentru a observa modificările aduse senzorului comercial pe bază de nanofibre de carbon, suprafața activă a celor doi electrozi de lucru, a fost analizată cu metoda spectrofotometrică FTIR

În spectrele FTIR pentru CNF-Co-Pc/SPE, respectiv CNF-Co/Pc-Lac/SPE, fiind evidente diferențele, atât ca număr de picuri cât și ca zgomot de fond. Se pot observa mai multe picuri reprezentative prezenței lacazei, în intervalul lungimii de undă $1460-1620\text{ cm}^{-1}$ [136].

În analizele preliminare, s-a evaluat comportamentul electrochimic ale CNF/SPE, CNF-CoPc/SPE și CNF-CoPc-Lac/SPE în soluții de tampon fosfat 10^{-1} M cu valori diferite ale pH-ului (3,0, 4,0, 5,0, 6,0). Conform studiilor anterioare, semnalul stabil a fost obținut în domeniul de potențial $-0,4$ și $+1,3\text{V}$ [3]. Prin urmare, acest domeniu de potențial a fost folosit pentru studiul comportamentului electrochimic al electrozilor imersate în PBS 10^{-1} M (pH= 3,0, 4,0, 5,0, 6,0) la o viteză de scanare de $0,1\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

În voltamogramele ciclice obținute cu CNF/SPE nu s-au observat picuri în domeniul de potențial studiat (rezultatele nu sunt prezentate), ceea ce demonstrează că suprafața activă a electrodului nu prezintă contaminări și nanofibrele de carbon au puritate ridicată.

La imersia senzorului CNF-CoPc/SPE în soluție de tampon fosfat la diferite valori ale pH ului, CV a arătat două picuri, unul anodic, de mică intensitate și unul catodic, mai evident,. Curentul picului catodic a crescut odată cu creșterea pH-ului. La pH= 5,0, picul anodic apare la $0,67\text{ V}$ și picul catodic la $-0,21\text{ V}$. Picurile sunt relaționate cu procesul de oxido-reducere a CoPc de pe suprafața electrodului modificat și sunt în concordanță cu rezultatele obținute în alte studii [137].

Preliminar, a fost investigată reducerea electrochimică a lacazei de pe suprafața biosenzorului, în soluție PBS cu valori ale pH-ului între 3,0 și 6,0, iar răspunsurile CV au indicat că I_{pc} crește direct proporțional cu creșterea pH-ului, până la pH= 5,0. La pH=6,0, I_{pc} a avut o scădere considerabilă. Mai mult, creșterea pH-ului până la valoarea 5,0 a determinat o deplasare liniară a potențialului picului catodic la valori mai negative. Ecuația de regresie este: $E_p = -0,0362\text{ pH} + 0,0567$.

8.2.2. Răspunsul voltametric al electrozilor în soluția de acid p-cumaric

Conform studiilor preliminare dar și studiilor de specialitate s-a constatat că valoarea optimă a pH-ului pentru detecția compușilor fenolici, este 5,0 [138]. Picurile obținute la această valoare a pH-ului sunt mai evidente și bine definite [139][140,141] O intensitate mai mare a picului, indică faptul că etapa de imobilizare nu a afectat negativ activitatea enzimei. În plus o valoare mai mică a pH-ului ar putea contribui la degradarea mai rapidă a enzimei. Prin urmare, în următoarele analize experimentale s-a folosit ca electrolit suport soluția de PBS 10^{-1} M (pH=5,0).

Electrozii de lucru s-au utilizat pentru înregistrarea voltamogramelor ciclice, folosind o soluție de acid p-coumaric 10^{-3} M (PBS 10^{-1} M pH=5,0). Viteza de scanare folosită a fost $0,1\text{ V/s}$. Voltamogramele ciclice arată ușor diferit în funcție de modificările aduse electrodul de lucru folosit. La prima scanare voltametrică apare, în fiecare situație, un pic anodic bine evidențiat, ireversibil, care este asociat cu oxidarea grupării hidroxil pe inelul aromatic al moleculei și formarea radicalilor fenoxi, care pot ulterior dimeriza sau polimeriza [142]. În cazul biosenzorului picul anodic apare la un potențial de $0,904\text{ V}$.

La scanari succesive, produsul de oxidare a acidului p-cumaric se depune pe suprafața electrodului formând un film polimeric, explicându-se astfel apariția unui alt pic de oxidare reversibil, la un potențial mai mic decât cel al acidului p-cumaric[143]. Creșterea intensității picului de oxidare reversibil se explică prin creșterea în grosime a filmului polimeric ce acoperă suprafața electrodului și împiedică difuzia acidului p-cumaric și oxidarea acestuia pe suprafața electrodului[143].

La utilizarea CNF-CoPc-Lac/SPE, potențialul maxim aferent produsului de oxidare apare la $E_{pa} = 0,537\text{ V}$, iar picul de reducere are un potențial $E_{pc} = 0,011\text{ V}$. Astfel, se confirmă cvasi-reversibilitatea procesului de oxidare. Aceste valori sunt similare cu cele întâlnite în alte lucrări ce studiază procesul de oxido-reducere a acidului p-cumaric[143]. Atunci când produsul de oxidare este adsorbit pe suprafața electrodului, picul de oxidare a acidului p-cumaric scade în intensitate, pe când picul aferent produsului de oxidare crește în intensitate la scanări succesive (Figura 8.8).

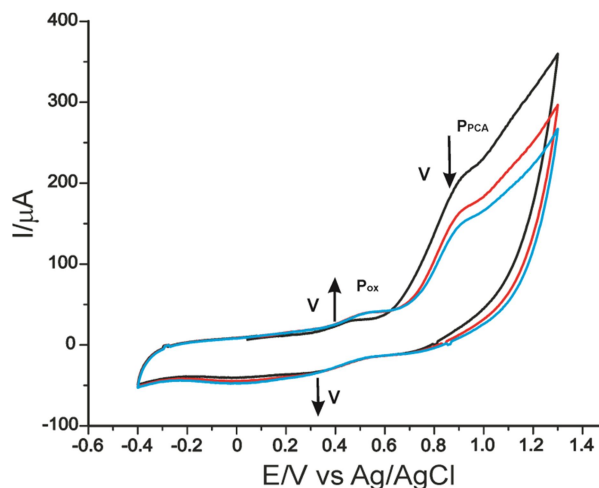


Figura 8.2. Voltamograma ciclică a CNF-CoPc-Lac/SPE imersat în soluție de acid p-cumaric 10^{-3} M (electrolit PBS 10^{-1} M, pH= 5,0): prima scanare (linia neagră), a doua scanare (linia roșie) și a treia scanare (linia albastră).

Picul aferent produsului de oxidare are un potențial de oxidare mai mic decât cel al acidului p-cumaric datorită formării unor polimeri organici prin oxidare[143]

CNF-CoPc-Lac/SPE se remarcă printr-o valoare redusă a potențialului picului catodic, ceea ce înseamnă că procesul de reducere necesită o energie de activare mai redusă și este influențat de prezența lacazei.[52][118][120]. De asemenea, valoarea mică a E_{pc} sugerează un proces rapid de transfer de electroni în procesul redox al PCA la nivelul suprafeței active a biosenzorului[122].

Prin urmare, CNF-CoPc-Lac/SPE prezintă o selectivitate mai bună comparativ cu ceilalți doi senzori la detectia acidului p-cumaric, confirmându-se astfel activitatea biocatalitică a lacazei imobilizată pe suprafața biosenzorului. Valorile parametrilor $E_{1/2}$ și I_{pc}/I_{pox} dovedesc că biosenzorul prezintă o sensibilitate superioară.

În plus, picul catodic este vizibil mai intens, motiv pentru care, calculele ulterioare se vor raporta la modificările acestuia. În cazul CNF-CoPc-Lac/SPE, semnalul a fost mai stabil și zgomotul de fond mai redus. Procesul de reducere a acidului PCA fost studiat și s-a demonstrat că acesta are loc la un potențial redus și se datorează legăturii duble conjugate pre-protonate [144]. Având în vedere că molecula de acid p-cumaric conține o grupare fenolică oxidabilă pe ciclul aromatic, se poate afirma că acest compus poate fi determinat voltametric.

Lacaza are capacitatea de a cataliza procesul de oxidare a acidului p-cumaric. Picurile obținute la viteza de scanare 0,1 V/s au intensități reduse și sunt mai puțin vizibile datorită influenței curentului capacitiv. La viteze de scanare mai ridicate, curenții faradaici sunt mai mari, iar picurile sunt mai bine definite[145].

Aceiași electrozi au fost utilizați pentru înregistrarea voltamogramelor de undă pătrată în soluția de acid p-coumaric 10^{-3} M (electrolit PBS 10^{-1} M pH=5,0). Domeniul de potențial studiat a fost situat între -0,4 și +1,3V, înălțimea impulsului, 0,09 V, o creșterea potențialului impulsului de 7 mV și o frecvență de 15 Hz. Această tehnică a prezentat rezultate similare cu voltametria ciclică. Cu toți cei trei electrozi s-au evidențiat două picuri de oxidare. În fiecare situație se remarcă picuri mai bine definite și curent de fond mai redus.

Cu ajutorul SWV este evidențiată reversibilitatea picului aferent produsului de oxidare (I_{pox}) și ireversibilitatea celui de-al doilea pic (I_{PCA}). În cazul CNF-CoPc-Lac/SPE primul pic anodic a fost observat la 0,392 V, iar al doilea la 0,885 V.

Mai mult decât atât, se remarcă o diferență mult mai mică între intensitatea primului pic anodic și cel de-al doilea, ceea ce confirmă că PCA se adsorbe pe suprafața senzorului, interacționând cu lacaza imobilizată. Influența vitezei de scanare asupra răspunsul voltametric

În etapa următoare, s-a studiat comportamentul electrochimic a celor trei electrozi în soluție de PCA 10^{-3} M (electrolitul suport a fost 10^{-1} M PBS la pH 5,0), aplicând viteze de scanare crescând în intervalul 0,1-1,0 V/s. Se observă diferențe remarcabile între intensitățile

curenților de oxidare și reducere și a potențialelor măsurate, încă de la a doua viteză de scanare aplicată, picurile crescând progresiv odată cu creșterea vitezei de scanare. Având în vedere că prezența enzimei influențează preponderent picul catodic, se va studia dependența I_{pc} în funcție de viteza de scanare.

S-a determinat că există o dependență liniară dintre curenții picului catodic și viteza de scanare pentru toți cei trei electrozi (Tabelul 8.2). Acest fapt indică că procesul ce are loc la suprafața electrozilor este controlat de adsorbția speciei electroactive [143].

Având în vedere ecuația de dependență liniară dintre curențul picului catodic și viteza de scanare, gradul de acoperire a suprafeței electrozilor cu specia electroactivă (Γ) a fost calculată folosind ecuația lui Laviron, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 8.2[146].

Comparând rezultatele obținute cu cei trei electrozi, se poate afirma că, în toate cazuri procesul de reducere este controlat de adsorbția PCA pe suprafața activă, acesta fiind mai rapid și mai evident în cazul biosenzorului.

Tabel 8.1. Ecuațiile de dependență liniară (I_{pc} vs. v), R^2 și Γ pentru cei trei electrozi utilizați în analiză

Electrozi	Ecuația liniară	R^2	Γ (mol \times cm $^{-2}$)
CNF/SPE	$I_{pc} = -197,46 \times 10^{-6} v - 7,5975 \times 10^{-6}$	0,996	$3,84 \times 10^{-10}$
CNF-CoPc/SPE	$I_{pc} = -229,75 \times 10^{-6} v - 11,029 \times 10^{-6}$	0,999	$4,46 \times 10^{-10}$
CNF-CoPc-Lac/SPE	$I_{pc} = -310,01 \times 10^{-6} v - 41,585 \times 10^{-6}$	0,982	$6,02 \times 10^{-10}$

Din aceste rezultate se poate aprecia că CNF-CoPc-Lac/SPE are proprietăți electroanalitice superioare pentru detecția PCA. În plus, prezența lacazei asigură selectivitate biosenzorului putând fi utilizat în analiza unor probe complexe.

Imobilizarea lacazei împreună cu nanofibrele de carbon și ftalocianina de cobalt duc la o bioselectivitate și conductibilitate mai bună, aceste nanomateriale având efect sinergic în biodetecție[147]. Având în vedere că CNF-CoPc-Lac/SPE a dovedit performanțe superioare privind sensibilitatea și selectivitatea, el va fi utilizat în analizele cantitative ulterioare.

8.2.3. Curba de calibrare

Pentru realizarea curbei de calibrare s-au înregistrat voltamogramele ciclice a acidului p-cumaric, la adăugarea succesivă a unor cantități variabile, între 5 μ L și 30 μ L, de soluție stoc de acid coumaric 10^{-3} M în 50 mL PBS pH 5,0 urmată de agitare. După omogenizarea soluției de analizat s-a înregistrat voltamogramele ciclice. Domeniul de concentrație studiat a fost 0,1 μ M – 202,5 μ M. Curențul picului catodic crește odată cu creșterea concentrației de PCA. Curențul picului anodic a fost liniar în domeniul 0,4-6,4 μ M.

Cu ajutorul ecuației de regresie liniară, LOD ($3\sigma / m$, unde σ a fost deviația standard și m a fost panta curbei de calibrare) și LOQ ($10\sigma/s$)[148] au fost calculate și valorile sunt prezentate în Tabelul 8.3.

Tabel 8.2. Ecuația dependenței liniare dintre I_{pc} și c , R^2 , LOD și LOQ pentru CNF-CoPc/SPE și CNF-CoPc-Lac/SPE

Electrozi	Ecuația liniară	R^2	LOD (M)	LOQ (M)
CNF-CoPc/SPE	$y = -0,0114x - 0,4352$	0,9785	$9,29 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{-6}$
CNF-CoPc-Lac/SPE	$y = -0,0247x - 0,4188$	0,9714	$4,83 \times 10^{-7}$	$1,61 \times 10^{-6}$

Se poate observa că biosenzorul prezintă performanțe superioare sensorului, datorită prezenței enzimei ce îi oferă selectivitate și sensibilitate și favorizează interacțiunea cu acidul p-cumaric. O curbă de calibrare pentru același interval de concentrație (0,1 μ M – 202,5 μ M) a acidului p-cumaric, a fost realizată și prin cronoamperometrie (Figura 8.14), pentru CNF-CoPc-Lac/SPE, la un potențial menținut constant la -0,2 V. Valorile LOD și LOQ obținute au fost $1,63 \times 10^{-7}$ M, respectiv $5,42 \times 10^{-7}$ M, apropiate, cu cele obținute prin CV.

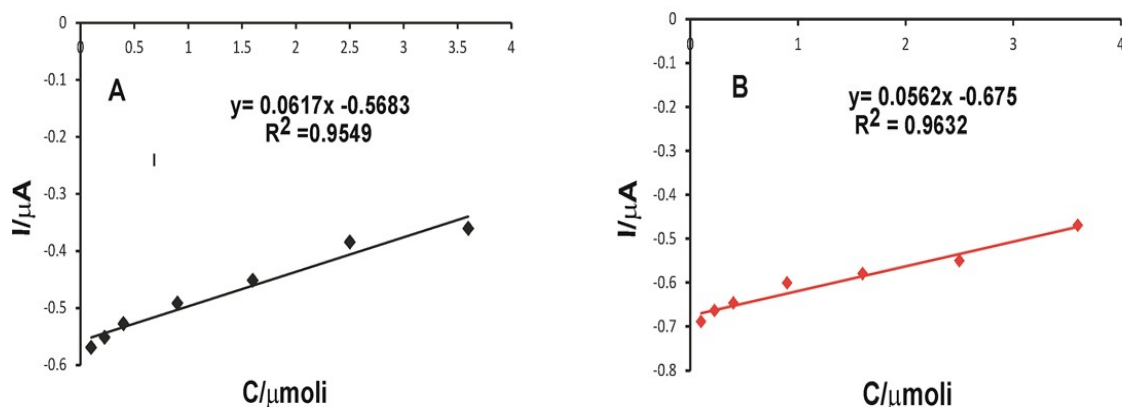


Figura 8.3. Ajustarea liniară în intervalul 0,1-3,6 μM pentru A) CNF-CoPc-Lac/SPE și B) CNF-CoPc/SPE.

Valorile scăzute ale limitelor de detecției și de cuantificare, sunt în concordanță cu valorile obținute de către alte tipuri de senzori sau biosenzori capabili să determine un acid hidroxicinamic. Biosenzorul prezintă sensibilitate ridicată, fiind o diferență favorabilă în cazul biosenzorului, datorată imobilizării lacazei, enzimă ce îi conferă în plus, selectivitate.

Metodele voltamperometrice s-au dovedit a fi fezabile pentru analiza acidului p-cumaric din diferite probe reale, precum fitopreparatele, utile în menținerea sănătății sau adjuvante în tratarea unor afecțiuni. Pentru determinarea cantitativă a acidului p-cumaric din fitopreparatele selectate, se poate folosi cu succes, noul senzor enzimatic dezvoltat în acest studiu.

8.2.4. Stabilitatea, reproductibilitatea și repetabilitatea biosenzorului.

A fost studiată stabilitatea biosenzorului și s-a constatat că poate fi folosit pentru mai mult de 30 de măsurători prin voltametrie ciclică în soluții ce conțin PCA. Pentru a verifica reproductibilitatea metode de fabricare, am studiat răspunsul a doi biosenzori preparați identic, în soluții de PCA de aceeași concentrație. Nu s-au observat diferențe mai mari de 2% între cei doi biosenzori. De asemenea, variația răspunsului biosenzorului la determinarea PCA în soluție de aceeași concentrație, la scoatere din soluție, clătire și repetarea voltamogramei ciclice nu a depășit 3%.

8.2.5. Studii de interferență

Pentru studiile de interferență, comportamentul biosenzorului a fost evaluat, la adăosuri de compuși înrudite chimic cu PCA, care se găsesc adesea în fitopreparate, de exemplu acid galic, acid ascorbic, acid vanilic, acid ferulic. Soluția de PCA a avut o concentrație de 50 μM , adăugându-se aceeași concentrație de interferenți.

Determinarea PCA nu este influențată semnificativ, de compușii interferenți. Se evidențiază picuri aferente celorlalți compuși, dar picurile anodice și picul catodic al PCA nu este influențat. Din aceste rezultate, se poate concluziona că senzorul CNF-CoPc-Lac/SPE are o precizie și o selectivitate bună pentru determinarea PCA din probe reale.

8.2.6. Determinarea PCA în fitopreparate

Fitopreparatele selectate pentru analiză au forme de prezentare diferite: cremă solidă, cremă și comprimate și au o compoziție bogată în substanțe antioxidante. Producătorul nu specifică pe prospect o concentrație exactă a PCA, astfel că determinarea cantitativă prin metoda voltametrică va fi validată de o metodă clasică de determinare. Cantități bine stabilite din fiecare produs au fost folosite pentru obținerea soluțiilor de analizat (Ghindazin 1g, Tuiazin 1g, Spirulina 0,75 g).

Pentru cuantificare s-a folosit intensitatea picului catodic, aferent potențialului -0,2 V, în cazul fiecărui produs. Rezultatele sunt incluse în Tabelul 8.6.

Tabel 8.3. Concentrațiile de PCA din fitopreparate obținute prin metoda voltametrică, respectiv metoda FTIR

Fitopreparate	Metoda FTIR mg/g PCA	Metoda voltametrică mg/g PCA
Spirulină	1,569	1,674
Ghindazin	0,644	0,783
Tuiazin	1,936	2.149

Pentru validarea metodei voltametrice s-a folosit metoda FTIR. Pentru analiza spectrometrică s-au pregătit cinci probe etalon cu concentrații diferite de acid p-cumaric: 1, 2, 3, 4, 5 mg/g, cu KBr. Probele din fitopreparate au fost analizate fără o pregătire prealabilă. Experimentele au fost analizate în triplicat.

S-a realizat o curba de calibrare în funcție de absorbanta corespunzătoare picului de la 1238 cm^{-1} , pic relaționat cu vibrația de alungire a grupării C-O fenolice[149]. Din ecuația de calibrare s-au calculat cantitățile de acid p-cumaric din fitopreparate.

Valorile concentrațiilor de PCA din probele reale calculate cu metoda spectrometrică sunt apropiate de cele obținute prin metoda voltametrică, datele fiind prezentate în Tabelul 8.6. Acestea certifică eficiența, sensibilitatea și selectivitatea senzorului enzimatic pe bază de nanofibre de carbon modificat cu ftalocianină de cobalt și lacază.

8.3. Concluzii

Acest studiu a demonstrat fezabilitatea dezvoltării unor senzori modificați: primul cu ftalocianină de cobalt și al doilea cu ftalocianină de cobalt și lacază pentru determinarea acidului p-cumaric din fitopreparate. Din rezultatele obținute putem concluziona că ftalocianina de cobalt a favorizat activitatea lacazei, fiind și un mediator al transferului de electroni în procesul de oxidare a acidului p-cumaric.

Metodele voltamperometrice folosite în biodetecție au fost voltamtria ciclică și voltamtria de undă pătrată. Pentru studiul comportamentului electrochimic al biosenzorului în domeniul de concentrație ales s-a folosit voltamtria ciclică și cronoamperometria.

Biosenzorul enzimatic prezintă o sensibilitate și selectivitate ridicată pentru detecția amperometrică a acidului hidroxicinamic. Valorile LOD și LOQ obținute de CNF-CoPc-Lac/SPE sunt apropiate de cele obținute de alți biosenzori pe bază de lacază pentru detecția altor compuși fenolici (Tabelul 8.4).

Concentrațiile de PCA obținute de CNF-CoPc-Lac/SPE au fost apropiate de cele obținute prin metoda spectrofotometrică FTIR.

În concluzie, noul biosenzor dezvoltat pe bază de ftalocianină de cobalt și lacaza are multiple avantaje precum: sensibilitate, selectivitate, fezabilitate și un cost redus. De asemenea, CNF-CoPc-Lac/SPE poate fi folosit în analizele de rutină pentru controlul calității produselor nutraceutice, alimentare sau farmaceutice.

CONCLUZII GENERALE, CONTRIBUȚII PERSONALE, PERSPECTIVE DE CERCETARE VIITOARE

CONCLUZII GENERALE

Teza cu titlul "*Realizarea unor noi senzori și biosenzori voltamperometrici pentru determinarea acizilor hidroxicinamici*" cuprinde atât un studiu teoretic de actualitate, bine documentat, cât și contribuții originale privind determinarea unor acizi hidroxicinamici din diferite fito-preparate sau produse cosmetice, cu ajutorul unor noi senzori și biosenzori electrochimici, în vederea obținerii unor rezultate precise, cu un cost relativ scăzut și într-un interval de timp scurt.

Interesul pentru acest grup de compuși fenolici provine din faptul că acizii hidroxicinamici (cum ar fi acizii ferulic, cafeic, sinapic și p-cumaric) reprezintă aproximativ o treime din compușii fenolici din dieta oamenilor. Suplimentele alimentare se regăsesc sub diferite forme de prezentare, având o compoziție din ce în ce mai complexă însă cu concentrații ale compușilor biologic-activi de multe ori, necunoscute. De asemenea, formulările cosmetice oferă o gamă largă de beneficii privind sănătatea și frumusețea pielii, iar proporțiile dintre principiile active, s-au dovedit a avea o deosebită importanță.

Cea mai importantă activitate biologică a acizilor hidroxicinamici, este cea antioxidantă datorată tocmai, structurii lor chimice, motiv pentru care sunt identificați tot mai des în produse comerciale de diferite tipuri. Mecanismul eliminării radicalilor liberi este explicat prin capacitatea acizilor hidroxicinamici de a dona un atom de hidrogen sau un electron, formând astfel un radical fenoxil stabil. În cazul orto-difenolilor, s-a demonstrat că transferul a doi electroni pe moleculă duce la formarea ulterioară a unui radical orto-hidroxifenoxil și a unei orto-chinone. Aceste mecanisme pot fi explicate în detaliu prin studii electrochimice.

Aceste informații au determinat realizarea unui studiu asupra tehnicilor voltametrice utilizate pentru caracterizarea și cuantificarea acestor compuși. Avantajele analitice ale tehnicilor voltametrice includ o sensibilitate excelentă cu o liniaritate bună într-un domeniu vast de concentrație, timp scurt de analiză și posibilitatea determinării simultane a unor compuși cu structură similară. Diferențele dintre principalele tehnici voltametrice constau în modul de aplicare a potențialului și măsurarea curentului rezultat.

Ulterior, am studiat nanomaterialele de carbon, precum grafenul, oxidul de grafen, fulerenul, nanoconurile de carbon, nanoparticulele de diamant, particulele cuantice de carbon, nanofibrele de carbon, nanotuburile de carbon, utilizate pentru modificarea electrozilor. S-au evidențiat numeroase avantaje ale acestora precum un raport suprafață-volum ridicat și o suprafață specifică mare, adsorbție interfacială eficientă, o viteză mai mare a transferului de electroni și proprietăți electrocatalitice bune. Încorporarea nanomaterialelor de carbon se poate face prin dispersia în solvent, formarea unei paste din carbon și serigrafie.

În studiile experimentale am ales să utilizez senzori serigrafiați pe bază de nanomateriale de carbon care au dovedit proprietăți excelente, atât utilizați ca atare, cât și după modificarea cu alți compuși chimici sau enzime.

Alegerea unei tehnici adecvate de imobilizare este esențială pentru fabricarea biosenzorilor. Una dintre cele mai simple metode de imobilizare a enzimei este prin adsorbție fizică. Enzimele pot fi, de asemenea, imobilizate prin încorporarea în matrici tridimensionale, cum ar fi un film electropolimerizat sau o pastă de carbon. Reticularea este o altă tehnică de imobilizare foarte frecvent abordată, care implică utilizarea unui compus bifuncțional, cum este glutaraldehida. Enzimele pot fi, de asemenea, imobilizate prin legături de afinitate între o grupare funcțională existentă pe suport și o grupare specifică prezentă în secvența enzimatică.

Toate metodele au multiple avantaje, dar și limitări. Putem preveni o parte dintre dificultățile ce pot apărea, alegând o metodă de imobilizare adaptată enzimei ce va fi încorporată dar și biomoleculei ce urmează a fi detectată. De asemenea, abordând o tehnică de

imobilizare potrivită putem evita instabilitatea sau degradarea enzimei. Procesul de imobilizare trebuie să fie simplu, reproductibil, cu un cost redus și cel mai scurt timp de procesare.

Toate aceste informații mi-au fost de un real ajutor pentru a alege analiții de interes, metodele de lucru, tipul de senzori și nanomateriale utilizate, optimizarea parametrilor experimentali, selectarea potrivită a enzimelor și tehnicilor de imobilizare, produsele testate și în final metodele clasice potrivite pentru validarea rezultatelor obținute.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Pentru studiile experimentale au fost selectați trei dintre acizii hidroxicinamici, acidul cafeic, acidul ferulic și acidul p-cumaric, aceștia fiind printre cei mai des întâlniți compuși fenolici din surse vegetale.

În primul studiu, acidul cafeic a fost determinat cu precizie în suplimente alimentare cu senzori serigrafiați de carbon modificați cu diferite nanomateriale, grafen, nanofibre de carbon și nanotuburi de carbon multistrat, folosind ca metodă de detecție voltametria ciclică. Caracterizarea senzorilor prin voltametrie ciclică în soluțiile de referință a arătat că nanotuburile de carbon sau nanofibrele de carbon îmbunătățesc semnificativ răspunsul senzorului în ceea ce privește sensibilitatea și reversibilitatea proceselor electrochimice.

Senzorii serigrafiați au fost apoi folosiți pentru a studia comportamentul electrochimic al acidului cafeic în soluție apoasă la pH 3,6. În toate cazurile a fost observat un proces redox reversibil care implică transferul a doi electroni și doi protoni. A fost evidențiat rolul nanomaterialelor în îmbunătățirea performanțelor electroanalitice ale senzorilor. Pentru fiecare sensor au fost realizate curbe de calibrare și au fost calculate limitele de detecție (LOD) și cuantificare (LOQ). Au fost obținute valori scăzute ale LOD și LOQ, în domeniu de la 10^{-7} până la 10^{-9} M, ceea ce a demonstrat că metoda este fezabilă pentru cuantificarea acidului cafeic în probe reale. Acidul cafeic a fost determinat cantitativ în trei suplimente alimentare folosind cel mai sensibil sensor și anume senzorul serigrafiat pe bază de nanofibre de carbon.

Metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu a fost utilizată pentru a valida rezultatele obținute cu senzorul serigrafiat pe bază de nanofibre de carbon. Rezultatele obținute prin utilizarea metodei voltametrice au fost în concordanță cu cele obținute prin utilizarea metodei spectrofotometrice, fără diferențe semnificative statistic între rezultatele obținute. De asemenea, acidul cafeic și alți compuși fenolici din compoziția suplimentelor alimentare testate au fost puși în evidență prin tehnica cromatografiei de înaltă performanță (HPLC).

Al doilea studiu realizat se referă la comportamentul electrochimic a tipuri electrozi serigrafiați modificați (SPE): un senzor bazat pe nanofibre de carbon (CNF / SPE), un senzor pe bază de nanofibre de carbon modificate cu nanoparticule de aur (CNF- GNP / SPE) și un biosenzor bazat pe nanofibre de carbon modificate cu nanoparticule de aur și tirozinază (CNF- GNP-Ty / SPE). Pentru a construi biosenzorul, tirozinaza (Ty) a fost imobilizată pe suprafața electrodului modificat cu nanofibre de carbon și nanoparticule de aur (senzor comercial), prin tehnica *drop-and-dry*.

Proprietățile electrochimice ale celor trei electrozi au fost studiate prin voltametrie ciclică în soluții electroactive, iar potențialul, curentul și forma picurilor au fost în funcție de natura materialelor utilizate pentru modificarea electrozilor. În cazul acidului ferulic, s-au observat o serie de picuri caracteristice, procesele fiind mai intense în cazul biosenzorului. De asemenea, biosenzorul a dovedit sensibilitate și selectivitate mai mare datorită imobilizării tirozinazei, o enzimă specifică pentru compușii fenolici. Curba de calibrare a fost realizată folosind CNF-GNP-Ty / SPE în soluții de acid ferulic de diferite concentrații în intervalul 0,1–129,6 μM . Acest nou biosenzor a permis valori scăzute ale limite de detecție și de cuantificare, $2,89 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ și respectiv $9,64 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ceea ce arată că metoda electroanalitică este fezabilă pentru cuantificarea acidului ferulic în probe reale. Acidul ferulic a fost determinat cantitativ în trei produse cosmetice cu ajutorul biosenzorului CNF-GNP-Ty / SPE. Rezultatele obținute au fost validate prin intermediul metodei spectrometrice în domeniul infraroșu, diferențele dintre valorile concentrațiilor de acid ferulic obținute prin cele două metode fiind sub 5%.

Pentru al treilea experiment, am ales să determin simultan acidul ferulic și acidul cafeic dintr-un produs fito-homeopat (Eye Blend- Secom). Cei doi compuși sunt menționați în specificațiile producătorului dar fără a se indica concentrația exactă. Scopul studiului a fost de a detecta simultan ambii compuși și de a cuantifica din produsul fito-homeopat, folosind un senzor caracterizat în alt studiu, CNF/SPE. Stabilitatea și reproductibilitatea electrodului CNF/SPE s-au dovedit a fi eficiente, iar sensibilitatea a fost ridicată, atât pentru CA ($2,39 \times 10^{-7}$ M) cât și pentru FA ($2,33 \times 10^{-7}$ M). De asemenea, s-a determinat capacitatea antioxidantă a compușilor în produsul analizat, prin metoda DPPH. Metoda electrochimică a fost eficientă și mai puțin costisitoare decât alte metode de analiză, prin urmare utilizarea ei poate fi extinsă pentru detecția acestor compuși fenolici din diverse produse farmaceutice.

În ultimul capitol din partea experimentală, am realizat un nou biosenzor enzimatic pe bază de lacază și ftalocianină de cobalt (CNF-CoPc-Lac/SPE) pentru determinarea acidului p-cumaric din trei tipuri de fito-preparate cu forme de prezentare diferite. Tehnicile voltametrice utilizate în analizele preliminare dar și pentru determinarea compusului în probele reale au fost voltametria ciclică și voltametria de undă pătrată.

Modificarea senzorilor a fost realizată prin tehnica turnării și reticulării, utilizând glutaraldehida ca agent de reticulare.

Preliminar, a fost investigată reducerea electrochimică a lacazei de pe suprafața biosenzorului, în soluție PBS cu valori ale pH-ului între 3,0 și 6,0, iar voltamogramele înregistrate au indicat că intensitatea curentului catodic crește direct proporțional cu creșterea pH-ului, până la pH= 5,0. La pH=6,0, I_{pc} a avut o scădere considerabilă. Mai mult, creșterea pH-ului până la valoarea 5,0 a determinat o deplasare liniară a potențialului picului catodic la valori mai negative, ceea ce înseamnă o energie de activare mai redusă și o selectivitate mai bună.

Curba de calibrare a fost realizată pentru intervalul de concentrație a acidului p-cumaric de 0,1–202,5 μ M, utilizând voltametria ciclică și cronoamperometria. Cu cei doi electrozi modificați am obținut rezultate optime, în domeniul de liniaritate 0,4-6,4 μ M, CNF-CoPc-Lac/SPE remarcându-se prin valori ale LOD și LOQ mai reduse, $4,83 \times 10^{-7}$ M respectiv $1,61 \times 10^{-6}$ M. Acidul p-cumaric a fost determinat cu succes din cele trei fitopreparate cu compoziție complexă. Rezultatele obținute prin metoda voltametrică au fost comparabile cu cele obținute prin metoda FTIR. Cantitatea de acid p-cumaric determinat cu CNF-CoPc-Lac/SPE a fost mai apropiată de cea obținută prin metoda spectrometrică.

Din toate experimentele întreprinse pot concluziona că:

- Nanomaterialele de carbon și nanoparticulele metalice sau semiconductoare sunt capabile să îmbunătățească performanța senzorilor sau biosenzorilor enzimatici, oferind proprietăți electrochimice și mecanice deosebite
- Parametrii electrochimici precum domeniul de potențial sau viteza de scanare trebuie optimizați astfel încât semnalul să fie cât mai stabil și zgomotul de fond redus
- pH-ul soluțiilor are o influență mare asupra stabilității și răspunsurilor biosenzorilor
- Aria suprafeței active a senzorului/biosenzorului, coeficientul de difuzie sau concentrația speciei active adsorbite sunt parametri importanți în evaluarea mecanismelor de oxidoreducere ce au loc la suprafața electrodului
- Tirozinaza și lacaza sunt capabile să oxideze acizii hidroxicinamici la compuși chinonici, care sunt electroactivi
- Procesul de recunoaștere a substraturilor este influențat de activitatea enzimelor
- Tehnica *drop-and-dry* urmată de reticulare cu glutaraldehidă s-a dovedit a fi potrivită pentru dezvoltarea biosenzorului, activitatea biocatalitică a enzimei fiind neschimbată după imobilizare
- Ftalocianina de cobalt este un compus mediator al transferului de electroni, îmbunătățind răspunsurile biosenzorului pe bază de lacază.
- Senzorii și biosenzorii dezvoltați în aceste studii prezintă valori ale limitelor de detecție și cuantificare reduse, intervale de liniaritate extinse, cu performanțe similare senzorilor raportați în literatura de specialitate
- Rezultatele determinărilor cantitative ai acizilor hidroxicinamici din probe reale au fost validate prin metode clasice de detecție precum, spectroscopia în infraroșu cu

transformată Fourier, cromatografia de lichide de înaltă performanță și metoda determinării activității antioxidante.

- Senzorii și biosenzori dezvoltati în aceste studii s-au dovedit a fi preciși și fezabili, deci pot fi utilizați în analiza de rutină în controlul calității produselor cosmetice, farmaceutice, suplimente alimentare și alte tipuri de probe.

PERSPECTIVE DE CERCETARE VIITOARE

Studiile realizate în cadrul acestei lucrări au demonstrat că biosenzorii enzimatici reprezintă o variantă precisă, selectivă și eficientă pentru determinarea acizilor hidroxicinamici din diferite produse comerciale. Perfecționarea tehnicii de imobilizare, utilizarea unor noi nanomateriale sau compuși polimerici ca mediatori și optimizarea parametrilor de lucru ar putea conduce la proiectarea unor sisteme de biosenzori portabile pentru o testarea de rutină, rapidă, la un cost relativ redus, a unor suplimente alimentare sau fitopreparate. Caracteristicile nanomaterialelor de carbon ar putea fi exploatare în vederea înglobării altor enzime capabile să își păstreze activitatea biocatalitică nemodificată la imobilizare, cu scopul de a dezvolta dispozitive cât mai sensibile, cu aplicabilitate extinsă în domenii diverse de cercetare.

De un interes particular poate fi dezvoltarea unor senzori portabili și miniaturizați pentru detecția simultană a acizilor hidroxicinamici din probe alimentare, de exemplu uleiuri vegetale deoarece acești compuși au efecte benefice pentru organismul uman și în același timp pot fi utilizați ca biomarkeri de autenticitate.

O altă abordare inovativă ar putea fi dezvoltarea și utilizarea unor dispozitive sensibile care instalate sau asociate unui *smartphone*, pot forma platforme independente pentru detecția diferiților analiți. Aceste instrumente ar putea transmite semnalele prin portul USB încorporat, *wireless* sau alte componente integrate și de asemenea, ar putea afișa și interpreta rezultatele prin intermediul unei aplicații mobile specializate. Aplicațiile mobile *open-source* ar putea fi un punct de inițiere spre testarea de rutină a suplimentelor alimentare și produselor farmaceutice nestandardizate. Tema de cercetare propusă poate fi o etapă către realizarea unui astfel de dispozitiv sensibil ce ar putea fi valorificat în viața de zi cu zi în industria alimentară, farmaceutică sau cosmetică.

Listă de lucrări

Bounegru Alexandra Virginia- <https://orcid.org/0000-0002-6005-492X>

Capitol de carte

Apetrei, C.; **Bounegru, A.V.** Electronic Noses and Traceability of Foods. In Comprehensive Foodomics; Elsevier, 2021; pp. 290–307 ISBN 978-0-12-816396-2.

Lucrări publicate

1. **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, doi:10.3390/s20236724. F.I.. 3.520
2. **Bounegru, A.V.**; Apetrei, C. Voltammetric Sensors Based on Nanomaterials for Detection of Caffeic Acid in Food Supplements. *Chemosensors* 2020, 8, 41, doi:10.3390/chemosensors8020041. F.I. 3.108
3. **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. F.I. 3.275
4. **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. F.I. 4.556
5. **Bounegru, A.V.**; Apetrei, C. Laccase and Tyrosinase Biosensors Used in the Determination of Hydroxycinnamic Acids. *IJMS* 2021, 22, 4811, doi:10.3390/ijms22094811. F.I. 4.556
6. **Bounegru, A.V.**; Apetrei, C. Development of a Novel Electrochemical Biosensor Based on Carbon Nanofibers–Cobalt Phthalocyanine–Laccase for the Detection of p-Coumaric Acid in Phytoproducts. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 9302, doi:10.3390/ijms22179302. F.I. 5.923

F.I. cumulată: 24.938

Lucrări prezentate la conferințe naționale și internaționale

- **Alexandra Virginia Mereșescu (Bounegru)**, Constantin Apetrei. Development of Screen-Printed Sensors Based on Carbonaceous Nanomaterials, Poster. Book of abstracts, <http://www.cssd-udjg.ugal.ro/index.php/abstracts-2019>, page 252. SCDS-UDJG 2019, The Seventh Edition, Galați, 13th-14th of June 2019
- **Alexandra Virginia Mereșescu (Bounegru)**, Constantin Apetrei. Voltammetric Determination of Caffeic Acid in Pharmaceutical Products, S3-221. RICCCCE 21, 21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, September 4-7 2019, Constanta – Mamaia, ROMANIA.
- **Mereșescu (Bounegru) Alexandra Virginia**, Apetrei Constantin. Development of screen-printed sensors based on carbonaceous nanomaterials for the determination of

caffeic acid. UGALINVENT, Research and Innovation Salon, Ediția a IV-a, 16-18 October 2019, Page 114.

- **Alexandra Virginia MEREŞESCU (Bounegru)**, Constantin APETREI. Development of nanomaterials-based electrochemical sensors for the determination of caffeic acid from food supplements, Iasi CHEM Conference 3th Edition, "Alexandru Ioan Cuza" University of Iasi, 31.oct - 1.nov 2019.
- **Mereşescu (Bounegru) Alexandra Virginia**, Apetrei Constantin. Development of Screen-printed Sensors And Biosensors For The Detection of Ferulic Acid. National Online Conference of Biophysics, CNB 2020, 14 - 16 June, 2020
- **Mereşescu (Bounegru) Alexandra Virginia**, Apetrei Constantin. Enzyme Sensor Based on Carbon Nanofibers Modified with Gold Nanoparticle and Tyrosinase Used for Ferulic Acid Detection in Cosmetics. SCDS-UDJG 2020, Galați, 18th and 19th of June 2020
- Ancuta Dinu, Dorin Dascalescu, Irina Georgiana Munteanu, **Alexandra Virginia Bounegru**, Ramona-Oana Rosca, Constantin Apetrei. Electrochemical sensors based on nanomaterials employed in water analysis. SCDS-UDJG 2020, Galați, 18th and 19th of June 2020.
- **Alexandra Virginia Mereşescu (Bounegru)**, Constantin Apetrei. Electrochemical Determination Of Ferulic Acid In Cosmetics Using Screen-Printed Carbon Nanofiber Electrodes Modified With Gold Nanoparticles. New Trends on Sensing- Monitoring- Telediagnosis for Life Sciences NT SMT-LS 2020 Brasov, Romania, July 3-4, 2020.
- **Alexandra Virginia Mereşescu (Bounegru)**, Constantin Apetrei. Electrochemical Sensor Based On Carbon Nanofibers For Detection Of P-Coumaric Acid In Phytoproducts. International Conference Chimia 2020 "New Trends In Applied Chemistry", 2021 Constanta, Romania, May 27 – 29.
- **Alexandra Virginia Bounegru (Mereşescu)**, Constantin Apetrei, Irina-Georgiana (Bulgaru) Munteanu, Ramona-Oana (Gunache) Roşca. Development Of Biosensors For The Hydroxycinnamic Acids Analysis. Next-Chem 'Tehnologii Inovatoare Trans-Sectoriale', Ediția A II-A, România – Bucureşti 27-28 Mai 2021.
- **Alexandra Virginia Mereşescu (Bounegru)**, Constantin Apetrei. Enzyme sensors based on carbonaceous nanomaterials modified with cobalt phthalocyanine and lacasse used for p-coumaric acid detection in pharmaceuticals products. SCDS-UDJG 2021, Galați, 10th and 11th of June 2021.
- Constantin Apetrei,* **Alexandra Virginia Bounegru**, Irina Georgiana Munteanu, Irina Mirela Apetrei. Electrochemical sensors and biosensors based on polypyrrole for detection of phenolic compounds in olive oils. SCDS-UDJG 2021, Galați, 10th and 11th of June 2021.
- **Alexandra Virginia Bounegru**, Constantin Apetrei. Development of a novel voltamperometric sensor based on carbon nanofibers and cobalt phthalocyanine for the detection of p-coumaric acid. CSAC2021: 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry. 01-15.07.2021
- Constantin Apetrei,* **Alexandra Virginia Bounegru**, Irina Georgiana Munteanu, Irina Mirela Apetrei. Development of a sensitive method for the voltammetric detection of phenolic compounds in extra virgin olive oils. CSAC2021: 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry. 01-15.07.2021
- **Alexandra Virginia Bounegru**, Constantin Apetrei. Development of novel biosensor for the detection of p-coumaric acid in phenolic extracts from virgin olive oils. 31st Anniversary World Congress on Biosensors. 26-29 July 2021.

Premii obținute

- Premiul I –Sesiunea de postere 2019. Alexandra Virginia Mereșescu (Bounegru), Constantin Apetrei. Poster: "Development of Screen-Printed Sensors Based on Carbonaceous Nanomaterials". SCDS-UDJG 2019, The Seventh Edition, Galați, 13th-14th of June 2019.
- Medalie de bronz, 2019. Alexandra Virginia Mereșescu (Bounegru), Constantin Apetrei. Poster: Development of screen-printed sensors based on carbonaceous nanomaterials for the determination of caffeic acid. UGALINVENT, Research and Innovation Salon, Ediția a IV-a, 2019.
- Mențiune- Sesiunea de postere 2020. Alexandra Virginia Mereșescu (Bounegru), Constantin Apetrei. Poster: Enzyme Sensor Based on Carbon Nanofibers Modified with Gold Nanoparticle and Tyrosinase Used for Ferulic Acid Detection in Cosmetics. SCDS-UDJG 2020, Galați, 18th and 19th of June 2020.
- Premiul II pentru articolul "Voltamperometric Sensors and Biosensors Based on Carbon Nanomaterials Used for Detecting Caffeic Acid—A Review", publicat în revista International Journal of Molecular Sciences la concursul pentru PREMIEREA REZULTATELOR CERCETĂRII STUDENȚILOR DOCTORANZI DIN CADRUL IOSUD-UDJG PENTRU ANUL 2020.
- Premiul III- Sesiunea de postere 2021. Alexandra Virginia Mereșescu (Bounegru), Constantin Apetrei. Poster: Enzyme sensors based on carbonaceous nanomaterials modified with cobalt phtalocyanine and lacasse used for p-coumaric acid detection in pharmaceuticals products. SCDS-UDJG 2021, Galați, 10th and 11th of June 2021.

Bibliografie selectivă

1. Zhang, H.; Tsao, R. Dietary Polyphenols, Oxidative Stress and Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects. *Current Opinion in Food Science* **2016**, *8*, 33–42, doi:10.1016/j.cofs.2016.02.002.
2. Heleno, S.A.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. Bioactivity of Phenolic Acids: Metabolites versus Parent Compounds: A Review. *Food Chemistry* **2015**, *173*, 501–513, doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.057.
3. 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.
4. Jiang, K.; Li, L.; Long, L.; Ding, S. Comparison of Alkali Treatments for Efficient Release of P-Coumaric Acid and Enzymatic Saccharification of Sorghum Pith. *Bioresource Technology* **2016**, *207*, 1–10, doi:10.1016/j.biortech.2016.01.116.
5. Pei, K.; Ou, J.; Huang, J.; Ou, S. P-Coumaric Acid and Its Conjugates: Dietary Sources, Pharmacokinetic Properties and Biological Activities: P-Coumaric Acid and Its Conjugates. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 2952–2962, doi:10.1002/jsfa.7578.
6. Taofiq, O.; González-Paramás, A.M.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I.C.F.R. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules* **2017**, *22*, 281, doi:10.3390/molecules22020281.
7. Vinholes, J.; Silva, B.; Silva, L. Hydroxycinnamic acids (HCAS): Structure, biological properties and health effects. In; 2015 ISBN 978-1-63483-355-4.
8. Singla, R.K.; Dubey, A.K.; Garg, A.; Sharma, R.K.; Fiorino, M.; Ameen, S.M.; Haddad, M.A.; Al-Hiary, M. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **2019**, *102*, 1397–1400, doi:10.1093/jaoac/102.5.1397.
9. Weber, F.; Engelke, G.H.; Schieber, A. Structure Elucidation and Tentative Formation Pathway of a Red Colored Enzymatic Oxidation Product of Caffeic Acid. *Food Chemistry* **2019**, *297*, 124932, doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.206.
10. Kim, J.-H.; Yu, D.; Eom, S.-H.; Kim, S.-H.; Oh, J.; Jung, W.; Kim, Y.-M. Synergistic Antibacterial Effects of Chitosan-Caffeic Acid Conjugate against Antibiotic-Resistant Acne-Related Bacteria. *Marine Drugs* **2017**, *15*, 167, doi:10.3390/md15060167.
11. Matejczyk, M.; Świsłocka, R.; Golonko, A.; Lewandowski, W.; Hawrylik, E. Cytotoxic, Genotoxic and Antimicrobial Activity of Caffeic and Rosmarinic Acids and Their Lithium, Sodium and Potassium Salts as Potential Anticancer Compounds. *Advances in Medical Sciences* **2018**, *63*, 14–21, doi:10.1016/j.advms.2017.07.003.
12. Mitani, T.; Ota, K.; Inaba, N.; Kishida, K.; Koyama, H.A. Antimicrobial Activity of the Phenolic Compounds of *Prunus Mume* against Enterobacteria. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2018**, *41*, 208–212, doi:10.1248/bpb.b17-00711.
13. Wu, Z.-M.; Yu, Z.-J.; Cui, Z.-Q.; Peng, L.-Y.; Li, H.-R.; Zhang, C.-L.; Shen, H.-Q.; Yi, P.-F.; Fu, B.-D. In Vitro Antiviral Efficacy of Caffeic Acid against Canine Distemper Virus. *Microbial Pathogenesis* **2017**, *110*, 240–244, doi:10.1016/j.micpath.2017.07.006.
14. Langland, J.; Jacobs, B.; Wagner, C.E.; Ruiz, G.; Cahill, T.M. Antiviral Activity of Metal Chelates of Caffeic Acid and Similar Compounds towards Herpes Simplex, VSV-Ebola Pseudotyped and Vaccinia Viruses. *Antiviral Research* **2018**, *160*, 143–150, doi:10.1016/j.antiviral.2018.10.021.
15. Ma, Y.; Cong, W.; Huang, H.; Sun, L.; Mai, A.H.; Boonen, K.; Maryam, W.; De Borggraeve, W.; Luo, G.; Liu, Q.; et al. Identification of Fukinolic Acid from *Cimicifuga Heracleifolia* and Its Derivatives as Novel Antiviral Compounds against Enterovirus A71 Infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2019**, *53*, 128–136, doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.07.014.

16. Shen, J.; Wang, G.; Zuo, J. Caffeic Acid Inhibits HCV Replication via Induction of IFN α Antiviral Response through P62-Mediated Keap1/Nrf2 Signaling Pathway. *Antiviral Research* **2018**, *154*, 166–173, doi:10.1016/j.antiviral.2018.04.008.
17. Kfoury, M.; Geagea, C.; Ruellan, S.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S. Effect of Cyclodextrin and Cosolvent on the Solubility and Antioxidant Activity of Caffeic Acid. *Food Chemistry* **2019**, *278*, 163–169, doi:10.1016/j.foodchem.2018.11.055.
18. Shiozawa, R.; Inoue, Y.; Murata, I.; Kanamoto, I. Effect of Antioxidant Activity of Caffeic Acid with Cyclodextrins Using Ground Mixture Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, *13*, 24–33, doi:10.1016/j.ajps.2017.08.006.
19. Spagnol, C.M.; Assis, R.P.; Brunetti, I.L.; Isaac, V.L.B.; Salgado, H.R.N.; Corrêa, M.A. In Vitro Methods to Determine the Antioxidant Activity of Caffeic Acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2019**, *219*, 358–366, doi:10.1016/j.saa.2019.04.025.
20. Thongchai, K.; Chuysinuan, P.; Thanyacharoen, T.; Techasakul, S.; Ummartyotin, S. Characterization, Release, and Antioxidant Activity of Caffeic Acid-Loaded Collagen and Chitosan Hydrogel Composites. *Journal of Materials Research and Technology* **2020**, *9*, 6512–6520, doi:10.1016/j.jmrt.2020.04.036.
21. Lima, R. de; Brondani, J.C.; Dornelles, R.C.; Lhamas, C.L.; Faccin, H.; Silva, C.V.; Dalmora, S.L.; Manfron, M.P. Anti-Inflammatory Activity and Identification of the Verbena Litoralis Kunth Crude Extract Constituents. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2020**, *56*, e17419, doi:10.1590/s2175-97902019000417419.
22. Choi, H.G.; Tran, P.T.; Lee, J.-H.; Min, B.S.; Kim, J.A. Correction to: Anti-Inflammatory Activity of Caffeic Acid Derivatives Isolated from the Roots of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge. *Arch. Pharm. Res.* **2019**, *42*, 378–378, doi:10.1007/s12272-018-1090-7.
23. Kırmızıbekmez, H.; İnan, Y.; Reis, R.; Sipahi, H.; Gören, A.C.; Yeşilada, E. Phenolic Compounds from the Aerial Parts of *Clematis Viticella* L. and Their *in Vitro* Anti-Inflammatory Activities. *Natural Product Research* **2019**, *33*, 2541–2544, doi:10.1080/14786419.2018.1448815.
24. Zaitone, S.A.; Ahmed, E.; Elsherbiny, N.M.; Mehanna, E.T.; El-Kherbetawy, M.K.; ElSayed, M.H.; Alshareef, D.M.; Moustafa, Y.M. Caffeic Acid Improves Locomotor Activity and Lessens Inflammatory Burden in a Mouse Model of Rotenone-Induced Nigral Neurodegeneration: Relevance to Parkinson's Disease Therapy. *Pharmacological Reports* **2019**, *71*, 32–41, doi:10.1016/j.pharep.2018.08.004.
25. Marino, M.; Tucci, M.; Taverniti, V.; Riso, P.; Porrini, M.; Klimis-Zacas, D.; Del Bo', C. Role of Caffeic and Chlorogenic Acid in the Modulation of Cellular Fatty Acid Uptake. *Proc. Nutr. Soc.* **2020**, *79*, E486, doi:10.1017/S0029665120004346.
26. Wahedi, K.; Amooshahi, P.; Jamshidi, M.; Khazalpour, S. Electrochemical Assessment of EC and ECE Mechanisms for Caffeic Acid in the Presence of Aromatic Amines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research* **2020**, *7*, 345–353.
27. Gülçin, İ.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T.; Akıncioğlu, H.; Koksal, Z.; Turkan, F.; Alwasel, S. The Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Metabolic Enzymes Including Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Glutathione S-Transferase, Lactoperoxidase, and Carbonic Anhydrase Isoenzymes I, II, IX, and XII. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, *31*, 1095–1101, doi:10.3109/14756366.2015.1094470.
28. Coleman, J.J.; Komura, T.; Munro, J.; Wu, M.P.; Busanelli, R.R.; Koehler, A.N.; Thomas, M.; Wagner, F.F.; Holson, E.B.; Mylonakis, E. Activity of Caffeic Acid Phenethyl Ester in *Caenorhabditis Elegans*. *Future Medicinal Chemistry* **2016**, *8*, 2033–2046, doi:10.4155/fmc-2016-0085.
29. Kilani-Jaziri, S.; Mokdad-Bzeouich, I.; Krifa, M.; Nasr, N.; Ghedira, K.; Chekir-Ghedira, L. Immunomodulatory and Cellular Anti-Oxidant Activities of Caffeic, Ferulic, and *p*-Coumaric Phenolic Acids: A Structure–Activity Relationship Study. *Drug and Chemical Toxicology* **2017**, *40*, 416–424, doi:10.1080/01480545.2016.1252919.
30. Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol 46311-39631, Mazandaran, Iran.; Abdi, R. Determining Caffeic Acid in Food Samples Using a Voltammetric Sensor Amplified by Fe₃O₄ Nanoparticles and Room

- Temperature Ionic Liquid. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2020**, 2539–2548, doi:10.20964/2020.03.30.
31. Chiou, S.-Y.; Sung, J.-M.; Huang, P.-W.; Lin, S.-D. Antioxidant, Antidiabetic, and Antihypertensive Properties of *Echinacea Purpurea* Flower Extract and Caffeic Acid Derivatives Using *In Vitro* Models. *Journal of Medicinal Food* **2017**, *20*, 171–179, doi:10.1089/jmf.2016.3790.
 32. Yusuf, M.; Nasiruddin, M.; Sultana, N.; Badruddeen; Akhtar, J.; Khan, M.I.; Ahmad, M. Regulatory Mechanism of Caffeic Acid on Glucose Metabolism in Diabetes. *Rese. Jour. of Pharm. and Technol.* **2019**, *12*, 4735, doi:10.5958/0974-360X.2019.00816.3.
 33. Agunloye, O.M.; Oboh, G.; Ademiluyi, A.O.; Ademosun, A.O.; Akindahunsi, A.A.; Oyagbemi, A.A.; Omobowale, T.O.; Ajibade, T.O.; Adedapo, A.A. Cardio-Protective and Antioxidant Properties of Caffeic Acid and Chlorogenic Acid: Mechanistic Role of Angiotensin Converting Enzyme, Cholinesterase and Arginase Activities in Cyclosporine Induced Hypertensive Rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019**, *109*, 450–458, doi:10.1016/j.biopha.2018.10.044.
 34. Salau, V.F.; Erukainure, O.L.; Islam, Md.S. Caffeic Acid Protects against Iron-Induced Cardiotoxicity by Suppressing Angiotensin-Converting Enzyme Activity and Modulating Lipid Spectrum, Gluconeogenesis and Nucleotide Hydrolyzing Enzyme Activities. *Biol Trace Elem Res* **2020**, doi:10.1007/s12011-020-02227-3.
 35. Pelinson, L.P.; Assmann, C.E.; Palma, T.V.; da Cruz, I.B.M.; Pillat, M.M.; Mânica, A.; Stefanello, N.; Weis, G.C.C.; de Oliveira Alves, A.; de Andrade, C.M.; et al. Antiproliferative and Apoptotic Effects of Caffeic Acid on SK-Mel-28 Human Melanoma Cancer Cells. *Mol Biol Rep* **2019**, *46*, 2085–2092, doi:10.1007/s11033-019-04658-1.
 36. Saleem, M.; Ali, H.A.; Akhtar, M.F.; Saleem, U.; Saleem, A.; Irshad, I. Chemical Characterisation and Hepatoprotective Potential of *Cosmos Sulphureus* Cav. and *Cosmos Bipinnatus* Cav. *Natural Product Research* **2019**, *33*, 897–900, doi:10.1080/14786419.2017.1413557.
 37. Abdelhafez, O.H.; Fawzy, M.A.; Fahim, J.R.; Desoukey, S.Y.; Krischke, M.; Mueller, M.J.; Abdelmohsen, U.R. Hepatoprotective Potential of *Malvaviscus Arboreus* against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Rats. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0202362, doi:10.1371/journal.pone.0202362.
 38. Martini, S.; Conte, A.; Tagliazucchi, D. Antiproliferative Activity and Cell Metabolism of Hydroxycinnamic Acids in Human Colon Adenocarcinoma Cell Lines. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3919–3931, doi:10.1021/acs.jafc.9b00522.
 39. Chen, H.; Guan, Y.; Baek, S.J.; Zhong, Q. Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded in Microemulsions: Enhanced *In Vitro* Activity against Colon and Breast Cancer Cells and Possible Cellular Mechanisms. *Food Biophysics* **2019**, *14*, 80–89, doi:10.1007/s11483-018-9559-y.
 40. Espíndola, K.M.M.; Ferreira, R.G.; Narvaez, L.E.M.; Silva Rosario, A.C.R.; da Silva, A.H.M.; Silva, A.G.B.; Vieira, A.P.O.; Monteiro, M.C. Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 541, doi:10.3389/fonc.2019.00541.
 41. Zeng, N.; Hongbo, T.; Xu, Y.; Wu, M.; Wu, Y. Anticancer Activity of Caffeic Acid N-butyl Ester against A431 Skin Carcinoma Cell Line Occurs via Induction of Apoptosis and Inhibition of the MTOR/PI3K/AKT Signaling Pathway. *Mol Med Report* **2018**, doi:10.3892/mmr.2018.8599.
 42. de Oliveira Silva, E.; Batista, R. Ferulic Acid and Naturally Occurring Compounds Bearing a Feruloyl Moiety: A Review on Their Structures, Occurrence, and Potential Health Benefits: FA and Natural Ferulated Compounds.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2017**, *16*, 580–616, doi:10.1111/1541-4337.12266.
 43. Boz, H. P-Coumaric Acid in Cereals: Presence, Antioxidant and Antimicrobial Effects. *International Journal of Food Science & Technology* **2015**, *50*, 2323–2328, doi:https://doi.org/10.1111/ijfs.12898.
 44. Kaneko, T.; Thi, T.H.; Shi, D.J.; Akashi, M. Environmentally Degradable, High-Performance Thermoplastics from Phenolic Phytomonomers. *Nature Mater* **2006**, *5*, 966–970, doi:10.1038/nmat1778.

45. Navaneethan, D.; Rasool, M. *P*-Coumaric Acid, a Common Dietary Polyphenol, Protects Cadmium Chloride-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Renal Failure* **2014**, *36*, 244–251, doi:10.3109/0886022X.2013.835268.
46. Scheepens, A.; Bisson, J.-F.; Skinner, M. *P*-Coumaric Acid Activates the GABA-A Receptor *In Vitro* and Is Orally Anxiolytic *In Vivo*: *P*-COUMARIC ACID IS GABAERGIC AND ANXIOLYTIC IN RODENTS. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 207–211, doi:10.1002/ptr.4968.
47. Sakamula, R.; Thong-asa, W. Neuroprotective Effect of *P*-Coumaric Acid in Mice with Cerebral Ischemia Reperfusion Injuries. *Metab Brain Dis* **2018**, *33*, 765–773, doi:10.1007/s11011-018-0185-7.
48. Yoon, H.S.; Lee, N.-H.; Hyun, C.-G.; Shin, D.-B. Differential Effects of Methoxylated *P*-Coumaric Acids on Melanoma in B16/F10 Cells. *JFN* **2015**, *20*, 73–77, doi:10.3746/pnf.2015.20.1.73.
49. Hoyos-Arbeláez, J.; Vázquez, M.; Contreras-Calderón, J. Electrochemical Methods as a Tool for Determining the Antioxidant Capacity of Food and Beverages: A Review. *Food Chemistry* **2017**, *221*, 1371–1381, doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.017.
50. Elgrishi, N.; Rountree, K.J.; McCarthy, B.D.; Rountree, E.S.; Eisenhart, T.T.; Dempsey, J.L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **2018**, *95*, 197–206, doi:10.1021/acs.jchemed.7b00361.
51. Xu, G.; Jarjes, Z.A.; Desprez, V.; Kilmartin, P.A.; Travas-Sejdic, J. Sensitive, Selective, Disposable Electrochemical Dopamine Sensor Based on PEDOT-Modified Laser Scribed Graphene. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *107*, 184–191, doi:10.1016/j.bios.2018.02.031.
52. Beluomini, M.A.; da Silva, J.L.; de Sá, A.C.; Buffon, E.; Pereira, T.C.; Stradiotto, N.R. Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymer on Nanostructured Carbon Materials: A Review. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2019**, *840*, 343–366, doi:10.1016/j.jelechem.2019.04.005.
53. Purushothama, H.T.; Nayaka, Y.A.; Vinay, M.M.; Manjunatha, P.; Yathisha, R.O.; Basavarajappa, K.V. Pencil Graphite Electrode as an Electrochemical Sensor for the Voltammetric Determination of Chlorpromazine. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* **2018**, *3*, 161–166, doi:10.1016/j.jsamd.2018.03.007.
54. Fu, L.; Wang, A.; Lai, G.; Lin, C.-T.; Yu, J.; Yu, A.; Liu, Z.; Xie, K.; Su, W. Correction to: A Glassy Carbon Electrode Modified with N-Doped Carbon Dots for Improved Detection of Hydrogen Peroxide and Paracetamol. *Microchim Acta* **2019**, *186*, 413, doi:10.1007/s00604-019-3568-5.
55. Asadian, E.; Ghalkhani, M.; Shahrokhian, S. Electrochemical Sensing Based on Carbon Nanoparticles: A Review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2019**, *293*, 183–209, doi:10.1016/j.snb.2019.04.075.
56. Szot-Karpińska, K.; Leśniewski, A.; Jönsson-Niedziółka, M.; Marken, F.; Niedziółka-Jönsson, J. Electrodes Modified with Bacteriophages and Carbon Nanofibres for Cysteine Detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2019**, *287*, 78–85, doi:10.1016/j.snb.2019.01.148.
57. Xiao, L.; Xu, R.; Wang, F. Facile Synthesis of CoxP Decorated Porous Carbon Microspheres for Ultrasensitive Detection of 4-Nitrophenol. *Talanta* **2018**, *179*, 448–455, doi:10.1016/j.talanta.2017.11.046.
58. Bezzon, V.D.N.; Montanheiro, T.L.A.; de Menezes, B.R.C.; Ribas, R.G.; Righetti, V.A.N.; Rodrigues, K.F.; Thim, G.P. Carbon Nanostructure-Based Sensors: A Brief Review on Recent Advances. *Advances in Materials Science and Engineering* **2019**, *2019*, 1–21, doi:10.1155/2019/4293073.
59. Baig, N.; Sajid, M.; Saleh, T.A. Recent Trends in Nanomaterial-Modified Electrodes for Electroanalytical Applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *111*, 47–61, doi:10.1016/j.trac.2018.11.044.
60. Avouris, P.; Dimitrakopoulos, C. Graphene: Synthesis and Applications. *Materials Today* **2012**, *15*, 86–97, doi:10.1016/S1369-7021(12)70044-5.
61. Skákalová, V.; Kotrusz, P.; Jergel, M.; Susi, T.; Mittelberger, A.; Vretenár, V.; Šiffalovič, P.; Kotakoski, J.; Meyer, J.C.; Hulman, M. Chemical Oxidation of Graphite: Evolution of the

- Structure and Properties. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 929–935, doi:10.1021/acs.jpcc.7b10912.
62. Chen, K.; Shi, L.; Zhang, Y.; Liu, Z. Scalable Chemical-Vapour-Deposition Growth of Three-Dimensional Graphene Materials towards Energy-Related Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 3018–3036, doi:10.1039/C7CS00852J.
63. Yu, X.; Zhang, W.; Zhang, P.; Su, Z. Fabrication Technologies and Sensing Applications of Graphene-Based Composite Films: Advances and Challenges. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *89*, 72–84, doi:10.1016/j.bios.2016.01.081.
64. Mortazavi, B.; Madjet, M.E.; Shahrokhi, M.; Ahzi, S.; Zhuang, X.; Rabczuk, T. Nanoporous Graphene: A 2D Semiconductor with Anisotropic Mechanical, Optical and Thermal Conduction Properties. *Carbon* **2019**, *147*, 377–384, doi:10.1016/j.carbon.2019.03.018.
65. Liu, B.; Zhou, K. Recent Progress on Graphene-Analogous 2D Nanomaterials: Properties, Modeling and Applications. *Progress in Materials Science* **2019**, *100*, 99–169, doi:10.1016/j.pmatsci.2018.09.004.
66. Sutradhar, S.; Patnaik, A. A New Fullerene-C60 – Nanogold Composite for Non-Enzymatic Glucose Sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *241*, 681–689, doi:10.1016/j.snb.2016.10.111.
67. Karousis, N.; Suarez-Martinez, I.; Ewels, C.P.; Tagmatarchis, N. Structure, Properties, Functionalization, and Applications of Carbon Nanohorns. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 4850–4883, doi:10.1021/acs.chemrev.5b00611.
68. Cabello, C.; Rincón, S.; Bartolo, P.; Ruiz-Espinoza, J.; Zepeda, A. Incorporation of Organic Groups on the Surface of Multi-Walled Carbon Nanotubes Using an Ultrasonic Tip. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* **2018**, *26*, 502–509, doi:10.1080/1536383X.2018.1453500.
69. Kim, H.; Wang, M.; Lee, S.K.; Kang, J.; Nam, J.-D.; Ci, L.; Suhr, J. Tensile Properties of Millimeter-Long Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Sci Rep* **2017**, *7*, 9512, doi:10.1038/s41598-017-10279-0.
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. Mintz, K.J.; Zhou, Y.; Leblanc, R.M. Recent Development of Carbon Quantum Dots Regarding Their Optical Properties, Photoluminescence Mechanism, and Core Structure. *Nanoscale* **2019**, *11*, 4634–4652, doi:10.1039/C8NR10059D.
72. Zhao, D.L.; Chung, T.-S. Applications of Carbon Quantum Dots (CQDs) in Membrane Technologies: A Review. *Water Research* **2018**, *147*, 43–49, doi:10.1016/j.watres.2018.09.040.
73. Haque, E.; Kim, J.; Malgras, V.; Reddy, K.R.; Ward, A.C.; You, J.; Bando, Y.; Hossain, Md.S.A.; Yamauchi, Y. Recent Advances in Graphene Quantum Dots: Synthesis, Properties, and Applications. *Small Methods* **2018**, *2*, 1800050, doi:10.1002/smt.201800050.
74. Chen, F.; Gao, W.; Qiu, X.; Zhang, H.; Liu, L.; Liao, P.; Fu, W.; Luo, Y. Graphene Quantum Dots in Biomedical Applications: Recent Advances and Future Challenges. *Frontiers in Laboratory Medicine* **2017**, *1*, 192–199, doi:10.1016/j.flm.2017.12.006.
75. Namdari, P.; Negahdari, B.; Eatemadi, A. Synthesis, Properties and Biomedical Applications of Carbon-Based Quantum Dots: An Updated Review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *87*, 209–222, doi:10.1016/j.biopha.2016.12.108.
76. Wang, L.; Wang, Y.; Xu, T.; Liao, H.; Yao, C.; Liu, Y.; Li, Z.; Chen, Z.; Pan, D.; Sun, L.; et al. Gram-Scale Synthesis of Single-Crystalline Graphene Quantum Dots with Superior Optical Properties. *Nat Commun* **2014**, *5*, 5357, doi:10.1038/ncomms6357.
77. Baker, R.T.K. Carbon Nanofibers. In *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*; Elsevier, 2001; pp. 932–941 ISBN 978-0-08-043152-9.
78. Luo, Y.; Nartker, S.; Wiederoder, M.; Miller, H.; Hochhalter, D.; Drzal, L.T.; Alcilija, E.C. Novel Biosensor Based on Electrospun Nanofiber and Magnetic Nanoparticles for the Detection of E. Coli O157:H7. *IEEE Transactions on Nanotechnology* **2012**, *11*, 676–681, doi:10.1109/TNANO.2011.2174801.

79. *Electrospinning for High Performance Sensors*; Macagnano, A., Zampetti, E., Kny, E., Eds.; 2015 edition.; Springer, 2015; ISBN 978-3-319-14405-4.
80. Sadir, S.; Prabhakaran, M.P.; Wicaksono, D.H.B.; Ramakrishna, S. Fiber Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for C-Reactive Protein. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *205*, 50–60, doi:10.1016/j.snb.2014.08.051.
81. Mondal, K.; Ali, Md.A.; Agrawal, V.V.; Malhotra, B.D.; Sharma, A. Highly Sensitive Biofunctionalized Mesoporous Electrospun TiO₂ Nanofiber Based Interface for Biosensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 2516–2527, doi:10.1021/am404931f.
82. Rezaei, B.; Ghani, M.; Shoushtari, A.M.; Rabiee, M. Electrochemical Biosensors Based on Nanofibres for Cardiac Biomarker Detection: A Comprehensive Review. *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, *78*, 513–523, doi:10.1016/j.bios.2015.11.083.
83. Sanati, A.; Jalali, M.; Raeissi, K.; Karimzadeh, F.; Kharaziha, M.; Mahshid, S.S.; Mahshid, S. A Review on Recent Advancements in Electrochemical Biosensing Using Carbonaceous Nanomaterials. *Microchim Acta* **2019**, *186*, 773, doi:10.1007/s00604-019-3854-2.
84. Labib, M.; Sargent, E.H.; Kelley, S.O. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 9001–9090, doi:10.1021/acs.chemrev.6b00220.
85. Kour, R.; Arya, S.; Young, S.-J.; Gupta, V.; Bandhoria, P.; Khosla, A. Review—Recent Advances in Carbon Nanomaterials as Electrochemical Biosensors. *J. Electrochem. Soc.* **2020**, *167*, 037555, doi:10.1149/1945-7111/ab6bc4.
86. Leca-Bouvier, B.D.; Blum, L.J. Enzyme for Biosensing Applications. In *Recognition Receptors in Biosensors*; Zourob, M., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2010; pp. 177–220 ISBN 978-1-4419-0918-3.
87. Alonso-Lomillo, M.A.; Domínguez-Renedo, O.; Matos, P.; Arcos-Martínez, M.J. Electrochemical Determination of Levetiracetam by Screen-Printed Based Biosensors. *Bioelectrochemistry* **2009**, *74*, 306–309, doi:10.1016/j.bioelechem.2008.11.003.
88. Cosnier, S.; Fombon, J.-J.; Labbé, P.; Limosin, D. Development of a PPO-Poly(Amphiphilic Pyrrole) Electrode for on Site Monitoring of Phenol in Aqueous Effluents. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1999**, *59*, 134–139, doi:10.1016/S0925-4005(99)00210-5.
89. Kim, M.A.; Lee, W.-Y. Amperometric Phenol Biosensor Based on Sol–Gel Silicate/Nafion Composite Film. *Analytica Chimica Acta* **2003**, *479*, 143–150, doi:10.1016/S0003-2670(02)01538-6.
90. Pedano, M. Amperometric Biosensor for the Quantification of Gentisic Acid Using Polyphenol Oxidase Modified Carbon Paste Electrode. *Talanta* **2000**, *53*, 489–495, doi:10.1016/S0039-9140(00)00515-4.
91. Tanimoto de Albuquerque, Y.D.; Ferreira, L.F. Amperometric Biosensing of Carbamate and Organophosphate Pesticides Utilizing Screen-Printed Tyrosinase-Modified Electrodes. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *596*, 210–221, doi:10.1016/j.aca.2007.06.013.
92. Mousty, C.; Lepellec, A.; Cosnier, S.; Novoa, A.; Marks, R.S. Fabrication of Organic Phase Biosensors Based on Multilayered Polyphenol Oxidase Protected by an Alginate Coating. *Electrochemistry Communications* **2001**, *3*, 727–732, doi:10.1016/S1388-2481(01)00252-1.
93. Andreescu, S.; Barthelmebs, L.; Marty, J.-L. Immobilization of Acetylcholinesterase on Screen-Printed Electrodes: Comparative Study between Three Immobilization Methods and Applications to the Detection of Organophosphorus Insecticides. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *464*, 171–180, doi:10.1016/S0003-2670(02)00518-4.
94. Robles, A.; Fabjanowicz, M.; Chmiel, T.; Płotka-Wasyłka, J. Determination and Identification of Organic Acids in Wine Samples. Problems and Challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *120*, 115630, doi:10.1016/j.trac.2019.115630.
95. APLICATII ALE TIROZINAZEI SI LACAZEI: BIOSENZORI ENZIMATICI ELECTROCHIMICI/APPLICATION OF TYROSINASE AND LACCASE: ENZYMATIC AND ELECTOCHEMICAL BIOSENSOR - ProQuest Available online: <https://search.proquest.com/openview/a3dde895406fc86b8b510f8e4c2d999f/1?pq-origsite=gscholar&cbl=946335> (accessed on 10 November 2019).

96. Inroga, F.A.; Rocha, M.O.; Lavayen, V.; Arguello, J. Development of a Tyrosinase-Based Biosensor for Bisphenol A Detection Using Gold Leaf-like Microstructures. *Journal of Solid State Electrochemistry* **2019**, *23*, 1659–1666.
97. da Silva, W.; Ghica, M.E.; Ajayi, R.F.; Iwuoha, E.I.; Brett, C.M. Tyrosinase Based Amperometric Biosensor for Determination of Tyramine in Fermented Food and Beverages with Gold Nanoparticle Doped Poly (8-Anilino-1-Naphthalene Sulphonic Acid) Modified Electrode. *Food chemistry* **2019**, *282*, 18–26.
98. Apetrei, I.; Apetrei, C. Development of a Novel Biosensor Based on Tyrosinase/Platinum Nanoparticles/Chitosan/Graphene Nanostructured Layer with Applicability in Bioanalysis. *Materials* **2019**, *12*, 1009, doi:10.3390/ma12071009.
99. Arduini, F.; Cinti, S.; Caratelli, V.; Amendola, L.; Palleschi, G.; Moscone, D. Origami Multiple Paper-Based Electrochemical Biosensors for Pesticide Detection. *Biosensors and Bioelectronics* **2019**, *126*, 346–354, doi:10.1016/j.bios.2018.10.014.
100. Brugnerotto, P.; Silva, T.R.; Brondani, D.; Zapp, E.; Vieira, I.C. Gold Nanoparticles Stabilized in β -Cyclodextrin and Decorated with Laccase Applied in the Construction of a Biosensor for Rutin. *Electroanalysis* **2017**, *29*, 1031–1037, doi:10.1002/elan.201600697.
101. Li, G.; Sun, K.; Li, D.; Lv, P.; Wang, Q.; Huang, F.; Wei, Q. Biosensor Based on Bacterial Cellulose-Au Nanoparticles Electrode Modified with Laccase for Hydroquinone Detection. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2016**, *509*, 408–414, doi:10.1016/j.colsurfa.2016.09.028.
102. Litescu, S.C.; Eremia, S.A.V.; Bertoli, A.; Pistelli, L.; Radu, G.-L. Laccase-Nafion Based Biosensor for the Determination of Polyphenolic Secondary Metabolites. *Analytical Letters* **2010**, *43*, 1089–1099, doi:10.1080/00032710903518518.
103. Raymundo-Pereira, P.A.; Silva, T.A.; Caetano, F.R.; Ribovski, L.; Zapp, E.; Brondani, D.; Bergamini, M.F.; Marcolino, L.H.; Banks, C.E.; Oliveira, O.N.; et al. Polyphenol Oxidase-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Analytica Chimica Acta* **2020**, *1139*, 198–221, doi:10.1016/j.aca.2020.07.055.
104. Cârâc, G.; Ștefan, C.S. *Electrochimie: Principii Fundamentale Și Aplicații*; Galați University Press, 2012;
105. Ekabutr, P.; Chailapakul, O.; Supaphol, P. Modification of Disposable Screen-Printed Carbon Electrode Surfaces with Conductive Electrospun Nanofibers for Biosensor Applications. *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, *130*, 3885–3893, doi:10.1002/app.39651.
106. Sakthivel, M.; Ramaraj, S.; Chen, S.-M.; Dinesh, B.; Ramasamy, H.V.; Lee, Y.S. Entrapment of Bimetallic CoFeSe₂ Nanosphere on Functionalized Carbon Nanofiber for Selective and Sensitive Electrochemical Detection of Caffeic Acid in Wine Samples. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1006*, 22–32, doi:10.1016/j.aca.2017.12.044.
107. Apetrei, C.; Apetrei, I.M.; De Saja, J.A.; Rodriguez-Mendez, M.L. Carbon Paste Electrodes Made from Different Carbonaceous Materials: Application in the Study of Antioxidants. *Sensors (Basel)* **2011**, *11*, 1328–1344, doi:10.3390/s110201328.
108. Giacomelli, C.; Ckless, K.; Galato, D.; Miranda, F.S.; Spinelli, A. Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with PH 2.0 to 8.5. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 332–338, doi:10.1590/S0103-50532002000300007.
109. Trabelsi, S.; Tahar, N.; Abdelhedi, R. Electrochemical Behavior of Caffeic Acid. *Electrochimica Acta* **2004**, *49*, 1647–1654, doi:10.1016/S0013-4686(03)00995-2.
110. Zare, H.R.; Golabi, S.M. Caffeic Acid Modified Glassy Carbon Electrode for Electrocatalytic Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). *J Solid State Electrochem* **2000**, *4*, 87–94, doi:10.1007/s100080050006.
111. Li, J.; Jiang, J.; Liu, M.; Xu, Z.; Deng, P.; Qian, D.; Tong, C.; Xie, H.; Yang, C. Facile Synthesis of MnO₂-Embedded Flower-like Hierarchical Porous Carbon Microspheres as an Enhanced Electrocatalyst for Sensitive Detection of Caffeic Acid. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *985*, 155–165, doi:10.1016/j.aca.2017.07.002.
112. Sakthivel, M.; Ramaraj, S.; Chen, S.-M.; Dinesh, B.; Ramasamy, H.V.; Lee, Y.S. Entrapment of Bimetallic CoFeSe₂ Nanosphere on Functionalized Carbon Nanofiber for Selective and Sensitive Electrochemical Detection of Caffeic Acid in Wine Samples. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1006*, 22–32, doi:10.1016/j.aca.2017.12.044.

113. González, M.; Guzmán, B.; Rudyk, R.; Romano, E.; Molina, M.A.A. Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds in Propolis. *acta farmacéutica bonaerense* **2003**, *22*, 6.
114. Apetrei, I.M.; Apetrei, C. Study of Different Carbonaceous Materials as Modifiers of Screen-Printed Electrodes for Detection of Catecholamines. *IEEE Sensors J.* **2015**, *15*, 3094–3101, doi:10.1109/JSEN.2014.2335534.
115. 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.
116. Thakurathi, M.; Gurung, E.; Cetin, M.M.; Thalangamaarachchige, V.D.; Mayer, M.F.; Korzeniewski, C.; Quitevis, E.L. The Stokes-Einstein Equation and the Diffusion of Ferrocene in Imidazolium-Based Ionic Liquids Studied by Cyclic Voltammetry: Effects of Cation Ion Symmetry and Alkyl Chain Length. *Electrochimica Acta* **2018**, *259*, 245–252, doi:10.1016/j.electacta.2017.10.149.
117. Tomac, I.; Šeruga, M. Electrochemical Properties of Chlorogenic Acids and Determination of Their Content in Coffee Using Differential Pulse Voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science* **2016**, *11*, 2854–2876.
118. Centeno, D.A.; Solano, X.H.; Castillo, J.J. A New Peroxidase from Leaves of Guinea Grass (*Panicum Maximum*): A Potential Biocatalyst to Build Amperometric Biosensors. *Bioelectrochemistry* **2017**, *116*, 33–38, doi:10.1016/j.bioelechem.2017.03.005.
119. Apetrei, I.; Apetrei, C. Amperometric Biosensor Based on Diamine Oxidase/Platinum Nanoparticles/Graphene/Chitosan Modified Screen-Printed Carbon Electrode for Histamine Detection. *Sensors* **2016**, *16*, 422, doi:10.3390/s16040422.
120. Apetrei, R.-M.; Cârâc, G.; Bahrim, G.; Camurlu, P. Sensitivity Enhancement for Microbial Biosensors through Cell Self-Coating with Polypyrrole. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2019**, *68*, 1058–1067, doi:10.1080/00914037.2018.1525548.
121. Quinn, E.A.; Malkin, S.H.; Rowley, A.F.; Coates, C.J. Laccase and Catecholoxidase Activities Contribute to Innate Immunity in Slipper Limpets, *Crepidula Fornicata*. *Developmental & Comparative Immunology* **2020**, *110*, 103724, doi:10.1016/j.dci.2020.103724.
122. Vilian, A.T.E.; Chen, S.-M. Preparation of Carbon Nanotubes Decorated with Manganese Dioxide Nanoparticles for Electrochemical Determination of Ferulic Acid. *Microchim Acta* **2015**, *182*, 1103–1111, doi:10.1007/s00604-014-1431-2.
123. Erady, V.; Mascarenhas, R.J.; Satpati, A.K.; Detriche, S.; Mekhalif, Z.; Dalhalle, J.; Dhason, A. Sensitive Detection of Ferulic Acid Using Multi-Walled Carbon Nanotube Decorated with Silver Nano-Particles Modified Carbon Paste Electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2017**, *806*, 22–31, doi:10.1016/j.jelechem.2017.10.045.
124. Liang, C.P.; Chang, C.H.; Liang, C.C.; Hung, K.Y.; Hsieh, C.W. In Vitro Antioxidant Activities, Free Radical Scavenging Capacity, and Tyrosinase Inhibitory of Flavonoid Compounds and Ferulic Acid from *Spiranthes Sinensis* (Pers.) Ames. *Molecules* **2014**, *19*, 4681–4694, doi:10.3390/molecules19044681.
125. da Silva, L.V.; Lopes, C.B.; da Silva, W.C.; de Paiva, Y.G.; Silva, F. de A. dos S.; Lima, P.R.; Kubota, L.T.; Goulart, M.O.F. Electropolymerization of Ferulic Acid on Multi-Walled Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode as a Versatile Platform for NADH, Dopamine and Epinephrine Separate Detection. *Microchemical Journal* **2017**, *133*, 460–467, doi:10.1016/j.microc.2017.04.014.
126. Zhao, Y.; Li, W.; Pan, L.; Zhai, D.; Wang, Y.; Li, L.; Cheng, W.; Yin, W.; Wang, X.; Xu, J.-B.; et al. ZnO-Nanorods/Graphene Heterostructure: A Direct Electron Transfer Glucose Biosensor. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 32327, doi:10.1038/srep32327.
127. Wang, L.; Wang, Y.; Zhuang, Q. Simple Self-Referenced Ratiometric Electrochemical Sensor for Dopamine Detection Using Electrochemically Pretreated Glassy Carbon Electrode Modified by Acid-Treated Multiwalled Carbon Nanotube. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2019**, *851*, 113446, doi:10.1016/j.jelechem.2019.113446.

128. 2-Propenoic Acid, 3-(4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl)- Available online: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C1135246&Type=IR-SPEC&Index=2> (accessed on 19 October 2020).
129. Trabelsi, S.K.; Tahar, N.B.; Trabelsi, B.; Abdelhedi, R. Electrochemical Oxidation of Ferulic Acid in Aqueous Solutions at Gold Oxide and Lead Dioxide Electrodes. *J Appl Electrochem* **2005**, *35*, 967–973, doi:10.1007/s10800-005-6723-0.
130. Pandian, K.; Mohana Soundari, D.; Rudra Showdri, P.; Kalaiyarasi, J.; Gopinath, S.C.B. Voltammetric Determination of Caffeic Acid by Using a Glassy Carbon Electrode Modified with a Chitosan-Protected Nanohybrid Composed of Carbon Black and Reduced Graphene Oxide. *Microchim Acta* **2019**, *186*, 54, doi:10.1007/s00604-018-3117-7.
131. Ebrahimi, P.; Shahidi, S.-A.; Bijad, M. A Rapid Voltammetric Strategy for Determination of Ferulic Acid Using Electrochemical Nanostructure Tool in Food Samples. *Food Measure* **2020**, *14*, 3389–3396, doi:10.1007/s11694-020-00585-z.
132. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Biomedical Functional Materials, Jiangsu Key Laboratory of New Power Batteries, College of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China and Changzhou Innovation & Development Institute of Nanjing Normal University, Changzhou 2130000, China; Jing, L. Simultaneous Quantitation of Caffeic Acid and Ferulic Acid Based on Graphite-like C₃N₄/Chitosan Modified Film. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2017**, 8504–8515, doi:10.20964/2017.09.48.
133. Zhang, Y.; Liu, Y.; Yang, Z.; Yang, Y.; Pang, P.; Gao, Y.; Hu, Q. Rapid Electrochemical Detection of Ferulic Acid Based on a Graphene Modified Glass Carbon Electrode. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 3834, doi:10.1039/c3ay40084k.
134. Gay Martín, M.; de Saja, J.A.; Muñoz, R.; Rodríguez-Méndez, M.L. Multisensor System Based on Bisphthalocyanine Nanowires for the Detection of Antioxidants. *Electrochimica Acta* **2012**, *68*, 88–94, doi:10.1016/j.electacta.2012.02.042.
135. GHINJUL, A. Studiul Capacității Antioxidante Și Conținutul Total de Polifenoli Din Mentha Piperita. **2018**.
136. Perna, V.; Baum, A.; Ernst, H.A.; Agger, J.W.; Meyer, A.S. Laccase Activity Measurement by FTIR Spectral Fingerprinting. *Enzyme and Microbial Technology* **2019**, *122*, 64–73, doi:10.1016/j.enzmictec.2018.12.009.
137. Apetrei, I.M.; Rodriguez-Mendez, M.L.; Apetrei, C.; de Saja, J.A. Enzyme Sensor Based on Carbon Nanotubes/Cobalt(II) Phthalocyanine and Tyrosinase Used in Pharmaceutical Analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *177*, 138–144, doi:10.1016/j.snb.2012.10.131.
138. Nazari, M.; Kashanian, S.; Rafipour, R. Laccase Immobilization on the Electrode Surface to Design a Biosensor for the Detection of Phenolic Compound Such as Catechol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *145*, 130–138, doi:10.1016/j.saa.2015.01.126.
139. Ribeiro, F.W.P.; Barroso, M.F.; Morais, S.; Viswanathan, S.; de Lima-Neto, P.; Correia, A.N.; Oliveira, M.B.P.P.; Delerue-Matos, C. Simple Laccase-Based Biosensor for Formetanate Hydrochloride Quantification in Fruits. *Bioelectrochemistry* **2014**, *95*, 7–14, doi:10.1016/j.bioelechem.2013.09.005.
140. Cadorin Fernandes, S.; Cruz Vieira, I.; Barbosa, A.M.J.; Souza Ferreira, V. Methomyl Detection by Inhibition of Laccase Using a Carbon Ceramic Biosensor. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 1623–1630, doi:https://doi.org/10.1002/elan.201100044.
141. Zapp, E.; Brondani, D.; Vieira, I.C.; Scheeren, C.W.; Dupont, J.; Barbosa, A.M.J.; Ferreira, V.S. Biomonitoring of Methomyl Pesticide by Laccase Inhibition on Sensor Containing Platinum Nanoparticles in Ionic Liquid Phase Supported in Montmorillonite. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *155*, 331–339, doi:10.1016/j.snb.2011.04.015.
142. Ziyatdinova, G.; Aytuganova, I.; Nizamova, A.; Budnikov, H. Differential Pulse Voltammetric Assay of Coffee Antioxidant Capacity with MWNT-Modified Electrode. *Food Anal. Methods* **2013**, *6*, 1629–1638, doi:10.1007/s12161-013-9591-y.
143. Janeiro, P.; Novak, I.; Seruga, M.; Maria Oliveira-Brett, A. Electroanalytical Oxidation of *p*-Coumaric Acid. *Analytical Letters* **2007**, *40*, 3309–3321, doi:10.1080/00032710701672822.

144. Sousa, W.R.; da Rocha, C.; Cardoso, C.L.; Silva, D.H.S.; Zanoni, M.V.B. Determination of the Relative Contribution of Phenolic Antioxidants in Orange Juice by Voltammetric Methods. *Journal of Food Composition and Analysis* **2004**, *17*, 619–633.
145. Sarkar, A.; Gopal Khan, G. Synthesis of BiFeO₃ Nanoparticle Anchored TiO₂-BiFeO₃ Nano-Heterostructure and Exploring Its Different Electrochemical Aspects as Electrode. *Materials Today: Proceedings* **2018**, *5*, 10177–10184, doi:10.1016/j.matpr.2017.11.016.
146. Dinu, A.; Apetrei, C. Voltammetric Determination of Phenylalanine Using Chemically Modified Screen-Printed Based Sensors. *Chemosensors* **2020**, *8*, 113, doi:10.3390/chemosensors8040113.
147. Sánchez-Calvo, A.; Costa-García, A.; Blanco-López, M.C. Paper-Based Electrodes Modified with Cobalt Phthalocyanine Colloid for the Determination of Hydrogen Peroxide and Glucose. *Analyst* **2020**, *145*, 2716–2724, doi:10.1039/C9AN02413A.
148. Zheng, L.; Song, J. Curcumin Multi-Wall Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode and Its Electrocatalytic Activity towards Oxidation of Hydrazine. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *135*, 650–655, doi:10.1016/j.snb.2008.09.035.
149. Aguilar-Hernández, I.; Afseth, N.K.; López-Luke, T.; Contreras-Torres, F.F.; Wold, J.P.; Ornelas-Soto, N. Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Phenolic Antioxidants: A Systematic Evaluation of Ferulic Acid, p-Coumaric Acid, Caffeic Acid and Sinapic Acid. *Vibrational Spectroscopy* **2017**, *89*, 113–122, doi:10.1016/j.vibspec.2017.02.002.