



UNIUNEA EUROPEANĂ



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

Axa prioritară 6 - Educație și competențe

Obiectiv specific 6.13 - Creșterea numărului absolvenților de învățământ terțiar universitar și nonuniversitar care își găsesc un loc de muncă urmare a accesului la activități de învățare la un potențial loc de muncă/cercetare/innovare, cu accent pe sectoarele economice cu potențial competitiv, identificate conform SNC, și domeniile de specializare inteligentă, conform SNCDI

Titlul proiectului: Excelența academică și valori antreprenoriale - sistem de burse pentru asigurarea oportunităților de formare și dezvoltare a competențelor antreprenoriale ale doctoranzilor și postdoctoranzilor – ANTREPRENORDOC

Contract nr. 36355/23.05.2019 POCU/380/6/13 - Cod SMIS: 123847

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

APLICAȚII ALE ELECTROZILOR MODIFICAȚI CHIMIC ȘI BIOCHIMIC ÎN ANALIZA AMINOACIZILOR DIN PRODUSE FARMACEUTICE

Doctorand,

Ancuța DINU (IACOB)

Conducător științific,

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

Seria C: Chimie Nr. 4

GALAȚI

2022



UNIUNEA EUROPEANĂ



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

Axa prioritară 6 - Educație și competențe

Obiectiv specific 6.13 - Creșterea numărului absolvenților de învățământ terțiar universitar și nonuniversitar care își găsesc un loc de muncă urmare a accesului la activități de învățare la un potențial loc de muncă/cercetare/inovare, cu accent pe sectoarele economice cu potențial competitiv, identificate conform SNC, și domeniile de specializare inteligentă, conform SNCDI

Titlul proiectului: Excelența academică și valori antreprenoriale - sistem de burse pentru asigurarea oportunităților de formare și dezvoltare a competențelor antreprenoriale ale doctoranzilor și postdoctoranzilor – ANTREPENORDOC

Contract nr. 36355/23.05.2019 POCU/380/6/13 - Cod SMIS: 123847

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT REZUMAT

APLICAȚII ALE ELECTROZILOR MODIFICAȚI CHIMIC ȘI BIOCHIMIC ÎN ANALIZA AMINOACIZILOR DIN PRODUSE FARMACEUTICE



Doctorand

Ancuța DINU (IACOB)

- Președinte,** Academician prof. univ. dr. ing. Eugen - Victor - Cristian RUSU
Director CSUD - Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
- Conducător științific,** Prof. univ. dr. chim. habil. Constantin APETREI
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
- Referenți științifici,** Cercet. șt. gr. I dr. chim. Alina VASILESCU
Centrul Internațional de Biodinamică din București
- Prof. univ. dr. HDR Stelian LUPU
Universitatea POLITEHNICĂ din București
- Prof. univ. dr. chim. habil. Geta CÂRÂC
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Seria C: Chimie Nr. 4

GALAȚI,

2022

MULȚUMIRI

Domnului profesor Constantin Apetrei,

Pentru tot ce-am învățat,
Ca un semn de mulțumire,
Teza mea de doctorat
E-un *senzor* de prețuire.

Cu-o *rețetă* de interes,
Excelentul pedagog,
Cu răbdare și acribie,
A garantat că am succes
Cu doctoratul în Chimie.

Vă mulțumesc! Efortul, tactul pedagogic, încrederea și întregul proces didactic de predare-învățare-evaluare pe care mi le-ați acordat de-a lungul anilor de studii doctorale sunt calități și competențe pe care le-am deprins și cu care deschid porțile noii profesii în învățământul universitar.

Domnului președinte Academician Prof. univ. dr. ing. Eugen Rusu, director al proiectului *Excelența academică și valori antreprenoriale - sistem de burse pentru asigurarea oportunităților de formare și dezvoltare a competențelor antreprenoriale ale doctoranzilor și postdoctoranzilor (ANTREPRENORDOC)*, îi mulțumesc pentru șansa de a participa la programe de pregătire științifică, de consiliere și orientare profesională, de formare pedagogică și antreprenorială, dar și pentru posibilitatea de a promova lucrările realizate în perioada studiilor doctorale.

Doamnei Cercet. șt. gr. I dr. chim. Alina Vasilescu și domnului Prof. univ. dr. HDR Stelian Lupu, membri ai comisiei de evaluare, le sunt recunoscătoare pentru interesul manifestat față de această cercetare și pentru sprijinul acordat. Îmi exprim gratitudinea față de doamna Prof. univ. dr. chim. habil. Geta Cârâc, membră a comisiei de evaluare, ce mi-a fost alături pe parcursul anilor de doctorat cu nenumărate încurajări, dovedindu-mi excepționalele calități umane și pedagogice pe care dumneaei le deține.

Mulțumirile mele se îndreaptă către membrii comisiei de îndrumare a acestei teze de doctorat, respectiv doamnei Prof. dr. chim. habil. Cătălina Iticescu și domnului Prof. dr. chim. Ștefan Dima pentru timpul alocat monitorizării studiilor realizate în Laboratorul de Senzori și Biosenzori al Facultății de Științe și Mediu, dar mai ales pentru informațiile suplimentare și recomandările împărtășite. În mod deosebit, domnului Lector dr. ing. Dumitru Dima, membru al comisiei de îndrumare, îi mulțumesc pentru buna dispoziție molipsitoare și tonusul încurajator al fiecărei zi de cercetare petrecută în laborator.

Mulțumesc cadrelor didactice ale Departamentului de Chimie din cadrul Facultății de Științe și Mediu pentru colaborarea și punerea la dispoziție a cunoștințelor și resurselor materiale, dar și colegilor mei, studenți doctoranzi, care au acordat atenție cercetărilor mele.

Asist. Drd. Ancuța Dinu (Iacob)
24 iunie 2022

CUPRINS:
(paginația corespunde tezei de doctorat)

TITLU CAPITOL	Pag.
Titlul tezei	i
Comisia	ii
Seriile tezelor de doctorat	iii
Mulțumiri	iv
Cuprins	v
Introducere	xi
Lista abrevierilor	xiii
Lista figurilor	xv
Lista tabelelor	xx
Lista schemelor	xxiii

PARTEA TEORETICĂ**Principalele studii în domeniul temei de doctorat**

CAPITOLUL I: Aminoacizii	1
I.1. Introducere	1
I.2. Clasificarea aminoacizilor	3
I.3. Proprietățile fizico-chimice ale aminoacizilor	6
I.4. Importanța și utilizările aminoacizilor	7
I.5. Produse farmaceutice pe bază de aminoacizi. Mod de administrare, efecte adverse și contraindicații	8
CAPITOLUL II: Metode electrochimice aplicate pentru determinarea aminoacizilor	10
II.1. Generalități	10
II.2. Metode analitice pentru detecția aminoacizilor	10
II.3. Metode instrumentale	11
II.4. Metode electrochimice. Clasificare și descriere	12
II.4.1. Metode potențimetrice și cronopotențimetrice	12
II.4.2. Metode amperometrice și cronoamperometrice	14
II.4.3. Metode coulometrice și conductometrice	14
II.4.4. Metode voltametrice	15
II.4.4.1. Voltametria ciclică	15

II.4.4.2. Voltmetria puls diferențială	16
II.4.4.3. Voltmetria de undă patrată	16
II.4.4.4. Voltmetria liniară	17
II.5. Parametrii analitici ai metodelor electrochimice	18
II.5.1. Limita de detecție și limita de cuantificare	18
II.5.2. Selectivitate și sensibilitate	18
II.5.3. Acuratețe și precizie	18
II.5.4. Repetabilitate și reproductibilitate	19
CAPITOLUL III: Senzori și biosenzori electrochimici modificați	20
III.1. Introducere. Compuși și materiale utilizate pentru modificarea electrozilor	20
III.2. Compuși organici electroactivi: albastru de Prusia, Albastru Meldola și ftalocianina de cobalt	24
III.2.1. Aspecte generale	24
III.2.2. Senzori și biosenzori modificați cu agenți organici electroactivi pentru detecția aminoacizilor	26
III.3. Polimeri conductori	27
III.3.1. Noțiuni introductive	27
III.3.2. Senzori și biosenzori modificați cu polimeri conductori pentru detecția aminoacizilor	27
III.4. Polimeri imprimați molecular	29
III.4.1. Introducere	29
III.4.2. Senzori și biosenzori modificați cu polimeri imprimați molecular pentru detecția aminoacizilor	33
III.5. Enzime utilizate în realizarea biosenzorilor pentru detecția aminoacizilor	38
III.5.1. Generalități. Tipuri de enzime	38
III.5.2. Biosenzori pe bază de enzime utilizați pentru detecția aminoacizilor	39

CONTRIBUȚII PERSONALE**Senzori și biosenzori dezvoltați pentru analiza fenilalaninei, tirozinei și triptofanului din produse farmaceutice**

CAPITOLUL IV: Introducere. Aspecte generale	42
CAPITOLUL V: Motivația, scopul și obiectivele cercetării	44
V.1. Motivația și scopul	44
V.2. Obiective generale	46
V.3. Obiective specifice	46

CAPITOLUL VI: Materiale și metode folosite pentru dezvoltarea noilor senzori și biosenzori pentru detecția aminoacizilor	48
VI.1. Compuși analizați: L-fenilalanina, L-tirozina și L-triptofanul. Proprietățile, sinteza și importanța lor pentru organismul uman	48
VI.1.1. L- fenilalanina	50
VI.1.2. L- tirozina	54
VI.1.3. L- triptofanul	55
VI.2. Materiale	56
VI.2.1. Electrozi serigrafiați	56
VI.2.2. Aparatură și celule electrochimice	58
VI.2.3. Soluții și reactivi	62
VI.3. Metode de caracterizare a electrozilor, a mediatorilor electroactivi și a aminoacizilor	66
VI.3.1. Analiza prin cronoamperometrie	66
VI.3.2. Analiza prin voltametrie ciclică	67
VI.3.3. Analiza spectrometrică în infraroșu cu transformată Fourier	68
VI.3.4. Analiza cromatografică de lichide de înaltă performanță	69
VI.3.5. Microscopia cu scanare electronică	70
CAPITOLUL VII: Analiza L-fenilalaninei, L-tirozinei și L-triptofanului din produse farmaceutice cu senzori și biosenzori electrochimici	72
VII.1. Detecția voltametrică a L-fenilalaninei din produse farmaceutice cu senzori serigrafiați modificați chimic cu agenți electroactivi	72
VII.1.1. Răspunsurile electrochimice ale electrozilor de carbon serigrafiați în soluție de KCl 0,1 M	72
VII.1.2. Comportamentul electrochimic al PB-SPCE, MB-SPCE și CoPc-SPCE în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]$ 0,001 M - KCl 0,1 M	76
VII.1.3. Răspunsul voltametric al senzorilor modificați în soluție de fenilalanină 0,001 M și KCl 0,1 M	80
VII.1.4. Influența concentrației de L-fenilalanină asupra răspunsului voltametric al PB-SPCE	84
VII.1.5. Stabilitate, reproductibilitate și studii de interferență	85
VII.1.6. Determinarea cantitativă a L-fenilalaninei din produse farmaceutice	85
VII.1.7. Concluzii	91
VII.2. Determinarea cantitativă prin voltametrie ciclică a L-triptofanului cu noul senzor modificat cu polipirol dopat cu $K_4[Fe(CN)_6]$	91
VII.2.1. Prepararea prin metoda cronoamperometrică a senzorului PB/FeCN/SPCE	92

VII.2.2. Comportamentul electrochimic al electrodului DRP-110 nemodificat în soluție de L-triptofan 0,001 M - KCl 0,1 M	93
VII.2.3. Răspunsul voltametric al electrodului modificat cu PPy/FeCN în soluție de KCl 0,1 M și în soluție de L-triptofan 0,001 M - KCl 0,1 M	94
VII.2.4. Influența vitezei de scanare asupra răspunsului senzorului PPy/FeCN/SPCE imersat în soluția de L-triptofan 0,001 M - KCl 0,1 M	95
VII.2.5. Influența concentrației de triptofan asupra răspunsului senzorului PPy/FeCN/SPCE imersat în soluția de L-triptofan 0,001 M - KCl 0,1 M. Curba de calibrare.	96
VII.2.6. Precizia, stabilitatea și reproductibilitatea senzorului	98
VII.2.7. Validarea senzorului prin determinarea cantitativă a L-triptofanului din probe farmaceutice	98
VII.2.8. Concluzii	101
VII.3. Studiul comparativ privind identificarea și cuantificarea experimentală a L-tirozinei din produse farmaceutice cu noul senzor PPy/FeCN/SPCE și noul biosenzor PPy/FeCN/Lacc/SPCE	101
VII.3.1. Procesul de preparare a senzorului PPy/FeCN/SPCE, respectiv a biosenzorului PPy/FeCN/Lacc/SPCE	102
VII.3.1.1. Prepararea soluției monomer-agent dopant	102
VII.3.1.2. Fabricarea senzorului prin doparea polipirolului pe suprafața electrodului prin cronoamperometrie	103
VII.3.1.3. Fabricarea senzorului enzimatic prin imobilizarea enzimei lacază	105
VII.3.1.3.1 Lacaza - Enzima utilizată la construcția biosenzorului	105
VII.3.1.3.2. Structura lacazei	107
VII.3.1.3.3. Mecanismul de acțiune al lacazei la suprafața biosenzorului	108
VII.3.1.4. Analiza SEM a senzorului	108
VII.3.2. Caracterizarea senzorului și biosenzorului prin voltametrie ciclică	109
VII.3.2.1. Răspunsul electrochimic obținut în soluție de KCl 0,1 M și în soluție de L-tirozină 0,001 M - KCl 0,1 M de către electrodul DRP-110 nemodificat	110
VII.3.2.2. Răspunsurile stabile ale electrozilor modificați chimic și biochimic imersați în soluție de KCl 0,1 M și în soluție de L-tirozină 0,001 M - KCl 0,1 M	110
VII.3.2.3. Efectul vitezei de scanare asupra senzorului, respectiv biosenzorului	117
VII.3.2.4. Curbele de calibrare și limitele de detecție obținute de către senzorul PPy/FeCN/SPCE, respectiv biosenzorul PPy/FeCN/Lacc/SPCE	120
VII.3.2.5. Studii de interferență și studii privind precizia, repetabilitatea, reproductibilitatea, stabilitatea senzorului și biosenzorului	124

VII.3.2.6. Determinarea cantitativă a L-tirozinei cu senzorul și biosenzorul preparați, precum și validarea acestora pe probe reale	126
VII.3.2.7. Concluzii	132
CAPITOLUL VIII: Principalii senzori și biosenzori voltametrici raportați în literatura de specialitate pentru detecția fenilalaninei, tirozinei și triptofanului	134
VIII.1. Senzori electrochimici	134
VIII.2. Biosenzori electrochimici	141
CAPITOLUL IX. Concluzii generale	146
CAPITOLUL X. Perspective viitoare de cercetare	149
CAPITOLUL XI. Valorificarea și impactul rezultatelor cercetării	150
XI.1. Articole publicate în jurnale cotate ISI	150
XI.2. Lucrări și postere prezentate la conferințe internaționale și naționale	150
XI.3. Premiera rezultatelor cercetării	153
XI.4. Citări ISI (Clarivate Analytics)	154
XI.5. Activități conexe desfășurate în cadrul programului individual de studii universitare de doctorat	155
BIBLIOGRAFIE	156
CURRICULUM VITAE	178

INTRODUCERE

Indispensabile vieții, proteinele sunt compuși organici macromoleculari care participă la toate funcțiile celulei vii. Din structura proteinelor fac parte aminoacizii, micromolecule cu multiple funcții, ce au în structura lor una sau mai multe grupe funcționale carboxil și una sau mai multe grupe funcționale amino legate de atomi de carbon, dar și un radical atașat structurii de bază.

Raportările în literatura științifică cu privire la investigațiile aminoacizilor au fost numeroase în ultimii ani, acest aspect datorându-se interesului pe care l-a acordat industria farmaceutică acestor compuși, dar mai ales recomandărilor crescute din sfera medicală. Astfel că, pe piața farmaceutică, sunt prezente variate medicamente și suplimente, sub forme farmaceutice diferite, cu diverse concentrații, provenind de la producători diferiți. Din aceste considerente se apreciază a fi necesare o serie de dispozitive pentru monitorizarea calității acestor produse, prezentând în această lucrare studii în legătură cu trei aminoacizi, respectiv: fenilalanina, tirozina și triptofanul; selectați în funcție de acțiunea lor asupra sistemului nervos central.

Fenilalanina sau acidul (S)-2-amino-3-fenilpropanoic, aminoacid esențial și precursor al tirozinei, este asimilată de către organismul uman prin intermediul consumării unor alimente precum: ouă, carne, pește, lapte sau prin administrarea unor suplimente medicamentoase, în scopul prevenirii bolii Parkinson, depresiei, bolii de piele vitiligo, tulburării deficit de atenție-hiperactivitate. O atenție deosebită trebuie acordată în cazul persoanelor ce suferă de fenilcetonurie, care este o tulburare moștenită datorită acumulării în exces a fenilalaninei de către organism. Din acest motiv aceste persoane trebuie să evite consumul de alimente sau suplimente ce conțin aminoacidul fenilalanină, în caz contrar pot risca să dezvolte și alte tulburări sau boli, precum: retard mental, hipertensiune arterială sau accident vascular cerebral. În prezent există un test pentru detecția fenilalaninei, chiar încă de la naștere, efectuat din serul sanguin: Testul Guthrie – un test de depistare neonatală a fenilcetonuriei, creat în anul 1963 de către Robert Guthrie. L-fenilalanina, D-fenilalanina, DL-fenilalanina sunt cele trei forme ale acestui aminoacid, respectiv forma naturală, sintetică și cea găsită în produse farmaceutice.

Tirozina sau acidul L-2-Amino-3-(4-hidroxifenil)propanoic, un aminoacid neesențial, care comparativ cu fenilalanina și triptofanul, se produce în mod natural în organism, chiar din fenilalanină, și care prin hidroxilare devine precursor a doi neurotransmițători importanți ai sistemului nervos central: adrenalina și noradrenalina. Asemeni celorlalți aminoacizi, lipsa de tirozină din organism se poate compensa cu ingerarea unor alimente (nuci, ovăz, fasole, carne, pește, grâu) sau produse farmaceutice, suplimente ce au rolul de a trata fenilcetonuria și tulburări de natură neurologică: depresia, deficitul de atenție, boala Alzheimer, retard mental.

Triptofanul sau acidul 2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propionic, este tot un aminoacid esențial, pe care organismul uman îl folosește pentru sinteza proteinelor, aportul acestuia făcându-se tot din surse externe, precum alimente sau produse farmaceutice. Acesta îndeplinește două funcții importante în organism: pe de o parte contribuie la biosinteza serotoninei, pe de altă parte este implicat în biosinteza melatoninei. Valorile concentrației sanguine a triptofanului în organism sunt situate în următoarele limite normale: între 10 și 40 milimoli/L, adică între 2,05 și 5,15 mg/L. În cazul unor valori sub limita normală a triptofanului se declanșează forme de depresie, insomniile, iar în cazul valorilor peste limita normală apar afecțiuni la nivelul sistemului nervos central: psihoza maniacodepresivă cu delir, schizofrenie.

Studiile privind cei trei aminoacizi aduc originalitate acestei teze, fiind incluse atât în partea teoretică unde s-au elaborat documentări de amploare în literatura de specialitate, cât mai ales în partea de contribuții personale. Astfel, au fost dezvoltate o serie de dispozitive versatile cu rol de analiză calitativă și cantitativă a aminoacizilor din diverse produse farmaceutice, utilizând materiale de generație nouă, cu proprietăți excelente, așa cum s-au dovedit a fi: polimerii, polimerii imprimați molecular, mediatorii electroactivi, enzimele, electrozi de carbon serigrafiați. Aceste dispozitive versatile se regăsesc în lucrare sub numele de senzori și biosenzori, fiind precizate toate etapele de preparare, modificare, analiză și validare ale acestora.

Diversitatea metodelor aplicate pentru studiul dispozitivelor dezvoltate au adus un aport semnificativ în această cercetare, întrucât rezultatele obținute au depășit performanțele altor senzori și biosenzori menționați în articolele publicate până în prezent. Aceste metode au fost cronoamperometria, voltametria ciclică, microscopia cu scanare electronică, spectroscopia cu transformată în infraroșu, cromatografia și metoda adaosului standard.

Probele reale pe care s-au efectuat testările senzorilor și biosenzorilor au fost constituite din produse farmaceutice care au avut în compoziție drept substanțe active aminoacizii menționați. Perspectivele viitoare de cercetare prevăd continuarea studiilor cu aceste instrumente realizate și pe alte probe, precum: fluide biologice, probe alimentare; reușind astfel să contribuim la sănătatea omenirii.

Prin urmare, această teză de cercetare intitulată *APLICAȚII ALE ELECTROZILOR MODIFICAȚI CHIMIC ȘI BIOCHIMIC ÎN ANALIZA AMINOACIZILOR DIN PRODUSE FARMACEUTICE* își atinge obiectivele, dar mai ales scopul de a realiza dispozitive precise, sensibile, selective, cu cost redus, pentru detecția și prevenirea unor boli prin măsurarea și verificarea concentrației de aminoacizi din medicamente și suplimente alimentare.

Cuvinte cheie: fenilalanină, tirozină, triptofan, aminoacid, senzor, biosenzor, voltametrie ciclică, lacază, polipirol, polimer conductor, polimer imprimat molecular

LISTĂ DE ABREVIERI

α - alfa	HPLC - cromatografia cu lichide de înaltă performanță
β - beta	I_{pa} - intensitatea picului anodic
β-CD - beta-ciclodextrină	I_{pc} - intensitatea picului catodic
γ - gama	Ile - izoleucina
δ - delta	IR - infraroșu
5-HTP - 5 - hidroxitriptofan	KBr - bromură de potasiu
R^2 - coeficient de determinare	KCl - clorură de potasiu
AA - aminoacid	L - levo
AAs - aminoacizi	LAAO - L - aminoacid oxidază
ADHD - hiperactivitate cu deficit de atenție	Lacc - lacază
Ala - alanina	LC-MS - cromatografia lichidă - spectrometria de masă
Arg - arginină	Leu - leucina
Asn - asparagina	LOD - limită de detecție
Asp - acidul aspartic	L-Phe - levo - fenilalanină
AuNPs - nanoparticule de aur	LOQ - limită de cuantificare
CA - cronoamperometrie	LSV - voltametria cu scanare liniară
CD - dicroism circular	M - masă moleculară
CME - electrod modificat chimic	MB - Albastrul lui Meldola
CoPc - Ftalocianină de Cobalt	Met - metionina
CV - voltametrie ciclică	MIPs - polimeri imprimați molecular
Cys - cisteina	MWCNTs - nanotuburi multistrat de carbon
Cys-Cys - cistina	NADH - nicotinamidă - adenin dinucleotidă
CPs - polimeri conductori	NP - nitropusiat de sodiu dihidrat
D - dextro	OMS - Organizația Mondială a Sănătății
DAAO - D-aminoacid oxidază	OTC -- <i>over the counter</i> - medicamente eliberate fără prescripție medicală
DPV - voltametria puls diferențială	PAH - fenilalanină hidroxilază
DTA - analiză termică diferențială	PANi - polianilina
E_{pa} - potențialul picului anodic	PB - Albastru de Prusia
E_{pc} - potențialul picului catodic	PEA - feniletilamina
EIS - spectroscopia de impedanță electrochimică	PEDOT - poli(3,4-etilendioxitiofen)
ETM - mediatori cu rol de transfer de electroni	Phe - Fenilalanina
FeCN sau $K_4[Fe(CN)_6]$ - hexacianoferrat de potasiu	PKU - fenilcetonurie
GA - glutaraldehidă	PMS - sindrom premenstrual
GC-MS - cromatografie de gaze-spectrometrie de masă	POC - <i>point of care</i>
Gln - glutamina	PPy - polipirol
Glu - acidul glutamic	Pro - prolina
Gly - glicina	Pt - platină
His - histidina	PTh - politiofen
	RMN - rezonanță magnetică nucleară

Aplicații ale electrozilor modificați chimic și biochimic
în analiza aminoacizilor din produse farmaceutice

rGO - oxid de grafen redus
RSD - deviație standard relativă
SARS - CoV - 2 - coronavirus sever acut
SDS - dodecil sulfat de sodiu
Ser - serina
SEM - microscopia cu scanare electronică
SNC - sistem nervos central
SPCEs - electrozi serigrafiați de carbon
SWV - voltametria de undă pătrată
TEM - microscopia electronică de transfer
TGA - analiză termogravimetrică
Thr - treonina
TRP - triptofan
Tyr - tirozină
UV - ultraviolet
V^{1/2} - rădăcina pătrată a vitezei de scanare
Val - valina
VIS - vizibil

PARTEA TEORETICĂ. Principalele studii în domeniul temei de doctorat.

CAPITOLUL I. AMINOACIZII

I.1. Noțiuni definitorii

Prevenirea unor boli metabolice ereditare, precum: fenilcetonuria (PKU), alkaptonuria, boala Parkinson, orientarea către o alimentație "bio" și către un stil de viață sănătos, înlăturând factorii ce conduc la numeroase tulburări și afecțiuni depresive, reprezintă temeiul pentru care a fost realizat prezentul studiu. Aminoacizii (AAs) responsabili de echilibrul sistemului nervos, de reglarea aproape a tuturor proceselor metabolice din organism, au fost analizați în această teză de cercetare, astfel încât carența sau excesul lor să poată fi depistate și tratate corespunzător și cât mai timpuriu.

AAs dețin diverse funcții în organism, în special utili pentru sinteza proteinelor, iar lipsa acestora din dieta zilnică poate avea drept consecință scăderea formării proteinelor, deci apariția unor afecțiuni nedorite. AAs sunt parte a proteinelor corpului uman, așadar sunt considerați elementele constitutive de bază ale organismului ce se regăsesc în organe, țesuturi, piele, mușchi, păr. În literatura de specialitate se găsesc numeroase lucrări științifice în care au fost studiate diverse aspecte privind AAs.

I.2. Clasificarea aminoacizilor

AAs sunt implicați în sinteza proteinelor, însă nu toți, doar 20 apar în codul genetic din cei peste 500 de AAs identificați. Acești 20 de AAs nu au apărut în același timp, unii dintre ei fiind încorporați în codul genetic ulterior.

S-au identificat următoarele criterii de clasificare a AAs: după structură, după poziția grupării amino ($-NH_2$), după necesarul nutrițional și după polaritate [6].

Astfel, după structură, AAs sunt molecule organice care conțin o grupare bazică amino ($-NH_2$), o grupare acidă carboxil ($-COOH$) și o grupare organică unică pentru fiecare AA (R).

I.3. Proprietățile fizico-chimice ale aminoacizilor

Multitudinea de funcții biologice și chimice pe care le îndeplinesc AAs pentru organismul uman se datorează proprietăților fizico-chimice ale acestora. Din punct de vedere fizic, proprietățile remarcabile sunt legate de aspect, solubilitate, punctul de topire, gust. Astfel, AAs se prezintă în stare solidă sub formă de cristale incolore [11]. Majoritatea AAs sunt solubili în apă și etanol, dar insolubili în solvenți organici (benzen, eter). Această proprietate depinde în mare măsură de temperatură, de natura solventului și de punctul izoelectric. Punctul lor de topire este ridicat, respectiv între $200-300^{\circ}C$. Majoritatea AAs nu au gust, însă unii sunt dulci (așa cum este Gly), iar alții amari (de exemplu Arg) [12].

Din punct de vedere chimic, AAs participă la reacții de decarboxilare, de esterificare, de acilare, cu formare de săruri, ce se datorează existenței grupărilor amino și carboxil. De asemenea, o serie de reacții specifice, precum reacția cu ninhidrină, cu reactivul Sanger's, reactivul Edmann's, pot identifica rapid AAs [13].

I.4. Importanța și utilizările aminoacizilor

Indiferent de tipul de AA, organismul uman are nevoie de proteine complexe în scopul unei funcționări corecte în orice moment. Rolurile importante pe care AAs le îndeplinesc sunt următoarele:

- reglarea expresiei genelor printr-un transfer de informații codificate, participând la procesele biochimice de transcripție, traducere, modificări post-tranlaționale [22];
- sintetizează și secretă hormoni (de exemplu: Tyr este precursor pentru sinteza epinefrinei, norepinefrinei, dopaminei și hormonilor tiroidieni) [23];
- participă la metabolismul specific nutrienților și la stresul oxidativ (așa cum Arg este activatorul N-acetilglutamat sintetazei) [24];
- rol în *turnover*-ul proteic celular (sintetizează și degradează printr-un proces continuu proteinele - Leu este un inhibitor al proteinelor în mușchiul scheletic și ficat)[25];
- funcție imunitară. Studii intense s-au efectuat asupra AAs TRP și Pro pentru funcțiile imune [26];
- rol în reproducere și lactație (de exemplu fertilitatea masculină, ovulația; creștere și dezvoltare fetală și lactogeneză) [9];
- obezitate, diabet și sindrom metabolic (Articole recente au arătat că suplimentarea alimentară cu Arg a redus nivelurile plasmatiche de glucoză, homocisteină și factori de risc asimetrici ai dimetilargininei pentru sindromul metabolic) [25]
- funcție endotelială, circulația sângelui și funcționarea normală a limfei [27];
- echilibru acido-bazic [28];
- regenerarea și remodelarea țesuturilor și altele [26].

Analizând toate aceste funcții, concluzionăm că AAs prezintă o reglare metabolică remarcabilă, cu rol primordial în dezvoltarea, creșterea, reproducerea și homeostazia organismelor; de asemenea, servind ca precursori principali pentru sinteza unor molecule de o importanță enormă.

I.5. Produse farmaceutice pe bază de aminoacizi. Mod de administrare, efecte adverse și contraindicații.

AAs și-au câștigat astfel titlul de cei mai importanți nutrienți ai organismului, aceștia reprezentând „elementele care ne formează viața” și care oferă corpului, alături de vitamine și minerale, materialul de care are nevoie pentru a repara mușchi, organe sau alte țesuturi ale acestuia [29].

Pe piața farmaceutică rulează o serie de OTC-uri (*over the counter*) ce conțin cantități semnificative de AAs, fiecare astfel de supliment fiind însoțit de un prospect cu mențiuni esențiale privind indicațiile substanțelor active, modul de administrare, efectele adverse și contraindicațiile pe care acestea le pot produce la nivelul organismului [30]. o analiză completă a AAs, atât calitativă cât și cantitativă, ar putea fi efectuată prin teste de identificare și de cuantificare din produse farmaceutice cu dispozitive ce pot fi dezvoltate în laborator.

CAPITOLUL II. METODELE ELECTROCHIMICE APLICATE PENTRU DETERMINAREA AMINOACIZILOR

II.1. Generalități

De-a lungul timpului, mulți cercetători au dezvoltat numeroase metode prin care AAs să poată fi detectați rapid și precis, atât din produse biologice, cât și din produse farmaceutice ori produse alimentare. În această parte a tezei sunt centralizate metodele raportate în literatura de specialitate prin care s-au detectat AAs. Dintre aceste metode se pot menționa metodele chimice, dar și metodele instrumentale, dintre care s-au detaliat metodele electrochimice pe bază de senzori și biosenzori.

Pentru detecția AAs s-au publicat numeroase articole științifice, review-uri, capitole de cărți și cărți până în prezent. Lucrările științifice descriu diverse metode de detecție a AAs, metode care au o serie de avantaje și dezavantaje. În realizarea tabelului II.1 s-au avut în vedere câteva criterii de performanță a acestor metode: precizie, selectivitate, acuratețe, sensibilitate, limită de detecție, cost și durată.

Tabel II.1. Avantajele și dezavantajele metodelor utilizate pentru determinarea AAs

	Precizie	Selectivitate	Acuratețe	Limită de detecție	Cost și durată
Ridicat	Metode electrochimice bazate pe realizare de senzori și biosenzori [32–35]				
Mediu	Metode instrumentale (electrice [36], optice [37], termice [38], magnetice și radiochimice [39])				
Scăzut	Metode chimice (volumetrie, gravimetrie, de precipitare) [40]				

II.2. Metode analitice pentru detecția aminoacizilor

Puține la număr, întrucât sunt costisitoare și necesită abilități analitice specifice, dar constituind baza cercetărilor următoare, metodele chimice aplicate pentru determinarea AAs fac referire la metode gravimetrice (agenți de precipitare anorganici, organici, electrodepunere) și metode volumetrice (titrări acid-bază, de precipitare, de complexonometrie, de oxido-reducere) [41].

II.3. Metode instrumentale

Metodele instrumentale, până în prezent, conform cercetărilor efectuate, sunt cele mai numeroase. În determinarea AAs, s-au folosit:

- Colorimetria [43–45], spectrofotometria în ultraviolet (UV) și infraroșu (IR) [46], dicromismul circular (CD) [68], fluorescența [47–51, 71], chemiluminiscenta [52,53];
- cromatografia de gaze [54], electroforeza capilară [55–57], HPLC – cromatografia cu lichide de înaltă performanță [58–62];
- spectroscopia Raman [63,64], spectroscopia asistată de laser [65], spectroscopia UV-VIS (UV-vizibil), asistate de chemometrie pentru interpretarea datelor [66];
- rezonanța magnetică nucleară (RMN) [67];
- spectrometria de masă [43,54,69,70].

Deși aceste metode s-au dovedit a fi numeroase și eficiente, ele prezintă și o serie de dezavantaje: sunt costisitoare, necesită timp, analize și echipamente speciale. Drept urmare, metodele electrice și electrochimice s-au evidențiat mai mult în ultima perioadă pentru determinarea AAs.

II.4. Metode electrochimice. Clasificare și descriere

Din categoria metodelor instrumentale, cele electrochimice, care au luat amploare în ultimii ani, au la bază construcția unor senzori sau biosenzori și măsoară una din mărimile: potențialul de electrod, intensitatea curentului prin celulă, cantitatea de electricitate care trece prin celulă, rezistența, timpul de desfășurare a procesului de electrod [41]. La rândul lor, aceste metode electrochimice se subclasifică în: potențiometrice, amperometrice, coulometrice, conductometrice, electrogravimetria, cronoamperometria (CA) și cronopotențiometrice

CV (voltametria ciclică) este una dintre metodele cel mai frecvent utilizate pentru caracterizarea sistemelor electrochimice, deoarece oferă atât informații calitative cât și cantitative despre un sistem studiat. Reprezentarea grafică a curentului înregistrat de electrodul de lucru în funcție de potențialul aplicat se numește curba CV. Folosind această metodă, o varietate de senzori și biosenzori pot fi aplicați, studiați și modificați pentru a determina substanța de analizat [83].

II.5. Parametrii analitici ai metodelor electrochimice

Orice metodă electrochimică aplicată pentru studiul unui analit reprezintă o măsurătoare. Astfel, Organizația Mondială de Standardizare (ISO) a stabilit și elaborat o serie de reguli și ghiduri ce menționează caracteristicile, parametrii, calitatea, forma unui produs sau serviciu din toate domeniile de activitate. Așa se întâmplă și în cazul aplicării și dezvoltării metodelor electrochimice, pentru a avea certitudinea că rezultatele obținute în urma aplicării metodelor au un sens real, adică pot fi aplicate oriunde în lume și au aceeași semnificație pentru oricine. Parametrii analitici de referință în cazul metodelor electrochimice sunt: limita de detecție (LOD), limita de cuantificare (LOQ), selectivitatea, sensibilitatea, acuratețea, precizia, repetabilitatea, reproductibilitatea [90].

CAPITOLUL III. SENZORI ȘI BIOSENZORI ELECTROCHIMICI MODIFICAȚI

III.1. Introducere. Compuși și materiale utilizate pentru modificarea electrozilor

În ultimii ani studiile privind dezvoltarea senzorilor și biosenzorilor, care s-au dovedit a avea un caracter interdisciplinar, a atras atenția multor cercetători, specialiști în diverse discipline fundamentale dar și aplicative, respectiv în chimie, biochimie, fizică, biofizică, biologie, bio-farmacomedicină, bioinginerie, industrie, transporturi, protecția mediului, automatizări, preconizând astfel un viitor al omeniilor ce va depinde de multe dintre aceste aparate, așa cum sunt diabeticii care depind de glucometru, un aparat de detecție a nivelului glicemiei din organism, ce se bazează pe un biosenzor [91]. Astfel de senzori se folosesc îndeosebi în sisteme de monitorizare a mediului, a sănătății, în controlul calității a diverselor produse.

Dacă senzorul este un instrument analitic ce traduce informații fizice și chimice în semnale măsurabile, biosenzorii au același rol, dar se bazează pe o combinație dintre un compus biologic de recunoaștere și un traductor fizic, elementul de recunoaștere putând fi o enzimă, un anticorp

sau un microorganism, făcându-l astfel mai sensibil și mai selectiv la detecția substanței supusă analizei.

Un pas important în realizarea senzorilor și biosenzorilor este reprezentat de etapa de selecție a materialelor de construcție sau de fabricare a acestora, care pot contribui la rezolvarea unor probleme ce intervin în detecția analitului, așa cum sunt: suprapunerea potențialelor redox al moleculelor, deteriorarea suprafeței electrozilor care conduc la o reproductibilitate scăzută.

III.2. Compuși organici electroactivi: Albastru de Prusia, Albastrul Meldola și Ftalocianina de Cobalt

Modificările SPCEs cu o serie de mediatori electrochimici și nanomateriale le conferă proprietăți ce-i fac utili pentru diverse aplicații. Agenți organici și anorganici electroactivi, precum: Albastru de Prusia (PB), Albastru de Meldola (MB), Ftalocianină de Cobalt (CoPc), Ftalocianină de Mangan, Ferocianură de Potasiu, Ftalocianină de Cupru, Ftalocianină de Fier; sunt specii electrochimice care conferă electrozilor următoarele avantaje: activitate electrocatalitică, performanțe bune în ceea ce privește LOD și nivelul de interferență, permit oxidarea sau reducerea la potențiale mici a speciilor de analizat [94–96].

PB se prezintă sub două forme: forma solubilă $KFe^{III}Fe^{II}(CN)_6$ și forma insolubilă $Fe_4^{III}[Fe^{II}(CN)_6]_3$; astfel structura PB prezintă valență mixtă, atomii de fier putând avea diferite stări de oxidare (Fe^{2+}/Fe^{3+}), deci structura de bază este formată dintr-o rețea polimerică tridimensională în care ionii ferici alternează cu ionii feroși pe siturile cu rețea cubică [95,130–133]. Din punct de vedere electrochimic, PB este evidențiat prin două reacții redox reversibile în care are loc reducerea PB la Alb de Prusia (PW) și oxidare la Galben de Prusia (PY) prin forma de valență mixtă a Verdelui de Prusia (PG) (Figura III.5). S-a demonstrat științific că utilizarea acestui compus a condus la obținerea unor senzori cu sensibilitate și selectivitate crescute [134].

MB este un alt compus foarte bine studiat, cercetătorii găsindu-i astfel aplicabilitate și atractivitate în domeniul dezvoltării senzorilor și biosenzorilor. Acest reactiv a fost utilizat pentru detecția acidului ascorbic, a peroxidului de hidrogen, pentru oxidarea nicotinamidei - adenin dinucleotidă (NADH). De asemenea, este un bun catalizator utilizat în construcția unor electrozi cu aplicabilitate în chimia industrială, fabricarea LED-urilor și pentru detecția unor produse farmaceutice [94,135–140].

CoPc este un compus chimic, un semiconductor organic, folosit pentru fabricarea multor dispozitive electronice (leduri, panouri fotovoltaice, senzori și biosenzori chimici) datorită avantajelor pe care le deține, respectiv sensibilitate, stabilitate termică și fotochimică, conductivitate, cost scăzut de fabricare [96,141,142].

III.3. Polimeri conductori

În ultimii zece ani, numeroase grupuri de cercetare au adus contribuții majore în domeniul electroanalizei, precum și în domeniul științei materialelor, obținerea a noi clase de materiale (nanomateriale), cum ar fi noi polimeri, care au permis posibilitatea unei game largi de detecție a analiților.

Cunoscuți și sub numele de compuși macromoleculari, polimerii se regăsesc aproape în fiecare material pe care oamenii îl utilizează în viața de zi cu zi. În esență, polimerii sunt alcătuiți din mai multe molecule mici - numite monomeri - legate între ele formând catene lungi [97]. CPs, cunoscuți și sub numele de "metale sintetice", reprezintă o generație nouă de polimeri, preferându-

se obținerea acestora prin sinteză electrochimică, întrucât prezintă avantajul simplității și posibilității de realizare a unor filme polimerice de diferite grosimi și niveluri de dopare [144]. CPs cel mai des întâlniți în studiile științifice sunt reprezentați de PPy, PANi, PEDOT, PTh, poliacetilena, structurile chimice ale acestora fiind prezentate în figura III.6.[144].

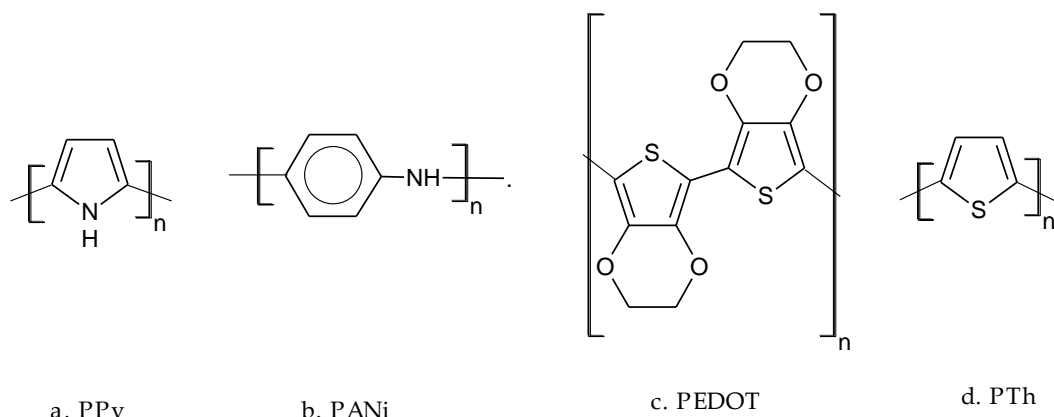


Figura III.6. Cei mai utilizați CPs: a.PPy; b.PANi; c.PEDOT; d.PTh (Adaptată după [144])

Această categorie de polimeri a atras atenția multor cercetători, tocmai datorită proprietății lor principale, anume conductivitatea electrică [145].

III.4. Polimeri imprimați molecular

Alți polimeri implicați în numeroase studii sunt MIPs din soluții de monomer cu molecule șablon, agenți de reticulare sau cu solvenți, fiind o metodă de preparare versatilă ce se folosește des pentru configurarea unor receptori biomimetici [152].

Întrucât AAs se regăsesc și în fluidele biologice, implicit în serul sanguin și în urina umană, este extrem de importantă monitorizarea nivelului acestora în organism, respectiv măsurarea concentrației cu ajutorul unor dispozitive mai sensibile și mai selective, așa cum sunt senzorii și biosenzorii.

III.5. Enzime utilizate în realizarea biosenzorilor pentru detecția aminoacizilor

Am demonstrat în primul capitol că AAs sunt componente principale în alimentația individului, astfel că o detecție rapidă și precisă a acestora nu doar din alimente, cât mai ales din fluidele biologice și produse farmaceutice au stimulat cercetătorii să dezvolte dispozitive fiabile și sensibile. Astfel de dispozitive sunt biosenzorii, pentru a căror fabricare este nevoie de un element modificador, cum sunt enzimele. De regulă, tipurile de enzime care au fost utilizate pentru dezvoltarea biosenzorilor au fost oxidoreductazele, polifenol oxidazele, peroxidazele sau aminooxidazele [127].

Pentru detecția unor AAs specifici se pot utiliza și alte tipuri de enzime, precum lacază (Lacc), tirozinază, L-glutamat oxidază, L-glutamat dehidrogenază, aceste enzime fiind selectate și în funcție de metoda de analiză [169].

**CONTRIBUȚII PERSONALE. Senzori și biosenzori dezvoltați pentru analiza fenilalaninei,
tirozinei și triptofanului din produse farmaceutice.****CAPITOLUL IV. INTRODUCERE. ASPECTE GENERALE**

Bolile metabolice reprezintă tulburări genetice care vizează căile metabolice ale unor compuși de natură alimentară. Aceste afecțiuni se datorează pe de o parte factorilor ereditari (unele pot fi depistate de la naștere), dar pot fi cauzate și de boli apărute pe parcursul vieții (fiind identificate după apariția unor simptome specifice).

Cea mai frecventă și extinsă boală metabolică este PKU, care se datorează lipsei enzimei PAH sau are un nivel scăzut în sânge, o enzimă necesară pentru convertirea AA esențial Phe în alt AA numit Tyr. Din acest motiv, Phe este unul dintre cei mai studiați AAs. Nivelul PKU poate fi depistat încă din perioada neonatală, detecția markerilor PKU din fluidele biologice realizându-se îndeosebi prin metodele: HPLC sau prin cromatografie de gaze-spectrometrie de masă (GC-MS). Există însă și alte metode pentru determinarea PKU precum: teste de activitate enzimatică, electroforeză capilară cuplată cu fluorescență indusă cu laser sau detecție electrochimică precum și teste genetice.

Pentru că depind de multe etape de prelucrare și necesită mult timp pentru analiză, sunt destul de costisitoare, necesită personal calificat, nu sunt portabile, multe dintre metodele enumerate anterior sunt inadecvate pentru testarea *point-of-care* (POC). Pentru analiza produselor farmaceutice, dar și pentru aplicațiile biomedicale aplicabile la POC sunt necesare dispozitive cu cost redus, ușor de manevrat și eficiente în depistarea precoce a unor boli metabolice, iar realizarea unor noi senzori care să îndeplinească aceste criterii reprezintă o direcție de cercetare de actualitate.

Din nevoia de a depista cât mai rapid bolile metabolice, au fost realizate și aplicate multe metode de testare, însă problema care se ridică și care face dificilă diagnosticarea sunt diferențele dintre criteriile de *screening* neonatale dintre țări și chiar în aceeași țară. Printre subiectele de interes major în rândul cercetătorilor se află cele legate de tehnicile electrochimice, datorită avantajelor pe care le prezintă, respectiv: simplitate, potențial excelent pentru miniaturizare, operare ușoară, cost redus și sensibilitate ridicată. Astfel, LOD mică oferită de aceste metode este motivul pentru care s-au depus eforturi de către mulți cercetători pentru studiul AAs. Pe de altă parte, metodele electrochimice prezintă și o serie de limitări la determinarea electrochimică a AAs. S-au observat că transferul de electroni este lent, sensibilitatea și reproductibilitatea sunt scăzute, stabilitatea este redusă pentru multe soluții și potențialul de detecție este ridicat. Astfel, pentru a înlătura aceste inconveniente, utilizarea electrozilor modificați chimic (CME) în scopul detectării AAs reprezintă o alternativă rezonabilă.

Până în prezent, pentru a îmbunătăți parametrii electroanalitici ai CMEs s-a apelat la o varietate de modificări ale suprafeței sensibile, cum ar fi acoperirea cu CPs (PPy) sau cu MIPs. Modificările suprafeței electrozilor s-au realizat și cu o serie de enzime. Există mai multe enzime care pot fi utilizate pentru detecția AAs, cea mai frecventă fiind tirozinaza, însă pentru acest studiu a fost selectată Lacc, întrucât este ușor de utilizat, nefiind necesari co-factori și participând la multe reacții de oxidare pentru o mare varietate de substanțe organice (poliamine, polifenoli, diamine, lignine). De asemenea, prezența enzimei a condus la obținerea unui biosenzor cu performanțe

mult mai crescute, comparativ cu senzorul obținut anterior, respectiv stabilitate, conductivitate, reproductibilitate și sensibilitate crescute, preparare ușoară.

CAPITOLUL V. MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

În contextul trăirii unor vremuri cu multe interdicții și măsuri restrictive privind împiedicarea răspândirii SARS-CoV-2, numeroase articole publicate de către specialiști atât în psihologie, medicină, chimie, evidențiază că izolarea și carantina au afectat întreaga omenire, accentuându-se și crescând numărul de stări depresive, tulburări afective, de anxietate și de somn.

Efectele negative care afectează sănătatea individului cauzate de noul coronavirus pot fi parțial sau complet tratate cu produse farmaceutice care conțin compuși ce acționează asupra SNC, așa cum sunt Phe, Tyr, TRP, compușii țintă ai acestei teze de cercetare. Un alt motiv pentru care a fost realizată această teză este reprezentat de faptul că una dintre afecțiunile tot mai des prezentă în rândul populației este depresia, iar în acest sens o măsură utilă ar putea fi reprezentată de monitorizarea valorilor AAs, respectiv a Phe, Tyr, TRP. Pentru prevenirea și tratarea formelor ușoare de depresie (post-partum, sezonieră, premestruală), pe piața farmaceutică s-au dezvoltat și se regăsesc o varietate de suplimente medicamentoase, ce conțin AAs supuși studiului, în diferite concentrații.

Obiectivul general al acestei teze de doctorat a fost realizarea de noi senzori și biosenzori electrochimici prin modificare chimică cu o serie de compuși electroactivi, CPs și MIPs, precum și prin modificare biochimică apelând la diverse enzime, în scopul detecției a trei AAs din produse farmaceutice prin metode electrochimice.

Teza de doctorat a avut o serie de obiective specifice, ce au fost în strânsă corelație cu activitățile prevăzute în programul individual de studii universitare de doctorat. Obiectivele propuse au fost atinse în primă etapă prin documentarea științifică, întocmirea a două recenzii și două referate științifice, intitulate după cum urmează:

- Recenzie a senzorilor și biosenzorilor electrochimici folosiți în electroanaliza Phe;
- Recenzie a senzorilor și biosenzorilor modificați cu CPs și MIPs utilizați pentru detecția electrochimică a AAs: Phe, Tyr și TRP;
- CPs și MIPs. Sinteză, proprietăți, aplicații;
- Metode electrochimice folosite în chimia analitică.

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

- *Determinarea voltametrică a Phe folosind senzori serigrafiați modificați chimic;*
- *Dezvoltarea senzorilor pe bază de SPCEs modificați cu PPy pentru determinarea L-Tyr din produse farmaceutice;*
- *Dezvoltarea unui senzor nou bazat pe PPy dopat cu hexacianoferat de potasiu (II) pentru detectarea L-TRP din medicamente;*
- *Cuantificarea Tyr din produse farmaceutice cu noul biosenzor modificat cu filme subțiri polimerice de PPy și cu Lacc.*

CAPITOLUL VI. MATERIALE ȘI METODE FOLOSITE PENTRU DEZVOLTAREA NOILOR SENZORI ȘI BIOSENZORI PENTRU DETECȚIA AMINOACIZILOR

VI.1. Compuși analizați: L-fenilalanina, L-tirozina și L-triptofanul. Proprietățile, sinteza și importanța acestora pentru organismul uman

Din cei 11 AAs esențiali și 9 neesențiali pentru organism, doar trei au fost supuși prezentului studiului, respectiv Phe, TRP (AAs esențiali) și Tyr (AA neesențial) datorită asemănării structurale și a rolului pe care acești AAs îl au pentru organismul uman

VI.2. Materiale

VI.2.1. Electrozi serigrafiați

În toate studiile s-au folosit SPCEs, achiziționați de la Metrohm DropSens (www.dropsens.com) (Oviedo, Spania). Pentru determinarea voltametrică a L-Phe din medicamente electrozii de lucru studiați au fost modificați de producător cu 3 substanțe electroactive comerciale: PB, CoPc și MB.

În cel de-al doilea studiu privind detecția L-TRP din produse farmaceutice, s-au utilizat SPCEs DRP-C110, fiind supuși unei electropolimerizării prin metoda CA. Acești SPCEs au fost imersați într-o soluție monomer/agent dopant preparată în prealabil din 0,1 M Py - 0,1 M FeCN.

Studiul comparativ pentru determinarea AA L-Tyr din produse farmaceutice s-a efectuat prin dezvoltarea unor SPCEs modificați în laboratorul de chimie, obținându-se pe de o parte senzori, pe de altă parte biosenzori.

VI.2.2. Aparatură și celule electrochimice

Pentru modificarea și caracterizarea senzorilor s-au folosit două potențiostate: potențiostatul/galvanostat EG&G modelul 263A (Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN, USA) controlat prin software-ul EChem și potențiostatul/galvanostat Biologic SP 150 (Bio-Logic Science Instruments SAS, France) controlat prin software-ul EC – Lab Express. La aceste aparate a fost conectată celula electrochimică, în care au fost introduși simultan electrozii, respectiv: electrodul de referință Ag/AgCl/KCl_{3M}, electrodul auxiliar și electrodul de lucru SPCE.

Pentru studiul probelor standard și a probelor reale cu conținut de AAs prin metoda FT-IR s-a utilizat spectrofometrul Bruker ALPHA FT-IR (BrukerOptik GmbH, Ettlingen, Germany), controlat de software-ul OPUS (BrukerOptik GmbH, Ettlingen, Germany). ElmaSonic S10H este baia de apă cu ultrasunete folosită pentru dizolvarea compușilor și omogenizarea soluțiilor.

Informații importante despre probele reale, despre morfologia speciilor depuse pe suprafața electrozilor, despre structura cristalină și compoziția chimică a acestora au fost obținute cu microscopul cu scanare electronică JEOL - JMS-T300.

U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS, a fost aparatul utilizat pentru analiza cromatografică a AAs studiați (achiziția Full MS - vDIA), controlat de programul software Xcalibur, versiunea 4.1. Cu ajutorul acestui dispozitiv s-a realizat determinarea calitativă și identificarea AAs din diferite preparate farmaceutice.

De asemenea, balanța analitică AS 60/220.R2 (SC Partner Corporation SRL, București, România), baloane cotate, pipete și micropipete au fost utilizate pentru cântărirea probelor solide și prepararea soluțiilor.

VI.2.3. Soluții și reactivi

Reactivii utilizați în acest studiu au fost achiziționați de la Sigma-Aldrich (St. Louis, SUA) și folosiți fără purificare suplimentară.

Astfel, pentru primul studiu de detecție a AA-ului L-Phe au fost necesare soluții inactice, precum KCl de concentrație 0,1 M; 0,001 M L-Phe– 0,1 M KCl, dar și soluțiile electroactive 0,001 M NP - 0,1 M KCl; 0,001 M SDS - 0,1 M KCl; 0,001 K₄[Fe(CN)₆] M – 0,1 M KCl.

De asemenea, au fost analizate trei produse farmaceutice: L-Phenylalanine 500 mg, sub formă de capsule (Solaray), DLPA 500 mg – DL – Phe free form – capsule vegetale (Solgar) și Amino 75 conținând AAs esențiali sub formă liberă (Solgar) – capsule vegetale care au în compoziție AA L-Phe în concentrație de 75 mg.

Pentru cel de-al doilea studiu de determinare a AA-ului L-TRP, s-au utilizat: L-TRP (≥ 98 %), KCl (≥99,0 %), K₄[Fe(CN)₆] (≥ 99,5 %), pirol (98 %). Pentru validarea rezultatelor obținute cu senzorii modificați s-au folosit două produse farmaceutice care conțin L-TRP: Sleep Optimizer SOLARAY (150 mg Tryptophan) și Cebrum NEUROPHARMA (1,02 mg Tryptophan).

În studiul comparativ dintre senzorii și biosenzorii dezvoltați pentru detecția AA-ului L-Tyr, au fost implicate următoarele substanțe: L-Tyr (≥ 98 %), KCl (≥99,0 %), FeCN (≥ 99,5 %), SDS (≥ 99,0 %), NP (≥ 99 %), pirol (98 %), Lacc, glutaraldehida (GA). Probele reale au fost reprezentate de produse cumpărate de pe piața farmaceutică. Pentru validarea rezultatelor obținute de către electrozii modificați, au fost selectate trei produse care conțin substanța L-Tyr în concentrații diferite, de la trei producători, unul dintre produse conținând mai mulți AAs, anume Cebrum. Astfel, au fost analizați L-Tyrosine 500 mg (SOLARAY) (500 mg L-Tyr), Tiroidin (PARAPHARM) (90 mg Tyr) și Cebrum (EVER NEURO PHARMA) (4,012 mg L-Tyr). În toate studiile, KCl a fost folosită ca electrolit suport, concentrația fiind de 0,1 M.

VI.3. Metode de caracterizare a electrozilor, a mediatorilor electroactivi și a aminoacizilor

VI.3.1. Analiza prin cronoamperometrie

Tehnica cronoamperometrică a fost utilizată în studiile acestei lucrări în scopul analizei activității electrochimice, a stabilității electrocatalizatorilor, dar și pentru modificarea electrozilor prin electropolimerizare. Cu ajutorul experimentului cronoamperometric s-au putut determina grosimea filmului de substanță modificatoare de la suprafeța senzorilor și biosenzorilor, a fost posibil studiul cineticii reacțiilor chimice, studiul proceselor de difuzie și absorbției.

VI.3.2. Analiza prin voltametrie ciclică - CV

Metoda de detecție care a stat la baza realizării prezentului studiu a fost CV urmărindu-se comportamentul electrochimic al SPCEs modificați în soluțiile de analizat KCl, K₄[Fe(CN)₆], KCl - L-Phe, KCl - L-Tyr, KCl - L-TRP și în soluțiile obținute din produse farmaceutice. CV este metoda cea mai atractivă și cea mai utilizată tehnică de către cercetători, prezentând următoarele avantaje: oferă informații calitative despre reacțiile electrochimice, oferă informații despre procesele redox, reacțiile eterogene de transfer de electroni și procesele de adsorbție, oferă o localizare rapidă a potențialului redox al speciilor electroactive [84].

VI.3.3. Analiza spectrometrică în infraroșu cu transformată Fourier - FT-IR

FT-IR este o metodă simplă, ușoară, rapidă, neinvazivă, s-a dovedit benefică pentru această cercetare, având drept scop identificarea compușilor studiați, atât în stare pură, cât mai ales din produsele farmaceutice selectate.

S-a dovedit științific că fiecare probă de analizat deține o amprentă moleculară unică, astfel metoda FT-IR se dovedește a fi una eficientă pentru validarea unor rezultate obținute cu alte tehnici de analiză, așa cum este metoda CV aplicată în studiile efectuate pentru această cercetare. De asemenea, spectrofotometria FT-IR este capabilă să identifice posibilele substanțe contaminante dintr-un material, să caracterizeze gradul de descompunere și oxidare a moleculelor, precum și tipurile de aditivi aflate în proba de analizat.

VI.3.4. Analiza cromatografică de lichide de înaltă performanță - HPLC

Metoda HPLC utilizată în această cercetare a avut drept scop validarea rezultatelor obținute prin metoda electrochimică CV prin analiza unor compuși, respectiv AAs, din probe reprezentate de produse farmaceutice.

VI.3.5. Microscopia cu scanare electronică - SEM

Informații importante raportate în această teză despre morfologia externă sau internă, despre compoziția chimică și structura cristalină a compușilor existenți în probele de analizat, au fost obținute cu ajutorul SEM. Prin intermediul acestui dispozitiv se obțin semnale care rezultă din interacțiunile electron-probă, datele fiind colectate de pe o zonă selectată a suprafeței probei, rezultatul constând într-o imagine bidimensională ce afișează variații spațiale ale proprietăților probei de analizat.

CAPITOLUL VII: ANALIZA L-FENILALANINEI, L-TIROZINEI ȘI L-TRIPTOFANULUI DIN PRODUSE FARMACEUTICE CU SENZORI ȘI BIOSENZORI ELECTROCHIMICI

VII.1. Detecția voltametrică a L-fenilalaninei din medicamente cu senzori serigrafiați modificați chimic cu agenți electroactivi

Această lucrare descrie proprietățile senzitive ale SPCEs modificați cu trei compuși chimici electroactivi diferiți: PB, CoPc și MB. Senzorul PB-SPCE s-a folosit pentru determinarea L-Phe utilizând tehnici de calibrare și de adaos standard pe probe pure, pe probe farmaceutice simple sau probe farmaceutice multicomponent. Senzorii au fost aplicați cu succes la determinarea AA esențial L-Phe din produse farmaceutice prin metoda CV. Validarea metodei s-a realizat prin metoda FT-IR și prin compararea rezultatelor obținute de PB-SPCE în analiza a trei produse farmaceutice de diferite concentrații cu cele indicate de producător.

VII.1.1. Răspunsurile electrochimice ale electrozilor de carbon serigrafiați în soluție de KCl 0,1 M

KCl este o soluție utilizată des în domeniul electrochimiei pentru depozitarea și activarea electrozilor având rolul de a neutraliza sau dilua contaminarea electrozilor prin diafragmă. De asemenea, această soluție este folosită drept soluție de referință, fiind inactivă din punct de vedere electrochimic [236].

Răspunsurile voltametrice ale celor trei senzori s-au înregistrat în această soluție de KCl 0,1 M cu diferite viteze de scanare și în diverse domenii de potențial. S-au obținut semnale bine definite, cu puțin zgomot de fond când viteza de scanare a fost de $0,6 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. Domeniul de potențial optim a fost de la -0,4 V la +1,3 V, domeniul în care apa nu este implicată în procesele electrochimice de la nivelul electrodului de lucru. Procesele electrochimice ale CoPc și respectiv MB imobilizate în electrozi nu sunt favorizate în acest electrolit și în domeniul de potențial folosit. Drept urmare, au fost centralizate rezultatele obținute cu PB-SPCE modificați ce s-au determinat din CV, menționând în tabelul VII.1. următorii parametri: potențialul picului anodic (E_{pa}), potențialul picului catodic (E_{pc}), intensitatea picului anodic (I_{pa}) și intensitatea picului catodic (I_{pc}). De asemenea, s-au calculat $E_{1/2}$, ΔE_p și $|I_{pc}/I_{pa}|$.

Tabel VII.1. Parametrii electrochimici obținuți din voltamogramele ciclice ale PB-SPCE imersat în soluție KCl 0,1 M la $0,6 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$

Electrod	Perechea de picuri	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E_{1/2}$ (V) ($E_{pa}+E_{pc}/2$)	ΔE_p (V) ($E_{pa}-E_{pc}$)	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	I_{pc}/I_{pa}
PB-SPCE	I	0,221	-0,009	0,115	0,230	136,1	-186,5	1,36
	II	0,855	0,676	0,765	0,179	64,7	-60,5	1,07

Întrucât KCl este o substanță electroinactivă cele două perechi de picuri sunt datorate proceselor redox ale PB imobilizat în electrodul serigrafat.

Aceste rezultate sunt în conformitate cu cele prezentate în literatura de specialitate, diferențele fiind datorate particularității electrodului (de exemplu aria suprafeței, materialul suport) și tehnicii voltametrice (domeniu de potențial, viteza de scanare).

VII.1.2. Comportamentul electrochimic al PB-SPCE, MB-SPCE și CoPc-SPCE în soluție de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,001 M - KCl 0,1 M

$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ prezintă activitate redox și aceasta se poate evidenția cu electrozi de carbon sau din metale nobile utilizând CV când se obține un pic anodic și unul catodic datorate oxidării reversibile ale ionului ferocianură la fericianură [239,240].

Așa cum se observă în figura VII.3, există o diferență netă între procesele redox care se observă în CVs celor trei SPCEs modificați. Astfel, în cazul CoPc-SPCE se observă două picuri, unul anodic și unul catodic, iar în cazul MB-SPCE și PB-SPCE se observă două perechi de picuri redox. Deci, la nivelul MB-SPCE și PB-SPCE pe lângă procesul redox ferocianură/fericianură se observă și procesele redox ale modifierului electroactiv prezent în stratul sensibil.

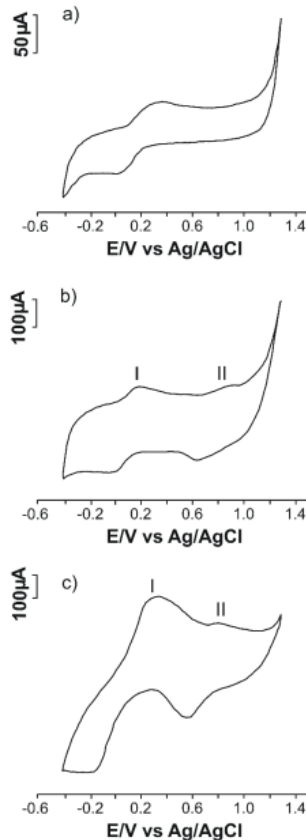


Figura VII.3. Voltamogramele ciclice ale: a) CoPc-SPCE; b) MB-SPCE; c) PB-SPCE imersați în soluție de $K_4[Fe(CN)_6]$ 0,001 M– KCl 0,1 M înregistrate cu viteza de scanare de $0,6 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$

Conform acestor rezultate obținute în urma măsurătorilor electrochimice, se poate observa că MB-SPCE și PB-SPCE, din figura VII.3.(b) și VII.3.c au cele mai bune răspunsuri înregistrate prin CV, unde pe lângă activitatea redox a soluției $K_4[Fe(CN)_6]$, se observă și activitatea compușilor electroactivi cu care au fost modificați senzorii, respectiv MB și PB.

Raportul I_{pc}/I_{pa} este mai mare sau mai mic decât valoarea ideală 1, dar apropiată de aceasta în cazul electrodului PB-SPCE (I_{pc}/I_{pa} este 1,05), demonstrând că procesul este cvasireversibil în cazul electrodului modificat cu PB. Rezultate similare s-au obținut și în cazul altor electrozi modificați cu CoPc sau MB [94,96,237].

VII.1.3. Răspunsul voltametric al senzorilor modificați în soluție de L-fenilalanină 0,001 M și KCl 0,1 M

Studiul celor 3 SPCEs modificați a continuat cu analiza soluției de L-Phe de concentrație 0,001 M dizolvată în KCl 0,1 M în domeniul de potențial de la -0,4 V la +1,3 V, la viteze de scanare diferite, cuprinse între $0,1 - 1,0 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. În figura VII.6. sunt prezentate voltamogramele ciclice obținute de fiecare SPCE modificat imersat în soluție de L-Phe, la viteza de scanare optimă de $0,6 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, întrucât zgomotul de fond a fost redus, iar semnalul bine definit.

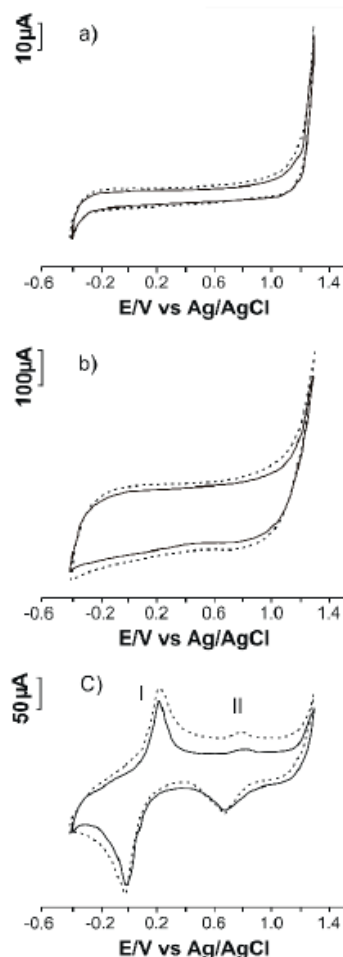


Figura VII.6. Voltamogramele ciclice ale a) CoPc-SPCE; b) MB-SPCE; c) PB-SPCE imersați în soluție de KCl 0,1 M (linia punctată) și în soluție de L-Phe 0,001 M - KCl 0,1 M (linia continuă) înregistrate cu $0,6 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$

Prin urmare, pentru detecția L-Phe se va folosi PB-SPCE, acesta fiind cel mai sensibil dintre cei trei electrozi. Intensitățile picurilor și potențialele obținute prin CV pentru senzorul PB-SPCE sunt detaliate în tabelul VII.4.

Tabel VII.4. Parametrii electrochimici obținuți din voltamogramele ciclice ale PB-SPCE imersat în soluție de Phe 0,001 M - KCl 0,1 M la $0,6 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$

Senzor	Perechea de picuri	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E_{1/2}$ (V)	ΔE_p (V)	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	I_{pc}/I_{pa}
PB-SPCE	I	0,210	-0,024	0,117	0,234	122,5	-158,2	1,29
	II	0,824	0,697	0,760	0,127	46,3	-43,2	0,93

Din compararea voltamogramelor ciclice obținute în soluție de KCl cu cele obținute în soluție L-Phe - KCl (tabelul VII.1., tabelul VII.4. și figura VII.6.) se observă că picurile sunt mai puțin intense în soluția ce conține L-Phe.

VII.1.4. Influența concentrației de L-fenilalanină asupra răspunsului voltametric al PB-SPCE

Concentrația soluțiilor de analizat are o importanță crucială în răspunsul unui senzor electrochimic. Pentru a determina influența concentrației L-Phe asupra PB-SPCE s-au înregistrat voltamogramele ciclice în soluții de L-Phe de concentrații diferite dizolvată în soluție de KCl 0,1 M, cuprinse între $0,33 - 21 \times 10^{-6}$ M. Răspunsurile electrochimice ale senzorului înregistrate prin CV sunt prezentate în figura VII.8.

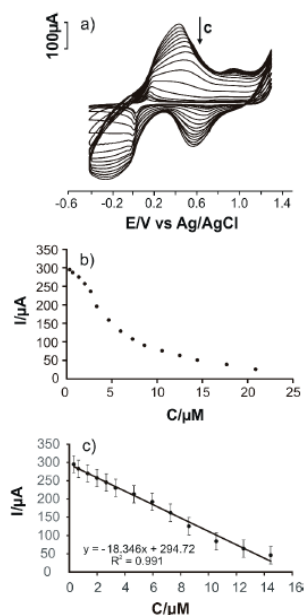


Figura VII.8. a) Voltamogramele ciclice ale PB-SPCE imersat în soluții de L-Phe în domeniul $0,33 - 21 \times 10^{-6}$ M. b) Reprezentarea grafică a dependenței dintre I_{pa} și concentrația de L-Phe în intervalul $0,33 - 21 \times 10^{-6}$ M. c) Dependența liniară dintre I_{pa} și concentrația de L-Phe în intervalul în domeniul $0,33 - 14,5 \times 10^{-6}$ M

Se observă că intensitatea picurilor crește odată cu creșterea concentrației (c). Valorile obținute pentru PB-SPCE sunt $LOD = 1,23 \times 10^{-8}$ M și $LOQ = 4,09 \times 10^{-8}$ M, valori similare sau mai mici decât cele raportate în literatura de specialitate [129]. Valorile LOD și LOQ ale senzorului PB-SPCE sunt foarte bune și prin urmare acest senzor s-a folosit pentru determinarea Phe din produse farmaceutice.

VII.1.5. Stabilitate, reproductibilitate și studii de interferență

Stabilitatea senzorului PB-SPCE a fost evaluată prin metoda voltametriei ciclice pentru 50 de scări consecutive. Senzorul PB-SPCE a menținut 96,2% din răspunsul inițial al curentului picului atunci când este imersat în soluție de Phe 5×10^{-6} M - KCl 0,1 M. În ceea ce privește stabilitatea pe termen lung a senzorului PB-SPCE, acesta a fost testat pe parcursul a zece zile, Senzorul PB-SPCE a păstrat 94% din răspunsul inițial după zece zile, cu o valoare a RSD de 3,28%. Aceste rezultate au demonstrat stabilitatea bună a senzorului. În plus, reproductibilitatea fabricării senzorului PB-SPCE a fost studiată prin pregătirea a cinci senzori diferiți.

Testele de reproductibilitate au fost efectuate în soluție de L-Phe 5×10^{-6} M - KCl 0,1 M. Valoarea RSD calculată pentru curentul picului anodic observat pentru toți cei cinci senzori a fost de 2,5%, demonstrând reproductibilitatea bună a dezvoltării sensorului.

Studiile de interferență ale sensorului PB-SPCE au fost efectuate în prezența unor specii chimice interferente folosind CV. Răspunsurile CV au fost înregistrate în soluție de L-Phe 5×10^{-6} M - KCl 0,1 M în prezența unei concentrații de 10 ori mai mare de specii interferente, cum ar fi glucoza, L-valină, L-metionină, L-histidină și acid ascorbic. Rezultatele obținute au arătat că sensorul PB-SPCE a reținut 93,5% din activitate în prezența speciilor chimice interferente. Prin urmare, sensorul PB-SPCE ar putea fi aplicat în analiza probelor reale.

VII.1.6. Determinarea cantitativă a L-fenilalaninei din produse farmaceutice

Pentru validarea sensorului în analiza L-Phe din probe reale au fost selectate și supuse analizei trei produse farmaceutice de la producători diferiți și care conțin L-Phe în concentrații diferite, după cum urmează: Amino 75 mg Solgar (L-Phe 75 mg), L-Phenylalanine 500 mg Solaray și DLPA 500 mg Solgar. Aceste produse farmaceutice s-au analizat prin două metode: CV (metoda dezvoltată în acest studiu) și FT-IR (metoda standard) [11].

Scopul acestor analize a fost compararea rezultatelor obținute prin cele 2 metode, precum și compararea cu valorile indicate de producători în prospectele produselor farmaceutice analizate. În tabelul VII.5. sunt prezentate rezultatele obținute în urma determinării cantitative a L-Phe prin cele 2 metode.

Tabel VII.5. Cantitatea de L-Phe măsurată în produse farmaceutice de diferite concentrații și de la producători diferiți

Produs farmaceutic	Cantitatea de L-Phe raportată de producător / mg	Cantitatea de L-Phe	
		Metoda CV/mg	Metoda FT-IR/mg
Amino 75	75	75±2	75±3
L-Phenylalanine 500	500	500±15	498±20
DLPA 500	500	500±14	503±22

O altă metodă prin care s-a determinat conținutul de L-Phe din produse farmaceutice a fost tehnica HPLC în tandem MS (spectrometria de masă) / ESI (cu ionizare electrospray) utilizând dispozitivul U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. În vederea realizării determinărilor calitative de identificare a AA-ului L-Phe din preparatele farmaceutice selectate, prin UHPLC-MS/ESI s-au optimizat și ulterior setat următoarele categorii de parametri operaționali: parametrii de ionizare HESI, parametrii de separare cromatografică, parametrii de operare MS (achiziția Full MS - vDIA (Achiziție independentă de date variabile)). Un exemplu de cromatogramă obținută cu dispozitivul U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS într-o probă reală este ilustrată în figura VII.11.

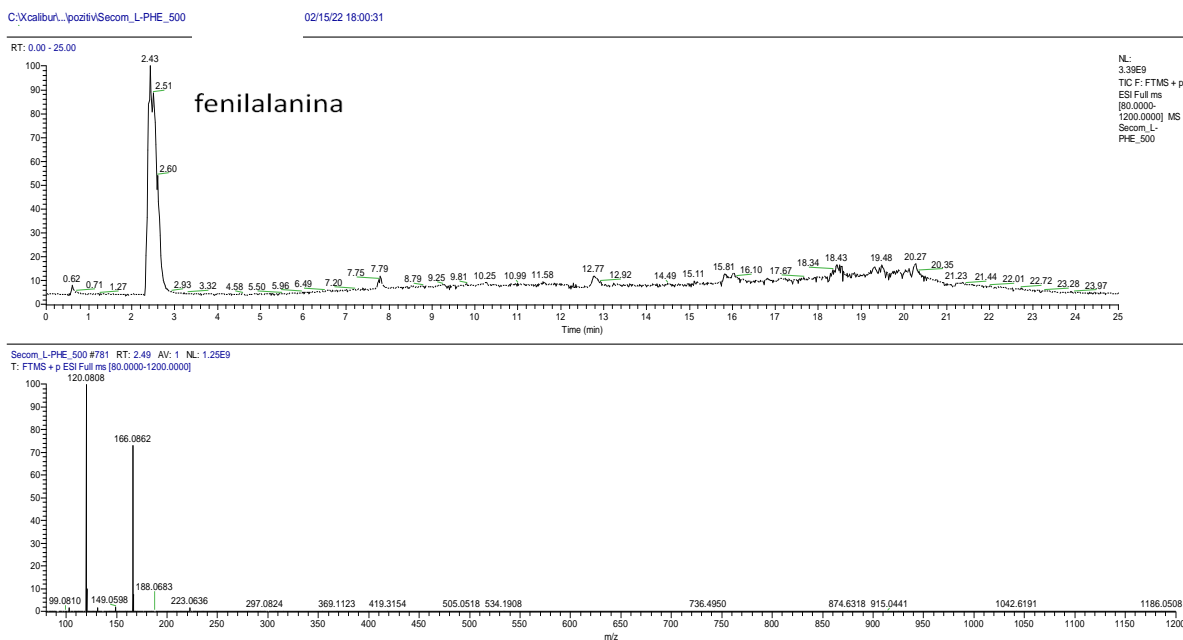


Figura VII.11. Analiza cromatografică a AA-ului L-Phe din produsul L-Phenylalanine (Solaray)

Conform datelor obținute, s-a calculat cantitatea de L-Phe per capsulă existentă în fiecare produs farmaceutic, rezultatele fiind centralizate în tabelul VII.8.

Tabel VII.8. Conținutul de L-Phe obținut prin metoda HPLC în probele analizate

Produs farmaceutic	Rezultate HPLC L-Phe (mg/capsulă)
L-Phenylalanine SECOM (500 mg L-Phe)	497,81
Amino 75 SOLGAR (75 mg L-Phe)	74,79
Cebrium EVER NEURO PHARM (4.012 mg L-Phe)	4,12

Datele obținute prin metoda cromatografică confirmă precizia metodelor CV și FT-IR, dovedind încă o dată că senzorii preparați sunt sensibili și selectivi față de AA-ul L-Phe.

VII.1.7. Concluzii

Senzorul modificat cu PB prezintă electroactivitate în toate mediile studiate ceea ce dovedește că acest senzor este util inclusiv pentru detecția compușilor redox inactivi cum este L-Phe.

Folosirea CV ca metodă de detecție a permis obținerea unor performanțe analitice foarte bune cu aplicabilitate în practica de laborator. S-a dovedit că senzorul PB-SPCE are performanțele analitice cele mai bune pentru determinarea L-Phe în produse farmaceutice. Are un domeniu de liniaritate vast, o sensibilitate ridicată și o LOD foarte mică.

Rezultatele obținute cu senzorul PB-SPCE sunt foarte apropiate cu cele obținute prin metoda standard și cele indicate de producător, la un nivel de precizie de 99%, demonstrând astfel că metoda propusă este mai rapidă, mai simplă și mai avantajoasă economic decât cele standard.

VII.2. Determinarea cantitativă prin voltametrie ciclică a L-triptofanului cu noul senzor modificat cu polipirol dopat cu $K_4[Fe(CN)_6]$

Această lucrare descrie dezvoltarea unui nou senzor cu aplicabilitate în determinarea și cuantificarea AA esențial L-TRP din produse farmaceutice. Senzorul propus are la bază un SPCE modificat cu polimerul conductor PPy dopat cu FeCN. Pentru modificarea SPCE cu PPy dopat cu FeCN s-a folosit CA.

Pentru studiul comportamentului electrochimic și al proprietăților sensibile ale senzorului la detecția L-TRP s-a folosit CV. Acest senzor dezvoltat a prezentat sensibilitate ridicată, o LOD scăzută de $1,05 \times 10^{-7}$ M, o LOQ egală cu $3,51 \times 10^{-7}$ M și un domeniu de liniaritate larg cuprins între $3,3 \times 10^{-7}$ M și $1,06 \times 10^{-5}$ M.

Performanțele analitice ale senzorului au fost evaluate pentru detecția L-TRP din preparate existente pe piața farmaceutică, iar rezultatele obținute de către acesta au evidențiat performanțe excelente, valide și comparabile cu cele obținute prin metoda standard.

VII.2.1. Prepararea prin metoda cronoamperometrică a senzorului PB/FeCN/SPCE

Pentru depunerea PPy pe SPCE s-a preparat o soluție de pirol 0,1 M și FeCN 0,1 M. 50 mL din soluție s-au introdus în celula electrochimică și apoi, în soluție, s-a introdus electrodul DRP-C110, făcându-se conexiunile la potențiosstatul EG&G.

Depunerea stratului de PPy în prezența agentului dopant (FeCN) s-a realizat cu ajutorul metodei CA, folosindu-se următorii parametri de lucru: potențialul de 0,8 V, timpul de depunere de 90 s. Cronoamperogramele obținute la electropolimerizare sunt prezentate în figura VII.14 sub două forme: dependența curentului în funcție de timp (figura VII.14.A) și dependența sarcinii în funcție de timp (figura VII.14.B).

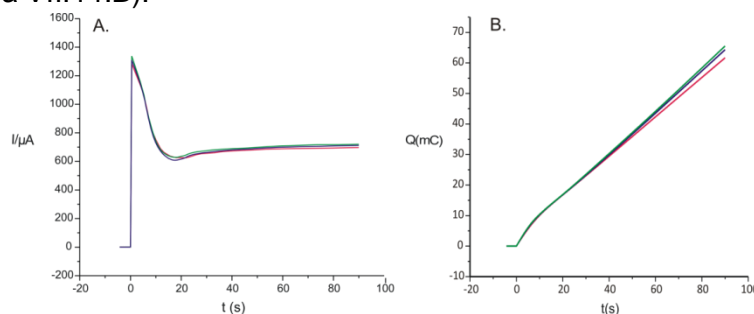


Figura VII.14. A. Dependența curentului (I) în funcție de timp (t) al curbelor înregistrate în timpul electrosintezei filmelor de PPy /FeCN la 0,8 V timp de 90 s; B. Dependența sarcinii (Q) în funcție de timp (t) în timpul electrosintezei PPy în prezența FeCN pentru trei replici de senzori

VII.2.2. Comportamentul electrochimic al electrodului DRP-110 nemodificat în soluție de L-triptofan 0,001 M - KCl 0,1 M

Înainte de modificare, SPCE a fost imersat în soluție de L-TRP 0,001 M - KCl 0,1 M și s-a înregistrat voltamograma ciclică, comparând astfel rezultatele obținute de către senzorul nemodificat cu cele ale senzorului modificat cu PPy/FeCN. Utilizând parametrii electrochimici menționați anterior, voltamograma obținută cu senzorul nemodificat la viteza de scanare $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ este prezentată în figura VII.15.

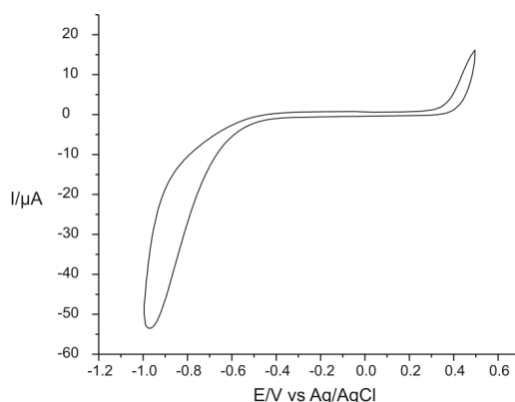


Figura VII.15. Comportamentul electrochimic al sensorului nemodificat în soluție de L-TRP 0,001 M și KCl 0,1 M la viteza de scanare $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$

VII.2.3. Răspunsul voltametric al electrodului modificat cu PPy/FeCN în soluție de KCl 0,1 M și în soluție de L-triptofan 0,001 M - KCl 0,1 M

După modificarea cu PPy/FeCN, comportamentul electrochimic al sensorului a fost analizat inițial într-o soluție de KCl 0,1 M, pentru a putea observa procesele redox ale PPy și ale ionului ferocianură inclus în matricea polimerică. În figura VII.16. se prezintă semnalul stabil al sensorului modificat imersat în KCl 0,1 M suprapus cu semnalul stabil al PPy/FeCN/SPCE imersat în soluție de L-TRP 0,001 M - KCl 0,1 M.

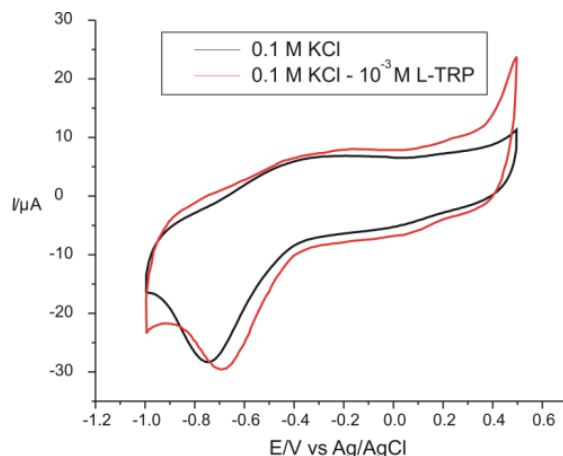


Figura VII.16. Răspunsul electrochimic al sensorului PPy/FeCN imersat în soluție de KCl 0,1 M (voltamograma neagră) și în soluție de L-TRP 0,001 M - KCl 0,1 M (voltamograma roșie) la $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$

Diferența importantă dintre cele două voltamograme este reprezentată de prezența AA L-TRP în cea de-a doua soluție în care a fost imersat electrodul, respectiv soluția de L-TRP 0,001 M având ca electrolit suport KCl 0,1 M.

Rezultatele obținute demonstrează că sensorul PPy/FeCN/SPCE poate fi util în detecția L-TRP, rezultate ce corespund celor raportate în alte lucrări științifice, cu mențiunea că anumite caracteristici ale electrodului (precum suprafața electrodului, materialul modifier) și anumiți parametri electrochimici (domeniul de potențial, viteza de scanare) diferă.

VII.2.4. Influența vitezei de scanare asupra răspunsului senzorului PPy/FeCN/SPCE

Senzorul propus pentru detecția L-TRP a fost imersat în soluția de L-TRP 0,001 M și KCl 0,1 M, înregistrându-se voltamogramele ciclice la 10 viteze de scanare diferite și obținându-se rezultatele prezentate în figura VII.17.A. Vitezele de scanare au variat între 0,1 – 1,0 V × s⁻¹.

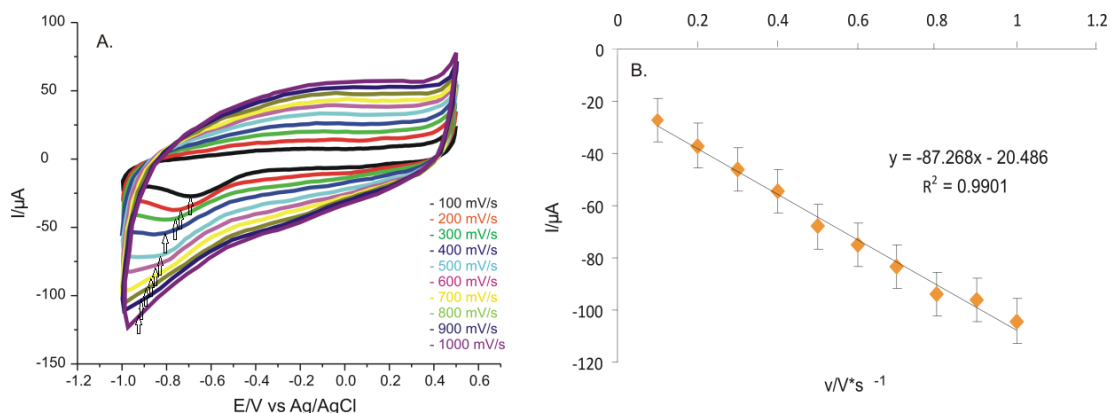


Figura VII.17. A. Voltamogramele ciclice ale senzorului PPy/FeCN-SPCE imersat în soluție de L-TRP 0,001 M - KCl 0,1 M, la viteze de scanare cuprinse între 0,1 și 1,0 V × s⁻¹ și B. Graficul dependenței liniare dintre I_{pc} și viteza de scanare

Ecuția lui Laviron a permis calculul gradului de acoperire pe suprafața electrodului cu centri activi, acesta fiind de $1,76 \times 10^{-10}$ mol × cm⁻², ținându-se totodată cont de ecuația liniară dintre viteza de scanare și curentul celui mai intens pic catodic. Această valoare este apropiată de rezultatele raportate în articole științifice în care s-au modificat electrozi cu mediatori.

VII.2.5. Influența concentrației de triptofan asupra răspunsului senzorului PPy/FeCN/SPCE imersat în soluția de L-triptofan 0,001 M - KCl 0,1 M. Curba de calibrare.

Concentrația soluției de analizat s-a dovedit a fi importantă în răspunsurile electrochimice ale senzorului PPy/FeCN, folosindu-se astfel în prezentul studiu soluții cu concentrații diferite de L-TRP, dizolvat în soluție de KCl 0,1 M. Domeniul de concentrații studiat a fost cuprins între $3,33 \times 10^{-7}$ M și $2,72 \times 10^{-5}$ M. Domeniul de liniaritate obținut este cuprins între $3,3 \times 10^{-7}$ M și $1,06 \times 10^{-5}$ M, iar din ecuația de calibrare s-au calculat valorile pentru LOD și LOQ, raportate în tabelul VII.10.

Tabel VII.10. LOD și LOQ obținute cu senzorul PPy/FeCN

Senzor	LOD (M)	LOQ (M)
PPy/FeCN-SPCE	$1,05 \times 10^{-7}$	$3,51 \times 10^{-7}$

Limita de detecție obținută cu senzorul PPy/FeCN/SPCE este mai mică decât limitele senzorilor dezvoltați până în prezent în cercetările științifice [220], putând fi utilizat pentru detecția sensibilă a L-TRP din probe farmaceutice.

VII.2.6. Precizia, stabilitatea și reproductibilitatea senzorului

Studiile de precizie efectuate pentru senzorul PPy/FeCN s-au realizat atât în aceeași zi, cât și în zile diferite, pe soluții cu conținut de L-TRP, de concentrație 5×10^{-6} M. Precizia a fost evaluată în 4 zile diferite, dar și în trei momente diferite ale zilei, la un interval de 2 ore. RSD % a prezentat următoarele valori 4,2% inter-day, respectiv 3.8% intra-day.

Stabilitatea bună a senzorului PPy/FeCN, atât pe termen scurt, cât și pe termen lung, a fost demonstrată prin metoda CV. Pe termen scurt s-au înregistrat 30 de scanări consecutive cu senzorul realizat în soluție de L-TRP 5×10^{-6} M - KCl 0,1 M, menținându-și intensitățile picurilor în proporție de 97,8% față de răspunsul inițial. Pe termen lung s-a obținut un procent de 96% de stabilitate din răspunsul inițial, după 5 zile, RSD prezentând o valoare de 95 % .

De asemenea, reproductibilitatea senzorului s-a efectuat tot în soluție de L-TRP 5×10^{-6} M - KCl 0,1 M, preparându-se 3 senzori diferiți. Valoarea RSD pentru curentul picului catodic observat în toate cele 3 cazuri a fost de 3,1 %.

VII.2.7. Validarea senzorului prin determinarea cantitativă a L-triptofanului din probe farmaceutice

O serie de produse existente pe piața farmaceutică conțin substanța supusă prezentului studiu, respectiv L-TRP. Dintre acestea, Cebrium și Sleep Optimizer au fost testate în scopul validării senzorului folosind metoda FT-IR precum și prin compararea rezultatelor electroanalitice cu cele indicate de producători. Cele două produse farmaceutice au compoziții diferite, concentrații diferite de L-TRP și provin de la producători diferiți.

În figura VII.19 se prezintă răspunsurile senzorului imersat în soluții de L-TRP obținute din produsele farmaceutice analizate. Concentrația estimată de L-TRP în soluțiile supuse analizei a fost de 5×10^{-6} M.

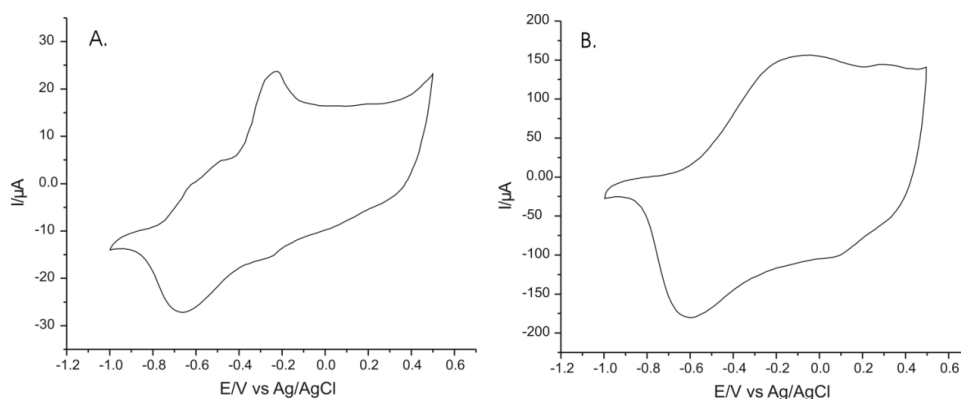


Figura VII.19. Răspunsurile voltametrice ale senzorului PPy/FeCN în soluții de: A. Cebrium (EVER NEURO PHARMA); B. Sleep Optimizer (SOLARAY)

VII.2.8. Concluzii

Metoda CA s-a dovedit a fi eficientă pentru depunerea PPy dopat cu FeCN prin electropolimerizare pe suprafața unui SPCE. Senzorul dezvoltat în acest studiu, PPy/FeCN/SPCE, prezintă utilitate în detecția L-TRP atât din soluții model, cât și din produse farmaceutice, prezentând rezultate electroanalitice excelente: sensibilitate ridicată, stabilitate bună și precizie. Rapiditatea răspunsului, costul scăzut și varietatea domeniilor în care poate fi aplicat acest nou

dispozitiv realizat pentru detecția L-TRP, respectiv în medicină, farmacie, chimie și industrie alimentară, selectivitatea foarte bună demonstrată de senzorul preparat la adaosuri de compuși care se găsesc în probele reale, sunt avantaje importante pentru plasarea acestuia pe piața comercială, putând contribui astfel la controlul calității produselor farmaceutice, la monitorizarea unor afecțiuni provocate de carența sau excesul de L-TRP, sau la controlul calității alimentelor.

VII.3. Studiul comparativ privind identificarea și cuantificarea experimentală a L-tirozinei din produse farmaceutice cu noul senzor PPy/FeCN/SPCE și noul biosenzor PPy/FeCN/Lacc/SPCE

În acest studiu, o serie de SPCEs au fost modificate cu PPy și dopate cu diferiți agenți, precum FeCN, Nitroprusiat de sodiu (NP) și Dodecilsulfat de sodiu (SDS), în scopul detecției selective și sensibile a acestui AA.

Pe de altă parte, au fost preparați și o serie de biosenzori modificate cu polimerul conductor (CP) PPy dopat cu FeCN, polimerul fiind selectat pentru proprietățile sale excelente, respectiv permeabilitate, conductivitate și stabilitate. Enzima Lacc, a fost ulterior imobilizată în matricea polimerică și reticulată cu glutaraldehidă (GA), întrucât această enzimă este un catalizator termostabil, obținând astfel un biosenzor performant.

Dezvoltarea și caracterizarea senzorilor și biosenzorilor s-a realizat prin următoarele metode electrochimice: CA, CV, microscopie electronică cu scanare (SEM), FT-IR.

VII.3.1. Procesul de preparare a senzorului PPy/FeCN/SPCE, respectiv a biosenzorului PPy/FeCN/Lacc/SPCE

VII.3.1.1. Prepararea soluției monomer-agent dopant

Pentru modificarea senzorului s-a utilizat o soluție obținută din pirol, FeCN și KCl, de concentrație pirol 0,1 M/FeCN 0,1 M/KCl 0,1 M. Pentru omogenizarea celor trei compuși, balonul cotate cu soluția preparată a fost introdus în baia cu ultrasunete timp de 5 minute. Depunerea s-a realizat prin conectarea SPCE DRP-C110 la potențostatul EG&G și imersarea acestuia în soluția monomer/agent dopant aflată în celula electrochimică, aplicând un potențial de 0,8 V timp de 90 s, la o temperatură constantă de 25°C. Ulterior, acești senzori preparați au fost clătiți cu apă ultrapură. Metoda de caracterizare a modificărilor ce au avut loc la suprafața de lucru a senzorului a fost CA.

VII.3.1.2. Fabricarea senzorului prin doparea polipirolului pe suprafața electrodului prin cronoamperometrie

În prezenta cercetare s-au modificat electrochimic SPCEs în scopul detecției L-Tyr. Pentru depunerea PPy, în prima etapă s-au realizat trei soluții diferite de monomer/agent dopant (FeCN, SDS și NP) de concentrație 0,1 M/0,1 M.

Ulterior comportamentul electrochimic al senzorilor PPy/FeCN/SPCE, PPy/SDS/SPCE și PPy/NP/SPCE a fost analizat prin metoda CV în soluție de KCl 0,1 M și apoi în soluție dublă de L-Tyr 0,001 M și KCl 0,1 M. În cazul acestei metode s-a lucrat cu următorii parametri: potențial inițial 0,0 V, potențial pozitiv maxim 0,5 V, potențial negativ maxim - 1,0 V, iar viteza de scanare a fost cuprinsă între 0,1 și 1,0 V × s⁻¹. S-au obținut cronoamperogramele prezentate în figura VII.22, provenind de la 6 senzori diferiți, dar analizați în aceleași tipuri de soluții.

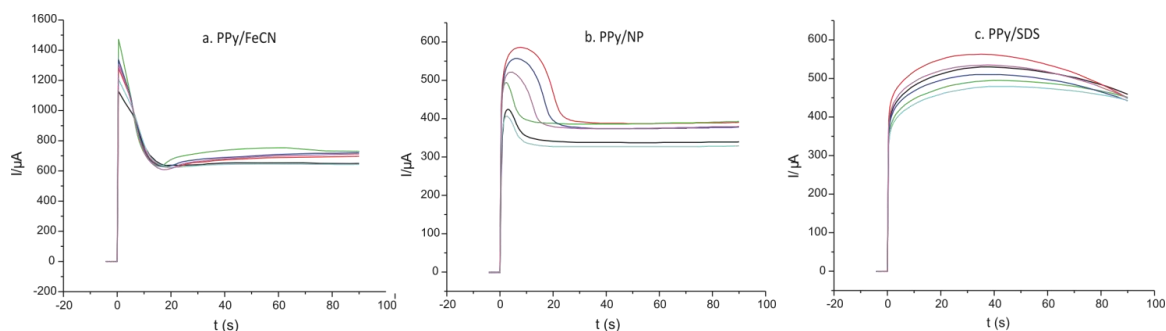


Figura VII.22. Curentul în funcție de timp al curbelor înregistrate în timpul electrosintezei celor șase senzori diferiți preparați în aceleași condiții (a) PPy/FeCN, (b) PPy/SDS și (c) PPy/NP

Agenții dopanți folosiți în acest studiu au fost selectați în funcție de o serie de caracteristici: electroactivitate, sarcini multiple și o masă moleculară mare. Aceste caracteristici ar trebui să îmbunătățească stabilitatea stratului sensibil, precum și sensibilitatea și selectivitatea.

VII.3.1.3. Fabricarea senzorului enzimatic prin imobilizarea enzimei lacază

VII.3.1.3.1. Lacaza - enzima utilizată la construcția biosenzorului

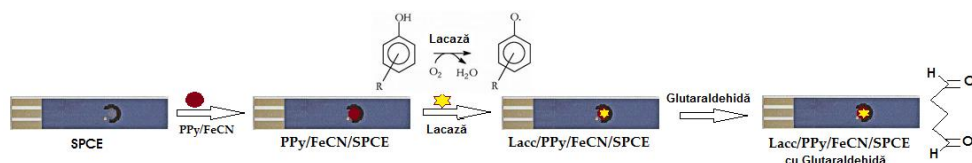
Descoperită încă din anii 1980 în arborele de lac, Lacc este o enzimă ce face parte din categoria oxidazelor de cupru ce reduce oxigenul molecular la apă. Enzima a fost selectată pentru acest studiu întrucât deține o serie de proprietăți catalitice unice, printre care și proprietatea de a oxida o varietate de substraturi organice, dar și unii compuși anorganici. Pe lângă aceste proprietăți, Lacc participă la degradarea polimerilor, la reticularea monomerilor și la scindarea inelului compușilor aromatici (așa cum sunt o parte dintre aminoacizi).

VII.3.1.3.2. Structura lacazei

Utilizată în industria farmaceutică, textilă, alimentară, chimică, pentru că oxidează nu doar substraturile toxice, cât și pe cele netoxice, Lacc este o enzimă foarte specifică și un catalizator eficient. Fiind cea mai veche și mai studiată formă enzimatică, Lacc se prezintă sub trei forme, în funcție de subunitatea de cupru: Lacc de tip 1, Lacc de tip 2 și Lacc de tip 3, putând fi diferențiate la UV-Vis.

VII.3.1.3.3. Mecanismul de acțiune al lacazei la suprafața biosenzorului

Transformarea senzorului PPy/FeCN/SPCE în biosenzorul PPy/FeCN/Lacc/SPCE s-a realizat prin turnarea în picături a unei soluții de enzimă Lacc pe suprafața electrodului de lucru, echivalentul a 10×10^{-6} M enzimă. Această etapă a fost urmată de o reticulare cu ajutorul reactivului GA și de o uscare. Tehnica de preparare a biosenzorului mai poartă denumirea de tehnică *drop-and-dry*, ilustrată în schema VII.5.



Schema VII.5. Diagrama schematică a imobilizării enzimei Lacc în construcția biosenzorului

VII.3.1.4. Analiza SEM a senzorului

Pentru caracterizarea senzorului din punct de vedere al grosimii și morfologiei stratului polimeric s-au folosit CA și SEM. Morfologia filmelor polimerice și imaginile obținute sunt prezentate în figura VII.27.

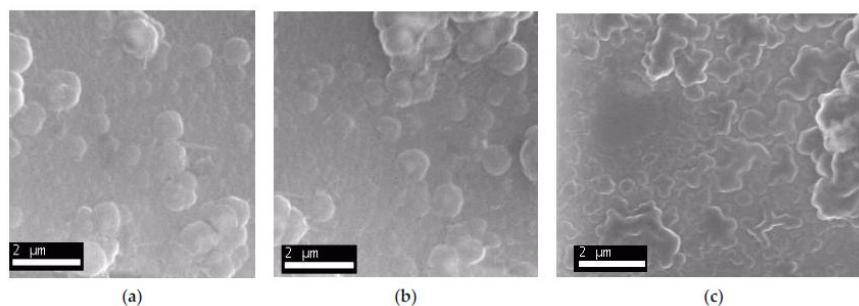


Figura VII.27. Imaginile obținute în urma SEM a senzorilor modificați cu PPy dopat cu: (a) FeCN; (b) NP și (c) SDS

VII.3.2. Caracterizarea senzorului și biosenzorului prin voltametrie ciclică

VII.3.2.1. Răspunsul electrochimic obținut în soluție de KCl 0,1 M și în soluție de L-tirozină 0,001 M - KCl 0,1 M de către electrodul DRP-110 nemodificat

Răspunsul electrochimic al SPCEs nemodificați a fost investigat în cele două soluții: soluție de KCl 0,1 M, respectiv în soluție de KCl 0,1 M - L-Tyr 0,001 M în domeniul de potențial de la -1,0 la 0,5 V. Acest pas este important pentru a putea compara rezultatele obținute de electrodul nemodificat cu cele obținute de electrozii modificați cu PPy dopați cu FeCN, NP și SDS, dar și cu electrodul modificat cu enzimă.

VII.3.2.2. Răspunsurile stabile ale electrozilor modificați chimic și biochimic imersați în soluție de KCl 0,1 M și în soluție de L-tirozină 0,001 M - KCl 0,1 M

- În soluție de KCl 0,1 M

Pentru stabilitatea acestor dispozitive, au fost înregistrate șase cicluri, la viteza de scanare $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, timp în care a avut loc atât stabilizarea în soluția de electrolit atât a PPy, în cazul senzorilor, cât și a Lacc, în cazul biosenzorilor [254]. Răspunsurile stabile ale senzorilor în soluția de KCl 0,1 M sunt ilustrate în figura VII.31, conform căreia se observă două picuri anodice și două picuri catodice care corespund pe de o parte proceselor redox ale PPy, iar sistemul redox II corespunde și procesului de oxido-reducere a ionului ferocianură imobilizat în matricea polimerică.

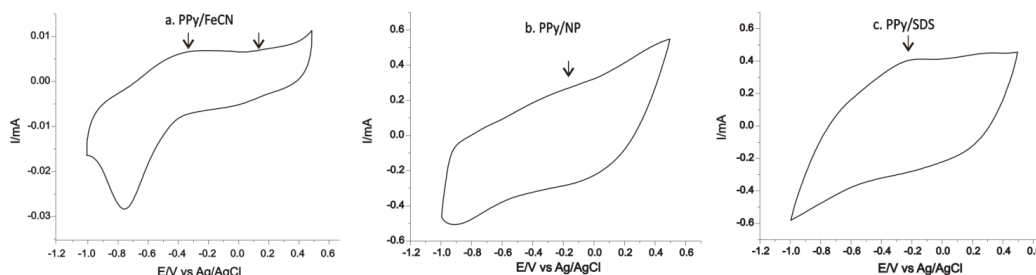


Figura VII.31. Răspunsurile stabile ale senzorilor pe bază de PPy imersați în soluție de KCl 0,1 M la viteza de scanare de $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$: (a) PPy/FeCN/SPCE (b) PPy/NP/SPCE (c) PPy/SDS/SPCE

Întrucât senzorul PPy/FeCN/SPCE prezintă picurile cele mai bine definite și un curent de fond mult mai redus comparativ cu ceilalți doi senzori, acesta a fost supus unei modificări suplimentare, transformându-l în senzor enzimatic, cu ajutorul enzimei Lacc. Astfel, s-a realizat un studiu comparativ privind răspunsurile stabile ale senzorului neenzimatic cu cele ale senzorului enzimatic, mai întâi în soluția de KCl 0,1 M, la aceeași viteză de scanare.

- În soluție de KCl 0,1 M - L-Tyr 0,001 M

În următoarea etapă, electrozii modificați au fost imersați într-o soluție de KCl 0,1 M - L-Tyr 0,001 M. La detecția AA L-Tyr răspunsurile electrochimice stabile obținute cu cei trei electrozi modificați cu PPy sunt prezentate în figura VII.33.

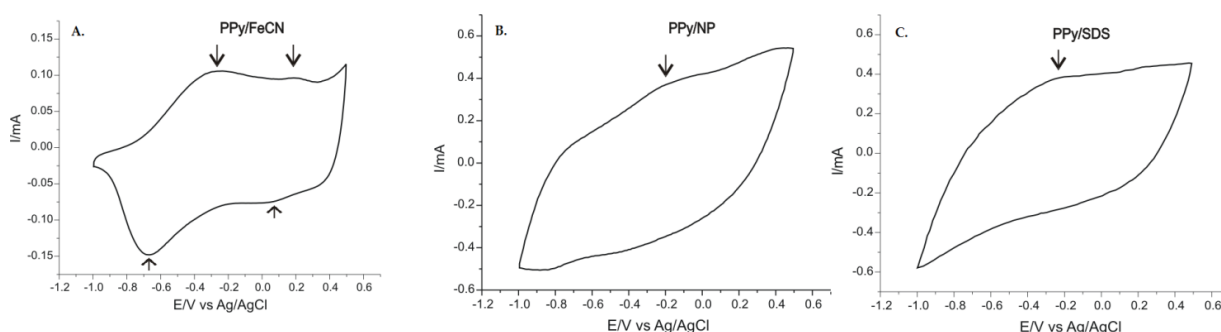


Figura VII.33. Răspunsurile electrochimice stabile ale senzorilor modificați cu PPy imersați în soluția de KCl 0,1 M - L-Tyr 0,001 M și înregistrate la viteza de scanare de $0,1 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ (a) PPy/FeCN/SPCE (b) PPy/NP/SPCE (c) PPy/SDS/SPCE

Se observă, intensități crescute ale picurilor anodice și catodice pentru senzorul neenzimatic imersat în soluția dublă.

O primă observație notabilă este cea dintre senzor și biosenzor, caz în care intensitățile picurilor sunt crescute atât la nivelul sistemului redox I, corespunzător PPy, cât și la nivelul sistemului redox II, corespunzător FeCN inclusă în matricea polimerică pe de o parte, pe de altă parte enzima Lacc oferă o selectivitate și o precizie mai bună biosenzorului.

VII.3.2.3. Efectul vitezei de scanare asupra senzorului, respectiv biosenzorului

Este bine cunoscut că viteza de scanare joacă un rol important în măsurătorile electrochimice, întrucât aceasta contribuie la evidențierea proceselor redox și influențează semnificativ răspunsurile voltametrice ale senzorilor. Voltamogramele au fost înregistrate la 10 viteze de scanare de la 0,1 la $1,0 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, în domeniul de potențial cuprins între -1,0 V și +0,5 V, făcând posibil astfel studiul caracteristicilor dinamice și a performanțelor senzorilor. Intensitățile picurilor sunt direct proporționale cu rădăcina pătrată din viteza de scanare, ceea ce indică faptul că procesele redox au ca etapă determinantă de viteză procesul de difuzie.

Din ecuația dependenței liniare și folosind ecuația lui Randles-Sevcik s-a calculat aria activă pentru cei trei senzori. Valorile obținute pentru A, suprafața activă a senzorului, calculată din panta ecuației de dependență dintre I_{pa} și $v^{1/2}$, precum și factorul de rugozitate sunt prezentate în tabelul VII.18.

Tabel VII.18. Suprafața activă și factorul de rugozitate pentru electrozii folosiți în analiză înainte și după modificare

Electrod	Soluție	Panta (mA × s ^{1/2} × V ^{-1/2})	R ²	Suprafața activă (cm ²)	Factorul de rugozitate
SPCE	L-Tyr 0,001 M - KCl 0,1 M	0,00005820	0,9946	0,0803	0,63
PPy/FeCN/SPCE		0,00085700	0,9972	1,1824	9,41
PPy/NP/SPCE		0,00027890	0,972	0,3847	3,06
PPy/SDS/SPCE		0,00034100	0,9910	0,4700	3,74

În concluzie, se observă că valoarea ariei active a senzorului PPy/FeCN este cea mai mare, deci acest senzor prezintă cea mai mare sensibilitate pentru detecția L-Tyr, drept pentru care s-a studiat mai departe influența vitezei de scanare pentru acest senzor comparativ cu biosenzorul preparat, tot în soluția de electrolit L-Tyr 0,001 M - KCl 0,1 M.

VII.3.2.4. Curbele de calibrare și limitele de detecție obținute de către senzorul PPy/FeCN/SPCE, respectiv biosenzorul PPy/FeCN/Lacc/SPCE

Această etapă este importantă deoarece din ecuația dreptei de calibrare se poate calcula LOD și LOQ a fiecărui senzor modificat cu PPy. Domeniul de concentrație studiat a fost cuprins între 0,5 – 27 × 10⁻⁶ M pentru toți cei trei senzori realizați în această lucrare. Un aspect important privind acești trei electrozi este creșterea liniară a intensității picului anodic odată cu creșterea concentrației de L-Tyr. Sensibilitatea pentru determinarea L-Tyr cu senzorii modificați PPy/FeCN/SPCE, PPy/NP/SPCE, PPy/SDS/SPCE, cât și cu senzorul nemodificat a fost de 1,463 A/M; 0,2789 A/M; 0,3412 A/M; respectiv 0,1543 A/M. Determinările voltametrice s-au efectuat cu toți cei trei senzori, iar în tabelul VII.20 se prezintă valorile LOD și LOQ obținute la detecția L-Tyr.

Tabel VII.20. Datele obținute din dreptele de calibrare pentru senzorii PPy/FeCN, PPy/NP și PPy/SDS la detecția L-Tyr

Senzor	LOD (M)	LOQ (M)
PPy/FeCN/SPCE	8,20 × 10 ⁻⁸	2,73 × 10 ⁻⁷
PPy/NP/SPCE	4,30 × 10 ⁻⁷	1,43 × 10 ⁻⁶
PPy/SDS/SPCE	3,51 × 10 ⁻⁷	1,17 × 10 ⁻⁶

Valorile cele mai mici ale LOD și LOQ au fost obținute în cazul senzorului PPy/FeCN/SPCE, confirmându-se sensibilitatea superioară a acestui senzor. Prin urmare, rezultatele senzorului au fost comparate cu cele ale biosenzorului dezvoltat (Tabel VII.20.).

Tabel VII.21. Datele obținute pentru curbele de calibrare a senzorului Ppy/FeCN/SPCE și biosenzorului Ppy/FeCN/Lacc/SPCE la detecția L-Tyr

Electrod	LOD (M)	LOQ (M)
senzor PPy/FeCN/SPCE	3,76 × 10 ⁻⁷	1,25 × 10 ⁻⁶
biosenzor PPy/FeCN/Lacc/SPCE	2,29 × 10 ⁻⁸	7,63 × 10 ⁻⁸

VII.3.2.5. Studii de interferență și studii privind precizia, repetabilitatea, reproductibilitatea, stabilitatea senzorului și biosenzorului

Atât pentru senzor, cât și pentru biosenzor, s-au efectuat studii de precizie, repetabilitate, reproductibilitate și stabilitate. De exemplu, în ceea ce privește stabilitatea electrozului, aceasta a fost determinată în aceeași soluție de L-Tyr timp de trei săptămâni. După trei săptămâni, s-a constatat că electrozului păstrează 91% din răspunsul inițial al semnalului. Atunci când nu au fost utilizați, senzorii au fost păstrați în frigider la o temperatură de 4°C într-o cutie uscată închisă.

A fost studiată și reproductibilitatea procesului de fabricare. Cinci biosenzori au fost pregătiți în condiții identice și au fost înregistrate răspunsurile în L-Tyr 10^{-6} M. Așa cum se observă în figura VII.40, diferențele dintre răspunsurile biosenzorului au fost mici, cu o abatere standard relativă (RSD) de 2,7%.

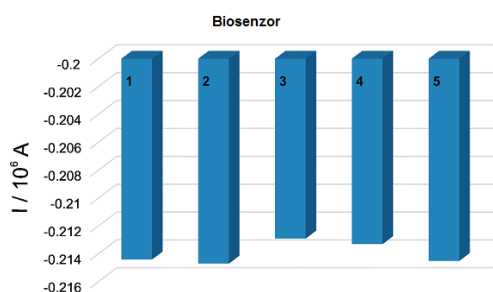


Figura VII.40. Stabilitatea răspunsurilor obținute cu 5 biosenzori modificați PPy/FeCN/Lacc/SPCE pentru L-Tyr de concentrație 10^{-5} M (RSD = 0,33%)

VII.3.2.6. Determinarea cantitativă a L-tirozinei cu senzorul și biosenzorul preparați, precum și validarea acestora pe probe reale

Trei produse farmaceutice, de la trei producători diferiți, care au în compoziție diferite concentrații de L-Tyr au fost selectate și analizate pentru validarea senzorilor și biosenzorilor preparați în acest studiu prin cuantificarea AA L-Tyr. Aceste produse farmaceutice au fost achiziționate de la farmaciile locale și poartă numele de L-Tyrosine (Solaray) (L-Tyr 500 mg), Tiroidin (Parapharm) (L-Tyr 90 mg) și Cebrum (Ever Neuro Pharma) (L-Tyr 4,012 mg), fiind analizate prin metoda CV. Prin urmare, concentrațiile fiecărui AA din soluția analizată au fost la un nivel similar.

PPy/FeCN/SPCE a fost folosit pentru cuantificarea L-Tyr din produsele farmaceutice deoarece are performanțele analitice cele mai bune dintre cei trei senzori realizați în această lucrare. Voltamogramele înregistrate cu PPy/FeCN/SPCE pentru soluțiile a două produse farmaceutice cu o concentrație de L-Tyr 0,001 sunt ilustrate în figura VII.41.

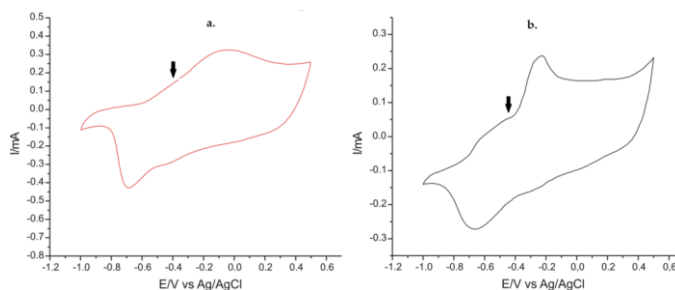


Figura VII.41. Răspunsurile voltametrice ale senzorului PPy/FeCN în soluție de: a. L-Tyrosine (Solaray); b. Cebrum (Ever Neuro Pharma).

Validarea electrozilor a fost efectuată prin metoda FT-IR. Rezultatele electroanalitice pentru cuantificarea L-Tyr obținută prin metoda CV bazată pe senzorul și biosenzorul dezvoltați în acest studiu au fost comparate atât cu cele obținute prin metoda FT-IR cât și cu cele furnizate de producătorii produselor farmaceutice analizate.

VII.3.2.7. Concluzii

Filmele de PPy dopate cu ionii FeCN, NP și SDS, au fost sintetizate cu succes prin metoda CA prin depunere pe SPCEs. Sensorii au fost folosiți pentru detecția L-Tyr în soluții etalon și în produse farmaceutice, dovedindu-se că PPy/FeCN/SPCE are cele mai bune performanțe electroanalitice. Prin utilizarea CV s-au atins performanțe analitice excelente ceea ce recomandă acest senzor pentru a fi folosit în practica de laborator. Rezultatele obținute cu PPy/FeCN/SPCE la cuantificarea L-Tyr au fost verificate prin metoda adaosului standard, obținându-se valori de recuperare bune. Metoda electroanalitică are o serie de avantaje importante pentru practica de laborator, cum sunt precizia, fiabilitatea, simplitatea și costul redus. Senzorul prezintă răspuns rapid, sensibilitate și stabilitate bune pentru detectarea voltamperometrică a L-Tyr, fiind utilă și pentru determinarea selectivă a probelor complexe care conțin diferiți AAs. Metoda voltamperometrică poate fi folosită în controlul calității produselor farmaceutice și fitoproduselor, precum și alte tipuri de probe de interes.

În acest studiu s-a dezvoltat un nou biosenzor prin imobilizarea enzimei Lacc la suprafața unui electrod modificat cu un material conductor cu proprietăți excelente, polimerul PPy dopat cu anionul FeCN, prin metoda CA. Caracterizarea electrodului modificat s-a efectuat prin tehnici voltametrice și spectroscopia FT-IR, rezultatele obținute demonstrând selectivitatea crescută a biosenzorului pentru determinarea cantitativă a L-Tyr, comparativ cu cele obținute de electrodul nemodificat cu enzima Lacc. De asemenea, Lacc și CP au demonstrat biocompatibilitate, proprietăți mecanice superioare și un raport mare suprafață - volum în cazul biosenzorului. Domeniul de concentrații în care a fost testat PPy/FeCN/Lacc/SPCE s-a încadrat în intervalul $0,2 - 6 \times 10^{-6}$ M iar LOD obținută a fost de $2,29 \times 10^{-8}$, o valoare mică comparativ cu senzorul neenzimativ și cu a altor dispozitive raportate în literatura de specialitate. Mai mult decât atât, acest nou biosenzor a demonstrat o bună stabilitate timp de o săptămână și recuperări acceptabile atunci când a fost testat pe probe reale, respectiv pe produse farmaceutice cu diferite concentrații de L-Tyr. Dezvoltarea acestui biosenzor se poate dovedi eficient în controlul calității produselor farmaceutice care conțin L-Tyr și reprezintă o provocare pentru cercetările viitoare, în sensul dezvoltării unui biosenzor care să detecteze nivelul de L-Tyr din alimente și fluide biologice încă de la naștere, deoarece un astfel de dispozitiv poate ajuta la prevenirea multor afecțiuni.

CAPITOLUL VIII. PRINCIPALII SENZORI ȘI BIOSENZORI VOLTAMETRICI RAPORTAȚI ÎN LITERATURA DE SPECIALITATE PENTRU DETECȚIA FENILALANINEI, TIROZINEI ȘI TRIPTOFANULUI

Pentru a demonstra că senzorii și biosenzorii dezvoltați în această teză de cercetare prezintă performanțe analitice foarte bune, am efectuat o documentare științifică cu privire la ceea ce s-a dezvoltat în ultimii 5-10 ani în acest sens. Deoarece studiile elaborate s-au axat pe electrozi modificați atât chimic, cât și biochimic, referințele în motoarele de căutare au avut în vedere

elementele modificatoare ale acestora: compuși organici electroactivi, polimeri conductori, polimeri imprimați molecular, enzime. Totodată s-a urmărit ca aceste dispozitive să fi fost studiate pentru detecția aminoacizilor (Phe, Tyr, TRP) prin tehnici electrochimice, precum: CV, CA, DPV, SWV, LSV.

Întrucât senzorii presupun etape de preparare diferite comparativ cu biosenzorii, rezultatele selectate din literatura de specialitate au fost structurate în două secțiuni: una în care sunt prezentați senzorii electrochimici și alta cu biosenzorii electrochimici.

CAPITOLUL IX. CONCLUZII GENERALE

Ultimii doi ani, în care piața farmaceutică mondială a avut o evoluție crescândă comparativ cu cea din anii 2017-2020, au marcat necesitatea existenței unor instrumente și dispozitive de control, de măsurare ori de verificare a calității medicamentelor. Prin urmare, obiectivul principal îndeplinit al acestei lucrări a fost de a dezvolta dispozitive ușor de manevrat, cu un cost redus, precise și sensibile la detecția unor aminoacizi din produse farmaceutice. Aminoacizii selectați, respectiv fenilalanina, tirozina și triptofanul, au fost cei mai solicitați de către populație, dar și recomandați de specialiștii din domeniul farmaco-medical, datorită consecințelor ce au apărut ca urmare a răspândirii și infectării cu noul coronavirus, dar mai ales a stărilor de panică, frică, stres cauzate de război. De asemenea, s-a urmărit ca excesul sau deficitul unuia dintre cei trei aminoacizi, să poată fi depistate cât mai timpuriu pentru a fi tratate corespunzător. În esență, prin intermediul unor dispozitive versatile s-a putut stabili asimilarea unei concentrații corecte de fenilalanină, tirozină sau triptofan, asigurând astfel cunoașterea biodisponibilității în organism a unei substanțe dintr-o formă farmaceutică (capsulă).

Am constatat astfel că:

- Fenilalanina, tirozina și triptofanul sunt aminoacizii cei mai căutați și studiați pentru tratarea unor afecțiuni ale sistemului nervos central (depresia, insomnia, anxietatea), însă nefiind găsită încă o metodă rapidă și eficientă de determinare cantitativă a lor din fluidele biologice, din produse farmaceutice sau din produse alimentare;

- Interesul crescut al cercetătorilor față de metodele electrochimice se datorează avantajelor pe care le dețin acestea, respectiv: economisesc timp de analiză, costurile sunt mai reduse, timpul de răspuns este mai rapid, utilizarea în cantități reduse a reactivilor;

- Polimerii conductori și polimerii imprimați molecular sunt materiale de generație nouă, având o sferă largă de utilizare, însă cu aplicații restrânse în ceea ce privește realizarea unor electrozi pentru detecția aminoacizilor;

- Albastru de Prusia, modificator al unui electrod serigrafiat de carbon, este un compus organic electroactiv prin care se pot detecta compuși redox inactivi, așa cum a fost detecția indirectă a aminoacidului fenilalanină din probe preparate cu produse farmaceutice;

- Cronoamperometria este o metoda electrochimică rapidă de modificare a electrozilor serigrafiați de carbon, obținându-se o reproductibilitate foarte bună a electropolimerizării senzorilor preparați în aceleași condiții experimentale;

- Polimerul conductor-polipirol împreună cu agentul dopant, ferocianura de potasiu, sunt modificatori chimici care au demonstrat semnale îmbunătățite ale electrozilor serigrafiați de carbon, detectând aminoacidul triptofan cu precizie, limită de detecție mare și sensibilitate crescută; dar mai

ales aminoacidul tirozină, când semnalele PPy/FeCN/SPCE au fost comparate cu ale altor doi electrozi modificați, respectiv PPy/NP/SPCE și PPy/SDS/SPCE;

- Lacaza este elementul modificador versatil ce a transformat senzorul PPy/FeCN/SPCE pentru detecția tirozinei în senzor biochimic, respectiv biosenzor. Această enzimă și-a demonstrat eficacitatea prin tehnica *drop-and-dry*, unde glutaraldehida a fost folosită ca agent reticulant, păstrându-și astfel activitatea enzimatică după multe utilizări ale biosenzorului;

- Cele mai importante informații și cele mai intense studii s-au efectuat folosind metoda voltametria ciclică. Această metodă a condus la obținerea unor rezultate originale, fiind folosită pentru studiul influenței unor parametri electrochimici importanți: viteza de scanare, concentrația analitului, studii de interferență, precizie, stabilitate și reproductibilitate;

- Pentru mecanismele redox s-au calculat aria suprafeței active sau coeficientul de difuzie, în funcție de parametrul care a influențat procesul redox;

- Toate modificările ce s-au aplicat electrozilor în laboratorul de senzori și biosensori au condus la rezultate cu performanțe crescute, dovedindu-le utilitatea pentru controlul calității produselor farmaceutice și alte tipuri de probe.

CAPITOLUL X. PERSPECTIVE VIITOARE DE CERCETARE

Oportunitatea de a realiza controlul complet, atât din punct de vedere cantitativ, cât și calitativ a unor medicamente sau OTC-uri (*over the counter drugs*) cu o serie de dispozitive versatile realizate în laboratorul de senzori și biosensori pot facilita multe activități desfășurate de inspectorii Agențiilor Naționale de Control a Calității Medicamentelor. Cu aceste dispozitive realizate în studiile anterior prezentate s-a demonstrat că sensibilitatea și selectivitatea crescute pot face din acestea instrumente veritabile de testare rapidă cu aplicabilitate în variate domenii: chimie, biochimie, medicină, farmacie, industrie alimentară ș.a.

Întrucât o parte din rezultatele obținute cu senzorii și biosenzorii pentru detecția Phe, Tyr și TRP, dezvoltați și prezentați în această teză de cercetare se numără printre cele mai bune în comparație cu cele raportate în literatura de specialitate, iar alte rezultate sunt chiar unice, așa cum am menționat în capitolul al VIII-lea, viitoarele studii propuse cu aceste dispozitive se axează pe următoarele obiective:

❖ testarea senzorilor și biosenzorilor pe fluidele biologice (urină, salivă, plasmă) pentru detecția celor trei AAs;

❖ lărgirea spectrului de detecție și pentru alți AAs de interes cu acțiune asupra SNC;

❖ studii suplimentare pentru modificările ce au loc la suprafața electrozilor prin metode precum: FT-IR, TEM, SEM etc.

❖ lărgirea spectrului de analiză electrochimică a senzorilor și biosenzorilor prin alte metode DPV, SWV, LSV.

❖ modificarea electrozilor cu alți CPs (PANi, Pth, PEDOT) și compararea rezultatelor cu cele obținute anterior;

❖ brevetarea dispozitivelor;

❖ plasarea pe piața comercială a senzorilor și biosenzorilor inițial prin realizarea unor campanii de testare gratuită în cadrul cabinetelor medicale, ulterior prin distribuirea la nivelul pieței farmaceutice și medicale;

❖ realizarea unor aplicații digitale (instalate pe smartphone, smartwatch, smart tv) conectate la dispozitivele realizate prin porturi USB pentru a asigura o monitorizare cu caracter continuu.

Tehnicile de detecție pot și ele îmbunătățite prin utilizarea unor noi tehnici, mai rapide și mai sensibile, cum sunt CV ultrarapidă sau prin combinarea tehnicilor de detecție, cum este tehnica spectroelectrochimică, ce combină tehnicile voltametrice cu spectroscopia în UV-Vis sau Raman. Aportul de informație de natură diferită poate aduce informații suplimentare utile în detecție și cuantificare.

Toate aceste activități sunt direcții viitoare de cercetare într-o etapă a studiilor postdoctorale, dar și pentru dezvoltarea unui plan de afaceri START-up, întrucât se încadrează în codurile CAEN 2651 și 3250 ce au ca domeniu de activitate *Fabricare de instrumente și dispozitive pentru măsură, verificare, control, navigație*, respectiv *Fabricarea de dispozitive, aparate și instrumente medicale și stomatologice*.

CAPITOLUL XI. VALORIFICAREA ȘI IMPACTUL REZULTATELOR CERCETĂRII

XI.1. Articole publicate în jurnale cotate ISI

➤ 2020

Dinu, A.; Apetrei, C., A Review on Electrochemical Sensors and Biosensors Used in Phenylalanine Electroanalysis, *Sensors* 2020, 20(9), 2496, <https://doi.org/10.3390/s20092496>, Factor de impact 3,576, Q1;

Dinu, A.; Apetrei, C., Voltammetric Determination of Phenylalanine Using Chemically Modified Screen-Printed Based Sensors, *Chemosensors* 2020, 8(4), 113, <https://doi.org/10.3390/chemosensors8040113>, Factor de impact 3,398, Q1.

➤ 2021

Dinu, A.; Apetrei, C., Development of Polypyrrole Modified Screen-Printed Carbon Electrode Based Sensors for Determination of L-Tyrosine in Pharmaceutical Products. *International Journal Molecular Sciences* 2021, 22(14), 7528, <https://doi.org/10.3390/ijms22147528>, Factor de impact 5,924, Q1;

Dinu, A.; Apetrei, C., Development of a Novel Sensor Based on Polypyrrole Doped with Potassium Hexacyanoferrate (II) for Detection of L-Tryptophan in Pharmaceuticals, *Inventions* 2021, 6(3), 56, <https://doi.org/10.3390/inventions6030056>.

➤ 2022

Dinu, A.; Apetrei, C., Quantification of Tyrosine in Pharmaceuticals with the New Biosensor Based on Laccase-Modified Polypyrrole Polymeric Thin Film. *Polymers* 2022, 14(3), 441. <https://doi.org/10.3390/polym14030441>, Factor de impact 4,329, Q1;

Dinu, A.; Apetrei, C., A Review of Sensors and Biosensors Modified with Conducting Polymers and Molecularly Imprinted Polymers Used in Electrochemical Detection of Amino Acids: Phenylalanine, Tyrosine, and Tryptophan, *International Journal Molecular Sciences* 2022, 23(3), 1218. <https://doi.org/10.3390/ijms23031218>, Factor de impact 5,924, Q1.

Factor de impact cumulat: 22,521 WOS

XI.2. Lucrări și postere prezentate la conferințe internaționale și naționale**➤ 2018**

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Development of polyaniline based sensors for the determination of ascorbic acid in pharmaceutical products, The 4th International Conference New Trends on Sensing - Monitoring - Telediagnosis for Life Sciences NT-SMT-LS 2018, Book of abstracts, pp. 39, Brașov, România, August 30 - September 1, 2018, **Conferință Internațională - poster**;

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Voltammetric Study of Phenylalanine by Means of Sensors Based on Polypyrrole Doped with Different Anions, Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG 2018 The Sixth Edition, Book of abstracts, pp 83, Galați, România, 7th-8th of June 2018, **Conferință Internațională - prezentare orală**;

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Development of the electrochemical sensors for the detection of neurotransmitters, European Conference of Psychiatry and Mental Health „Galatia 2018”, Abstract will be published in American Journal of Psychiatry and Neuroscience 2018, Galati, Romania, May 9-13, **Conferință Internațională - poster**;

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Development of voltammetric sensors based on conducting polymers for the detection of amino acids, 22nd Conference “New Cryogenic and Isotope Technologies for Energy and Environment” - EnergEn, Book of abstracts, pp 179, Băile Govora, România, October 24 – 26, 2018, **Conferință națională - poster**.

➤ 2019

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Determination of L-phenylalanine with polypyrrole sensors doped with different anions, Research and Innovation Salon, UGALINVENT, Edition IV, Book of abstracts, pp. 116, Galați, România, 16-18 October 2019, **Conferință Internațională - poster**.

➤ 2020

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Voltamperometric Sensors for Detection of the Amino Acid Phenylalanine, National online conference of Biophysics – CNB, Book of abstracts, pp. 66, Brașov, România, June 14 – 16, 2020, **Conferință națională - poster**;

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Electrochemical Sensor Modified with Cobalt Phthalocyanine for Voltammetric Determination of Phenylalanine, International online Conference - 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 116, Galați, România, June 18-19, 2020, **Conferință Internațională - prezentare orală**;

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Indirect voltammetric detection of acetylsalicylic acid with carbon paste electrodes, 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 262, Galați, România, June 18-19, 2020, **Conferință Internațională - poster**;

Ancuța Dinu, Dorin Dascalescu, Irina Georgiana Munteanu, Alexandra Virginia Bounegru, Ramona-Oana Rosca, Constantin Apetrei, Electrochemical sensors based on nanomaterials employed in water analysis, 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools

of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 258, Galați, România, June 18-19, 2020, **Conferință Internațională - poster;**

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Sensitive properties of screen printed carbon electrode modified with Meldola/s Blue for voltammetric detection of Phenylalanine, The 5th International Conference „New Trends on Sensing - Monitoring - Telediagnosis for Life Sciences NT-SMT-LS 2020”, Book of abstracts, pp. 103, Brașov (București), România, July 3 – 4, 2020, **Conferință Internațională - prezentare orală;**

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Sensitive properties of screen-printed carbon electrode modified with polypyrrole and various doppind agents for the voltammetric detection of different amino-acids, UGALMAT, International Conference on Materials Science & Engineering, Book of abstracts, pp. 25, December 8-9, 2020, Galați, România, **Conferință Internațională - prezentare orală.**

➤ **2021**

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Electrochemical Sensors and Biosensors Modified with Polypyrrole for the Detection of the Amino-acids L-Phenylalanine and L-Tyrosine, 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 111, Galați, România, June 10-11, 2021, **Conferință Internațională - online - prezentare orală;**

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Development of a Novel Biosensor Based on Laccase/Polypyrrole/Screen-Printed Electrode for Detection of L-Tyrosine in Pharmaceuticals, 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 278, Galați, România, June 10-11, 2021, **Conferință Internațională - online - poster;**

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

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Comparative study of two sensors performances regarding the detection of L-Phenylalanine and L-Tyrosine, 16th International Conference on European Integration - Realities and Perspectives, May 14-15, 2021, Galați, România, **Conferință Internațională - online - prezentare orală;**

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Versatile electrochemical devices for L-Tyrosine amino acid detection, 16th International Conference on European Integration - Realities and Perspectives, May 14-15, 2021, Galați, România, **Conferință Internațională - online - prezentare orală;**

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Electrochemical biosensors based on polypyrrole and laccase for the detection of L-Tyrosine in pharmaceutical products, Poster, The 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry, July 1-15, 2021, online chemosensors mdpi - 10.3390/CSAC2021-10626 (registering DOI), <https://sciforum.net/paper/view/10626>, **Conferință Internațională - online - poster.**

➤ 2022

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Molecularly imprinted polymers based electrochemical sensor for quantification of amino acids, International Conference on Contemporary Scientific and Technological Aspects towards an Entrepreneurial Approach, Universitatea Danubius, 25 februarie, 2022, Galați, România, **Conferință Internațională - online - prezentare orală**;

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Enzymes involved in the development of electrochemical biosensors for amino acid detection: phenylalanine, tyrosine, tryptophan, International Conference on Contemporary Scientific and Technological Aspects towards an Entrepreneurial Approach, Universitatea Danubius, 25 februarie, 2022, Galați, România, **Conferință Internațională - online - prezentare orală**;

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Modern Alternatives for Depression Monitoring by Measuring the Concentration of Amino Acids in Biological Fluids, European Conference of Psychiatry and Mental Health "Galatia 2022", 23-27 martie, Galați 2022, România, **Poster**;

Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Sensitivity, selectivity, precision and accuracy of the new devices designed to prevent post-COVID 19 depression and neuropsychiatric disorders caused by war, International online Conference - 10th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, Galați, România, 9-10 iunie, 2022, **Conferință Internațională - online - prezentare orală**.

XI.3. Premiarea rezultatelor cercetării**➤ 2018**

Premiul I - Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Dezvoltarea unor senzori pe bază de polianilină pentru determinarea acidului ascorbic din produse farmaceutice, Sesiunea de Comunicări Științifice Studentești – Secțiunea „Chimia în Slujba Umanității”, 17 mai 2018, Galați, România;

Premiul al II-lea - Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Voltammetric Study of Phenylalanine by Means of Sensors Based on Polypyrrole Doped with Different Anions, Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG 2018 The Sixth Edition, Book of abstracts, pp 83, Galați, România, 7th-8th of June 2018, **Conferință Internațională - prezentare orală**.

➤ 2020

Premiul al III-lea - Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Electrochemical Sensor Modified with Cobalt Phthalocyanine for Voltammetric Determination of Phenylalanine, International online Conference - 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 116, Galați, România, June 18-19, 2020, **Conferință Internațională - prezentare orală**.

Premiul *The most active team of students* - International online Summer School Food Safety and Healthy Living FSHL – 05 – 08 iulie, Brașov (București), 2020, România

➤ 2021

Premiul al II-lea - Ancuța Dinu, Constantin Apetrei, Electrochemical Sensors and Biosensors Modified with Polypyrrole for the Detection of the Amino-acids L-Phenylalanine and L-Tyrosine, 8th Edition of Scientific Conference organized by the Doctoral Schools of „Dunărea de

Ancuța DINU (IACOB)

Aplicații ale electrozilor modificate chimic și biochimic
în analiza aminoacizilor din produse farmaceutice

CONTRIBUȚII PERSONALE. Senzori și biosenzori dezvoltati pentru analiza fenilalaninei, tirozinei și triptofanului din produse farmaceutice

Jos” University of Galați, Book of abstracts, pp. 111, Galați, România, June 10-11, 2021, **Conferință Internațională - online - prezentare orală;**

Premiul al III - lea GALA CEREX IOSUD UDJG (Gala Cercetării de Excelență - Premierea rezultatelor cercetării științifice doctorale - Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați) - Dinu, A.; Apetrei, C., Development of Polypyrrole Modified Screen-Printed Carbon Electrode Based Sensors for Determination of L-Tyrosine in Pharmaceutical Products. International Journal Molecular Sciences 2021, 22(14), 7528, <https://doi.org/10.3390/ijms22147528>, Factor de impact 5.924, **Articol;**

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

XI.5. Activități conexe desfășurate în cadrul programului individual de studii universitare de doctorat

- **Participare la Școala Internațională Food Safety and Healthy Living FSHL – 05 – 08 iulie, Brașov (București), 2020, România;**
- **Participare la Sesiuni de comunicări științifice pentru studenți - 2018;**
- **Susținere de laboratoare la disciplinele:** Chimie, Cataliză (sub îndrumarea domnului **profesor dr. Habil Constantin Apetrei**), Poluare Chimică și Analiza Probelor de Mediu, Poluarea și Protecția Mediului (sub îndrumarea doamnei lector dr. Mihaela Timofti), Chimie analitică (sub îndrumarea doamnei profesor Maria Cioroi și doamnei conferențiar Simona Ștefan, Chimie Terapeutică (sub îndrumarea doamnei profesor Oana Dragostin și doamnei conferențiar Elena Lisă) - **2017-2022;**
- **Membră a grupului țintă a** Proiectului *Excelența academică și valori antreprenoriale - sistem de burse pentru asigurarea oportunităților de formare și dezvoltare a competențelor antreprenoriale ale doctoranzilor și postdoctoranzilor (ANTREPRENORDOC)*, cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Capital Uman, 2014-2020, Contract nr. 36355/23.05.2019 POCU/380/6/13 - Cod SMIS: 123847 - **2021**
- **Membră a comitetului de organizare** în cadrul Conferinței Școlilor Doctorale „Perspective și provocări în cercetarea doctorală”, Secțiunea Chemistry – Electrochemistry in Life Sciences, Galați - **2020,2021**

Participare la cursuri, seminarii, workshopuri, stagii de practică atât organizate atât de Școala Doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești, cât și de la proiectul ANTREPRENORDOC.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Tessari, P.; Lante, A.; Mosca, G. Essential Amino Acids: Master Regulators of Nutrition and Environmental Footprint? *Sci Rep* **2016**, *6*, 26074, doi:10.1038/srep26074.
2. Terstappen, F.; Tol, A.J.C.; Gremmels, H.; Wever, K.E.; Paauw, N.D.; Joles, J.A.; M. van der Beek, E.; Lely, A.T. Prenatal Amino Acid Supplementation to Improve Fetal Growth: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **2020**, *12*, 2535, doi:10.3390/nu12092535.
3. Alagawany, M.; Elnesr, S.S.; Farag, M.R.; Tiwari, R.; Yatoo, Mohd.I.; Karthik, K.; Michalak, I.; Dhama, K. Nutritional Significance of Amino Acids, Vitamins and Minerals as Nutraceuticals in Poultry Production and Health – a Comprehensive Review. *Veterinary Quarterly* **2021**, *41*, 1–29, doi:10.1080/01652176.2020.1857887.
4. Jiménez-Jiménez, F.J.; Alonso-Navarro, H.; García-Martín, E.; Agúndez, J.A.G. Cerebrospinal and Blood Levels of Amino Acids as Potential Biomarkers for Parkinson's Disease: Review and Meta-analysis. *Eur J Neurol* **2020**, *27*, 2336–2347, doi:10.1111/ene.14470.
5. Jing, X.; Dong, Q.; Hong, D.; Lu, R. Amino Acid Encoding Methods for Protein Sequences: A Comprehensive Review and Assessment. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. and Bioinf.* **2020**, *17*, 1918–1931, doi:10.1109/TCBB.2019.2911677.
6. Lopez, M.J.; Mohiuddin, S.S. Biochemistry, Essential Amino Acids. **2020**.
7. Damodaran, S. Amino Acids, Peptides and Proteins. *Fennema's food chemistry* **2008**, *4*, 425–439.
8. Akram, M.; Asif, H.; Uzair, M.; Akhtar, N.; Madni, A.; Shah, S.A.; Hasan, Z. Amino Acids: A Review Article. *Journal of Medicinal Plants Research* **2011**, *5*.
9. Wu, G. Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health. *Advances in nutrition* **2010**, *1*, 31–37.
10. Sanger, F. The Arrangement of Amino Acids in Proteins. In *Advances in protein chemistry*; Elsevier, **1952**; Vol. 7, pp. 1–67 ISBN 0065-3233.
11. Pharmacopoeia, J. European Pharmacopoeia. *Strasbourg: Council of Europe* **2002**.
12. Română, F. Ediția a Xa. *Editura Medicală, București* **1993**, 1060–1063.
13. Barrett, G. *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*; Springer Science & Business Media, **2012**; ISBN 94-009-4832-8.
14. Snider, M.J.; Wolfenden, R. The Rate of Spontaneous Decarboxylation of Amino Acids. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 11507–11508.
15. Rahman, M.; Mukherjee, A.; Kovalev, I.S.; Kopchuk, D.S.; Zyryanov, G.V.; Tsurkan, M.V.; Majee, A.; Ranu, B.C.; Charushin, V.N.; Chupakhin, O.N. Recent Advances on Diverse Decarboxylative Reactions of Amino Acids. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2019**, *361*, 2161–2214.
16. Roach, D.; Gehrke, C.W. Direct Esterification of the Protein Amino Acids: Gas-Liquid Chromatography of N-TFA n-Butyl Esters. *Journal of Chromatography A* **1969**, *44*, 269–278.
17. Bolm, C.; Hernández, J.G. From Synthesis of Amino Acids and Peptides to Enzymatic Catalysis: A Bottom-up Approach in Mechanochemistry. *ChemSusChem* **2018**, *11*, 1410–1420.

18. Koga, T.; Naraoka, H. Synthesis of Amino Acids from Aldehydes and Ammonia: Implications for Organic Reactions in Carbonaceous Chondrite Parent Bodies. *ACS Earth and Space Chemistry* **2022**.
19. Yemm, E.; Cocking, E.; Ricketts, R. The Determination of Amino-Acids with Ninhydrin. *Analyst* **1955**, *80*, 209–214.
20. Zhang, H.; Li, F.; Dun, J.; Sun, N.; Liu, H.; Chen, G. Combination of Derivatization–HPLC–MS and Enzymatic Hydrolysis–Edman Degradation for Amino Acid Sequence and Configuration of Polymyxin B Components. *Chromatographia* **2021**, *84*, 1057–1064.
21. Hyland, K.; Reott, M. Prevalence of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Deficiency in at-Risk Populations. *Pediatric neurology* **2020**, *106*, 38–42.
22. Buccitelli, C.; Selbach, M. MRNAs, Proteins and the Emerging Principles of Gene Expression Control. *Nature Reviews Genetics* **2020**, *21*, 630–644.
23. Genchi, G. An Overview on D-Amino Acids. *Amino Acids* **2017**, *49*, 1521–1533.
24. Estévez, M.; Xiong, Y. Intake of Oxidized Proteins and Amino Acids and Causative Oxidative Stress and Disease: Recent Scientific Evidences and Hypotheses. *Journal of food science* **2019**, *84*, 387–396.
25. Trinh, B.; Peletier, M.; Simonsen, C.; Plomgaard, P.; Karstoft, K.; Pedersen, B.K.; van Hall, G.; Ellingsgaard, H. Amino Acid Metabolism and Protein Turnover in Lean and Obese Humans during Exercise— Effect of IL-6 Receptor Blockade. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **2022**.
26. Bender, D.A. *Amino Acid Metabolism*; John Wiley & Sons, **2012**; ISBN 1-118-35818-X.
27. Cruzat, V.F.; Krause, M.; Newsholme, P. Amino Acid Supplementation and Impact on Immune Function in the Context of Exercise. *Journal of the international Society of Sports Nutrition* **2014**, *11*, 1–13.
28. Solano, F. Metabolism and Functions of Amino Acids in the Skin. *Amino Acids in Nutrition and Health* **2020**, 187–199.
29. Wu, G. Functional Amino Acids in Nutrition and Health. *Amino acids* **2013**, *45*, 407–411.
30. Vale, N.; Ferreira, A.; Matos, J.; Fresco, P.; Gouveia, M.J. Amino Acids in the Development of Prodrugs. *Molecules* **2018**, *23*, 2318.
31. Bongioanni, A.; Bueno, M.S.; Mezzano, B.A.; Longhi, M.R.; Garnerio, C. Amino Acids and Its Pharmaceutical Applications: A Mini Review. *International Journal of Pharmaceutics* **2022**, *613*, 121375, doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121375.
32. Dinu, A.; Apetrei, C. A Review on Electrochemical Sensors and Biosensors Used in Phenylalanine Electroanalysis. *Sensors* **2020**, *20*, 2496.
33. Liu, M.; Lao, J.; Wang, H.; Xu, Z.; Li, J.; Wen, L.; Yin, Z.; Luo, C.; Peng, H. Electrochemical Determination of Tyrosine Using Graphene and Gold Nanoparticle Composite Modified Glassy Carbon Electrode. *Russian Journal of Electrochemistry* **2021**, *57*, 41–50.
34. Xia, Y.; Zhao, F.; Zeng, B. A Molecularly Imprinted Copolymer Based Electrochemical Sensor for the Highly Sensitive Detection of L-Tryptophan. *Talanta* **2020**, *206*, 120245, doi:10.1016/j.talanta.2019.120245.
35. Wadhwa, R.; Lagenaur, C.F.; Cui, X.T. Electrochemically Controlled Release of Dexamethasone from Conducting Polymer Polypyrrole Coated Electrode. *Journal of Controlled Release* **2006**, *110*, 531–541, doi:10.1016/j.jconrel.2005.10.027.

36. Liu, Z.; Li, X.; Masai, H.; Huang, X.; Tsuda, S.; Terao, J.; Yang, J.; Guo, X. A Single-Molecule Electrical Approach for Amino Acid Detection and Chirality Recognition. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabe4365, doi:10.1126/sciadv.abe4365.
37. Pettiwala, A.M.; Singh, P.K. Optical Sensors for Detection of Amino Acids. *CMC* **2018**, *25*, 2272–2290, doi:10.2174/0929867324666171106161410.
38. Matthews, M.E.; Atkinson, I.; Presswala, L.; Najjar, O.; Gerhardstein, N.; Wei, R.; Rye, E.; Riga, A.T. Dielectric Classification of D-and L-Amino Acids by Thermal and Analytical Methods. *J Therm Anal Calorim* **2008**, *93*, 281–287, doi:10.1007/s10973-007-8835-8.
39. Xu, W.; Zhong, C.; Zou, C.; Wang, B.; Zhang, N. Analytical Methods for Amino Acid Determination in Organisms. *Amino Acids* **2020**, *52*, 1071–1088, doi:10.1007/s00726-020-02884-7.
40. Luo, Y.; Matejic, T.; Ng, C.-K.; Nunnally, B.; Porter, T.; Raso, S.; Rouse, J.; Shang, T.; Steckert, J. Characterization and Analysis of Biopharmaceutical Proteins. In *Separation Science and Technology*; Elsevier, **2011**; Vol. 10, pp. 283–359 ISBN 978-0-12-375680-0.
41. Jäntschi, L.; Nașcu, H.I. *Chimie Analitică Și Instrumentală*; AcademicPres, **2009**; ISBN 973-744-191-5.
42. Dan Li; Guo, M.; Kong, X.; Dai, G.; Lin, S. Volumetric Properties of Amino Acids in Aqueous Solutions of Glucosamine Hydrochloride at T = 293.15–313.15 K. *Russ. J. Phys. Chem.* **2019**, *93*, 2635–2644, doi:10.1134/S0036024419130132.
43. De Silva, V.; Oldham, C.D.; May, S.W. L-Phenylalanine Concentration in Blood of Phenylketonuria Patients: A Modified Enzyme Colorimetric Assay Compared with Amino Acid Analysis, Tandem Mass Spectrometry, and HPLC Methods. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **2010**, *48*, 1271–1279.
44. Shokrollahi, A.; Refahi, M. DEVELOPMENT OF CLOUD POINT EXTRACTION-SCANOMETRY, FOR THE PRECONCENTRATION AND DETERMINATION OF COLORLESS SPECIES: APPLICATION FOR THE DETERMINATION OF PHENYLALANINE. *Química Nova* **2019**, *42*, 36–41.
45. Fan, Y.; Liu, J.-H.; Lu, H.-T.; Zhang, Q. Electrochemistry and Voltammetric Determination of L-Tryptophan and L-Tyrosine Using a Glassy Carbon Electrode Modified with a Nafion/TiO₂-Graphene Composite Film. *Microchim Acta* **2011**, *173*, 241–247, doi:10.1007/s00604-011-0556-9.
46. Quintelas, C.; Braga, A.; Mesquita, D.P.; Amaral, A.L.; Ferreira, E.C.; Belo, I. NIR Spectroscopy Applied to the Determination of 2-phenylethanol and L-phenylalanine Concentrations in Culture Medium of *Yarrowia Lipolytica*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2019**, *94*, 812–818.
47. Li, C.F.; Du, L.M.; Wu, H.; Chang, Y.X. Determination of L-Phenylalanine by Cucurbit [7] Uril Sensitized Fluorescence Quenching Method. *Chinese Chemical Letters* **2011**, *22*, 851–854.
48. Naghashian-Haghighi, A.; Hemmateenejad, B.; Shamsipur, M. Determination of Enantiomeric Excess of Some Amino Acids by Second-Order Calibration of Kinetic-Fluorescence Data. *Analytical biochemistry* **2018**, *550*, 15–26.
49. Kang, C.; Wu, H.-L.; Xiang, S.-X.; Xie, L.-X.; Liu, Y.-J.; Yu, Y.-J.; Sun, J.-J.; Yu, R.-Q. Simultaneous Determination of Aromatic Amino Acids in Different Systems Using Three-

- Way Calibration Based on the PARAFAC-ALS Algorithm Coupled with EEM Fluorescence: Exploration of Second-Order Advantages. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 6358–6368.
50. Thiessen, G.; Robinson, R.; De Los Reyes, K.; Monnat, R.J.; Fu, E. Conversion of a Laboratory-Based Test for Phenylalanine Detection to a Simple Paper-Based Format and Implications for PKU Screening in Low-Resource Settings. *Analyst* **2015**, *140*, 609–615.
 51. Huo, J.Z.; Li, X.S.; An, J.D.; Li, Y.; Du, G.X.; Wu, X.X.; Liu, Y.Y.; Ding, B. Photo-Luminescent Chiral Carbon-Dot@ Eu (D-Cam) Nanocomposites for Selectively Luminescence Sensing of L-Phenylalanine. *Journal of Molecular Structure* **2020**, *1201*, 127214.
 52. Kamruzzaman, M.; Alam, A.-M.; Kim, K.M.; Lee, S.H.; Kim, Y.H.; Kim, G.-M.; Dang, T.D. Microfluidic Chip Based Chemiluminescence Detection of L-Phenylalanine in Pharmaceutical and Soft Drinks. *Food chemistry* **2012**, *135*, 57–62.
 53. Li, S.; Xing, M.; Wang, H.; Zhang, L.; Zhong, Y.; Chen, L. Determination of Tryptophan and Tyrosine by Chemiluminescence Based on a Luminol–N-Bromosuccinimide–ZnS Quantum Dots System. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 59286–59291, doi:10.1039/C5RA07233F.
 54. Kawana, S.; Nakagawa, K.; Hasegawa, Y.; Yamaguchi, S. Simple and Rapid Analytical Method for Detection of Amino Acids in Blood Using Blood Spot on Filter Paper, Fast-GC/MS and Isotope Dilution Technique. *Journal of Chromatography B* **2010**, *878*, 3113–3118.
 55. Dailey, C.A.; Garnier, N.; Rubakhin, S.S.; Sweedler, J.V. Automated Method for Analysis of Tryptophan and Tyrosine Metabolites Using Capillary Electrophoresis with Native Fluorescence Detection. *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405*, 2451–2459, doi:10.1007/s00216-012-6685-0.
 56. Hawkins, G.R.; Zipkin, I.; Marshall, L.M. Determination of Uric Acid, Tyrosine, Tryptophan, and Protein in Whole Human Parotid Saliva by Ultraviolet Absorption Spectrophotometry. *J Dent Res* **1963**, *42*, 1015–1022, doi:10.1177/00220345630420040301.
 57. Zhao, M.; Zhou, M.-F.; Feng, H.; Cong, X.-X.; Wang, X.-L. Determination of Tryptophan, Glutathione, and Uric Acid in Human Whole Blood Extract by Capillary Electrophoresis with a One-Step Electrochemically Reduced Graphene Oxide Modified Microelectrode. *Chromatographia* **2016**, *79*, 911–918, doi:10.1007/s10337-016-3115-z.
 58. Neurauter, G.; Scholl-Bürgi, S.; Haara, A.; Geisler, S.; Mayersbach, P.; Schennach, H.; Fuchs, D. Simultaneous Measurement of Phenylalanine and Tyrosine by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Fluorescence Detection. *Clinical biochemistry* **2013**, *46*, 1848–1851.
 59. Zhong, Y.-F.; Bao, G.-M.; Xia, Y.-F.; Peng, X.-X.; Peng, J.-F.; He, J.-X.; Lin, S.; Zeng, L.; Fan, Q.; Xiao, W.; et al. Recyclable Europium Functionalized Metal-Organic Fluorescent Probe for Detection of Tryptophan in Biological Fluids and Food Products. *Analytica Chimica Acta* **2021**, *1180*, 338897, doi:10.1016/j.aca.2021.338897.
 60. Bech-Andersen, S. Determination of Tryptophan with HPLC after Alkaline Hydrolysis in Autoclave Using α -Methyl-Tryptophan as Internal Standard. *Acta Agriculturae Scandinavica* **1991**, *41*, 305–309, doi:10.1080/00015129109439913.
 61. Boulet, L.; Faure, P.; Flore, P.; Montéréal, J.; Ducros, V. Simultaneous Determination of Tryptophan and 8 Metabolites in Human Plasma by Liquid Chromatography/Tandem Mass

- Spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2017**, *1054*, 36–43, doi:10.1016/j.jchromb.2017.04.010.
62. Whiley, L.; Nye, L.C.; Grant, I.; Andreas, N.; Chappell, K.E.; Sarafian, M.H.; Misra, R.; Plumb, R.S.; Lewis, M.R.; Nicholson, J.K.; et al. Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with Electrospray Ionization Quantification of Tryptophan Metabolites and Markers of Gut Health in Serum and Plasma—Application to Clinical and Epidemiology Cohorts. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 5207–5216, doi:10.1021/acs.analchem.8b05884.
63. Sereda, V.; Ralbovsky, N.M.; Vasudev, M.C.; Naik, R.R.; Lednev, I.K. Polarized Raman Spectroscopy for Determining the Orientation of Di-d-phenylalanine Molecules in a Nanotube. *Journal of Raman Spectroscopy* **2016**, *47*, 1056–1062.
64. da Silva, K.P.; Ptak, M.; Pizani, P.; Mendes Filho, J.; Melo, F.; Freire, P. Raman Spectroscopy of L-Phenylalanine Nitric Acid Submitted to High Pressure. *Vibrational Spectroscopy* **2016**, *85*, 97–103.
65. Oztekin, E.K.; Hahn, D.W. Differential Laser-Induced Perturbation Spectroscopy for Analysis of Mixtures of the Fluorophores L-Phenylalanine, L-Tyrosine and L-Tryptophan Using a Fluorescence Probe. *Photochemistry and photobiology* **2016**, *92*, 658–666.
66. Li, Q.Q.; Duan, J.; Wu, L.J.; Huang, Y.; Tang, G.; Min, S.G. Sucrose as Chiral Selector for Determining Enantiomeric Composition of Phenylalanine by UV–Vis Spectroscopy and Chemometrics. *Chinese Chemical Letters* **2012**, *23*, 1055–1058.
67. Prakash, M.; Geetha, D.; Caroline, M.L.; Ramesh, P. Crystal Growth, Structural, Optical, Dielectric and Thermal Studies of an Amino Acid Based Organic NLO Material: L-Phenylalanine L-Phenylalaninium Malonate. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, *83*, 461–466.
68. Hong, A.; Jang, H.; Jeong, C.; Choi, M.C.; Heo, J.; Kim, N.J. Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Jet-Cooled Phenylalanine and Its Hydrated Clusters. *The journal of physical chemistry letters* **2016**, *7*, 4385–4390.
69. Chen, S.; Fu, Y.; Bian, X.; Zhao, M.; Zuo, Y.; Ge, Y.; Xiao, Y.; Xiao, J.; Li, N.; Wu, J.-L. Investigation and Dynamic Profiling of Oligopeptides, Free Amino Acids and Derivatives during Pu-Erh Tea Fermentation by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Chemistry* **2022**, *371*, 131176, doi:10.1016/j.foodchem.2021.131176.
70. Orhan, H.; Vermeulen, N.P.; Tump, C.; Zappey, H.; Meerman, J.H. Simultaneous Determination of Tyrosine, Phenylalanine and Deoxyguanosine Oxidation Products by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry as Non-Invasive Biomarkers for Oxidative Damage. *Journal of Chromatography B* **2004**, *799*, 245–254.
71. Rigobello-Masini, M.; Masini, J.C. Sequential Injection Chromatography for Fluorimetric Determination of Intracellular Amino Acids in Marine Microalgae. In *Amino Acid Analysis*; Springer, **2012**; pp. 305–315.
72. Hu, H.; Smith, S.; Li, X.; Qian, Z.; Su, Y.; Lin, M.; Tu, J.; Liu, Y.-M. Fast Quantification of Free Amino Acids in Food by Microfluidic Voltage–Assisted Liquid Desorption Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2020**, *412*, 1947–1954, doi:10.1007/s00216-020-02450-w.

73. Glasstone, S. *An Introduction to Electrochemistry*; Read Books Ltd, **2011**; ISBN 1-4465-4546-6.
74. Bagotsky, V.S. *Fundamentals of Electrochemistry*; John Wiley & Sons, **2005**; Vol. 44; ISBN 0-471-74198-1.
75. Simões, F.R.; Xavier, M.G. Electrochemical Sensors. In *Nanoscience and its Applications*; Elsevier, **2017**; pp. 155–178 ISBN 978-0-323-49780-0.
76. Koncki, R. Recent Developments in Potentiometric Biosensors for Biomedical Analysis. *Analytica chimica acta* **2007**, *599*, 7–15.
77. Lingane, P.J.; Peters, D.G. Chronopotentiometry. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* **1971**, *1*, 587–634.
78. Zhou, Y.; Yu, B.; Levon, K. Potentiometric Sensing of Chiral Amino Acids. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2774–2779, doi:10.1021/cm030060e.
79. Amine, A.; Mohammadi, H. Amperometry. *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng* **2018**.
80. Sacchi, S.; Pollegioni, L.; Pilone, M.S.; Rossetti, C. Determination of D-Amino Acids Using a D-Amino Acid Oxidase Biosensor with Spectrophotometric and Potentiometric Detection. *Biotechnology techniques* **1998**, *12*, 149–153.
81. Lingane, J.J. Coulometric Analysis. *Journal of the American Chemical Society* **1945**, *67*, 1916–1922.
82. Canali, C.; Larsen, L.B.; Martinsen, Ø.G.; Heiskanen, A. Conductometric Analysis in Bio-Applications: A Universal Impedance Spectroscopy-Based Approach Using Modified Electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *212*, 544–550.
83. Puthongkham, P.; Venton, B.J. Recent Advances in Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *Analyst* **2020**, *145*, 1087–1102.
84. Marken, F.; Neudeck, A.; Bond, A.M. Cyclic Voltammetry. In *Electroanalytical methods*; Springer, **2010**; pp. 57–106.
85. Xu, T.; Dai, H.; Jin, Y. Electrochemical Sensing of Lead (II) by Differential Pulse Voltammetry Using Conductive Polypyrrole Nanoparticles. *Microchimica Acta* **2020**, *187*, 1–7.
86. Taei, M.; Ramazani, G. Simultaneous Determination of Norepinephrine, Acetaminophen and Tyrosine by Differential Pulse Voltammetry Using Au-Nanoparticles/Poly(2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propane-1,3-Diol) Film Modified Glassy Carbon Electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *123*, 23–32, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.09.005.
87. Mirceski, V.; Gulaboski, R.; Lovric, M.; Bogeski, I.; Kappl, R.; Hoth, M. Square-wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 2411–2422.
88. Ensafi, A.A.; Karimi-Maleh, H.; Mallakpour, S. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Acetaminophen, and Tryptophan by Square Wave Voltammetry Using N-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-3,5-Dinitrobenzamide-Modified Carbon Nanotubes Paste Electrode. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 666–675, doi:10.1002/elan.201100465.
89. Davies, T.J.; Compton, R.G. The Cyclic and Linear Sweep Voltammetry of Regular and Random Arrays of Microdisc Electrodes: Theory. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005**, *585*, 63–82.
90. Pletcher, D.; Greff, R.; Peat, R.; Peter, L.; Robinson, J. *Instrumental Methods in Electrochemistry*; Elsevier, **2001**; ISBN 1-78242-054-1.

91. Wang, X.; Ahmad, M.; Sun, H. Three-Dimensional ZnO Hierarchical Nanostructures: Solution Phase Synthesis and Applications. *Materials* **2017**, *10*, 1304, doi:10.3390/ma10111304.
92. Asal, M.; Özen, Ö.; Şahinler, M.; Baysal, H.T.; Polatoğlu, İ. An Overview of Biomolecules, Immobilization Methods and Support Materials of Biosensors. *SR* **2019**, *39*, 377–386, doi:10.1108/SR-04-2018-0084.
93. Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, *8*, 1400–1458, doi:10.3390/s80314000.
94. Adamski, J.; Kochana, J. Meldola's Blue—Doped Titania Sol-Gel Sensor for NADH Determination. *Open Chemistry* **2011**, *9*, 185–191.
95. HUTANU, F.; Gheorghe, G. MODIFIED PRUSSIAN BLUE SCREEN PRINTED ELECTRODES FOR H₂O₂ DETECTION. *Food and Environment Safety Journal* **2016**, *12*.
96. Apetrei, I.; Rodriguez-Mendez, M.; Apetrei, C.; De Saja, J. Enzyme Sensor Based on Carbon Nanotubes/Cobalt (II) Phthalocyanine and Tyrosinase Used in Pharmaceutical Analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *177*, 138–144.
97. Namazi, H. Polymers in Our Daily Life. *Bioimpacts* **2017**, *7*, 73–74, doi:10.15171/bi.2017.09.
98. Kane-Maguire, L.A.P.; Wallace, G.G. Chiral Conducting Polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2545, doi:10.1039/b908001p.
99. Ravichandran, R.; Sundarajan, S.; Venugopal, J.R.; Mukherjee, S.; Ramakrishna, S. Applications of Conducting Polymers and Their Issues in Biomedical Engineering. *J. R. Soc. Interface.* **2010**, *7*, doi:10.1098/rsif.2010.0120.focus.
100. Saldívar-Guerra, E.; Vivaldo-Lima, E. Introduction to Polymers and Polymer Types. In *Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing*; Saldívar-Guerra, E., Vivaldo-Lima, E., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2013**; pp. 1–14 ISBN 978-1-118-48079-3.
101. Yussuf, A.; Al-Saleh, M.; Al-Enezi, S.; Abraham, G. Synthesis and Characterization of Conductive Polypyrrole: The Influence of the Oxidants and Monomer on the Electrical, Thermal, and Morphological Properties. *International Journal of Polymer Science* **2018**, *2018*, 1–8, doi:10.1155/2018/4191747.
102. Zaabal, M.; Bakirhan, N.K.; Doulache, M.; Kaddour, S.; Saidat, B.; Ozkan, S.A. A New Approach on Sensitive Assay of Adefovir in Pharmaceutical and Biological Fluid Samples Using Polypyrrole Modified Glassy Carbon Electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2020**, *323*, 128657, doi:10.1016/j.snb.2020.128657.
103. Tat'yana, V.V.; Efimov, O.N. Polypyrrole: A Conducting Polymer; Its Synthesis, Properties and Applications. *Russian chemical reviews* **1997**, *66*, 443.
104. Geană, E.-I.; Artem, V.; Apetrei, C. Discrimination and Classification of Wines Based on Polypyrrole Modified Screen-Printed Carbon Electrodes Coupled with Multivariate Data Analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* **2021**, *96*, 103704, doi:10.1016/j.jfca.2020.103704.
105. Apetrei, I.; Apetrei, C. Application of Voltammetric E-Tongue for the Detection of Ammonia and Putrescine in Beef Products. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *234*, 371–379.