

## Exploratory Research Project (PCE-38)-2021-2023

**New Improved Reliable Platforms with Modern Nano-Technology for On-site Real-Time Detection in Automated Data-Intensive Process MONitor and Control Systems**

**Contract Nr. PCE 38/2021: Noi platforme fiabile cu nanotehnologie modernă pentru detectie on-site, în timp real în procesul de monitorizare automata de date intensive si sisteme de control**

**(Acronim: PORAPMONS)**

**PN-III-P4-ID-PCE-2020-0059**

**Director de proiect (PL: Prof. Univ. Dr. CS1 Jacobus (Koos) Frederick van Staden**

**Laboratorul de Electrochimie si PATLAB, București al INCDEMC, Timișoara**

**Instituția gazdă a proiectului: National Institute of Research and Development for Electrochemistry and Condensed Matter (INCDEMC), Timisoara**

**Durata proiectului în luni: 36 luni (2021-2023)**

**Bugetul proiectului: 1 198 032.00 LEI**

### **STATEMENT PENTRU DISEMINARE CATRE PUBLICUL LARG:**

Platformele inteligente, interactive, portabile, pentru multidetecție/sensing în timp real dezvoltate in cadrul PORAPMONS pentru analiza de ape, produse alimentare, geluri farmaceutice, analize biomedicale servesc la colectarea, procesarea si trimiterea datelor referitoare la calitatea mediului, alimentelor, gelurilor farmaceutice, sangelui, catre factorii de raspundere. Datorita raportului crescut calitate/preț, ele vor putea fi integrate in domeniile alimentar, farmaceutic, control de mediu, clinic favorizand cresterea nivelului de trai în țară.

## Rezumatul proiectului

Scopul propunerii este explorarea și împingerea tehnologiei fiabile de platforme analitice spre o nouă dimensiune, superioară științific – o suprafață inteligentă de mici dimensiuni, care transmite date în timp real, inline spre un traductor dinamic proiectat ca un sistem de dispozitive. Măsurătorilor vor fi făcute onsite utilizând probe reale de băuturi/alimente și produse din ape dulci, mediu, și scurgeri de microplastice. Diverse arhitecturi și micro/nanotehnologii avansate vor fi proiectate. Produsul final va fi complet integrat într-o platformă mică, inteligentă, interactivă, portabilă, avansată, de proces pentru multidetecție/sensing în timp real.

Sistemul complet, portabil va fi conectat la un sistem inteligent, mic, bazat pe un chip nou, compact, on-site, cu un impact mare asupra colectării datelor și transmiterea lor prin wireless. PORAPMONS va adăuga valoare la procesul de monitorizare automată de date intensive și sisteme ingineresti, dincolo de stadiul actual de dezvoltare, cu un stimulent al unei noi comunicări rapide, în timp real spre sistemul de informații adaptiv privind gestionarea resurselor bazelor de date. Acestea sunt făcute pentru apă/alimente/agricultură/industria medicală în Europa (Lume) pentru analize de risc și pentru soluții tehnice interpretative și interoperative. Aceasta va forma un curent pentru dezvoltarea investițiilor și dezvoltarea industriilor locale în România, pentru ridicarea nivelului de trai în țară.

## Membrii echipei

Nume	Rolul în proiect
Jacobus Frederick van Staden, DSc, Prof., CSI	Director de proiect
Raluca-Ioana van Staden, PhD, Prof., CSI	Cercetător principal
Ionela-Raluca Stancu	Cercetător Postdoc
Ramona Georgescu State	Cercetător Postdoc
Catalina Negut	Cercetător Postdoc
Ruxandra Maria Ilie-Mihai	Cercetător Postdoc

Bianca Maria Tuchi	Doctorand
Damaris Cristina Gheorghe	Doctorand
Irina-Alina Chera-Anghel	Doctorand
Roxana Andreea Niculae	Doctorand
Carmen Pandurescu	Cercetător

## Scop

Actuala deversare masivă de deșeuri, materii prime poluate și ape uzate (incluzând materiale plastice) care conțin un număr mare de substanțe toxice periculoase creează o preocupare enormă în România (și la nivel mondial) pentru producerea sigură și adecvată de alimente, băuturi, sucuri, apă potabilă și chiar produse farmaceutice și medicamente. Pentru a elimina aceste substanțe toxice (de exemplu, poluanți, pesticide, micotoxine, metale toxice, substanțe chimice perturbatoare endocrine (EDC)) din resurse, este nevoie de micro/nanotehnologii și metodologii suficiente, moderne și adecvate pentru obținerea de date calitative și cantitative cu scopul de a lăsa doar nivelurile adecvate de substanțe necesare unei vieți umane durabile și sănătoase (de exemplu vitamine, minerale, antioxidanți) în lanțul alimentar, ape curate și producțiile agricole și farmaceutice. În plus, consumul acestor produse contaminate cu substanțe toxice este legat de mai multe boli cronice acute cu dezvoltare rapidă, poate provoca tumori canceroase și alte tulburări ce pot fi foarte periculoase pentru oameni. În prezent, este foarte dificil să rezolvi această problemă complet în materiile prime și chiar și în producția de mărfuri sigure din cauza unei mari necunoașteri de substanțe implicate (număr, niveluri, tipuri). Datele colectate din diferite baze de date științifice arată că, deși diferite proiecte de cercetare în acest sens au fost finalizate și sunt în curs de desfășurare cu o serie de proceduri, măsurători și metode disponibile pentru a încerca și rezolva complet aceste probleme și pentru a îmbunătăți producția de diverse produse, acestea nu sunt complet adecvate, fiabile, în siguranță și cu un nivel de securitate ridicată. Acest lucru este cauzat în principal de procedurile lente de măsurare și de producție de rezultate finale, inclusiv prelevarea manuală și transportul la laboratoare. În plus, până în prezent, nu a fost acordată o atenție globală pentru dezvoltarea de noi sisteme inovatoare îmbunătățite de detectare la fața locului, automatizate în timp real/on-line, cu acumulări de procese mari de date, cu inginerie a sistemelor de monitorizare și control și inginerie chimică folosind platforme fiabile, adecvate și durabile bazate pe micro/nano-tehnologii

moderne pentru a asigura o calitate a produsului suficient de sigură.

### Obiective

Prin urmare, scopul acestui al doilea proiect PN-III-P4-ID-PCE-2020-0059 este de a explora și de a conduce actuala, fiabila și durabila noastră tehnologie de platforme la o nouă dimensiune științifică mult mai intensă a sistemelor de dispozitive mici, inteligente, cu răspuns în timp real al suprafețelor către traductor aplicate în producția dinamică reală de băuturi/alimente, ape dulci, ambalare, poluare a mediului și deversarea de micro-plastice pentru garantarea siguranței și securității vieții. Intenționăm să îmbunătățim sistemele noastre actuale de platforme fiabile și durabile, de la proiectarea de bază a cercetării, structurarea, optimizarea, evaluarea și validarea cu noi arhitecturi posibile și noi micro/nano-tehnologii moderne avansate până la dispozitive de detecție la fața locului în timp real sub formă de dispozitive cu platforme de senzori de detectare portabile, mici și compacte legate de sisteme cibernetice foarte compacte bazate pe cipuri ca sisteme automate de monitorizare și control a proceselor intensive de date on-line.

Proiectul are următoarele obiective strategice cheie (unele dintre ele fiind deja într-un stadiu avansat)

O1: Urmărirea, explorarea și vizarea celor mai toxice și periculoase substanțe din deșeuri și aditivi alimentari, precum și a componentelor sănătoase din alimente (vitamine, antioxidanți, metale);

O2: Configurarea specificațiilor potrivite sistemelor de procese ale platformei portabile pentru un management adecvat cu planificare strategică;

O3: Identificarea, selecția, proiectarea, dezvoltarea, evaluarea senzorilor/sondelor/dispozitivelor modificate/serigrafiate ale platformei electrochimice/optice;

O4: Evaluarea și validarea senzorilor/sondelor/dispozitivelor modificate/serigrafiate ale platformei electrochimice/optice și integrarea acestora în platformele de detectare pentru monitorizarea și controlul sustenabil folosind instrumente inovatoare de luare a deciziilor;



O5: Implementarea și deschiderea de noi orizonturi de perspectivă ale micro-tehnologiei, cu platforme cu procese complet integrate, inteligente, interactive, avansate, portabile, cu multiplă detecție/sensing în timp real, conectate la sisteme foarte mici, inteligente, bazate pe cipuri compacte, on-site, pentru comunicarea în timp real cu sistemul complet integrat on-site (in-line) și automatizat de monitorizare, control și management al proceselor cu utilizare intensă de date.

## Metodologie

Lucrările științifice și dezvoltarea tehnologică sunt structurate și distribuite în șapte (7) pachete de lucru de bază (WP) și *etape intermediare (MS)*, cu fiecare WP împărțit în sarcini (activități-A) și livrabile-D:-

WP1: Selecția de substanțe toxice specifice și componente sănătoase (vitamine, antioxidanți, metale) (M1-M8); O1.

A1.1 Selectarea celor mai proeminente, specifice și problematice substanțe toxice (de exemplu, poluanți, pesticide, micotoxine, metale toxice, substanțe chimice perturbatoare endocrine (EDC)) din deșeuri, materie primă poluată, apă uzată (inclusiv material plastic), conservanți, aditivi și poluanți emergenți din lanțurile alimentare;

A1.2 To select the most prominent healthy components (vitamins, antioxidants, metals etc.) from the food-chain, clean water, and agricultural and pharmaceutical productions.

D1- Raportarea preluării datelor selectate. (M8).

*Etapă intermediară (MS1). Selecția de substanțe toxice specific și component sănătoase (vitamine, antioxidanți, metale) (M8).*

WP2: Specificații adecvate ale sistemelor de proces ale platformei portabile pentru un management adecvat. (M1-M12); O2.

A2.1 Configurarea specificațiilor adecvate ale sistemelor de proces cu planificare strategică pentru studiile de cercetare necesare pentru implementarea dispozitivelor portabile, mici și compacte, fiabile și durabile pentru un management adecvat.

**A2.2** Investigarea preliminară a dispozitivelor portabile de suprafață dinamică la traductor cuplate cu o varietate de sonde de detecție adecvate modificate/serigrafiate ale platformei. D2- Raportarea preluării datelor, specificațiilor și sondelor inovatoare de detectare ale platformei portabile (M12).

*Etapă intermediară (MS1). Specificații adecvate ale sistemelor de proces ale platformei portabile pentru un management adecvat (M12).*

**WP3: Dezvoltarea și evaluarea senzorilor/sondelor/dispozitivelor modificate/serigrafiate ale platformei electrochimice/optice. (M7-M26); O3.**

**A3.1** Identificarea și selectarea materialului modificat/serigrafiat adecvat și proiectarea membranei/suprafeței sensorului adecvat, a traductorului sensorului, transportul semnalului, amplificarea și procesarea pentru platforma sensorului electrochimic/optic.

**A3.2** Construirea și integrarea diferitelor părți ale platformei senzorilor într-o sondă adecvată a platformei nanostructurate de detectare.

**A3.3** Investigarea și caracterizarea aprofundată a funcționalității parametrilor fizici și chimici ai sondei platformei de detectare.

**A3.4** Optimizarea cu evaluare constantă în profunzime a platformei de detectare în ceea ce privește intervalul de concentrație, selectivitatea, caracteristicile de răspuns și limita de detecție pentru fiecare dintre analiții/substanța țintă selectate.

**A3.5** Evaluarea dispozitivelor de detectare a platformei pe soluții standard de analiți țintă la scară de laborator.

**A3.6** Evaluarea matricelor de interferență.

*Etapă intermediară (M3) Performanța diferiților senzori/sonde/dispozitive electrochimice.*

**D3.1-D3.6.** Diferite rapoarte privind rezultatul diferitelor sarcini M26.

**WP4: Senzori/sonde/dispozitive modificate/serigrafiate ale platformelor electrochimice/optice unice și platforme integrate de detectare pentru monitorizare și control sustenabil folosind instrumente inovatoare de luare a deciziilor (M12-M36); O4.**

**A4.1 Evaluarea și validarea senzorilor/sondelor/dispozitivelor electrochimice/optice optime, fiabile și adecvate din WP3 la platforme unice de detectare pentru poluanți emergenți selectați și componente sănătoase (vitamine, antioxidanți, metale etc.) din probe reale.**

**A4.2 Integrarea platformelor unice de detectare în rețele multifuncționale de dispozitive de detectare cu senzori interactivi, fiabili, inteligenți, cu răspunsuri rapide, pentru monitorizarea și controlul sustenabil folosind instrumente inovatoare de luare a deciziilor în sisteme integrate de tip senzor-platforme de detectare, cu fezabilitate semnificativă de utilizare on-site.**

***Etapă intermediară (M4) Performanța diferitelor senzori/sonde/dispozitive unic modificate/serigrafiate ale platformei electrochimice/optice și platforme de detectare integrate D4.1-D4.2. Diferite rapoarte cu privire la rezultatele diferitelor sarcini M36***

**WP5: Dispozitive de detectare mici, rapide, inteligente, interactive în timp real, portabile ale platformei de procese, pentru sisteme automate de monitorizare, control și management a proceselor cu utilizare intensă de date (M12-M36).**

**A5.1 Implementarea aplicațiilor dinamice de ultimă oră ale dispozitivelor portabile mici, inteligente, interactive, in-vivo, in-line de detecție a proceselor de suprafață către traductor, on-site, care oferă un sistem securizat fezabil, fiabil și durabil.**

**A5.2 Pentru deschiderea de noi orizonturi de perspectivă micro-tehnică, cu dispozitive cu platformă portabilă de detecție multiplă/sensing în timp real, complete integrate, inteligente, interactive, cu procese avansate, conectate la sisteme compacte, inteligente și noi, bazate pe cipuri on-site, cu impact profund asupra aplicațiilor de colectare de date și transmitere prin comunicații tip wireless.**

**A5.3 Comunicarea în timp real de la dispozitivul de detectare a platformei portabile de proces interactiv, complet integrată la fața**

locului (in-line) prin intermediul sistemului automatizat de monitorizare, control și management al procesului cu utilizare intensă de date va fi furnizată în mod continuu bazei de date adaptive a sistemelor informatice de management a apei/alimentelor/resurselor agricole/medicale în Europa (-și în întreaga lume-) pentru analiza riscurilor și pentru soluții și servicii tehnice interoperative interpretative cu un sistem de management al datelor de calitate în timp real.

*Etapă intermediară (M5) Performanța dispozitivelor portabile inteligente de detectare a proceselor interactive în timp real*

D5.1- D5.3. Raport final M36.

#### WP6: Management de proiect.(M1-M36)

A6.1 Evaluarea continuă a progresului și evaluarea proiectului.

A6.2 Coordonare adecvată continuă și management de proiect. Directorul de proiect (PD-KVS), cu sprijinul membrilor echipei responsabili, va fi responsabil pentru activitățile respective în WP6.

#### WP7: Diseminare.(M1-M36)

A7.1 Diseminare prin intermediul unui site web, fluturași și a rezultatelor prin brevete, lucrări publicate în reviste ISI peer-reviewed, prezentări la workshop-uri, conferințe, seminarii

A7.2 Integrarea cunoștințelor cu pregătirea/educarea studenților/tinerilor cercetători. Directorul de proiect (PD) cu toți membrii echipei vor fi implicați în WP7.

Diseminare

Lucrari publicate/acceptate in reviste ISI:

1. Review. Recent Trends on the Electrochemical Sensors Used for the Determination of Tartrazine and Sunset Yellow FCF from Food and Beverage Products  
Ramona Georgescu State, Jacobus (Koos) Frederick van Staden and Raluca-Ioana Stefan-van Staden  
Journal of the Electrochemical Society 169 (2022) 017509; <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac4a4c>
2. Mini Review- recent developments in electrochemical detection of atrazine

- Ionela Raluca Comnea-Stancu, Jacobus (Koos) Frederick van Staden and Raluca-Ioana Stefan-van Staden  
*Analytical Letters* 56(6) (2023) pages 847-869; <https://doi.org/10.1080/00032719.2022.2107659>
3. Rapid and sensitive electrochemical determination of tartrazine in commercial food samples using IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO composite modified carbon paste electrode  
Ramona Georgescu State, Jacobus (Koos) Frederick van Staden, Razvan State, and Florica Papa  
*Food Chemistry* 385 (2022) 132616; <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132616>
  4. Mini-Review: Electrochemical Sensors Used for the Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins  
Damaris-Cristina Gheorghe, Raluca-Ioana Stefan-van Staden and Jacobus (Koos) Frederick van Staden  
*Critical Reviews in Analytical Chemistry*. Published Online: 26 Feb 2022  
<https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2045557>
  5. Review - Progress in electroanalysis of p53, CEA and CA19-9.  
Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, and Jacobus (Koos) Frederick van Staden  
*Journal of the Electrochemical Society* 169 (3) (2022) 037158.
  6. Recent electrochemical methods proposed for the detection of hepatitis C virus. A minireview  
Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Jacobus (Koos) Frederick van Staden, Hassan Y. Aboul-Enein  
*Revista de Chimie* 2022, 73 (2), 1-16, <https://doi.org/10.37358/RC.22.2.8515>
  7. Minireview: Current Trends, and Future Challenges for the determination of Patulin in Food Products.  
Catalina Cioates Negut, Raluca-Ioana Stefan-van Staden and Jacobus Frederick van Staden  
*Analytical Letters* 56(1) (2023) 25-41.; <https://doi.org/10.1080/00032719.2022.2083146>
  8. Recent Trends in Ibuprofen and Ketoprofen Electrochemical Quantification – A Review  
Bianca-Maria Ţuchiu, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Marius Bădulescu and Jacobus Frederick van Staden  
*Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2022 DOI: 10.1080/10408347.2022.2050348 .
  9. Disposable stochastic sensors for fast analysis of ibuprofen, ketoprofen, and flurbiprofen in their topical pharmaceutical formulations  
Bianca-Maria Ţuchiu, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Marius Bădulescu and Jacobus Frederick van Staden  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 215 (2022) 114758;  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114758>
  10. Nanographene-based electrochemical sensors for ultrasensitive determination of sorbic acid from food.  
Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Andreea-Roxana Niculae, Jacobus Frederick van Staden, Ramona State, Paula Sfirloaga  
*Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 414, (2022) 6813–6824.
  11. N-methylfulleropyrrolidine based multimode sensor for determination of butoconazole nitrate  
Bianca-Maria Ţuchiu, Raluca-Ioana Stefan-van Staden and Jacobus (Koos) Frederick van Staden  
*ACS Omega*, 7(46) (2022) 42537-42544. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05904>
  12. Mini-Review–Electrochemical sensors used for the determination of some antifungal azoles  
Bianca-Maria Ţuchiu, Raluca-Ioana Stefan-van Staden and Jacobus (Koos) Frederick van Staden.  
*ECS Sensors Plus* 1 (2022) 030601; <https://doi.org/10.1149/2754-2726/ac88e3>
  13. Sulfur-doped graphene based electrochemical sensors for fast and sensitive determination of (R)-(+)-Limonene from beverages  
Andreea-Roxana Niculae, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Jacobus Frederick van Staden, and Ramona Georgescu State  
*Sensors* 22(15), (2022) 5851; <https://doi.org/10.3390/s22155851>.
  14. Carbon Nanopowder Based Stochastic Sensor for Ultrasensitive assay of CA 15-3, CEA and HER2 in whole blood.  
Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Oana-Raluca Musat, Damaris-Cristina Gheorghe, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai and Jacobus (Koos) Frederick van Staden.

- Nanomaterials 12 (2022) 3111. <https://doi.org/10.3390/nano12183111>
15. Sodium Metabisulfite in Food and Biological Samples: A Rapid and Ultra-Sensitive Electrochemical Detection Method  
Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, Bianca Cristina Ion and Jacobus (Koos) Frederick van Staden  
Micromachines 13(10) (2022) 1707; <https://doi.org/10.3390/mi13101707>
  16. Ultrasensitive assay of HER-1, HER-2, and heregulin- $\alpha$  in whole blood  
Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Oana-Raluca Musat, Damaris Cristina Gheorghe, Catalina Cioates Negut, Paula Sfirloaga  
Talanta Open 6 (2022) 2022; <https://doi.org/10.1016/j.talo.2022.100151>
  17. Stochastic Sensors for the Enantioselective Determination of Serine in Blood for the Early Diagnosis of Breast Cancer  
Oana Raluca Musat, Raluca-Ioana Stefan-van Staden  
Analytical Letters, 55(13) (2022) 2124-2131; <https://doi.org/10.1080/00032719.2022.2047999>
  18. Smart Portable Device Based on the Utilization of a 2D disposable paper stochastic sensor for fast ultrasensitive screening of food samples for bisphenols.  
Raluca-Ioana Stefan van Staden, Irina-Alina Chera-Anghel, Damaris-Cristina Gheorghe, Jacobus (Koos) Frederick van Staden and Marius Badulescu  
Sensors 23(1) (2023) 314. <https://doi.org/10.3390/s23010314>
  19. Gold Nanoparticles/Nanographene-Based 3D Sensors Integrated in Mini-Platforms for Thiamine Detection.  
Damaris-Cristina Gheorghe, Jacobus (Koos) Frederick van Staden, Raluca-Ioana Stefan van Staden and Paula Sfirloaga  
Sensors 23(1) (2023) 344. <https://doi.org/10.3390/s23010344>
  20. Paper based sensor for determination of flurbiprofen in oromucosal spray.  
Bianca-Maria Ţuchiu, Raluca-Ioana Stefan-van Staden and Jacobus (Koos) Frederick van Staden.  
Sci Bull UPB, 00, 000, 2023
  21. Highly sensitive and selective electrochemical platform based on molecularly imprinted polymer with zinc oxide nanoparticles and multiwalled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrode for amaranth determination.  
Ramona Georgescu-State, Jacobus (Koos) Frederick van Staden, Raluca-Ioana Stefan-van Staden and Razvan Nicolae State.  
Microchimica Acta. 190 (2023) 229. Published 29 May 2023. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05811-1>
  22. Multimode Detection Platform Based on 3D Integrated Sensor for Fast On-Site Assay of Methylprednisolone in Its Pharmaceutical Formulation and Surface Water Sample.  
Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Bianca-Maria Ţuchiu, Jacobus (Koos) Frederick van Staden and Paula Sfarloaga  
Journal of The Electrochemical Society 170(3)(2023) 037516 DOI: 10.1149/1945-7111/acc42d
  23. Stochastic platform based on calix[6]arene and TiO<sub>2</sub> modified reduced graphene oxide electrode for on-site determination of nonivamide in pharmaceutical and water samples, Bianca-Maria Tuchia, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Jacobus (Koos) Frederick van Staden. RSC Advances 13 (2023) 17628–17632
  24. Mini-Review–Recent innovations in corticosteroids determination using electrochemical sensors, Bianca-Maria Tuchia, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Jacobus (Koos) Frederick van Staden  
Analytical Letters <https://doi.org/10.1080/00032719.2023.2220847>
  25. Calix[6]arene modified multi-walled carbon nanotubes/gold nanoparticles screen printed electrode based disposable stochastic platform for the simultaneous determination of calcipotriol and betamethasone in pharmaceutical and surface water samples,  
Bianca-Maria Tuchia \*, Raluca-Ioana Stefan-van Staden \*, Jacobus (Koos) Frederick Van Staden, Hassan Y. Aboul-Enein. Chemosensors 11(8) (2023) 446.
  26. Ultrasensitive assay of atrazine in food and water samples, Andreea-Roxana Niculae, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Jacobus Frederick Van Staden,

Electroanalysis, 2023, e202300248, <https://doi.org/10.1002/elan.202300248>

27. Fast Screening Test of Apple Juice and Surface Water for Patulin Recognition and Quantification, Catalina Cioates Negut, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Jacobus (Koons) Frederick van Staden, ACS Food & Science Technology, 2023, 3(7), 1248–1254, <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00136>
28. A very sensitive electrochemical platform for the detection of Brilliant Blue FCF from soft drinks based on copper oxide nanoparticles and poly (crystal violet), Bianca-Cristina Ion, Ramona Georgescu-State, Ionela-Raluca Comnea-Stancu, Jacobus (Koons) Frederick van Staden, Food Chemistry, 2024, 437, 137751, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137751>
29. Enantioanalysis of leucine in whole blood samples using enantioselective, stochastic sensors. RI Stefan-van Staden, OR Musat, Chemosensors, 11(5), 259, 2023
30. Ultrasensitive assay of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in whole blood using carbon nanotubes based stochastic microsensors. RI Stefan-van Staden, OR Musat, Microchem J., 194, 109288, 2023

#### Capitole de carti:

Graphene-based Nanocomposites for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sensing, in Graphene – based Nanocomposites Sensors, Nanoscience & Nanotechnology Series, (S. Kumar, S. Patra, Eds.) I. R. Comnea-Stancu, R. Georgescu-State, J. F. van Staden, R. I. Stefan-van Staden, The Royal Society of Chemistry, UK, Croydon, 2024.

#### Participari la conferinte

1. Carbon Nanopowder Based Stochastic Sensor for Ultrasensitive assay of CA 15-3, CEA and HER2 in whole blood  
Oana-Raluca Musat, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Damaris-Cristina Gheorghe, Ruxandra-Maria Ilie-Mihai, and Jacobus (Koons) Frederick van Staden  
The International Symposium "PRIOrities of CHEMistry for a sustainable development" PRIOCHEM XVIII-th Edition October 26-28, 2022, Bucharest, Romania
2. Improved advanced materials and intelligent control systems for a wide set of applications†  
Jacobus (Koons) Frederick van Staden. Virtual Lecture.  
SusChem Brokerage Event 2022 Horizon Europe - Work Programme 2023-2024 Cluster 4: Digital, Industry, Space:  
TOPIC: Leadership in enabling and industrial technologies. Project Ideas in LEIT, NMBP, KET, WATER, WASTE WATER.  
8-10 December 2022. Brussels, Europe.
3. Novel smart food production from primary production, packaging Systems to consumption  
Jacobus (Koons) Frederick van Staden. Virtual Lecture.  
SusChem Brokerage Event 2022 Horizon Europe - Work Programme 2023-2024 Cluster 6: Food, Bioeconomy, Natural Resources, Agriculture and Environment. PATLAB FOOD SECURITY, SUSTAINABLE AGRICULTURE INTERESTS:  
Final Exact Areas of interest depend on the Project Call selected. 8-10 December 2022. Brussels, Europe.
4. Sensitive platforms for fast on-site screening of food – Oral presentation (OP9-5-1), S9-5 DAC Study Group  
R.-I. Stefan-van Staden, A.- R. Niculae, E. Y. Rasit, D.-C. Gheorghe, J. (Koons) F. van Staden  
Euroanalysis XXI, 27-31 August 2023, Geneva, Switzerland.
5. Smart Portable Device Based on the Utilization of a 2D Disposable Paper Stochastic Sensor for Fast Ultrasensitive Screening of Food Samples – Poster (PS3-41)  
R.I. Stefan-van Staden, I.-A. Chera-Anghel, D.-C. Gheorghe, J. (Koons) F. van Staden, M. Badulescu  
Euroanalysis XXI, 27-31 August 2023, Geneva, Switzerland, p. 318.
6. Simultaneous determination of vitamins B5, B7 and B9 using stochastic sensors as tools – Poster (PS3-67)  
D.-C. Gheorghe, R.I. Stefan-van Staden, E. Rasit, J. (Koons) F. van Staden  
Euroanalysis XXI, 27-31 August 2023, Geneva, Switzerland, p. 337.



7. Sensitive detection of patulin in water and apple juice samples – Poster (PS1-15)  
C. Cioates-Negut, R.I. Stefan-van Staden, J. (Koos) F. van Staden  
Euroanalysis XXI, 27-31 August 2023, Geneva, Switzerland, p. 198-199.
8. Electrochemical determination of phenolic antioxidant BHT in cosmetic and food samples – Poster (PS3-29)  
R.-M. Ilie-Mihai, R. I. Stefan-van Staden, J. (Koos) F. van Staden  
Euroanalysis XXI, 27-31 August 2023, Geneva, Switzerland, p. 310.
9. On-site simultaneous determination of calcipotriol and betamethasone in topical pharmaceutical formulations and surface water samples using an intelligent mini platform based on carbon nanotubes-gold nanoparticles screen-printed electrode modified with calix[6]arene – Poster (PS2-44)  
B.-M. Tuchiu, R.I. Stefan-van Staden, J. (Koos) F. van Staden  
Euroanalysis XXI, 27-31 August 2023, Geneva, Switzerland, p. 271-272.
10. Calix[6]arene and TiO<sub>2</sub> modified reduced graphene oxide electrode-based portable stochastic platform for the determination of nonivamide from topical pharmaceutical dosage forms and water samples – Poster (PS3-52)  
B.-M.Tuchiu, R.I. Stefan-van Staden, J. (Koos) F. van Staden  
Euroanalysis XXI, 27-31 August 2023, Geneva, Switzerland, p. 327.
11. Ultrasensitive assay of atrazine in food and water samples – Poster (PS1-32)  
A.-R. Niculae, J. (Koos) F. van Staden, R.I. Stefan-van Staden  
Euroanalysis XXI, 27-31 August 2023, Geneva, Switzerland, p. 211.

# Raportari:

2021:- Etapa 1-Selectarea substanțelor toxice specifice și a componentelor sănătoase și configurarea specificațiilor adecvate ale sistemelor de procesare a platformei portabile pentru o gestionare adecvată.

## Metode electrochimice de detecție a atrazinei

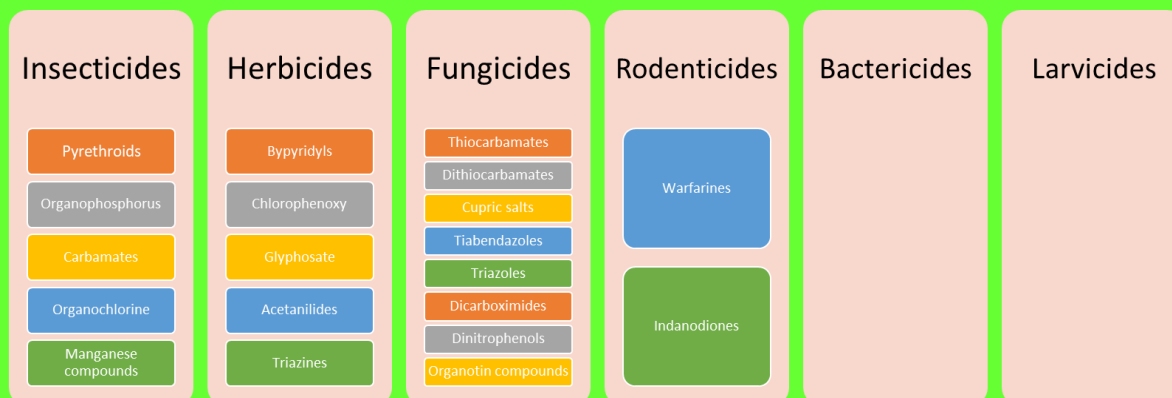
### Rezumat

Această lucrare își propune să discute toate studiile recente din ultimii cinci ani în ceea ce privește detecția electrochimică a pesticidului atrazină. Atrazina este un erbicid din clasa triazinelor care este foarte persistent în mediu datorită solubilității sale în apă și a degradării lente. Unele dintre efectele expunerii la atrazină pot fi: suprimarea imunității, carcinogenitatea, tulburările hormonale și anomaliile de reproducere.

Cuvinte cheie: atrazină, detecție electrochimică, senzori, pesticide.

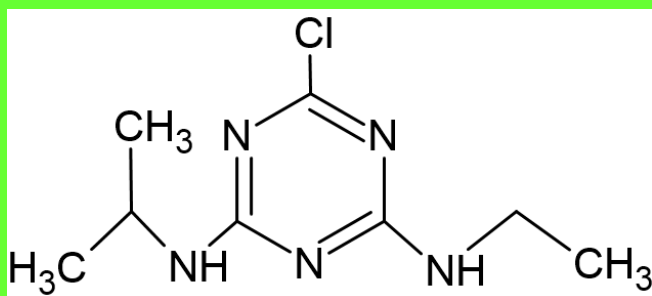
### 1. Introducere

Pesticidele sunt utilizate pe scară largă în sectorul agricol pentru a avea un control mai bun asupra producției de alimente și pentru a limita existența unor dăunători (cum ar fi insecte, ierburi, ciuperci etc). Chiar dacă sunt utilizate pentru efectele favorabile asupra managementului alimentar, utilizarea și expunerea lor continuă pot aduce și efecte nedorite asupra sănătății umane, cum ar fi carcinogenitatea, infertilitatea, bolile neurologice, imunologice și respiratorii. Ele pot fi clasificate după utilizare (**figura 1**) sau după structura/compoziția lor chimică. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) le-a clasificat ca fiind cancerigene, neurotoxice și teratogene<sup>1</sup>.



**Figura.1.** Clasificarea pesticidelor în funcție de grupa de dăunatori pe care îi combat

Atrazina este un erbicid sintetic care a fost autorizat pentru prima dată în anul 1958 în Elveția și ulterior a fost înregistrat în 1959 în Statele Unite pentru uz comercial, iar apoi la o utilizare globală<sup>2</sup>. Utilizarea sa s-a dovedit a fi controversată pentru că, datorită persistenței și mobilității sale, atrazina a fost găsită în locuri precum: sol, plantații, rezervoare utilizate pentru alimentarea cu apă publică, ape subterane, pâraie, lacuri, râuri, mări și chiar și ghețarii din zonele îndepărtate<sup>3</sup>. Uniunea Europeană a interzis complet utilizarea atrazinei în 2004<sup>4</sup>, totuși prezența acesteia a fost încă observată de-a lungul apelor de coastă din Europa, în special în Marea Egee, care leagă și face schimb de apă cu Marea Marmara și Marea Neagră care sunt granițe naturale cu țările în care atrazina este încă folosită<sup>5</sup>.



**Figura.2.** Structura chimică a atrazinei

Înainte de a fi complet interzisă de Uniunea Europeană, reziduurile de atrazină aveau o limită uniformă de 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  pentru apa potabilă și apele subterane<sup>3,6</sup>. La nivel mondial, limitele stabilite pentru prezența atrazinei sunt următoarele: 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  concentrație maximă permisă de OMS pentru atrazină și metaboliții săi cloro-s-triazine în apa de băut<sup>7</sup>, 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  de guvernul australian, 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  în Statele Unite și 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  în Brazilia pentru apă dulce, având în vedere utilizarea apei pentru consumul uman și protecția vieții acvatice<sup>8-10</sup>.

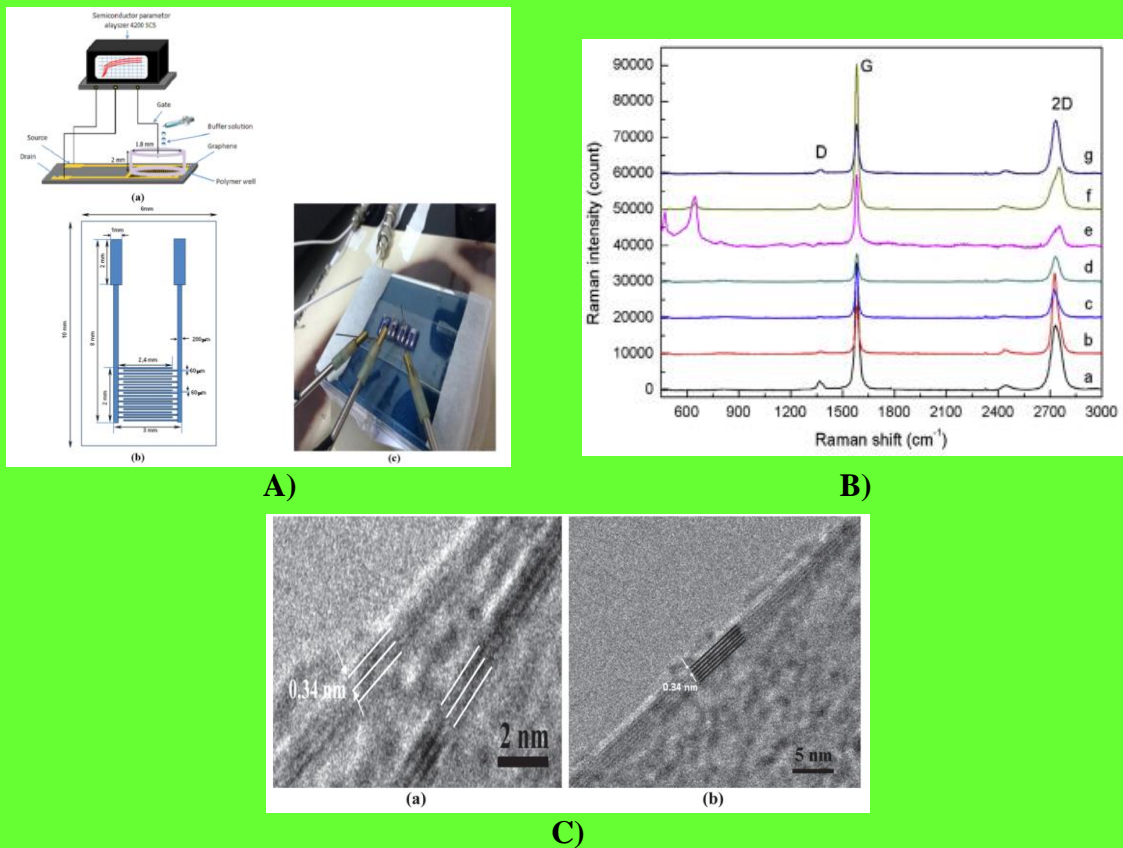
Chiar dacă în unele țări a fost interzisă utilizarea atrazinei, controlul prezenței acestui compus în apă și, de asemenea, în probele de alimente este de o importanță majoră datorită efectelor nocive pe care le poate avea asupra mediului acvatic și sănătății umane. Metodele cromatografice clasice<sup>11-15</sup> pentru determinarea atrazinei sunt analize costisitoare, de lungă durată și necesită probe mari de reactivi și personal calificat. Datorită acestor limitări în ultimii ani metodele electrochimice au cunoscut o dezvoltare continuă în detecția pesticidelor<sup>16,17</sup>. Următoarea lucrare prezintă în continuare noutățile din ultimii cinci ani în ceea ce privește detecția bazată pe senzori electrochimici pentru detecția atrazinei.

## 2. Detecția electrochimică a atrazinei

Dezvoltarea metodelor și tehnicilor de detecție a atrazinei este o chestiune importantă pentru a asigura siguranța apei și a alimentelor. Metodele cromatografice clasice de detecție sunt utilizate pentru analiza atrazinei și pesticidelor pentru validarea metodelor prin legislația agențiilor de reglementare. Chiar dacă aceste metode sunt foarte sensibile și reproductibile, ele încă prezintă multe dezavantaje, cum ar fi: instrumente de laborator foarte scumpe și sofisticate, pregătirea complicată a probelor care include etape de extracție și purificare cu cantități mari de solvenți organici, cerința de supraveghere de către un chimist analitic și incapacitatea unei analize la fața locului și în timp real. În consecință, metodele electrochimice au cunoscut un progres din ce în ce mai mare în analiza pesticidelor, datorită avantajelor lor prezentate față de cele clasice: cost scăzut, dimensiuni reduse și echipamente miniaturizate, portabilitate, sensibilitate mare, timp de detecție rapid, selectivitate și acuratețe. În cele ce urmează vom prezenta studiile recente privind detecția electrochimică a atrazinei.

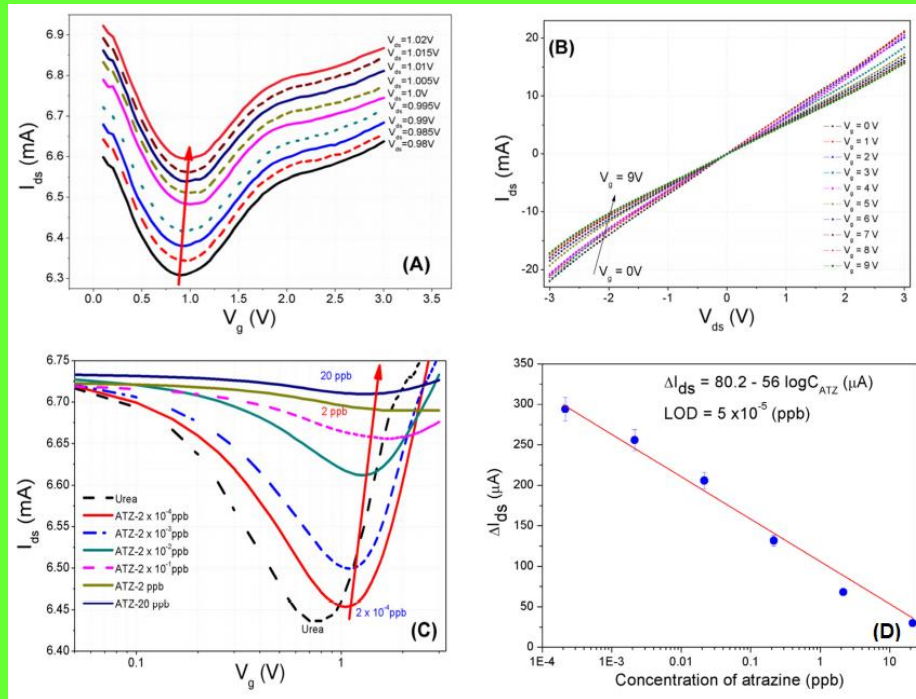
Guan și colab. au prezentat un biosenzor pentru detecția atrazinei bazat pe inhibiția tirozinei. Biosenzorul a fost incubat într-o soluție de PBS care conținea atrazină timp de 15 minute, apoi a fost înregistrată semnalul biosenzorului inhibat în 5.0  $\mu\text{M}$  de soluție de fenol. S-a obținut un interval liniar în intervalul 231,82 – 13090 nM și o limită de detecție de 46,36 nM. Biosenzorul a prezentat o bună stabilitate operațională și recuperabilitate. Autorii au testat aplicarea practică a biosenzorului analizând probe reale de apă dintr-un râu, un lac și apă uzată din terenuri agricole dotate cu diverse concentrații de atrazină, obținând valori ale recuperării în intervalul 93,0 – 106,2 %<sup>18</sup>.

Medina-Sanchez et al au dezvoltat o platformă lab-on-chip (LOC) pentru degradarea electrochimică a atrazinei pe bază de diamant dopat cu bor modificat cu nanoparticule de platină. Dispozitivul LOC are integrați doi electrozi BDD: unul a cărui suprafață a fost acoperită cu nanoparticule de platină pentru detecția atrazinei prin imunotest magne-toenzimatic și altul BDD gol pentru degradarea atrazinei prin oxidare anodică. Acest dispozitiv prezintă avantajul unei detecții complet automatizate și garantează detecția atrazinei până la o limită de detecție de 3,5 pM<sup>19</sup>.



**Figura 3.** A) Ilustrarea schematică a unei configurații de dispozitiv FET (a) și configurația experimentală (b) și (c) pentru GFET-uri cu poartă de electrolit. B) Spectrele Raman (a - g) ale filmului de grafen/FLG măsurate pe substratul de Cu în diferitele locații corespunzătoare. C) Imagini HRTEM tipice ale filmului de grafen/FLG măsurate în două locații diferite: grosimile filmului sunt trei straturi (A) și șase straturi (B)<sup>20</sup>.

Cao și colaboratorii au raportat elaborarea unui tranzistor cu efect de câmp pe bază de grafen pentru detecția atrazinei. Ei au imobilizat molecule de urează într-un canal de grafen cu puține straturi (FLG) între electrozii S și D<sup>20</sup>. Mecanismul de detecție a atrazinei se bazează pe reacția de hidroliză enzimatică a ureei, urmată de măsurarea modificărilor curentului dren-sursă al sensorului FET. În senzorii/biosenzorii de tip FET este important ca conductivitatea suprafeței electrodului să măsoare parametri precum: poziția, intensitatea și lățimea punctului minim de conductanță. Când atrazina este introdusă în sistem, aceasta scade semnalul curentului deoarece acționează ca un inhibitor prin reducerea activității enzimei și, prin urmare, scade concentrațiile ionilor la electrozi. Scăderea curentului diferențial dren-sursă ( $\Delta I_{ds}$ ) odată cu creșterea concentrațiilor de atrazină a avut loc în intervalul 0,9273 pM – 92,73 nM (**figura 4C**). În consecință, dispozitivul FET propus de autori a prezentat o liniaritate bună în intervalul menționat anterior, cu un coeficient de determinare de 0,98 (R<sup>2</sup>) și limită de detecție de 0,2388 nM<sup>20</sup>.



**Figura.4** Caracteristicile electrice ale senzorului fabricat. **A)**  $I_{ds}$  în funcție de  $V_g$  pentru diferite  $V_d$ -uri de la 0,98 la 1,02 V cu un pas de 0,05 V.; **B)**  $I_{ds}$  în funcție de  $V_{ds}$  pentru diferite  $V_g$  de la 0 la 9 V cu un pas de 1,0 V. Săgeata punctată arată direcția deplasării în minimum de  $I_{ds}$ ; and **C)** Curbele  $I_{ds}$  versus  $V_g$  măsurate pentru diferite concentrații de atrazină la  $V_{ds} = 1,0$  V. Pe măsură ce concentrația de atrazină crește, de la  $2 \times 10^{-4}$  la 20 ppb, minimum de  $I_{ds}$  este deplasat către  $V_g$  mai mare.<sup>20</sup>

Grupul lui Van Chuc a raportat o metodă de depunere a unui film multistrat de grafen deasupra unui electrod preexistent de polianilină<sup>21</sup>. Grupul a pregătit electrozi de lucru din platină (Pt) și contraelectrozi de crom (Cr) pe placă de oxid de siliciu folosind tehnologia microelectronică plană. Apoi, următorul pas a fost electrodepunerea polianilinei (PANI) pe electrodul de lucru Pt prin voltametrie ciclică într-un domeniu de potențial:  $-200$  mV -  $+800$  mV la o rată de scanare de  $50$  mV/s. Monomerul de anilină  $0,05$  mol/L a fost preparat  $0,1$  mol/L  $H_2SO_4$ . Filmele de grafen au fost obținute prin metoda CVD (depunerea chimică de vapori) pe o bandă de Cu: în prima etapă s-a atins un flux de argon de  $1000$  sccm și o temperatură constantă de  $1000^\circ C$  în camera CVD, după aceea a fost adăugat hidrogen în camera CVD. După 30 de minute în sistemul CVD a fost introdus un flux de metan pentru a începe creșterea grafenului pe banda de Cu, proces care a fost menținut încă 30 de minute. După această procedură CVD, filmele de grafen au fost lăsate să se răcească la temperatura camerei sub un flux de Ar. Procesul CVD pentru sinteza filmului de grafen a fost descris în detaliu într-o altă lucrare a grupului Van Chuc<sup>22</sup>. Astfel, stratul de grafen sintetizat a fost desprins de banda de Cu și transferat la electrodul de lucru (Pt/PANI) folosind ca strat

polimetil metacrilat (PMMA). Iar etapa finală de imobilizare a anticorpilor anti-atrazină pe filmele PANI/Gr a fost făcută folosind glutaraldehidă ca reticulant. Noul imuosenzor a atins o limită de detecție de  $0,1994 \text{ pM}^{21}$ .

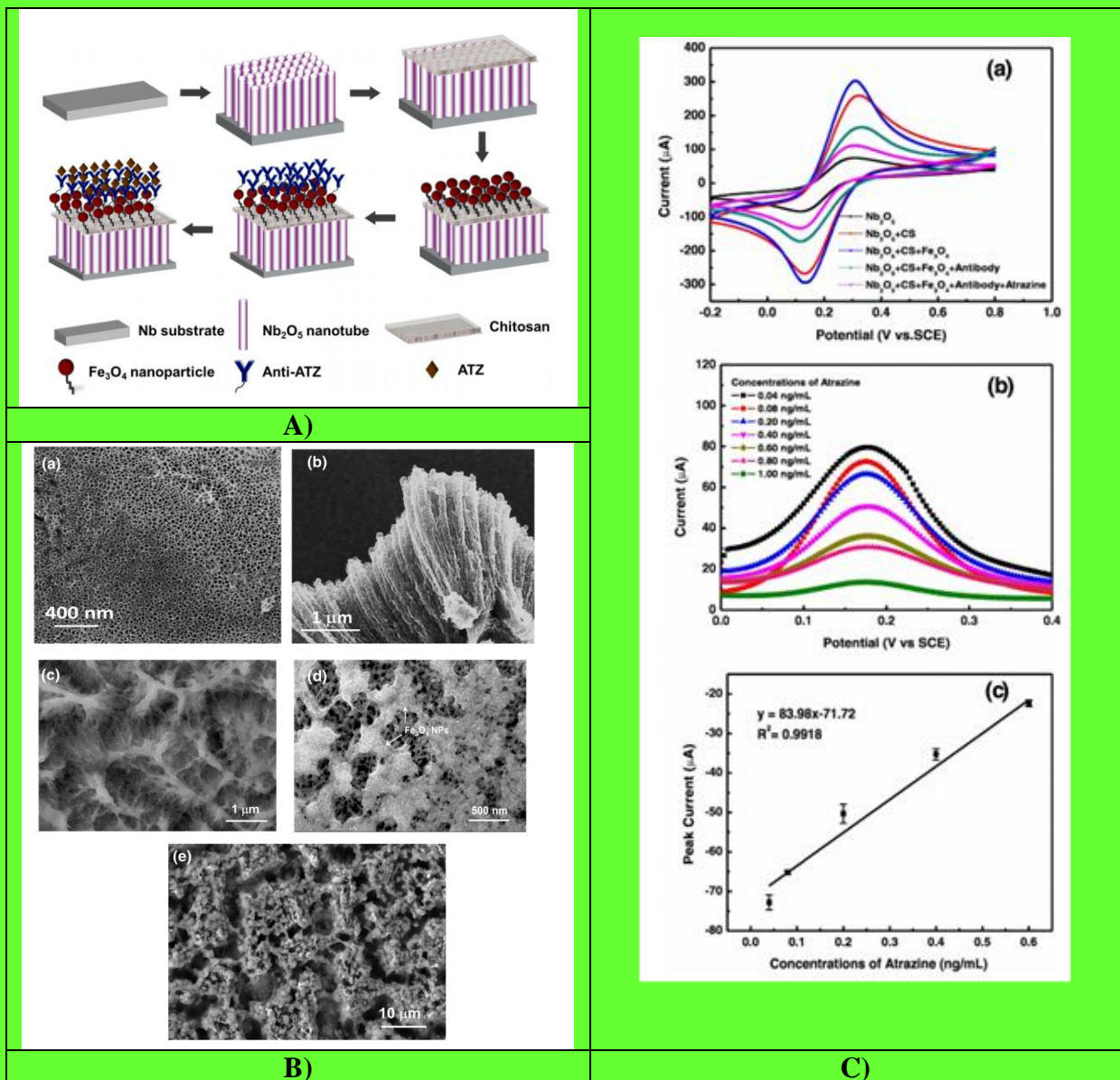
Bhardwaj și colab.<sup>23</sup> au propus pentru prima dată o modalitate electrochimică simplă de a crește nanofilmele de polianilină dopate cu glicină pe un substrat de siliciu într-o singură etapă. Polianilina a fost depusă electrochimic utilizând metoda de electrodepunere în vrac la un potențial constant de  $0,7 \text{ V}$  timp de 5 minute folosind monomerul anilină de concentrație  $0,1 \text{ M}$  dopată cu o cantitate adecvată de glicină (5%) preparată în  $10^{-3} \text{ M HCl}$ . Înainte de imobilizarea anticorpilor anti-antrazină, electrozii Glicină-PANI au fost incubați timp de 30 de minute cu  $10 \text{ mL}$  de  $0,05 \text{ M EDC}$  și  $0,01 \text{ M NHS}$  (1:1) preparate în tampon MES pH=5. Astfel, filmele subțiri de glicină PANI formate au fost ușor și direct bioconjugate cu anticorpul anti-atrazină. Apoi răspunsul noului electrod bazat pe Ab/Gly/PANI a fost înregistrat față de concentrația variabilă de atrazină și a fost atins un interval liniar de  $5 \times 10^{-8} - 4,63 \text{ nM}$  și s-a obținut o valoare LOD de  $0,3246 \text{ pM}$ . Astfel, imunosenzorul propus are un mod ușor de fabricare și utilizează glicina, un aminoacid natural ca platformă de detecție, care facilitează imobilizarea anticorpilor specifici pe substratul conductiv<sup>23</sup>.

Kardaş și alții au dezvoltat un electrod cu pastă de carbon CuO NPs/ILs pentru analiza atrazinei din probele de apă uzată. Ei au sintetizat nanoparticulele de CuO și lichidul ionic 2-(3-acetoxi-4-metoxibenzilidenamino)-tiofenol (AMT), iar după caracterizarea TEM, EDX și XRD a nanoparticulelor de CuO au pregătit senzorul amestecând lichidul ionic (AMT) cu nanoparticulele de CuO, pulbere de grafit și ulei de parafină până când s-a obținut o pastă uniformă. Senzorul modificat a fost apoi caracterizat prin CV și EIS care arată capacitatea sa catalitică în comparație cu electrodul nemodificat. Noul sensor bazat pe CuO NPs/ILs/CPE a prezentat o limită foarte scăzută de detecție de  $2 \times 10^{-12} \text{ M}$  și valori foarte bune de recuperare din probele de apă uzată<sup>24</sup>.

Grupul Yang a propus pentru detecția atrazinei o platformă electrochimică bazată pe rețele de nanotuburi Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> modificate cu nanoparticule de chitosan (CS) și carboxil-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> și anticorp monoclonal atrazină. Rețelele de nanotuburi Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> au fost crescute din substrat Nb prin metoda de anodizare. Ilustrația schematică a senzorului propus este prezentată în **figura 5A**. NP-urile de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> carboxilate au fost alese pentru creșterea imobilizării anticorpilor și, de asemenea, pentru îmbunătățirea răspunsurilor la semnal electrochimic, iar prin adăugarea de chitosan grupul de cercetare a reușit să asigure o atașare sigură fără aglomerarea NP-urilor Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pe suprafața Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Performanța electrochimică a platformei a fost măsurată după



fiecare ajustare cu matrice  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  prin CV în 0,1 M PBS cu 5,0 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  și 0,1 M KCl. În plus, ATZ ar putea fi cuantificată prin electrod nanotub anti-ATZ/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /CS/ $\text{Nb}_2\text{O}_5$  folosind metoda DPV într-un interval liniar de  $1,85 \times 10^{-3} - 2,78 \times 10^{-3} \text{ nM}^{25}$ .



**Figura.5** A.) Ilustrare schematică a proceselor de fabricație pe rețele de nanotuburi  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  modificate cu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs. B) Imagini SEM ale (a) vedere la suprafață a rețelelor de nanotuburi  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  auto-ordonate; (b) vedere în secțiune transversală a rețelelor de nanotuburi  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ; (c) electrod CS/ $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ; (d) electrod  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /CS/ $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ; (e) electrod anti-anti-ATZ/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /CS/ $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . C) a) Voltamograme ciclice (CV) ale electrodului  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  gol, electrod CS/ $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , electrod  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /CS/ $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , electrod anti-ATZ/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /CS/ $\text{Nb}_2\text{O}_5$  și electrod ATZ/anti-ATZ/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /CS/ $\text{Nb}_2\text{O}_5$  efectuate în PBS 0,1 M (pH 7,5) conținând 5,0 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  și 0,1 M KCl. (b) Voltametrică în puls diferențiat (DPV) ale aceluiași electrolit cu diferite concentrații de soluții ATZ: 0,04, 0,08, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 și 1,0 ng/mL. (c) Relația liniară între intensitățile de vârf ale curentului și concentrațiile de atrazină în intervale de 0,04 ng/mL-0,6 ng/mL.<sup>25</sup>

Yola și Atar au raportat un electrod pe bază de nanocompozite cu nanoparticule de platină și nanoparticule de platină cu imprimare moleculară (Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs) pentru analiza atrazinei<sup>26</sup>. În studiul lor, primul pas în dezvoltarea noului senzor a fost prepararea Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs folosind tratament hidrotermal. Ulterior, suspensiile Pt NPs/ C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NT au fost turnate în picătură pe un electrod de carbon vitros curat (GCE). Electrocul imprimat ATR (MIP/Pt NPs/ C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE) a fost format pe Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs /GCE folosind metoda voltametriei ciclice (CV) timp de 10 cicluri în 100 mM fenol în prezența a 25 nM ATR (0,1 M, pH 7,0 PBS). Nanostructurile au fost caracterizate prin următoarele tehnici: SEM, TEM, EDX, XPS și XRD. Electrocul modificat a fost caracterizat prin CV și EIS și aria suprafeței a fost calculată a fi de 0,822 cm<sup>2</sup> comparativ cu 0,070 cm<sup>2</sup> pentru GCE-ul nemodificat. Rezultatele obținute evidențiază performanțele îmbunătățite ale electrocului MIP/Pt NPs/ C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE. Autorii au optimizat condițiile de lucru în ceea ce privește pH-ul, concentrația monomerului, timpul de eluare și ciclul de scanare pentru electrodepunerea monomerului. Astfel, MIP/Pt NPs/ C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE a arătat un domeniu liniar în intervalul 1,0×10<sup>-12</sup> – 1,0×10<sup>-10</sup> M pentru detecția atrazinei și a atins o limită de detecție de 1,5×10<sup>-13</sup> M. Senzorul a arătat, de asemenea, valori mari ale selectivității și sensibilității în probele de apă uzată<sup>26</sup>.

Lucrarea echipei Ahmad descrie un senzor bazat pe MIP pentru detecția atrazinei. Folosind procesul de polimerizare, au pregătit MIP-uri cu diferite rapoarte de monomer: șablon și crosslinker: șablon. Astfel, au optimizat raportul crosslinker:monomer:atrazină la 5:25:1 pentru recunoașterea atrazinei. Sistemul MIP poate detecta atrazina în apă până la o concentrație de 0,04 nM<sup>27,28</sup>.

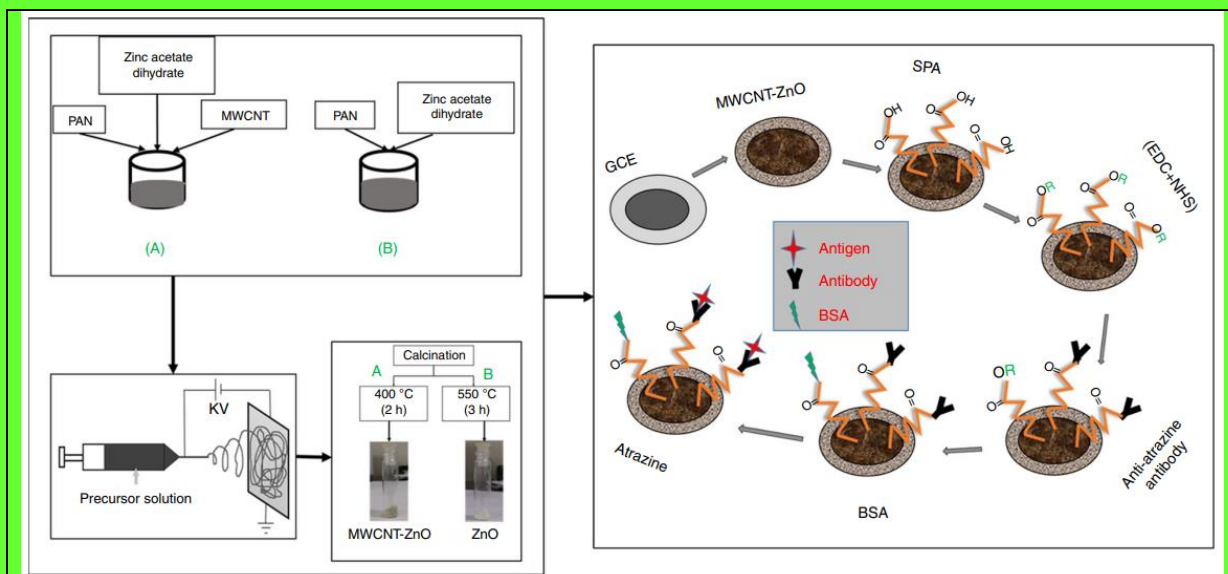
Madianos și echipa sa<sup>29</sup> au reușit să dezvolte un aptasenzor impedimetric bazat pe PtNP pentru detecția atrazinei și acetamipiridei. Aptasenzorul a fost construit prin fuziunea filmelor bidimensionale PtNP auto-asamblate (care au fost formate prin tehnica de pulverizare cu magnetron) și acizii nucleici specifici țintă au arătat o sensibilitate ridicată și detecția selectivă a două pesticide: atrazină și acetamipirid<sup>29</sup>.

Calfuman și colaboratorii au prezentat proiectarea, construcția și caracterizarea unui electrod de carbon vitros modificat cu metaloporfirina tetrarutenată (M=Ni(II) și Zn (II) și bis(trifluormetilsulfonil)imida 1-butil-3-metilimidazolium, BMIMNTF<sub>2</sub>). Aceștia au propus o metodă simplă și rapidă pentru prepararea a doi electrozi modificați: 8 μL dintr-un amestec de lichid ionic și 1 mM de metaloporfirină tetrarutenată (1:9) au fost turnate în 0 picături pe suprafața electrocului de carbon sticlos și apoi lăsate la temperatura camerei. Noii senzori

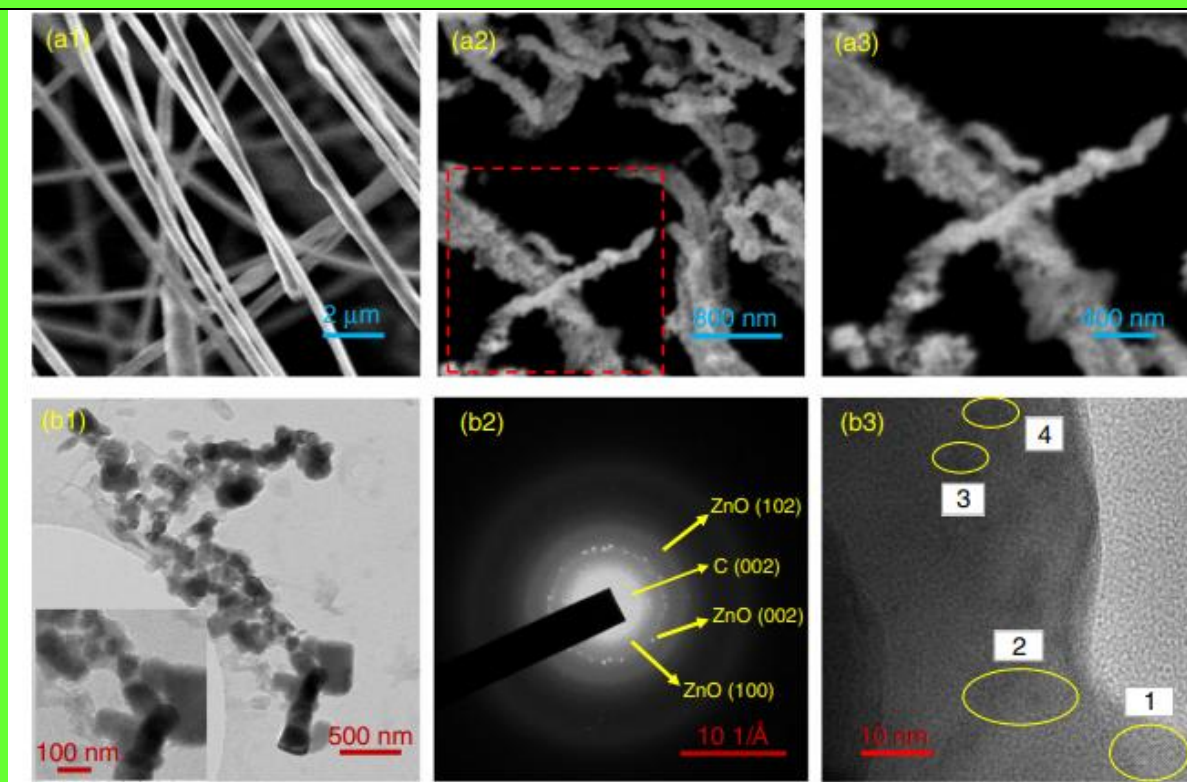
modificați au atins caracteristici bune de răspuns (**tabelul 1**), sunt foarte stabili și reproductibili și prezintă avantajele unei modalități de preparare ușoare și rapide<sup>30</sup>.

În 2019, Supraja și grupul acesteia au dezvoltat doi imunosenzori foarte sensibili bazați pe nanofibre de oxid de metal pentru detecția atrazinei. Primul articol a raportat utilizarea nanofibrelor de oxid de mangan ( $Mn_2O_3$ ) ca material de transducere<sup>31</sup>, iar în al doilea articol<sup>32</sup> au detaliat utilizarea nanofibrelor de oxid de staniu ( $SnO_2$ ) ca material de detectare, care este opus acțiunii semiconductoare a  $Mn_2O_3$ . Datorită naturii sale semiconductoare,  $Mn_2O_3$  are o capacitate mai mare de a transfera electroni la interfața electrod/electrolit în comparație cu alte nanomateriale de oxid de metal cu bandgap mare, rezultând o sensibilitate excelentă și o limită scăzută de detecție. Anterior, grupul a raportat detecția primerilor de consens specific virusului Dengue folosind nanofibre  $Mn_2O_3$  obținând o limită de detecție de ordinul de mărime  $10^{-21}$  M<sup>33</sup>.  $Mn_2O_3$  au fost sintetizate folosind metoda electrospinning. Ulterior, anticorpii anti-atrazină au fost imobilizați pe electrodul de carbon sticlos modificat din nanofibră  $Mn_2O_3$ . Detecția atrazinei a fost realizată prin spectroscopie de impedanță electrochimică. Intervalul liniar obținut cu electrodul GCE/MNF/EDC-NHS/Ab/BSA pentru detecția atrazinei a fost 1 zg/mL-1μg/mL în intervalul de frecvență 0,001 Hz – 10 kHz, iar limita de detecție a fost calculată a fi 0,22 zg/mL, cea mai joasă limită de detecție de până acum, pentru detecția electrochimică a atrazinei<sup>31</sup>. Al doilea articol în care se raportează detectarea electrochimică a atrazinei folosind nanofibre  $SnO_2$  electrofilate, limita de detecție a fost stabilită la 0,9 zM, chiar mai mică decât cea raportată anterior. Fabricarea senzorului  $SnO_2$  modificat urmează aceiași pași ca și electrodul de carbon sticlos modificat din nanofibră  $Mn_2O_3$ . Analiza electrochimică a noului senzor anti-atrazină modificat a fost făcută folosind CV și DPV, iar echipa de cercetare a evaluat aplicația practică a senzorului prin analizarea apei subterane și minerale pentru a detecta atrazină. În concluzie, a fost stabilită o metodă electrochimică bazată pe un senzor ultrasensibil cu nanofibre  $SnO_2$  pentru detecția atrazinei în apă ce atinge o limită de detecție de 0,9 zM, cea mai joasă limită de detecție înregistrată pentru acest compus vreodată cu o metodă electrochimică<sup>32</sup>.

Recent, același grup a propus o platformă electrochimică bazată pe nanofibre MWCNT-ZnO pentru detectarea atrazinei<sup>34</sup>. Protocolul de fabricare a senzorului modificat urmează aceiași pași ca și studiile raportate anterior și este reprezentat în **figura 6**. Nanofibrele MWCNT-ZnO au fost obținute prin metoda electrospinning urmată de calcinare la temperatură înaltă. Studiile morfologice au fost efectuate în timpul procesului de achiziție a nanofibrelor (SEM, TEM înainte și după calcinare) - **figura 6**.



A)

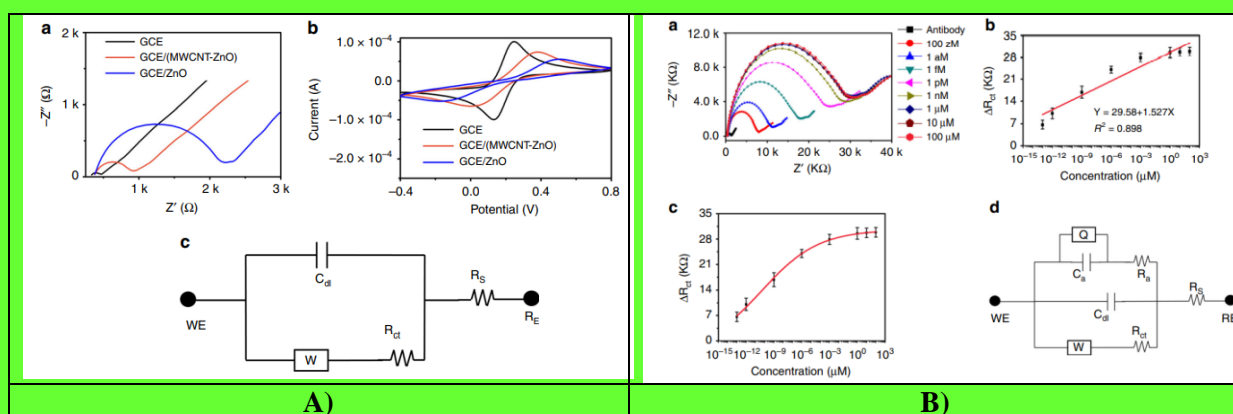


B)

**Figura.6** A) Reprezentarea schematică a sintezei nanofibrelor de ZnO și pregătirea electrodului. B) Studiul morfologic al nanofibrelor ZnO încorporate MWCNT folosind SEM și TEM. Imagini SEM ale nanofibrelor MWCNT-ZnO (a1) înainte de calcinare, (a2) după calcinare la 400°C și (a3) imagine de înaltă rezoluție a nanofibrelor calcinate. Imagini TEM ale nanofibrelor MWCNT-ZnO (b1) după calcinare cu o inserție care arată imaginea mărită de înaltă rezoluție (b2) model SAED și (b3) HRTEM care arată o interfață de nanofibre MWCNT-ZnO policristaline.<sup>34</sup>



În cele din urmă, MWCNT-ZnO a fost turnat în picătură (soluție de 20 mg/mL) pe un GCE curățat și uscat la 60°C într-un incubator pentru o perioadă de timp de 120 de minute. Înainte de imobilizarea anticorpilor ATZ, MWCNT-ZnO/GCE a fost funcționalizat cu SPA și EDC-NHS (agent de cuplare EDC și activator NHS). Ulterior senzorul modificat a fost caracterizat prin tehnici EIS și CV (figura 7A). Răspunsul electrochimic al anti-ATZ-MWCNT-ZnO/GCE a fost testat pentru diferite concentrații de ATZ prin tehnica EIS (figura 7B). Astfel, această platformă a reușit să atingă o valoare LOD de 5.358 zM și un domeniu liniar de detecție de 10 zM - 1μM. Dispozitivul propus prezintă o bună stabilitate, selectivitate, reproductibilitate și repetabilitate.



**Figura 7. A)** Caracterizarea electrochimică a MWCNT-ZnO prin a) EIS, b) CV B) Analiza electrochimică a anti-ATZ-MWCNT-ZnO/GCE: a) Analiza EIS a anti-ATZ-MWCNT-ZnO/GCE pentru diferite concentrații de ATZ, b) curba de calibrare cu potrivire liniară, c) ajustarea curbei sigmoidal logistic a datelor, d) modelarea electrică a mecanismului de detecție<sup>34</sup>.

**Tabelul 1. Senzori folosiți pentru detecția atrazinei**

<b>NR. CRT.</b>	<b>Material electrod</b>	<b>Metodă</b>	<b>Domeniu liniar (nmol/L)</b>	<b>LOD (nmol/L)</b>	<b>Probe</b>	<b>REF.</b>
1	poly(L-DOPA)-tyrosinase (PDM-Tyr)/NAFION/Au	Măsurarea inhibiției	50 - 30000	10000	Apă de râu, apă de lac, apă uzată	18
2	PtNPs-BDD	CA	0.0045 – 45	0.0035	-	19
3	GRAPHENE FET (GFET)	FET	$2 \times 10^{-4}$ – 20	$5 \times 10^{-8}$	-	20
4	PANi/Gr- $\alpha$ -ATZ	SWV	2 – 20000	0.043	-	21
5	Glycine-PANi	Conductanță	100 – 1 000	0.07	-	23
6	CuO NPs/ILs/CPE	DPV+CV	0.01 – 2.0	0.002	Apă uzată	24
7	anti-ATZ/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /CS/Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> nanotube	DPV	0.04 – 0.6	0.018	-	25
8	MIP/Pt NPs/C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> NTs/GCE	DPV	0.001– 0.1	0.00015	Apă uzată	26
9	(Atr:EGDMA:MAA)MIP	CV	-	$4 \times 10^4$	Apă	27
10	Pt NP film/ SiO <sub>2</sub> substrates	EIS	0.6 – 1000	0.04	-	29
11	GC/BMIMNTF2/ZnTRP	DPV	212 – 2500	230	-	30
12	GC/BMIMNTF2/NiTRP	DPV	76.8 – 3500	540	-	
13	GCE/MNF/ EDC-NHS/Ab/BSA	EIS	$1 \times 10^{-12}$ – 1000	$2.21 \times 10^{-13}$	Apă	31
15	GCE/SnO <sub>2</sub> /EDC-NHS/Antibody/ BSA	DPV+CV	$1 \times 10^{-12}$ – 1000	$0.9 \times 10^{-12}$	-	32
16	MWCNT-ZnO NANOFIBERS	EIS, CV	$1 \times 10^{-11}$ – 1000	$5.368 \times 10^{-11}$	-	34
17	DOM/AgNP/GC-AgNP aggregation	SWASV	20 – 220	19.3	Apă de râu	35
18	DOM/AgNP/GC-AgNP NON-aggregation	SWASV	10 – 140	13.6		
19	CLs/PGE	SWV	5.0 – 320	0.008	Apă potabilă	36
20	CC125/CB-SPE	CA	100 – 5000	1	Apă de râu	37
21	Al <sub>2</sub> NiCoO <sub>5</sub> (ANCO)/GCE	DPV	0.0023 – 0.463	0.00139	Probe de sânge	38
22	AIRGOC- SPE	SWV	1.2 – 23	0.4	Trestie de zahăr, Apă de râu	39

Studiul lui Zahran et al<sup>35</sup>, descrie sinteza AgNP-urilor prin tehnica de reducere chimică directă și aplicarea lor pentru detectarea atrazinei din probele de apă. După sinteza lor, AgNP-urile au fost acoperite cu DOM (materie organică dizolvată, în acest caz acid humic) și transferate pe un electrod de carbon sticlos prin metoda de lipire timp de 30 de minute. Coeficientul de lipire și stabilitatea AgNP-urilor la suprafața GCE au fost optimizate înainte ca senzorul să fie utilizat pentru detectarea atrazinei. Aplicabilitatea senzorului a fost studiată în probe de apă de râu cu valori bune de recuperare (96-109%). Parametrii analitici cum ar fi domeniul liniar și limita de detecție obținuți cu senzorul DOM/AgNPs/GC sunt afișați în **tabelul 1**.

Annu și colaboratorii au pregătit un senzor de grafit creion modificat cu celuloză (PGE) pentru detecția atrazinei. În acest scop, celuloza a fost obținută prin hidrolizare din plantă izolată în condiții optimizate (temperatură, timp și concentrație de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), apoi a fost dispersată în N,N-dimetilformamidă, după care a fost turnată în picătură la suprafața pe PGE curățat și păstrat la temperatura camerei până când solventul s-a evaporat și a apărut o peliculă stabilă. Caracteristicile de răspuns electrochimic au fost obținute folosind tehnica SWV, intervalul liniar a fost stabilit a fi 0,023 – 1,483 nM și limita de detecție a fost calculată a fi 0,0371 pM. Senzorul a fost evaluat în termeni de acuratețe, precizie, reproductibilitate, repetabilitate și stabilitate, dând rezultate foarte bune. Aplicabilitatea metodei a fost evaluată prin detecția atrazinei din apa de la robinet cu valori foarte bune de recuperare (98,3-99,1)<sup>36</sup>.

Un biosenzor nou amperometric pe bază de alge a fost proiectat de Attaallah și colab., pentru detecția atrazinei din apa râului. Algele verzi fotosintetice *Chlamydomonas reinhardtii* au fost immobilizate pe electrozi serigrafiați modificați cu negru de fum pentru a monitoriza schimbările în evoluția oxigenului algelor în timpul procesului fotosintetic. Scăderea degajării de oxigen, care are loc în prezența atrazinei, produce o scădere a semnalelor de curent prin măsurători amperometrice, în mod dependent de concentrația analitului. S-a constatat că atrazina are un răspuns liniar în domeniul 0,1 – 5 μM și o limită de detecție de 1 nM. Senzorul propus a fost testat pentru detectarea atrazinei din apa râului obținând valori bune de recuperare (96-107%) și, de asemenea, a dovedit a fi stabil pe o perioadă de 10 ore de lucru și la 3 săptămâni de depozitare

<sup>37</sup>.



Ahmed și echipa sa au reușit să dezvolte un electrod serigrafic modificat cu compozit grafen-oxid imprimat cu atrazină (AIRGOC-SPE) pentru detecția atrazinei în matrice apoasă<sup>39</sup>. Ca prim pas, au pregătit compozitul de oxid de grafen redus imprimat (AIRGOC): oxidul de grafen (GO) a fost obținut prin metoda Hummer modificată<sup>40</sup>, apoi redus la RGO prin metoda Amarnath<sup>41</sup>. În etapa următoare au preparat un compozit imprimat poros prin modificarea RGO cu [BMIM]BF<sub>4</sub>, un lichid ionic. În etapa finală, compozitul imprimat a fost preparat astfel: s-a făcut o complexare de pre-polimerizare prin adăugarea unei anumite cantități de atrazină la compozitul de grafen modificat [BMIM]BF<sub>4</sub>, iar apoi la acest amestec s-a adăugat o soluție care conține pirol, FeCl<sub>2</sub> și H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> și lăsat să se polimerizeze. Produsul final a fost spălat intens cu apă deionizată, urmat de o soluție de amestec format din metanol și acid acetic (9:1) până la îndepărtarea completă a ATZ din compozit. AIRGOC-SPE a fost preparat prin acoperirea suprafeței circulare cu puncte negre a SPE-ului nemodificat cu AIRGOC nou preparat și apoi uscat la aer la temperatura camerei, după optimizarea parametrilor cum ar fi cantitatea de compozit de depozitat, tipul de reactiv de legare și de asemenea raportul dintre AIRGOC și agentul de legare. Sensorul astfel modificat a fost evaluat pentru detecția atrazinei folosind tehnica SWV obținându-se următoarele rezultate (**tabelul 2**). Pentru a demonstra aplicabilitatea AIRGOC-SPE, autorii au determinat atrazina din trestie de zahăr și probe de apă de râu. Rezultatele au arătat că SPE modificate sunt eficiente în detecția ATZ în probe reale (valorile de recuperare sunt în intervalul 90 – 108%)<sup>39</sup>.

**Tabelul 2.** Parametrii curbei de calibrare pentru detecția ATZ folosind electrodul AIRGOC-SPE

Parametrii	Valori
Domeniu liniar (nM)	1.2 – 23
Coeficient de liniaritate( $r^2$ )	0.9999
Panta ( $\mu\text{M}/\text{nM}$ )	0.16
Intercept ( $\mu\text{A}$ )	6.8
LOD (nM)	0.4
LOQ (nM)	1.2

Durai și Badhulika<sup>38</sup> au propus pentru detecția atrazinei din probele de sânge un electrod de carbon sticlos modificat cu compozit perovskit dublu fără plumb Al<sub>2</sub>NiCoO<sub>5</sub> (ANCO). Aceștia

au prezentat pentru prima dată sinteza și caracterizarea morfologiei prin tehnici SEM, XRD, Raman și FTIR a nanofulgilor de  $\text{Al}_2\text{NiCoO}_5$ . Senzorul a fost pregătit cu o tehnică simplă de turnare în picătură, după sinteza  $\text{Al}_2\text{NiCoO}_5$ . Capacitatea de detectare îmbunătățită a ANCO/GCE se datorează prezenței situsurilor active electrocatalitice cu cupluri redox  $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$  și  $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$  la situsurile octaedrice ale nanofulgilor  $\text{Al}_2\text{NiCoO}_5$ . Performanțele acestui senzor (**tabelul 1**) și faptul că a reușit să detecteze atrazina în probele biologice arată că poate fi o platformă promițătoare pentru o varietate de aplicații bioanalitice.

### 3. Concluzii

Putem concluziona că în ultimii cinci ani domeniul metodelor electrochimice de mediu a cunoscut un progres activ, iar mai multe studii au reușit să atingă limite joase de detecție și sensibilitate foarte bună în ceea ce privește detecția atrazinei. Au fost testate și aplicate diferite metode pentru atingerea acestui obiectiv: anticorpi imobilizați la suprafața electrodului, polimeri de imprimare moleculară (MIP), modificarea suprafețelor electrozilor cu nanomateriale sau nanofibre de oxizi metalici. O parte dintre senzorii raportați au fost investigați doar în soluții standard de laborator și nu au fost testați în probe reale, unde alte posibile substanțe interferente pot exista și ar putea influența răspunsul senzorilor. Acesta este un parametru important care va trebui luat în considerare în studiile viitoare. pentru o analiză corectă și precisă a atrazinei. Senzorii electrochimici prezentați aici promit a fi o opțiune de luat în seamă pentru aplicații reale pe teren printr-un viitor dispozitiv fiabil, rapid, precis, sensibil, selectiv și portabil.

### Bibliografie

1. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. World Health Organization, Geneva, WHO. 2012.
2. K.R. Solomon, D.B. Baker, R.P. Richards, K.R. Dixon, S.J. Klaine, T.W. La Point, R.J. Kendall, C.P. Weisskopf, J.M. Giddings, J.P. Giesy, L.W. Hall Jr. and W.M. Williams, *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 31 (1996).
3. F.P. de Albuquerque, J.L. de Oliveira, V. Moschini-Carlos and L.F. Fraceto, *Sci. Total Environ.*, **700**, 134868 (2020).

4. E.U. Commission Decision of 10 March 2004 concerning the non inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance, EC 2004.
5. K. Nödler, T. Licha and D Voutsas, *Mar. Pollut. Bull.*, **70**, 112 (2013).
6. F. Ackerman, *Int. J. Occup. Environ. Health*, **13**, 437 (2007).
7. World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality, p. 1. Available: (11 jun. 2019). WHO, 2017
8. Australian Drinking Water Guidelines. Paper 6 National Water Quality Management Strategy. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra. NHMRC/NRMMC 2011.
9. United States Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Regulations, USEPA, 2009.
10. IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. Available: (21 jun. 2019). CONAMA, 2005. Resolução no 357, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasil, 2019.
11. T. Zhang, Z. Q. B. Li, and Z. Yang, *Food Analytical Methods*, **12**, 1179 (2019).
12. S.H. Guan, M.W. Huang, X. Li and Q. Cai, *Anal. Lett.*, **51**, 613 (2018).
13. L. Jia, M.Su, X. Wu and H. Sun, *Journal of Separation Science*, **39**, 4512 (2016).
14. Huang, Y.; Shi, T.; Luo, X.; Xiong, H.; Min, F.; Chen, Y. *Food Chem.*, **275**, 255 (2019).
15. Song, N.; Lee, J.Y.; Mansur, A.R.; Jang, H.W.; Lim, M.; Lee, Y. *Food Chem.*, **298**, 125050 (2019).
16. J.S. Noori, J. Mortensen and Alemnew Geto, *Sensors*, **20**, 2221 (2020).
17. B. Perez-Fernandez, A. Costa-Garcia and A. de la Escosura-Muniz, *Biosensors*, **10**, 32 (2020).
18. Y. Guan, L. Liu, C. Chen, X. Kang and Q. Xie, *Talanta*, **160**, 125 (2016).

19. M. Medina-Sanchez, C.C. Mayorga-Martinez, T. Watanabe, T.A. Ivandini, Y. Honda, A. Nakata, A. Fujishima, Y. Einaga and A. Merkoci, *Biosens. Bioelectron.*, **75**, 365 (2016).
20. T.T. Cao, V.C. Nguyen, H.B. Nguyen, H.T. Bui, T.T. Vu, N.H. Phan, B.T. Phan, L. Hoang, M. Bayle, M. Paillet, J.L. Sauvajol, N.M. Phan and D.L. Tran, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, **7**, 035007 (2016).
21. N. Van Chuc, N.H. Binh, C.T. Thanh, N. Van Tu, N. Le Huy, N.T. Dzung, P.N. Minh, V.T. Thu, and T.D. Lam, *J. Mat. Sci. Technol.*, **32**, 539 (2016).
22. N.V. Chuc, C.T. Thanh, N.V. Tu, V.T.Q. Phuong, P.V. Thang, N.T.T. Tam, *J. Mater. Sci. Technol.*, **31**, 479 (2015).
23. S.K. Bhardwaj, A.L. Sharma, K.-H. Kim and A. Deep, *Mater. Res. Express*, **4**, 125022 (2017).
24. Kardaş, M. Beytur, O. Akyildirim, H. Yuksek, M.L. Yola and N. Atar, *Journal of Molecular Liquids*, **248**, 360 (2017).
25. M. Yang, X. Zhao, S. Zheng, X. Liu, B. Jin, H. Li and Y. Gan, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **791**, 17 (2017).
26. M.L. Yola and N. Atar, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **56**, 7631 (2017).
27. A.L. Ahmad, N.F.C. Lah and S.C. Low, *Journal of Polymer Research*, **25**, 243 (2018).
28. A.L. Ahmad, N.F.C. Lah and S.C. Low, *Journal of Physical Science*, **29**, 33 (2018)
29. L. Madianos, E. Skotadis, G. Tsekenis, L. Patsiouras, M. Tsigkourakos and D. Tsoukalas, *Microelectronic Engineering*, **189**, 39 (2018).
30. K. Calfuman, J. Honores, M. Isaacs, D. Quezada, J. Valdebenito and M. Urzua, *Electroanalysis*, **31**, 671 (2019).
31. P. Supraja, S. Tripathy, S.R.K. Vanjari, V. Singh and S.G. Singh, *Sens. Actuat.B*, **285**, 317 (2019).
32. P. Supraja, S. Tripathy, S.R.K. Vanjari, V. Singh, S.G. Singh, *Biosens. Bioelectron.*, **141**, 111441 (2019).

33. S. Tripathy, S.R. Krishna Vanjari, V. Singh, S. Swaminathan, and S.G. Singh, *Biosens. Bioelectron.*, **90**, 378 (2017).
34. P. Supraja, V. Singh, S.R.K. Vanjari and S.G. Singh, *Microsyst. Nanoeng.*, **6**, 3 (2020).
35. M. Zahran, Z. Khalifa, M. A.-H. Zahran and M.A. Azzem, *ACS Applied Nano Materials*, **3**, 3868 (2020).
36. Annu, S. Sharma, A. Nitin and R. Jain, *Diamond and Related Materials*, **105**, 107788 (2020).
37. R. Attaallah, A. Antonacci, V. Mazzaracchio, D. Moscone, G. Palleschi, F. Arduini, A. Amine and V. Scognamiglio, *Biosens. Bioelectron.*, **159**, 112203 (2020).
38. L. Durai and S. Badhulika, *Sensors and Actuators B*, **325**, 128792 (2020).
39. S. Ahmed, H. Shaikh, A. Solangi, J. Barek, Sirajuddin, A. Denizli and M.H. Agheem, *Monatsh. Chem.*, **151**, 1271 (2020).
40. L. Shahriary and A.A. Athawale, *Int. Journal of Renewable Energy Environ. Eng.*, **2**, 58 (2014).
41. C.A. Amarnath, C.E. Hong, N.H. Kim, B.C. Ku, T. Kuila and J.H. Lee, *Carbon*, **49**, 3497 (2011).

## **Review. Tendințe recente privind senzorii electrochimici utilizați pentru determinarea tartrazinei și a galbenului FCF din produse alimentare și băuturi**

### **Rezumat**

Coloranții sintetici au fost folosiți pe scară largă în industria alimentară datorită avantajelor lor, cum ar fi stabilitatea bună la oxigen, lumină și pH, reproductibilitate, culoare strălucitoare, sensibilitate scăzută la condițiile de depozitare și procesare tehnologică și desigur, costuri reduse. Din păcate, unele dintre ele au un potențial cu efect dăunător asupra sănătății umane (prezența grupării azo în structura moleculară a coloranților azoici are efecte cancerigene și mutagene asupra sănătății umane), astfel, detectarea lor în diferite produse alimentare și băuturi a devenit esențială. Prin urmare, această lucrare prezintă cea mai recentă dezvoltare în designul senzorilor pentru determinarea a doi coloranți azoici utilizați în mod obișnuit – tartrazina și galbenul amurg în probe reale de alimente și băuturi, aratând că există o varietate de senzori eficienți cu limite de detecție mici, domeniu liniar de concentrație mare, cu selectivități și sensibilități ridicate.

## Introducere

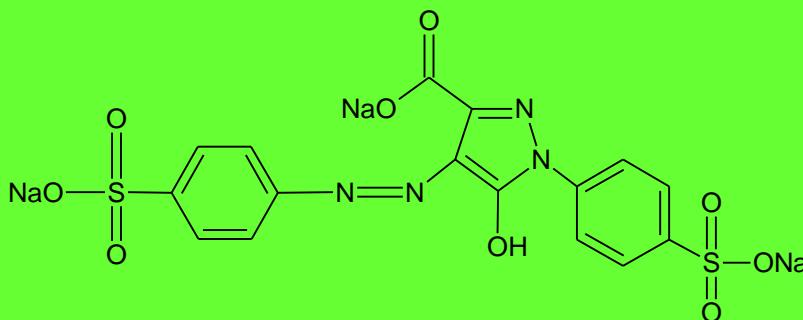
În ultimele secole, coloranții alimentari au fost utilizați în alimente și băuturi datorită caracteristicilor lor unice: revenirea culorii în timpul procesării, îmbunătățirea culorii alimentelor și uniformitatea culorii produsului rezultat.<sup>1</sup> Coloranții alimentari sunt clasificați în naturali și sintetici. Majoritatea coloranților naturali sunt extrași din surse vegetale precum  $\beta$ -carotenul, betanina, antocianii și clorofila, în timp ce alți coloranți precum carminul provin din surse animale.<sup>1,2</sup> Cu toate acestea, acești coloranți naturali sunt ușor degradabili, mai sensibili la temperatură, lumina, pH și sunt foarte scumpi.<sup>3</sup> Prin urmare, coloranții alimentari sintetici sunt utilizați pe scară largă în industria alimentară datorită stabilității lor ridicate la oxigen, lumină, pH și datorită faptului că sunt mai reproductibili și au o culoare mai strălucitoare, o sensibilitate mai mică la condițiile de depozitare și prelucrare tehnologică, precum și costuri mai mici.<sup>2,4</sup> Cel mai mare grup de coloranți alimentari sintetici este cel al coloranților azoici. Cei mai folosiți coloranți azoici în industria alimentară sunt coloranții galbeni (tartrazina și galben amurg) și coloranții roșii (amarant, roșu allura și alți).<sup>2</sup> În structura lor chimică se găsește gruparea azo ( $-\text{N}=\text{N}-$ ) ca cromofor și gruparea  $-\text{OH}$  pe inelul aromatic.<sup>2</sup> Datorită utilizării lor pe scară largă, au fost identificate o serie de efecte negative asupra sănătății umane.<sup>2</sup>

În ultimii ani, numeroase echipe de cercetători și-au concentrat atenția asupra dezvoltării și îmbunătățirii unor metode electrochimice mai sensibile și mai rapide pentru determinarea tartrazinei și a galbenului amurg FCF în probe alimentare, băuturi, farmaceutice,<sup>5-7</sup> apă<sup>8,9</sup> și în cosmetice.<sup>10</sup> Tehnicile electrochimice se bazează pe prepararea senzorilor sau biosenzorilor și pot determina următorii parametri: intensitatea curentului în întreaga celulă electrochimică (amperometrie sau voltametrie), potențialul electrodului (potențiometrie), rezistența și timpul necesar dezvoltării electrodului (conductanța electrică), cantitatea de electricitate care intră în celulă (coulometrie) și forța de opoziție la curentul electric dintr-un circuit (spectroscopie de impedanță electrochimică). Dintre metodele menționate mai sus, tehnicile voltametrice sunt utilizate în cea mai mare parte pentru determinarea tartrazinei și respectiv a galbenului amurg din probe de alimente și băuturi. Tipurile de metode voltametrice utilizate pot fi: voltametria ciclică (CV), voltametria cu undă pătrată (SWV), voltametria puls diferențială (DPV) și voltametria de baleiaj liniar (LSV). Această lucrare se concentrează pe cele mai recente lucrări de cercetare (de până la cinci ani) referitoare la senzorii electrochimici utilizați pentru detectarea tartrazinei și a galbenului FCF din alimente și băuturi.

### *Senzori electrochimici utilizați pentru determinarea tartrazinei*

Tartrazina (Tz) este un colorant alimentar organic sintetic,<sup>11,12</sup> solubil în apă, de culoare portocalie, utilizat în diverse produse alimentare: băuturi răcoritoare, bomboane, prăjituri, supe și alte alimente, farmaceutice, textile și cosmetice.<sup>1</sup> Tartrazina este unul dintre cei mai des utilizați coloranți azoici sintetici din lume. Denumirea IUPAC a tartrazinei este 5-hidroxi-1-(4-sulfonatofenil)-4-[(E)-(4-sulfonatofenil)diazenil]-1H-pirazol-3 carboxilat trisodic. Este, de asemenea, cunoscut sub numele de Food Yellow No. 4 cu numărul Comunității Europene (CE) E 102 și ca Food Drug & Cosmetic (FD&C) Yellow No. 5, C.I. nr. 19140.<sup>1</sup>

Prezența grupării azo în structura moleculară a tartrazinei (Fig. 1) are efecte cancerigene și mutagene asupra sănătății umane.<sup>13</sup> Astfel, multe studii au raportat că nivelurile de concentrație ridicată de tartrazină pot fi dăunătoare sănătății și pot provoca diverse boli precum cancer, astm, alergii, hiperactivitate la copii și toxicitate dermică.<sup>13-15</sup> Doza zilnică acceptată (ADI) de tartrazină a fost stabilită la 7.5 mg kg<sup>-1</sup> greutate corporală per zi de către Organizația Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură (FAO) și Comitetul de experți a Organizației Sănătății (OMS) pentru aditivi alimentari (JECFA) și de către Comitetul științific al UE pentru alimente (SCF). În băuturile răcoritoare, conținutul maxim de tartrazină nu trebuie să depășească 0.01 g mL<sup>-1</sup>.<sup>1</sup> În concluzie, este foarte important să se detecteze nivelul de tartrazină din alimente și băuturi pentru îmbunătățirea siguranței alimentelor din întreaga lume.



**Fig. 1.** Structura chimică a tartrazinei

Au fost raportate numeroase metode analitice pentru determinarea tartrazinei, precum electroforeza capilară (CE),<sup>12,16</sup> cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC),<sup>17-20</sup> cromatografia pe strat subțire (TLC)<sup>21,22</sup> și spectrofotometria.<sup>23,24</sup> Deși aceste metode sunt utilizate cu acuratețe ridicată, majoritatea sunt costisitoare, complicate și au un timp de testare lung.<sup>25,26</sup> Cu toate acestea, metodele electrochimice sunt mai promițătoare datorită simplității, sensibilității bune, selectivității ridicate, costurilor reduse, preparării ușoare a probelor și timpului scurt de analiză.<sup>2,26</sup>

În ultimul timp, determinarea electrochimică a tartrazinei în alimente și băuturi s-a realizat folosind diferite tipuri de electrozi modificați (Tabelul I). Electrozii modificați chimic reprezintă o tendință de viitor în chimia analitică.<sup>2</sup>

Rovina și colaboratorii<sup>1</sup> au publicat o lucrare cuprinzătoare despre diferite metode analitice utilizate pentru detectarea tartrazinei ce ar putea fi utile autorităților de reglementare și analiștilor pe partea de foods pentru a controla și verifica nivelul de tartrazină din alimente și băuturi. De asemenea, Lipskikh și coautorii<sup>2</sup> în articolul lor au descris despre compararea senzorilor electrochimici și despre protocoalele de măsurare prin determinare voltametrică ai celor mai des utilizați coloranți azoici din alimente.



**Tabelul I. Senzori electrochimici utilizați pentru detectarea tartrazinei în produse alimentare și băuturi.**

Senzor	Metoda	Domeniul liniar ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Limita de detectie ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Proba	Ref.
g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> /PGE	DPV	0.1 – 10.0	0.21	pudra falsa de sofran	13
Gr/PLPA/PGE	DPV	2 – 100	1.54	suc de portocale	14
N-PC-G/CS/GCE	DPV	0.05 – 15.00	0.036	băutură răcoritoare	15
MIP-PmDB/PoPD-GCE	DPV	0.005 – 1.1	0.0035	băutură răcoritoare	25
PEDOT@TbHCF/GCE	DPV	0.1 – 206 .0	0.032	băutură răcoritoare, cipsuri, bomboane si jeleuri	26
PTH/MWCNT-G/GCE	SWV	1 – 100 250 – 450	0.25 0.303	băutură răcoritoare	27
N-grap/Graphite	SWV	2.0 – 50.0	0.02	băutură de sportivi	28
CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE	DPV	0.02 – 0.19	0.003	bomboane, jeleuri si bauturi racoritoare	29
PGMCPE	CV	1 – 27 35 – 87	0.28	bomboane si băutură răcoritoare	30
PLA-ERGO/GCE	DPV	1 – 250	0.25	băutură carbogazoasă si suc de fructe	31
MIP/MWCNTs/GCE	DPV	0.08 – 1.00 1 – 10	0.027	fanta, aroma de lapte si băutură de ananas	32
Pp-ABSA/ZnO NPs-CPE	DPV	0.0349 – 1.246 1.246 – 5.440	0.08	pudra de portocale si băutură răcoritoare	33

Coc/CPE	SWV	0.12 – 3.00	0.3	puđră de gelatină aromată	34
Au/(AuNPs-PAH/NiTsPc) <sub>5</sub>	DPV	0 – 3	0.055	suc	35
		4 – 9	0.122		
SDSMCPE	DPV	20 – 50	5.2	puđra galbena de lamaie	36
		60 – 110			
Microspheres-laccase/AuNPs/SPE	DPV	0.2 – 14.0	0.04	bomboane acoperite cu ciocolată și suc de mango	37
TiO <sub>2</sub> -ErGO-GCE	SDLSV	0.02 – 20.00	0.008	băutură carbogazoasă	38

**g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/PGE** – nitrură de carbon grafitic/ electrod grafit de tip creion;

**Gr/PLPA/PGE** – electrod grafit de tip creion modificat cu grafen si poli(L-fenilalanina);

**N-PC-G/CS/GCE** – grafen N-dopat crescut pe un nanocompozit de carbon poros ierarhic/chitosan/ electrod de carbon sticlos;

**MIP-PmDB/PoPD-GCE** – electrod de carbon sticlos modificat cu un copolimer imprimat molecular-m-dihidroxibenzen/o-fenilendiamină;

**PEDOT@TbHCF/GCE** – poli(3,4-etilendioxitiofen)@terbiu hexacianoferrat compozit/ electrod de carbon sticlos;

**PTH/MWCNT-G/GCE** – politiofen/ nanotuburi de carbon cu pereți multipli-grafen/ electrod de carbon sticlos;

**N-grap/Graphite** – film de lac de unghii incolor/ grafit;

**CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE** – chitosan/ oxid de grafen/ nanotuburi de carbon cu pereți multipli/ nanoparticule de aur/ electrod de carbon sticlos;

**PGMCPE** – electrod pasta de carbon modificat cu poli(glicine);

**PLA-ERGO/GCE** – electrod de carbon sticlos modificat cu poli(L-arginina)-oxid de grafen redus electrochimic;

**MIP/MWCNTs/GCE** – polimer imprimat molecular/ nanotuburi de carbon cu pereți multipli / electrod de carbon sticlos;

**Pp-ABSA/ZnO NPs-CPE** – poli(acid p-aminobenzensulfonic)/ nanoparticule de oxid de zinc – electrod de pastă de carbon;

**Coc/CPE** – electrod pasta de carbon decorat cu un microcompozit de complex de cobalt;

**Au/(AuNPs-PAH/NiTsPc)<sub>5</sub>** – film de ftalocianina tetrasulfonica de nichel (II)-nanoparticule de Au;

**SDSMCPE** – electrod pastă de carbon modificat cu dodecil sulfat de sodiu;

**Microspheres-laccase/AuNPs/SPE** – microsferă conjugată lacaze/nanoparticule de aur acoperite pe un electrod serigrafic cu pastă de carbon;

**TiO<sub>2</sub>-ErGO-GCE** – electrod de carbon sticlos modificat cu TiO<sub>2</sub> și oxid de grafen redus electrochimic;

**SDLSV** – voltametrie de scanare liniară derivată de ordinul al doilea;

Karimi și colaboratorii<sup>13</sup> au propus un senzor sensibil pentru detectarea electrochimică a tartrazinei în probe alimentare bazat pe un electrod grafit de tip creion modificat cu nitrură de carbon grafitic (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) care a fost sintetizat prin piroliza directă a melaminei. Cercetătorii au investigat mai întâi activitatea electrochimică a Tz folosind CV și DPV. Intervalul de concentrație al Tz a fost cuprins între 0.1 – 10.0 μmol L<sup>-1</sup> cu o limită de detecție de 0.21 μmol L<sup>-1</sup> obținute în condiții optime. Senzorul propus a arătat o bună stabilitate și reproductibilitate cu o valoare a deviației standard relative (RSD) de 2.5%. Electrocul g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/ grafit de tip creion a fost folosit cu succes pentru a detecta nivelurile de Tz din două probe de pulbere falsă de șofran.<sup>13</sup>

Tahtaisleyen și colaboratorii<sup>14</sup> au dezvoltat o platformă senzor pentru detectarea tartrazinei, folosind grafen și poli(L-fenilalanină) care a fost conectat la suprafața electrodului de grafit de tip creion. Prin voltametrie puls diferențială, tartrazina a prezentat o limită de detecție de 1.54 μmol L<sup>-1</sup> și un domeniu de concentrație liniară cuprins între 2 și 100 μmol L<sup>-1</sup>. Senzorul modificat a arătat rezultate satisfăcătoare pentru determinarea tartrazinei în probe de suc de portocale. S-a obținut un procent de recuperare cuprins în intervalul 98.71% și 104.44%.<sup>14</sup>

Pentru determinarea tartrazinei, An și colaboratorii<sup>15</sup> au descris o nouă platformă de senzori electrochimici bazată pe chitosan (CS) și grafen dopat cu N, cultivate nativ pe nanocompozitul de carbon poros ierarhic (N-PC-G). Senzorul propus a prezentat un răspuns de curent liniar pentru oxidarea electrochimică a tartrazinei în intervalul 0.05 – 15.00 μmol L<sup>-1</sup> cu o limită de detecție mică de 0.036 μmol L<sup>-1</sup>, obținute în condiții experimentale optime. Mai mult, electrodul construit a prezentat de asemenea și o bună sensibilitate și selectivitate asupra oxidării Tz. Aplicabilitatea N-PC-G/CS/GCE a fost testată în băuturi răcoritoare pentru a verifica eficacitatea senzorului.<sup>15</sup>

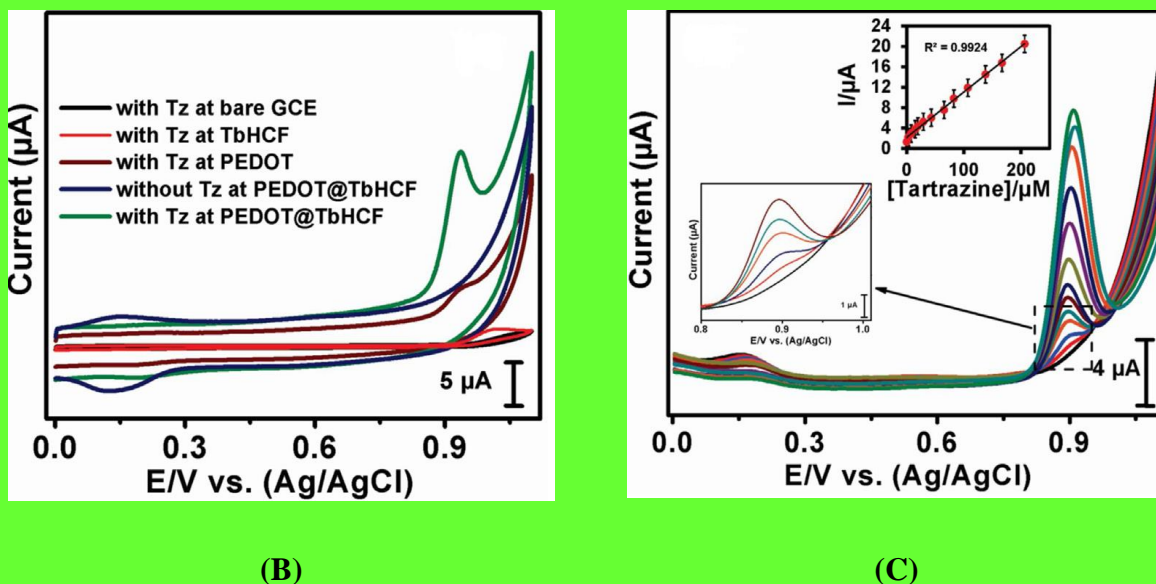
Zhao și coautorii<sup>25</sup> au dezvoltat pentru prima dată un senzor nou bazat pe copolimeri imprimați molecular (MIPs) utilizați pentru analiza directă și rapidă a tartrazinei. MIP-urile au fost immobilizate direct pe suprafața electrodului de carbon sticlos (GCE) prin polimerizarea electrochimică a m-dihidroxibenzenului (m-DB) și o-fenilendiaminei (o-PD) utilizați ca monomeri. Relația liniară dintre concentrația Tz și semnalul curentului picului a fost cuprinsă între 0.005 – 1.1 μmol L<sup>-1</sup> și cu o limită de detecție de 0.0035 μmol L<sup>-1</sup>. Selectivitatea electrodului dezvoltat a fost investigată folosind șase tipuri de specii interferente care nu au arătat nici-o diferență semnificativă în curentul picului pentru detectarea Tz. Senzorul propus a

prezentat mai multe avantaje, precum: stabilitate bună, sensibilitate ridicată, este ieftin și oferă posibilitatea investigării in situ. Senzorul MIP-PmDB/PoPD-GCE a fost capabil să determine Tz în băuturi răcoritoare fără pretratare a probei. Pentru a studia acuratețea acestui electrod modificat, conținutul de Tz a fost determinat și prin HPLC. Rezultatele obținute de senzorul dezvoltat au fost comparabile cu cele obținute prin HPLC, indicând faptul că senzorul MIP-PmDB/PoPD-GCE a fost fezabil și precis.<sup>25</sup>

Sakthivel și colaboratorii<sup>26</sup> au propus o metodă electrochimică pentru fabricarea compozitului poli(3,4-etilendioxitiofen) (PEDOT)@terbiu hexacianoferrat (TbHCF) pe electrodul de carbon sticlos pentru detectarea sensibilă a tatrazei. Rezultatele lor sunt detaliate în Fig. 2.<sup>26</sup> Compozitul PEDOT@TbHCF a fost investigat prin microscopie electronică cu scanare (SEM), spectroscopie cu raze X cu dispersie de energie (EDX), difracție cu raze X (XRD), spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), EIS și spectroscopie Raman. Comportamentul electrochimic al Tz a fost testat folosind CV și DPV. Senzorul propus a prezentat o activitate electrocatalitică bună asupra detectării Tz. Senzorul dezvoltat a prezentat un domeniu de concentrație liniar larg cuprins între 0.1 – 206.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o sensibilitate ridicată. Limita de detecție a fost de 0.032  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Pentru aplicabilitatea practică a senzorului dezvoltat s-au folosit diferite probe de alimente precum băutura răcoritoare, chipsuri, bomboane și jeleu și s-au obținut recuperări satisfăcătoare pentru detectarea tartrazinei.<sup>26</sup>



(A)

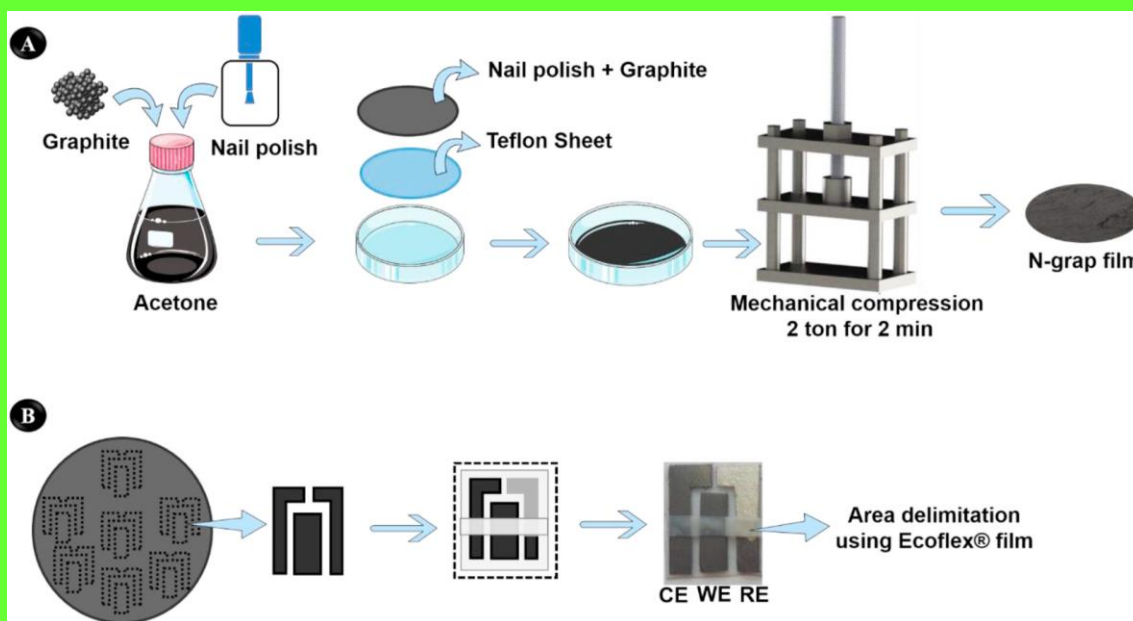


**Fig. 2.** (A) Reprezentarea schematică a procesului de preparare al senzorului PEDOT@TbHCF/GCE și al mecanismului redox pentru electrooxidarea Tz; (B) CV ale GCE nemodificat, TbHCF/GCE, PEDOT/GCE și TbHCF@PEDOT/GCE cu și fără prezența Tz ( $99 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) în  $\text{N}_2$  saturat  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  PBS (pH 5), viteza de scanare de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ; (C) DPV al TbHCF@PEDOT/GCE în PBS saturat de  $\text{N}_2$  (pH 5) conținând diferite concentrații de Tz ( $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$  -  $206 \mu\text{mol L}^{-1}$ )<sup>26</sup>

AL-Refai și coautorii<sup>27</sup> au descris un senzor voltametric selectiv și sensibil pentru detectarea tartrazinei pe bază de nanocompozit de poliofen și mix de nanotub de carbon cu pereți multipli și de grafen (PTH/MWCNT-G) care a fost obținut prin polimerizare oxidativă chimică. PTH/MWCNT-G a fost caracterizat folosind FT-IR și XRD și morfologia a fost investigată prin SEM, microscopie electronică cu transmisie (TEM) și prin spectroscopie de raze X cu dispersie de energie. În condiții optime, efectul vitezei de scanare a sugerat că oxidarea electrochimică a Tz pe suprafața senzorului propus a fost ireversibilă cu un proces de difuzie. Comportamentul electrocatalitic al senzorului dezvoltat a fost examinat prin voltametrie cu undă pătrată (SWV), iar rezultatele au prezentat două domenii liniare:  $1 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$  și  $250 - 450 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Limita de detecție a fost de  $0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$  și respectiv  $0.303 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Electrocul modificat a arătat, de asemenea, o bună stabilitate și reproductibilitate. Pentru evaluarea aplicației practice, probele de băuturi răcoritoare au fost mixate cu diferite concentrații de Tz și s-au obținut ratele de recuperare cuprinse în intervalele  $97.87\% - 106.7\%$ .<sup>27</sup>

Lima și colaboratorii<sup>28</sup> au propus o nouă metodă de preparare a unui dispozitiv electrochimic de unică folosință și ieftin bazat pe grafit și lac de unghii incolor (N-grap), așa cum este prezentat în Fig. 3<sup>28</sup> utilizat pentru determinarea tartrazinei prin voltametrie cu undă pătrată. Microscopia electronică cu scanare a indicat că electrocul compozit N-grap a arătat o porozitate

ridică. Pentru caracterizarea electrochimică a electrodului, autorii au folosit metode de voltametrie ciclică și spectroscopie de impedanță electrochimică. Domeniul liniar al senzorului dezvoltat a fost cuprins între 2.0 – 50.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cu un LOD de 0.02  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Dispozitivul N-grap a fost aplicat cu succes pentru detectarea Tz în probe de băuturi pentru sportivi. Rezultatele obținute au fost comparabile cu cele obținute prin tehnica UV-Vis sugerând acuratețea metodei dezvoltate.<sup>28</sup>



**Fig. 3.** Ilustrarea generală a procedurii de preparare a dispozitivului N-grap.<sup>28</sup>

În 2021, Rovina și colaboratorii<sup>29</sup> au folosit un senzor electrochimic bazat pe un electrod de carbon sticlos (GCE) modificat cu chitosan (CHIT), oxid de grafen (GO), nanotuburi de carbon cu pereți multipli (MWCNT) și nanoparticule de aur (AuNP) pentru determinarea tartrazinei. Folosind DPV, curenții picului anodic depind liniar de concentrațiile Tz în intervalul 0.02 – 0.19  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , cu o limită de detecție de 0.003  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Senzorul CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE prezintă o bună stabilitate, o reproductibilitate acceptabilă, o selectivitate ridicată și a fost utilizat cu succes pentru determinarea Tz în diferite produse alimentare comerciale. Nivelurile de Tz din probe de alimente au fost de asemenea analizate prin metoda HPLC. Rezultatele obținute prin ambele metode au fost în bună concordanță.<sup>29</sup>

În lucrarea lui Manjunatha<sup>30</sup> a fost dezvoltat un senzor bazat pe CPE modificat cu poli(glicină) pentru detectarea tartrazinei. Metodele CV și DPV au fost utilizate pentru a testa comportamentul electrochimic al Tz pe suprafața senzorului. Rezultatele obținute au demonstrat că filmul de polimer de pe electrod a prezentat o activitate electrocatalitică bună pentru oxidarea Tz în soluție tampon fosfat (PBS) pH = 7.0. Senzorul propus a prezentat două domenii de concentrație liniară 1 – 27  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și 35 – 87  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cu o limită de detecție de 0.28  $\mu\text{mol L}^{-1}$

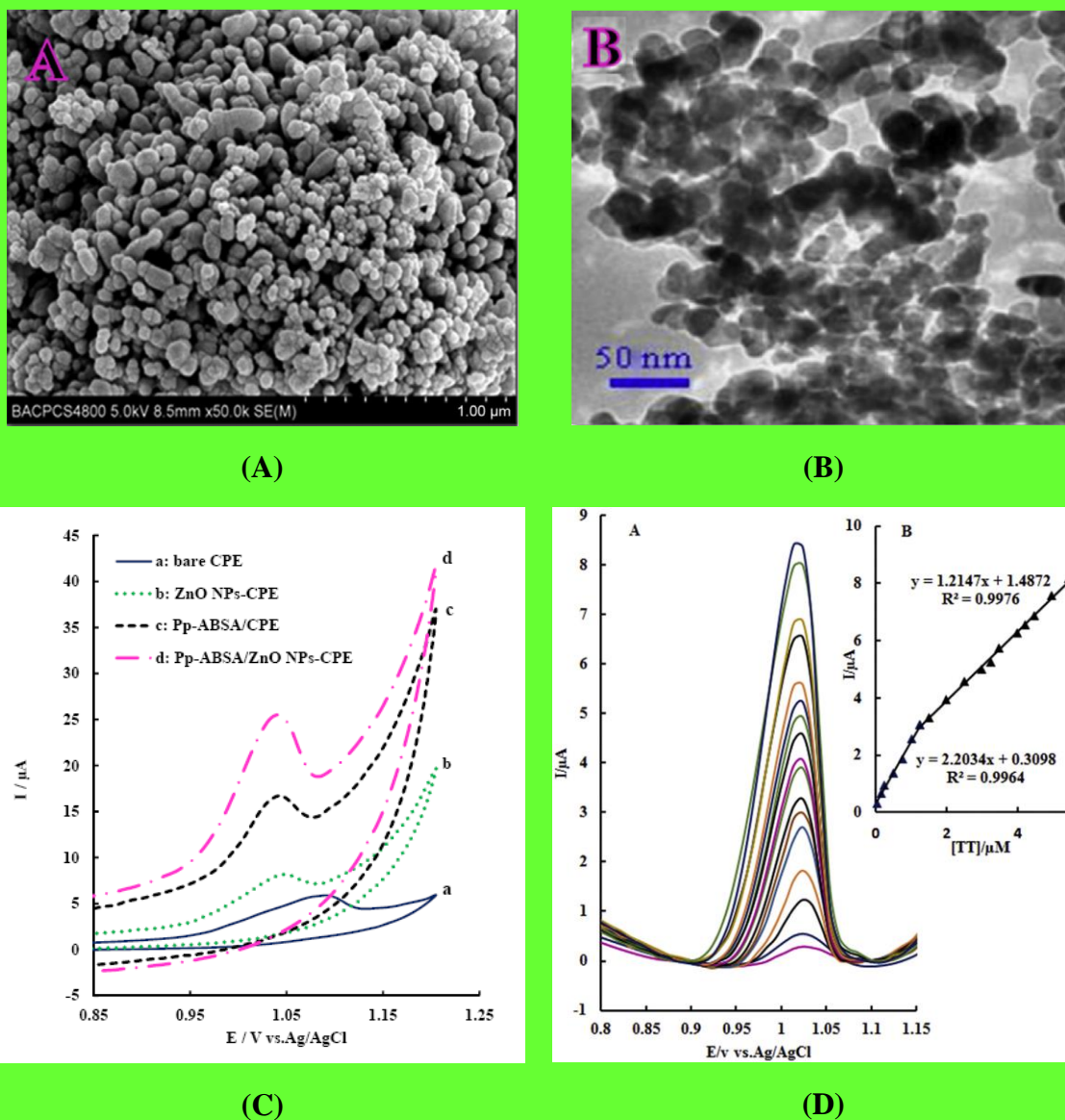


și o limită de cuantificare de  $0.94 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A fost investigată aplicabilitatea practică a PGMCPPE pentru determinarea Tz în diverse probe de alimente, cum ar fi bomboane și băuturi răcoritoare. Rata de recuperare pentru cele două probe a fost de 94.5%, respectiv 98.2%, iar valoarea RSD a fost mai mică de 1.0%. Aceste rezultate au demonstrat buna acuratețe a metodei propuse.<sup>30</sup>

Wang și coautorii<sup>31</sup> au raportat o metodă electrochimică rapidă pentru determinarea tartrazinei în probe de băuturi carbogazoase și suc de fructe, folosind GCE modificat cu poli(L-arginina)-oxid de grafen redus electrochimic. Electrocul modificat a prezentat un pic de oxidare mai mare decât cel al electrocului nemodificat datorită suprafeței și conductivității active electrochimice crescute. Curentul picului anodic a arătat o relație liniară asupra concentrației de Tz în intervalul  $1 - 250 \mu\text{mol L}^{-1}$  cu o limită de detecție de  $0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Selectivitatea sensorului a fost examinată folosind influența diferitelor specii interferente asupra detecției Tz. Rezultatele au indicat că sensorul a prezentat o selectivitate bună. Metoda propusă a fost aplicată cu succes la detectarea Tz în probe de băuturi carbogazoase și suc de fructe, iar valorile de recuperare obținute au fost cuprinse între 98.2% și 99.6%.<sup>31</sup>

Wang și colaboratorii<sup>32</sup> au preparat un senzor electrochimic sensibil bazat pe un electrod de carbon sticlos modificat cu nanotuburi de carbon cu pereți multipli și film polimeric imprimat molecular (MIP) utilizat pentru determinarea tartrazinei. MIP a fost utilizat în construcția sensorului datorită avantajelor sale: selectivitatea ridicată, costul scăzut și funcționarea simplă. Performanța electrocului modificat a fost analizată prin CV, spectroscopie de impedanță electrochimică și DPV. Rezultatele au indicat că filmul MIP a îmbunătățit răspunsul electrochimic pentru detectarea Tz. Studiul DPV a arătat o limită de detecție de  $0.027 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $S/N = 3$ ) pentru tartrazină cu două domenii de concentrație liniară cuprinse între  $0.08 - 1.00 \mu\text{mol L}^{-1}$  și  $1 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . MIP/MWCNTs/GCE a prezentat o selectivitate bună asupra oxidării electrochimice a Tz. Sensorul propus a fost aplicat cu succes pentru a determina Tz în diferite băuturi răcoritoare. Rata de recuperare a fost între 94.8% și 101.9% cu valoarea RSD mai mică de 4.5%, demonstrând acuratețea metodei propuse.<sup>32</sup>

Pentru determinarea electrochimică a tartrazinei în băuturi răcoritoare, un electrod pe baza de pastă de carbon modificat cu nanoparticule de oxid de zinc (ZnO NPs) și acid p-aminobenzensulfonic (p-ABSA) a fost dezvoltat de către Karim-Nezhad și colaboratorii.<sup>33</sup> Rezultatele sunt prezentate în Fig. 4.<sup>33</sup> Electrocul modificat a prezentat o activitate electrocatalitică bună asupra oxidării Tz prin obținerea de curenți mult mai mari. Curentul picului anodic a prezentat două relații liniare asupra concentrației de Tz în intervalele  $0.034 - 1.246 \mu\text{mol L}^{-1}$  și  $1.246 - 5.440 \mu\text{mol L}^{-1}$ , cu o limită de detecție de  $0.08 \mu\text{mol L}^{-1}$  și o sensibilitate bună de  $2.2034 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ . Sensorul propus a fost capabil să detecteze Tz în unele băuturi răcoritoare și în pudra de portocale. Conținutul de Tz a fost investigat prin metoda aditiei standard. Autorii au demonstrat acuratețea metodei lor prin tehnica HPLC.<sup>33</sup>



**Fig. 4.** (A) Imagine SEM a nanopaticulelor de oxid de zinc; (B) Imagine TEM a nanopaticulelor de oxid de zinc; (C) CV înregistrate cu CPE namodificat (curba a), ZnO NPs-CPE (curba b), Pp-ABSA/CPE (curba c) și Pp-ABSA/ZnO NPs-CPE (curba d) în  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS (pH 3.0) și  $5.98 \text{ umol L}^{-1}$  tartrazină; (D) Voltamograme puls diferențiale ale Pp-ABSA/ZnO NPs-CPE în  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS (pH 3.0) conținând concentrații diferite de tartrazină. Inset: curba de calibrare a concentrației pentru tartrazină.<sup>33</sup>

Penagos-Llanos și colaboratorii<sup>34</sup> au descris un senzor sensibil, simplu și ieftin pe bază de pastă de carbon modificat cu un microcompozit de complex de cobalt ( $\text{CoC}$ ) pentru determinarea simultană a perechilor de coloranți alimentari sintetici: tartrazină-galben amurg (Tz-SY) și tartrazină-roșu allura (Tz-AR). Caracterizarea electrochimică a electrodului pastă de carbon decorat cu complex de Co a fost investigată prin EIS. Rezultatele obținute au demonstrat că

modificarea CPE cu complexul de Co a fost realizată cu succes și că metoda aplicată este eficientă în creșterea atât a semnalului electrochimic, cât și a conductivității electrice a electrozului. Intervalul liniar de concentrație și limita de detecție a Tz a fost  $0.12 - 3.00 \mu\text{mol L}^{-1}$  și respectiv  $0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Reproducibilitatea a electrozului modificat a fost testată prin măsurători succesive ( $n = 6$ ) folosind doi senzori pentru o perioadă de 3 zile. Validarea metodei a fost realizată pentru un standard de gelatină nearomatizată mixat cu concentrații diferite de Tz-SY și Tz-AR și a indicat o rată de recuperare mai mare de 90%.<sup>34</sup>

În 2020, Lima și colaboratorii<sup>35</sup> au folosit nanoparticule de aur (AuNPs) și ftalocianina trasulfonată de nichel(II) (NiTsPc) pentru detectarea electrochimică a tartrazinei prin DPV. Filmul Layer-by-Layer (LBL) a fost preparat folosind arhitectura Au-(AuNPs-PAH/NiTsPc)<sub>5</sub>. Semnalul analitic pentru curentul picului anodic și concentrațiile Tz au fost obținute în două domenii liniare cuprinse între  $0 - 3 \mu\text{mol L}^{-1}$  și respectiv  $4 - 9 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Limita de detecție a fost de  $0.055 \mu\text{mol L}^{-1}$  pentru primul domeniu de concentrație liniar și  $0.122 \mu\text{mol L}^{-1}$  pentru al doilea domeniu de concentrație liniar. Studiul de selectivitate al senzorului a fost examinat în prezența diferitelor substanțe interferente, indicând faptul că aceste specii străine nu au interferat în detectarea tartrazinei. Electrozul Au/(AuNPs-PAH/NiTsPc)<sub>5</sub> a fost utilizat pentru detectarea Tz în probe de suc cu recuperările cuprinse între 97.74% și 108.26%.<sup>35</sup>

Raril și Manjunatha<sup>36</sup> au construit un senzor bazat pe CPE modificat cu dodecil sulfat de sodiu pentru determinarea tartrazinei. Electrozul modificat a arătat o îmbunătățire semnificativă a activității electrocatalitice în comparație cu electrozul nemodificat. Senzorul a fost folosit pentru determinarea electrochimică a Tz, indicând două intervale liniare de concentrație cuprinse între  $20 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$  și  $60 - 110 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Limita de detecție a fost de  $5.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ . SDSMCPE a prezentat o bună sensibilitate, selectivitate, stabilitate acceptabilă și repetabilitate. Studiul de recuperare a fost efectuat într-o probă de pudra galbenă cu aroma de lămâie arătând o recuperare bună, variind de la 91.1% la 104%.<sup>36</sup>

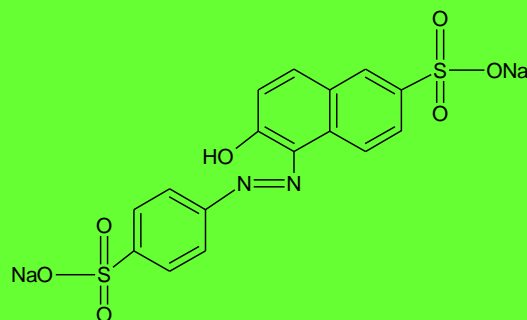
În cercetările efectuate de către Mazlan și coautorii<sup>37</sup>, a fost dezvoltat pentru prima dată un nou biosenzor prin modificarea unui electroz serigrafic (SPE) cu enzimă lacază și nanoparticule de aur pentru detectarea tartrazinei. Acest biosenzor se bazează pe imobilizarea enzimei lacazei pe microsferă de poli(glicidil metacrilat-co-n-butil acrilat) (poli(GMA-co-nBA)). Curentul picului anodic a prezentat o relație liniară asupra concentrației de Tz în intervalul  $0.2 - 14.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  cu un LOD de  $0.04 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Microsferele-laccase/AuNPs/SPE au fost evaluate pentru detectarea Tz în probe de băuturi și alimente. Procentul de recuperare a fost între 94.75% și 108.00% și RSD% a fost mai mic de 5%. Rezultatele au arătat că metoda biosenzorului a avut o corelație bună cu metoda HPLC sugerând că materialul propus a fost fiabil și validat.<sup>37</sup>

He și colaboratorii<sup>38</sup> au folosit un compozit de TiO<sub>2</sub> cu oxid de grafen redus pentru a modifica un electroz de carbon sticlos obținut prin reducere hidrotermală și electrochimică utilizat pentru determinarea tartrazinei. Morfologia materialelor sintetizate a fost analizată prin TEM și XRD. După ce senzorul a fost modificat electrochimic, curentul picului de oxidare pe suprafața electrozului a crescut. Rezultatele electrochimice au demonstrat că oxidarea Tz a fost un proces controlat de adsorbție care implică un proton și un electron. Senzorul TiO<sub>2</sub>-ErGO-GCE a detectat Tz într-un domeniu larg ( $0.02 - 20.00 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) și a atins un LOD de  $0.008 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Astfel, GCE modificat a fost aplicat cu succes pentru a detecta tartrazina din băutura carbogazoasă.<sup>38</sup>

### ***Senzori electrochimici utilizați pentru determinarea galbenului FCF***

Galbenul amurg (SY) (Fig. 5.) este un colorant alimentar sintetic, o pulbere de culoare portocalie-roșie și este solubilă în apă. Acest colorant azoic se găsește în domeniul cosmeticelor, medicamentelor și industriei alimentare, datorită avantajelor sale, cum ar fi îmbunătățirea culorii, texturii și aspectului produselor.<sup>5,39</sup> Este unul dintre coloranții sintetici cei mai frecvent utilizați în produsele alimentare și băuturi gasit sub numele de E110.<sup>40</sup> Galbenul amurg este cunoscut și sub numele de galben portocaliu S și CI Food Yellow 3, INS No.110 conform Comitetului de experți mixt FAO/OMS pentru aditivi alimentari (JECFA). Denumirea chimică a galbenului amurg este disodiu 2-hidroxi-1-(4-sulfonatofenilazo)naftalen-6-sulfonat.<sup>39</sup>



**Fig. 5.** Structura chimică a galbenului FCF

Multe studii au raportat că un consum excesiv de galben amurg ar putea provoca unele efecte negative asupra sănătății umane precum reacții astmatice, alergii, diaree, eczeme și anxietate.<sup>5,41,42</sup> Prin urmare, utilizarea galbenului amurg în alimente, băuturi și produse farmaceutice ar trebui verificate cu mai multa strictețe. Valoarea maximă a dozei zilnice acceptate (ADI) pentru galbenul amurg a fost stabilită la 2.5 mg/kg greutate corporală. Cu toate acestea, unele țări au permis o valoare maximă de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de SY în băuturi răcoritoare.<sup>5,42</sup>

Astfel, pentru asigurarea sănătății consumatorilor din întreaga lume, este foarte important să se determine conținutul de galben amurg în produsele alimentare și băuturi prin dezvoltarea unei tehnici analitice simple, rapide și ieftine. Până în prezent, numeroase metode analitice, cum ar fi cromatografia lichidă de înaltă performanță,<sup>43,44</sup> spectrofotometria,<sup>45,46</sup> electroforeza capilară,<sup>47</sup> fluorescența<sup>48</sup> și metode electrochimice au fost dezvoltate pentru detectarea galbenului amurg, dar multe dintre aceste metode electrochimice au atras în mod special atenția datorită simplității, rapidității, sensibilității ridicate, selectivității, costurilor reduse, manevrării bune și timpului scurt de testare.

În ultimii ani, au fost dezvoltați diferite tipuri de senzori electrochimici, așa cum se vede mai jos în Tabelul II, pe baza electrozilor de carbon sticlos, electrozilor de pastă de carbon, electrozilor de carbon serigrafiați și electrozilor de grafit creion care au fost modificați cu

materiale noi pentru detectarea electrochimică a galbenului amurg din probe de alimente și băuturi. Din acest tabel se poate observa că domeniile de concentrație liniara ale senzorilor electrochimici au fost foarte largi. Până acum, în fiecare an, materiale noi, substanțe și combinații ale acestora au fost folosite pentru dezvoltarea de noi senzori fiabili, sensibili și selectivi pentru determinarea electrochimică a galbenului amurg.

**Tabelul II. Sensori electrochimici utilizați pentru detectarea galbenului amurg în produse alimentare și băuturi.**

Senzor	Metoda	Domeniul liniar ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Limita de detecție ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Proba	Ref.
Dy <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NPs/MWCNTs/GCE	SWV	0.001 – 0.140	0.00035	puđră de băutură aromatică	5
ZnO-Pd/[C4mim]-[PF6]/PE	LSW	0.001 – 280	0.0004	suc de portocale și suc de fructe	9
IL/NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /rGO/CPE	DPV	0.05 – 30.00 30 – 500	0.03	puđra de suc de portocale	10
ERGO/GCE	DPV	0.05 – 1.00	0.0192	bauturi racoritoare	40
GO/AgNPs–MIPs/GCE	CV	0.1 – 0.6 0.6 – 12.0	0.02	bauturi racoritoare	41
rGO-g-CN/ZnO-AuNPs/GCE	SWV	0.005 – 0.085	0.0013	bomboane, suc de fructe si vin rosu	42
SiO <sub>2</sub> @MIP-PDA/CPE	DPV	0.0045 – 9.1	0.0015	fanta, bomboane cu aroma de portocale, puđra de jeleu cu aroma de portocale, snack de branza si suc de portocale	49
EGO-PGE	DPV	0.5 – 10.0	0.057	suc de portocale	50
GCE/MWCNT@MIP-PDA	DPV	0.0022 – 4.64	0.0014	jelu, fanta, mirinda, ciocolata, puđra instant de suc,	51

				inghetata si bomboane	
AuNPs/PANI-co-PoAN-co-PoT/GO/Au electrode	SWV	5 – 500	0.0142	bomboane, pudra instant de suc si bautura racoritoare	52
PDDA-Gr-Pd/GCE	DPV	0.01 – 10.0	0.002	bauturi racoritoare	53
GO/MWCNTs/GCE	LSW	0.09 – 8.00	0.025	suc de portocale	54
ZnO/Cysteic acid/GCE	DPV	0.1 – 3.0	0.03	bauturi racoritoare si gelatina de piersici	55
rGO/CPE	DPV	0.05 – 10.00	0.027	fanta, mirinda, snack de branza si cheetoz	56
CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE	DPV	0.02 – 0.2	0.0001	bomboane, jeleu si bauturi racoritoare	57
PLC/PGE	DPV	1 – 1000	0.125	prajitura, jeleu, suc de portocale si suc de fructe	58
Au-Pd-RGO/GCE	DPV	0.69 – 331.00	0.0015	bauturi racoritoare	59
ERGO-AuNRs/GCE	DPV	0.01 – 3.00	0.0024	suc de portocale, sifon cu aroma de portocale si jeleu	60
PDDA-Gr-(Pt-Cu)/GCE	DPV	0.02 – 10.00	0.006	bauturi racoritoare	61
PDDA-Gr-(Pd-Pt)/GCE		0.02 – 10.00	0.004		
PDDA-Gr-(Co-Ni)/GCE		0.008 – 10.00	0.002		
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -MWCNTs/GCE	DPV	0.2 – 3.5	0.0014	bauturi racoritoare	62
M-NCS/GCE	SWV	0.001 – 2.5	0.00095	mirinda, bautura pentru sportivi, bomboane si ciocolata	63



GC/EGr-1	LSV	6 – 100	1.8	suc de portocale	64
GC/EGr-2		1 – 100	0.3		
rGO/NiBTC/SPCE	DPV	0.05 – 5.0	0.025	bautura pentru sportivi cu aroma de portocale si bautura galbena pentru sportivi	65
ZnONF/CPE	SWV	0.001 – 0.022 0.022 – 0.154	0.0002	bauturi racoritoare	66
MIP/f-MWCNTs/GCE	DPV	0.05 – 100.00	0.005	bomboane, bomboana acoperita cu ciocolata, pudra de jeleu cu aroma de portocale, pudra de suc de piersici si bautura	67
Sparked Mo-SPE	DPV	0.005 – 0.25	0.002	suc de portocala si cocktail Margarita	68
MGO/ $\beta$ -CD/IL/AuNPs/GCE	DPV	0.005 – 2.000	0.002	minute maid si mirinda	69
ZnO/RGO/ZnO@Zn	DPV	0.01 – 5.00	0.003	bauturi racoritoare	70

**Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs/MWCNTs/GCE** – nanoparticule de oxid de disprozium/ nanotuburi de carbon cu pereți multipli/ electrod de carbon sticlos;

**ZnO-Pd/[C4mim]-[PF6]/PE** – nanoparticule de oxid de zinc dopate cu paladiu/ 1-butil-3-metilimidazolium hexafluorofosfat/ electrod pastă;

**IL/NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/rGO/CPE** – lichid ionic/ NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/ oxid de grafen redus/ electrod pasta de carbon;

**ERGO/GCE** – oxid de grafen exfoliat pe un electrod de carbon sticlos;

**GO/AgNPs–MIPs/GCE** – oxid de grafen decorat cu nanoparticule de argint – polimeri imprimați molecular/ electrod de carbon sticlos;

**rGO-g-CN/ZnO-AuNPs/GCE** – oxid de grafen redus-nitrură de carbon grafitic/ ZnO-nanoparticule de Au/ electrod de carbon sticlos;

**SiO<sub>2</sub>@MIP-PDA/CPE** – nanoparticule de dioxid de siliciu acoperite cu polidopamină cu imprimare moleculară/ electrod cu pastă de carbon;

**EGO-PGE** – electrod de grafit de tip creion modificat cu oxid de grafen preparat electrochimic;

**GCE/MWCNT@MIP-PDA** – electrod de carbon sticlos/ nanotuburi de carbon cu pereți multipli acoperiti cu polidopamină imprimata molecular;

**AuNPs/PANI-co-PoAN-co-PoT/GO/Au electrode** – nanoparticule de aur/ poli(anilină-co-o-anisidină-co-o-toluidină)/nanocompozit de oxid de grafen/electrod de aur;

**PDDA-Gr-Pd/GCE** – poli(clorură de dialildimetilamoniu) - grafen dispersat și nanoparticule de paladiu /electrod de carbon sticlos;

**GO/MWCNTs/GCE** – oxid de grafen/ nanotuburi de carbon cu pereți multipli/ electrod de carbon sticlos;

**ZnO/Cysteic acid/GCE** – ZnO/ acid cisteic/ electrod de carbon sticlos;

**rGO/CPE** – oxid grafen redus/ electrod pasta de carbon;

**CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE** – chitosan/ grafen/ nanotuburi de carbon cu pereți multipli/ nanoparticule de aur/ electrod de carbon sticlos;

**PLC/PGE** – electrod grafit de tip crion modificat cu poli(L-cisteine);

**Au-Pd-RGO/GCE** – electrod de carbon sticlos modificat cu Au-Pd-oxid de grafen redus;

**ERGO-AuNRs/GCE** – nanohibrid de nanorods de aur decorat cu nanofoi de oxid de grafen / electrod de carbon sticlos;

**PDDA-Gr-(Pd-Pt)/GCE** – poli(clorură de dialildimetilamoniu)-grafen dispersat-(Pd-Pt)/ electrod de carbon sticlos;

**PDDA-Gr-(Pt-Cu)/GCE** – poli(clorură de dialildimetilamoniu)-grafen dispersat-(Pt-Cu)/ electrod de carbon sticlos;

**PDDA-Gr-(Co-Ni)/GCE** – poli(clorură de dialildimetilamoniu)-grafen dispersat-(Co-Ni)/ electrod de carbon sticlos;

**Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs/GCE** – Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticule - nanotuburi de carbon cu pereți multipli/ electrod de carbon sticlos;

**M-NCS/GCE** – M-nanosfere de carbon dopat cu azot/ electrod de carbon sticlos;

**GC/EGr-1, GC/EGr-2** – electrozi de carbon sticlos modificati cu grafen;

**rGO/NiBTC/SPCE** – electrod de carbon serigrafat modificat cu oxid de grafen redus și NiBTC;

**ZnONF/CPE** – nanoflower de oxid de zinc/electrod pastă de carbon;

**MIP/f-MWCNTs/GCE** – polimer imprimat molecular/ nanotuburi de carbon cu pereți multipli funcționalizați/ electrod de carbon sticlos;

**Sparked Mo-SPE** – electrod de grafit serigrafic cu sparked molibden;

**MGO/ $\beta$ -CD/IL/AuNPs/GCE** –  $\beta$ -ciclodextrină/ lichid ionic/ nanoparticule de aur functionalizate pe oxid de grafen magnetic/ electrod de carbon sticlos;

**ZnO/RGO/ZnO@Zn** – oxid de zinc/ senzor neenzimatic electrochimic pe bază de grafen și fără lianți.

În lucrarea lui Baytak și a colaboratorilor<sup>5</sup>, a fost descrisă o nouă platformă voltametrică bazată pe un electrod de carbon sticlos modificat cu nanoparticule de oxid de disprozium ( $Dy_2O_3$ ) și nanotuburi de carbon cu pereți multipli. Platforma  $Dy_2O_3$ NPs/MWCNTs/GCE a fost utilizată pentru determinarea galbenului amurg în prezența de tartrazina. Pentru studiile de absorbție, autorii au concluzionat că SY este absorbit pe suprafața electrodului modificat după un timp de 200 s. Electrocul modificat a prezentat o activitate electrocatalitică bună. Platforma propusă a prezentat un pic anodic îmbunătățit la 0.705 V și un pic catodic la 0.690 V pentru SY. Raspunsul curentului picului a fost liniar cu concentrația de SY într-un domeniu de concentrație mare de 0.001 – 0.140  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și a atins o limită de detecție de 0.00035  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Aceste rezultate au fost obținute prin voltametrie cu undă pătrată. Platforma propusă a aratat o acuratețe mare și precizie pentru cuantificarea a SY. Rezultatele experimentale au demonstrat că platforma voltametrică dezvoltată ar putea fi utilizată în mod adecvat pentru detectarea SY în diferite probe de alimente și produse farmaceutice.<sup>5</sup>

Motahharinia și coautorii<sup>9</sup> au determinat galbenul amurg în probe reale folosind un senzor electroanalitic amplificat cu nanoparticule de Pd-ZnO. Pd-ZnO a fost obținut prin metoda de precipitare chimică și a fost utilizat în continuare pentru a modifica electrodul pastă în prezența de hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazolium ([C4mim]-[PF6]) și ulei de parafină. Senzorul ZnO-Pd/[C4mim]-[PF6]/PE a avut un semnal de oxidare de aproape 2.6 ori mai mare decât semnalul electrodului nemodificat. De asemenea, senzorul propus s-a dovedit a fi eficient în determinarea SY în domeniul de concentrație de 0.001 – 280  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , cu un LOD de 0.0004  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Rata de recuperare în diverse probe alimentare a fost între 97.84% – 104.73%.<sup>9</sup>

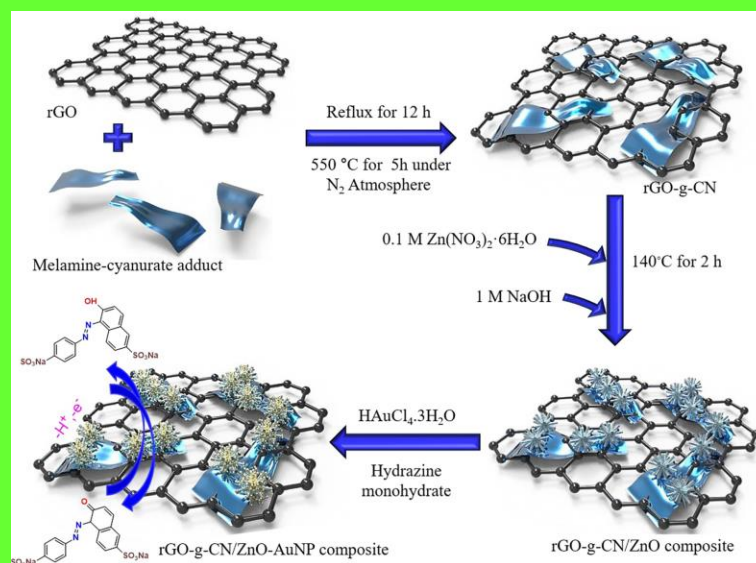
Un senzor electrochimic bazat pe modificarea electrodului pastă de carbon cu un nanocompozit de  $NiFe_2O_4$ -rGO și clorură de 1-etil-3-metilimidazoliu utilizat ca lichid ionic (IL) a fost dezvoltat de către Darabi și colaboratorii<sup>10</sup> utilizat pentru determinarea galbenului amurg când tartrazina (Tz) și roșu allura (AR) sunt prezente. Detectarea SY a fost realizată prin voltametrie puls diferențială rezultând o limită de detecție mica de 003  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și un interval liniar de concentrație mare cuprins între 0.05 – 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Valoarea coeficientului de difuzie fiind de  $3.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Senzorul propus (IL/ $NiFe_2O_4$ /rGO/CPE) a fost testat cu succes pentru a detecta SY, Tz și AR în probe reale: suc de portocale și probe de șampon. Rezultatele obținute au fost comparate cu rezultatele obținute prin HPLC. Valoarea RSD a fost mai mică de 5%, ceea ce indică faptul că senzorul dezvoltat a fost precis și eficient pentru examinare în diferite probe reale.<sup>10</sup>

În 2019, Tran și coautorii<sup>40</sup> au dezvoltat un senzor electrochimic pentru detectarea sensibilă a galbenului amurg folosind o abordare eficientă și simplă. Ei au preparat senzorul ERGO/GCE prin electrodepunerea oxidului de grafen redus electrochimic (ERGO) pe suprafața a senzorului

GCE și la caracterizat prin metodele CV și FE-SEM. Acest senzor a arătat o suprafață electroactivă bună, care permite adsorbția eficientă a SY. În condiții optime, senzorul propus a avut o relație liniară bună cu concentrațiile cuprinse între 0.05 – 1.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , o limită de detecție de 0.0192  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o sensibilitate de 9  $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ . Stabilitatea electrodului modificat a fost investigată timp de 2 zile, observându-se o ușoară scădere de 15% din răspunsul inițial. Avantajele acestui senzor dezvoltat au fost stabilitatea bună, sensibilitatea ridicată, selectivitatea și reutilizarea ridicată. Senzorul ERGO/GCE a fost folosit pentru detectarea SY în diferite probe de băuturi răcoritoare cu ratele de recuperare cuprinse între 93.35% și 107.7%. Rezultatele au sugerat că metoda propusă a prezentat o precizie bună. Autorii au demonstrat aplicabilitatea și acuratețea metodei lor folosind HPLC. Rezultatele obținute prin ambele metode au fost comparabile.<sup>40</sup>

În cercetarea efectuată de către Qin și colaboratori sai<sup>41</sup> a fost obținut un senzor electrochimic prin modificarea unui electrod de carbon sticlos cu oxid de grafen decorat cu nanoparticule de argint – polimeri imprimați moleculari (GO/AgNPs–MIPs) pentru recunoașterea selectivă a galbenului amurg. GO/AgNPs au fost sintetizate prin tehnologia de auto-asamblare, iar GO/AgNPs-MIPs au fost obținute cu tehnologia imprimării la suprafață prin utilizarea a SY ca șablon și respectiv a GO/AgNPs ca substrat. Senzorul rezultat a fost preparat printr-o tehnică de turnare în picătură la temperatura camerei. Senzorul dezvoltat GO/AgNPs–MIPs/GCE a prezentat două domenii dinamice liniare cuprinse între 0.1 – 0.6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și 0.6 – 12.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o limită de detecție de 0.02  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Selectivitatea a senzorului modificat a fost investigată prin testarea răspunsului electrochimic a 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  SY în prezența aceleiași concentrații de substanțe interferente, cum ar fi albastru strălucitor G, amarant, acid ascorbic și tartrazina. Rezultatele au sugerat că senzorul propus are o selectivitate ridicată asupra SY. Pentru reproductibilitate, autorii au construit 5 electrozi modificați în același mod obținându-se o deviație standard relativă de 8.33%. De asemenea, stabilitatea GO/AgNPs–MIPs/GCE a fost testată timp de o lună și s-a observat că senzorul a rămas în jur de 85.2% din răspunsul curentului inițial. Aceste rezultate au arătat o bună reproductibilitate și stabilitate a senzorului modificat. Senzorul propus a fost aplicat cu succes pentru determinarea SY în diverse băuturi răcoritoare.<sup>41</sup>

Vilian și colaboratorii<sup>42</sup> au dezvoltat un senzor pe baza de oxid grafen redus - nitruț de carbon grafitic și nanoparticule de ZnO-Au (rGO-g-CN/ZnO-AuNPs) pentru determinarea galbenului amurg. Procesul de formare a compozitului rGO-g-CN/ZnO-AuNPs este ilustrat în Fig. 6.<sup>42</sup> Senzorul propus a fost fabricat pe cale hidrotermală. Ei au obținut un interval de concentrație liniar de 0.005 până la 0.085  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , o limită de detecție de 0.0013  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o sensibilitate de 0.5898  $\mu\text{A nm}^{-1}\text{cm}^2$ . Autorii au verificat oxidarea SY în probe reale folosind SWV și au concluzionat că senzorul propus este eficient chiar și atunci când interferenții sunt prezenți, obținându-se recuperări bune.<sup>42</sup>



**Fig. 6.** Ilustrarea schematică a procesului de preparare a compozitului rGO-g-CN/ZnO-AuNPs.<sup>42</sup>

În 2021, Bonyadi și Ghanbari<sup>49</sup> au dezvoltat un senzor selectiv și sensibil pe baza de nanoparticule de siliciu acoperite cu polidopamină imprimate molecular pentru detectarea electrochimică a galbenului amurg în diferite probe alimentare. Autorii au sintetizat nanoparticule de SiO<sub>2</sub>@MIP-PDA printr-o metodă verde într-un singur pas folosind tehnologia imprimării suprafeței și le-au analizat prin microscopie electronică cu scanare cu emisie de câmp, microscopie cu forță atomică, microscopie electronică cu transmisie de înaltă rezoluție (HRTEM), spectroscopie în infraroșu cu Transformata Fourier și metode de analiză gravimetrică termice (TGA). Acesta a fost folosită pentru a modifica electrodul de pastă de carbon. Procesul de preparare a nanoparticulelor de SiO<sub>2</sub>@MIP-PDA imprimate cu SY este ilustrat în Fig. 7.<sup>49</sup> Senzorul dezvoltat a demonstrat o sensibilitate bună, selectivitate ridicată, stabilitate bună și o reproductibilitate adecvată. SiO<sub>2</sub>@MIP-PDA/CPE a prezentat un domeniu dinamic liniar mare cuprins între 0.0045 pmol L<sup>-1</sup> și 9.1 pmol L<sup>-1</sup> și o limită de detecție mica de 0.0015 pmol L<sup>-1</sup> (S/N = 3). Aplicabilitatea senzorului modificat a fost testată în diverse probe alimentare: suc de portocale, pudră de jeleu cu aromă de portocale, bomboane, băutură cu fructe și snack cu brânză. Procentele de recuperare au fost mai mari de 96.19%. Precizia metodei utilizate a fost evaluată prin comparație cu o metoda spectrofotometrică de referință. Rezultatele obținute de senzorul propus sunt în concordanță cu rezultatele obținute prin tehnica spectrofotometrică.<sup>49</sup>

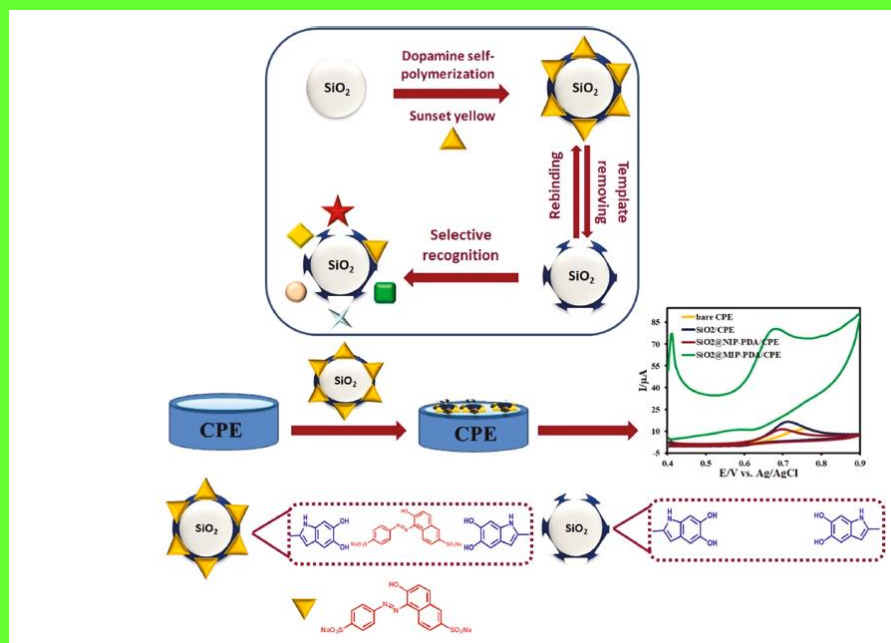
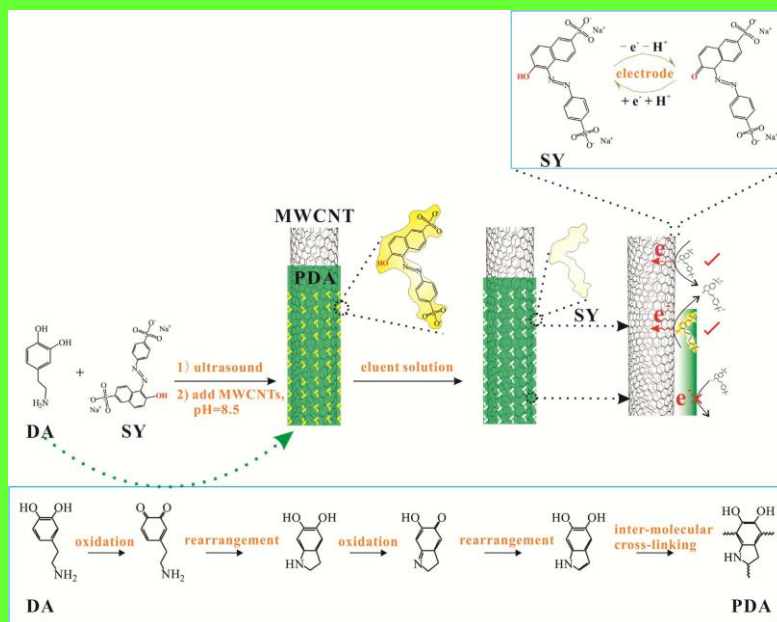


Fig. 7. Reprezentarea schematică a procesului de preparare a nanoparticulelor de  $\text{SiO}_2\text{@MIP-PDA}$  imprimate pe SY<sup>49</sup>

S. Tahtaisleyen și coautorii<sup>50</sup> au dezvoltat un electrod de grafit de tip creion modificat cu oxid de grafen pentru determinarea galbenului amurg. Prin intermediul cronoamperometriei, autorii au obținut un electrod de grafit de tip creion modificat cu oxid de grafen într-o singură etapă prin aplicarea unui potențial constant de + 1.9 V timp de 60 de secunde în 5.0 mol L<sup>-1</sup> acid sulfuric. CV și DPV au fost realizate în PBS pH 9 care conține 1.0 mmol L<sup>-1</sup> SY în intervalul de potențial + 0.4 V și + 1.0 V. Sensorul propus s-a dovedit a fi foarte stabil, prezentând o reproductibilitate bună și fără interferențe de la alte substanțe. Experimentele lor au aratat o limită de detecție de 0.057 μmol L<sup>-1</sup> și o limită de cuantificare egală cu 0.19 μmol L<sup>-1</sup>. Acest senzor EGO-PGE a fost folosit în continuare cu succes în analiza sucului de portocale.<sup>50</sup>

Yin și colaboratorii<sup>51</sup> au folosit un senzor pe baza de nanotuburi de carbon cu pereți multipli (MWCNT) acoperiti cu polidopamină imprimată molecular (MIP) pentru a determina galbenul amurg. Ei au obținut senzorul electrochimic prin picurarea unei suspensii de MWCNT@MIP-PDA pe un GCE, obținând astfel GCE/MWCNT@MIP-PDA. Procesul de preparare a MWCNT@MIP-PDA imprimat cu SY este prezentat în Fig. 8.<sup>51</sup> Acest senzor a arătat un răspuns electrochimic extrem de selectiv și ultrasensibil asupra SY în condiții optimizate datorită cavităților sale superficiale imprimate pe matricea electrocatalitică a MWCNT-urilor și datorită barierei electronice a polidopaminei neimprimate către moleculele exterioare. Prin urmare, senzorul obținut a aratat o relație liniară asupra concentrațiilor de SY de la 0.0022 μmol L<sup>-1</sup> la 4.64 μmol L<sup>-1</sup>, cu o limită de detecție de 0.0014 μmol L<sup>-1</sup>. De asemenea, a avut o bună stabilitate, selectivitate și reproductibilitate și a detectat galbenul amurg în probe reale spiked. S-a obținut un procent de recuperare în intervalul 96.0% și 103.6%.<sup>51</sup>





**Fig. 8.** Procedura de fabricare a MWCNT@MIP-PDA. (Jos) Procesul de formare a PDA prin polimerizare oxidativă spontană. (Sus) Mecanismul redox al SY<sup>51</sup>

Galbenul amurg a fost de asemenea determinat cu succes de către Alqarni și colaboratorii săi<sup>52</sup> folosind un terpolimer poli(anilină-co-o-anisidină-co-o-toluidină)/ nanocompozit de oxid de grafen (PANI-co-PoAN-co-PoT/GO) dopat cu nanoparticule de aur. Aceștia au sintetizat nanocompozitul menționat prin proces de polimerizare oxidativă in situ cu asistență ultrasonică. Ulterior, senzorul electrochimic a fost obținut prin acoperirea unui electrod de Au cu PANI-co-PoAN-co-PoT/GO și nanoparticule de Au. Comportamentul electrochimic al senzorului nou obținut, AuNPs/PANI-co-PoAN-co-PoT/GO/Au, a fost investigat prin CV și SWV și a arătat o curbă de calibrare liniară pentru galbenul amurg în intervalul 5 – 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o limită de detecție de 0.0142  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , dovedind astfel o bună selectivitate, o limită de detecție mică, o sensibilitate ridicată și o stabilitate excelentă al senzorului propus. Senzorul propus a fost capabil să detecteze SY în diferite produse alimentare pe baza răspunsului său rapid și a preparării ușoare.<sup>52</sup>

Determinarea simultană a SY și Tz a fost studiată de către Yu și colaboratorii<sup>53</sup> folosind un senzor electrochimic bazat pe un compozit poli(clorură de dialildimetilamoniu) (PDDA)- grafen dispersat (Gr) și nanoparticule de paladiu (Pd NP). Senzorul modificat a arătat o sensibilitate ridicată și o selectivitate bună datorită efectului sinergic a creșterii ariei active a suprafeței și îmbunătățirii eficienței a transferului de electroni a Gr și a nanoparticulelor de Pd. Comportamentul electrochimic al SY și Tz pe suprafața senzorului a fost examinat prin CV și DPV. Curentul picului anodic a prezentat o relație liniară asupra concentrației de SY în intervalul 0.01 – 10.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cu o limită de detecție de 0.002  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , obținută în condiții experimentale optime. Precizia și fiabilitatea a senzorului PDDA-Gr-Pd/GCE în probe reale au fost analizate

prin metoda aditiei standard. Metoda dezvoltată a fost utilizată cu succes pentru detectarea simultană a SY și Tz în probe de băuturi răcoritoare cu valori de recuperare acceptabile.<sup>53</sup>

Qiu și coautorii<sup>54</sup> au reușit să determine simultan galbenul amurg și tartrazina folosind un nanocompozit GO/MWCNT. Ei au preparat foi de oxid de nanografită din fulgi de grafit prin sonicarea soluției de GO și apoi centrifugând-o la 16000 RPM. Apoi au adăugat MWCNT la soluția GO obținută, urmată de centrifugare. Compozitul obținut a fost supus sonicării, rezultând astfel GO/MWCNT. Autorii au observat că în condiții optime curentul picului a crescut în intervalul 0.09 – 8.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pentru detecția tartrazinei și SY având, de asemenea o limită de detecție de 0.025  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pentru galben amurg și 0.01  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pentru tartrazină. Sensorul a fost validat cu succes pentru determinarea a SY și Tz în sucul de portocale.<sup>54</sup>

Dorajji și Jalali<sup>55</sup> au determinat simultan galbenul amurg și tartrazina folosind un electrod de carbon sticlos modificat cu ZnO și acid cisteic. Metoda DPV a fost utilizată ca metodă de investigare. Autorii au obținut curbe de calibrare liniare în intervalul 0.1 – 3.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și 0.07 – 1.86  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o limită de detecție de 0.01  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și 0.03  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pentru galbenul amurg și respectiv tartrazină. S-a obținut o recuperare bună (>95%) și un RSD% <5% pentru determinarea SY și Tz în băuturi răcoritoare procesate.<sup>55</sup>

Vatandost și colaboratorii<sup>56</sup> au folosit un CPE modificat cu oxid de grafen redus (rGO) pentru a monitoriza SY în diferite produse alimentare. rGO a fost preparat printr-o metodă prietenoasă cu mediul, folosind extract de ceai verde ca agent reducător. Autorii au obținut după optimizarea condițiilor de lucru un domeniu liniar cuprins între 0.05 și 10.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cu o limită de detecție de 0.027  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și de asemenea o sensibilitate mare. rGO/CPE a prezentat o activitate electrocatalitică foarte bună, precum și o conductivitate electrică ridicată, demonstrând o stabilitate excelentă a electrodului modificat. Autorii au studiat de asemenea și selectivitatea sensorului prin investigarea influenței diferitelor substanțe străine asupra detecției SY. S-a observat că roșul allura interferează în timp ce amarantul interferează ușor în determinarea SY. Testarea pe probe reale (băuturi și alimente) a evidențiat un timp rapid de analiză, recuperări bune și performanțe generale bune pentru detectarea SY în produse alimentare. Rezultatele experimentale au fost comparate cu rezultatele înregistrate prin spectroscopie UV-Vis utilizată ca metodă de referință, testul F și respectiv testul t Student pentru precizie și acuratețe și nu s-au observat diferențe între metode.<sup>56</sup>

Rovina și coautorii<sup>57</sup> au folosit un senzor electrochimic sensibil și simplu bazat pe un electrod de carbon sticlos modificat cu oxid de grafen (GO), nanotuburi de carbon multipereți, nanoparticule de aur și membrană nanocompozită de chitosan (CHIT) pentru a determina conținutul de galben amurg din produse comerciale. DPV a fost preferată ca metodă de analiză. Astfel, autorii au concluzionat că CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE a îmbunătățit semnalele electrochimice asupra detecției SY. Curbele de calibrare au arătat o corelație liniară de la 0.02 la 0.2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , în timp ce limitele de detectare și cuantificare au fost 0.0001  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (0.032  $\text{mg mL}^{-1}$ ) și respectiv 0.0002  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (0.096  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Ei au observat, de asemenea, că speciile interferente nu modifică în mod evident curentul picului de oxidare, demonstrând și o bună selectivitate. Sensorul construit a fost utilizat pentru determinarea SY în diverse probe de alimente și băuturi. RSD% a fost mai mic de 5%, ceea ce sugerează o precizie bună a sensorului

preparat. Mai mult, testul de recuperare a senzorului CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE a fost investigat utilizând probe cu o concentrație precisă de SY. Senzorul propus a demonstrat o bună aplicabilitate și fiabilitate pentru detectarea galbenului amurg.<sup>57</sup>

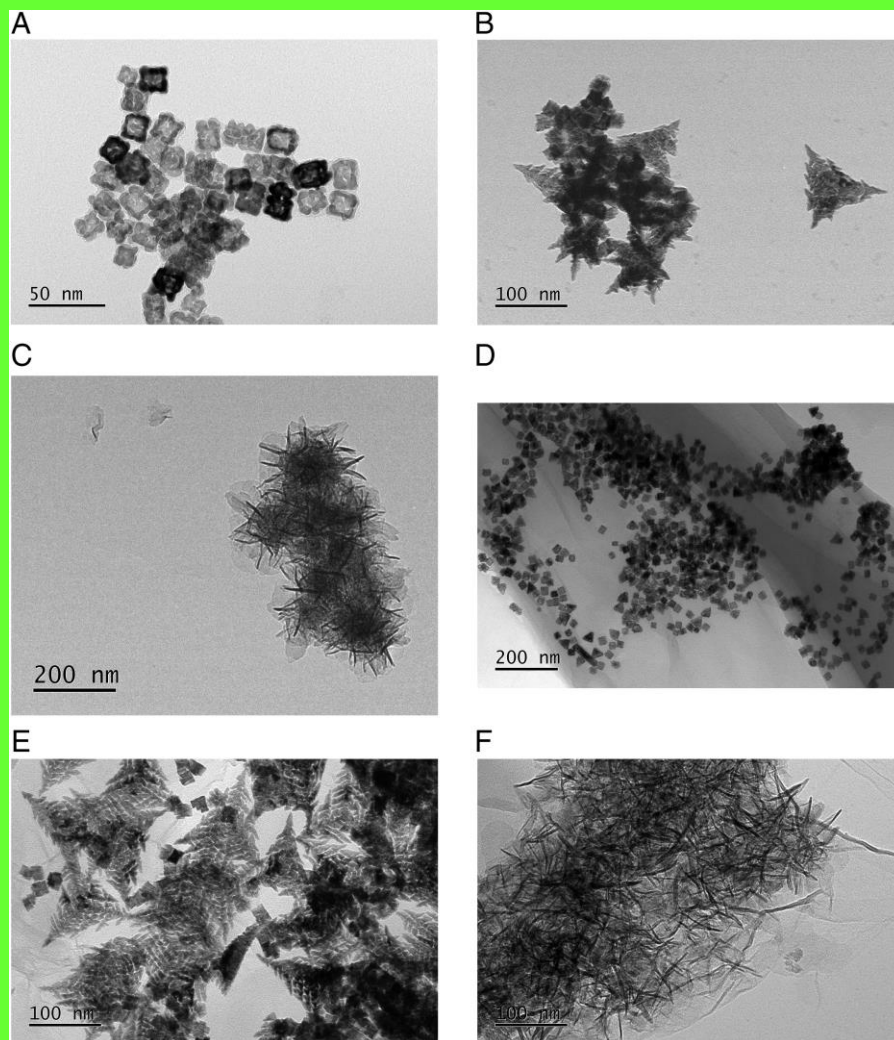
Koyun și Sahin<sup>58</sup> au determinat galbenul amurg în alimente și băuturi folosind un electrod de grafit tip creion modificat cu poli(L-cisteină) (PLC/PGE) prin metoda voltametriei puls diferențiale. Ei au observat că electrodul modificat a avut un răspuns electrochimic îmbunătățit decât senzorul nemodificat PGE. Răspunsul liniar pentru oxidarea electrochimică a SY al senzorului propus a fost în domeniul de concentrație de 10 – 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cu o limită de detecție de 0.125  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (S/N = 3). Acest senzor a fost testat cu succes în probe de alimente și băuturi, cum ar fi: jeleu, prăjitură, suc mixt de fructe și suc de portocale.<sup>58</sup>

Detectarea electrochimică a galbenului amurg a fost de asemenea studiată de către Wang și colaboratorii<sup>59</sup> folosind un GCE modificat cu un nanocompozit Au-Pd și oxid de grafen redus (RGO). Acest senzor a fost fabricat printr-o metodă simplă de sinteză într-o singură etapă. Prezența RGO a îmbunătățit legătura dintre nanocompozitele Au-Pd și de asemenea a accelerat transferul de sarcină între electrolit și suprafața senzorului. Electrodul modificat a prezentat o activitate electrocatalitică bună, cu un domeniu de concentrație liniar mare cuprins între 0.69 – 331.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o limită de detecție mica de 0.0015  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Senzorul Au-Pd-RGO/GCE a prezentat o sensibilitate ridicată, stabilitate și repetabilitate. Practicabilitatea senzorului dezvoltat a fost evaluată prin măsurarea concentrației de SY în băuturi răcoritoare. Rata de recuperare a fost obținută între 98.82% și 102.47%.<sup>59</sup>

Deng și colaboratorii<sup>60</sup> au folosit GCE modificat cu nanohibrid de nanorods de aur (AuNRs) decorate cu nanofoi de oxid de grafen (GO) pentru determinarea simultană a galbenului amurg și a tartrazinei. Senzorul dezvoltat a prezentat performanțe analitice foarte bune cu o limită de detecție mica de 0.0024  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și un interval liniar mare cuprins între 0.01 – 3.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pentru SY. ERGO-AuNRs/GCE a arătat că poate fi aplicat pentru detectarea SY în probe de suc de portocale, sifon de portocale și jeleu. Recuperările de SY în probele alimentare au fost de la 89.4% și 106.5%.<sup>60</sup>

Li și colaboratorii<sup>61</sup> au construit trei senzori electrochimici folosind nanoflori bimetalice Co-Ni, nanocadre bimetalice Pd-Pt, nanoframuri bimetalice Pt-Cu și poli(clorură de dialildimetilamoniu) (PDDA) - grafen dispersat (Gr) utilizați pentru detectarea galbenului amurg. Morfologia unică a nanocompozitelor PDDA-Gr-(Pt-Cu), PDDA-Gr-(Pd-Pt) și PDDA-Gr-(Co-Ni) conferă electrozilor electrochimici construiți o conductivitate electrică excelentă și suprafețe active mari și de asemenea îmbunătățește sensibilitatea determinării galbenului amurg. Morfologiile acestor nanocompozite, precum și morfologiile nanocadelor bimetalice Pd-Pt, nanoframelor bimetalice Pt-Cu și nanoflorilor bimetalice Co-Ni au fost caracterizate prin TEM (Fig. 9).<sup>61</sup> Senzorii propuși au fost examinați prin metodele CV și DPV și au fost comparate cu altele pentru detectarea SY. Intensitatea curentului anodic al SY asupra celor trei senzori modificați a fost liniară cu concentrația de SY în intervalele cuprinse între 0.02 – 10.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 0.02 – 10.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și respectiv 0.008 – 10.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Limitele de detecție obținute au fost 0.006  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 0.004  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și 0.002  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Rezultatele au arătat că PDDA-Gr-(Co-Ni)/GCE a fost mai sensibil, un cost scăzut și un domeniu dinamic liniar mare în comparație cu

ceilalți doi senzori, ceea ce a demonstrat că metalul poate realiza proprietăți similare și chiar mai bune. În plus, cei trei electrozi modificați au fost aplicați cu succes pentru determinarea SY în băuturi răcoritoare cu RSD mai mic de 5%.<sup>61</sup>



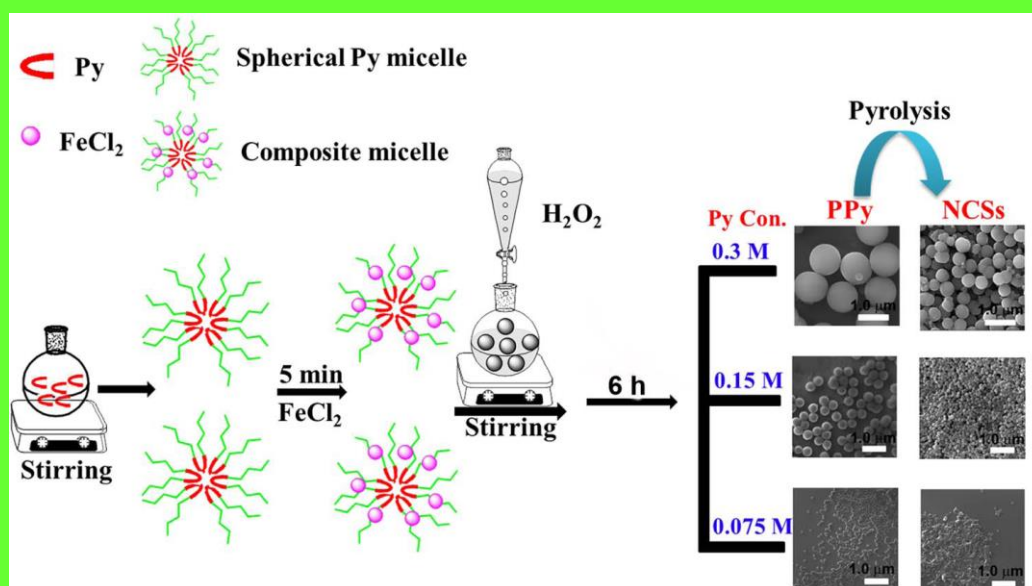
**Fig. 9.** (A) Imagini TEM ale nanocadrelor bimetalice Pd-Pt, (B) nanoframurilor bimetalice Pt-Cu și (C) nanoflorilor bimetalice Co-Ni. (D) Imagini TEM ale compozitului PDDA-Gr-(Pd-Pt), (E) compozitului PDDA-Gr-(Pt-Cu) și (F) compozitului PDDA-Gr-(Co-Ni)<sup>61</sup>

Recent, Shaikshavali și coautorii<sup>62</sup> au dezvoltat un senzor selectiv și sensibil bazat pe un electrod de carbon sticlos modificat cu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNT pentru detectarea galbenului amurg. Sinteza nanocompozitelor Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNT a fost realizată printr-o tehnică hidrotermală simplă într-un singur pas. Studiile FE-SEM, EDS și XRD au confirmat structura cubică și puritatea nanocompozitelor sintetizate. Performanța electrochimică a SY a fost evaluată prin metodele CV, DPV și EIS. Electrocul modificat a arătat o arie a suprafeței active mai mare, o conductivitate ridicată și o activitate electrocatalitică îmbunătățită asupra detectării SY. Analiza voltametriei puls diferențiale arată o limită de detecție de 0.0014 μmol L<sup>-1</sup> cu un domeniu de



concentrație liniară de  $0.2 - 3.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Studiul de selectivitate a fost testat folosind influența diferitelor substanțe interferente asupra determinării SY. Rezultatele experimentale au indicat că senzorul propus are selectivitate ridicată, repetabilitate bună, reproductibilitate și stabilitate. Aplicabilitatea senzorului  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MWCNTs/GCE}$  a fost examinată în băuturi răcoritoare. Valorile de recuperare au fost atinse între 90% și 101% dovedind că metoda propusă a fost adecvată pentru determinarea SY în probe de băuturi răcoritoare, obținându-se o bună precizie și acuratețe.<sup>62</sup>

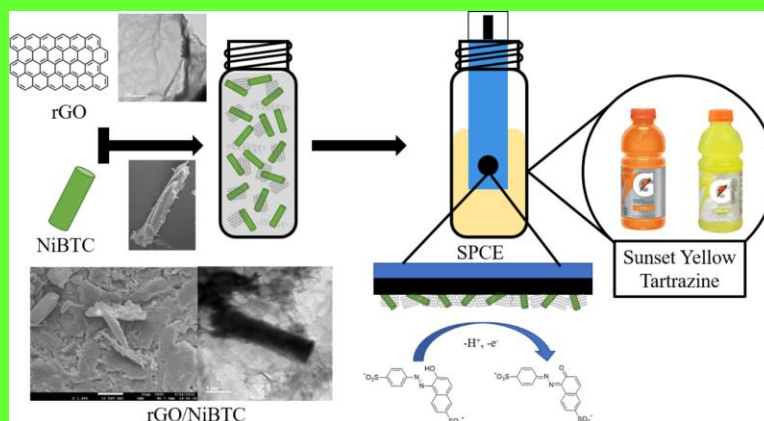
În 2019, Wang și coautorii<sup>63</sup> au dezvoltat o abordare „nano verde” pentru a produce nanosfere de polipirol monodispersat (PPy) cu dimensiuni reglabile prin simpla modificare a concentrației de pirol. S-a obținut un model liniar și apoi a fost folosit pentru a anticipa dimensiunea nanosferelor de polipirol. Sinteza nanosferelor de carbon dopate cu azot (NCSs) cu dimensiuni bine controlate a fost realizată prin carbonizarea directă a nanosferelor de PPy recoltate, ceea ce s-a dovedit o modalitate ușoară de fabricare a NCSs foarte dispersabile de dimensiuni controlate. Procedura de preparare a nanosferei PPy și a NCSs este prezentată în Fig. 10.<sup>63</sup> A fost investigat răspunsul electrochimic al nanosferelor de carbon dopat cu azot preparat pe SY. NCS-urile cu dimensiune medie (M-NCS) au prezentat cea mai bună performanță electrochimică, un domeniu liniar larg de la  $0.001 \mu\text{mol L}^{-1}$  la  $2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , o limită de detecție mica de  $0.00095 \mu\text{mol L}^{-1}$  și o sensibilitate foarte mare de  $679.16 \text{ Amol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ . Senzorul construit a fost aplicat pentru determinarea a SY folosind metoda de aditie standard în diferite probe alimentare, cum ar fi băuturi pentru sportivi, mirinda, ciocolată și bomboane. Rata de recuperare a fost cuprinsă între 91.7% și 102.3%.<sup>63</sup>



**Fig. 10.** Reprezentarea schematică a procesului de fabricare a nanosferei PPy și a NCSs cu dimensiune controlată<sup>63</sup>

Pogacean și colaboratori<sup>64</sup> au folosit 2 materiale pe bază de grafen utilizați ca modificatori ai electrozilor de carbon sticlos pentru a determina galbenul amurg. Pulsurile de curent au fost folosite pentru a exfolia tije de grafit pentru a obține modificatorii grafenului. Unul dintre ei (EGr-1) a fost exfoliat într-o soluție de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> și HNO<sub>3</sub>, în timp ce al doilea (EGr-2) a fost exfoliat în H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> și NaCl, obținându-se în final 2 senzori: GC/EGr-1 și GC/EGr-2, care au fost utilizați pentru determinarea SY. Autorii au obținut pentru fiecare electrod diferite sensibilități, domenii liniare și limite de detecție: pentru GC/EGr-1 sensibilitatea a fost de 0.017 μA/mol L<sup>-1</sup>, domeniul liniar între 6 și 100 mol L<sup>-1</sup> și limita de detecție a fost de 1.8 mol L<sup>-1</sup>, în timp ce pentru al doilea sensibilitatea a fost mai mare (0.021 μA/mol L<sup>-1</sup>), intervalul liniar a fost cuprins între 1 – 100 mol L<sup>-1</sup> și LOD a fost de 0.3 mol L<sup>-1</sup>, concluzionând că acesta din urmă a fost cel mai performant pentru detectarea SY dintre cele două dezvoltate. Aplicabilitatea electrodului GC/EGr-2 a fost evaluată în două probe de suc de portocale. Rezultatele au dovedit că senzorul propus a fost capabil să detecteze conținutul de SY în probe reale.<sup>64</sup>

Wu și Lee<sup>65</sup> au dezvoltat un senzor bazat pe un electrod de carbon imprimat serigrafic (SPCE) modificat cu o combinație de rGO (preparat hidrotermic) și cadre de metal organic de NiBTC utilizată pentru determinarea simultană a galbenului amurg și a tartrazinei. Procesul de modificare a SPCE cu rGO și NiBTC este descris în Fig. 11.<sup>65</sup> Senzorul modificat a avut un răspuns electrochimic crescut de 36.5 și respectiv de 33.4 ori pentru detectarea SY și Tz, comparativ cu electrodul nemodificat. Astfel, în urma experimentelor, autorii au obținut domeniile liniare cuprinse între 0.05 – 5.0 μmol L<sup>-1</sup> pentru SY și 0.075 – 5.0 μmol L<sup>-1</sup> pentru Tz și limite de detecție de 0.025 și 0.05 μmol L<sup>-1</sup> pentru galben amurg și respectiv pentru tartrazină, făcându-le adecvate pentru detecția SY și Tz în băuturi răcoritoare.<sup>65</sup>



**Fig. 11.** Procesul de construire al senzorului rGO/NiBTC/SPCE<sup>65</sup>

Ya și colaboratorii<sup>66</sup> au dezvoltat un senzor electrochimic bazat pe nanoflower de oxid de zinc (ZnONF) pentru a detecta galbenul amurg. Astfel, ZnONF a fost sintetizat printr-o metodă simplă și a fost folosit pentru a modifica un electrodul de pastă de carbon (CPE). În condiții optime, autorii au obținut o concentrație liniară în domeniul 0.001 – 0.022 μmol L<sup>-1</sup> și 0.022 –



0.154  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o limită de detecție de 0.0002  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (0.10  $\mu\text{g/L}$ ) ( $S/N = 3$ ). Reproducibilitatea senzorului propus a fost investigată prin utilizarea a șase electrozi modificați obținuți în același mod. De asemenea, stabilitatea electrodului modificat a fost examinată după păstrarea lui pe termen lung într-un frigider timp de șapte zile și s-a observat o scădere de până la 93.7% din răspunsul curentului inițial. Pentru a studia selectivitatea senzorului în detectarea SY, a fost testată influența a unor substanțe ca potențiale interferente. Rezultatele experimentale au indicat o bună stabilitate, reproducibilitate și o selectivitate mare a ZnONF/CPE. Senzorul propus a fost utilizat pentru determinarea SY în băuturi răcoritoare cu recuperări de 97.5% – 103%, rezultate care au fost confirmate prin HPLC.<sup>66</sup>

Un senzor pe baza de polimeri imprimați molecular pe nanotuburi de carbon cu pereți multipli funcționalizați (MIP/f-MWCNTs) a fost propus de către Arvand și colaboratorii<sup>67</sup> pentru determinarea galbenului amurg în probe alimentare. În acest studiu s-a folosit electropolimerizarea pentru a obține senzorul MIP. Astfel, acrilamida a fost electropolimerizată pe suprafața senzorului f-MWCNTs/GCE, în timp ce galbenul amurg a fost utilizat ca moleculă șablon. După extracția a SY, amprentele rămase s-au dovedit viabile pentru a reatașa selectiv moleculele de SY. Senzorul dezvoltat a fost folosit pentru determinarea electrochimică a SY, arătând un domeniu liniar de concentrație mare de 0.05 – 100.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o limită de detecție de 0.005  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , obținută în condiții optime. Studiile de interferență au confirmat că diferiți interferenți adăugați nu interferează cu detectarea SY. MIP/f-MWCNTs/GCE a fost aplicat cu succes în diferite probe de alimente, cum ar fi bomboane, bomboane acoperite cu ciocolată, pudră de jeleu cu aromă de portocale, praf de suc de piersici și băuturi racoritoare. Au fost obținute recuperările cuprinse între 91.4% și 105.9%. De asemenea, autorii au investigat acuratețea metodei dezvoltate folosind o metoda spectrofotometrică de referință. Rezultatele au arătat că valorile obținute prin metoda electrochimică sunt în concordanță cu cele obținute prin metoda spectrofotometrică UV-Vis.<sup>67</sup>

În 2020, Kolozof și colaboratorii<sup>68</sup> au dezvoltat pentru prima dată un electrod de grafit serigrafat modificat cu molibden generat (Mo-SPE) utilizat pentru determinarea simultană a galbenului amurg și a tartrazinei. Mo-SPEs au fost obținute prin aplicarea a 40 de cicluri în condiții ambientale realizate la 1.2 kV, Mo fiind conectat la polul „+” în timp ce SPE la polul „-”. În condiții optime, electrodul modificat a arătat un domeniu de concentrație liniar cuprins între 0.005 și 0.25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o limită de detecție de 0.002  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Au fost efectuate studii de interferență și au arătat rezultate satisfăcătoare. La utilizarea senzorului Sparked Mo-SPE în probe reale s-au obținut recuperări în intervalul 94% -109%, dovedind eficiența acestuia în determinarea simultană a SY și Tz.<sup>68</sup>

Li și colaboratorii<sup>69</sup> au modificat un electrod de carbon sticlos cu oxid de grafit magnetic (MGO) funcționalizat cu  $\beta$ -ciclodextrină, lichid ionic și nanoparticule de aur pentru a determina galbenul amurg. Autorii au obținut acest senzor imprimat molecular în mai multe etape, începând cu coprecipitarea particulelor magnetite pe suprafața oxidului de grafen, rezultând MGO. Ulterior,  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) și lichidul ionic (IL) au fost adsorbite pe MGO, urmate de adăugarea de nanoparticule de aur (AuNPs) pe MGO/ $\beta$ -CD/IL obținut anterior. În final, MIP-urile au fost obținute prin polimerizare de precipitare. Astfel, în urma dezvoltării senzorului

menționat pentru detecția SY, autorii au obținut în condiții optime un domeniu liniar de concentrație mare cuprins între 0.005 și 2.000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o limită de detecție mica de 0.002  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Datorită abordării lor sinergice, senzorul preparat a arătat o sensibilitate ridicată, selectivitate bună și un răspuns rapid pentru detectarea galbenului amurg. Pentru examinarea fezabilității și aplicabilității, MGO/ $\beta$ -CD/IL/AuNPs/GCE a fost utilizat în detectarea galbenului amurg în diverse probe reale: mirinda, minute mead și apa spiked. Recuperările obținute au fost cuprinse între 97% – 105%, făcându-l potrivit pentru determinarea SY.<sup>69</sup>

Galbenul amurg a fost detectat cu succes în băuturi răcoritoare de către Wu și colaboratorii,<sup>70</sup> care a dezvoltat un senzor nonezimatic pe baza de oxid de zinc și oxid de grafen. Astfel, ZnO/RGO/ZnO a fost crescut pe o folie de Zn printr-o tehnică hidrotermală, în care folia de zinc acționează atât ca suport pentru oxidul de zinc, cât și ca reductor pentru oxidul de grafen și de asemenea, ca sursă pentru zinc în stratul inferior. Senzorul obținut ZnO/RGO/ZnO@Zn s-a dovedit a fi eficient pentru determinarea SY cu următoarele caracteristici: reproductibilitate și stabilitate bună, o sensibilitate de 20.25  $\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ , o limită de detecție egală cu 0.003  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și un domeniu liniar cuprins între 0.01 – 5.00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .<sup>70</sup>

## Concluzii

Având în vedere efectele nocive pe care le au tartrazina și galbenul amurg asupra sănătății umane, există o nevoie esențială de îmbunătățire continuă a metodelor extrem de sensibile pentru detectarea a acestor doi coloranți azoici alimentari. Prin urmare, este extrem de important să se determine conținutul de tartrazină și galben amurg din alimente și băuturi pentru a îmbunătăți siguranța alimentelor din întreaga lume.

Prin urmare, această lucrare a descris tendințele recente în dezvoltarea senzorilor electrochimici și a metodelor utilizate pentru determinarea tartrazinei și a galbenului amurg în probe de alimente și băuturi. S-a aratat că există o varietate de senzori modificați care posedă limite mici de detecție, domenii mari de concentrație liniară, selectivități și sensibilități ridicate. În general, cele mai bune rezultate s-au obținut pe electrod de carbon sticlos modificat cu diverse nanoparticule metalice, nanotuburi de carbon cu pereți multipli și în ultimul timp cu polimeri imprimați molecular, utilizați ca modificatori unici sau în diferite combinații. De asemenea, pare să existe o tendință de a dezvolta senzori electrochimici care determină simultan galbenul amurg și tartrazina. Având în vedere importanța materiei descrise, este rezonabil să ne așteptăm ca senzori mai precisi, metode mai rapide și mai sensibile să fie dezvoltate în viitor pentru detectarea diversilor coloranți alimentari în probe comerciale reale.

## Referințe

1. K. Rovina, S. Siddiquee, and S. M. Shaarani, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **47**, 309 (2017).
2. O. I. Lipskikh, E. I. Korotkova, Ye. P. Khristunova, J. Barek, and B. Kratochvil, *Electrochim. Acta*, **260**, 974 (2018).
3. K. Rovina, P. P. Prabakaran, S. Siddiquee, and S. M. Shaarani, *Trends Anal. Chem.*, **85**, 47 (2016).

4. K. Rovina, S. Siddiquee, and S. M. Shaarani, *Trends Food Sci. Technol.*, **65**, 68 (2017)
5. A. K. Baytak, E. Akbaş, and M. Aslanoglu, *Anal. Chim. Acta*, **1087**, 93 (2019).
6. E. Blanco, L. Hristova, R. Martínez-Moro, L. Vázquez, G. J. Ellis, L. Sánchezd, M. del Pozo, M. D. Petit-Domínguez, E. Casero, and C. Quintana, *Sens. Actuators B Chem.*, **324**, 128731 (2020).
7. J. Penagos-Llanos, O. García-Beltrán, E. Nagles, and J. J. Hurtado, *Electroanalysis*, **32**, 2174 (2020).
8. L. Magerusan, F. Pogacean, M. Coros, C. Socaci, S. Pruneanu, C. Leostean, and I. O. Pana, *Electrochim. Acta*, **283**, 578 (2018).
9. M. Motahharinia, H. A. Zamani, and H. Karimi-Maleh, *Eurasian Chem. Commun.*, **2**, 760 (2020).
10. R. Darabi and M. Shabani-Nooshabadi, *Food Chem.*, **339**, 127841 (2021).
11. L. Zhao, B. Zeng, and F. Zhao, *Electrochim. Acta*, **146**, 611 (2014).
12. J. Yi, L. Zeng, Q. Wu, L. Yang, and T. Xie, *Food Anal. Methods*, **11**, 1608 (2018).
13. M. A. Karimi, V. H. Aghaei, A. Nezhadali, and N. Ajami, *Food Anal. Methods*, **11**, 2907 (2018).
14. S. Tahtaisleyen, O. Gorduk, and Y. Sahin, *Anal. Lett.*, **53**, 1683 (2020).
15. Z.-Z. An, Z. Li, Y.-Y. Guo, X.-L. Chen, K.-N. Zhang, D.-X. Zhang, Z.-H. Xue, X.-B. Zhou, and X.-Q. Lu, *Chin. Chem. Lett.*, **28**, 1492 (2017).
16. M. A. Prado, L. F. V Boas, M. R. Bronze, and H. T. Godoy, *J. Chromatogr. A*, **1136**, 231 (2006).
17. W. de A. S. Bento, B. P. Lima, and A. P. S. Paim, *Food Chem.*, **183**, 154 (2015).
18. D. Chen, M. Wu, S. Xie, X. Li, Y. Tao, X. Wang, L. Huang, Y. Pan, D. Peng, and Z. Yuan, *J. Chromatogr. Sci.*, **57**, 462 (2019).
19. E. Dinç, A. H. Aktaş, D. Baleanu, and Ö. Üstündağ, *J. Food Drug Anal.*, **14**, 284 (2006).
20. M. Vidal, R. Garcia-Arrona, A. Bordagaray, M. Ostra, and G. Albizu, *Talanta*, **184**, 58 (2018).
21. F. Soponar, A. C. Moț, and C. Sârbu, *J. Chromatogr. A*, **1188**, 295 (2008).
22. T.-X. Tang, X.-J. Xu, D.-M. Wang, Z.-M. Zhao, L.-P. Zhu, and D.-P. Yang, *Food Anal. Methods*, **8**, 459 (2015).
23. R. Li, Z.-T. Jiang, and Y.-H. Liu, *J. Food Drug Anal.*, **16**, 91 (2008).

24. R. Sahraei, A. Farmany, and S. S. Mortazavi, *Food Chem.*, **138**, 1239 (2013).
25. X. Zhao, Y. Liu, J. Zuo, J. Zhang, L. Zhu, J. Zhang, *J. Electroanal. Chem.*, **785**, 90 (2017).
26. M. Sakthivel, M. Sivakumar, S.-M. Chen, and K. Pandi, *Sens. Actuators B*, **256**, 195 (2018).
27. H. H. AL-Refai, A. A. Ganash, and M. A. Hussein, *Synth. Met.*, **280**, 116875 (2021).
28. L. F. de Lima, A. L. Ferreira, C. C. Maciel, M. Ferreira, and W. R. de Araujo, *Talanta*, **227**, 122200 (2021).
29. K. Rovina, S. Siddiquee, and S. Md Shaarani, *Drug Chem. Toxicol.*, **44**, 447 (2021).
30. J. G. Manjunatha, *Heliyon*, **4**, e00986 (2018).
31. P. Wang, X. Liu, Q. Hu, H. Gao, and W. Ma, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **15**, 8901 (2020).
32. Z. Wang, Y. Shan, L. Xu, G. Wu, and X. Lu, *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, **22**, 83 (2017).
33. G. Karim-Nezhad, Z. Khorablou, M. Zamani, P. S. Dorraji, and M. Alamgholiloo, *J. Food Drug Anal.*, **25**, 293 (2017).
34. J. Penagos-Llanos, O. García-Beltrán, J. A. Calderón, J. J. Hurtado-Murillo, E. Nagles, and J. J. Hurtado, *J. Electroanal. Chem.*, **852**, 113517 (2019).
35. L. F. de Lima, C. C. Maciel, A. L. Ferreira, J. C. de Almeida, and M. Ferreira, *Mater. Lett.*, **262**, 127186 (2020).
36. C. Raril and J. G. Manjunatha, *Port. Electrochim. Acta*, **39**, 59 (2021).
37. S. Z. Mazlan, Y. H. Lee, and S. A. Hanifah, *Sensors*, **17**, 2859 (2017).
38. Q. He, J. Liu, X. Liu, G. Li, P. Deng, J. Liang, and D. Chen, *Sensors*, **18**, 1911 (2018).
39. K. Rovina, L. A. Acung, S. Siddiquee, J. H. Akanda, and S. M. Shaarani, *Food Anal. Methods*, **10**, 773 (2017)
40. Q. T. Tran, T. T. Phung, Q. T. Nguyen, T. G. Le, and C. Lagrost, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 7539 (2019).
41. C. Qin, W. Guo, Y. Liu, Z. Liu, J. Qiu, and J. Peng, *Food Anal. Methods*, **10**, 2293 (2017).
42. A. T. E. Vilian, S.-M. Kang, S. Y. Oh, C. W. Oh, R. Umapathi, Y. S. Huh, and Y.-K. Han, *Food Chem.*, **323**, 126848 (2020).
43. Ş. D. Zor, B. Aşçı, Ö. A. Dönmez, and D. Y. Küçükkaraca, *J. Chromatogr. Sci.*, **54**, 952 (2016).

44. S. P. Alves, D. M. Brum, É. C. B. de Andrade, and A. D. P. Netto, *Food Chem.*, **107**, 489 (2008).
45. A. Benvidi, S. Abbasi, S. Gharaghani, M. D. Tezerjani, and S. Masoum, *Food Chem.*, **220**, 377 (2017).
46. M. S. El-Shahawi, A. Hamza, A. A. Al-Sibaai, A. S. Bashammakh, and H. M. Al-Saidi, *J. Ind. Eng. Chem.*, **19**, 529 (2013).
47. H.-Y. Huang, Y.-C. Shih, and Y.-C. Chen, *J. Chromatogr. A*, **959**, 317 (2002).
48. Y. Yuan, X. Zhao, M. Qiao, J. Zhu, S. Liu, J. Yang, and X. Hu, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **167**, 106 (2016).
49. S. Bonyadi and K. Ghanbari, *Microchem. J.*, **167**, 106322 (2021).
50. S. Tahtaisleyen, O. Gorduk, and Y. Sahin, *Anal. Lett.*, **54**, 394 (2021).
51. Z.-Z. Yin, S.-W. Cheng, L.-B. Xu, H.-Y. Liu, K. Huang, L. Li, Y.-Y. Zhai, Y.-B. Zeng, H.-Q. Liu, Y. Shao, Z.-L. Zhang, and Y.-X. Lu, *Biosens. Bioelectron.*, **100**, 565 (2018).
52. S. A. Alqarni, M. A. Hussein, and A. A. Ganash, *ChemistrySelect*, **3**, 13167 (2018).
53. L. Yu, H. Zheng, M. Shi, S. Jing, and L. Qu, *Food Anal. Methods*, **10**, 200 (2017).
54. X. Qiu, L. Lu, J. Leng, Y. Yu, W. Wang, M. Jiang, and L. Bai, *Food Chem.*, **190**, 889 (2016).
55. P. S. Dorraji and F. Jalali, *Food Chem.*, **227**, 73 (2017).
56. E. Vatandost, A. G.-H. Saraei, F. Chekin, S. N. Raeisi, and S.-A. Shahidi, *Food Chem. X*, **6**, 100085 (2020).
57. K. Rovina, S. Siddiquee, and S. M. Shaarani, *Food Control*, **82**, 66 (2017).
58. O. Koyun and Y. Sahin, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **13**, 159 (2018).
59. J. Wang, B. Yang, K. Zhang, D. Bin, Y. Shiraishi, P. Yang, and Y. Du, *J. Colloid Interface Sci.*, **481**, 229 (2016).
60. K. Deng, C. Li, X. Li, and H. Huang, *J. Electroanal. Chem.*, **780**, 296 (2016).
61. L. Li, H. Zheng, L. Guo, L. Qu, and L. Yu, *J. Electroanal. Chem.*, **833**, 393 (2019).
62. P. Shaikshavali, T. M. Reddy, A. L. Narayana, O. M. Hussain, G. Venkataprasad, and T. V. Gopal, *J. Food Meas. Charact.*, **14**, 3319 (2020).
63. M. Wang, H. Shi, M. Cui, W. Liu, and X. Liu, *J. Electrochem. Soc.*, **166**, B13 (2019).
64. F. Pogacean, M. Coros, V. Mirel, L. Magerusan, L. Barbu-Tudoran, A. Vulpoi, R.-I. Stefan-van Staden, and S. Pruneanu, *Microchem. J.*, **147**, 112 (2019).

65. J.-H. Wu and H.-L. Lee, *Microchem. J.*, **158**, 105133 (2020).
66. Y. Ya, C. Jiang, T. Li, J. Liao, Y. Fan, Y. Wei, F. Yan, and L. Xie, *Sensors*, **17**, 545 (2017).
67. M. Arvand, M. Zamani, and M. S. Ardaki, *Sens. Actuators B Chem.*, **243**, 927 (2017).
68. P.-A. Kolozof, A. B. Florou, K. Spyrou, J. Hrbac, and M. I. Prodromidis, *Sens. Actuators B Chem.*, **304**, 127268 (2020).
69. J. Li, X. Wang, H. Duan, Y. Wang, Y. Bu, and C. Luo, *Talanta*, **147**, 169 (2016).
70. X. Wu, X. Zhang, C. Zhao, and X. Qian, *Talanta*, **179**, 836 (2018).

## **Determinarea electrochimică rapidă și sensibilă a tartrazinei în probe alimentare comerciale utilizand electrodul de pastă de carbon modificat cu IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO**

### **Rezumat**

A fost dezvoltat un senzor electrochimic (IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE) bazat pe modificarea electrodului de pasta de carbon cu un lichid ionic (1-butyl-2,3-dimetilimidazolium tetrafluoroborat) și un compozit (AuTiO<sub>2</sub>/GO) utilizat pentru determinarea rapidă și sensibilă a tartrazinei prin metoda voltametrie puls diferențială. În condiții experimentale optime, curentul picului a fost liniar cu concentrația de tartrazină în intervalele 1 – 400 μmol L<sup>-1</sup> și 400 – 1000 μmol L<sup>-1</sup>, cu sensibilitățile de 0.008 μA μmol L<sup>-1</sup> și respectiv 0.002 μA μmol L<sup>-1</sup> și cu o limită de detecție de 0.33 μmol L<sup>-1</sup> (S/N = 3). Pentru a demonstra performanța metodei, a fost studiată reproductibilitatea și valorile RSD% obținute au fost de 2.72%. Metoda a fost aplicată pentru determinarea sensibilă a tartrazinei în probe de băutură izotonică, muștar și vopsea galbena de oua cu ratele de recuperare cuprinse între 98.55% și 103.62%.

### **Introducere**

Tartrazina (Tz, E102) este un colorant alimentar organic sintetic care poate fi găsit în diverse produse alimentare, cum ar fi lactatele, băuturile, bomboanele, etc.<sup>1-3</sup> Coloranții alimentari sintetici prezintă anumite avantaje precum: culoare reproductibilă și mai strălucitoare, sensibilitate mai redusă la prelucrarea tehnologică, costuri de producție mai mici și stabilitate ridicată la lumină.<sup>4-5</sup>

Structura chimică a Tz conține gruparea azo (–N=N–) și gruparea –OH pe inelul aromatic. Cu toate acestea, conținutul de Tz ar trebui controlat datorită potențialului său nociv asupra sănătății umane;<sup>1,6</sup> prin urmare, cantitatea de tartrazină utilizată ar trebui monitorizată în mod constant. Comitetul mixt FAO/WHO de experți pentru aditivi alimentari (JECFA) și Comitetul științific al UE pentru alimente (SCF) au stabilit doza zilnică acceptabilă (DZA) pentru tartrazină de 7.5 mg kg<sup>-1</sup> greutate corporală pe zi.<sup>4,7</sup> Concentrațiile mari de Tz poate provoca astm bronșic la copii, alergii, anxietate, migrene, eczeme și toxicitate dermică.<sup>2,5,6,8</sup> Prin urmare, detectarea



conținutului de tartrazină în produsele alimentare este foarte importantă pentru îmbunătățirea siguranței alimentare din întreaga lume.

Până în prezent, pentru determinarea tartrazinei au fost raportate numeroase metode analitice, cum ar fi cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC),<sup>9-12</sup> electroforeza capilară (CE)<sup>13,14</sup> și spectrofotometria.<sup>15,16</sup> Aceste metode sunt utilizate pe scară largă cu precizie ridicată. Cu toate acestea, majoritatea dintre ele au nevoie de echipamente scumpe, cantități mari de solvenți organici, pretratare implicând extracția, separare și adsorbție cu costuri mari și timp lung de analiză. Pe de altă parte, metodele electrochimice au atras mai multă atenție datorită simplității, răspunsului rapid, sensibilității și selectivității ridicate și costului relativ scăzut. În ultimii ani, diferiți electrozi modificați (Tabelul I)<sup>1-3,5,6,8,17-24</sup> au fost dezvoltați pentru determinarea electrochimică a tartrazinei.

**Tabelul I.** Comparația diferiților electrozi utilizați pentru detectarea tartrazinei.

Electrod	Metodă	Domeniul liniar de concentrație ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Limita de detecție ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Ref.
MIP-MWNTs-IL@PtNPs/GCE <sup>a</sup>	DPV	0.03 – 5.0 5.0 – 20.0	0.008	1
Gr/PLPA/PGE <sup>b</sup>	DPV	2 – 100	1.54	2
CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE <sup>c</sup>	DPV	0.02 – 0.19	0.003	3
g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> /PGE <sup>d</sup>	DPV	0.1 – 10.0	0.21	5
MIP-PmDB/PoPD-GCE <sup>e</sup>	DPV	0.005 – 1.1	0.0035	6
Pp-ABSA/ZnO NPs-CPE <sup>f</sup>	DPV	0.0349 – 1.246 1.246 – 5.440	0.08	8
N-PC-G/CS/GCE <sup>g</sup>	DPV	0.05 – 15.0	0.036	17
PGMCPE <sup>h</sup>	CV	1 – 27 35 – 87	0.28	18
PLA-ERGO/GCE <sup>i</sup>	DPV	1 – 250	0.25	19
MIP/MWCNTs/GCE <sup>j</sup>	DPV	0.08 – 1.00 1 – 10	0.027	20
Au/(AuNPs-PAH/NiTsPc) <sub>5</sub> <sup>k</sup>	DPV	0.5 – 3.0	0.055	21

Au/(AuNPsP-PAH/NiTsPc) <sub>5</sub> <sup>k</sup>		4.0 – 9.0	0.122	
TiO <sub>2</sub> -ErGO-GCE <sup>l</sup>	SDLSV	0.02 – 20.00	0.008	22
Exfoliated graphite-GCE <sup>m</sup>	DPV	0.009 – 0.374	0.0028	23
PEDOT@TbHCF/GCE <sup>n</sup>	DPV	0.1 – 206 .0	0.032	24
IL/AuTiO <sub>2</sub> /GO/CPE	DPV	1 – 400 400 – 1000	0.33	This work

<sup>a</sup>Electrod de carbon sticlos acoperit cu un film de polimer imprimat molecular – nanotuburi de carbon cu pereți multipli – lichid ionic – nanoparticule de Pt; <sup>b</sup>Electrod de grafit creion modificat cu grafen/poli (L-fenilalanina); <sup>c</sup>Chitosan/oxid de grafen/ nanotuburi de carbon cu pereți multipli/nanoparticule de aur/electrod de carbon sticlos; <sup>d</sup>Nitrură de carbon grafitică/ electrod de grafit creion; <sup>e</sup>Copolimer imprimat molecular-m-dihidroxibenzen/o-fenildiamine/electrod de carbon sticlos; <sup>f</sup>Poli (acid p-aminobenzenesulfonic)/nanoparticule de oxid de zinc – electrod de pasta de carbon; <sup>g</sup>Chitosan/grafen N-dopat crescut pe nanocompozit de carbon poros ierarhic/electrod de carbon sticlos; <sup>h</sup>Poli(glicina)/electrod pasta de carbon; <sup>i</sup>Poli(L-arginina)-oxid de grafen redus electrochimic-electrod de carbon sticlos; <sup>j</sup>Polimer imprimat molecular/nanotuburi de carbon cu pereți multipli/electrod de carbon sticlos; <sup>k</sup>Film de ftalocianina de nichel (II)-tetrasulfonic-nanoparticule de Au; <sup>l</sup>TiO<sub>2</sub>-oxid de grafen redus-electrod de carbon sticlos; <sup>m</sup>Electrod de carbon sticlos modificat cu grafit exfoliat; <sup>n</sup>Poli(3,4-etilendioxitiofen)@ compozit de hexacianoferat de terbiu/ electrod de carbon sticlos.

În domeniul cercetării electrochimice electrozii cu pastă de carbon (CPE) au devenit foarte populari ca materiale pentru senzori, datorită modificării lor ușoare, curentului de fond scăzut, suprafeței de regenerare rapidă, rezistenței ohmice scăzute și costurilor reduse, precum și versatilității și ușurința cu care pot să fie funcționalizați prin încorporarea directă a diversilor modificatori în prepararea pastei de carbon.<sup>25,26</sup>

Utilizarea dioxidului de titan (TiO<sub>2</sub>) în senzorii electrochimici are multiple avantaje în comparație cu alte materiale, inclusiv costuri reduse, capacitate bună de adsorbție, conductivitate electrică bună etc. TiO<sub>2</sub> are tendința de a forma agregate dacă nu se folosește un surfactant, diminuând astfel stabilitatea și sensibilitatea senzorului. Prin urmare, este necesar să se ancoreze TiO<sub>2</sub> pe oxidul de grafen pentru îmbunătățirea dispersiei și pentru fixarea TiO<sub>2</sub> pe electrodul de pastă de carbon.<sup>27</sup>

Mai mult, sinteza nanoparticulelor cu morfologie controlată și dispersie mare pe suporturi cu suprafețe specifice mari facilitează controlul compoziției și mărimea fazei active catalitice. Nanoparticulele cu morfologie controlată și proprietăți dorite au cunoscut o dezvoltare remarcabilă în ultimii ani datorită potențialului lor vast în nanotehnologie.<sup>28</sup> Nanoparticulele de aur au fost preferate ca modificatori în acest studiu deoarece sunt capabile să amplifice sensibilitatea senzorilor electrochimici.<sup>3</sup>

Recent, lichidele ionice la temperatura camerei (IL) sunt compuși ionici non-moleculari care au fost dezvoltați și utilizați pe scară largă în multe domenii ale electrochimiei, chimiei biofizice,

științei materialelor, etc. datorită aplicațiilor și proprietăților lor unice, cum ar fi conductivitatea ridicată, stabilitate electrochimică, afinitatea lor de a interacționa cu diverse substanțe, interval electrochimic larg și toxicitate scăzută.<sup>29,30</sup>

În această lucrare, a fost dezvoltat un nou electrod pe baza de pastă de carbon modificat cu IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO utilizat pentru determinarea rapidă și sensibilă a tartrazinei în probe reale. Senzorul propus, IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE arată un răspuns bun pentru oxidarea electrochimică a tartrazinei în probele alimentare comerciale (de exemplu: băutura izotonică, muștar și vopsea galbena de oua).

## Parte experimentală

### *Materiale și reactivi*

Tartrazina, tetrafluoroborat de 1-butil-2,3-dimetilimidazoliu, pudra de grafit (< 20 μm, sintetică), pudră de oxid de grafen, fosfat monosodic, fosfat disodic, nitrat de fier (III), sulfat de cupru (II) pentahidrat, clorură de mangan (II), clorură de magneziu, sulfat de potasiu, clorură de potasiu, clorură de sodiu, azotat de sodiu, azotat de potasiu, acid ascorbic, D-glucoză, zaharoză, galben amurg FCF și roșu allura AC au fost achiziționate de la Sigma Aldrich, ulei de parafină de la Fluka (Buchs, Suedia) și nanopulberea de dioxid de titan (TiO<sub>2</sub>) (Degussa, P25) de la Wako Chemicals. Polivinilpirolidonă, M.W. 8000 și acid cloroauric (HAuCl<sub>4</sub>) au fost achiziționate de la Alfa-Aesar (Germania).

Soluția tampon fosfat (PBS, 0.1 mol L<sup>-1</sup>) a fost preparată utilizând fosfat monosodic și fosfat disodic. pH-ul soluției tampon a fost ajustat utilizând cantități diferite de soluție de NaOH sau HCl de 0.1 mol L<sup>-1</sup> pentru a obține pH-uri diferite (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 și 7.0). Soluția stoc de tartrazină 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> a fost preparată în apă deionizată. Soluțiile de lucru au fost preparate zilnic și protejate de lumina soarelui.

### *Aparatură și metode*

Analizele voltametriei ciclice (CV) și voltametriei puls diferențiale (DPV) au fost efectuate folosind un mini potențostat EmSTAT Pico (software PsTrace 5.7 PalmSens) conectat la un laptop pentru achiziția de date. Măsurătorile prin spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS) au fost realizate folosind un potențostat IVIUM COMPACTSTAT conectat la un laptop cu software IVIUM 2.025. Toate experimentele electrochimice au fost efectuate la aproximativ 22 °C. Rezultatele au fost înregistrate folosind o celulă electrochimică care conține trei electrozi: electrodul de pastă de carbon modificat, Ag/AgCl (0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl) și fir de Pt ca electrozi de lucru, referință și auxiliar. Ajustarea pH-ului a fost realizată cu un pH-metru Mettler Toledo.

Morfologia senzorilor a fost investigată prin microscopie electronică cu scanare (SEM). Imaginile SEM au fost realizate cu un microscop Quanta Inspect F al companiei FEI cu fascicul de electroni cu emisie în câmp (FEG) și o rezoluție de 1.2 nm echipat cu EDAX (Mn = 129 eV).

### ***Sinteza nanoparticulelor de Au***

Nanoparticule de Au (AuNPs) inconjurate de polivinilpirolidonă (PVP) au fost obținute prin metoda polioliului alcalin. O metodă de sinteză modificată, adaptată din studiile anterioare descrise în detaliu într-o publicație anterioară<sup>31</sup>, a fost realizată pentru producerea de nanoparticule monodisperse. Mai exact, s-au adăugat prin picurare 5 mL de 5 mmol L<sup>-1</sup> AuHCl<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O soluție Roth în etilenglicol (EG) la 100 mL soluție alcalină 25 mmol L<sup>-1</sup> NaOH și 5 mmol L<sup>-1</sup> PVP menținute la 120 °C în flux de hidrogen (25 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>) sub agitare într-un balon cu trei găuri. În această așa-numită sinteză a polioliului alcalin, EG servește atât ca agent reducător, cât și ca solvent. Temperatura se menține la 120 °C timp de 60 de minute pentru a obține procesul de nucleare și creșterea particulelor metalice datorită faptului că precursorul metallic este redus de EG la faza sa metalică. Suspensia de nanoparticule de metal așa cum este obținută conține particule distribuite uniform, având o dimensiune nano. Soluțiile au fost apoi răcite la temperatura camerei menținând în tot acest timp atmosfera inertă.

AuNPs au fost separate prin adăugarea de acetonă la suspensiile coloidale. Amestecul a fost apoi răcit la -16 °C timp de 24 de ore; precipitatele au fost spălate în mod repetat cu acetonă și separate prin centrifugare la 14000 rpm pentru a îndepărta orice urmă de PVP și EG. Ulterior a fost uscat în cuptor la 100 °C timp de 4 ore.

### ***Prepararea compozitului AuTiO<sub>2</sub>/GO***

Pentru sinteza compozitului AuTiO<sub>2</sub>/GO, 50 mg oxid de grafen și 50 mg TiO<sub>2</sub> au fost dispersate în apă deionizată și apoi ultrasunicate timp de 30 de minute fiecare. Cele două soluții au fost amestecate și ultrasunicate timp de 4 ore la 80 °C până când apa a fost îndepărtată. Materialul obținut a fost uscat timp de 24 de ore la 100 °C și apoi încălzit într-un curent de gaz inert la 300 °C. Apoi a fost redus folosind un amestec de reducere de 5% H<sub>2</sub>/Ar timp de 1 oră la 300 °C și apoi a fost răcit la temperatura camerei. În cele din urmă, compozitul Au/TiO<sub>2</sub>/GO a fost obținut prin impregnarea nanoparticulelor de Au sintetizate anterior pe pulberea de TiO<sub>2</sub>/GO, rezultând astfel un nou material compozit cu încărcare metalică de 5% (5% Au@TiO<sub>2</sub>/GO).

### ***Prepararea senzorului IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE***

Pentru prepararea senzorului electrochimic IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE s-au folosit 90 mg pulbere de grafit și 10 mg compozit AuTiO<sub>2</sub>/GO peste care s-au adăugat 40 μL ulei de parafină și s-au amestecat timp de 20-30 min pentru a forma un pastă omogenă. Apoi, 30 uL dintr-o soluție de tetrafluoroborat de 1-butil-2,3-dimetilimidazoliu utilizat ca lichid ionic (IL) (soluție stoc 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> în metanol) s-au adăugat la pasta de carbon pentru a forma electrodul de pastă de carbon modificat. Pasta obținută a fost introdusă într-un tub de plastic. Contactul electric a fost realizat prin introducerea unui fir de argint în pastă. Suprafața senzorului modificat a fost refacută prin netezirea pe o folie de aluminiu. Când nu a fost utilizat, IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE a fost păstrat la temperatura camerei, într-un loc uscat, ferit de lumină. Utilizarea nanoparticulelor de TiO<sub>2</sub> și Au a îmbunătățit conductivitatea senzorilor. Lichidul ionic a fost folosit ca electrocatalizator.

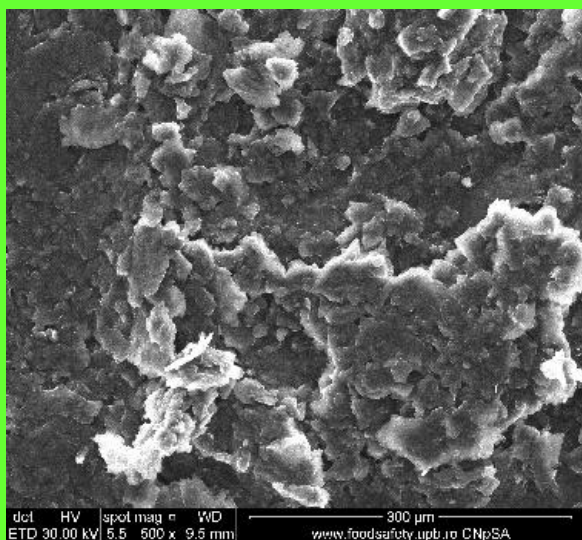
### *Prepararea probelor*

Pentru a testa aplicația practică, senzorul electrochimic propus a fost utilizat pentru determinarea tartrazinei în diferite produse alimentare comerciale: băutură izotonică, muștar și vopsea galbena de oua, care au fost achiziționate de la un supermarket local. Probele de băutură izotonică și cele de vopsea galbena de oua au fost diluate în PBS pH = 2.0, într-un raport de 1:1 (v/v) și amestecate cu diferite concentrații de tartrazină. Probele de muștar au fost cântărite, apoi au fost diluate de 10 ori cu PBS pH = 2.0, apoi au fost agitate timp de 15 min și apoi au fost filtrate, după care au fost amestecate cu diferite concentrații de tartrazină. Probele au fost proaspăt preparate imediat înainte de analiză.

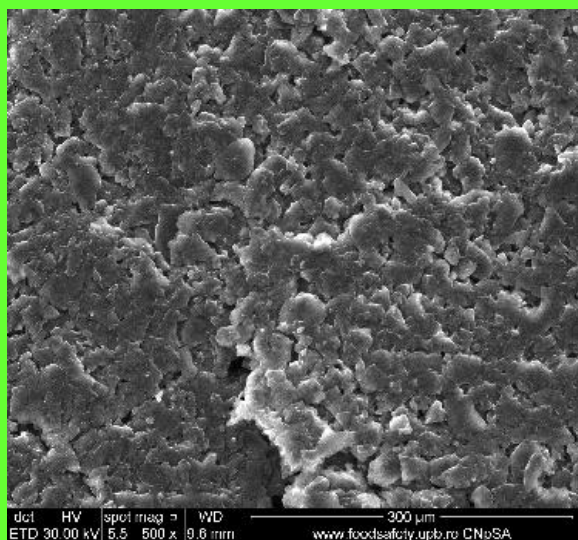
## Rezultate și discuții

### *Caracterizare SEM-EDX*

Tehnica SEM a fost utilizată pentru a caracteriza morfologiile de suprafață ale electrozilor construiți. Fig. 1 prezintă imaginile SEM ale senzorilor CPE, IL/CPE, AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE, IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE și spectru EDAX al senzorului IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE. O suprafață poroasă densă poate fi observată pentru CPE și IL/CPE, adăugând că pentru acesta din urmă suprafața este mai omogenă. Când a fost adăugat compozitul AuTiO<sub>2</sub>/GO și IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO la electrodul de pastă de carbon, microstructura se modifică. CPE modificat cu AuTiO<sub>2</sub>/GO prezintă o suprafață mai densă și uniformă, îmbunătățind astfel aria suprafeței și semnalul. În Fig. 1c și d, prezența Au/TiO<sub>2</sub> este confirmată de zonele mai luminoase din imaginile SEM și din spectrul EDAX (Fig. 1e).

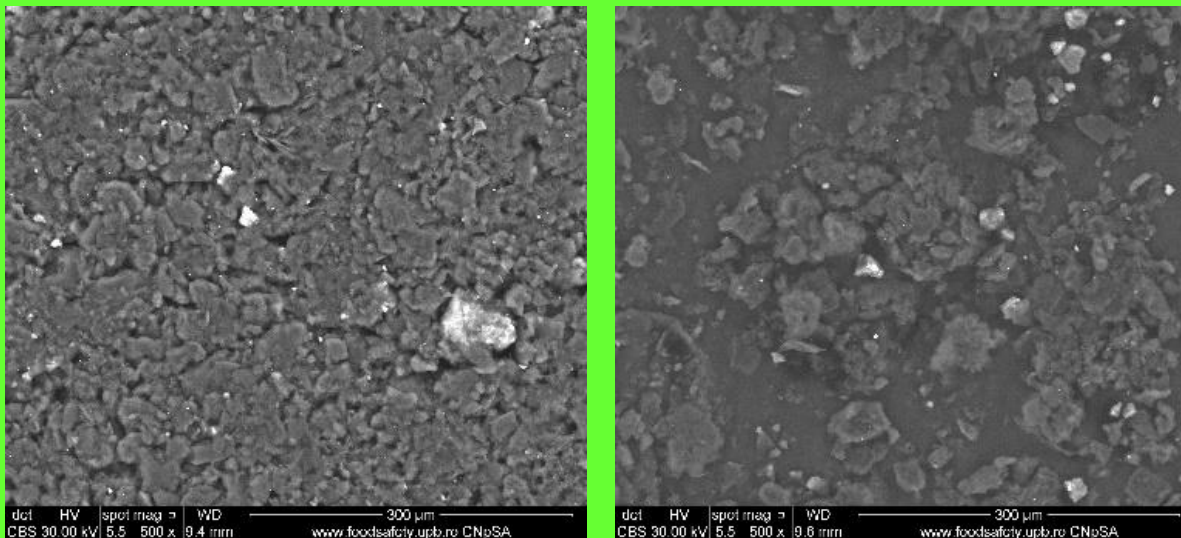


(a)



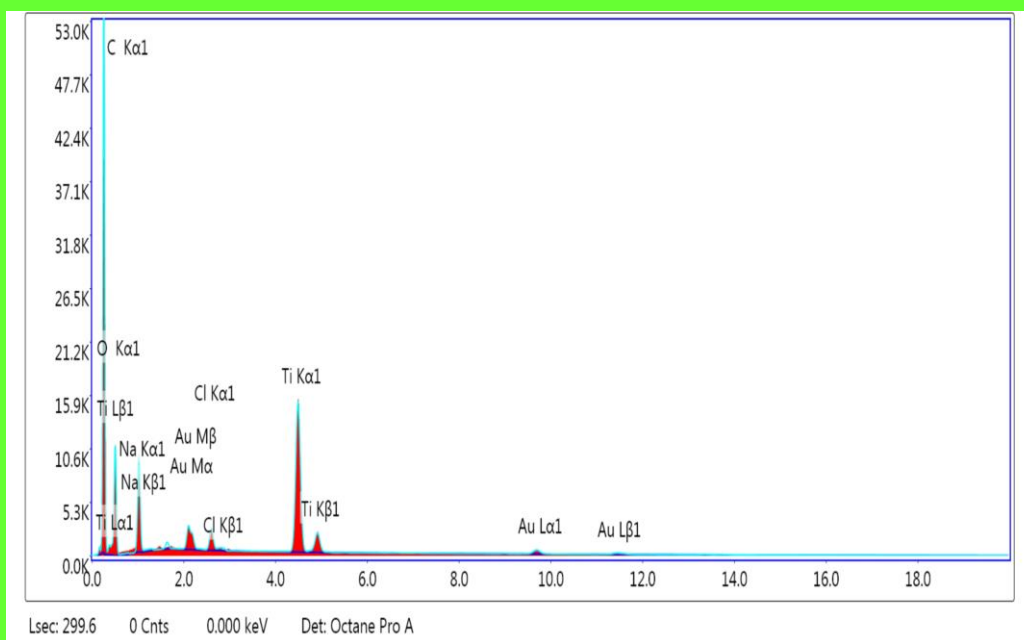
(b)





(c)

(d)



(e)

**Fig. 1.** Imaginile SEM ale (a) CPE, (b) IL/CPE, (c) AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE și (d) IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE; (e) Spectrul EDAX al IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE

Prezența compozitului AuTiO<sub>2</sub>/GO a fost demonstrată și prin maparea SEM. Fig. 2 prezintă maparea SEM al senzorului AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE. S-a observat că aurul/dioxidul de titan a fost distribuit pe întregul eșantion.



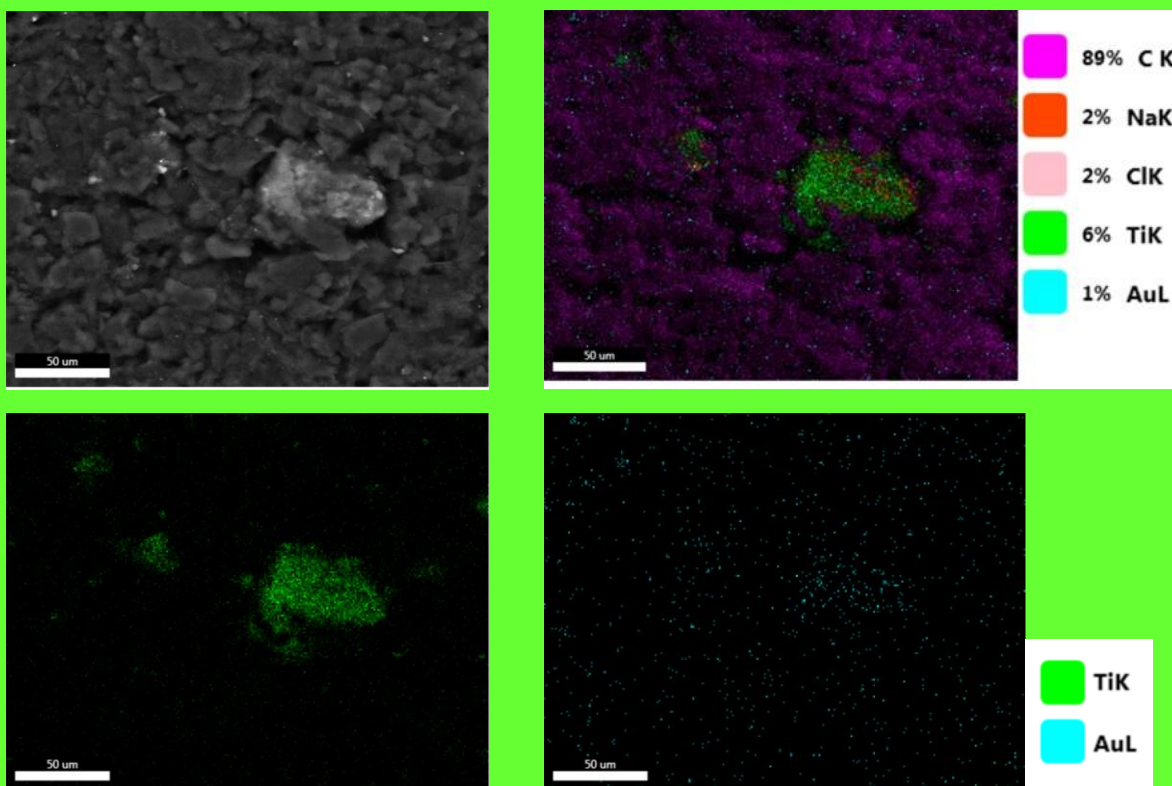


Fig. 2. Maparea SEM al senzorului Au/TiO<sub>2</sub>/GO/CPE

### *Caracterizarea electrochimică a senzorilor*

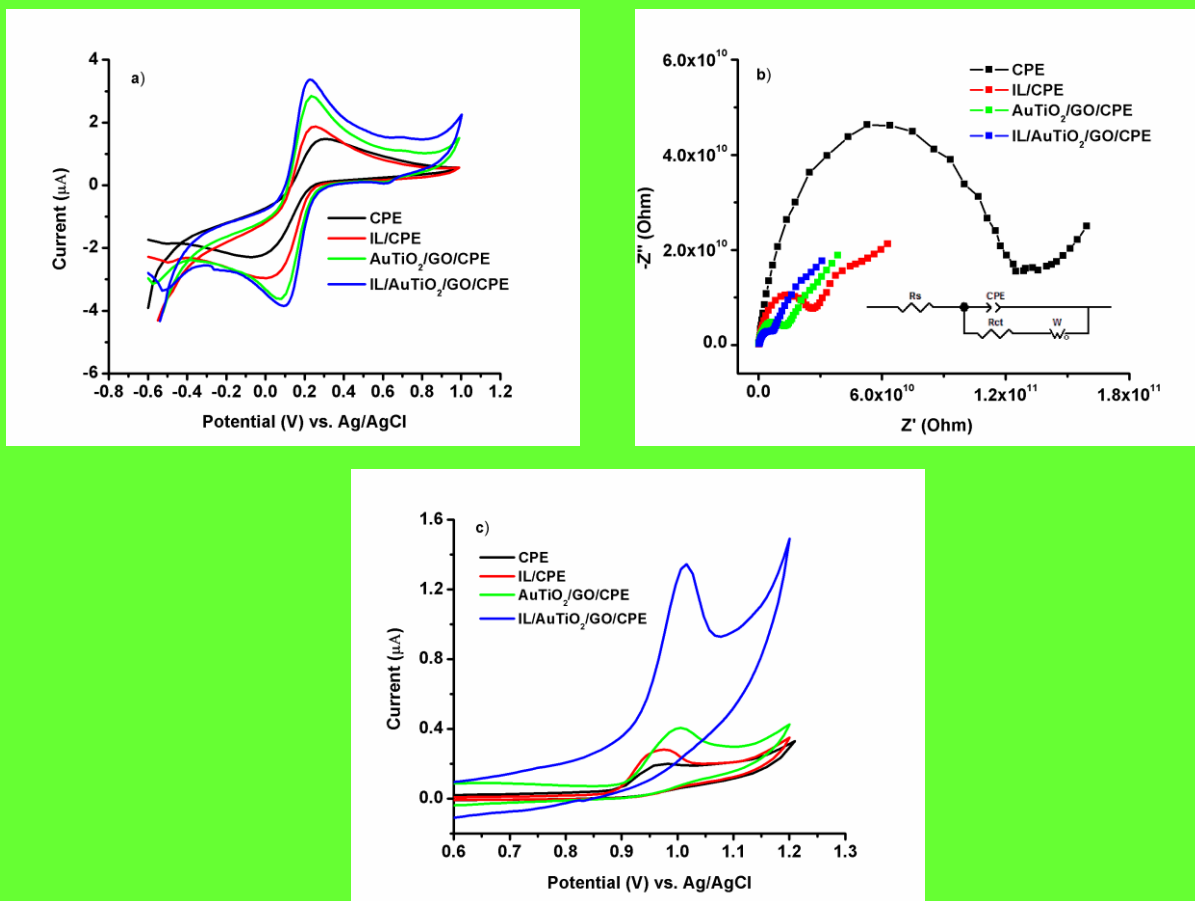
Caracterizarea electrochimică a senzorilor: electrod de pastă de carbon (CPE), electrod de pastă de carbon modificat cu IL (IL/CPE), electrod de pastă de carbon modificat cu AuTiO<sub>2</sub>/GO (AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE) și electrod de pastă de carbon modificat cu IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO (IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE) a fost realizată folosind următoarele metode: voltametria ciclică (CV) și spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS).

Voltametria ciclică a fost folosită pentru a studia răspunsul electrochimic al senzorului modificat. Măsurătorile de CV au fost efectuate într-o soluție de  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ) într-un interval de potențial cuprins între  $-0.6 \text{ V}$  și  $1.0 \text{ V}$ , folosind ca electrozi de lucru: CPE, IL/CPE, AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE și IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE (Fig. 3a). Se poate observa că după modificarea electrodului CP cu IL, AuTiO<sub>2</sub>/GO și IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO, conductivitatea senzorului a crescut. Prin urmare, acest lucru a indicat că modificarea a fost realizată și răspunsul electrochimic a fost îmbunătățit.

Studiul EIS a fost realizat pentru a examina interfața senzorilor într-un interval de frecvență cuprins între  $1.0 \times 10^5$  și  $1.0 \times 10^{-1} \text{ Hz}$ . Toate măsurătorile EIS au fost efectuate într-o soluție de  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ). Diagramele Nyquist sunt ilustrate în Fig. 3b.

După cum se poate observa din Fig. 3b, CPE a arătat un semicerc larg bine definit într-un interval de frecvență joasă care corespunde unei rezistențe electrice ridicate  $R_{ct} = 1.250 \times 10^5 \Omega$ . După procesul de modificare a CPE cu IL, diametrul semicercului a scăzut ( $R_{ct} = 2.818 \times 10^4 \Omega$ ). Același comportament a fost observat ulterior pentru CPE modificat cu  $\text{AuTiO}_2/\text{GO}$  ( $R_{ct} = 1.392 \times 10^4 \Omega$ ). În cazul  $\text{IL}/\text{AuTiO}_2/\text{GO}/\text{CPE}$  se observă un semicerc mult mai mic ( $R_{ct} = 5.714 \times 10^3 \Omega$ ). În concluzie, CPE modificat cu  $\text{AuTiO}_2/\text{GO}$  și respectiv cu IL, a prezentat un semicerc mai mic și o valoare  $R_{ct}$  mai mică decât valoarea  $R_{ct}$  a electrodului de pastă de carbon nemodificat. Rezultatele EIS au arătat că sunt în buna concordanță cu rezultatele obținute prin CV într-o soluție de  $5.30 \times 10^{-3} \text{ mol/L K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ).

Comportamentul electrochimic al CPE,  $\text{IL}/\text{CPE}$ ,  $\text{AuTiO}_2/\text{GO}/\text{CPE}$  și  $\text{IL}/\text{AuTiO}_2/\text{GO}/\text{CPE}$  a fost testat folosind de asemenea și metoda CV. În Fig. 3c sunt prezentate voltamogramele ciclice înregistrate pentru toți senzorii în PBS pH 2.0 care conține Tz ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Comparând cei patru electrozi (Fig. 3c),  $\text{IL}/\text{AuTiO}_2/\text{GO}/\text{CPE}$  a dat cele mai bune rezultate pentru oxidarea tartrazinei. Astfel, acest senzor a fost caracterizat și investigat în continuare pentru detectarea electrochimică a Tz în probe alimentare reale.



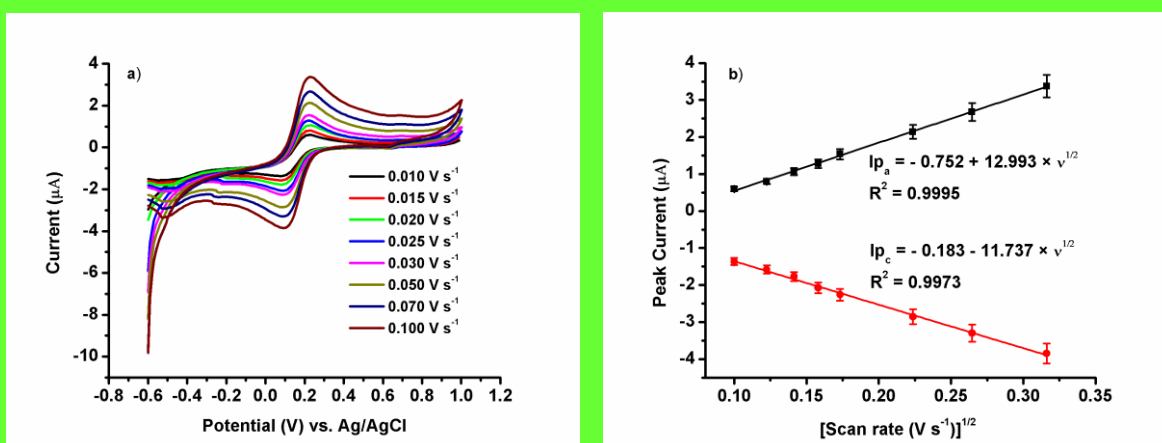
**Fig. 3. (a)** Voltamograme ciclice ale curentului reprezentate grafic în funcție de potențial (Condiții de lucru: step potențial  $0.025 \text{ V}$ ; viteza de scanare  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ ) într-o soluție de  $5.0 \times 10^{-3}$

mol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] în 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl folosind CPE, IL/CPE, AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE și IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE; (b) Spectrele de impedanță electrochimică înregistrate pentru CPE, IL/CPE, AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE și IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE într-o soluție de 5.0 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] în 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl (Condiții: intervalul de frecvență cuprins între 1.0 × 10<sup>5</sup> și 1.0 × 10<sup>1</sup> Hz). Inset: diagrama circuitului echivalent a interfeței electrochimice utilizată pentru a se potrivi spectrelor de impedanță unde: R<sub>s</sub> este rezistența soluției, CPE este elementul de fază constantă, R<sub>ct</sub> este rezistența de transfer de electroni și Z<sub>w</sub> este rezistența de difuzie Warburg; (c) Voltamogramele ciclice înregistrate în PBS pH 2.0 care conține 100 μmol L<sup>-1</sup> tartrazină pentru CPE, IL/CPE, AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE și IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE

Activitatea electrocatalitică a celor patru senzori a fost investigată prin calcularea ariei suprafeței electroactive utilizând ecuația Randles-Sevcik<sup>32</sup> pentru procese cvasi-reversibile. Ecuația intensității curentului picului poate fi descrisă după cum urmează:

$$I_{p_a} = \pm (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D_R^{1/2} v^{1/2} \quad (1)$$

unde:  $I_{p_a}$  – curentul picului anodic (A),  $n$  - numărul de electroni transferați (în acest caz,  $n = 1$ ),  $A$  – aria suprafeței active a electrodului (cm<sup>2</sup>),  $C_0$  – concentrația de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (mol cm<sup>-3</sup>),  $D_R$  - coeficientul de difuzie (7.60 × 10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) și  $v$  – viteza de scanare (V s<sup>-1</sup>). Studiul a fost realizat într-o soluție de 5.0 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl). Prin variația vitezei de scanare de la 0.010 la 0.100 V s<sup>-1</sup>, picurile anodice și catodice ( $I_{p_a}$  și  $I_{p_c}$ ) au arătat o dependență liniară asupra rădăcinii pătrate a vitezei de scanare, sugerând că procesul redox a fost controlat prin difuzie. Fig. 4a arată tendința dintre creșterea vitezei de scanare și intensitatea curentului. Dependențele liniare pentru ambele picuri  $I_{p_a}$  vs.  $v^{1/2}$  și  $I_{p_c}$  vs.  $v^{1/2}$  sunt prezentate în Fig. 4b. Valorile suprafeței active au fost determinate din Ec. (1). Senzorul IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE prezintă o arie activă mai mare de 0.0036 cm<sup>2</sup> comparativ cu 0.0015 cm<sup>2</sup> pentru CPE, 0.0019 cm<sup>2</sup> pentru IL/CPE și respectiv 0.0030 cm<sup>2</sup> pentru AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE.



**Fig. 4.** (a) Voltamograme ciclice într-o soluție de 5.0 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] în 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl la diferite viteze de scanare de la 0.010 la 0.100 V s<sup>-1</sup> folosind IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE (Condiții de lucru: domeniul de potențial -0.6 V - 1.0 V; step potențial de 0.025 V); (b)

Dependența curentului picului asupra rădăcinii pătrate a vitezei de scanare, folosind IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE

### *Influența vitezei de scanare asupra oxidării tartrazinei*

Comportamentul electrochimic al tartrazinei a fost investigat prin tehnica voltametriei ciclice, folosind IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE la diferite viteze de scanare cuprinse între 0.01 – 0.70 V s<sup>-1</sup>. Acest studiu a fost efectuat în PBS pH = 2.0 conținând 100 μmol L<sup>-1</sup> tartrazină. Curenții picului anodic au crescut odată cu creșterea vitezei de scanare (Fig. 5a).

S-a observat o relație liniară între curentul picului și rădăcina pătrată a vitezei de scanare ( $v^{1/2}$ ) (Fig. 5b), dată de următoarea ecuație de regresie:  $I_{p_a}$  (μA) = - 0.029 + 2.871 ×  $v^{1/2}$  ( $R^2 = 0.9938$ ), care a arătat că oxidarea Tz pe suprafața senzorului IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE a fost un proces tipic controlat prin difuzie.<sup>33,34</sup>

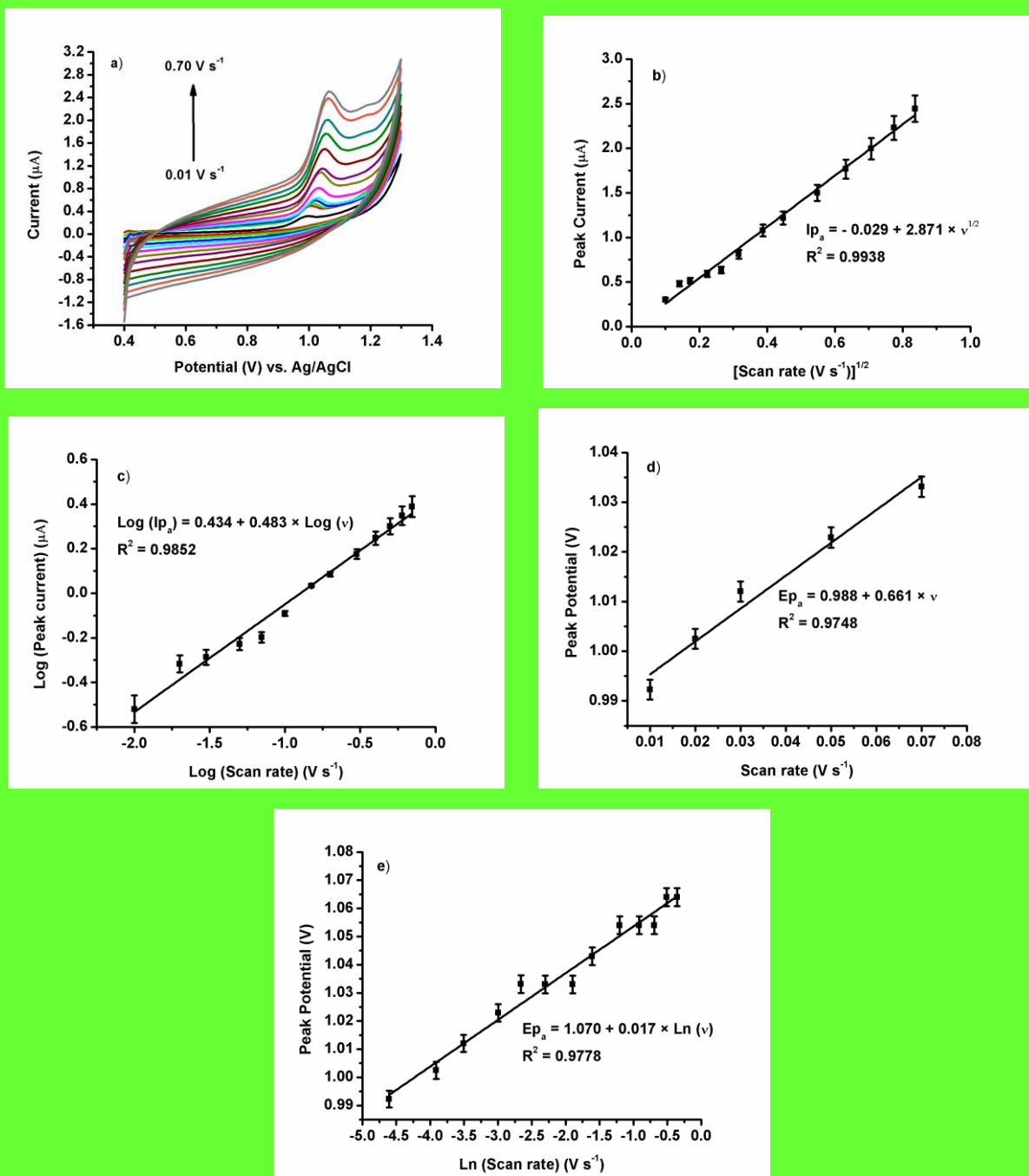
Dependența liniară obținută prin reprezentarea grafică a logaritmului din curentul picului și logaritmul vitezei de scanare este ilustrată în Fig. 5c. Relația dintre ele este dată de ecuația:  $\text{Log}(I_{p_a})$  (μA) = 0.434 + 0.483 ×  $\log(v)$ . Dacă valoarea pantei este 0.5 indică un proces controlat prin difuzie, în timp ce, dacă este aproape de 1, este controlat prin adsorbție. Astfel, valoarea pantei obținute a fost calculată a fi 0.483 ceea ce a confirmat că procesul electrochimic al Tz asupra IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE este controlat prin difuzie. Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele obținute din Fig. 5b.

Ecuația Laviron<sup>35</sup> a fost utilizată pentru a calcula constanta de viteză heterogenă:

$$E_{p_a} = E^0 - \left( \frac{RT}{\alpha n F} \right) \ln \left( \frac{RT k_s}{\alpha n F} \right) + \left( \frac{RT}{\alpha n F} \right) \ln v \quad (2)$$

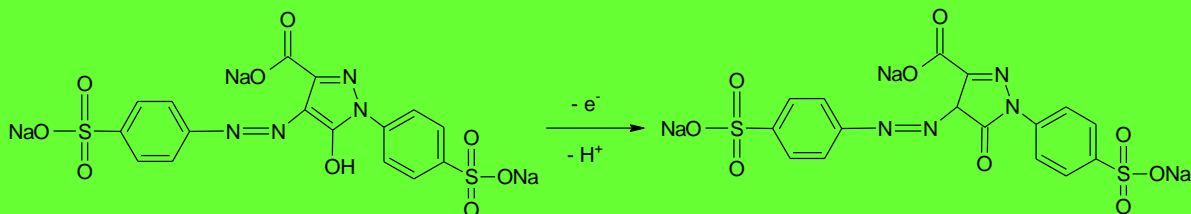
unde  $E^0$  - potențialul formal (V),  $R$  - constanta universală a gazului (8.314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>),  $T$  - temperatura absolută (298.15 K),  $\alpha$  - coeficientul de transfer de electroni al oxidării Tz,  $n$  - numărul de electroni transferați,  $k_s$  - constanta de viteză heterogenă a reacției electrochimice (s<sup>-1</sup>),  $F$  - constanta lui Faraday (96.485 C mol<sup>-1</sup>) și  $v$  - viteza de scanare (V s<sup>-1</sup>). Potențialul formal al Tz ( $E^0 = 0.988$ ) a fost găsit ca valoare a interceptului din relația:  $E_{p_a}$  (V) = 0.988 + 0.661 ×  $v$ , care a fost asociat cu potențialul picului și viteza de scanare (Fig. 5d). În Fig. 5d, potențialul picului de oxidare ( $E_{p_a}$ ) a fost deplasat pozitiv odată cu creșterea vitezei de scanare ( $v$ ).

Fig. 5e ilustrează relația liniară dintre potențialul picului anodic și logaritmul natural din viteza de scanare. Constanta de viteză heterogenă a reacției electrochimice a fost calculată a fi 0.443 s<sup>-1</sup> folosind valorile interceptului și pantei din ecuația:  $E_{p_a}$  (V) = 1.070 + 0.017 ×  $\ln(v)$ . Conform acestei ecuații, cei doi parametri cinetici  $\alpha$  și  $n$  au fost determinați a fi 0.5 și respectiv 0.8 (~ 1 electron).



**Fig. 5.** (a) Voltamograme ciclice înregistrate la viteze de scanare diferite între 0.01 și 0.70 V s<sup>-1</sup> în PBS pH = 2.0 continand 100 μmol L<sup>-1</sup> tartrazină, folosind IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE; (b) Dependența liniară a curentului picului asupra rădăcinii pătrate a vitezei de scanare; (c) Dependența dintre logaritmul curentului picului și logaritmul vitezei de scanare; (d) Dependența liniară între potențialul picului și viteza de scanare; (e) Corelația liniară a potențialului picului vs. logaritmul natural din viteza de scanare

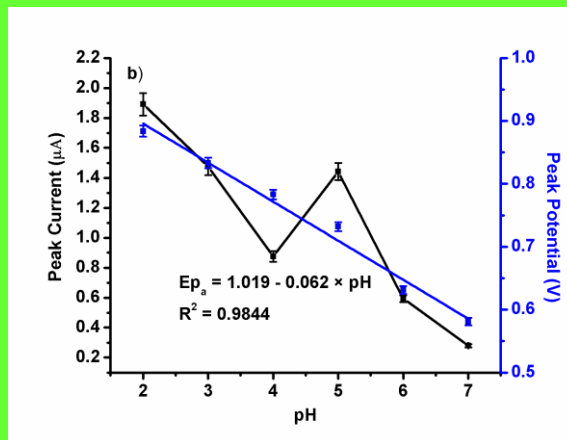
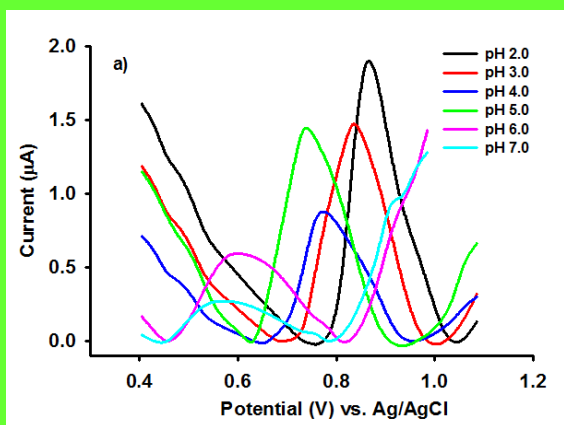
Astfel, un electron a fost implicat în procesul de oxidare a tartrazinei care se află pe inelul aromatic. Schema 1 descrie mecanismul de oxidare electrochimic posibil a tartrazinei.



**Schema 1.** Mecanismul posibil a electrooxidării tartrazinei asupra IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE în mediu acid (pH = 2.0)

### Efectul de pH

Valoarea de pH a soluției tampon este un parametru esențial, care are o influență majoră asupra comportamentului electrochimic al tartrazinei. Influența de pH asupra oxidării electrochimice a unei soluții de tartrazină (100 μmol L<sup>-1</sup>) în PBS la diferite valori ale pH-ului (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 și 7.0) la suprafața senzorului IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE a fost investigată prin metoda voltametriei puls diferențiale, așa cum se arată în Fig. 6a. Intensitatea curentului a scăzut de la pH = 2.0 la 4.0 cu o ușoară creștere la pH = 5.0 și apoi a început să scadă până când a fost atins pH = 7.0 (Fig. 6b). După cum se poate observa în Fig. 6b, cea mai mare intensitate a curentului a fost observată când pH-ul a fost 2.0. Se știe că tartrazina este o moleculă aromatică protică și se transformă în cationi la pH scăzut prin deprotonare. pH-ul optim de 2.0 a fost mai mic decât constanta de disociere acidă a tartrazinei (pK<sub>a</sub> = 9.4).<sup>36</sup> Astfel, pentru soluția de pH < pK<sub>a</sub>, moleculele de tartrazină există într-o formă cationică.<sup>37</sup> Prin urmare, PBS pH 2.0 a fost selectat ca suport electrolit pentru experimentele viitoare. Pe măsură ce pH-ul crește, a fost observată o schimbare de potențial ușor negativă. Fig. 6b arată relația dintre potențialul picului (E<sub>p</sub>) și valorile pH-ului. Relația liniară: E<sub>p</sub> (V) = 1.019 - 0.062 × pH cu coeficientul de regresie (R<sup>2</sup>) de 0.9844 și valoarea pantei de 0.062 V pH<sup>-1</sup>, care este apropiată de valoarea teoretică nernstiană de 0.059 V pH<sup>-1</sup>, indicând că numărul de protoni este egal cu numărul de electroni implicați în procesul de oxidare.



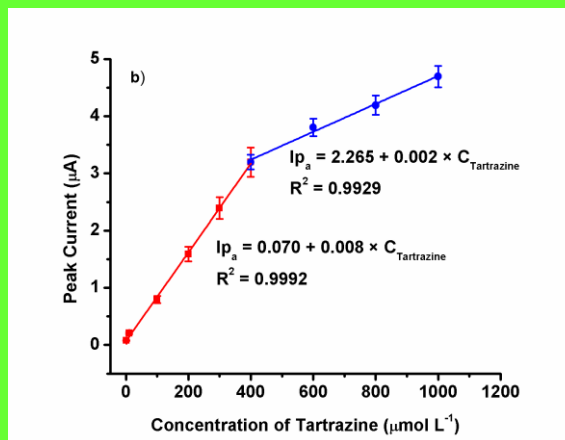
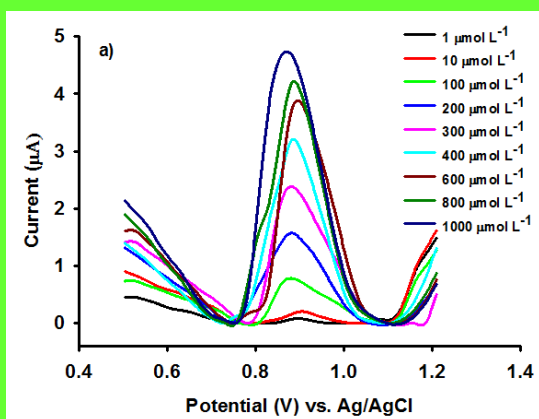


**Fig. 6. (a)** Voltamograme puls diferențiale a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  tartrazină la IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE în PBS de diferite pH-uri 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 și 7.0; **(b)** Efectul de pH asupra curentului picului și dependența liniară a potențialului picului cu pH-ul. Condiții de lucru: step potențial de  $0.025 \text{ V}$  și viteză de scanare de  $0.025 \text{ V s}^{-1}$

### Caracteristicile de răspuns ale IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE asupra oxidării tartrazinei

De asemenea, au fost studiate caracteristicile de răspuns ale oxidării tartrazinei pe suprafața sensorului IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE. A fost utilizată metoda voltametriei puls diferențiale (Fig. 7a) în PBS pH = 2.0 conținând diferite concentrații de tartrazină. În Fig. 7b, răspunsul curentului picului în funcție de concentrația de tartrazină a fost reprezentat grafic și a prezentat o dependență liniară pe două domenii de concentrație: de la 1 la  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$  și de la 400 la  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ , cu coeficienții de corelație de 0.9992 și respectiv 0.9929. Limita de detecție (LOD) a fost de  $0.33 \mu\text{mol L}^{-1}$ , care a fost calculată utilizând următoarea ecuație:  $\text{LOD} = 3s/m$ ,<sup>38</sup> unde  $s$  - deviația standard a răspunsului intensității curentului (3 măsuratori) a matorului (PBS) și  $m$  - panta curbei de calibrare. Ecuația de regresie liniară corespunzătoare a fost:  $I_{p_a} (\mu\text{A}) = 0.070 + 0.008 \times C_{\text{tartrazină}}$ . Conform acestei ecuații, sensibilitatea sensorului propus a fost de  $0.008 \mu\text{A} \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Valoarea LOD a IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE a fost comparabilă cu cele raportate anterior în literatura de specialitate pentru determinarea tartrazinei folosind diverși senzori (Tabelul I). Deși, în majoritatea cazurilor (Tabelul I) s-a observat o limită de detecție mică și un domeniu liniar larg. Astfel, electrodul dezvoltat a prezentat multe avantaje, cum ar fi sensibilitate ridicată, refacerea ușoară a suprafeței, proces simplu de modificare și stabilitate bună. Deși limita de detecție raportată în această lucrare este mai mare cu două ordine de mărime, sensorul propus poate fi utilizat la concentrații mai mari decât sensorul propus anterior,<sup>22</sup> avantajele sensorului dezvoltat în comparație cu cel publicat anterior<sup>22</sup> sunt: probele nu necesită diluție înainte de măsurare deoarece concentrația de tartrazină din probele analizate se află în intervalul de concentrație liniar al sensorului propus; designul sensorului propus este foarte fiabil; costul sensorului propus de noi este foarte mic, iar timpul de utilizare mai mare. Mai mult, metoda poate fi realizată folosind echipamente ieftine într-un timp relativ scurt.



**Fig. 7. (a)** Voltamograme puls diferențiale înregistrate cu IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE în PBS pH = 2.0 continand diferite concentrații de tartrazină (1 până la 1000 μmol L<sup>-1</sup>); **(b)** Curbele de calibrare obținute cu IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE în două domenii liniare, de la 1 la 400 μmol L<sup>-1</sup> (linia roșie) și de la 400 la 1000 μmol L<sup>-1</sup> (linia albastră). Condiții de lucru: step potențial de 0.025 V și viteză de scanare de 0.025 V s<sup>-1</sup>

### Studii de interferență

Pentru studiul selectivității au fost testați mai mulți ioni anorganici: Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> și specii organice: zaharoza, glucoza, acidul ascorbic, roșu allura și galbenul amurg ca posibili interferenți în determinarea tartrazinei. Posibilele specii interferente au fost alese dintre substanțele întâlnite în mod obișnuit cu tartrazina în probele alimentare. Limita tolerată a fost definită ca, concentrația maximă de interferent care a cauzat o variație a intensității curentului în termeni de: eroare relativă (± 5% nivel de acceptare) și bias (%). Toate soluțiile evaluate au fost obținute în condiții optime, PBS pH = 2.0 cu o concentrație constantă de tartrazină (10 μmol L<sup>-1</sup>). Rezultatele experimentale nu au prezentat nici-o influență evidentă asupra detectării tartrazinei atunci când s-a utilizat un exces mai mare de 10 ori de acid ascorbic, galben amurg și roșu allura; de 25 de ori de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> și glucoză; de 50 de ori de K<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup> și Fe<sup>3+</sup>, de 100 de ori de Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> și zaharoză (Tabelul II), ceea ce indică faptul că senzorul propus a prezentat o selectivitate ridicată asupra determinării tartrazinei.

**Tabelul II.** Influența speciilor coexistente asupra detectării tartrazinei (n = 5)

Speciile coexistente	Concentrația de specii coexistente (μmol L <sup>-1</sup> )	Limita tolerată	Eroarea relativă (%)	Bias (%)
Cu <sup>2+</sup>	1000	100	3.22	2.43
Mg <sup>2+</sup>	1000	100	-2.50	1.18
Na <sup>+</sup>	1000	100	1.69	-2.28
Cl <sup>-</sup>	1000	100	-3.87	6.36
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1000	100	0.33	-1.97
Sucroza	1000	100	3.72	-1.33
K <sup>+</sup>	500	50	0.73	2.64
Mn <sup>2+</sup>	500	50	3.26	1.99
Fe <sup>3+</sup>	500	50	1.68	0.87
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	250	25	-0.56	-3.33
Glucoza	250	25	0.94	-0.35
Acid ascorbic	100	10	-3.66	-3.27

Galben apus	100	10	-4.21	-7.28
Rosu Allura	100	10	-4.21	-3.92

### *Reproductibilitate, repetabilitate și stabilitate*

Au fost investigate în condiții experimentale optime reproductibilitatea, repetabilitatea și stabilitatea senzorului IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE folosind o soluție de 10 μmol L<sup>-1</sup> tartrazină în PBS pH = 2.0 prin DPV. Pentru evaluarea reproductibilitatii, au fost preparați 3 noi electrozi electrochimici modificați în același mod. Pentru toți electrozii modificați, deviația standard relativă (RSD%) a fost de 2.72% (n = 5); după fiecare 5 măsuratori rezultatul obținut a fost corelat cu repetabilitatea. Pentru aceiași senzori, repetabilitatea între zile a fost calculată la 3.85% pentru 5 măsurători repetitive. Apoi, stabilitatea pe termen lung a IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE a fost examinată prin pastrarea electrodului modificat la temperatura camerei timp de două săptămâni. După această perioadă, intensitatea curentului a tartrazinei a rămas în jur de 96.23% ± 2.19% din răspunsul curentului inițial. Rezultatele de mai sus au demonstrat o bună stabilitate și reproductibilitate a senzorului propus în detectarea tartrazinei.

### *Aplicația analitică*

Aplicabilitatea metodei dezvoltate a fost verificată prin efectuarea de teste de recuperare a tartrazinei din diferite probe alimentare comerciale: băutura izotonică, muștar și vopsea galbena de oua. Senzorul IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE a fost utilizat pentru a efectua măsurători de DPV în probe reale pentru detectarea tartrazinei. Probele alimentare au fost pregătite așa cum s-a menționat anterior. Probele au fost introduse într-o celulă electrochimică; ulterior a fost înregistrată înălțimea curentului picului. Valorile obținute au fost introduse în ecuația de calibrare de mai sus precum și concentrațiile/cantitățile de tartrazină. Valorile de recuperare, RSD și Bias (%) sunt prezentate în Tabelul III. Recuperările au fost găsite în intervalul 98.55-103.62%, cu valorile RSD% și Bias (%) mai mici de 5.00%, respectiv 2.00%. Rezultatele au confirmat că senzorul dezvoltat poate fi utilizat în mod precis și fiabil pentru analiza tartrazinei în probe alimentare.

**Tabelul III.** Determinarea nivelurilor de tartrazină în băutura izotonică, muștar și vopsea galbena de oua folosind IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE

Probe	Cantitatea adaugata (μmol L <sup>-1</sup> )	Cantitatea gasita (μmol L <sup>-1</sup> )	Recuperarea (%)	RSD (%)	Bias (%)
Bautura	1.00	0.99	98.96	2.03	1.05
Izotonica	5.00	5.05	101.00	0.07	-0.99
	10.00	10.02	100.20	0.94	-0.20

	40.00	40.19	100.48	1.98	-0.48
Muștar	1.00	0.99	98.55	0.96	1.48
	5.00	5.01	100.16	0.67	-0.16
	10.00	9.94	99.35	0.62	0.65
	40.00	39.47	98.68	4.30	1.34
Vopsea	1.00	1.00	99.99	4.85	0.01
Galbena	5.00	4.98	99.51	3.38	0.50
de oua	10.00	10.36	103.62	4.00	-3.49
	40.00	40.44	101.10	1.90	-1.08

### Concluzii

Această lucrare a raportat pentru prima dată un senzor electrochimic utilizat pentru determinarea sensibilă a tartrazinei pe baza de electrod de pastă de carbon modificat cu un IL și respectiv un compozit AuTiO<sub>2</sub>/GO. Electrocul modificat a arătat o activitate electrochimică bună față de oxidarea tartrazinei în mediu acid la pH 2.0, o selectivitate, sensibilitate, reproductibilitate mare și o bună stabilitate. IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO/CPE a fost aplicat cu succes pentru a detecta tartrazina din probe de băutură izotonică, muștar și vopsea galbena de oua cu valorile de recuperare mai mari de 98.55% și cu valorile RSD și Bias mai mici de 5.00%, respectiv 2.00%, indicând fiabilitatea metodei.

### Referințe

1. L. Zhao, B. Zeng, and F. Zhao, *Electrochim. Acta*, **146**, 611 (2014).
2. S. Tahtaisleyen, O. Gorduk, and Y. Sahin, *Anal. Lett.*, **53**, 1683 (2020).
3. K. Rovina, S. Siddiquee, and S. Md Shaarani, *Drug Chem. Toxicol.*, **44**, 447 (2021).
4. O. I. Lipskikh, E. I. Korotkova, Ye. P. Khristunova, J. Barek, and B. Kratochvil, *Electrochim. Acta*, **260**, 974 (2018).
5. M. A. Karimi, V. H. Aghaei, A. Nezhadali, and N. Ajami, *Food Anal. Methods*, **11**, 2907 (2018).
6. X. Zhao, Y. Liu, J. Zuo, J. Zhang, L. Zhu, J. Zhang, *J. Electroanal. Chem.*, **785**, 90 (2017).
7. K. Rovina, S. Siddiquee, and S. Md Shaarani, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **47**, 309 (2017).
8. G. Karim-Nezhad, Z. Khorablou, M. Zamani, P. S. Dorraji, and M. Alamgholiloo, *J. Food Drug Anal.*, **25**, 293 (2017).
9. S. Bonan, G. Fedrizzi, S. Menotta, and C. Elisabetta, *Dyes Pigm.*, **99**, 36 (2013).

10. E. Dinç, A. H. Aktaş, D. Baleanu, and Ö. Üstündağ, *J. Food Drug Anal.*, **14**, 284 (2006).
11. D. Chen, M. Wu, S. Xie, X. Li, Y. Tao, X. Wang, L. Huang, Y. Pan, D. Peng, and Z. Yuan, *J. Chromatogr. Sci.*, **57**, 462 (2019).
12. W. de A. S. Bento, B. P. Lima, and A. P. S. Paim, *Food Chem.*, **183**, 154 (2015).
13. J. Yi, L. Zeng, Q. Wu, L. Yang, and T. Xie, *Food Anal. Methods*, **11**, 1608 (2018).
14. M. A. Prado, L. F. V Boas, M. R. Bronze, and H. T. Godoy, *J. Chromatogr. A*, **1136**, 231 (2006).
15. R. Sahraei, A. Farmany, and S. S. Mortazavi, *Food Chem.*, **138**, 1239 (2013).
16. R. Li, Z.-T. Jiang, and Y.-H. Liu, *J. Food Drug Anal.*, **16**, 91 (2008).
17. Z.-Z. An, Z. Li, Y.-Y. Guo, X.-L. Chen, K.-N. Zhang, D.-X. Zhang, Z.-H. Xue, X.-B. Zhou, and X.-Q. Lu, *Chin. Chem. Lett.*, **28**, 1492 (2017).
18. J. G. Manjunatha, *Heliyon*, **4**, e00986 (2018).
19. P. Wang, X. Liu, Q. Hu, H. Gao, and W. Ma, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **15**, 8901 (2020).
20. Z. Wang, Y. Shan, L. Xu, G. Wu, and X. Lu, *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, **22**, 83 (2017).
21. L. F. de Lima, C. C. Maciel, A. L. Ferreira, J. C. de Almeida, and M. Ferreira, *Mater. Lett.*, **262**, 127186 (2020).
22. Q. He, J. Liu, X. Liu, G. Li, P. Deng, J. Liang, and D. Chen, *Sensors*, **18**, 1911 (2018).
23. X. Song, Z. Shi, X. Tan, S. Zhang, G. Liu, and K. Wu, *Sens. Actuators B*, **197**, 104 (2014).
24. M. Sakthivel, M. Sivakumar, S.-M. Chen, and K. Pandi, *Sens. Actuators B*, **256**, 195 (2018).
25. S. G. Hernández-Vargas, C. A. Cevallos-Morillo, and J. C. Aguilar-Cordero, *Electroanalysis*, **32**, 1938 (2020).
26. C. O. Chikere, E. Hobben, N. H. Faisal, P. Kong-Thoo-Lin, and C. Fernandez, *Microchem. J.*, **160**, 105668 (2021).
27. Z. Qin, J. Zhang, Y. Liu, J. Wu, G. Li, J. Liu, and Q. He, *Chemosensors*, **8**, 70 (2020).
28. O. V. Salata, *J. Nanobiotechnology*, **2**, 3 (2004).
29. R. Darabi and M. Shabani-Nooshabadi, *Food Chem.*, **339**, 127841 (2021).
30. S. Šekuljica, V. Guzsvány, J. Anojčić, T. Hegedűs, M. Mikov, and K. Kalcher, *J. Mol. Liq.*, **306**, 112900 (2020).
31. F. Papa, C. Negrila, A. Miyazaki, and I. Balint, *J. Nanopart. Res.*, **13**, 5057 (2011).
32. P. Zanello, Inorganic electrochemistry: theory, practice and application, *RSC Adv.*, (2003).
33. X. Ye, Y. Du, D. Lu, and C. Wang, *Anal. Chim. Acta*, **779**, 22 (2013).

34. T. Gan, J. Sun, S. Cao, F. Gao, Y. Zhang, and Y. Yang, *Electrochim. Acta*, **74**, 151 (2012).
35. E. Laviron, *J. Electroanal. Chem.*, **101**, 19 (1979).
36. G. L. Dotto, M. L. G. Vieira, V. M. Esquerdo, and L. A. A. Pinto, *Brazilian J. Chem. Eng.*, **30**, 13 (2013).
37. S. Sahnoun, M. Boutahala, C. Tiar, and A. Kahoul, *C. R. Chim.*, **21**, 391 (2018).
38. S. A. Ozkan, J. M. Kauffmann, and P. Zuman, in: F. Scholz (Ed.), Chapter 8, *Electroanalytical Method Validation in Pharmaceutical Analysis and Their Applications in Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, Springer Publishing House, 252 (2015).

## **Trenduri recente în cuantificarea electrochimică a ibuprofenului și ketoprofenului – review**

### **Rezumat**

Medicamentele antiinflamatoare nesteroidiene sunt produse și utilizate intens. Prin urmare, este nevoie de metode de detecție simple, rentabile, sensibile și selective, care să îmbunătățească calitatea analizelor acestora. Scopul acestui review este de a prezenta construcția, performanțele analitice și aplicabilitatea senzorilor electrochimici recent dezvoltati pentru determinarea ibuprofenului și ketoprofenului.

**Cuvinte cheie:** ibuprofen, ketoprofen, detecție electrochimică, senzor

### **Introducere**

Ibuprofenul și ketoprofenul sunt derivați ai acidului propionic, o subclasă a medicamentelor antiinflamatoare nesteroidiene (AINS). Prin inhibarea unei enzime numită ciclooxygenază, AINS împiedică sinteza prostaglandinelor cu efecte proinflamatoare, manifestându-și astfel acțiunile antiinflamatorii, analgezice și antipiretice.<sup>1</sup> De aceea sunt utilizate în afecțiuni precum durerea ușoară până la moderată, tulburări musculo-scheletice, crize de gută, febră și dismenoree. Deși



AINS sunt o clasă de medicamente bine stabilită, utilizată pe scară largă și eficientă, nu sunt lipsite de efecte secundare. În principal, aceste medicamente afectează sistemele gastrointestinal, cardiovascular și renal.<sup>2,3</sup> Studii recente au arătat că utilizarea de AINS pe scară largă a dus la apariția lor ca contaminanți ai mediului. Chiar și în concentrații scăzute sau sub formă de reziduuri sau metaboliți, AINS au efecte ecotoxicologice asupra biotei acvatice (de exemplu, plante, bacterii și animale), producând deteriorări ale ADN-ului, citotoxicitate și genotoxicitate, modificări ale enzimelor de stres oxidativ și modificări hematologice.<sup>4</sup>

Ca metode compendiale, Farmacopeea Europeană indică utilizarea titrimetriei și titrării potențimetrice pentru a determina ibuprofenul și ketoprofenul, în timp ce Farmacopeea Statelor Unite recomandă HPLC și titrimetria.<sup>5-7</sup> Un studiu de literatură a evidențiat folosirea a mai multor tehnici cromatografice pentru cuantificarea ibuprofenului și a ketoprofenului, cum ar fi cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) cu UV-Vis,<sup>8</sup> HPLC în fază inversă (RP-HPLC) cu detecție de fluorescență<sup>9</sup> sau detecție UV-Vis,<sup>10,11</sup> cromatografia de lichide ultra-performantă cuplată cu spectrometria de masă în tandem (UPLC-MS/MS),<sup>12</sup> cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS)<sup>13</sup> și cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă în tandem (GC-MS/MS);<sup>14</sup> alte categorii de metode precum spectrofluorimetria<sup>15</sup> și electroforeza capilară (CE)<sup>16,17</sup> au fost de asemenea identificate în literatură. Aceste metode de determinare au fost aplicate pe diferite tipuri de probe reale sau cu adăugare de analit, cum ar fi probe biologice (ser și plasmă umană, urină ecvină) sau forme farmaceutice (tablete și geluri). Deși sensibile, fiabile și precise, tehnicile menționate mai sus prezintă o serie de dezavantaje, deoarece sunt costisitoare și necesită mult timp, pretratare și separare a probei precum și supravegherea unui personal specializat.

Metodele electrochimice, cum ar fi cronoamperometria (CA), potențiomertia, voltametria ciclică (CV), voltametria puls diferențială (DPV) și voltametria cu undă pătrată (SWV) reprezintă o alternativă atractivă la tehnicile convenționale, deoarece sunt simple, ieftine și foarte sensibile. Un alt avantaj al acestor metode este că principiul lor se bazează pe un fenomen de suprafață care permite utilizarea unor cantități mici de probe, astfel favorizând miniaturizarea.<sup>18</sup> În plus, senzorii utilizați în aceste metode sunt ușor de proiectat și oferă un răspuns rapid care poate fi îmbunătățit mai departe prin adăugarea de modificatori chimici sau prin funcționalizarea suprafeței.

Acest review se concentrează pe activitatea de cercetare desfășurată în ultimii cinci ani și care vizează dezvoltarea de noi senzori cu aplicabilitate în determinarea ibuprofenului și ketoprofenului.

### **1. Senzori electrochimici utilizați pentru determinarea ibuprofenului**

Ibuprofenul (IBP), notat chimic acid (RS)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanoic, a fost anterior determinat electrochimic din apă și probe biologice, forme farmaceutice și soluții apoase folosind senzori electrochimici, cum ar fi electrodul de diamant dopat cu bor,<sup>19,20</sup> electrodul de grafit serigrafiat,<sup>21</sup> două tipuri de electrozi compoziți din nanofibră de carbon funcționalizată cu argint,<sup>22</sup> electrod compozit din grafit cu zeolit expandat dopat cu argint<sup>23</sup> și o platformă de detectare care include un aptamer atașat printr-o legătură covalentă la nanoparticulele de aur și depus pe suprafața unui electrod de carbon sticlos.<sup>24</sup>

Următorii senzori electrochimici recent dezvoltați (Tabelul 1) și utilizați în determinarea ibuprofenului sunt clasificați în două categorii, și anume senzori 3D și senzori de unică folosință.

Clasa de senzori 3D este alcătuită din electrozi pe bază de carbon sticlos, electrozi cu pastă de carbon și alte tipuri de electrozi.

**Tabel 1.** Caracteristicile analitice ale senzorilor electrochimici raportați în literatură și utilizați pentru detectarea ibuprofenului și ketoprofenului.

Analit	Electrod	Metodă de detecție	Domeniu liniar ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Limită de detecție	Matricea probei	Referință
	pretreated GCE	SWSV	1,45 – 3,87	0,96	comprimate	25
	SD-MWCNT/GCE	FIA-AMP	10 – 1000	1,9	comprimate lichid	27
	polyaniline nanofiber/GCE	DPSV	0,96 – 1,94	0,48	comprimate	28
	MB/Apt/nanocomposite/GCE	DPV	$7 \times 10^{-5} - 6$	$2 \times 10^{-5}$	comprimate suspensie orală ser	29
	Apt/AuNPs@N-GQDs/GCE	DPV	$1 \times 10^{-10} - 0,2$	$33,33 \times 10^{-12}$	ape uzate comprimate ser	30
	P(L-Asp)/GCE	SWV	1 – 150	0,22	ape uzate comprimate urină	31
<b>Ibuprofen</b>	AgNPs@Af-GO-MIP/GCE	DPV	1 – 100	$8,7 \times 10^{-3}$	comprimate urină urină infectată	32
	Cu <sub>3</sub> TeO <sub>6</sub> /GCE	DPV	0,02 – 5 9 – 246	$1,7 \times 10^{-2}$	urină ser	33
	Mt–CPE	DPV	0,1 – 10000	$6,8 \times 10^{-2}$	comprimate apă de râu	34
	Pd–PdO/Mt–CPE	DPV	$1,0 \times 10^{-2} - 1$	$2,85 \times 10^{-3}$	sânge	35
	MWCNT–CPE	DPV	2,36 – 242	9,1	comprimate	36
	Clay–CPE	DPV	1 – 1000	$83,5 \times 10^{-2}$	comprimate sânge	37
	CPE–Clay/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	DPV	1 – 1000	$1,95 \times 10^{-2}$	sânge	38
	HKUST-CNF	CV	4,84 – 29,08	0,1	—	39
		CA	9,69 – 48,47	$6,3 \times 10^{-4}$		
		MPA	9,69 – 58,17	$1,93 \times 10^{-2}$		
	BDDE	DPV	0,95 – 66,9	0,41	comprimate	40

		SWV		0,93	lichid urină	
	ITO {PAH PB/SWCNTs} <sub>3</sub>	CV	$4,7 \times 10^{-2} - 0,23$	—	—	41
	CNF/SPCE	DPV	0,8 – 30	0,35	comprimate	42
	SPCE		18,42 – 489,14	5,33		
	SPCNTE	DPV	9,21 – 155,12	2,90	apă de la robinet	43
	SPCNFE		19,39 – 114,40	5,81		
	SPGPHE		30,54 – 86,29	9,21		
	aSPCE	DPV	0,5 – 20 20 – 500	$5,9 \times 10^{-2}$	comprimate	44
	GCE	DPV	9 – 5000	11,4	—	51
<b>Ketoprofen</b>	ITO-LMR	ITO-LMR probe	1 – 1000	500	—	52
	CPS	DPV	0,088 – 1,96 1,96 – 6,02	$0,11 \pm 0,01$ $0,21 \pm 0,05$	ape uzate pești	53

**GCE** = electrod de carbon sticlos

**SD-MWCNT/GCE** = electrod de carbon sticlos modificat cu nanotuburi de carbon de diametru scurt cu pereți multipli

**MB/Apt/nanocomposite/GCE** = electrod de carbon sticlos modificat cu albastru de metilen intercalat pe un aptamer specific ibuprofenului imobilizat pe nanocompozit alcătuit din nanotuburi de carbon cu pereți multipli/lichid ionic/chitosan

**Apt/AuNPs@N-GQDs/GCE** = electrod de carbon sticlos modificat cu un aptamer specific pentru ibuprofen legat de un nanocompozit alcătuit din puncte cuantice de grafen dopate cu azot și nanoparticule de aur

**P(L-Asp)/GCE** = electrod de carbon sticlos modificat cu poli(acid L-aspartic)

**AgNPs@Af-GO-MIP/GCE** = electrod de carbon sticlos modificat cu oxid de grafen funcționalizat cu acid și decorat cu nanoparticule de argint învelite în polimer molecular amprentat

**Cu<sub>3</sub>TeO<sub>6</sub>/GCE** = electrod de carbon sticlos modificat cu telurat de cupru 3D asemănător pietrei

**Mt-CPE** = electrod cu pastă de carbon dopată cu montmorillonit

**Pd-PdO/Mt-CPE** = electrod cu pastă de carbon modificat cu montmorillonit de sodiu impregnat cu particule de paladiu

**MWCNT-CPE** = electrod cu pastă de carbon modificat cu compozit din nanotuburi de carbon cu pereți multipli

**Clay-CPE** = electrod cu pastă de carbon modificat cu particule de argilă

**CPE-Clay/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** = electrod cu pastă de carbon modificat cu particule de oxid de aluminiu susținute pe argilă

**HKUST-CNF** = electrod compozit din cadru metal-organic de [Cu<sub>3</sub>(1,3,5-benzentricarboxilat)<sub>2</sub>] nanofibră de carbon-epoxidic

**BDDE** = electrod de diamant dopat cu bor

**ITO|{PAH|PB/SWCNTs}**<sub>3</sub> = nanoparticule auto-asamblate strat cu strat de albastru de Prusia, nanotuburi de carbon cu un singur perete și filme nanostructurate de clorhidrat de poli-alilamină depuse pe oxid de indiu și staniu

**CNF/SPCE** = electrod de carbon serigrafiat modificat cu nanofibre de carbon

**SPCE** = electrod de carbon serigrafiat

**SPCNTE** = electrod serigrafiat modificat cu nanotuburi de carbon

**SPCNFE** = electrod serigrafiat modificat cu nanofibre de carbon

**SPGPHE** = electrod serigrafiat modificat cu grafen

**aSPCE** = electrod de carbon serigrafiat activat

**ITO-LMR** = senzor bazat pe rezonanța în modul lossy din fibră optică acoperit cu strat de oxid de indiu și staniu

**CPS** = senzor de hârtie de carbon



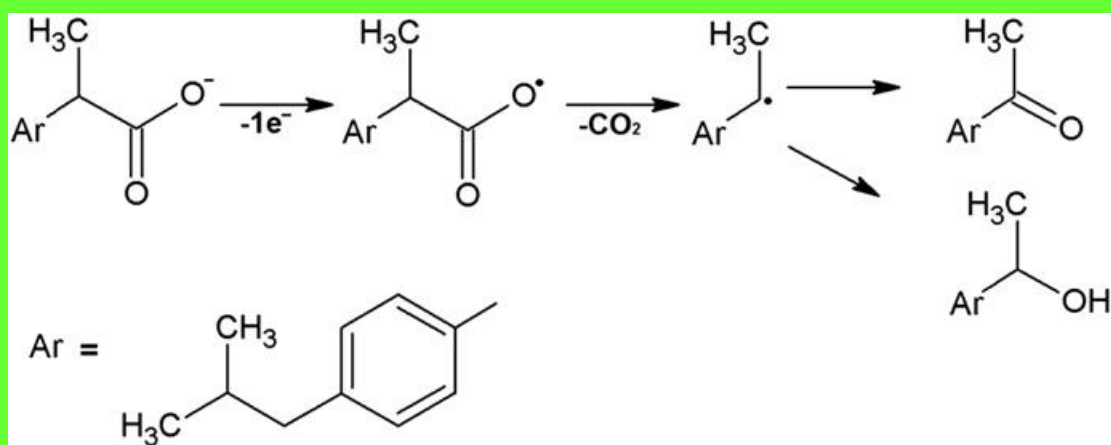
## 1.1. Senzori 3D utilizați pentru determinarea ibuprofenului

### 1.1.1. Electrozi pe bază de carbon sticlos utilizați pentru determinarea ibuprofenului

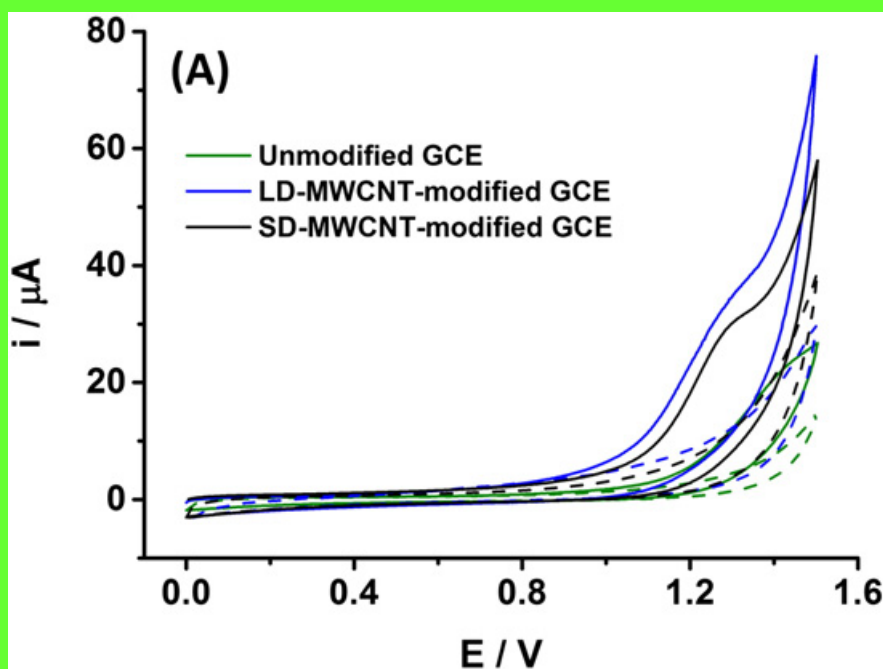
Senthil Kumar et al.<sup>25</sup> au folosit un electrod de carbon sticlos (GCE) pretratată prin voltametria cu undă pătrată pentru determinarea IBP în diferite tablete. Două metode de pretratare au fost aplicate electrodului: lustruire mecanică cu suspensie de alumina și tratament electrochimic la potențial de 1,5 V timp de 2 secunde. În timpul utilizării metodei voltametrice de redizolvare anodică cu undă pătrată (SWSV), senzorul a înregistrat o limită de detecție (LOD) de 0,96  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și un domeniu liniar între 1,45 și 3,87  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Deviația standard relativă (RSD) bazată pe cinci măsurători identice efectuate la o concentrație de analit de 1,94  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a fost de 2,5%.<sup>25</sup> Mai târziu în acel an, grupul lui Senthil Kumar<sup>26</sup> a folosit cu succes același GCE pretratată pentru determinarea simultană a paracetamolului și IBP în tablete prin voltametria de redizolvare anodică puls diferențială (DPSV) și SWSV. Răspunsul senzorului a fost liniar în intervalul de concentrație 1,45 și 3,39  $\mu\text{mol L}^{-1}$  în timpul utilizării DPSV și SWSV cu o LOD de 0,96  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pentru DPSV și 0,48  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pentru SWSV. RSD observat pentru șapte măsurători succesive efectuate la 1,45  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a fost de 2,7% pentru DPSV și 2,4% pentru SWSV.<sup>26</sup>

Montes și coautorii<sup>27</sup> au studiat cuantificarea IBP și a naproxenului din tablete și forme farmaceutice lichide folosind GCE modificate cu două tipuri de nanotuburi de carbon cu pereți multipli (MWCNT), cu diametru mare (LD-MWCNT) sau mic (SD-MWCNT). Oxidarea electrochimică a celor doi compuși a fost studiată folosind CV și verificată ulterior în experimente amperometrice. Mecanismul de oxidare electrochimică a IBP este prezentat în Figura 1. Electrocul modificat cu SD-MWCNT a dovedit o sensibilitate de detecție superioară (Figura 2), în special atunci când a fost folosit în detecția amperometrică, ca urmare a unei activități electrocatalitice mai bune a materialului. Acest lucru se datorează unei densități mai mari de împachetare a nanotuburilor de carbon confirmată prin măsurători spectroscopice Raman, care este în corelație cu o rată mai mare de transfer de electroni confirmată prin măsurători spectroscopice de impedanță electrochimică (EIS). În timpul determinării IBP cu metoda amperometrică folosind electrocul modificat cu SD-MWCNT, s-a obținut un domeniu liniar de la 10 la 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de 1,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . RSD calculat pentru 15 măsurători efectuate în 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$

IBP a fost de 4,2%. Formele farmaceutice care conțin IBP au fost analizate utilizând electrodul modificat cu SD-MWCNT într-un sistem de analiză prin injecție în flux (FIA) cu detecție amperometrică și rezultatele au fost similare cu cele obținute prin CE.<sup>27</sup>



**Figura 1.** Mecanismul oxidării electrochimice a ibuprofenului. Adaptat după<sup>27</sup> un articol cu acces deschis distribuit sub licența Creative Commons Attribution.



**Figure 2.** Voltamogramă ciclică pentru 1 mmol L<sup>-1</sup> ibuprofen în 0,1 mol L<sup>-1</sup> soluție tampon fosfat (pH 7,5) la GCE modificat cu LD-MWCNT (liniile negre), SD-MWCNT (liniile albastre) și GCE nemodificat (liniile verzi), respectiv pentru blank (liniile întrerupte). Viteza de scanare a fost de 50 mV s<sup>-1</sup>. Adaptat după<sup>27</sup> un articol cu acces deschis distribuit sub licența Creative Commons Attribution.

Kavitha et al.<sup>28</sup> au fabricat un electrod de carbon sticlos modificat cu nanofibră de polianilină pentru detectarea IBP din tablete farmaceutice prin DPSV, iar rezultatele obținute au fost în concordanță cu cele raportate de companiile producătoare. GCE a fost modificat prin adăugarea unei cantități mici de soluție, obținută anterior prin agitarea în apă a nanostructurii de polianilină preparate chimic. S-a obținut un

domeniu liniar de la 0,96 la 1,94  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD scăzută (0,48  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). RSD calculat pentru 7 determinări identice la o concentrație de 1,21  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a fost de 2,1%.<sup>28</sup>

Roushani și Shahdost-fard<sup>29</sup> au dezvoltat un aptasenzor pentru detectarea selectivă și sensibilă a IBP în forme farmaceutice (tablete și suspensie orală), ser uman cu adiție de IBP și apă reziduală. Electrocul a fost produs prin aplicarea pe suprafața unui GCE a unui strat dintr-o pastă nanocompozită care conține MWCNT, lichid ionic (IL) și chitosan (Chit). Nanocompozitul mărește suprafața electrocului, accelerează procesele de transfer de electroni și oferă o matrice stabilă pentru aptamer. Electrocul menționat anterior și denumit MWCNTs/IL/Chit/GCE a fost cuplat cu tereftalaldehidă prin grupările amino libere și apoi o sondă de captură cu terminație 3'-amino (ssDNA1) was a fost atașată covalent prin cuplare amidică la tereftalaldehidă. Un aptamer specific IBP (ssDNA2) a fost legat de ssDNA1 prin hibridizare și apoi molecule de albastru de metilen (MB) au fost intercalate în ssDNA2 ca markeri electrochimici pentru procesele redox. Aptasenzorul (notat MB/Apt/nanocompozit/GCE) detectează IBP prin legarea specifică de acesta și formarea unui complex aptamer/IBP în timp ce MB se detașează de aptamer și curentul scade, astfel încât MB poate indica concentrațiile IBP. Aptasenzorul a fost utilizat pentru determinarea IBP prin tehnica DPV și a furnizat un domeniu liniar de concentrație între  $7 \times 10^{-5}$  și 6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , o LOD de  $2 \times 10^{-5}$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o valoare RSD de 2,7% (obținută din patru măsurători efectuate cu patru MB/Apt/nanocompozit/GCE diferiți pentru o concentrație IBP de  $2 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Gradele de recuperare au variat de la 96,62 la 105,152%.<sup>29</sup>

În 2018, Roushani și Shahdost-fard<sup>30</sup> au proiectat o platformă nouă de aptasensing bazată pe un GCE modificat cu un nanocompozit care conține puncte cuantice de grafen dopat cu azot (N-GQD) și nanoparticule de aur (AuNP) care permite aptamerului (Apt) să se lege de nanocompozit. În primul rând, pe GCE gol a fost aplicat un strat de N-GQD-uri sintetice interne, obținându-se N-GQD-uri/GCE. AuNP-urile au fost electrodepuse pe suprafața electrocului dintr-o soluție de  $\text{HAuCl}_4$  și  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , obținându-se astfel AuNPs@N-GQDs/GCE. O sondă de captură cu grupare amino ( $\text{NH}_2$ -ssDNA1) legată covalent de AuNPs a fost utilizată ca agent de legătură între nanocompozit și Apt specific IBP (ssDNA2). Aptasenzorul astfel preparat, denumit Apt/AuNPs@N-GQDs/GCE, cuantifică concentrația IBP prin

formarea unui complex IBP-Apt în timp ce răspunsul relativ al semnalului scade pe măsură ce concentrația IBP la nivelul platformei crește. Curbele de calibrare au fost obținute prin DPV, măsurătorile arătând un domeniu de liniaritate între  $1 \times 10^{-10}$  și  $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $33,33 \times 10^{-12} \mu\text{mol L}^{-1}$ . Codeina, diclofenacul de sodiu, paracetamolul și valproatul de sodiu în concentrații de  $10^3$  ori mai mari decât IBP ( $5 \times 10^{-5} \mu\text{mol L}^{-1}$ ) au fost alese ca substanțe potențial interferente și analizate. Afinitatea Apt pentru IBP a fost mult mai puternică în comparație cu cea pentru celelalte substraturi, dovedind că aptasenzorul detectează IBP cu selectivitate ridicată. Aptasenzorul obținut a fost folosit pentru evaluarea tabletelor, probelor de apă uzată și ser uman, obținându-se grade de recuperare bune (97 – 102%).<sup>30</sup>

Mekassa și co-autorii<sup>31</sup> au obținut un GCE modificat cu acid L-aspartic (P(L-Asp)/GCE) prin electropolimerizare folosind CV (20 de cicluri, viteză de scanare  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ ). Senzorul a prezentat o activitate electrocatalitică bună în ceea ce privește oxidarea IBP, fiind capabil să îmbunătățească valoarea curentului de vârf și să scadă suprapotențialul în comparație cu GCE nemodificat. Metoda voltametrică cu undă pătrată (SWV) folosind electrodul P(L-Asp)/GCE a fost aplicată în condiții optimizate, obținându-se un domeniu liniar în intervalul  $1 - 150 \mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $0,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Electrocul a fost folosit pentru opt măsurători succesive în  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  IBP, obținându-se o valoare a RSD de 3,1% ceea ce indică o bună repetabilitate a senzorului. Pentru a studia influența potențialilor interferenți în cuantificarea IBP ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), au fost alese substanțe precum acidul ascorbic, acidul uric, cofeina, glucoza, lactoza,  $\text{Mg}^{2+}$  și  $\text{Na}^+$ . Chiar și la concentrații echimolare, cofeina a prezentat o interferență notabilă, care poate fi atribuită suprapunerii picurilor redox a cofeinei și IBP, în timp ce acidul uric a afișat o interferență minoră la concentrații de 10 ori mai mari decât IBP. Celelalte substanțe nu au interferat. Valori de recuperare cuprinse între 90,0% și 108,0% au fost obținute în urma analizei tabletelor farmaceutice și a probelor de urină cu adădire de IBP folosind P(L-Asp)/GCE.<sup>31</sup>

Nair și Sooraj<sup>32</sup> au propus un electrod bazat pe un nou polimer molecular amprentat (MIP) pentru detectarea electrochimică a IBP. Fabricarea senzorului presupune o serie de etape. Nanoparticule de argint sintetizate (AgNPs) și oxid de grafen funcționalizat cu acid (Af-GO) au fost amestecate cu un extract de frunze de *Caesalpinia sappan* pentru a obține Af-GO decorat cu AgNPs (AgNPs@Af-GO) și

apoi AgNPs@Af-GO a fost mai întâi tratat cu un amestec de IBP (ca șablon), acrilamidă (ca monomer), dimetacrilat de etilenglicol (ca agent de cross-linking) și metanol; apoi, la amestec s-a adăugat, 2,2'-azobisisobutironitril (ca inițiator radical) pentru a obține un polimer. Metanolul a fost folosit pentru a desprinde IBP din polimer, obținând AgNPs@Af-GO-MIP, care a fost utilizat la modificarea unui GCE. Când tehnica CV a fost folosită pentru a compara GCE modificat cu AgNPs@Af-GO-MIP cu un GCE modificat cu AgNPs@Af-GO-NIP (un produs de polimerizare obținut prin aceeași metodă dar fără IBP ca șablon), GCE modificat cu AgNPs@Af-GO-MIP a prezentat un pic de oxidare corespunzător IBP, în timp ce celălalt electrod nu a prezentat niciun pic redox. Acest lucru a confirmat formarea cavităților de memorie pe baza șablonului IBP pe suprafața polimerului AgNPs@Af-GO-MIP. Atunci când a fost studiat de DPV, GCE modificat cu AgNPs@Af-GO-MIP utilizat pentru analiza IBP a arătat un răspuns liniar în intervalul de concentrație 1 – 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $8,7 \times 10^{-3} \mu\text{mol L}^{-1}$ . Repetabilitatea senzorului a fost evaluată în 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  IBP prin DPV timp de opt cicluri, obținând o valoare RSD de 1,9%. Studiile de interferență au fost efectuate prin determinări simultane ale IBP și substanțe selectate precum acidul ascorbic, acidul uric, glucoza și lactoza în concentrații de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  fiecare. GCE modificat cu AgNPs@Af-GO-MIP a avut un răspuns al curentului de 7 ori mai mare pentru IBP în comparație cu potențialii interferenți, în timp ce GCE modificat cu AgNPs@Af-GO-NIP a prezentat un răspuns similar atât pentru IBP, cât și pentru substanțele selectate, indicând că senzorul MIP este foarte sensibil la IBP. Probele (tablete, urină umană și urină umană infectată cu adăugare de IBP) au fost analizate folosind metoda DPV și rezultatele recuperării IBP au variat între 97,8 și 100,6%.<sup>32</sup>

Mutharani et al.<sup>33</sup> au modificat un GCE cu telurat de cupru ( $\text{Cu}_3\text{TeO}_6$ ) cu structură 3D asemănătoare pietrei pentru determinarea electrochimică a IBP. Echipa a sintetizat o nanostructură de  $\text{Cu}_3\text{TeO}_6$  cu care a fost acoperit un GCE prin metoda depunerii cu picătura. Comportamentul electrochimic al  $\text{Cu}_3\text{TeO}_6/\text{GCE}$  a fost explorat folosind EIS și CV; rezultatele au dovedit o rată superioară de transfer a electronilor și picuri redox pronunțate în comparație cu un GCE nemodificat. Studiile de activitate electrocatalitică efectuate prin CV pe  $\text{Cu}_3\text{TeO}_6/\text{GCE}$ ,  $\text{TeO}_2/\text{GCE}$ ,  $\text{CuO}/\text{GCE}$  și GCE nemodificat au prezentat cel mai mare pic anodic pentru  $\text{Cu}_3\text{TeO}_6/\text{GCE}$ , un pic semnificativ crescut pentru  $\text{TeO}_2/\text{GCE}$  și

CuO/GCE, în timp ce GCE nu a prezentat niciun vârf observabil pentru oxidarea IBP. Măsurătorile DPV aplicate pe diferite concentrații de IBP au exprimat două domenii liniare de concentrație de la 0,02 la 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și de la 9 la 246  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $1,7 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ . Selectivitatea senzorului a fost analizată în 15  $\mu\text{mol L}^{-1}$  IBP împreună cu agenți potențial interferenți, cum ar fi teofilina, dopamina, acidul uric, acidul ascorbic, naproxenul, glucoza și clorpromazina în concentrații 20 de ori mai mari decât IBP. Curentul răspuns asociat substanțelor interferente a arătat modificări ușoare în detectarea IBP. Pentru reproductibilitatea senzorului au fost testați prin CV în 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  IBP 5 electrozi modificați, obținându-se o valoare RSD de 3,7%. Probele biologice cu adădire de IBP (urină umană și ser) au fost utilizate pentru determinarea IBP cu  $\text{Cu}_3\text{TeO}_6/\text{GCE}$  iar rezultatele recuperării au fost în intervalul de la 96 la 98,6%.<sup>33</sup>

### 1.1.2. Electrozi cu pastă de carbon utilizați pentru determinarea ibuprofenului

Loudiki și colaboratorii<sup>34</sup> au folosit un electrod cu pastă de carbon dopat cu montmorillonit (Mt-CPE) pentru a explora oxidarea electrochimică a IBP. Electrocul a fost obținut prin amestecarea argilei de montmorillonit de sodiu cu pulbere de grafit și apoi pasta a fost introdusă în cavitatea unui vârf de pipetă din plastic. O bară de carbon a fost folosită pentru stabilirea contactului electric. Măsurătorile CV comparative efectuate pe Mt-CPE și un electrod cu pastă de carbon (CPE) nemodificat au arătat un pic anodic bine definit la senzorul modificat, corespunzător electrooxidării IBP. Activitatea electrocatalitică a electrodului a fost confirmată în continuare prin tehnicile CA și EIS. Măsurătorile DPV au arătat un domeniu liniar de concentrație al IBP de la 0,1 la 10000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $6,8 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ . Valorile RSD de 1,24% și 1,07% au fost obținute după opt măsurători efectuate în 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și, respectiv, 0,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Studiile de interferență ale cuantificării IBP folosind  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , și  $\text{K}^+$  în concentrații de 1000 de ori mai mari decât IBP și paracetamol, acid uric, acid ascorbic și dopamină în concentrațiile de 100 de ori mai mari decât IBP nu au evidențiat nicio influență semnificativă asupra răspunsului curentului (modificare a semnalului <2%), în timp ce ionii precum  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  și  $\text{PO}_4^{3-}$  în concentrație de 100 de ori mai mari decât IBP au crescut ușor semnalul (2%). Au fost analizate probe reale (tablete și apă de râu) cu senzorul propus și comparate cu rezultatele prin HPLC, obținându-se valori de recuperare corespunzătoare în intervalul 98,50 – 99,25%.<sup>34</sup>



Mai târziu, în 2016, Loudiki et al.<sup>35</sup> au produs un electrod cu pastă de carbon modificat cu montmorillonit de sodiu impregnat cu particule de paladiu (Pd-PdO/Mt-CPE) pentru cuantificarea IBP. Senzorul a fost obținut prin amestecarea montmorillonitului de sodiu impregnat cu particule de paladiu (Pd-PdO/Mt) cu o pulbere de carbon și apoi pasta a fost incorporată în cavitatea a electrodului. O bară de carbon a reprezentat contactul electric. Activitatea voltametrică a IBP studiată prin CV la diverși senzori, cum ar fi CPE nemodificat, Mt-CPE și Pd-PdO/Mt-CPE a dezvăluit un pic de oxidare distinct la Pd-PdO/Mt-CPE, care demonstrează o rată rapidă de transfer a electronilor, confirmând că electrodul are capacități fiabile de electrooxidare. Metoda DPV a fost folosită pentru curba de calibrare, obținându-se un domeniu liniar între  $1,0 \times 10^{-2}$  și  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $2,85 \times 10^{-3} \mu\text{mol L}^{-1}$ . Senzorul propus a fost aplicat pentru determinarea IBP din probe de sânge uman, obținându-se valori de recuperare cuprinse între 95,65 și 99,07%. Metoda propusă a oferit rezultate similare cu cele obținute prin HPLC în ceea ce privește liniaritatea, LOD, acuratețea și specificitatea.<sup>35</sup>

Rivera-Hernández și colaboratorii<sup>36</sup> au proiectat un electrod cu pastă de carbon modificat cu un compozit de nanotuburi de carbon cu pereți multipli. Pasta obținută prin amestecarea pulberii de grafit și a nanotuburilor de carbon cu pereți multipli cu ulei mineral a fost introdusă într-un tub de plastic cu un fir de cupru pentru asigurarea contactului electric. Când electrodul modificat a fost comparat cu unul nemodificat, voltamogramele ciclice (CVs) efectuate în  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$  IBP au prezentat un pic anodic de trei ori mai mare pentru electrodul cu pastă de carbon modificat cu compozitul de nanotuburi de carbon cu pereți multipli. Măsurătorile DPV au evidențiat un domeniu liniar între 2,36 și  $242 \mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $9,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Electrodul a fost utilizat pentru șase măsurători succesive în  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$  IBP pentru a evalua repetabilitatea acestuia, obținându-se o RSD de 1,93%. Studiile de interferență efectuate folosind  $\text{NO}_3^-$ , oxalat, acid ascorbic, povidonă, polietilen glicol, oxid de siliciu, zaharoză, sorbitol și microceluloză în concentrații echimolare, de 10 ori și de 100 de ori mai mari decât IBP au arătat că  $\text{NO}_3^-$ , oxalatul și acidul ascorbic au interferat cu detecția IBP în timp ce celelalte specii potențial interferente nu au interferat. Aplicabilitatea senzorului a fost testată pe tablete farmaceutice, obținându-se valori de recuperare cuprinse între 101,24 și 104,67%.<sup>36</sup>

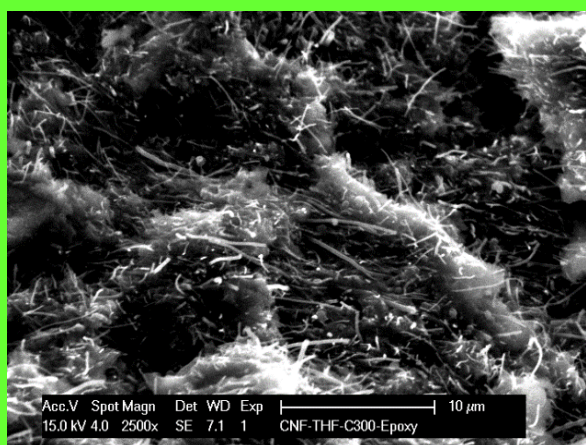
Hammami și co-autorii<sup>37</sup> au propus un electrod cu pastă de grafit modificat cu particule de argilă (Clay-CPE). Caracterizarea suprafeței și comportamentul electrochimic al Clay-CPE și CPE nemodificat față de oxidarea IBP au fost observate prin CV, diagrame Tafel și EIS, rezultatele colectate indicând o rată ridicată de transfer al electronilor și o supratensiune anodică scăzută pentru Clay-CPE. Când DPV a fost utilizat, s-a obținut un domeniu liniar de concentrație de 1 – 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cu o LOD de  $83,5 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ . Reproducibilitatea Clay-CPE a fost evaluată pe baza a opt măsurători succesive în 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  IBP, valoarea RSD obținută a fost de 2,31%. Studiile de interferență au fost efectuate folosind metoda soluțiilor mixte. S-a folosit o soluție de IBP (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) și soluții de diferite concentrații de potențiali interferenți (dopamină, catecol, acid ascorbic, fenol, 3-aminofenol, paracetamol, resorcinol, 4-nitrofenol, acid salicilic și hidrochinonă). Paracetamolul, acidul ascorbic, fenolul și concentrațiile de 10 ori mai mari de resorcinol, 4-nitrofenol și acid salicilic au scăzut răspunsul curentului pentru IBP, în timp ce concentrațiile de 50 de ori mai mari de 3-aminofenol, hidrochinonă, catecol și dopamină și concentrațiile echimolare de resorcinol, 4-nitrofenol și acid salicilic nu a avut nicio influență asupra oxidării IBP. IBP determinat prin DPV din tablete farmaceutice a furnizat valori de recuperare de 99,56% și 100,82%, în timp ce probele de sânge uman cu adăugare de IBP au avut un răspuns liniar în domeniul 1 – 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  IBP, panta curbei de calibrare scăzând cu 80,16% în comparație cu panta obținută în tampon fosfat.<sup>37</sup>

El Ouafy și coautorii<sup>38</sup> au modificat un electrod cu pastă de carbon cu particule de oxid de aluminiu intercalate cu argilă (CPE–Clay/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) pentru a evalua activitatea sa electrocatalitică asupra oxidării IBP. Studiul comportamentului electrochimic al IBP la CPE, CPE–Clay și CPE–Clay/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  în soluție de 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  IBP în 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  tampon fosfat a furnizat CVs care arată un pic de oxidare în intervalul de potențial 0,5 – 1,4 V, care descrie un proces redox ireversibil. În plus, voltamogramele descriu un curent de vârf crescut și un potențial de vârf scăzut pe CPE–Clay/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  în comparație cu CPE și CPE–Clay, ceea ce indică o performanță electrocatalitică îmbunătățită. Măsurătorile DPV aplicate în IBP au furnizat un domeniu liniar de concentrație de la 1 la 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $1,95 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ . Studiile de repetabilitate efectuate în 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  IBP au indicat o valoare RSD de 3,4% după nouă măsurători. Selectivitatea senzorului propus a fost evaluată prin studii de interferență realizate într-o soluție care

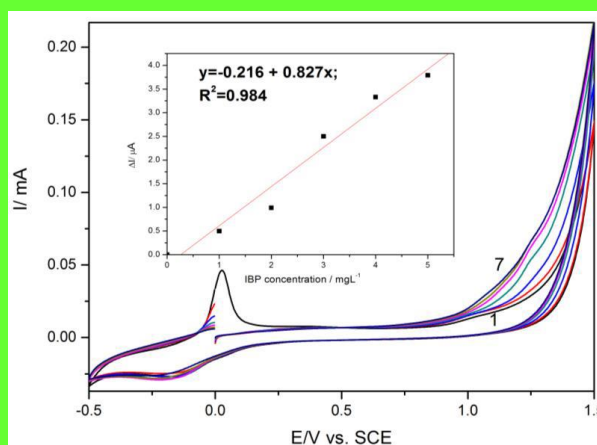
conține  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  IBP și un amestec de molecule interferente selectate (acid ascorbic echimolar și resorcinol și acid salicilic în concentrație de 0,1 ori față de IBP); voltamograma a ilustrat faptul că densitatea curentului IBP nu este influențată de prezența acestor compuși potențial interferenți. Probele de sânge uman cu adăugare de IBP analizate prin DPV utilizând CPE–Clay/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  au prezentat o LOD de  $8,81 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$  și o valoare RSD de 4,08% după nouă măsurători efectuate în soluție de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  IBP.<sup>38</sup>

### 1.1.3. Alte tipuri de electrozi utilizați pentru determinarea ibuprofenului

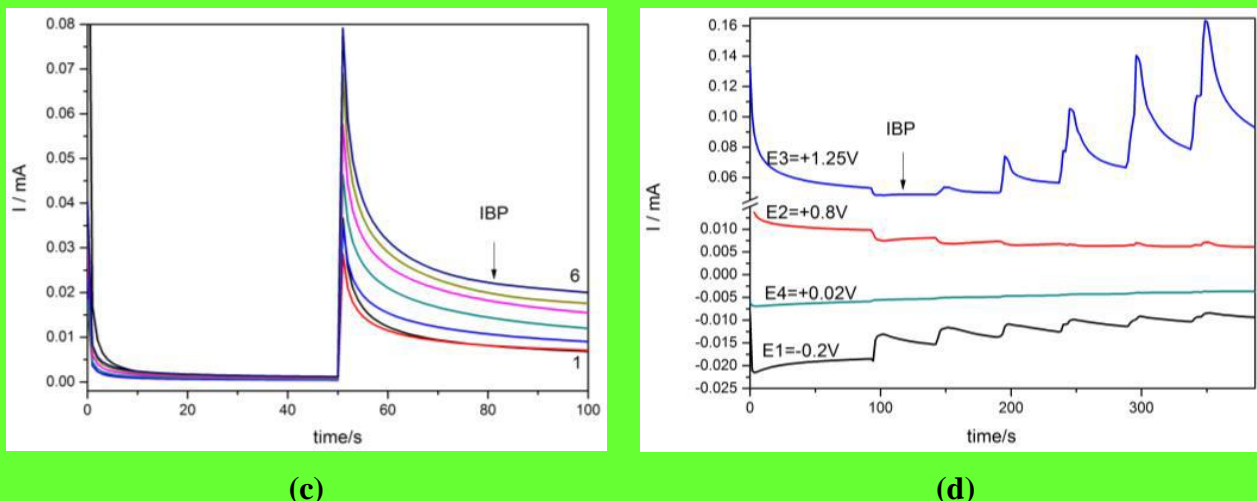
Echipa lui Motoc și Manea<sup>39</sup> a dezvoltat un electrod compozit (HKUST-CNF) sintetizat electrochimic alcătuit din cadru metal-organic de  $[\text{Cu}_3(1,3,5\text{-benzetricarboxilate})_2]$  (HKUST-1) nanofibră de carbon și epoxid pentru cuantificarea simultană a IBP și diclofenacului (DCF). Măsurătorile CV, CA și de amperometrie cu pulsații multiple (MPA) au furnizat un interval liniar al concentrației IBP de  $4,84 - 29,08 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $9,69 - 48,47 \mu\text{mol L}^{-1}$  și, respectiv,  $9,69 - 58,17 \mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $6,3 \times 10^{-4} \mu\text{mol L}^{-1}$  și  $1,93 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ . Rezultatele microscopiei electronice cu scanare (SEM), CV, CA și MPA sunt prezentate în Figura 3. RSD calculată pe baza a trei măsurători a fost de 2,05% pentru CV, 0,81% pentru CA și 1,14 pentru MPA. Sensorul a fost testat prin CV, CA și MPA pentru detecția simultană a IBP și DCF pentru a evalua o potențială interferență reciprocă, rezultatele indicând posibilitatea de a detecta selectiv cei doi compuși prin comutarea potențialului.<sup>39</sup>



(a)



(b)



**Figure 3.** (a) Imagine SEM a electrodului compozit HKUST-CNF, (b) Voltamogramă ciclică înregistrată la electrodul HKUST-CNF în 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suport electrolit (curba 1) și în prezența diferitelor concentrații de ibuprofen: curbele 2–7: 1–6 mg L<sup>-1</sup> ibuprofen; viteza de scanare: 0,05 V s<sup>-1</sup>; interval de potențial: -0,5 până la +1,5 V/SCE. Inset: Diagrame de calibrare ale curenților înregistrați la E = +1,25 V vs. SCE față de concentrațiile de ibuprofen, (c) CA înregistrată la două niveluri de potențial de +0,8 V și +1,25 V vs. SCE la electrodul HKUST-CNF în 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suport electrolit (curba 1) și în prezența a 2 mg L<sup>-1</sup> ibuprofen (curba 2), 4 mg L<sup>-1</sup> ibuprofen (curba 3), 6 mg L<sup>-1</sup> ibuprofen (curba 4), 8 mg L<sup>-1</sup> ibuprofen (curba 5), 10 mg L<sup>-1</sup> ibuprofen (curba 6), (d) Amperograme cu pulsații multiple înregistrate la electrodul HKUST-CNF în 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suport electrolit și adăugând consecutiv și continuu 2 mg L<sup>-1</sup> ibuprofen, înregistrat la E1 = -0,2 V/SCE, E2 = +0,8 V/SCE, E3 = +1,25 V/SCE, E4 = +0,02 V/SCE. Adaptat după<sup>39</sup> un articol cu acces deschis distribuit sub licența Creative Commons Attribution.

Švorc et al.<sup>40</sup> au folosit un electrod cu diamant dopat cu bor (BDDE) pentru detecția IBP. Măsurătorile DPV și SWV au fost utilizate pentru curbele de calibrare, obținându-se un domeniu liniar de concentrație similar de 0,95 – 66,9 μmol L<sup>-1</sup>, în timp ce o LOD mai mica, 0,41 μmol L<sup>-1</sup>, a fost atinsă prin DPV comparativ cu 0,93 μmol L<sup>-1</sup> atinsă prin SWV. Valorile RSD sub 5% (3,6% pentru DPV și 4,6% pentru SWV) au fost obținute din șase măsurători în 10 μmol L<sup>-1</sup> IBP. Pentru studiile de interferență au fost studiate substanțe precum stearatul de magneziu, amidonul, celuloza, acidul benzoic, benzoatul de sodiu, glucoza, acidul ascorbic, acidul uric, dopamina și cofeina în diferite raporturi de concentrație (1:1, 1:10, 1:100) împreună cu IBP (10 μmol L<sup>-1</sup>). Stearatul de magneziu, amidonul, celuloza, acidul benzoic, benzoatul de sodiu, glucoza, dopamina, acidul uric în concentrații de 20 de ori mai mari și cofeina echimolară nu au interferat cu detectarea IBP, în timp ce acidul ascorbic în concentrații de 10 ori mai mari și acidul uric în concentrații de 100 de ori mai mari scad răspunsul curentului pentru IBP cu aproximativ 20%. Semnalele suprapuse care au împiedicat detectarea IBP au fost înregistrate pentru acidul ascorbic în concentrații de 100 de ori mai mari, cofeina în concentrații de 10 ori și de 100 de ori mai mari. Forme farmaceutice (tablete și lichide) și probe de urină umană au fost analizate utilizând DPV și SWV cu

rezultate de recuperare variind de la 99,8 la 107,5% (DPV) și de la 99,8 la 105% (SWV) pentru produsele farmaceutice și de la 95 la 107% (DPV) și de la 97 la 103% (SWV) pentru urină.<sup>40</sup>

Carvalho și colaboratorii<sup>41</sup> au construit un electrod bazat pe nanoparticule de albastru de Prusia (PB NPs), nanotuburi de carbon cu un singur perete (SWCNT) și filme nanostructurate de clorhidrat de poli-alilamină (PAH) depuse pe oxid de indiu și staniu (ITO). PB NPs au fost mai întâi sintetizate și apoi trei straturi duble de filme nanostructurate au fost depuse pe ITO folosind metoda de auto-asamblare strat cu strat, prin imersarea alternativă a substratului în soluții apoase încărcate negativ (PB NPs sau PB/SWCNT) și pozitiv (PAH). În funcție de soluțiile încărcate negativ, s-au obținut doi electrozi: “blank” ITO|{PAH|PB}<sub>3</sub> când s-a folosit PB NPs și ITO|{PAH|PB/SWCNTs}<sub>3</sub> când s-a folosit PB/SWCNTs. Măsurătorile electrodului ITO|{PAH|PB}<sub>3</sub> în soluție de electrolit KCl au prezentat două procese redox pe voltamogramă, primul pic înregistrat la 160 mV (vs. SCE) corespunzând transformării albului de Prusia în PB, iar al doilea pic apărând la 850 mV (vs. SCE) corespunzând conversiei PB în verde de Berlin, în timp ce la ITO|{PAH|PB/SWCNTs}<sub>3</sub> au fost observate cele două procese redox cu densități de curent foarte ridicate, 0,12 și 0,87 V (vs. SCE), o caracteristică care se datorează conductivității electrice îmbunătățite a nanotuburilor de carbon. CVs efectuate în prezența IBP relevă o inhibare a picurilor de densități de curent ale speciilor de PB care este proporțională cu concentrațiile de IBP, indicând o interacțiune între componente. S-a propus că PB interacționează prin situsurile sale Fe<sup>3+</sup> cu grupul funcțional COO<sup>-</sup> prezent în structura IBP în condiții de pH neutru. Primul proces catodic a demonstrat un domeniu liniar de concentrație de la  $4,7 \times 10^{-2}$  până la  $0,23 \mu\text{mol L}^{-1}$  IBP și o sensibilitate bună ( $2532,37 \pm 69,05 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ ), în timp ce al doilea proces anodic a prezentat un domeniu liniar mai larg,  $0,047 - 0,37 \mu\text{mol L}^{-1}$  dar o sensibilitate diminuată ( $\sim 592,54 \pm 1,49 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ ). Aceste rezultate sugerează că primul proces redox este mai potrivit și mai fiabil pentru detectarea IBP.<sup>41</sup>

## 1.2. Senzori de unică folosință utilizați pentru determinarea ibuprofenului

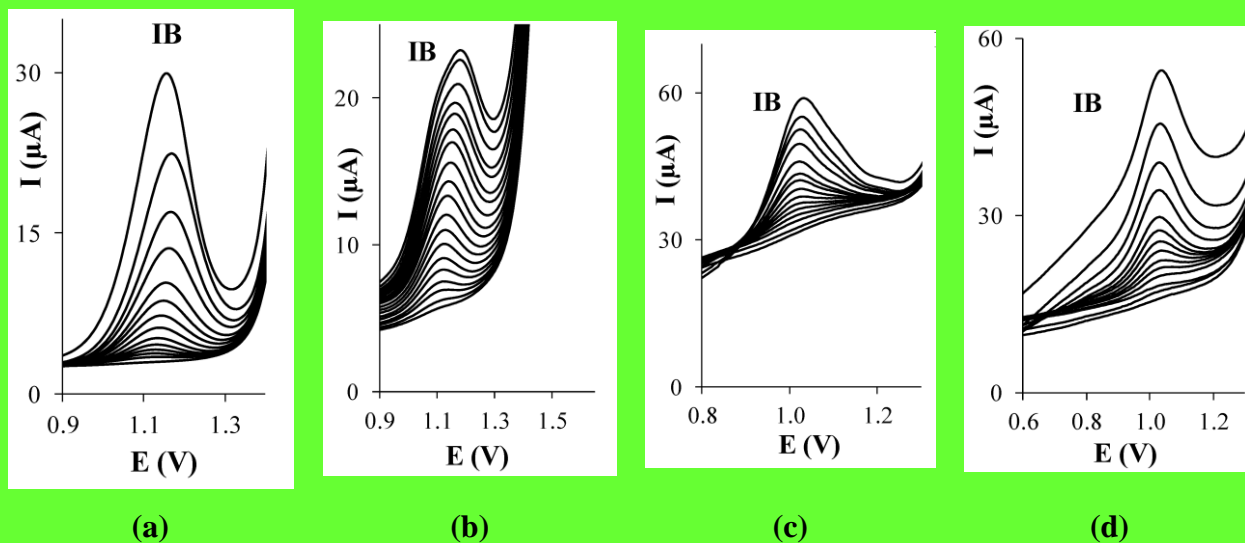
Apetrei et al.<sup>42</sup> au descris un electrod de carbon serigrafat modificat cu nanofibre de carbon (CNF/SPCE) pentru cuantificarea electrochimică a IBP. Sensorul a fost obținut prin dispersarea nanofibrelor de carbon

pe un electrod serigrafiat comercial. CVs la CNF/SPCE efectuate în  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  tampon acetat (pH 4,5) și în  $10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  IBP în  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  tampon acetat (pH 4,5) au evidențiat lipsa picurilor redox atunci când a fost utilizat în soluția de electrolit suport, în timp ce măsurătorile în soluția IBP au afișat un pic de oxidare ireversibil la +1,19 V. Analizele prin DPV au arătat un pic de oxidare al IBP la +1,08 V vs. Ag, un domeniu liniar de concentrație între 0,8 și  $30 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $0,35 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ . Repetabilitatea CNF/SPCE determinată prin zece determinări succesive în soluție IBP  $10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  în  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  tampon acetat (pH 4,5) a fost exprimată printr-o valoare a RSD de 1,8%. Studiile de interferență efectuate prin DPV în soluții care conțin IBP ( $10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ) și diferite substanțe potențial interferente (paracetamol, acid ascorbic și glucoză) în concentrații echimolare nu au evidențiat interferențe semnificative (valori ale abaterilor relative ale curentului de vârf al IBP sub 4%). CNF/SPCE a fost utilizat în studiul de recuperare folosind probe de tablete, iar rezultatele obținute au fost aproape de 100%.<sup>42</sup>

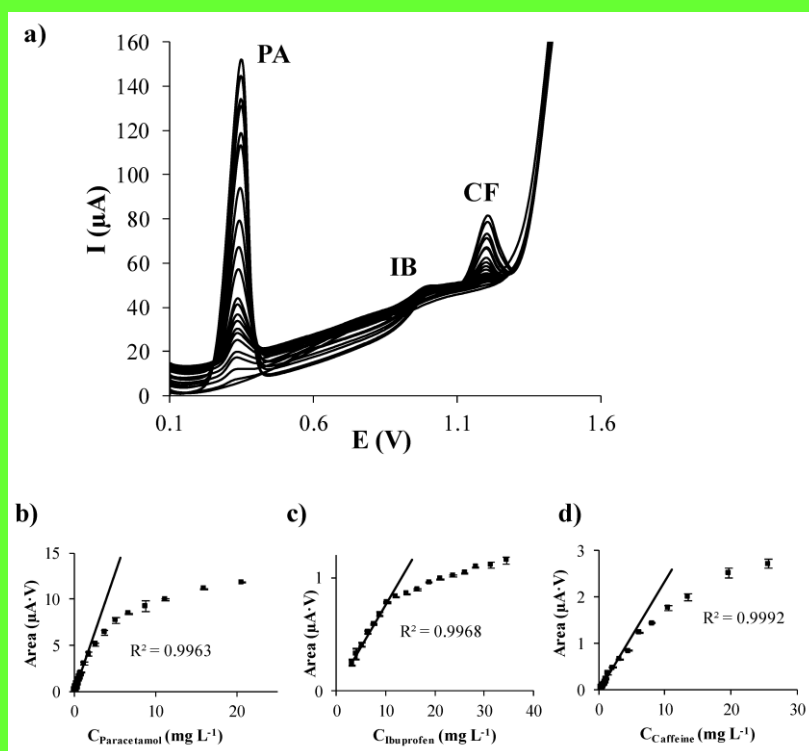
Serrano și co-autorii<sup>43</sup> au folosit patru electrozi serigrafiați comerciali pentru determinarea simultană a IBP, paracetamol și cofeină. Electrocul de carbon serigrafiat (SPCE), electrocul serigrafiat modificat cu nanotuburi de carbon cu pereți multipli (SPCNTE), electrocul serigrafiat modificat cu nanofibre de carbon (SPCNFE) și electrocul serigrafiat modificat cu grafen (SPGPHE) utilizați în măsurători DPV individuale (Figura 4) au furnizat următoarele intervale de concentrație liniare pentru IBP: 18,42 – 489,14  $\mu\text{mol L}^{-1}$  la SPCE, 9,21 – 155,12  $\mu\text{mol L}^{-1}$  la SPCNTE, 19,39 – 114,40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  la SPCNFE și 30,54 – 86,29  $\mu\text{mol L}^{-1}$  la SPGPHE; valorile LOD calculate au fost 5,33, 2,90, 5,81 și 9,21  $\mu\text{mol L}^{-1}$  la SPCE, SPCNTE, SPCNFE și, respectiv, SPGPHE. Calibrarea simultană pentru IBP, paracetamol și cofeină a fost efectuată prin DPV utilizând SPCNFE (Figura 5) pentru a evalua influența moleculelor coexistente asupra comportamentului analitic individual, rezultatele obținute prezentând domenii liniare mai înguste (10,66 – 49,44, 0,59 – 5,29 și 1,03 – 5,66  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pentru IBP, paracetamol și, respectiv, cofeină) și valori ale LOD diminuate (2,9, 0,19 and 0,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pentru IBP, paracetamol și cofeină). Voltamogramele individuale și simultane sunt prezentate în figurile 4 și 5. Pentru IBP, sensibilitățile calculate pe baza pantelor curbilor de calibrare au fost 0,0380, 0,0404, 0,082 și 0,051  $\mu\text{A V mg}^{-1} \text{ L}$  pentru SPCE, SPCNTE, SPCNFE și SPGPHE. Cuantificarea simultană a IBP, paracetamol și cofeină în probe de apă de la robinet



a fost efectuată prin DPV utilizând SPCNFE, obținându-se valori de recuperare cuprinse între 97,6 și 103,1%.<sup>43</sup>



**Figura 4.** Voltamograme puls diferențiale individuale ale ibuprofen în 0,1 mol L<sup>-1</sup> tampon acetat (pH 5,5) folosind: (a) electrod de carbon serigrafiat (SPCE), (b) electrod serigrafiat modificat cu nanotuburi de carbon (SPCNTE), (c) electrod serigrafiat modificat cu nanofibre de carbon, (d) electrod serigrafiat modificat cu grafen (SPGPHE). Adaptat după<sup>43</sup> un articol cu acces deschis distribuit sub licența Creative Commons Attribution.



**Figura 5.** (a) voltamograme puls diferențiale ale unui amestec de paracetamol, ibuprofen și cofeină; și respectivele grafice de calibrare (b), (c) și (d) în 0,1 mol L<sup>-1</sup> tampon acetat (pH 5,5) utilizând un electrod serigrafiat modificat cu nanofibre de carbon (SPCNFE). Adaptat după<sup>43</sup> un articol cu acces deschis distribuit sub licența Creative Commons Attribution.

Tyszczyk-Rotko și colaboratorii<sup>44</sup> au propus un electrod de carbon serigrafat activat electrochimic (aSPCE) pentru detecția IBP. Activarea electrochimică implică cinci cicluri voltametrice de la 0 la 2 V la o viteză de scanare de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  într-o soluție de NaOH ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) și apoi electrodul este clătit cu apă deionizată. Pentru a evalua comportamentul electrochimic al IBP la aSPCE, CVs la diferite viteze de scanare variind de la 5 la  $500 \text{ mV s}^{-1}$  au fost aplicate într-o soluție de IBP  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  în tampon acetat ( $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ) de pH  $4,5 \pm 0,1$ ; voltamogramele au prezentat un pic anodic în jurul valorii de  $0,9\text{V}$  și niciun vârf pe domeniul catodic. Măsurătorile DPV în condiții optime efectuate pe IBP au furnizat două domenii liniare de concentrație de la  $0,5$  la  $20 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  și de la  $20$  la  $500 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $5,9 \times 10^{-2} \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ . Testele de repetabilitate au fost efectuate prin zece măsurători succesive în  $20 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  IBP și s-a obținut o RSD de 3,5%; pentru analiza de reproductibilitate, trei aSPCE preparați independent au fost utilizați în  $20 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  IBP și au prezentat o valoare a RSD de 4,5%. În studiile de interferență, paracetamolul și glucoza (concentrații de 50 de ori mai mari decât IBP) nu au interferat cu semnalul IBP ( $20 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Aplicabilitatea aSPCE pe tablete farmaceutice a fost evaluată prin DPV; rezultatele au fost în concordanță cu compoziția cantitativă furnizată de producător în timp ce eroarea relativă calculată a fost între 3,1 și 4,7%.<sup>44</sup>

## 2. Senzori electrochimici utilizați pentru determinarea ketoprofenului

Înainte de 2016, ketoprofenul (KTP), acidul 2-(3-benzoilfenil)propanoic, a fost detectat în forme farmaceutice (capsule, tablete, supozitoare și soluții injectabile) și plasmă umană folosind electrodul picurător de mercur și electrodul polimeric.<sup>45-48</sup> În plus, a fost raportată utilizarea electrozilor cu membrană potențiometrici, enantioselectivi pentru enantioanaliza KTP.<sup>49,50</sup>

Cebula et al.<sup>51</sup> au folosit un GCE pentru a detecta ketoprofenul. CVs efectuate la o viteză de scanare de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  într-o soluție de KTP în  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  tampon fosfat (pH 7,0) au afișat un vârf catodic la  $-1,3 \text{ V}$  care corespunde unui proces de reducere ireversibil. Măsurătorile DPV au furnizat un domeniu liniar de concentrație cuprins între 9 și  $5000 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de  $11,4 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ .<sup>51</sup>

Bogdanowicz et al.<sup>52</sup> au dezvoltat un senzor din fibră optică acoperit cu strat de ITO, bazat pe fenomenul de rezonanță în modul lossy (LMR). Senzorul, denumit ITO-LMR, a fost produs prin pulverizarea magnetron a ITO pe o fibră optică de silice acoperită cu polimer și apoi KTP a fost electrodepus pe electrod. Electrocul permite monitorizarea optică și electrochimică simultană a modificărilor care apar în timpul procesului electrochimic, iar răspunsul său spectral se bazează pe procesul de electrodepunere al KTP. Senzorul ITO-LMR a înregistrat un domeniu liniar de concentrație al KTP de la 1 la 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și o LOD de 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .<sup>52</sup>

Torrinha și co-autorii<sup>53</sup> au folosit senzori de hârtie de carbon (CPS) de unică folosință pentru detecția electrochimică a KTP. Măsurătorile prin CV ale KTP în 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  tampon Britton-Robinson (BRB) pH 5,5 au relevat un proces controlat prin difuziune și voltamogramele au prezentat două picuri de reducere la -1,05 și -1,1 V vs. Ag/AgCl, cel mai pronunțat fiind cel la -1,1 V. DPV aplicată în condiții optime a fost selectată pentru detecția KTP, obținându-se două domenii liniare dinamice, de la 0,088 la 1,96  $\mu\text{mol L}^{-1}$  și de la 1,96 la 6,02  $\mu\text{mol L}^{-1}$  precum și o LOD de  $0,11 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$  sau  $0,21 \pm 0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ , în funcție de curba de calibrare. Testele de reproductibilitate efectuate pe cinci senzori au prezentat o valoare RSD în intervalul 10 – 16%, în timp ce repetabilitatea evaluată prin cinci măsurători succesive a condus la un RSD de la 6 la 15%. Concentrații mari (500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) de sulfați, nitriți, fosfați, glucoză, lactoză și acid ascorbic și 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  paracetamol, aspirină, ibuprofen și diclofenac nu au evidențiat nicio interferență asupra picului KTP la -1,1 V. Probe reale cu adăugare de KTP (ape uzate și pești) evaluate prin DPV folosind CPS au furnizat valori bune de recuperare.<sup>53</sup>

## Concluzii

Acest review subliniază câteva tendințe recente în detecția electrochimică a ibuprofenului și ketoprofenului. Senzorii descriși reprezintă metode alternative fiabile de determinare pentru metodele standard propuse în Farmacopee, deoarece sunt remarcabil de sensibili, foarte selectivi, ușor de reprodus și economici. Aceștia au fost utilizați cu succes la determinarea ibuprofenului și ketoprofenului din diverse tipuri de probe, cum ar fi forme farmaceutice, probe biologice și resurse de apă cu valori bune de recuperare.

În cazul ketoprofenului, deși este utilizat pe scară largă ca AINS eficient sub diferite forme farmaceutice, a existat un interes limitat pentru dezvoltarea senzorilor electrochimici dedicați analizei acestuia în diferite probe.

## Referințe

1. J. R. Vane and R. M. Botting, *Scand. J. Rheumatol.*, **25**, 9–21 (1996).
2. M.-J. Domper Arnal, G. Hijos-Mallada, and A. Lanas, *Expert Opinion on Drug Safety*, 1–12 (2021).
3. S. Harirforoosh and F. Jamali, *Expert Opin. Drug Saf.*, **8**, 669–681 (2009).
4. A. Mejía-García, H. Islas-Flores, L. M. Gómez-Oliván, N. SanJuan-Reyes, J. M. Ortega-Olvera, and M. D. Hernández-Navarro, *Handb. Environ. Chem.*, 41–53 (2020).
5. *European pharmacopoeia, Council of Europe*, 10<sup>th</sup> ed., Strasbourg (2017), p. 2921–2923.
6. *European pharmacopoeia, Council of Europe*, 10<sup>th</sup> ed., Strasbourg (2017), p. 3035–3037.
7. *The United States Pharmacopeia USP 34-NF 29*, (2011).
8. E. Ameyibor and J. T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17**, 83–88 (1998).
9. Y. Y. Lau, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **19**, 2143–2153 (1996).
10. S. Ravisankar, M. Vasudevan, M. Gandhimathi, and B. Suresh, *Talanta*, **46**, 1577–1581 (1998).
11. D. K. Bempong and L. Bhattacharyya, *J. Chromatogr. A*, **1073**, 341–346 (2005).
12. A. Szeitz, A. N. Edginton, H. T. Peng, B. Cheung, and K. W. Riggs, *Am. J. Anal. Chem.*, **01**, 47–58 (2010).
13. J. Y. Kim, S. J. Kim, K.-J. Paeng, and B. C. Chung, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **24**, 315–319 (2001).
14. E. Waraksa, M.K. Woźniak, E. Kłodzińska, R. Wrzesień, B. Bobrowska-Korczak, J. Namieśnik, *J. Sep. Sci.*, **41**, 3881–3891 (2018).
15. P. C. Damiani, M. Bearzotti, and M. A. Cabezón, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**, 679–683 (2001).
16. J. Sádecká, M. Čakrt, A. Hercegová, J. Polonský, and I. Skačáni, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**, 881–891 (2001).
17. M. Friedberg and Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **695**, 193–198 (1997).

18. A. C. Power and A. Morrin, *IntechOpen* (2013) <https://www.intechopen.com/chapters/42956>.
19. A. B. Lima, E. O. Faria, R. H. Montes, R. R. Cunha, E. M. Richter, R. A. Munoz, and W. T. dos Santos, *Electroanalysis*, **25**, 1585–1588 (2013).
20. A. B. Lima, L. M. Torres, C. F. Guimarães, R. M. Verly, L. M. Silva, Á. D. Carvalho Júnior, and W. T. dos Santos, *J. Braz. Chem. Soc.*, **25**, 478–483 (2014).
21. S. Amin, M. T. Soomro, N. Memon, A. R. Solangi, T. Qureshi, and A. R. Behzad, *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.*, **1-2**, 8–13 (2014).
22. F. Manea, S. Motoc, A. Pop, A. Remes, and J. Schoonman, *Nanoscale Res. Lett.*, **7**, 331 (2012).
23. S. Motoc, F. Manea, A. Pop, R. Pode, and G. Burtica, *Adv. Sci., Eng. Med.*, **3**, 7–12 (2011).
24. M. Roushani and F. Shahdost-fard, *Talanta*, **144**, 510–516 (2015).
25. E. Suresh, K. Sundaram, B. Kavitha, and N. Senthil Kumar, *Int. J. PharmTech Res.*, **9**, 182–188 (2016).
26. E. Suresh, K. Sundaram, B. Kavitha, S. Maria Rayappan, and N. Senthil Kumar, *J. Adv. Chem. Sci.*, **2**, 369–372 (2016).
27. R. H. O. Montes, A. P. Lima, R. R. Cunha, T. J. Guedes, W. T. P. dos Santos, E. Nossol, E. M. Richter, and R. A. A. Munoz, *J. Electroanal. Chem.*, **775**, 342–349 (2016).
28. E. Suresh, K. Sundaram, B. Kavitha, and N. Senthil Kumar, *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, **8**, 44 (2016).
29. M. Roushani and F. Shahdost-fard, *Mater. Sci. Eng. C*, **68**, 128–135 (2016).
30. M. Roushani and F. Shahdost-fard, *Bioelectrochemistry*, **126**, 38–47 (2019).
31. B. Mekassa, M. Tessema, B. S. Chandravanshi, and M. Tefera, *IEEE Sens. J.*, **18**, 37–44 (2018).
32. A. S. Nair and M. P. Sooraj, *J. Mater. Sci.*, **55**, 3700–3711 (2019).
33. B. Mutharani, R. Rajakumaran, S.-M. Chen, P. Ranganathan, T.-W. Chen, D. A. Al Farraj, M. Ajmal Ali, and F. M. A. Al-Hemaid, *Microchem. J.*, **159**, 105378 (2020).
34. A. Loudiki, H. Hammani, W. Boumya, S. Lahrich, A. Farahi, M. Achak, M. Bakasse, and M. A. El Mhammedi, *Appl. Clay Sci.*, **123**, 99–108 (2016).

35. A. Loudiki, W. Boumya, H. Hammani, H. Nasrellah, Y. El Bouabi, M. Zeroual, A. Farahi, S. Lahrich, K. Hnini, M. Achak, M. Bakasse, and M. A. El Mhammedi, *Mater. Sci. Eng. C*, **69**, 616–624 (2016).
36. S. I. Rivera-Hernández, G. A. Álvarez-Romero, S. Álvarez-Romero, M. E. Páez-Hernández, C. A. Galán-Vidal, and M. Romero-Romo, *Instrum. Sci. Technol.*, **44**, 483–494 (2016).
37. H. El Ouafy, H. Hammani, A. Farahi, S. Lahrich, M. Bakasse, and M. A. El Mhammedi, *ChemistrySelect*, **4**, 11282–11287 (2019).
38. H. El Ouafy, T. El Ouafy, M. Oubenali, A. El Haimouti, A. Gamouh, and M. Mbarki, *Methods Objects Chem. Anal.*, **16**, 81–87 (2021).
39. S. Motoc, F. Manea, A. Iacob, A. Martinez-Joaristi, J. Gascon, A. Pop, and J. Schoonman, *Sensors*, **16**, 1719 (2016).
40. L. Švorc, I. Strežová, K. Kianičková, D. M. Stanković, P. Otřisal, and A. Samphao, *J. Electroanal. Chem.*, **822**, 144–152 (2018).
41. C. L. Carvalho, G. de Andrade Rodrigues, J. L. Magalhães, R. A. de Sousa Luz, E. T. da Silva, and W. Cantanhêde, *Surf. Interfaces*, **25**, 101276 (2021).
42. I. M. Apetrei, A. A. Bejinaru, M. Boev, C. Apetrei, and O. Dumitriu Buzia, *Farmacia*, **65**, 790–795 (2017).
43. N. Serrano, Ò. Castilla, C. Ariño, M. Diaz-Cruz, and J. Díaz-Cruz, *Sensors*, **19**, 4039 (2019).
44. K. Tyszczyk-Rotko, J. Kozak, and A. Węzińska, *Appl. Sci.*, **11**, 9908 (2021).
45. M. M. Ghoneim and A. Tawfik, *Can. J. Chem.*, **81**, 889–896 (2003).
46. L. Amankwa and L. G. Chatten, *Analyst*, **109**, 57–60 (1984).
47. K. Emara, A. Ali, and N. Maali, *Talanta*, **41**, 639–645 (1994).
48. J. Lenik, C. Wardak, and B. Marczewska, *Acta Pol. Pharm.*, **63**, 239–244 (2006).
49. R.-I. Stefan-van Staden, N. Suzan Nhlapo, J. Frederick van Staden, and H. Y. Aboul-Enein, *Anal. Lett.*, **42**, 764–774 (2009).
50. R.-I. Stefan-van Staden and R. G. Bokretsiion, *Anal. Methods*, **4**, 1492 (2012).



51. Z. Cebula, P. Niedziałkowski, and T. Ossowski, *Special Issue Conference Abstract Book CNS 2018*, **1**, 7–8 (2018).
52. R. Bogdanowicz, P. Niedziałkowski, M. Sobaszek, D. Burnat, W. Białobrzeska, Z. Cebula, P. Sezemsky, M. Koba, V. Stranak, T. Ossowski, and M. Śmietana, *Sensors*, **18**, 1361 (2018).
53. Á. Torrinha, M. Martins, M. Tavares, C. Delerue-Matos, and S. Morais, *Talanta*, **226**, 122111 (2021).

## Aflatoxine

### 1. Introducere

Aflatoxinele sunt micotoxine cancerigene produse de mușcăiurile *Aspergillus*. Au fost dezvoltate metode pentru determinarea aflatoxinelor în probe de praf din aer și urină umană colectate de la fabricile de furaje. Pentru probele de praf din produse agricole precum copra, semințe de bumbac și porumb, au fost dezvoltate metode pentru determinarea aflatoxinelor B1, B2, G1 și G2. Pentru probele de urină, au fost dezvoltate metode pentru analiza celor patru aflatoxine de mai sus care apar în mod natural în praf, precum și pentru metaboliților acestora aflatoxina M1 și Q1.

Au fost descoperite la începutul anilor 1960, datorită unor focare numite boala „curcan X”, când aproximativ 100.000 de curcani au murit în Anglia. Alte animale, cum ar fi rațe, porci și bovine, au fost, de asemenea, afectate.

Sursa considerată responsabilă de boală a fost făina de arahide infectată cu mușcăi, din care a fost izolată o toxină. Toxina a fost identificată ca fiind derivată din matrița mușcăiului *Aspergillus* [1, 2]. Când a fost determinată structura, s-a descoperit că existau patru aflatoxine diferite produse de matriță. Toxinele au fost denumite aflatoxina B1, B2, G1 și G2 din primele litere din toxina *Aspergillus* cu defecte, cu literele B și G din fluorescență în albastru sau verde sub lumină ultravioletă și numărul din ordinea de reținere pe plăci cromatografice cu strat subțire. [3, 4].

De când au fost descoperite aflatoxine la animale, au fost observate mai multe cazuri de otrăvire acută la oameni. Un focar a început în 1974 în mai multe sate din nord-vestul Indiei, unde a fost găsit porumb puternic contaminat ce conținea niveluri de până la 15 mg / kg de aflatoxine [4]. Pe lângă otrăvirea acută, s-a descoperit că aflatoxinele sunt unul dintre factorii de dezvoltare a cancerului la ficat la un număr mare la oameni.

Limitele de detecție a aflatoxinelor din probele de praf au fost în intervalul 1,8-3,1 ng / g folosind detecția fluorescenței.

Aflatoxinele au fost determinate în urină până la niveluri de 6,8-18 pg / ml. În praful de copra și semințe de bumbac contaminat, au fost detectate aflatoxine cu un conținut de 9-50 pg / mg de aflatoxină B1. Nu s-au putut detecta aflatoxine în nicio probă de urină obținută de la lucrătorii fabricii de furaje acestea au fost mai mici de 6,8 pg / ml de aflatoxine B1, B2, G1 și G2 și mai puțin de 18 pg / ml de aflatoxine M1 și Q1[5].

Aflatoxinele sunt o mare problemă care zi de zi devine mai importantă datorită implicației lor în producția de culturi, calitatea alimentelor și sănătatea oamenilor și animalelor. Aflatoxinele sunt, de asemenea, peste tot, deoarece acești metaboliți toxici secundari sunt micotoxinele produse de un număr mare de specii *Aspergillus*, și anume *A. flavus* și *A. parasiticus* principalii producători; totuși, specii precum *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. parvisclerotigenus*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*, *Emericella astellata* și *E. venezue-lensis* sunt și acestea producătoare de aflatoxine [6,7].

Deoarece aceste toxine au fost recunoscute ca fiind o problemă semnificativă la nivel mondial în 1960 (datorită faptului că au fost izolate și identificate ca toxine cauzale în „boala curcan-X” după ce 100.000 de curci au murit în Anglia din cauza necrozei hepatice acute și a hiperplaziei căilor biliare după consumul de arahide infectate cu *Aspergillus flavus* [8-10], cercetătorii au studiat multe modalități de a lupta împotriva acestei amenințări; totuși, după mai bine de jumătate de secol, aflatoxinele sunt încă o mare problemă cu care nu a fost ușor de rezolvat, deoarece oamenii nu sunt capabili să manipuleze factorii esențiali care afectează contaminarea cu aflatoxine, cum ar fi vremea regiunii, genotipul culturilor, tipul de sol, temperaturile zilnice minime și maxime și evaporarea netă zilnică [10].

Aflatoxinele (AF) afectează aproape tot ceea ce mâncăm: cerealele (porumb, grâu și orez în principal) și derivații acestora; semințe oleaginoase (bumbac, arahide, rapiță, nucă de cocos, floarea-soarelui și altele), manioc, nuci, fructe uscate, produse delicate, condimente, vinuri, leguminoase, fructe, lapte și derivate din lapte [11,12] și chiar bomboane de ciocolată. Pentru a găsi o soluție pentru această problemă, unele organizații și instituții au propus strategii de prevenire pentru a reduce riscurile pe care le prezintă această problemă publică în special în țările cu venituri mici, dar aceste strategii nu sunt suficiente pentru a oferi o soluție reală acestei situații la nivel mondial [13].

## 2. Chimia și biosinteza aflatoxinelor

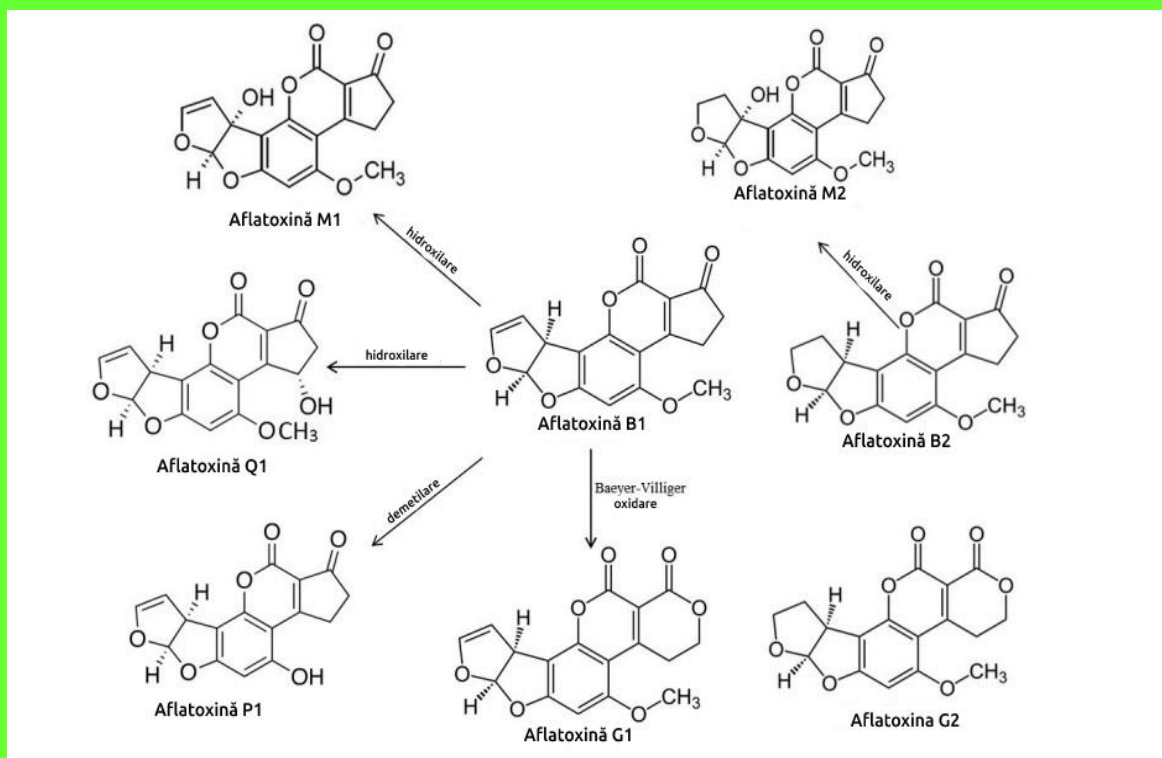
Cele patru aflatoxine majore produse de mușgăi sunt aflatoxinele B1, B2, G1 și G2 [14]. Aceste patru aflatoxine sunt un grup de difuranocumarine cu structuri similare (Figura 1). Aflatoxinele B2 și G2 sunt derivații dihidro ai aflatoxinelor B1 și, respectiv, G1. Legătura dublă a funcției vinil eter a aflatoxinelor B1 și G1 este importantă pentru efectele cancerogene ale aflatoxinelor, așa cum este discutat mai jos și poate fi utilizată pentru derivatizare în mai multe moduri de a spori fluorescența pentru detectare [14].

Aflatoxinele (AF) reprezintă cei mai toxici compuși din micotoxine, având toxicitate mutagenă și carcinogenă și contribuind la cancerul hepatic primar uman, fiind clasificați ca fiind cancerigeni din grupa 1 la om [15,16]. Sunt metaboliți secundari produși de *Aspergillus parasiticus* și *Aspergillus flavus*, care sunt prezenți în sol și în alte materiale organice. Aceste ciuperci pot crește pe fructe uscate (smochine și stafide), pe alune, nuci măcinate, porumb, semințe de bumbac, cafea, cacao, cereale (porumb, grâu, orz, ovăz, orez), floarea soarelui și semințe de soia [17,18].

Au fost identificate șaisprezece aflatoxine, dar sunt analizate doar aflatoxinele B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2) și M1 (AFM1) [39]. *Aspergillus flavus* produce numai aflatoxine B (AFB1 și AFB2), în timp ce *Aspergillus parasiticus* produce aflatoxine B (AFB1, AFB2) și aflatoxine G (AFG1, AFG2) [19,20].

Aflatoxina M1 reprezintă principalul metabolit hidroxilat al AFB1, care poate fi detectat în țesuturile și fluidele animale (urină și lapte). În laptele mamiferelor, aflatoxina M1 poate fi detectată la 12-24 ore după ingestia de alimente sau furaje contaminate cu AFB1, concentrația sa care apare în laptele excretat fiind corelată cu nivelurile de AFB1 găsite în furajele crude [21].

Contaminarea cu AFM1 a apărut și în produsele lactate din laptele de vacă, în special în brânză, chiar și la o concentrație mai mare decât cele găsite în laptele crud. Acest lucru este posibil datorită stabilității AFM1 față de tratamentul de încălzire implicat în procesarea laptelui, care se leagă bine de cazeină [21,22]. Aflatoxinele au fost denumite B și G pe baza culorilor lor de fluorescență la lumină ultravioletă (UV, 365 nm), AFB1 și AFB2 produc o culoare albastră, în timp ce AFG1 și AFG2 verde. Sunt derivați difuranocumarini, cu greutate moleculară mică, care sunt solubili în solvenți, cum ar fi metanol, cloroform și acetonitril, având un spectru larg de toxicitate. Structurile lor chimice sunt desenate în Figura 1.



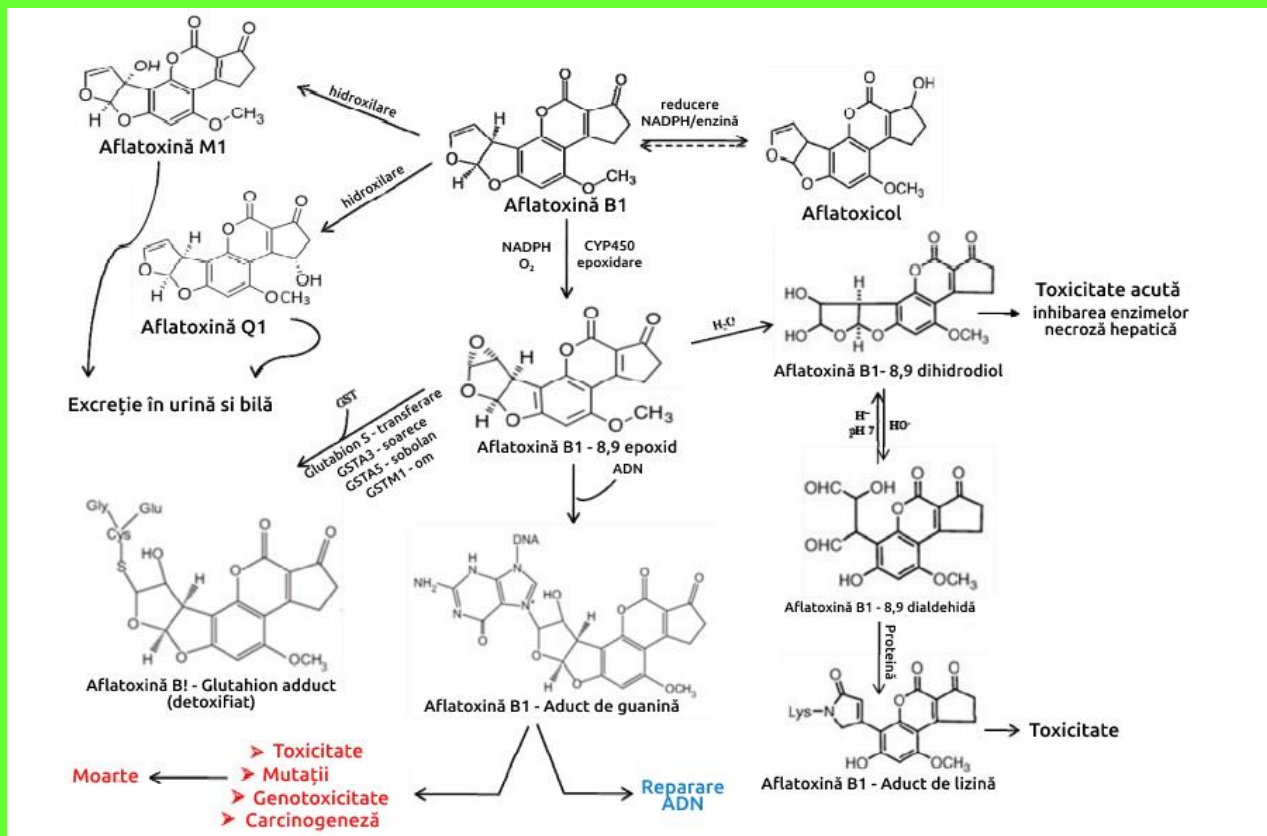
**Figura 1.** Structuri chimice ale aflatoxinelor și metabolizii acestora [19].

Aflatoxinele sunt instabile la lumina UV, dar foarte stabile la tratamentele termice (de exemplu, coacerea, pasteurizarea, prăjirea) [23]. Aceste micotoxine pot induce unele tipuri de cancer, hipoglicemie și niveluri crescute ale transaminazelor serice, considerându-se că aflatoxinele sunt molecule lipofile și niveluri crescute ale transaminazelor serice, considerându-se că aflatoxinele sunt molecule lipofile care sunt transportate de fluxul sanguin și depozitate în hepatocite [24]. După ingestie, biodegradarea AFB1 are loc în ficat, într-un sistem enzimatic care implică citocromul microsomal hepatic P450.

Metabolitul hidroxilat-AFB1 rezultat din oxidarea și demetilarea AFB1 este considerat a fi foarte toxic, cu efecte mutagene și cancerigene [20,23,24]. O reprezentare schematică a metabolismului aflatoxinei B1 și a formării aductului este prezentată în Figura 2. Forma epoxidică a aflatoxinei B1 (AFBO), se leagă de obicei la proteine, la ADN și ARN, la poziția bazei de guanină în celulele hepatice, modificând codul genetic care asigură creșterea celulelor în cele mai active țesuturi (ficat, intestin și măduvă osoasă) și, prin urmare, duce la apariția mutațiilor genetice și în continuare la cancer [25,26].

Reducerea aflatoxinei B1 de către citosolica reductază duce la formarea aflatoxinei, un produs de detoxifiere care poate fi reoxidat înapoi la aflatoxina B1 de către o dehidrogenază microsomală, crescând astfel timpul de înjumătățire fiziologic al AFB1 [27]. Alte aflatoxine naturale și metabolizii lor hidroxilați nu sunt implicați în reacțiile de epoxidare și, prin urmare, sunt considerați a fi mai puțin mutageni și

cancerigeni. Unii dintre acești metaboliți sunt excretați în urina indivizilor contaminați, acesta fiind folosit ca indicator al expunerii individuale la aflatoxina B [25].



**Figura 2.** Biodegradarea aflatoxinei B1 prin căi metabolice. ADN = acid dezoxiribonucleic. NADPH = fosfat de nicotinamidă adenină dinucleotidică. CYP450 = citocromul P450. GST = glutation-S-transferază. s [25,26].

Până în prezent, aflatoxina B1, care se găsește într-o concentrație ridicată în alimente și hrana contaminate a animalelor, este considerată a fi cel mai toxic compus dintre aflatoxine. Nivelul și durata expunerii la AFB1 sunt factori determinanți pentru efectele toxice ale acestei micotoxine.

Se consideră că doza sa letală (LD50) pentru majoritatea speciilor variază de la 1 la 50 mg / kg, cu un nivel critic de toxicitate mai mic de 1 mg / kg pentru unele specii foarte sensibile, cum ar fi păsările de curte, păstrăvul curcubeu și șobolanii [29].

La om, consumul de alimente contaminate cu aflatoxine a fost legat de diferite boli, cum ar fi cancerul de ficat, encefalopatia, fibroza interstițială pulmonară și efectele asupra sistemului reproductiv și imunitar [28]. Incidența carcinomului hepatocelular este direct legată de consumul de aflatoxine din dietă, cu toate acestea, o cuantificare a expunerii individuale pe viață este foarte dificil de prezis. Cancerul de ficat reprezintă cel mai frecvent tip de cancer din Thailanda, China, Filipine și multe țări africane, incidența acestei boli variind de la o țară la alta [20,30,31].

## 2.1. Aflatoxina M1

Aflatoxina M1 (AFM1) reprezintă principalul metabolit hidroxilat al AFB1, biotransformat în ficat și excretat în laptele produs de glandele mamare ale oamenilor și animalelor care alăptează, hrănit cu

alimente contaminate cu AFB1 [29]. Datorită stabilității ridicate a AFM1 față de tehnologiile de prelucrare a laptelui, cum ar fi pasteurizarea și încălzirea ultra-ridicată a temperaturii (UHT), precum și a altor metode de prelucrare a produselor lactate, această micotoxină se găsește nu numai în lapte, ci și în produsele lactate, de obicei la o concentrație mai mare decât cea găsită în laptele crud [32].

Deoarece laptele, care conține proteine, vitamine, minerale și acizi grași, este cel mai frecvent nutrient, în special pentru sugari și copii, prezența AFM1 în lapte și produse lactate reprezintă un factor important de risc pentru sănătate. Apariția AFM1 în laptele matern uman, laptele și produsele lactate prezintă o preocupare reală pentru sănătatea publică, în special pentru sugari și copii mici.

Se consideră că sugarii sunt mai expuși la contaminarea cu AFM1 prin ingestia de lapte matern decât cea utilizând formulele pentru sugari [33]. Astfel, un nivel maxim de AFM1 în formula de lapte pentru sugari a fost stabilit la 0,025 μg / kg prin Regulamentul Comisiei Europene (UE 165/2010), dar prezența AFM1 în laptele matern uman nu este încă limitată. S-a observat că AFM1 poate fi detectat în laptele mamiferelor care alăptează după 12 ore, cu un vârf al concentrației la 24 de ore de la ingestia alimentelor contaminate cu AFB1.

Pe parcursul a 72 de ore de la oprirea aportului de alimente contaminate cu AFB1, s-a observat o scădere a concentrației AFM1 la niveluri nedetectabile [34]. Datorită caracteristicilor sale semi-polare, AFM1 se leagă puternic de cazeină, o fosfoproteină găsită în lapte. Inactivarea AFM1 este dificil de realizat, observându-se că prelucrarea laptelui a indus efecte dramatice asupra concentrației AFM1 [35].

Chiar dacă AFM1 este considerat a fi mai puțin mutagen și cancerigen decât AFB1, citotoxicitatea sa a fost studiată in vitro utilizând microzomi hepatici umani și linia celulară umană care exprimă sau nu exprimă enzimele citocromului P450 uman. Aceste experimente au demonstrat un potențial toxic ridicat al AFM1 în absența activării metabolice, comparativ cu AFB1 [36].

Astfel, luând în considerare efectul toxic al AFM1, prin mutația genei care provoacă daune ADN-ului, anomalii cromozomiale și transformarea celulelor [21], Agenția Internațională pentru Cercetarea Cancerului a modificat clasificarea acestei aflatoxine în 2002 din Grupul 2B în Grupul 1 [37].

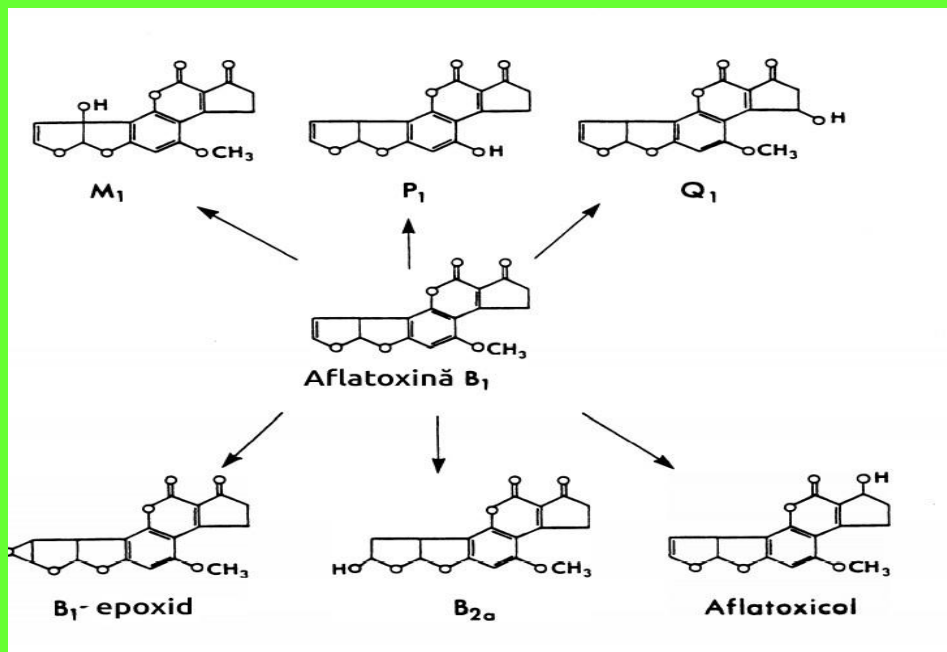
Ca rezultat al tuturor acestor lucruri, diferite tehnici analitice pentru detectarea și cuantificarea aflatoxinelor au fost dezvoltate și raportate în literatura de specialitate, cum ar fi cromatografia, absorbția UV, spectrometria, fluorescența și testele imunochimice.

Alegerea metodei analitice trebuie să ia în considerare diferite aspecte pentru detectarea acestor micotoxine, cum ar fi molecula țintă, matricea complexă, caracteristicile chimice, timpul de analiză și că limitele de detectare sau / și cuantificare trebuie să fie sub limitele specifice de reglementare. În plus, această revizuire va evidenția punctele tari și punctele slabe ale diferitelor metode analitice dezvoltate și raportate în ultima perioadă pentru detectarea și cuantificarea AFM1 în lapte și produse lactate ca o necesitate pentru monitorizarea și controlul siguranței alimentare [37].

### **3. Mecanismul toxicității aflatoxinelor și efectelor lor asupra sănătății**

Aflatoxinele sunt compuși toxici și cancerigeni și au demonstrat acțiune mutagenă în sisteme de testare in vitro [38]. Aflatoxina Bi, aflatoxina cea mai studiată, sa dovedit a fi transformată în mai mulți metaboliți prin căi de biotransformare, după cum a analizat Eaton et al. [39]. Principalii metaboliți care au fost găsiți la diferite specii sunt prezentați în Figura 3, deși nu toți metaboliții au fost găsiți la oameni.



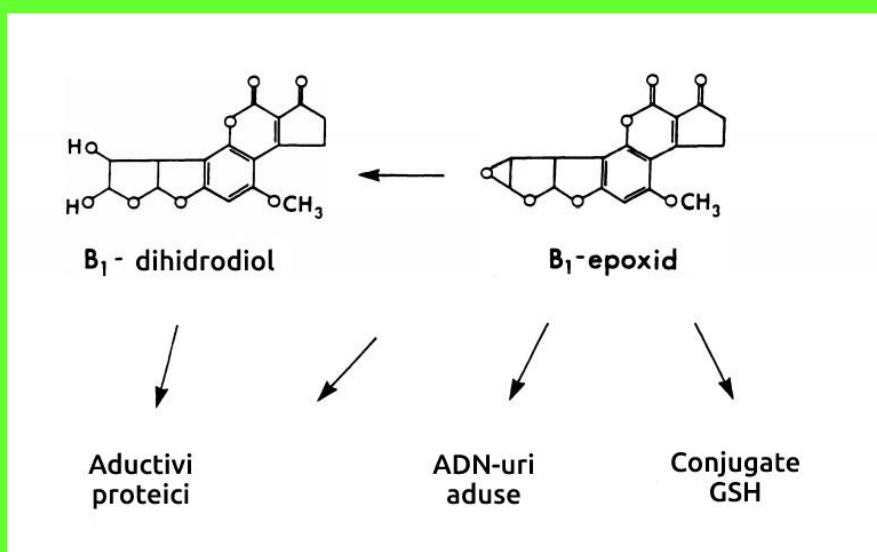


**Figura 3.** Biotransformări ale aflatoxinei B<sub>1</sub>[39]

Prin acțiunea enzimelor citocromului P-450, aflatoxinele hidroxilite M<sub>1</sub>, P<sub>1</sub> și Q<sub>1</sub> se formează din aflatoxina B<sub>1</sub>. Acestea sunt considerate produse de detoxifiere, deoarece sunt mai puțin cancerigene decât aflatoxina B<sub>1</sub>. Aflatoxinele hidroxilite formează cu ușurință conjugate de glucuronid și sulfat. Acești conjugăți sunt solubili în apă și sunt excretați în urină sau bilă împreună cu aflatoxine neconjugate ca aflatoxină M<sub>1</sub> [40].

Alți metaboliți transformați din aflatoxina B<sub>1</sub> sunt aflatoxina de către o reductază citosolică, aflatoxina B, care poate fi formată din acizi, și aflatoxina B<sub>1</sub> 8,9-epoxid formată din enzime P-450. Aflatoxina B<sub>1</sub> își obține efectul cancerigen prin conversia în aflatoxină B<sub>1</sub>-8,9-epoxid de enzimele citocromului P-450 și poate reacționa apoi cu ADN în poziția N-7 a guaninei sau obține un efect toxic prin formarea de aductivi proteici.

Prin reacția cu glutation (GSH), aflatoxina poate fi excretată din organism și, prin urmare, este considerată o cale de detoxifiere a aflatoxinei B<sub>1</sub>-8,9-epoxid. Prin hidroliza aflatoxinei B<sub>1</sub>-8,9-epoxid se formează aflatoxina-8,9-dihidrodiol, care poate forma aducti proteici prin reacția cu lizina. Aceste căi sunt prezentate în Figura 4.





**Figura 4.** Căi metabolice pentru aflatoxina B1-8,9-epoxid [39,41]

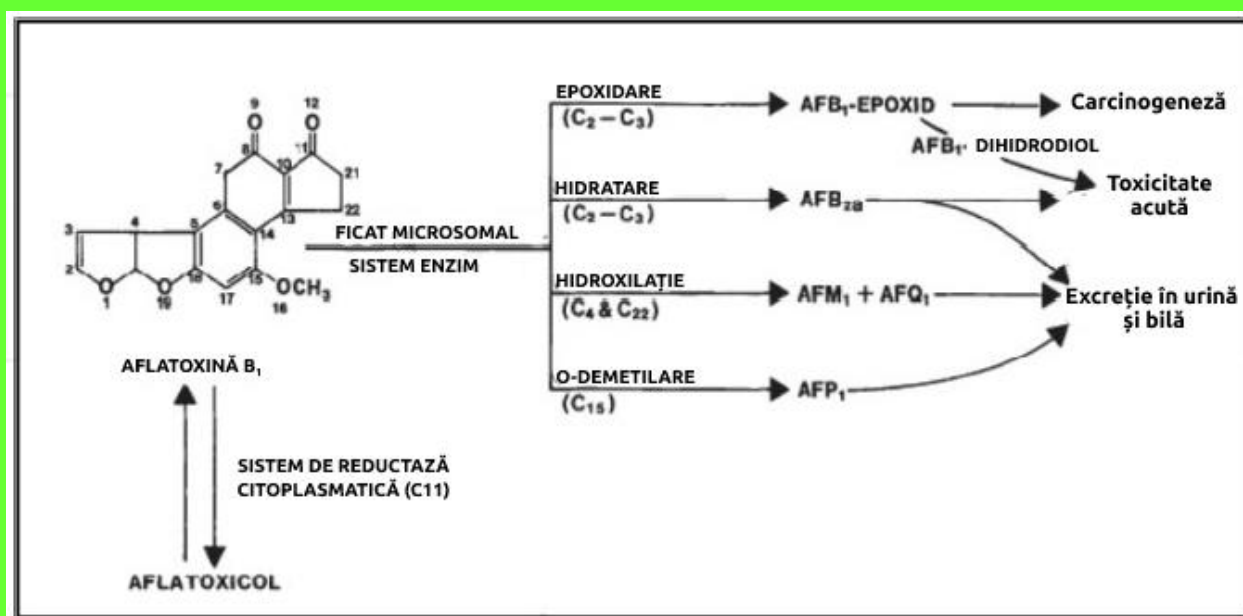
Efectele cancerigene și toxice ale aflatoxinei B1 sunt considerate a depinde de concurența dintre aceste căi metabolice diferite, deoarece unele căi activează aflatoxina la un epoxid reactiv, iar altele dezactivează aflatoxina.

Aflatoxina B1 este cea mai toxică dintre cele patru, iar cele mai multe cercetări s-au concentrat asupra acestei aflatoxine. Dar toate cele patru aflatoxine s-au dovedit a fi acut toxice, măsurate ca valori LDS, la diferite specii. La rațe, valorile LD50 pentru aflatoxinele B1, B2, G1 și G2 au fost de 0,36, 0,78, 1,70 și respectiv 3,44 mg / kg [41]. Deoarece aflatoxina B1 (Figura 2) poate fi activată la un epoxid și formează aducti ADN, se presupune, de asemenea, că este cancerigenă.

Alte aflatoxine, cum ar fi aflatoxina B2, care este derivatul dihidro al aflatoxinei B1, dau un aduct ADN identic cu cel al aflatoxinei B1. O ipoteză este astfel că aflatoxina B2 poate fi convertită în aflatoxină B1 [6], se consideră că principala cale de expunere la aflatoxine este ingestia de alimente contaminate cu aflatoxine.

Atenția sa concentrat în principal asupra cauzării cancerului hepatic de către aflatoxine, deoarece aflatoxina B1 poate fi metabolizată și activată în acest organ.

În plus față de expunerea prin dietă, alte căi de expunere, cum ar fi inhalarea prafului încărcat de aflatoxine, pot prezenta un risc de a provoca alte tipuri de cancer decât cancerul hepatic, cum ar fi cancerul respirator. În studiile epidemiologice, s-a observat o creștere a incidenței cancerului hepatic în rândul lucrătorilor din fabricile de furaje din Danemarca [42] și al lucrătorilor la fabricile de cereale din Suedia [43] și cancerul respirator în rândul lucrătorilor olandezi din presa de ulei [44].



**Figura 5.** Metabolizarea aflatoxinei în ficat [46, 47]

După absorbție, cea mai mare concentrație de toxină se găsește în ficat [45]. Odată ajuns în ficat, aflatoxina B1 este metabolizată de enzimele microsomale citocromul P-450 3A4 în metaboliți diferiți prin hidroxilare, hidratare, demetilare și epoxidare. Variațiile activității sale catalitice ale P-450 3A4 sunt importante în probleme de biodisponibilitate și interacțiuni medicamentoase [46].

La fel ca în Fig. (5) hidroxilarea AFB1 la C4 sau C22 produce, respectiv AFM1 și AFQ1. Hidratarea legăturii duble C2 - C3 are ca rezultat formarea AFB2a care se formează rapid la anumite specii aviare [46].

AFP1 rezultă din O-demetilare în timp ce epoxidul AFB1 se formează prin epoxidare la legătura dublă 2,3 Aflatoxicolul este singurul metabolit al AFB1 produs de un sistem enzimatic citoplasmatic reductază solubilă [47].

Producătorii de carne de păsări crescute la sol, carne de porc precum și procesatorii de produse lactate recunosc că prezența aflatoxinelor în furaje este unul dintre principalii factori care afectează producția animală.

Ca urmare a prețurilor mai ridicate ale ingredientelor furajere, calitatea acestora se înrăutățește, unele boabe prezentând niveluri tot mai ridicate de aflatoxine. Niveluri ridicate de contaminare pot fi găsite și în boabele de distilare, un ingredient în creșterea ofertei, provenite din utilizarea porumbului în producția de etanol din SUA. Unii producători consideră că micotoxinele devin la fel de importante ca bolile bacteriene și virale.

Această atitudine reprezintă o abordare complet diferită a importanței acordate aflatoxinelor în 1987.

În acea perioadă, majoritatea cultivatorilor considerau că aflatoxinele nu reprezentau o problemă serioasă. Ar trebui să subliniem că în prezent există încă unii producători care confundă micotoxicoza cu bolile virale și bacteriene.

O parte din această problemă se datorează lipsei accesului la bune tehnici de diagnostic precum histopatologia, un instrument excelent pentru confirmarea diagnosticului. Este important să subliniem că, ca parte a evaluării primilor absorbantți, un factor cheie în această evaluare a fost demonstrarea protecției organelor țintă. Pe piața de astăzi, există un aflux de produse care se pretind a fi eficiente în controlul efectelor dăunătoare cauzate de aflatoxine.

Unele dintre aceste produse își bazează eficacitatea pe campanii de marketing fără a prezenta rezultate in vitro și / sau in vivo pentru a-și susține afirmațiile. Unii își bazează eficacitatea numai pe teste in vitro sau pe un efect pozitiv asupra performanței (adesea fără diferențe semnificative statistice), iar alții pe o anumită îmbunătățire a răspunsului imun. Uneori, aceste efecte pozitive sunt obținute datorită prezenței drojdiei, bacteriilor benefice, enzimelor și / sau imuno-modulatorilor care sunt adăugați absorbantților micotoxinelor.

Aceste ingrediente acționează pentru a atenua efectele secundare cauzate de aflatoxine, dar au un efect redus sau deloc asupra organelor țintă. Din păcate, puține produse pe piața globală au o eficacitate dovedită asupra principalelor organe țintă afectate de micotoxine împotriva cărora sunt testate. În ultimii 2 ani, guvernul brazilian a adoptat o abordare științifică pentru aprobarea lianților micotoxinici prin evaluarea prezenței sau absenței unui efect semnificativ statistic asupra organelor țintă. LAMIC (Laboratorio de Analisis Micotoxicologicos), sub îndrumarea dr. Carlos Mallmann, este un laborator cheie responsabil de acest tip de test.

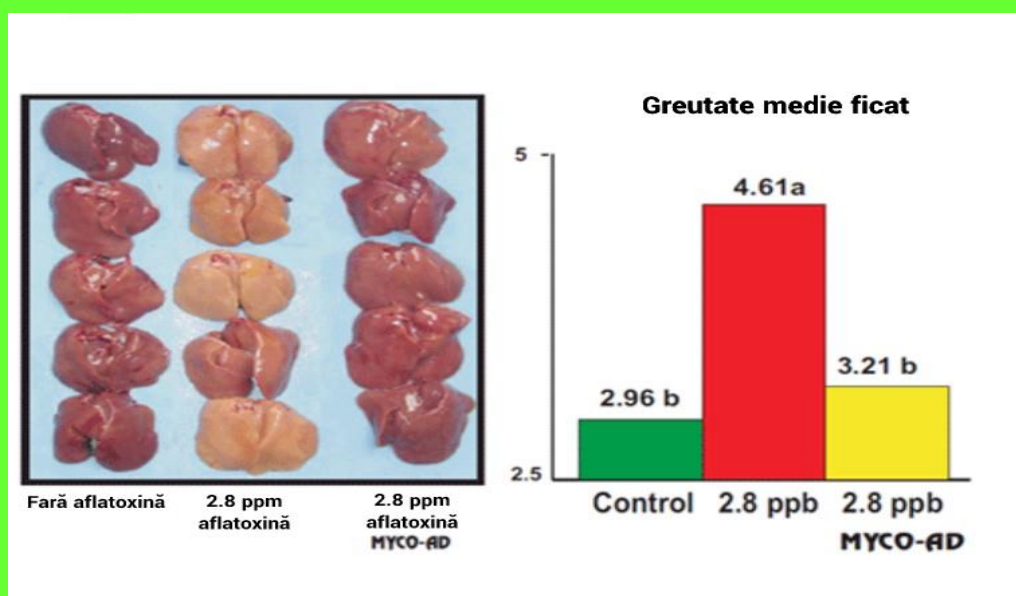
Până în prezent, puține produse au trecut acest test strict (majoritatea pentru aflatoxină) care trebuie repetat la fiecare doi ani, pentru a demonstra că produsul își menține eficacitatea. Ca urmare a acestei noi abordări a guvernului brazilian, companiile sunt obligate să-și testeze produsele la LAMIC, care acum a devenit unul dintre laboratoarele de referință de top din lume. Dacă o companie susține în campania sa de marketing că oricare dintre produsele sale au fost testate de LAMIC, nu înseamnă că absorbantul a fost aprobat.

Uneori rezultatele obținute arată o îmbunătățire a performanței, dar nu este neapărat legată de protecția organelor țintă. Dacă un produs indică sau sugerează o aprobare LAMIC, este foarte recomandabil să solicitați studiul original și să căutați la sfârșitul acestuia o declarație scrisă în portugheză care să indice că produsul este aprobat pentru o perioadă de 2 ani.

Puține produse au studii științifice care arată un efect pozitiv asupra organelor țintă pentru a-și susține afirmațiile. De exemplu efectul produsului MYCO-AD, care arată un efect pozitiv asupra ficatului și dimensiunii broilerilor hrăniți cu 2,8 ppm de aflatoxină obținut în baza mai multor cercetări ale unor universități independente și centre de cercetare din întreaga lume este prezentat în figura 6 respectiv figura 7.



**Figura 6.** Efectul MYCO-AD asupra dimensiunii broilerilor hrăniți cu 2,8 ppm de aflatoxină [48]



**Figura 7.** Efectul MYCO-AD asupra ficatului broilerilor hrăniți cu 2,8 ppm de aflatoxină [48]

Experimentele efectuate pentru a demonstra suspiciunea că aflatoxinele pot fi responsabile de cancerul respirator au arătat că aflatoxina B1 poate fi activată în țesuturile extrahepatice, de exemplu, în celulele din căile respiratorii superioare la animale [49, 50].

Deoarece aflatoxina B1 poate fi metabolizată în sistemul respirator, există riscul de cancer respirator. Unele dintre ele au efecte neurotoxice, observându-se că prezența lor în cantități mici poate provoca tremurături la animale, în timp ce cantități mari pot provoca leziuni ale creierului sau chiar moarte [51].

S-a demonstrat că expunerea pe termen lung la doze mici de aflatoxine poate induce cancer, în special la ficat și rinichi [51-53]. Tabelul 1 rezumă efectele observate asupra oamenilor și animalelor din cauza contaminării cu aflatoxină [52-54].

**Tabel 1.** Simptomele și efectele prezente la oameni și animale prin contaminarea cu aflatoxine [52-54]

Sistem	Vascular	Digestiv	Respirat o	Nervos	Piele	Reproductiv și excretor
<b>Simptome / Efecte</b>	Fragilitate crescută a vaselor de sânge	Vărsături Hemoragi intestinală	Respirații scurte	Tremur / Lipsă de coordonare	Iritare	Infertilitatea
	Hemoragie internă la mucoase și plămâni	Necroză hepatică	Sângerarea plămânilor	Depresie	Senzatie arzătoare	Nefrotoxicitate
		Distrugerea membranei mucoase		Durere de cap	Fotosensibilitate	

### 3.1. Apariția aflatoxinelor

Aflatoxinele sunt produse de *Aspergillus flavus* și *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxinele sunt metaboliți secundari produși de aceste specii. Nivelurile de aflatoxine produse variază între diferite tulpini ale matrițelor și în interiorul matriței, adică între conidii și sclerotie.

S-a constatat că unele tulpini de *Aspergillus flavus* produc niveluri de 97 400 ng / g de aflatoxină B1 în conidii, în timp ce în alte tulpini au fost detectate numai niveluri scăzute sau nu s-au detectat aflatoxine [54]. În consecință, apariția mucegaiurilor *Aspergillus* nu indică automat prezența aflatoxinelor. Mai mulți factori de mediu, cum ar fi temperatura, activitatea apei (aw), intensitatea luminii, pH-ul și gazele atmosferice, influențează producția de aflatoxine de către matrițe [55]. Dintre acești factori, temperatura și activitatea apei s-au dovedit a fi cele mai importante pentru producerea de aflatoxine. Temperatura optimă pentru producerea de aflatoxine este cuprinsă între 25 ° C și 30 ° C, dar aflatoxinele mai pot fi produse la temperaturi de până la 15 ° C.

Activitatea optimă a apei, adică raportul dintre presiunea vaporilor de apă a substratului și presiunea vaporilor apei pure la aceeași temperatură și presiune, este de 0,95 la 0,99. Producția de aflatoxină scade la valori aw sub 0,85, chiar dacă creșterea fungică poate continua fără producția de aflatoxine până la o valoare aw de 0,78.

Factorii biologici, cum ar fi tipul de substrat, agenții antifungici și tipul speciilor de mucegai, sunt, de asemenea, importanți pentru producerea de aflatoxine. Deteriorarea culturilor, fie mecanic, fie de către

insecte, s-a dovedit a fi un alt factor important în dezvoltarea infecțiilor cu mucegai. Odată ce un produs a fost contaminat cu aflatoxine, acestea nu dispar chiar dacă creșterea mucegaiului a fost întreruptă.

Deși aflatoxinele pot fi produse într-o varietate de materiale, ele apar mai ales în arahide, semințe de bumbac și porumb [56]. În consecință, majoritatea studiilor privind producția de aflatoxine s-au concentrat pe aceste produse. Se știe că producția de aflatoxine poate începe în etapa pre-recoltare și apoi poate continua în timpul recoltării, uscării, depozitării și prelucrării. Alte produse în care se pot detecta aflatoxine sunt copra [57] și condimentele [58].

Ouăle și laptele pot fi contaminate indirect cu aflatoxine de către animalele hrănite cu furaje care conțin aflatoxine. Aflatoxinele au fost detectate în cea mai mare parte în produsele cultivate în zone tropicale sau semitropicale, dar au apărut în furaje, la niveluri de peste 400 ng / g, stocate prin tratament acid în Suedia [59]. Vacile hrănite cu furaje contaminate cu aflatoxină au dat lapte care conține aflatoxină M<sub>1</sub> la niveluri de peste 50 pg / g. Organizația pentru Alimentație și Agricultură (FAO) este responsabilă pentru evaluarea contaminării legate de micotoxină [60].

În Uniunea Europeană (UE), contaminarea alimentelor cu mai multe micotoxine este evaluată de Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA), care a stabilit limite maxime admise pentru aflatoxine (AF), ochratoxină A (OTA) și patulină (PAT) (UE) Regulamentul 466/2001) (Comisia Europeană, 2001) [61]. Tabelul 2 evidențiază cele mai importante aflatoxine, ciupercile care le produc, grupul de cancerigenitate al acestora, precum și alimentele și furajele contaminate și limitele maxime admisibile (ML) pentru acești compuși, date de SUA-FDA și UE (EC2006) [ 62].

**Tabelul 2.** Cele mai frecvente aflatoxine toxicitatea și limitele lor în alimente și furaje [62]

Micotoxină	Sursa fungică	Grup de toxicitate	Alimente contaminate	ML-SUA-FDA (μ g / kg)	ML-UE-EFSA
Aflatoxine (B1 , B2, G1, G2)	Aspergillus flavus Aspergillus parasiticus	1	Grâu, porumb, orez, arahide, fistic, migdale, alune, nuci macinate, nuci, smochine, semințe de bumbac	20	4-10 pentru total 2-5 pentru B10, 1 pentru B1 în alimentele pentru copii
Aflatoxină M <sub>1</sub>	Metabolit al aflatoxinei B1	2B	Lapte și produse lactate	0,5	0,05 0,025 lapte pentru bebeluși

Limita admisibilă a aflatoxinei în alimentele destinate consumului uman este de 4-30 ppb, în funcție de țara implicată [63]. În Statele Unite, 20 ppb este limita maximă de reziduuri aflatoxine admise în alimentele destinate consumului uman [64].

**Tabel 3.** Niveluri maxime de risc de acceptare a contaminării totale cu aflatoxine de către diferite țări și organizații [65]

Niveluri maxime de risc de acceptare a contaminării totale cu aflatoxine de către diferite țări și organizații	
Tară/Organizație	Limita maximă de risc in ppb
Uniunea Europeană	4
USA	20
RSA	15
Japonia	0
Codex Alimentarius Commission	15

#### 4. Metode moderne de determinare a aflatoxinelor

Detectarea și cuantificarea aflatoxinei din alimente și furaje este un aspect foarte important al problemelor de siguranță. Aflatoxinele sunt de obicei detectate și identificate în funcție de spectrele lor de absorbție și emisie, absorbția maximă având loc la 360 nm.

Toxinele B prezintă fluorescență albastră la 425 nm, în timp ce toxinele G prezintă fluorescență verde la 540 nm sub iradiere UV. Acest fenomen de fluorescență este larg acceptat pentru aflatoxine.

Cromatografia în strat subțire (TLC) este una dintre cele mai vechi tehnici utilizate pentru detectarea aflatoxinelor [66], în timp ce cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), cromatografia lichidă-spectroscopia de masă (LCMS) și testul imun-sorbent legat de enzime (ELISA) sunt metodele cele mai frecvent utilizate pentru detectarea acestuia [67,68].

ELISA poate fi utilizat pentru identificarea aflatoxinelor pe baza estimării concentrației de AfB1-lizină (metabolit al toxinei AFB1) în sânge. Mai exact, testul detectează niveluri de AfB1 în sânge de până la 5 pg / mg de albumină, făcându-l o metodă rentabilă pentru monitorizarea de rutină care poate fi utilizată și pentru detectarea virusului hepatitei B.

Fosforescența la temperatura camerei (RTP) în tulpinile aflatoxigenice cultivate pe mediu este frecvent utilizată în micologia alimentară. Aflatoxinele imobilizate pe perle de rășină pot induce RTP în prezența sau absența oxigenului și a atomilor grei [69,70] și au, de asemenea, sensibilitate și specificitate ridicate [70].

Mai mult, s-au dezvoltat mai mulți senzori și imunoanalize pentru a detecta ultra-urme de aflatoxine pentru a asigura siguranța alimentelor.

**Tabelul 4.** Determinarea aflatoxinei M1 prin diverse metode [71-79]

Nr	Metoda de cuantificare / Detector	Limita de detectare / Eșantion
1	Cromatografie în strat subțire cu detector de fluorescență (TLC-FD)	100 (lapte praf fără grăsimi) 5 (lapte) 100 (ficat de vită) 12.5 (lapte și produse lactate) 1-15 (brânză)



2	Cromatografie lichidă de înaltă performanță cu detector de fluorescență (HPLC-FD)	5–35 (lapte crud) 0,01-5 (brânză) 600 (brânză albă și albastră)
3	Cromatografie lichidă de înaltă performanță cu spectrometrie de masă (HPLC-MS / MS)	50 (lapte) 0,59 (lapte integral) 0,66 (lapte cu conținut scăzut de grăsimi)
4	Cromatografie lichidă cu detector de fluorescență (LC-FD)	0,3 (produse lactate) 0,8 (lapte matern uman)
5	Spectrometrie de masă tandem prin cromatografie lichidă (LC-MS / MS)	4 (lapte bovin) 0,83 (lapte praf)
6	Cromatografie lichidă de înaltă performanță prin Ionizare Electrospray cu spectrometrie de masă tandem (UHPL-ESI / MS)	1 (lapte praf) 2 (lapte lichid)
7	Test imunosorbent legat de enzime / lichid de înaltă performanță Detector de cromatografie-fluorescență (ELISA / HPLC-FD)	0–13.58 (ELISA în laptele matern uman) 13.58 (HPLC) > 50 (ELISA) 2 (HPLC în lapte) 4–31 / 50 (lapte de bivoli și vacă)
8	Test imunosorbent legat de enzime / cromatografie lichidă de înaltă performanță-lichid Cromatografie Spectrometrie de masă tandem (ELISA / HPLC-LC-MS)	1.3–6.22 (ELISA) 62,9 (LC-MS în laptele crud și UHT)
9	Test imunosorbent legat de enzime (ELISA)	70,6–770,97 (brânză)
10	Electro chimioluminiscent-imunoanaliză	0,3 (lapte)
11	Fluoro-imunoanaliză rezolvată în timp (TRFIA)	0,188 (lapte)
12	Test de imunotest injecție secvențială (SIIA)	200 (lapte)
13	Detecrie electrochimică cu membrane lipidice cu două straturi (ECS-BLMs)	761 (lapte degresat)
14	ELISA-SPE (electrozi serigrafiați)	25 (lapte)
15	Imunotest de injecție de flux	11 (lapte crud)
16	Imunotest enzimatic chimiluminiscent direct	1 (lapte)
17	Imunocip	240 (adăugat în apă potabilă)

În ultimii ani, odată cu dezvoltarea rapidă a nanotehnologiei, au fost proiectate și pregătite o varietate de nanomateriale cu funcții speciale. Nanomaterialele sunt acele materiale care au cel puțin o dimensiune pe scara nanometrului (0,1–100 nm) în spațiul tridimensional.

Descoperirea nanomaterialelor marchează un mare pas înainte în domeniul explorării lumii microcosmice și promovează progresul analizei chimice, iar nanomaterialele se bucură de reputația de „cele mai promițătoare materiale din secolul XXI”.

Datorită structurii lor speciale, nanomaterialele au un efect de suprafață bun, o reactivitate ridicată și un efect de dimensiuni reduse și prezintă multe caracteristici utile în ceea ce privește proprietățile catalitice, electrochimice, termice și optice. Prin urmare, nanoparticulele vor avea perspective largi de aplicare în industria chimică, științele vieții, protecția mediului și alte domenii.

Pentru a îmbunătăți în continuare sensibilitatea și simplitatea analizei și detectării aflatoxinelor, sunt utilizate mai multe tipuri de nanomateriale, cum ar fi nanomaterialele metalice, nanomaterialele de carbon, oxidul metalic și nanomaterialele de hidroxid.

Proprietățile acestor nanomateriale și aplicațiile lor în detectarea aflatoxinelor sunt introduse și discutate Tabelul 5. Când scara materialelor este redusă la nivelul nanometrului, nanomaterialele pot prezenta multe proprietăți unice, iar combinația lor cu senzori va fi de așteptat să îmbunătățească în continuare performanța senzorilor electrochimici.

Prin urmare, dezvoltarea de nanomateriale ca un nou tip de senzor a fost favorizată de mulți cercetători.

Utilizarea nanomaterialelor poate ajuta la îmbunătățirea sensibilității senzorilor și la scurtarea timpului de pregătire a probei și de detectare experimentală; prin urmare, nanomaterialele sunt studiate profund și utilizate pe scară largă în detectarea cantitativă a aflatoxinelor.

În plus, se introduce și progresul cercetării privind combinația de nanomateriale și senzori pentru detectarea aflatoxinelor. Limitările și provocările viitoare ale tehnologiei de detectare a nanomaterialelor sunt, de asemenea, discutate [80].

**Tabel 5.** Diferite nanomateriale utilizate pentru detectarea aflatoxinelor [80]

Tipul de nanomateriale / PN	Proprietăți	Țintă	Semnal de detectare	Gama liniară	LOD	Mostră reală
Nanomateriale metalice	Coeficienți mari de dispariție, Bună stabilitate și conductivitate, Performanță fotoelectrică bună,	AF	Semnal electrochimic	0,5-20 ng / ml	0,09 ng / ml	Porumb
		B1		20-60 ng / ml		
	AuNPs	Bună biocompatibilitate, Suprafață specifică ridicată,	AF	Semnal electrochimic	0,1-12 ng / ml	0,1 ng / ml
AuNPs		B1	1-8 ng / ml		0,16 ng / ml	

		Ușor de modificat.				
Oxizi metalici și hidroxizi	AuNPs	AF B1	Semnal electrochimic	-	$1,0 \times 10^{-15}$ mol / L	Arahi de, orez, lapte, făină, soia
	AuNPs	AF B1	Semnal electrochimic	100 ng / mL – 1 pg / mL	6,9 pg / ml	Arahi de
	AuNPs	AF M1	Semnal colorimetric	2–600 ng / L	0,9 ng / L	Lapte , ser
	GNR- uri	AF B1	Semnal electrochimic	0,5-20 ng / ml	0,16 ng / ml	Arahi de
	ITO	AF B1	Semnal electrochimic	0,125-1,5 ng / ml	0,15 ng / ml	-
	Sm 2 O 3 nanoro ds	AF B1	Semnal electrochimic	10–700 pg / ml	57,82 pg mL <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	-
	Fe 3 O 4 nanop articule	AF B1	Semnal electrochimic	0,05-5 ng / mL	0,07 ng / ml	Alime nte
	CNTs	AF M1	Semnal de electrochilumi niscență	$1,0 \cdot 10^{-5}$ x 10 <sup>5</sup> pg / ml	0,3 pg / ml	Lapte
	CNTs	AF B1	Semnal electrochimic	0,05-25 ng / ml	0,03 ng / ml	Orez
	c- MWC NTs	AF B1	Semnal electrochimic	0,25- 1,375 ng / mL	0,08 ng / ml	-
Nanomater iale de carbon	SWCN Ts	AF B1	Semnal electrochimic	0,01–100 ng / mL	3,5 pg / ml	Făină de poru mb
	MWC NTs	AF B1	Semnal electrochimic	0,1-10 ng / ml	0,03 ng / ml	Ulei de masli ne
	MWC N	AF B1	Semnal electrochimic	$3,2 \times 10^{-9}$ – $721 \times 10^{-9}$	$1,6 \times 10^{-9}$ mol /	-

				mol / L	L		
Alte nanomateriale	MWCNTs		AF B1	Semnal electrochimic	$1 \times 10^{-10}$ – $1 \times 10^{-5}$ mol / L	0,03 nmol / L	Ulei de rapita, ulei reciclat
	GO	Nanomateriale bidimensionale de carbon,	AF B1	Semnal electrochimic	0,5-5 ng / ml	0,23 ng / ml	-
	GO	Proprietăți optice și electrice excelente,	AF M1	Semnal de electrochiluminiscentă	5-150 ng / mL	0,01 ng / ml	Lapte
	rGO	Suprafață mare, Rezistență și rezistență ridicate,	AF B1	Semnal electrochimic	10 fg / mL – 10 pg / mL	10 fg / ml	-
	rGO	Performanță bună de conducere a căldurii,	AF B1	Semnal electrochimic	$1,0 \times 10^{-17}$ – $1,0 \times 10^{-15}$ g / mL	$2 \times 10^{-18}$ g / mL	Vin
	Grăpe	Funcționalizarea și biocompatibilitatea facilei.	AF B1	Semnal electrochimic	0,05-25 ng / ml	0,034 ng / ml	Orez
	GQDs	Atomic zero-dimensional, Bună dispersie, Site-uri active mai abundente, Bună compatibilitate și fotostabilitate, Proprietăți chimice și fizice mai bune, Solubilitate ridicată în apă.	AF M1	Semnal electrochimic	0,015-25 mmol / L	2 umol / L	Lapte
	CNHs		AF B1	Semnal de electrochiluminiscentă	0,05-200 ng / ml	0,02 ng / ml	Porumb
	MBs	Rezistivitate și permeabilitate ridicate,	AF B1	Semnal colorimetric	20–800 ng / L	12 ng / L	Porumb
	MBs	Sensibilitate	AF B1	Semnal colorimetric	0,01-1 ng / ml	7 pg / ml	Porumb

MBs	excelentă, dispersie bună și suspendare, Rată mare de legare,	AF B1	Semnal fluorescent	0,001-0,050 ng / mL	0,3 pg / ml	Grâu, orez, porumb
MBs	Dimensiune controlabilă, Funcționalizare ușoară.	AF B1	Semnal fluorescent	0,5-40 ng / ml	0,2 ng / ml	Arahide, lapte
MNPs		AF B1	Semnal fluorescent	-	0,01 nM	Porumb
QDs	Bună stabilitate la lumină, bună biocompatibilitate, Durată lungă de viață a fluorescenței, Sensibilitate excelentă	AF B1	Semnal fluorescent	10-400 nmol / L	3,4 nmol / L	Orez, arahide

**Notă:** NP: nanoparticule; PEDOT: poli (2,3-dihidrotieno-1,4-dioxină); AFM1: aflatoxină M1; GNR: nanorods de aur; CS: fir complementar; ITO: oxid de staniu de indiu; PDDA: poli dimetil dialil amoniu clorură; c-MWCNTs: nanotuburi de carbon multi-carboxilate de carbon; SWCNTs: nanotuburi de carbon cu pereți unici; [BMIM] PF6: 1-butil-3-metilimidazolium hexanuorofosfat; MIP: imprimat molecular polimer; GO: oxid de grafen; rGO: oxid de grafen redus; PPy: polipirol; PPA: acid pirolic; PANI: polianilină; GQDs: QD grafene; MB: margele magnetice; MNP-uri: nanoparticule magnetice; HCR: reacție în lanț de hibridizare; PAPDI: sondă perilenică.

#### 4.1. Nanomateriale folosite în analiza stocastică pentru detectarea aflatoxinelor

##### 4.1.1. Nanomateriale metalice

Nanomaterialele metalice pot fi combinate cu o varietate de macromolecule biologice, au caracteristici puternice de adsorbție, nu afectează activitățile biologice normale și pot fi utilizate pentru a detecta o varietate de activități enzimatică. În același timp, nanomaterialele metalice au, de asemenea, o bună biocompatibilitate și sunt ușor de combinat cu biomoleculele în detectarea siguranței alimentelor. Creșterea locurilor de legare disponibile pentru biomolecule la suprafață este, de asemenea, un avantaj major, astfel încât nanoparticulele metalice se pot lega de mai multe biomolecule, cum ar fi un anticorp, aptamer, enzimă și așa mai departe. În plus, fluorescența unică și proprietățile electrice ale nanomaterialelor metalice reprezintă baza principală pentru analiza alimentelor.

În funcție de lungimile de undă de emisie sau absorbție ale nanomaterialelor metalice corespunzătoare, aflatoxinele pot fi analizate cantitativ și calitativ. Când dimensiunea particulelor acestor materiale este suficient de mică, acestea vor avea un efect cuantologic și vor prezenta activități optice, electrice, chimice și catalitice [81-83].

Anticorpul anti-AFB1 a fost folosit ca element de recunoaștere și poate detecta 10-700 pg / ml AFB1 în alimente. Ca oxid de metal obișnuit, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a fost investigat pe scară largă pentru costul redus, nontoxicitatea, ușurința de producție și depozitare și așa mai departe.

Chauhan și colab. a dezvoltat un imunosenzor electrochimic de cristal de cuarț (QCM) reutilizabil pentru detectarea AFB1 în alimente. Anticorpus monoclonal anti-AFB1 a fost imobilizat pe un electrod de cristal de cuarț acoperit cu aur ca anticorpus de captură, în timp ce anticorpus de detecție IgG de iepure a fost legat de nanoparticulele AuFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Bioelectrodul poate fi regenerat. În experiment, AFB1 din proba de porumb a fost capturat pe suprafața electrodului de către anticorpus de captură în timp ce antigenul liber a fost spălat, iar anticorpus de detecție a continuat să reacționeze cu AFB1 în probă, formând un complex sandwich pe suprafața electrodului. Cantitatea de AFB1 din eșantion a fost calculată prin detecția mărimii semnalului generat de etichetă pe complex, iar intervalul de detecție a fost de 0,05-5 ng / mL [84].

#### 4.1.2. Nanomateriale de carbon pentru detecția aflatoxinelor

Nanomaterialele de carbon includ în principal punctele cuantice de carbon (QD), fulerenele, nanotuburile de carbon, nanofibrele de carbon, grafenul și derivații acestora. Nanomaterialele de carbon nu numai că au efecte nano, dar au și proprietăți electrice excelente (cum ar fi fereastra potențială mai largă și viteza de transmisie rapidă a electronilor), proprietăți puternice de adsorbție, stabilitate chimică bună, controlabilitate bună și biocompatibilitate, ușurință în funcționalizare și alte caracteristici fundamentale pentru aplicarea lor în analiză și detecție [85].

Aplicarea nanomaterialelor de carbon în analiza electrochimică nu se limitează adesea la un singur rol și funcție, dar de cele mai multe ori implică suprapunerea eficientă a mai multor funcții pentru a finaliza îmbunătățirea performanței analizei aflatoxinelor. GAN și colab. a construit un dispozitiv de electrochiluminiscență ultrasunetos (ECL) bazat pe extracția magnetică de oxid de grafen a AFM1 și compozit CdTe QDs-nanotub de carbon (CNT) marcat cu anticorpus pentru a detecta AFM1 în lapte.

Această metodă nu numai că utilizează caracteristicile bune de adsorbție a nanomaterialelor de carbon, dar sugerează, de asemenea, că CNT-urile pot amplifica semnalul ECL. Materialul compozit magnetic GO-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a fost utilizat ca adsorbant pentru a extrage AFM1 din lapte. Anticorpus AFM1 a fost combinat cu complexul CdTe QDs-CNTs pentru a forma un marker de semnal, care a fost apoi imobilizat pe un electrod de carbon serigrafiat (SPCE). Conținutul de AFM1 a fost determinat de intensitatea semnalului de electrochiluminiscență al unui complex imun format prin reacție de recunoaștere specifică antigen-anticorpus. LOD pentru AFM1 a fost la o concentrație de 0,3 pg / ml, care a fost mult mai mare decât cea a ELISA [86].

#### 4.1.3. Grafenul

Grafenul este un nanomaterial bidimensional cu grosime atomică și o structură hexagonală în fașă compusă din atomi de carbon hibridizați SP<sup>2</sup> și este unitatea componentă de bază a tuturor materialelor din carbon. Grafenul are o rată rapidă de transfer de electroni (200.000 cm<sup>2</sup> / (V · s)), proprietăți mecanice excelente, conductivitate termică ridicată, suprafață specifică mare și o bună biocompatibilitate.

GO este un derivat al grafenului care este produs de oxidarea diferită a foilor de grafen. Prepararea GO este de obicei din oxid de grafit, care este mai convenabil decât grafenul. GO este ușor de cuplat cu substanțe electrochimice active și biomolecule din cauza diferitelor grade de oxidare și a numărului diferit de grupe funcționale care conțin oxigen.

Datorită grupurilor funcționale care conțin oxigen, are o bună biocompatibilitate și hidrofilitate, ceea ce asigură că structura și activitatea unei varietăți de biomolecule nu sunt distruse după cuplare și este convenabilă pentru construirea metodelor de analiză a aflatoxinelor cu diferite moduri de detecție.

Srivastava și colab. [87] au pregătit electrozi GO / Au prin dispersarea omogenă a soluției de oxid de grafen pe suprafața electrodului de aur (Au). Anticorpus AFM1 a fost imobilizat cu succes pe suprafața



electrodului utilizând EDC ca agent de cuplare și NHS ca activator, apoi imobilizat cu BSA. Electrocul imunocomplex BSA / anti-AFB1 / GO / Au a fost construit prin blocarea situsurilor nespecifice.

Rezistența la transferul de sarcină ( $R_{ct}$ ) al electrocului în funcție de concentrația AFB1 într-o soluție tampon de fosfat conținând fericianură de potasiu a fost studiată de EIS. Rezultatele au arătat că există o gamă largă liniară între concentrația  $R_{ct}$  și AFB1 de 0,5-5 ng / mL, iar LOD a fost 0,23 ng / mL. Rijian Mo și colab. [88] a propus un nou biosenzor bazat pe film de acid poliacrilic modificat GO (PAA) pentru detectarea AFB1 prin stivuirea  $\pi - \pi$  cu aptamerul AFB1. Aptamerul AFB1 a fost imobilizat covalent pe suprafața canalului membranei PAA și apoi s-a adăugat oxid de grafen pentru a lega aptamerul.

La introducerea oxidului de grafen încărcat negativ și a aptamerului, sarcina negativă a nanocanalelor PAA crește, provocând obstacole sterice. În prezența AFB1, a apărut recunoașterea specifică aptamerului și legarea AFB1, oxidul de grafen a fost separat de suprafața membranei PAA și densitatea de încărcare și obstacolele sterice au fost reduse. Ca urmare, cantitatea de Fe (CN) 6 3- adăugată prin nanocanal crește și răspunsul curent crește. Senzorul are o selectivitate bună pentru AFB1, cu un LOD de 0,13 ng / mL și o gamă largă liniară de la 1 ng / mL la 20 ng / mL.

Goud și colab. [89] a construit un senzor electrochimic pentru detectarea AFB1 folosind GO și aptamer etichetat de sonda redox MB ca platformă de amplificare a semnalului. Oxidul de grafen funcționalizat a fost imobilizat pe SPCE, iar apoi aptamerul marcat cu MB a fost imobilizat pe SPCE printr-o legătură amidă carbodiimidă folosind hexametilendiamină (HMDA) ca distanțier.

Când AFB1 interacționează cu molecula țintă, forma dublu-catenară a aptamerului va fi convertită în forma G-quadruplex, care este aproape de suprafața electrocului și efectuează un transfer rapid de electroni. Creșterea concentrației analitului țintă crește, de asemenea, cantitatea de structură quadruplex formată și, ulterior, tot mai mulți aptameri etichetați cu MB sunt mai aproape de suprafața electrocului, rezultând un semnal electrochimic crescut. În acest design, stratul de oxid de grafen crește conductivitatea și caracteristicile catalitice ale sistemului de senzori, ceea ce ajută la îmbunătățirea sensibilității semnalelor electrochimice la analiți țintă.

Intervalul de răspuns liniar al AFB1 a fost 0,05-6,0 ng / mL, iar LOD a fost 0,05 ng / mL. Recent, GQD-urile au fost utilizate și în detectarea și analiza aflatoxinelor pe baza modului de detectare de mai sus. SHADJOU și colab. [90] au inventat o metodă de analiză electrochimică AFM1 în care GQD-urile,  $\alpha$ -ciclodextrina și nanoparticulele de argint (AgNPs) au fost depuse succesiv pe GCE pentru a pregăti o peliculă compusă ternară, iar metoda de detectare AFM1 a fost stabilită prin voltametrie de baleiaj liniar (LSV).

În această metodă,  $\alpha$ -ciclodextrina ca mediu conductor, GQD-urile ca stabilizator și AgNPs ca electrocatalizator au contribuit împreună la detectarea țintei și la amplificarea semnalului. În condiții optime, domeniul de detecție a fost de 0,015-25 mmol / L, iar limita de cuantificare a fost de 2  $\mu$ mol / L. Această metodă poate fi utilizată pentru detectarea AFM1 în lapte fără niciun tratament. Wang și colab. s-a preparat film nanocompozit PPy / PPa / rGO pe GCE prin polimerizare de curent constant prin utilizarea soluției compozite de oxid de grafen redus, PPy și PPa și a fixat anticorpul pe suprafața unui electrod PPy / PPa / rGO / GCE prin cuplare covalentă pentru ultrasunete detectarea AFB1.

O metodă sensibilă de detectare a AFB1 a fost stabilită explorând relația dintre modificarea  $R_{ct}$  a unui electrod modificat cu anticorp înainte și după testul substanței care urmează să fie testată și concentrația de AFB1 în substanța care urmează să fie testată. Această metodă are un răspuns bun la AFB1 în domeniul de detecție de 10 fg / mL – 10 pg / mL. La același nivel de concentrație, reacția încrucișată respectivă [91].

#### 4.1.4. Nanomateriale din nanotuburi de carbon

Nanotuburile de carbon (CNT) sunt un fel de nanomaterial de carbon care constă din foi de grafit înfășurate cu o structură stratificată. Nanotuburile de carbon pot fi împărțite în SWCNT și nanotuburi de carbon cu pereți multipli (MWCNT) în funcție de numărul de lamele de perete. Nanotuburile de carbon (CNT) au unele proprietăți electrice speciale, cum ar fi metalicitatea, semiconductivitatea, conductivitatea electrică ridicată și o bună activitate electrocatalitică.

Ca urmare, CNT-urile devin un material excelent de transport al electronilor care poate accelera foarte mult transferul de electroni între materialele electroactive.

Singh și colab. au preparat electrozi compuși c-MWCNT / ITO prin depunerea electroforetică într-un singur pas de c-MWCNT pe sticlă ITO. Un electrod imun BSA / anti-AFB1 / MWCNTs / ITO a fost preparat prin cuplarea covalentă a anticorpului aflatoxin monoclonal la electrodul compozit prin EDC și NHS și blocarea siturilor sale active nespecifice cu BSA.

Constanta de asociere a electrodului a fost 0,0915 ng / mL, indicând faptul că electrodul are o afinitate puternică pentru AFB1. Rezultatele au arătat că metoda a avut o sensibilitate ridicată în domeniul liniar de 0,25-1,375 ng / mL (LOD = 0,08 ng / mL) [92].

#### 4.1.5. Senzori electrochimici

Sensibilitatea senzorului electrochimic a fost mult îmbunătățită datorită stratului funcțional nanocompozit; prezintă o selectivitate excelentă față de AFB1 datorită filmului de polimer molecular imprimat poros (MIP). Morfologiile de suprafață ale electrozilor modificate au fost caracterizate folosind un microscop electronic de scanare.

Performanța senzorului imprimat a fost investigată prin voltametrie ciclică, voltametrie diferențială a impulsului și spectroscopie de impedanță electrochimică în detaliu. O relație liniară între semnalul de răspuns al senzorului și logaritmul concentrațiilor AFB1 variind de la  $1 \times 10^{-10}$  la  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> a fost obținută cu o limită de detecție de 0,03 nmol L<sup>-1</sup>. A fost aplicat pentru a detecta cu succes AFB1 în grasimea de porc. Un senzor electrochimic amprentat sensibil și selectiv pentru determinarea aflatoxinei B1 (AFB1) a fost construit pe un electrod de carbon sticlos prin modificarea treptată a nanotuburilor de carbon multi-pereți funcționali (MCNT), nanoparticulelor bimetalice Au / Pt (Au / PtNPs) și o imprimare subțire film [93].

În dezvoltarea senzorilor electrochimici dedicați detectării AFB1, au fost utilizate diferite tipuri de receptori pe senzor, platforme, inclusiv anticorpi, acizi nucleici, liganzi proteici, celule vii procariote și eucariote și aptameri. Mai multe metode de detectare electrochimică, cum ar fi amperometria, potențiomtria și conductometria, au fost utilizate în proiectarea senzorilor pe bază de AFB1, cele mai frecvent utilizate fiind metodele amperometrice.

Au fost raportate sensibilitatea bună, costul redus și posibilitatea miniaturizării senzorilor amperometrici dezvoltați [94]. La proiectarea senzorilor electrochimici, diferite materiale ale electrozilor au fost utilizate ca platforme de senzori, cele mai frecvent întâlnite materiale fiind platina, aurul și diferite forme de carbon. Posibilitățile de fabricație în masă, costuri reduse și teste cu picătură simplă au atras un interes tot mai mare pentru tehnologia serigrafiată.

De asemenea, miniaturizarea platformelor de senzori electrochimici duce la un consum considerabil mai mic de probă și, în plus, combinația metodelor de detectare electrochimică cu progresul în tehnologiile senzorilor face ca acești senzori electrochimici să fie potriviți pentru integrarea în dispozitivele portabile și de îngrijire, precum și pentru aplicații in situ [95].

În literatura de specialitate existentă, au fost raportate mai multe platforme de detectare electrochimică pentru detecțiile AFB1 și AFM1.

În primul rând, a fost efectuată o ELISA indirectă competitivă pe electrozii SPE folosind analiza DPV pentru detectarea AFB1. Metoda prezentată a fost aplicată cu succes pentru detectarea AFB1 în probe de orz cu sensibilitate ridicată și recuperări bune [96].

ELISA bazat pe SPE a arătat performanțe analitice mai bune decât ELISA spectrofotometrică cu un LOD de 30 pg / ml [97]. După un an, a fost dezvoltat un senzor cronoamperometric direct legat de HRP pentru detectarea AFM1 în probele de lapte [98]. Rezultatele obținute au arătat că, utilizând SPE-uri, AFM1 poate fi măsurat până la 25 pg / mL cu un interval de lucru dinamic între 30 și 160 pg / mL.

Între timp, într-un studiu realizat de Parker și colab., S-a ajuns la concluzia că prezența ionului divalent (calciu) este foarte recomandată pentru stabilizarea probelor de lapte pe electrozi metalici [98]. Integrarea nanotehnologiei sau a nanostructurilor în aplicațiile de biosensibilizare îmbunătățește performanța analitică a metodelor de detectare electrochimică datorită raportului ridicat de impact al suprafeței, activității catalitice excelente a suprafeței, ușurinței de preparare și bioconjugării [98].

Electrozii de carbon sticloși (GCE) sau suprafețele GCE modificate au fost utilizate pe scară largă pentru pregătirea senzorilor electrochimici pentru detectarea AF. După captarea analitului pe suprafața senzorului, schimbarea semnalului electrochimic este măsurată prin măsurători DPV, EIS și amperometrie. În mod similar, nanotuburile de carbon cu pereți unici (SWNT) au fost, de asemenea, utilizate pe scară largă în dezvoltarea platformelor de detectare electrochimică.

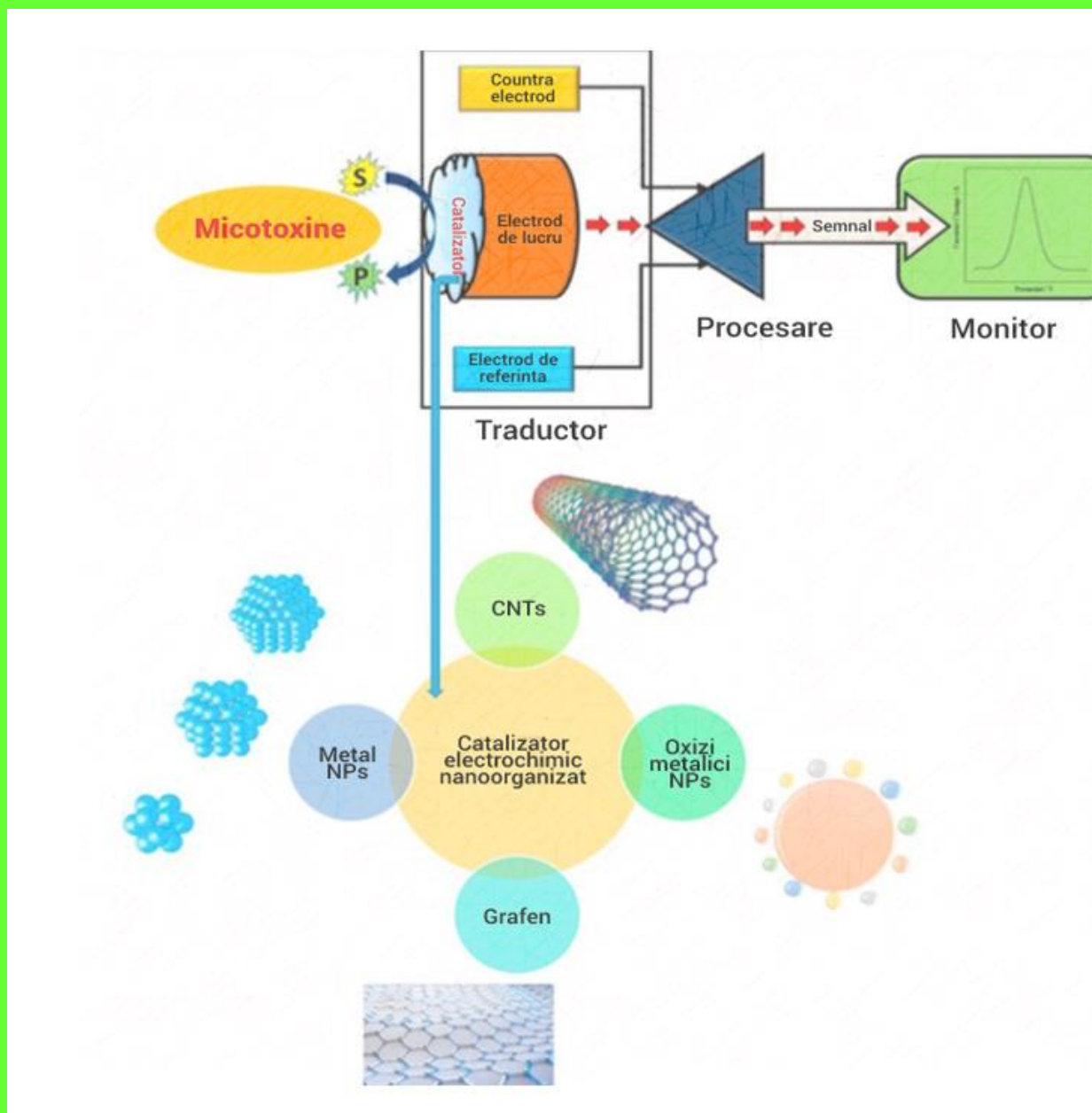
Pentru detectarea AFB1 în pulbere de porumb, un conjugat imobilizat AFB1-BSA pe suprafețe SWCE / GCE modificate cu chitosan a fost utilizat pentru dezvoltarea unei imunoanaliză indirectă competitivă bazată pe electrochimie [99]. Oxidul de grafen (GO), a fost utilizat pentru fabricarea senzorilor electrochimici pentru detectarea aflatoxinelor. Recent, s-au dezvoltat senzori electrochiluminiscenti și EIS pe bază de GO pentru detectarea AFM1 și AFB1 [100, 101]. Platformele de detectare raportate pentru detectarea AF pe baza generării de semnal electrochimic au fost rezumate în Tabelul 6.

**Tabel 6.** Metodele uzuale de detectare a aflatoxinelor [96-102]

Analiză	Metodă	LOD	Regăsire
AFB1	ELISA cu DPV	30 pg / ml	Orz
AFM1	Amperometric	25 pg / ml	Lapte
AFB1	Amperometria pulsului intermitent (IPA)	30 pg / ml	Porumb
AFM1	EIS	15 ng / L	Lapte
AFBI	LSV	0,06 ng / ml	Orez
AFM1	EIS	1 pg / ml	Lapte
AFM1	EIS	8 ng / L	Lapte
AFB1	DPV	0,07 ng / ml	-
AFM1	DPV	0,2 ng / ml	PBS

		0,7 ng / ml	-
AFB1	EIS	0,01 ng / ml	polen de albino
AFB1	Amperometric	0,05 ng / ml	Probele de ser uman și struguri
AFB1	DPV	3,5 pg / ml	Pulbere de porumb
AFM1	Electrochiluminiscent (ECL)	0,3 pg / ml	Lapte
AFB1	EIS	0,5 pg / ml	Probele de porumb

Există o relație logaritmică între diferența de potențial (pd) și concentrație [103]. Măsurarea semnalului poate fi sub formă de voltametrie diferențială a impulsului, voltametrie ciclică, cronoamperometrie, spectroscopie de impedanță electrochimică sau voltametrie de baleiaj liniar [104]. Un număr de senzori electrochimici au fost raportați a fi utilizați în analiza aflatoxinelor [105] și majoritatea dintre aceștia implică imobilizarea anticorpilor pe suprafața unui electrod.



**Figura 8.** Senzorul tip sandviș nonenzimatic modificat cu chitosan, nanoparticule de aur, anti-aflatoxină B1 și oxid de fier III [106]

Senzorul electrochimic de tipul sandwich neenzimatic a fost dezvoltat prin modificarea electrozilor de carbon sticloși folosind chitosan, nanoparticule de aur, anti-aflatoxină B1 și miez magnetic oxid III de fier ( $Fe_3O_4$ ) cu o coajă de aur funcționalizată cu 3 - ((2-mercapto- etil imino) metil) benzen-1,2-diol și marcat cu AFB1

**Tabel 7.** Compararea diferitelor metode de analiză a aflatoxinelor[107]

Metodă	Înveliș	LOD	Analiză multiplă	Nevoie de operator calificat	Expertiză
Densitometr u TLC		1-20 ng / Kg	Da	Da	nu

HPTLC		Pictogramă	Da	Da	Nu
HPLC			Da	Da	Nu
LC-MS / MS		0,8 g / kg	Da	Da	Nu
Fluorometru		5–5000 g / Kg	Da	Da	Nu
FTIR		<10 g / kg	Da	Da	Nu
RIA	Izotop radio	1 g / kg	Da	Da	Nu
ELISA	Enzime		Da	Da	Nu
Imunodipstick	Aur coloidal	5 g / kg	Da	Da	Da
QCM-uri		0,01-10 ng / ml	Da	Da	Nu
SPR		3,0–98 ng / ml	Da	Da	Nu
OLWS		0,5-10 ng / ml	Da	Da	Nu
Electrochimică		2 g / kg	Da	Da	Nu
Electrochimică		1 femtomolar	Da	Da	Nu

## 5. Managementul contaminării cu aflatoxine a alimentelor

### 5.1. Efectele procesării asupra aflatoxinei

Tehnicile de eliminare a aflatoxinei pot fi metode fizice sau chimice. S-a observat că îndepărtarea fizică din mărfuri a boabelor, semințelor sau nucilor deteriorate de mușcari reduce aflatoxinele cu 40-80% [108]. Soarta aflatoxinei variază în funcție de tipul de tratament termic (de exemplu, gătit, uscare, pasteurizare, sterilizare și uscare prin pulverizare).

Aflatoxinele se descompun la temperaturi de 237–306 ° C; prin urmare, pasteurizarea laptelui nu poate proteja împotriva contaminării cu AFM1 [109] a raportat că nici pasteurizarea, nici fierberea nu au influențat nivelul de AFM1 în laptele de bovine. Cu toate acestea, boabele de porumb fierte au redus aflatoxinele cu 28%, iar prăjirea după fierbere a redus nivelul acestora cu 34-53%. S-a constatat că prăjirea fisticului la 90 ° C, 120 ° C și 150 ° C timp de 30, 60 și 120 de minute reduce nivelurile de aflatoxine cu 17–63% [110].

Scăderea conținutului de aflatoxină depinde de combinația de timp și temperatură. Mai mult, gătirea alcalină și înmuierea porumbului pentru producerea de tortilla reduc aflatoxina cu 52% [111] au raportat reduceri ale conținutului de aflatoxine de 50-80% numai după extrudare. Când s-a adăugat



hidroxid (0,7 și 1,0%) sau bicarbonat (0,4%), reducerea a fost sporită la 95%. Rezultate similare au fost raportate de [112] pentru extrudarea gătitului de alune.

Cea mai mare reducere a aflatoxinei sa dovedit a fi de 59% cu un conținut de umiditate de 35% în făina de arahide, iar variabilele de extrudare au afectat în mod semnificativ compoziția sa nutrițională [113]. Saalia și Phillips, au raportat o reducere cu 84% a aflatoxinei din făina de arahide atunci când sunt găsite în prezența clorurii de calciu [114].

## **5.2. Efectele temperaturii mediului asupra producției de aflatoxine**

Schimbările climatice joacă un rol major în producția de aflatoxină din *Aspergillus* în culturile alimentare [115,116]. Schimbările climatice afectează interacțiunile dintre diferite specii micotoxigene și toxinele produse de acestea în alimente și furaje [117,118].

Modificările temperaturii mediului influențează nivelurile de expresie ale genelor reglatoare (aflR și aflS) și producția de aflatoxine la *A. flavus* și *A. parasiticus* [119]. [120] a raportat o bună corelație între expresia unei gene structurale timpurii (aflD) și AFB1.

Temperatura interacționează cu o activitate a apei (aw) și influențează raportul genelor reglatoare (aflR / aflS), care este direct proporțional cu producția de AFB1 [121].

Interacțiunile dintre activitatea apei și temperatura au un efect proeminent asupra *Aspergillus* spp. și producția de aflatoxine [122]. Creșterea temperaturii la 37 ° C și stresul apei reduc semnificativ producția de AFB1 produsă, în ciuda creșterii *A. flavus* în aceste condiții.

Adăugarea de CO<sub>2</sub> sub aceeași temperatură și activitate a apei mărește producția de AFB1 [123,124]. Potrivit [124], biomasa fungică și producția de AFB1 au fost raportate ca fiind cele mai mari la 28 ° C și 0,96 aw, în timp ce nu s-a observat o creștere fungică sau producția de AFB1 la 20 ° C cu valori aw de 0,90 și 0,93. De asemenea, nu a fost observată producție de AFB1 la 37 ° C.

PCR cantitativă cu transcriptază inversă a arătat, de asemenea, că genele reglatoare aflR și aflS au fost extrem de exprimate la 28 ° C, în timp ce cea mai scăzută expresie a fost observată la 20 și 37 ° C, sugerând că temperatura joacă un rol semnificativ în exprimarea genelor și în producția de aflatoxine [125]

## **.5.3. Depozitarea și tehnologii de ambalare**

După cum sa menționat anterior, este bine cunoscut faptul că contaminarea cu AF a alimentelor crește odată cu perioada de depozitare. De aceea, este necesară selectarea corectă a materialelor de ambalare pentru a preveni absorbția umezelii și formarea AF care va influența calitatea generală a produsului și siguranța [126, 127].

Contaminarea după recoltare a cerealelor poate avea loc și în timpul transportului, astfel încât cerealele trebuie să fie bine acoperite și / sau aerate în timpul transportului [126].

Depozitarea înainte și în timpul comercializării trebuie făcută în saci corespunzători, de preferință saci de sisal, deoarece acest tip de material facilitează aerarea în tranzit.

Utilizarea recipientelor din materiale vegetale (lemn, bambus, stuf) sau noroi așezat pe platforme ridicare și acoperite cu stuf sau tablă de acoperiș metalică este o altă modalitate de prevenire. Depozitele trebuie construite pentru a preveni infestarea cu insecte și rozătoare și pentru a preveni pătrunderea umezelii în boabe. În timp ce noile tehnologii de stocare, cum ar fi utilizarea coșurilor de metal sau ciment de către fermierii mici ar servi mai bine, absorbția lor a fost lentă datorită costului ridicat.

În prezent, mulți fermieri își depozitează boabele în pungi, în special din polipropilenă, care nu sunt etanșe la aer, dar există dovezi că această metodă facilitează contaminarea fungică și dezvoltarea AF [126, 128, 129]. În prezent, există eforturi de comercializare a sacilor de depozitare ermetică îmbunătățiți în Africa, pe baza sacului triplu dezvoltat pentru bobul de găină care a fost sau este testat pentru alte mărfuri [126].

Au fost propuse nu numai materialele de ambalare și ambalare din plastic pentru depozitare optimă. Shak- erardekani și Karim au raportat în 2012 o scurtă comunicare în care au studiat efectul a cinci tipuri diferite de folii de ambalare flexibile (polietilenă cu densitate redusă (LDPE) care a servit drept control, clorură de polivinil de calitate alimentară (PVC) nylon (LDPE / PA), poliamidă / polipropilenă (PA / PP) și polietilen tereftalat (PET)) pe umiditatea și conținutul AF al fisticului în timpul depozitării la temperatura camerei (22-28 ° C) și umiditatea relativă de 85-100 %.

Probele au fost analizate la 0, 2, 4, 6, 8 și 10 luni în perioada de depozitare. Rezultatele au arătat că a existat o creștere a conținutului de umiditate odată cu creșterea timpului de depozitare a fisticilor. Creșterea conținutului de umiditate a fost asociată cu nivelul AF al fisticului în timpul depozitării.

Toate materialele de ambalare, cu excepția LDPE, au determinat absorbția umezelii și formarea AF a produsului. Cele mai potrivite materiale de ambalare pentru menținerea calității și siguranței nucilor cu fistic au fost filmele din PET, urmate de nylon, PA / PP și PVC. Perioada de valabilitate a fisticului sa dovedit a fi prelungită de la 2 luni (martor) la 5 luni când PET-ul a fost folosit ca material de ambalare [127-129]. Pe piață, există unele produse care s-au dovedit recent pe durata de valabilitate a cerealelor.

Acesta este cazul Mater-Bi® (MB), un produs bioplastic compus din amidon, poliacaprolactonă (e-caprolactonă) și o cantitate minoră de plastifiant natural, fiind un produs fiabil și ușor adaptabil utilizat în prezent pentru a face cumpărături pungi, biofiltre, filme agricole și o serie de alte produse comerciale [130].

Mai mult, MB este complet biodegradabil, având o rată de defalcare similară cu cea a celulozei, având un profil favorabil ridicat de impact asupra mediului [131]. În zilele noastre, utilizarea învelișurilor de biopolimeri pe semințe a fost o metodă de control economic și de succes.

Cel mai utilizat este chitosanul, un biopolimer care se găsește în mod natural în pereții celulari ai anumitor ciuperci, dar a cărui sursă primară de producție este hidroliza chitinei în mediu alcalin la temperaturi ridicate [132].

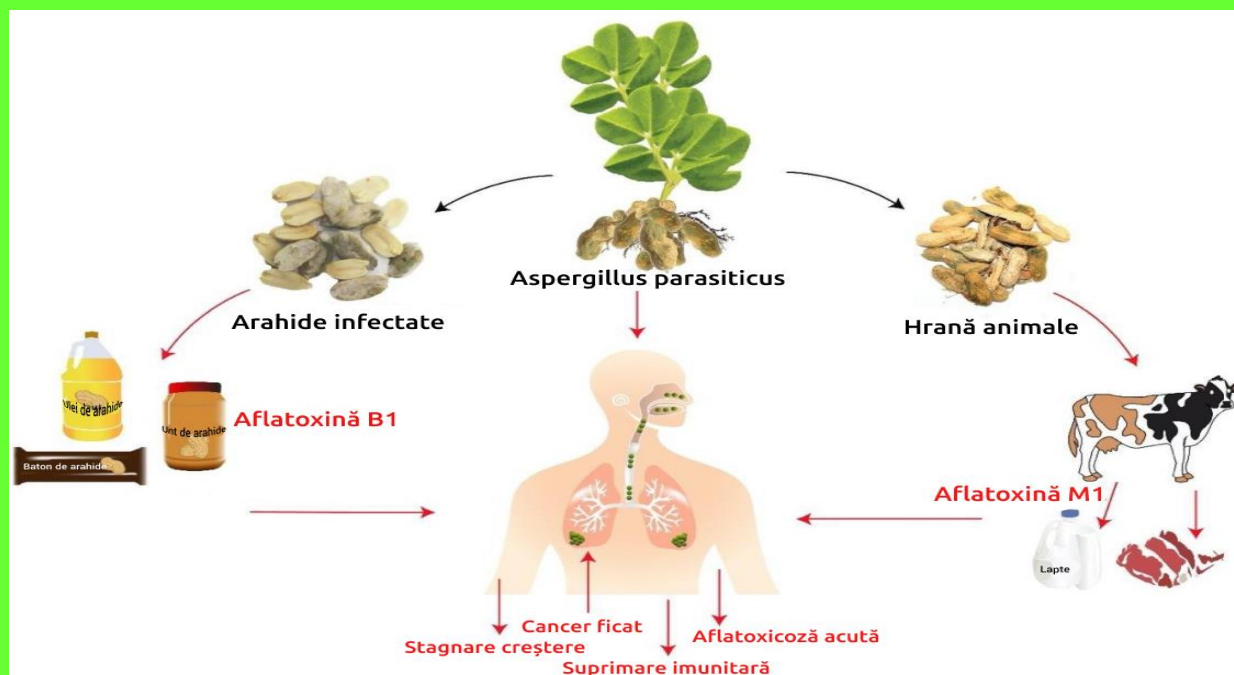
Chitosanul este cunoscut pentru proprietățile sale antifungice și antimicrobiene și poate fi utilizat în soluții, filme, sfere, hidrogeluri, nanoparticule, fibre și acoperiri, ceea ce îl face util pentru o varietate de aplicații în diferite zone [133]. Începând cu anii nouăzeci, chitosanul a fost folosit pentru acoperirea fructelor și legumelor datorită proprietăților sale bactericide și fungicide și a capacității sale de a forma pelicule care favorizează conservarea produselor datorită modificării atmosferei interne și reducerii pierderilor de transpirație.

În plus, acoperirea conferă fructului mai multă fermitate și favorizează reducerea dezvoltării microbiene [134, 135]. Datorită succesului rezultatelor obținute folosind chitosanul ca biocid, un număr mare de cercetători din întreaga lume au aplicat chitosan în semințe în condiții de depozitare, raportând o scădere favorabilă a ciupercilor de depozitare chiar și în condiții de umiditate ridicată și astfel scăderea numărului de micotoxinele s-au dezvoltat în boabe

- nu toate alimentele mucegăite conțin neapărat aflatoxine, deoarece nu toate tulpinile de *Aspergillus flavus* produc aflatoxine;
- aflatoxinele pot fi prezente chiar și în alimentele aparent nemucegăite;

- alimentele contaminate cu aflatoxine sunt practic imposibil de decontaminat.

Simpla îndepărtare a stratului de mușgai de la suprafața alimentului nu asigură decontaminarea completă, întrucât aflatoxinele difuzează prin micelii practic în toată masa alimentului. Încercarea de a decontamina alimentul prin metode fizice, chimice sau biologice nu sunt eficiente, mai mult decât atât favorizează degradarea alimentelor și la diminuarea valorii lor nutritive [135].



**Figure 9.** Surse de expunere la aflatoxine și fluxul acestuia în lanțul alimentar [136]

## Concluzii

Prin prezentarea diferitelor metode analitice pentru determinarea aflatoxinei în lapte (animal, uman sau praf) și produse lactate, am arătat că platformele de sensibilizare electrochimică oferă alternative foarte sensibile și specifice la metodele convenționale. În timp ce TLC, HPLC și testul imunosorbent legat de enzime sunt considerate metodele standard de aur pentru determinarea AFM1, acestea sunt încă mai greoaie, mai scumpe și consumă mai mult timp. Astfel, senzorii electrochimici reprezintă o alternativă adecvată pentru detectarea AFM1, oferind mai multe avantaje, cum ar fi versatilitatea, sensibilitatea ridicată, costul redus de producție, modificarea ușoară și stabilitatea bună.

În plus, o imobilizare orientată a biomoleculilor poate fi realizată datorită dimensiunilor mici, simplității și funcționalității lor ușoare, permițând în acest fel o creștere a eficienței de legare și minimizând adsorbțiile nespecifice pe suprafața sensorului electrochimic.

Deoarece contaminarea cu aflatoxină B1 a furajelor și a produselor alimentare rămâne în continuare o problemă din ce în ce mai preocupantă, contaminarea cu aflatoxină M1 a laptelui și a produselor lactate va continua să fie un factor de risc pentru oameni și în special pentru sugari și copii mici. Luând în considerare dezvoltarea rapidă și continuă a metodelor analitice și a nanotehnologiei, vor continua să fie dezvoltate diferite abordări pentru analiza aflatoxinelor.

Siguranța alimentară și sănătatea umană sunt strâns legate, iar calitatea și siguranța alimentelor sunt, de asemenea, o problemă stringentă la care mulți oameni au acordat atenție și au acordat importanță în ultimii ani. În prezent, există încă mult loc pentru dezvoltarea metodelor de detectare a aflatoxinelor. Fluxul de detectare trebuie îmbunătățit.

Cu toate acestea, majoritatea metodelor pot detecta doar o singură componentă, ceea ce, în mod evident, limitează aplicarea lor practică. Este foarte important să se dezvolte metode care pot detecta aflatoxine multiple sau biotoxine în același timp pentru a asigura siguranța alimentelor. În prezent, majoritatea dispozitivelor de detectare electrochimică utilizate pentru detectarea aflatoxinelor se află încă în stadiul de cercetare de laborator și este dificil de detectat probele în timp real cât mai convenabil și rapid posibil cu kiturile comerciale sau cu glucometre.

Metodele practice, portabile, reutilizabile și de detectare rapidă și dispozitivele analitice trebuie studiate în continuare. Metodele existente utilizează mai multe moduri de detectare, cum ar fi tehnologia de identificare, metodele imune, tehnologia aptamer, imprimarea moleculară și așa mai departe. Ca o nouă metodă de analiză a alimentelor, majoritatea schemelor de detectare a tehnologiei de detectare a nanomaterialelor se află în stadiul de laborator, ceea ce arată că întregul proces de operare nu este suficient de stabil și este încă imatur. Principalul motiv este că condițiile de preparare a nanomaterialelor sunt încă stricte, iar procesul de detectare necesită utilizarea unor instrumente la scară largă.

Prin urmare, aplicarea nanomaterialelor pentru detectare este încă limitată. Odată cu îmbunătățirea continuă a schemei de pregătire a senzorilor electrochimici cu nanopori și simplificarea tehnologiei de detectare, instrumentele ușoare și simple pot fi utilizate pentru detectare, lăsând în același timp instrumentele la scară largă în laborator; acesta este aspectul care trebuie îmbunătățit continuu.

În același timp, pentru a detecta mai multe componente simultan, este necesar să se găsească metode experimentale adecvate și reactivi pentru substanțe specifice. Cu toate acestea, în viața reală, poate fi necesară detectarea unui număr mare de substanțe care sunt imprevizibile în prezent.

Acest lucru necesită urgent metode de detectare eficiente și versatile care nu numai că pot determina preliminar prezența anumitor substanțe în alimente, cum ar fi metalele, proteazele active, agenții patogeni nocivi, carbohidrații și grăsimile, dar, de asemenea, pot determina gama generală a concentrației acestora.

Senzori stocastici pot detecta cu precizie componentele și conținutul specific al acestor substanțe, ceea ce este esențial în detectarea alimentelor. Prin urmare, îmbunătățirea metodelor de detectare a tehnologiei nanomateriale, extinderea domeniului de detectare și simplificarea echipamentelor de detectare sunt direcțiile viitoarei cercetări.

Producerea de porumb, arahide și alte cereale fără aflatoxine asigură siguranța alimentelor.

Sănătatea și bunăstarea economică a unui fermier reprezintă o investiție importantă în sectorul agricol. Deoarece este dificil să se identifice alune care sunt contaminate, este important să se evite consumul de arahide care sunt șifonate, rupte, decolorate sau care prezintă simptome de infecție fungică. La fel de mult ca fermierii clasifică arahide pentru piață, aceștia trebuie să fie calificați și pentru consum.

Utilizarea unor bune practici de producție a culturilor și a tehnicilor de manipulare post-recoltare poate reduce în mod eficient contaminarea fungică și poate menține calitatea produsului. Astfel de eforturi ar oferi apoi fermierilor oportunități de a accesa piețe satisfăcătoare care au în prezent standarde de calitate stricte

## Referințe

1. Van der Zijden ASM, Blanche Koelensmid W A A, Boldingh J, Barrett C B, Ord W O and Philp J. *Aspergillus flavus* and turkey X disease. Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey X disease. *Nature*, 195, 1060-10621, 962.

2. Nesbitt B F, O'Kelly J, Sargeant K and Sheridan A. *Aspergillus flavus* and turkey X disease. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 195, 1062-1063, 1962.
3. Dvorackova I. *Aflatoxins and Human Health*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
4. Betina V. *Mycotoxins, Bioactive Molecules*, Vol. 9, Elsevier, Amsterdam, 1989.
5. Hall A J, Wild C P. Epidemiology of aflatoxin-related disease. In Eaton D L and Groopman J D (Eds). *The Toxicology of Aflatoxins*, Academic Press, San Diego, CA, 1994, 233-258.
6. \*\*\*IARC. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. 8 Summary of data reported and evaluation. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
7. Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., & Samson, R. A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 49, 201-241.
8. Asao, T., Buchi, G. H., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, E. L., & Wogan, G. N. (1965). The structures of aflatoxins B1 and G1. *Journal of the American Chemical Society*, 87-882.
9. D'Mello, J. P. F., & Macdonald, A. M. C. (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69(1997), 155-166.
10. Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R. V., Breiman, R., & Wilson, D. (2006). Public Health Strategies for Reducing Aflatoxin Exposure in Developing Countries: A Workgroup Report. *Environmental Health Perspectives*, 114(12), 1898-1903.
11. Gimeno. (2004). Aflatoxina M1 no leite. Riscos para a saúde pública, prevenção e controlo Alimentação Animal. *Revista de la Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais*, 49, 32-44.
12. Wild, C. P., & Gong, Y. Y. (2010). Mycotoxins and human disease: A largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31(1), 71-82.
13. Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Lemes, D. P., Nakano, F., & Taniwaki, M. H. (2012). Co-occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control*, 26(1), 36-41.
14. Betina V. *Mycotoxins, Bioactive Molecules*, Vol. 9, Elsevier, Amsterdam, 1989
15. Zain, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Soc.* 2011, 15, 129–144.
16. \*\*\*International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; IARC: Lyon, France, 2002; Volume 82, p. 171.
17. Mejri Omrani, N.; Hayat, A.; Korri-Youssoufi, H.; Marty, J.L. Electrochemical biosensors for food security: Mycotoxins detection. In *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications*; Nikolelis, D.P., Nikoleli, G.-P., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2016; pp. 469–490.
18. Wilson, D.M.; Mubatanhema, W.; Jurjevic, Z. Biology and ecology of mycotoxigenic aspergillus species as related to economic and health concerns. In *Mycotoxins and Food Safety*; DeVries, J.W., Trucksess, M.W., Jackson, L.S., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Publ.: New York, NY, USA, 2002; Volume 504, pp. 3–17.
19. Shephard, G.S. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 395, 1215–1224.



20. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003, 16, 497–516.
21. Prandini, A.; Tansini, G.; Sigolo, S.; Filippi, L.; Laporta, M.; Piva, G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47, 984–991.
22. Alshannaq, A.; Yu, J.-H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2017, 14, 632.
23. Campagnollo, F.B.; Ganev, K.C.; Khaneghah, A.M.; Portela, J.B.; Cruz, A.G.; Granato, D.; Corassin, C.H.; Oliveira, C.A.F.; Sant’Ana, A.S. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1 : A review. *Food Control* 2016, 68, 310–329.
24. Santini, A.; Raiola, A.; Ferrantelli, V.; Giangrosso, G.; Macaluso, A.; Bognanno, M.; Galvano, F.; Ritieni, A. Aflatoxin m-1 in raw, uht milk and dairy products in sicily (Italy). *Food Addit. Contam. Part B* 2013, 6, 181–186.
25. Murphy, P.A.; Hendrich, S.; Landgren, C.; Bryant, C.M. Food mycotoxins: An update. *J. Food Sci.* 2006, 71, R51–R65.
26. Bartoszek, A. Genotoxic food components. In *Carcinogenic and Anticarcinogenic Food Components*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2005.
27. Troxel, C.M.; Reddy, A.P.; O’Neal, P.E.; Hendricks, J.D.; Bailey, G.S. In vivo aflatoxin B1 metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (*danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997, 143, 213–220.
28. Marin, S.; Ramos, A.J.; Cano-Sancho, G.; Sanchis, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* 2013, 60, 218–237.
29. Ketney, O.; Ovidiu, T.; Tifrea, A. Structural diversity and biochemical and microbiological characteristics of aflatoxins. In *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*; De Gruyter Open: Warsaw, Poland, 2014; Volume 18, p. 3.
30. Peers, F.G.; Linsell, C.A. Dietary aflatoxins and liver cancer—A population based study in kenya. *Br. J. Cancer* 1973, 27, 473–484.
31. Vanrensburg, S.J.; Cookmozaffari, P.; Vanschalkwyk, D.J.; Vanderwatt, J.J.; Vincent, T.J.; Purchase, I.F. Hepatocellular-carcinoma and dietary aflatoxin in mozambique and transkei. *Br. J. Cancer* 1985, 51, 713–726.
32. Jalili, M.; Scotter, M. A review of aflatoxin M1 in liquid milk. *Iran. J. Health Saf. Environ.* 2015, 2, 283–295.
33. El-Tras, W.F.; El-Kady, N.N.; Tayel, A.A. Infants exposure to aflatoxin M1 as a novel foodborne zoonosis. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, 2816–2819. [CrossRef] [PubMed]
34. Gürbay, A.; Sabuncuo ğlu, S.A.; Girgin, G.; Şahin, G.; Yi ğit, Ş.; Yurdakök, M.; Tekinalp, G. Aflatoxin M1 levels in breast milk samples from ankara, turkey. *Toxicol. Lett.* 2010, 196, S345. [CrossRef]
35. De Roma, A.; Rossini, C.; Ritieni, A.; Gallo, P.; Esposito, M. A survey on the aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from southern italy. *Food Control* 2017, 81, 30–33. [CrossRef]
36. Neal, G.E.; Eaton, D.L.; Judah, D.J.; Verma, A. Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived in vitro systems. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998, 151, 152–158.



37. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; IARC: Lyon, France, 2002; Volume 82, p. 171.
38. Hall A J, Wild C P. Epidemiology of aflatoxin-related disease. In Eaton D L and Groopman J D (Eds). *The Toxicology of Aflatoxins*, Academic Press, San Diego, CA, 1994, 233-258.
39. Eaton D L, Ramsdell H S and Neal G E. Biotransformation of aflatoxins. In Eaton D L and Groopman J D (Eds). *The Toxicology of Aflatoxins*, Academic Press, San Diego, CA, 1994, 45-72.
40. Groopman J D. Molecular dosimetry methods for assessing human aflatoxin exposures. In Eaton D L and Groopman J D (Eds). *The Toxicology of Aflatoxins*, Academic Press, San Diego, CA, 1994, 259-279.
41. Roebuck B D and Maxuitenko Y Y. Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In Eaton D L and Groopman J D (Eds). *The Toxicology of Aflatoxins*, Academic Press, San Diego, CA, 1994, 27-43.
42. Olsen J H, Dragsted L and Autrup H. Cancer risk and occupational exposure to aflatoxins in Denmark. *Br. J. Cancer*, 58 (1988), 392-396.
43. McLaughlin J K, Malker HSR, Malker B K, Stone B J, Ericsson J L E, Blot W J, Weiner J A and Fraumeni J F Jr. Registry-based analysis of occupational risks for primary liver cancer in Sweden. *Cancer Res.*, 47(1987), 287-291.
44. Hayes R B, van Nieuwenhuize J P, Raatgever J W and ten Kate F J W. Aflatoxin exposures in the industrial setting, an epidemiological study of mortality. *Food Chem. Toxicol.*, 22 (1984), 39-43
45. Mintzlaff HJ, Lotzsch R, Tauchmann F, Meyer W, Leistner L. Aflatoxin residues in the liver of broiler chicken given aflatoxin-containing feed. *Fleischwirtschaft*; 1974, 54: 774-778. [44] Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS Journal* ; 2006, 8 (1).
46. Patterson DSP, Allcroft R. Metabolism of aflatoxins in susceptible and resistant animal species. *Fd. Cosmet. Toxicol* 1970, 8: 43.
47. Dhanasekaran D, Shanmugapriya S, Thajuddin N Panneerselvam A. Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. In *aflatoxins - biochemistry and molecular biology*, Guevara-Gonzalez, R.G. (editor), ISBN 978-953-307-395-8, InTech, Published, 2011, PP.221-254.
48. Special Nutrients Inc., TARGET ORGANS - The key to an effective mycotoxins adsorbent, 2009
49. Ball R W, Huie J M and Coulombe R A Jr. Comparative activation of aflatoxin Bi by mammalian pulmonary tissues. *Toxicol. Lett.*, 75 (1995), 119-125.
50. Larsson P, Pettersson H and Tjälve H. Metabolism of aflatoxin Bi in the bovine olfactory mucosa. *Carcinogenesis*, 10 (1989), 1113-1118.
51. Pitt, J.I. Toxigenic fungi: Which are important? *Med. Mycol.* 2000, 38, 17–22.
52. Rodricks, J.V. *Mycotoxins in Human and Animal Health*; Pathotox Publishers: Park Forest South, IL, USA, 1977; p. 656, ISBN 0930376005, 9780930376000. 12. Stoloff, L. Aflatoxin as a cause of primary liver-cell cancer in the united states: A probability study. *Nutr. Cancer* 1983, 5, 165–186.
53. Ueno, Y. *Trichothecenes: Chemical, Biological, and Toxicological Aspects*; Kodansha: New York, NY, USA, 1983; ISBN 0444996613. 14. Niessen, L. Pcr-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 119, 38–46.

54. Wicklow D T and Shotwell O L. IntraFungal distribution of aflatoxins among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Can. J. Microbiol.*, 29 (1983), 1-5.
55. Ellis W O, Smith J P, Simpson B K and Oldham J H. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30 (1991), 403-439.
56. Wilson D M and Payne G A. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In Eaton D L and Groopman J D (Eds). *The Toxicology of Aflatoxins*, Academic Press, San Diego, CA, 1994, 309-325.
57. Stoloff L. Aflatoxins-an overview. In Rodricks J V, Hesseltine C W and Mehlman M A (Eds). *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Pathotox, Park Forest South, IL, 1977, 7-28.
58. Gamer R C, Whattam M M, Taylor P J L and Stow M W. Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by highperformance liquid chromatographic analysis and post-column derivatisation with pyridinium bromide perbromide. *J. Chromatogr.*, 648 (1993), 485-490.
59. Pettersson H, Holmberg T, Larsson K and Kaspersson A. Aflatoxins in acid-treated grain in Sweden and occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. *J. Sci. Food Agric.*, 48 (1989), 411-420.
60. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003, 16, 497–516.
61. European Commission. Commission Regulation (EC) No. 466/2001 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs; EU Law Publication: Luxembourg, 2001.
62. Alshannaq, A.; Yu, J.-H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2017, 14, 632.
63. \*\*\*FAO, Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed. Food and Nutrition Paper 81, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2003.
64. \*\*\*Food and Drug Administration (FDA), Compliance guidance manual, 2004.
65. Diaz-Rios L, Jaffe S., Standards, Competitiveness, and Africa's groundnut Exports to Europe: Barrier, Catalyst, or Distraction, Agriculture & Rural Development Department, 39, 2008.
66. Fallah, A. A., Rahnema, M., Jafari, T., and Saei-Dehkordi, S. S. (2011). Seasonal variation of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control* 22, 1653–1656.
67. Tabari, M., Karim, G., Ghavami, M., and Chamani, M. (2011). Method validation for aflatoxin M<sub>1</sub> determination in yoghurt using immunoaffinity column clean-up prior to high-performance liquid chromatography. *Toxicol.*
68. Sulyok, M., Beed, F., Boni, S., Abass, A., Mukunzi, A., and Krska, R. (2015). Quantitation of multiple mycotoxins and cyanogenic glucosides in cassava samples from Tanzania and Rwanda by an LC-MS/MS-based multi-toxin method. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control, Expo. Risk Assess.* 32, 488–502.
69. Costa-Fernandez, J. M., and Sanz-Medel, A. (2000). Room temperature phosphorescence biochemical sensors. *Quim. Anal.* 19, 189–204.
70. Li, G. R., Wu, J. J., Jin, W. J., and Xie, J. W. (2003). Antioxygen quenching room temperature phosphorescence stabilized by deoxycholate aggregate.

71. Gurban A., Epure P., Achievements and Prospects in Electrochemical-Based Biosensing Platforms for Aflatoxin M1 Detection in Milk and Dairy Products, December 2017.
72. Fukayama, M.; Winterlin, W.; Hsieh, D.P. Rapid method for analysis of aflatoxin M1 in dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1980, 63, 927–930. [PubMed]
73. Gauch, R.; Leuenberger, U.; Baumgartner, E. Rapid and simple determination of aflatoxin M1 in milk in the low parts per 1012 range. *J. Chromatogr. A* 1979, 178, 543–549.
74. Bakirci, I. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in milk and milk products produced in van province of turkey. *Food Control* 2001, 12, 47–51.
75. Bijl, J.; van Peteghem, C. Rapid extraction and sample clean-up for the fluorescence densitometric determination of aflatoxin M1 in milk and mil powder. *Anal. Chim. Acta* 1985, 170, 149–152.
76. Andreou, V.G.; Nikolelis, D.P.; Tarus, B. Electrochemical investigation of transduction of interactions of aflatoxin M1 with bilayer lipid membranes (blms). *Anal. Chim. Acta* 1997, 350, 121–127.
77. Micheli, L.; Grecco, R.; Badea, M.; Moscone, D.; Palleschi, G. An electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 21, 588–596.
78. Badea, M.; Micheli, L.; Messia, M.C.; Candigliota, T.; Marconi, E.; Mottram, T.; Velasco-Garcia, M.; Moscone, D.; Palleschi, G. Aflatoxin M1 determination in raw milk using a flow-injection immunoassay system. *Anal. Chim. Acta* 2004, 520, 141–148.
79. Vdovenko, M.M.; Lu, C.C.; Yu, F.Y.; Sakharov, I.Y. Development of ultrasensitive direct chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of aflatoxin M1 in milk. *Food Chem.* 2014, 158, 310–314.
80. Chunlei Y., Qi W., Recent Advances in Aflatoxins Detection Based on Nanomaterials, *Nanomaterials*, 10, 1626, 2020.
81. Jans, H.; Huo, Q. Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2849–2866.
82. Dykman, L.; Khlebtsov, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2256–2282.
83. Sun, J.; Xianyu, Y.; Jiang, X. Point-of-care biochemical assays using gold nanoparticle-implemented microfluidics. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43, 6239–6253.
84. Ruchika, C.; Jay, S.; Pratima, R.S.; Basu, T.; Richard, O.K.; Malhotra, B.D. Electrochemical piezoelectric reusable immunosensor for aflatoxin B1 detection. *Biochem. Eng. J.* 2015, 103, 103–113.
85. Reverté, L.; Prieto-Simón, B.; Campàs, M. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems. A review. *Anal. Chim. Acta* 2015, 908, 8–21.
86. Gan, N.; Zhou, J.; Xiong, P.; Hu, F.; Cao, Y.; Li, T.; Jiang, Q. An Ultrasensitive Electrochemiluminescent Immunoassay for Aflatoxin M1 in Milk, Based on Extraction by Magnetic Graphene and Detection by Antibody-Labeled CdTe Quantum Dots-Carbon Nanotubes Nanocomposite. *Toxins* 2013, 5, 865–883.

87. Srivastava, S.; Ali, M.A.; Umrao, S.; Parashar, U.K.; Srivastava, A.; Sumana, G.; Malhotra, B.D.; Pandey, S.S.; Hayase, S. Graphene Oxide-Based Biosensor for Food Toxin Detection. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 174, 960–970.
88. Rijian, M.; Lei, H.; Xiemin, Y.; Tiantian, S.; Chunxia, Z.; Zhe, W.; Pengzhi, H.; Shengli, S.; Chengyong, L. A novel aflatoxin B1 biosensor based on a porous anodized alumina membrane modified with graphene oxide and an aflatoxin B1 aptamer. *Electrochem. Commun.* 2018, 95, 9–13.
89. Goud, K.Y.; Hayat, A.; Catanante, G.L.; Satyanarayana, M.; Gobi, K.V.; Marty, J.L. An electrochemical aptasensor based on functionalized graphene oxide assisted electrocatalytic signal amplification of methylene blue for aflatoxin B1 detection. *Electrochim. Acta* 2017, 244, 96–103.
90. Shadjou, R.; Hasanzadeh, M.; Heidar Oor, M.; Shadjou, N. Electrochemical monitoring of aflatoxin M1 in milk samples using silver nanoparticles dispersed on  $\alpha$ -cyclodextrin-GQDs nanocomposite. *J. Mol. Recognit.* 2018, 31, e2699.
91. Wang, D.; Hu, W.; Xiong, Y.; Xu, Y.; Li, C. Multifunctionalized reduced graphene oxide-doped polypyrrole/pyrrolepropylic acid nanocomposite impedimetric immunosensor to ultra-sensitively detect small molecular aflatoxin B1. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 63, 185–189.
92. Singh, C.; Srivastava, S.; Ali, M.A.; Gupta, T.K.; Sumana, G.; Srivastava, A.; Mathur, R.B.; Malhotra, B.D. Carboxylated multiwalled carbon nanotubes based biosensor for aflatoxin detection. *Sens. Actuators B Chem.* 2013, 185, 258–264
93. Wang Z., Li J., Xu, L. *et al.*, Electrochemical sensor for determination of aflatoxin B<sub>1</sub> based on multiwalled carbon nanotubes-supported Au/Pt bimetallic nanoparticles. *J Solid State Electrochem* 18, 2487–2496, 2014.
94. Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L.; Palleschi, G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Anal. Chim. Acta* 2007, 605, 111–129.
95. Karczmarczyk, A.; Baeumner, A.J.; Feller, K.-H. Rapid and sensitive inhibition-based assay for the electrochemical detection of ochratoxin a and aflatoxin M1 in red wine and milk. *Electrochim. Acta* 2017, 243, 82–89.
96. Atul S. Kotagiri Y., Recent Advances in Electrochemical-Based Sensing Platforms for Aflatoxins Detection, Biosensor Lab, Department of Chemistry, Zuarinagar, India, 2016.
97. Ammida, N.H.S.; Micheli, L.; Palleschi, G. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B1 in barley. *Anal. Chim. Acta* 2004, 520, 159–164.
98. Parker, C.O.; Tothill, I.E. Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 in milk with focus on matrix interference. *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 2452–2457.
99. Zhang, X.; Li, C.-R.; Wang, W.-C.; Xue, J.; Huang, Y.-L.; Yang, X.-X.; Tan, B.; Zhou, X.-P.; Shao, C.; Ding, S.-J.; et al. A novel electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B1 in corn using single-walled carbon nanotubes/chitosan. *Food Chem.* 2016, 192, 197–202.
100. Gan, N.; Zhou, J.; Xiong, P.; Hu, F.; Cao, Y.; Li, T.; Jiang, Q. An ultrasensitive electrochemiluminescent immunoassay for aflatoxin M1 in milk, based on extraction by magnetic graphene and detection by antibody-labeled cdte quantumn dots-carbon nanotubes nanocomposite. *Toxins* 2013, 5, 865–883.

101. Wang, D.; Hu, W.; Xiong, Y.; Xu, Y.; Li, M.C. Multifunctionalized reduced graphene oxide-doped polypyrrole/pyrrolepropylic acid nanocomposite impedimetric immunosensor to ultra-sensitively detect small molecular aflatoxin B1. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 63, 185–189.
102. Yugender Goud K., Suresh Kumar K., Progress on nanostructured electrochemical sensors and their recognition elements for detection of mycotoxins, *Biosensors and Bioelectronics*, 121, 205-222, 2018,
103. C. L. Morgan, D. J. Newman, and C. P. Price, “Immunosensors: technology and opportune
104. A.-L. Valimaa, A. T. Kivistö, P. I. Leskinen, and M. T. Karp, “A novel biosensor for the detection of zearalenone family mycotoxins in milk,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 80, no. 1, pp. 44–48, 2010.
105. J. H. Owino, O. A. Arotiba, N. Hendricks et al., “Electrochemical immunosensor based on polythionine/gold nanoparticles for the determination of aflatoxin B1,” *Sensors*, vol. 8, no. 12, pp. 8262–8274, 2008.
106. Z. Linting, L. Ruiyi, L. Zaijun, X. Qianfang, F. Yinjun, and L. Junkang, “An immunosensor for ultrasensitive detection of aflatoxin B1 with an enhanced electrochemical performance based on graphene/conducting polymer/gold nanoparticles/the ionic liquid composite film on modified gold electrode with electrodeposition,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 174, pp. 359–365, 2012.
107. Wacoo Alex P., Wendi D., *Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops*, Uganda Industrial Research Institute, Uganda , 2014.
108. Park, D. L., Effect of processing on aflatoxin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504, 173–179, 2002.
109. Awasthi, V., Bahman, S., Thakur, L. K., Singh, S. K., Dua, A., and Ganguly, S. (2012). Contaminants in milk and impact of heating: an assessment study. *Indian J. Public Health* 56, 95–99
110. Yazdanpanah, H., Mohammadi, T., Abouhossain, G., and Cheraghali, A. M.. Effect of roasting on degradation of aflatoxins in contaminated pistachio nuts. *Food Chem. Toxicol.* 43, 1135–1139. 2005.
111. Torres, P., Guzman-Ortiz, M., and Ramirez-Wong, B., Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying processes. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2825–2829, 2001.
112. Hameed, H. G., *Extrusion and Chemical Treatments for Destruction of Aflatoxin in Naturally-Contaminated Corn*. Ph.D. thesis, University of Arizona, Tucson, AZ, 1993.
113. Cheftel, J. C., “Extrusion cooking and food safety,” in *Extrusion Cooking*, eds C. Mercier, P. Linko, and J. M. Harper (Eagan, MN: American Association of Cereal Chemists), 435–461, 1989.
114. Saalia, F. K., and Phillips, R. D., Degradation of aflatoxins by extrusion cooking: effects on nutritional quality of extrudates. *LWT Food Sci. Technol.* 44, 1496–1501, 2011a.
115. Saalia, F. K., and Phillips, R. D., Reduction of aflatoxins in peanut meal by extrusion cooking in the presence of nucleophiles. *LWT Food Sci. Technol.* 44, 1511–1516, 2011b.
116. Paterson, R., and Lima, N., How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* 43, 1902–1914, 2010.
117. Paterson, R., and Lima, N., Further mycotoxin effects from climate change. *Food Res. Int.* 44, 2555–2566, 2011.



118. Paterson, R., and Lima, N., "Climate change, fumonisins and animal feed," in *Nutrieconomics: Balancing Global Nutrition and Productivity*, ed. E. M. Binder (Tulln: BiominWorld Nutrition Forum), 241–247, 2012.
119. Magan, N., and Aldred, D., Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 131–139, 2007.
120. Magan, N., Aldred, D., Hope, R., and Mitchell, D., Environmental factors and interactions with mycoflora of grain and grapes: effects on growth and deoxynivalenol and ochratoxin production by *Fusarium culmorum* and *Aspergillus carbonarius*. *Toxins* 2, 353–366, 2010.
121. Magan, N., Medina, A., and Aldred, D., Possible climate change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and post-harvest. *Plant Pathol.* 60, 150–163, 2011.
122. Schmidt-Heydt, M., Rufer, C. E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., and Geisen, R., The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Res.* 26, 241–246, 2010.
123. Medina, A., Rodriguez, A., and Magan, N., Effect of climate change on aspergillus flavus and aflatoxin B1 production. *Front. Microbiol.* 5:348, 2014.
124. Abdel-Hadi, A., Carter, D., and Magan, N., Temporal monitoring of the nor-1 (aflD) gene of *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin B1 production during storage of peanuts under different environmental conditions. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1914–1922, 2010.
125. Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G., and Perrone, G., Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 162–169, 2016.
126. Hell, K., & Mutegi, C., Aflatoxin control and prevention strategies in key crops of Sub-Saharan Africa. *African Journal of Microbiology Research*, 5(5), 459-466, 2011.
127. Shakerardekani, A., & Karim, R., Effect of different types of plastic packaging films on the moisture and aflatoxin contents of pistachio nuts during storage. *Journal of Food Science and Technology In Press* , 1-3, 2012.
128. Hell, K., Cardwell, K. F., Setamou, M., & Poehling, H. M., The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agro- ecological zones of Benin, West Africa. *Journal of Stored Products Research*, 36(4), 365-382, 2000.
129. Udoh, J. M., Cardwell, K. F., & Ikotun, T., Storage structures and aflatoxin content of maize in five agroecological zones of Nigeria. *Journal of Stored Products Research*, 36(2), 187-201, 2000.
130. Bastioli, C., Global status of the production of biobased packaging materials. *Starch/Starke*, 53(8), 351-355, 2001.
131. Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* ., 21(6), 703-714.
132. Miranda-Castro, S.P. (2000). La quitina y su potencial aplicación industrial. *Revista Investigación y Desarrollo. Periodismo de Ciencia y tecnología*,



133. Miranda-Castro, S.P. (2004). Películas compuestas de quitosano y esponjas para usos biomédicos y alimentarios. (A Chitosan and/or porous solids film for Biomedical and/or Food Uses, a process for the obtention thereof and use of the same). Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, México.
134. Miranda, S. P., Miranda, E., & Serrano, J. (2007). Chitosan and gamma irradiated chitosan against *Aspergillus flavus* in maize. *Asian Chitin Journal*, 3-37.
135. Rivero, D., Cruz, A., Martínez, B., Ramírez, M. A., Rodríguez, A. T., & Cárdenas, R. M. (2004). Efecto protector de la quitosana en semillas de arroz frente a *Fusarium sp.* *Revista de Protección Vegetal*, 19(2), 140-144
136. Alam T, Anco DJ, Rustgi S., Management of Aflatoxins in Peanut. Clemson (SC): Clemson Cooperative Extension, Land-Grant Press by Clemson Extension, 2020.

## Hormoni de creștere și steroizi-metode de determinare

### 5. Introducere

În ultimii ani, o creștere a educației și a conștientizării consumatorilor a crescut cererea de alimente sigure și sănătoase și nevoia de a cunoaște alimentele pe care le consumă sănătoase și inofensive. În plus, pentru aceasta, trebuie prezentate informații obiective. Prin urmare, pentru a se asigura că alimentele sunt lipsite de reziduuri chimice nedorite, cum ar fi hormoni sau pentru a confirma că reziduurile se încadrează în limitele maxime de toleranță, sunt necesare metode analitice standard pentru detectare și cuantificare [1]. În consecință, dezvoltarea esențială a noilor tehnici de pregătire multisample și a metodelor de detectare și cuantificare a reziduurilor devin esențiale [2].

Prin urmare, principalele obiective ale acestui referat sunt să revizuiască hormonii și reziduurile hormonale anabolice din alimentele de origine animală (lapte și carne), să evidențieze impactul potențial asupra sănătății publice și să rezume cele mai recente și practic aplicabile metode de detectare și cuantificarea hormonilor și a reziduurilor de promotor de creștere hormonală în matricile alimentare de origine animală. Hormonii sunt mesageri biochimici endogeni, care sunt produși într-un fel de țesut pentru a fi eliberați prin fluxul sanguin și transportați la organele țintă pentru a stimula, inhiba sau coordona treptat unele activități fiziologice într-un țesut diferit într-o anumită perioadă de timp [3, 4].

Hormonii pot fi grupați ca steroizi și nesteroidieni (hormoni proteici) și  $\beta$ -agoniști (clenbuterol, cimaterol, ractopamină, salbutamol și zilpaterol), iar hormonii steroizi sunt subgrupați în continuare ca steroizi anabolizanți și corticosteroizi. Prin urmare, hormonii steroizi conțin atât EGA (estrogeni, androgeni și gestageni), care sunt, de asemenea, cunoscuți ca hormoni sexuali sau steroizi anabolizanți, precum și corticosteroizi [5-7].

Hormoni steroizi: estrogeni, androgeni, gestageni și corticosteroizi sunt steroizi care acționează ca hormoni. Deși utilizarea acestui grup mare de compuși în scopuri de îngrășare a animalelor a fost descrisă de la începutul anilor 1950, a fost interzisă în Uniunea Europeană în zilele noastre.

În consecință, preocuparea crescută a publicului și lansarea strategiilor legislative în cadrul validării metodelor și evaluării riscurilor au indus necesitatea dezvoltării unor metode analitice foarte sensibile și specifice pentru determinarea hormonilor steroizi în matricile comestibile. Hormonii steroizi sunt un grup de compuși lipofili, cu greutate moleculară mică, biologic activi, care acționează ca hormoni.

Compusul părinte din care derivă toți steroizii este colesterolul. Așa cum se arată în figura 1, colesterolul este format din 3 inele hexagonale de carbon și 1 inel pentagonal, în general aranjate într-un

mod 6-6-6-5. În funcție de activitatea lor biologică și efectele farmacologice, hormonii steroizi pot fi împărțiți în 2 grupe importante. La început, steroizii sexuali, un subset de hormoni care produc diferențe sexuale sau care susțin reproducerea.

Acestea includ estrogeni, gestageni și androgeni. Al doilea grup, corticosteroizii, include glucocorticosteroizii și mineralocorticosteroizii. Glucocorticosteroizii reglează multe aspecte ale metabolismului și funcției imune, în timp ce mineralocorticosteroizii reglează volumul de sânge și conținutul de electroliți. Hormonii steroizi pot fi, de asemenea, clasificați după originea lor endo sau exogenă.

Hormonii steroizi prezenți biosintetic în organism sunt numiți hormoni endogeni și sunt mesagerii chimici de la o celulă (sau grup de celule) la alta ( estradiol). Steroizii xenobiotici sau exogeni sunt compuși străini, produși în mod natural sau sintetic (metiltestosteron, noretandrolonă).

Folosind acest lucru, hormonii steroizi pot fi, în general, împărțiți în trei grupe principale: estrogeni, gestageni și androgeni, sau numiți și EGA. Estrogenii (estrogeni alternativi sau steroizi C18), dintre care 17-estradiolul este cel mai activ compus, sunt un grup de compuși steroizi, numiți pentru importanța lor în ciclul estru. Estrogenii endogeni (estronă, estradiol, estriol) și analogii hemi-sintetici (estradiol-3-benzoat) sunt mai puțin activi oral comparativ cu estrogenii sintetici ( etinilestradiol, omologul sintetic al estradiolului).

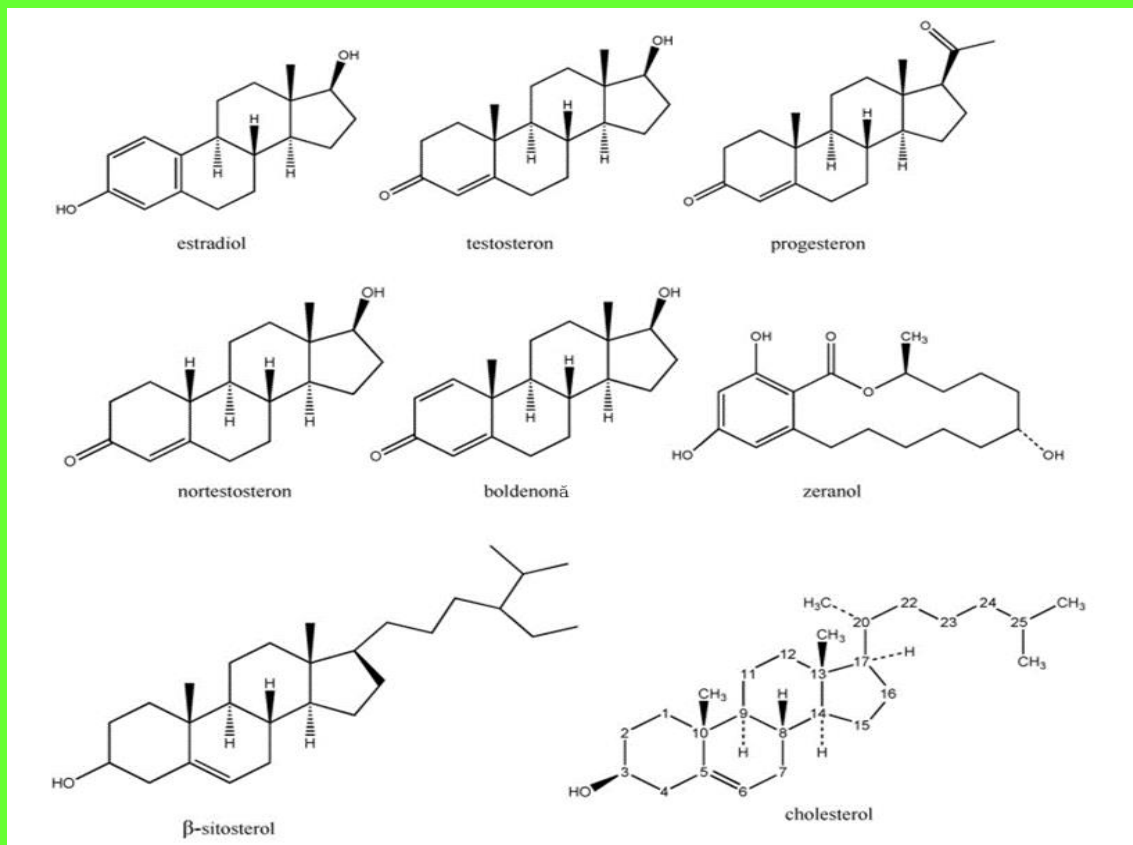
Stilbenii (dietilstilbestrolul, dienestrolul, hexestrolul) și zeranolul sunt compuși nestobiotici nesteroidieni care imită efectele estrogenice prin asemănări structurale cu estradiolul. Pregnane (C21-steroidi) este structura chimică de bază pentru gestageni, numite și progestative sau progestagene. Fie sunt de origine naturală, fie sunt derivați sintetici ai progesteronului sau 17-hidroxiprogesteronului.

Androgenul (C19-steroidi) este termenul generic pentru orice compus natural sau sintetic, de obicei un hormon steroid, care stimulează sau controlează dezvoltarea și menținerea caracteristicilor masculine. Androgenii, numiți și hormoni androgenici, sunt cei mai des utilizați steroizi anabolizanți pe piața neagră. Androgenul principal și cel mai cunoscut este testosteronul.

Un grup important de asemănări cu steroizi sunt fitosterolii. Acești steroli vegetali sunt alcooli steroizi naturali și au o structură chimică similară cu cea a colesterolului. Acestea sunt alcătuite dintr-un ciclu tetraciclic ciclopenta enantren și un lanț lateral lung și flexibil la atomul de carbon C17 (Figura1) [8-10]. În general, uleiurile vegetale și produsele derivate din uleiuri sunt considerate cele mai bogate surse naturale de steroli, urmate de cereale, nuci și legume [8-16].

Metabolizarea sterolilor vegetali a fost demonstrată la organismele superioare [17-19]. Efectele fiziologice ale fitosterolilor și în principal proprietățile lor de scădere a colesterolului au crescut interesul pentru apariția lor în produsele alimentare și diete. În consecință, există un interes tot mai mare pentru determinarea lor în produsele alimentare, în care fitosterolii pot fi fie intrinseci, fie adăugați.

De la encefalopatia spongiformă bovină (ESB) și criza dioxinei, grăsimea animală a fost interzisă din hrana animalelor și este înlocuită cu material vegetal. Acest lucru a implicat faptul că, în loc de colesterol, fitosterolii sunt principalul tip de steroli din hrana animalelor [20].



**Figura 1.** Exemple de hormoni steroizi și compuși înrudiți (estradiol, testosteron, progesteron, nortestosteron, boldenonă, zeranol, -sitosterol) și compusul lor colesterol [21]

## 6. Utilizarea hormonilor și reziduurile lor

În general, hormonul și substanțele anabolice hormonale sunt utilizate în practica de producție a alimentelor de origine animală, în principal datorită capacității lor de creștere în greutate și de a reduce aportul mediu de furaje în raport cu creșterea în greutate. Efectele sinergice și capacitatea de a spori capacitatea de retenție a azotului și de a construi proteine sunt, de asemenea, raportate [22].

În plus, efectul sinergic al corticosteroizilor atunci când este combinat cu steroizi anabolizanți sau β-agoniști a fost dezbătut în diverse lucrări de cercetare [23]. În Uniunea Europeană, utilizarea hormonilor și a altor compuși anabolizanți în scopul îngrășării, creșterii producției și promovării creșterii la animalele de fermă este complet interzisă, iar reziduurile sunt monitorizate [24].

Cu toate acestea, este permisă utilizarea anumitor hormoni în scopuri terapeutice și reproductive în condiții reglementate de către medicii veterinari autorizați. În astfel de cazuri, profesioniștilor li se permite pe bază de tranziție și sub control veterinar strict să utilizeze 17-beta estradiol, testosteron și progesteron și derivații săi pentru tratamentul tulburărilor ginecologice, cum ar fi macerarea / mumificarea fetală, piometrul la bovine și inducerea estrului la bovine, cai, oi și caprine (Tabelul 1) [25, 26, 27].

**Tabelul 1.** Limita maximă de reziduuri (LMR) și ADI a diferiților hormoni selectați secvențial [29-35]

Substanță farmacologică activă	Reziduu marcator	Specii de animale	Țesut țintă	Reziduu maxim (MRL, μg/kg = PPb)		
				EU	CODEX	USA
<b>17β-Estradiol</b>	Nu se aplică	Toate mamiferel e Specii producătoare de mancare	Mușchi	*Fără LMR necesar	#Inutil	0,12
			Ficat			0,24
			Rinichi			0,36
			Grăsimi			0,48
			Lapte (μg/L)			-
<b>Clorhidrat de clenbuterol</b>	Clenbuterol	Bovine și cabaline	Mușchi	0,1	0,2	Interzis utilizare în mâncarea animalelor
			Ficat	0,5	0,6	
			Rinichi	0,5	0,6	
			Grăsimi	-	0,2	
			Lapte (μg/L)	0,05	0,05	
<b>Progesteron</b>	Nu se aplică	Bovine, ovine și caprine	Mușchi	*Fără LMR necesar	#Inutil	5
			Ficat			15
			Rinichi			30
			Grăsimi			30
		Ecvidee (femela)	Lapte			-
<b>Testosteron</b>	Testosteron	Bovine	Mușchi	*Fără LMR necesar	#Inutil	0,64
			Ficat			1,30
			Rinichi			1,90
			Grăsimi			2,60
<b>Acetat de trenbolon</b>	Trenbolon	Bovine	Mușchi	*Fără LMR necesar	2	Nu este necesar
			Ficat	10		
<b>Zeranol</b>	Zeranol	Bovine	Mușchi	*Fără LMR necesar	2	Nu este necesar
			Ficat	10	20	
		Ovine	Mischi	-	-	
			Ficat	-	-	
			Lapte	-	-	

Hormonii steroizi sunt folosiți la îngrășarea animalelor datorită capacității lor de a crește în greutate și de a reduce raportul de conversie a hranei, care este aportul mediu de hrană în raport cu creșterea în greutate. În plus, efectele sinergice și capacitatea lor de a reduce retenția de azot și de a crește retenția de apă și conținutul de grăsimi au fost raportate în literatură.

De asemenea, corticosteroizii pot fi folosiți ilegal în îngrășarea animalelor. Acest lucru deoarece s-a descris că acestea pot avea un efect sinergetic atunci când sunt combinate cu steroizi sau beta-agoniști

anabolizanți [36,37-41]. De obicei, hormonii steroizi sunt implantați în urechea animalului, astfel încât substanța activă să poată fi eliberată pe o perioadă lungă de timp în sânge [42].

De câțiva ani, utilizarea steroizilor anabolizanți la îngrășarea animalelor este interzisă în Comunitatea Europeană din cauza posibilelor lor efecte toxice asupra sănătății publice. Deși toxicologii au declarat că anumiți promotori de creștere sunt siguri în condiții convenționale de aplicare, aceste rezultate sunt în discuție și uneori controversate științific [43].

## **2.1. Utilizările hormonilor de creștere și steroizilor în producția de lapte**

Există excepții și practici paradoxale la nivel mondial în ceea ce privește utilizarea hormonilor în scopuri de îngrășare și de creștere a producției de lapte. De exemplu, în SUA, estradiolul este utilizat sub formă de implant de cauciuc siliconic care conține 25,7 sau 43,9 miligrame (mg) de estradiol fiind acoperit cu cel puțin 0,5 mg pulbere de oxitetraciclină.

Se utilizează pentru a crește rata de creștere în greutate la alăptarea și la pașii de creștere; pentru o eficiență îmbunătățită a hranei și o creștere a ratei de creștere în greutate la boi și juninci limitate la doza de 25,7 mg implant pentru mai puțin de 200 de zile sau 43,9 mg implant la fiecare 400 de zile [44].

În plus, substanțele anabolice hormonale sintetice, cum ar fi DES, hexestrol și etinilestradiol, sunt încă oferite pe piața ilegală în scopul creșterii greutatei corporale în practica de îngrășare a animalelor. Practic, acești compuși sunt folosiți ca implanturi pentru urechi (eliberate într-o anumită perioadă), injectabile (concentrații mari în locurile de injectare).

Estradiolul este utilizat ca promotor al creșterii la bovine și poate produce creșteri de două până la de zece ori în țesutul muscular al animalelor tratate [45]. Din produsele anabolice hormonale xenobiotice, cu efecte estrogenice, zeranolul este utilizat la bovine și ovine de carne pentru a crește rata de creștere în greutate, eficiența hranei și carcasa de înaltă calitate.

În cazul producției de bovine de vită, se utilizează la doza de 36 mg (un implant format din 3 pelete, fiecare având 12 mg doză de zeranol ca API). Această doză de implant este indicată pentru a crește rata de creștere în greutate și pentru a îmbunătăți conversia furajelor la vițeei de vită înțărcați, bovine de vită în creștere, boi de furaje și juninci de furaje. La bovine, acesta va fi evacuat la 65 de zile după implant cu un efect rezidual de  $\leq 2$  ppb ( $\mu\text{g} / \text{kg}$ ) în toate organele și țesuturile [46, 47].

Exemple binecunoscute de androgeni utilizați la îngrășarea animalelor sunt propionatul de testosteron în combinație cu benzoat de estradiol sau xenobiotic asemănător cu androgenii, cum ar fi 19-nortestosteron, 17 $\beta$ -metil testosteron, boldenonă și trenbolon. Pentru a îmbunătăți eficiența conversiei furajelor și pentru a îmbunătăți creșterea în greutate la juninci, o combinație de propionat de testosteron (200 mg) și benzoat de estradiol (20 mg), ca un singur implant de ureche percutanat [48].

Cei mai importanți hormoni găsiți în lapte și alte produse lactate prin utilizarea unei varietăți de metode analitice constau în prolactină, steroizi incluzând estrogeni, progesteron, corticoizi și androgeni. Mai mult, a fost raportată existența altor hormoni, cum ar fi factorul de creștere tip insulină-1 (IGF-1) [49] și hormoni locali, inclusiv prostaglandine (PG) [50,51], în produsele lactate. S-a presupus că majoritatea hormonilor sunt transferați în lapte prin difuzie. Cu toate acestea, sunt disponibile dovezi pentru mecanisme active precum cele pentru progesteron la capre și prolactină la vaci [52, 53]. Nivelul PG în probele de lapte ar putea fi utilizat ca marker al mastitei la vaci [54]. Hormonii care apar în mod natural în produsele lactate au efecte biologice la om și animale, care variază de la efecte de promovare a creșterii legate de steroizii sexuali [55], până la proprietăți cancerigene care se asociază cu unii metaboliți activi ai estrogenilor și IGF-1 [56,57].

**Tabel 1.** Concentrațiile hormonilor în laptele de vacă [57].

Hormoni	Concentrație	Metodă analitică
<b>Prolactină</b>	15,4 ± 1	radioimunotest
<b>IGF-1</b>	4 ± 1	radioimunotest
<b>PGE2</b>	2,4 ± 0,3	radioimunotest
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	2 ± 0,5	radioimunotest
<b>TXB2</b>	1 ± 0,5	radioimunotest
<b>Corticosteroidi</b>	14 ± 4	proteine competitive testul de legare (CPB).
<b>Testosteron</b>	0,09 ± 0,03	radioimunotest
<b>5<math>\alpha</math>-esteroids</b>	3 ± 1	radioimunotest
<b>Progesteron</b>	12 ± 2	radioimunotest
<b>Esterone</b>	0,13	GC-MS
<b>17<math>\beta</math>-estradiol</b>	0,02	GC-MS
<b>Esteriol</b>	0,027 ± 0,01	HPLC

Prezența progesteronului în lapte sau, într-un termen corect, o creștere a concentrației de progesteron în lapte a fost utilizată ca un instrument de diagnostic bun în sarcină, confirmată în medicina veterinară [58].

Concentrațiile fiziologice de progesteron la vaci, lapte la diferite stări reproductive ale estrului, ziua 21 a ciclului, ciclul mediu și sarcina au fost determinate ca 5,42, 11,36, 8,53 și respectiv 11,75 ng / ml [ 59].

Nivelul măsurabil de P în produsele lactate și produsele lactate din comerț utilizând testul radioimunologic a fost de 1,4, 6, 17, 12, 98, 43 și 300 ng / ml sau ng / g în laptele degresat, laptele de unt, laptele praf degresat, lapte de băut, lapte praf, smântână și, respectiv, unt. Această investigație a confirmat din nou lipofilitatea ridicată a progesteronului [60]. Alte studii au demonstrat, de asemenea, diferențele dintre concentrațiile de progesteron din lapte și produse lactate (Tabelul 2).

**Tabel 2.** Concentrațiile (ng / ml sau ng / g) de progesteron, estrogeni din lapte și produse lactate [61]

Hormoni	Lapte	Cremă	Unt	Iaurt	Brânză Gouda
<b>Progesteron</b>	9,81	48,6	141	13,3	44,2
<b>17<math>\beta</math>-estradiol</b>	0,02	0,03	0,3	0,02	0,03
<b>Esterone</b>	<b>0,13</b>	<b>0,26</b>	<b>1,47</b>	<b>0,160</b>	<b>0,17</b>

## 2.2. Legislație și reglementare

Uniunea Europeană a emis numeroase reglementări privind utilizarea anumitor substanțe cu acțiune hormonală în creșterea animalelor. În acest paragraf, este prezentată cea mai relevantă legislație privind hormonii steroizi și matricile comestibile de origine animală.

În 1981 prin Directiva 81/602 / CEE [62], UE a interzis utilizarea substanțelor cu acțiune hormonală (17-estradiol, testosteron, progesteron, zeranol, acetat de trenbolon și acetat de megestrol (MGA)) pentru promovarea creșterii la animale. Directiva 88/146 / CEE [63] a fost promulgată interzicând administrarea atât a hormonilor sintetici (acetat de trenbolon și zeranol), cât și a administrării



hormonilor naturali (estradiol, progesteron și testosteron) în scopuri de promovare a creșterii sau îngrășare.

Comerțul cu carne și produse din carne derivate de la animale tratate cu astfel de substanțe în scopuri terapeutice sau zootehnice a fost reglementat prin 88/299 / CEE [64]. Regulamentul 2377/90 / CE al Consiliului [65] reglementează utilizarea medicamentelor veterinare prin descrierea unei proceduri pentru stabilirea limitelor maxime de reziduuri (LMR) pentru produsele veterinare din produsele alimentare de origine animală.

Directiva 96/23 / CE a Consiliului [66] reglementează controlul reziduurilor (monitorizare și supraveghere) ale medicamentelor veterinare, agenții care favorizează creșterea și contaminanții specifici la animale vii și produse de origine animală. Această directivă cuprinde controlul reziduurilor unui grup mare de produse medicinale veterinare pentru animalele producătoare de alimente, precum și pentru produsele lor primare, cum ar fi carnea, ouăle și mierea.

Prezenta directivă împarte toate reziduurile în compuși din grupa A, care cuprinde substanțe interzise (în conformitate cu 96/22 / CE [67] și anexa IV din 2377/90 / CE [68] și ca atare hormoni steroizi. Grupa B cuprinde toți autorizații autorizați produse medicinale veterinare în conformitate cu anexele I și III din 2377/90 / CE [69].

Pentru a asigura punerea în aplicare armonizată a Directivei 96/23 / CE [70], Directiva 2002/657 / CE [71] înlocuiește fostele Decizii 93/256 / CEE [72] și 93/257 / CEE [73] și reglementează implementarea metodelor analitice și interpretarea rezultatelor prin oferirea de criterii de performanță și instrucțiuni pentru validare.

Mai mult, CE 2002/657 [74] stabilesc criterii comune pentru interpretarea rezultatelor testelor și introduce o procedură pentru stabilirea progresivă a limitelor minime de performanță necesare (MRPL) pentru metodele analitice utilizate pentru detectarea substanțelor pentru care nu există limită permisă (limită maximă).

Acest lucru este deosebit de important pentru compușii a căror utilizare nu este autorizată sau este interzisă în mod specific în UE. În cadrul Deciziei Comisiei CE / 2002/657 [75], este introdus un sistem de puncte de identificare (IP) pentru a interpreta datele obținute (cromatograme, spectre) atunci când se utilizează metode de detectare, altele decât tehnicile de scanare completă. Acest sistem se bazează pe numărul și raportul ionilor din spectrul MS obținut.

Pentru confirmarea substanțelor interzise (96/23 / CE, grupa A [76] este necesar un minim de patru IP-uri [77,78,79]. De la punerea în aplicare a criteriilor 2002/657 / CE [80], un numărul de studii descrie aplicabilitatea acestor linii directe pentru determinarea hormonilor steroizi în țesuturi, grăsimi și lapte. reproductibilitate și decizie (CC) și limite de detectare (CC).

### **3. Metode actuale pentru determinarea hormonilor și a reziduurilor hormonale**

În ultimii ani, au existat îngrijorări cu privire la prezența hormonilor steroizi în matricile comestibile, acoperind o gamă largă de tipuri fizice de matrice, de la țesuturile musculare și organice (ficat și rinichi) la grăsimi și lapte. În consecință, a fost nevoie de dezvoltarea continuă a unor metode analitice îmbunătățite cu mai multe reziduuri, multimatrice și multi-tehnici.

În primul rând, aceste metode trebuie să fie suficient de sensibile pentru a acoperi nu numai limitele legislative, ci și să permită determinarea compușilor interzise, interzise sau necunoscute în urma utilizării greșite sau a utilizării neintenționate care pot duce la reziduuri în matricile de origine animală.

În al doilea rând, determinarea reziduurilor în matricile de origine animală necesită dezvoltarea unor metode de extracție și curățare înainte de detectare. Acest lucru se datorează complexității matricei și concentrațiilor scăzute (ng până la mg kg<sup>-1</sup>) care ar trebui detectate. Urina, gunoiul de grajd și părul sunt utilizate în principal pentru a monitoriza utilizarea ilegală a hormonilor steroizi, deoarece sunt disponibili înainte de sacrificare. După sacrificare, se colectează țesuturi hepatice, renale, grase sau musculare.

Părțile consumabile ale animalului, cum ar fi ficatul, rinichii și țesutul muscular, sunt țesuturile țintă pentru analiza reziduurilor. Mai mult, hormonii steroizi sunt compuși lipofili și ca atare se pot acumula în grăsimi; progestageni sunt cunoscuți pentru această proprietate specială.

În mod obișnuit, grăsimea de la nivelul rinichiului este luată la nivelul abatorului, deoarece este cea mai ușoară matrice de luat și, prin urmare, este cel mai mic prejudiciu pentru carcasă [81,82].

Pe baza literaturii disponibile, cu accent pe metodele multireziduale pentru steroizi din carne, au fost dezvoltate și sunt descrise o serie de metode analitice [83,84-90]. Sunt descrise mai puține metode pentru grăsimea renală [91], rinichi [92], ficat [93] și lapte [94,95]. De Brabander și colab. [96] a analizat pe larg posibilitățile spectrometriei de masă în determinarea reziduurilor substanțelor interzise (printre altele EGA și cortizosteroidi) în matricile animalelor producătoare de carne

Matricile de probă, destinate analizei hormonilor și reziduurilor anabolice hormonale, ar trebui să fie supuse unui proces de pregătire, care necesită etapele de extracție sau purificare și separare pentru a detecta și cuantifica analiții de interes. Mai ales în analiza reziduurilor, cum ar fi hormonii din probele de alimente originare de la animale, prezența efectului matricial a făcut ca etapele de preparare a probelor să fie laborioase, durabile și reactive.

În prepararea eșantionului de hrană de origine animală, componentele reale ale eșantionului, cum ar fi lipidele, grăsimile și proteinele, vor prezenta o complexitate a matricei în procesul de analiză a țintei analiților. În plus, gama largă de hormoni și compuși asemănători hormonilor și nivelurile minime obișnuite (ng până la μg / kg) care ar trebui detectate și cuantificate fac din analiza reziduurilor pentru hormoni o sarcină dificilă.

Pentru a detecta și a determina cele mai scăzute niveluri de reziduuri, sunt necesare activități de pretratare a eșantionului, care permit preconcentrarea analiților țintă, dar vor duce și la concentrația componentelor potențiale ale matricei care interferează [97]. În mod convențional, probele de origine animală, cum ar fi mușchiul, grăsimea, rinichii și ficatul, vor fi măcinate și / sau congelate și omogenizate și apoi extrase cu solvenți organici (metanol și acetone).

Detectarea reziduurilor și cuantificarea hormonilor și a promotorilor de creștere anabolică hormonală se fac pe scară largă prin metode de analiză imunologică și cromatografică. Aceste metode pot fi, de asemenea, clasificate ca screening și metode de analiză confirmatoare. Mijloacele cromatografice sau instrumentale pot efectua atât testul de screening, cât și testul de cuantificare. Din această cauză, acestea devin înlocuirea metodelor de screening pentru analiza metodelor bazate pe imunochimie, cum ar fi testul radioimuno (RIA) și testul imunosorbent legat de enzime (ELISA).

Nopp și colab. [98] au rezumat bine că detectarea și cuantificarea hormonilor steroizi în matricile alimentare provenite de la animale au fost dominate de metode de separare cromatografică (GC sau LC) cuplate cu diferite sisteme de detectare sensibile și specifice, cum ar fi spectrometrul de masă (MS).

În general, se menționează că GC cuplat cu un singur quad-MS sau triple quad (GC-MS-MS) a fost cea mai folosită tehnică. În prezent, sistemul cromatografic lichid (LC) cuplat cu spectrometria de

masă ca detector (LC-MS / MS) devine o tehnică mai preferată [99, 100]. În această revizuire, ambele mijloace de analiză pot fi rezumate, acordându-se atenție metodelor cromatografice.

**Tabel 3.** Determinarea hormonilor și anabolizanților hormonalți în alimentele de origine animală folosind diferite tehnici de preparare a probelor și metode analitice [101-106]

Probă (hormon)	Extracție și/sau tehnică de curățare	Solvent pentru extracție	Metoda de testare și detectoare utilizate	LOD (μg/kg)
Carne de vită (clenbuterol)	HF-SPME	Metanol (MeOH) și AA	HPLC-DAD	0,01 – 0,03 (μg/ml)
Carne de porc (grăsime topită) (MPA)	SPE (C18 cartilaj, 500 mg, 3 ml)	MeOH	HPLC-tandem MS	0,5
Carne (steroizi și corticosteroizi)	SFE și SPME SFE și SPE	CO <sub>2</sub> , MeOH ACN, AA	HPLC-UV, (coloana 100 × 5 mm RP-C18)	
Grăsime și carne de rinichi (steroid hormoni)	LSE și Si-NH <sub>2</sub> SPE	ACN hexan MeOH	GC-EI-IT-MS	0,5 - 5
Carne (hormoni steroizi)	LSEC18 SPE	ACN hexan MeOH: H <sub>2</sub> O	GC-EI-IT-MS	0,1 – 0,4
Lapte de bovină (șase tipuri de estrogen)	Deproteinizare Degrasare (ASE) LLEC18-SPE	Acid acetic MeOH:H <sub>2</sub> O Hexane ACN: H <sub>2</sub> O	HPLC-ESI-MS/MS (mod pozitiv) (ACN/apă/AA)	0,005 – 0,01
Lapte (DES)	CNTs-HF-SPME	MeOH	HPLC-UV	5,1 μg/L
Iaurt (17β-estradiol)	MIP	Acid acetic MeOH	HPLC-UV	0,03 – 0,13
<b>Produse lactate</b>				0,290,23 – 0,400,58
Iaurt Lichid Brânzeturi probiotice (estrogeni)	HF-LPME	ACN plus acid acetic	HPLC-UV	

**Notă.** AA = acid acetic, ACN = acetonitril, EI = impact de electroni, ESI = ionizare prin pulverizare de electroni, cromatografie gazoasă GC, H<sub>2</sub>O = apă, HFLPME = microextracție în fază lichidă cu fibre goale, HFSPME = microextracție în fază solidă cu fibre goale, HF-SPME = microextracție în fază solidă cu fibre goale, HPLC = cromatografie lichidă de înaltă performanță, HPLC-DAD = HPLC cu detector de fotodiode, HPLC-UV = cromatografie lichidă de înaltă performanță-cu detector UV, IT = capcană de ioni, LOD = limită de detecție, LSE = extracție lichid-solid, MeOH =

**metanol, MIP = polimer imprimat molecular, MS = spectrometrie de masă și SPE = extracție în fază solidă**

#### **4. Electroanaliza hormonilor cu ajutorul senzorilor electrochimici**

Multe metode analitice de tip au fost dezvoltate pentru a determina concentrațiile de hormoni, inclusiv tehnici cromatografice [110-113], imunoanalize [114,115], fluorescență UFLC [116] electroforeză [117,118] și metode electroanalitice [119,120]. Deși aceste metode au fost folosite cu succes, ele necesită mult timp și pași lungi pentru pretratarea probei.

Tehnicile electrochimice sunt utilizate în mare măsură pentru determinarea moleculelor electroactive în forme farmaceutice și fluide fiziologice datorită manipulării lor ușoare, simplității și costului redus [121-127]. Ca substanță electroactivă, hormonul a atras, de asemenea, mult interes din partea electrochimicilor. Abordarea electrozilor modifiți fabricați chimic în determinarea electrochimică oferă mai multe avantaje.

Ele pot reduce potențialul excesiv, pot crește viteza de reacție și sensibilitatea, pot îmbunătăți selectivitatea și reprezintă LOD bun [128-133]. Electrozii modifiți cu polimeri fabricați prin electropolimerizare au primit un interes larg în detectarea biomoleculelor datorită selectivității sale ridicate, sensibilității și omogenității în depunerea electrochimică, aderenței puternice la suprafața electrodului și stabilității chimice a filmelor [134,135].

Protiva Rain Roy și colab. [136] a raportat electroanaliza simultană a dopaminei și a acidului ascorbic utilizând electrod modificat cu poli- (N, N-dimetilanilină). Milczarek și Ciszewski au raportat o modificare a electrodului cu film polimeric de 2,2-bis (3-Amino-4-hidroxifenil) hexafluoropropan și au studiat activitățile electrocatalitice către oxidarea DA, UA și AA [137].

Recent, senzorii electrochimici au fost folosiți pe scară largă în detectarea proteinelor, acizilor nucleici, hormonilor și pesticidelor. Împreună cu specificitatea și sensibilitatea ridicată a metodelor de imunotest, senzorii electrochimici au caracteristici importante, cum ar fi o limită de detecție scăzută, o analiză rapidă, ușurința de manipulare, un cost redus și un fundal endogen redus folosind diferite tipuri de electrozi [138]. Mai multe tehnologii, cum ar fi nanoparticulele de aur și microbule paramagnetice, au fost utilizate pe scară largă în senzorii electrochimici pentru a îmbunătăți limitele de detecție [139].

Analiza alimentelor se efectuează la sfârșitul procesului de producție folosind tehnici convenționale, cum ar fi cromatografia, spectrometria de masă, detectarea ultraviolete sau tehnici de fluorescență, fie individual, fie combinate cu alte tehnici de separare [140, 141].

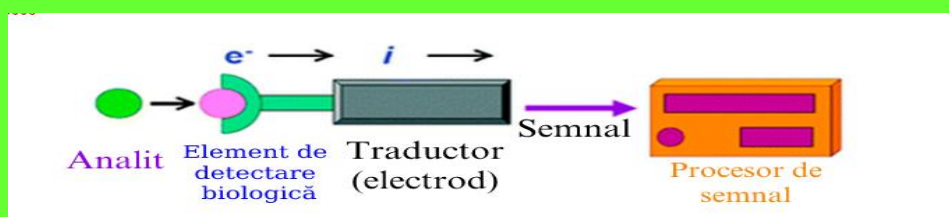
Aceste abordări tradiționale au mai multe limitări. În primul rând, deoarece analiza se efectuează la sfârșitul procesului, produsele contaminate pot trece prin întregul lanț de producție sau chiar pot fi introduse pe piață înainte de a se observa contaminarea. În al doilea rând, aceste metode de analiză sunt laborioase și complexe, costisitoare, consumatoare de timp, necesită volume mari de eșantioane și personal calificat [142].

În acest context, senzorii pot oferi o alternativă posibilă pentru a permite screeningul probelor de alimente înainte de sfârșitul procesului de producție [143]. Mai mult, senzorii oferă, de asemenea, monitorizare rapidă și la fața locului și informații în timp real despre procesul de producție [144]. Dintre diferiții senzorii electrochimici au fost folosiți pe scară largă datorită mecanismelor de biointeracțiune bine înțelese și a procesului de detectare [145]. Senzorii electrochimici pot reprezenta instrumente

inteligente de detectare a produselor alimentare ca parte a unui sistem de analiză precisă, sensibilă, specifică și rapidă [146,147].

Aceste dispozitive conțin un element de recunoaștere biologică, ca și ceilalți senzori (enzime, proteine, anticorpi, acizi nucleici, celule, țesuturi sau receptori), reacționând în mod specific cu analitul țintă și producând un semnal electric legat de concentrația analitului. O reprezentare schematică a unui senzor electrochimic este prezentată în Figura 2.

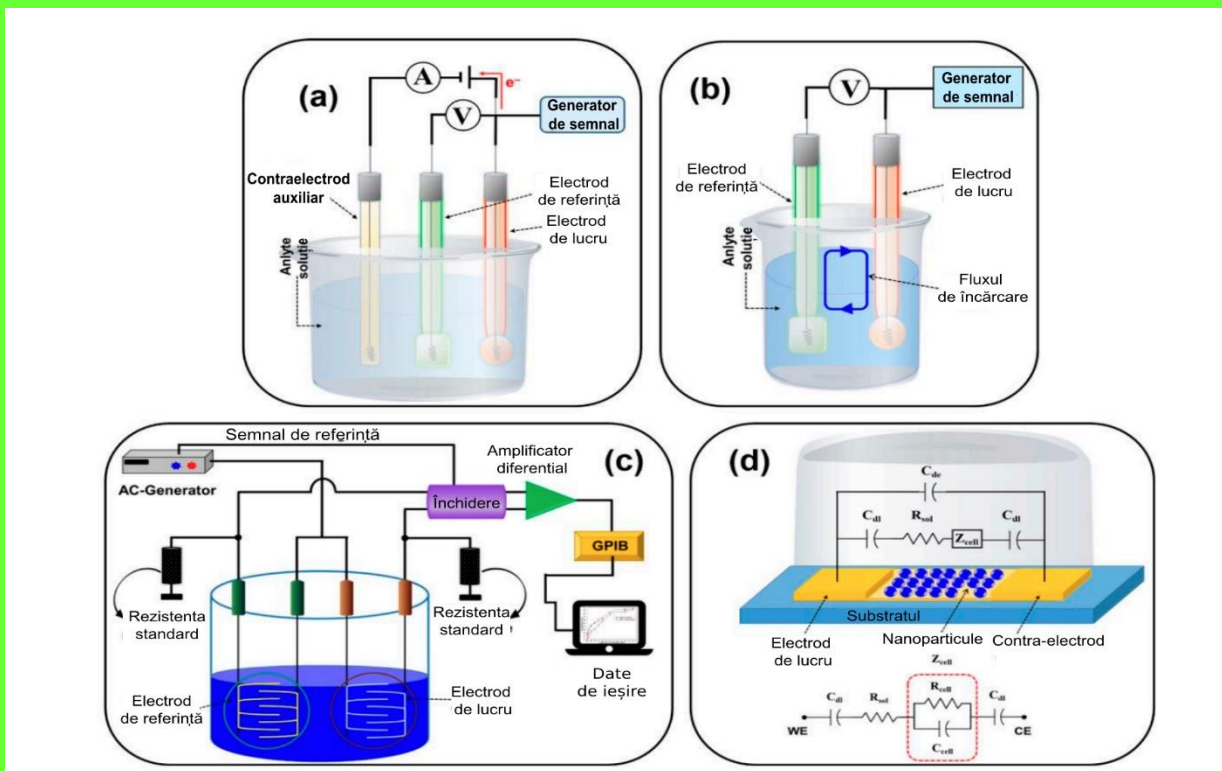
Dintre diferitele tipologii de senzori, cele electrochimice combină sensibilitatea, așa cum se indică prin limite de detecție scăzute, a traductoarelor electrochimice cu specificitatea ridicată a proceselor de biorecunoaștere [148]. Aceste dispozitive conțin un element de recunoaștere biologică, ca și ceilalți biosenzori (enzime, proteine, anticorpi, acizi nucleici, celule, țesuturi sau receptori), reacționând în mod specific cu analitul țintă și producând un semnal electric legat de concentrația analitului. O reprezentare schematică a unui senzor electrochimic este prezentată în Figura 2.



**Figura 2.** Schema unui senzor cu un traductor electrochimic [148]

Electrodul de lucru / senzor acționează ca un element de transducție, în timp ce un contraelectrod stabilește o legătură între soluție și suprafața electrodului de detectare [149]. Tehnicile electrochimice au fost considerate instrumente utile pentru analiza siguranței alimentelor. Sunt ieftine, portabile, ușor de manevrat și rapide. Astfel, ele pot fi preferate celorlalte tehnici analitice. Pentru mai multe detalii despre teoriile care stau la baza diferitelor abordări electrochimice utilizate în zona de biosensibilizare, sunt cunoscute mai multe cărți și recenzii din literatură [150, 151-154].

Clasificați pe principiul transducției și apoi pe tehnica electrochimică corespunzătoare, senzorii electrochimici sunt clasificați ca (a) potențiomtric, (b) amperometric, (c) impedimetric, (d) conductometric și (e) voltammetric, așa cum se arată în Figura 3 .



**Figura 3.** Diagrama schematică a (a) amperometrică / voltammetrică, (b) potențiomtrică, (c) senzorilor conducto-metrici și (d) senzorului impedimetric cu echivalența relativă ( $C_{dl}$  = capacitatea dublu strat a electrozilor,  $R_{sol}$  = rezistența soluției,  $C_{de}$  = capacitatea electrodului,  $Z_{cell}$  = impedanță introdusă de nanoparticulele legate, iar  $R_{cell}$  și  $C_{cell}$  sunt rezistența și capacitatea în paralel) [155].

#### 4.1. Aplicarea senzorilor electrochimici în analiza hormonilor prezenți în alimente

##### 4.1.1. Determinarea estrogenilor cu ajutorul senzorilor electrochimici

Substanțele chimice care perturb sistemul endocrin (EDC) sunt contaminanți / poluanți ai mediului și sunt, de asemenea, cunoscuți ca și compuși care perturbă hormonii [181]. OMS este deosebit de sensibilă la problema prezenței și determinării perturbatorilor endocrini [156]. În plus, EDC reprezintă o clasă largă de molecule, cum ar fi pesticide (a se vedea, de exemplu, trifluralin [157]) și substanțe chimice industriale, materiale plastice și plastifianți, combustibili și multe alte substanțe chimice prezente în mediu.

**Tabelul 4.** Caracteristicile analitice ale senzorilor electrochimici pentru estrogeni [158-160]

Electrod	Format Sensor	Tehnică Electrochimică	Probă/Analiză	L.R.	LOD
BDDE	Senzor electrochimic, folosind un catodic diamant dopat cu bor pretratat (Cpt-BDD) electrod combinat cu Metoda de extracție	SWV	E,E-dienestrol/ țesut de pește	$2.30 \times 10^{-7} - 9.69 \times 10^{-6} \text{ M}$	$5.43 \times 10^{-8} \text{ M}$



<b>SPCE</b>	Aptasenzor impedimetric pe bază de carbon electrod SPC modificat prin nanodots	EIS	17b-estradiol/apă	$1.0 \times 10^{-7}$ – $1.0 \times 10^{-12}$ M	$0.5 \times 10^{-12}$ M
<b>AuE</b>	Biosenzor electrochimic bazat pe puncte cuantice grafen (GQD)/polimer conducător și lacază electrozi de aur modificați	CV	17b-estradiol/nr mostre reale	$0.1-120 \times 10^{-6}$ M	1 mM

**Abrevieri: AuE: electrod de aur; BDDE: diamant dopat cu bor electrod; CV: voltametrie ciclică; SPCE: electrod de carbon serigrafiat;**

Dintre substanțele chimice care afectează sistemul endocrin, ar fi estrogenul, capabil să interfereze cu metabolismul hormonal din organismele umane, afectând astfel funcțiile fiziologice, cum ar fi creșterea, dezvoltarea și reproducerea. De obicei, estrogenii din mediu sunt împărțiți în produse naturale, cum ar fi 17β-estradiol (E2), estronă (E1) și estriol (E3) și forme sintetice, cum ar fi bisfenol A (BPA) [161,162], 17α-etinilestradiol (EE2), dietilstilbestrolul (DES) și alții. Estrogenii naturali sunt sintetizați în organismul uman și animal, iar estrogenii sintetici sunt în general utilizați ca agenți activi în contracepție sau terapie hormonală [163].

Acești estrogeni pot pătrunde pe căile navigabile după excreția de la oameni și animale, adăugându-se la estrogenii naturali și medicamente veterinare excretate de animale în multe zone rurale. În acest context, este inevitabil ca estrogenii să poată accesa lanțul alimentar și să afecteze sănătatea publică. Datorită lipofilicității lor, estrogenii se pot acumula în țesuturile adipoase [164]. Estrogenii exogeni sunt eliminați foarte lent, astfel interferând cu funcția și metabolismul sistemului endocrin. Prin urmare, este de o mare importanță monitorizarea contaminării cu estrogeni exogeni în apă și alimente.

Foarte recent, au fost publicate recenzii interesante axate pe metode privind determinarea estrogenilor în matricile alimentare. În special, Gunatilake [165] a revizuit noile evoluții metodologice pentru a determina cinci estrogeni steroidieni, estriol, 17α-estradiol, 17β-estradiol, estronă și etinilestradiol în matricile alimentare, inclusiv produse lactate, pește, carne. În plus, s-a acordat o atenție semnificativă metodelor și abordărilor analitice, care permit determinarea directă a contaminantului, optimizând timpul de analiză și protocoalele.

Bala [166] a raportat o privire de ansamblu privind progresele recente în senzorii electrochimici pe baza spectroscopiei de impedanță electrochimică pentru a detecta perturbatori endocrini, inclusiv estrogeni sintetici. În această revizuire, a fost subliniat faptul că senzorii bazați pe EIS pot fi ușor implementați în dispozitive complet automatizate prin integrarea electrozilor în cipuri microfluidice. În cele din urmă, Sun [167] a descris pe larg evoluțiile recente în senzori pentru a detecta estrogeni în mediu

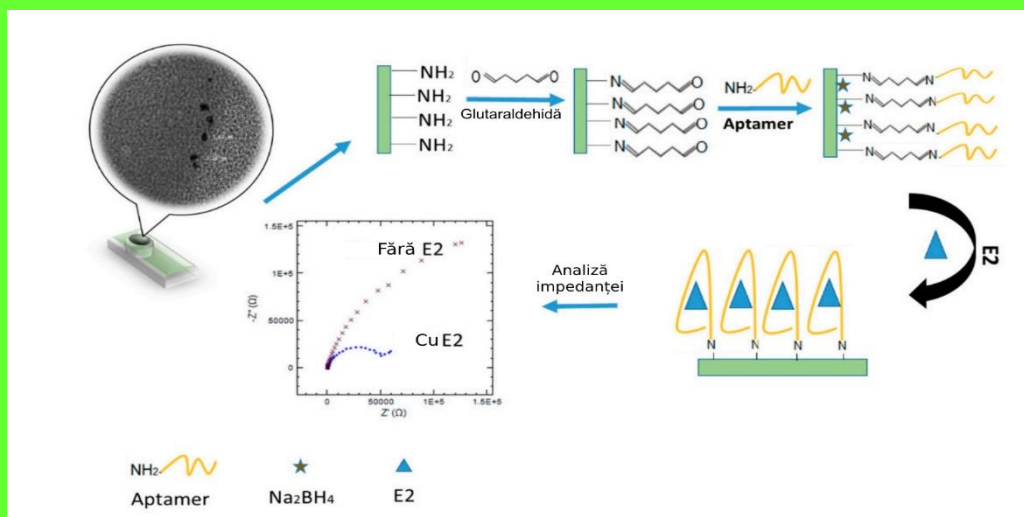
și alimente, inclusive senzori pe bază de molecule, senzori pe bază de celule și senzori pe bază de organisme.

În special, au fost luate în considerare lucrările publicate în 2017-2019 și axate pe metode de detectare a estrogenilor și utilizarea nanomaterialelor pentru dezvoltarea senzorilor, evidențiind avantajele și limitările diferitelor tipuri de senzori.

Oliveira [168] și colegii săi au descris un senzor electrochimic promițător pentru a monitoriza estrogenul sintetic E, E-dienestrol (E, E-DNL) în țesutul peștilor, folosind un electrod cu diamant pretratată catodic borat (Cpt-BDD) combinat cu electrodul rapid, metodă de extracție ușoară, ieftină, eficientă, robustă și sigură (QuEChERS). Un domeniu de concentrație liniară de la  $2,30 \times 10^{-7}$  la  $9,69 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> din E, E-DNL, cu o limită de detecție de  $5,43 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, a fost evidențiat un test de repetabilitate și reproductibilitate bun. Procedura a fost aplicată cu succes pentru a cuantifica E, E-DNL în extractele QuEChERS din țesutul hepatic de tilapia Nilului (*Oreochromis niloticus*) cu o recuperare cuprinsă între 92,3 și 98,8%.

Haniphah [169] a proiectat și asamblat un aptasenzor impedimetric simplu și sensibil bazat pe nanodoturi de carbon conductoare (CD) pentru a detecta 17b-estradiol (E2). Nanodoturile de carbon au fost electrodepozitate pe un electrod serigrafat (SPE), acționând ca o platformă pentru imobilizarea sondei aptamer 76<sup>-mer</sup>. Figura 4 prezintă fluxul pasului procesului pentru fabricarea și asamblarea aptasenzorului impedimetric pentru a determina 17b-estradiol. Apasenzorul impedimetric a prezentat un interval de concentrație liniară de la  $1,0 \times 10^{-7}$  la  $1,0 \times 10^{-12}$  M, cu o limită de detecție de  $0,5 \times 10^{-12}$  M.

Senzorul dezvoltat a arătat o selectivitate ridicată spre E2 în prezența progesteronului (PRG), estriol (E3). Mai mult, rata medie de recuperare pentru probele de apă de râu cu vârfuri a variat de la 98,2% la 103,8%, ceea ce demonstrează apasenzorul posibilă aplicație pentru detectarea E2 în probele de apă.



**Figura 4.** Reprezentarea schematică a strategiei de imobilizare și detectarea hibridizării a 17 b-estradiol pe aptamer / CD-uri / SPCE [170]

În cele din urmă, doi senzori bazați pe puncte cuantice grafene (GQDs) / electrozi de aur lacas (Au) au fost dezvoltați de Cabaj și colegii săi [171]. Procesul de determinare a hormonilor sa bazat pe reacția redox catalizată de enzima lacază. În condiții optimizate, senzorul a prezentat un interval liniar de la  $0,1-120 \times 10^{-6}$  M) cu o limită de detecție de aproximativ 1 μM. Mai mult, metoda a fost aplicată cu succes pentru determinarea hormonilor în prezența compușilor care interferează, cum ar fi acidul

ascorbic, L-cisteina, acidul uric. Ca ultim comentariu, ar trebui să fie importantă o investigație a aplicabilității senzorului la probe reale, de exemplu, în apă.

## **5. Impactul hormonilor asupra sănătății**

### **5.1. Impactul asupra sănătății a hormonilor prezenți în alimentele de origine animală**

În prepararea eșantionului de hrană de origine animală, componentele reale ale eșantionului, cum ar fi lipidele, grăsimile și proteinele, vor prezenta o complexitate a matricei în procesul de analiză a țintei analiților. În plus, gama largă de hormoni și compuși asemănători hormonilor și nivelurile minime obișnuite (ng până la  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ) care ar trebui detectate și cuantificate fac din analiza reziduurilor pentru hormoni o sarcină dificilă.

În general, hormonii ca reziduu în alimente (în principal lactate și carne), după intrarea în corpul uman, pot afecta sistemul endocrin și ar putea fi considerați ca fiind compuși perturbatori endocrini (EDC). Acesta ar putea fi un factor de risc potențial pentru creșterea bolilor dependente de estrogen, cum ar fi cancerul de sân la femei și se poate expune la alte probleme ale sistemului reproductiv [172,173].

Diferite studii epidemiologice au arătat o corelație puternică între consumul de carne și produse lactate și rata de incidență a cancerelor mamare, ovariene și ale corpului uterin feminin. Mai exact,  $17\beta$ -estradiolul (E2) este cel mai activ estrogen și estrogen natural, care poate fi toxic și cancerigen, chiar și la niveluri scăzute [174, 175].

#### **5.1.1. Estrogenii**

Concentrația de estrogeni naturali în hrană variază de la specie la specie, împreună cu vârsta, sexul și starea fiziologică [176]. Laptele este considerat a fi una dintre sursele puternice de steroizi, inclusiv estrogeni [177]. Rezultatele investigațiilor epidemiologice la scară largă au evidențiat faptul că  $17\beta$ -estradiolul, ca și cancerigen mamare, acționează atât ca inițiator, cât și ca promotor al carcinogenezei mamare.

#### **5.1.2. Zeranol**

Cercetările efectuate pe culturi de celule epiteliale umane prin tratamente repetate cu zeranol s-au dovedit a reduce timpul de dublare a celulelor, stimulând formarea coloniilor [178]. Zeranolul administrat oral a arătat efecte estrogenice slabe în studiile de toxicitate pe termen lung folosind șobolani, câini și maimuțe prin modificări ale glandelor mamare și ale organelor de reproducere [178]. În mai multe studii genotoxice in vitro și in vivo, zeranolul și metaboliții săi, zearalenona și taleranolul, au fost negative [179].

#### **5.1.3. Dietilstilbestrolul (DES)**

Diverse rapoarte au sugerat că DES are proprietăți mutagenice, cancerigene și teratogene, care au ridicat probleme de sănătate publică pe scară largă [180]. Utilizarea sa în produsele alimentare veterinare ca stimulent al creșterii animalelor a fost interzisă în mai multe țări (din 1979 în SUA și 1981 în UE). Prin urmare, UE a propus o limită minimă de performanță necesară (MRPL) de 0,5-2,0  $\mu\text{g} / \text{kg}$  pentru a-și controla abuzul la animalele producătoare de carne [181].

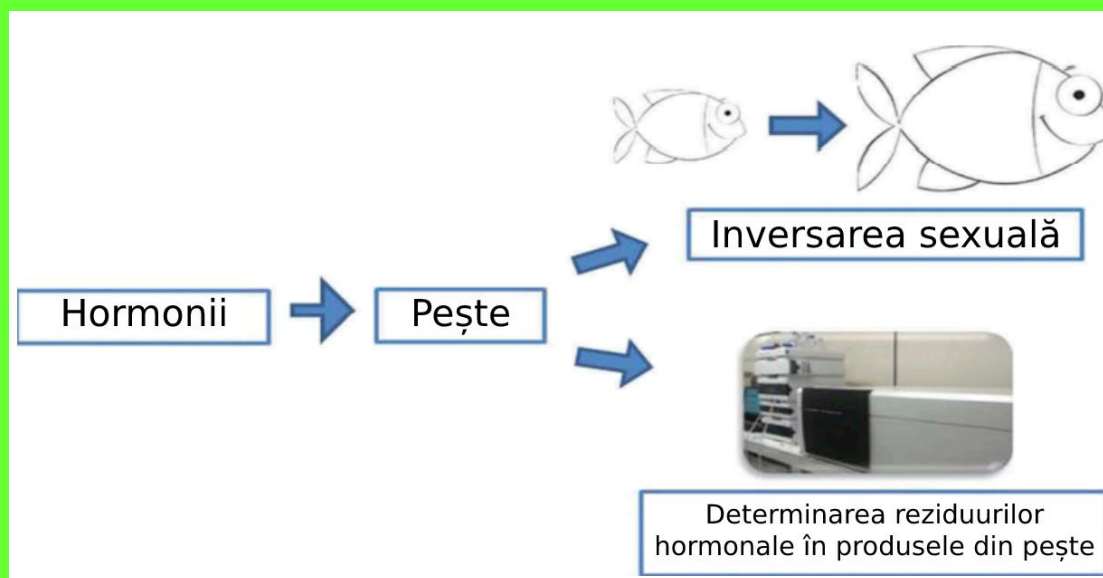
#### **5.1.4. Progesteronul**

Într-un studiu efectuat pe o femeie aflată în postmenopauză, progesteronul (200-300 mg / zi / oral) și estradiolul (1,5 sau 3 mg / zi / percutanat) au fost administrați timp de cinci ani și nu au existat dovezi de hiperplazie endometrială sau carcinom după cinci ani. ani de tratament cu estradiol și

progesteron [182]. Aceste rezultate de la animale de laborator ar putea fi indicații pentru a considera progesteronul ca una dintre cauzele potențiale ale problemelor de sănătate publică. Într-un alt studiu, progesteronul nu a demonstrat nicio dovadă de genotoxicitate [183].

### 5.1.5. $\beta$ -agoniști

Conform diferitelor descoperiri ale cercetărilor, atunci când  $\beta$ -agoniștii, cum ar fi clenbuterolul, se acumulează dincolo de o anumită concentrație în organism, din cauza unei afinități mai mari față de receptori, acestea provoacă reacții care declanșează tremurături musculare, tahicardie și dureri musculare [184].



**Figura 5.** Hormonii sunt utilizați în piscicultură pentru a crește producția de pește atunci când un sex al unei specii are capacitatea de a crește mai mare și mai repede decât celălalt sex [185].

### Concluzii

Dezvoltarea unor abordări de detectare extrem de sensibile, fiabile, robuste, portabile și rentabile a devenit fundamentală pentru a garanta siguranța alimentelor, abordând problema critică a infecției / contaminării produselor alimentare din mai multe cauze, cum ar fi bacteriile, contaminanții, alergeni, droguri etc.

Având în vedere dezavantajele abordărilor analitice convenționale, cum ar fi protocoalele analitice complexe, durata lungă a procedurii analitice, operațiunea costisitoare și personalul calificat, este destul de clar că abordarea biosensibilizării este foarte atractivă din mai multe motive: ușor de manevrat, relativ redus cost, sensibilitate bună și miniaturizare ușoară. În acest domeniu, senzorii electrochimici sunt instrumente de detectare emergente, mai ales dacă nanomaterialele pot îmbunătăți performanțele analitice. Cu toate acestea, ar trebui confruntate mai multe probleme și provocări.

De exemplu, unele protocoale analitice descrise implică utilizarea de reactivi sensibili și proceduri în mai mulți pași, care măresc timpul și costul măsurării, ceea ce face ca introducerea lor în domeniul siguranței alimentare și al domeniului de reglementare să fie foarte complicată. Mai mult, majoritatea analizelor descrise s-au adresat cuantificării analitului țintă doar în soluții apoase sau probe sintetice (preparate prin adăugarea contaminantului într-o etapă intermediară sau chiar la sfârșitul preparării probei) și doar câteva analizează probe reale.

Pentru a rezuma, tehnologia serigrafiată aplicată senzorilor electrochimici în controlul calității alimentelor oferă caracteristici importante, cum ar fi miniaturizarea setărilor de măsurare, un cost redus de producție în masă, proceduri ușoare de utilizare și, de asemenea, posibilitatea de a utiliza astfel de dispozitive cu volume mici de probe. În plus, o selecție adecvată a nanomaterialelor utilizate pentru construcția lor poate îmbunătăți, de asemenea, timpul de răspuns și poate spori selectivitatea și sensibilitatea.

Sunt necesare programe de conștientizare publică și campanii de mobilizare comunitară pentru a alerta comunitatea agricolă, profesioniștii din industria alimentară și proprietarii industriei cu privire la consecințele negative și la potențialele efecte asupra sănătății publice legate de utilizarea și utilizarea incorectă a hormonilor și a anabolizanților hormonalni la animalele crescute pentru hrana umană.

Utilizarea hormonilor și a promotorilor de creștere anabolică hormonală ar trebui să fie întotdeauna în sarcina profesioniștilor veterinari și trebuie să existe programe stricte de monitorizare a reglementărilor.

Metodele analitice sensibile, selective, exacte și eficiente din punct de vedere al costurilor în ceea ce privește timpul și consumul de reactivi trebuie selectate, dezvoltate, validate și utilizate.

Se recomandă mai întâi utilizarea metodelor imunologice de analiză ca instrument de screening pentru a limita numărul de probe care necesită teste de confirmare. Apoi, procesul de testare ar trebui să fie mărit cu metode excelente de preparare a probelor de ultimă tehnologie pentru a evita efectul matricei probelor și pentru a crește concentrația analitului de interes.

Studiile de cercetare până în prezent, cu privire la utilizarea hormonilor și a anabolizanților hormonalni ar trebui să fie sintetizate în continuare, iar impactul potențial al acestor compuși asupra consumatorilor trebuie studiat în profunzime.

### Referințe

1. N. VanHoof, D. Courtheyn, D. J. P. Antignac et al., "Multiresidue liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of beta agonists in urine using molecular imprinted polymers," *Rapid Communication in Mass Spectrometer*, vol. 19, no. 19, pp. 2801–2808, 2005.
2. H. Noppe, B. Le Bizec, K. Verheyden, and H. F. De Brabander, "Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices," *Analytica Chimica Acta*, vol. 611, no. 1, pp. 1–16, 2008.
3. H. Galbraith, "Hormones in international meat production: biological, sociological and consumer issues," *Nutrition Research Reviews*, vol. 15, no. 2, pp. 243–314, 2002.
4. P. Annamaria, "Steroid hormones in food producing animals," in *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine* IntechOpen, London, UK, 2012.
5. D. Courtheyn, B. Le Bizec, G. Brambilla et al., "Recent developments in the use and abuse of growth promoters," *Analytica Chimica Acta*, vol. 473, no. 1-2, pp. 71–82, 2002.
6. A. A. M. Stolker and U. A. T. Brinkman, "Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review," *Journal of Chromatography A*, vol. 1067, no. 1-2, pp. 15–53, 2005.
7. E. S. E. Hafez, M. R. Jainudeen, and Y. Rosnina, "Hormones and growth factors in reproduction," "Hormones and growth factors in reproduction," in *Reproduction in Farm Animals*, B. Hafez and E. Hafez, Eds., pp. 108–120, Wiley-Blackwell, Lindon, UT, USA, 7th edition, 2013
8. P. Fernandes, J.M.S. Cabral, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2335.
9. V. Piironen, D.G. Lindsay, T.A. Miettinen, J. Toivo, A.-M. Lampi, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 939.
10. S.L. Abidi, *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 173.



11. M.J. Lagarda, G. Garc'ia-Llatas, R. Farre, J. Pharmaceut. ´ Biomed. Anal. 41 (2006) 1486.
12. H.S.M. Ahmida, P. Bertucci, L. Franzo, R. Massoud, C. ` Cortese, A. Lala, G. Federici, J. Chromatogr. B 842 (2006) 43.
13. S. Rozner, N. Garti, Colloid Surf. A 282–283 (2006) 435.
14. R. Santos, E. Limas, M. Sousa, M. da Conceic,ao Castilho, F. ~ Ramos, M.I.N. da Silveira, Food Chem. 102 (2006) 113.
15. Y.-T. Lin, S.-S. Wu, H.-L. Wu, J. Chromatogr. A 1156 (2007) 280.
16. R.E. Ostlund, Curr. Opin. Lipidol. 15 (2004) 37.
17. R. Draisci, R. Merlanti, G. Ferretti, L. Fantozzi, C. Ferranti, F. Capolongo, S. Sefato, C. Montesissa, Anal. Chim. Acta 586 (2007) 171.
18. S. Poelmans, K. De Wasch, Y. Martele, R. Schilt, N. Van Hoof, ´ H. Noppe, T. Verlsycke, C.R. Janssen, D. Courtheyn, H.F. De Brabander, Proceedings EuroFoodChem XIII, Bruges, Belgium, 2003, p. 74.
19. K. Verheyden, H. Noppe, V. Mortier, J. Vercruysee, E. Claerebout, F. Van Immerseel, C.R. Janssen, H.F. De Brabander, Anal. Chim. Acta 586 (2007) 163.
20. M.J. Tikkanen, Handb. Exp. Pharmacol. 170 (2005) 215.
21. S. Impens, The use of gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC–MS–MS) for optimization of targeted research on residues in matrices of animal origin, Ph.D. Thesis, Ghent University, Ghent, Belgium, 2002, p. 201, ISBN 90-5864-025-6.
22. M. E. Dikeman, “Effects of metabolic modifiers on carcass traits and meat quality,” Meat Science, vol. 77, no. 1, pp. 121–135, 2007.
23. H. F. De Brabander, B. Le Bizec, G. Pinel et al., “Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals,” Journal of Mass Spectrometry, vol. 42, no. 8, pp. 983–998, 2007.
24. EU/EC, “Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin,” Official Journal of European Commissions, vol. 37, pp. 1–72, 2010.
25. EU/EC, “Amending council directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having hormonal or thyreostatic action and of beta agonists,” European Community Council (ECC) Directive 2003/74/EC of 22 September 2003, Official Journal of European Commissions, vol. 262, pp. 17–21, 2003.
26. D. Courtheyn, B. Le Bizec, G. Brambilla et al., “Recent developments in the use and abuse of growth promoters,” Analytica Chimica Acta, vol. 473, no. 1-2, pp. 71–82, 2002.
27. U S–FDA, “Tolerances for residue of new animal drugs in food,” in Animal Drugs, Feeds, and Related Products, Implantation or Injectable Dosage form New Animal Drugs, Code of Federal Regulation (CITE: 21CFR 522)Vol. 6, FDA, Silver Spring, MD, USA, 2017.
28. U S–FDA, “Implantation or injectable dosage form new animal drugs, zeranol,” in Animal Drugs, Feeds, and Related Products, Code of Federal Regulation (CITE 21CFR 556.760) Vol. 6, FDA, Silver Spring, MD, USA, 2017.
29. U S–FDA, “Tolerances for residue of new animal drugs in food, trenbolone,” in Animal Drugs, Feeds, and Related Products, Code of Federal Regulation (CITE: 21CFR 556.739) Vol. 6, FDA, Silver Spring, MD, USA, 2017.
30. U S–FDA, “Oral dosage form new animal drugs, clenbuterol syrup,” in Animal Drugs, Feeds, and Related Products, Code of Federal Regulation (CITE 21CFR 520.452)Vol. 6, FDA, Silver Spring, MD, USA, 2017.
31. EU/EC, “Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin,” Official Journal of European Commissions, vol. 37, pp. 1–72, 2010.



32. CAC, "Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations for residues of veterinary drugs in foods," in Codex Alimentarius Commission (CAC)/MRL 2- 2017, pp.
33. JECFA, "Evaluation of certain veterinary drug residues in food," in Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) vol. 52, WHO Technical Report Series 893 pages, WHO Technical Report Series, Geneva, Switzerland, 2000. 1–84, CAC, Japan, 2017.
34. D. Courtheyn, B. Le Bizec, G. Brambilla, H.F. De Brabander, E. Cobbaert, M. Van de Wiele, J. Vercammen, K. De Wasch, *Anal. Chim. Acta* 473 (2002) 71.
35. J.-P. Antignac, B. Bizec, F. Monteau, F. Poulain, F. Andre, J. *Chromatogr. B* 757 (2001) 11.
36. J.-P. Antignac, F. Monteau, J. Negrolli, F. Andr´e, B. Le Bizec, *Chromatographia* 59 (2004) 1. [29] B. Shao, R. Zhao, J. Meng, Y. Xue, G. Wu, J. Hu, X. Tu, *Anal. Chim. Acta* 548 (2005) 41.
37. H.F. De Brabander, B. Le Bizec, G. Pinel, J.-P. Antignac, K. Verheyden, V. Mortier, D. Courtheyn, H. Noppe, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 983.
38. H. Noppe, K. Verheyden, W. Gillis, D. Courtheyn, P. Vanthemsche, H.F. De Brabander, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 22.
39. A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15.
40. A. Daxenberger, D. Ibarreta, H.H.D. Meyer, *Hum. Reprod. Update* 7 (2001) 340.
41. U S–FDA, "Tolerances for residue of new animal drugs in food," in *Animal Drugs, Feeds, and Related Products, Implantation or Injectable Dosage form New Animal Drugs, Code of Federal Regulation (CITE: 21CFR 522)* Vol. 6, FDA, Silver Spring, MD, USA, 2017.
42. P. E. Strydom, L. Frylinck, J. L. Montgomery, and M. F. Smith, "A comparison of three  $\beta$ -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle," *Meat Science*, vol. 81, no. 3, pp. 557–564, 2009.
43. U S–FDA, "Implantation or injectable dosage form new animal drugs, zeranol," in *Animal Drugs, Feeds, and Related Products, Code of Federal Regulation (CITE 21CFR 556.760)* Vol. 6, FDA, Silver Spring, MD, USA, 2017.
44. Hassan MALEKINEJAD, Aysa REZABAKHSH, *Hormones in Dairy Foods and Their Impact on Public Health*, Iran J Public Health, Vol. 44, No.6, Jun 2015, pp.742-758.
45. Collier RJ, Miller MA, Hildebrandt JR, Torkelson AR, White TC, Madsen KS, Vicini JL, Eppard PJ, Lanza GM (1991). Factors affecting insulin-like growth factor-I concentration in bovine milk. *J Dairy Sci*, 74 (9):2905-2911.
46. Atroshi F, Rizzo A, Osterman T, Parantainen J (1989). Free fatty acids and lipid peroxidation in normal and mastitic bovine milk. *Zentralbl Veterinarmed*, A 36 (5):321-330.
47. Hansel W, Hixon J, Shemesh M, Tobey D (1976). Concentrations and activities of prostaglandins of the F series in bovine tissue, blood and milk. *J Dairy Sci*, 59 (7):1353-1365.
48. Schams D, Karg H (1986). Hormones in milk. *Ann N Y Acad Sci*, 464:75-86.
49. Foulkes JA, Cookson AD, Sauer MJ (1982). Artificial insemination of cattle based on daily enzyme immunoassay of progesterone in whole milk. *Vet Rec*, 111 (13):302-303.
50. Atroshi F, Parantainen J, Kangasniemi R, Osterman T (1987). Milk prostaglandins and electrical conductivity in bovine mastitis. *Vet Res Commun*, 11 (1):15-22.
51. Andersson AM, Skakkebaek NE (1999). Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *Eur J Endocrinol*, 140 (6):477-485.
52. Vadgama JV, Wu Y, Datta G, Khan H, Chillar R (1999). Plasma insulin-like growth factor-I and serum IGF-binding protein 3 can be associated with the progression of breast cancer, and predict the risk of recurrence and the probability of survival in African-American and Hispanic women. *Oncology*, 57 (4):330-340.
53. Hoffmann B, Hamburger R, Hollwich W (1977). Determination of progesterone directly in milk fat as an improved method for fertility control in cattle. *Zuchthygiene*, 2 (1):1-7.

54. Rioux P, Rajotte D (2004). Progesterone in milk: a simple experiment illustrating the estrous cycle and enzyme immunoassay. *Adv Physiol Educ*, 28 (1-4):64-67.
55. Hoffmann B, Hamburger R, Karg H (1975). Natural occurrence of progesterone in commercial milk products (author's transl). *Z Lebensm Unters Forsch*, 158 (5):257-259.
56. Hassan MALEKINEJAD, Aysa REZABAKHSH, Hormones in Dairy Foods and Their Impact on Public Health, Iran *J Public Health*, Vol. 44, No.6, Jun 2015, pp.742-758.
57. Directive 81/206/EEC, Off. J. Eur. Comm., L222 (1981) 32.
58. Directive 88/146/EEC, Off. J. Eur. Comm., L70 (1988) 16.
59. Directive 88/299/EEC, Off. J. Eur. Comm., L128 (1988) 36.
60. Commission Regulation 2377/90, Off. J. Eur. Comm., L224 (1990) 1.
61. Council Directive 96/22/EC, Off. J. Eur. Comm., L125 (1996) 3.
62. Council Directive 96/23/EC, Off. J. Eur. Comm., L125 (1996) 10
63. Commission Decision 2002/657/EC, Off. J. Eur. Comm., L221 (2002) 8.
64. Commission Decision 93/256/EEC, Off. J. Eur. Comm., L118 (1993) 64.
65. Commission Decision 93/257/EEC, Off. J. Eur. Comm., L118 (1993) 75.
66. F. Andre, K. De Wasch, H.F. De Brabander, S. Impens, L.A.M. ´ Stolker, L. Van Ginkel, R. Stepahny, R. Schilt, D. Courtheyn, Y. Bonnaire, P. Furst, P. Gowik, G. Kennedey, T. Kuhn, J.-P. ´ Moretain, M. Sauer, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 435.
67. J.-P. Antignac, B. Le Bizec, F. Monteau, F. Andre, *Anal. Chim. ´ Acta* 483 (2003) 325.
68. S. Impens, The use of gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC–MS–MS) for optimization of targeted research on residues in matrices of animal origin, Ph.D. Thesis, Ghent University, Ghent, Belgium, 2002, p. 201, ISBN 90-5864-025-6.
69. A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15.
70. B. Shao, R. Zhao, J. Meng, Y. Xue, G. Wu, J. Hu, X. Tu, *Anal. Chim. Acta* 548 (2005) 41.
71. S. Hartmann, H. Steinhart, *J. Chromatogr. B* 704 (1997) 105.
72. E. Daeseleire, R. Vandeputte, C. Van Peteghem, *Analyst* 123 (1998) 2595.
73. S. Impens, K. De Wasch, M. Cornelis, H.F. De Brabander, *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 235.
74. B. LeBizec, P. Marchand, C. Gade, D. Maume, F. Monteau, F. ´ Andre, Proceedings of the EuroResidue IV Conference, ´ Veldhoven, 2000, p. 226.
75. P. Marchand, B. Le Bizec, C. Gade, F. Monteau, F. Andre, *J. ´ Chromatogr. A* 867 (2000) 219.
76. J. Seo, H. Kim, B.C. Chung, J. Hong, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 303.
77. C. Blasco, C. Van Poucke, C. Van Peteghem, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 230.
78. H. Malekinejad, P. Scherpenisse, A.A. Bergwerf, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9785
79. H.F. De Brabander, B. Le Bizec, G. Pinel, J.-P. Antignac, K. Verheyden, V. Mortier, D. Courtheyn, H. Noppe, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 983.
80. C. Blasco, C. Van Poucke, and C. Van Peteghem, “Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1154, no. 1-2, pp. 230–239, 2007.
81. H. Noppe, B. Le Bizec, K. Verheyden, and H. F. De Brabander, “Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 611, no. 1, pp. 1–16, 2008.
82. Z. Zeng, R. Liu, J. Zhang, J. Yu, L. He, and X. Shen, “Determination of seven free anabolic steroid residues in eggs by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Journal of Chromatographic Science*, vol. 51, no. 3, pp. 229–236, 2013.
83. I. M. Zuchowska, B. Wozniak, and A. Posyniak, “Determination of hormone residues in milk by gas chromatography-mass spectrometry,” *Food Analytical Methods*, vol. 10, no. 3, pp. 727–739, 2017.

84. T. Gao, N. Ye, and L. Jian, "Determination of ractopamine and clenbuterol in beef by graphene oxide hollow fiber solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography," *Analytical Letters*, vol. 49, no. 8, pp. 1163–1175, 2016.
85. L. Giannetti, D. Barchi, F. Fiorucci et al., "High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry validation of medroxyprogesterone acetate in products of pork origin and serum," *Journal of Chromatographic Science*, vol. 43, no. 7, pp. 333–336, 2005.
86. K. Kureckova, B. Maralikova, and K. Ventura, "Supercritical fluid extraction of steroids from biological samples and first experience with solid-phase micro extraction–liquid chromatography," *Journal of Chromatography B*, vol. 770, no. 1-2, pp. 83–89, 2002.
87. M.-R. Fuh, S.-Y. Huang, and T.-Y. Lin, "Determination of residual anabolic steroid in meat by gas chromatography-ion trap-mass spectrometer," *Talanta*, vol. 64, no. 2, pp. 408–414, 2004.
88. B. Socas-Rodríguez, M. Asensio-Ramos, J. Hernandez-Borges, A. V. Herrera-Herrera, and M. A. Rodríguez-Delgado, "Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 44, pp. 58–77, 2013.
89. Y. Shi, D.-D. Peng, C.-H. Shi, X. Zhang, Y.-T. Xie, and B. Lu, "Selective determination of trace 17 $\beta$ -estradiol in dairy and meat samples by molecularly imprinted solid-phase extraction and HPLC," *Food Chemistry*, vol. 126, no. 4, pp. 1916–1925, 2011.
90. S. Studzinska, B. Buszewski, Fast method for the resolution and determination of sex steroids in urine, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 927 (2013) 158–163.
91. N. Tagawa, H. Tsuruta, A. Fujinami, Y. Kobayashi, Simultaneous determination of estriol and estriol 3-sulfate in serum by column-switching semi-micro high-performance liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection, *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 39–45.
92. S. Wang, W. Huang, G. Fang, J. He, Y. Zhang, On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment, *Anal. Chim. Acta* 606 (2008) 194–201.
93. Z.L. Li, S. Wang, N.A. Lee, R.D. Allan, I.R. Kennedy, Development of a solid-phase extraction—enzyme-linked immune sorbent assay method for the determination of estrone in water, *Anal. Chim. Acta* 503 (2004) 171–177.
94. Y.P. Tang, S.Q. Zhao, Y.S. Wu, J.W. Zhou, M. Li, A direct competitive inhibition time-resolved fluoro immunoassay for the detection of unconjugated estriol in serum of pregnant women, *Anal. Methods* 5 (2013) 4068–4073.
95. S.H. Wang, S.L. Lin, L.Y. Du, H.S. Zhuang, Electrochemical enzyme-linked immunoassay for the determination of estriol using methyl red as substrate, *Anal. Lett.* 39 (2006) 947–956.
96. N.S. Lisboa, C.S. Fahning, G. Cotrim, J.P. Anjos, J.B. Andrade, V. Hatje, G.O. Rocha, A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters, *Talanta* 117 (2013) 168–175.
97. A.P. Fonseca, D.L.D. Lima, V.I. Esteves, Degradation by solar radiation of estrogenic hormones monitored by UV–visible spectroscopy and capillary electrophoresis, *Water Air Soil Pollut.* 215 (2011) 441–447.
98. S. Flor, S. Lucangioli, M. Contin, V. Tripodi, Simultaneous determination of nine endogenous steroids in human urine by polymeric-mixed micelle capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 31 (2010) 3305–3313.
99. K.D. Santos, O.C. Braga, I.C. Vieira, A. Spinelli, Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode, *Talanta* 80 (2009) 1999–2006.
100. Hadi Beitollahi, Hassan Karimi-Maleh, Hojatollah Khabazzadeh, Epinephrine in the presence of norepinephrine using carbon paste electrode modified with carbon nanotubes and novel 2-(4-Oxo-3-phenyl-3,4-dihydro-quinazolinyl)-N'-phenyl-hydrazinecarbothioamide, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9848–9851.

101. Somayeh Tajik, Mohammad Ali Taher, Hadi Beitollahi, Application of a new ferrocene-derivative modified-graphene paste electrode for simultaneous determination of isoproterenol, acetaminophen and theophylline, *Sensors Actuators B Chem.* 197 (2014) 228–236.
102. Zahra Taleat, Mohammad Mazloun Ardakani, Hossein Naeimi, Hadi Beitollahi, Maryam Nejati, Hamid Reza Zare, Electrochemical behavior of ascorbic acid at a 2,2 $\phi$ -[3,6-Dioxo- 1,8-octanediy]bis(nitriloethylidyne)]-bis-hydroquinone carbon paste electrode, *Anal. Sci.* 24 (2008) 1039–1044.
103. Mohammad Mehdi Foroughi, Hadi Beitollahi, Somayeh Tajik, Mozhdeh Hamzavi, Hekmat Parvan, Hydroxylamine Electrochemical sensor based on a modified carbon nanotube paste electrode: Application to determination of hydroxylamine in water samples, *Int. J. Electrochem. Sci.* 9 (2014) 2955–2965.
104. Mohammad Mazloun-Ardakani, Bahram Ganjipour, Hadi Beitollahi, Mohammad Kazem Amini, Fakhradin Mirkhalaf, Hossein Naeimi, Maryam Nejati-Barzoki, Simultaneous determination of levodopa, carbidopa and tryptophan using nanostructured electrochemical sensor based on novel hydroquinone and carbon nanotubes: application to the analysis of some real samples, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 9113–9120.
105. S. Mohammadi, H. Beitollahi, A. Mohadesi, Electrochemical behaviour of a modified carbon nanotube paste electrode and its application for simultaneous determination of epinephrine, uric acid and folic acid, *Sens. Lett.* 11 (2013) 388–394.
106. Hadi Beitollahi, Jahan-Bakhsh Raof, Hassan Karimi-Maleh, Rahman Hosseinzadeh, Electrochemical behavior of isoproterenol in the presence of uric acid and folic acid at a carbon paste electrode modified with 2,7-bis(ferrocenyl ethyl)fluoren-9-one and carbon nanotubes, *J. Solid State Electrochem.* 16 (2012) 1701–1707. [
107. Mohammad Reza Akhgar, Hadi Beitollahi, Mohammad Salari, Hassan KarimiMaleh, Hassan Zamani, Fabrication of a sensor for simultaneous determination of norepinephrine, acetaminophen and tryptophan using a modified carbon nanotube paste electrode, *Anal. Methods* 4 (2012) 259–264.
108. J.G. Manjunatha, M. Deraman, N.H. Basri, N.S.M. Nor, I.A. Talib, N. Ataollahi, Sodium dodecyl sulfate modified carbon nanotubes paste electrode as a novel sensor for the simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid, *C. R. Chimie* 17 (2014) 465–476.
109. Y. Ohnuki, T. Ohsaka, H. Matsuda, N. Oyama, Permselectivity of films prepared by electrochemical oxidation of phenol and amino-aromatic compounds, *J. Electroanal. Chem.* 158 (1983) 55–67.
110. A. Volkov, G. Tourillon, P.C. Lacaze, J.E. Dubois, Electrochemical polymerization of aromatic amines: IR, XPS and PMT study of thin film formation on a Pt electrode, *J. Electroanal. Chem.* 115 (1980) 279–291. [
111. Protiva Rain Roy, Takeyoshi Okajima, Takeo Ohsaka, Simultaneous electroanalysis of dopamine and ascorbic acid using poly-(N,N-dimethylaniline) modified electrode, *Bioelectrochemistry* 59 (2003) 11–19.
112. G. Milczarek, A. Ciszewski, 2,2-bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane modified glassy carbon electrodes as selective and sensitive voltammetric sensors, selective detection of dopamine and uric acid, *Electroanalysis* 16 (2004) 1977–1983.
113. Ahmadi, A., H. Shirazi, N. Pournagher, A. Akbarzadeh, K. Omidfar (2014): An electrochemical immunosensor for digoxin using core-shell gold coated magnetic nanoparticles as labels. *Mol. Biol. Rep.* 41, 1659-1668.
114. Vidal, J. C., L. Bonel, A. Ezquerra, P. Duato, J. R. Castillo (2012): An electrochemical immunosensor for ochratoxin A determination in wines based on a monoclonal antibody and paramagnetic microbeads. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1585-1593.



115. Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L.; Palleschi, G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Anal. Chim. Acta* 2007, 605, 111–129. [CrossRef]
116. Mishra Kumar, G.; Barfidokht, A.; Tehrani, F.; Kumar Mishra, R. Food Safety Analysis Using Electrochemical Biosensors. *Foods* 2018, 7, 141. [CrossRef]
117. Thakur, M.S.; Ragavan, K.V. Biosensors in food processing. *J. Food Sci. Technol.* 2013, 50, 625–641. [CrossRef]
118. Barfidokht, A.; Gooding, J.J. Approaches toward allowing electroanalytical devices to be used in biological fluids. *Electroanalysis* 2014, 26, 1182–1196. [CrossRef]
119. Ronkainen, N.J.; Halsall, H.B.; Heineman, W.R. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1747–1763. [CrossRef]
120. Chen, A.; Chatterjee, S. Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 5425–5438. [CrossRef] 12. Curulli, A. Nanomaterials in Electrochemical Sensing Area: Applications and Challenges in Food Analysis. *Molecules* 2020, 25, 5759. [CrossRef]
121. Naresh, V.; Lee, N. Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors* 2021, 21, 1109. [CrossRef]
122. Mishra, G.K.; Sharma, V.; Mishra, R.K. Electrochemical aptasensors for food and environmental safeguarding: A review. *Biosensors* 2018, 8, 28. [CrossRef]
123. Bartlett, P.N. *Bioelectrochemistry 45: Fundamentals, Experimental Techniques, and Applications*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2008.
124. Bonizzoni, M.; Anslyn, E.V. Combinatorial Methods for Chemical and Biological Sensors. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 14597–14598. [CrossRef]
125. Suni, I.I. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2008, 27, 604–611. [CrossRef]
126. Katz, E.; Willner, I. Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. *Electroanalysis* 2003, 15, 913–947. [CrossRef]
127. Wang, J. *Analytical Electrochemistry*, 2nd ed.; Wiley/VCH: New York, NY, USA, 2000.
128. Diamanti-Kandarakis, E.; Bourguignon, J.-P.; Giudice, L.C.; Hauser, R.; Prins, G.S.; Soto, A.M.; Zoeller, R.T.; Gore, A.C. Endocrine Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* 2009, 30, 293–342.
129. World Health Organization (WHO). State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals-2012; Bergman, Å., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A., Zoeller, R.T., Eds.; United Nations Environment Programme: Nairobi, Kenya; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2013.
130. Medeiros, A.S.; Silva, D.B.; Santos, A.O.; Castro, S.S.L.; Oliveira, T.M.B.F. Voltammetric sensing of E,E-dienestrol in fish tissue by combining a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode and QuEChERS extraction method. *Microchem. J.* 2020, 155, 104718. [CrossRef]
131. Hazani Mat Zaid, M.; Abdullah, J.; Rozi, N.; Rozlan, A.A.M.; Hanifah, S.A. A Sensitive Impedimetric Aptasensor Based on Carbon Nanodots Modified Electrode for Detection of 17 $\beta$ -Estradiol. *Nanomaterials* 2020, 10, 1346. [CrossRef]
132. Spsychalska, K.; Baluta, S.; Swist, A.; Cabaj, J. Biosensors for  $\beta$ 17-estradiol detection based on graphene quantum dots (GQDs)/conducting polymer and laccase modified platinum/gold electrodes. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2020, 15, 3127–3142. [CrossRef]
133. Sun, Y.; Zhao, J.; Liang, L. Recent development of antibiotic detection in food and environment: The combination of sensors and nanomaterials. *Microchim. Acta* 2021, 188, 21–43. [CrossRef] [PubMed]
134. Shen, Z.; He, L.; Cao, Y.; Hong, F.; Zhang, K.; Hu, F.; Lin, J.; Wu, D.; Gan, N. Multiplexed electrochemical aptasensor for antibiotics detection using metallic-encoded apoferritin probes and

- double stirring bars-assisted target recycling for signal amplification. *Talanta* 2019, 197, 491–499. [CrossRef]
135. Fuentes, N.; Silveyra, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2019, 116, 135–170.
  136. Tran, T.K.A.; Yu, R.M.K.; Islam, R.; Nguyen, T.H.T.; Bui, T.L.H.; Kong, R.Y.C.; O'Connor, W.A.; Leusch, F.D.L.; Andrew-Priestley, M.; MacFarlane, G.R. The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs. *Environ. Pollut.* 2019, 248, 1067–1078. [CrossRef]
  137. Zamfir, L.-G.; Puiu, M.; Bala, C. Advances in Electrochemical Impedance Spectroscopy Detection of Endocrine Disruptors. *Sensors* 2020, 20, 6443. [CrossRef]
  138. Lu, X.; Sun, J.; Sun, X. Recent advances in biosensors for the detection of estrogens in the environment and food. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2020, 127, 115882.
  139. Medeiros, A.S.; Silva, D.B.; Santos, A.O.; Castro, S.S.L.; Oliveira, T.M.B.F. Voltammetric sensing of E,E-dienestrol in fish tissue by combining a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode and QuEChERS extraction method. *Microchem. J.* 2020, 155, 104718.
  140. Hazani Mat Zaid, M.; Abdullah, J.; Rozi, N.; Rozlan, A.A.M.; Hanifah, S.A. A Sensitive Impedimetric Aptasensor Based on Carbon Nanodots Modified Electrode for Detection of 17 $\beta$ -Estradiol. *Nanomaterials* 2020, 10, 1346.
  141. Spsychalska, K.; Baluta, S.; Swist, A.; Cabaj, J. Biosensors for  $\beta$ 17-estradiol detection based on graphene quantum dots (GQDs)/conducting polymer and laccase modified platinum/gold electrodes. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2020, 15, 3127–3142. [CrossRef]
  142. J. D. Yager and N. E. Davidson, “Estrogen carcinogenesis in breast cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 354, no. 3, pp. 270–282, 2006.
  143. D. Ganmaa and A. Sato, “The possible role of female sex hormones in milk from pregnant cows in the development of breast, ovarian and corpus uteri cancers,” *Medical Hypotheses*, vol. 65, no. 6, pp. 1028–1037, 2005.
  144. F. Massart, J. C. Harrell, G. Federico, and G. Saggese, “Human breast milk and xenoestrogen exposure: a possible impact on human health,” *Journal of Perinatology*, vol. 25, no. 4, pp. 282–288, 2005.
  145. A. Daxenberger, D. Ibarreta, and H. H. Meyer, “Possible health impact of animal oestrogens in food,” *Human Reproduction Update*, vol. 7, no. 3, pp. 340–355, 2001.
  146. S. Hartmann, M. Lacorn, and H. Steinhart, “Natural occurrence of steroid hormones in food,” *Food Chemistry*, vol. 62, no. 1, pp. 7–20, 1998.
  147. S. Liu and Y. C. Lin, “Transformation of MCF-10A human breast epithelial cells by zeranol and estradiol-17 beta,” *Ee Breast Journal*, vol. 10, no. 6, pp. 514–521, 2004.
  148. JECFA, “Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food: estradiol-17 $\beta$ , progesterone, and testosterone,” in *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Vol. 43, WHO Food Additives Series*, Geneva, Switzerland, 2000.
  149. P. E. Strydom, L. Frylinck, J. L. Montgomery, and M. F. Smith, “The comparison of three  $\beta$ -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle,” *Meat Science*, vol. 81, no. 3, pp. 557–564, 2009.
  150. J. Y. Yang, Y. Zhang, H. T. Lei et al., “Development of an ultrasensitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of diethylstilbestrol in seafood,” *Analytical Letters*, vol. 46, no. 14, pp. 2189–2202, 2013.
  151. F. Tasçi, “Determination of diethylstilbestrol residue in raw meat sold in Burdur, Turkey,” *Journal of Applied Biological Sciences*, vol. 8, no. 3, pp. 32–34, 2014.
  152. D. L. Moyer, B. d. Lignieres, P. Driguez, and J. P. Pez, “Prevention of endometrial hyperplasia by progesterone during long-term estradiol replacement: influence of bleeding pattern and secretory



- changes \*\* supported in part by BesinsIscovesco laboratories, Paris, France,” *Fertility and Sterility*, vol. 59, no. 5, pp. 992–997, 1993.
153. M. J. Seraj, A. Umemoto, M. Tanaka, A. Kajikawa, and K. Monden, “DNA adduct formation by hormonal steroids in vitro,” *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 370, no. 1, pp. 49–59, 1996.
154. IARC, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Hormonal Contraception and Postmenopausal Hormone Therapy*, Vol. 72, IARC Press, Lyon, France, 1999.
155. Celia A. Hoga, Fernanda L. Almeida & Felix G. R. Reyes (2018) A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues, *CyTA - Journal of Food*, 16:1, 679-691. 18 Jun 2018.

## **Mini-Review: Senzori Electrochimici Utilizați pentru Determinarea Vitaminelor Lipo- și Hidro-solubile**

### **Rezumat**

Vitaminele sunt printre cei mai esențiali compuși organici care sunt necesari organismului uman, pentru ca acesta să se dezvolte și să crească într-un mod sănătos. Scopul acestui mini-review este de a prezenta o serie de senzori electrochimici dezvoltați pentru determinarea vitaminelor din probe biologice, farmaceutice sau alimentare. Pentru acest mini-review au fost luate în considerare articolele din 2016-2021.

### **Introducere**

Organismul uman are nevoie de o serie de vitamine, pentru ca acesta să se dezvolte într-un mod sănătos. Există două tipuri de vitamine: vitaminele hidrosolubile, care nu sunt stocate în organism, și vitaminele liposolubile, care sunt stocate în țesutul adipos al corpului uman. Încă de la o vârstă fragedă, acești compuși organici sunt necesari pentru ca oamenii să se dezvolte într-un mod sănătos. O parte din vitaminele care sunt necesare pentru corpul uman sunt: vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>9</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina D și vitamina K. Vitaminele D și K sunt liposolubile, iar vitaminele care fac parte din complexul de vitamine B sunt hidrosolubile.

Vitamina B<sub>2</sub>, cunoscută și sub denumirea de riboflavină, este una dintre vitaminele necesare pentru dezvoltarea corpului uman. Din cauza faptului că nu poate fi sintetizată intern, este recomandat ca aceasta

să fie inclusă în dietă în cantități mici.<sup>1</sup> Vitamina B<sub>2</sub> este o componentă importantă a flavoenzimei, care ajută la cataliza diverselor reacții biochimice a proteinelor, grăsimilor și carbohidraților din corpul uman. O parte din beneficiile riboflavinei sunt: reducerea oboselii, în special cea a ochilor, ajută la creșterea sănătoasă a părului, a unghiilor și a pielii și reduce inflamația limbii, a buzelor și a gurii.<sup>2,3</sup> Carența vitaminei B<sub>2</sub> poate provoca următoarele simptome: exfolierea pielii, mâncărimi ale ochilor, fotofobie și durere în gât.<sup>4,5</sup> Există o serie de metode care sunt utilizate pentru detecția acestui tip de vitamină, precum, chemiluminescență,<sup>6,7</sup> cromatografie lichidă,<sup>8-10</sup> polarografie,<sup>11</sup> UV-vis<sup>12</sup> și spectroscopie fluorescentă.<sup>13,14</sup>

Vitamina B<sub>6</sub>, cunoscută și sub denumirea de piridoxină, este o vitamină hidrosolubilă, alături de restul vitaminelor din complexul B.<sup>15</sup> Acest tip de vitamină are un rol important în reducerea stării de greață într-un stadiu incipient al sarcinii și este de asemenea implicată în răspunsul organismului uman la peste 100 enzime. Datorită faptului că piridoxina se regăsește în majoritatea alimentelor, precum tonul, cartofii, orezul, spanacul, tofu, carnea de vită, somonul, pepenele roșu și pieptul de pui, sunt utilizate metode analitice pentru analiza probelor de alimente.<sup>19-23</sup>

Vitamina B<sub>9</sub>, care este cel mai bine cunoscută sub denumirea de acid folic, aparține complexului B de vitamine, care este solubil în apă și este cunoscută cel mai bine pentru rolul său important în ceea ce privește funcțiile biologice,<sup>24</sup> sinteza și repararea ADN-ului, producerea de celule sănătoase și metilarea ADN-ului.<sup>25,26</sup> Chiar dacă se regăsește în alimente precum varza, fructele, nucile și multe altele, este imposibil pentru organismul uman să producă această vitamină. Complicații serioase care au ca rezultat malformații ale craniului, ale creierului și ale coloanei vertebrale ale fătului sunt provocate de către deficiența acidului folic.<sup>27</sup>

Vitamina B<sub>12</sub>, cunoscută și sub denumirea de cobalamină, este o vitamină care conține cobalt, și care este hidrosolubilă. Această vitamină ajută la formarea celulelor roșii, sinteza ADN-ului, și păstrarea funcțiilor neurologice.<sup>28</sup> Datorită faptului că bacteriile prezente în intestinul subțire sintetizează parțial vitamina B<sub>12</sub>, este necesar ca această vitamină să fie ingerată din alimente.<sup>29</sup> Sursa principală o reprezintă: carnea,

ouăle, moluștile comestibile, scoicile, ficatul, peștele și laptele. O cantitate scăzută de vitamină B<sub>12</sub> poate cauza diverse probleme de sănătate, precum oboseală, anemie, insuficiență renală, afecțiuni ale ficatului sau neurotoxicitate.<sup>30</sup> Printre cele mai utilizate tehnici pentru detecția cobalaminei se află: radioscopia, chemiluminescența, cromatografia lichidă de înaltă performanță, spectrometrie de masă, spectrometrie de absorbție atomică și electroforeză capilară.<sup>31</sup>

Vitamina D, o vitamină liposolubilă, este împărțită în două grupuri, ergocalciferol, cunoscut și sub denumirea de D<sub>2</sub>, și colecalciferol, cunoscut și sub denumirea de D<sub>3</sub>. Vitamina D<sub>2</sub> este obținută din sinteză chimică și plante, iar vitamina D<sub>3</sub> este prezentă natural în corpul uman. Aceste vitamine se regăsesc în albușul de ou (vitaminele D<sub>2</sub> și D<sub>3</sub>), ciuperci shitake (Vitamina D<sub>2</sub>), ulei de ficat de cod (Vitamina D<sub>3</sub>) și somon proaspăt (Vitamina D<sub>3</sub>).<sup>32,33</sup> Acest tip de vitamină are un rol important în ceea ce privește întărirea oaselor. Deficiența de vitamină D<sub>3</sub> poate provoca osteomalacie la adulți, rahitism în rândul copiilor, boli cardiovasculare, Parkinson, hipertensiune arterială și cancer.<sup>34-40</sup>

Vitamina K este o vitamină liposolubilă și este cunoscută sub denumirea de compus naftochinonic. Există sub două forme, respectiv K<sub>1</sub> și K<sub>2</sub>. Vitamina K<sub>1</sub> este produsă de legume verzi și de plante și este forma predominantă. Vitamina K<sub>2</sub> derivă din ouă, alimente fermentate, carne și caș. Această vitamină este importantă pentru calcifierea oaselor<sup>41,42</sup> și pentru coagularea sângelui.<sup>43,44</sup> Deficiența acestui compus poate provoca hemoragie excesivă și poate determina scăderea protrombinei.<sup>45,46</sup>

Spre deosebire de metodele analitice care sunt utilizate în prezent pentru determinarea vitaminelor, senzorii electrochimici reprezintă o alternativă rapidă, sigură și convenabilă.

Acest mini-review se bazează pe senzorii electrochimici care au fost utilizați pentru determinarea vitaminelor din diverse tipuri de probe (biologice, farmaceutice și alimente).

### **Senzori Electrochimici Utilizați pentru Detecția Vitaminei B<sub>2</sub>**

Li și colab.<sup>47</sup> au propus un senzor electrochimic pentru determinarea vitaminei B<sub>2</sub> din probe farmaceutice. Senzorul propus, având ca matrice un electrod de carbon vitros (GCE) și nanoparticule de aur (AuNPs) și

care a fost modificat cu hibrid de grafenă redus și polidopamină (PDA-RGO), a avut efect atunci când a fost vorba despre analiza probelor farmaceutice, a avut eficacitate atunci când a fost vorba de analiza probelor farmaceutice, senzorul propus putând fi folosit pentru monitorizarea medicamentelor terapeutice. Pentru a demonstra eficiența suprafeței modificate, dar și pentru a se obține o comparație între electrozii modificați, a fost utilizată volametriă ciclică. Astfel, o soluție standard fero/ferocianidă cvasi-reversibilă, având o concentrație de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl, a fost utilizată. Potențialul a avut un interval de la  $-0.3$  până la  $0.8 \text{ V}$  față de Ag/AgCl și viteza de scanare a fost de  $0.05 \text{ V s}^{-1}$ . Pentru electrodul nemodificat, se pot observa următoarele: s-a obținut un pic redox slab, care a avut separările pic-cu-pic egale cu  $198 \text{ mV}$ . Datorită locurilor active și a zonei suprafeței senzorului, curenții picului au crescut foarte mult atunci când dispersia de PDA-RGO a fost depusă pe suprafața electrodului nemodificat. De asemenea, separările pic-cu-pic au scăzut la  $145 \text{ mV}$ . Spre deosebire de electrodul nemodificat, curenții picului au scăzut cu  $38.1\%$ , atunci când nanoparticulele de aur au fost electrodepuse pe GCE, datorită faptului că acestea au permis mai multor  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$  să ajungă pe suprafața electrodului cu mai multă ușurință. Având în vedere faptul că separările pic-cu-pic au scăzut cu  $53 \text{ mV}$ , se dovedește că AuNP-urile pot accelera transferul electronilor între suprafața electrodului și soluție. Dintre toți electrozii modificați, cele mai scăzute separări pic-cu-pic și cel mai mare răspuns de curent au fost obținute atunci când a fost utilizat senzorul GCE/AuNPs@PDA-RGO, ceea ce sugerează posibilitatea unui efect sinergic care există între AuNp și PDA-RGO. Pentru detectarea vitamine B<sub>2</sub> din probele farmaceutice, cea mai mare sensibilitate a fost obținută atunci când a fost utilizat senzorul bazat pe GCE/AuNPs@PDA-RGO. Recuperările vitaminei B<sub>2</sub> sunt cuprinse  $104.40$  și  $105.00\%$ , iar RSD sunt între  $0.25$ - $1.43\%$ . Acestea au fost analizate utilizând voltametriă puls diferențială (DPV). Senzorul propus a arătat o sensibilitate ridicată, având LOD de  $0.0096 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , un domeniu larg cu o regresie liniară ( $R^2$ ) de  $0.9977$  în  $0.02$ - $60.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Un alt grup de cercetători, condus de Puangjan A.,<sup>48</sup> a realizat un senzor electrochimic bazat pe nanotuburi de carbon cu multi-canal funcționalizați chimic, pe care a fost depus oxid cupros ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ); pe substratul de cupru s-a depus de asemenea un compozit de oxid de argint ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ). Sensorii utilizați pentru realizarea acestui studiu sunt: nanotuburi de carbon cu multi-canal (MWCNTs), nanotuburi de carbon cu

multi-canal funcționalizați (*f*-MWCNTs), compozitul *f*-MWCNTs-Cu<sub>2</sub>O, compozitul *f*-MWCNTs-Ag<sub>2</sub>O și compozitul *f*-MWCNTs-Cu<sub>2</sub>O-Ag<sub>2</sub>O. Pentru determinarea vitaminei B<sub>2</sub>, a fost utilizat compozitul *f*-MWCNTs-Cu<sub>2</sub>O-Ag<sub>2</sub>O. Dintre acești senzori, electrodul reprezentat de compozitul *f*-MWCNTs-Cu<sub>2</sub>O-Ag<sub>2</sub>O a avut cea mai bună stabilitate ciclică. Senzorul propus a arătat o sensibilitate ridicată, un răspuns rapid, o limită scăzută de detecție, o stabilitate extinsă și o liniaritate largă, atunci când a fost vorba de detectarea vitaminei B<sub>2</sub>. Aceste rezultate sunt date de comportamentul capacitiv al compozitului *f*-MWCNTs-Cu<sub>2</sub>O-Ag<sub>2</sub>O, care este crescut de particulele de Cu<sub>2</sub>O și Ag<sub>2</sub>O, care sunt puternic atașate de suprafața nanotuburilor funcționalizate. Intervalul liniar de concentrație a fost de 0.05-1752.65 μmol L<sup>-1</sup>, iar limita de detecție a fost de 0.014 μmol L<sup>-1</sup>. Pentru realizarea acestui studiu, au fost utilizate următoarele tipuri de probe: mostre de miere, probe de suc de portocale și probe de urină umană.

Vijayaprasath și colab.<sup>49</sup> au propus un nou electrod de carbon vitros modificat cu nanofoi de oxid de gadolinu (Gs<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-GCE) pentru detectare electrochimică a vitamine B<sub>2</sub>. Pentru a observa dacă Gs<sub>2</sub>O<sub>3</sub> are posibilitatea de a detecta vitamina de interes în prezența diferiților interferenți, precum biotina, serotonina, dopamina, acidul uric și epinefrina, a fost utilizată tehnica DPV. Acești interferenți au fost adăugați la o anumită concentrație, și anume: 0.5 mmol L<sup>-1</sup>. Selectivitatea ridicată a electrodului propus a fost demonstrată prin faptul că nu a existat nicio interferență de semnal pentru posibilele substanțe menționate anterior. Rezultatele obținute demonstrează că noul senzor propus are o reproductibilitate și o stabilitate bună și, de asemenea, are o selectivitate ridicată. Probele reale, reprezentate de tablete comerciale și lapte praf, au fost testate pentru determinarea vitaminei B<sub>2</sub>. Senzorul propus de acest grup de cercetători permite detectarea sensibilă a diferitelor concentrații de vitamina B<sub>2</sub> din probe farmaceutice sau alimente, ceea ce poate duce la utilizarea acestuia în diferite domenii.

Un alt tip de nanoparticule, paladiu-cupru (Pd-Cu), a fost folosit și plasat pe un cărbune activat de către Sanhili și colab.<sup>50</sup> pentru detecția electrochimică a acestei vitamine. Pentru realizarea acestui studiu, un electrod de carbon a fost modificat cu nanoparticule din aliaj Pd-Cu prin depunere pe carbon de coajă de nucă (Pd-Cu@NSC). Pentru a studia activitatea electrocatalitică a electrodului propus, au fost efectuate CV-uri și DPV-uri. Precum studiul anterior,<sup>49</sup> acești cercetători au folosit tablete de riboflavină și lapte

praf pentru a testa și a demonstra selectivitatea senzorului. Pentru analiza probelor a fost utilizat Pd-Cu@NSC/SPCE. Acest electrod a avut o performanță extraordinară de electro-oxidare atunci când a fost vorba de detectarea aceste vitamine, având în vedere funcționalitatea suprafeței, suprafața mare, transferurile rapide de electroni și o bună conductivitate. Valoarea LOD a fost de  $7.64 \text{ pmol L}^{-1}$ , intervalul liniar de concentrație a fost bun ( $0.004\text{-}0.001 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), iar sensibilitatea curentului a fost de  $63.4 \text{ } \mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ . De asemenea, în urma utilizării SPCE-ului propus, selectivitatea, reproductibilitatea și stabilitatea au fost excepționale, făcând posibilă utilizarea acestuia pentru detectarea vitaminei de interes din diferite tipuri de probe.

### **Senzori Electrochimici Utilizați pentru Detecția Vitaminei B<sub>6</sub>**

Un senzor electrochimic a fost propus de Sadeghi și colab.<sup>51</sup> pentru determinarea vitaminei B<sub>6</sub> din probe de suc și de apă. Acest grup de cercetători a proiectat un senzor amplificat pentru a folosi doi mediatori conductivi, reprezentați de NiO-CNT-uri și, respectiv, MOHFPE. Senzorul modificat, care conține CPE și cei doi mediatori, a arătat o îmbunătățire a curentului de oxidare (de până la 2.5 ori). Mai mult, recuperările obținute în urma utilizării senzorului electrochimic au fost de 97.33-103.8%, confirmând astfel capacitatea senzorului propus pentru a detecta vitamina B<sub>6</sub> din probe reale. Acest grup de cercetători a studiat importanța celor doi mediatori și astfel au fost obținute următoarele rezultate: curentul de oxidare al vitaminei de interes a crescut de la  $19.8 \text{ } \mu\text{A}$  la  $4.94 \text{ } \mu\text{A}$ ; de asemenea, a putut fi observată o schimbare notabilă pentru potențialul relativ, care a scăzut de la  $626 \text{ mV}$  la  $526 \text{ mV}$ . Rezultatele obținute demonstrează că prin adăugarea acestor doi mediatori, conductivitatea CPE poate fi îmbunătățită și astfel se poate crea o stare electrică bună pentru proiectarea unui senzor sensibil.

### **Senzori Electrochimici Utilizați pentru Detecția Vitaminei B<sub>9</sub>**

Sharma și Arya<sup>52</sup> au propus un senzor eficient și convenabil pentru determinarea vitaminei B<sub>9</sub>, folosind un electrod de platină. Pentru a sintetiza nanoparticulele de dioxid de staniu (SnO<sub>2</sub>) nedopate, Ag dopate și Pd-Ag co-dopate, a fost folosită o tehnică hidrotermală asistată de sol gel. Pentru a demonstra că nanoparticulele de SnO<sub>2</sub> co-dopate cu Pd și Ag au o capacitate remarcabilă pentru detecția vitaminei de



interes, s-au folosit următoarele tehnici: CV și DPV. Ca și agent de detectare, a fost utilizat electrodul de platină modificat (Pt). Cele două nanoparticule sintetizate au fost utilizate pentru a îmbunătăți activitatea catalitică a electrocului Pt. Electrocul propus a avut o limită scăzută de detecție, iar intervalele de detecție liniară au fost largi. Mai mult, nanosenzorul a fost testat pentru determinarea vitaminei de interes, iar rezultatele obținute au fost favorabile și de succes. Tehnica utilizată pentru a studia comportamentul electrochimic al vitaminei B<sub>9</sub> pentru: electrocul de Pt nemodificat, SnO<sub>2</sub>/Pt, Ag-SnO<sub>2</sub> și Pd și Ag-SnO<sub>2</sub>/Pt a fost voltametria ciclică. Spre deosebire de electrocul nemodificat, electrozii modificați menționați anterior au prezentat o creștere vizibilă a picului redox. Pentru testarea probelor farmaceutice, a fost utilizată tehnica DPV. După efectuarea metodei standard de adăugare, s-au observat următoarele: 4.978 mg/comprimat, dovedind astfel că electrocul propus poate fi utilizat pentru analiza cantitativă a vitaminei B<sub>9</sub>. Comparând rezultatele obținute pentru vitamina B<sub>9</sub> pură și probele farmaceutice, se poate ajunge la următoarea concluzie: nanoparticulele sintetizate sunt sensibile atunci când este vorba despre determinarea vitaminei de interes.

Yuan și colab.<sup>53</sup> au modificat un electrocul de carbon vitros (GCE) cu nanoparticule de platină/nanoplachete de grafen/nanotuburi de carbon cu multicanal/compozit de β-ciclodextrină (PtNPs-GNPs-MWCNTs-β-CD). Compozitul a fost preparat în urma utilizării unei metode de asamblare cu ultrasunete. Pentru a obține electrocul modificat, au fost preparate diferite cantități de GNP, MWCNT și PtNP în apă ultrapură, folosind un tratament cu ultrasunete. În urma utilizării acestui tratament, a avut loc polișarea GCE nemodificat. Apoi, o suspensie de PtNPs-GNPs-MWCNTs-β-CD, de volume diferite, a fost depusă pe suprafața electrocului. Astfel, a fost obținut electrocul de interes: PtNPs-GNPs-MWCNTs-β-CD/GCE. Aplicabilitatea practică și sensibilitatea senzorului propus de acești cercetători a fost utilizată pentru determinarea acidului folic din tabletele farmaceutice. Concentrația a fost cuprinsă în următorul interval: 0.02-0.50 mmol L<sup>-1</sup>, recuperările au fost cuprinse între 07.55-102.96%, iar LOD a avut o valoare de 0.48 μmol L<sup>-1</sup>. Aceste rezultate dovedesc faptul că electrocul propus a fost capabil să determine acidul folic din probe reale.

### **Senzori Electrochimici Utilizați pentru Detecția Vitaminei B<sub>12</sub>**

Dimitropoulou și colab.<sup>54</sup> au propus dezvoltarea unui biosenzor ADN electrochimic pentru determinarea vitaminei B<sub>12</sub>, folosind un electrod de pastă de carbon (CPE), care a fost modificat prin utilizarea unui complex de mangan (II). Acest electrod necesită materiale ușor de folosit și convenabil. Pentru a obține acest electrod, întâi a fost studiat comportamentul electrochimic al Mn-CPE într-un tampon acetat (pH 5.2), care avea o concentrație de 0.2 mol L<sup>-1</sup> și care conținea 0.01 mol L<sup>-1</sup> NaCl. Datorită acestuia, asupra picurilor de oxidare și de reducere ale senzorului a fost investigat efectul ratei de scanare. După acest pas, a avut loc fiziosorbția dsADN pe Mn-CPE. Prin utilizarea voltametriei ciclice în 0.2 mol L<sup>-1</sup> tampon acetat (pH 5.2), care conținea 0.01 mol L<sup>-1</sup> NaCl, s-a dovedit ca dsADN a fost imobilizat cu succes pe Mn-CPE. Apoi, a fost utilizată voltametria cu undă pătrată pentru a demonstra că dsADN a fost fiziosorbit pe Mn-CPE. Atunci când a fost utilizat electrodul propus, au fost identificate următoarele picuri: picul de oxidare a fost găsit la +1.021 V față de Ag/AgCl și picul de reducere, care a avut o intensitate scăzută, a fost găsit la +0.610 V față de Ag/AgCl, demonstrând astfel că vitamina de interes a fost imobilizată cu succes pe Mn-dsDNA-CPE. De asemenea, voltametria cu undă pătrată a fost efectuată pentru a analiza comportamentul electrochimic al vitaminei B<sub>12</sub>. Următoarele picuri de oxidare au fost obținute: în absența vitamine B<sub>12</sub>, picul a fost la +0.770 V față de Ag/AgCl și în prezența vitaminei B<sub>12</sub>, picul a fost la +1040 V față de Ag/AgCl, atunci când a fost folosit CPE. Atunci când a fost utilizat Mn-CPE, picul de oxidare a fost indentificat la +1.038 V față de Ag/AgCl în prezența vitaminei B<sub>12</sub>. Oxidarea vitaminei B<sub>12</sub> pe Mn-dsDNA-CPE este foarte complexă, astfel că, pentru experimentele următoare, grupul de cercetători a folosit picul de reducere a manganului pentru a observa comportamenul vitaminei de interes. Pentru restul experimentului, pH de dizolvare ales a fost cel de 5.2, datorită faptului că picul a crescut până la această valoare, apoi a scăzut la valoarea 6.2, rămânând constant. S-a observat că interacțiunea dintre vitamina B<sub>12</sub> și Mn-dsDNA-CPE a fost maximă, în timp ce cea cu Mn-CPE a fost minimă. Pentru validarea electrodului propus, Mn-dsDNA-CPE, au fost testate probe biologice de urină provenite de la oameni, în vederea determinării vitaminei B<sub>12</sub>. Tehnica aleasă a fost SWAsSv. Selectivitatea senzorului electrochimic a fost testată prin compararea rezultatelor pentru panta curbei de calibrare cu cele ale graficului de adunare standard. Pentru probele biologice testate, panta a avut o

valoare de  $0.0135 \text{ A L g}^{-1}$ , care este apropiată de panta curbei de calibrare, a cărei valoare a fost  $0.0133 \text{ A L g}^{-1}$ . Aceste rezultate dovedesc că nu a existat nicio interferență creată de componentele matricei de probă atunci când a fost vorba de determinarea vitaminei  $B_{12}$ . Valorile recuperărilor sunt cuprinse între 99.2% și 101.6%, valori care confirmă faptul că senzorul electrochimic propus este precis atunci când vine vorba de bioanaliza  $B_{12}$ . Biosenzorul propus este selectiv, simplu, sensibil, rentabil, având o gamă largă de concentrații liniare, cu limite scăzute de detecție, atunci când vine vorba de determinarea vitaminei  $B_{12}$  din probe reale.

Karastogianni S. și Girousi S.<sup>55</sup> au propus un senzor electrochimic pentru detectarea vitaminei  $B_{12}$  cunoscută sub numele de cianocobalamină, din probe farmaceutice. După adăugarea modificadorului, pentru a studia proprietățile electrochimice ale senzorului obținut, s-a folosit voltametria ciclică (CV). În comparație cu picurile obținute pentru electrodul cu pastă de carbon (CPE), unde potențialul pentru picul anodic a fost la 122 mV și pentru picul catodic la 7 mV, cele ale Mn-CPE au fost reduse de la 125 mV la 89 mV. Această diferență s-ar putea datora activității electrochimice a electrodului modificat. Senzorul electrochimic propus a fost utilizat pentru determinarea vitamine  $B_{12}$  prin voltametrie cu undă pătrată (SWV). Coeficientul de corelație a avut o valoare egală cu 0.9998 și relația liniară dintre curentului de pic al SWV și concentrațiile de vitamina  $B_{12}$  a fost de la 13.86 la  $1500 \text{ ng L}^{-1}$ . Mai mult, s-a obținut următoarea limită de detecție:  $4.34 \text{ ng L}^{-1}$ . Prin utilizarea unor substanțe considerate interferență, a fost studiată și selectivitatea senzorului. Recuperările vitaminei  $B_{12}$  sunt cuprinse în următorul interval: 95-105%. Rezultatele obținute au dovedit că substanțele studiate nu au interferat cu determinarea vitaminei de interes. Vitamina A și vitamina E, care sunt considerate posibili inhibitori, nu au avut niciun efect asupra analizei efectuate, datorită faptului că în soluțiile apoase, solubilitatea lor este scăzută. Senzorul propus a arătat o selectivitate bună atunci când a fost utilizat pentru determinarea vitaminei  $B_{12}$  din probe reale.

Sharma și colab.<sup>56</sup> au propus dezvoltarea unui senzor electrochimic care a fost preparat prin depunerea de nanoparticule de oxid de staniu dopat cu aur ( $\text{Au-SnO}_2$ ) pe un substrat de oxid de indiu și staniu (ITO). Pentru a sintetiza nanoparticulele de oxid de staniu ( $\text{SnO}_2$ ) și  $\text{Au-SnO}_2$ , a fost folosită o metodă de sol gel.

Datorită faptului că încorporarea Au cu SnO<sub>2</sub> trebuie verificată, au fost efectuate tehnici de caracterizare precum EDX, FTIR, Raman și altele. De asemenea, a fost realizată o comparație a performanței electrodului Au-SnO<sub>2</sub>/ITO prin utilizarea următoarelor metode: spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS), voltametrie ciclică (CV) și voltametrie cu impulsuri diferențiale (DPV). Pentru a demonstra comportamentul electrocatalitic al senzorului modificat față de vitamina B<sub>12</sub>, s-a utilizat metoda DPV. Pentru a studia comportarea electrochimică a celor trei electrozi (ITO, SnO<sub>2</sub>/ITO și Au-SnO<sub>2</sub>), au fost utilizate următoarele metode: CV, EIS și DPV; aceste experimente au fost efectuate într-o soluție tampon fosfat (PBS), care conținea 5 mmol L<sup>-1</sup> [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>. Pentru ca toate studiile electrochimice să fie realizate, a fost folosit un sistem care conține trei electrozi. Un fir de platină acționat ca și contraelectrod, iar pentru electrodul de referință a fost folosit un fir Ag/AgCl. Când a fost folosită metoda DPV, s-a aplicat următorul interval de potențial: -0,6 V până la 0,6 V. Pentru electrodul Au-SnO<sub>2</sub>/ITO, valoarea curentului a crescut (111.24 μA), datorită conductibilității extraordinare a dopanților Au, care sunt capabili să accelereze transferul de electroni, ducând astfel la o difuzie mai rapidă a electronilor între electrodul propus și speciile redox care sunt prezente în electrolit. Laptele proaspăt de vacă a fost folosit ca și probă pentru realizarea acestui studiu. Precizia de detecție a vitaminei de interes nu a fost afectată de posibili interferenți care pot fi găsiți în probele testate. Folosind metoda DPV, a avut loc studiul curentului care corespunde la 20 μL din fiecare concentrație (0-1500 pmol L<sup>-1</sup>). Probele spiked au fost, de asemenea, preparate prin amestecarea a 10 μL din proba standard și 10 μL din proba de lapte. S-au obținut următoarele rezultate: valoarea picului care corespunde la 1 pmol L<sup>-1</sup> pentru proba spiked este puțin mai mare decât cea pentru proba standard de vitamina B<sub>12</sub> (110.843 μA până la 109.984 μA). Valorile RSD obținute sunt: 0.55% pentru proba spiked și 4.23% pentru proba reală. Aceste rezultate demonstrează că senzorul propus este potrivit pentru detectarea vitaminei B<sub>12</sub> din probe reale.

Pereira și colab.<sup>57</sup> au propus utilizarea unui electrod de diamant dopat cu bor pentru monitorizarea perechilor redox a Co(I/II). Acest studiu propune dezvoltarea unei metode care necesită implicarea unui electrod de diamant dopat cu bor catodic pretratată (BDDE) pentru analiza vitaminei B<sub>12</sub> din suplimente prin monitorizarea perechii redox Co(I/II). CV, EIS și SQWV au fost utilizate pentru evaluarea

electrodului propus. Pentru a testa aplicabilitatea acestui electrod au fost folosite ca mostre pastă de dinți fortificată cu vitamine B<sub>12</sub> și suplimente sub formă de tablete. Dat fiind faptul că perechea redox Co(I/II) de vitamină B<sub>12</sub> are o intensitate de curent mai mare și un transfer electronic mai rapid, aceasta a fost monitorizată. Atunci când a fost testat în condiții optimizate, a fost obținut următorul interval liniar de concentrație: 0.25-5.0 μmol L<sup>-1</sup>; LOD a avut o valoare de 86.0 nmol L<sup>-1</sup>.

### **Senzori Electrochimici Utilizați pentru Detecția Vitaminei D**

Chauhan și colab.<sup>58</sup> au propus un biosenzor electrochimic pentru detectarea vitaminei D<sub>3</sub>, pentru care s-au folosit nanorodurile de oxid de gadolinu (Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NRs). Acidul aspartic (Asp) a fost utilizat pentru sinteza hidrotermală și funcționalizarea electrodului (Asp-Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NRs). Mai mult, Asp nu a avut nicio influență asupra structurii, a fazei și a formei electrodului propus. Potențialul zeta pentru ambii electrozi a avut valori de +29 mV pentru electrodul gol și +24 mV pentru electrodul modificat. Între cei doi electrozi, cel modificat a arătat mai multe proprietăți electrochimice și o hidrofilitate sporită spre deosebire de electrodul gol. Folosind depunerea electroforetică, un film subțire de Asp-Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NRs a fost depus pe un substrat de sticlă care a fost acoperit cu oxid de indiu-staniu (ITO). Pentru a obține imunosenzorul și pentru a determina vitamina de interes, un anticorp monoclonal vitamina D<sub>3</sub> (Ab-D<sub>3</sub>) a fost imobilizat pe suprafața electrodului modificat. Astfel, s-a obținut un nou imunoelectrod: BSA/Ab-VD/Asp-Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NRs. Limita de detecție care s-a obținut pentru imunosenzor a fost de 0.10 ng mL<sup>-1</sup>, sensibilitatea a avut o valoare de 0.38 μA ng<sup>-1</sup> mL cm<sup>-2</sup> și intervalul liniar de concentrație a fost cel de 10-100 ng mL<sup>-1</sup>, interval care acoperă cel fiziologic al vitaminei D<sub>3</sub>. Imunosenzorul propus a avut un răspuns adecvat și nu a existat niciun efect de interferență.

Un alt articol prezintă munca lui Sarkar și colab.<sup>59</sup>, care au modificat punctele de carbon (CDs) cu chitosan (CH) pentru a obține un senzor pentru detectarea vitaminei D<sub>2</sub>. Pentru caracterizarea CD-urilor s-au folosit: spectroscopia Raman, microscopia electronică de transmisie, spectroscopia UV/VIS și spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier. Pentru prepararea compozitului de puncte de carbon-chitosan (CD-CH), soluția de chitosan (1%) a fost preparată folosind o soluție de acid acetic (1%); după

ce a fost preparat compozitul, acesta a fost depus pe un substrat de sticlă de oxid de indiu-staniu (ITO) folosind metoda de depunere în picătură. S-a obținut următorul electrod: BSA/Ab-VD<sub>2</sub>/CD-CH/ITO. Pentru acest studiu a fost utilizată tehnica DPV, pentru a testa Ag-VD<sub>2</sub> în următoarele: intervalul de potențial a fost cel de la -0.2 la 0.5 V, amplitudinea pulsului a fost de 25 mV, treapta de potențial a fost cea de 5 mV, iar perioada pulsului de 50 ms. Pentru electrodul propus a fost înregistrat un răspuns în următorul interval: 1-50 ng mL<sup>-1</sup>, folosind tehnica DPV. LOD a avut valoarea de 1,35 ng mL<sup>-1</sup>, sensibilitatea a fost de 0,2 μA ng<sup>-1</sup> mL cm<sup>-2</sup> iar liniaritatea a fost între 10-50 ng mL<sup>-1</sup>. Biosenzorul propus a avut specificitate față de vitamina D<sub>2</sub>.

Men și colab.<sup>60</sup> au folosit un electrod de carbon vitros, care a fost modificat cu nanocristale bimetalice AuPd pentru detectarea vitaminelor D<sub>2</sub> și D<sub>3</sub>. Aceste două vitamine au fost determinate dintr-o soluție mixtă organică/apă folosind electrodul modificat propus. Răspunsul electrocatalitic al vitaminelor de interes a fost caracterizat prin utilizarea tehnicii CV, la o rată de scanare de 50 mV s<sup>-1</sup>, respectiv 0.0-1.5 V. Intervalul liniar de concentrație pentru vitamina D<sub>2</sub> a fost între 1 și 10 μM, iar limita de detecție a fost de 0.05 μmol L<sup>-1</sup>. Pentru vitamina D<sub>3</sub>, intervalul liniar a fost cuprins între 5 și 50 μmol L<sup>-1</sup>, iar limita de detecție a fost de 0.18 μmol L<sup>-1</sup>. Aceste două vitamine au fost detectate din tablete disponibile comercial în regiunea lor. Pentru vitaminele D<sub>2</sub> și D<sub>3</sub>, recuperările au fost mai mari decât 99% și, respectiv, 97%.

Un alt grup de cercetători, condus de Anusha<sup>61</sup>, a propus un nanosenzor electrochimic pentru analiza probelor de sânge. Pentru acest studiu au fost utilizate nanoparticule bimetalice, reprezentate de nichel și cupru și fullerene-C60. Pentru a obține nanosenzorul, un electrod de carbon sticlos a fost modificat cu fullerene-C60 folosind metoda drop-casting; după ce a avut loc această modificare, pe suprafața electrodului nou modificat au fost depuse CuNP-uri și NiNP-uri. Pentru senzorul propus s-a obținut următoarea limită de detecție: 0.0025 μmol L<sup>-1</sup> și intervalul de concentrație a fost de la 1.25 la 475 μmol L<sup>-1</sup>. Datorită faptului că vitamina D<sub>3</sub> nu este solubilă în apă, a fost investigată influența diverșilor solvenți pentru analiza precisă a vitaminei de interes. S-au obținut următoarele recuperări: în ser și în urină, recuperarea a fost mai mare de 98%, iar la tablete, recuperarea a fost mai mare de 96%. Pe baza



rezultatelor obținute, senzorul propus a fost folosit cu succes pentru determinarea vitaminei de interes din probe farmaceutice și biologice.

### **Senzori Electrochimici Utilizați pentru Detecția Vitaminei K**

Jesadabundit și colab.<sup>62</sup> au propus electrozi serigrafiați din carbon și grafit pentru determinarea vitaminei K totale (vitamina K<sub>1</sub> și vitamina K<sub>2</sub>) din probe naturale. Comparativ cu electrodul de carbon serigrafiat (SPCE), electrodul de grafit serigrafic (SPGE) a prezentat o sensibilitate mai mare pentru determinarea vitaminei de interes. Limita de determinare a fost observată la 0.099 μg mL<sup>-1</sup>. Pentru a studia eficiența senzorului, comportamentul electrochimic al unui amestec care conține atât vitamina K<sub>1</sub> cât și vitamina K<sub>2</sub>, o soluție tampon fosfat pH 3.0 și etanol (60:40) a fost testat individual folosind atât SPCE, cât și SPGE prin voltametrie ciclică (CV). Rata de scanare a fost de 100 mV s<sup>-1</sup> și potențialul operat a fost în următorul interval: -1.0 V până la +0.2 V. Pe baza acestora, rezultatele curentului de fond au fost mai mici atunci când a fost utilizat SPGE, comparativ cu cele ale SPCE. Voltametria ciclică a celor doi electrozi a fost studiată și în prezența vitaminei K. În timp ce SPGE a furnizat în mod clar două picuri catodice și anodice, cu un pic mult mai mare, SPCE a prezentat un pic larg și anodic, la 0.123 V. SPGE, care este electrodul propus, prevede următoarele: costuri reduse, o analiză rapidă, o sensibilitate ridicată, simplitate și un volum redus al probelor testate. Având în vedere faptul că limita de detecție a fost atinsă la 0.099 μg mL<sup>-1</sup> și liniaritatea a fost într-un interval de 1-15 μg mL<sup>-1</sup>, senzorul propus poate fi utilizat cu succes pentru determinarea vitaminei K totale, a vitaminei K<sub>1</sub> sau vitamina K<sub>2</sub> din probe reale.

### **Concluzii**

Acest mini-review a descris o parte din cei mai recentți senzori electrochimici care au fost utilizați pentru detectarea vitaminelor lipo- și hidrosolubile. Sensorii propuși pot fi utilizați pentru detectarea acestor vitamine din diferite tipuri de probe, precum: probele biologice, probele alimentare și probele farmaceutice. Datorită sensibilității și a selectivității lor ridicate, a recuperărilor bune și a prețului convenabil, acești senzori electrochimici reprezintă o alternativă bună pentru a înlocui metodele standard de analiză (spre exemplu, HPLC) utilizate pentru determinarea vitaminelor din diferite probe.

## References

1. H. Robert Horton, L. Moran, R. Ochs, J. Rawn, and K. Scrimgeour, *Prentice-Hall* (1996).
2. K. Kodama, M. Suzuki, T. Toyosawa, and S. Araki, *Life Sci.*, **78**, 134-139 (2005).
3. H. R. Scholte, H. F. M. Busch, H. D. Bakker, J. M. Bogaard, I. E. M. Luyt-Houwen, and L. P. Kuyt, *Biochim. Biophys. Acta*, **1271**, 75-83 (1995).
4. T. Nie, K. Zhang, J. Xu, L. Lu, and L. Bai, *J. Electroanal. Chem.*, **717**, 1–9 (2014).
5. D. M. Stanković, D. Kuzmanović, E. Mehmeti, and K. Kalcher, *Monatsh. Chem.*, **147**, 995–1000 (2016).
6. T. Pérez-Ruiz, Martínez-Lozano, A. Sanz, and V. Tomás, *Analyst*, **119**, 1825–1828 (1994).
7. E. J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, and A. Molina-Díaz, *Microchim. Acta*, **162**, 199–204 (2008).
8. M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A. I. Castellote, and M. C. Lopez-Sabater, *J. Chromatogr. B*, **830**, 41–46 (2006).
9. D. Wirkus, A. Jakubus, R. Owczuk, P. Stepnowski, and M. Paszkiewicz, *J. Chromatogr. B*, **1043**, 228–234 (2017).
10. P. Moreno and V. Salvadó, *J. Chromatogr. A*, **870**, 207–215 (2000).
11. H. Y. Gu, A. M. Yu, and H. Y. Chen, *Anal. Lett.*, **34**, 2361–2374 (2001).
12. J. Ghasemi and M. Vosough, *Spectrosc. Lett.*, **35**, 153–169 (2002).
13. A. M. I. Mohamed, H. A. Mohamed, N. M. Abdel-Latif, and M. R. A. Mohamed, *J. AOAC Int.*, **94**, 1758–1769 (2011).
14. J. Sun, C. Ren, L. Liu, and X. Chen, *Chin. Chem. Lett.*, **19**, 855–859 (2008).
15. E. E. Snell and B. E. Haskell, *Comp. Biochem.*, **21**, 47 (1970).
16. J. Ensiyeh and M. A. C. Sakineh, *Midwifery*, **25**, 649 (2009).
17. R. Jennifer, M. D. T. Niebyl, and M. D. Murphy Goodwin, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **186**, S253 (2002).
18. M. Jamigorn and V. Phupong, *Arch. Gynecol. Obstet.*, **276**, 245 (2007).
19. M. Bijad, H. Karimi-Maleh, M. Farsi, and S. A. Shahidi, *J. Food Meas. Character.*, **12**, 634 (2018).

20. T. Eren, N. Atar, M. L. Yola, and H. Karimi-Maleh, *Food Chem.*, **185**, 430 (2015).
21. S. Cheraghi, M. A. Taher, and H. Karimi-Maleh, *J. Food Compos. Anal.*, **62**, 254 (2017).
22. M. Bijad, H. Karimi-Maleh, and M. A. Khalilzadeh, *Food Anal. Methods*, **6**, 1639 (2013).
23. Z. Shamsadin-Azad, M. A. Taher, S. Cheraghi, and H. Karimi-Maleh, *J. Food Meas. Charact.*, **13**, 1781 (2019).
24. V. Herbert, *Annu. Rev. Med.*, **16**(1), 359–70 (1965).
25. P. Nagaraja, R. A. Vasantha, and H. S. Yathirajan, *Anal. Biochem.*, **307**, 316–321 (2002).
26. M. Dietrich, C. J. P. Brown, and G. Block, *J. Am. Coll. Nutr.*, **24**, 266–274 (2005).
27. D. E. Breithaupt, *Food Chem.*, **74**, 521–525 (2001).
28. Y. Kou, J. Lu, X. Jiang, B. Tian, Y. Xue, M. Wang, and L. Tan, *Electroanalysis*, **31**, 1155–1163 (2019).
29. L. Bandzuchova, R. Selesovska, T. Navratil, and J. Chylkova, *Electroanalysis*, **25** (1), 213–22 (2013).
30. Y. Jia, Y. Hu, Y. Li, Q. Zeng, X. Jiang, and Z. Cheng, *Microchim. Acta*, **186**, 84 (2019).
31. S. S. Kumar, R. S. Chouhan, and M. S. Thakur, *Anal. Biochem.* **398**, 139–149 (2010).
32. A. Lichtenstein, M. Ferreira Júnior, M. M. Sales, F. B. de Aguiar, L. A. M. Fonseca, N. M. Sumita, and A. J. S. Duarte, *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, **59**, 495 (2013).
33. A. Schmid and B. Walther, *Adv. Nutr.*, **4**, 453 (2013).
34. B. Dawson-Hughes, R. P. Heaney, M. F. Holick, P. Lips, P. J. Meunier, and R. Vieth, *Springer*, (2005).
35. V. Ganji, C. Milone, M. M. Cody, F. McCarty, and Y. T. Wang, *Int. Arch. Med.*; **3**(1), 29 (2010).
36. P. Knekt, A. Kilkkinen, H. Rissanen, J. Marniemi, K. Sääksjärvi, and M. Heliövaara, *Arch. Neurol.*, **67**(7), 808–11 (2010).
37. G. Hajiluiian, G. Nameni, P. Shahabi, M. Mesgari-Abbasi, S. Sadigh-Eteghad, and M. Farhangi, *Int. J. Obesity*; **41**(4), 639–44 (2017).
38. A. Talaie, M. Mohamadi, and Z. Adgi, *Diabetol. Metab. Syndr.*, **5**(1), 8[7] (2013).
39. I. Mozos and O. Marginean, *Bio. Med. Res. Int.* (2015).
40. C. J. Lavie, J. H. Lee, and R. V. Milani, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **58**(15), 1547–56 (2011).
41. R. Maurizi, V. Greto, R. Buzzetti, N. Napoli, P. Pozzilli, and S. Manfrini, *Metabolis.*, **70**, 57-71 (2017).

42. C. Vermeer and L. Braam, *J. Bone Miner. Metab.*, **19**, 201-206 (2001).
43. J. C. Swanson and J. W. Suttie, *Biochemistry*, **21**, 6011-6018 (1982).
44. J. Stenflo, *J. Biol. Chem.*, **249**, 5527-5535 (1974).
45. M. R. Marchili, E. Santoro, A. Marchesi, S. Bianchi, L. R. Aufiero, and A. Villani, *Ital. J. Pediatr.*, **44**, 1-5 (2018).
46. J. C. Phillippi, S. L. Holley, A. Morad, and M. R. Collins, *J. Midwifery Wom. Heal.*, **61**, 632-636 (2016).
47. P. Li, Z. Liu, Z. Yan, X. Wang, E. M. Akinoglu, M. Jin, G. Zhou, and L. Shui, *J. Electrochem. Soc.*, **166**, B821 (2019).
48. A. Puangjan, S. Chaiyasith, W. Taweeporngitgul, and J. Keawteo, *MSC 7548*.
49. G. Vijayaprasath, I. Habibulla, V. Dharuman, S. Balasubramanian, and R. Ganesan, *ACS Omega*, **5**, 29 (2020).
50. A. Sangili, P. Veerakumar, S. M. Chen, C. Rajkumar, and K. C. Lin, *Microchim. Acta*, **186**, 299 (2019).
51. H. Sadeghi, S. A. Shahidi, N. Raeisis, A. G. H. Saraei, and F. Karimi, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **15**, 10488 – 10498 (2020).
52. A. Sharma and S. Arya, *J. Electrochem. Soc.*, **166**, B1107 (2019).
53. M. M. Yuan, J. Zou, Z. N. Huang, D. M. Peng, and J. G. Yu, *Anal. Bioanal. Chem.*, **412**, 2551–2564 (2020).
54. G. Dimitropoulou, S. Karastogianni, and S. Girousi, *J. Appl. Bioanal.*, **3**(4), 70-80 (2017).
55. S. Karastogianni and S. Girousi, *Anal. Lett.*, 1-12 (2021).
56. A. Sharma, S. Arya, D. Chauhan, P. R. Solanki, S. Khajuria, and A. Khosla, *J. Mater. Res. Technol.*, **9**(6), 14321-14337 (2020).
57. D. F. Pereira, E. R. Santana, J. V. Piovesan, and A. Spinelli, *Diam. Relat. Mater.*, **105**, 107793 (2020).
58. D. Chauhan, R. Kumar, A. K. Panda, and P. R. Solanki, *J. Mater. Res. Technol.*, **8**, 6, 5490-5503 (2019).
59. T. Sarkar, H. B. Bohidar, and P. R. Solanki, *Int. J. Biol. Macromol.*, **109**, 687-697 (2018).

60. K. Men, Y. Chen, J. Liu, and D. Wei, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **12**(10), 9555-9564, (2017).
61. T. Anusha, K. S. Bhavani, J. S. Kumar, and P. K. Brahman, *Diam. Relat. Mater.*, **104**, 107761 (2020).
62. W. Jesadabundit, S. Chaiyo, W. Siangproh, and O. Chailapakul, *ChemElectroChem*, **7**(1), 155-162 (2020).

### **Progresul în electroanaliza p53, CEA și CA19-9. Un minireview.**

#### **Rezumat**

Screening tests for panels of biomarkers such as the panel comprising p53, CEA and CA19-9 facilitated early diagnosis of cancers, and improvement of the quality of life. In this minireview, diverse electrochemical sensors used for the assay of p53, CEA, and CA 19-9 in biological samples will be shown.

#### **Introducere**

În secolul al XX-lea, peste 18 milioane de persoane de pe tot globul prezentau tumori maligne și aproape 10 milioane de oameni au murit din cauza cancerului. Până în anul 2040, numărul de indivizi practice se va înmulți, cunoscând o expansiune în țările din centrul câmpiei.<sup>1</sup> În ultimii doi ani, s-a realizat o îmbunătățire clară a analizei și terapiei creșterii maligne: indivizii care se confruntă cu cele mai cunoscute tipuri de cancer sunt de două ori mai predispuși la creșterea speranței de viață cu aproape 10 ani, spre deosebire de pacienții analizați la mijlocul anilor 1970.<sup>2,3</sup> Ratele de supraviețuire au avansat enorm, dar sunt posibile pentru anumite tipuri de boală, care, printre diferitele componente, s-a datorat găsirii locației celulei canceroase și accesibilității crescute la testele de screening. Un număr mare de persoane afectate de cancer intră în cadrul sistemului medical trecând printr-o patologie: în general, concluziile esențiale și repetitive ale creșterii maligne sunt, în situația actuală, dependente de analiza țesutului afectat;<sup>2</sup> ceea ce implică, de asemenea, că majoritatea tumorilor sunt analizate atunci când este prea târziu sau sunt etichetate cu un diagnostic greșit, ceea ce limitează existența unei terapii de succes. Prin urmare, este necesară dezvoltarea unor instrumente care să poată fi utilizate în teste de screening rapide. Biomarkerii

tumorali prezintă cel mai mare interes funcțional în screening-ul bolii și evaluarea adecvată a tratamentelor. Cu ajutorul biomarkerilor, poate fi identificată prezența malignității sau pot fi oferite date utile despre modul în care se va comporta malignitatea (adică probabilitatea de progresie sau o reacție la tratament). La pacienții care nu prezintă simptome, analiții tumorali pot fi folosiți în evaluarea analizei pentru recunoașterea precoce a cancerelor. Dacă pacienții prezintă simptome, atunci biomarkerii pot face diferența în analiza leziunilor neoplazice inofensive și cele care pun pericol viața. După încheierea operației și excizarea atentă a neoplasmului, investigarea analiților tumorali poate permite evaluarea ipotezei, percepției postoperatorii, prognozei tratamentului și verificarea reacției pacientului la tratamentul de bază.<sup>4</sup> Proteina p53, antigenul carcinoembrionar și antigenul carbohidrat 19-9 sunt cei mai folosiți biomarkeri în cercetare de screening pentru o bună confirmare a cancerului gastric și colorectal.

### Metode electroanalitice propuse pentru testarea p53, CEA și CA19-9

Senzorii electrochimici s-au dovedit a fi instrumente excelente pentru testele de screening ale probelor biologice.<sup>5</sup> Diverse metode electroanalitice (de exemplu, DPV, SWV, amperometrie, metode stocastice) au fost propuse până în prezent pentru analiza p53, CEA și CA19-9 (Tabelul 1).

**Tabelul 1.** Senzori electrochimici utilizați pentru analiza biomarkerilor de cancer gastric din diferite probe biologice.

Marker tumoral	Tip de probă	Metodă electrochimică	Senzor	Limită de detecție	Referință
p53	Salivă	DPV <sup>a)</sup>	SPCE <sup>b)</sup> /PEI <sup>c)</sup> /NPs <sup>d)</sup> -Ab <sup>e)</sup> B	5.00fg mL <sup>-1</sup>	[37]
p53	Plasmă	SWV <sup>f)</sup> , DPV	P-Cys <sup>g)</sup> -GQDs <sup>h)</sup> -GNP <sup>i)</sup>	0.065fmol L <sup>-1</sup>	[38]
p53	Lizat celular	Amperometrie	AbC <sup>j)</sup> -p53-HRP <sup>k)</sup> -AbD/ MBs <sup>l)</sup>	1.29ng mL <sup>-1</sup>	[39]



p53	Ser	Bandă de testare imunocromatografică	Pt <sup>m</sup> -Pd <sup>n</sup> NPs	50.00pg mL <sup>-1</sup>	[40]
p53	Sânge integral	Metodă stocastică	L/DP <sup>o</sup> ), L/GP <sup>p</sup> )	5.85 × 10 <sup>-9</sup> □g mL <sup>-1</sup>	[41]
CEA	Ser	DPV	Ab2/PTh <sup>r</sup> )-Au <sup>s</sup> )/CEA/BSA <sup>t</sup> )/Ab1/AuNPs <sup>u</sup> )/CS <sup>v</sup> )/rGO <sup>w</sup> )/GCE <sup>x</sup> )	147.10fg mL <sup>-1</sup>	[52]
CEA	Sânge	DPV	CEA/BSA/Ab1/Ag <sup>y</sup> )@C NFSs <sup>z</sup> )/GCE	5.12pg mL <sup>-1</sup>	[53]
CEA	Sânge	DPV	BSA/anti-CEA <sup>aa</sup> )/3D CS-AuNPs <sup>ab</sup> )/hPPy <sup>ac</sup> )	3.60pg mL <sup>-1</sup>	[54]
CEA	Ser	EIS <sup>ad</sup> )	anti-CEA/rGO/GCE	50.00pg mL <sup>-1</sup>	[55]
CEA	Ser	SWV	Ab2-AuNPs-Fc <sup>ae</sup> )	0.01ng mL <sup>-1</sup>	[56]
CEA	Sânge integral, urină, salivă, și țesut	Metodă stocastică	CHIT <sup>af</sup> )/ E-NGr1 <sup>ag</sup> ) CHIT/ E-NGr2 <sup>ah</sup> )	2.00g mL <sup>-1</sup>	[57]
CA19-9	Lizat celular si ser	DPV	SPCE <sup>ai</sup> )/CB2 <sup>aj</sup> )-Ab	70.00mU mL <sup>-1</sup>	[78]
CA19-9	Ser	EIS	Au@Pd-Gra <sup>ak</sup> )/Thi-Ab2 <sup>al</sup> )/HRP	6.00mU mL <sup>-1</sup>	[79]
CA19-9	Ser	LSV <sup>am</sup> )	PDA-Ag-Ab <sup>an</sup> )/CA19-9/Au/GO-MA <sup>ao</sup> )/GCE	32.00mU mL <sup>-1</sup>	[80]
CA19-9	-	Imunotest fotoelectrochimic	ITO <sup>ap</sup> )/TiO <sub>2</sub> NWs <sup>ar</sup> )/Au/CdSe@ZnS <sup>as</sup> )	3.90mU mL <sup>-1</sup>	[81]
CA19-9	Sânge integral, urină, salivă, și țesut	Metodă stocastică	PIX <sup>at</sup> )/nanographene materials	985 mU mL <sup>-1</sup>	[82]

a) Voltametrie în puls diferențiat; b) Electrode de carbon serigrafiate; c) Polietilenimină; d) Nanoparticule; e) Anticorpi; f) Voltametrie cu undă pătrată; g) Poli L-cisteină; h) Puncte cuantice de grafenă; i) Nanoparticule de aur; j) Anticorp de captare specific; k) Peroxidaza de hrean; l) Sfere magnetice; m) Platină; n) Paladiu; o) 2,6-bis((E)-2-(furan-2-il)vinil)-4-(4,6,8-trimetilazulenă1-il)piridină în pasta de diamant; p) 2,6-bis((E)-2-(furan-2-il)vinil)-4-(4,6,8-trimetilazulenă1-il)piridină în pasta de grafit; r) Anticorp/politionină; s) Aur; t) Albumina serică bovină; u) Anticorp/Nanoparticule de aur; v) Chitosan; w) Oxid de grafenă redusă; x) Electrode sticlă de carbon; y) Argint; z) Nanosferă de nanocarbon; aa) Albumină serică bovină/anticorp antigen carcinoembric; ab) Nanoparticule tridimensionale de aur chitosan; ac) Polipirol asemănător cornului; ad) Spectroscopie de impedanță electrochimică; ae) Nanoparticule de aur modificate cu ferocen cu anticorpi policlonali; af) Chitosan; ag) Material grafenic obținut prin exfolierea electrochimică a barelor de

grafit într-un amestec de 0,2 mol L<sup>-1</sup> amoniac și 0,2 mol L<sup>-1</sup> sulfat de amoniu; <sup>ah)</sup> Material grafenic obținut prin exfolierea electrochimică a barelor de grafit într-un amestec de 0,3 mol L<sup>-1</sup> amoniac și 0,1 mol L<sup>-1</sup> sulfat de amoniu; <sup>ai)</sup> Eșectrozi serigrafiați de carbon; <sup>aj)</sup> Negru de fum; <sup>ak)</sup> Nanocompozite de grafenă funcționalizate cu miez de aur de paladiu/carcasă bimetalice; <sup>al)</sup> Anticorpi secundari de tionină; <sup>am)</sup> Voltametrie cu baleiaj liniar; <sup>an)</sup> Anticorp polidopamină-Ag; <sup>ao)</sup> Oxid de grafenă-melamină; <sup>ap)</sup> Oxid de indiu staniu; <sup>ar)</sup> Nanofire de oxid de titan; <sup>as)</sup> Miez de cadmiu-seleniu zinc-sulf; <sup>at)</sup> Protoporfirină IX.

Analiza simultană a antigenului carbohidrat 19-9, a antigenului carcinoembrionar și a supresorului tumoral p53 a fost efectuată folosind senzori stocastici bazați pe materiale de grafenă.<sup>6-8</sup> Senzorii stocastici pot recunoaște analiții în cantități foarte mici, care nu sunt detectați de majoritatea celorlalți senzori existenți. Alte beneficii considerabile ale senzorilor stocastici în comparație cu alte instrumente accesibile sunt fiabilitatea ridicată, costul scăzut de analiză, în timp ce nu este necesară pregătirea probei. Răspunsul senzorilor stocastici se bazează pe conductivitatea canalului; analiza calitativă se bazează pe semnăturile detectate pentru biomarkeri.<sup>9</sup> Selectivitatea senzorilor stocastici se bazează pe diferențele dintre semnăturile obținute pentru biomarkeri și alte substanțe găsite în probele biologice; senzorii stocastici s-au dovedit a fi foarte selectivi. Testul cantitativ are loc în interiorul canalului/porului.<sup>9</sup> Senzorii stocastici sunt foarte fiabili și pot fi utilizați pentru analiza simultană a celor trei biomarkeri.

### **Electroanaliza supresorului tumoral p53**

Proteina p53 a fost găsită inițial în 1979 având un rol de complice în restricția celulară a marelui antigen T al virusului simian.<sup>10,11</sup> S-a demonstrat că este o proteină fosforilată<sup>12,13</sup> care este exprimată într-un mod excepțional, mai mult în celulele bolii decât în celulele obișnuite,<sup>14</sup> fiind descrisă de o soliditate scăzută, care a fost constrânsă de măsuri post-tranlaționale,<sup>15</sup> și gata de a lega ADN-ul.<sup>16</sup> La nivel celular, s-a observat că proteina p53 este echipată pentru a împiedica dezvoltarea celulei.<sup>17</sup> Mai târziu, gena TP53 care codifică proteina p53 a fost configurată ca un supresor al creșterii malignității și s-a observat că este gena care suferă cele mai multe mutații în cadrul bolilor, cu aproximativ 50% penetranță.<sup>18,19</sup>

Supresorul de cancer p53 este o fosfoproteină abia perceptibilă în interiorul nucleului celulelor tipice.<sup>20</sup> În ceea ce privește stresul celular, în special cel inițiat de tulburarea acidului dezoxiribonucleic, p53 are capacitatea de a înțelege mișcarea ciclului celular, în acest fel, permițând fixarea ADN-ului<sup>21</sup> sau poate provoca apoptoza.<sup>22</sup> Aceste capacități sunt realizate, într-o măsură limitată, prin caracteristica de

transactivare a proteinei, care stimulează o progresie a calităților asociate cu ghidul ciclului celular. În interiorul celulelor maligne care poartă o proteină mutantă, p53 nu are capacitatea de a controla expansiunea celulară, ceea ce duce la fixarea inutilă a ADN-ului și la dezvoltarea celulelor care sunt în mod ereditar instabile.<sup>23-26</sup> Cele mai recunoscute modificări ale supresoare tumorale în excrescențele maligne umane sunt transformări eronate în interiorul genei care suferă o succesiune de codificări.<sup>27,28</sup> În interiorul grupurilor histogenetice majore pot fi găsite modificări similare, inclusiv afecțiuni maligne ale colonului, stomacului, plămânilor, creierului și gâtului.<sup>29</sup> Se apreciază că aceste modificări proteice sunt evenimentele ereditare cu cea mai mare continuitate în excrescențe maligne umane, în lume fiind înregistrate peste jumătate din cazuri. Peste 90% din modificările de proteine dezvăluite până acum, sunt grupate în mijlocul exonilor 4 și 10 și pot fi găsite în zona restrictivă a ADN-ului supresorului tumoral.<sup>30</sup> O caracteristică izbitoare a proteinei p53 care a atras atenția cercetătorilor este reprezentată de stabilitatea sa extinsă (timp de înjumătățire de câteva ore și 20 de minute pentru p53 de tip sălbatic) și adunarea sa în miezul celulelor neoplazice.

Deficiența mișcării utile a p53 este cunoscută pentru instigarea transformărilor de calitate și dezvoltarea cancerului ca urmare a divergențelor de structură în constituția proteinei. Valorile de ser ale p53 pentru pacienții cu excrescențe maligne gastrointestinale se modifică de la  $0.52 \pm 0.23 \text{ ng mL}^{-1}$  până la  $1,03 \pm 0,59 \text{ ng mL}^{-1}$ .<sup>33</sup> Proteina p53 suferă modificări din cauza supraexpresiei, proces care este cauzat de aranjarea celulelor neoplazice, obstructivitatea creșterii și stresul genotoxic. În acest mod, examinarea sângelui/serului uman pentru identificarea nivelului ajustat al nivelului de proteină p53 este o procedură convingătoare pentru diagnosticul și prognosticul cancerului în faza de început. Identificarea precoce a bolii crește șansele unui tratament de succes. Nu doar diminuează gradul de infecție, dar influențează suplimentar și costul tratamentului. În stadiile incipiente ale cancerului, costurile tratamentului nu sunt echivalente cu costurile unui tratament pentru pacienții cu stadiul avansat al cancerului. După cum indică informațiile detaliate primite recent de la țările cu venituri mari, medicamentele și remediul general pentru pacienții cu cancer în faza terminală, sunt de două până la mai multe ori mai mari în contrast cu pacienții care au o fază incipientă a bolii.<sup>34</sup> Pe o astfel de premisă, există o recunoaștere a îmbunătățirii

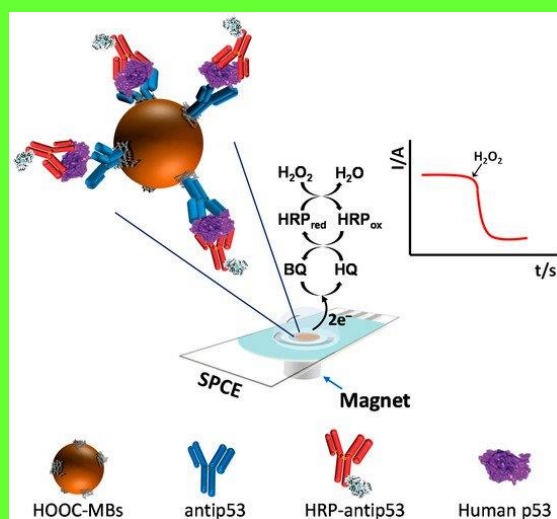
metodelor de recunoaștere a urmelor de proteine maligne care pot fi găsite în interiorul substanțelor organice care merită luată în considerare. Numeroase și recente strategii implicate în procesul de identificare a cantităților de analit/proteină modificată includ tehnici obișnuite precum test legat de imunoabsorbția enzimelor (ELISA), imunotestul electroforetic, proteomica bazată pe spectrometrie de masă și radioimunoanalizarea (RIA).<sup>35</sup> În orice caz, aceste tehnici prezintă diferite inconveniente, cum ar fi specialiști bine pregătiți pentru a opera echipamentele, materialele și instrumentele scumpe și, de asemenea, o planificare riguroasă a testelor.<sup>36</sup>

O echipă de cercetare<sup>37</sup> a folosit voltametria diferențială cu impulsuri ca metodă electrochimică pentru a investiga analitul p53 din probele de salivă. Ei au conceput un imunosenzor electrochimic, alegând un electrod de carbon serigrafiat (SCPE) care a fost adaptat cu o matrice de nanoparticule de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> carboxilat prin depunere strat cu strat și a inclus și polietilenimină ca substrat pe care au fost depuși anticorpi p53. Echipa a rafinat condițiile experimentale și le-a actualizat, reușind astfel să obțină valori mari ale intervalului de concentrație și, de asemenea, valori mari ale anticorpilor. Când au fost procesați în matrice complexe care includ cantități mari de proteine (adică ser fetal bovin și lizat celular), imunosenzorii au arătat o selectivitate bună cu interferență minimă. Ei au raportat că au obținut un interval de detecție de 1,0 până la  $10 \times 10^{-3}$  pg mL<sup>-1</sup>, o limită de detecție foarte scăzută (LOD) cu o valoare de 5,0 fg mL<sup>-1</sup>, toate acestea au fost realizate cu succes datorită potențialului stabilit de 100 mV față de Ag/AgCl.

O analiză similară de cercetare prezentată de Hasanzadeh și colab.,<sup>38</sup> a promovat un sistem de amplificare a semnalului dependent de imunosenzorul electrochimic ultrasensibil, pentru cuantificarea supresorului tumoral p53. În această cercetare, punctele cuantice de grafenă (GQD) cu un diametru de ~ 5 nm, încorporate prin piroliza acidului citric, au fost depuse electric pe stratul exterior al catozilor de Au modificați cu poli-cisteină prin interacțiunea grupărilor NH<sup>3+</sup> ale cisteinei cu grupările GQD care conțin oxigen. Sono-electrodepunerea rezultată cu GQDs/AuNPs (GNPs) a permis imobilizarea covalentă a răspunsului imun p53 biotinilat asupra filmului nanocompozit format din poli L-cisteină (P-Cys) ca rețea conductivă și GNPs ca și componentă sinergică (P-Cys -GQD-GNP). Biosenzorul a fost apoi utilizat

pentru identificarea proteinei p53 prin aplicarea a două strategii electrochimice, voltametrie cu impulsuri diferențiale (DPV) și voltametrie cu unde pătrate (SWV). Au fost raportate un interval liniar de detecție (0,0488-12,5 pM) și un LOD scăzut al p53 în plasma umană naturală (23,4 fM). Biosenzorul a fost evaluat atât pentru lizate de celule obișnuite, cât și pentru cele maligne (linia celulară tipică de la șoarece L929, celulele maligne ale colonului HCT, linia celulară PC-3 pentru afecțiunea prostatei și linia celulară de adenocarcinom uman de prostată MCF7).

Pedrero și echipa ei de cercetare<sup>39</sup> au descris un imunosenzor amperometric (Figura 1), construit cu sfere magnetice, alterate cu grupări carboxilice, pe care anticorpul specific au fost legați covalent, urmat de un timp de incubare a sferelor magnetice cu o combinație de HRP-anti- p53 (anticorp p53 care a fost marcat cu peroxidază de hrean). Fabricarea configurației sandwich include un senzor serigrafiat sub care a fost plasat un magnet pentru a reține sferile magnetice modificate. Echipa de cercetare a folosit amperometria ca tehnică electrochimică, iar rezultatele amperometrice au fost măsurate la -20V (față de electrodul de referință (Ag/AgCl), urmate de două elemente suplimentare, HQ (hidrochinona) ca mediator redox și peroxidul de hidrogen ( $H_2O_2$ ) fiind substratul enzimei.



**Figura 1.** Ilustrare schematică a elementelor fundamentale ale imunosenzorului amperometric sandwich amperometric, dezvoltat pentru determinarea proteinei umane p53. (Acces deschis de la editorul „MDPI”).<sup>39</sup>

Lizatele celulare au servit ca probe biologice pentru evaluarea proteinei p53, probe care au fost diluate simplu și matricea nu a reprezentat nicio interferență în ansamblu. Un kit comercial ELISA a fost folosit ca test comparativ pentru analiza inițială, rezultatele obținute în urma aplicării celor două metode asigură o bună corelare între ele, validând ipoteza că senzorii electrochimici pot fi o alternativă foarte atrăgătoare pentru o determinare fără efort și rapidă a diferiților analiți biologici prin utilizarea instrumentelor transferabile și prietenoase cu bugetul.

Jiang și colab.<sup>40</sup> au detaliat o bandă de testare imunocromatografică pentru identificarea proteinei tumorale p53 atât cantitativ cât și calitativ, test care este controlat de nanoparticule metalice de platină-paladiu care dă o cataliză îmbunătățită, și de asemenea, peroxidaza. Reacția peroxidazei cu 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidină (TMB) va prezenta intensități de culoare diferite care vor fi vizibile cu ochiul liber, și vor fi estimate de cercetători, marcând-o drept regula acestui test. După efectuarea experimentului, rezultatul a avut o colorație vizibilă după 30 de secunde, în intervalul de concentrație scăzută a biomarkerului, datorită activității intense a nanoparticulelor de platină-paladiu. S-a obținut o limită de detecție de  $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$  și, de asemenea, intervalul de concentrație a avut o valoare cuprinsă între  $0,1-10 \text{ ng mL}^{-1}$ , atunci când evaluarea cantitativă a proteinei a fost efectuată prin folosirea unui cititor de benzi de test portabil. Sensibilitatea benzii de testare s-a confruntat cu o sensibilitate sporită de 2000 de ori, când au comparat-o cu un test pe benzi colorate pe bază de coloizi de aur.

O altă echipă de cercetare condusă de van Staden și colab.<sup>41</sup>, a prezentat un alt senzor pentru recunoașterea p53. Analiza cercetării a fost realizată prin proiectarea unui senzor care utilizează 2,6-bis((E)-2-(furan-2-il)vinil)-4-(4,6,8-trimetilazulen-1-il)piridină ca material nanostructurat. Senzorul proiectat a identificat cu succes proteina supresoare 53 din probele de sânge netratate, iar valorile atinse de acest senzor sunt în intervalul  $\text{fg mL}^{-1}$ , ceea ce înseamnă că a fost obținută o concentrație foarte scăzută. Valorile au fost detectate în câțiva mililitri de probă, recuperările au fost mai mari de 98,00%, iar valorile pentru abaterea standard relativă au fost într-o măsură mai mică, sub 0,20%. Prin metoda stocastică, validarea metodei menționate s-a făcut prin analiza a 20 de probe de sânge, astfel că întreaga



analiză a cercetării a demonstrat că proteinele gastrice pot fi detectate cu ajutorul senzorilor electrochimici prin obținerea unei bune interdependențe între rezultate.

Pentru analiza supresoarelor tumorale p53, folosind senzorii electrochimici prezentați, în diverse probe biologice, cea mai bună limită de detecție a fost obținută atunci când a fost utilizat senzorul SPCE/PEI/NPs-Ab<sup>37</sup>, prin aplicarea metodei voltametriei cu impulsuri diferențiate (DPV).

### **Electroanaliza antigenului carcinoembrionar (CEA)**

Gold et al.<sup>42</sup> identifică cu succes în 1965 o nouă proteină, numită antigen carcinoembrionar (CEA), care este în zilele noastre cel mai utilizat biomarker tumoral. La nivel molecular, reprezintă o proteină onco-fetală care se dezvoltă devreme în viața fetală, totuși CEA poate fi găsit, de asemenea, la adulții sănătoși, dar în cantități mici. În mod fundamental, a fost clasificată ca glicoproteină cu o greutate de 200 kDa<sup>43</sup>, fiind găsită în celulele interstițiale epiteliale pe partea endo-luminală a stratului celular și este, de asemenea, o componentă a glicocalixului. CEA face parte din super-grupul de imunoglobuline<sup>44</sup> numit grupul de particule de prindere celulară legate de CEA (CEACAM). Acestea includ CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5 (CEA), CEACAM6, CEACAM7 și CEACAM8. În interiorul corpului uman, cercetările au arătat că proteina este eliminată în fluxul sanguin și poate fi găsită în ductul biliar, în secrețiile mucoase ale stomacului și în interiorul intestinului subțire. Pacienții afectați de diferite afecțiuni maligne, precum colorectal, stomac, pancreas, plămâni și prostată au prezentat valori diferite de CEA, în funcție de tipul malignității. În ciuda faptului că funcția sa definită nu a fost găsită, s-a declarat că CEA este un participant la procesul de aderență celulară, astfel încât ar putea împiedica apoptoza.<sup>44</sup>

La adulți, nivelurile normale de CEA serice sunt sub 2,5 ng mL<sup>-1</sup>, un interval de valori între 2,5-5,0 mg mL<sup>-1</sup> este evaluat ca fiind neglijabil, în timp ce o valoare crescută este considerată a fi peste 5 ng mL<sup>-1</sup>. Există diverse infecții inofensive asemănătoare bolilor inflamatorii intestinale, pancreatitei, endometriozei, bolii pulmonare obstructive cronice și cirozei hepatice, unde valorile CEA pot fi găsite în jurul limitei superioare. Fumatul este un obicei care poate ridica nivelurile normale de proteine, astfel

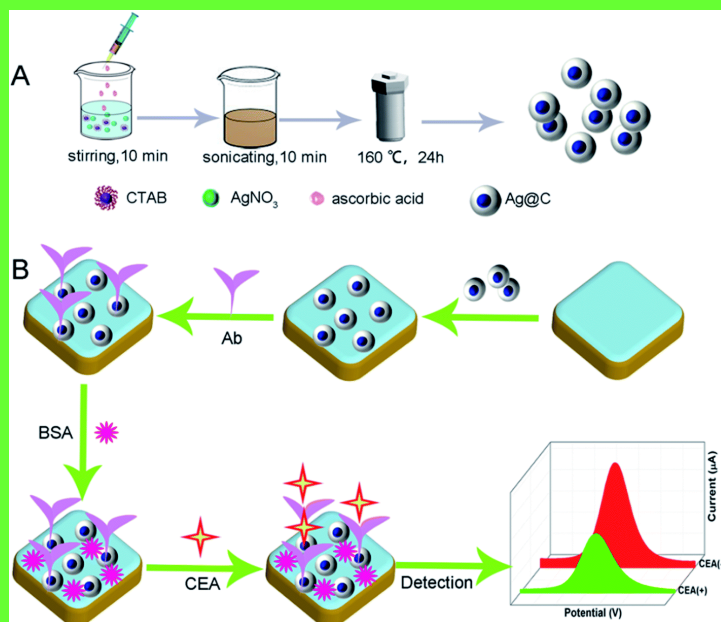
încât la fumători punctul de reper superior este în jur de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ . Cu toate acestea, pacienții afectați de o varietate de afecțiuni maligne au fost testați și s-a confirmat valori crescute de CEA într-un domeniu cu valori cuprinse între 5-40%.<sup>44,45</sup>

Antigenul carcinoembrionar (CEA) a fost găsit cu cel mai mare succes în testele de sânge. De asemenea, poate fi analizat în alte fluide corporale și în țesuturi de la biopsie.<sup>46</sup> Cea mai bună utilizare a CEA a fost ca marker de creștere tumorală, în special în cancerul tractului gastrointestinal.<sup>47</sup> Când valoarea CEA a fost profund afectată înainte de rezecția de organ sau altă administrare, este foarte posibil ca această valoare să se fi redus după rezecția în totalitate a celulelor canceroase.<sup>48</sup> În plus, nivelurile  $>20 \text{ ng mL}^{-1}$  înainte de tratament ar putea fi asociate cu malignitatea, care s-a răspândit până acum (boală metastatică).<sup>49</sup> Pacienți cu creșteri tumorale benigne și maligne, au avut valori crescute ale CEA. Cancerul de rect și cancerul de colon sunt două tipuri de cancer care, atunci când au apărut în mod repetitiv, au dus la creșterea valorii CEA.<sup>50</sup> Pacienții cu excrescențe benigne care au avut alte boli sau infecții precum pancreatita, boli inflamatorii intestinale, ciroză hepatică sau au fumat în mod continuu, au prezentat un nivel ridicat, au prezentat de asemenea valori crescute ale CEA.<sup>51</sup> Nivelurile CEA, care au schimbat progresia cancerului, ar trebui, în general, să fie corelate cu alte rezultate clinice.

Metodele electrochimice au avut rezultate mai bune la analiza probelor biologice pentru determinarea CEA. Un studiu de cercetare prezentat de Lai și echipa sa<sup>52</sup> prezintă un senzor de tip sandwich schițat pe nanoparticule de aur pe care au fost depuse oxid de grafenă și chitosan redus și decorat în continuare cu un amestec de aur și politionină care servește drept punct de semnal. Pentru designul imunosenzorului electrochimic, electrodul sticlos de carbon a fost adaptat cu un amestec strat cu strat de chitosan, nanoparticule de aur și oxid de grafenă redus, oferind în continuare o suprafață activă electrochimică largă și un transfer de electroni amplificat. Amestecul de aur și politionină a fost formulat printr-o metodă de reducere chimică, astfel semnalul electrochimic a fost îmbunătățit și a avut ca rezultat o conductivitate ridicată și o suprafață mare. Imunosenzorul dezvoltat pentru identificarea antigenului carcinoembrionar a manifestat o stabilitate ridicată în timp, sensibilitate și selectivitate favorabile față de CEA, prin obținerea

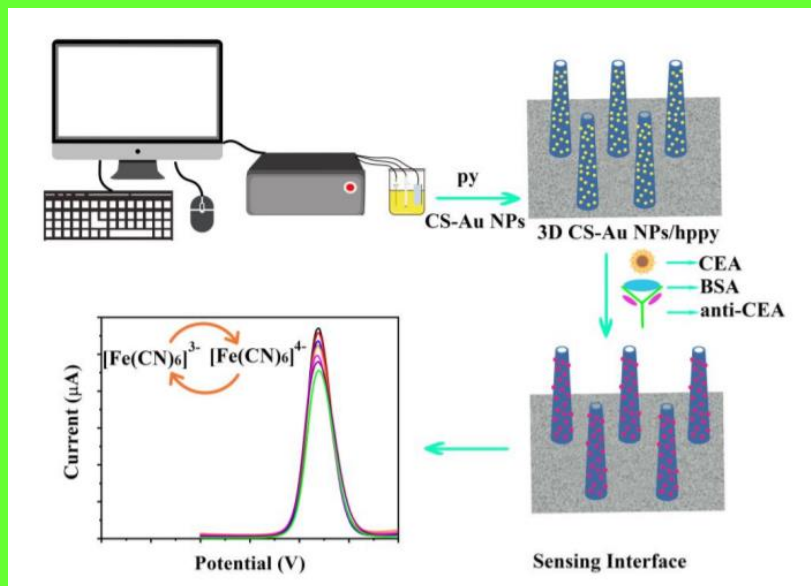
unui interval mare de concentrații cu valori cuprinse între  $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$  și  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9972$ ), și  $0,1471 \text{ pg mL}^{-1}$  reprezentând limita de detecție.

Pentru recunoașterea CEA, în studiul lor, Ding și personalul său de cercetare<sup>53</sup> au reușit să acopere cu nano-carbon exteriorul unor nanosfere de argint pentru a realiza o structură frogspawn, dar în mod tridimensional, structură care a fost folosită pentru a captura antigen anti-carcinoembrionar. O ilustrare schematică a structurii lor dezvoltate este prezentată în Schema 1. Mai mult, au sintetizat și nanocabluri de argint-carbon (Ag@C NCs) pentru comparație, iar rezultatele obținute au arătat că structura globulară 3D avea caracteristici îmbunătățite față de structura simplă din nanosfere de argint-carbon pregătite anterior, cum ar fi o conductivitate electrică mai bună, solubilitate superioară în apă, o capacitate mai fină a materialului fiind compatibil cu țesuturile organice și o suprafață a materialului extinsă - fiind preferate pentru dezvoltarea unei capacități mai mari de încărcare a anticorpilor; conductivitatea electrică crescută a structurii a fost asociată cu rezultatul sinergic al amestecării argintului cu carbonul grafit și grupării hidroxil afișate cu o structură diferită. Rolul nanosferelor de carbon - argint urma să fie platforma din care cercetătorii s-au inspirat pentru a dezvolta imunosenzorul pentru identificarea CEA, iar după îmbunătățirile pe care le-a suferit, în final, senzorul a afișat o valoare în jurul picogramelor ca și limită de detecție și un vast domeniul de detecție, variind de la  $0,0001 \text{ ng mL}^{-1}$  la  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ . De asemenea, imunosenzorul propus a fost folosit în detectarea CEA în probele de ser, cu mare succes, în principal datorită designului și caracteristicilor sale îmbunătățite, cum ar fi specificitatea și stabilitatea crescute, precum și o reproductibilitate adecvată, făcându-l în general o alegere bună în detectarea atât a CEA, cât și a altor biomarkeri în diferite boli.



**Schema 2.** Ilustrarea schematică a (A) pregătirii NFS Ag@C și (B) fabricării imunosenzorului electrochimic pe bază de Ag@C NFS pentru detectarea CEA. (Acces deschis de la editura „The Royal Society of Chemistry”).<sup>53</sup>

După cum se vede în Figura 2, o micro/nanostructură de nanoparticule de chitosan-aur, asemănător unui corn tridimensional, a fost utilizată ca interfață de detecție, în platforma de detecție electrochimică a CEA în diferite concentrații. Această platformă poate fi utilizată pentru screening clinic și diagnostic precoce, așa cum au arătat studiile efectuate de Ma și colaboratorii.<sup>54</sup> Deoarece interfața de detecție prezintă o suprafață specifică mare, conductivitate uimitoare, stabilitate și biocompatibilitate a structurii tridimensionale compuse din CS-AU NPs/hPPy, s-a observat că o concentrație scăzută de CEA poate fi detectată cu precizie. Imunosenzorul electrochimic a indicat o relație liniară favorabilă în condiții optime de pH, timp de incubare și temperatură, cu un interval larg de detecție CEA de la 0,01 la 120 ng mL<sup>-1</sup> și o limită de detecție scăzută de 0,0036 ng mL<sup>-1</sup>. În plus, imunosenzorul construit a demonstrat o bună specificitate și stabilitate pentru detectarea CEA.



**Figura 2.** Ilustrarea schematică a pregătirii filmului 3D CS-Au NPs/hPPy și a detectării pentru CEA. (Acces deschis de la editura „ESG”).<sup>54</sup>

Într-un alt studiu, prezentat de Jozghorbani et al.<sup>55</sup>, punctul de plecare în proiectarea imunosenzorului electrochimic este reprezentat de electrodul sticlos de carbon. La început, cercetătorii au folosit oxid de grafenă redusă ca agent de acoperire pentru electrodul de carbon, pentru a construi în continuare o platformă, astfel încât să poată adera anticorpul CEA la platformă. Utilizarea unui linker, clorhidrat de carbodiimidă (EDC), linker N-hidroxisuccinimidă (NHS) este o alegere bună pentru activarea grupărilor carboxil, cele din oxidul de grafenă redusă, iar după activare, cercetătorii au folosit anticorpul pentru a închide suprafața electrodului. Pentru o interconectare adecvată între antigen și anticorp, parametrii trebuiau îmbunătățiți, pentru a face acest lucru, echipa a investigat acești parametri cu două metode electrochimice, precum voltametria ciclică (CV) și spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS). De asemenea, aceste metode au fost îmbunătățite în analiza rolului electrochimic al senzorului. S-a obținut o limită de detecție bună, cu un rezultat valoric de 0,05 ng mL<sup>-1</sup>, iar imunosenzorul prezentat a evidențiat un răspuns fin la atingerea unui domeniu de concentrație cuprins între 0,1–5 ng mL<sup>-1</sup>. Mai mult, metoda amperometrică a fost evaluată prin detectarea antigenului carcinoembrionar în probe reale, cum ar fi serul

uman, rezultatele obținute putând fi comparate cu cele obținute din testul legat de imuno absorbția enzimelor (ELISA) standard.

Un imunosenzor de identificare a antigenului carcinoembrionar a fost propus de echipa lui Gu<sup>56</sup> sub forma unui tip sandwich electrochimic cu îmbunătățirea semnalului electrochimic folosind un derivat de ferocen care a fost integrat în proiectare, prin adăugarea unui sistem intern de raportare. Senzorul nou fabricat a făcut posibilă detectarea CEA în soluții tampon și probe biologice. Nanoparticulele de aur care au fost folosite pentru a crește conductivitatea suprafeței senzorului conțin și derivați secundari anti-CEA și derivați ferocen atașați. Calibrarea senzorului a fost realizată cu soluții de diferite concentrații ale proteinei țintă prin utilizarea voltametriei cu unde pătrate. Rezultatele curbei de calibrare au arătat că senzorul are un domeniu de concentrație între 0,05–20 ng mL<sup>-1</sup>, cu un LOD pentru CEA de aproximativ 0,01 ng mL<sup>-1</sup>. Probele de ser uman au fost folosite pentru a verifica performanța senzorului, pentru a identifica mai precis CEA. Senzorul prezintă și o eficiență bună după ce a fost depozitat timp de 4 săptămâni.

van Staden și colab.<sup>57</sup> au propus și dezvoltat doi senzori stocastici pentru validarea unui test de screening pentru identificarea și cuantificarea a trei biomarkeri ai cancerului: antigenul carbohidrat 19-9, antigenul carcinoembrionar și supresor tumoral p53. Biomarkerii au fost identificați din diferite probe biologice: salivă, țesut, sânge integral și urină. Rezultatele obținute la analiza biomarkerilor din probe organice utilizând senzorii investigați au fost comparate cu rezultatele obținute din analiza acelorași biomarkeri cu metodele standard, ELISA (pentru CEA și CA19-9) și chemiluminiscență (pentru p53). Limita de determinare a atins 2x10<sup>-4</sup> g mL<sup>-1</sup> iar intervalul liniar de concentrație a avut valori de 2,0x10<sup>-14</sup> – 1,6x10<sup>-9</sup> g mL<sup>-1</sup>. Materialele de grafenă care au fost dopate cu azot, reprezentând originalitatea acestui studiu, au fost folosite ca matrice permițând o fixare tangibilă a chitosanului (n=371–744). Pasta obținută în urma procesului de amestecare fizică a fost introdusă într-un senzor având forma unui ac – reprezentând o nouă modalitate în domeniul senzorilor stocastici, datorită faptului că sunt folosite special pentru analiza



probelor organice. În acest studiu, aceste materiale au fost alese pentru designul senzorului, datorită faptului că chitosanul oferă porii disponibili pentru detectarea stocastică; într-un studiu timpuriu, au fost stabilite existența porilor și, de asemenea, caracteristicile mecanice ale compuşilor CS-GR.<sup>58</sup> În general, materialele grafenice sunt preferate ca materiale active și materiale suport, pentru proiectarea senzorilor electrochimici;<sup>59-61</sup> cercetătorii au continuat să facă upgrade și să progreseze proprietățile grafenei, prin modificare electrochimică sau chimică, unde au inclus diverși modificatori organici sau anorganici, îmbunătățind astfel caracteristicile de răspuns ale senzorilor.<sup>59-61</sup>

Ca o comparație între fabricarea și designul senzorilor prezentați în această parte a revizuirii, senzorul CHIT/E-NGr proiectat de van Staden și colab.<sup>57</sup> a atins cea mai inferioară limită de detecție. Alegerea matricelor și a materialelor active pentru proiectarea senzorului a făcut posibilă, de asemenea, un domeniu larg de concentrare și o analiză multiplă de biomarkeri din patru tipuri diferite de probe biologice.

### **Electroanaliza antigenului carbohidrat 19-9 (CA19-9)**

Antigenul carbohidrat 19-9 (CA19-9) este cel mai frecvent utilizat și actualul analit de cea mai bună calitate pentru boala pancreatică.<sup>62-65</sup> Acest antigen Lewis modificat a fost recunoscut inițial de Koprowski și colegii săi în anul 1979, când a fost obținut un răspuns imun, de la un șoarece în care a fost introdusă o linie celulară de creștere malignă colorectală umană.<sup>66</sup> Antigenul Lewis este necesar pentru producerea de CA19-9, care este cunoscut și sub numele de antigen de sânge Lewis sialilat.<sup>67</sup> Antigenul carbohidrat se corelează cu stadiul sau greutatea cancerului, la pacienții cu afecțiuni ale pancreasului, cu niveluri anormale de CA19-9 în sistemul lor și, prin urmare, pot fi utilizate pentru a estima, a concluziona și a evalua rezecabilitatea.<sup>68,69</sup>

Observat în alte tipuri de afecțiuni și diverse tipuri de cancer, CA19-9 a fost adaptat pentru a prognoșta pacienții care suferă de IPMN - malignitatea neoplasmelor mucinoase papilare intraductale și pNENs - neoplasme neuroendocrine pancreatice, două malignități pancreatice necanceroase cu un risc minim de cancer.<sup>70,71</sup> Pentru IPMN, la indivizii cu boală care pun viața în pericol, nivelul seric mediu al CA19-9 a

fost de  $78,72 \text{ U mL}^{-1}$ , comparativ cu pacienții cu malignitate benignă, care au prezentat o valoare de  $27,03 \text{ U mL}^{-1}$ ,<sup>70</sup> CA19-9 a fost utilizat ca analit într-o varietate de excrescențe maligne, în special cele care provin din intestin.<sup>72</sup> Un studiu a constatat că pacienții care sufereau de malignitate colorectală și un nivel crescut de antigen carbohidrat au avut un rezultat mai prost decât pacientul care suferă de aceeași boală, dar cu un nivel scăzut de antigen carcinoembriic ( $P = 0,013$ ).<sup>73</sup> Pentru colangiocarcinom, o investigație combinată a 31 de articole a arătat că CA19-9 a avut o afectabilitate de 0,72 (95% întindere de certitudine (95% CI): 0,70-0,75) și o claritate de 0,84 (95% CI: 0,82-0,85), cu o zonă sub curba caracteristică de funcționare a receptorului (ROC) (AUC) de 0,83.<sup>74</sup>

Sensibilitatea antigenului carbohidrat ca biomarker este de aproximativ 80%,<sup>75</sup> iar dificultățile semnificative includ fals negative la persoanele Lewis-negative dar și fals pozitive în stările inflamatorii și tumorile nonpancreatice. Atunci când este combinat cu indicații sau factori potențiali de pericol, CA19-9 are potențial de screening. Când se utilizează CA19-9 ca biomarker, este important să se verifice starea antigenului Lewis. Dacă este utilizat în rolul de indicator, CA19-9 prezintă numeroase funcții precum: evaluarea stadiului tumorii, prognosticul acesteia, rezecabilitatea, timpii de reparație și, de asemenea, eficacitatea sa terapeutică.<sup>76</sup> Timpul de supraviețuire al unui pacient și al unui om sănătos. este în contact strâns cu valorile standard de antigen carbohidrat. În rolul unui promotor, cercetătorii pot folosi CA19-9 pentru a evalua caracteristicile biologice ale bolii pancreatice. De asemenea, CA19-9 poate crește evoluția tumorii intervenind în reacția imunologică a organismului, implică proteinele în procesul de glicozilare, reglând valoarea E-selectinei<sup>77</sup>, întărind angiogeneza și, în același timp, CA19-9 este un tratament țintă atrăgător pentru boală, inclusiv sisteme care încorporează anticorpi și imunizări ale persoanelor afectate de diferite boli și afecțiuni maligne.

Numeroși imunosenzori electrochimici și analize de cercetare au fost create pentru a evalua antigenul carbohidrat 19-9 și sunt prezentate în literatură de diferiți cercetători. Una dintre aceste analize de cercetare prezentate de Ibáñez-Redín et al.<sup>78</sup> introduce electrozi de carbon serigrafiați (SPCE) noi care au fost acoperiți cu foi de negru de fum (CB) și polielectroliți prin utilizarea depunerilor strat cu strat (LbL) ca și metodă. Folosind voltametria cu impuls diferențiat ca metodă electrochimică, imunosenzorii

dezvoltați în această cercetare au fost eficienți în recunoașterea analitului CA19-9 într-un interval dinamic de 0,01 până la 40 U mL<sup>-1</sup> și, de asemenea, în obținerea unei limite îmbunătățite de detecție cu o valoare de 0,07 U. mL<sup>-1</sup>. Pe lângă avantajul detectării CA19-9 în soluții standard având concentrațiile relevante pentru investigațiile clinice, imunosenzorii au fost capabili să detecteze CA19-9 în probele de ser uman și lizat de celule. Dezvoltarea acestor electrozi serigrafiați cu estimarea costurilor care sunt accesibile pentru a fi reproduse și, de asemenea, cu piese prietenoase cu bugetul pentru proiectarea senzorilor, arată că aceste tipuri de electrozi pot fi capabili să identifice biomarkeri maligni; un avantaj poate fi recrearea acestor imunosenzori care pot fi reajustați pentru a crea electrozi noi și mai buni.

Un alt studiu realizat de Yang și colab.<sup>79</sup> definește un imunosenzor electrochimic prin utilizarea nanoparticulelor de aur amestecate cu grafenă poroasă funcționalizată (Au-PGO) pentru a crea un electrod de tip sandwich care servește drept platformă de detecție. Echipa de cercetare a implicat, de asemenea, în procesul de amestecare și creare a senzorului, a unor nanocompozite de grafenă cărora le-a adăugat un miez bimetalic constând din particule de paladiu și aur (Au@Pd-Gra) care funcționează ca amplificatori de semnal pentru o identificare ultrasensibilă a antigenului carbohidrat 19- 9 (CA19-9). Senzorul Au@Pd-Gra inițial a fost pregătit în continuare, astfel încât cercetătorii să poată imobiliza peroxidaza de hrean (HRP), o cantitate mare de tionină (Thi) și anticorpi secundari (Ab<sub>2</sub>), ducând la formarea bioconjugatului final, senzor pe care l-au numit Au@Pd-Gra/Thi-Ab<sub>2</sub>/HRP. Senzorul rezultat a fost prezentat ca având numeroase avantaje precum o biocompatibilitate favorizată față de componentele organice, o activitate redox electrochimică cu valori sporite și nu în ultimul rând o activitate electrocatalitică superioară. Pentru ca limita de detecție să fie îmbunătățită pentru imunosenzorul propus, s-a realizat un studiu privind efectul sinergic între miezul bimetalic și peroxidaza de hrean, iar rezultatul a fost că în prezența H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s-a observat o îmbunătățire triplă a semnalului de detecție. Echipa de cercetare a reușit să obțină o performanță satisfăcătoare a imunosenzorului electrochimic pentru evaluarea CA19-9, cu un domeniu larg de concentrație de 0,015 până la 150 U mL<sup>-1</sup> și o limită de detecție relativ scăzută de 0,006 U mL<sup>-1</sup>, în situația în care condițiile de lucru sunt ideale. În concluzie, imunosenzorul a prezentat o

specificitate adecvată și o sensibilitate vastă, având în vedere o implementare fezabilă în cercetarea clinică.

Pentru a putea fi dezvoltate metode de detectare ultrasensibilă a analiților canceroși, este nevoie de strategii convingătoare de amplificare a sensibilității. În acest proces, Zhang și colab.,<sup>80</sup> arată că utilizarea unui proces argint/clorură de argint aplicat unui imunosenzor amperometric având structura unui senzor de tip sandwich are ca rezultat recunoașterea precisă a antigenului carbohidrat 19-9. Combinând nanoparticule de polidopamină-argint (PDA-Ag NPs) cu anticorpi care pot fi marcați, amestecul fiind folosit ca precursor de semnal și grafenă oxid-melamină (GO-MA) pentru a fi substratul construcției, au reușit să dezvolte o interfață inteligentă de detecție. Nu s-a obținut niciun răspuns al curentului după incubarea anticorpilor etichetați, cel mai probabil din cauza conductibilității insuficiente între anticorpi și electrod. Când a fost introdus  $H_2O_2$ , totuși, nanoparticulele de argint care provin de la anticorpii etichetați au fost gravate în ioni de argint, apoi au fost adsorbite în continuare de GO-MA pentru a stabili substratul electroactiv GO-MA-Ag. În soluția tampon care conține clorură de potasiu, substratul nou format a prezentat un vârf electrochimic puternic și stabil al procesului argint/clorură de argint. Imunosenzorul dezvoltat a afișat caracteristici foarte bune, cum ar fi un domeniu larg de concentrație de la 0,0001 până la 100  $U\ mL^{-1}$  și o limită de detecție ultrascăzută de 0,032  $mU\ mL^{-1}$  atunci când condițiile optime au fost puse în practică. Folosind această metodă pentru a construi platforma de tip sandwich, există o mare promisiune că electrozii pot fi folosiți cu succes în diagnosticarea clinică pentru o mai bună detecție a factorilor cancerigeni.

Zhu și colab.<sup>81</sup> au stabilit un protocol pentru recunoașterea sensibilă și specifică a antigenului carbohidrat 19-9, în care au prezentat o nouă metodă fotoelectrochimică îmbunătățită. Folosind tehnica strat cu strat, echipa a descris cum au folosit nanoparticule de aur și le-au decorat cu nanofire de oxid de titan ( $TiO_2NWs$ ) pentru a genera o configurație hibridă. Ulterior, a fost asamblată o structură finală, prin acoperirea structurii hibride cu un strat subtil de puncte cuantice combinate cu ioni de cadmiu, seleniu, zinc și sulf, rezultând o arhitectură sensibilă de nanofire aur-oxid de titan cu miez  $CdSe@ZnS$  ( $TiO_2NWs/Au/CdSe@ZnS$ ) pentru a capta anticorpii CA19-9 (Ab1). Componentele pentru semnalul de

amplificare au fost făcute din anticorpi CA19-9 amestecați cu molecule de bipiridiniu ( $V^{2+}$ ), pentru a crea noi conjugați  $Ab_2@V^{2+}$ . Imunosenzorul creat afișează o intensitate mare a fotocurentului măsurat, ceea ce poate fi explicat prin faptul că structura nou dezvoltată are capacitatea de a absorbi energia luminii, în același timp poate interfera în procesul de reparație între electroni-găuri. Anticorpii secundari CA19-9 provoacă obstrucție sterică și acest proces legat de îndepărtarea electronilor bipiridiniului induce o reducere a semnalului de identificare a fotocurentului, întregul proces fiind produs de antigenele secundare ale antigenului carbohidrat secundar – conjugații de bipiridiniu. Cercetătorii au reușit să obțină o gamă largă de concentrații de la 0,01 la 200 U mL<sup>-1</sup> și un LOD scăzut cu o valoare de 0,0039 U mL<sup>-1</sup> pentru identificarea Ag țintă, utilizând acest tip de imunotest fotoelectrochimic cu un imunosenzor bine realizat. Această procedură fotoelectrochimică prezentată a arătat, de asemenea, o mare stabilitate în timp a senzorului, o repetabilitate ridicată a testelor, specificitate pentru analit și, în viitor, ar putea fi utilizată pentru a detecta biomarkeri relevanți suplimentari.

Un nou studiu dezvoltat de van Staden și colab.,<sup>82</sup> propune utilizarea ca modificador a unei protoporfirine IX imobilizate care va fi amestecată în continuare cu diferite particule de grafenă care conțin o cantitate mare de azot, pentru proiectarea unui senzor stocastic capabil să detecteze simultan antigenul carbohidrat. 19-9, proteina p53 și antigenul carcinoembrionar în diverse probe organice, cum ar fi salivă, urină, sânge integral și probe de țesut. Sensorii au fost creați prin amestecarea particulelor fine de grafenă cu ulei de parafină și soluția de modificador, urmată de formarea senzorului în care pasta nou formată a fost introdusă într-un tub de plastic. Folosind metoda stocastică ca metodă electrochimică de cercetare, senzorul a evidențiat sensibilități mari și LOD scăzute, în timp ce intervalele de concentrație obținute din curbele de calibrare au afișat valori ridicate; toate aceste proprietăți au condus la recunoașterea analiților maligni în faze distincte ale cancerului gastric. LOD s-a confruntat cu o creștere a valorilor sale, de la  $2,1 \times 10^{-13}$  la  $2,6 \times 10^{-4}$  g mL<sup>-1</sup>, mai ales din cauza pudrei de grafenă care a fost tratată termic.

Pentru testarea CA19-9 folosind tehnici electrochimice, cel mai bun senzor a fost cel bazat pe electrod de carbon sticlos decorat cu grafen oxid-melamină (GO-MA) ca substrat al structurii și nanoparticule de polidopamină-argint (PDA-Ag NPs), în rol de precursor de semnal.

Imunosenzorul amperometric tip sandwich PDA-Ag-Ab/CA19-9/Au/GO-MA/GCE<sup>80</sup> a obținut cea mai bună limită de detecție. Echipa de cercetare a folosit voltametria cu baleiaj liniar ca tehnică electrochimică pentru determinarea CA19-9 în probe reale.

## Concluzii

Această recenzie rezumă cele mai recente tehnici electrochimice utilizate pentru determinarea p53, CEA și CA19-9 din probe biologice. Sensorii electrochimici utilizați depindeau de diferite matrice ajustate cu diferite materiale electrocatalitice. Avantajele precum sensibilitatea ridicată, stabilitatea, selectivitatea și reproductibilitatea fac ca senzorii electrochimici prezentați în această revizuire să fie selectați ca instrumente posibile pentru testele de screening ale probelor biologice pentru p53, CEA și CA19-9, pentru a putea detecta mai devreme cancerul gastric sau cancerul de colon.

## Referințe

1. World Health Organization. WHO Report on Cancer. Setting Priorities, Investing Wisely and Providing Care for All. World Health Organization; Geneva, Switzerland, (2020).
2. S.S. Raab, and D.M. Grzybicki, *Cancer J. Clin.*, **60**, 139 (2010).
3. K. Malecka, E. Mikuła, and E.E. Ferapontova, *Sens.*, **2**, 736 (2021).
4. M.J. Duffy, *Med. Princ. Pract.*, **22**, 4 (2013).
5. A. Scozzari, In *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*; Evangelista, V., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2008.
6. C. Cioates Negut , R.I. Stefan-van Staden, E.M. Ungureanu, and D. I. Udeanu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **128**, 280 (2016).
7. R.I. Stefan-van Staden, I. R. Comnea-Stancu, C. A. Visan, and A. Streinu-Cercel, *J. Electrochem. Soc.*, **162**, B351 (2015).



8. C. Cioates Negut, R.-I. Stefan-van Staden, I. Moldoveanu, E.M. Ungureanu, and C. Stanciu-Gavan, *Electrochem. commun.*, **51**, 98 (2015).
9. R.I. Stefan-van Staden, and I. Moldoveanu, *J. Electrochem. Soc.*, **161**, B3001 (2014).
10. D.P. Lane, and L.V. Crawford, *Nature*, **278**, 261 (1979).
11. D.I. Linzer, and A.J. Levine, *Cell*, **17**, 43 (1979).
12. V. Rotter, M.A. Boss, and D. Baltimore, *J. Virol.*, **38**, 336 (1981).
13. G. Jay, G. Khoury, A.B. DeLeo, W.G. Dippold, and L.J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 2932 (1981).
14. S. Benchimol, D. Pim, and L. Crawford, *EMBO J.*, **1**, 1055 (1982).
15. M. Oren, W. Maltzman, and A.J. Levine, *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 101(1981).
16. J. Bargonetti, P.N. Friedman, S.E. Kern, B. Vogelstein, and C. Prives, *Cell*, **65**, 1083 (1991).
17. S.J. Baker, S. Markowitz, E.R. Fearon, J.K. Willson, and B. Vogelstein, *Science*, **249**, 912 (1990).
18. T. Soussi and K.G. Wiman, *Cancer Cell*, **12**, 303 (2007).
19. D. Lane, and A. Levine, *Perspect. Biol.*, **2**, a000893 (2010).
20. S. Benchimol, D. Pim and L. Crawford, *EMBO J.*, **1**, 1055 (1982).
21. M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, and R. W. Craig, *Cancer Res.*, **51**, 6304 (1991).
22. E. Yonish-Rouach, D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, and M. Oren, *Nature*, **352**, 345 (1991).
23. A. J. Levine, *Cell*, **88**, 323 (1997).
24. M. Oren, and V. Rotter, *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 9 (1999).

25. A.J. Giaccia, and M.B. Kastan, *Genes Dev.*, **12**, 2973 (1998).
26. C. Prives, *Cell*, **95**, 5 (1998).
27. C. Caron de Fromentel, and T. Soussi, *Genes Chromosomes Cancer*, **4**, 1 (1992).
28. T. Soussi, Y. Legros, R. Lubin, K. Ory, and B. Schlichtholz, *Int. J. Cancer*, **57**, 1 (1994).
29. M.S. Greenblatt, W.P. Bennett, M. Hollstein, and C.C. Harris, *Cancer Res.*, **54**, 4855 (1994).
30. C. Bérout, and T. Soussi, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 200 (1998).
31. N. Rivlin, B. Ran, O. Moshe, and R. Varda, *Genes & cancer*, **2**, 466 (2011).
32. A. Chen, B. Yuanwu, G. Xiaoxiao, S. Yongsoon, D. Dan, and L. Yuehe, *RSC Adv.*, **2**, 11029 (2012).
33. A.M. Attallah, M.M. Abdel-Aziz, A.M. El-Sayed, and A.A. Tabll, *Cancer Detect Prev.*, **27**, 127 (2003).
34. World Health Organization Cancer Fact Sheet 2017. [(accessed on 22 September 2021)]; Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
35. R. Aebersold, and M Matthias. *Nature*, **422**, 198 (2003).
36. B. Zhang, Z. Xue, Y. Hui-hui, X. Shi-jun, T. Dai-hua, and F. Wei-ling, *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 19 (2007).
37. G. Ibáñez-Redín, N. Joshi, G.F. do Nascimento, D. Wilson, M.E. Melendez, A.L. Carvalho, R.M. Reis, D. Gonçalves, and O.N. Jr. Oliveira, *Mikrochim Acta.*, **187**, 619 (2020).
38. M. Hasanzadeh, H.N. Baghban, N. Shadjou, and A. Mokhtarzadeh, *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 1348 (2018).
39. M. Pedrero, F.J.M. de Villena, C. Muñoz-San Martín, S. Campuzano, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, and J. M. Pingarrón, *Biosensors*, **6**, 56 (2016).
40. T. Jiang, Y. Song, D. Du, X. Liu, and Y. Lin, *ACS Sensors*, **1**, 717 (2016).

41. R.I. Stefan-van Staden, R.M. Ilie-Mihai, L. Dinu Gugoasa, and C. Stanciu-Gavan, *J. Electrochem. Soc.*, **166**, B183 (2019).
42. P. Gold, and S.O. Freedman, *J. Exp. Med.*, **121**, 439 (1965).
43. P. Gold, and S.O. Freedman, *J. Exp. Med.*, **122**, 467 (1965).
44. S. Hammarström, *Semin. Cancer Biol.*, **9**, 67 (1999).
45. J. Seth, C. Sturgeon, and I. Hanning, *Lancet*, **1**, 1399 (1988).
46. M.B. Garnick, and W.R. Fair, *Ann. Intern Med.*, **123**, 205 (1996).
47. P.R. Carroll, M.A. Carducci, A.L. Zietman, and J.M. Rothaermel, Prostate Cancer Foundation, **1** (2005).
48. J.C. Routh, and B.C. Leibovich, *Mayo Clin. Proc.*, **80**, 899 (2005).
49. R.K. Tähtelä, *Int. J. Res.*, **6** (2004).
50. A. Smith, F. Wisloff, and D. Samson. *Br. J. Haematol.*, **132**, 41 (2005).
51. H.M. Narjis, and H.J. Aziz, *Int. J. Cell. Sci. Biol*, **3** (2014).
52. L. Yuxuan, H. Hao, X. Zhihuan, L. Song, D. Yan, and L. Xueying, *Mater. Express.*, **9**, 444 (2019).
53. M. Ding, L. Zha, H. Wang, J. Liu, P. Chen, Y. Zhao, L. Jiang, Y. Li, R. Ouyang, and Y. Miaoa, *RSC Adv.*, **11**, 16339 (2021).
54. S. Ma, Q. Zhang, M. Qin, H. Wang, Y. Zhu, Y. Zhang, and K. Zhang, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **16**, 2021.
55. M. Jozghorbani, M. Fathi, S. Habib Kazemi, and N. Alinejadian, *Anal. Biochem.*, **613**, 114017 (2021).
56. X. Gu, Z. She, T. Ma, S. Tian, and H.B. Kraatz, *Biosens. Bioelectron.*, **102**, 610 (2018).
57. R.I. Stefan-van Staden, R.-M. Ilie-Mihai, F. Pogacean, and S. M. Pruneanu, *New J. Chem.*, **44**, 20203 (2020).
58. A.M. Pandele, M. Ionita, and H. Iovu, *UPB Sci. Bull.*, **76**, 107 (2014).

59. S.A. Zaidi, F. Shahza, and S. Batool, *Talanta*, **210**, 120669 (2020).
60. M. Coros, S. Pruneanu, and R.I. Stefan-van Staden, *J. Electrochem. Soc.*, **167**, 037528 (2020).
61. R.I. Stefan-van Staden, R.M. Ilie-Mihai, F. Pogacean, and S. Pruneanu, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **23**, 1 (2019).
62. D.P. Ryan, T.S. Hong, and N. Bardeesy, *N. Engl. J. Med.*, **371**, 2140 (2014).
63. G. Luo, M. Guo, K. Jin, Z. Liu, C. Liu, H. Cheng, Y. Lu, J. Long, L. Liu, J. Xu, Q. Ni, and X. Yu, *Pancreatology*, **16**, 1057 (2016).
64. G. Luo, C. Liu, M. Guo, H. Cheng, Y. Lu, K. Jin, L. Liu, J. Long, J. Xu, R. Lu, Q. Ni, and X. Yu, *Ann. Surg.*, **265**, 800 (2017).
65. R. Kannagi, *Chang Gung Med. J.*, **30**, 189 (2007).
66. H. Koprowski, Z. Steplewski, K. Mitchell, M. Herlyn, D. Herlyn, and P. Fuhrer, *Somatic Cell Genet.*, **5**, 957 (1979).
67. T.F. Orntoft, E.M. Vestergaard, E. Holmes, J.S. Jakobsen, N. Grunnet, M. Mortensen, P. Johnson, P. Bross, N. Gregersen, K. Skorstengaard, U.B. Jensen, L. Bolund, and H. Wolf, *J. Biol. Chem.*, **271**, 32260 (1996).
68. W. Hartwig, O. Strobel, U. Hinz, S. Fritz, T. Hackert, C. Roth, M.W. Buchler, and J. Werner, *Ann. Surg. Oncol.*, **20**, 2188 (2013).
69. U.K. Ballehaninna, and R.S. Chamberlain, *J. Gastrointest. Oncol.*, **3**, 105 (2012).
70. J.Y. Jang, T. Park, S. Lee, Y. Kim, S.Y. Lee, S.W. Kim, S.C. Kim, K.B. Song, M. Yamamoto, T. Hatori, S. Hirono, S. Satoi, T. Fujii, S. Hirano, Y. Hashimoto, Y. Shimizu, D.W. Choi, S.H. Choi, J.S. Heo, F. Motoi, I. Matsumoto, W.J. Lee, C.M. Kang, H.S. Han, Y.S. Yoon, M. Sho, H. Nagano, G. Honda, S.G. Kim, H.C. Yu, J.C. Chung, Y. Nagakawa, H.I. Seo, and H. Yamaue, *Ann. Surg.*, **266**, 1062 (2017).

71. G. Luo, K. Jin, H. Cheng, C. Liu, M. Guo, Y. Lu, C. Yang, J. Xu, W. Wang, H. Gao, S. Zhang, J. Long, Q. Ni, J. Chen, and X. Yu, *Oncol. Lett.*, **14**, 6795 (2017).
72. S. Scara, P. Bottoni, and R. Scatena, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **867**, 247 (2015).
73. J. Stikma, D.C. Grootendorst, and P.W. van der Linden, *Clin. Colorectal Cancer*, **13**, 239 (2014).
74. B. Liang, L. Zhong, Q. He, S. Wang, Z. Pan, T. Wang, and Y. Zhao, *Med. Sci. Monit.*, **21**, 3555 (2015).
75. K.S. Goonetilleke, and A.K. Siriwardena, *Eur. J. Surg. Oncol.*, **33**, 266 (2007).
76. S.K. Goh, G. Gold, C. Christophi, and V. Muralidharan, *ANZ J. Surg.*, **87**, 987 (2017).
77. A. Takada, K. Ohmori, T. Yoneda, K. Tsuyuoka, A. Hasegawa, M. Kiso, and R. Kannagi, *Cancer Res.*, **53**, 354 (1993).
78. G. Ibáñez-Redín, E.M. Materon, R.H.M. Furuta, D. Wilson, G.F. do Nascimento, M.E. Melendez, A.L. Carvalho, R.M. Reis, O.N. Oliveira Jr., and D. Gonçalves, *Microchim. Acta*, **187**, 417 (2020).
79. F. Yang, Z. Yang, Y. Zhuo, Y. Chai, and R. Yuan, *Biosens. Bioelectron.*, **66**, 356 (2015).
80. N. Zhang, D. Zhang, C. Changshun, and Z. Ma, *Anal. Chim. Acta*, 1093 (2019).
81. H. Zhu, G.C. Fan, E.S. Abdel-Halim, J.R. Zhang, and J.J. Zhu, *Biosens Bioelectron.*, **77**, 339 (2016).
82. R.I. Stefan-van Staden, R.M. Ilie-Mihai, and S. Gurzu, *Anal. Lett.*, **53**, 2545 (2019).

## 2022:- Etapa 2-Dezvoltarea, evaluarea senzorilor / sondelor / dispozitivelor cu platformă electrochimică / optică serigrafiată pe soluții de analiți țintă și senzori / sonde / dispozitive fiabile și adecvate pentru platforme de detectare de tip unic pe probe reale.

### Rezumatul etapei:

În cadrul acestei etape s-au identificat și selectat cele mai bune materiale pentru design-ul screen-printed electrozilor, plasma rece s-a utilizat pentru depuneri de nanostrate de carbon (e.g., structuri de grafit, grafena), nanograften, nanoparticule de metale rare au fost sintetizate și utilizate la design-ul senzorilor. Acești senzori au fost integrați în platforme 2D/3D și utilizați la determinarea unor substanțe de interes din produse alimentare, farmaceutice, mediu (ape) și din probe biologice. Toți senzorii au fost caracterizați utilizând metode de analiză de suprafață, spectrometrie de impedanță, SEM. Toți senzorii construiți au fost evaluați electrochimic și validați pentru determinări de biomarkeri pentru diagnosticarea cancerului de sân, vitamine (tiamina), coloranți, bisulfiti, limonen, acid sorbic, poluanți (cu ar fi bisfenolii) și a unor compuși farmaceutici cum ar fi ibuprofen, ketoprofen, flurbiprofen, nitrat de butoconazole. O lucrare a fost prezentată ca poster la o conferință internațională, 4 lucrări sunt acceptate spre publicare în reviste ISI, 13 lucrări au fost publicate în reviste ISI și alte 6 lucrări sunt în evaluare la reviste ISI.

### Raportul de etapa:

**Toate activitățile și obiectivele prevăzute pentru această etapă au fost îndeplinite. Câteva din rezultatele cele mai bune obținute în această etapă sunt prezentate mai jos.**

## **Minireview: Tendințe actuale și provocări viitoare pentru determinarea patulinei în produsele alimentare**

### Rezumat

Această mini-revizuire ia în considerare articole din ultimii cinci ani și prezintă un rezumat al metodelor analitice convenționale și actuale pentru determinarea patulinei (PAT) în produsele alimentare.

**Cuvinte cheie:** patulina; imunosenzori/biosenzori/aptasenzori; cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC); produse alimentare

### Introducere

Patulina (PAT) este o micotoxină produsă de o varietate de mușcăiuri, în special *Aspergillus*, *Penicillium* și *Byssochlamys*. PAT este asociată în mod obișnuit cu mere și produsele din mere, dar se găsește și în pere, smochine și roșii (Funes și Resnik 2009; Karaca și Nas 2006; Cunha și colab. 2014), precum și în ardeiul gras, cereale precum: grâul, orezul și porumbul și în unele brânzeturi (Van de Perre și colab. 2014; Assuncao și colab. 2016; Pattono și colab. 2013). Prezența PAT este reglementată. Se cunosc



patru categorii de toxine alimentare, cum ar fi toxina vegetală, un agent patogen bacterian, ficotoxina și micotoxina (Malhotra et al. 2014). Toxina vegetală este un metabolit secundar produs de plantă (Mithofer și Maffei 2016). Există un alt microorganism agresiv care provoacă daune organismului, un agent patogen bacterian, *Mycobacterium tuberculosis*, care provoacă tuberculoza (Doss et al. 2017), febra tifoidă, sifilisul și tetanosul (Seale et al. 2014). O altă toxină se găsește sub formă de ficotoxină și este produsă de microalgele marine (Rasmussen et al. 2016). Cea mai frecventă toxină prezentă într-o mare varietate de alimente și furaje este micotoxina, un metabolit secundar produs de ciuperci aparținând genurilor *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* și *Penicillium*, care este foarte toxică pentru oameni și sănătatea animalelor. Culturile sunt adesea contaminate de micotoxine, ceea ce duce la pierderi economice substanțiale la nivel mondial (Moretti, Logrieco și Susca 2017). PAT poate pătrunde în organism prin piele, tractul respirator și digestiv, dar ingerarea de alimente contaminate cu micotoxine rămâne principala cale de pătrundere în organism (Agriopoulou 2016).

O serie de produse agricole, cum ar fi furajele (Kebede et al. 2020), ierburile și condimentele (Gambacorta et al. 2019), cerealele (Varzakas 2016), cacao și cafeaua (Bessaire et al. 2019), sucul de struguri, vinurile (Welke 2019), berea (Pascari et al. 2018), produse lactate și laptele (Viegas et al. 2020), fructele și legumele proaspete și uscate (Sanzani, Reverberi, și Geisen 2016), precum și nucile (Kluczkovski 2019), pot fi contaminate cu PAT. Datorită consumului de alimente sau de furaje contaminate cu PAT (Binder et al. 2007), au fost identificate următoarele efecte adverse (acute și cronice): cancerigene, mutagene, teratogene și imunosupresoare (Wild și Gong 2010). Astfel, Agenția Internațională pentru Cercetarea Cancerului (IARC) a inclus aflatoxina B1 (AFB1) în grupa 1 de compuși cancerigeni pentru om (Ostry et al. 2017).

Concentrațiile de PAT găsite în sucurile și probele de mere comercializate în Brazilia au depășit limita maximă admisă stabilită în această țară, fiind un real pericol pentru consumatori (Dias et al. 2019). Deși PAT a demonstrat, de asemenea, efecte teratogene și mutagene în studiile pe celule de la animale, aceasta nu este încă considerată cancerigenă pentru oameni (Mandappa, Basavaraj, și Manonmani 2018). Tehnicile analitice utilizate pentru detectarea PAT sunt tehnici cromatografice, cum ar fi cromatografia în

strat subțire (TLC), cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) cuplată cu ultraviolete (UV), fluorescență (FLD), matrice de diode (DAD) sau spectrometrie de masă (MS) și cromatografia lichidă de înalta ultra performanță (UHPLC) sau cromatografia lichidă de ultra performanță (UPLC) cu material de umplere a coloanei redus (1-2 μm) (Pereira, Fernandes și Cunha et al. 2014). Analizele PAT sunt mult îmbunătățite prin cuplarea tehnicilor de cromatografie lichidă (LC) cu MS (de exemplu, LC-MS; cromatografie lichidă-spectrometrie de masă în tandem (LC-MS/MS)) (Alshannaq și Yu 2017).

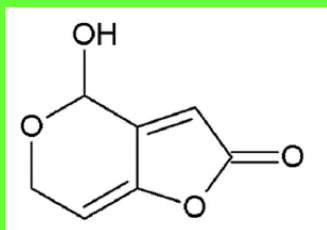
Pentru o determinare rapidă a PAT se utilizează metode bazate pe imunoanaliza, cum ar fi testul imunoenzimatic (ELISA) (Zhang et al. 2018) și cel cu flux lateral (LFD) (Krska și Molinelli 2009), dipstick-uri și dispozitive de curgere (Pereira, Fernandes și Cunha et al. 2014). Biosenzorii sunt instrumente rapide, fiabile și cu costuri reduse care permit identificarea micotoxinelor în alimente (Logrieco et al. 2005). Cele mai recente metode de determinare a PAT în alimente sunt realizate prin metode proteomice și genomice, tehnici moleculare, nasul electronic (Rodríguez et al. 2015) și imagistica hiperspectrală (HSI) (Liang et al. 2018). Cel mai recent studiu utilizează imagistica prin spectrometrie de masă cu ionizare prin ablație cu laser (imagistică LAESI) pentru a investiga răspândirea PAT din zonele putrede în zonele sănătoase ale fructelor (da Silva Lima et al. 2022). În comparație cu metodele analitice care sunt utilizate în prezent pentru determinarea PAT, senzorii electrochimici sunt remarcabili datorită simplității experimentelor, costului redus și selectivității ridicate.

Scopul acestei mini-revizuiri este de a discuta cele mai inovatoare metode analitice bazate pe senzori care pot determina cantitativ și calitativ PAT în produsele alimentare.

### **Informații generale despre PAT**

PAT ( $C_7H_6O_4$ , 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c] piran-2(6H)-ona) (Figura 1) aparține clasei de micotoxine care este produsă în principal de specia fungică *Penicillium expansum* și a fost utilizată pentru prima dată datorită proprietăților sale antibiotice (Sadok, Szmagara și Staniszevska 2018). În prezent, PAT este un contaminant frecvent întâlnit în hrana pentru animale și alimente (Zbynovska et al. 2016). Cele mai grave efecte asupra sănătății în urma ingerării de PAT la om sunt edemele, ulcerațiile intestinale, agitația,

convulsiile, vărsăturile și inflamațiile (Nunes da Silva et al. 2007). Copii sunt mai expuși riscului de toxiinfecții alimentare cauzate de PAT, deoarece consumă mai multe produse alimentare contaminate. În ultimele decenii, din cauza toxicității PAT, multe țări au elaborat reglementări stricte privind concentrația maximă admisă în alimentele contaminate.



**Figura 1.** Structura patulinei (PAT).

În Tabelul 1 sunt prezentate standardele pentru PAT adoptate de către Uniunea Europeană (UE) (Comisia Comunităților Europene 2006), China (Comisia națională pentru sănătate și planificare familială a Republicii Populare Chineze, Administrația de Stat pentru Alimente și Medicamente 2017), Administrația Americană pentru Alimente și Medicamente (US Food and Drug Administration 2004), Comisia Alimentară Codex (CAC) (Organizația pentru Alimentație și Agricultură/Organizația Mondială a Sănătății 2019), America de Sud, Uruguay și Brazilia (Ramos Girona et al. 2011). Accentul pus pe diferite standarde este aproape același pentru fructe și preparatele din fructe. S-a observat că standardele stabilite de UE sunt mai complete. Valoarea maximă a nivelului de PAT a fost stabilit de UE la 50  $\mu\text{g/L}$  pentru sucurile de fructe și produsele derivate, 25  $\mu\text{g/L}$  pentru produsele solide pe bază de mere și 10  $\mu\text{g/L}$  pentru sucurile și alimentele destinate bebelușilor și copiilor mici (Puel, Galtier și Oswald 2010). Organizația Mondială a Sănătății (OMS) limitează PAT la mai puțin de 0.4  $\mu\text{g/L}$ . Stabilirea unor limite maxime pentru anumite alimente a dus la o cerere tot mai mare de metode analitice eficiente, selective și sensibile. Deoarece PAT este rezistentă la temperaturi ridicate și stabilă în condiții acide, este dificil de eliminat din timpul procesului de fabricare al alimentelor (Zhong et al. 2018).

**Tabel 1.** Standarde privind limita de contaminare pentru PAT în produsele alimentare conform Uniunii Europene, China, Comisia Alimentara Codex, America, Uruguay, Brazilia și Agentia Americana pentru Mancare si Medicamenete.

Regiunea	Produse alimentare	Limita standard ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
	Sucuri de fructe, sucuri de fructe concentrate sub formă reconstituită și nectaruri de fructe	50
	Băuturi spirtoase, cidru și alte băuturi fermentate derivate din mere sau care conțin suc de mere	50
	Produse solide din mere, inclusiv compot de mere, piure de mere destinat consumului direct	25
UE	Suc de mere și produse solide din mere, inclusiv compot de mere și piure de mere, pentru sugari și copii mici	10
	Alimente pentru sugari, altele decât alimentele prelucrate pe bază de cereale pentru sugari și copii mici	10
	Produse din fructi	50
China	Suc de fructe și legume	50
	Lichior	50
CAC	Suc de mere	50
South America, Uruguay, and Brazil	Suc de fructi	50

### Metode convenționale de separare pentru PAT

În legătură cu problemele de siguranță alimentară, ar trebui să existe un instrument sofisticat pentru cuantificarea conținutului de PAT în alimente (Tabel 2). Sunt disponibile numeroase tehnici convenționale de separare pentru determinarea PAT, cum ar fi TLC (Welke et al. 2009), HPLC (Wu et al. 2018), cromatografia în fază gazoasă (GC) (Zhou și Tang 2020), cromatografia în fază gazoasă cuplata cu spectroscopia de masă (GC-MS) (Xiao și Fu 2012), LC-MS (Schlegel și Elsinghorst 2020) și electroforeza capilară (CE) (Goud et al. 2018). ELISA (Leite et al. 2020) și reacția în lanț a polimerazei (PCR) (Tannous et al. 2015) sunt metode standard utilizate în laboratoarele acreditate.

**Tabel 2.** Metode raportate pentru determinarea PAT.

Metoda	Domeniul liniar de concentrație	Limita de cuantificare	Limita de detectie	Referinte
MISPE-CZE-MS/MS <sup>a</sup>	1.0 - 100.0 µg/kg	1.0 µg/kg	-	Moreno-Gonzalez et al., 2021
HPLC-MS <sup>b</sup>	0.5 - 50.0 µg/L	0.3 µg/L	1.0 µg/L	Yang et al., 2017
HPLC-DAD <sup>c</sup>	5.0 - 100.0 µg/kg	5.0 µg/kg	1.5 µg/kg	Sadok, Szmagara, and Staniszewska, 2018
MI-SPE-LC-MS/MS <sup>d</sup>	1.0 - 100.0 ng/mL	0.2-0.5 ng/g	0.05-0.2 ng/g	Zhao et al., 2019
UPLC-MS/MS <sup>e</sup>	-	42 µg/kg	50 µg/L; 12.5 µg/kg	Dias et al., 2019
MMISB <sup>f</sup>	-	50 ng/g	10 ng/g	Regal et al., 2017

<sup>a</sup>MISPE-CZE-MS/MS - molecularly imprinted polymer solid-phase extraction capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry; <sup>b</sup>HPLC-MS - high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry; <sup>c</sup>HPLC-DAD - high-performance liquid chromatography coupled with diode array; <sup>d</sup>MI-SPE-LC-MS/MS - molecularly imprinted polymer acts as a sorbent in the solid-phase extraction column coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry; <sup>e</sup>UPLC-MS/MS – ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; <sup>f</sup>MMISB - magnetic molecularly imprinted stir-bar.

Electroforeza în zona capilară cu extracție în fază solidă cu polimeri moleculari imprinși în linie cuplată cu spectrometria de masă (MISPE-CZE-MS/MS) este o nouă metodă dezvoltată de Moreno-Gonzalez et al. (2021) pentru determinarea PAT în măr și produsele sale. Caracteristicile de performanță analitică ale metodei în linie-MISPE-CZE-MS/MS pentru determinarea PAT în mere și produsele sale au fost legate de concentrație de la 1.00 până la 100.00 µg/kg cu un coeficient de determinare ( $R^2$ ) egal cu 0.997 și limită de cuantificare (LOQ) de 1.00 µg/kg sub conținutul maxim de PAT conform UE pentru acest produs. Timpul de migrare și acuratețe a picului au fost estimate ca fiind mai mici de 1.60, respectiv 14.90%. Selectivitatea a fost examinată în prezența 5-hidroximetilfurfuralului, care a reprezentat interferența critică în acest tip de matrice. Determinarea PAT prin această metodă a arătat o îmbunătățire a gradului de automatizare, pe lângă acuratețe, selectivitate și sensibilitate. Prin combinarea HPLC cu MS (Spadaro et al. 2020), s-a obținut un tandem analitic LC-MS sensibil, care a fost utilizat în domenii importante, cum ar fi prelucrarea alimentelor (Stadler et al. 2020), în agricultura (Hajrulai-Musliu et al.

2021) și produse farmaceutice (Wei et al. 2019). O abordare HPLC-MS pentru detectarea PAT în suc a fost dezvoltată cu succes de către Yang et al. (2017). Au fost obținute următoarele caracteristici analitice pentru PAT: intervalul liniar de concentrație a fost de la 0.50 la 50  $\mu\text{g/L}$ ,  $R^2$  de 0.9986, valoarea calculată a LOQ a fost de 0.30  $\mu\text{g/L}$ , iar limita de detecție (LOD) a avut o valoare de 1.0  $\mu\text{g/L}$  în suc. Recuperările au fost cuprinse între 91.6 și 95.7%, cu abatere standard relativă între 6.53 și 11.6% pentru măsurătorile pe parcursul unei zile, și abaterea standard relativă între 6.87 și 11.0% pentru măsurătorile între zile. Metoda descrisă poate fi aplicată cu succes în analiza diferitelor tipuri de probe.

Sadok, Szmagara și Staniszewska (2018) au raportat că HPLC cuplata cu matricea de diode a fost potrivită pentru detectarea PAT în căpșuni. A fost descrisă extracția optimizată a probelor de fructe prin metoda modificată Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) cu acetonitril acidulat cu acid acetic și săruri tamponate cu citrat, urmată de o extracție dispersivă în fază solidă cu ajutorul unei amine și a carbonului grafitizat. Metoda a prezentat o limită de detecție de 1.5  $\mu\text{g/kg}$  și o limită de cuantificare de 5.0  $\mu\text{g/kg}$ , iar validarea s-a realizat pe o probă reală pentru trei niveluri de concentrație de 5.0, 10.0 și 50.0  $\mu\text{g/kg}$ . După validare, recuperarea PAT a fost ridicată. Această metodă a fost utilizată cu succes pentru analizarea căpșunilor congelate și proaspete. Zhao et al. (2019) au preparat un polimer imprimat molecular (MIP) cu adsorbție specifică pentru PAT. MIP a fost polimerizat din 2-oxindol și acid 6-hidroxicotinic ca moleculă model, trimetacrilat de trimetilolpropan ca agent de reticulare, acid metil acrilic ca monomer, metanol ca solvent porogen și 2,2-azobis-(2-metilpropionitril) ca inițiator. MIP acționează ca sorbent în coloana de extracție în fază solidă. MI-SPE s-a utilizat pentru extracția selectivă a PAT din alimente. A fost raportată o selectivitate remarcabilă față de PAT în mere, suc de mere, păducel, suc de păducel, suc mixt, vinuri și roșii pentru trei concentrații spike, cu o abatere standard relativă mai mică de 4.5% și s-au obținut recuperări medii între 81.3 și 106.3%. Prin combinarea metodei MI-SPE cu LC-MS/MS s-a observat o liniaritate largă de concentrație de la 1.0 la 100.0  $\text{ng/mL}$  cu  $R^2$  mai mare de 0.998. Valorile obținute pentru limita de cuantificare a zece determinări au fost de 0.2 până la 0.5  $\text{ng/g}$ , iar limita de detecție a trei determinări a fost de 0.05-0.2  $\text{ng/g}$ . Comparativ cu metoda QuEChERS, metoda propusă a avut ca rezultat o purificare mai bună și o recuperare mai mare a PAT din alimente.



Dias et al. (2019) au dezvoltat o metodă inovatoare pentru determinarea PAT în probe de mere prin cromatografie lichidă în tandem cu spectrometria de masă (UPLC-MS/MS). S-a realizat validarea metodei prin evaluarea domeniului liniar, a limitei de cuantificare și detecție, acuratețea, efectul matricei precum și precizia. Această metodă a fost adecvată pentru determinarea PAT în mere și sucuri de mere, cu recuperări cuprinse între 102 și 108% în sucul de mere, și între 76 și 84% în mere, cu o abatere standard relativă mai mică de 15% în ambele cazuri. Regal et al. (2017) au investigat o metodă rapidă și selectivă, ușor de reprodus în alte laboratoare pentru izolarea PAT din mere. Metoda se bazează pe o bară de agitare magnetică imprimată molecular (MMISB) cu 2-oxindol folosit drept șablon. Prin această metodă, protocolul de extracție a fost redus, iar barele de agitare imprimate au fost ușor de utilizat. Recuperările din probele de mere au fost cuprinse între 60.0 și 70.0%. În viitor, metoda poate fi îmbunătățită cu ajutorul unor instrumente mai sensibile. Aceste tehnici prezintă unele inconveniente care implică personal calificat necesar pentru efectuarea analizei, substanțe chimice nocive utilizate în timpul procedurilor experimentale, o cantitate mare de analit, etape de spălare plictisitoare și costuri ridicate.

### **Metode recente bazate pe senzori nanostructurați pentru determinarea PAT**

Provocările recente ale chimiei analitice sunt reprezentate de testarea probelor alimentare (Tabel 3). Senzorii sunt remarcabili datorită simplității experimentelor, costului redus și selectivității. Aceștia au aplicații importante printre senzorii obișnuiți și se află în stadiul comercial pentru evaluări în agricultură, industrie și mediu (Goud et al. 2019). În detectarea urmelor, au fost efectuate studii extinse pentru a îmbunătăți selectivitatea prin modificarea suprafeței electrodului combinată cu selectivitatea chimică. Această modificare poate afecta parametrii importanți, cum ar fi stabilitatea, sensibilitatea, reproductibilitatea și repetabilitatea.

**Tabel 3.** Diferite metode analitice utilizate pentru determinarea PAT.

Electrod modificat	Aplicație	Domeniul de concentrație (mol L <sup>-1</sup> )	Limita de detecție (mol L <sup>-1</sup> )	Referinte
MIP <sup>a</sup> /Au@PANI <sup>b</sup> /SeS <sub>2</sub> @Co	Potentiometric	1.0×10 <sup>-12</sup> -1.0×10 <sup>-7</sup>	6.6×10 <sup>-13</sup>	Selvam et al., 2021

MOF <sup>c</sup> /SPE <sup>d</sup>					
Peroxidase-like AgNPs@ZnMOF <sup>e</sup>	MIP-capped	Fluorescence	$1.0 \times 10^{-7}$ - $1.0 \times 10^{-5}$	$6.0 \times 10^{-8}$	Bagheri et al., 2018
DNA <sup>f</sup> aptamers		Colorimetric	$3.0 \times 10^{-10}$ - $2.0 \times 10^{-8}$	$3.0 \times 10^{-10}$	Wu et al., 2016
Apt <sup>g</sup> /PEG <sup>h</sup> /SPCE		Impedimetric	$6.4 \times 10^{-9}$ - $1.6 \times 10^{-7}$	$1.8 \times 10^{-11}$	Khan et al., 2019
MIP/Thionine-PtNP-NGE <sup>i</sup> /GCE <sup>j</sup>		Potentiometric	$1.3 \times 10^{-11}$ - $1.3 \times 10^{-8}$	$6.4 \times 10^{-12}$	Huang et al., 2019
MIP-Au <sup>k</sup> /CS-CDs <sup>l</sup> /GCE		Potentiometric	$1.0 \times 10^{-12}$ - $1.0 \times 10^{-9}$	$7.6 \times 10^{-13}$	Guo et al., 2017
rGO <sup>m</sup> /SnO <sub>2</sub> <sup>n</sup> composite for receptor-free electrochemical technique		Voltammetric	$5.0 \times 10^{-9}$ - $6.0 \times 10^{-7}$	$6.6 \times 10^{-10}$	Shukla et al., 2020
Apt/DpAu <sup>o</sup> /ZnO NRs <sup>p</sup> -CS/AuE <sup>r</sup>		Voltammetric	$3.2 \times 10^{-12}$ - $3.2 \times 10^{-7}$	$1.7 \times 10^{-12}$	He and Dong, 2018
AuNP-BP NSs <sup>s</sup> /GCE based aptasensing		Impedimetric	$1.0 \times 10^{-10}$ - $1.0 \times 10^{-5}$	$3.0 \times 10^{-11}$	Xu et al., 2019
MIP/Au@Cu-MOF <sup>t</sup> /N-GQDs <sup>u</sup> /GCE		Voltammetric	$6.4 \times 10^{-12}$ - $4.5 \times 10^{-7}$	$4.5 \times 10^{-14}$	Hatamluyi et al., 2020
anti-PAT-BSA <sup>v</sup> IgG <sup>w</sup> GCE		Voltammetric	$3.2 \times 10^{-8}$ - $1.3 \times 10^{-6}$	$3.2 \times 10^{-8}$	Song, Wang, and Kim, 2021
MIP-QCM <sup>x</sup>		Piezoelectric	$4.8 \times 10^{-8}$ - $3.8 \times 10^{-7}$	$1.9 \times 10^{-8}$	Fang et al., 2016
MIP capped Mn-doped ZnS QDs <sup>y</sup>		Phosphorescent	$4.3 \times 10^{-7}$ - $6.5 \times 10^{-6}$	$3.2 \times 10^{-7}$	Zhang et al., 2017
rGO-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> <sup>z</sup>		Fluorimetric traditional method	$3.8 \times 10^{-8}$ - $5.1 \times 10^{-7}$	$2.3 \times 10^{-8}$	Ma et al., 2018
		Fluorimetric amplification method	$3.2 \times 10^{-9}$ - $1.9 \times 10^{-7}$	$1.8 \times 10^{-9}$	

<sup>a</sup>Molecularly imprinted polymer; <sup>b</sup>Gold-polyaniline nanocomposites; <sup>c</sup>Selenium disulphide loaded metal-organic framework derived cobalt; <sup>d</sup>Screen-printed electrode; <sup>e</sup>Silver nanoparticle loaded metal-organic framework derived zinc; <sup>f</sup>Deoxyribonucleic acid; <sup>g</sup>Aptamer; <sup>h</sup>Carboxy-amine polyethylene glycol chain; <sup>i</sup>Platinum nanoparticles – Nitrogen-doped graphene; <sup>j</sup>Glassy carbon electrode; <sup>k</sup>Gold; <sup>l</sup>Chitosan-carbon dots; <sup>m</sup>Reduced graphene oxide; <sup>n</sup>Tin oxide; <sup>o</sup>Electrodeposition of gold nanoparticles; <sup>p</sup>Zinc oxide nanorods composite; <sup>r</sup>Gold electrode; <sup>s</sup>Gold nanoparticle - black phosphorus nanosheets; <sup>t</sup>Gold nanoparticles functionalized copper-metal organic framework; <sup>u</sup>Nitrogen-doped graphene quantum dots; <sup>v</sup>Bovine serum albumin; <sup>w</sup>Immunoglobulin; <sup>x</sup>Quartz crystal microbalance sensor; <sup>y</sup>Manganese-doped zinc sulphide quantum dots; <sup>z</sup>Magnetized reduced graphene oxide.

### ***Metode electrochimice pentru determinarea PAT***

Metode electrochimice actuale de determinare a PAT, cum ar fi amperometria, voltametria, impedimetria, potențiomertia și electrochimiluminiscenta, în care materialele nanostructurate au fost utilizate ca matrice pentru proiectarea dispozitivului de biosensibilitate, sunt comparate în tabelul 3.

Selvam et al. (2021) au dezvoltat un nou polimer molecular imprimat pe baza unei platforme nanocompozite de aur și polianilină (Au@PANI) și a unui cadru metal-organic derivat din cobalt încărcat cu disulfură de seleniu (SeS<sub>2</sub>-@CoMOF) pentru determinarea PAT. Nanocompozitul Au@PANI a fost obținut prin polimerizare interfacială, în timp ce nanocompozitul SeS<sub>2</sub> încărcat cu CoMOF a fost obținut prin sinteză hidrotermală. Caracteristicile de performanță ale electrodului analitic serigrafiat modificat cu MIP/Au@PANI/SeS<sub>2</sub>@CoMOF au fost studiate în tampon fosfat acid (PBS) de concentrație 10 mmol L<sup>-1</sup>, care a prezentat un interval de concentrație liniar logaritmic între 1.0×10<sup>-12</sup> și 1.0×10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> și o limită de detecție de 6.6×10<sup>-13</sup> mol L<sup>-1</sup> pentru PAT. Selectivitatea (valoarea de 15.4 a fost factorul de amprentare pentru PAT) și stabilitatea senzorului (doar 6.7% s-a pierdut după 35 de zile) au fost excepționale. Senzorul MIP a determinat recuperări de 106.4% pentru PAT în sucul de mere. Senzorul dezvoltat a prezentat avantaje precum stabilitate la depozitarea pe termen lung, costuri reduse, măsurători cu ciclu reversibil și monitorizarea în timp real a PAT în probe. Această strategie poate fi utilizată în viitor pentru a dezvolta alți senzori.

Studiul lui Khan et al. (2019) a utilizat o platformă portabilă de aptasenzor impedimetric pentru determinarea electrochimică fără etichetă a PAT. Determinarea PAT a fost bazată pe interacțiunea dintre sarea de diazoniu și lantul de polietilenglicol carboxiamina (PEG) grefat pe un electrod de carbon screen-printed (SPCE). Prin spectroscopie de impedanță electrochimică s-a obținut un interval bun de concentrație liniară între 6.4×10<sup>-9</sup> și 1.6×10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. Limita de cuantificare a fost de 2.6×10<sup>-11</sup> mol L<sup>-1</sup>, iar limita de detecție a fost de 1.8×10<sup>-11</sup> mol L<sup>-1</sup>. Selectivitatea aptasenzorului a fost testată în raport cu alte micotoxine prezente în mod obișnuit în alimente. Precizia aptasenzorului propus a fost evaluată și s-a obținut o recuperare a toxinei de 99%. Aceste rezultate au arătat că aptasenzorul propus are potențial pentru determinarea PAT în sucul de mere.

În studiul lui Huang et al. (2019) a fost raportat un nou senzor electrochimic pentru determinarea ultra urmelor de PAT prin modificarea unui film molecular imprimat cu tionină - nanoparticule de platină (PtNP) - grafenă dopată cu azot (NGE) (MIP/ Tionină-PtNP-NGE). Tionina a funcționat ca indicator al semnalului electrochimic pentru MIP, în timp ce PtNP pentru amplificarea semnalului. NGE este utilizat frecvent în senzori, deoarece prezintă o stabilitate mecanică bună și conductivitate electrică. Sensibilitatea senzorului modificat a fost îmbunătățită prin combinarea avantajelor tioninei, PtNP și NGE. Senzorul proiectat a prezentat o performanță bună pentru PAT de la concentrația de  $1.3 \times 10^{-11}$  la  $1.3 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> și o limită de detecție de  $6.4 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup>. Această metodă bazată pe tionină-PtNP-NGE și pe filmul MIP deschide noi oportunități pentru recunoașterea sensibilă și rapidă a PAT, cu potențiale aplicații pentru alte micotoxine. Senzorul electrochimic dezvoltat a fost utilizat pentru determinarea PAT în sucul de mere și de struguri.

Guo et al. (2017) au utilizat MIP-urile pentru determinarea PAT. Pentru prima dată, pentru a îmbunătăți MIP au fost adăugați trei modificatori: puncte de carbon (CD), chitosan (CS) și nanoparticule de aur (AuNP). MIP-urile sunt materiale de recunoaștere obținute prin sinteza asistată de șablon. Procesul de imprimare constă în polimerizarea monomerilor și al agentului de reticulare în prezența unei ținte care acționează ca șablon (Piletsky et al. 2020). Electropolimerizarea și optimizarea acestuia au fost realizate prin voltametrie ciclică (CV) și voltametrie în puls diferențial (DPV). Pentru senzorul preparat MIPAu/CS-CDs/GCE, răspunsurile liniare au fost de la  $1.0 \times 10^{-12}$  la  $1.0 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> cu limită de detecție de  $7.6 \times 10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup>. Datorită recuperărilor din sucul proaspăt de mere, al selectivității, reproductibilității și stabilității bune ale senzorului, acesta a fost potrivit pentru determinarea PAT.

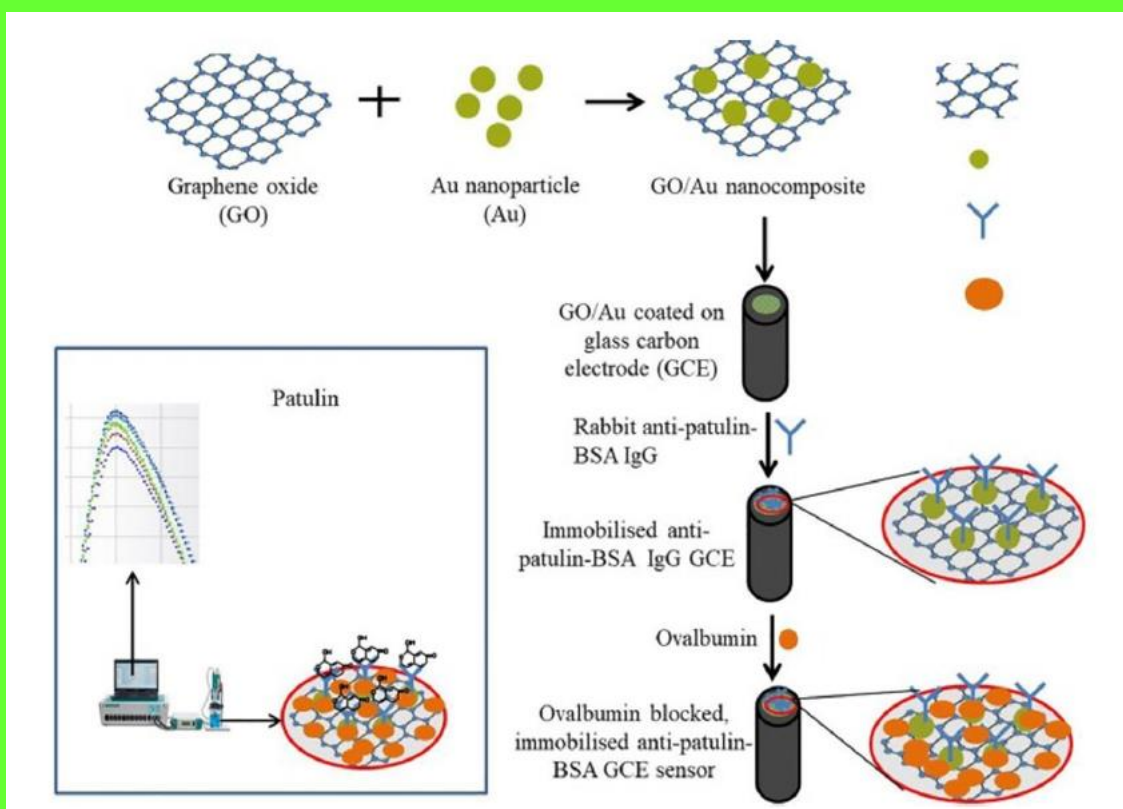
Shukla et al. (2020) au utilizat un compozit de oxid de grafenă redus (rGO)/oxid de staniu (SnO<sub>2</sub>) (rGO/ SnO<sub>2</sub>) fără eticheta a receptorilor pentru recunoașterea electrochimică a PAT. Compozitul a prezentat caracteristici electrochimice promițătoare și un răspuns bun la măsurarea directă al acestuia în sucul de mere contaminat. Răspunsul DPV al senzorului rGO/SnO<sub>2</sub>/GCE a prezentat un interval de concentrație de la  $5.0 \times 10^{-9}$  la  $6.0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, cu o limită de detecție de  $6.6 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>, datorită caracterului electrocatalitic ridicat al SnO<sub>2</sub> și al suprafeței mari a rGO.

Electrodul modificat a prezentat sensibilitate, reproductibilitate și selectivitate bună pentru PAT în suc de mere. Senzorul electrochimic a fost capabil să determine rapid PAT în probe și nu a necesitat extracție sau curățare. Recuperările cu senzorul modificat au fost comparabile cu cele ale metodei HPLC, ceea ce sporește fezabilitatea metodei pentru aplicații industriale.

He și Dong (2018) au dezvoltat un aptasenzor cu un electrod de aur modificat cu chitosan și nanoroduri de oxid de zinc (ZnO-NRs). Compusul a fost obținut prin interacțiunea cu amoniac urmată de creșterea hidrotermală. Noul senzor a fost conceput pentru dozarea cantitativă a PAT cu hexacianoferat ca sondă redox și aptameri ca grup de recunoaștere. Pentru a îmbunătăți performanța electrodului, au fost adăugate pe suprafață nanoroduri de ZnO, chitosan și AuNP electrodepuse. În condiții optime, investigarea senzorului prin metoda DPV a arătat o concentrație liniară de la  $3.2 \times 10^{-12}$  la  $3.2 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> PAT și o limită de detecție scăzută de  $1.7 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup>. Acest senzor a fost utilizat pentru determinarea PAT din mere cu recuperări de la 95.6 la 104.8%. Prin urmare, rezultatele demonstrează că senzorul aptameric este un potențial instrument pentru determinarea PAT.

Hatamluyi et al. (2020) au introdus o nouă procedură pentru dezvoltarea unui senzor electrochimic cu amprentă moleculară pentru determinarea ultrasensibilă și selectivă a PAT. În prima etapă, suprafața unui GCE a fost modificată cu puncte cuantice de grafene dopate cu azot (N-GQDs) și cu o structură organică de Cu-metal funcționalizată cu AuNPs (Au@Cu-MOF). În a doua etapă, un strat de MIP a fost plasat pe suprafața Au@Cu-MOF/N-GQDs/GCE prin electropolimerizare. Senzorul MIP modificat a prezentat în condiții optime prin metoda DPV un interval larg de concentrații liniare între  $6.4 \times 10^{-12}$  și  $4.5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, și limită de detecție de  $4.5 \times 10^{-14}$  mol L<sup>-1</sup>. Această metodă bazată pe asocierea dintre Au@Cu-MOF și N-GQDs combinate cu MIP a oferit sensibilitate, selectivitate, reproductibilitate și stabilitate bune. Recuperările (97.6 până la 99.4%) și precizia (abaterile standard relative de la 1.23 până la 4.61) pentru această metodă au fost remarcabile pentru determinarea PAT în suc de mere. Măsurătorile au fost confirmate prin cromatografie, ceea ce a condus la o bună perspectivă pentru senzori și biosenzori pe bază de MIP.

Song, Wang și Kim (2021) au dezvoltat un imunosenzor bazat pe un GCE pentru determinarea simplă, sensibilă și rapidă a PAT. Pentru a obține senzorul imobilizat, s-a utilizat un GCE gol, lustruit, acoperit cu nanocompozit de oxid de grafenă (GO)/ aur (Au) (GO/Au), urmat de imobilizarea albuminei serice bovine anti-PAT (BSA) de imunoglobulină G (IgG) de la iepure. Pregătirea senzorului GCE imobilizat pentru detectarea PAT este prezentat în Figura 2. Curentul de peak în DPV a crescut o dată cu concentrația de PAT până la  $1.3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , cu un nivel scăzut de detecție de  $3.2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . Acest imunosenzor a oferit o bună specificitate, deoarece nu reacționează reticulat cu OTA, dar reacționează reticulat cu BSA, ceea ce ar putea să îi limiteze aplicațiile la probele care conțin BSA.



**Figura 2.** Schema de preparare a unui electrod de carbon sticlos (GCE) imobilizat pentru determinarea PAT. Reproducere figurii s-a realizat cu permisiunea (Song, Wang și Kim 2021), Elsevier.

### *Metode impedimetrice pentru determinarea PAT*

Xu et al. (2019) au utilizat pentru prima dată nanofolii de fosfor negru (BP NSs) pentru obținerea unui test impedimetric pentru determinarea PAT. GCE a fost modificat cu AuNP-BP NSs obținut din BPNSs și



AuNP prin atracție electrostatică. Determinarea s-a bazat pe diferențele dintre rezistența la transferul de electroni la electrodul modificat. Electrocul modificat prezintă un interval larg de concentrații liniare de la  $1.0 \times 10^{-10}$  la  $1.0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> și o limită de detecție de  $3.0 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup>. Pentru senzorul propus, recuperările au fost cuprinse între 96.2 și 104.0%, iar abaterea standard relativă a fost mai mică de 5% în probele de alimente. Metoda a fost utilizată pentru a testa urmele de PAT în produsele alimentare contaminate. Timpul îndelungat pentru prepararea nanomaterialelor și modificarea electrozilor sunt dezavantajele acestei metode.

### ***Metode de fluorescență pentru determinarea PAT***

Aptamerii sunt o clasă de oligonucleotide monocatenare care se leagă în mod specific de moleculele țintă cu un nivel ridicat de afinitate, cum ar fi moleculele mici, proteinele și celulele (Ellington și Szostak 1990). Aceștia sunt ușor de preparat, modificat și sunt caracterizați prin stabilitatea lor ridicată. Aptamerii, în combinație cu transmițători fluorescenți (Luo et al. 2017), colorimetrici (Xia et al. 2017) și electrochimici (Tabrizi et al. 2017) sunt utilizați de obicei pentru analiză. Recent, nanomaterialele au atras mai multă atenție în proiectarea biosenzorilor fluorescenți. Wu et al. (2016) au raportat anterior un aptamer ADN de înaltă afinitate pentru determinarea PAT utilizând fluorescența.

Bagheri et al. (2018) au utilizat eficient MIP pentru determinarea selectivă a PAT. Suportul sintetizat de nanoparticule de argint/ Zn sub formă de fulgi pe nanocompozite de tip metal-organic frameworks (MOF) (AgNPs@ZnMOF) au fost utilizate cu succes. Înainte de această lucrare, niciun studiu nu a raportat utilizarea fluorescenței catalizate de MOF pe bază de MIP. Reacția acid tereftalic - peroxid de hidrogen catalizată de AgNPs@ZnMOF cu capac MIP a generat o fluorescență puternică. Intensitatea fluorescenței produsului generat a scăzut proporțional cu concentrația de PAT de la  $1.0 \times 10^{-7}$  la  $1.0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, iar limita de detecție a fost de  $6.0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Metoda propusă a fost utilizată pentru determinarea PAT într-un mediu acvatic complex și în sucul de mere fără nici o etapă de preparare.

Wu et al. (2016) au raportat un aptamer ssDNA de înaltă afinitate care a fost legat în mod specific la PAT cu determinarea fluorescenței. A fost stabilită o metodă colorimetrică bazată pe aptameri cu afinitate și specificitate ridicată pentru PAT. Performanța analitică al aptasenzorului colorimetric a fost

realizată de la  $3.0 \times 10^{-10}$  la  $2.0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> cu o limită de detecție de  $3.0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>. Metoda dezvoltată a prezentat o precizie bună (6.87%). În aplicațiile analitice, s-a efectuat determinarea PAT în probe de alimente și s-a comparat cu HPLC-MS și a existat o corelație bună între aceste metode.

Zhang et al. (2017) au prezentat o metodă optică bazată pe puncte cuantice de sulfură de zinc dopate cu mangan acoperite cu MIP (MIP-QD) pentru determinarea PAT în sucul de mere. Nanosenzorul a fost sintetizat folosind acidul 6-hidroxinicotinic ca șablon inactiv în procesul sol-gel de imprimare moleculară. Legarea MIP pe QDs a fost confirmată prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) și difracție de raze X (XRD). Testele de legare au arătat că MIP-QDs-urile au selectivitate și rata de transfer de masă ridicate chiar și adsorbția a fost mai mare decât cea a polimerilor neimprimați, ceea ce a demonstrat o capacitate de absorbție specifică și o recunoaștere specifică pentru PAT printre analogii de micotoxine. Cu senzorul modificat s-a determinat PAT cu concentrații de la  $4.3 \times 10^{-7}$  la  $6.5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> cu o limită de detecție de  $3.2 \times 10^{-7}$  și coeficient de corelație de 0.9945. Recuperările de 102.9 la 127.2% și abaterile standard relative mai mici de 4.95% pentru probele de suc de mere au fost în bună concordanță cu cele obținute prin metoda HPLC, demonstrând fezabilitatea metodei. Rezultatele au oferit o nouă strategie pentru determinarea PAT în matrici complexe.

Ma et al. (2018) au dezvoltat un test fluorescent selectiv și rapid bazat pe oxid de grafenă redus magnetizat (rGO-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) și DNază I pentru determinarea PAT în sucul de mere și de struguri. În prima etapă, oxidul de grafenă redus magnetizat a fost introdus pentru separare, îmbunătățind sensibilitatea și precizia metodei. În a doua etapă, DNază I a fost introdusă pentru amplificarea semnalului de fluorescență, iar sensibilitatea a fost de aproximativ 13 ori mai mare decât atunci când nu s-a utilizat DNaza I. În concluzie, metoda dezvoltată deschide o nouă abordare de monitorizare a siguranței alimentare.

#### ***Senzor de microbalanță cu cristal de cuarț pentru determinarea PAT***

Fang et al. (2016) au raportat un senzor de microbalanță cu cristal de cuarț (QCM) bazat pe un film MIP pentru a determina PAT. Capacitatea de adsorbție al elementului de recunoaștere MIP a fost demonstrată cu ajutorul ecuației Scatchard. După evaluarea în condiții optime, senzorul MIP-QCM a prezentat un

interval de concentrație liniară pentru PAT de la  $4.8 \times 10^{-8}$  la  $3.8 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> cu limită de detecție de  $1.9 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> cu un raport semnal-zgomot de 3. Senzorul a prezentat un coeficient de selectivitate pentru PAT de 3.82, reproductibilitate și stabilitate bune pe termen lung. S-au efectuat teste cu senzorul modificat pentru determinarea PAT în probe reale, cu recuperări de la 76.9 la 91.3% fata de metoda de referință HPLC-MS. Cu acest senzor, s-au determinat urme de PAT în mere, suc de mere, suc de pere concentrat și fulgi de grâu sub formă de pulbere.

Pentru electrozii modificați din Tabelul 3, au fost raportate limite de detecție și intervale de concentrație liniara. Elementele cu dublă recunoaștere, cum ar fi Au@Cu-MOF și N-GQDs combinate cu MIP au condus la electrodul modificat MIP/Au@Cu-MOF/N-GQDs/GCE cu sensibilitate de ordinul  $10^{-14}$  mol L<sup>-1</sup>, selectivitate, reproductibilitate și stabilitate bune. Aceste rezultate arată că performanța electrodului MIP/Au@Cu-MOF/N-GQDs/GCE (Hatamluyi et al. 2020) este comparabilă sau chiar mai bună decât al altor senzori determinati prin alte metode.

## **Concluzii**

Această mini-revizuire a subliniat tendințele recente în dezvoltarea senzorilor electrochimici pentru detectarea și cuantificarea PAT. În plus față de metodele convenționale de determinare a PAT, senzorii electrochimici reprezintă o alternativă rapidă, fiabilă și ieftină. Majoritatea metodelor prezentate pot determina doar un singur component, ceea ce le limitează aplicațiile practice. Este urgent și important să se dezvolte metode care să poată detecta simultan mai multe micotoxine pentru o mai bună siguranță alimentară. Deși s-au făcut multe progrese până în prezent, sunt necesare eforturi susținute din partea comunității științifice pentru a combate limitările metodelor actuale. Utilizarea senzorilor 2D de unica folosință și a senzorilor 3D imprimati ar putea duce la o nouă generație de senzori electrochimici concepuți pentru monitorizarea la fața locului.

## **Referinte bibliografice:**

Agriopoulou, S. 2016. Enniatins: An emerging food safety issue. *EC Nutrition* 5 (3):1142–6.

- Alshannaq, A. F., and J.-H. Yu. 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14 (6):632. doi:10.3390/ijerph14060632.
- Assuncao, R., C. Martins, D. Dupont, and P. Alvito. 2016. Patulin and ochratoxin a co-occurrence and their bioaccessibility in processed cereal-based foods: A contribution for Portuguese children risk assessment. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 96:205–14. doi:10.1016/j.fct.2016.08.004.
- Bagheri, N., A. Khataee, B. Habibi, and J. Hassanzadeh. 2018. Mimetic Ag nanoparticle/Zn-based MOF nanocomposite (AgNPs@ZnMOF) capped with molecularly imprinted polymer for the selective detection of patulin. *Talanta* 179:710–8. doi:10.1016/j.talanta.2017.12.009.
- Bessaire, T., I. Perrin, A. Tarres, A. Bebius, F. Reding, and V. Theurillat. 2019. Mycotoxins in green coffee: Occurrence and risk assessment. *Food Control* 96:59–67. doi:10.1016/j.foodcont.2018.08.033.
- Binder, E. M., L. M. Tan, L. J. Chin, J. Handl, and J. Richard. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* 137 (3-4):265–82. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.06.005.
- Commission of the European Communities, EC No 1881/ 2006. 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in food stuff. UK: Official Journal of the European Union.
- Cunha, S. C., M. A. Faria, V. L. Pereira, T. M. Oliveira, A. C. Lima, and E. Pinto. 2014. Patulin assessment and fungi identification in organic and conventional fruits and derived products. *Food Control* 44:185–90. doi:10.1016/j.foodcont.2014.03.043.
- da Silva Lima, G., G. Franco dos Santos, R. R. F. Ramalho, D. V. A. de Aguiar, J. V. Roque, L. I. L. Maciel, R. C. Simas, I. Pereira, and B. G. Vaz. 2022. Laser ablation electrospray ionization mass spectrometry imaging as a new tool for accessing patulin diffusion in mold-infected fruits. *Food chemistry* 373 (Pt B):131490. doi:10.1016/j.foodchem.2021.131490.

- Dias, J. V., R. C. da Silva, I. R. Pizzutti, I. D. dos Santos, M. Dassi, and C. D. Cardoso. 2019. Patulin in apple and apple juice: Method development, validation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and survey in Brazilian south supermarkets. *Journal of Food Composition and Analysis* 82:103242. doi:10.1016/j.jfca.2019.103242.
- Doss, J., K. Culbertson, D. Hahn, J. Camacho, and N. Barekzi. 2017. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses* 9 (3):50. doi:10.3390/v9030050.
- Ellington, A. D., and J. W. Szostak. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346 (6287):818–22. doi:10.1038/346818a0.
- Fang, G., H. Wang, Y. Yang, G. Liu, and S. Wang. 2016. Development and application of a quartz crystal microbalance sensor based on molecularly imprinted sol-gel polymer for rapid detection of patulin in foods. *Sensors and Actuators B: Chemical* 237:239–46. doi:10.1016/j.snb.2016.06.099.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2019. General standard for contaminants and toxins in food and feed CXS 193-1995. European Commission: Codex Alimentarius Commission. 2–66.
- Funes, G. J., and S. L. Resnik. 2009. Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. *Food Control* 20 (3):277–80. doi:10.1016/j.foodcont.2008.05.010.
- Gambacorta, L., N. E. Darra, R. Fakhoury, A. Logrieco, and M. Solfrizzo. 2019. Incidence and levels of *Alternaria* mycotoxins in spices and herbs produced worldwide and commercialized in Lebanon. *Food Control* 106:106724. doi:10.1016/j.foodcont.2019.106724.
- Goud, K. Y., K. K. Reddy, M. Satyanarayana, S. Kummari, and K. V. Gobi. 2019. A review on recent developments in optical and electrochemical aptamer-based assays for mycotoxins using advanced nanomaterials. *Mikrochimica Acta* 187 (1):29. doi:10.1007/s00604-019-4034-0.
- Goud, K. Y., S. K. Kailasa, V. Kumar, Y. F. Tsang, S. E. Lee, K. V. Gobi, and K.-H. Kim. 2018. Progress on nanostructured electrochemical sensors and their recognition elements for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors & Bioelectronics* 121:205–22. doi:10.1016/j.bios.2018.08.029.

- Guo, W., F. Pi, H. Zhang, J. Sun, Y. Zhang, and X. Sun. 2017. A novel molecularly imprinted electrochemical sensor modified with carbon dots, chitosan, and gold nanoparticles for the determination of patulin. *Biosensors & Bioelectronics* 98:299–304. doi:10.1016/j.bios.2017.06.036.
- Hajrulai-Musliu, Z., R. Uzunov, S. Jovanov, D. Jankuloski, V. Stojkovski, L. Pendovski, and J. J. Sasanya. 2021. A new LC-MS/MS method for multiple residues/contaminants in bovine meat. *BMC Chemistry* 15 (1):62. doi:10.1186/s13065-021-00788-5.
- Hatamluyi, B., M. Rezayi, H. R. Beheshti, and M. T. Boroushaki. 2020. Ultra-sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor for patulin detection based on a novel assembling strategy using Au@Cu-MOF/N-GQDs. *Sensors and Actuators B: Chemical* 318:128219. doi:10.1016/j.snb.2020.128219.
- He, B., and X. Dong. 2018. Aptamer based voltammetric patulin assay based on the use of ZnO nanorods. *Mikrochimica Acta* 185 (10):462. doi:10.1007/s00604-018-3006-0.
- Huang, Q., Z. Zhao, D. Nie, K. Jiang, W. Guo, K. Fan, Z. Zhang, J. Meng, Y. Wu, and Z. Han. 2019. Molecularly Imprinted Poly(thionine)-Based Electrochemical Sensing Platform for Fast and Selective Ultratrace Determination of Patulin. *Analytical Chemistry* 91 (6):4116–23. doi:10.1021/acs.analchem.8b05791.
- Karaca, H., and S. Nas. 2006. Aflatoxins, patulin, and ergosterol contents of dried figs in turkey. *Food Additives and Contaminants* 23 (5):502–8. doi:10.1080/02652030600550739.
- Kebede, H., X. Liu, J. Jin, and F. Xing. 2020. Current status of major mycotoxins contamination in food and feed in Africa. *Food Control* 110:106975. doi:10.1016/j.foodcont.2019.106975.
- Khan, R., S. Ben Aissa, T. A. Sherazi, G. Catanante, A. Hayat, and J. L. Marty. 2019. Development of an Impedimetric Aptasensor for Label-Free Detection of Patulin in Apple Juice. *Molecules* 24 (6):1017. doi:10.3390/molecules24061017.
- Kluczkovski, A. M. 2019. Fungal and mycotoxin problems in the nut industry. *Current Opinion in Food Science* 29:56–63. doi:10.1016/j.cofs.2019.07.009.



- Krska, R., and A. Molinelli. 2009. Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393 (1):67–71. doi:10.1007/s00216-008-2424-y.
- Leite, M., A. Freitas, A. S. Silva, J. Barbosa, and F. Ramos. 2020. Maize (*Zea mays* L.) and mycotoxins: A review on optimization and validation of analytical methods by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Trends in Food Science & Technology* 99:542–65. doi:10.1016/j.tifs.2020.03.023.
- Liang, K., Q. X. Liu, J. H. Xu, Y. Q. Wang, C. S. Okinda, and M. X. Shena. 2018. Determination and Visualization of Different Levels of Deoxynivalenol in Bulk Wheat Kernels by Hyperspectral Imaging. *Journal of Applied Spectroscopy* 85 (5):953–61. doi:10.1007/s10812-018-0745-y.
- Logrieco, A., D. W. M. Arrigan, K. Brengel-Pesce, P. Siciliano, and I. Tothill. 2005. DNA arrays, electronic noses, and tongues, biosensors and receptors for rapid detection of toxigenic fungi and mycotoxins: A review. *Food Additives and Contaminants* 22 (4):335–44. doi:10.1080/02652030500070176.
- Luo, Z., Y. Wang, X. Lu, J. Chen, F. Wei, Z. Huang, C. Zhou, and Y. Duan. 2017. Fluorescent aptasensor for antibiotic detection using magnetic bead composites coated with gold nanoparticles and a nicking enzyme. *Analytica Chimica Acta* 984:177–84. doi:10.1016/j.aca.2017.06.037.
- Ma, L., T. Guo, S. Pan, and Y. Zhang. 2018. A fluorometric aptasensor for patulin based on the use of magnetized graphene oxide and DNase I-assisted target recycling amplification. *Mikrochimica Acta* 185 (10):487. doi:10.1007/s00604-018-3023-z.
- Malhotra, B., S. Srivastava, M. A. Ali, and C. Singh. 2014. Nanomaterial-Based Biosensors for Food Toxin Detection. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174 (3):880–96. doi:10.1007/s12010-014-0993-0.
- Mandappa, I. M. K. Basavaraj, and H. K. Manonmani. 2018. Analysis of mycotoxins in fruit juices in fruit juices. In *Fruit juices: Extraction, Composition, Quality, and Analysis*, ed. G. Rajauria and B. K. Tiwari. 763–777, The Netherland: Elsevier.

- Mithofer, A., and M. E. Maffei. 2016. General mechanisms of plant defense and plant toxins. 1–22. In *Plant Toxins. Toxinology*, ed. P. Gopalakrishnakone, C. Carlini, and R. Ligabue-Braun. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7\\_21-1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7_21-1).
- Moreno-Gonzalez, D., P. Jac, P. Riasova, and L. Novakova. 2021. In-line molecularly imprinted polymer solid-phase extraction-capillary electrophoresis coupled with tandem mass spectrometry for the determination of patulin in apple-based food. *Food Chemistry* 334 (127607) doi:10.1016/j.foodchem.2020.127607.
- Moretti, A., A. F. Logrieco, and A. Susca. 2017. Mycotoxins: An underhand food problem. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 1542:3–12.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. 2017. State Food and Drug Administration, GB 2761-2017 National food safety standard mycotoxin limit in foodstuff. China: Standards Press of China.
- Nunes da Silva, S. J., P. Z. Schuch, C. R. Bernardi, M. H. Vainstein, A. Jablonski, and R. J. Bender. 2007. Patulin in food: State-of-the-art and analytical trends. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29 (2):406–13. doi:10.1590/S0100-29452007000200043.
- Ostry, V., F. Malir, J. Toman, and Y. Grosse. 2017. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research* 33 (1):65–73. doi:10.1007/s12550-016-0265-7.
- Pascari, X., A. J. Ramos, S. Marin, and V. Sanchis. 2018. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Research International* (Ottawa, Ont.) 103:121–9. doi:10.1016/j.foodres.2017.07.038.
- Pattono, D., A. Grosso, P. P. Stocco, M. Pazzi, and G. Zeppa. 2013. Survey of the presence of patulin and ochratoxin in traditional semi-hard cheeses. *Food Control* 33 (1):54–7. doi:10.1016/j.foodcont.2013.02.019.
- Pereira, V. L., J. O. Fernandes, and S. C. Cunha. 2014. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* 36 (2):96–136. doi:10.1016/j.tifs.2014.01.005.

- Piletsky, S., F. Canfarotta, A. Poma, A. M. Bossi, and S. Piletsky. 2020. Molecularly Imprinted Polymers for Cell Recognition. *Trends in Biotechnology* 38 (4):368–87. doi:10.1016/j.tibtech.2019.10.002.
- Puel, O., P. Galtier, and I. P. Oswald. 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* 2 (4):613–31. doi:10.3390/toxins2040613.
- Ramos Girona, A. J. C. A. Da Rocha Rosa, L. R. Cavaglieri, and C. A. Guedes. 2011. Legislation and economic impact of mycotoxins. In *Mycotoxins and mycotoxicosis*, ed. A. J. Ramos, 427–62. Madrid. Espana.
- Rasmussen, S., A. Andersen, N. Andersen, K. Nielsen, P. Hansen, and T. O. Larsen. 2016. Chemical diversity, origin, and analysis of phycotoxins. *Journal of Natural Products* 79 (3):662–73. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01066.
- Regal, P., M. Diaz-Bao, R. Barreiro, C. Fente, and A. Cepeda. 2017. Design of a molecularly imprinted stir-bar for isolation of patulin in apple and LC-MS/MS detection. *Separations* 4 (2):11. doi:10.3390/separations4020011.
- Rodriguez, A., M. Rodriguez, M. J. Andrade, and M. D. G. Cordoba. 2015. Detection of filamentous fungi in foods. *Current Opinion in Food Science* 5:36–42. doi:10.1016/j.cofs.2015.07.007.
- Sadok, I., A. Szmagara, and M. M. Staniszewska. 2018. The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. *Food Chemistry* 245:364–70. doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.093.
- Sanzani, S. M., M. Reverberi, and R. Geisen. 2016. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biology and Technology* 122:95–105. doi:10.1016/j.postharvbio.2016.07.003.
- Schlegel, K. M., and P. W. Elsinghorst. 2020. Myco-DES: Enabling remote extraction of mycotoxins for robust and reliable quantification by stable isotope dilution LC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 92 (7):5387–95. doi:10.1021/acs.analchem.0c00087.

- Seale, H., A. A. Blencowe, H. Manu, R. Nair, S. A. Bahl, A. K. Qazi, J. A. Zaidi, S. N. Berkley, J. E. Cousens, and Lawn, A. C. 2014. Estimates of possible severe bacterial infection in neonates in sub-Saharan Africa, South Asia, and Latin America for 2012: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious Diseases* 14 (8):731–41. doi:10.1016/S1473-3099(14)70804-7.
- Selvam, S. P., A. N. Kadam, K. R. Maiyelvaganan, M. Prakash, and S. Cho. 2021. Novel SeS<sub>2</sub>- loaded Co MOF with Au@PANI comprised electroanalytical molecularly imprinted polymer based disposable sensor for patulin mycotoxin. *Biosensors & Bioelectronics* 187:113302. doi:10.1016/j.bios.2021.113302.
- Shukla, S., Y. Haldorai, I. Khan, S.-M. Kang, C. H. Kwak, S. Gandhi, V. K. Bajpai, Y. S. Huh, and Y.-K. Han. 2020. Bioreceptor-free, sensitive and rapid electrochemical detection of patulin fungal toxin, using a reduced graphene oxide@SnO<sub>2</sub> nanocomposite. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 113:110916. doi:10.1016/j.msec.2020.110916.
- Song, X., D. Wang, and M. Kim. 2021. Development of an immuno-electrochemical glass carbon electrode sensor based on graphene oxide/gold nanocomposite and antibody for the detection of patulin. *Food Chemistry* 342:128257. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128257.
- Spadaro, D., G. R. Meloni, I. Siciliano, S. Prencipe, and M. L. Gullino. 2020. HPLC-MS/MS method for the detection of selected toxic metabolites produced by *Penicillium* spp. in nuts. *Toxins* 12 (5):307. doi:10.3390/toxins12050307.
- Stadler, D., F. Berthiller, M. Suman, R. Schuhmacher, and R. Krska. 2020. Novel analytical methods to study the fate of mycotoxins during thermal food processing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412 (1):9–16. doi:10.1007/s00216-019-02101-9.
- Tabrizi, M. A., M. A. Shamsipur, R. Saber, S. Sarkar, and V. Ebrahimi. 2017. A high sensitive visible light-driven photoelectrochemical aptasensor for shrimp allergen tropomyosin detection using graphitic carbon nitride-TiO<sub>2</sub> nanocomposite. *Biosensors & Bioelectronics* 98:113–8. doi:10.1016/j.bios.2017.06.040.

- Tannous, J., A. Atoui, A. E. Khoury, S. Kantar, N. Chdid, I. P. Oswald, O. Puel, and R. Lteif. 2015. Development of a real-time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apples. *Food Microbiology* 50:28–37. doi:10.1016/j.fm.2015.03.001.
- US Food and Drug Administration. 2004. Food and Drug Administration (FDA) Compliance Policy Guide. Compliance policy guidance for fda staff. Sec. 510.150 Apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products—Adulteration with patulin. Silver Spring, MD.
- Van de Perre, E., L. Jacxsens, W. Van Der Hauwaert, I. Haesaert, and B. De Meulenaer. 2014. Screening for the presence of patulin in molded fresh produce and evaluation of its stability in the production of tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (1):304–9. doi:10.1021/jf404192n.
- Varzakas, T. 2016. Quality and safety aspects of cereals (wheat) and their products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56 (15):2495–510. doi:10.1080/10408398.2013.866070.
- Viegas, S., R. Assunc\_~ao, M. Twaru\_zek, R. Kosicki, J. Grajewski, and C. Viegas. 2020. Mycotoxins feed contamination in a dairy farm - potential implications for milk contamination and workers' exposure in a One Health approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100 (3):1118–23. doi:10.1002/jsfa.10120.
- Wei, F., X. Liu, X. Liao, L. Shi, S. Zhang, J. Lu, L. Zhou, and W. J. Kong. 2019. Simultaneous determination of 19 mycotoxins in lotus seed using a multimycotoxin UFLC-MS/MS method. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 71 (7):1172–83. doi:10.1111/jphp.13101.
- Welke, J. E. 2019. Fungal and mycotoxin problems in grape juice and wine industries. *Current Opinion in Food Science* 29:7–13. doi:10.1016/j.cofs.2019.06.009.
- Welke, J. E., M. Hoeltz, H. A. Dottori, and I. B. Noll. 2009. Effect of processing stages of apple juice concentrates on patulin levels. *Food Control* 20 (1):48–52. doi:10.1016/j.foodcont.2008.02.001.
- Wild, C. P., and Y. Y. Gong. 2010. Mycotoxins and human disease: A largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31 (1):71–82. doi:10.1093/carcin/bgp264.

- Wu, S., N. Duan, W. Zhang, S. Zhao, and Z. Wang. 2016. Screening and development of DNA aptamers as capture probes for colorimetric detection of patulin. *Analytical Biochemistry* 508:58–64. doi:10.1016/j.ab.2016.05.024.
- Wu, Z., E. Xu, Z. Jin, and J. Irudayaraj. 2018. An ultrasensitive aptasensor based on fluorescent resonant energy transfer and exonuclease-assisted target recycling for patulin detection. *Food Chemistry* 249:136–42. doi:10.1016/j.foodchem.2018.01.025.
- Xia, Y., M. Liu, L. Wang, A. Yan, W. He, M. Chen, J. Lan, J. Xu, L. Guan, and J. Chen. 2017. A visible and colorimetric aptasensor based on DNA-capped single-walled carbon nanotubes for the detection of exosomes. *Biosensors & Bioelectronics* 92:8–15. doi:10.1016/j.bios.2017.01.063.
- Xiao, H., and S. Fu. 2012. A Sensitive Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Determination of Patulin in Apple Juice. *Journal of AOAC International* 95 (6):1709–12. doi:10.5740/jaoacint.11-169.
- Xu, J., X. Qiao, Y. Wang, Q. Sheng, T. Yue, J. Zheng, and M. Zhou. 2019. Electrostatic assembly of gold nanoparticles on black phosphorus nanosheets for electrochemical aptasensing of patulin. *Mikrochimica Acta* 186 (4):238. doi:10.1016/j.foodchem.2018.01.025.
- Yang, Y., Y. Yang, B. Shao, and J. Zhang. 2017. A simple and rapid method for determination of patulin in juice by High-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* 10 (9):2913–8. doi:10.1007/s12161-017-0859-5.
- Zbynovska, K., P. Petruska, A. Kalafova, and M. Capcarova. 2016. Patulin - a Contaminant of Food and Feed: A review. *Acta Fytotechnica et zootechnica* 19 (02):64–7. doi:10.15414/afz.2016.19.02.64-67.
- Zhang, L., X.-W. Dou, C. Zhang, A. Logrieco, and M. Yang. 2018. A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. *Toxins* 10 (2):65. doi:10.3390/toxins10020065.
- Zhang, W., Y. Han, X. Chen, X. Luo, J. Wang, T. Yue, and Z. Li. 2017. Surface molecularly imprinted polymer capped Mn-doped ZnS quantum dots as a phosphorescent nanosensor for detecting patulin in apple juice. *Food Chemistry* 232:145–54. doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.156.



- Zhao, M., H. Shao, Y. He, H. Li, M. Yan, Z. Jiang, J. Wang, A. M. Abd El-Aty, A. Hacimuftuoglu, F. Yan, et al. 2019. The determination of patulin from food samples using dual dummy molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 1125:121714. doi:10.1016/j.jchromb.2019.121714.
- Zhong, L., J. Carere, Z. Lu, F. Lu, and T. Zhou. 2018. Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins (Basel)* 10 (11):475. doi:10.3390/toxins10110475.
- Zhou, Q., and D. Tang. 2020. Recent advances in photoelectrochemical biosensors for analysis of mycotoxins in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 124:115814. doi:10.1016/j.trac.2020.115814.

## Determinarea simultana a ibuprofenului, ketoprofenului si flurbiprofenului

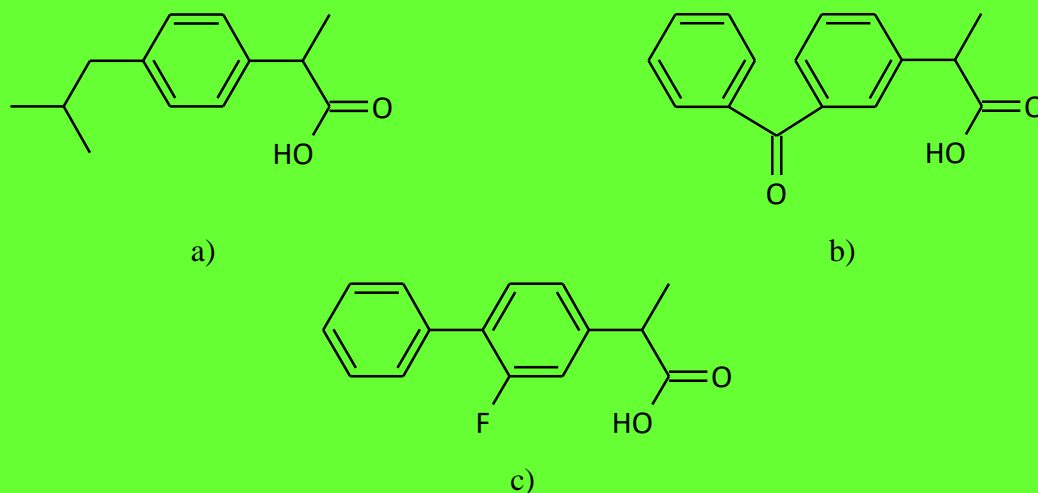
### Rezumat

Pentru analiza rapidă a ibuprofenului, ketoprofenului și flurbiprofenului în formele lor farmaceutice au fost propuși trei senzori stocastici de unică folosință pe bază de maltodextrină (echivalent dextroză = 4 – 7) și nanostructuri (monostrat de cupru, monostrat de carbon și strat compozit de carbon-cupru) depuse cu ajutorul plamei reci pe hârtie de copiator. Cele mai largi domenii liniare de concentrație înregistrate au fost: pentru ibuprofen  $1 \text{ fmol L}^{-1} - 1 \text{ mmol L}^{-1}$  când a fost utilizat senzorul stocastic de unică folosință pe bază de monostrat de carbon, pentru ketoprofen  $1 \text{ fmol L}^{-1} - 1 \text{ mmol L}^{-1}$  când a fost utilizat senzorul stocastic de unică folosință pe bază de monostrat de cupru și strat compozit de carbon-cupru, iar pentru flurbiprofen  $1 \text{ fmol L}^{-1} - 10 \text{ mmol L}^{-1}$  când a fost folosit senzorul stocastic de unică folosință pe bază de strat compozit de carbon-cupru. Cea mai joasă limită de detecție înregistrată pentru fiecare medicament antiinflamator nesteroidian a fost  $1 \text{ fmol L}^{-1}$ .

### Introducere

Ibuprofen (IBP), notat acid (RS)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanoic, ketoprofen (KTP), notat acid 2-(3-benzoilfenil)propanoic și flurbiprofen (FBP), notat acid 2-(3-fluor-4-fenilfenil)propanoic, sunt derivați ai acidului propionic (Figura 1) incluși în clasa medicamentelor antiinflamatoare nesteroidiene (AINS). Ca urmare a efectelor lor antiinflamatorii, analgezice și antipiretice, sunt indicate în dureri ușoare până la

moderate, febra apărută în urma răcelii sau gripei, afecțiuni reumatoidale, osteoartrite și dismenoree. AINS se clasează pe primul loc ca cele mai prescrise medicamente într-un studiu privind polifarmacia la pacienții vârstnici, realizat în Statele Unite [1].



**Figura 1.** Structura chimică a a) ibuprofenului, b) ketoprofenului și c) flurbiprofenului.

Farmacopeea Europeană recomandă metode de analiză, cum ar fi titrarea directă pentru IBP și titrarea potențimetrică pentru KTP și FBP [2-4], în timp ce Farmacopeea Statelor Unite propune HPLC ca metodă de determinare pentru IBP (în stare pură și forme farmaceutice, cum ar fi tabletele și suspensiile orale) și FBP (tablete și soluție oftalmică) și titrare directă pentru KTP și FBP în stare pură [5]. Până în prezent, metodele de determinare raportate în literatura de specialitate pentru analiza IBP, KTP și FBP în diferite matrice sunt: cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) [6,7], HPLC cu fază inversă (RP-HPLC) [8,9], HPLC cu detecție fluorescent [10], cromatografia lichidă ultraperformantă cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (UPLC-MS/MS) [11], spectrofluorimetria [12,13], potențimetrica [14-16], electroforeza capilară (CE) [17,18] și cromatografia gazoasă cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS) [19,20]. În ciuda faptului că sunt reproductibile, sensibile și fiabile, astfel de metode necesită pretratarea probei care poate dura mult timp și implică instrumente și reactivi costisitoare și complexe care depind de personal specializat.

Este nevoie de un control rapid al calității acestor compuși (IBP, KTP și FBP), în special în timpul proceselor lor de sinteză. Pentru a evalua calitatea compușilor activi din materia primă obținută în urma sintezei, este nevoie de metode rapide și fiabile de analiză. În cele din urmă, utilizarea metodelor rapide și ieftine de analiză a compușilor activi (IBP, KTP și FBP) în formulările lor economisește bani și poate scădea costul formelor farmaceutice topice.

Această lucrare a propus trei senzori stocastici de unică folosință obținuți prin depunerea de nanostructuri folosind plasmă rece (cupru, carbon și compozit carbon-cupru) pe hârtie de copiator. Alegerea acestor

materiale a ținut cont și de costurile de producție ale senzorilor de unică folosință - care erau foarte mici dacă aceste materiale erau alese pentru proiectarea senzorilor. Utilizarea materialelor nanostructurate s-a dovedit a oferi rezultate excelente în analiza electrochimică [21-27]. Materialele depuse pe hârtia de copiat: cupru, carbon și compozitul carbon-cupru nu interacționează direct cu profenii; pentru a obține detecția stocastică, este nevoie de o moleculă capabilă să asigure canalele/porii. De aceea, senzorii au fost modificați cu maltodextrină (MD) (echivalent dextroză = 4 – 7) pentru determinarea a trei compuși din clasa AINS (IBP, KTP și FBP) din probe reale (geluri și spray bucofaringian). MD promovează răspunsul senzorilor stocastici. Prin urmare, senzorii propuși reprezintă o alternativă avantajoasă cu costuri reduse pentru metodele menționate mai sus, deoarece aceste tipuri de senzori sunt potriviți pentru măsurarea simultană a mai multor analiți într-o singură măsurătoare, sunt foarte sensibili, cu o limită de detecție scăzută și nu necesită pretratarea probei, indiferent de tipul matricei.21-23

## **Experimental**

### *Materiale și reactivi*

Ibuprofenul, ketoprofenul, flurbiprofenul și maltodextrina de calitate analitică au fost achiziționate de la Sigma Aldrich (Milwaukee, SUA). Pentru prepararea soluțiilor s-a folosit apă deionizată. Soluția de tampon fosfat (PBS), pH = 5 a fost obținută folosind  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  și  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , cumpărate de la Sigma Aldrich.

Soluțiile stoc de IBP, KTP și FBP ( $1,00 \times 10^{-2}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) au fost preparate în etanol. Seturile de soluții (concentrații de până la  $1,00 \times 10^{-15}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) necesare pentru calibrarea senzorilor stocastici de unică folosință au fost obținute din soluțiile stoc prin metoda diluției succesive și tamponate cu PBS (pH = 5).

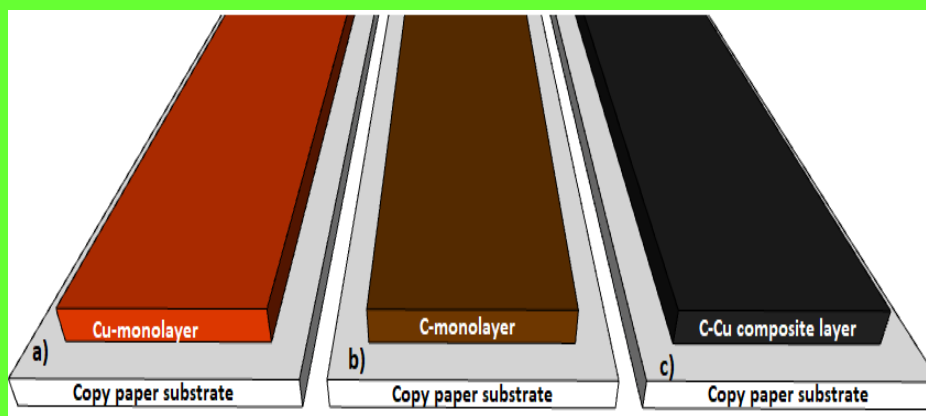
### *Aparatură și metode*

Apa deionizată a fost obținută prin utilizarea Direct-Q3 Water Purification System (Millipore Corporation, Franța). Măsurătorile electrochimice au fost desfășurate pe un mini potențiostat EmStat Pico conectat la un computer cu software-ul PStTrace versiunea 5.8 (PalmSens BV, Houten, Țările de Jos). O celulă electrochimică clasică cu trei electrozi a fost asamblată utilizând un senzor stocastic ca electrod de lucru, un fir de Ag/AgCl ( $1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl) ca electrod de referință și un fir de Pt ca contraelectrod.

### *Design-ul senzorilor stocastici de unică folosință pe bază de maltodextrină*

Pregătirea celor trei nanostructuri bazate pe monostrat de cupru (Cu), carbon (C) și strat de nanocompozit C-Cu pe hârtie a fost efectuată folosind plasma termoionică cu arc în vid (TVA), o metodă de depunere cu plasmă rece. Mai multe detalii despre plasma TVA pot fi găsite în altă parte [24]. Această plasmă TVA a fost folosită anterior pentru depunerea filmelor pe substraturi din plastic, textil și hârtie de copiator [25-

28]. A fost folosită hârtie de imprimare A4 ca substrat. Hârtia a fost uscată în prealabil prin suflare cu azot gazos, urmată de un tratament în vid înalt timp de cel puțin 2 ore, pentru a îndepărta contaminanții reziduali și pentru a optimiza condițiile de depunere a monostraturilor și stratului compozit. Monostraturile de Cu și C și stratul compozit C-Cu au fost depuse la temperatura camerei pe substraturi de hârtie, plasate pe plasma TVA superioară, pentru a construi senzori flexibili. Această configurație 2D este prezentată în Figura 2.



**Figura 2.** Configurația 2D a senzorilor bazată pe **a)** monostrat de cupru, **b)** monostrat de carbon și **c)** strat compozit cupru-carbon.

Straturile de nanostructuri au fost sintetizate pe baza a două materiale cu puritate ridicată ( $\text{Cu} = 99,9\%$ ,  $\text{C} = 99,98\%$ ) utilizate în construcția aplicațiilor cu senzori 2D. Trei forme de nanostructuri au fost obținute pe substraturi de hârtie de copiator: primul senzor a fost obținut prin depunerea unui nanostrat de pelete de Cu plasat în creuzetul de grafit; al doilea senzor a fost obținut prin depunerea unui nanostrat de C furnizat de o tijă de grafit pur cu diametrul de 10 mm; iar al treilea senzor a fost obținut prin depunerea stratului compozit C-Cu. Pentru depunerea stratului compozit C-Cu a fost proiectat un anod special bazat pe C și Cu. Un proces de depunere într-o singură etapă a fost utilizat pentru sintetizarea stratului compozit C-Cu. Pe scurt, anodul proiectat este un creuzet de grafit pur care conține ambele materiale care urmează să fie evaporate. În creuzet, o tijă de carbon (cu diametrul de 10 mm și înălțimea de 10 mm) a fost poziționată și înconjurată complet cu 10 grame de pelete de Cu. Un singur nor de plasmă stabil din ambele materiale a fost aprins și menținut prin utilizarea bombardamentului cu electroni dintr-un singur filament de tungsten fierbinte. Substratul de hârtie de copiator A4 a fost plasat cu fața în jos la o distanță de 33 cm de norul de plasmă și fixat cu cleme pentru a permite depunerea directă a stratului pe suprafață. Grosimea filmului a fost controlată prin timpul de depunere, care a fost de 7 minute. Presiunea de vid și parametrii electrici ai plasmei Cu, C și C-Cu utilizate în timpul depunerii sunt prezentați în Tabelul 1.

**Tabelul 1.** Parametrii utilizați pentru depunerea cu plasmă de Cu, C și C-Cu pe hârtie de copiere.

Stratul	I <sub>f</sub> (A)	I <sub>a</sub> (A)	U <sub>a</sub> (V)	Presiune de vid (mBar)
Cu	53	1.4	150	$2 \times 10^{-5}$
C	53	2	350	$3 \times 10^{-5}$
C-Cu	53	2.4	400	$2 \times 10^{-5}$

I<sub>f</sub> = curentul filamentului de wolfram, I<sub>d</sub> și U<sub>d</sub> = curentul și tensiunea de descărcare.

Pentru a optimiza timpul de imersie în soluția apoasă de MD ( $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L), am pregătit 3 senzori de fiecare tip și i-am imersat timp de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 și 120 de minute. Răspunsul unui senzor nemodificat de fiecare tip a fost comparat cu răspunsul obținut după 8 imersiuni; numai după imersia senzorilor timp de 120 min în MD a fost obținut un semnal stocastic. Prin urmare, toți cei trei senzori au fost scufundați timp de două ore într-o soluție apoasă de MD ( $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L) pentru modificarea suprafeței lor. Ulterior, senzorii au fost uscați pentru o perioadă de 24 de ore înainte de utilizare.

Când nu erau utilizați, senzorii au fost depozitați într-un recipient uscat la temperatura camerei.

### *Modul stochastic*

Deoarece modul stocastic necesită valori t<sub>off</sub> și t<sub>on</sub>, s-a optat pentru o tehnică cronoamperometrică și măsurătorile au fost efectuate la un potențial constant de 115 mV față de Ag/AgCl care a fost optimizat pentru a obține cea mai mare fiabilitate pentru citirea valorilor toff și ton. Calibrarea senzorului a fost efectuată utilizând soluții standard de AINS de diferite concentrații. Semnătura AINS (t<sub>off</sub>) identificată în diagrame a fost utilizată pentru analiza calitativă, în timp ce valoarea t<sub>on</sub> a fost utilizată pentru determinarea concentrației de AINS, pe baza ecuației de calibrare a fiecărui senzor:

$$1/t_{on} = a + b \times C_{NSAID}$$

unde a este ordonata la origine, iar b este panta/sensibilitatea.

Concentrațiile necunoscute ale AINS au fost calculate utilizând ecuația de calibrare.

### *Probe*

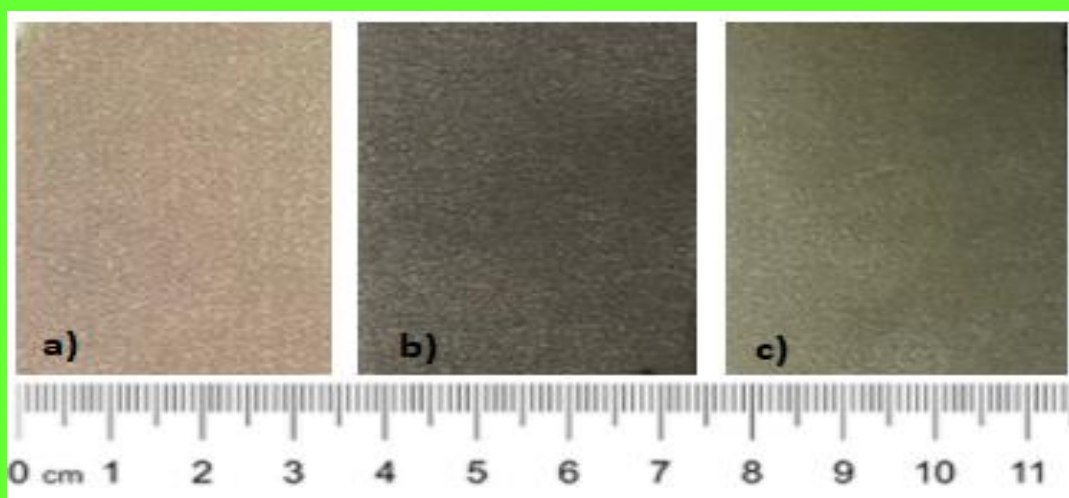
Trei forme farmaceutice topice (Ibutop Gel 50 mg/g gel, Ketonal 25 mg/g gel și Strepsils Intensiv 8,75 mg/doză spray bucofaringian) care conțin ibuprofen, ketoprofen și, respectiv, flurbiprofen, obținute dintr-o farmacie locală au fost analizate fără niciun tratament prealabil. Ibutop Gel conține ibuprofen ca ingredient farmaceutic activ (API) și excipienți, cum ar fi alcool izopropilic, 2,2-dimetil-4-hidroximetil-1,3-dioxolan, poloxamer 407, trigliceride cu lanț mediu, ulei de lavandă, ulei de neroli și apă purificată, în timp ce Ketonal conține ketoprofen ca API și excipienți precum carbomer, trolamină, ulei esențial de

lavandă, etanol 96% și apă purificată. Flurbiprofen este API în Strepsils Intensiv și produsul conține, de asemenea, betadex, fosfat acid disodic dodecahidrat, acid citric monohidrat, parahidroxibenzoat de metil (E218), parahidroxibenzoat de propil (E216), hidroxid de sodiu, aromă de mentă, aromă de cireșe, N-2,3-trimetil-2-izopropilbutanamidă, zaharină, hidroxipropil betadex și apă purificată ca excipienți.

## Rezultate și discuții

### *Caracterizarea materialului utilizat pentru design-ul senzorilor stocastici de unică folosință*

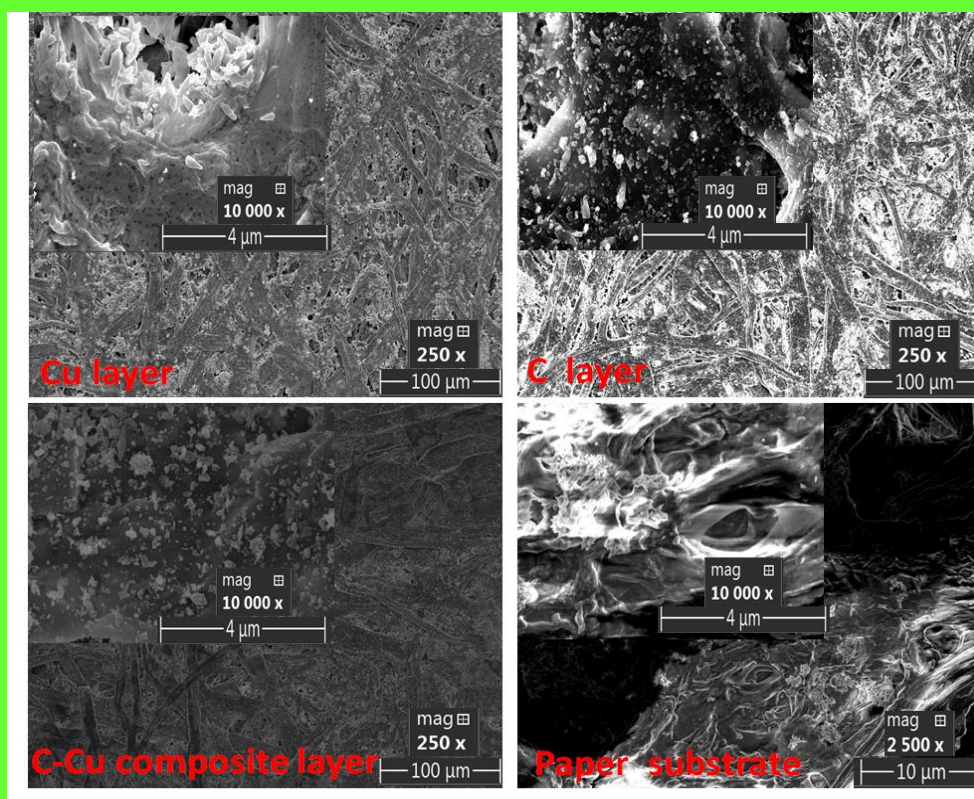
În Figura 3 sunt prezentate fotografiile digitale ale substraturilor de hârtie de copiator acoperite cu a) Cu, b) C și c) C-Cu:



**Figura 3.** Fotografii digitale ale a) monostratului de Cu, b) monostratului C și c) stratului compozit C-Cu depuse pe suport de hârtie de copiere.

Microscopul electronic cu scanare (Apreo S Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, SUA) a fost utilizat pentru a caracteriza evoluția morfologiilor de suprafață a substraturilor de hârtie de copiator neacoperite și acoperite. După cum se arată în Figura 4, imaginile sunt realizate la mărirea de  $10000 \times$  și  $250 \times$  imagini SEM pentru stratul de Cu, stratul de C, stratul compozit C-Cu depuse pe substrat de hârtie de copiator, respectiv, în timp ce o mărire de  $10000 \times$  și  $250 \times$  s-au folosit pentru imaginile SEM ale hârtiei de copiator neacoperite. Pe baza rezultatelor prezentate în Figura 4, comparând diferențele de morfologie a suprafeței dintre hârtia de copiator acoperită și neacoperită, se poate observa că porozitatea hârtiei de copiere a fost acoperită parțial cu nanostratul de Cu și respectiv C și acoperită total cu stratul de compozit C-Cu. Imaginile SEM au dezvăluit o acoperire uniformă și continuă de straturi (Cu, C, C-Cu) pe substratul de hârtie. Aceste rezultate indică faptul că folosind nanostructurile pentru toate cele trei tipuri de acoperiri sunt ușor de obținut senzori.

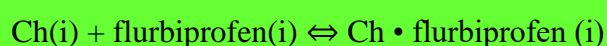
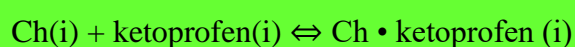
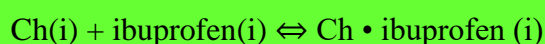




**Figura 4.** Morfologia SEM a monostratului de Cu, monostratului de C, stratului compozit C-Cu depuse pe substrat de hârtie de copiator și substrat de hârtie de copiator neacoperită: imaginea microscopului electronic cu scanare (SEM) din vedere de sus a probelor cu mărire diferită (250 × - bară de scară 100 μm respectiv 10000 × - bară de scară 4 μm și 2500 × - bară de scară 10 μm respectiv 10000 × - bară de scară 4 μm).

#### *Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici*

Metoda stocastică este centrată pe conductivitatea canalului și implică un răspuns bazat pe un proces în două etape. Prima fază este reprezentată de blocarea canalului de către molecula AINS, când curentul scade la 0, în timp ce a doua fază are loc când molecula de AINS intră în canal, se leagă de peretele său și suferă procese redox pentru o anumită perioadă de timp. În a doua fază au loc următoarele ecuații de echilibru:





unde Ch este canalul și i este interfața.

$t_{off}$  caracterizează prima etapă și reprezintă semnătura AINS (analiza calitativă), în timp ce  $t_{on}$  descrie a doua etapă, oferind informații cu privire la concentrația de AINS (analiza cantitativă).

Caracteristicile de răspuns ale celor trei senzori stocastici dezvoltati pentru analiza IBP, KTP și FBP sunt enumerate în Tabelul 2. Pentru toate cele trei AINS, au fost înregistrate valori distincte ale  $t_{off}$  pentru fiecare senzor, indicând o identificare selectivă. Acest lucru a permis utilizarea senzorilor pentru determinarea simultană a tuturor celor trei AINS din probele care le conțin pe toate.

Au fost înregistrate următoarele domenii liniare de concentrație și limite de determinare: de la  $1,00 \times 10^{-15}$  la  $1,00 \times 10^{-3}$  cu un LOD de  $1,00 \times 10^{-15}$  pentru IBP când a fost folosit senzorul stocastic bazat pe monostrat de C,  $1,00 \times 10^{-15} - 1,00 \times 10^{-3}$  cu un LOD de  $1,00 \times 10^{-15}$  pentru KTP când au fost folosiți senzorii stocastici bazați pe monostrat de Cu și strat compozit C-Cu și  $1,00 \times 10^{-15} - 1,00 \times 10^{-2}$  cu un LOD de  $1,00 \times 10^{-15}$  pentru FBP când a fost folosit senzorul stocastic bazat pe stratul compozit C-Cu. Domeniile liniare de concentrație largi obținute pentru fiecare senzor de unică folosință indică faptul că senzorii pentru IBP, KTP și FBP pot fi utilizați pentru cuantificarea lor din forme farmaceutice fără diluarea probei precum și din probe biologice fără nicio etapă de preconcentrare. Limitele de cuantificare de nivelul  $\text{fmol L}^{-1}$  precum și valorile ridicate de sensibilitate obținute au arătat capacitatea ridicată a senzorilor propuși pentru analiza IBP, KTP și FBP, în timp ce diferitele semnături înregistrate pentru aceștia au arătat capacitatea senzorilor de a fi utilizați pentru testele de puritate a substanței active, precum și pentru efectuarea testului de uniformitate a conținutului formelor lor farmaceutice.

Având în vedere caracteristicile de răspuns ale senzorilor propuși pentru IBP, KTP și FBP, senzorul stocastic de unică folosință ales este cel bazat pe stratul compozit C-Cu.

**Tabelul 2.** Caracteristicile de răspuns ale senzorilor stocastici de unică folosință folosiți pentru analiza ibuprofenului, ketoprofenului, și flurbiprofenului.

<b>Senzor stocastic de unică folosință bazat pe MD și</b>	<b>Ecuția de calibrare și coeficientul de corelație (r)</b>	<b>Domeniu liniar de concentrație (<math>\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b><math>t_{off}</math> (s)</b>	<b>Sensibilitate (<math>\text{s}^{-1}/\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Limita de determinare (<math>\text{mol L}^{-1}</math>)</b>
<b>Ibuprofen</b>					
Cu-monostrat	$1/t_{on} = 0.13 + 9.35 \times 10^8 \times C$ $r = 0.9995$	$1.00 \times 10^{-12} - 1.00 \times 10^{-2}$	1.9	$9.35 \times 10^8$	$1.00 \times 10^{-12}$
C-monostrat	$1/t_{on} = 0.15 + 1.85 \times 10^{11} \times C$ $r = 0.9976$	$1.00 \times 10^{-15} - 1.00 \times 10^{-3}$	1.1	$1.85 \times 10^{11}$	$1.00 \times 10^{-15}$
C-Cu strat compozit	$1/t_{on} = 0.08 + 3.19 \times 10^2 \times C$ $r = 0.9966$	$1.00 \times 10^{-6} - 1.00 \times 10^{-3}$	2.5	$3.19 \times 10^2$	$1.00 \times 10^{-6}$

<b>Ketoprofen</b>					
Cu- monostrat	$1/t_{on} = -0.03 + 5.01 \times 10^{11} \times C$ $r = 0.9978$	$1.00 \times 10^{-15} - 1.00 \times 10^{-3}$	1.4	$5.01 \times 10^{11}$	$1.00 \times 10^{-15}$
C- monostrat	$1/t_{on} = 0.10 + 1.15 \times 10^2 \times C$ $r = 0.9969$	$1.00 \times 10^{-6} - 1.00 \times 10^{-2}$	0.7	$1.15 \times 10^2$	$1.00 \times 10^{-6}$
C-Cu strat compozit	$1/t_{on} = 0.13 + 1.25 \times 10^{12} \times C$ $r = 0.9998$	$1.00 \times 10^{-15} - 1.00 \times 10^{-3}$	1.5	$1.25 \times 10^{12}$	$1.00 \times 10^{-15}$
<b>Flurbiprofen</b>					
Cu- monostrat	$1/t_{on} = 0.08 + 3.70 \times 10^8 \times C$ $r = 0.9982$	$1.00 \times 10^{-13} - 1.00 \times 10^{-3}$	0.8	$3.70 \times 10^8$	$1.00 \times 10^{-13}$
C- monostrat	$1/t_{on} = 0.04 + 3.92 \times 10^5 \times C$ $r = 0.9994$	$1.00 \times 10^{-8} - 1.00 \times 10^{-2}$	1.7	$3.92 \times 10^5$	$1.00 \times 10^{-8}$
C-Cu strat compozit	$1/t_{on} = 0.03 + 7.97 \times 10^{10} \times C$ $r = 0.9991$	$1.00 \times 10^{-15} - 1.00 \times 10^{-2}$	1	$7.97 \times 10^{10}$	$1.00 \times 10^{-15}$

### *Selectivitate*

Selectivitatea senzorilor stocastici este conferită de valorile semnăturii (parametrul  $t_{off}$ ) pentru eventualele specii interferente. Răspunsul senzorului la analiții pentru care a fost proiectat nu este influențat de cantitatea de specii interferente. Selectivitatea senzorilor propuși este confirmată de diferitele semnături obținute pentru IBP, KTP și FBP, ceea ce înseamnă că niciunul dintre ei nu interferează în analiza unui AINS selectat. Paracetamolul este de obicei asociat cu IBP, KTP și FBP și, prin urmare, a fost verificată selectivitatea senzorilor propuși. Semnăturile obținute pentru paracetamol cu ajutorul senzorilor propuși au fost: 2,5 s atunci când a fost utilizat senzorul bazat pe monostrat de Cu, 2,7 s atunci când a fost utilizat senzorul bazat pe monostrat de C și 3,0 s atunci când a fost utilizat senzorul bazat pe stratul compozit C-Cu; aceste valori au dovedit că nu există interferențe din partea paracetamolului atunci când senzorii sunt utilizați pentru determinarea IBP, KTP și FBP în produsele farmaceutice. În plus, niciunul dintre ingredientele utilizate pentru formularea compușilor farmaceutici nu interferează, deoarece valorile semnăturilor lor sunt mult diferite de semnăturile înregistrate pentru IBP, KTP și FBP.

### *Reproductibilitatea design-ului senzorilor stocastici de unică folosință*

S-au proiectat zece senzori de fiecare tip și au fost utilizați pentru testarea ibuprofenului, ketoprofenului și flurbiprofenului. Sensibilitatea senzorilor a fost determinată pentru toți cei 10 senzori de fiecare tip. Valorile RSD% determinate pentru variația sensibilităților înregistrate pentru cei 10 microsenzori de fiecare tip au fost următoarele: pentru senzorul bazat pe monostrat de Cu, 0,12% pentru ibuprofen, 0,10% pentru ketoprofen și 0,10% pentru flurbiprofen; pentru senzorul bazat pe monostrat de C 0,13% pentru ibuprofen, 0,13% pentru ketoprofen și 0,11% pentru flurbiprofen; și, pentru senzorul bazat pe stratul compozit C-Cu 0,10% pentru ibuprofen, 0,09% pentru ketoprofen, și 0,08% pentru flurbiprofen. Rezultatele au arătat că design-ul propus al senzorilor stocastici este foarte reproductibil.

## Stabilitate

Senzorii de unică folosință au fost păstrați pentru o perioadă de șapte luni și utilizați pentru determinarea IBP, KTP și FBP. Rezultatele obținute au fost consistente în toată această perioadă de timp și nu au existat diferențe majore în ceea ce privește sensibilitatea senzorilor, variațiile de sensibilitate fiind mai mici de 1,00%.

## Analiza ibuprofenului, ketoprofenului și flurbiprofenului din formele lor farmaceutice

Testele de uniformitatea conținutului sunt foarte importante pentru industria farmaceutică. Senzorii propuși au fost potriviți pentru analiza IBP, KTP și FBP direct din formele farmaceutice, deoarece concentrația substanțelor active se găsește în domeniul liniar de concentrație al senzorilor de unică folosință. Prin urmare, senzorii au fost utilizați în analiza calitativă și cantitativă a IBP, KTP și FBP în trei forme farmaceutice topice. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 3, iar diagramele sunt prezentate în Figurile S1, S2 și S3.

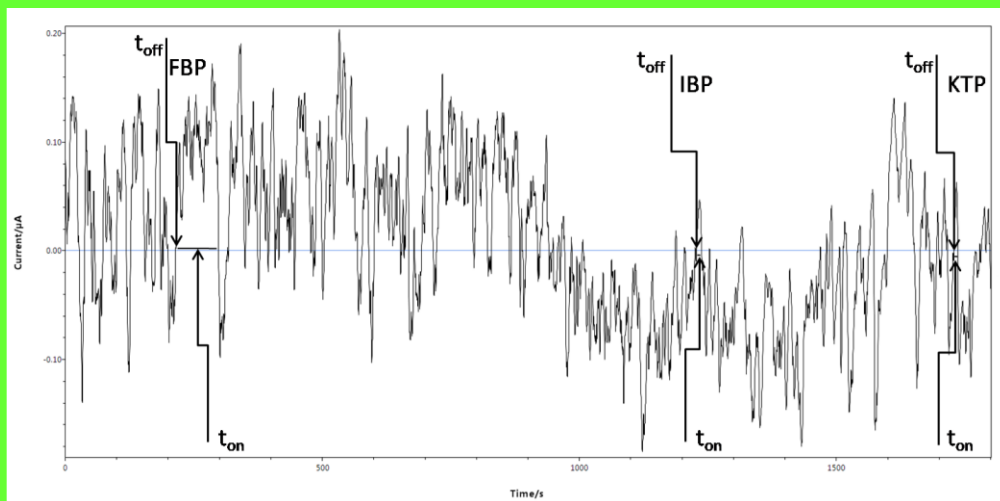
**Tabelul 3.** Analiza ibuprofenului, ketoprofenului și flurbiprofenului în forme farmaceutice topice.

AINS	Forma farmaceutică	Senzor stocastic	Concentrația AINS în forma farmaceutică
Ibuprofen	Gel (50 mg ibuprofen/g gel)	MD/Cu- monostrat	49.93 ± 0.03 mg/g gel
		MD/C- monostrat	49.98 ± 0.02 mg/g gel
		MD/C-Cu compozit strat	49.46 ± 0.03 mg/g gel
Ketoprofen	Gel (25 mg ketoprofen/g gel)	MD/Cu- monostrat	24.94 ± 0.04 mg/g gel
		MD/C- monostrat	24.08 ± 0.03 mg/g gel
		MD/C-Cu compozit strat	24.73 ± 0.03 mg/g gel
Flurbiprofen	Spray bucofaringian (16.20 mg flurbiprofen/mL)	MD/Cu- monostrat	16.18 ± 0.02 mg/mL
		MD/C- monostrat	15.98 ± 0.03 mg/mL
		MD/C-Cu compozit strat	16.13 ± 0.03 mg/mL

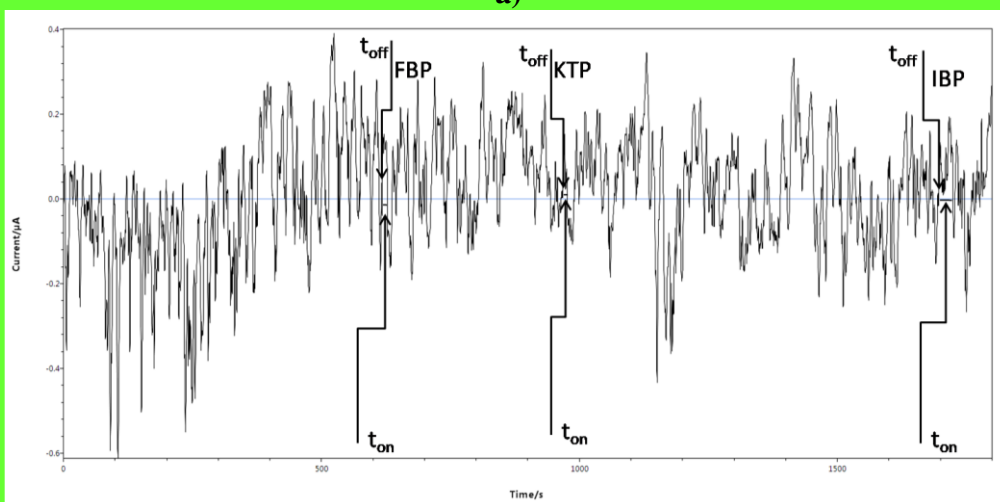
Puritatea substanței active este o problemă majoră în industria farmaceutică. Având în vedere procesul de sinteză a AINS din clasa profen, este nevoie de o metodă de discriminare între diferitele substanțe active de tip profen. Pentru a demonstra că este posibilă analiza fiabilă a unui profen în prezența celorlalți, s-a efectuat o validare suplimentară a senzorilor folosind diverse soluții mixte care conțin cei trei profeni în raporturi molare diferite (Tabelul 4). Rezultatele prezentate în Tabelul 4 reprezintă o medie înregistrată pentru diferite concentrații de medicamente de tip profeni, amestecate în diferite rapoarte în soluțiile mixte preparate. Diagramele obținute sunt prezentate în Figura 5.

**Tabelul 4.** Recuperarea ibuprofenului, ketoprofenului și flurbiprofenului în soluții mixte

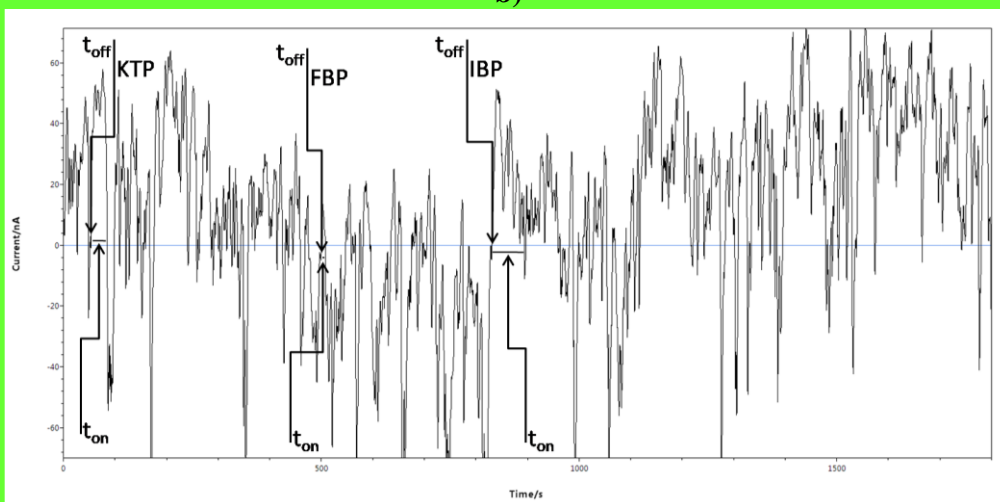
<b>IBP:KTP:FBP (mol : mol : mol)</b>	<b>Senzor stocastic</b>	<b>IBP</b>	<b>KTP</b>	<b>FBP</b>
<b>1 : 1 : 1</b>	MD/Cu- monostrat	99.87 ± 0.02	99.93 ± 0.01	99.47 ± 0.03
	MD/C- monostrat	99.90 ± 0.03	99.98 ± 0.02	99.97 ± 0.02
	MD/C-Cu compozit strat	99.95 ± 0.02	99.97 ± 0.03	99.98 ± 0.01
<b>1 : 1 : 2</b>	MD/Cu- monostrat	99.95 ± 0.01	99.18 ± 0.03	99.48 ± 0.02
	MD/C- monostrat	99.89 ± 0.03	99.87 ± 0.02	99.93 ± 0.03
	MD/C-Cu compozit strat	99.90 ± 0.02	99.90 ± 0.02	99.85 ± 0.02
<b>1 : 2 : 1</b>	MD/Cu- monostrat	99.95 ± 0.02	99.90 ± 0.03	99.17 ± 0.02
	MD/C- monostrat	99.97 ± 0.03	99.85 ± 0.03	99.18 ± 0.03
	MD/C-Cu compozit strat	99.90 ± 0.03	99.97 ± 0.03	99.98 ± 0.01
<b>2 : 1 : 1</b>	MD/Cu- monostrat	99.83 ± 0.02	99.90 ± 0.04	99.87 ± 0.03
	MD/C- monostrat	99.91 ± 0.02	99.87 ± 0.02	99.15 ± 0.02
	MD/C-Cu compozit strat	99.94 ± 0.03	99.95 ± 0.01	99.80 ± 0.03
<b>1 : 1 : 5</b>	MD/Cu- monostrat	99.64 ± 0.02	99.58 ± 0.03	99.76 ± 0.02
	MD/C- monostrat	99.18 ± 0.03	99.96 ± 0.02	99.99 ± 0.01
	MD/C-Cu compozit strat	99.48 ± 0.03	99.98 ± 0.03	99.95 ± 0.03
<b>1 : 5 : 1</b>	MD/Cu- monostrat	99.32 ± 0.02	99.37 ± 0.03	99.15 ± 0.02
	MD/C- monostrat	99.87 ± 0.02	99.37 ± 0.02	99.98 ± 0.03
	MD/C-Cu compozit strat	99.80 ± 0.03	99.87 ± 0.03	99.98 ± 0.02
<b>5 : 1 : 1</b>	MD/Cu- monostrat	99.83 ± 0.02	99.90 ± 0.04	99.95 ± 0.03
	MD/C- monostrat	99.90 ± 0.03	99.15 ± 0.02	99.27 ± 0.04
	MD/C-Cu compozit strat	99.80 ± 0.03	99.75 ± 0.03	99.93 ± 0.04
<b>1 : 1 : 10</b>	MD/Cu- monostrat	99.90 ± 0.03	99.80 ± 0.04	99.89 ± 0.03
	MD/C- monostrat	99.87 ± 0.02	99.15 ± 0.02	99.99 ± 0.03
	MD/C-Cu compozit strat	99.90 ± 0.03	99.91 ± 0.04	99.90 ± 0.02
<b>1 : 10 : 1</b>	MD/Cu- monostrat	99.87 ± 0.03	99.98 ± 0.02	99.99 ± 0.03
	MD/C- monostrat	99.73 ± 0.02	99.96 ± 0.04	99.98 ± 0.03
	MD/C-Cu compozit strat	99.80 ± 0.04	99.87 ± 0.03	99.85 ± 0.03
<b>10 : 1 : 1</b>	MD/Cu- monostrat	99.92 ± 0.03	99.93 ± 0.03	99.89 ± 0.02
	MD/C- monostrat	99.96 ± 0.03	99.87 ± 0.02	99.90 ± 0.03
	MD/C-Cu compozit strat	99.87 ± 0.02	99.89 ± 0.03	99.27 ± 0.02
<b>1 : 1 : 100</b>	MD/Cu- monostrat	99.90 ± 0.03	99.98 ± 0.02	99.87 ± 0.03
	MD/C- monostrat	99.98 ± 0.02	99.95 ± 0.03	99.97 ± 0.02
	MD/C-Cu compozit strat	99.93 ± 0.03	99.90 ± 0.04	99.92 ± 0.02
<b>1 : 100 : 1</b>	MD/Cu- monostrat	99.84 ± 0.02	99.87 ± 0.03	99.90 ± 0.03
	MD/C- monostrat	99.97 ± 0.02	99.95 ± 0.02	99.93 ± 0.02
	MD/C-Cu compozit strat	99.89 ± 0.03	99.90 ± 0.02	99.91 ± 0.03
<b>100 : 1 : 1</b>	MD/Cu- monostrat	99.15 ± 0.02	99.85 ± 0.01	99.99 ± 0.03
	MD/C- monostrat	99.87 ± 0.03	98.57 ± 0.02	98.32 ± 0.03
	MD/C-Cu compozit strat	99.90 ± 0.03	99.23 ± 0.02	99.47 ± 0.02



a)



b)



c)

**Figura 5.** Diagrame obținute în urma măsurării soluției mixte care conține diferite proporții de ibuprofen, ketoprofen și flurbiprofen având concentrația de ordinul mărimii de  $10^{-4}$  mol  $L^{-1}$  folosind senzorii stocastici de unică folosință modificați cu maltodextrină și pe bază de a) Cu-monostat, b) C-monostat și c) C-Cu strat compozit.

Rezultatele au arătat valori ridicate de recuperare cu abatere standard relativă foarte scăzută, demonstrând că este posibilă determinarea unui profen în prezența celorlalți cu fiabilitate ridicată și, de asemenea, că senzorii stocastici de unică folosință pot fi utilizați fiabil pentru testele de puritate ale compuși activi de tip profeni. Comparativ cu metodele cromatografice de analiză prezentate mai sus [6-11,17-20], avantajele aceste metode de analiză sunt: s-a obținut o sensibilitate mai mare, au fost înregistrate limite de cuantificare mai mici; nu s-a aplicat nicio metodă de pretratare a probelor pentru analiza profenilor; timpul de analiză a fost mult mai mic, iar costul per analiză mult mai mic decât costurile implicate de metodele de analiză cromatografice.

## Concluzii

Pentru identificarea și determinarea ibuprofenului, ketoprofenului și flurbiprofenului au fost utilizați trei senzori stocastici de unică folosință bazați pe depunere cu plasmă rece de monostrat de cupru, monostrat carbon și strat compozit carbon-cupru pe hârtie de copiator și modificați cu maltodextrină (echivalent dextroză = 4 – 7) în forme farmaceutice topice. Concentrațiile de ibuprofen, ketoprofen și flurbiprofen în formulele lor farmaceutice se încadrează în domeniile liniare de concentrație ale celor trei senzori stocastici de unică folosință, favorizând utilizarea acestora pentru determinarea uniformității conținutului. În plus, aceștia pot fi utilizați pentru testele de puritate ale ibuprofenului, ketoprofenului și flurbiprofenului. Sensorii propuși sunt candidați excelenți pentru industria farmaceutică, atunci când testele de puritate și de conținut de uniformitate sunt necesare pentru a fi efectuate rapid, pentru medicamentele de tip profen.

## Referințe

- [1] H. Young, S. Pan, A.G. Yap, K.R. Reveles, K. Bhakta, Polypharmacy prevalence in older adults seen in United States physician offices from 2009 to 2016, PLoS One 16 (2021), e0255642.
- [2] European pharmacopoeia, Council of Europe, 10th ed., Strasbourg (2017a), p. 2921–2923.
- [3] European pharmacopoeia, Council of Europe, 10th ed., Strasbourg (2017b), p. 3035–3037.
- [4] European pharmacopoeia, Council of Europe, 10th ed., Strasbourg (2017c), p. 2680–2681.
- [5] The United States Pharmacopeia USP 34-NF 29, (2011).
- [6] A. Tartaglia, A. Kabir, F. D'Ambrosio, P. Ramundo, S. Ulusoy, H.I. Ulusoy, G. M. Merone, F. Savini, C. D'Ovidio, U. Grazia, K.G. Furton, M. Locatelli, Fast off-line FPSE-HPLC-PDA determination of six NSAIDs in saliva samples, J. Chromatogr. B 1144 (2020), 122082.



- [7] M. Locatelli, V. Ferrone, R. Cifelli, R.C. Barbacane, G. Carlucci, Microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography determination of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and urine, *J. Chromatogr. A* 1367 (2014) 1–8.
- [8] V. D'Angelo, F. Tessari, G. Bellagamba, E. De Luca, R. Cifelli, C. Celia, R. Primavera, M. Di Francesco, D. Paolino, L. Di Marzio, M. Locatelli, Microextraction by packed sorbent and HPLC–PDA quantification of multiple anti-inflammatory drugs and fluoroquinolones in human plasma and urine, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 31 (2016) 110–116.
- [9] M. Locatelli, A. Tartaglia, F. D'Ambrosio, P. Ramundo, H.I. Ulusoy, K.G. Furton, A. Kabir, Biofluid sampler: A new gateway for mail-in-analysis of whole blood samples, *J. Chromatogr. B* 1143 (2020), 122055.
- [10] K.-M. Park, Z.-G. Gao, C.-K. Kim, Assay of flurbiprofen in rat plasma using HPLC with fluorescence detection, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 1849–1855.
- [11] M.E. Yaman, A. Atila, T.C. Akman, M. Albayrak, Y. Kadioglu, Z. Halici, A sensitive UPLC-MS/MS method for the determination of Flurbiprofen in rat plasma: Application to real sample, *J. Chromatogr. Sci.* 59 (2021) 502–509.
- [12] P.C. Damiani, M. Bearzotti, M.A. Cabez'ón, Spectrofluorometric determination of ibuprofen in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 679–683.
- [13] R.N. Saha, S. Chandran, P.R. Jadhav, P.B. Kharwade, Rapid and sensitive spectrofluorimetric method for the estimation of celecoxib and Flurbiprofen, *Indian, J. Pharm. Sci.* 68 (2006) 20–25.
- [14] Z. Kormosh, I. Hunka, Y. Bazel, O. Matviychuk, Potentiometric determination of Ketoprofen and Piroxicam at a new PVC electrode based on Ion Associates of Rhodamine 6G, *Mat. Sci. Eng. C.* 30 (2010) 997–1002.
- [15] A.A. Bunaciu, A. Grasu, H.Y. Aboul-Enein, Pharmaceutical applications of a flurbiprofen sensor, *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 193–197.
- [16] R.-I. Stefan-vanStaden, R.G. Bokretson, K.I. Ozoemena, J.F. vanStaden, H. Y. Aboul-Enein, Enantioselective, potentiometric membrane electrodes based on different cyclodextrins as chiral selectors for the assay of S-flurbiprofen, *Electroanalysis* 18 (2006) 1718–1721.
- [17] J. Sadecka, M. Cakrt, A. Hercegova, J. Polonský, I. Skacani, Determination of ibuprofen and naproxen in tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 881–891.
- [18] M. Friedberg, Z.K. Shihabi, Ketoprofen analysis in serum by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 695 (1997) 193–198.

- [19] E. Waraksa, M.K. Wozniak, E. Kłodzinska, R. Wrzesien, B. Bobrowska-Korczak, J. Namiesnik, A rapid and sensitive method for the quantitative analysis of ibuprofen and its metabolites in equine urine samples by gas chromatography with Tandem Mass Spectrometry, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 3881–3891.
- [20] B. Yilmaz, E. Alkan, Determination of flurbiprofen in pharmaceutical preparations by GC–MS, *Arab. J. Chem.* 12 (2019) 2077–2083.
- [21] H. Karimi-Maleh, A. Khataee, F. Karimi, M. Baghayeri, L. Fu, J. Rouhi, C. Karaman, O. Karaman, R. Boukherroub, A green and sensitive guanine-based DNA biosensor for idarubicin anticancer monitoring in biological samples: A simple and fast strategy for control of health quality in chemotherapy procedure confirmed by docking investigation, *Chemosphere* 291 (2022), 132928.
- [22] Y. Orooji, P.N. Asrami, H. Beitollahi, S. Tajik, M. Alizadeh, S. Salmanpour, M. Baghayeri, J. Rouhi, A.L. Sanati, F. Karimi, An electrochemical strategy for toxic ractopamine sensing in pork samples; twofold amplified nano-based structure analytical tool, *Food Meas.* 15 (2021) 4098–4104.
- [23] H. Karimi-Maleh, F. Karimi, L. Fu, A.L. Sanati, M. Alizadeh, C. Karaman, Y. Orooji, Cyanazine herbicide monitoring as a hazardous substance by a DNA nanostructure biosensor, *J. Hazard. Mat.* 423 (2022), 127058.
- [24] H. Karimi-Maleh, O.A. Arotiba, Simultaneous determination of cholesterol, ascorbic acid and uric acid as three essential biological compounds at a carbon paste electrode modified with copper oxide decorated reduced graphene oxide nanocomposite and ionic liquid, *J. Colloid Interf. Sci.* 560 (2020) 208–212.
- [25] H. Karimi-Maleh, M. Alizadeh, Y. Orooji, F. Karimi, M. Baghayeri, J. Rouhi, S. Tajik, H. Beitollahi, S. Agarwal, V.K. Gupta, S. Rajendran, S. Rostamnia, L. Fu, F. Saberi-Movahed, S. Malekmohammadi, Guanine-based DNA biosensor amplified with Pt/SWCNTs nanocomposite as analytical tool for nanomolar determination of daunorubicin as an anticancer drug: a docking/experimental investigation, *Ind. Eng. Chem. Res.* 60 (2021) 816–823.
- [26] H. Karimi-Maleh, M.L. Yola, N. Atar, Y. Orooji, F. Karimi, P.S. Kumar, J. Rouhi, M. Baghayeri, A novel detection method for organophosphorus insecticide fenamiphos: molecularly imprinted electrochemical sensor based on core-shell Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MOF-74 nanocomposite, *J. Colloid Interf. Sci.* 592 (2021) 174–185.
- [27] H. Karimi-Maleh, Y. Orooji, F. Karimi, M. Alizadeh, M. Baghayeri, J. Rouhi, S. Tajik, H. Beitollahi, S. Agarwal, V.K. Gupta, S. Rajendran, A. Ayati, L. Fu, A. L. Sanati, B. Tanhaei, F. Sen, M. Shabani-Nooshabadi, P.N. Asrami, A. Al-Othman, A critical review on the use of potentiometric based biosensors for biomarkers detection, *Biosens. Bioelectron.* 184 (2021), 113252.

- [28] C. Cioates Negut, S.S. Gheorghe, R.-I. Stefan-van Staden, J.F. van Staden, Fast screening test for molecular recognition of levodopa and dopamine in biological samples using 3D printed stochastic microsensors, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 205 (2021), 114292.
- [29] R.-I. Stefan-van Staden, D.-C. Gheorghe, R.-M. Ilie-Mihai, L.-B. Tudoran, S. M. Pruneanu, Stochastic biosensors based on N- and S-doped graphene for the enantioanalysis of aspartic acid in biological samples, *RSC Adv.* 11 (2021) 23301–23309.
- [30] R.-M. Ilie-Mihai, R.-I. Stefan-van Staden, L. Magerusan, M. Coros, S. Pruneanu, Enantioanalysis of tryptophan in whole blood samples using stochastic sensors—a screening test for Gastric Cancer, *Chirality* 32 (2019) 215–222.
- [31] C. Surdu-Bob, I. Mustata, C. Iacob, General characteristics of the Thermoionic Vacuum Arc plasma, *J. Optoelectron. Adv. M.* 9 (2007) 2932–2934.
- [32] R.-I. Stefan-van Staden, S.S. Gheorghe, R.-M. Ilie-Mihai, M. Badulescu, Disposable stochastic sensor based on deposition of a nanolayer of silver on silk for molecular recognition of specific biomarkers, *J. Electrochem. Soc.* 168 (2021), 037515.
- [33] R.-I. Stefan-van Staden, L.A. Gugoas, ăa, M. Badulescu, C.C. Surdu-Bob, Novel textile material based disposable sensors for Biomedical Analysis, *RSC Adv.* 5 (2015) 45545–45550.
- [34] R.-I. Stefan-van Staden, I. Moldoveanu, C.C. Surdu-Bob, M. Badulescu, J.F. van Staden, Carbon modified paper based sensors, *J. Electrochem. Soc.* 162 (2015) B360–B362.
- [35] R.-I. Stefan-van Staden, I.R. Comnea-Stancu, C.C. Surdu-Bob, M. Badulescu, Nanostructured materials detect epidermal growth factor receptor, neuron specific enolase and carcinoembryonic antigen, *Nanoscale* 7 (2015) 15689–15694.

## **Senzori bazati pe nanografene pentru determinarea acidului sorbic**

### **Rezumat**

Au fost propuși doi senzori pe bază de nanografen decorati cu pastă de nanoparticule de aur modificată cu porfirine metalice (protoporfirina Zn IX și clorură de 2,3,7,8,12,13,17,18 octaetil, 21H, 23H-porfirina Mn(III)). pentru determinarea acidului sorbic în produsele de panificație și maioneză. Senzorii au fost caracterizați folosind SEM și impedanță. Caracteristicile răspunsului au arătat că limitele de detecție pentru ambii senzori au fost de 0,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$  în timp ce limitele de cuantificare au fost de 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Ambii senzori pot fi utilizați între 1 și 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Cea mai mare sensibilitate (0,35nA/ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) a fost înregistrată atunci când a fost utilizat senzorul bazat pe clorură de 2,3,7,8,12,13,17,18 octaetil, 21H, 23H-porfirina Mn(III). Recuperări mari (valori mai mari de 95,00%) și

valori scăzute RSD (%) (mai mici de 5,00%) au fost înregistrate pentru ambii senzori atunci când au fost utilizați pentru determinarea acidului sorbic în pâine și maioneză.

## 1. Introducere

Cunoscut ca E200 în industria alimentară, acidul sorbic (acid 2,4-hexadienoic) este un compus organic natural utilizat ca conservant alimentar. Rolul său este de a păstra proprietățile organoleptice ale alimentelor în lanțul alimentar global și de a prelungi durata de valabilitate a produselor. Are proprietăți antimicrobiene și are proprietăți pozitive asupra organismului uman, dacă este utilizat în cantități rezonabile contribuind la detoxifierea și stimularea imunității. Este foarte eficient în inhibarea creșterii mușcăiurilor, drojdiilor și ciupercilor, care pot strica alimentele și pot răspândi boli mortale. Acidul sorbic este utilizat pe scară largă pentru a inhiba drojdia și mușcăiul în brânza procesată, pentru diferite tipuri de sucuri și vin și unele produse de panificație. De asemenea, este folosit în carnea procesată ca alternativă la nitriți. Principalele grupe de alimente care contribuie la aportul zilnic de nutrienți au un conținut de acid sorbic, care variază între 200–2000 mg/kg (ou lichid 5000 mg/kg, fructe de mare fierte 6000 mg/kg) și băuturi răcoritoare, vin 200–300 mg/kg (suc de struguri 2000 mg/kg, concentrate lichide de ceai 600 mg/kg). Doza zilnică acceptabilă (DZA) pentru acid sorbic este de 25 mg/kg greutate corporală. Datorită importanței sale în industria alimentară corelată cu starea de sănătate a populației, există necesitatea dezvoltării unor metode rapide, rentabile și fiabile de analiză a acidului sorbic din alimente.

Până în prezent, metodele propuse pentru analiza acidului sorbic sunt: metode cromatografice de analiză [1-4], electroforeză capilară [5-7], metode electrochimice de analiză [8] și metoda de analiză prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară protonică [8]. 9].

Metodele electrochimice de analiză sunt extrem de fiabile și rentabile, fiind necesară o prelevare minimă de probe înainte de măsurători. Prin urmare, această lucrare a propus noi senzori electrochimici ca instrumente de screening a pâinii și a maionezei pentru acid sorbic. Au fost proiectați doi senzori pe bază de nanografen decorati cu pastă de nanoparticule de aur modificată cu porfirine metalice (protoporfirina Zn IX și clorură de 2,3,7,8,12,13,17,18 octaetil, 21H, 23H-porfirina Mn(III)). , caracterizat și validat pentru determinarea acidului sorbic în pâine și maioneză. Grafenii sunt materialele de alegere pentru mulți cercetători din domeniul senzorilor electrochimici; utilizarea nanografenelor a crescut sensibilitatea măsurătorilor prin creșterea ariei suprafeței active a senzorilor electrochimici [10]. Modificarea materialului nanografen cu nanoparticule de aur a îmbunătățit conductivitatea nanografenului, în timp ce porfirinele sunt bine cunoscute pentru activitatea lor electrocatalitică atunci când sunt utilizate în proiectarea senzorilor amperometrici/voltametrici [11].

## 2. Experimental

## 2.1. Materiale și reactivi

Acid sorbic, protoporfirina de zinc IX (ZnPIX), clorură de 2,3,7,8,12,13,17,18-Octaetil-21H,23H-porfirină mangan (III) (Mn(TPP)Cl), pulbere de nanografen (6 -8 nm) (NPs-Gr), nanoparticule de aur (10 nm diametru, OD 1, suspensie stabilizată în 0,1 mmol L<sup>-1</sup> PBS, fără reactanți), fosfat monosodic, fosfat disodic, zaharoză, glucoză, benzoat de sodiu, sulfat de potasiu, clorură de magneziu, acid ascorbic, acetat de sodiu, fructoză, propionat de etil, sorbat de potasiu, au fost achiziționate de la Sigma Aldrich și ulei de parafină (d420, 0,86 g cm<sup>-1</sup>) a fost achiziționat de la Fluka (Buchs, Suedia).

Soluția tampon fosfat (PBS, 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a fost preparată amestecând soluții de fosfat monosodic și fosfat disodic. pH-ul soluției tampon a fost ajustat folosind cantități diferite de soluții de NaOH sau HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> pentru a obține valori diferite ale pH-ului (2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 și 8,0). Soluția stoc de 10-2 mol L<sup>-1</sup> acid sorbic a fost preparată proaspătă, înainte de măsurători, în apă deionizată.

## 2.2. Aparatură și metode

Măsurătorile voltametriei ciclice (CV), voltametriei cu undă pătrată (SWV) și spectroscopiei de impedanță electrochimică (EIS) au fost efectuate folosind un mini potențostat EmSTAT Pico (software PsTrace 5.8 PalmSens) conectat la un laptop pentru achiziția de date. Toate experimentele electrochimice au fost efectuate la temperatura camerei. Rezultatele au fost înregistrate folosind o celulă electrochimică care conține trei electrozi: electrodul de pastă de nanografen modificat, Ag/AgCl (0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl) și firul Pt ca electrozi de lucru, de referință și, respectiv, auxiliari. Ajustarea pH-ului a fost realizată cu un pH-metru Mettler Toledo.

Morfologia de suprafață a probelor studiate a fost investigată utilizând microscopie electronică cu scanare (SEM) (Inspect S), Compania FEI Țările de Jos. Toate probele au fost analizate în modul vid înalt folosind detectorul ETD, tensiune înaltă (HV) de 30 kV, la ordinul de mărire 3000.

## 2.3. Proiectarea senzorului electrochimic

Pentru a pregăti senzorii electrochimici pentru analiza acidului sorbic, s-au făcut următorii pași: 40 mg de pulbere de nanografen au fost amestecate cu 4 μL suspensie stabilizată de nanoparticule de aur (în 0,1 mmol L<sup>-1</sup> PBS) și s-a adăugat ulei de parafină până când s-a obținut o pastă omogenă. obținut. Pasta a fost împărțită în două părți și în fiecare parte o soluție de 20 μL 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> soluție de porfirină (protoporfirina de zinc IX,2,3,7,8,12,13,17,18-Octaetil-21H, 23H-porfirină mangan (III) clorură) pentru a obține electrozi ZnPIX/AuNPs-Gr și Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr. Două tuburi de plastic neconductive proiectate folosind o imprimantă 3D în laboratorul nostru au fost umplute cu pastele modificate. Un fir de argint a servit ca contact electric între pasta modificată și circuitul extern.

## 2.4. Pregătirea probelor

Proba utilizată pentru validarea senzorilor au fost: pâine albă, pâine neagră și maioneză ușoară. S-au adăugat 10 mL de PBS (pH=2) la 1 g de pâine neagră/albă. Amestecul rezultat a fost agitat timp de 4 minute și lăsat în baia cu ultrasunete timp de 30 de minute.

1 g din proba de maioneză a fost cântărită la balanța analitică, a fost dizolvată în 10 ml de PBS (pH = 2) și agitată timp de 4 minute.

## 3. Rezultate și discuții

### 3.1. Caracterizarea SEM a suprafeței active a senzorilor electrochimici

Imaginile SEM au fost utilizate pentru a caracteriza morfologia de suprafață a pastelor AuNPs-Gr ZnPIX/AuNPs-Gr și Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr.

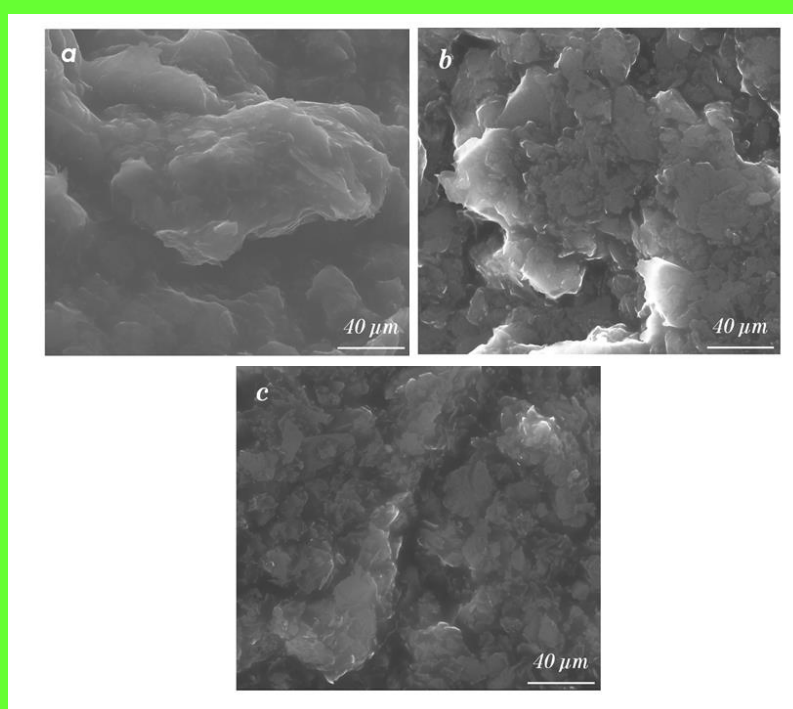


Figura 1. Imagini SEM ale (a) AuNPs-Gr, (b) ZnPIX/AuNPs-Gr și (c) paste Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr.

După cum se arată în Figura 1 (a), imaginea SEM reprezentativă prezintă foi plate prezentate în straturi subțiri de nanofoi. În cazul pastei ZnPIX/AuNPs-Gr (Fig. 1b) și Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr pastei (Fig. 1c) foile plate sunt strâns asociate între ele, prezentate în forme agregate.



### 3.2. Caracterizarea electrochimică a senzorilor

Caracterizarea electrochimică a senzorilor ZnPIX/AuNPs-Gr și Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr față de senzorul bazat pe AuNPs-Gr a fost efectuată folosind următoarele metode: voltametrie ciclică (CV) și spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS) (Figura 4) .

CV a fost folosit pentru a studia răspunsul electrochimic al senzorilor modificați (Figura 4(a)). Măsurătorile voltametriei ciclice au fost efectuate într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ) într-un interval de potențial între  $-0,6\text{V}$  și  $1,0\text{V}$ , folosind ca electrozi de lucru, AuNPs-Gr, ZnPIX/AuNPs-Gr, Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr, (Figura 2 (a)). Se poate observa că după modificarea pastei AuNPs cu soluții de ZnPIX și Mn(TPP)Cl conductivitatea senzorului a crescut. În consecință, modificarea senzorilor și răspunsul electrochimic a fost îmbunătățită.

Studiul EIS a fost efectuat pentru a examina interfața senzorului într-un interval de frecvență de la  $1,0 \times 10^5$  la  $1,0 \times 10^{-1} \text{ Hz}$ . Toate măsurătorile EIS au fost efectuate într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ). În Figura 4(b) sunt reprezentate diagramele Nyquist. În Figura 2(b) se observă că cel mai mare semicerc aparține senzorului nemodificat, cu  $R_{ct} = 3,548 \times 10^6 \Omega$ , cel mai mic semicerc aparține senzorului ZnPIX/AuNPs-Gr ( $R_{ct} = 399,5 \Omega$ ), în timp ce pentru Mn Senzor (TPP)Cl/AuNPs-Gr, diametrul semicercului a scăzut la  $R_{ct} = 1389 \Omega$ . Prin urmare, senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr a prezentat un semicerc mai mic și o valoare  $R_{ct}$  mai mică decât valorile  $R_{ct}$  obținute pentru senzorul AuNPs-Gr și senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr. Rezultatele EIS au arătat că sunt în concordanță cu rezultatele obținute prin voltametrie ciclică (CV), care au fost obținute pentru o soluție de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ). ).

Comportamentul electrochimic al celor trei senzori a fost examinat folosind metoda voltametriei cu unde pătrate (SWV), într-o soluție care conține  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$  acid sorbic tamponat cu PBS la  $\text{pH}=2,0$ . Voltamogramele înregistrate pentru toți senzorii sunt ilustrate în Figura 2(c). Comparând cei trei senzori (Figura 2(c)), folosind metoda SWV, senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr și senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr au dat cele mai bune rezultate pentru oxidarea acidului sorbic. Senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr a funcționat mult mai bine decât senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr. Prin urmare, senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr și senzorul

ZnPIX/AuNPs-Gr au fost caracterizați și testați în continuare pentru determinarea electrochimică a acidului sorbic în probe de alimente reale, cum ar fi pâinea albă, pâinea neagră și maioneza.

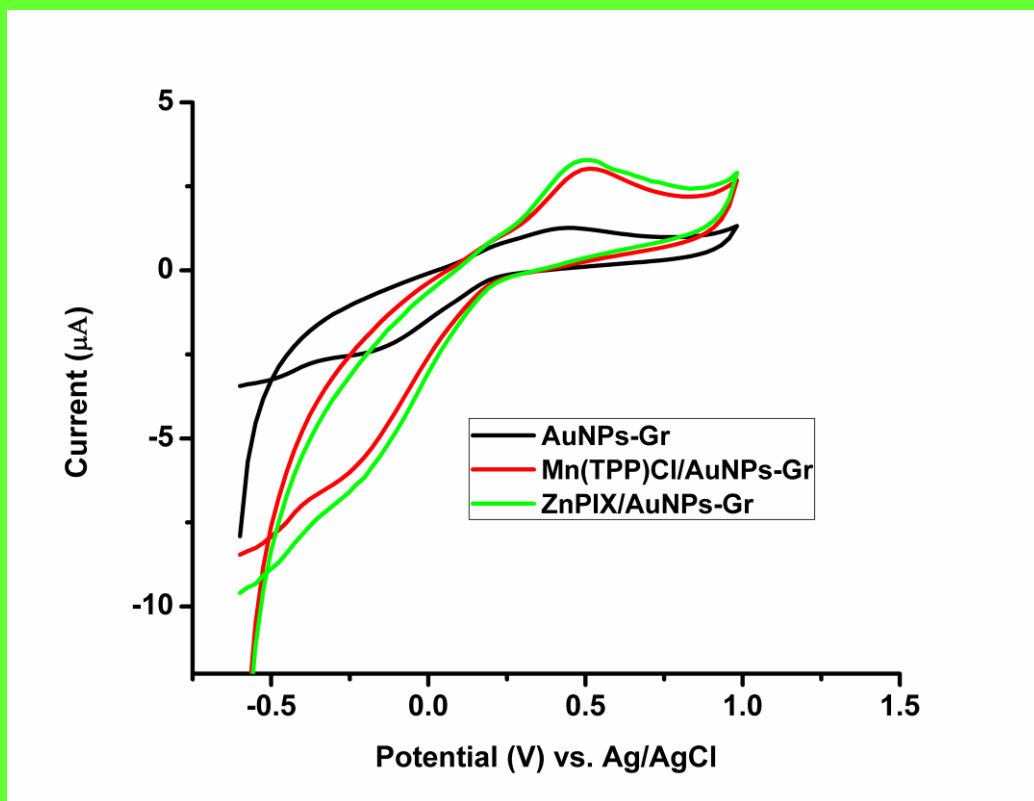


Fig.2(a)

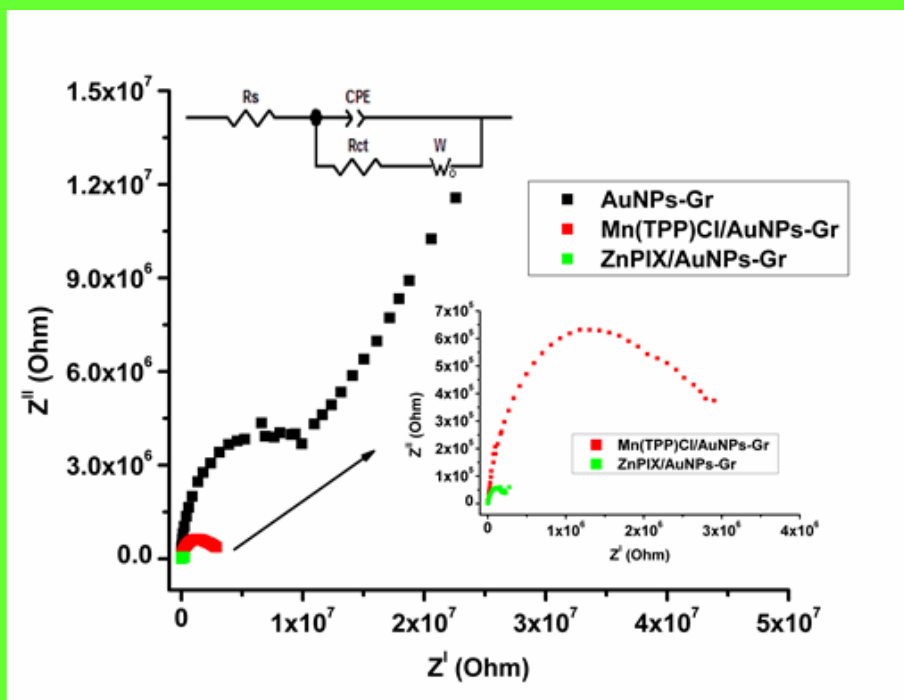
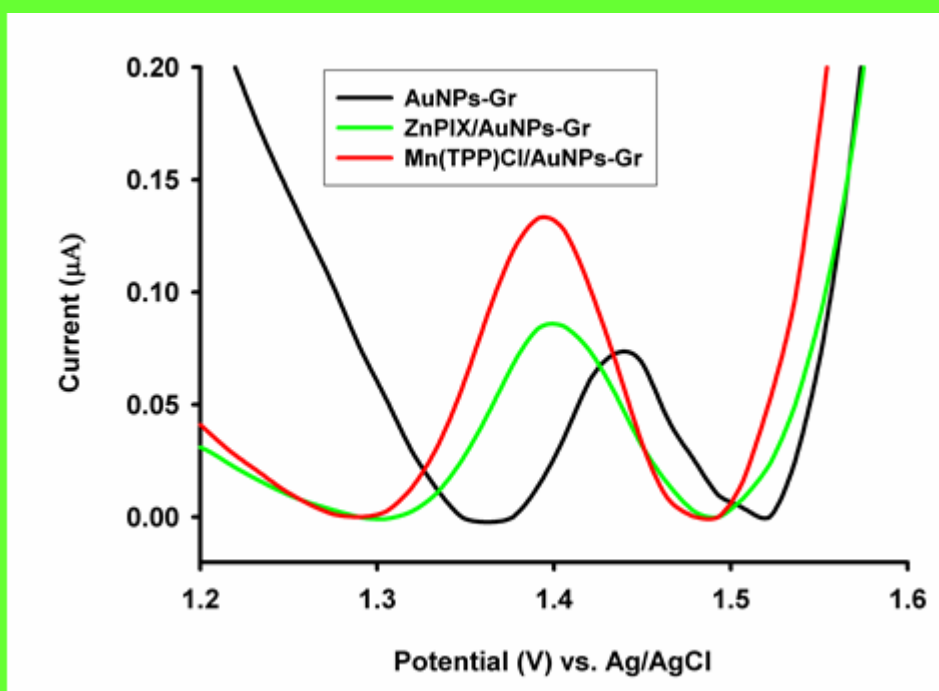


Fig. 2(b)

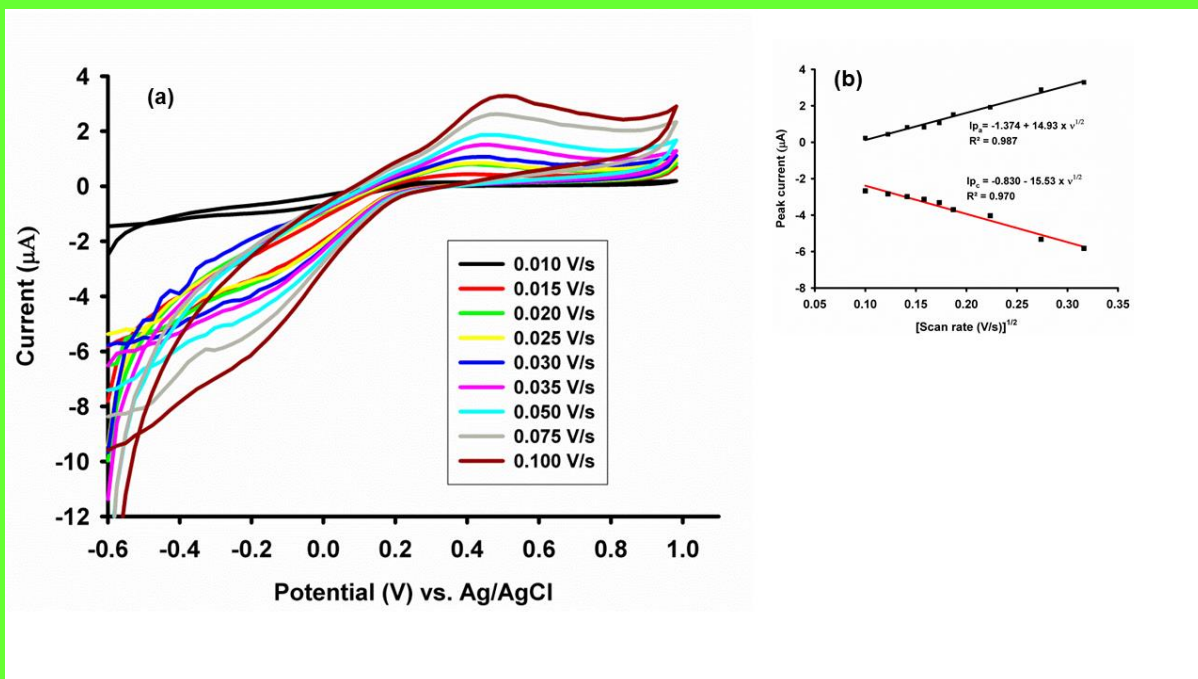


**Fig. 2(c)**

**Figura 2. (a)** Voltamograme ciclice ale curentului reprezentate în funcție de potențial (Condiții de lucru: potențial în trepte 0,025 V; viteza de scanare 0,1 V/s) într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] în 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl utilizând AuNPs-Gr (linia neagră), Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr (linia roșie) și ZnPIX/AuNPs-Gr (linia verde); (b) Spectrele de impedanță electrochimică înregistrate pentru AuNPs-Gr (linia neagră), Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr (linia roșie) și ZnPIX/AuNPs-Gr (linia verde) într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] în 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl (Condiții: interval de frecvență între  $1,0 \times 10^5$  și  $1,0 \times 10^{-1}$  Hz). Inset: diagrama circuitului echivalent a interfeței electrochimice utilizată pentru a se potrivi spectrelor de impedanță unde  $R_s$  este rezistența soluției, CPE este elementul de fază constantă,  $R_{ct}$  este rezistența de transfer de electroni și  $Z_w$  este rezistența de difuzie Warburg; (c) Voltamogramele cu unde pătrate înregistrate în pH 2,0 PBS care conțin 400 μmol L<sup>-1</sup> acid sorbic pentru AuNPs-Gr (linia neagră), ZnPIX/AuNPs-Gr (linia verde) și Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr (linie roșie).

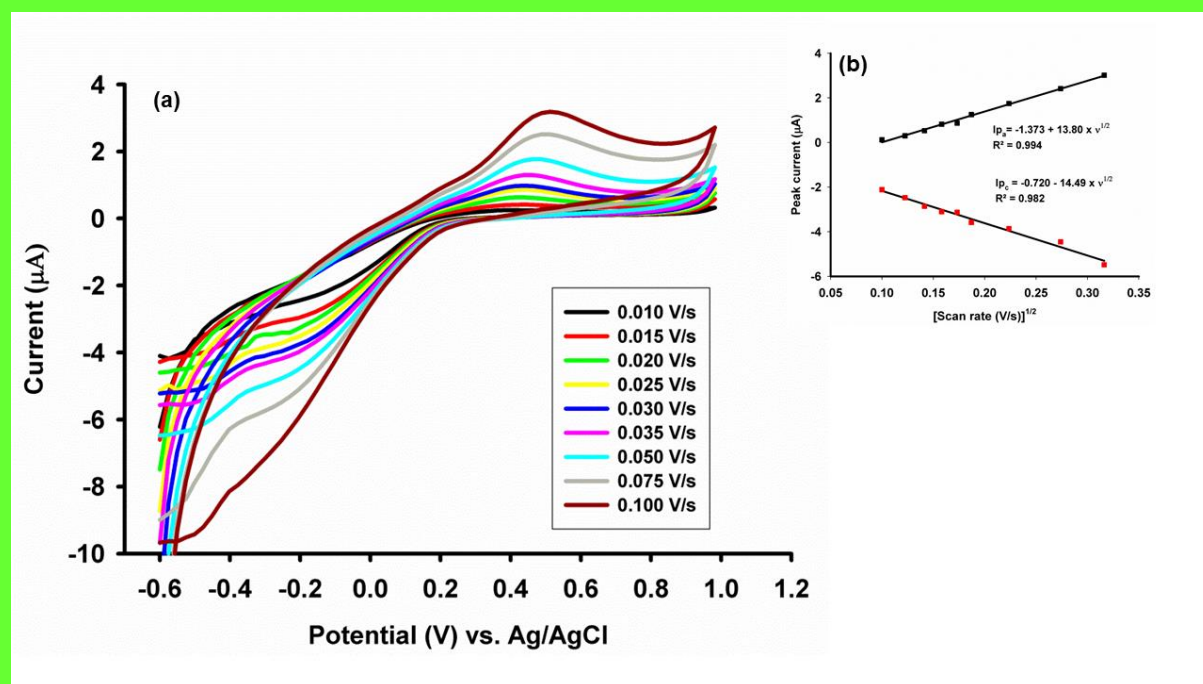
Activitatea electrocatalitică a celor trei senzori a fost investigată prin calcularea suprafeței electroactive folosind ecuația Randles-Sevcik.

Prin variația ratei de scanare de la 0,010 la 0,100 V/s, vârfurile anodice și catodice ( $I_{pa}$  și  $I_{pc}$ ) au arătat o dependență liniară de rădăcina pătrată a ratei de scanare, sugerând că procesul redox a fost controlat prin difuzie. Figurile 3 (a) și 4 (a) arată tendința dintre creșterea ratei de scanare și intensitatea curentului. Dependențele liniare pentru ambele vârfuri  $I_{pa}$  față de  $v^{1/2}$  și  $I_{pc}$  față de  $v^{1/2}$  sunt prezentate în figurile 3(b) și 4(b). Sensorul ZnPIX/AuNPs-Gr a avut o valoare mai mare pentru zona ( $0,0041\text{cm}^2$ ) fata de valoarea ( $0,0038\text{cm}^2$ ) obtinuta pentru sensorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr, si cu valoarea ( $0,0015\text{cm}^2$ ) obtinuta pentru zona sensorului AuNPs-Gr (Figura S1).



**Figura 3. (a)** Voltamograme ciclice într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] în 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl la diferite viteze de scanare de la 0,010 la 0,100 V/s folosind ZnPIX /AuNPs-Gr (Condiții de lucru: interval de potențial de la -0,6 V la 1,0 V; potențial de treaptă 0,025 V);

**(b)** Dependența curentului de vârf de rădăcina pătrată a ratei de scanare, folosind senzorul ZnPIX/AuNPs-G.

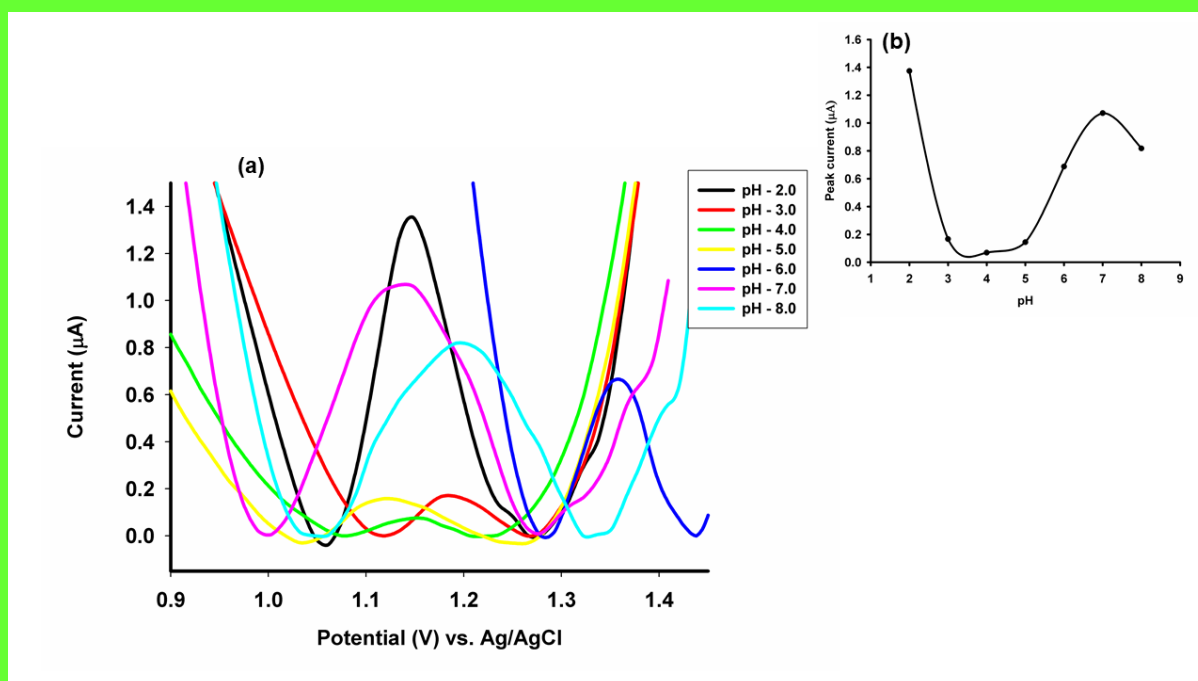


**Figura 4. (a)** Voltamograme ciclice într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] în 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl la diferite viteze de scanare de la 0,010 la 0,100 V s<sup>-1</sup> folosind Senzor Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr. (Condiții de lucru: interval de potențial de la -0,6 V la 1,0 V; potențial de treaptă 0,025 V);

(b) Dependența curentului de vârf de rădăcina pătrată a ratei de scanare, folosind senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr.

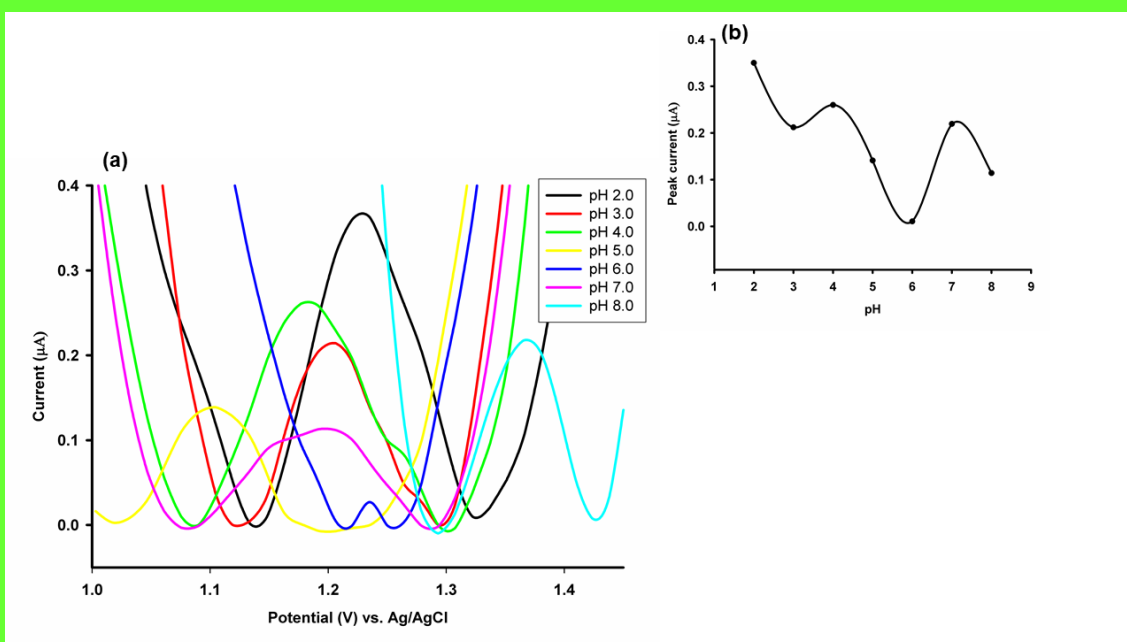
### 3.4. Influența valorii pH-ului asupra comportamentului electrochimic al senzorilor

Valoarea pH-ului soluției este esențială în măsurătorile electrochimice. Pentru a determina influența valorii pH-ului asupra analizei acidului sorbic, o soluție de acid sorbic cu concentrația de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  a fost tamponată cu PBS la diferite valori ale pH-ului (2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 și 8,0). Figura 5 arată că pentru senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr intensitatea curentului electric a scăzut de la pH = 2,0 la 5,0 cu o creștere evidentă la pH = 6,0 și 7,0 apoi a început să scadă până când a fost atins pH = 8,0 (Figura 5). Figura 5 arată că la pH 2,0 cea mai mare intensitate a curentului a fost atinsă pentru analiza acidului sorbic. La un pH scăzut (mediu acid) acidul sorbic tinde să se oxideze mai ușor decât la un pH ridicat (mediu alcalin), ceea ce pare să se datoreze faptului că la pH alcalin se transformă în ionul său sorbant, care este mai puțin predispus. a oxida. Prin urmare, valoarea optimă a pH-ului a fost 2,0.



**Figura 5.** (a) Voltamograme cu undă pătrată de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  acid sorbic obținute folosind senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr atunci când soluția a fost tamponată cu PBS la următoarele valori ale pH-ului de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 și 8,0; (b) Efectul pH-ului asupra curentului de vârf.

Același mod a fost urmat și pentru senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr. Figura 6 arată că intensitatea curentului electric a scăzut de la pH = 2,0 la pH 3,0, apoi crește la pH 4,0, scade la pH 6,0, urmată de o creștere la pH 7,0, apoi o scădere finală la pH 8,0. Figura 6 arată că la pH 2,0 este cea mai mare intensitate de curent pentru analiza acidului sorbic. Prin urmare, pH-ul 2,0 a fost selectat ca pH optim.



**Figura 6.** (a) Voltamograme cu undă pătrată de 100 μmol L<sup>-1</sup> acid sorbic obținute utilizând senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr când soluția a fost tamponată cu PBS la următoarele valori ale pH-ului de 2,0, 3,0 , 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 și 8,0; (b) Efectul pH-ului asupra curentului de vârf.

### 5. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor electrochimici

Caracteristicile de răspuns ale senzorilor electrochimici propuși au fost determinate folosind voltametrie cu undă pătrată, la valoarea optimă a pH-ului (2,0) și sunt rezumate în Tabelul 1.

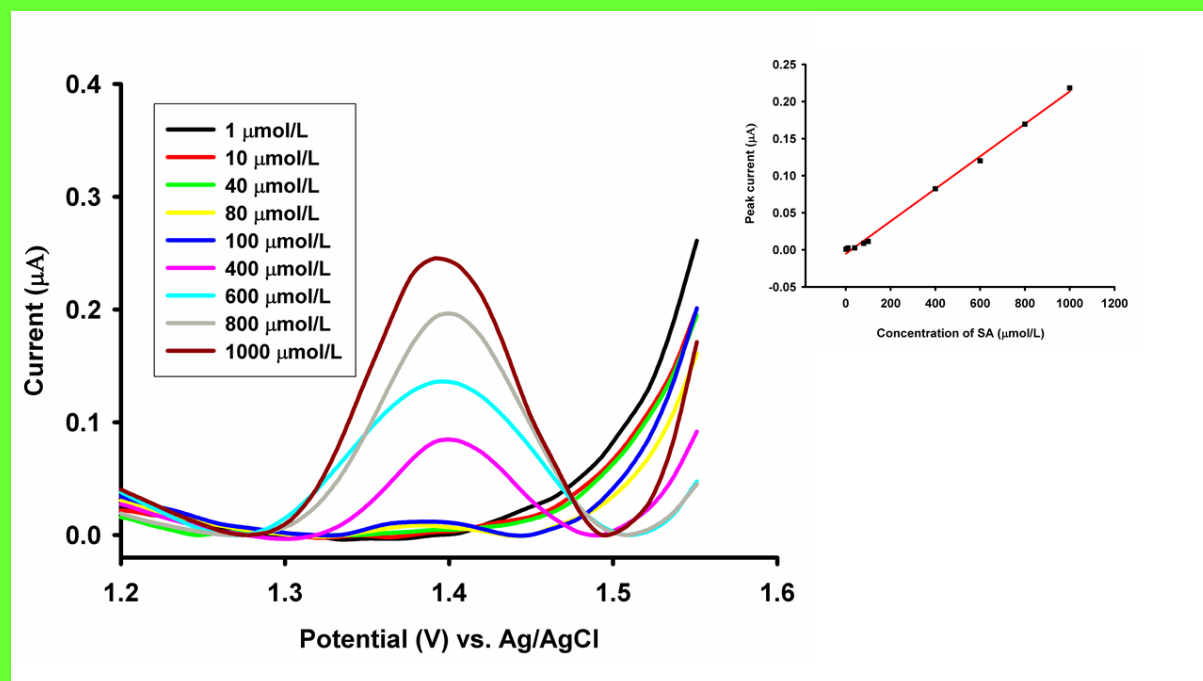
Tabelul 1. Caracteristicile de răspuns ale senzorilor electrochimici utilizați pentru determinarea acidului sorbic

Parametru	Senzor electrochimic	
	Senzor ZnPIX/AuNPs-Gr	Senzor Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr
Ecuția de calibrare*	$I_{pa} = -5.29 + 0.22xC$ ; $r = 0.9985$	$I_{pa} = -5.01 + 0.35xC$ ; $r = 0.9984$
Interval liniar de concentrație (μmol L <sup>-1</sup> )	1-1000	1-1000
Sensibilitate (nA/μmol L <sup>-1</sup> )	0.22±0.03	0.35±0.02
Limita de detecție (μmol L <sup>-1</sup> )	0.33	0.33
Limită de determinare (μmol L <sup>-1</sup> )	1	1
Repetabilitate curentului de vârf (% RSD)	5.56	5.41

\* $\langle I_{pa} \rangle = nA$ ;  $\langle C \rangle = \mu mol L^{-1}$



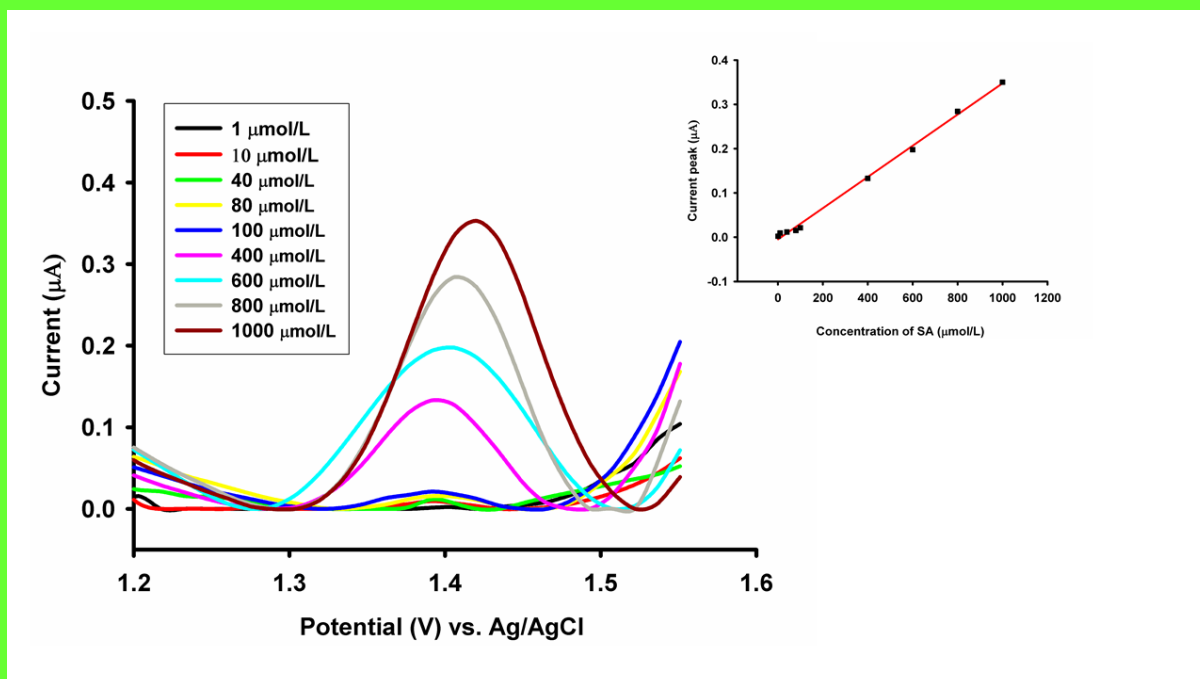
Figura 7 a arătat pentru senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr vârfurile obținute în timpul calibrării, precum și graficul de calibrare pentru acid sorbic. Intervalul de concentrație liniar a fost între 1 și 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cu un coeficient de corelație de 0,9985. Limita de detecție a fost de 0,33  $\mu\text{mol/L}$ , care a fost calculată ca o treime din limita de cuantificare (cea mai mică concentrație din intervalul de concentrație liniară, 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).



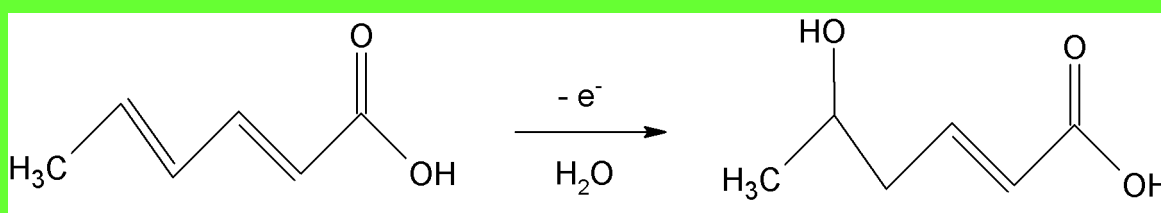
**Figura 7** Voltamograme cu undă pătrată înregistrate cu senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr în PBS pH = 2,0 care conține diferite concentrații de acid sorbic (1 până la 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) și graficul de calibrare obținut cu senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr de la 1 până la 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Condiții de lucru: potențial de treaptă de 0,025 V și frecvență de 5,0 Hz.

Sensibilitatea senzorului ZnPIX/AuNPs-Gr a fost de 0,22 nA  $\mu\text{mol}^{-1}$  L.

Figura 8 a arătat voltamogramele obținute în timpul calibrării senzorului Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr, precum și graficul de calibrare pentru acid sorbic. Intervalul de concentrație liniar a fost între 1 și 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Limita de detecție (calculată ca o treime din limita de cuantificare) a fost de 0,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Sensibilitatea înregistrată pentru acest senzor a fost de 0,35 nA  $\mu\text{mol}^{-1}$  L.



**Figura 8.** (a) Voltamograme cu undă pătrată înregistrate cu senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr în PBS pH = 2,0 care conține diferite concentrații de acid sorbic (1 până la 1000 µmol L<sup>-1</sup>); (b) Curba de calibrare obținută cu senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr de la 1 la 1000 µmol L<sup>-1</sup>. Condiții de lucru: potențial de treaptă de 0,025 V și frecvență de 5,0 Hz.



**Schema 1.** Mecanismul posibil al oxidării electrochimice a acidului sorbic în medii acide (pH = 2)

Posibilul mecanism de reacție al acidului sorbic este prezentat în Schema 1 și implică ruperea unei duble legături și adăugarea de OH<sup>-</sup> urmată de deprotonarea chimică a produsului de oxidare.

În timp ce limitele de cuantificare și detecție, precum și intervalele de concentrație liniare sunt aceleași pentru ambii senzori, sensibilitatea senzorului Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr este mai mare. Prin urmare, acesta este senzorul ales.

### 3.6. Studii de interferență

Pentru studiul de selectivitate, mai mulți ioni, cum ar fi COO<sup>-</sup>, Mg<sup>2+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> și specii organice precum zaharoza, glucoza, fructoza, acidul ascorbic, benzoatul de sodiu, propionat de etil, sorbat de potasiu, au fost testați ca posibile interferențe în determinarea acidului sorbic. . Posibilele substanțe interferente au fost alese dintre substanțele întâlnite în mod obișnuit cu acidul sorbic în pâinea albă, pâinea neagră și maioneză. Limita de toleranță a fost definită ca concentrația maximă de interferență care a cauzat o modificare a intensității curentului în termeni de eroare relativă (± 5% nivel de acceptare) și polarizare (%) și semnal modificat (%). Toate soluțiile evaluate au fost obținute în condiții optime, pH=2,0 PBS cu o

concentrație constantă de acid sorbic (400 pmol/L). Rezultatele experimentale nu au arătat nicio influență evidentă asupra detectării acidului sorbic atunci când un exces de 10 ori de acid ascorbic pentru propionat de etil și zaharoză și un raport de 1:1 de CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, acid ascorbic, benzoat de sodiu, fructoză, glucoză, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Mg<sup>2+</sup>. (Tabelul 2, Figura 9).

Tabel 2. Toleranța interferențelor la detectarea a 400 μmol/L acid sorbic folosind senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr.

Interferent	Tolerance level ratio (interferent: sorbic acid)	Signal changed (%)	Relative error (%)	Bias (%)
Ethil propionate	10:1	-2.78	-2.71	-6.76
Sucrose	10:1	2.16	2.21	-5.37
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	1:1	0.70	0.70	2.89
Ascorbic acid	1:1	-0.91	-0.90	0.61
Sodium benzoate	1:1	0.37	0.37	-1.18
Fructose	1:1	-2.18	-2.14	2.32
Glucose	1:1	0.62	0.62	2.32
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1:1	0.20	0.20	3.34
Mg <sup>2+</sup>	1:1	-3.14	-3.04	-6.03
Potassium sorbate	1:1	0.94	0.95	2.47

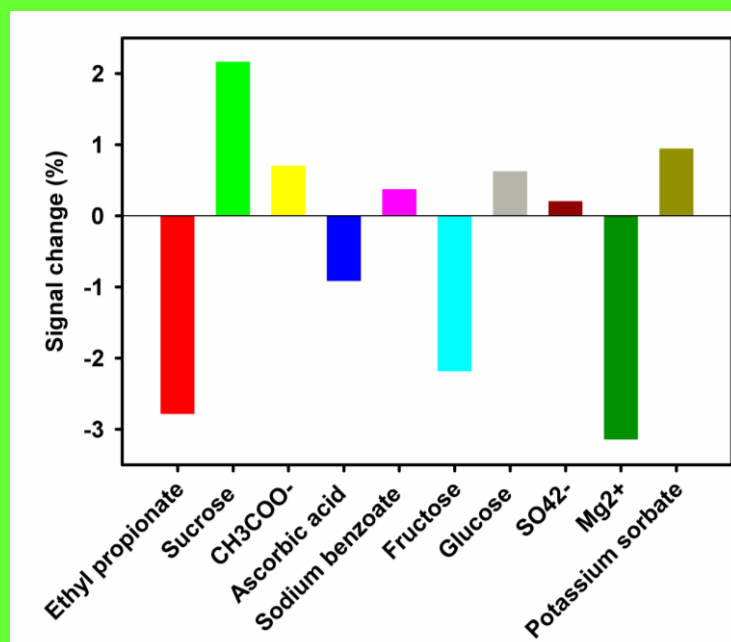
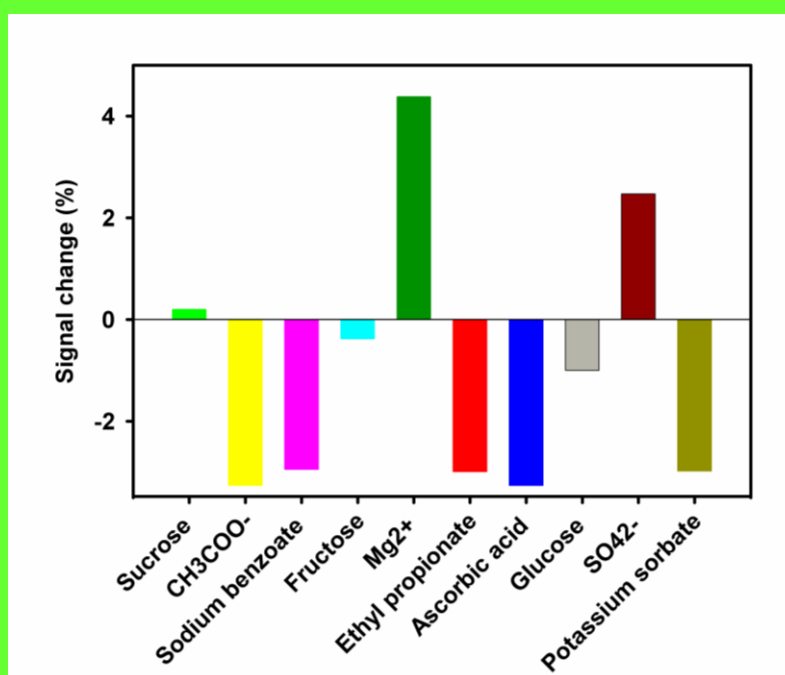


Figura 9. Răspunsuri selective ale senzorului ZnPIX/AuNPs-Gr. Acid sorbic = 400 μmol L<sup>-1</sup>.

Pentru senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr, rezultatele experimentale nu au arătat nicio influență evidentă asupra detectării acidului sorbic atunci când un exces de 10 ori de zaharoză, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, benzoat de sodiu, fructoză, Mg<sup>2+</sup> și a 1: Pentru studiile de selectivitate au fost utilizate 1 raport de propionat de etil, acid ascorbic, glucoză, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, sorbat de potasiu (Tabelul 3, Figura 10).

**Tabel 3.** Toleranța interferențelor la detectarea a 400 μmol/L acid sorbic folosind senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr.

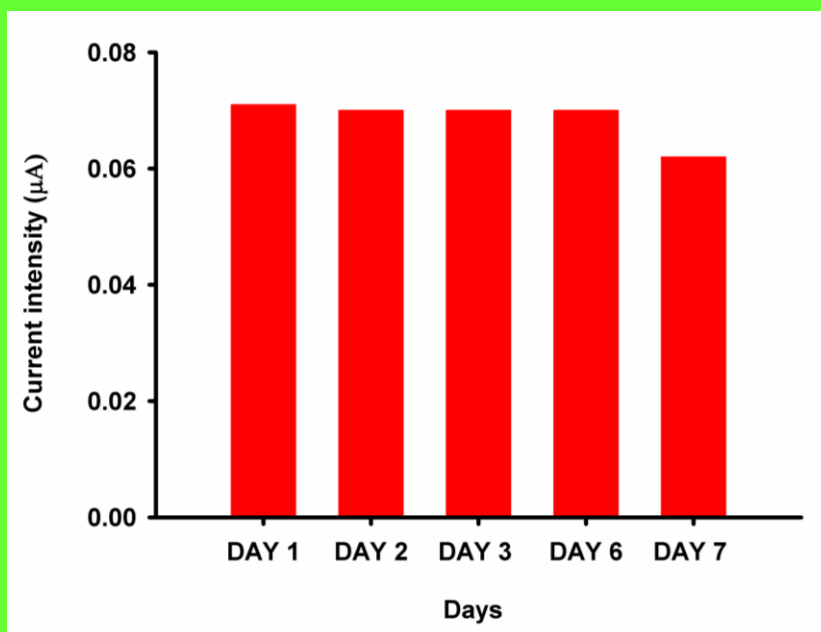
Interferent	Tolerance level ratio (interferent: sorbic acid)	Signal changed (%)	Relative error (%)	Bias (%)
Sucrose	10:1	0.02	0.02	-0.39
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	10:1	-3.26	-3.16	5.65
Sodium benzoate	10:1	-2.95	-2.86	0.41
Fructose	10:1	-0.38	-0.38	1.20
Mg <sup>2+</sup>	10:1	4.38	4.58	-6.45
Etil propionat	1:1	-2.99	-2.91	-0.10
Ascorbic acid	1:1	-3.26	-4.50	-8.46
Glucose	1:1	-1.00	-0.99	0.41
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1:1	2.47	2.53	-7.05
Potassium sorbate	1:1	-2.98	-2.89	-10.02



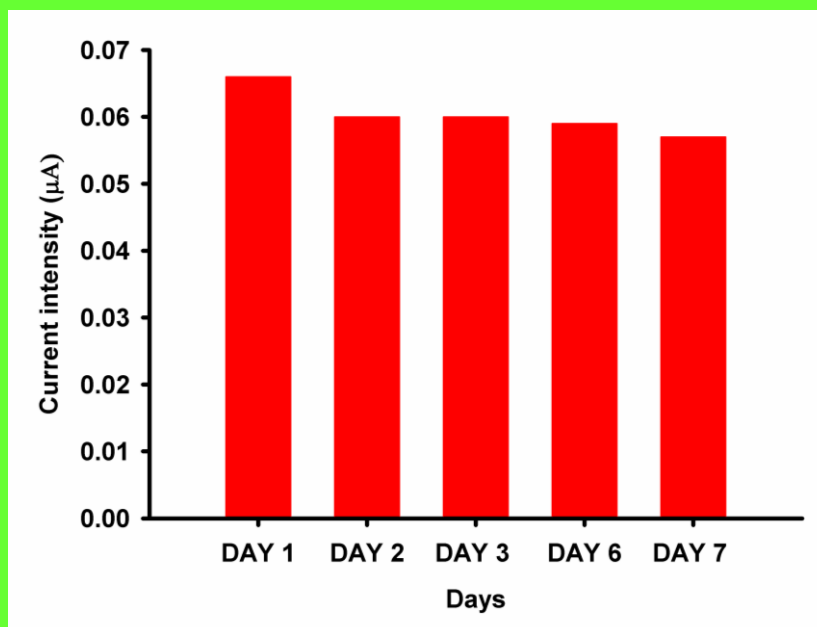
**Figura 10.** Răspunsuri selective ale senzorului Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr. Acid sorbic = 400 μmol L<sup>-1</sup>.

### 3.7. Reproducibilitate, repetabilitate și stabilitate

Reproducibilitatea, repetabilitatea și stabilitatea au fost testate în condiții optime de lucru folosind SWV pentru ambii senzori: senzor ZnPIX/AuNPs-Gr și senzor Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr într-o soluție de acid sorbic de  $400\mu\text{mol L}^{-1}$  preparată în PBS pH. =2,0. Pentru a evalua reproducibilitatea, 3 noi senzori de fiecare tip. Abaterea standard relativă (RSD%) a fost de 2,47% (n=4) pentru senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr și 0,76% (n=4) pentru senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr. Rezultatele obținute au fost corelate cu repetabilitatea. Pentru aceiași senzori, repetabilitatea între zile a fost determinată a fi de 4,31% pentru 4 măsurători repetitive, pentru ambii senzori. Apoi, stabilitatea senzorilor a fost examinată prin menținerea electrozilor la temperatura camerei timp de șapte zile. După 7 zile, în cazul senzorului ZnPIX/AuNPs-Gr (Figura 11), intensitatea curentului măsurat pentru concentrația de acid sorbic de mai sus a fost de 87,32% (reprezentând raportul dintre valoarea intensității curentului măsurat în a 7-a zi, iar intensitatea curentului măsurată în prima zi înmulțită cu 100) cu o valoare RSD (%) de 5,41%; iar în cazul senzorului Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr (Figura 12) intensitatea curentului măsurat pentru concentrația de acid sorbic de mai sus a fost de 86,37% (reprezentând raportul dintre valoarea intensității curentului măsurat în a 7-a zi, iar intensitatea curentului măsurată în prima zi înmulțită cu 100) cu o valoare RSD (%) de 5,56%. Rezultatele de mai sus au demonstrat o bună stabilitate și reproducibilitate a senzorului propus în detectarea acidului sorbic.



**Figura 11.** Stabilitatea senzorului ZnPIX/AuNPs-Gr.



**Figura 12.** Stabilitatea senzorului Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr.

### 3.8. Aplicație analitică

Validarea senzorilor propuși este esențială pentru utilizarea ulterioară în controlul calității produselor alimentare și a securității alimentare. Prin urmare, pentru ambii senzori a fost utilizată metoda de adăugare standard pentru validarea lor, pentru a demonstra că aceștia sunt foarte fiabili pentru analiza acidului sorbic în pâinea albă și neagră, precum și în maioneză.

**Tabelul 4.** Determinarea acidului sorbic în probele de pâine albă, pâine neagră și maioneză folosind senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr

Probă	Cantitate adăugată (µmol/L)	Cantitate găsită (µmol/L)	Recuperare (%)	RSD %
<b>pâine albă</b>	400	386.41	96.60	0.71
<b>Probă</b>	800	787.72	98.47	1.25
<b>Paine neagra</b>	400	393.12	98.28	3.93
<b>Probă</b>	800	791.00	98.88	1.63
<b>Maioneză</b>	400	384.68	96.17	0.76
	800	798.21	99.78	3.62



**Table 5.** Detection of sorbic acid in white bread, black bread and mayonnaise samples using the Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr sensor.

<b>Probă</b>	<b>Cantitate adăugată (μmol/L)</b>	<b>Cantitate găsită (μmol/L)</b>	<b>Recuperare (%)</b>	<b>RSD %</b>
<b>pâine albă</b>	400	389.85	97.46	4.58
<b>Probă</b>	800	773.53	96.69	0.24
<b>Paine neagra</b>	400	381.01	95.25	2.98
<b>Probă</b>	800	791.56	98.94	2.84
<b>Maioneză</b>	400	397.19	99.30	0.81
	800	761.40	95.17	0.33

Probele au fost preparate așa cum se arată mai sus și pentru fiecare dintre probe a fost determinată concentrația de acid sorbic. După această etapă, s-au adăugat cantități cunoscute de acid sorbic, urmate de măsurători ale concentrației acestuia.

Rezultatele prezentate în tabelele 4 și 5 au arătat o fiabilitate ridicată a testului acidului sorbic în pâinea albă și neagră, precum și în maioneză. Când a fost folosit senzorul ZnPIX/AuNPs-Gr, recuperările au fost mai mari de 96,00% pentru pâinea albă cu RSD, mai puțin de 1,50%; mai mare de 98,00% pentru pâinea neagră cu valori RSD mai mici de 4,00%; în timp ce pentru maioneză, recuperarea a fost mai mare de 96,00% cu valori RSD mai mici de 4,00% (Tabelul 4). Când a fost folosit senzorul Mn(TPP)Cl/AuNPs-Gr, recuperările au fost mai mari de 96,50% pentru pâinea albă cu RSD, mai puțin de 5,00%; mai mare de 95,00% pentru pâinea neagră cu valori RSD mai mici de 3,00%; în timp ce pentru maioneză, recuperarea a fost mai mare de 95,00% cu valori RSD mai mici de 1,00% (Tabelul 5). În consecință, senzorii propuși pot fi utilizați pentru analiza acidului sorbic în pâinea albă/neagră și maioneză.

#### 4. Concluzii

Această lucrare a raportat doi senzori electrochimici utilizați pentru determinarea fiabilă a acidului sorbic. Senzorii s-au bazat pe modificarea unei paste de nanografen decorată cu aur cu soluții de protoporfirina Zn IX și clorură de 2,3,7,8,12,13,17,18 octaetil, 21H, 23H-porfirina Mn(III). Pentru ambii senzori au fost înregistrate stabilitate ridicată, selectivitate, sensibilitate și reproductibilitate. Caracteristica senzorilor propuși este utilizarea lor în industria alimentară și supermarketuri pentru controlul calității alimentelor, în ceea ce privește analiza concentrației de acid sorbic.

## Referințe

1. A. Özdemir, S. Şanlı, B. Sardoğan, S. Sardoğan, Determinarea acidului sorbic în probe de brânză prin metoda rapidă HPLC-DAD, *Int. J. Anal. Chim.* [ID articol 6049028 (2020) 1-10.
2. C. De Luca, S. Passi, E. Quattrucci, Determinarea simultană a acidului sorbic, a acidului benzoic și a parabenilor în alimente: o nouă tehnică de cromatografie gazoasă-spectrometrie de masă adoptată într-un sondaj privind alimentele și băuturile italiene, *Food Addit. Contam.* 12 (1995) 1-7.
3. S. Yarramraju, V. Akurathi, K. Wolfs, A.V. Schepdael, J. Hoogmartens, E. Adams. Investigarea produselor de degradare volatila a acidului sorbic în formulările farmaceutice utilizând cromatografia de gaze în spațiul de cap static. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 456–463.
4. T. D'Amore, A. Di Taranto, G. Berardi, V. Vita, M. Iammarino, Going green in food analysis: a rapid and precise method for the determination of sorbic acid and benzoic acid in foods by capilar ion cromatografie cu detectie de conductivitate, *LWT* 141 (2021) 110841.
5. X. Zhang, S. Xu, Y. Sun, Y. Wang, C. Wang, Determinarea simultană a acidului benzoic și a acidului sorbic în produsele alimentare prin CE după preconcentrarea on-line prin joncțiunea pH-ului dinamic, *Chromatographia* 73 (2011) 1217–1221.
6. Y. Tang, M. Wu. O metodă rapidă pentru determinarea simultană a acidului ascorbica și a acidului sorbic în sucurile de fructe prin electroforeză în zona capilară. *Talanta* 65 (2005) 794–798.
7. F. Han, Y.Z. El, L. Li, G.N. Fu, H.Y. Xie, W.E. Gan, Determinarea acidului benzoic și a acidului sorbic în produsele alimentare folosind analiza fluxului electrocinetic – extracția în fază solidă a perechii de ioni – electroforeza zonei capilare, *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 79-85.
8. I.C. Lopes, P.V.F. Santos, V.C. Diculescu, M. César, U. de Araújo, A.M. Oliveira-Brett, Acid sorbic și produșii săi de degradare: caracterizare electrochimică, *Anal. Lett.* 45 (2012) 408–417.
9. T. Ohtsuki, K. Sato, N. Sugimoto, H. Akiyama, Y. Kawamura, Analiza cantitativă absolută pentru acidul sorbic în alimente procesate folosind spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară de protoni, *Anal. Chim. Acta* 734 (2012) 54-61,
10. M Coros, S Pruneanu, RI Stefan-van Staden, Recent progress in the graphene-based electrochemical sensors and biosensors. Un revizuire. *J. Electrochim. Soc.* 167 (2020) 037528.
11. C Cioates-Negut, RI Stefan-van Staden, JF van Staden, Porphyrins – ca materiale active in proiectarea senzorilor. O imagine de ansamblu. *ECS J. Solid State Sci. Technol.* 9 (2020) 051005.

## Determinarea CA 15-3, CEA si HER2 in sange

### Rezumat

Doi microsenzori obținuți prin imobilizarea fizică a 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfină (TPP) și 5,10,15,20-tetrakis (clorură de pentafluorofenil)-21H,23H-fier (III) Porfirina (Fe(TPFPP)Cl) în nanopulbere de carbon decorată cu nanoparticule de aur (AuNp) a fost proiectată, caracterizată, validată și utilizată pentru recunoașterea moleculară și determinarea ultrasensibilă simultană a CEA, CA15-3 și HER2 în sângele integral. S-au înregistrat sensibilități mari pentru ambii microsenzori. Au fost înregistrate limite scăzute de cuantificare pentru toți biomarkerii CEA (12,8 pg mL<sup>-1</sup> prin utilizarea Fe(TPFPP)Cl/AuNp și 190fg mL<sup>-1</sup> prin utilizarea TPP/AuNp), CA 15-3 (100fU mL<sup>-1</sup> pentru ambii microsenzori. ) și HER2 (3,9 fg mL<sup>-1</sup> prin utilizarea Fe(TPFPP)Cl/AuNp și 35fg mL<sup>-1</sup> prin utilizarea TPP/AuNp). O corelație foarte bună între rezultatele obținute folosind microsenzorii propuși și ELISA certificată de testul t student a dovedit că testul de screening poate fi utilizat pentru analiza ultrasensibilă a celor trei biomarkeri din sângele integral.

### 1. Introducere

CA 15-3, CEA și HER-2 au un rol de biomarkeri de prognostic și pot facilita tratamentul personalizat pentru cancerul de sân. Cancerul de sân diagnosticat precoce, precum și prescrierea unui tratament personalizat pentru pacientul cu cancer de sân confirmat au un impact major asupra sănătății pacientului, precum și strâns legate de rezultatele testelor, screening rapid, fiabil și precis [1,2]. CA15-3 este utilă pentru depistarea precoce a recidivei tumorale la pacienții tratați anterior pentru cancer de sân în stadiul II și III, fără semne clinice de activitate a bolii. Determinarea combinată a CA 15-3 și CEA poate crește sensibilitatea detectării recidivante a tumorii [3]. Nivelurile de CA 15-3 și CEA în cancerul de sân s-au dovedit a fi biomarkeri sensibili pentru evaluarea pacienților cu cancer de sân [4]. Cancerele de sân HER2-pozitive tind să fie mai agresive decât cancerele de sân HER2-negative. Alături de gradul tumorii și stadiul cancerului, statutul HER2 ajută la determinarea opțiunilor de tratament [5].

În ceea ce privește testarea celor trei biomarkeri, ELISA (pe baza truselor de testare disponibile de la multe companii) rămâne metoda standard de alegere pentru testarea CA15-3, CEA și HER2, deși pentru HER2 metoda imunohistochimiei este preferată în special atunci când este determinată din țesutul tumoral. . Alte metode de analiză sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Cea mai recentă metodă propusă pentru testarea CA 15-3, CEA și HER2.

Table 1. The latest method proposed for the assay of CA 15-3, CEA, and HER2.

Biomarker	Tool	Linear concentration range	Limit of determination	Ref.
CEA	Immunosensor	0.01pg mL <sup>-1</sup> – 80.00ng mL <sup>-1</sup>	10fg mL <sup>-1</sup>	[6]
	Aptamer biosensor	1-30000 pg mL <sup>-1</sup>	1pg mL <sup>-1</sup>	[7]
	Graphene-based immunosensor	0.1 – 5.0ng mL <sup>-1</sup>	0.1ng mL <sup>-1</sup>	[8]
	Fe(TPFPP)Cl/AuNp	12.8pg mL <sup>-1</sup> - 20.0μg mL <sup>-1</sup>	12.8pg mL <sup>-1</sup>	This work
	TPP/AuNp	100fg mL <sup>-1</sup> - 1μg mL <sup>-1</sup>	100fg mL <sup>-1</sup>	This work
CA 15-3	Immunosensor	0.1fg mL <sup>-1</sup> – 1.0μg mL <sup>-1</sup>	0.1fg mL <sup>-1</sup>	[9]

	Quantum dots/electrochemiluminescence	10 $\mu$ U mL <sup>-1</sup> -500U mL <sup>-1</sup>	10 $\mu$ U mL <sup>-1</sup>	[10]
	Fluorescent biosensor	Up to 25.6 $\mu$ U mL <sup>-1</sup>	-	[11]
	Fe(TPFPP)Cl/AuNp	100nU mL <sup>-1</sup> - 1000U mL <sup>-1</sup>	100nU mL <sup>-1</sup>	This work
	TPP/AuNp	100nU mL <sup>-1</sup> - 1000U mL <sup>-1</sup>	100nU mL <sup>-1</sup>	This work
	Fiber-optic ball-tip resonator	3.7pg mL <sup>-1</sup> – 128.0ng mL <sup>-1</sup>	3.7pg mL <sup>-1</sup>	[12]
	Bifunctional carbon nanorods	Up to 900pg mL <sup>-1</sup>	7fg mL <sup>-1</sup>	[13]
HER2	Aptamer based colorimetric sensor	Up to 50.0pmol mL <sup>-1</sup>	9.8pmol mL <sup>-1</sup>	[14]
	Fe(TPFPP)Cl/AuNp	3.9fg mL <sup>-1</sup> - 30.0pg mL <sup>-1</sup>	3.9fg mL <sup>-1</sup>	This work
	TPP/AuNp	35fg mL <sup>-1</sup> - 39pg mL <sup>-1</sup>	35fg mL <sup>-1</sup>	This work

Importanța utilizării nanomaterialelor în analiza biomedicală a CA15-3 a fost arătată într-un articol de revizuire [15].

Prin urmare, această lucrare a propus doi noi microsenzori stocastici bazați pe nanopulbere de carbon (nC) modificată cu nanoparticule de aur (AuNp) și două porfirine: 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfină (TPP) și 5,10, 15,20-tetrakis (pentafluorofenil clorură)-21H,23H-fier (III) porfirina (Fe(TPFPP)Cl) pentru testarea simultană a CEA, CA15-3 și HER2, deoarece testul de screening se bazează pe simultan testul va oferi mai multe informații despre diagnosticul și tratamentul personalizat al cancerului de sân. Noutatea lucrării este, pe lângă noul design utilizat pentru microsenzorii stocastici propuși pentru testarea CEA, CA 15-3 și HER2, utilizarea unui singur instrument pentru analiza simultană a celor trei biomarkeri.

Utilizarea nanoparticulelor de aur va crește conductivitatea nanopulbei de carbon, în timp ce materialele porfirinice vor furniza canalele necesare (formate în agregatele moleculare) pentru detectarea stocastică [16]. Selecția tipului de senzor stocastic pentru analiza acestor molecule în sânge integral a fost făcută deoarece senzorii stocastici sunt capabili să efectueze în mod fiabil analiza calitativă și cantitativă a biomarkerilor din sângele integral [17-21]. Mecanismul de dezvoltare a curentului pentru senzorii stocastici se bazează pe conductivitatea canalului: molecula intră în canal și curentul scade la zero până când întreaga moleculă este în interiorul canalului - timpul necesar pentru a intra în canal depinde de dimensiune, volum, conformația, capacitatea de desfășurare (dacă este proteine) și viteza determinată de potențialul aplicat și este cunoscută ca semnătura moleculei atribuită ca valoare toff pe diagrame. În timpul canalului, au loc procese redox, într-un timp de echilibru numit ton pe diagrame; valoarea tonului se citește între două valori toff și depinde de concentrația moleculei în fluidul biologic, de unde este determinată molecula.

## 2. Materiale și metode

Toate substanțele chimice au fost de calitate analitică. Suspensia de nanoparticule de aur, CA15-3, CEA și HER2 au fost achiziționate de la Sigma Aldrich; iar uleiul de parafină a fost cumpărat de la Fluka. Pentru prepararea soluțiilor utilizate în experimente s-a folosit apă deionizată. Toate soluțiile CA15-3, CEA și HER2 au fost preparate în soluție tampon fosfat (PBS, pH=7,40). Când nu sunt utilizate, soluțiile au fost păstrate la o temperatură de -20°C.

Toate măsurătorile electrochimice au fost efectuate conectând un computer care avea software-ul GPES la un AUTOLAB/PGSTAT 302 N (Metrohm). Celula electrochimică cuprindea trei electrozi: electrodul de referință (Ag/AgCl), contraelectrodul (Pt) și

electrodul de lucru (microsenzorul stocastic). Toate măsurătorile au fost efectuate la 25°C. Pentru măsurarea valorilor ton și toff a fost utilizată o metodă cronoamperometrică, la un potențial constant (125 mV vs Ag/AgCl).

Pentru proiectarea microsenzorilor: 100 mg de nanopulbere de carbon au fost amestecate cu 10 μL suspensie de nanoparticule de aur și s-a adăugat ulei de parafină până când s-a obținut o pastă. Pasta a fost împărțită în două părți egale, iar pe fiecare s-au adăugat 50μL din una dintre următoarele porfirine: 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfină (TPP/AuNp) și 5,10,15,20 -tetrakis (clorura de pentafluorfenil)-21H,23H-fier (III) porfirina (Fe(TPFPP)Cl/AuNp). Sârma de argint a servit ca contact între pastă și circuitul extern. Fiecare pastă modificată a fost plasată într-un tub de plastic neconductor (imprimat 3D în laborator) cu diametrul interior de 10μm și lungimea de 5mm. Microsenzorii stocastici au fost spălați cu apă deionizată și uscați între măsurători. Când nu sunt folosite, acestea sunt păstrate într-un loc uscat.

Metoda stocastică a fost efectuată la 25°C. A fost utilizată o metodă cronoamperometrică pentru măsurătorile ton și toff la un potențial constant (125 mV vs Ag/AgCl). Pe baza valorii toff, analitul a fost identificat în diagramele înregistrate cu microsenzorii stocastici și în continuare valoarea tonei a fost citită și utilizată pentru determinarea concentrației fiecărui biomarker (Figura 1). Concentrațiile necunoscute de CA 15-3, CEA și HER2 în probele de sânge integral au fost determinate din ecuațiile de calibrare ( $1/\text{tonă} = a + b \times C_{\text{biomarker}}$ ) înregistrate cu fiecare dintre senzori pentru fiecare dintre biomarkeri.

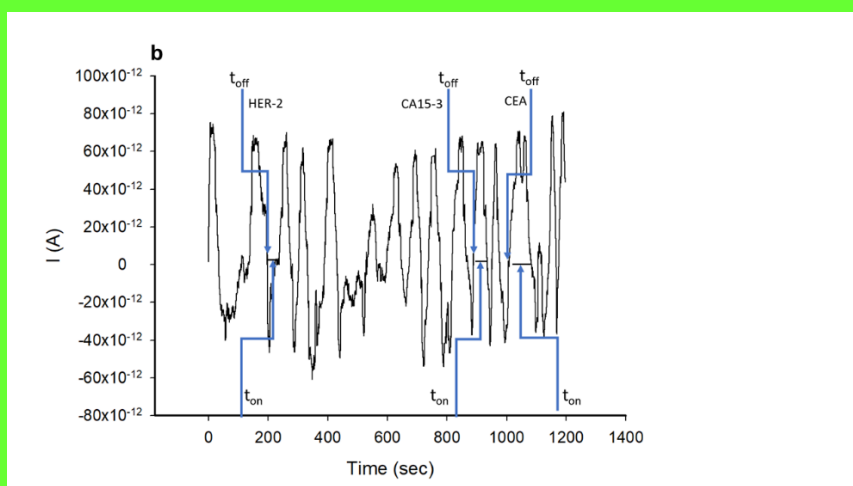


Figura 1. Recunoașterea modelului CA15-3, CEA și HER2 în probele de sânge integral, folosind microsenzori stocastici bazați pe: a) Fe(TPFPP)Cl/AuNp și (b) TPP/AuNp.

Probele de sânge integral au fost obținute de la Spitalul Universitar București (avizul comisiei de etică nr. 11/2013). Aceste probe au fost obținute de la pacienți confirmați cu cancer de sân. Probele biologice nu au necesitat nici un pretratament înainte de măsurători. Celula electrochimică a fost încărcată cu probă biologică, iar după înregistrarea diagramei și identificarea semnăturilor CA15-3, CEA și HER2, concentrațiile necunoscute ale biomarkerilor din sânge.

Table 1 Response characteristics of the stochastic sensors used for the assay of CA15-3, CEA, and HER 2.

Stochastic microsensor based on nC	Signature $t_{off}$ (s)	Linear concentration range	Calibration equations; correlation coefficient, $r^*$	Sensitivity	LOQ
Fe(TPFPP)Cl/AuN P	CA15-3*				
	4.7	$1.00 \times 10^{-7}$ - $1.00 \times 10^3$	$1/t_{on} = 0.03 + 5.80 \times 10^3 \times C$ $r=0.9998$	$5.80 \times 10^3$	$1.00 \times 10^{-7}$
	CEA**				
	0.6	$1.28 \times 10^{-5}$ - $2.00 \times 10^{-1}$	$1/t_{on} = 0.04 + 6.16 \times 10 \times C$ $r=0.9993$	$6.16 \times 10$	$1.28 \times 10^{-5}$
	HER 2**				
	2.6	$3.90 \times 10^{-9}$ - $3.90 \times 10^{-5}$	$1/t_{on} = 0.02 + 1.43 \times 10^5 \times C$ $r=0.9999$	$1.43 \times 10^5$	$3.90 \times 10^{-9}$
TPP/AuNp	CA15-3*				
	6.8	$1.00 \times 10^{-7}$ - $1.00 \times 10^3$	$1/t_{on} = 0.04 + 2.32 \times 10^3 \times C$ $r=0.9994$	$2.32 \times 10^3$	$1.00 \times 10^{-7}$
	CEA**				
	1.9	$1.00 \times 10^{-7}$ - 1.00	$1/t_{on} = 0.03 + 1.90 \times 10^4 \times C$ $r=0.9997$	$1.90 \times 10^4$	$1.00 \times 10^{-7}$
	HER 2**				
	1.3	$3.50 \times 10^{-8}$ - $3.90 \times 10^{-5}$	$1/t_{on} = 0.03 + 3.53 \times 10^4 \times C$ $r=0.9986$	$3.53 \times 10^4$	$3.50 \times 10^{-8}$

\*<C>= U mL<sup>-1</sup>; <t<sub>on</sub>>=s; <Sensitivity> = s<sup>-1</sup> U<sup>-1</sup> mL; \*\*<C>= µg mL<sup>-1</sup>; <t<sub>on</sub>>=s; <Sensitivity> = s<sup>-1</sup> µg<sup>-1</sup> mL; LOQ - limit of quantification

Toate intervalele de concentrație liniare sunt largi, făcând posibilă determinarea acestor biomarkeri în oricare dintre etapele cancerului de sân. Sensibilitatea sunt de asemenea foarte mari; sensibilități mai mari au fost înregistrate pentru testul CEA și HER2 atunci când a fost utilizat senzorul bazat pe TPP/AuNp. Comparând cu cei mai recenti senzori utilizați pentru testarea CA15-3, CEA și HER2 (Tabelul 1), se poate concluziona că senzorul bazat pe TPP/AuNp a prezentat cea mai inferioară limită de

determinare (ordine de mărime fg mL<sup>-1</sup>) și pentru testul HER2, senzorul bazat pe Fe(TPFPP)Cl/AuNp a prezentat limita inferioară de determinare. Pentru testarea CA15-3, deși limitele de determinare sunt mai mari decât cele raportate anterior [9-11], senzorii propuși pot fi utilizați pentru testarea CA15-3 fără nicio prelucrare a probei, intervalul de concentrație liniar acoperind pacienții cu cancer de sân în oricare dintre stadiile bolii. Avantajele senzorilor propuși față de cei prezentați în Tabelul 1, sunt, de asemenea, următoarele: pot efectua detectarea simultană a celor trei biomarkeri; nu este nevoie de eșantionare înainte de măsurători; analiza calitativă fiabilă a fiecărui biomarker, urmată imediat de analiza sa cantitativă.

### 3.2. Măsurători de stabilitate și reproductibilitate

Au fost proiectați 10 senzori stocastici din fiecare dintre cele două tipuri (TPP/AuNp și Fe(TPFPP)Cl/AuNp), iar măsurătorile au fost efectuate zilnic timp de o lună. Măsurătoarea pentru fiecare tip de senzor a demonstrat că nu există modificări semnificative ale sensibilității, variația acesteia fiind pentru fiecare tip mai mică de 0,12%; aceasta a dovedit reproductibilitatea designului fiecărui tip de senzor stocastic. După 30 de zile de măsurători, variația sensibilităților înregistrate pentru senzorul stocastic bazat pe TPP/AuNp a fost mai mică de 0,11%, în timp ce pentru senzorul stocastic bazat pe Fe(TPFPP)Cl/AuNp a fost mai mică de 0,08%; aceasta a dovedit că senzorii sunt stabili cel puțin o lună, când se efectuează măsurători zilnice.

### 3.3. Selectivitatea microsenzorilor stocastici

Selectivitatea microsenzorilor stocastici este dată de diferența dintre semnaturile (valorile toff) înregistrate pentru CA15-3, CEA și HER2 și cele obținute pentru alți biomarkeri/substanțe din probele biologice. Posibilele specii de interferență selectate au fost: p53, Ki67, maspin și CA19-9.

Table 3. Selectivitatea senzorilor stocastici.

Senzor stocastic bazat pe nC si	CA15-3, Semnatura (s)	CEA, Semnatura (s)	HER2, Semnatura (s)	Maspin, Semnatura (s)	Ki67, Semnatura (s)	CA19-9, Semnatura (s)	p53, Semnatura (s)
Fe(TPFPP)Cl/AuNp	4.7	0.6	2.6	2.0	1.3	3.0	3.5
TPP/AuNp	6.8	1.9	1.3	1.3	3.2	2.5	0.8

Rezultatele prezentate în Tabelul 3 au demonstrat că niciuna dintre presupusele specii interferente nu interferează cu analiza simultană a CA15-3, CEA și HER2.

### 3.4. Determinarea simultană ultrasensibilă a CA15-3, CEA și HER2 în sângele integral

Zece mostre de sânge integral de la pacienții confirmați cu cancer de sân au fost testate folosind cei doi microsenzori stocastici. Imediat după citirea valorilor toff, între două valori toff, au fost citite valorile tone corespunzătoare. Valorile tonelor au fost utilizate pentru a determina concentrațiile de CA15-3, CEA și HER2 în probele de sânge integral, în conformitate cu metoda stocastică descrisă mai sus. Rezultatele obținute după screening-ul probelor de sânge integral sunt prezentate în Tabelul 4.



S-au obținut corelații foarte bune între rezultatele obținute cu ajutorul celor doi microsenzori stocastici. Testul t pereche a fost, de asemenea, efectuat la un nivel de încredere de 99,00% (valoarea t teoretică tabelată: 4,032) pentru fiecare biomarker. Toate valorile t calculate au fost mai mici decât valoarea tabelată, demonstrând că nu există o diferență semnificativă statistic între rezultatele obținute folosind cei doi microsenzori stocastici și ELISA (metoda standard utilizată pentru analiza acestor biomarkeri în probele de sânge integral) (Tabelul 4). În consecință, microsenzorii stocastici propuși pot fi utilizați în mod fiabil pentru determinarea ultrasensibilă simulată a CA15-3, CEA și HER2 în probele de sânge integral.

Tabelul 4 Determinarea CA15-3, CEA și HER2 din sânge.

Sample no	U mL <sup>-1</sup> , CA 15-3			ng mL <sup>-1</sup> , CEA			pg mL <sup>-1</sup> , HER 2		
	Stochastic microsensors based on								
	Fe(TPFPP)Cl/ AuNp	TPP/AuNp	ELISA	Fe(TPFPP)Cl/ AuNp	TPP/AuNp	ELISA	Fe(TPFPP)Cl/ AuNp	TPP/AuNp	ELISA
1	448.09±0.03	447.52±0.02	450.00±0.12	24.00±0.05	23.18±0.02	24.00±0.12	64.43±0.02	64.40±0.05	63.00±0.17
2	448.12±0.03	449.49±0.05	443.00±0.17	7.18±0.05	7.21±0.03	7.30±0.10	4.96±0.02	4.90±0.03	4.87±0.12
3	206.55±0.05	205.30±0.03	204.00±0.14	17.87±0.04	17.98±0.03	17.00±0.12	61.97±0.04	62.03±0.05	60.00±0.10
4	265.72±0.03	269.13±0.04	260.00±0.12	17.15±0.04	17.78±0.02	16.98±0.13	64.39±0.03	64.22±0.02	64.00±0.11
5	398.64±0.03	398.78±0.02	392.00±0.14	11.80±0.03	11.85±0.03	11.23±0.14	40.94±0.02	39.14±0.05	38.40±0.12
6	448.10±0.03	428.15±0.08	440.10±0.12	13.90±0.04	13.96±0.02	13.15±0.11	33.01±0.02	32.25±0.03	33.10±0.14
7	220.87±0.03	223.15±0.04	221.00±0.15	3.20±0.02	3.19±0.03	3.00±0.14	18.04±0.02	18.00±0.03	17.45±0.13
8	563.86±0.07	569.43±0.03	560.0±0.11	11.14±0.02	11.85±0.03	12.00±0.11	3.36±0.04	3.76±0.05	3.12±0.02
9	303.88±0.04	304.20±0.03	300.00±0.15	12.00±0.03	11.79±0.02	11.50±0.14	27.97±0.03	28.03±0.05	25.50±0.12
10	111.35±0.03	118.40±0.05	115.20±0.14	8.50±0.02	8.43±0.03	8.50±0.12	28.51±0.03	28.28±0.02	27.50±0.11
t-test	2.13	2.21	-	2.61	2.29	-	2.41	2.38	-

## 5. Concluzii

Microsenzorii stocastici propuși au fost utilizați pentru testarea simultană a CA15-3, CEA și HER2 în probe de sânge integral. Intervalele lor liniare de concentrare de lucru au acoperit pacienții cu cancer de sân în orice stadiu al bolii, determinările fiind efectuate cu sensibilitate ridicată. Testul de screening bazat pe utilizarea celor doi microsenzori ca instrumente de screening poate fi utilizat pentru depistarea precoce a cancerului de sân, pentru determinarea necesității unui tratament personalizat, precum și pentru determinarea eficienței tratamentului pentru cancerul de sân.

## Referințe

1. Lau, K.H.; Tan, A.M.; Shi, Y. Terapii țintite noi și emergente pentru cancerul de sân avansat. *Int.J.Mol.Sci.* 2022, 23, 2288.
2. Maitra, D.; Srivastava, A. Markerii tumorali, factori de prognostic și predictiv în cancerul de sân. *Breast Cancer* 2022, 549, 221-241.
3. Jo, Y.; Lee, J.H.; Cho, E.S.; Lee, H.S.; Shin, S.J.; Park, E.J.; Baik, S.H.; Lee, K.Y.; Kang, J. Semnificația clinică a modificării antigenului carcinoembrionar precoce la pacienții cu cancer colorectal nemetastatic. *Front.Oncol.* 2022, 12, 739614.
4. Hoyes, D.F.; Zurawski, Jr. V.R.; Kufe, D.W. Comparația nivelurilor circulante de CA15-3 și antigen carcinoembrionar la pacienții cu cancer de sân. *J.Clin.Oncol.*, 1986, 4, 1542-1550.
5. Zhang, H.; Katerji, H.; Turner, B.M.; Hicks, D.G. HER2-cancer de sân scăzut. *Am.J.Clin.Pathol.* 2022, 157, 328-336.
6. Liao, X.; Wang, X.; Zhang, M.; Mei, L.; Chen, S.; Qi, Y.; Hong, C. Un imunosenzor bazat pe un ciclu redox avansat electrochimic-chimic-chimic, strategie de amplificare pentru determinarea ultrasensibilă a CEA. *Anal.Chim.Acta* 2021, 1170, 338647.
7. Zhang, K.; Pei, M.; Chen, Y.; Zhang, Z.; Niu, C.; Liu, X.; Liu, J.; Guo, F.; Huang, H.; Lin, X. Un nou biosenzor electrochimic aptamer bazat pe nanostructuri ADN tetraedrice și asamblare catalitică a acelor de păr pentru detectarea CEA. *J.Electroanal.Chem.* 2021, 898, 115635.
8. Jozghorbani, M.; Fathi, M.; Kazemi, S.H.; Alinejadian, N. Determinarea antigenului carcinoembrionar ca marker tumoral folosind un nou imunosenzor electrochimic fără etichete pe bază de grafen. *Anal.Biochim.* 2021, 613, 114017.
9. Martins, T.S.; Bott-Neto, J.L.; Oliveira, Jr. O.N.; Machado, S.A.S. Un imunosenzor electrochimic de tip sandwich bazat pe compozit Au-rGO pentru detectarea markerului tumoral CA15-3. *Microchim. Acta* 2022, 189, 38.
10. Asbaghian-Namin, H.; Karami, P.; Naghshara, H.; Gholamin, D.; Johari-Ahar, M. Imunotest electrochemiluminescent pentru determinarea CA15-3 și CA72-4 utilizând nanocompozit de oxid de grafen modificat cu puncte cuantice CdSe și complex Ru(bpy)<sub>3</sub>. *Microchim. Acta* 2021, 188, 238.
11. Wu, Y.; Chen, X.; Wang, X.; Yang, M.; Xu, F.; Hou, C.; Huo, D. Un biosenzor fluorescent bazat pe cadre prismatice goale din metal-polidopamină și 6-carboxifluoresceină (FAM) - aptamer proteic marcat pentru detectarea CA 15-3. *Sens.Actuators B* 2021, 329, 129249.
12. Sypabekova, M.; Amantajeva, A.; Vangelista, L.; Gonzalez-Vila, A.; Caucheteur, C.; Tosi, D. Limita ultra-scăzută de detectare a biomarkerului HER2 solubil în ser cu un rezonator cu vârf de bilă din fibră optică. *ACS Mens.Sci.Au* 2022, <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00008>
13. Guerrero-Esteban, T.; Gutierrez-Sanchez, C.; Garcia-Mendiola, T.; Revenga-Parra, M.; Pariente, F. Nanorods bifuncționale de carbon pentru determinarea HER2 extrem de sensibilă pe baza electrochimiluminiscentei. *Sens.Actuators B* 2021, 343, 130096.
14. Ranganathan, V.; Srinivasan, S.; Singh, A.; DeRosa, M.C. Un test colorimetric al fluxului lateral pe bază de aptamer pentru detectarea receptorului 2 al factorului de creștere epidermică uman (HER2). *Anal.Biochim.* 2020, 588, 113471.
15. Oktaviyanti, I.K.; Ali, D.S.; Awadh, S.A.; Opuencia, M.J.C.; Yusupov, S.; Dias, R.; Alsaikhan, F.; Mohammed, M.M.; Sharma, H.; Mustafa, Y.F.; Saleh, M.M. Progrese recente în aplicațiile sistemelor de imunodectie bazate pe nanomateriale pentru detectarea biomarkerilor de cancer de sân CA15-3. *Anal.Bioanal.Chem.* 2022, <http://doi.org/10.1007/s00216-022-04150-z>

16. Sabuzi, F.; Stefanelli, M.; Monti, D.; Conte, V.; Galloni, P. Agregate porfirine amfifile: o investigație DFT. *Molecule* 2019, 25, 133.
17. Stefan-van Staden, R.I.; Comnea-Stancu, I.R.; Surdu-Bob, C.C.; Badulescu, M. Materialele nanostructurate detectează receptorul factorului de creștere epidermic, enolaza neuron specifică și antigenul carcinoembrionar. *Nanoscale* 2015, 7, 15689-15694.
18. Stefan-van Staden, R.I.; Gheorghe, D.C.; Ilie-Mihai, R.M.; Barbu-Tudoran, L.; Pruneanu, S.M. Biosenzori stocastici bazați pe grafen dopat cu N și S pentru enantioanaliza acidului aspartic din probele biologice. *RSC Adv.*, 2021,11, 23301-23309.
19. Ilie-Mihai, R.M.; Gheorghe, D.C.; Stefan-van Staden, R.I.; Lungu-Moscalu, A.; Pruneanu, S.M.; van Staden, J.F. Metoda de screening rapidă a probelor biologice bazată pe senzori stocastici cu ac pentru depistarea precoce a cancerului gastric. *Rev de Chimie*, 2021, 72, 22-34.
20. Stefan-van Staden, R.I.; Gheorghe, S.S.; Ilie-Mihai, R.M.; Badulescu, M. Senzor Stochastic de unica folosinta bazat pe depunerea unui nanstrat de argint pe matase pentru recunoasterea moleculara a biomarkerilor specifici. *J. Electrochim. Soc.* 2021, 168, 037515.
21. Stefan-van Staden, R.I.; Boga, I.M.; Ilie-Mihai, R.M.; Gheorghe, D.C.; Coros, Pruneanu, S.M. Microsenzori stocastici bazați pe grafen modificat pentru recunoașterea modelului maspin în probele biologice. *Anal. Bioanal. Chim.* 2022, 414, 3667-3673.

## Determinarea metabisulfitului de sodiu din alimente

### Rezumat

Beneficiul principal al utilizării sulfiților ca aditiv alimentar este proprietățile lor antimicrobiene și antioxidante, care împiedică creșterea ciupercilor și bacteriilor într-o varietate de alimente. Aplicarea metodelor analitice este necesară pentru a asigura controlul calității alimentelor legat de prezența sulfiților într-o varietate de alimente. Pentru detectarea metabisulfitului de sodiu în probele de alimente și urină, doi senzori pe bază de oxid de grafen redus dopat cu pastă de Pd și modificat cu 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfină și 5,10,15,20- S-au propus tetrakis (clorură de pentafluorfenil)-21H,23H-fier (III) porfirina. Noii senzori au fost evaluați și caracterizați folosind voltametrie cu undă pătrată. Caracteristicile de răspuns au arătat că limitele de detecție pentru senzori au fost  $3,0 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup> pentru TPP/rGO@Pd0 și  $3,0 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> pentru senzorii bazați pe Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0, în timp ce limitele de cuantificare au fost  $1,0 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> pentru TPP/rGO@Pd0 și  $1,0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> pentru senzorii bazați pe Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0. Senzorii pot fi utilizați pentru a determina metabisulfitul de sodiu într-un interval de concentrație cuprins între  $1,0 \times 10^{-11}$  și  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> pentru senzorul bazat pe TPP/rGO@Pd0 și între  $1,0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> și  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> pentru senzorul bazat pe Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0.

## 1. Introducere

Aditivii alimentari au devenit din ce în ce mai importanți în industria alimentară modernă ca urmare a schimbărilor în stilul de viață uman și a cerințelor nutriționale ulterioare [1,2]. Este o practică obișnuită să se folosească conservanți alimentari atunci când se depozitează alimente pentru perioade lungi de timp pentru a preveni alterarea din cauza creșterii microbiene sau fungice sau a modificărilor chimice neintenționate [3]. Nu este clar ce efecte toxice și mecanismele de acțiune au aceste substanțe chimice, în ciuda utilizării lor pe scară largă în industria alimentară. Noi cercetări sugerează o legătură între consumul excesiv de anumiți aditivi alimentari și o serie de boli umane [4]. Preocupările legate de siguranța alimentelor și posibilele pericole ale aditivilor alimentari au crescut ca răspuns la această problemă de-a lungul anilor. Metabisulfitul de sodiu (SMB), un conservant comun în industria alimentară, s-a dovedit a avea efecte neurotoxice și crește indicatorii de deteriorare a țesuturilor în studiile in vivo cu animale [5].

În multe produse alimentare, în special fructe, legume, fructe de mare, produse de patiserie și băuturi alcoolice, SMB, cunoscut și sub numele de piro-sulfat de sodiu ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), este un aditiv alimentar sintetic care este utilizat ca un antioxidant și conservant antibacterian [6,7]. În plus, este utilizat ca excipient în sectorul farmaceutic pentru a crește stabilitatea principiilor active [8]. S-a demonstrat că dozele orale mari de SMB cresc indicii de deteriorare celulară și pot avea efecte genotoxice asupra țesuturilor de șoarece, conform rapoartelor anterioare [9]. În plus, studii suplimentare in vivo au arătat că nivelurile ridicate de SMB pot provoca apoptoză și peroxidarea lipidelor în țesutul stomacal de șobolan [10]. Numeroase domenii, inclusiv farmacologia, analiza mediului, știința alimentației, cinetica enzimatică și diagnosticul medical, au beneficiat de utilizarea metodelor și senzorilor analitici bazați pe electrochimie [11-13]. Crearea de senzori electrochimici bazați pe nanomateriale este un domeniu activ de cercetare care se anticipează că va produce tehnologii de ultimă oră pentru menținerea integrității alimentelor care vor înlocui metodele actuale. Oxidul de grafen redus (rGO) este un material unic care poate fi utilizat pentru crearea de senzori electroanalitici (rGO). Similar cu nanofile de grafen, rGO este compus din câteva straturi de atomi de carbon  $\text{sp}^2$  și prezintă o structură bidimensională singulară. Acest sistem pi-conjugat are ca rezultat o mobilitate ridicată a electronilor și un transfer rapid de sarcină, ceea ce face vizibil un efect electro-catalitic [14]. Conform studiilor [15, 16] electrozii pe bază de grafen sunt mai activi electrocatalitic și mai conductivi decât alți pe bază de carbon. materiale. Numeroase studii [17] au arătat că adăugarea de nanoparticule de metal nobile la grafen poate îmbunătăți activitatea electrocatalitică a materialului [18–20]. Datorită proprietății sale electrocatalitice excelente, nanoparticulele de paladiu (Pd), în special, au fost investigate pe larg pentru determinarea diferiților analiți [21]. Pentru reacțiile chimice, în special cele care implică transferul de electroni, porfirinele [22, 23] și metaloporfirinele sunt bine cunoscute pentru proprietățile lor electrocatalitice [24, 25].

Ca urmare, studiul actual demonstrează dezvoltarea și validarea unei metode simple de cuantificare a metabisulfidului de sodiu în alimente și probe biologice. Această metodă a fost demonstrată în prăjituri, fulgi de fasole, pastă de hrean și probe de urină ca dovadă de concept.

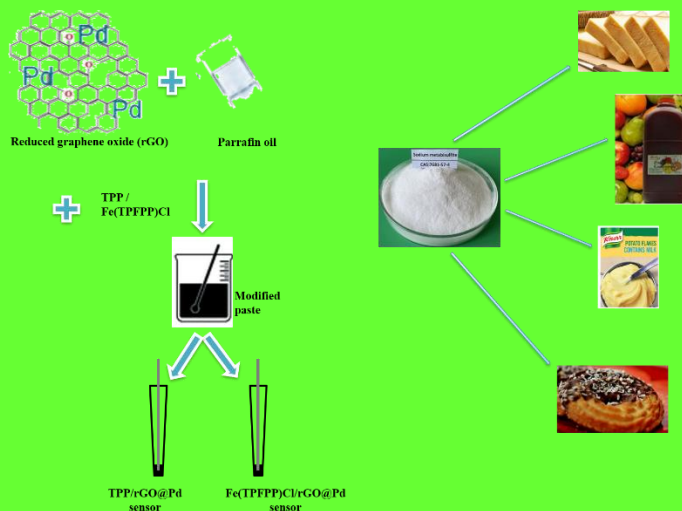
## 2. Materiale și metode

Metabisulfid de sodiu, 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23Hporfină (TPP), 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil)-21H,23H-porfirina clorură de fier(III) (Fe(TPFPP)Cl) Fosfat monosodic, fosfat disodic, acesulfam K, zaharoză, glucoză, benzoat de sodiu, d-sorbitol, sulfat de fier heptahidrat, maltodextrină, azotat de sodiu și clorură de amoniu au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich și ulei de parafină (d420, 0,86 g cm<sup>-3</sup>) a fost achiziționat de la Fluka (Buchs, Suedia). Oxidul de grafen redus dopat cu Pd(0)(rGO@Pd0) a fost achiziționat de la NanoInnova Technologies. Soluția tampon de fosfat (PBS, 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a fost preparată prin amestecarea soluțiilor de fosfat monosodic și fosfat disodic. pH-ul soluției tampon a fost ajustat folosind cantități diferite de soluții de NaOH sau HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> pentru a obține valori diferite ale pH-ului (2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0 și 8,0) . Soluția stoc de 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> metabisulfid de sodiu a fost preparată proaspătă, înainte de măsurători, în apă deionizată.

Folosind un mini potențostat EmSTAT Pico (software PsTrace 5.9 PalmSens) conectat la un laptop pentru achiziția de date, au fost efectuate măsurători pentru voltametrie ciclică (CV), voltametrie cu undă pătrată (SWV) și spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS).

Toate experimentele electrochimice au fost efectuate la temperatura camerei. Electrocul de pastă de nanografen modificat, Ag/AgCl (0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl) și firul Pt au fost folosiți ca electrozi de lucru, de referință și, respectiv, auxiliari, scufundați într-o celulă electrochimică, pentru înregistrarea rezultatelor. A fost folosit un pH-metru Mettler Toledo pentru a regla pH-ul. O cantitate de 100 mg de oxid de grafen redus dopat cu paladiu a fost amestecată cu ulei de parafină până când s-a obținut o pastă omogenă. Pastele modificate (Schema 1) au fost preparate prin adăugarea a 25  $\mu$ L dintr-o soluție de 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfină (1,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> în tetrahidrofuran) și 25  $\mu$ L dintr-o soluție de 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil)-21H,23H-porfirina clorură de fier(III) (1,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> în tetrahidrofuran) la pasta goală. Sensorii TPP/rGO@Pd0 și, respectiv, Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0 au fost obținuți prin introducerea pastelor în tuburi de plastic neconductive (diametru interior 25 mm) în care un fir de argint introdus în pastă a servit ca contact electric între pasta și circuitul extern.

Senzorii noi dezvoltați au fost utilizați pentru a detecta Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> în trei tipuri de mostre de alimente (cookie, fulgi de fasole și pastă de hrean) cumpărate de la un supermarket din România și, de asemenea, o probă biologică, obținută de la un voluntar sănătos. Probele au fost diluate în PBS pH=4,5, într-un raport 1:1 (v/v) și apoi adăugate cu diferite concentrații de metabisulfid de sodiu.



**Schema 1.** Proiectarea senzorilor electrochimici modificați

### 3. Results

#### 3.1. Caracterizarea electrochimică a senzorilor

CV, EIS și SWV au fost utilizate ca tehnici de caracterizare pentru senzorul gol, oxid de grafen redus simplu dopat cu paladiu ( $rGO@Pd$ ) și cei doi senzori modificați: oxid de grafen redus dopat cu paladiu pe baza de 5,10,15,20- tetrafenil-21H,23H-porfina (TPP/ $rGO@Pd$ ) și pe bază de 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil)-21H,23H-porfirina clorură de fier(III) ( $Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd$ ). Pentru a analiza răspunsul chimic al senzorilor, a fost utilizată voltametria ciliară (Figura 1). CV-urile (Fig. 1a)) au fost efectuate folosind  $rGO@Pd$ , TPP/ $rGO@Pd$  și  $Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd$ , ca electrozi de lucru într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} K_3[Fe(CN)_6]$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1} KCl$ ) la potențiale între  $-0,6 \text{ V}$  și  $1,0 \text{ V}$ . Este evident că conductivitatea senzorului a crescut după ce electrodul rGO a fost modificat cu TPP și  $Fe(TPFPP)Cl$ . Una dintre motivele conductivității crescute este dată de funcția porfirinelor ca modificador. Datorită structurii lor unice, porfirina poate avea capacitatea de a controla reacțiile redox pe care le mediază analiții țintă. Prin urmare, a arătat că modificarea a fost făcută și că răspunsul electrochimic a fost îmbunătățit. Studiul EIS a fost efectuat pentru a investiga interfața senzorilor pe un spectru de frecvență cuprins între  $1,0 \times 10^5$  și  $1,0 \times 10^{-1} \text{ Hz}$ . Fiecare dintre măsurătorile EIS a fost efectuată într-o soluție care a conținut  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} K_3[Fe(CN)_6]$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1} KCl$ ). Fig. 1b) prezintă diagrame Nyquist. Fig. 1b) demonstrează că la frecvențe joase, unde rezistența electrică este mare ( $R_{ct} = 2,61 \times 10^5 \Omega$ ),  $rGO@Pd$  a prezentat un semicerc mare, bine definit. Diametrul semicercului sa micșorat ( $R_{ct} = 7,16 \times 10^4 \Omega$ ) după ce  $rGO@Pd$  a fost modificat cu TPP. Senzorul gol care a fost modificat cu  $Fe(TPFPP)Cl$  a prezentat ulterior un semicerc chiar mai mic ( $R_{ct} = 1,71 \times 10^4 \Omega$ ). În concluzie, în comparație cu electrodul de pastă de grafen nemodificat, senzorii care au fost tratați cu TPP și  $Fe(TPFPP)Cl$  a prezentat un semicerc mai mic și o valoare  $R_{ct}$  mai mare. Rezultatele EIS pentru o soluție de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L } K_3[Fe(CN)_6]$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1} KCl$ ) au arătat o concordanță bună cu rezultatele CV. Pentru

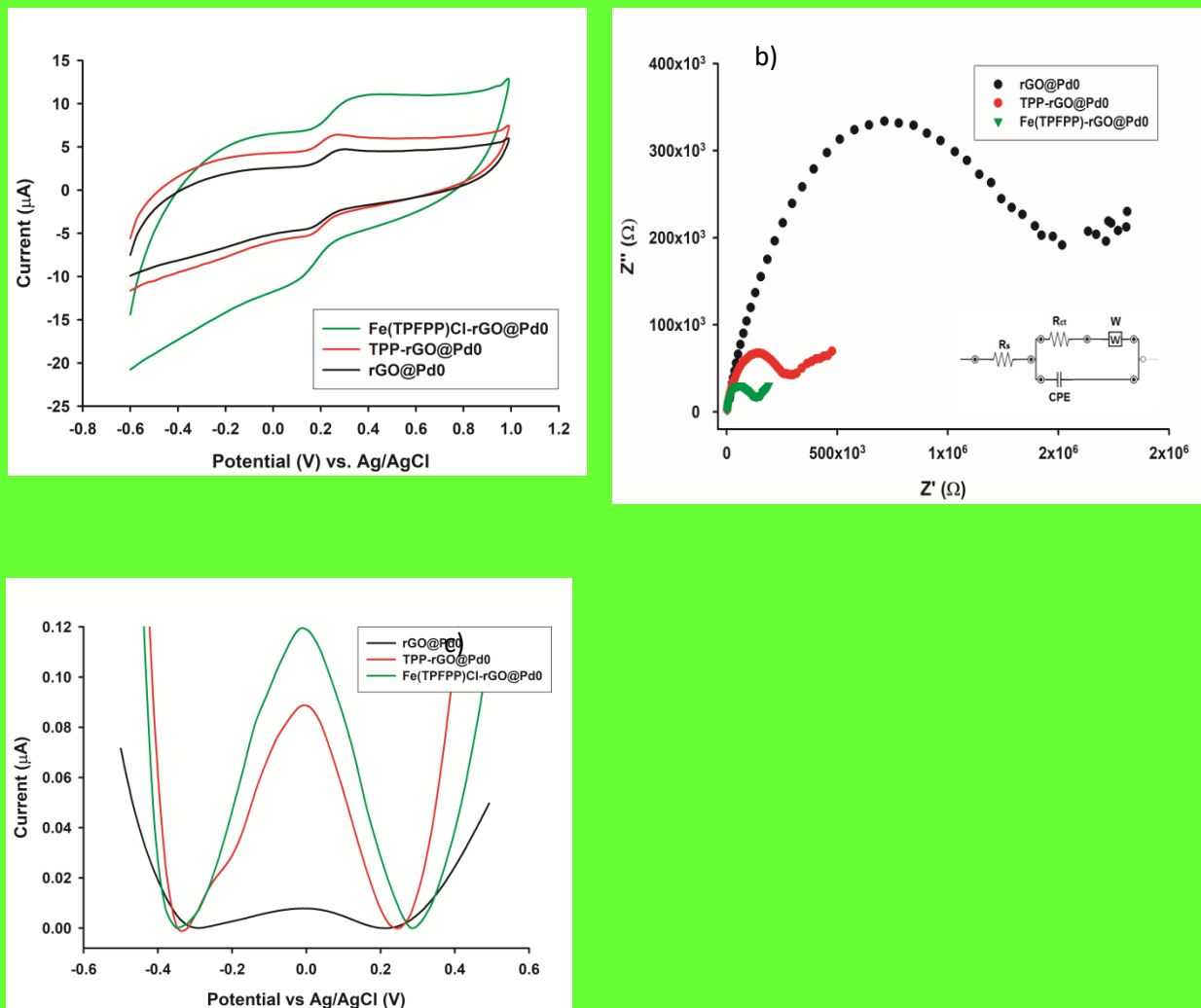
a compara comportamentul electrochimic dintre cei trei electrozi, senzorul gol și cei doi senzori modificați, o soluție care conține  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> metabisulfid de sodiu tamponat cu PBS la pH 4,5 a fost analizată folosind o metodă SWV. Din fig. 1c) se poate observa că, dintre cei trei senzori, senzorii Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0 și TPP/rGO@Pd0 au dat cele mai bune rezultate pentru oxidarea metabisulfidului de sodiu. După caracterizare și testare ulterioară, cei doi senzori au fost evaluați pentru capacitatea lor de a determina electrochimic prezența Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> în probe de prăjitură, fulgi de cartofi, pastă de hrean și urină.

Calculul suprafeței electroactive a celor patru senzori a fost realizat cu ajutorul ecuației Randles-Sevcik [26] pentru procese cvasi-reversibile. Acest lucru a permis investigarea activității electrocatalitice a senzorilor. Ecuația pentru intensitatea de vârf a curentului poate fi rezumată după cum urmează:

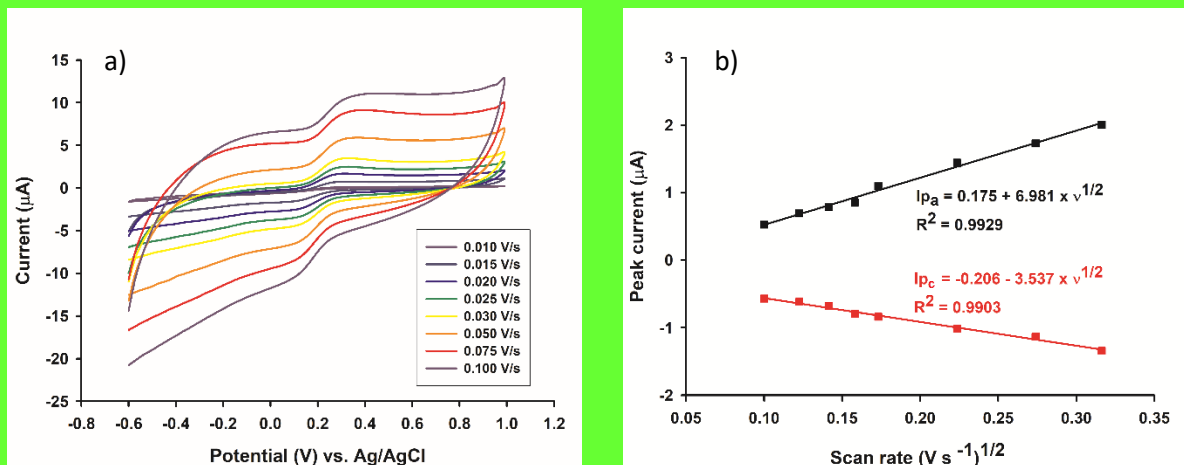
$$I_{p_a} = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D_R^{1/2} \nu^{1/2}$$

unde:  $I_{p_a}$  – curent de vârf anodic (A),  $n$  – numărul de electroni transferați (în acest caz,  $n = 1$ ),  $A$  – aria suprafeței active a electrozului (cm<sup>2</sup>),  $C_0$  – concentrația de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (mol cm<sup>-3</sup>),  $D_R$  – coeficient de difuzie ( $7,60 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) și  $\nu$  – rata de scanare (V s<sup>-1</sup>). Experimentul a fost efectuat într-o soluție care conținea  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] și 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl. Faptul că vârfurile anodice și catodice,  $I_{p_a}$  și  $I_{p_c}$ , au arătat o dependență liniară de rădăcina pătrată a ratei de scanare (Fig. 2 și 3) în ciuda faptului că viteza de scanare a fost variată de la 0,010 la 0,100 V s<sup>-1</sup> oferă dovezi că procesul redox a fost controlat prin difuzie. Figura. 2a) și 3a) ilustrează modelul care apare pe măsură ce rata de scanare și intensitatea curentului continuă să crească în timp. Figura. 2b) și 3b) ilustrează dependențele liniare ale celor două vârfuri,  $I_{p_a}$  vs.  $\nu^{1/2}$  și respectiv  $I_{p_c}$  vs.  $\nu^{1/2}$ . Prin comparație, senzorul bazat pe Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0 prezintă cea mai mare activitate activă sunt (0,019 cm<sup>2</sup>) lângă celălalt senzor modificat TPP/rGO@Pd0 (0,0095cm<sup>2</sup>) și în comparație cu senzorul nemodificat rGO@Pd0 (0,0009cm<sup>2</sup>).

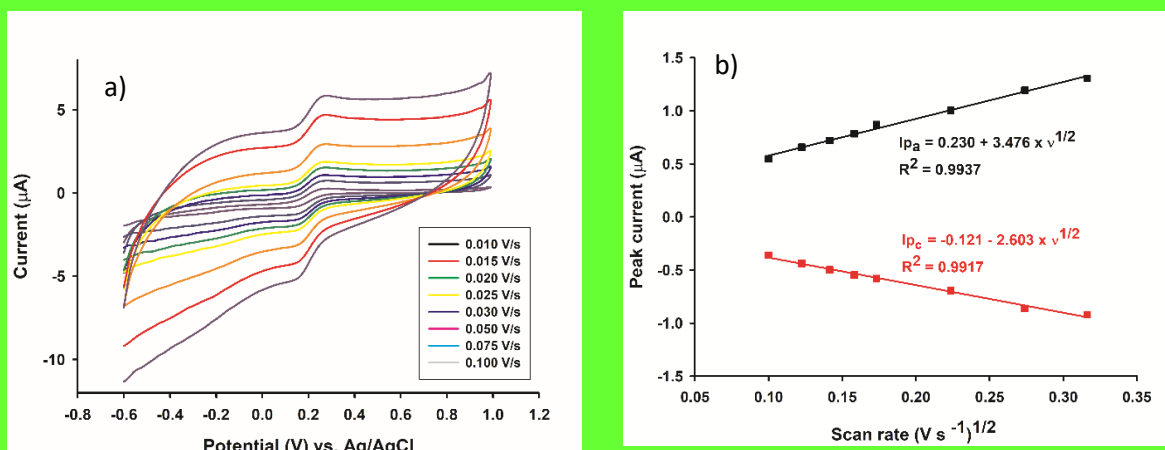




**Figura 1. a)** Voltamograme ciclice ale curentului trasat în funcție de potențial (condiții de lucru: potențial de treaptă 0,025V; rata de scanare 0,1 V s<sup>-1</sup>) într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl) folosind rGO@Pd0 (linia neagră), TPP/ rGO@Pd0 (linia roșie) și Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0 (linia verde). **(b)** Spectrele de impedanță electrochimică înregistrate pentru rGO@Pd0 (linia neagră), TPP/ rGO@Pd0 (linia roșie) și Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0 (linia verde) într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl) (condiții: interval de frecvență între  $1,0 \times 10^5$  și  $1,0 \times 10^{-1}$  Hz). Inset: schema circuitului echivalent a interfeței electrochimice utilizată pentru a se potrivi spectrelor de impedanță unde R<sub>s</sub> este rezistența soluției, CPE este elementul de fază constantă, R<sub>ct</sub> este rezistența de transfer de electroni și W este rezistența la difuzie Warburg. **(c)** Voltamogramele cu unde pătrate înregistrate în PBS pH 4,5 care conțin  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> pentru rGO@Pd0 (linia neagră), TPP/ rGO@Pd0 (linia roșie) și Fe(TPFPP)Cl/ rGO@Pd0 (linia verde); condiții de lucru: potențial de treaptă 0,03 V, amplitudine: 0,1 V, frecvență : 10 Hz.



**Figura 2. a)** Voltamograme ciclice într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl) la diferite viteze de scanare de la 0,010 la 0,100 V s<sup>-1</sup> folosind Senzor Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0 (condiții de lucru: interval de potențial de la -0,6 la 1,0 V; potențial de treaptă 0,025 V). **(b)** Dependența curentului de vârf de rădăcina pătrată a ratei de scanare, folosind senzorul Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0

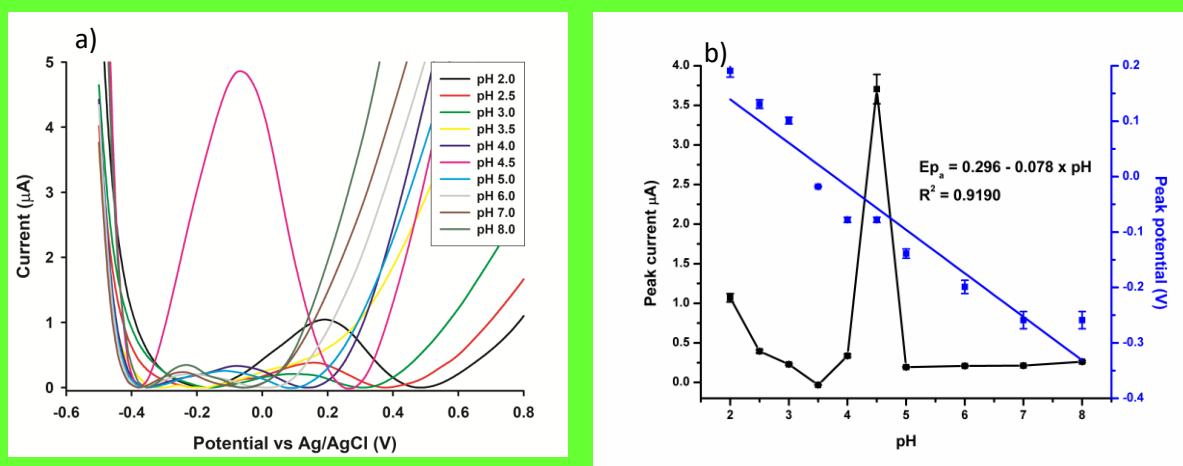


**Figura 3. a)** Voltamograme ciclice într-o soluție de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl) la diferite viteze de scanare de la 0,010 la 0,100 V s<sup>-1</sup> folosind Senzor TPP/rGO@Pd0 (condiții de lucru: interval de potențial de la -0,6 la 1,0 V; potențial de treaptă 0,025 V). **(b)** Dependența curentului de vârf de rădăcina pătrată a ratei de scanare, folosind senzorul TPP/rGO@Pd0

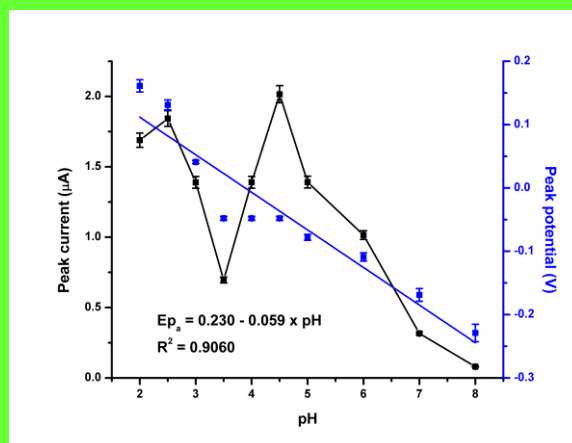
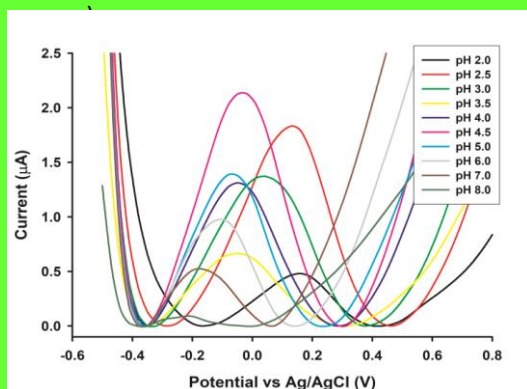
### 3.2. Influența valorii pH-ului asupra comportamentului electrochimic al senzorilor

Atunci când se efectuează măsurători electrochimice (Fig. 4a) și 5a)), este absolut necesar să se țină seama de nivelul pH-ului soluției, prin urmare o soluție de metabisulfid de sodiu  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  a fost tamponată cu PBS cu valori diferite de pH (2,0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0 și 8.0). Din Fig. 4b) se poate observa că, în cazul senzorului TPP/rGO@Pd0, are loc o ușoară creștere a curentului în jurul pH-ului 2,0, urmată de o scădere la pH 3,5, atingând o valoare maximă a curentului la pH. 4,5, urmat de

un platou de la pH=5-8. Când vine vorba de senzorul Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0 (Fig 5b)) se poate observa că la pH=2,5 se obține o creștere mare a curentului, urmată de scăderea valorii curentului. La pH=4,5 se realizează o valoare maximă a curentului, continuată de o reducere finală a valorii curentului la pH=8. După cum se demonstrează în ambele figuri, cea mai mare intensitate de curent a metabisulfidului de sodiu a fost observată când pH-ul a fost de 4,5 când au fost utilizați ambii senzori. Corelația dintre valorile pH-ului și potențialul de vârf ( $E_{pa}$ ) este prezentată în Fig. 4b) și 5b). O observație bună poate fi făcută cu privire la ecuația din Fig. 4b) când a fost utilizat senzorul TPP/rGO@Pd0, unde se poate observa că valoarea pantei obținute este  $-0,078 \text{ V pH}^{-1}$  care este apropiată de valoarea teoretică nernstiană a  $0,059 \text{ V pH}^{-1}$ , afirmând că numărul de protoni implicați în procesul de oxidare este egal cu cantitatea de electroni care sunt prezenți în proces. Pe de altă parte, Fig. 5b) oferă un rezultat interesant al ecuației,  $E_{pa} \text{ (V)} = 0,230 - 0,059 \text{ pH}$ , cu un coeficient de regresie ( $R^2$ ) de 0,9060 obținut pentru Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0, unde panta valoarea de  $0,059 \text{ V pH}^{-1}$ , este aceeași cu valoarea teoretică nernstiană de  $0,059 \text{ V pH}^{-1}$ , demonstrând astfel că numărul de protoni și electroni implicați în procesul de oxidare este egal.



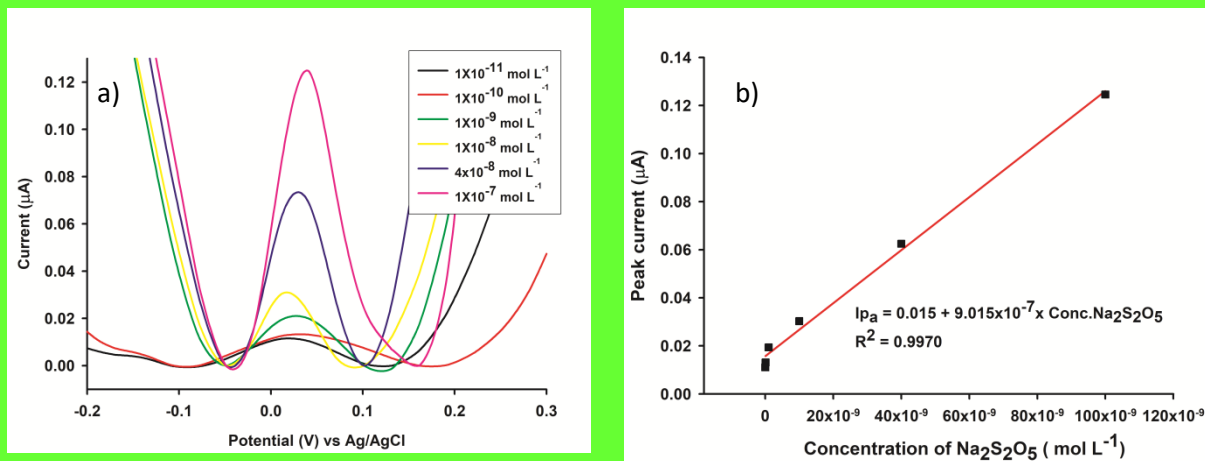
**Figura 4.** (a) Voltamograme cu undă pătrată de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  utilizând senzorul TPP/rGO@Pd0 în PBS la valori pH 2,0 – 8,0. (b) Efectul pH-ului asupra curentului de vârf (puncte negre) și dependența liniară a potențialului de vârf cu pH-ul (linia albastră)



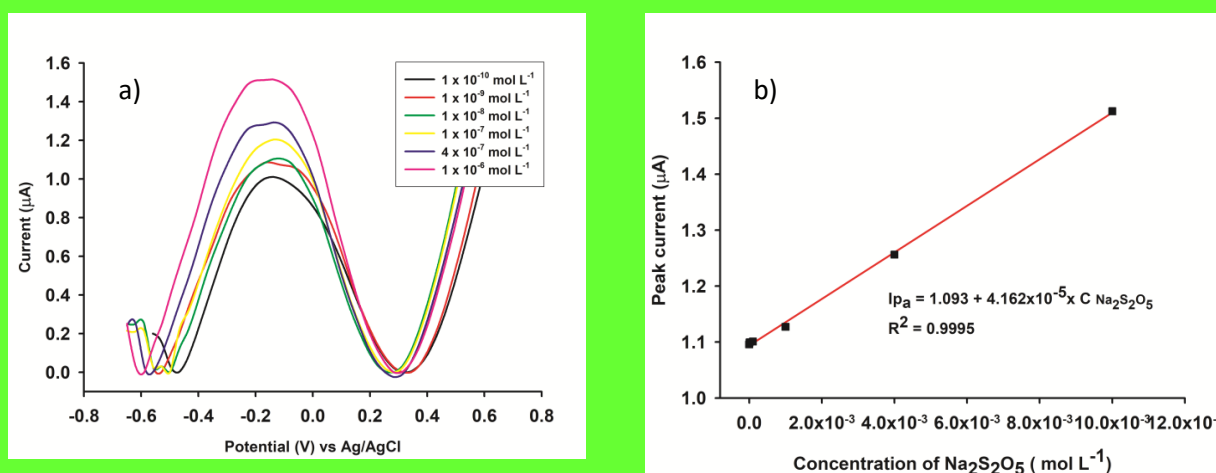
**Figura 5.** (a) Voltamograme cu undă pătrată de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> utilizând senzorul Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0 în PBS la valori pH 2,0 – 8,0. (b) Efectul pH-ului asupra curentului de vârf (puncte negre) și dependența liniară a potențialului de vârf cu pH-ul (linia albastră)

### 3.3 Caracteristicile de răspuns ale senzorilor electrochimici

La nivelul ideal de pH (pH=4,5), caracteristicile de răspuns ale senzorilor electrochimici propuși au fost identificate folosind voltametrie cu undă pătrată și sunt enumerate în Tabelul 1. O gamă largă de concentrații, sensibilități mari și limite scăzute de cuantificare și determinare pentru cele propuse. senzorii au fost obținuți datorită condițiilor optime de lucru și capacității electrocatalitice a porfirinelor utilizate în proiectarea lor. Graficul de calibrare pentru metabisulfid de sodiu este prezentat în Fig. 6b) împreună cu vârfurile care au fost obținute în timpul calibrării TPP/rGO@Pd0 senzor. Intervalul de concentrație liniar a fost de la  $1,0 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> la  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> cu un coeficient de corelație de 0,9970. LOD și LOQ au fost calculate a fi  $3,0 \times 10^{-12}$  și  $1,0 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup>, respectiv. Valorile LOD și LOQ după cum urmează: LOD = 3 s/m și LOQ = 10 s/m; unde s este abaterea standard a curentului de vârf al semifabricatului (4 măsurători) și m reprezintă panta curbei de calibrare. Sensibilitatea senzorului TPP/rGO@Pd0 a fost de  $9,015 \times 10^{-7}$  mA/mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 6. (a)** Voltamograme cu unde pătrate înregistrate cu senzorul TPP/rGO@Pd0 în PBS pH 4,5 care conțin diferite concentrații de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> de la  $1,0 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> la  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. **(b)** Curba de calibrare obținută cu senzorul TPP/rGO@Pd0 de la  $1,0 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> la  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Condiții de lucru: potențial de treapta 0,03 V, amplitudine: 0,1 V, frecvența: 10 Hz.



**Figura 7. (a)** Voltamograme cu unde pătrate înregistrate cu senzor Fe(TPFPP)Cl /rGO@Pd0 în PBS pH 4,5 care conține diferite concentrații de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> de la  $1,0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> la  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, **(b)** Curba de calibrare obținută cu senzorul Fe(TPFPP)Cl /rGO@Pd0 de la  $1,0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> la  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Condiții de lucru: potențial de treapta 0,03 V, amplitudine: 0,1 V, frecvența: 10 Hz.

În ceea ce privește senzorul Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0, Fig. 7b) prezintă vârfulurile dobândite după măsurătorile de calibrare, în plus față de graficul de calibrare a metabisulfidului de sodiu. Pentru calculul LOD și LOQ au fost utilizate formulele menționate mai sus. Prin urmare, s-au obținut rezultate foarte bune: intervalul de concentrație liniar de la  $1,0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> la  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, valori LOD și LOQ calculate a fi  $3,0 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup> și  $1,0 \times 10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>, un coeficient de corelație mult superior de 0,9995 și o sensibilitate de  $4,162 \times 10^{-5}$  mA/mol L<sup>-1</sup>.

**Tabelul 1.** Caracteristicile de răspuns ale senzorilor electrochimici utilizați pentru detectarea metabisulfitului de sodiu.

Parametru	Senzori electrochimici	
	TPP/rGO@Pd0	Fe(TPFPP)Cl/ rGO@Pd0
Ecuția de calibrare*	$I_{pa}=0.02+9.02 \times 10^{-7} \times C_{Na_2S_2O_5}$ $R^2=0.9970$	$I_{pa}=1.09+4.16 \times 10^{-5} \times C_{Na_2S_2O_5}$ $R^2=0.9995$
Interval liniar de concentrație (mol L <sup>-1</sup> )	$1.0 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-7}$	$1.0 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-6}$
Sensibilitate (mA mol L <sup>-1</sup> )	$9.02 \times 10^{-7}$	$4.16 \times 10^{-5}$
Limita de detectare (mol L <sup>-1</sup> )	$3.0 \times 10^{-12}$	$3.0 \times 10^{-11}$
Limita de cuantificare (mol L <sup>-1</sup> )	$1.0 \times 10^{-11}$	$1.0 \times 10^{-10}$
Repetabilitate a curentului de vârf (%, RSD)	2.78	2.75

Sarea anorganică a metabisulfitului de sodiu al acidului sulfuric (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) se dizolvă în apă pentru a produce ioni de sodiu, bisulfit și sulfit[27]:  $Na_2S_2O_5 + H_2O = 2Na^+ + 2HSO_3^-$  și  $HSO_3^- = H^+ + SO_3^{2-}$ . Anionii de bisulfit sunt transformați în sulfat. anioni când este prezent oxigen:  $2HSO_3^- + O_2 = 2H^+ + 2SO_4^{2-}$ .

#### 3.4. Studii de interferență ale senzorilor electrochimici

Pentru a testa interferențe potențiale în detectarea metabisulfitului de sodiu, au fost testați o serie de ioni, inclusiv NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> și specii organice, inclusiv acesulfam K, zaharoză, glucoză, benzoat de sodiu, d-sorbitol și maltodextrină. Substanțele găsite frecvent la prăjituri cu metabisulfiteină de sodiu, fulgi de fasole și pasta de hrean și probe de urină au fost alese drept substanțe potențiale interferente. Concentrația maximă de interferență care a dus la o modificare a intensității curentului în ceea ce privește eroarea relativă (nivel de acceptare de 5%), părtinire. (%), iar semnalul schimbat (%) a fost denumit limită de toleranță. Toate măsurătorile au fost efectuate folosind soluții de metabisulfit de sodiu ( $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) tamponate cu PBS la un pH de 4,5. Rezultatele experimentale când TPP Senzorul /rGO@Pd0 a fost

utilizat, nu a prezentat nicio influență asupra detectării metabisulfidului de sodiu atunci când un exces de 10 ori de ion NH<sub>4</sub>, de 25 de ori benzoat de sodiu, de 50 de ori glucoză și zaharoză și de 100 de ori Fe<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> i s-au adăugat acesulfam K, d-sorbitol și maltodextrină (Tabelul 2), ceea ce indică faptul că senzorul propus a prezentat o selectivitate bună la determinarea Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

**Tabelul 2.** Influența unor posibile specii interferente asupra detectării  $1,0 \times 10^{-8}$  metabisulfid de sodiu (n=4) utilizând senzorul TPP/rGO@Pd0.

Possible interfering species	Concentration of possible interfering species (mol L <sup>-1</sup> )	Tolerance limit	Relative error (%)	Bias (%)
Fe <sup>2+</sup>	$1.0 \times 10^{-7}$	10	0.20	-1.83
Na <sup>+</sup>	$1.0 \times 10^{-7}$	10	1.33	-7.33
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	$1.0 \times 10^{-7}$	10	-0.35	0.15
Glucose	$1.0 \times 10^{-7}$	10	0.74	0.45
Sucrose	$2.5 \times 10^{-7}$	25	1.50	2.04
Sodium benzoate	$5.0 \times 10^{-7}$	50	1.10	0.73
Acesulfam K	$1.0 \times 10^{-6}$	100	-2.25	2.68
D-Sorbitol	$1.0 \times 10^{-6}$	100	-0.62	1.29
MD	$1.0 \times 10^{-6}$	100	-2.41	2.15

În cazul celui de-al doilea senzor, senzorul Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0, rezultatele indicate în tabelul 3 arată că un exces adăugat de 10 ori de ioni NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> și glucoză, de 25 de ori zaharoză, 50 de ori benzoat de sodiu și 100 de ori acesulfam K, d-sorbitol și maltodextrină nu manifestă nicio influență asupra detectării metabisulfidului de sodiu, demonstrând, de asemenea, că senzorul are o selectivitate bună la determinarea Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Deoarece porfirinele și complexele metalice (inclusiv Fe(III)) cu porfirine imită activitatea enzimelor, rezultă că acestea promovează selectiv oxidarea metabisulfidului de sodiu.



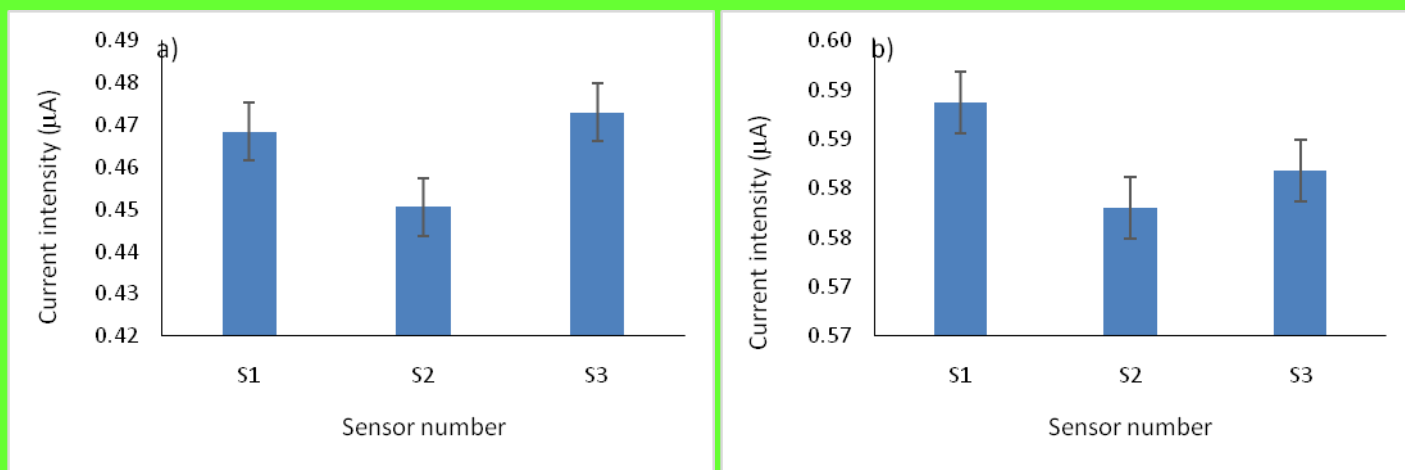
Enzimele artificiale TPP și Fe(TPFPP)Cl acționează ca electrocatalizatori într-un proces care nu este un substrat- reacție de legare. Deoarece porfirinele sunt imitații de enzime, utilizarea lor ca enzime artificiale în electrochimie a fost investigată în detaliu [28–31].

**Tabelul 3.** Influența unor posibile specii interferente asupra detectării  $1,0 \times 10^{-8}$  metabisulfid de sodiu (n=4) folosind senzorul Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0.

Possible interfering species	Concentration of possible interfering species (mol L <sup>-1</sup> )	of Tolerance limit	Relative error (%)	Bias (%)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	$1.0 \times 10^{-7}$	10	-1.80	-3.76
Sodium benzoate	$2.5 \times 10^{-7}$	25	0.35	-0.36
Glucose	$5.0 \times 10^{-7}$	50	-2.30	2.65
Sucrose	$5.0 \times 10^{-7}$	50	0.49	-1.74
Fe <sup>2+</sup>	$1.0 \times 10^{-6}$	100	-4.68	5.89
Na <sup>+</sup>	$1.0 \times 10^{-6}$	100	1.45	-2.35
Acesulfam K	$1.0 \times 10^{-6}$	100	-1.94	2.37
D-Sorbitol	$1.0 \times 10^{-6}$	100	-0.83	4.97
MD	$1.0 \times 10^{-6}$	100	-0.05	2.03

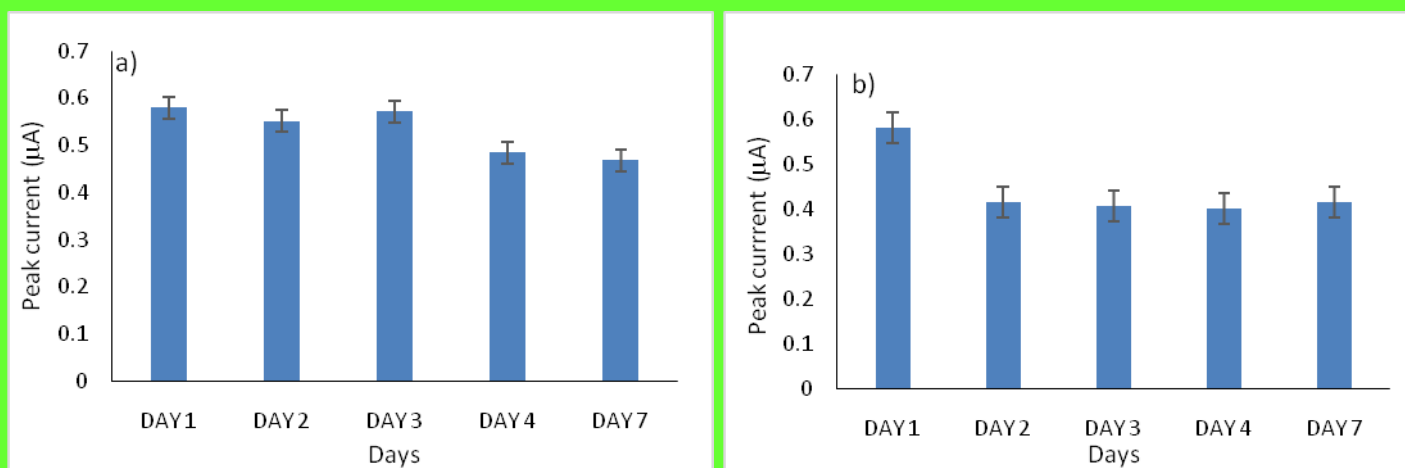
### 3.5. Reproducibilitate, repetabilitate și stabilitate

Repetabilitatea, reproductibilitatea și stabilitatea senzorilor dezvoltăți (TPP/rGO@Pd0 și Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0) au fost investigate folosind o soluție de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ( $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) în PBS pH 4,5, în condițiile experimentale optime de către SWV. Reproducibilitatea a fost analizată folosind trei senzori noi de fiecare tip, care au fost pregătiți în același mod. Abaterea standard relativă (RSD%) a fost calculată a fi 2,55 % (n = 5) pentru senzorul TPP/rGO@Pd0 și 0,94% (n = 5) pentru senzorul Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0.



**Figura 8.** Reproducibilitatea a) TPP/ rGO@Pd0 și b) Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0

Pentru repetabilitatea în intervalul zilei, repetabilitatea a fost determinată a fi 1,54% ( $n = 5$ ) pentru senzorul TPP/rGO@Pd0 și 0,97% ( $n = 5$ ) pentru senzorul Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0. Stabilitatea senzorilor a fost examinată timp de 7 zile. Electrozii modificați au fost ținuți la temperatura camerei pe toată durata examinării stabilității. După 7 zile, în cazul senzorului TPP/ rGO@Pd0, intensitatea curentului Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ( $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) a scăzut la o valoare de 80,70% din valoarea inițială din prima zi de evaluare. ; iar în cazul Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0, curentul de vârf a scăzut până la o valoare de 71,59% față de valoarea inițială din prima zi de evaluare.



**Figura 9.** Stabilitatea senzorilor a) TPP/rGO@Pd0 și Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0 pentru o perioadă de 7 zile.

### 3.6. Determinarea metabisulfidului de sodiu în probe alimentare și biologice

Pentru ca senzorii propuși să fie utilizați mai pe scară largă în monitorizarea calității alimentelor și menținerea securității alimentare, aceștia trebuie validați. Senzorii au fost validați folosind metoda standard de adăugare pentru a arăta cât de precise sunt la măsurarea metabisulfidului de sodiu în prăjituri,

fasole, fulgi, pastă de hrean și probe de urină. După cum se poate observa în tabelele 4 și 5, testul de metabisulfid de sodiu în prăjituri, fulgi de fasole, pastă de hrean și probe de urină are un grad foarte ridicat de fiabilitate.

Pentru prepararea probei, s-au adăugat zece mililitri de PBS (pH = 4,5) la 1 g de prăjitură, fulgi de fasole. Amestecul rezultat a fost agitat timp de 4 minute și lăsat în baie cu ultrasunete timp de 30 de minute. Un gram de probă de pastă de hrean a fost cântărit folosind o balanță analitică și a fost dizolvat în 10 ml de PBS (pH = 4,5) și agitat timp de 4 minute. Proba de urină a fost diluată cu PBS pH= 4,5 într-un raport de 1:1 (v/v) și apoi adăugată cu diferite concentrații de metabisulfid de sodiu.

După introducerea probelor în celula electrochimică, a fost măsurat curentul de vârf. Concentrațiile de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> și valorile obținute au fost introduse în ecuația de calibrare de mai sus. Tabelele 4 și 5 rezumă valorile de recuperare, RSD și părtinire (%).

**Tabelul 4.** Determinarea metabisulfidului de sodiu din alimente și probe biologice folosind senzorul TPP/rGO@Pd0.

Samples	Amount added (mol L <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	Amount found (mol L <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	Recovery (%)	RSD (%)	Bias (%)
	-	$4.41 \times 10^{-9}$	-	1.30	-
Cookie	$1.0 \times 10^{-7}$	$9.98 \times 10^{-8}$	99.83	0.05	0.17
	$1.0 \times 10^{-8}$	$9.87 \times 10^{-9}$	98.68	0.24	1.34
	-	$3.45 \times 10^{-8}$	-	0.47	-
Bean flakes	$1.0 \times 10^{-7}$	$9.97 \times 10^{-8}$	99.73	0.57	0.27
	$1.0 \times 10^{-8}$	$1.00 \times 10^{-8}$	99.96	1.21	0.04
	-	$6.92 \times 10^{-8}$	-	0.52	-
Horseradish paste	$1.0 \times 10^{-7}$	$9.99 \times 10^{-8}$	99.87	0.80	0.13
	$1.0 \times 10^{-8}$	$1.00 \times 10^{-8}$	99.97	0.86	0.03
	-	-	-	3.78	-
Urine	$1.0 \times 10^{-7}$	$9.78 \times 10^{-8}$	97.82	4.50	2.23
	$1.0 \times 10^{-8}$	$9.97 \times 10^{-9}$	99.73	2.16	0.27

**Tabelul 5.** Determinarea metabisulfitului de sodiu în probele alimentare și biologice folosind senzorul Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0.

Samples	Amount added (mol L <sup>-1</sup> )	Amount found (mol L <sup>-1</sup> ) 1)	Recovery (%)	RSD (%)	Bias (%)
	-	$1.06 \times 10^{-8}$	-	1.31	-
Cookie	$1.0 \times 10^{-7}$	$9.93 \times 10^{-8}$	99.32	2.22	0.67
	$1.0 \times 10^{-8}$	$9.99 \times 10^{-9}$	99.98	4.48	0.01
	-	$8.44 \times 10^{-7}$	-	4.03	-
Bean flakes	$1.0 \times 10^{-7}$	$9.99 \times 10^{-8}$	99.98	1.29	0.01
	$1.0 \times 10^{-8}$	$9.99 \times 10^{-9}$	99.98	3.45	0.01
	-	$9.87 \times 10^{-9}$	-	2.92	-
Horseradish paste	$1.0 \times 10^{-7}$	$9.95 \times 10^{-8}$	99.54	1.86	0.46
	$1.0 \times 10^{-8}$	$9.71 \times 10^{-9}$	97.11	4.54	2.98
	-	-	-	5.94	-
Urine	$1.0 \times 10^{-7}$	$9.99 \times 10^{-8}$	99.95	0.21	0.05
	$1.0 \times 10^{-8}$	$9.99 \times 10^{-9}$	99.93	1.04	0.06

Din Tabelul 4 se poate observa că s-au obținut valori foarte bune de recuperare, atunci când a fost utilizat senzorul TPP/rGO@Pd0. Pentru probele de alimente, recuperările au avut valori ridicate, cu mult peste 99%, cu o singură excepție, pentru concentrația de metabisulfit de sodiu ( $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) de biscuiți cu vârfuri, valorile de recuperare au fost foarte apropiate de 99%. De asemenea, proba de urină a prezentat valori de recuperare peste 99,9%. Valorile RSD pentru probe au fost între  $0,05 \pm 4,50$ . În cazul senzorului Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0, din Tabelul 5 se poate observa că recuperările atât în probele alimentare, cât și în urină sunt peste 97%, cu valori RSD variind de la 0,21 la 5,94. Prin urmare, dat fiind faptul că rezultatele prezentate în tabelele 4 și 5 au valori foarte bune, se poate susține că ambii senzori, TPP/rGO@Pd0 și Fe(TPFPP)Cl/rGO@Pd0 au demonstrat că sunt capabili să ofere o creștere atât în sensibilitatea cât și în selectivitatea testului pentru metabisulfit de sodiu în probele alimentare și biologice.

## 5. Concluzii

Nanomaterialele sunt un nou instrument promițător pentru îmbunătățirea siguranței alimentelor și monitorizarea controlului calității, iar utilizarea lor în tehnologie va deschide cu siguranță calea pentru crearea unor senzori electrochimici și mai sensibili. Prin urmare, prezentul studiu prezintă doi senzori electrochimici, bazați pe oxid de grafen redus dopat cu pastă de Pd și modificat cu 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfina și 5,10,15,20-tetrakis (clorură de pentafluorofenil). Porfirina )-21H,23H-fier (III) a fost proiectată, caracterizată, testată și validată pentru determinarea metabisulfidului de sodiu în trei probe diferite de alimente și o probă biologică. Ambii senzori au arătat niveluri foarte ridicate de stabilitate, selectivitate, sensibilitate și reproductibilitate în măsurătorile lor. Senzorii propuși au avantajul de a putea fi utilizați în industria alimentară în scopul controlului calității alimentelor în raport cu determinarea cantității de metabisulfid de sodiu prezent în probe.

Contribuții autor: Conceptualizare, J.F.v.S. și R.-M.I.-M.; metodologie, J.F.v.S și R.-M.I.-M.; validare, R.-M.I.-M. și B.C.I.; ancheta, R.-M.I.-M. și B.C.I.; scris—revizuire și editare, J.F.v.S. și R.-M.I.-M.; supraveghere, J.F.v.S.; finanțare achiziție, J.F.v.S. Toți autorii au citit și au fost de acord cu versiunea publicată a manuscrisului.

## Referințe

22. Martins, F.C.O.L.; Sentanin, M. A.; De Souza, D. Metode analitice în determinarea aditivilor alimentari: Compuși cu aplicații funcționale. *Food Chim.* 2019, 272, 732–750.
23. Zhong, Y.; Wu, L.; Chen, X.; Huang, Z.; Hu, W. Efectele informațiilor despre aditivi alimentari asupra dorinței consumatorilor de a accepta alimente cu aditivi. *Int. J. Environ. Sanatate Res.* 2018, 15, 2394.
24. Leyva Salas, M.; Mounier, J.; Valence, F.; Coton, M.; Thierry, A.; Coton, E. Agenți microbieni antifungici pentru bioconservarea alimentelor-O revizuire. *Microorganismes* 2017, 5, 37.
25. Mephram, B. Aditivi alimentari: o evaluare etică. *Br. Med. Taur.* 2011, 99, 7–23.
26. Lai, M.C.; Hung, T.Y.; Lin, K.M.; Sung, P.S.; Wu, S.J.; Yang, C.S.; Wu, Y.J.; Tsai, J.J.; Wu, S.N.; Huang, C.W. Metabisulfid de sodiu: Efecte asupra curenților ionici și a excitotoxicității. *Neurotox. Res.* 2018, 34, 1–15.
27. Ahmadi, F.; Lee, Y. H.; Lee, W. H.; Oh, Y. K.; Park, K. K.; Kwak, W. S. Conservarea deșeurilor de fructe și legume cu metabisulfid de sodiu. *J. Environ. Administra.* 2018, 224, 113–121.

28. Vieira, H. H.; Toledo, J. C. Jr.; Catelan, A.; Gouveia, T. H. N.; Aguiar, F. H. B.; Lovadino, J. R.; Lima, D. A. N. L. Efectul gelului de metabisulfit de sodiu asupra rezistenței de legare a dentinei dinților albiți. *EURO. J. Dent.* 2018, 12, 163–170.
29. Trivedi, H. K. O metodă de indicare a stabilității pentru determinarea bisulfitului de sodiu antioxidant în formularea farmaceutică prin tehnica RP-HPLC. *Sci. Farmacia.* 2011, 79, 909–920.
30. Carvalho, I. M.; Melo Cavalcante, A. A.; Dantas, A. F.; Pereira, D. L.; Costa Rocha, F. C.; Andrade, T. J.; Da Silva, J. Genotoxicitatea metabisulfitului de sodiu în țesuturile de șoarece evaluate prin testul cometei și testul micronucleului. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Mediu. Mutagen.* 2011, 720, 58–61.
31. Ercan, S.; Ozturk, N.; Celik-Ozenci, C.; Gungor, N. E.; Yargicoglu, P. Metabisulfitul de sodiu induce peroxidarea lipidelor și apoptoza în țesutul gastric de șobolan. *Toxicol. Ind. Health* 2010, 26, 425–431.
32. Toh, H. S.; Tschulik, K.; Batchelor-McAuley, C.; Compton, R. G. Cuantificarea electrochimică a ionilor de iodură în urina sintetică folosind nanoparticule de argint: o dovadă de concept, *Analyst* 2014, 139, 3986-3990.
33. Guan, P.; Li, Y.; Zhang, J.; Li, W. Biosenzor non-enzimatic de glucoză bazat pe nanoparticule de CeO<sub>2</sub> decorate cu CuO. *Nanomateriale* 2016, 6, 159.
34. Favero, G.; Fusco, G.; Mazzei, F.; Tasca, F.; Antiochia, R. Caracterizarea electrochimică a electrozilor serigrafiați cu grafen și MWCNT modificați cu AuNP-uri pentru dezvoltarea biosenzorului de lacază. *Nanomaterials* 2015, 5, 1995-2006.
35. Du, X.; Skachko, I.; Barker, A., Andrei, E.Y. Se apropie de transport balistic în grafen suspendat. *Nat. Nanotehnologia.* 2008, 3, 491–495.
36. Wang, Y.; Li, Y.; Tang, L., Lu, J.; Li, J. Aplicarea electrozilor modificați cu grafen pentru detectarea selectivă a dopaminei. *Electrochimie. comun.* 2009, 11, 889-892.
37. Alwarappan, S.; Erdem, A.; Liu, C.; Li, C.-Z. Testarea proprietăților electrochimice ale nanofoilor de grafen pentru aplicații de biosensing. *J. Fiz. Chim. C.* 2009, 113, 8853-8857.
38. Niculae, A.-R.; Stefan-van Staden, R.-I.; van Staden, J.F.; Georgescu State, R. Senzori electrochimici pe bază de grafen dopați cu sulf pentru determinarea rapidă și sensibilă a (R)-(+)-limonenului din băuturi. *Senzori* 2022, 22, 5851.
39. Palanisamy, S.; Ku, S.; Chen, S.M. Senzor de dopamină bazat pe un electrod de carbon sticlos modificat cu un compozit redus de oxid de grafen și nanoparticule de paladiu. *Microchim. Acta* 2013, 180, 1037-1042.

40. Zhou, H.; Liu, Y.; Chi, W.; Yu, C.; Yu, Y. Prepararea și proprietățile antibacteriene ale nanocompozitului Ag@ polidopamină/oxid de grafen. *Appl. Surf. Sci.* 2013, 282, 181-185.
41. Fu, L.; Yu, A. Electroanaliza dopaminei utilizând nanocompozite reduse de oxid de grafen-paladiu, *Nanosci. Nanotehnologia. Lett.* 2015, 7, 147-151.
42. Chen, Z. H.; Jie, J. S.; Luo, L. B.; Wang, H.; Lee, C. S.; Lee, S. T. Aplicații ale nanofirelor de siliciu funcționalizate cu nanoparticule de paladiu în senzori de hidrogen, *Nanotechnology*, 2007, 18, 345502.
43. Comnea-Stancu, I.R.; van Staden, J.K.F.; Stefan-van Staden, R.-I. Detectarea facilă a naftalenei cu un electrod de pastă de oxid de grafen regenerabil 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)-21H,23H-porfină nichel (II)/N-(1-naftil) etilendiamină diclorhidrat. *J. Electrochim. Soc.* 2022, 169, 037527.
44. Cioates Negut, C.; Stefan-van Staden, R.-I.; Sfirloaga, P. Simultaneous Molecular Recognition of Interleukins 2 and 4, and of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Biological Samples. *Electroanalysis* 2022, <https://doi.org/10.1002/elan.202200305>.
45. Bedioui, F.; Griveau, S.; Nyokong, T.; Appleby, A.J.; Caro, C.A.; Gulppi, M.; Ochoae, G.; Zagal, J.H. Reglarea proprietăților redox ale electrozilor moleculari pe bază de metaloporfirine și metaloftalocianine pentru cea mai mare activitate electrocatalitică în oxidarea tiolilor. *Fiz. Chim. Chim. Fiz.* 2007, 9, 3383–3396.
46. Georgescu State, R.; van Staden, J.K.F.; Stat, R.N.; Papa, F. Determinarea electrochimică rapidă și sensibilă a tartrazinei în probe alimentare comerciale folosind electrodul de pastă de carbon modificat compozit IL/AuTiO<sub>2</sub>/GO. *Food Chim.* 2022, 385, 132616.
47. Zanello, P. *Electrochimie anorganică: Teorie, practică și aplicare* RSC Publishing, 2003.
48. Shabliy, T.; Gomelya, M.; Pohrebennyk, V.; Ivanenko, O.; Nosachova, Y. Dezvoltarea de noi sisteme de dezoxidare a apei pentru centrale termice și electrice. *J. Ecol. Ing.* 2022, 23, 193–205.
49. Elemans, J.A.A.W.; Nolte, R.J.M. Compuși de cușcă de porfirine pe bază de glicouril - De la imitații de enzime la mașini moleculare funcționale. *Chim. Commun.* 2019, 55, 9590–9605.
50. Zamborlini, G.; Jugovac, M.; Cossaro, A.; Verdini, A.; Floreano, L.; Lüftner, D.; Puschnig, P.; Feyer, V.; Schneider, C.M. Porfirina de nichel la suprafață imită centrul reactiv al unui cofactor enzimatic. *Chim. comun.* 2018, 95, 13423–13426.
51. Aghayan, M.; Mahmoudi, A.; Nazari, K.; Dehghanpour, S.; Sohrabi, S.; Sazegar, M.R.; Mohammadian-Tabrizi, N. Fe(III) porfirina metalo-organică cadru ca o enzimă artificială mimează și aplicarea acesteia în biosensing de glucoză și H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Poros Mat.* 2019, 26, 1507–1521.



52. Anderson, H.L.; Sanders, J.K.M. Imită enzimelor bazate pe oligomeri ciclici de porfirină: strategie, proiectare și sinteză exploratorie. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1995, 18, 2223–2229.

**Etapa 3 Dispozitive de proces platforme de detectie mici, rapide, inteligente, interactive  
in timp real, portabile pentru monitorizarea automata a datelor intensive ale  
procesului, controlul si managementul sistemului.**

**Cateva din rezultatele cele mai semnificative ale acestei etape sunt prezentate mai jos:**

**Determinarea amarantului utilizand o platformă electrochimică pe baza de polimer  
imprimat molecular prin modificarea electroduului de carbon imprimat serigrafic cu  
nanoparticule de oxid de zinc și nanotuburi de carbon cu pereți multipli**

## **Introducere**

Coloranții sunt adesea folosiți pentru a face un produs mai atractiv și mai tentant pentru consumatorul final și sunt utilizați pe scară largă în diverse industrii, cum ar fi alimente, produse farmaceutice, cosmetice și textile [1].

În ultimul timp, coloranții sintetici au devenit mai utilizați în comparație cu cei naturali datorită uniformității culorii, stabilității la pH, lumina și oxigen, datorită costului scăzut de producție și a contaminării microbiologice scăzute [2]. Unul dintre coloranții utilizați pe scară largă atunci când este nevoie de culoarea roșie este amarantul, un colorant azoic solubil în apă, adăugat în mare parte în diverse produse alimentare [2], dar găsit și în apele reziduale din confectii [2]. Cu toate acestea, dacă este prezent în cantități mari, poate provoca multe efecte adverse asupra sănătății, cum ar fi anxietate, amețeli, alergii, citotoxicitate, poate avea interacțiuni dăunătoare cu aspirina și acidul benzoic și poate dezvolta genotoxicitate ridicată, conducând în cele din urmă la cancer, ca o consecință a grupării sale funcționale azo și a structurii inelare aromatice [2–4]. Dar trebuie să luăm în considerare faptul că, dacă este găsit, chiar și în cantități mici, pentru o perioadă lungă de timp, va afecta sănătatea individului, ducând la citotoxicitate. Prin urmare, amarantul a devenit strict reglementat de Comitetul de experți FAO/WHO pentru aditivi alimentari, stabilind o valoare acceptată maximă a dozei zilnice (DZA) între 0 și 1,5 mg/kg [5]. Prin urmare, trebuie dezvoltată o metodă analitică sensibilă și rapidă pentru detectarea amarantului în diferite probe. Până în prezent, pentru detectarea acestui colorant au fost folosite diverse tehnici, cum ar fi cromatografia în strat subțire (TLC) [6], cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) [6], spectrofotometrie UV-Vis [9], cromatografie lichidă și spectrometrie de masă cu ionizare prin electrospray (LC-MS) [10] și electroforeza capilare (CZE) [11]. Unul dintre principalele dezavantaje ale acestor metode este că necesită echipamente scumpe și personal special instruit, au nevoie de pretratate și consumă cantități mari de solvenți și pot fi, de asemenea, consumatoare de timp. Astfel, metodele electrochimice au fost luate în considerare în ultima vreme datorită avantajelor evidente precum costul redus, rezultate rapide, sensibilitate ridicată și ușurință în miniaturizare [4].

Electrozii serigrafiați (SPE) sunt una dintre cele mai populare opțiuni pentru analiza electrochimică, în special pentru detectarea compușilor farmaceutici, datorită numeroaselor avantaje ale acestora, inclusiv: tehnici de fabricație ieftine și simple, ușurință în pregătire și utilizare, proiectare și modificare flexibilă pentru aplicații diferite, adaptabilitate deplină la dispozitive portabile și capacitatea de utilizare pentru măsurarea diferiților compuși [7, 8].

Pentru a dezvolta o platforma care posedă o bună selectivitate și stabilitate pentru determinarea amarantului s-au luat în considerare MIP-urile (polimeri imprimați molecular). MIP-urile sunt foarte stabile și rentabile și pot produce numeroase site-uri de recunoaștere pentru moleculele țintă [14], prin urmare pot fi platforme de detectare eficiente [5]. Un dezavantaj major pe care îl au MIP-urile simple este conductivitatea electrică și activitatea electrochimică slabă. Pentru a depăși această problemă, diferite materiale conductoare pot fi utilizate ca substraturi de electrozi, cum ar fi oxizii de grafen, nanoparticulele de oxid sau alte materiale pe bază de carbon. Nanotuburile de carbon (CNT) sunt utilizate intens în construcția senzorilor, datorită suprafeței lor mari, conductivității electrice bune și stabilității chimice [15-17]. În special, MWCNT-urile pot îmbunătăți în mod eficient transferul de electroni și, astfel, pot îmbunătăți sensibilitatea senzorului. Prin urmare, MWCNT-urile sunt folosite ca materiale de armare în senzorii compoziți, formând un substrat conductiv și obținând senzori electrochimici mai eficienți [5].

În ultimii ani, senzorii electrochimici bazați pe diferite nanomateriale metalice, cum ar fi AuNPs-urile [18, 19] și nanostructurile metalice oxidice precum ZnONPs-urile [15] au atras o atenție deosebită datorită ariei lor active mari și conductivității electrice ridicate. Pentru a îmbunătăți în continuare stabilitatea chimică, selectivitatea și conductivitatea platformei, pot fi adăugate și diverse nanoparticule de oxizi, așa cum s-a menționat anterior. Oxidul de zinc (ZnO) este un material utilizat pe scară largă deoarece poate poseda o stabilitate impresionantă atât în medii oxidative, cât și în medii acide, oferind astfel efecte suplimentare asupra caracteristicilor electrochimice ale compozitului [15]. Oxidul de zinc este, de asemenea, unul dintre oxizii preferați datorită benzii sale interzise largi (3.37 eV) și energiei puternice de legare a excitației (60 eV).

Polimerii conductori (CPs) sunt din ce în ce mai studiați recent datorită aplicațiilor lor largi și proprietăților unice în senzorii chimici și biosenzorii [9–12]. Polimerii conductori sunt macromolecule, care sunt alcătuite din numeroasele subunități repetate de monomeri [24]. Polimerii conductori precum polimeramina (PMel), politiofenul, polipirolul, polianilina și derivații săi sunt utilizați în mod obișnuit în aplicațiile MIP-urilor datorită conductivității lor relativ ridicate și producției [13–15]. Melamina este un trimer de cianamidă cu trei grupe amino printre acești polimeri și monomerii înrudiți. Pe parcursul procesului de acumulare, aceste grupuri funcționale pot

oferi un număr mare de site-uri active. PMel bogat în azot cu numeroși electroni  $\pi$  poate interacționa cu analiții țintă mai ușor decât alți CPs [28].

Deoarece platformele bazate pe MIP au o sensibilitate scăzută, polimerul conducător este combinat cu MIP pentru a crește sensibilitatea și selectivitatea platformei. Prin urmare, PMel este considerat un candidat promițător pe scară largă în domeniul MIP-ului.

În acest studiu, descriem o metodă eficientă și selectivă pentru detectarea amarantului prin electrodepunerea unui film PMel imprimat molecular în prezența amarantului pe suprafața unui electrod de carbon imprimat serigrafic ZnO-MWCNT (MIP/ZnO-MWCNT/SPCE). Platforma MIP a fost realizată prin eluarea moleculelor șablon de amarant pentru a lăsa cavități imprimate pe suprafața filmului de polimer, care ar putea prezenta o bună capacitate de recunoaștere a amarantului în soluție. Această lucrare ar putea deschide calea pentru dezvoltarea de platforme portabile și simple de detectare pentru analiza la fața locului a amarantului.

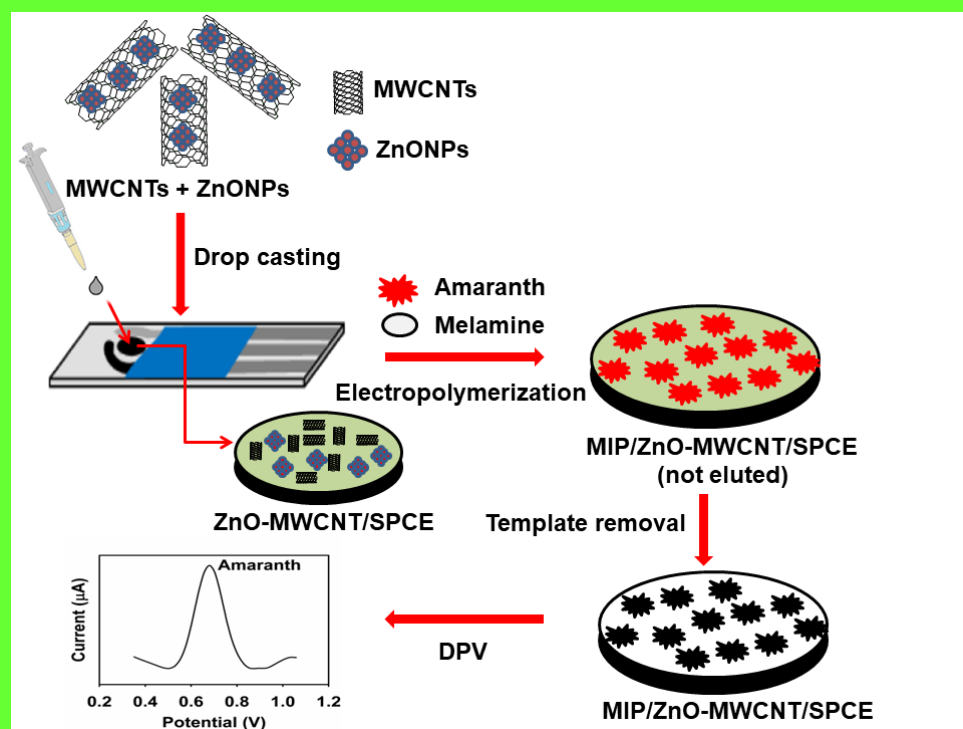
## Experimental

### *Prepararea senzorilor MIP și NIP*

Înainte de modificare, SPCE a fost curățat cu apă deionizată și apoi activat în 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  prin voltametrie ciclică (CV) în intervalul de potențial între -0,2 V și +1,3 V la o rată de scanare de 0,1  $\text{V s}^{-1}$  timp de 5 cicluri.

După cum se arată în Schema 1, MIP/ZnO-MWCNT/SPCE a fost obținut prin electrodepunerea unui film de PMel imprimat molecular în prezența amarantului pe suprafața ZnO-MWCNT/SPCE. Pe scurt, 2,0 mg de MWCNT și 2,0 mg de nanoparticule de ZnO au fost amestecate cu 2 mL de DMF:H<sub>2</sub>O într-un raport de 1:1 ca mediu de dispersie pentru a crea o soluție omogenă și stabilă, care a fost apoi sonicat timp de trei ore. Acest tip de soluție este o cerință esențială pentru obținerea unui proces repetabil de modificare a SPCE. Deoarece soluția conține 50% apă, poate fi utilizată cu orice SPE-uri bazate pe orice material pentru substrat sau compoziție de cerneală. Majoritatea substraturilor din plastic și a cernelurilor SPE conductoare nu pot fi amestecate cu soluții DMF pure de CNT, care sunt utilizate în mod obișnuit [29]. Apoi, 5  $\mu\text{L}$  de ZnO-MWCNT au fost încărcate pe suprafața SPCE printr-o tehnică convențională de turnare în picătură. ZnO-MWCNT/SPCE a fost obținut după uscare la

temperatura camerei timp de 60 de minute. Prin urmare, acest parametru trebuie gestionat deoarece SPE-urile sunt complet deteriorate de temperaturile de evaporare de până la 37 °C. Ulterior, pentru a crea platforma MIP, ZnO-MWCNT/SPCE a fost polimerizat electrochimic în electrolit suport 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> care conține 1 mM amarant (moleculă șablon) și 5 mM melamină (monomer) prin aplicarea a 5 cicluri consecutive de CV în intervalul de potențial de la 0 la +1,2 V la un rata de scanare de 0,1 V s<sup>-1</sup>. După polimerizare, pentru a îndepărta molecula șablon din filmul de polimer și a crea platforma finala MIP/ZnO-MWCNT/SPCE, electrodul a fost incubat într-o soluție de etanol și apă (1:1, v/v) timp de 15 minute. NIP/ZnO-MWCNT/SPCE a fost realizat folosind aceeași procedură, dar fără amarant în H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0,5 M.



**Schema 1.** Ilustrarea schematică a etapelor de fabricare a platformei MIP/ZnO-MWCNT/SPCE și a procesului de detectare a amarantului.

### Prepararea probelor

Au fost examinate patru tipuri diferite de probe pentru a testa aplicabilitatea metodei: sirop Robitussin Junior pentru tuse uscată (0,132 mg amarant/5 ml sirop), capsule Aciclovir Arena, apă de la robinet și apă uzată. Siropul

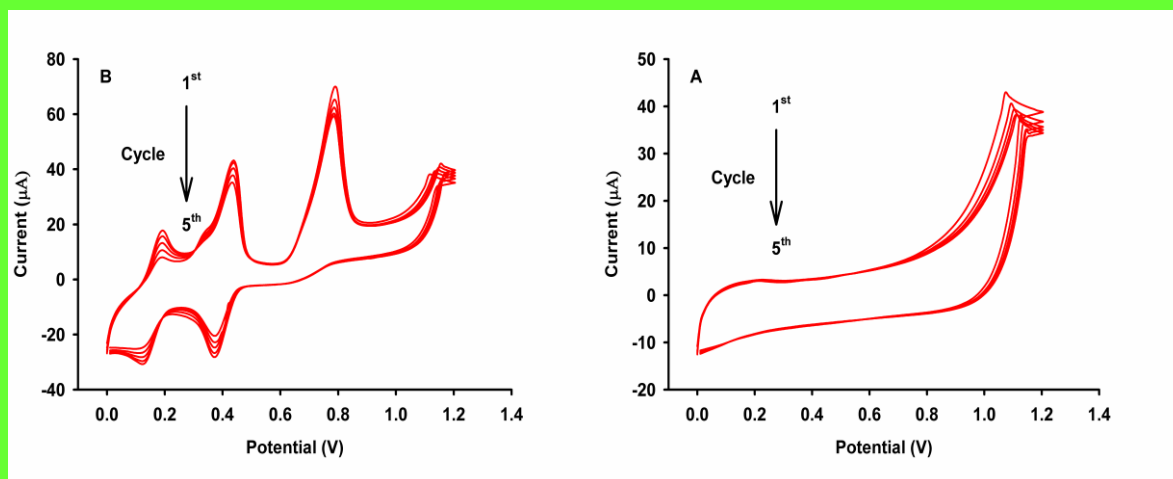
și capsulele au fost obținute de la o farmacie locală. Trei capsule de Aciclovir Arena au fost cântărite cu acuratețe individual și dizolvate în 10 mL PBS pH 3,5, care conține 0,1 M KCl, și sonicate timp de 30 de minute. Ulterior, probele au fost filtrate, iar soluțiile limpezi au fost adăugate cu diferite concentrații de amarant din curba de calibrare. Siropul pentru tuse a fost diluat în PBS pH 3,5, conținând KCl 0,1 M, obținându-se trei concentrații distincte. Probele de apă au fost, de asemenea, tamponate cu PBS pH 3,5, care conține 0,1 M KCl într-un raport de 1:1 (v/v) și adăugate cu concentrații cunoscute de amarant prin metoda de adăugare standard.

## Rezultate și discuții

### *Electropolimerizarea polimelaminei imprimata molecular*

Electropolimerizarea este o metodă tipică pentru prepararea filmului PMel imprimat pe un electrod de suprafață conductor. În această lucrare, performanța electrochimică a polimerizării melaminei a fost studiată prin CV în  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M. Voltamogramele ciclice înregistrate ale polimerizării electrochimice pentru MIP-uri și NIP-uri sunt prezentate în Fig. 1. Pentru a forma un film PMel imprimat pe ZnO-MWCNT/SPCE, electropolimerizarea melaminei a fost efectuată în prezența a 1 mM de amarant (Fig. 1A). Evident, două vârfuri de oxidare suplimentare apar în jurul +0,4 V și, respectiv, +0,8 V, indicând crearea unor filme PMel imprimate cu amarant. Moleculele șablon de amarant au fost încorporate în matricea polimerică în timpul procesului de electropolimerizare ca produs al atracțiilor necovalente, cum ar fi atracțiile electrostatice și de hidrogen. În special, interacțiunile puternice cu hidrogen pot apărea între grupările hidroxil sau ( $-\text{S}=\text{O}$ ) și grupările amină ale melaminei. În plus, interacțiunile electrostatice dintre PMel [30] încărcat pozitiv și amarant [31] încărcat negativ ar putea, de asemenea, să prindă moleculele de amarant pe filmul PMel. Numeroase cavitati de imprimare vor fi produse pentru recunoașterea precisă a amarantului după ce moleculele șablon au fost îndepărtate.

După cum se vede în Fig. 1B, un vârf anodic foarte slab a apărut la aproximativ +0,2 V, sugerând că monomerii melaminei suferă o electropolimerizare. Pe măsură ce numărul de cicluri crește, curenții de vârf anodici scad de la primul la al cincilea ciclu, demonstrând că filmul PMel s-a format pe suprafața electrodului.

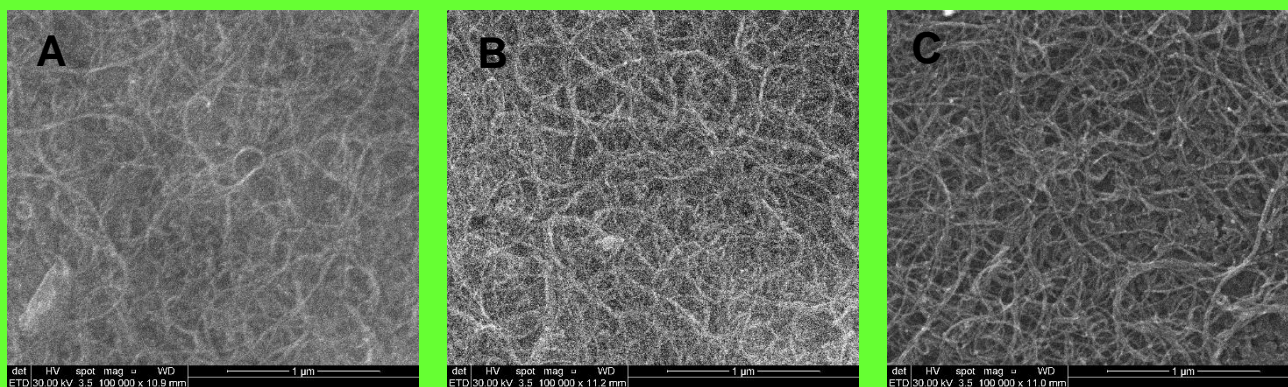


**Fig. 1.** (A) CV-uri multiscan de ZnO-MWCNT/SPCE înregistrate în electrolit suport 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> care conține 5 mM melamină și 1 mM amarant și (B) care conține 5 mM melamină.

#### *Caracterizarea SEM*

Morfologiile senzorilor MIP și NIP (Fig. 2) au fost investigate prin SEM. Imaginea SEM (Fig. 2A) arată depunerea filmului de melamină și amarant pe ZnO-MWCNT/SPCE. Prezența MWCNT pe SPCE este clar vizibilă, în timp ce prezența filmului de amarant este observată, de asemenea, făcând imaginea mai „ințeșoasă”. De asemenea, ZnO-MWCNT/SPCE prezintă o omogenitate bună și o acoperire a suprafeței. După ce moleculele șablon (amarant) au fost îndepărtate (Fig. 2B), suprafața platformei devine mult mai aspră, prezentând ceva similar cu o suprafață gravată, atât pe MWCNT, cât și pe SPCE. Acest tip de aspect gravat demonstrează că amarantul a fost îndepărtat cu succes și complet. Formarea nanotuburilor este, de asemenea, clar vizibilă (Fig. 2C), prezentând o acoperire bună și omogenitate similare cu platforma din Fig. 2A. Aici, depunerea de melamină fără amarant prezintă o suprafață clară în comparație cu cazul în care a fost adăugată molecula șablon.





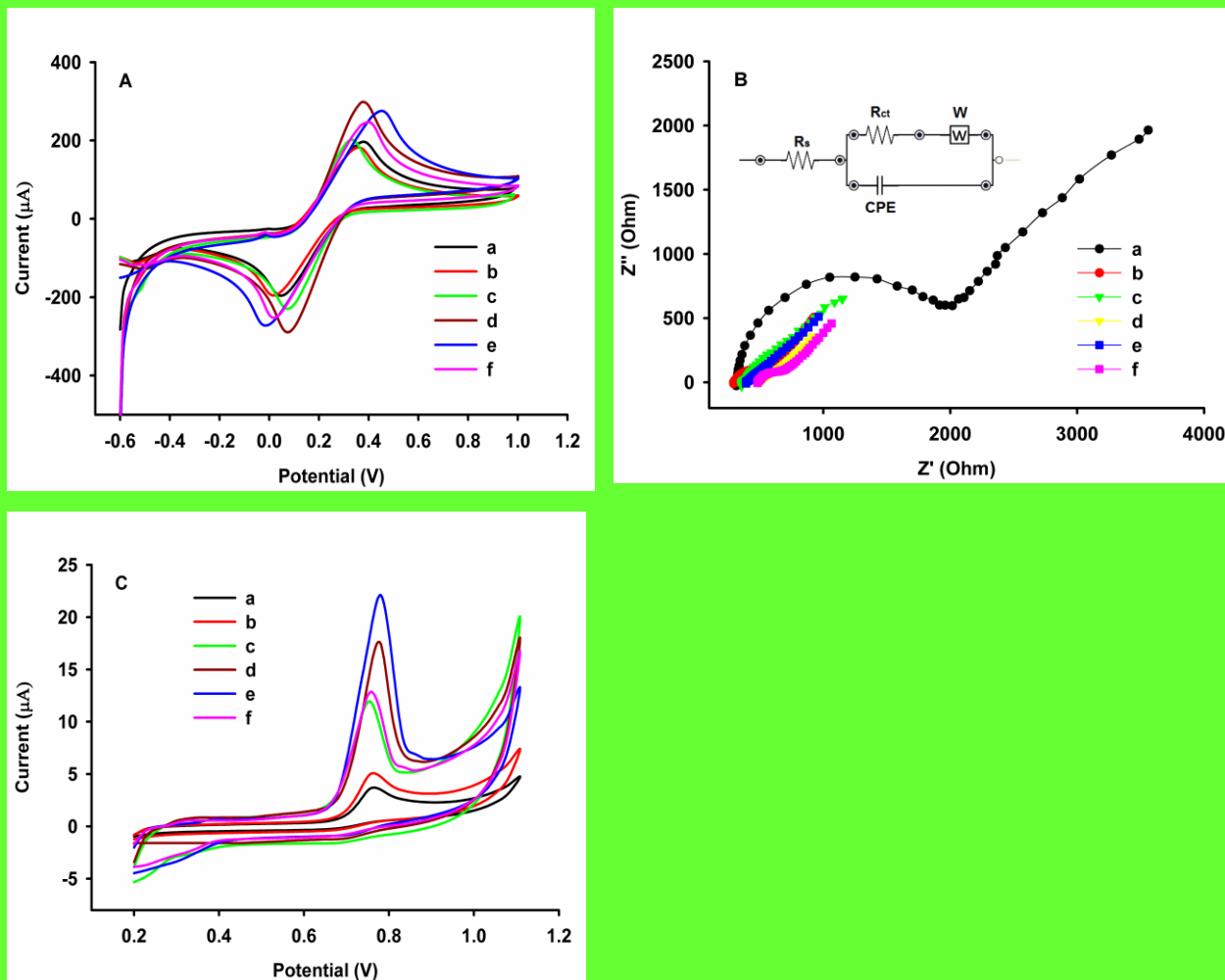
**Fig. 2.** Imaginile SEM ale (A) MIP/ZnO-MWCNT/SPCE înainte și (B) după îndepărtarea șabloanelor și (C) NIP/ZnO-MWCNT/SPCE.

### *Caracterizarea electrochimică a electrozilor modificate*

Comportamentul electrochimic al electrozilor modificate a fost studiat prin CV într-o soluție mixtă de 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  și 0,1 M KCl ca proba redox într-un interval de potențial de la -0,6 V la +1,0 V ( Fig. 3A). La SPCE (curba a din Fig. 3A), sunt văzute o pereche de vârfuri redox simetrice, cu curenți de vârf de 183  $\mu\text{A}$  și -178  $\mu\text{A}$  pentru vârfurile anodice ( $I_{p_a}$ ) și, respectiv, catodice ( $I_{p_c}$ ). După modificarea SPCE cu MIP-uri (curba b din Fig. 3A), curenții de vârf redox scad lent ( $I_{p_a} = 181 \mu\text{A}$ ;  $I_{p_c} = -170 \mu\text{A}$ ), mai ales din cauza introducerii conductivității electrice slabe a filmului MIP. Conductivitatea electrică bună și suprafața largă a ZnO-MWCNT-urilor determină creșterea curenților de vârf redox a semnalului ( $I_{p_a} = 204 \mu\text{A}$ ;  $I_{p_c} = -202 \mu\text{A}$ ) după ce ZnO-MWCNT-urile au fost încărcate pe suprafața SPCE (curba c din Fig. 3A). După cum era de așteptat, cele mai înalte vârfuri redox au fost găsite la MIP/ZnO-MWCNT/SPCE (curba d din Fig. 3A) cu  $I_{p_a}$  de 281  $\mu\text{A}$  și  $I_{p_c}$  de -276  $\mu\text{A}$ , unde amprentarea amarantului crește semnificativ conductivitatea electrochimică prin delocalizarea intermoleculară cauzată în PMel. Valorile de vârf redox scad odată ce șabloanele de amarant sunt îndepărtate (curba e din Fig. 3A) ( $I_{p_a} = 249 \mu\text{A}$ ;  $I_{p_c} = -243 \mu\text{A}$ ), ceea ce sugerează indirect că moleculele șablon sunt imprimate cu succes în MIP-uri în timpul polimerizării electrochimice. Un efect similar este observat atunci când melamina singură este electropolimerizată pe ZnO-MWCNT/SPCE pentru a crea platforma NIP/ZnO-MWCNT/SPCE (curba f din Fig. 3A). Cu toate acestea, curenții de vârf ai platformei NIP/ZnO-MWCNT/SPCE ( $I_{p_a} = 232 \mu\text{A}$ ;  $I_{p_c} = -227 \mu\text{A}$ ) sunt mai mari decât cei ai SPCE.

Diagramele Nyquist ale diversilor electrozi modificați au fost studiate în  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5 mM care conține 0,1 M KCl în intervalul de frecvență de la 0,1 Hz la 100 kHz cu  $E_{dc}$  de 0,20 V și  $E_{ac}$  de 0,01 V și sunt afișate în Fig. 3B. O secțiune semicirculară la frecvențe înalte și o secțiune liniară la frecvențe joase sunt de obicei văzute în diagrama Nyquist și sunt strâns legate de procesul de transfer limitat de electroni și, respectiv, de procesul controlat de difuzie. Diametrul unui semicerc indică de obicei valoarea rezistenței la transferul de sarcină a electronilor ( $R_{ct}$ ). Circuitul Randles (Fig. 3B) a fost folosit pentru a determina valorile  $R_{ct}$ , unde  $R_s$  reprezintă rezistența electrolitului,  $W$  indică impedanța Warburg și  $CPE$  denotă elementul de fază constantă. Datorită adăugării ZnO-MWCNT-urilor cu conductivitate ridicată, valoarea  $R_{ct}$  a ZnO-MWCNT/SPCE (curba c, 130  $\Omega$ ) este semnificativ mai mică decât cea a SPCE (curba a, 1405  $\Omega$ ). Senzorul MIP/SPCE are valoarea  $R_{ct}$  de 157  $\Omega$  (curba b). Înainte ca șabloanele să fie îndepărtate, valoarea  $R_{ct}$  a MIP/ZnO-MWCNT/SPCE scade dramatic (curba d, 69  $\Omega$ ), mai ales din cauza delocalizării intermoleculare a PMel care îmbunătățește semnificativ electroconductibilitatea. Când moleculele șablon sunt eliminate, valoarea  $R_{ct}$  se îmbunătățește ușor (curba e, 77  $\Omega$ ). Aceste rezultate au demonstrat că amarantul a fost încorporat în filmul PMel și că șablonul poate fi îndepărtat din filmul PMel prin procesul de eluare. În plus,  $R_{ct}$ -ul platformei NIP/ZnO-MWCNT/SPCE este mai mare decât valoarea  $R_{ct}$  a MIP/ZnO-MWCNT/SPCE, indicând faptul că filmele MIP încărcate pe suprafața ZnO-MWCNT-urilor cresc foarte mult eficiența transferului de electroni (curba f, 154).  $\Omega$ ).

Fig. 3C afișează răspunsurile CV ale diferiților electrozi modificați în 0,1 M PBS pH 3,5 și 0,1 M KCl ca electrolit suport care conține 10  $\mu\text{M}$  amarant cu o rată de scanare de 0,1  $\text{V s}^{-1}$ . MIP/ZnO-MWCNT/SPCE (curba e) a arătat cele mai bune rezultate pentru oxidarea amarantului în comparație cu ceilalți 5 electrozi. Astfel, au fost investigate caracteristicile suplimentare și potențialul acestei platforme pentru determinarea electrochimică a amarantului în probe farmaceutice și de apă.



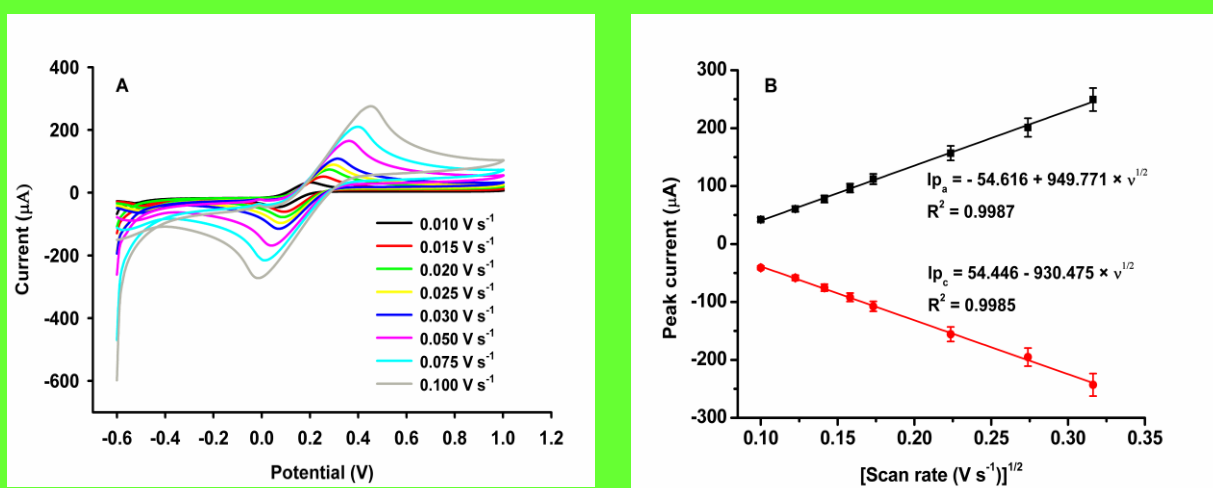
**Fig. 3.** (A) CV-uri și (B) diagramele Nyquist ale diferitelor platforme într-o soluție mixtă de 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  și 0,1 M KCl. Insetul din Fig. 3B ilustrează circuitul Randles. (C) CV-urile diferitelor platforme au fost înregistrate în 0,1 M PBS pH 3,5 și 0,1 M KCl ca electrolit suport care conține 10  $\mu\text{M}$  amarant. Curba **a** pentru SPCE, **b** pentru MIP/SPCE, **c** pentru ZnO-MWCNT/SPCE, **d** pentru MIP/ZnO-MWCNT/SPCE înainte și **e** pentru MIP/ZnO-MWCNT/SPCE după îndepărtarea șablonului, și **f** pentru NIP/ ZnO-MWCNT/SPCE.

Un parametru important care influențează răspunsul electrochimic este suprafața electrochimică activă. Echivalentul Randles-Sevcik (1) pentru procesele cvasi-reversibile ale unui cuplu redox a fost utilizat pentru a calcula suprafețele electroactive ale diferiților electrozi, unde  $I_p$  este curentul de vârf (A),  $n$  este numărul de electroni implicați în procesul redox ( $n = 1$ ),  $D$  este coeficientul de difuzie ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $v$  este viteza de scanare ( $\text{V s}^{-1}$ ),  $A$  este aria suprafeței active a electrodului ( $\text{cm}^2$ ) și  $C$  este concentrația de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) [32].

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} D^{1/2} v^{1/2} AC \quad (1)$$

Din această ecuație, după îndepărtarea șablonului, platforma MIP/ZnO-MWCNT/SPCE a arătat o suprafață electroactivă mai mare de 0,26 cm<sup>2</sup>, comparativ cu 0,18 cm<sup>2</sup>, 0,17 cm<sup>2</sup>, 0,21 cm<sup>2</sup> și 0,24 cm<sup>2</sup> pentru SPCE, MIP/SPCE, ZnO -MWCNT/SPCE și NIP/ZnO-MWCNT/SPCE. Cea mai mare arie activă a fost înregistrată pentru platforma MIP/ZnO-MWCNT/SPCE înainte de îndepărtarea șablonului (0,31 cm<sup>2</sup>).

Picurile anodice și catodice ( $I_{p_a}$  și  $I_{p_c}$ ) pentru SPCE și electrozii modificați au prezentat o dependență liniară a rădăcinei pătrate a ratei de scanare, sugerând că procesul redox a fost guvernat de difuzie. Pe măsură ce viteza de scanare crește de la 0,010 la 0,100 V s<sup>-1</sup>, cele două vârfuri cresc în mod corespunzător (Fig. 4A). Fig. 4B prezintă dependențele liniare ale  $I_{p_a}$  și  $I_{p_c}$  față de  $v^{1/2}$  ale platformei MIP/ZnO-MWCNT/SPCE după îndepărtarea șablonului.



**Fig. 4.** (A) CV-urile MIP/ZnO-MWCNT/SPCE (după îndepărtarea șablonului) în soluție amestec de 5 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>/<sup>4-</sup> și 0,1 M KCl la viteze de scanare diferite de la 0,010 la 0,100 V s<sup>-1</sup> și (B) curbele liniare corespunzătoare între curentul de vârf și rădăcina pătrată a ratei de scanare.

#### Optimizarea condițiilor analitice

Diferiți parametri, cum ar fi raportul molar dintre monomer-șablon, numărul de cicluri de electropolimerizare, timpul de eluare și efectul pH-ului și al electrolitului de susținere, sunt studiați pentru a vedea modul în care aceștia influențează performanța MIP-ului. Acest lucru se face astfel încât să poată fi găsite cele mai bune condiții experimentale pentru construcția electrodului MIP și ca performanța platformei să poată fi îmbunătățită.

#### *Efectul raportului molar melamină-amarant*

Optimizarea procesului de electropolimerizare este foarte esențială pentru crearea unui polimer eficient și stabil folosind monomeri funcționali. Melamina a fost aleasă ca monomer funcțional pentru polimerizarea electrochimică și a fost utilizată în diferite combinații. Pentru a produce o film polimeric durabil și stabil, raportul dintre monomer și molecula șablon trebuie optimizat. De asemenea, raportul molar dintre monomerul melamină și molecula șablon are un efect semnificativ asupra site-urilor imprimate în matricea polimerului. În primul rând, un electrolit suport de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M este utilizat pentru electropolimerizare cu diferite rapoarte molare ale moleculelor de monomer și șablon, în timp ce concentrația de melamină este menținută constantă la 5 mM. Influența diferitelor rapoarte molare asupra performanței sensorului a fost investigată prin testarea răspunsurilor CV ale fiecărei platforme MIP în PBS pH 3,5 care conține amarant (0,1 mM). Curenții de vârf ai amarantului cresc atunci când raportul molar dintre monomer și șablon crește de la 0,25 la 1,0 (Fig. 5A). Prin creșterea raportului molar, PMel poate fi pusă la dispoziție pentru a lega moleculele șablon, rezultând o creștere a numărului de site-uri de recunoaștere în filmele MIP-urilor. Cu toate acestea, semnalul curenților de vârf al amarantului scade atunci când raportul molar depășește 1,0 (Fig. 5A). Prin urmare, raportul molar dintre melamină și amarant a fost selectat ca 1.0.

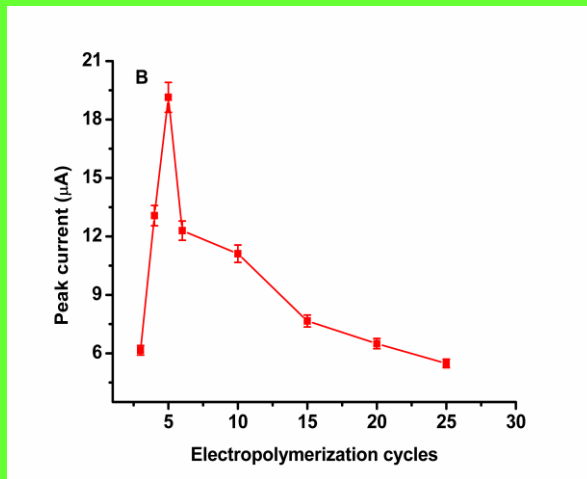
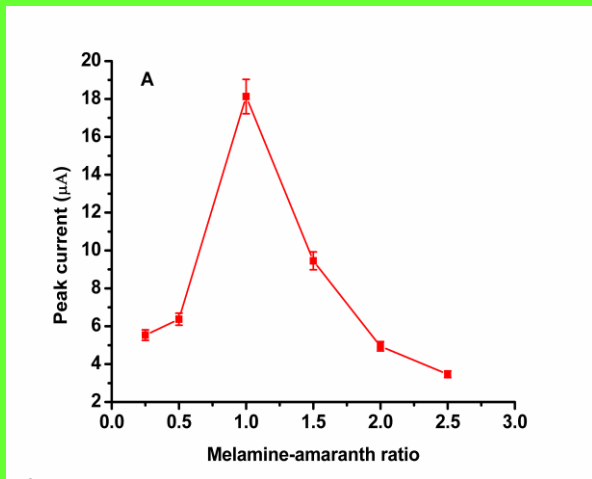
#### *Efectul numărului de cicluri de electropolimerizare*

Grosimea filmului MIP influențează direct câte cavitati de amarant imprimate există, ceea ce are un impact important asupra sensibilității. În procesul de polimerizare electrochimică, grosimea este de obicei controlată prin variarea numărului de cicluri. Răspunsul electrochimic al platformelor MIP a fost de asemenea investigat prin CV

în PBS pH 3,5 care conține amarant (0,1 mM). Fig. 5B arată că semnalul intensității curentului amarantului crește semnificativ pe măsură ce numărul de cicluri de electropolimerizare crește de la 3 la 5 și apoi scade de la 5 la 25. Acest comportament poate fi explicat prin faptul că ciclurile suplimentare de electropolimerizare duc la crearea site-urilor de recunoaștere mai eficiente. Deși răspunsul curentului de vârf pare să scadă atunci când numărul de cicluri de electropolimerizare crește, prin urmare este posibil ca filmul MIP să fi devenit prea gros pentru a îndepărta total moleculele șablon de amarant. Astfel, numărul de 5 cicluri este selectat ca număr optim pentru procesul de polimerizare electrochimică.

#### *Efectul timpului de eluare*

Platforma, după electropolimerizare, a fost eluat și incubat într-o soluție apoasă de etanol pentru o anumită perioadă de timp cu scopul de a investiga efectul timpului de eluare al moleculelor șablon de amarant asupra performanței platformei MIP. Răspunsul electrochimic al platformelor MIP a fost de asemenea testat utilizând metoda CV în PBS pH 3,5 care conține 0,1 mM amarant. După cum se poate observa în Fig. 5C, curenții de vârf de răspuns cresc odată cu creșterea timpului de eluție și ating un maxim la 15 min. Prin urmare, 15 min a fost ales ca timp optim de eluție, confirmând faptul că eluția amarantului este completă, astfel încât cavitățile imprimate să poată prezenta o bună capacitate de recunoaștere și un răspuns maxim de curent de vârf la amarant în soluție la reutilizare.



Efectele pH-ului și ale electrolitului suport

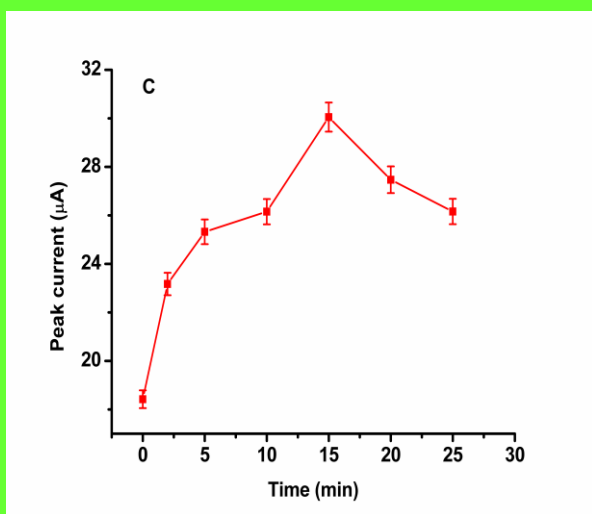


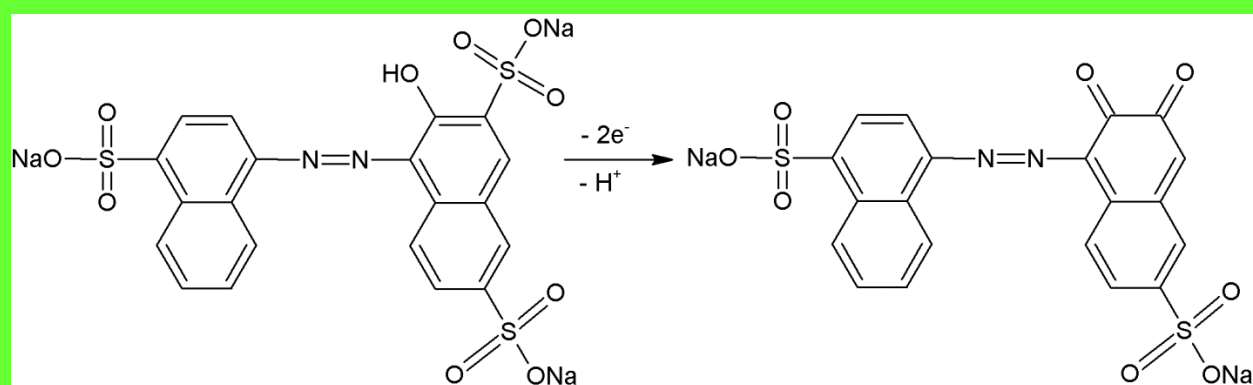
Fig. 5. (A) Influența raportului melamină-amarant, (B) Numarul ciclurilor de electropolimerizare și (C) Timpul de eluție asupra curentului de vârf.

asemena, alți parametri importanți care au un impact major asupra comportamentului electrochimic al amarantului. Influența pH-ului asupra electrooxidării a 100 μM amarant în soluție de PBS la diferite valori ale pH-ului cuprinse între 2,5 și 6,5 la platforma MIP/ZnO-MWCNT/SPCE a fost studiată prin voltametrie în puls diferențial (DPV) (Fig. 6A). După cum se poate observa în Fig. 6B, curentul de vârf a crescut de la pH 2,5 la pH 3,5 și apoi a început să scadă până când a fost atins pH-ul 6,5. Cel mai mare vârf de oxidare al amarantului a fost găsit într-un mediu acid la pH 3,5. Prin urmare, valoarea optimă a pH-ului a fost selectată să fie 3,5. În plus, se observă o schimbare ușor negativă a potențialului odată cu creșterea pH-ului (Fig. 6B), indicând faptul că protonii sunt

Ef  
ectele  
pH-  
ului și  
ale  
electr  
olitul  
ui  
supor  
t  
sunt,  
de

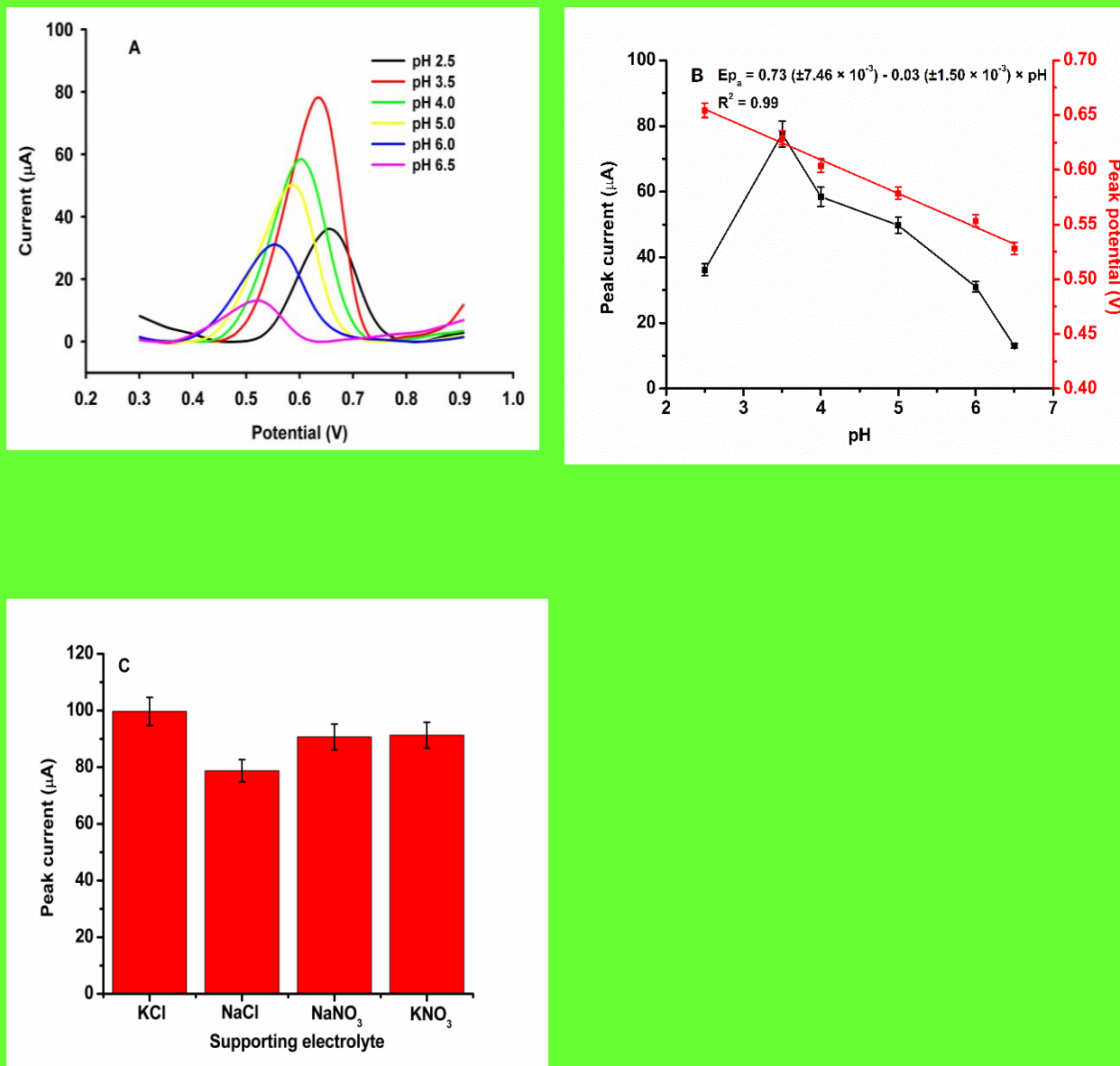


implicați în oxidarea amarantului. Relația liniară dintre potențialul de vârf față de pH poate fi exprimată ca  $E_{p_a} = 0.73 (\pm 7.46 \times 10^{-3}) - 0.03 (\pm 1.50 \times 10^{-3}) \times \text{pH}$  with  $R^2 = 0.99$  și valoarea pantei de  $0,03 \text{ V pH}^{-1}$ , care este aproximativ apropiată de valoarea teoretică Nernstiană ( $0,029 \text{ V pH}^{-1}$ ) pentru un proces de oxidare electrochimică cu raportul protoni:electroni de 1:2 [33]. Astfel, în procesul de oxidare al amarantului de pe senzorul MIP implică un proton și doi electroni, așa cum este prezentat în Schema 2. Această constatare este în bună concordanță cu publicații anterioare [16,17].



**Schema 2.** Posibilul mecanism al oxidării electrochimice al amarantului la platforma MIP/ZnO-MWCNT/SPCE în mediu acid (pH 3,5).

Pentru a studia efectul suportului electrolit asupra electrooxidării amarantului, s-au adăugat separat o serie de electroliți de susținere precum KCl, NaCl,  $\text{NaNO}_3$  și  $\text{KNO}_3$  cu o concentrație de 0,1 M în PBS pH 3,5 care conține  $100 \mu\text{M}$  amarant. Cel mai mare curent de vârf a fost obținut atunci când a fost utilizat 0,1 M KCl, așa cum se arată în Fig. 6C.



**Fig. 6.** (A) DPV de 100  $\mu\text{M}$  amarant la MIP/ZnO-MWCNT/SPCE în 0,1 M PBS la pH-uri diferite (2,5 – 6,5); (B) Efectul pH-ului asupra răspunsurilor curente (puncte negre) și relația liniară dintre potențialul de vârf față de pH (linia roșie); (C) Efectul electrolitului suport asupra oxidării a 100  $\mu\text{M}$  amarant (PBS pH 3,5).

#### *Influența vitezei de scanare asupra oxidării amarantului*

Comportamentul electrochimic al 10  $\mu\text{M}$  amarant a fost studiat prin CV, utilizând MIP/ZnO-MWCNT/SPCE la diferite viteze de scanare între 0,02 și 0,80  $\text{V s}^{-1}$  (Fig. 7A). După cum se observă în Fig. 7B, curenții anodici de vârf au variat liniar cu rădăcina pătrată a vitezei de scanare, în conformitate cu ecuația de regresie prezentată mai jos:

$$I_{p_a} (\mu A) = -0.29 (\pm 0.12) + 18.7 (\pm 0.23) \times v^{1/2} \quad (2)$$

Fig. 7C prezintă relația liniară care a fost obținută prin reprezentarea logaritmilor curentului de vârf și a vitezei de scanare. Ecuația pentru această relație este:

$$\text{Log}(I_{p_a}) (\mu A) = 1.27 (\pm 7.88 \times 10^{-3}) + 0.52 (\pm 6.25 \times 10^{-3}) \times \text{Log}(v) \quad (3)$$

Valoarea pantei a fost de 0,52, ceea ce indică faptul că procesul electrochimic al amarantului pe suprafața platformei MIP este controlat prin difuzie [36].

Teoria pentru calcularea standardelor constantei de viteză eterogenă a reacției electrochimice ( $k_s$ ), a numărului de electroni implicați ( $n$ ) și a coeficientului de transfer de electroni ( $\alpha$ ) a fost prezentată prin ecuația Laviron [37]:

$$E_{p_a} = E^0 - \left( \frac{RT}{\alpha n F} \right) \ln \left( \frac{RT k_s}{\alpha n F} \right) + \left( \frac{RT}{\alpha n F} \right) \ln v \quad (4)$$

$E^0$  a fost egală cu 0,73 V și a fost identificată ca fiind valoarea de intercept a ecuației:

$$E_{p_a} (V) = 0.73 (\pm 1.24 \times 10^{-3}) + 0.17 (\pm 8.13 \times 10^{-3}) \times v \quad (5)$$

Această ecuație a fost obținută din graficul potențialului de vârf în funcție de viteza de scanare (Fig. 7D). După cum se observă în Fig. 7D, potențialul picului anodic a fost ușor deplasat în sens pozitiv odată cu creșterea vitezei de scanare.

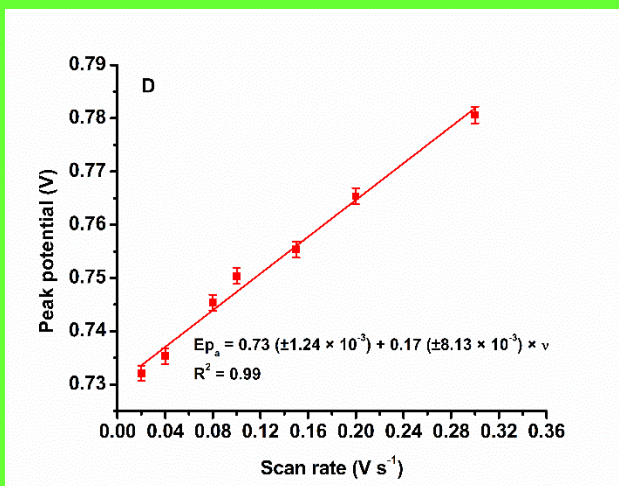
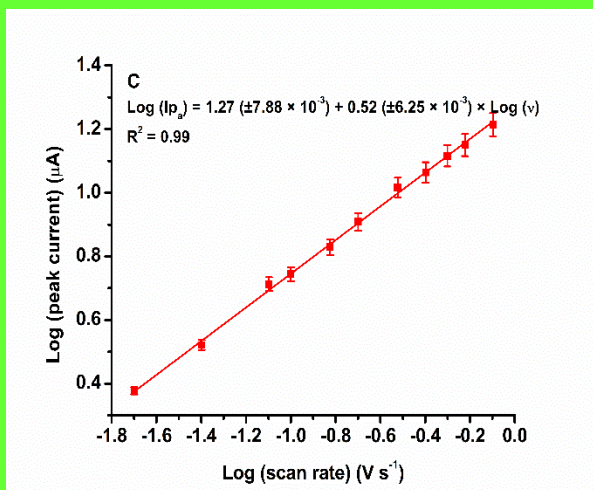
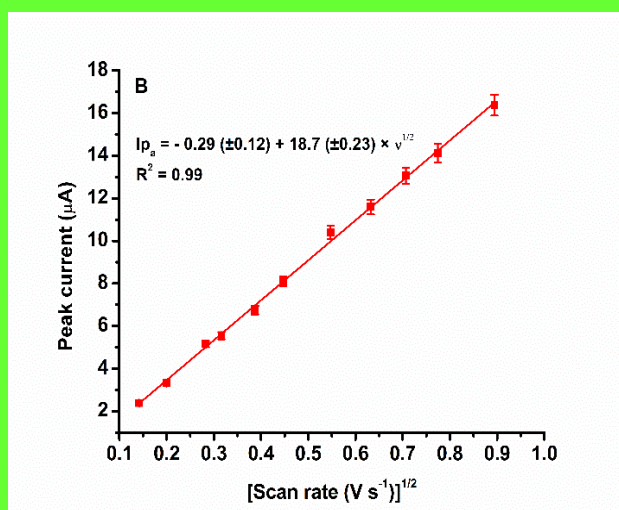
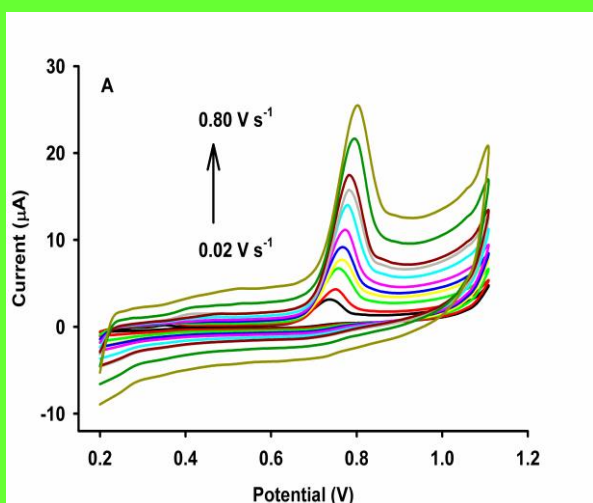
A fost prezentată, de asemenea, relația dintre potențialul picului anodic și logaritmul natural al vitezei de scanare (Fig. 7E), care a demonstrat o dependență liniară și poate fi exprimată astfel:

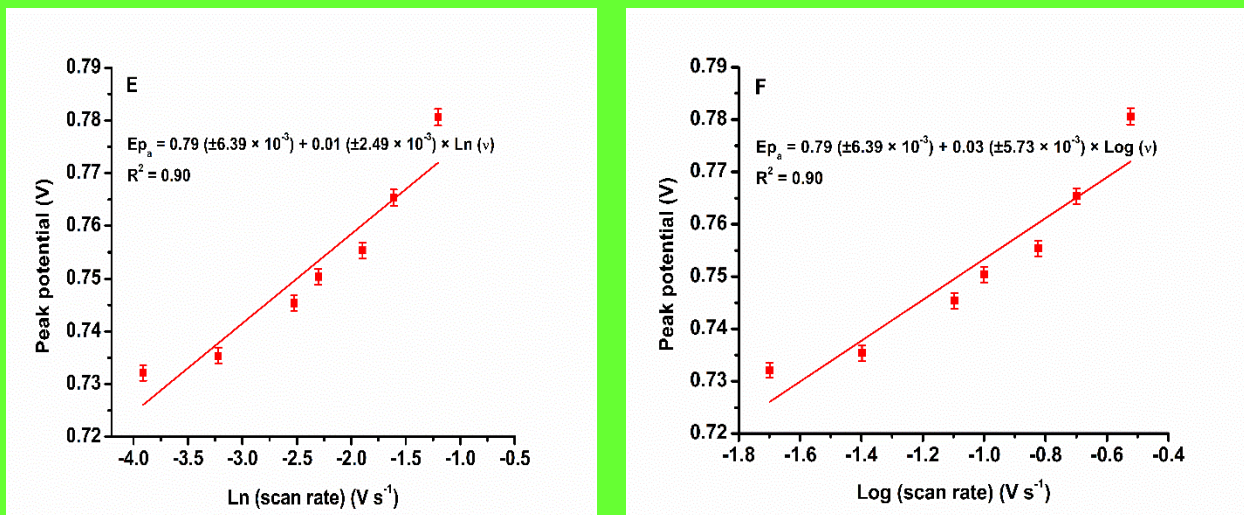
$$E_{p_a} (V) = 0.79 (\pm 6.39 \times 10^{-3}) + 0.01 (\pm 2.49 \times 10^{-3}) \times \text{Ln}(v) \quad (6)$$

Parametrii  $\alpha$  și  $n$  au fost obținuți din graficul  $E_{p_a}$  vs.  $\log(v)$  (Fig. 7F), utilizând valoarea pantei din ecuația de mai jos:

$$E_{p_a} (V) = 0.79 (\pm 6.39 \times 10^{-3}) + 0.03 (\pm 5.73 \times 10^{-3}) \times \text{Log}(v) \quad (7)$$

Valorile calculate pentru acești doi parametri cinetici au fost  $\alpha = 0,52$  și  $n = 1,85$  ( $\sim 2 e^-$ ). Astfel, doi electroni au fost implicați în procesul de oxidare electrochimică a amarantului. Acest rezultat poate fi atribuit mecanismului propus pentru oxidarea electrochimică a amarantului, așa cum se arată în Schema 2.  $K_s$  a fost determinat din Ecuația (4) și s-a obținut valoarea de  $5,17 s^{-1}$ .





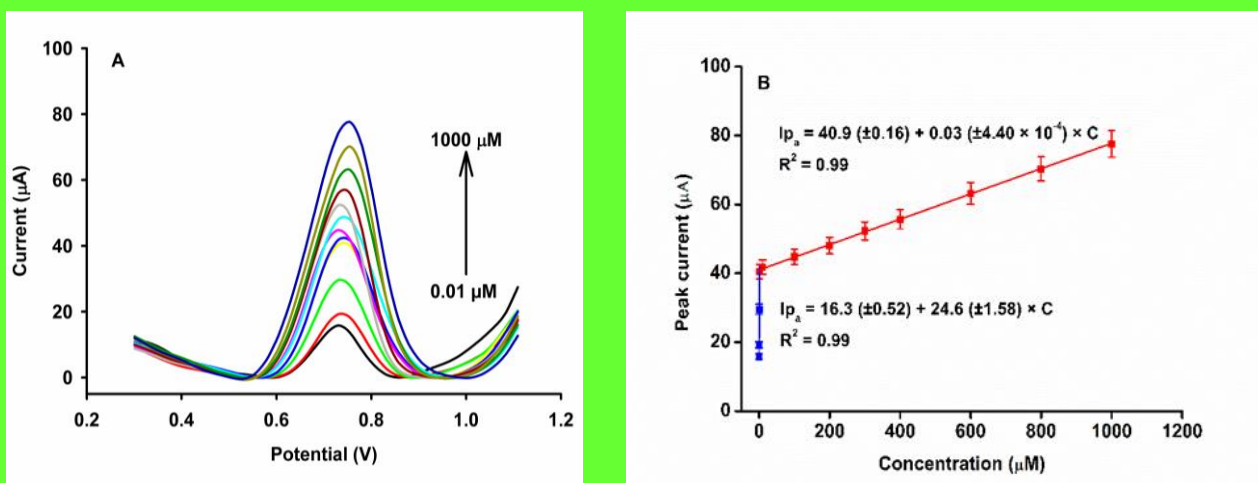
**Fig. 7.** (A) CV-urile MIP/ZnO-MWCNT/SPCE înregistrate la diferite viteze de scanare (0,02 - 0,80 V s<sup>-1</sup>) în PBS (pH 3,5) și 0,1 M KCl conținând 10 μM amarant; (B) Relația liniară a curentului de vârf vs. rădăcina pătrată a vitezei de scanare; (C) Corelația liniară a logaritmului curentului de vârf vs. logaritmul vitezei de scanare; (D) Dependența dintre potențialul de vârf și viteza de scanare; (E) Dependența liniară a potențialului de vârf față de logaritmul natural al vitezei de scanare; (F) Relația dintre potențialul de vârf și logaritmul vitezei de scanare.

### Performanță analitică

#### Domeniul liniar și limita de detecție

Fig. 8A prezintă răspunsurile DPV ale diferitelor concentrații de amarant înregistrate la MIP/ZnO-MWCNT/SPCE în condiții optime. După cum se arată în Fig. 8B, răspunsul curentului de vârf al amarantului a fost reprezentat grafic în funcție de concentrație și a arătat o relație liniară pe două intervale de concentrație, de la 0,01 la 1 μM și de la 1 la 1000 μM. Ecuțiile de regresie liniară pot fi exprimate astfel:  $I_{p_a} (\mu A) = 16.3 (\pm 0.52) + 24.6 (\pm 1.58) \times C$  and  $I_{p_a} (\mu A) = 40.9 (\pm 0.16) + 0.03 (\pm 4.40 \times 10^{-4}) \times C$ , with the  $R^2$  of 0.99 and 0.99, respectively. Limita de detecție (LOD) a fost calculată ca fiind de 0,003 μM folosind ecuația:  $LOD = 3\sigma/S$ , unde  $\sigma$  este abaterea standard a răspunsului intensității curentului din soluția martor și  $S$  este panta curbei de calibrare.

Sensibilitatea platformei MIP/ZnO-MWCNT/SPCE a fost determinată utilizând următoarea ecuație:  
 Sensibilitate = panta intervalului linear al graficului de calibrare/aria activă a MIP. Astfel, s-a obținut o sensibilitate de  $96,2 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ .



**Fig. 8.** (A) Curbe DPV înregistrate cu MIP/ZnO-MWCNT/SPCE în PBS 0,1 M (pH 3,5) și KCl 0,1 M conținând diferite concentrații de amarant (0,01 până la 1000  $\mu\text{M}$ ); (B) Relația liniară a răspunsurilor curenților picurilor în funcție de concentrațiile de amarant.

Platforma dezvoltată MIP/ZnO-MWCNTs/SPCE prezintă performanțe analitice acceptabile în ceea ce privește limita inferioară de detecție și cele două intervale liniare mari. Performanța analitică a platformei propuse este comparabilă cu alte metode analitice [9,10] și chiar depășește unii senzori deja raportați [3,38–42], așa cum este rezumat în Tabelul 1.

**Tabelul 1.** Comparația performanței platformei propuse cu alte metode analitice raportate anterior pentru determinarea amarantului.

Metode	Domeniul liniar ( $\mu\text{M}$ )	Limita de detectie ( $\mu\text{M}$ )	Referinte
UV-Vis	0.04 – 3.97	0.01	[9]
LC-MS	0.01 – 0.16	-	[10]
CZE	0.01 – 0.07	$1.8 \times 10^{-4}$	[11]
MnO <sub>2</sub> NRs-ErGO/GCE	0.02 – 10 10 – 400	0.001	[34]
PLCys-GR/GCE	0.01 – 1	0.004	[3]
GQDIL/CPE	0.1 – 400	0.03	[38]
H-SWCNT/SPCE	0.057 – 1.40	0.03	[39]
Ni-Mo-MOF/SPE	0.15 – 500	0.05	[40]
rGO-methionine/SPCE	1 – 10 10 – 100	0.057	[41]
Pd/GO/SPE	0.08 – 360	0.03	[42]
PDDA-Gr-(Pd-Cu)@MIP-PDA/GCE	0.006 – 10	0.002	[43]
SFrGO- $\beta$ CD/GCE	0.02 – 0.14 0.15 – 0.6	$2.2 \times 10^{-5}$	[44]
CMIG/GCE	0.02 – 150	0.003	[45]
MIP/ZnO-MWCNT/SPCE	0.01 – 1 1 – 1000	0.003	This work

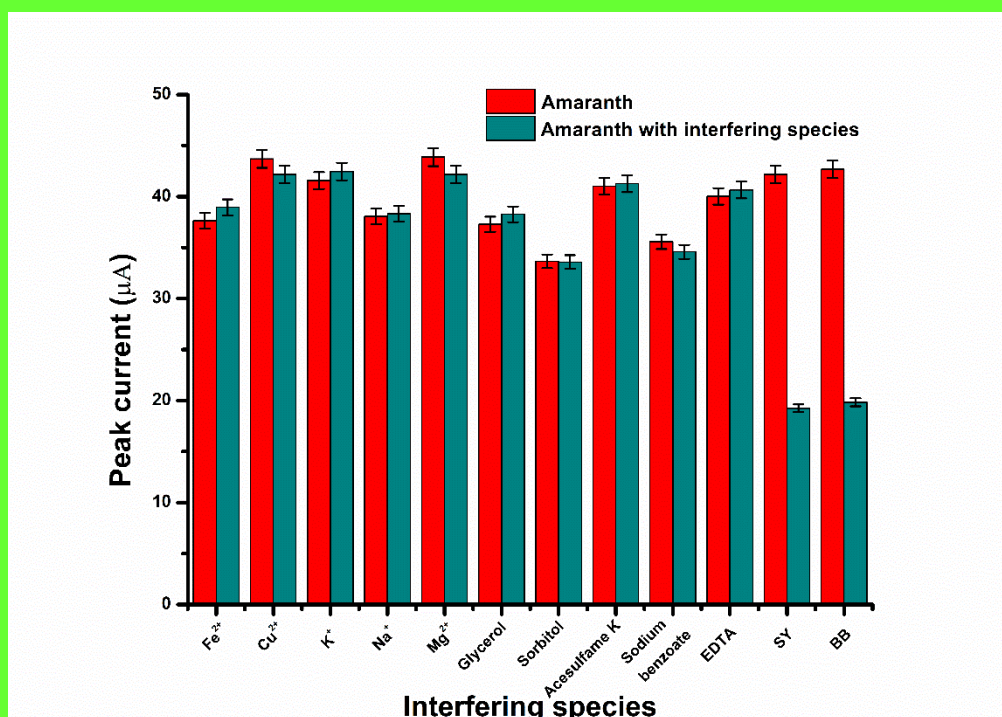
### Studiul de selectivitate

Unul dintre avantajele majore ale senzorilor electrochimici pe bază de MIP este recunoașterea specifică. Prin urmare, au fost studiate o serie de specii interferente precum Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, acesulfam K, benzoat de sodiu, glicerol, sorbitol, EDTA, albastru strălucitor și galben apus pentru a testa selectivitatea MIP/ZnO-MWCNT/SPCE asupra oxidării electrochimice a amarantului (Fig. 9). Studiul a fost realizat prin utilizarea metodei DPV în PBS pH 3,5 și 0,1 M KCl, 1  $\mu\text{M}$  amarant și diferite concentrații ale uneia dintre speciile interferente alese. Datorită



prezenței unor cavități specifice de recunoaștere, răspunsul curentului de vârf al amarantului este mult mai mare decât cel al albastrului strălucitor și al galbenului apus. Cavitățile de imprimare pot replica selectiv moleculele de amarant și în cele din urmă pot induce răspunsul unor curenți de vârf distincti. Astfel, cavitățile nu pot lega acești coloranți la fel de strâns ca amarantul din cauza structurilor lor moleculare diferite, ceea ce duce la un răspuns mai slab al curenților de vârf. Aceste rezultate nu au prezentat nici-o interferență în detectarea amarantului atunci când a fost utilizat un raport de 1:1.

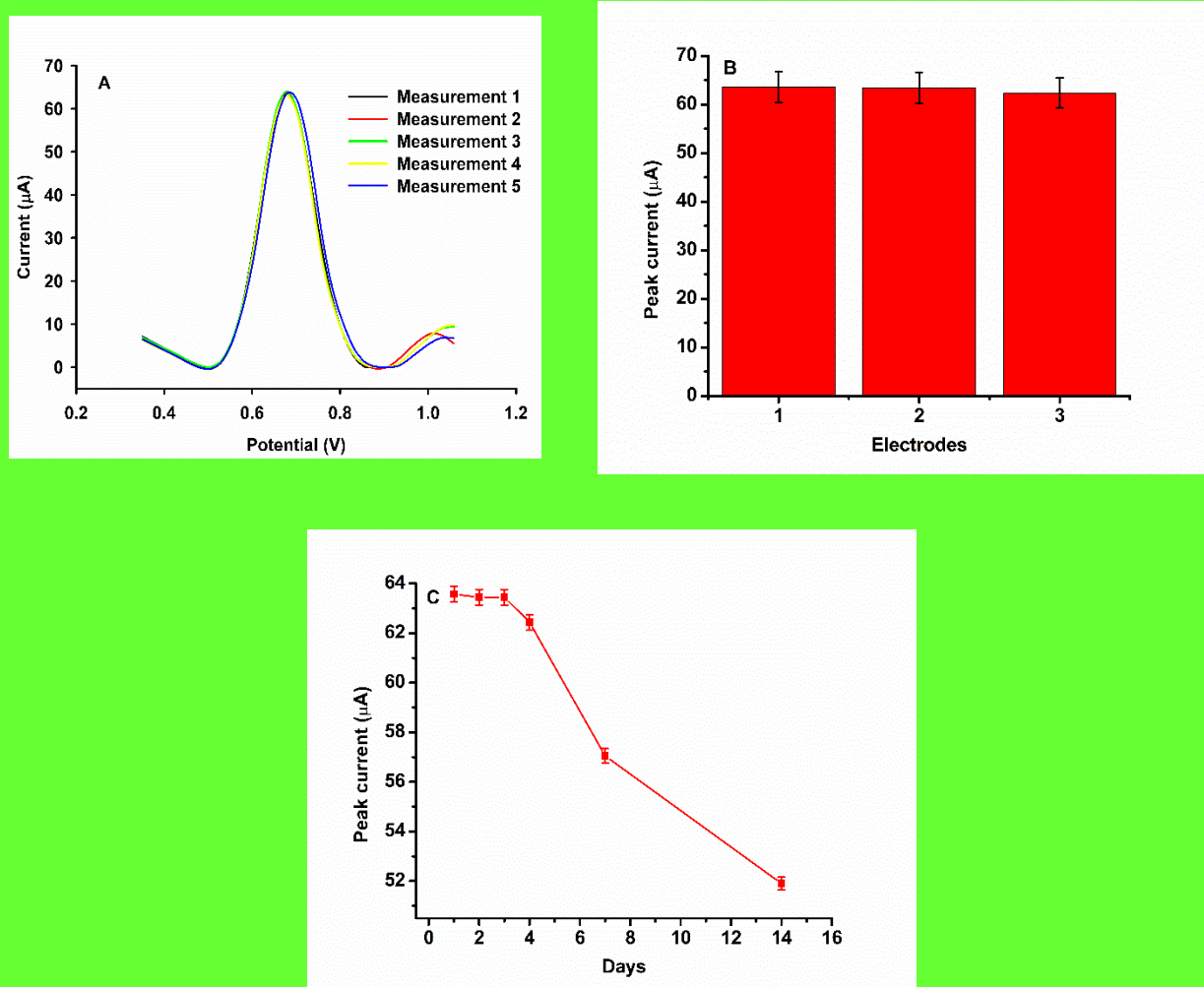
În plus, erorile relative ale semnalului intensitatii curentului sunt mai mici de 5,0% chiar și în prezența unui exces de concentrații de 100 de ori de  $K^+$ , acesulfam K și benzoat de sodiu; concentrații de 50 de ori de  $Fe^{2+}$  și EDTA; concentrații de 25 de ori de  $Cu^{2+}$ ,  $Na^+$ , and  $Mg^{2+}$ ; și concentrații de 10 ori de sorbitol și glicerol, ceea ce sugerează că platforma MIP dezvoltată este selectivă pentru amarant. Deci, se poate afirma că MIP/ZnO-MWCNT/SPCE poate recunoaște selectiv amarantul dintr-o soluție complexă fără a fi nevoie de pretratări pentru separare.



**Fig. 9.** Rezultatele studiului de interferență ale platformei MIP/ZnO-MWCNT/SPCE folosind metoda DPV.

*Repetabilitate, reproductibilitate și stabilitate*

Repetabilitatea, reproductibilitatea și stabilitatea platformei MIP/ZnO-MWCNT/SPCE au fost investigate prin DPV utilizând o soluție de amarant (10  $\mu\text{M}$ ) în condiții optime de lucru. A fost investigată repetabilitatea uneia dintre platformele MIP, iar valoarea abaterii standard relative (RSD%) pentru cinci măsurători succesive s-a dovedit a fi de 0,2%, sugerând că platforma MIP propusă posedă o repetabilitate bună (Fig. 10A). Trei platforme MIP diferite au fost preparate în mod similar și evaluate pentru a determina reproductibilitatea lor. Valoarea RSD% obținută a fost de 0,9% ( $n = 5$ ), ceea ce arată o reproductibilitate excelentă, iar rezultatele sunt prezentate în Fig. 10B. Stabilitatea platformei dezvoltate a fost examinată timp de 2 săptămâni. În acest timp, platforma a fost depozitată într-o zonă uscată, ferită de lumină, la temperatura camerei. După cum se poate observa în Fig. 10C, după 2 săptămâni, răspunsul curentului de vârf al amarantului a scăzut la 81,6% din valoarea sa inițială, demonstrând că MIP/ZnO-MWCNT/SPCE are o stabilitate satisfăcătoare.



**Fig. 10.** (A) Repetability, (B) Reproducibility și (C) Stabilitatea în timp a platformei MIP/ZnO-

*Aplicare în probe farmaceutice și de apă*

Pentru a studia aplicabilitatea practică, a fost utilizată platforma MIP/ZnO-MWCNT/SPCE pentru a determina nivelul de amarant în diferite probe reale (Robitussin Junior, Aciclovir Arena, apă de la robinet și apă uzată), utilizând metoda standard de adăugare bazată pe analiză în trei exemplare a fiecărei probe. În plus, studiile de recuperare au fost efectuate în PBS pH 3,5 și 0,1 M KCl utilizând probe cu diferite concentrații de amarant pentru a valida acuratețea platformei propuse. Recuperările au variat de la 99,7% la 102%, iar valorile RSD au fost mai mici de 3,2% (Tabelul 2), ceea ce sugerează că platforma dezvoltată are o precizie bună pentru determinarea amarantului în probe farmaceutice și de apă. În experimentele noastre, nu am găsit limitări majore ale metodei dezvoltate.

**Tabel 1.** Detectarea amarantului în probe farmaceutice și de apă utilizând MIP/ZnO-MWCNT/SPCE.

Probe	Concentratia adaugata ( $\mu\text{M}$ )	Concentratia găsită ( $\mu\text{M}$ )	Recuperarea (%)	RSD (%)
Robitussin Junior	-	44.6	102 ± 0.92 [a]	2.2
	-	44.3	101 ± 0.15 [a]	0.3
	-	44.3	101 ± 0.11 [a]	0.2
Aciclovir Arena	0.10	0.10	100 ± 0.69 [a]	2.5
	1.00	1.02	102 ± 1.26 [a]	3.2
	10.0	10.0	99.9 ± 0.23 [a]	0.7
Apă de robinet	0.10	0.10	99.9 ± 0.14 [a]	0.5
	1.00	1.01	100 ± 0.10 [a]	0.2

	10.0	10.0	100 ± 0.24 [a]	0.4
Apă uzată	0.10	0.10	100 ± 0.60 [a]	1.7
	1.00	1.01	100 ± 0.27 [a]	0.6
	10.0	9.98	99.7 ± 0.29 [a]	0.7

<sup>a</sup>Deviatia standard (n = 3)

## Bibliografie

1. Pogacean F, Rosu M-C, Coros M, et al (2018) Graphene/TiO<sub>2</sub> -Ag based composites used as sensitive electrode materials for amaranth electrochemical detection and degradation. *J Electrochem Soc* 165:B3054–B3059. <https://doi.org/10.1149/2.0101808jes>
2. Mohammadzadeh Jahani P, Aflatoonian MR, Abbasi Rayeni R, et al (2022) Graphite carbon nitride-modified screen-printed electrode as a highly sensitive and selective sensor for detection of amaranth. *Food and Chemical Toxicology* 163:112962. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112962>
3. Gao Y, Li H, Tong J, Wang L (2021) A new voltammetric sensor based on poly(L-cysteine)/GR composite film modified electrode for the sensitive determination of amaranth in wastewater. *Environ Technol* 42:2385–2390. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1701569>
4. Beitollahi H, Garkani Nejad F, Dourandish Z, Tajik S (2022) A novel voltammetric amaranth sensor based on screen printed electrode modified with polypyrrole nanotubes. *Environ Res* 214:113725. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113725>
5. Wu Y, Li G, Tian Y, et al (2021) Electropolymerization of molecularly imprinted polypyrrole film on multiwalled carbon nanotube surface for highly selective and stable determination of carcinogenic amaranth. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 895:115494. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115494>
6. Alizadeh M, Demir E, Aydogdu N, et al (2022) Recent advantages in electrochemical monitoring for the analysis of amaranth and carminic acid as food color. *Food and Chemical Toxicology* 163:112929. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112929>
7. Tang TX, Xu XJ, Wang DM, et al (2015) A Rapid and Green Limit Test Method for Five Synthetic Colorants in Foods Using Polyamide Thin-layer Chromatography. *Food Anal Methods* 8:459–466. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9907-6>
8. Wu H, Guo JB, Du LM, et al (2013) A rapid shaking-based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food colourants in soft drinks, sugar- and gelatin-based confectionery by high-performance liquid chromatography. *Food Chem* 141:182–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.015>
9. Sha O, Zhu X (2015) Simultaneous ionic liquid aqueous two-phase extraction and spectrophotometric determination of amaranth and brilliant blue in food samples. *Journal of Analytical Chemistry* 70:558–565. <https://doi.org/10.1134/S1061934815050123>
10. Martin F, Oberson JM, Meschiari M, Munari C (2016) Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC-MS in selected matrices. *Food Chem* 197:1249–1255. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.067>

11. Feng J, Li J, Huang W, et al (2021) Capillary Zone Electrophoresis Determination of Five Trace Food Additives in Beverage Samples Using Counterflow Transient Isotachophoresis. *Food Anal Methods* 14:380–388. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01894-1>
12. Khosrokhavar R, Motaharian A, Milani Hosseini MR, Mohammadsadegh S (2020) Screen-printed carbon electrode (SPCE) modified by molecularly imprinted polymer (MIP) nanoparticles and graphene nanosheets for determination of sertraline antidepressant drug. *Microchemical Journal* 159:105348. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105348>
13. Ayankojo AG, Reut J, Ciocan V, et al (2020) Molecularly imprinted polymer-based sensor for electrochemical detection of erythromycin. *Talanta* 209:120502. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120502>
14. Afzali Z, Mohadesi A, Ali Karimi M, Fathirad F (2022) A highly selective and sensitive electrochemical sensor based on graphene oxide and molecularly imprinted polymer magnetic nanocomposite for patulin determination. *Microchemical Journal* 177:107215. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107215>
15. Prabhu K, Malode SJ, Shetti NP, Kulkarni RM (2022) Analysis of herbicide and its applications through a sensitive electrochemical technique based on MWCNTs/ZnO/CPE fabricated sensor. *Chemosphere* 287:132086. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132086>
16. Fathirad F, Afzali D, Mostafavi A, et al (2013) Fabrication of a new carbon paste electrode modified with multi-walled carbon nanotube for stripping voltammetric determination of bismuth(III). *Electrochim Acta* 103:206–210. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.03.162>
17. Afzali D, Padash M, Fathirad F, Mostafavi A (2015) Determination of trace amounts of antimony(III) based on differential pulse voltammetric method with multi-walled carbon-nanotube-modified carbon paste electrode. *Ionics (Kiel)* 21:565–570. <https://doi.org/10.1007/s11581-014-1200-6>
18. Afzali D, Fathirad F, Ghaseminezhad S (2016) Determination of trace amounts of ochratoxin A in different food samples based on gold nanoparticles modified carbon paste electrode. *J Food Sci Technol* 53:909–914. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2016-8>
19. Afzali D, Zarei S, Fathirad F, Mostafavi A (2014) Gold nanoparticles modified carbon paste electrode for differential pulse voltammetric determination of eugenol. *Materials Science and Engineering C* 43:97–101. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.035>
20. S. K. Shukla, C. S. Kushwaha, N. B. Singh (2017) Recent developments in conducting polymer based composites for sensing devices. In: *Materials Today: Proceedings*. pp 5672–5681
21. Naveen MH, Gurudatt NG, Shim YB (2017) Applications of conducting polymer composites to electrochemical sensors: A review. *Appl Mater Today* 9:419–433
22. Afzali D, Fathirad F (2016) Determination of zearalenone with a glassy carbon electrode modified with nanocomposite consisting of palladium nanoparticles and a conductive polymeric ionic liquid. *Microchimica Acta* 183:2633–2638. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1907-3>
23. Fathirad F, Mostafavi A, Afzali D (2017) Conductive polymeric ionic liquid/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite as an efficient catalyst for the voltammetric determination of amlodipine besylate. *J AOAC Int* 100:406–413. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0216>

24. Kumar N, Goyal RN (2020) Simultaneous determination of melatonin and 5-hydroxytryptophan at the disposable poly-(melamine)/poly-(o-aminophenol) composite modified screen printed sensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 874:114458. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114458>
25. Mostafiz B, Bigdeli SA, Banan K, et al (2021) Molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode (MIP-CPE)-based sensors for the sensitive detection of organic and inorganic environmental pollutants: A review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 32:e00144
26. Ahmad OS, Bedwell TS, Esen C, et al (2019) Molecularly imprinted polymers in electrochemical and optical sensors. *Trends Biotechnology* 37:294–309
27. Chen L, Wang X, Lu W, et al (2016) Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chem Soc Rev* 45:2137–2211
28. Wu S, Yin ZZ, Chen X, et al (2020) Electropolymerized melamine for simultaneous determination of nitrite and tartrazine. *Food Chem* 333:127532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127532>
29. Fanjul-Bolado P, Queipo P, Lamas-Ardisana PJ, Costa-García A (2007) Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. *Talanta* 74:427–433. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.07.035>
30. Cao Q, Zhao H, Zeng L, et al (2009) Electrochemical determination of melamine using oligonucleotides modified gold electrodes. *Talanta* 80:484–488. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.006>
31. Liu X, Cao L, Song W, et al (2011) Functionalizing metal nanostructured film with graphene oxide for ultrasensitive detection of aromatic molecules by surface-enhanced Raman spectroscopy. *ACS Appl Mater Interfaces* 3:2944–2952. <https://doi.org/10.1021/am200737b>
32. Zanello P (2003) *Inorganic Electrochemistry Theory, Practice and Application*. The Royal Society of Chemistry
33. Bard AJ, Faulkner LR (2001) *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Ed., Wiley
34. He Q, Liu J, Liu X, et al (2018) Manganese dioxide Nanorods/electrochemically reduced graphene oxide nanocomposites modified electrodes for cost-effective and ultrasensitive detection of Amaranth. *Colloids Surf B Biointerfaces* 172:565–572. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.005>
35. Jing S, Zheng H, Zhao L, et al (2017) Electrochemical sensor based on poly(sodium 4-styrenesulfonate) functionalized graphene and Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle clusters for detection of amaranth in soft drinks. *Food Anal Methods* 10:3149–3157. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0889-z>
36. D. K. Gosser Jr. (1993) *Cyclic voltammetry, simulation and analysis of reaction mechanisms*. VCH Publisher, New York
37. Laviron E (1979) General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J Electroanal Chem Interf Electrochem* 101:19–28
38. Akbari S (2022) A new voltammetric sensor according to graphene quantum dots/ionic liquid modified carbon paste electrode for amaranth sensitive determination. *Int J Environ Anal Chem* 102:789–803. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1726338>

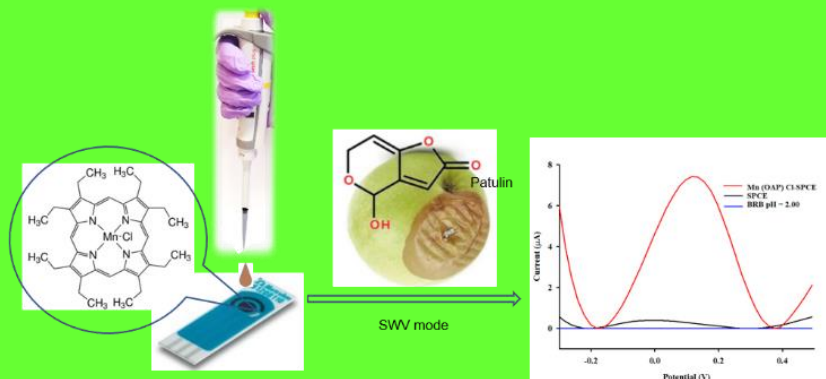


39. Nuñez-Dallos N, Macías MA, OlimpoGarcía-Beltrán, et al (2018) Voltammetric determination of amaranth and tartrazine with a new double-stranded copper(II) helicate-single-walled carbon nanotube modified screen printed electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 822:95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.05.017>
40. Tajik S, Orooji Y, Karimi F, et al (2021) High performance of screen-printed graphite electrode modified with Ni–Mo–MOF for voltammetric determination of amaranth. *Journal of Food Measurement and Characterization* 15:4617–4622. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01027-0>
41. Akkapinyo C, Subannajui K, Poo-Arporn Y, Poo-Arporn RP (2021) Disposable electrochemical sensor for food colorants detection by reduced graphene oxide and methionine film modified screen printed carbon electrode. *Molecules* 26:2312. <https://doi.org/10.3390/molecules26082312>
42. Tajik S, Beitollahi H, Jang HW, Shokouhimehr M (2020) A simple and sensitive approach for the electrochemical determination of amaranth by a Pd/GO nanomaterial-modified screen-printed electrode. *RSC Adv* 11:278–287. <https://doi.org/10.1039/d0ra08723h>
43. Li L, Zheng H, Guo L, et al (2019) A sensitive and selective molecularly imprinted electrochemical sensor based on Pd-Cu bimetallic alloy functionalized graphene for detection of amaranth in soft drink. *Talanta* 197:68–76. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.009>
44. Deepeka J, Kaur P, Kumar V, et al (2023) Appraising the electrocatalytic performance of beta-cyclodextrin embellished supramolecular recognition system for pernicious food colorants. *Anal Chim Acta* 1240:340753. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340753>
45. Chen Y, Sun Y, Wang R, et al (2023) One-pot synthesis of a novel conductive molecularly imprinted gel as the recognition element and signal amplifier for the selective electrochemical detection of amaranth in foods. *Biosens Bioelectron* 228:115185. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115185>

## **Test rapid de screening din sucurile de mere și apele de suprafață pentru recunoașterea și cuantificarea patulinei**

- O metodă rapidă de screening bazată pe utilizarea unui electrod serigrafiat a fost propusă pentru testarea la fața locului a patulinei din sucurile de mere și ape. Designul electrodului serigrafic s-a bazat pe imobilizarea fizică a clorurii de 2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfina mangan (III).
- Utilizarea senzorului serigrafiat modificat ca instrument de screening rapid al probelor de apă și sucuri de mere este un pas important în analiza calității alimentelor.
- Principalul impact al utilizării unei astfel de metode se reflectă în puritatea apei și al sucurilor de mere, care vor influența și mai mult starea de sănătate a populației.





Imagine reprezentativa

## INTRODUCERE

Patulina (PAT) este o micotoxină care poate fi găsită în apă, mere și produse din mere.<sup>1</sup> Mucegaiurile precum *Aspergillus Penicillium expansum*, *Byssochlamys* și alte specii de *Penicillium* sunt responsabile de producerea acesteia. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a stabilit că valoarea conținutului de PAT din produsele pe bază de fructe trebuie să fie mai mică de 0.4 micrograme per kilogram din greutatea corporală a consumatorului. Uniunea Europeană (UE) a decis că valoarea concentrației maxime de PAT în sucul de fructe trebui să fie de 10 micrograme per kilogram din greutatea corporală a unui sugar și de 50 de micrograme per kilogram din greutatea corporală a unui adult.<sup>2</sup> Prin urmare, este important să se dezvolte metode analitice sensibile pentru detectarea PAT. S-au dezvoltat metode analitice pentru detectarea PAT, precum cromatografia lichidă (LC),<sup>3</sup> cromatografia în strat subțire (TLC),<sup>4</sup> cromatografia lichidă în tandem cu spectrometria de masă (LC-MS/MS),<sup>5</sup> cromatografia gazoasă cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS),<sup>6</sup> și electroforeza capilară (CE).<sup>7</sup> Aceste metode sunt sensibile și precise, dar necesită adesea echipamente costisitoare, voluminoase și mult timp pentru pregătirea probelor. Metodele electroanalitice au primit o importanță deosebită în domeniul determinării PAT datorită avantajelor lor precum viteza, simplitatea de operare, sensibilitatea ridicată și portabilitatea.<sup>8</sup>

Tehnologia de serigrafie a avansat semnificativ de-a lungul timpului pentru analiza electrochimică a substanțelor.<sup>9</sup> Proiectarea senzorilor poate fi realizată la un cost scăzut cu reproductibilitate și uniformitate bună folosind procesul de serigrafie.<sup>10</sup> Un electrod serigrafiat este format dintr-un substrat chimic inactiv pe care cei trei electrozi – electrodul de lucru, de referință și contra-electrodul – sunt imprimați printr-o metodă de

serigrafie.<sup>11</sup> Gama extinsă de modificări ale electrodului serigrafiat a deschis numeroase domenii de aplicare pentru analiza mediului și a alimentelor.<sup>12</sup> Materialele de carbon din electrozii serigrafiați sunt adesea folosite pentru realizarea electrozilor de lucru, deoarece au un curent de fond scăzut, o suprafață care poate fi curățată cu ușurință și un domeniu larg de potențial.<sup>13</sup> Aceste materiale au o mulțime de beneficii deoarece sunt ieftine, ușor de utilizat, inerte din punct de vedere chimic și pot fi utilizate atât în formele lor nemodificate, cât și în cele modificate.<sup>14</sup> Electrozii de carbon serigrafiați (SPCE) sunt flexibili deoarece suprafața electrodului de lucru poate fi modificată în mai multe moduri.<sup>15,16</sup> O varietate de substraturi pot fi utilizate pentru a modifica suprafața SPCE-urilor îmbunătățindu-le funcționalitățile și aplicațiile.<sup>17</sup>

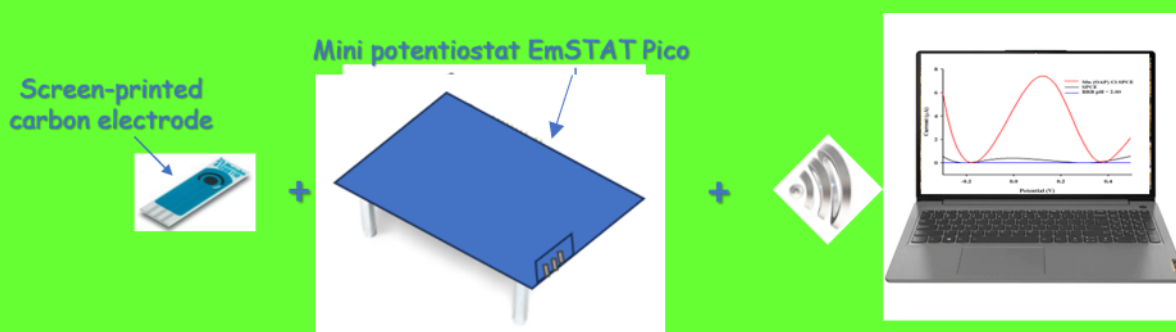
Porfirinele sunt o clasă de compuși organici macrociclici care includ patru inele pirol legate prin punți de metină, precum și diverși ioni metalici care sunt încadrați în miezul macrociclic. Datorită capacităților excepționale de transfer de electroni și fotoluminiscente, porfirinele s-au folosit până în prezent într-o varietate de domenii, precum electrocataliză, dispozitive optice și senzori chimici.<sup>18</sup>

Pentru a îmbunătăți designul senzorilor și activitatea de suprafață, este necesar să se introducă un material care posedă activitate electrocatalitică la suprafața electrodului. Electrozi modificați cu mangan-porfirina au fost utilizați în detecția electrochimică a peroxidului de hidrogen,<sup>19</sup> cisteinei,<sup>20</sup> nitrobenzenului,<sup>21</sup> bromatului,<sup>22</sup> riboflavinei<sup>23</sup> și acidului uric<sup>24</sup> datorită activității lor catalitice ridicate.

În studiul nostru de cercetare, am modificat suprafața electrodului de carbon serigrafiat cu 2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfină mangan (III) clorură (Mn (OAP) Cl). Determinarea PAT din probele de suc de mere și apă au arătat utilizarea practică a senzorului dezvoltat. Comportamentul electrochimic al electrodului modificat s-a obținut utilizând voltametria ciclică (CV), spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS) și voltametria cu undă pătrată (SWV). Noutatea acestei cercetări în comparație cu metodele propuse până în prezent pentru determinarea PAT a fost dată de utilizarea Mn (OAP) Cl în designul senzorului și de posibilitatea efectuării testului de screening rapid din probele de sucuri de mere și a apelor de suprafață.

## **PREGĂTIREA SPCE-URILOR MODIFICATE**

Suprafața electrodului de lucru a fost modificată prin picurarea a 20  $\mu\text{L}$  de Mn (OAP) Cl, soluție de concentrație  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  în tetrahidrofuran, apoi solventul se lasă să se evapore complet la temperatura camerei. Înainte și după utilizare, SPCE-urile se spală cu apă deionizată și apoi să lasă la uscat. Aceștia au fost păstrați la temperatură ambiantă, loc uscat și feriți de lumină atunci când nu s-au folosit. Comportamentul electrochimic pe suprafața SPCE-urilor nemodificate și modificate a fost studiat folosind CV și EIS. Suprafața sistemului cu trei electrozi a fost acoperită cu soluții pentru măsurători. Toate cercetările electrochimice au fost efectuate la temperatura ambiantă.



**Schema 1.** Procedura analitică pentru determinarea PAT.

Toate determinările SWV au fost efectuate pe un interval de potențial de  $-0.5 - +0.5 \text{ V}$ , treapta de potențial de  $0.02 \text{ V}$ , amplitudine de  $0.1 \text{ V}$  și frecvența de  $20.00 \text{ Hz}$  așa cum sunt prezentate în Tabelul 1.

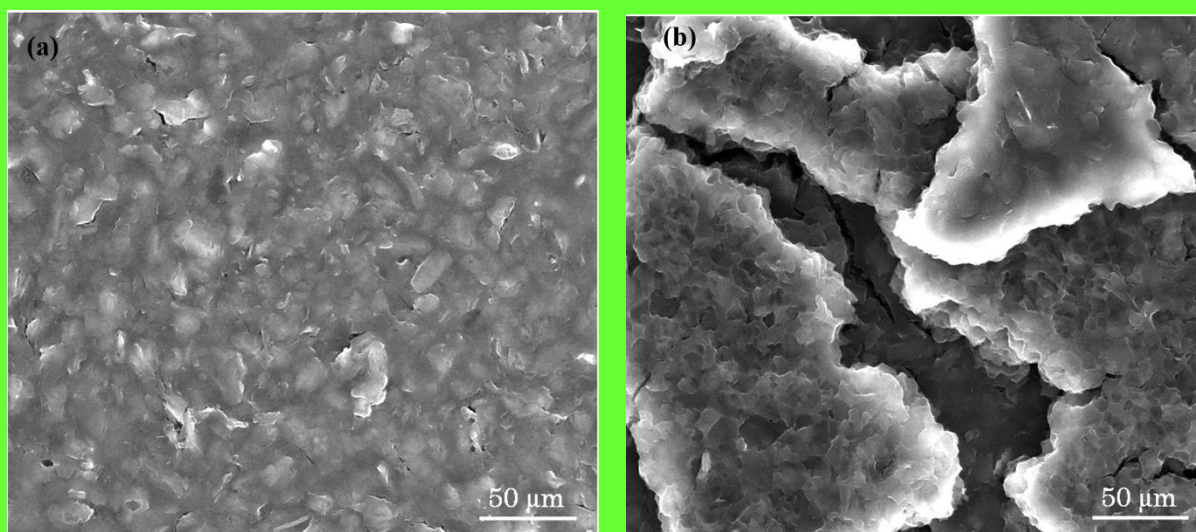
**Tabel 1.** Parametrii de lucru pentru SWV.

Parametrii SWV	Valoare
Timpul de echilibru (s)	0
Treapta de potențial (V)	0.02
Amplitudine (V)	0.10
Frecvența (Hz)	20.00

## REZULTATE SI DISCUTII

**Caracterizarea prin microscopie electronică cu scanare (SEM).** S-a folosit analiza SEM pentru caracterizarea morfologică a suprafeței senzorului nemodificat și modificat, așa cum se arată în Figura 1.

Rezultatele analizei calitative indică faptul că suprafața sensorului nemodificat este uniformă și lipsită de orice fisuri, spre deosebire de sensorul modificat.

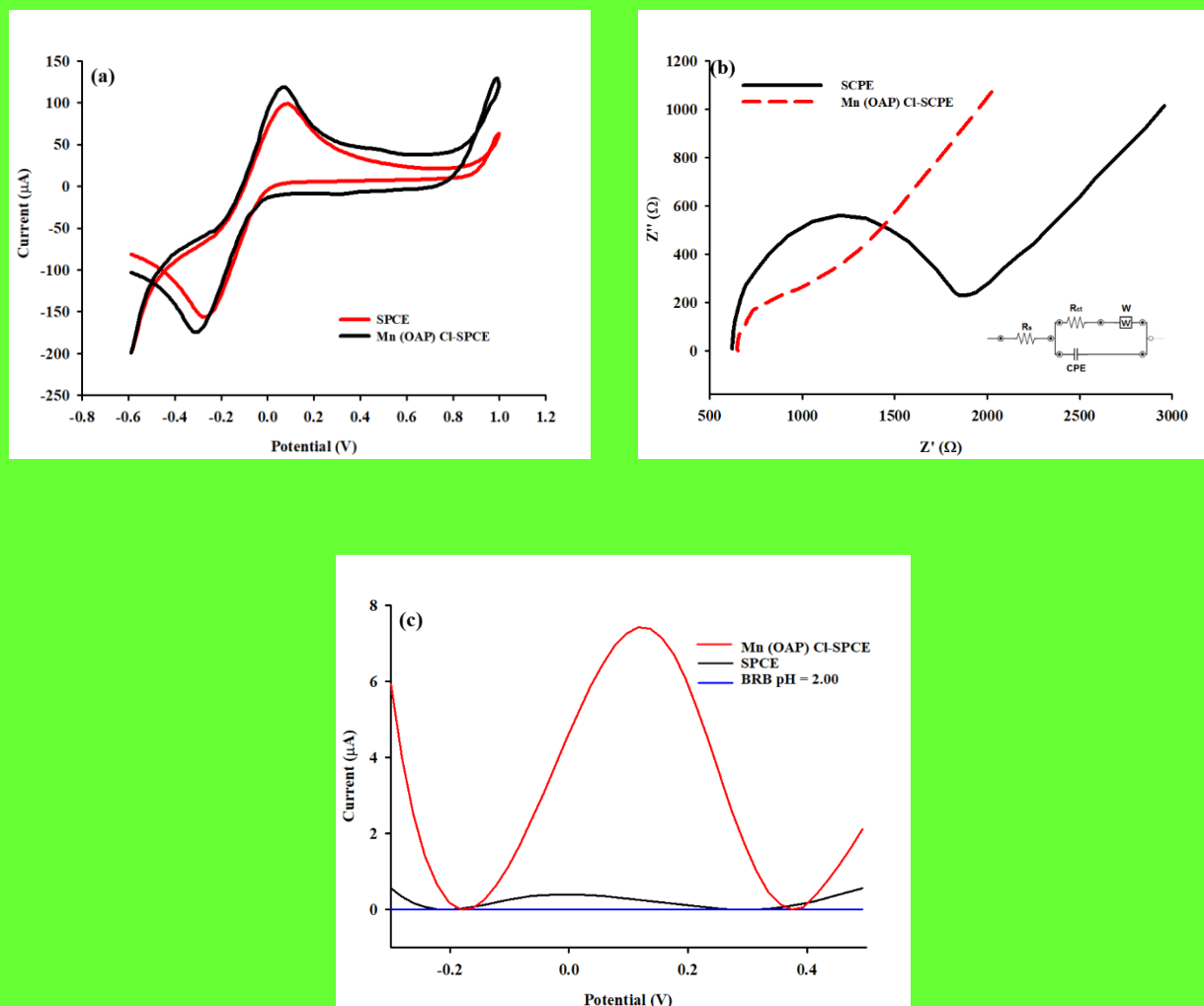


**Figura 1.** Imagini SEM ale senzorilor (a) SPCE și (b) Mn (OAP) Cl/SPCE.

**Caracterizarea electrochimică a senzorilor.** Metodele CV și EIS au fost utilizate pentru caracterizarea electrochimică a senzorilor SPCE și Mn (OAP) Cl/SPCE. Voltamogramele ciclice din Figura 2a au fost înregistrate într-o soluție de  $5.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  fericianură de potasiu (în  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl) pe un domeniu de  $-0.6 - +1.0 \text{ V}$ , cu o rată de scanare de  $0.1 \text{ Vs}^{-1}$ , folosind SPCE și Mn (OAP) Cl/SPCE ca electrozi de lucru. Modificarea electrodului SPCE cu Mn (OAP) Cl a condus la o electroactivitate crescută. Porfirinele acționează ca modificatori, care este unul dintre motivele conductivității crescute. Porfirinele pot controla reacțiile redox de care sunt responsabili analiții țintă. Acestea arată că schimbarea a avut loc și că răspunsul electrochimic a fost îmbunătățit. Studiul EIS a fost realizat pentru a analiza interfața senzorilor pe o gamă largă de frecvențe, de la  $1.00 \times 10^5$  la  $1.00 \times 10^{-1} \text{ Hz}$ . Fiecare măsurătoare EIS a fost făcută într-o soluție care conține  $5.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  fericianură de potasiu (în  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl). După cum se poate observa în diagramele Nyquist (Figura 2b), SPCE a prezentat un semicerc mare, ceea ce înseamnă că a avut o rezistență electrică mare ( $R_{ct} = 1.14 \times 10^3 \Omega$ ). Spectrele de impedanță au fost realizate folosind diagrama de circuit echivalent al interfeței electrochimice, care reprezintă rezistența soluției ( $R_s$ ), parametrul de fază constantă (CPE), rezistența la transferul de electroni ( $R_{ct}$ ) și rezistența la difuzie Warburg ( $Z_w$ ) (Figura 2b). După modificarea SPCE cu Mn (OAP) Cl, s-a obținut un semicerc cu diametru mai mic ( $R_{ct} = 3.73 \times 10^2 \Omega$ ). Diametrul mai mic al semicercului și valoarea  $R_{ct}$  mai mică arată că Mn (OAP) Cl/SPCE accelerează viteza cu care sunt

transferații electronii. Rezultatele obținute prin EIS în soluția cu fericianură de potasiu de concentrație  $5.00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (în 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl) confirmă rezultatele obținute prin metoda CV.

Comportamentul electrochimic al SPCE și Mn (OAP) Cl/SPCE a fost, de asemenea, studiat prin utilizarea tehnicii SWV în PAT de concentrație  $1.00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> care conține BRB pH 2.00 și NaCl 0.1 mol L<sup>-1</sup> ca electrolit suport. După cum se arată în Figura 2c, senzorul Mn (OAP) Cl/SPCE a arătat o oxidare a PAT mai ridicată față de senzorul nemodificat SPCE.



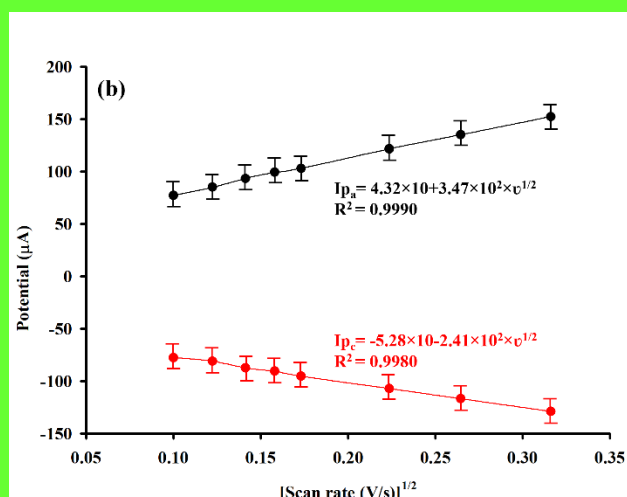
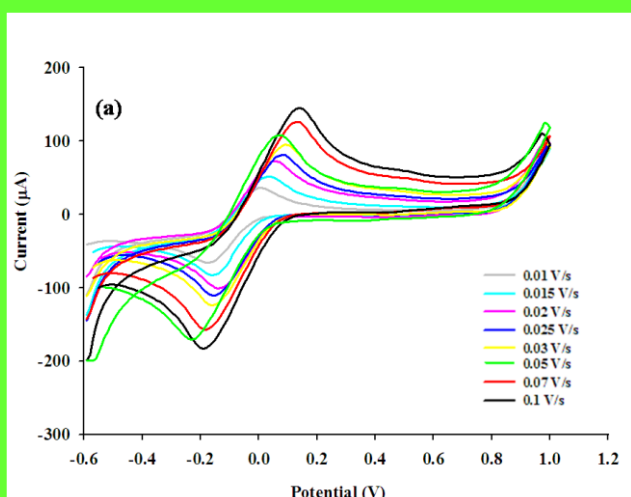
**Figura 2.** (a) Voltamograme ciclice în soluție de fericianură de potasiu de concentrație  $5.00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (în 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl) pentru SPCE, Mn (OAP) Cl/SPCE; (b) Spectre de impedanță în soluție de fericianură de potasiu de concentrație  $5.00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (în 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl) pentru SPCE, Mn (OAP) Cl/SPCE; (c) Voltamograme SWV în soluții

de PAT  $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  care conține pH 2.00 BRB și NaCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  pentru SPCE, Mn (OAP) Cl/SPCE și BRB pH 2.00.

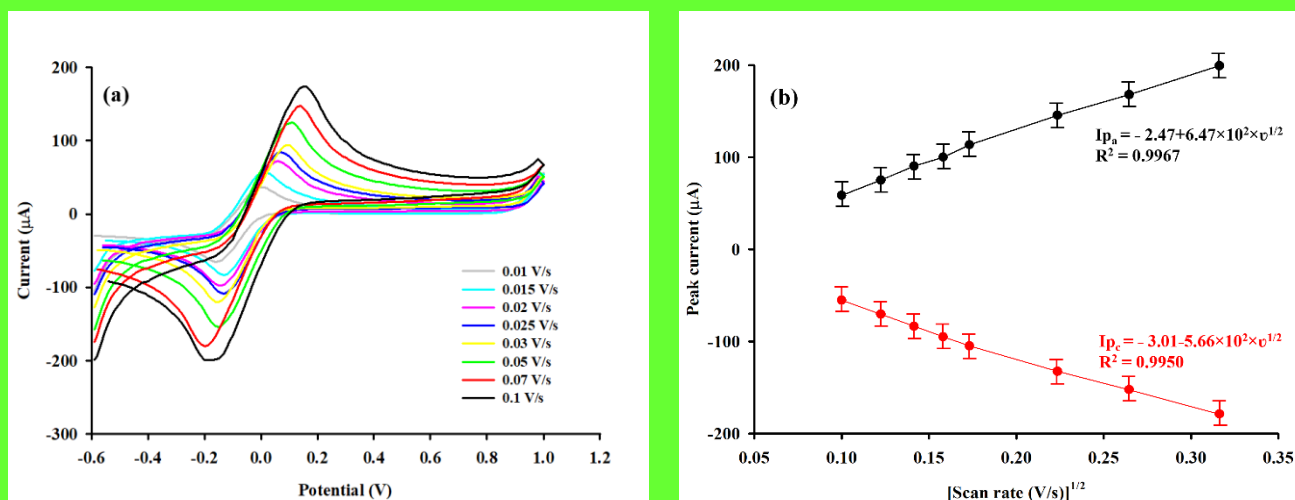
Datele EIS au condus la alegerea circuitului echivalent Randles. Pentru procesele cvasi-reversibile, ecuația Randles-Sevcik<sup>26</sup> a fost utilizată pentru a examina activitatea electrocatalitică a senzorilor; prin urmare, pentru senzorul Mn (OAP) Cl/SPCE s-a obținut o suprafață electroactivă de  $0.0015 \text{ cm}^2$  față de  $0.0010 \text{ cm}^2$  pentru senzorul SPCE. Ecuația (1) arată intensitatea curentului de pic:

$$I_p = \pm(2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D_R^{1/2} \nu^{1/2} \quad (1)$$

unde  $I_p$  este curentul de pic ( $\mu\text{A}$ ), notația „+” corespunde lui  $I_{pa}$ , în timp ce „-” corespunde  $I_{pc}$ ,  $n$  este numărul de electroni transferați (în acest caz  $n=1$ ),  $A$  este aria suprafeței active a electrodului ( $\text{cm}^2$ ),  $C_0$  este concentrația de fericianură de potasiu ( $\text{mol cm}^{-3}$ ),  $D_R$  este coeficientul de difuzie ( $7.60 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) și  $\nu$  este viteza de scanare ( $\text{Vs}^{-1}$ ). Pentru electrozii nemodificați și modificați, atât vârfurile anodice ( $I_{pa}$ ) cât și cele catodice ( $I_{pc}$ ) au arătat o dependență liniară față de rădăcina pătrată a ratei de scanare, indicând un proces redox controlat de difuzie. Experimentul s-a realizat într-o soluție de fericianură de potasiu cu concentrația de  $5.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  și KCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  (Figurile 3a și 4a). Dependența liniară a  $I_{pa}$  și  $I_{pc}$  față de  $\nu^{1/2}$  este prezentată în Figurile 3b și 4b.



**Figura 3.** (a) Voltamograme ciclice pentru senzorul SPCE în domeniul ratelor de scanare de la  $0.01 \text{ V s}^{-1}$  la  $0.1 \text{ V s}^{-1}$  în fericianură de potasiu  $5.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (în  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ); (b) dependența curenților de pic față de rădăcina pătrată a ratei de scanare.

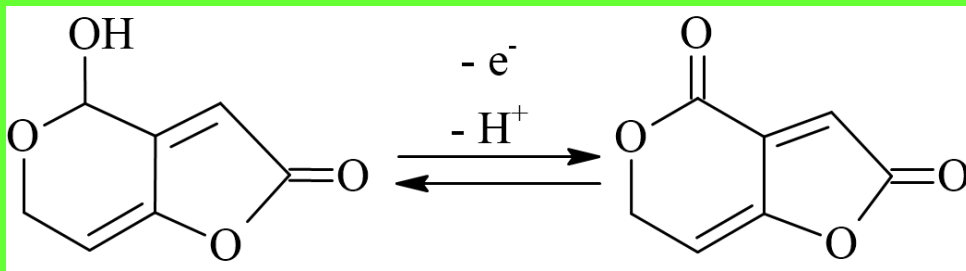


**Figura 4.** (a) Voltamograme ciclice pentru senzorul Mn (OAP) Cl/SPCE în domeniul ratelor de scanare de la  $0.01 \text{ V s}^{-1}$  la  $0.1 \text{ V s}^{-1}$  în fericianură de potasiu  $5.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (în  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ); (b) dependența curenților de pic față de rădăcina pătrată a ratei de scanare.

### OPTIMIZAREA PH-ULUI ȘI A ELECTROLITULUI SUPORT

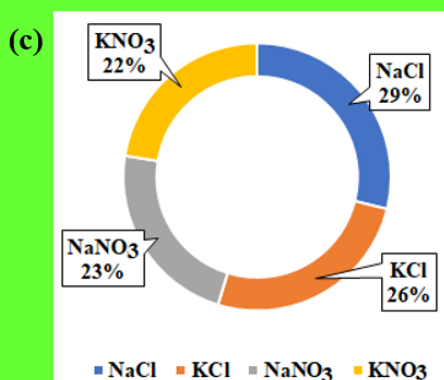
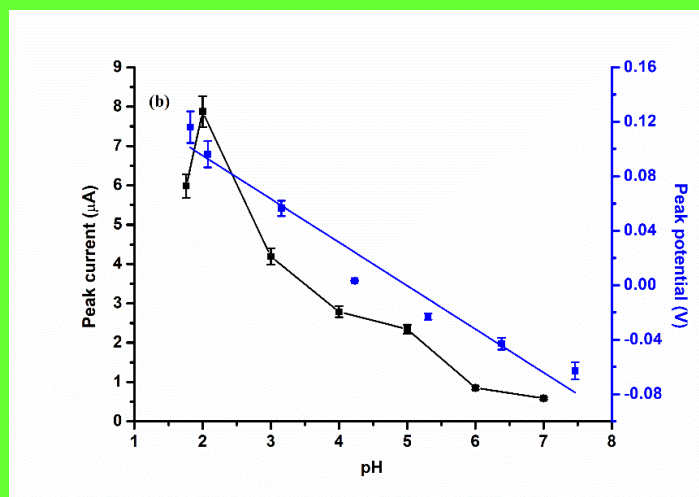
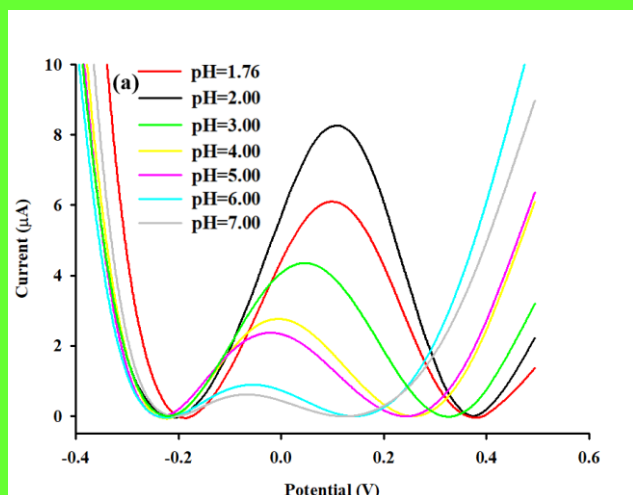
Pentru a îmbunătăți condițiile de lucru, s-au optimizat pH-ul și electrolitul suport asupra oxidării PAT. A fost investigată influența pH-ului soluțiilor de tampon Britton-Robinson (BRB) la diferite valori ale acestuia cuprinse între 1.76 și 7.00 care conțin PAT de concentrație  $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Figura 5a arată că vârful maxim de oxidare pentru PAT a fost atins într-un mediu acid la un  $\text{pH}=2.00$ , care este mai mic decât valoarea  $\text{pK}_a$  de 11.7. Prin urmare,  $\text{pH}=2.00$  pentru soluția de BRB a fost aplicat la toate măsurătorile ulterioare. Figura 5b arată relația dintre potențialul de pic și pH. Conform relației liniare  $E_{p_a} = 0.16 - 0.034 \times \text{pH}$ , coeficientul de regresie a fost de 0.9549, iar valoarea pantei de 0.034 V este apropiată de valoarea teoretică nernstiană, astfel că în procesul redox sunt implicați același număr de electroni și protoni, așa cum se prezintă în Schema 2.





**Schema 2.** Mecanismul posibil de electrooxidare a patulinei în mediu acid.

Influența electroliților suport asupra electrooxidării PAT a fost studiată prin adăugarea a câte 0.1 mol L<sup>-1</sup> de NaCl, KCl, NaNO<sub>3</sub> și KNO<sub>3</sub> la concentrația de PAT de 1.00×10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> și BRB pH de 2.00. După cum se vede în Figura 5c, curentul maxim de pic a fost măsurat atunci când s-a utilizat NaCl 0.1 mol L<sup>-1</sup>. Prin urmare, NaCl de 0.1 mol L<sup>-1</sup> s-a utilizat ca electrolit suport în prepararea tuturor soluțiilor ulterioare.



**Figura 5.** (a) Diagrame SWV pentru PAT  $1.00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> în BRB la diferite valori de pH; (b) Efectul pH-ului asupra curentului de pic (pătrate negre) și dependența liniară a potențialului de pic de pH (pătrate albastre); (c) Efectul electroliților suport.

### EFFECTUL RATEI DE SCANARE ASUPRA OXIDĂRII PATULINEI

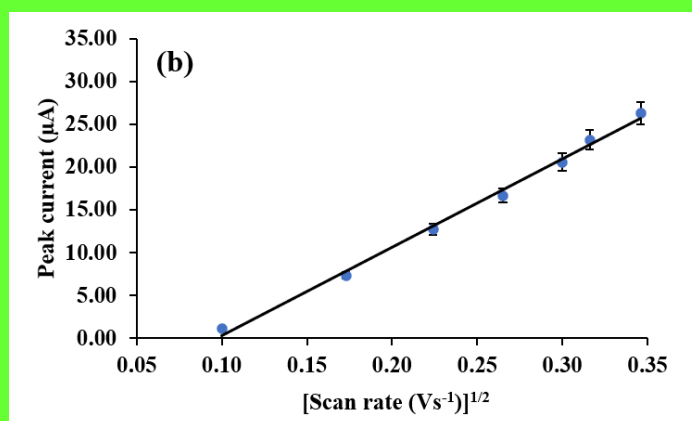
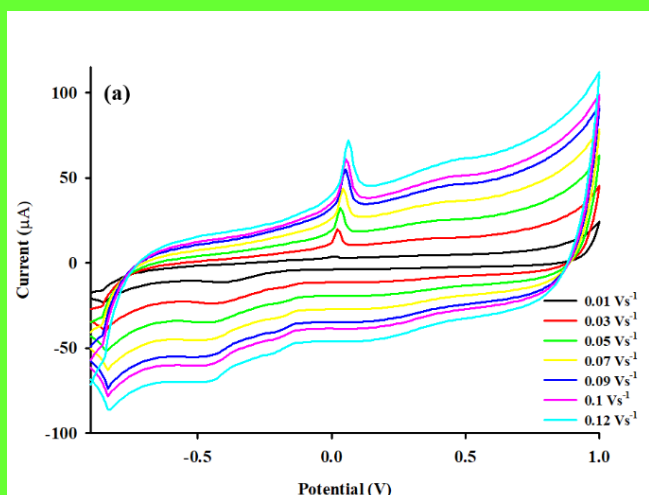
Metoda CV la diferite rate de scanare de la 0.01 la 0.12 V s<sup>-1</sup> a fost utilizată pentru a studia comportamentul electrochimic al PAT. Voltamogramele ciclice s-au realizat într-o soluție de BRB cu pH 2.00 care conține NaCl 0.1 mol L<sup>-1</sup> și PAT  $1.00 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>. Figura 6a arată că pe măsură ce rata de scanare a crescut, a crescut și curentul de pic anodic. Conform ecuației de regresie (2):

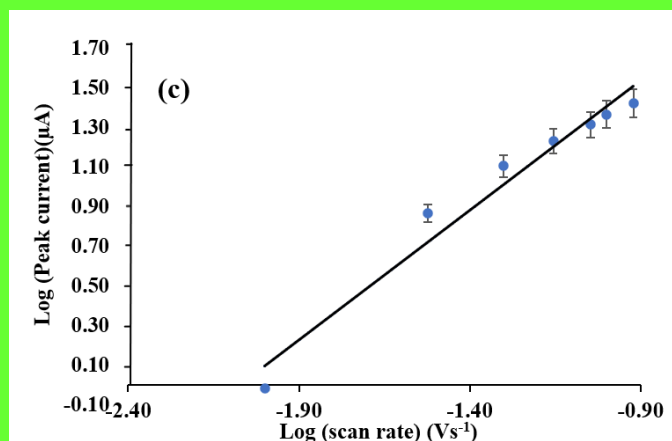
$$I_{pa} = -10.07 + 103.54 \times v^{1/2} \quad R^2 = 0,9966 \quad (2)$$

exista o dependență liniară între curentul de pic și rădăcina pătrată a ratei de scanare ( $v^{1/2}$ ) (Figura 6b). De asemenea s-a observat o dependență liniară între logaritmul intensității curentului în raport cu logaritmul ratei de scanare (Figura 6c), relație descrisă de ecuația de regresie (3):

$$\log I_{pa} = 2.71 + 1.30 \times \log v \quad R^2 = 0,9647 \quad (3)$$

Ca rezultat, s-a obținut o valoare de 1.30 pentru panta care este apropiată de procesul de adsorbție al PAT pe suprafața Mn (OAP) Cl/SPCE.



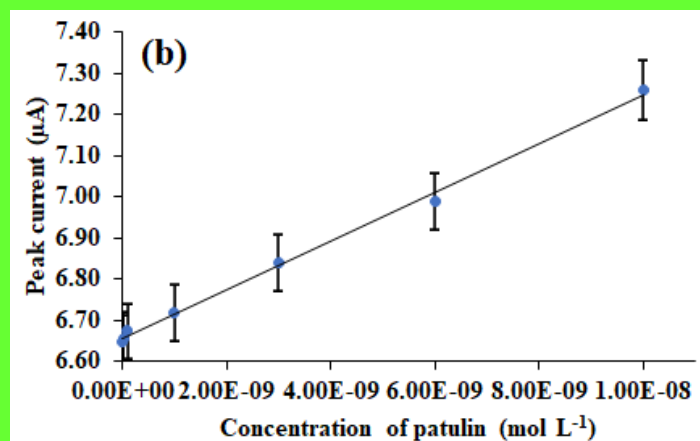
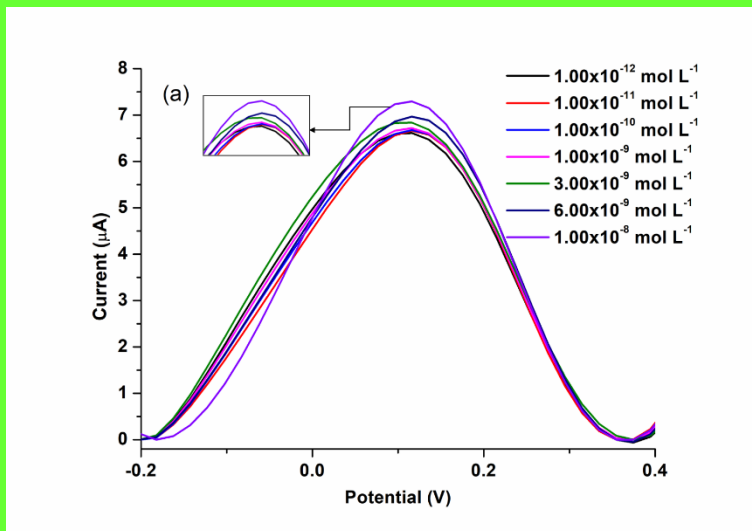


**Figura 6.** (a) Voltamograme ciclice la diferite rate de scanare de la 0.01 la 0.12 V s<sup>-1</sup>; (b) Corelația liniară a curentului de pic față de rădăcina pătrată a ratei de scanare; (c) Corelația liniară a logaritmului curentului de pic cu logaritmul ratei de scanare.

#### PERFORMANȚA ANALITICĂ

După optimizarea valorii pH-ului și a electrolitului suport, s-au studiat caracteristicile de răspuns ale senzorului Mn (OAP) Cl/SPCE. Diagramele SWV s-au realizat în BRB la pH 2.00 cu NaCl 0.1 mol L<sup>-1</sup> și diferite concentrații de PAT (Figura 7a). Trasarea răspunsului curentului de pic în funcție de concentrația PAT (Figura 7b) a determinat o dependență liniară în domeniul de concentrații 1.00×10<sup>-12</sup> și 1.00×10<sup>-8</sup>, caracterizată prin ecuația de regresie (4):

$$I_{pa} = 6.66 + 5.90 \times 10^7 \times C_{PAT} \quad R^2 = 0.9972, \quad n = 5 \quad (4)$$



**Figura 7.** (a) Diagrame SWV înregistrate în BRB pH 2.00, NaCl 0.1 mol L<sup>-1</sup> și PAT cu concentrația cuprinsă între 1.00×10<sup>-12</sup> și 1.00×10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>. (b) Curba de calibrare.

În acord cu ghidul ICH, au fost stabiliți parametrii de validare ai metodei propuse.<sup>27,28</sup> În Tabelul 2 sunt prezentate rezultatele obținute pentru metoda de lucru.

**Tabel 2.** Date de regresie ale curbelor de calibrare pentru determinarea cantitativă a PAT în BRB la pH 2.00.

Parametrii	Valoarea
Domeniul liniar (mol L <sup>-1</sup> )	1.00×10 <sup>-12</sup> – 1.00×10 <sup>-8</sup>
Intercept (µA)	6.66
Sensibilitatea (µA mol L <sup>-1</sup> )	5.90×10 <sup>7</sup>
Coeficient de corelație	0.9972
LOQ (mol L <sup>-1</sup> )	1.00×10 <sup>-12</sup>
LOD (mol L <sup>-1</sup> )	3.33×10 <sup>-13</sup>
Număr de puncte	7
RSD-ul intercept-ului (%)	3.93
RSD-ul pantei	8.60×10 <sup>-8</sup>

Următoarele ecuații:  $LOQ = 10\sigma/m$  și  $LOD = 3\sigma/m$ , s-au folosit pentru a determina limita de cuantificare (LOQ) și limita de detecție (LOD), unde  $\sigma$  este abaterea standard a curentului de pic pentru concentrația cea mai mică a PAT din curba de calibrare și  $m$  este panta din ecuația de calibrare; astfel, s-au obținut valori de  $1.00 \times 10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup> și  $3.33 \times 10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup> pentru LOQ și LOD. Domeniul larg de concentrații și valoarea LOD a Mn (OAP) Cl/SPCE pentru determinarea PAT au fost comparabile cu cele descrise în lucrările anterioare<sup>29,30</sup> și mai bune decât altele (Tabelul 3).<sup>31-34</sup>

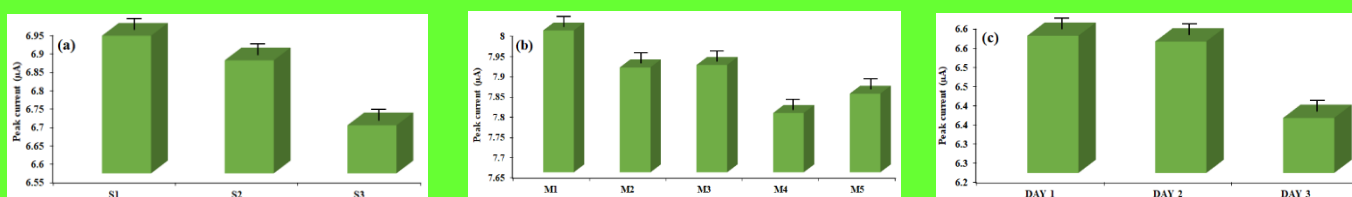
**Tabel 3.** Comparația performanțelor analitice obținute pentru determinarea PAT prin metoda de lucru propusă cu metode existente în literatură.

Metoda	Domeniul liniar (mol L <sup>-1</sup> )	LOD (mol L <sup>-1</sup> )	Referințe
Aptasenzor electrochimic	$3.20 \times 10^{-13} - 3.20 \times 10^{-6}$	$1.90 \times 10^{-13}$	29
SWV	$1.00 \times 10^{-12} - 25.00 \times 10^{-8}$	$3.33 \times 10^{-13}$	30
Voltametrie	$5.00 \times 10^{-8} - 6.00 \times 10^{-7}$	$6.60 \times 10^{-10}$	31
Voltametrie	$3.20 \times 10^{-8} - 1.28 \times 10^{-6}$	$3.20 \times 10^{-8}$	32
Imunosenzor impedimetric	$6.50 \times 10^{-11} - 6.50 \times 10^{-8}$	$6.36 \times 10^{-8}$	33
Potentiometrie	$1.30 \times 10^{-11} - 1.30 \times 10^{-8}$	$6.4 \times 10^{-12}$	34
SWV	$1.00 \times 10^{-12} - 1.00 \times 10^{-8}$	$3.33 \times 10^{-13}$	Lucrarea prezenta

### REPRODUCTIBILITATEA, REPETABILITATEA ȘI STABILITATEA SENZORILOR

Reproductibilitatea, repetabilitatea și stabilitatea senzorului Mn (OAP) Cl/SPCE au fost studiate într-o soluție de PAT cu concentrația de  $1.00 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>. Trei senzori modificați notați S1-S3 s-au folosit pentru testul de reproductibilitate. Deviația standard relativă (RSD) găsită a fost de 1.5 % (media a cinci măsurători). S-a analizat repetabilitatea măsurătorilor (M1-M5) pentru unul dintre senzorii modificați și s-a obținut valoarea de 0.9% pentru RSD (media de cinci măsurători). Stabilitatea senzorului Mn (OAP) Cl/SPCE a fost testată la trei zile după depozitarea la temperatură ambiantă și în loc uscat. În comparație cu primul răspuns, intensitatea curentului PAT a fost menținută la 93.5 %. Deși electrozii de carbon serigrafiați sunt pentru o singură utilizare,

rezultatele au arătat că senzorul Mn (OAP) Cl/SPCE este reproductibil, și stabil. Figura 8 reprezintă graficele pentru reproductibilitatea, repetabilitatea și stabilitatea senzorului modificat.



**Figura 8.** (a) Reproducibilitatea, (b) repetabilitatea și (c) stabilitatea Mn (OAP) Cl/SPCE.

### EVALUAREA POTENȚIALELOR SPECII INTERFERENTE

Compușii organici precum fructoza, glucoza, acidul ascorbic, aflatoxina  $M_1$  și ionii de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  și  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  ar putea interfera în determinarea patulinei în probele de suc de mere și ape. Selectarea potențialelor specii interferente se bazează pe compoziția probelor. Studiul s-a efectuat în BRB la pH 2.00, NaCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , PAT  $1.00 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  și diferite concentrații de potențiali interferenți. După cum se poate observa în Tabelul 4, rezultatele au arătat că excesele de 10 ori mai mari de acid ascorbic, glucoză și  $\text{Fe}^{2+}$ , de 50 de ori mai mari de  $\text{NO}_3^-$  și de 500 de ori mai mari de fructoză, aflatoxină  $M_1$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  și  $\text{Cl}^-$  nu au un efect asupra intensității curentului al PAT. Acest lucru a arătat că senzorul propus a fost bun pentru determinarea PAT. Nivelul de toleranță reprezintă cantitatea maximă de interferență care a produs o fluctuație a curentului de pic cu o eroare relativă și Bias de 5%.

**Tabel 4.** Efectele speciilor interferente pentru determinarea PAT.

Potențiale specii interferente	Concentrația potențialelor specii interferente ( $\text{mol L}^{-1}$ )	Nivel de toleranță	RSD (%)*	Bias (%)
$\text{NO}_3^-$	$5.00 \times 10^{-8}$	50	0.20	-4.01
Acid ascorbic	$1.00 \times 10^{-8}$	10	0.26	-0.09
Fructoza	$5.00 \times 10^{-7}$	500	0.11	-3.24
Glucoza	$1.00 \times 10^{-8}$	10	0.23	-0.55
$\text{Fe}^{2+}$	$1.00 \times 10^{-8}$	10	0.23	-0.09

CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	5.00×10 <sup>-7</sup>	500	1.23	-3.39
Cl <sup>-</sup>	5.00×10 <sup>-7</sup>	500	0.82	-0.12
Aflatoxina M <sub>1</sub>	5.00×10 <sup>-7</sup>	500	0.01	-1.81

\* Fiecare număr este media a cinci teste.

#### APLICATII ANALITICE

Pentru a testa aplicabilitatea senzorului modificat s-au folosit probe de apă și sucuri de mere (cumpărate de la o piață locală și preparate în casă). Probele s-au diluat cu BRB de pH 2.00 și NaCl 0.1 mol L<sup>-1</sup> în care s-au adăugat diferite concentrații de PAT. Toate probele au fost pregătite înainte de studiu. În scopuri statistice, toate măsurătorile au fost efectuate de cinci ori, iar mediile și abaterile standard au fost calculate. Tabelul 5 prezintă toate valorile pentru recuperare, RSD și Bias (%).

**Tabel 5.** Recuperări din probele de sucuri de mere și ape.

Probe	Adăugat (mol L <sup>-1</sup> )	Găsit (mol L <sup>-1</sup> )	Recuperarea (%)	RSD (%) <sup>*</sup>	Bias (%)
Suc de mere 1	1.00×10 <sup>-8</sup>	9.99×10 <sup>-9</sup>	99.88	0.06	0.12
	1.00×10 <sup>-9</sup>	9.84×10 <sup>-10</sup>	98.38	0.31	1.65
Suc de mere 2	1.00×10 <sup>-8</sup>	9.99×10 <sup>-9</sup>	99.86	0.61	0.14
	1.00×10 <sup>-9</sup>	9.78×10 <sup>-10</sup>	97.82	1.73	2.23
Suc de mere 3	1.00×10 <sup>-8</sup>	9.99×10 <sup>-9</sup>	99.85	1.30	0.15
	1.00×10 <sup>-9</sup>	9.82×10 <sup>-10</sup>	98.20	2.38	1.84
Apa 1	1.00×10 <sup>-8</sup>	9.91×10 <sup>-9</sup>	99.06	0.92	0.95
	1.00×10 <sup>-9</sup>	9.79×10 <sup>-10</sup>	97.87	0.13	2.18
Apa 2	1.00×10 <sup>-8</sup>	9.91×10 <sup>-9</sup>	99.11	1.84	0.90
	1.00×10 <sup>-9</sup>	9.65×10 <sup>-10</sup>	96.52	1.80	3.60
Apa 3	1.00×10 <sup>-8</sup>	9.96×10 <sup>-9</sup>	99.59	4.49	0.41
	1.00×10 <sup>-9</sup>	9.63×10 <sup>-10</sup>	96.27	1.37	3.88

\* Fiecare număr este media a cinci teste.



Metoda este fiabilă deoarece cu senzorul modificat s-au obținut rate de recuperare a patulinei din probe de 96.27–99.88%, RSD și Bias sub 5.00%.

Senzorul Mn (OAP) Cl/SPCE a arătat performanțe remarcabile pentru determinarea PAT, un domeniu larg de concentrație liniara, limită scăzută de detecție, reproductibilitate favorabilă.

Datorita rezultatelor excepționale, Mn (OAP) Cl/SPCE reprezintă un instrument sigur pentru diagnosticarea la fața locului în viitor.

## REFERINTE

(1) Sajid, M.; Mehmood, S.; Yuan, Y.; Yue, T. Mycotoxin patulin in food matrices: occurrence and its biological degradation strategies. *Drug Metab. Rev.* **2019**, 51 (1), 105-120.

(2) Commission of the European Communities, EC No 1881/ 2006. Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Food Stuffs. *Official Journal of the European Union* **2006**.

(3) Sadok, I.; Stachniuk, A.; Staniszewska, M. Developments in the Monitoring of Patulin in Fruits Using Liquid Chromatography: An Overview. *Food Anal. Methods* **2019**, 12, 76-93.

(4) Turkmen, Z.; Kurada, O. Rapid HPTLC determination of patulin in fruit-based baby food in Turkey. *JPC - J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* **2020**, 33 (3), 209–217.

(5) Ouhibi, S.; Vidal, A.; Martins, C.; Gali, R.; Hedhili, A.; De Saeger, S.; De Boevre, M. LC-MS/MS methodology for simultaneous determination of patulin and citrinin in urine and plasma applied to a pilot study in colorectal cancer patients. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, 136, 110994.

(6) Kharandi, N.; Babri, M.; Azad, J. A novel method for determination of patulin in apple juices by GC-MS. *Food Chem.* **2013**, 141, 1619–1623.

(7) Güray, T.; Yılmaz Tuncel, N.; Tunçel, M.; Uysal, U. D. Validated micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) method for determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey and comparison with HPLC. *Chem. Pap.* **2019**, 73, 2209–2220.

- (8) Zouari, M.; Campuzano, S.; Pingarrón, J. M.; Raouafi, N. Femtomolar direct voltammetric determination of circulating miRNAs in sera of cancer patients using an enzymeless biosensor. *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1104, 188–198.
- (9) Singh, S.; Wang, J.; Cinti, S. Review—An Overview on Recent Progress in Screen-Printed Electroanalytical (Bio)Sensors. *ECS Sensors Plus* **2022**, 1, 023401.
- (10) Metters, J. P.; Randviir, E. P.; Banks, C. E. Screen-printed back-to-back electroanalytical sensors. *Analyst* **2014**, 21, 1395339.
- (11) Hayat, A.; Marty, J. L. Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring. *Sensors (Basel)* **2014**, 14 (6), 10432-10453.
- (12) Trojanowicz, M. Impact of nanotechnology on the design of advanced screen-printed electrodes for different analytical applications. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, 84, 22-47.
- (13) Lawal, A. T. Synthesis and utilisation of graphene for fabrication of electrochemical sensors. *Talanta*, **2015**, 131, 424-443.
- (14) García-Miranda Ferrari, A.; Rowley-Neale, S. J.; Banks, C. E. Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field. *Talanta Open* **2021**, 3, 100032.
- (15) Agüí, L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: a review. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 622 (1-2), 11-47.
- (16) Pchelintsev, N. A.; Millner, P. A. A novel procedure for rapid surface functionalisation and mediator loading of screen-printed carbon electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 612 (2), 190-197.
- (17) Asefa, T.; Duncan, C. T.; Sharma, K. K. Recent advances in nanostructured chemosensors and biosensors. *Analyst* **2009**, 134, 1980-1990.
- (18) Kubendhiran, S.; Sakthinathan, S.; Chen, S. M.; Tamizhdurai, P.; Shanthi, K.; Karuppiah, C. Green reduction of reduced graphene oxide with nickel tetraphenyl porphyrin nanocomposite modified electrode for enhanced

electrochemical determination of environmentally pollutant nitrobenzene. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 497, 207-216.

(19) Sebarchievici, I.; Tăranu, B. O.; Birdeanu, M.; Rus, S. F.; Fagadar-Cosma, E. Electrocatalytic behavior and application of manganese porphyrin/gold nanoparticle-surface modified glassy carbon electrodes. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, 390, 131-140.

(20) Gallo, M. C.; Pires, B. M.; Toledo, K. C. F.; Jannuzzi, S. A. V.; Arruda, E. G. R.; Formiga, A. L. B.; Bonacin, J. A. The use of modified electrodes by hybrid systems gold nanoparticles/Mn-porphyrin in electrochemical detection of cysteine. *Synth. Met.* **2014**, 198, 335-339.

(21) Boakye, A.; Yu, K.; Asinyo, B. K.; Chai, H.; Raza, T.; Xu, T.; Zhan, G.; Qu, L. A Portable Electrochemical Sensor Based on Manganese Porphyrin-Functionalized Carbon Cloth for Highly Sensitive Detection of Nitroaromatics and Gaseous Phenol. *Langmuir* **2022**, 38 (39), 12058–12069.

(22) Sheen, S.; Jos, T.; Rajith, L.; Kumar, K. G. Manganese porphyrin sensor for the determination of bromate. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, 53 (3), 1561–1566.

(23) Khaloo, S. S.; Mozaffari, S.; Alimohammadi, P.; Kargar, H.; Ordookhanian, J. Sensitive and Selective Determination of Riboflavin in Food and Pharmaceutical Samples Using Manganese (III) Tetraphenylporphyrin Modified Carbon Paste Electrode. *Int. J. Food Prop.* **2016**, 19, 2272–2283.

(24) Guo, X. M.; Guo, B.; Li, C.; Wang, Y. L. Amperometric Highly Sensitive Uric Acid sensor Based on Manganese (III)porphyrin-Graphene Modified Glassy Carbon Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2016**, 783, 8-14.

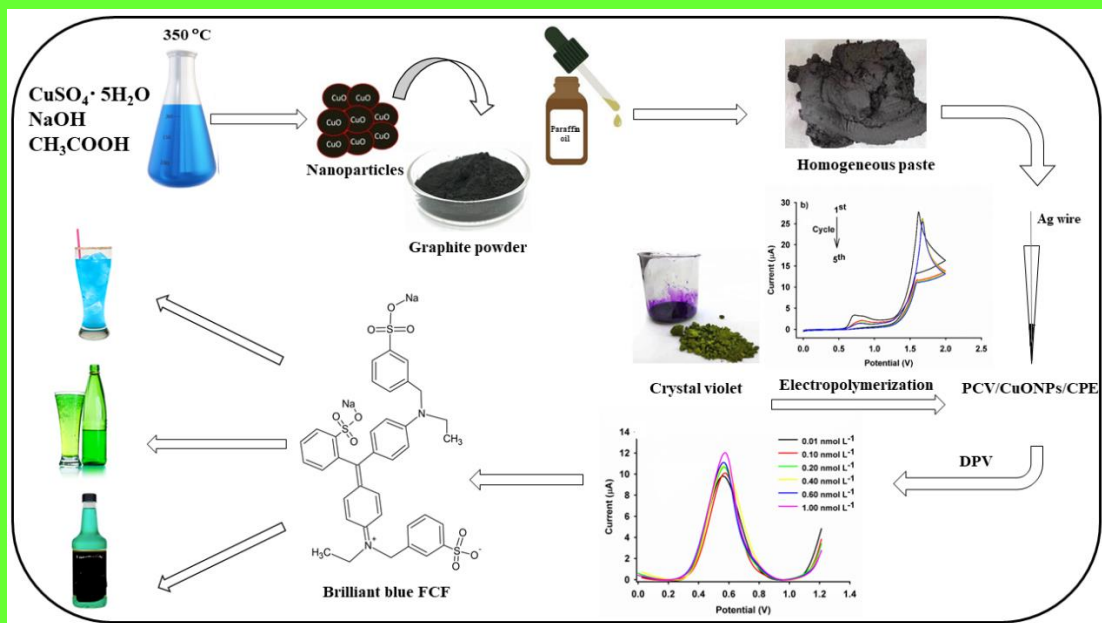
(25) Britton H. T. S.; Robinson, R. A. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.* **1931**, 0, 1456–1462.

(26) Zanello, P. *Inorganic Electrochemistry: Theory, Practice, and Application*; The Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge, UK, 2003.

(27) ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.

- (28) Ozkan, S. A.; Kauffmann, J. M.; Zuman, P. *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, Springer; Berlin/Heidelberg, Germany, 2015.
- (29) He, B.; Lu, X. An Electrochemical Aptasensor Based on Tetrahedral DNA Nanostructures as a Signal Probe Carrier Platform for Sensitive Detection of Patulin. *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1138, 123-131.
- (30) Afzali, Z.; Mohadesi, A.; Ali Karimi, M.; Fathirad, F. A highly selective and sensitive electrochemical sensor based on graphene oxide and molecularly imprinted polymer magnetic nanocomposite for patulin determination. *Microchem. J.* **2022**, 177, 107215.
- (31) Shukla, S.; Y. Haldorai; I. Khan; S.-M. Kang; C. H. Kwak, S. Gandhi, V. K. Bajpai, Y.S. Huh, Y.-K. Han. Bioreceptor-free, sensitive, and rapid electrochemical detection of patulin fungal toxin, using a reduced graphene oxide@SnO<sub>2</sub> nanocomposite. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, 113, 110916.
- (32) Song, X.; Wang, D.; Kim, M. Development of an immuno-electrochemical glass carbon electrode sensor based on graphene oxide/gold nanocomposite and antibody for the detection of patulin. *Food Chem.* **2021**, 342, 128257.
- (33) Riberi, W. I.; Zon, M. A.; Fernández, H.; Arévalo, F. J. Impedimetric immunosensor to determine patulin in apple juices using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide. *Microchem. J.* **2020**, 158, 105192.
- (34) Huang, Q.; Zhao, Z.; Nie, D.; Jiang, K.; Guo, W.; Fan, K.; Zhang, Z.; Meng, J.; Wu, Y.; Han, Z. Molecularly Imprinted Poly(thionine)-Based Electrochemical Sensing Platform for Fast and Selective Ultratrace Determination of Patulin. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 4116-4123.

**O platformă electrochimică ultrasensibilă bazată pe nanoparticule de oxid de cupru și poli (cristal violet) pentru detectarea Brilliant Blue FCF din băuturi răcoritoare**



**Schema 1.** Reprezentarea grafică a platformei de senzori PCV/CuONPs/CPE

## Introducere

Pentru a conserva alimentele, în industria alimentară se folosesc multe substanțe chimice diferite. Pe lângă conservanți, antioxidanți, ceară, îndulcitori și arome, există și o anumită categorie de aditivi alimentari, și anume coloranții, care pot fi naturali sau sintetici și pot fi clasificați în cinci categorii în funcție de structura lor moleculară: trifenilmetani, azo, chinoline, xantene și indigoide (Ghoreishi et al., 2011; Lipskikh et al., 2020). Astfel de coloranți pot fi găsiți în alimente precum băuturi răcoritoare, cocktailuri, bomboane, prăjituri, înghețată, jeleuri etc. (Ghoreishi et al., 2011; Lipskikh et al., 2020; Wang et al., 2015). Includerea acestor substanțe în produsele alimentare oferă mai multe avantaje, cum ar fi o stabilitate sporită împotriva unor factori precum lumina, oxigenul și modificările de pH. În plus, acestea își mențin culoarea în timp și oferă clienților un aspect atrăgător (Ghoreishi et al., 2011; Lipskikh et al., 2020). Deși aceste substanțe au utilizări în sectorul alimentar, ele creează o problemă de sănătate atunci când se depășește limita admisă. Printre afecțiunile potențiale cauzate de excesul de coloranți alimentari se numără alergiile, bolile respiratorii, hiperactivitatea, anxietatea, bolile hepatice și bolile renale (Ghoreishi et al., 2011; Lipskikh et al., 2020; Sierra-Rosales et al., 2019).

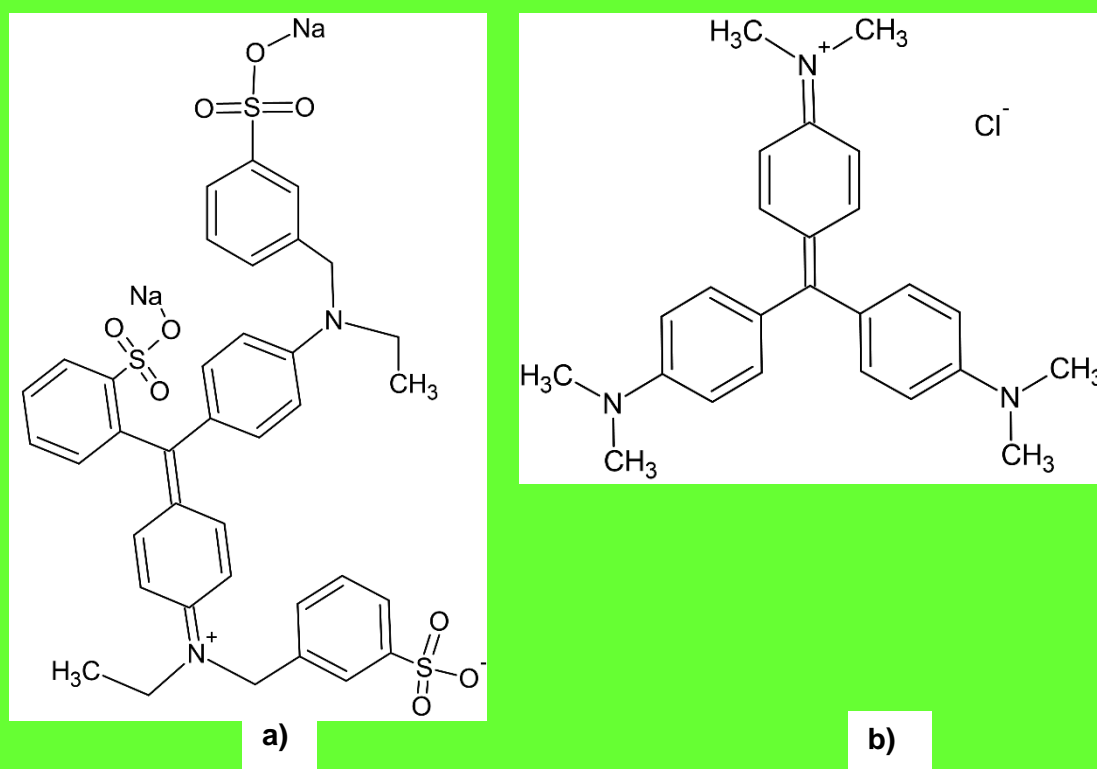
Albastrul strălucitor FCF (BB) (Fig. 1a) este un colorant alimentar sintetic, cunoscut sub denumirea comercială E133, care se găsește în mod obișnuit în diverse produse alimentare și băuturi, cu o structură de trifenilmetan care se găsește în băuturile răcoritoare atât singur, cât și în combinație cu alți coloranți, cum ar fi tartrazina, pentru a conferi o culoare verde (Lipskikh et al., 2020). Acest aditiv este utilizat într-o gamă largă de produse, inclusiv băuturi aromatizate, produse lactate fermentate aromatizate, corusta de brânză comestibilă, condimente, deserturi, înghețată comestibilă, produse de cofetărie, cum ar fi guma de mestecat și cea de înmprospătare a respirației, conserve de fructe roșii, mazăre procesată (conservată), mazăre moale și mazăre de grădină, gustări și băuturi alcoolice. Aproximativ 5% din FCF albastru strălucitor ingerat este absorbit în tractul gastrointestinal, în timp ce restul este excretat în fecale. Cu toate acestea, poate fi absorbit rapid în fluxul sanguin prin intermediul limbii sau al pielii. Conform unor studii recente, dozele mari de această substanță pot duce la depuneri la nivelul rinichilor și al vaselor limfatice, precum și la prezența unor reziduuri potențial cancerigene (Silva et al., 2022).

În conformitate cu orientările de reglementare stabilite de Organizația Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură (FAO) și de Comitetul de experți pentru aditivi alimentari (JECFA) al Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), doza zilnică admisă nu trebuie să depășească 6.0 mg/kg de greutate corporală pe zi. Uniunea Europeană a stabilit un set cuprinzător de legi care clasifică produsele alimentare și stabilește cantitățile maxime pentru utilizarea acestora. Limita permisă pentru albastru strălucitor FCF într-un produs alimentar este de 200 mg/kg (Regulamentul (UE) nr. 1333/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind aditivii alimentari).

Mai multe metode analitice, cum ar fi spectrofotometria (Heydari et al., 2016), electroforeza capilară (Yi et al., 2018), electrochimiluminescența (Chen et al., 2017) și cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) (Faraji et al., 2017), au fost raportate pentru detectarea BB. Chiar dacă aceste tehnici sunt foarte precise, fiabile, foarte sensibile și selective, ele prezintă, de asemenea, mai multe dezavantaje, cum ar fi cantitatea mare de solvenți organici necesari pentru procedurile de separare și extracție, costul lor ridicat și faptul că sunt consumatoare de timp. Prin urmare, din acest motiv, comunitatea științifică dezvoltă în permanență noi alternative la metodele clasice de detectare a aditivilor alimentari. Metodele electrochimice sunt alternative

excelente la aceste metode analitice clasice, deoarece au numeroase avantaje, cum ar fi costul redus, sensibilitatea ridicată și robustețea în timp, intervale largi de concentrație și posibilitatea de a utiliza echipamente portabile pentru măsurători la fața locului (Florian et al., 2002; Ganesh et al., 2018; Ghoreishi et al., 2011; Lipskikh et al., 2020; Sierra-Rosales et al., 2019, 2017; Wang et al., 2015). Dezvoltarea de noi senzori de platformă electrochimică implică utilizarea unei diversități de compuși modifikatori și nanomateriale care sporesc intensitatea semnalului și transportul de electroni atunci când sunt utilizate pe suprafața senzorului (Ghoreishi et al., 2011; Tang și Jin, 2016).

Cristal violet este un colorant care aparține clasei trifenilmetanilor și este utilizat într-o varietate de scopuri, inclusiv pentru colorarea în domenii biologice și histopatologice. Formula sa chimică este ilustrată în Fig. 1b (Ganesh et al., 2018; Shankar et al., 2011; Sun et al., 2013). Poli (cristal violet) (PCV) a primit mult interes ca o modificare a electrodului datorită costului său ieftin, conductivității electrice mari, stabilității bune, polimerizării rapide și eficiente și grosimii controlabile (Chen et al., 2014; Tang et al., 2016; Tang și Jin, 2016; Tang și Jin, 2016; Wang et al., 2017).



**Fig. 1.** Structurile chimice ale **(a)** albastrului strălucitor FCF și **(b)** cristal violet



Nanoparticulele de oxid metalic sunt foarte potrivite pentru aplicații electrice și fotocatalitice datorită dimensiunii lor. Aceste nanoparticule au stârnit un interes extraordinar, deoarece oferă proprietăți optice, fizice, chimice și electrice îmbunătățite în comparație cu materialele în vrac. Suprafețele electrozilor de lucru pot fi modificate cu diverse nanoparticule de oxizi metalici prin legare covalentă, adsorbție fizică, electrodepunere sau electropolimerizare (Agnihotri et al., 2021). Oxidul de cupru (CuO) este adesea utilizat ca modificador al senzorilor electrochimici pentru o bună conductivitate, creșterea suprafeței sensorului și siguranța cu care se poate realiza reacția redox. De asemenea, sinteza acestor particule este relativ simplă și rapidă, folosind reacții de soluție tratată termic (Arévalo et al., 2017; Karimi-Maleh et al., 2017; Teymoori et al., 2018).

Prezentul studiu descrie dezvoltarea unei platforme electrochimice care utilizează pasta de carbon care a fost modificată cu nanoparticule (NP) de CuO și poli (cristal violet) pentru a investiga și detecta FCF albastru strălucitor din diferite băuturi răcoritoare.

Din câte cunoaștem, nu au fost efectuate studii privind electropolimerizarea cristalului violet pe electrodul din pastă de carbon CuONPs (CPE) pentru detectarea BB. Ca urmare, autorii acestei cercetări prezintă, pentru prima dată, un dispozitiv de detectare a platformei BB în probe de băuturi răcoritoare care combină transductorul electrochimic CPE cu nanoparticule de material CuO și poli (cristal violet), demonstrând stabilitate, selectivitate și sensibilitate.

## **Experimental**

### *Sinteza nanoparticulelor de CuO*

Amestecarea a 250 mL de 0.2 mol L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O cu 0.833 mL de acid acetic a dus la sinteza de nanoparticule de oxid de cupru. Amestecul albastru-verzui a fost supus încălzirii, iar apoi s-au adăugat 10 mL de soluție de hidroxid de sodiu de 8 mol L<sup>-1</sup>. Ulterior, amestecul de culoare neagră închisă a fost agitat și încălzit la 300 °C timp de 120 de minute. Suspensia neagră a fost lăsată să se răcească la temperatura ambiantă, urmată de o serie de cinci spălări cu apă deionizată. Ulterior, materialul a fost supus la uscare la o temperatură de 100 °C

timp de 2 ore și, în final, a fost supus la calcinare timp de 3 ore la o temperatură de 400 °C (Karimi-Maleh et al., 2017).

#### *Prepararea platformei CuONPs/CPE*

Pentru prepararea a 50 mg de CuONPs/CPE, s-au folosit 45 mg de pulbere de grafit și 5 mg de CuONPs sintetizate, obținându-se o pastă omogenă prin adăugarea a 20 μL de ulei de parafină. Pasta a fost introdusă ulterior într-un tub din material inert, iar conectivitatea electrică a fost stabilită prin utilizarea unui fir de argint.

#### *Design-ul platformei PCV/CuONPs/CPE*

Pentru a pregăti platforma electrochimică bazată pe PCV/CuONPs/CPE, electrodul CuONPs/CP a fost imersat într-o soluție salină tamponată cu fosfat cu un pH de 7.4, care conține  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> cristal violet. Pelicula a fost apoi formată prin electropolimerizare. Toate etapele utilizate în configurația platformei PCV/CuONPs/CPE sunt prezentate în Schema 1.

#### *Pregătirea probelor*

Pentru a evalua platforma electrochimică, au fost analizate diferite băuturi răcoritoare, inclusiv suc de mere acidificat, suc de mure și sirop de mentă cumpărate dintr-un supermarket, pentru a determina BB. Inițial, probele de suc au fost pregătite în soluție salină tamponată cu fosfat cu un pH de 3.0, folosind un raport volumetric de 1:1, iar ulterior au fost îmbogățite cu diferite concentrații de BB. Diferite concentrații de BB au fost adăugate la probele de suc, care au fost diluate la un nivel de 1:1 în PBS cu un pH de 3,0. Toate probele au fost pregătite proaspăt imediat înainte de analiză.

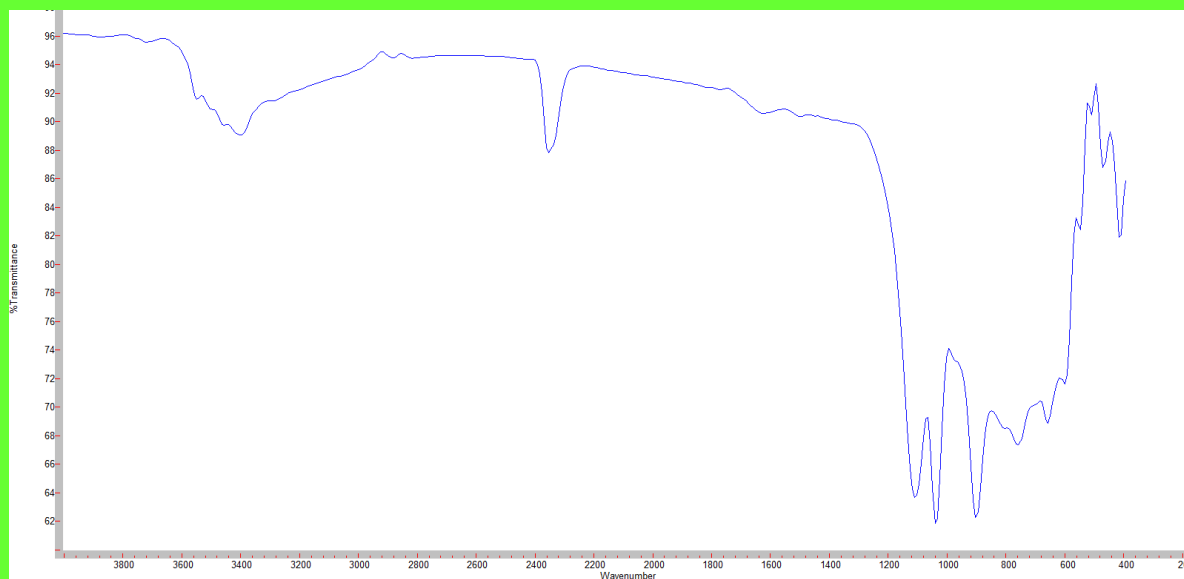
## **Rezultate și discuții**

#### *Caracterizarea FT-IR și SEM*

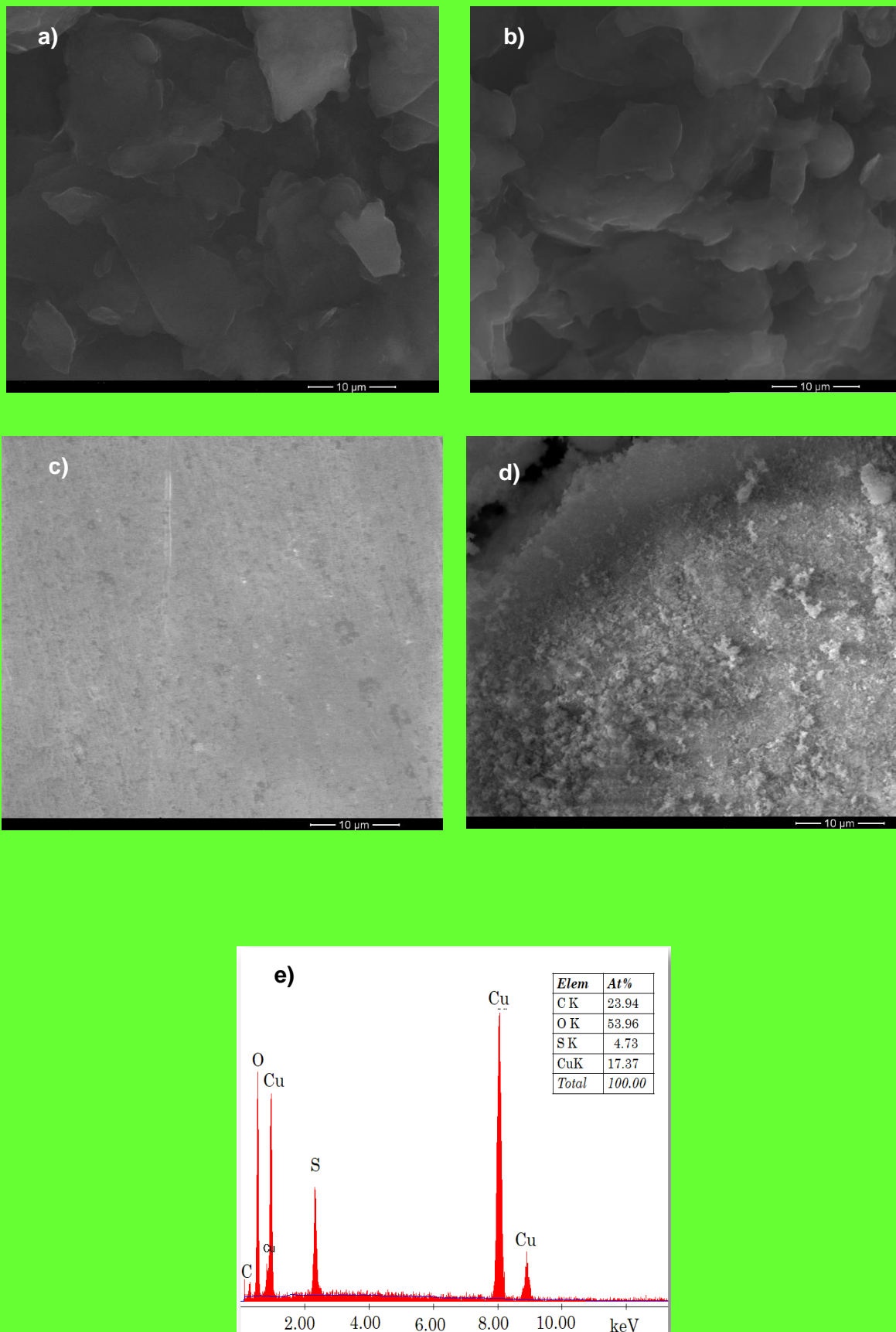
După cum se arată în Fig. 2, investigația FT-IR a fost realizată în intervalul 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  pentru a identifica în continuare prezența CuONP-urilor. Vârful observat la 3400  $\text{cm}^{-1}$  este comparabil cu întinderea O-H, iar prezența vârfului la 410  $\text{cm}^{-1}$  se potrivește cu legătura individuală Cu-O. Sinteza CuO a fost confirmată de spectrul FTIR al CuO, care a prezentat vârfuri la 410 și 510  $\text{cm}^{-1}$  (Elango et al., 2018; Siddegowda et al., 2018).

Microscopul electronic de scanare (SEM) a fost utilizat pentru a caracteriza caracteristicile morfologice ale electrozilor. Reprezentarea grafică descrisă în Fig. 3a ilustrează prezența fulgilor de grafit în probă, împrăștiati în mod necontrolat. După adăugarea de CuONPs, imaginea SEM a arătat că particulele au prezentat forme distincte și interesante cu o organizare precisă (Fig. 3b). Întreaga suprafață a CPE este acoperită cu o peliculă de PCV care prezintă o arhitectură omogenă care este obținută printr-o tehnică de depunere strat cu strat în timpul a 5 scanări voltametrice consecutive (Fig. 3c). Această caracteristică permite peliculelor să catalizeze speciile electroactive difuzive cu o eficiență ridicată. Fig. 3d prezintă imaginea SEM a CuONP-urilor.

Spectrul de dispersie a energiei (EDX) a fost utilizat pentru a analiza aranjamentul elementelor chimice în cadrul materialului compozit (Fig. 3e). Analiza semicantitativă a arătat că elementele componente majore ale materialului studiat sunt Cu și O, iar în cantități mici, S și C.

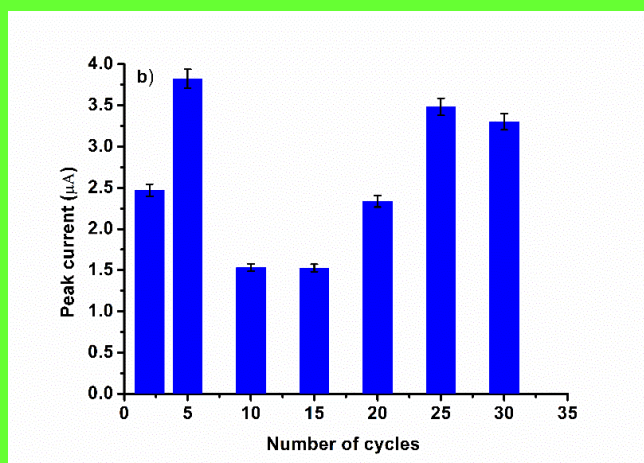
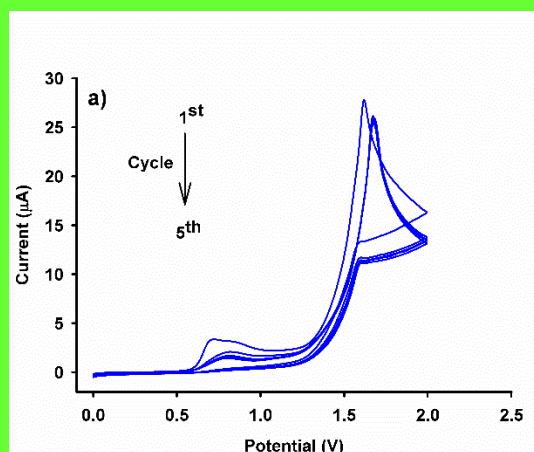


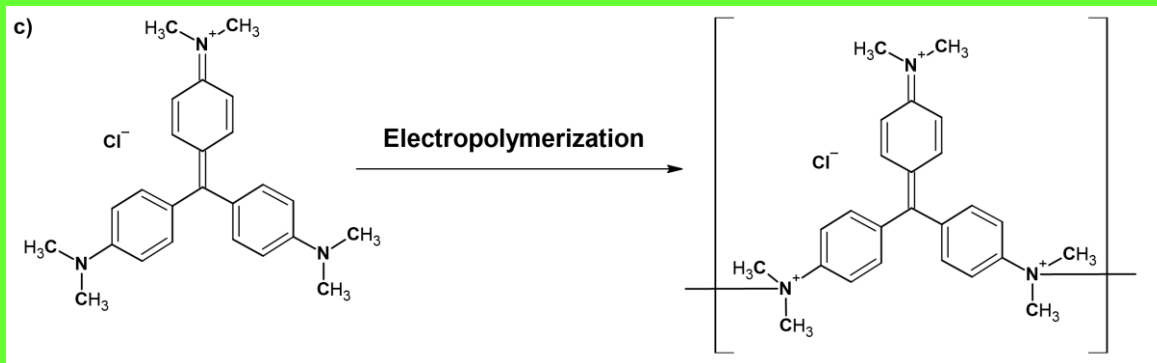
**Fig. 2.** Spectrul FT-IR al CuONPs



**Fig. 3.** Imaginea SEM a (a) bare CPE, (b) CuONPs/CPE, (c) PCV/CuONPs/CPE, și (d) CuO NPs, (e) Spectrul EDX al CuONPs.

Polimerizarea electrochimică a cristalului violet a fost realizată prin voltametrie ciclică. CV-urile succesive au fost efectuate în PBS pH = 7.4 conținând  $10^{-3}$  M soluție de cristal violet. Potențialul a fost menținut de la 0.0 la 2.0 V la o rată de scanare de  $0.1 \text{ V s}^{-1}$  și s-a investigat numărul de cicluri de potențial necesare pentru a dezvolta poli (cristal violet)/CuONPs/CPE. Fig. 4a prezintă rezultatele procesului de scanare multiplă a CV-urilor CuONPs/CPE. Datele prezentate în Fig. 4a indică prezența unui vârf de oxidare la aproximativ +0.7 V, care poate fi atribuit formării unui film de poli (cristal violet). Studiul a urmărit să examineze numărul potențial de cicluri necesare pentru dezvoltarea unui CuONPs/CPE modificat cu poli (cristal violet). Pentru a atinge acest obiectiv, au fost construiți mai mulți electrozi PCV/CuONPs/CP prin aplicarea unui număr diferit de cicluri voltametrice (variind de la 2 la 30) la CuONPs/CPE imersate într-o soluție de cristal violet (PBS pH = 7.4). În urma procesului de electropolimerizare care a implicat mai multe cicluri, electrozii au fost supuși testării într-o soluție mixtă de  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  conținând KCl ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Răspunsul electrozului rezultat a fost înregistrat ulterior (Fig. 4b). Se poate observa că intensitatea curentului de răspuns crește semnificativ pe măsură ce numărul de cicluri de electropolimerizare crește de la 2 la 5 și apoi scade de la 5 la 20, după care se observă o ușoară creștere și o scădere a intensității la 25 și, respectiv, 30 de cicluri. Curentul anodic maxim a fost atins la 5 cicluri, după cum arată Fig. 4b; prin urmare, 5 cicluri au fost considerate a fi numărul optim pentru procesul de polimerizare electrochimică. Deși curentul de vârf de răspuns pare să scadă atunci când numărul de cicluri de electropolimerizare crește, este posibil ca filmul PCV să fi devenit prea gros. Fig. 4c reprezintă procesul de formare a poli (cristal violet) pe suprafața CuONPs/CPE prin electropolimerizare.





**Fig. 4. (a)**

CV-urile  
înregistra  
te prin  
polimeriz  
area

electrochimică a cristalului violet la o concentrație de  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> în PBS pH = 7.4 utilizând CuONPs/CPE (condiții de lucru: potențial de step 0.025 V, viteză de scanare 0.1 V s<sup>-1</sup>, număr de scanări 5); **(b)** Numărul optim de cicluri utilizate pentru construcția PCV/CuONPs/CPE; **(c)** Polimerizarea electrochimică a cristalului violet.

#### *Caracterizarea electrochimică a senzorilor*

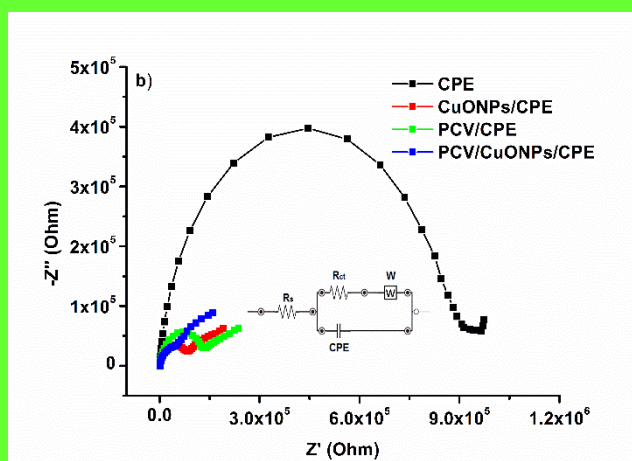
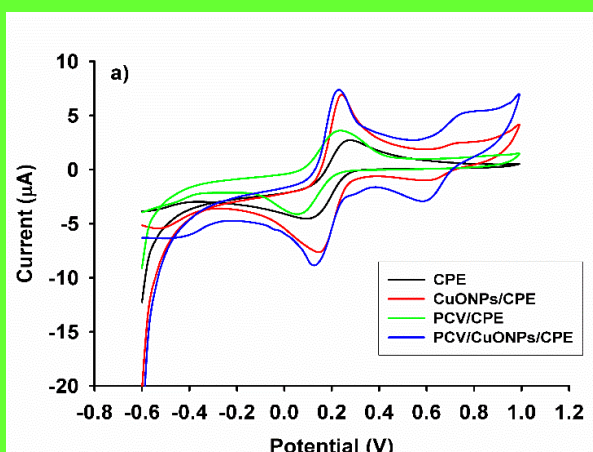
Electrozii PCV/CuONPs/CPE, CuONPs/CPE, PCV/CPE și CPE au fost descriși din punct de vedere electrochimic, utilizând CV, EIS și DPV ca metode de lucru.

Măsurătorile CV au fost efectuate într-o soluție de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $5.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (KCl 0.1 mol L<sup>-1</sup>) în intervalul de potențial cuprins între -0.6 și 1.0 V, utilizând electrozii de lucru: PCV/CuONPs/CPE, CuONPs/CPE, PCV/CPE și CPE (Fig. 5a). În urma adăugării modifierului, se poate observa o îmbunătățire a activității electrochimice. Cel mai bun răspuns electrochimic este dat de PCV/CuONPs/CPE. Controalele experimentale prezentate în Fig. 5a (curbele roșii și albastre) arată două perechi distincte de vârfuri atât la CuONPs/CPE, cât și la PCV/CuONPs/CPE. Prima pereche de vârfuri bine definite se observă la aproximativ +0.2 V (Epa<sub>1</sub>) și +0.1 V (Epc<sub>1</sub>). Aceste vârfuri corespund cuplului redox  $[(Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ . A doua pereche de vârfuri redox sunt observate în jurul valorii de +0.7 V (Epa<sub>2</sub>) și +0.6 V (Epc<sub>2</sub>), care corespund cuplului redox Cu(II)/Cu(III), sugerând prezența CuONP-urilor pe suprafața electrodului, similar altor rapoarte anterioare (Muñoz et al., 2015; Zhang et al., 2015). Cu toate acestea, vârful de oxidare corespunzător Cu(II)/Cu(III) în intervalul +0.7 V și +0.6 V nu a fost observat în Fig. 8a, care ar putea fi suprapus de vârful de oxidare al albastru strălucitor.

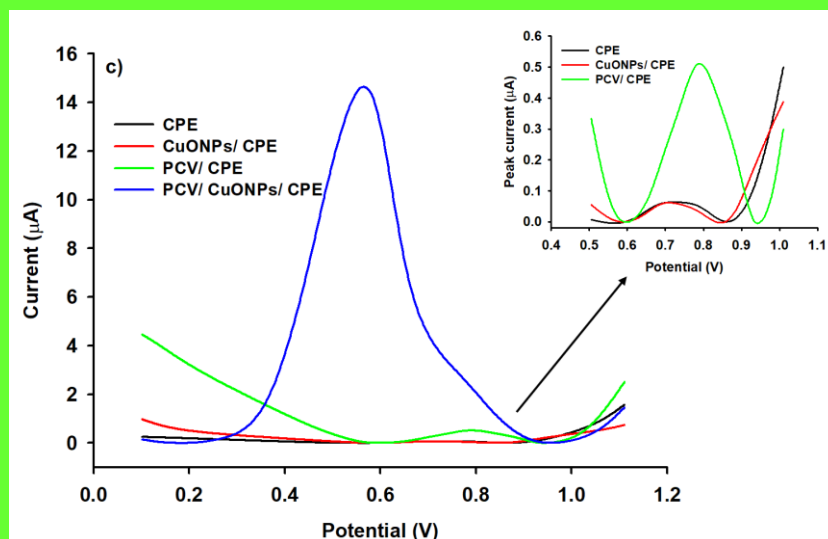
Analiza EIS a fost efectuată într-un domeniu de frecvență între  $2.0 \times 10^5$  și  $1.0 \times 10^{-1}$  Hz, măsurată într-o soluție de  $K_3[Fe(CN)_6]$   $5.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl). Rezultatele pot fi observate în diagramele Nyquist prezentate în Fig. 5b. Circuitul echivalent Randles a fost ales pentru a se potrivi datelor EIS. Acest circuit se

numără printre cele mai simple și mai frecvent utilizate pentru a descrie sistemele electrochimice simple asociate cu procesele de interfață/electrolit. După cum se poate observa în diagrama Nyquist, cel mai mare semicerc corespunde CPE, cu  $R_{ct} = 8.195 \times 10^5 \Omega$ . Sensorii modificați CuONPs/CPE și PCV/CPE prezintă semicercuri mai mici în comparație cu senzorul nemodificat ( $R_{ct} = 6.668 \times 10^4 \Omega$  pentru CuONPs/CPE și  $R_{ct} = 9.352 \times 10^4 \Omega$  pentru senzorul PCV/CPE). Senzorul PCV/CuONPs/CPE prezintă cel mai mic semicerc, cu o valoare  $R_{ct}$  de  $2.256 \times 10^4 \Omega$ . Aceste rezultate corespund celor obținute prin voltametrie ciclică.

Modul de funcționare a celor trei senzori a fost studiat cu ajutorul tehnicii DPV (Fig. 5c). Voltamogramele au fost înregistrate pentru o soluție de  $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  BB în PBS pH = 3.0 și KCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  ca electrolit de suport. Se observă o creștere a semnalului dat de oxidarea BB pentru senzorii modificați, iar cele mai bune rezultate au fost date de senzorul PCV/CuONPs/CPE. În plus, platforma PCV/CuONPs/CPE a fost utilizată pentru cuantificarea colorantului BB în diferite probe de băuturi răcoritoare.







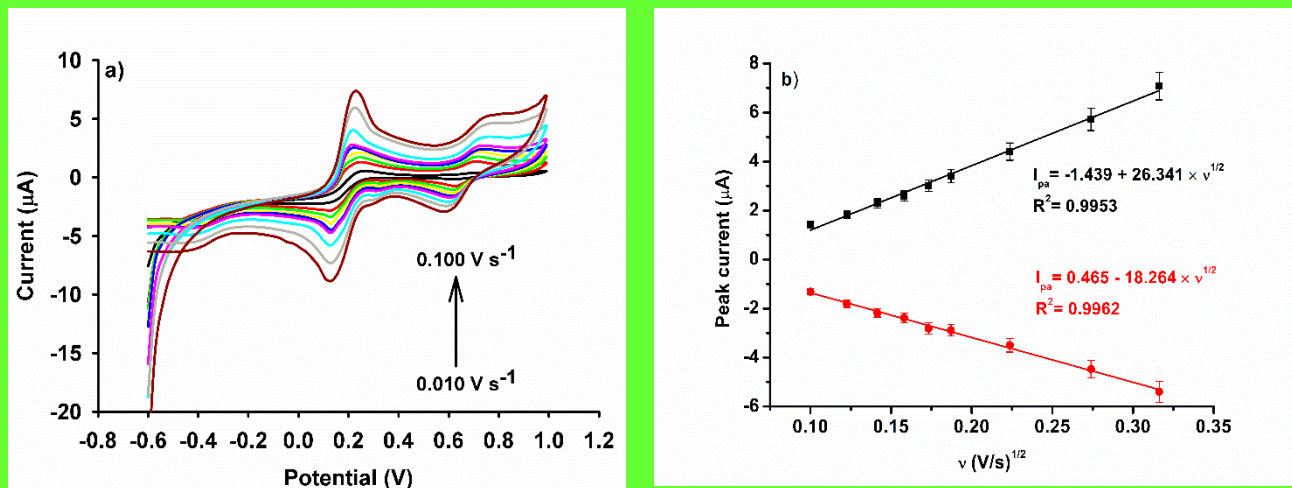
**Fig. 5. (a)** CV-urile și **(b)** Spectrul EIS folosind CPE, CuONPs/CPE, PCV/CPE, PCV/CuONPs/CPE într-o soluție de  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ), circuitul Randles echivalent inserat; **(c)** Platformele DPV înregistrate într-o soluție de  $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ BB}$  (PBS pH = 3.0 and KCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### Calcularea ariei suprafeței active

Variația vitezei de scanare între  $0.010$  și  $0.100 \text{ V s}^{-1}$  a fost măsurată prin voltametrie ciclică (Fig. 6a). Obținând corelația liniară între intensitatea vârfurilor anodice și catodice în funcție de curentul de vârf (Fig. 6b) și aplicând ecuația Randles-Sevcik, a fost calculată valoarea ariei active electrocatalitice a platformei PCV/CuONPs/CPE ( $0.007211 \text{ cm}^2$ ). Pentru a verifica reversibilitatea reacției și pentru a calcula aria electroactivă a platformei dezvoltate, ecuația Randles-Sevcik este următoarea:

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} D^{1/2} v^{1/2} AC, \quad (1)$$

unde  $I_p$  este curentul de vârf (A),  $n$  este numărul de electroni implicați în procesul redox ( $n = 1$ ),  $D$  este coeficientul de difuzie ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ),  $v$  este viteza de scanare ( $\text{V s}^{-1}$ ),  $A$  este suprafața activă a electrodului ( $\text{cm}^2$ ), iar  $C$  este concentrația de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ).

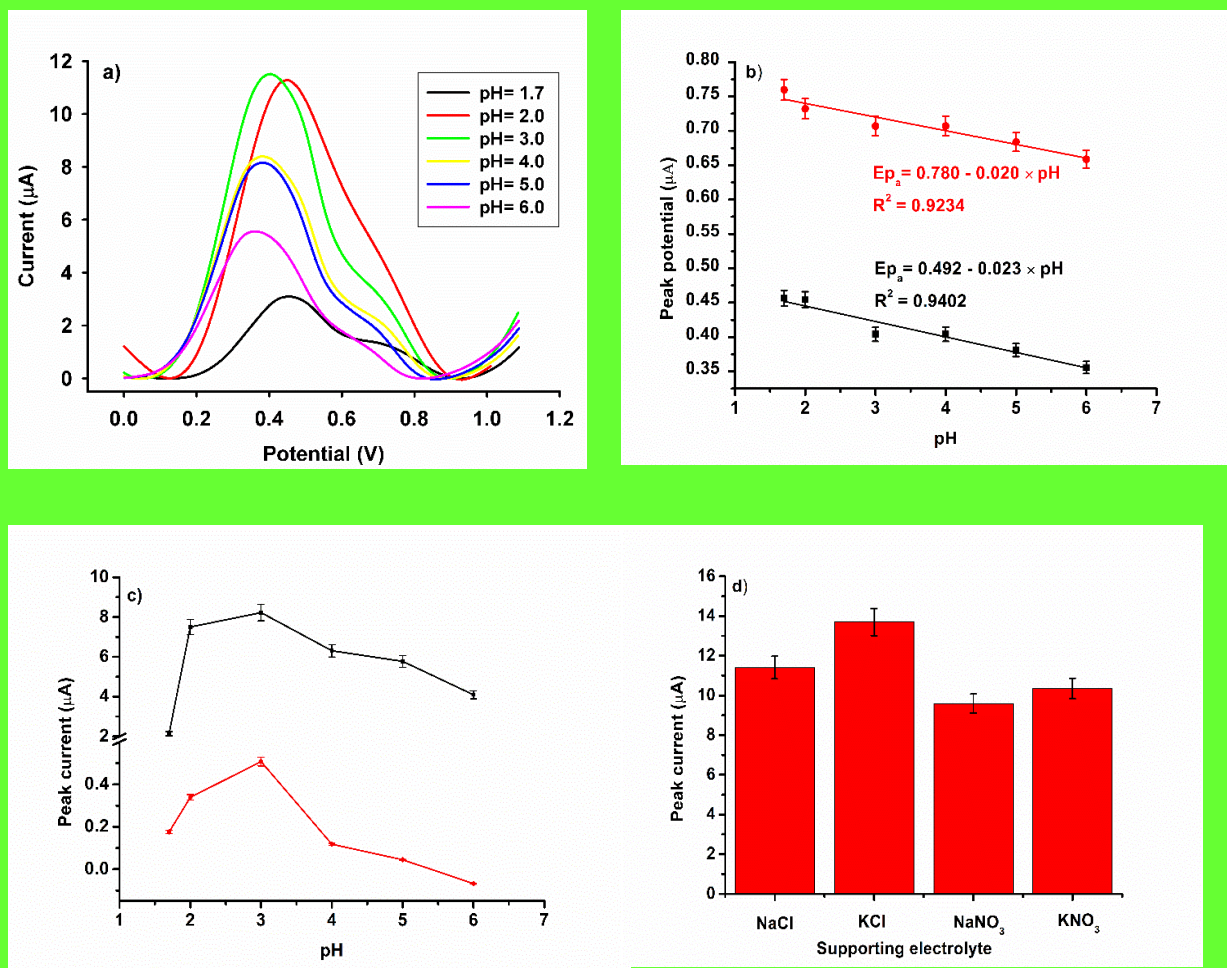


**Fig. 6. (a)** CV-urile platformei PCV/CuONPs/CPE au fost obținute într-o soluție de  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl) la diferite viteze de scanare între  $0.010$  și  $0.100 \text{ V s}^{-1}$ ; **(b)** Dependența liniară a vârfurilor anodice și catodice de curentul de vârf.

#### *Influența pH-ului și a electrolitului supor asupra platformei PCV/CuONPs/CPE*

Un parametru important în măsurătorile electrochimice este efectul pH-ului asupra activității platformei. Studiul s-a concentrat pe analiza influenței pH-ului soluțiilor PBS, care au fost testate într-un interval de pH de la 1.7 la 6.0 ( $n = 5$ ). Aceste soluții conțineau  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  BB. S-a observat că a existat o creștere a intensității curentului cu apariția celui de-al doilea vârf de curent la  $\text{pH} = 3.0$ , urmată de o scădere a semnalului odată cu creșterea valorii pH-ului (Fig. 7a, c). Fig. 7b prezintă o reprezentare grafică a corelației dintre potențialul de vârf pentru cele două vârfuri și pH. Ecuațiile de regresie liniară pentru ambele vârfuri,  $E_{p_{a1}} = 0.780 - 0.020 \times \text{pH}$  și  $E_{p_{a2}} = 0.492 - 0.023 \times \text{pH}$ , cu  $R^2 = 0.9234$  pentru vârful 1 și, respectiv,  $R^2 = 0.402$  pentru vârful 2, arată că valorile pantei mediului acid ajută la o oxidare mai rapidă a BB, rezultând că  $\text{pH} = 3.0$  este optim pentru condițiile de lucru.

Pentru a îmbunătăți semnalul platformei au fost adăugate diferite soluții de electrolit, inclusiv  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  și  $\text{KCl}$ , toate având un nivel de concentrație de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . Fig. 7d arată o creștere a semnalului datorată adăugării de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl în comparație cu ceilalți electroliți de susținere.



**Fig. 7. (a)** Voltammogramele DPV a  $1.0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> BB la PCV/CuONPs/CPE în PBS la diferite pH-uri între 1.7 și 6 (condiții de lucru: interval de potențial -0.2 până la 1.1 V, viteză de scanare 0.025); **(b)** Graficul dependenței potențialului de vârf de valoarea pH-ului; **(c)** Graficul influenței pH-ului asupra intensității curentului; **(d)** Graficul influenței electrolitului suport asupra oxidării electrochimice a  $1.0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> BB (PBS pH = 3.0).

#### *Efectul variației vitezei de scanare asupra albastrului strălucitor*

Pentru a urmări activitatea electrochimică a BB la suprafața senzorului, s-a folosit ca metodă de analiză voltametria ciclică prin variația vitezei de scanare. Potențialul utilizat a variat între 0 și 1.2 V, iar rata de scanare a fost de la 0.02 la 0.40 V s<sup>-1</sup> (Fig. 8a). Soluția BB  $0.4 \text{ nmol L}^{-1}$  a fost preparată în PBS pH = 3.0 și KCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . Pe baza CV-ului înregistrat, s-a observat că BB are un proces redox reversibil la suprafața platformei PCV/CuONPs/CPE. Mecanismul redox luat în considerare a prezentat o separare între vârfuri de 75 mV. Mai exact, procesul oxidativ al BB a avut loc la potențialul oxidat de 0.655 V, în timp ce reducerea a avut loc la potențialul catodic de 0.579 V, așa cum este ilustrat în Fig. 8b. Rezultatul obținut este mai aproape de o valoare teoretică

nernstiană de 59 mV pH<sup>-1</sup> și indică faptul că procesul redox este reversibil. Relația liniară dintre logaritmul intensității curentului trasat față de logaritmul vitezei de scanare (Fig. 8c) a oferit următoarea ecuație:

$$\log I_{pa} = 0.996 + 1.066 \times \log v, R^2 = 0.9945 \quad (2)$$

Valoarea pantei este de 1.066, ceea ce sugerează că procesul este guvernat de adsorbție, deoarece se apropie foarte mult de valoarea teoretică așteptată de 1 pentru un astfel de proces (David K. Gosser Jr., 1993).

Ecuația Laviron a fost utilizată pentru a determina constanta de viteză ( $k_s$ ) și numărul total de electroni ( $n$ ) care participă la reacția electrochimică (Laviron, 1979):

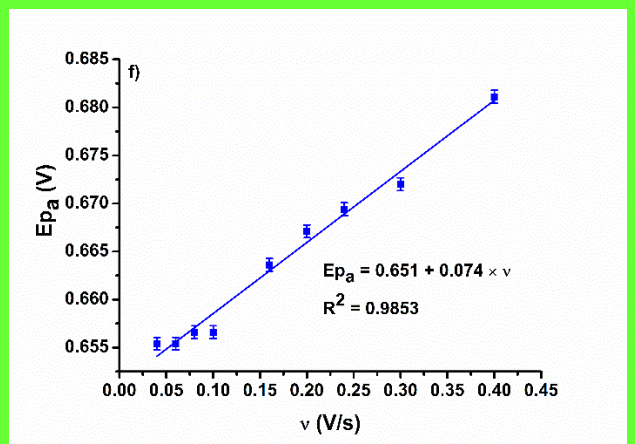
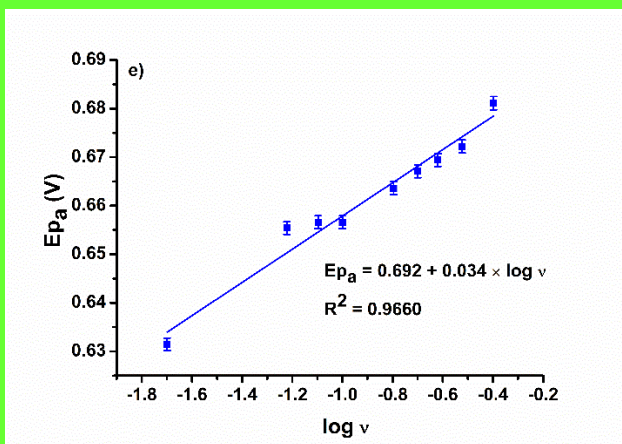
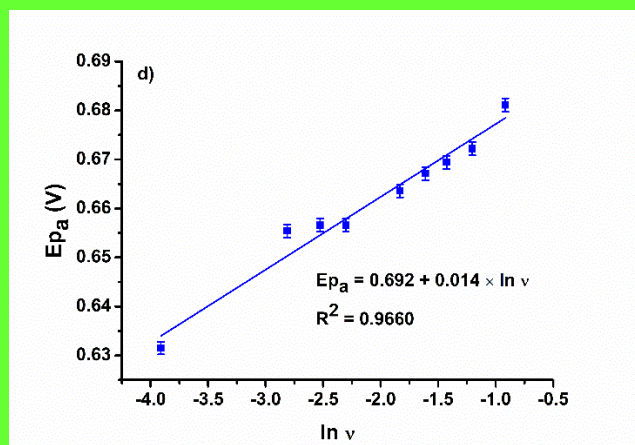
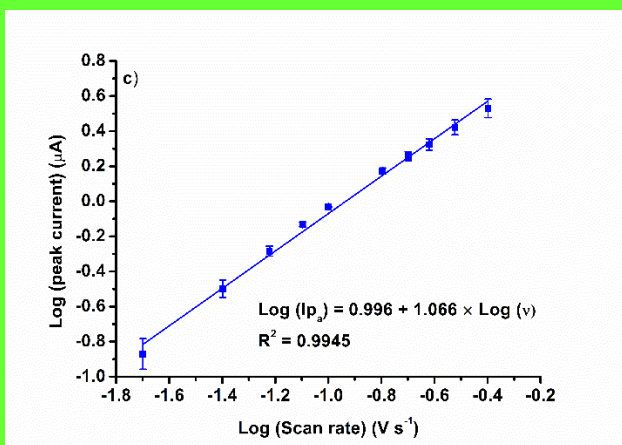
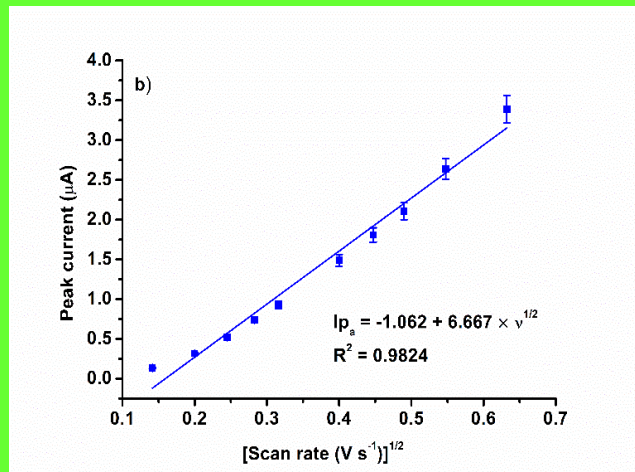
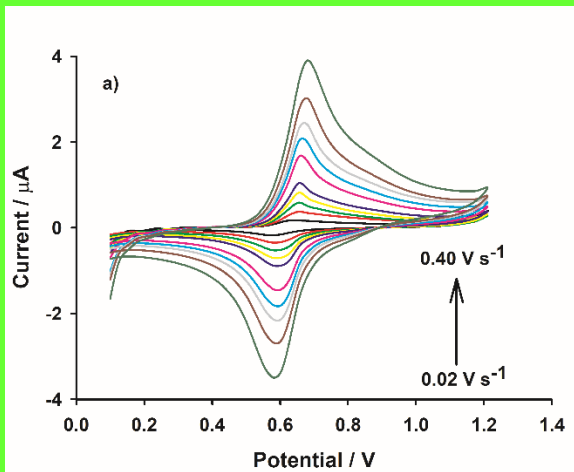
$$E_p = E^0 - \left(\frac{RT}{\alpha F}\right) \ln \left(\frac{RTk_s}{\alpha nF}\right) + \left(\frac{RT}{\alpha nF}\right) \ln v \quad (3)$$

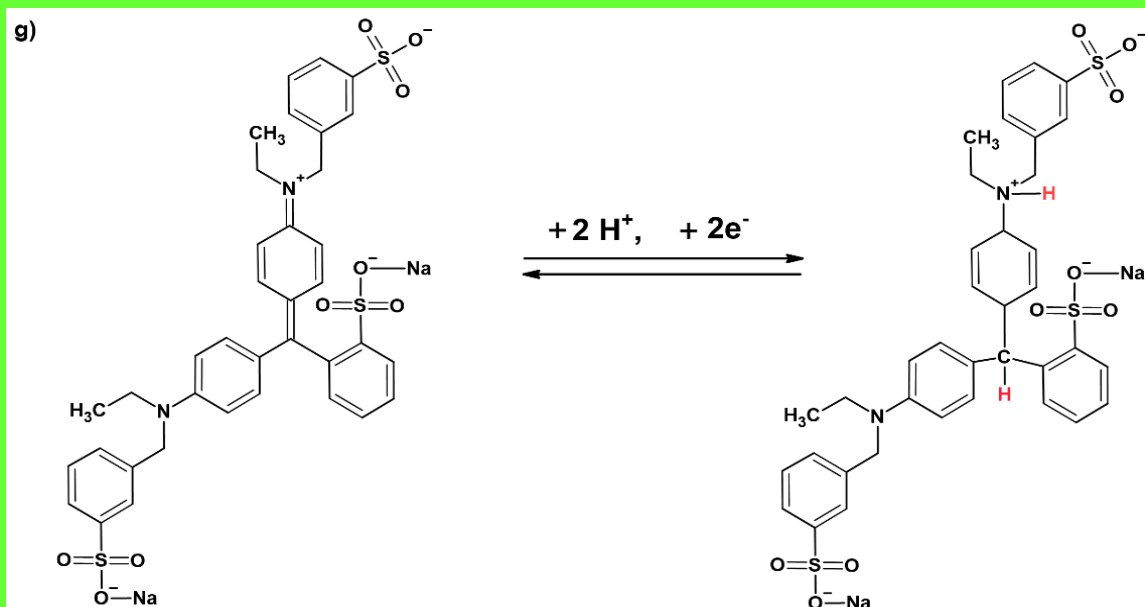
unde  $E^0$  este potențialul formal (V),  $R$  este constanta universală a gazelor (8.134 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>),  $T$  este temperatura absolută (298.15 K),  $\alpha$  este coeficientul de transfer de electroni,  $F$  este constanta lui Faraday (96485 C mol<sup>-1</sup>), iar  $v$  este viteza de scanare (V s<sup>-1</sup>). Se știe că potențialul formal este reprezentat de interceptarea graficului  $E_{pa}$  în funcție de  $v$  (Fig. 8f),  $E^0 = 0.651$ . Parametrii  $\alpha$  și  $n$  au fost calculați din următoarea ecuație:

$$E_{pa} = 0.692 + 0.014 \times \ln v, R^2 = 0.9660 \quad (4)$$

obținută prin dependența lui  $E_{pa}$  cu  $\ln v$  (Fig. 8d). Valorile calculate au fost  $n = 1.96$  (~2 e) și  $\alpha = 0.8$ . În continuare,  $k_s$  a fost calculat din ecuația (2) și s-a obținut valoarea de 4.23 s<sup>-1</sup>. Având în vedere natura reversibilă a procesului electrochimic redox BB, se poate presupune că mecanismul de reducere electrochimică a colorantului este cel prezentat în Fig. 8g.



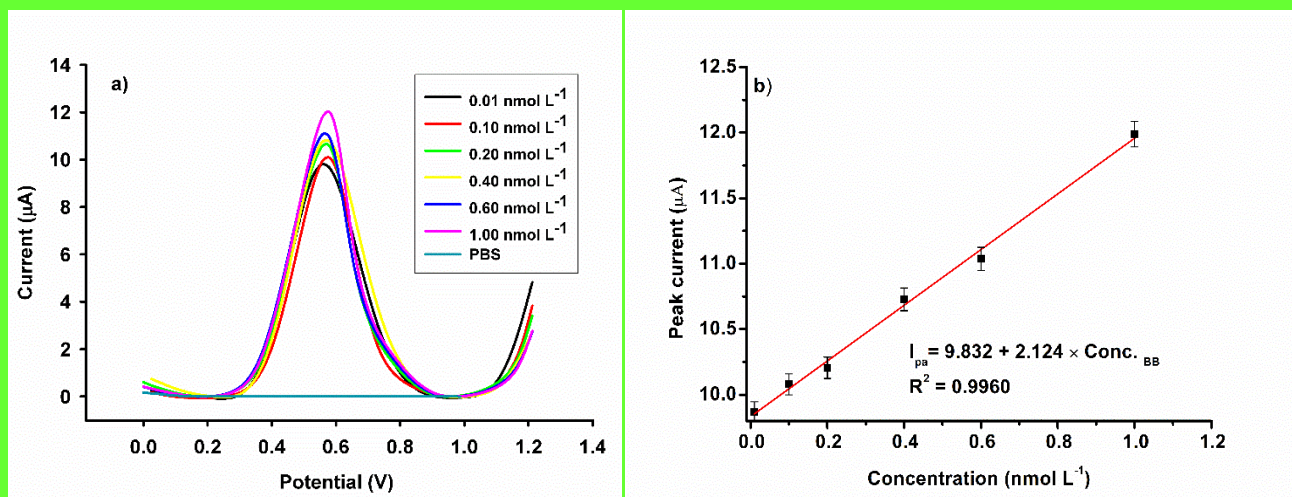




**Fig. 8.** (a) CV-uri ale PCV/CuONPs/CPE de variație a vitezei de scanare a soluției BB  $0.4 \text{ nmol L}^{-1}$  în PBS pH = 3.0 cu KCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) Corelația liniară a curentului de vârf cu rădăcina pătrată a vitezei de scanare; (c) Corelația liniară a logaritmului curentului de vârf cu logaritmul vitezei de scanare; (d) Corelația liniară a potențialului de vârf cu logaritmul natural al vitezei de scanare; (e) Corelația liniară a potențialului de vârf cu logaritmul vitezei de scanare; (f) corelația liniară a potențialului de vârf cu viteza de scanare; (g) Posibilul mecanism de reacție a BB la suprafața platformei PCV/CuONPs/CPE.

#### *Răspunsul caracteristic al platformei PCV/CuONPs/CPE pentru determinarea albastrului strălucitor FCF*

Pentru a studia caracteristicile de răspuns ale platformei PCV/CuONPs/CPE, s-au utilizat soluții de BB la diferite concentrații în PBS pH = 3.0 și KCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . Domeniul de concentrație variază de la  $0.01 \text{ nmol L}^{-1}$  la  $1.00 \text{ nmol L}^{-1}$ . Diferitele voltammograme de impulsuri (Fig. 9a) arată o corelație pozitivă între concentrația de BB și curentul de vârf. Acest lucru poate fi observat în Fig. 9b prin dependența liniară a concentrației de BB de intensitatea curentului. Din corelația liniară a concentrației de BB cu curentul de vârf, s-a obținut ecuația de regresie liniară după cum urmează:  $I_{p_a} = 9.832 + 2.124 \times \text{Conc.}_{\text{BB}}$ , unde  $I_{p_a}$  este intensitatea curentului,  $\text{Conc.}_{\text{BB}}$  este concentrația de albastru strălucitor ( $\text{nmol L}^{-1}$ ), iar 2.124 este panta cu  $R^2 = 0,9960$ .



**Fig. 9.** (a) Curbele DPV au fost obținute cu PCV/CuONPs/CPE în diferite concentrații de BB începând de la 0.01 până la 1.00 nmol L<sup>-1</sup> (PBS pH = 3.0, KCl 0.1 mol L<sup>-1</sup>); (b) Dependența liniară a concentrației de BB de curentul de vârf.

Determinarea limitei de detecție (LOD) a fost realizată prin utilizarea ecuației  $LOD = 3s/S$ . În această ecuație,  $s$  reprezintă abaterea standard a răspunsului curentului de vârf al PBS, care a fost măsurat de patru ori. Între timp,  $S$  reprezintă panta curbei de calibrare. Valoarea obținută a fost de 0.003 nmol L<sup>-1</sup>. Cu o eficiență de detecție ridicată și o limită de detecție scăzută, platforma PCV/CuONPs/CPE are o bună performanță analitică. Răspunsul analitic al platformei este similar cu cel al altor tehnici analitice (Tabelul 1).

Sensibilitatea platformei propuse a fost obținută cu ajutorul ecuației:  $\text{Sensibilitate} = \text{pantă}/A$ , unde  $A$  este suprafața activă a platformei dezvoltate. Prin urmare, sensibilitatea a fost determinată ca fiind de 294.55 μA nmol L<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>.

**Tabelul 1.** Analiza BB din diferite băuturi răcoritoare utilizând platforma PCV/CuONPs/CPE

Proba	Spiked (nmol L <sup>-1</sup> )	Detectat (nmol L <sup>-1</sup> )	Regăsirea (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	Bias (%)
Suc de mere acidulat	-	1.41	-	4.19	-
	0.2	0.19	99.22	0.56	0.79

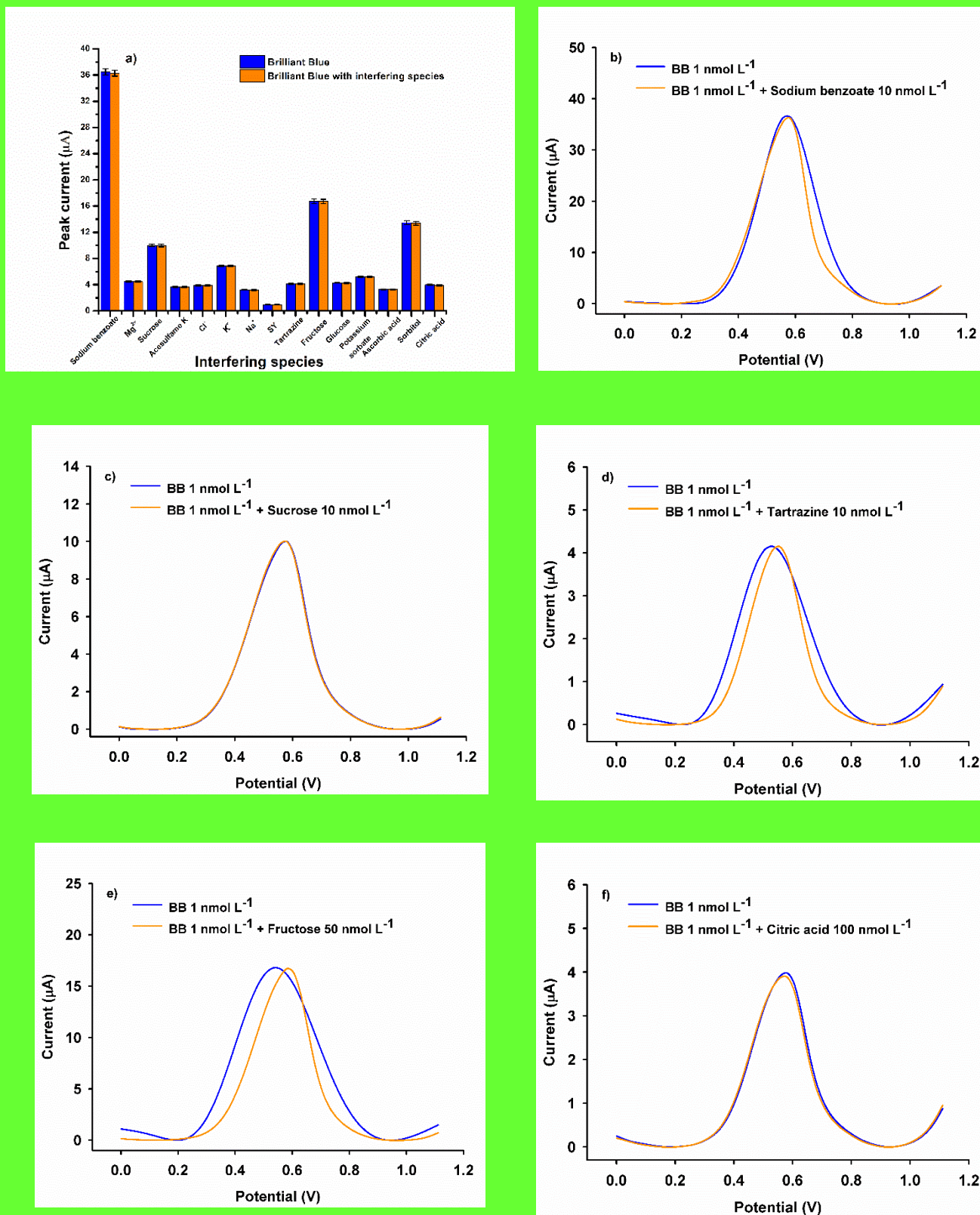


	0.6	0.59	99.39	4.22	0.23
Suc de mure	-	1.96	-	3.43	-
	0.2	0.19	99.19	0.38	0.81
	0.6	0.60	100.65	0.07	-0.65
Sirop de mentă	-	0.54	-	0.54	-
	0.2	0.20	100.67	0.45	-0.66
	0.6	0.59	99.50	4.22	0.50

<sup>a</sup>Deviația standard (n = 3)

### *Studii de selectivitate*

Pentru a verifica selectivitatea platformei PCV/CuONPs/CPE pentru detectarea BB, am ales mai mulți posibili ioni interferenți și substanțe organice care se găsesc în probele de băuturi răcoritoare. Printre ioni se numără  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , iar substanțele organice sunt zaharoza, glucoza, fructoza, sorbitolul, acidul ascorbic, acidul citric, acesulfam K, sorbatul de potasiu, benzoatul de sodiu și doi coloranți, inclusiv galben apus de soare FCF și tartrazina. Toate soluțiile analizate au fost preparate în condiții optime, utilizând PBS pH = 3.0 și  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl ca electrolit de suport și o concentrație fixă de  $1.0 \text{ nmol L}^{-1}$  BB. Constatările experimentale nu au indicat nicio modificare semnificativă a intensității curentului în detectarea BB atunci când s-a adăugat un surplus de 10 ori  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , benzoat de sodiu, zaharoză, acesulfam K, tartrazină, sorbitol, acid ascorbic, glucoză, 25 ori  $\text{K}^+$ , sunset yellow, 50 ori fructoză, sorbat de potasiu și 100 ori  $\text{Na}^+$  și acid citric (Fig. 10). Erorile relative ale semnalului de intensitate a curentului sunt mai mici de 5.0 %, ceea ce sugerează că platforma PCV/CuONPs/CPE este selectivă pentru detectarea BB.

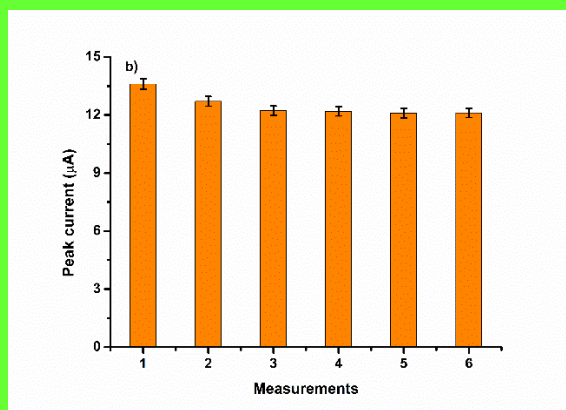
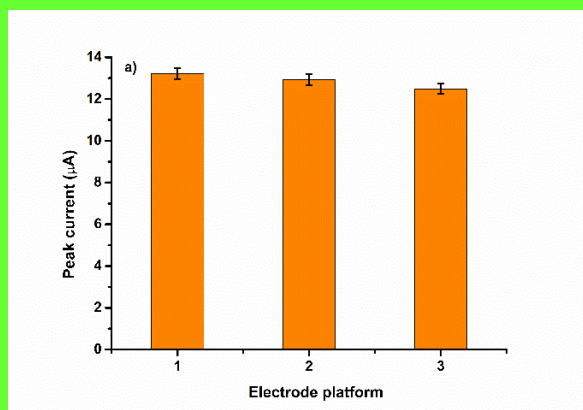


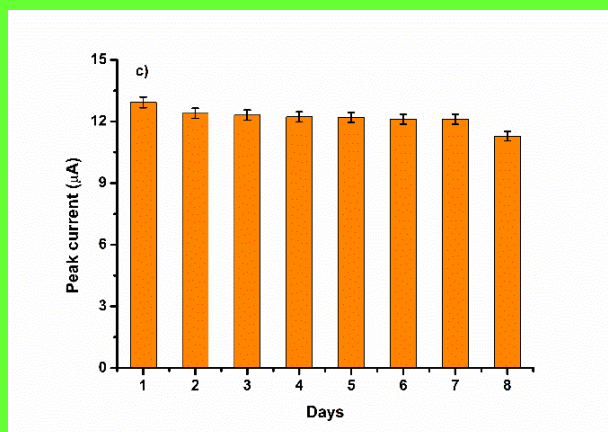
**Fig. 10. (a)** Măsurătorile studiului de selectivitate ale platformei PCV/CuONPs/CPE; **(b)** curbele DPV pentru 1 nmol L<sup>-1</sup> BB și 1 nmol L<sup>-1</sup> BB cu 10 nmol L<sup>-1</sup> benzoat de sodiu; **(c)** curbele DPV pentru 1 nmol L<sup>-1</sup> BB și 1 nmol L<sup>-1</sup> BB cu 10 nmol L<sup>-1</sup> zaharoză; **(d)** curbele DPV pentru 1 nmol L<sup>-1</sup> BB și 1 nmol L<sup>-1</sup> BB cu 10 nmol L<sup>-1</sup> tartrazină;

**(e)** curbele DPV pentru 1 nmol L<sup>-1</sup> BB și 1 nmol L<sup>-1</sup> BB cu 50 nmol L<sup>-1</sup> fructoză; **(f)** Curbele DPV pentru 1 nmol L<sup>-1</sup> BB și 1 nmol L<sup>-1</sup> BB cu 100 nmol L<sup>-1</sup> acid citric.

### *Reproductibilitate, repetabilitate și stabilitate*

Pentru a evalua repetabilitatea, reproductibilitatea și stabilitatea platformelor PCV/CuONPs/CPE, a fost utilizată o soluție care conține 0.4 nmol L<sup>-1</sup> BB. Soluția a fost preparată în PBS pH = 3.0 și KCl 0.1 mol L<sup>-1</sup> și a fost analizată folosind tehnica DPV. Reproducibilitatea a fost monitorizată într-o zi, utilizând trei platforme PCV/CuONPs/CPE diferite care au fost preparate prin aceleași operațiuni. S-a obținut o abatere standard relativă (RSD%) de 3.58% (n = 5) pentru toți electrozii modificați (Fig. 11a). Pentru studii de repetabilitate, o platformă care utilizează CPE care a fost modificată cu CuONPs și poli (cristal violet) a fost examinată în mod repetat pentru șase serii de BB, cu o valoare RSD de 1,93% (Fig. 11b). Pentru a evalua stabilitatea, am testat o platformă modificată timp de 8 zile la temperatura camerei (Fig. 11c). După această perioadă de 8 zile, s-a observat o scădere a răspunsului intensității curentului la 87.24% (RSD% < 5%) față de valoarea sa inițială. Aceste constatări au arătat că platforma BB proiectată are un nivel ridicat de repetabilitate, reproductibilitate și stabilitate.





**Fig. 11.** (a) Repetabilitatea, (b) Reproducibilitatea, and (c) Timpul stabilității platformei PCV/CuONPs/CPE.

### *Analiza probelor reale*

Pentru a testa aplicațiile analitice ale platformei propuse, a fost utilizată o selecție de trei băuturi răcoritoare, inclusiv suc de mere acidulat, suc de mure și sirop de mentă. Pentru a determina BB în băuturile răcoritoare, au fost efectuate măsurători DPV utilizând platforma PCV/CuONPs/CPE. Băuturile răcoritoare au fost preparate așa cum s-a menționat anterior. Experimentele de recuperare au fost, de asemenea, efectuate în PBS pH = 3.0 și KCl 0.1 mol L<sup>-1</sup>, utilizând probe de băuturi răcoritoare îmbogățite cu concentrații cunoscute de BB din curba de calibrare, pentru a confirma acuratețea și aplicabilitatea practică a platformei propuse (Tabelul 1). Se poate observa că platforma electrochimică dezvoltată are o recuperare bună, cu o rată de recuperare cuprinsă între 99.19 % și 100.67 %, ceea ce sugerează acuratețea și aplicabilitatea sa pentru utilizare practică.

### **Referințe**

- Agnihotri, A.S., Varghese, A., M, N., 2021. Transition metal oxides in electrochemical and bio sensing: A state-of-art review. *Applied Surface Science Advances* 4. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100072>
- Arévalo, F.J., Osuna-Sánchez, Y., Sandoval-Cortés, J., Di Tocco, A., Granero, A.M., Robledo, S.N., Zon, M.A., Vettorazzi, N.R., Martínez, J.L., Segura, E.P., Iliná, A., Fernández, H., 2017. Development of an electrochemical sensor for the determination of glycerol based on glassy carbon electrodes modified with a copper oxide nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes/pectin composite. *Sens Actuators B Chem* 244, 949–957. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.093>
- Chen, M., Chao, M., Ma, X., 2014. Poly(crystal violet)/graphene-modified electrode for the simultaneous determination of trace lead and cadmium ions in water samples. *J Appl Electrochem* 44, 337–344. <https://doi.org/10.1007/s10800-013-0641-3>

- Chen, X., Jiahao YIN, Chao ZHANG, Nian LU, Zhidong CHEN, 2017. Determination of Brilliant Blue FCF by a Novel Solid-state ECL Quenching Sensor of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-poly(sulfosalicylic acid)/GCE. *ANALYTICAL SCIENCES* 33, 1123–1128.
- Elango, M., Deepa, M., Subramanian, R., Mohamed Musthafa, A., 2018. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Polyindole/Ag–CuO Nanocomposites by Reflux Condensation Method. *Polymer - Plastics Technology and Engineering* 57, 1440–1451. <https://doi.org/10.1080/03602559.2017.1410832>
- Faraji, M., Sahneh, B.N., Javanshir, R., 2017. An Ion-pair Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Simultaneous Determination of Synthetic Dyes in Ice Cream Samples by HPLC, Iranian Chemical Society Anal. Bioanal. Chem. Res.
- Florian, M., Yamanaka, H., Carneiro, P.A., Zanoni, M.V.B., 2002. Determination of brilliant blue FCF in the presence and absence of erythrosine and quinoline yellow food colours by cathodic stripping voltammetry. *Food Addit Contam* 19, 803–809. <https://doi.org/10.1080/02652030210146855>
- Ganesh, P.S., Kumara Swamy, B.E., Fayemi, O.E., Sherif, E.S.M., Ebenso, E.E., 2018. Poly(crystal violet) modified pencil graphite electrode sensor for the electroanalysis of catechol in the presence of hydroquinone. *Sens Biosensing Res* 20, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2018.08.001>
- Ghoreishi, S.M., Behpour, M., Golestaneh, M., 2011. Simultaneous voltammetric determination of Brilliant Blue and Tartrazine in real samples at the surface of a multi-walled carbon nanotube paste electrode. *Analytical Methods* 3, 2842–2847. <https://doi.org/10.1039/c1ay05327b>
- Gosser, D.K.Jr., 1993. Cyclic voltammetry simulation and analysis of reaction mechanisms. VCH Publisher, New York.
- Heydari, R., Hosseini, M., Alimoradi, M., Zarabi, S., 2016. A Simple Method for Simultaneous Spectrophotometric Determination of Brilliant Blue FCF and Sunset Yellow FCF in Food Samples after Cloud Point Extraction, *J.Chem.Soc.Pak*.
- Karimi-Maleh, H., Shojaei, M., Amini, F., Akbari, A., 2017. Analysis of Levodopa in the Presence of Vitamin B6 Using Carbon Paste Electrode Modified with 1-Butyl-3 methylimidazolium Hexafluorophosphate and CuO Nanoparticles. *Electroanalysis* 29, 1854–1859. <https://doi.org/10.1002/elan.201600785>
- Laviron, E., 1979. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem* 101, 19–28.
- Lipskikh, O.I., Korotkova, E.I., Barek, J., Vyskocil, V., Saqib, M., Khristunova, E.P., 2020. Simultaneous voltammetric determination of Brilliant Blue FCF and Tartrazine for food quality control. *Talanta* 218, 121136. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121136>
- Shankar, S.S., Kumara Swamy, B.E., Chandra, U., Sherigara, B.S., 2011. Simultaneous Determination of Dopamine, Ascorbic Acid and Uric Acid at Poly (Crystal Violet) Modified Carbon Paste Electrode, *Anal. Bioanal. Electrochem*.
- Siddegowda, K., Mahesh, B., Swamy, N., 2018. Fabrication of copper oxide nanoparticles modified carbon paste electrode and its application in simultaneous electroanalysis of guanine, adenine and thymine. *Sens Actuators A Phys* 280, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2018.07.049>
- Sierra-Rosales, P., Toledo-Neira, C., Ortúzar-Salazar, P., Squella, J.A., 2019. MWCNT-modified Electrode for Voltammetric Determination of Allura Red and Brilliant Blue FCF in Isotonic Sport Drinks. *Electroanalysis* 31, 883–890. <https://doi.org/10.1002/elan.201800786>
- Sierra-Rosales, P., Toledo-Neira, C., Squella, J.A., 2017. Electrochemical determination of food colorants in soft drinks using MWCNT-modified GCEs. *Sens Actuators B Chem* 240, 1257–1264. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.135>



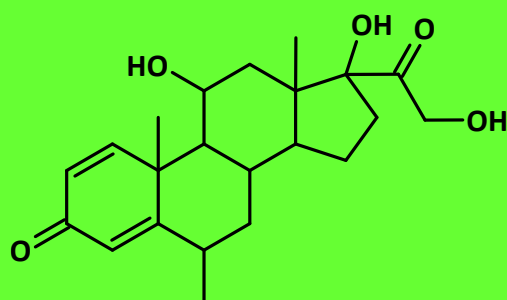
- Sun, W., Wang, Y., Lu, Y., Hu, A., Shi, F., Sun, Z., 2013. High sensitive simultaneously electrochemical detection of hydroquinone and catechol with a poly(crystal violet) functionalized graphene modified carbon ionic liquid electrode. *Sens Actuators B Chem* 188, 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.07.032>
- Tang, J., Jin, B., 2016. Poly (crystal violet) - Multi-walled carbon nanotubes modified electrode for electroanalytical determination of luteolin. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 780, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.08.037>
- Tang, J., Wang, W., Zheng, S., Zhang, Y., Wei, J., Wang, J., 2016. Electrochemical Determination of Tert-Butyl Hydroquinone in Edible Oil Samples at Poly (Crystal Violet) Modified Glassy Carbon Electrode. *Food Anal Methods* 9, 3044–3052. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0495-5>
- Teymoori, N., Raoof, J.B., Khalilzadeh, M.A., Ojani, R., 2018. An electrochemical sensor based on CuO nanoparticle for simultaneous determination of hydrazine and bisphenol A. *Journal of the Iranian Chemical Society* 15, 2271–2279. <https://doi.org/10.1007/s13738-018-1416-x>
- Wang, M., Yang, M., Sun, Q., Gao, Y., Zhao, J., 2015. Development of a facile sensor for the determination of Brilliant Blue FCF in beverages. *Int J Environ Anal Chem* 95, 969–979. <https://doi.org/10.1080/03067319.2015.1077521>
- Wang, W., Tang, J., Zheng, S., Ma, X., Zhu, J., Li, F., Wang, J., 2017. Electrochemical Determination of Bisphenol A at Multi-walled Carbon Nanotubes/Poly (Crystal Violet) Modified Glassy Carbon Electrode. *Food Anal Methods* 10, 3815–3824. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0944-9>
- Yi, J., Zeng, L., Wu, Q., Yang, L., Xie, T., 2018. Sensitive Simultaneous Determination of Synthetic Food Colorants in Preserved Fruit Samples by Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection. *Food Anal Methods* 11, 1608–1618. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1141-6>

**Platformă multimod de detecție bazată pe senzor 3D integrat pentru testarea rapidă in-situ a metilprednisolonului în forma sa farmaceutică și în probe de apă de suprafață**

## **Introducere**

Senzorii multimod se bazează pe materiale active capabile să furnizeze semnale în mai multe moduri de detecție. Integrarea lor în platforme permite comutarea ușoară între moduri și, de asemenea, utilizarea lor ca instrumente portabile pentru determinarea in-situ a diferiților analiți. Metilprednisolonul a fost selectat ca analit model pentru a dovedi detecția multimod a senzorului 3D și platformei.

Glucocorticoizii sintetici sunt o clasă largă de medicamente care sunt, atât din punct de vedere structural, cât și funcțional similare cu glucocorticoizii, hormonii steroizi endogeni. Această clasă de medicamente include metilprednisolonul (MP, 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihidroxi-6 $\alpha$ -metil-1,4-pregnadien-3,20-dionă), prezentat în Fig. 1. Având în vedere spectrul său larg de acțiuni, este prescris pentru diverse afecțiuni, în principal pentru efectele sale antiinflamatorii și imunosupresoare. Aceste afecțiuni includ tulburări reumatice, hipersensibilități severe, tulburări dermatologice, tulburări autoimune și tulburări gastrointestinale inflamatorii [1-3]. În plus, poate fi utilizat împreună cu alte medicamente imunosupresoare pentru a preveni și trata boala grefă contra gazdă [4].



**Figura 1.** Structura chimică a metilprednisolonului

Deși utilizarea terapeutică a metilprednisolonului este de necontestat, aceasta este legată de câteva reacții adverse nedorite care afectează metabolismul, echilibrul electrolitic, ochii, pielea și sistemele musculo-scheletice, endocrin, imunitar, cardiovascular și gastrointestinal [5].

Similar cu alți glucocorticoizi sintetici, metilprednisolonul provoacă aceleași efecte asupra funcțiilor vitale ale corpului observate la oameni, majoritatea vertebratelor, inclusiv la pești. Rapoarte recente au indicat că au fost găsite în unele ape de suprafață în concentrații care au impact biologic asupra peștilor. Luând în considerare utilizarea crescândă a acestor molecule, se anticipează că nivelul concentrației lor în mediu va crește și mai mult [6].

Atât monografia din Farmacopeea europeană, cât și cea din Statele Unite recomandă utilizarea cromatografiei lichide ca metodă de determinare compendială a metilprednisolonului din starea sa pură și în comprimate [7]. O analiză a literaturii recente a arătat că au fost utilizate, în principal, metode cromatografice pentru a determina metilprednisolonul din probe biologice și de apă. Acestea includ cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță – spectrometrie de masă în tandem (UHPLC–MS/MS),



cromatografia lichidă – spectrometrie de masă în tandem (LC–MS/MS), test imunocromatografic (ICA), lichid cromatografie–electrospray–spectrometrie de masă în tandem (LC–ESI-MS/MS) [8–14]. Aceste tehnici sunt robuste și dau rezultate precise, cu toate acestea, ele au unele dezavantaje, și anume echipamente scumpe care necesită supraveghere cu personal specializat, o rată mare de consum de solvenți și proceduri de pregătire a probelor care necesită timp. Eforturile de cercetare au fost îndreptate către metode electrochimice bazate pe senzori pentru a contracara aceste dezavantaje și pentru a oferi o alternativă la metodele tradiționale. Acestea sunt superioare metodelor clasice datorită fiabilității, designului simplist al senzorului, procedurilor minime de procesare a probelor, miniaturizării și portabilității.

Utilizarea electrozilor din pastă de carbon în studiile electrochimice oferă o varietate de beneficii, inclusiv simplitatea designului, suprafața ușor de reînnoit, rentabilitatea, sensibilitatea, acuratețea și robustețea. Mai mult, ele produc un răspuns stabil caracterizat printr-o rezistență ohmică scăzută și un curent non-Faradaic scăzut. În plus, răspunsul și sensibilitatea lor față de moleculele electroactive pot fi îmbunătățite semnificativ prin modificarea lor prin procedee chimice sau fizice folosind o gamă largă de materiale și compuși [15-18]. Grafenul este un material utilizat pe scară largă în construcția senzorilor electrochimici. S-a demonstrat că îmbunătățește suprafața electroactivă a senzorilor, ceea ce duce, la rândul său, la o sensibilitate mai bună [19]. În trecut, senzorii care foloseau grafenul ca nanoelectrocatalizator s-au dovedit a fi excepțional de fiabili pentru testarea diferitelor medicamente [20,21].

Un senzor care poate răspunde simultan în mai multe moduri diferite este denumit senzor multimod [22]. Diferiți senzori multimod au fost proiectați și utilizați pentru a determina numeroase molecule [23–26]. Valinomicina este o moleculă macrocyclică compusă din 12 aminoacizi și esterii care funcționează și ca ionofor de potasiu. Poate facilita transportul ionilor de potasiu prin membranele lipidice [27]. Până în prezent, doi electrozi modificați au fost raportați pentru analiza electrochimică a metilprednisolonului [28,29].

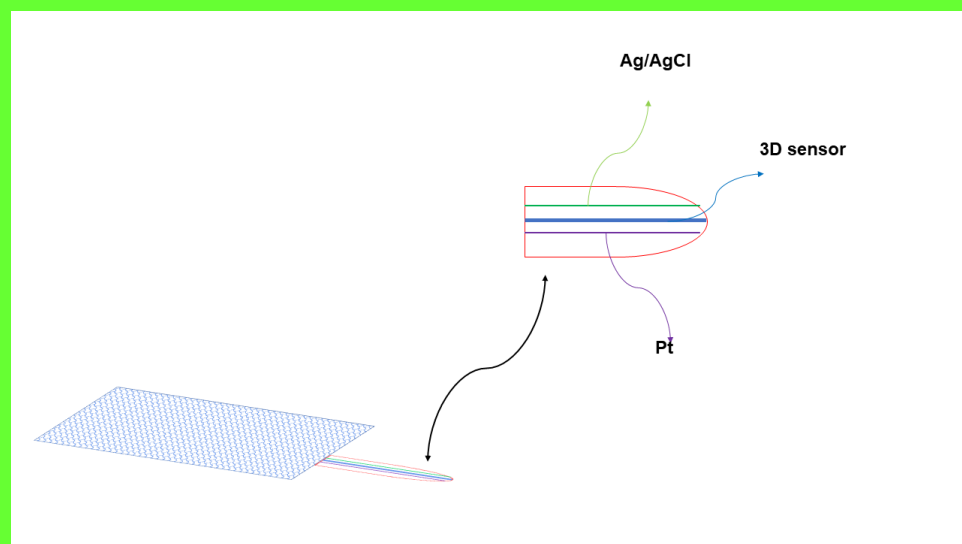
Această lucrare propune utilizarea unei platforme multimod bazate pe un electrod integrat de pastă de nanografen modificat cu valinomicină (VMC/NGPE) pentru identificarea și cuantificarea in-situ a metilprednisolonului în comprimate farmaceutice și în probe de apă de suprafață. Noutatea este dată de proiectarea senzorului multimod, de utilizarea valinomicinei care are proprietăți electrocatalitice bune (necesare

în modul voltametriei cu undă pătrată), și de asemenea poate oferi canalele immobilizate în pasta de nanografen necesare pentru detecția stocastică. De asemenea, este o noutate integrarea senzorului multimod într-o platformă portabilă capabilă să efectueze determinarea metilprednisolonului și să trimită datele prin wireless către utilizatorul final.

## Experimental

### Designul senzorului 3D VMC/NGPE

Pentru a pregăti senzorul electrochimic 3D pe bază de valinomicină, 100 mg de pulbere de nanografen și 50  $\mu\text{L}$  de ulei de parafină au fost amestecate bine într-un mojar de agat până când s-a obținut o pastă omogenă. Apoi, la pastă s-au adăugat 100  $\mu\text{L}$  dintr-o soluție de valinomicină  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , formând astfel pasta de nanografen modificat (VMC/NGP). Pasta modificată a fost plasată într-un tub de plastic 3D (imprimat în laboratorul nostru folosind imprimanta 3D); un fir de argint a servit drept contact electric. Suprafața electrodului a fost lustruită cu folie de aluminiu. Înainte de fiecare măsurătoare, electrodul a fost clătit cu apă deionizată. Când nu a fost utilizat, VMC/NGPE a fost păstrat în frigider, la  $2-8^\circ \text{ C}$ .



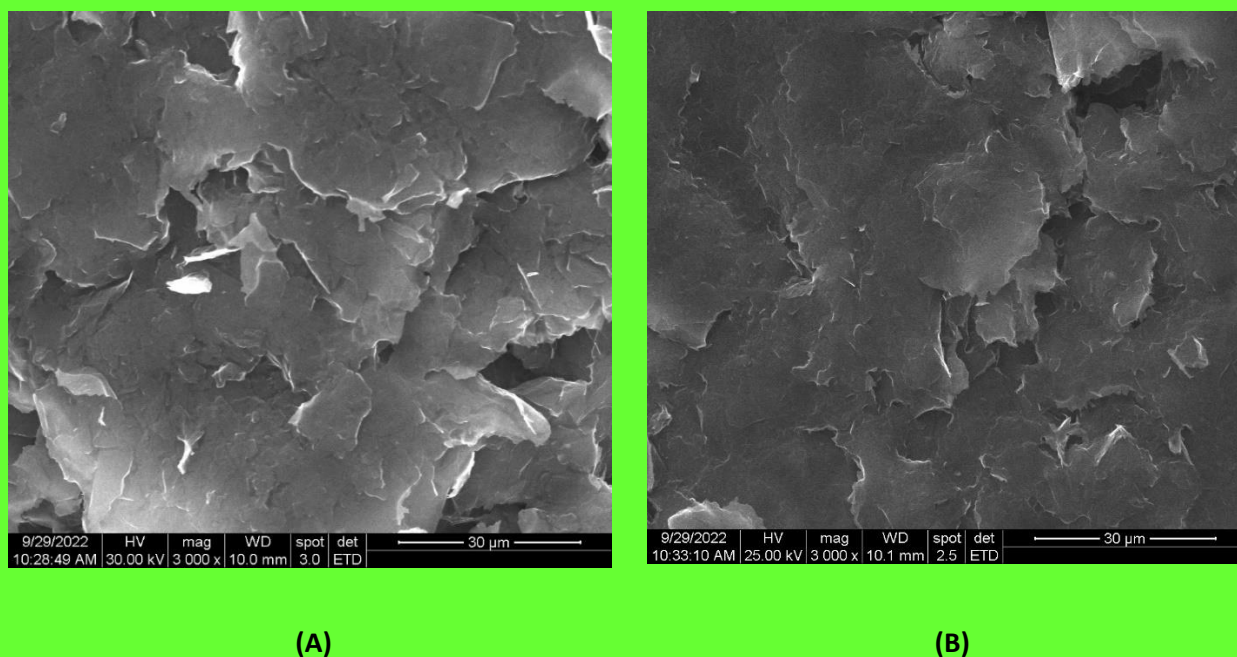
**Schema 1** Reprezentarea schematică a platformei de detectare multimod bazată pe senzor 3D integrat.

Senzorul 3D a fost integrat în platforma mini potențostatului EmStat Pico împreună cu senzorul de pseudoreferință Ag/AgCl și un fir de Pt care servește ca senzor auxiliar (Schema 1).

## Rezultate și discuții

### *Caracterizarea SEM a suprafeței active a senzorului electrochimic*

Morfologia suprafeței pastei de nanografen (NGP) și VMC/NGP a fost caracterizată folosind imagini SEM. Fig. 2(A) afișează o imagine SEM reprezentativă a NGP și se poate observa că este aranjată în straturi subțiri de structuri asemănătoare nanofilelor, în timp ce imaginea SEM VMC/NGP (Fig. 2(B)) dezvăluie nanofile ce sunt mai agregate.



**Figura 2.** Imagini SEM de (A) NGP și (B) VMC/NGP.

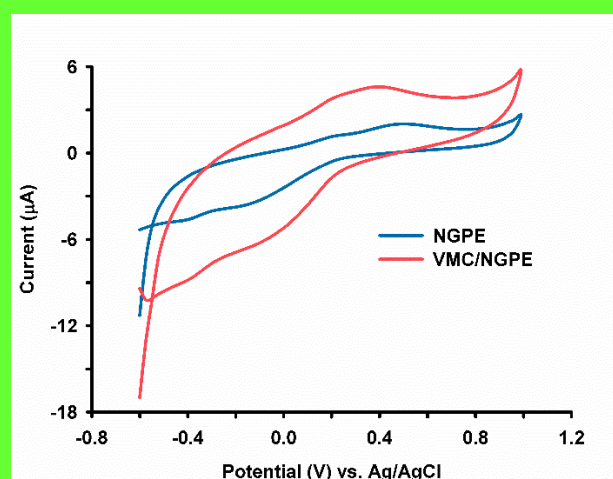
### *Caracterizarea electrochimică a senzorului 3D integrat în platforma multimodală*

Voltmetria ciclică (CV) și spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS) au fost utilizate pentru caracterizarea senzorilor nemodificat (NGPE) și 3D modificat (VMC/NGPE). Tehnica CV a fost folosită pentru a investiga răspunsul electrochimic al VMC/NGPE. CV (Fig. 3(A)) au fost înregistrate folosind NGPE și VMC/NGPE ca electrozi de lucru într-o soluție de  $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de fericianură de potasiu ( $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ), în intervalul de potențial  $-0,60 - 1,00 \text{ V}$ , la o rată de scanare de  $0,10 \text{ V s}^{-1}$ . În comparație cu NGPE, VMC/NGPE a prezentat vârfuri redox mai mari, ceea ce indică faptul că procesul de modificare a îmbunătățit conductibilitatea.

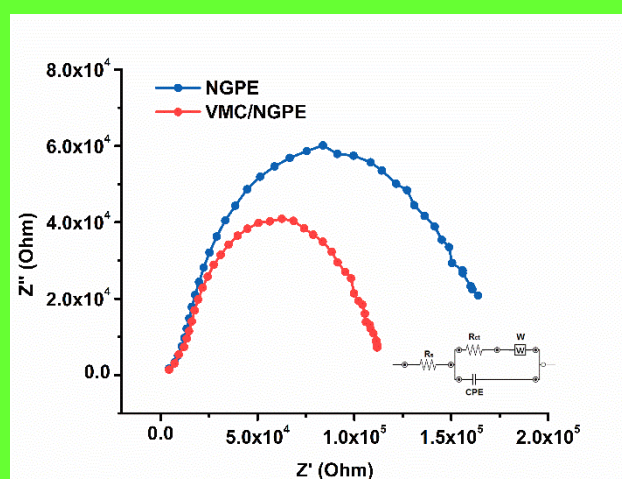
Metoda EIS a fost utilizată pentru a analiza interfața NGPE și VMC/NGPE la un interval de frecvență între  $10^5$  și  $122 \text{ Hz}$ . Măsurătorile au fost efectuate într-o soluție de  $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de fericianură de potasiu ( $0,10 \text{ mol L}^{-1}$

KCl). În Fig. 3(B) este prezentat graficul Nyquist, înregistrat pentru NGPE și VMC/NGPE. NGPE a afișat un semicerc mare, bine definit într-un interval de frecvență joasă, corespunzător unei rezistențe electrice ridicate ( $R_{ct} = 6,61 \times 10^4 \Omega$ ), în timp ce VMC/NGPE a arătat un semicerc mai mic, indicând o rezistență electrică mai mică ( $R_{ct} = 4,57 \times 10^4 \Omega$ ). Transportul mai rapid al electronilor poate fi realizat prin folosirea VMC/NGPE, așa cum demonstrează semicercul mai mic și valoarea  $R_{ct}$  mai mică. Constatările EIS sunt confirmate de măsurătorile CV.

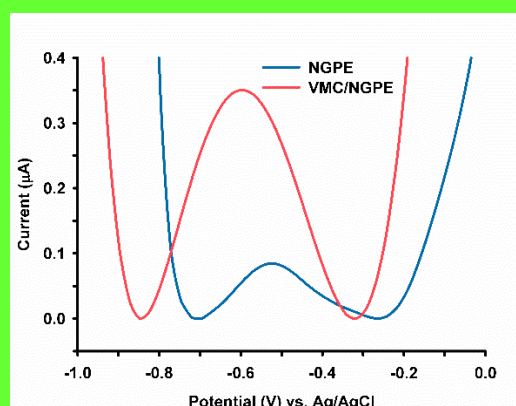
Comportamentul electrochimic al electrodului nemodificat și a celui modificat a fost investigat în continuare utilizând tehnica SWV în PBS pH 10,00 care conține  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl ca electrolit suport și  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  MP. VMC/NGPE a depășit NGPE în ceea ce privește rezultatele electrooxidării MP, așa cum este prezentat în Fig. 3(C).



(A)



(B)



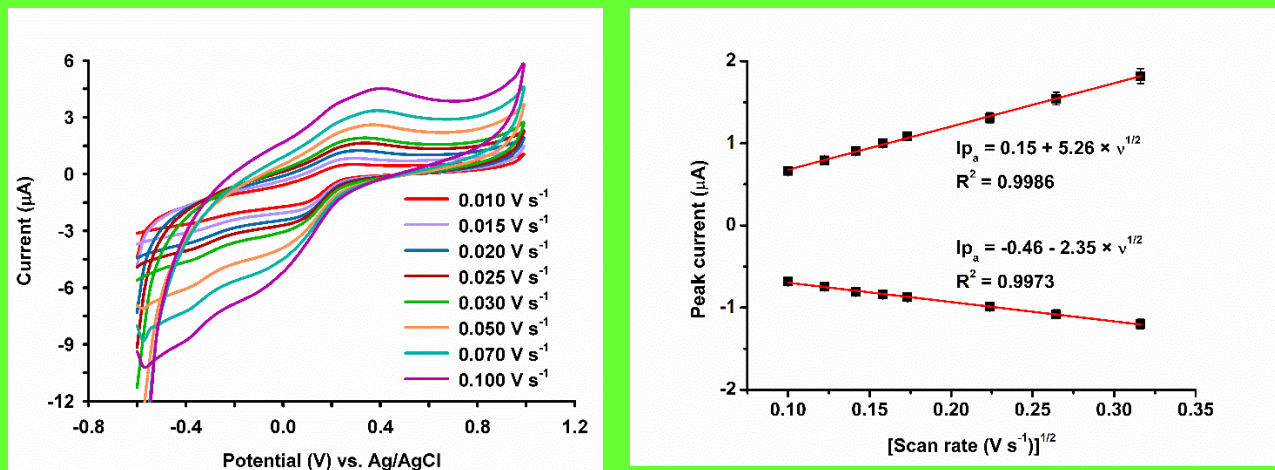
(C)

**Figura 3. (A)** Voltamograme ciclice ale curentului reprezentat în funcție de potențial (condiții de lucru: treaptă de potențial 0,025 V; rata de baleiaj 0,1 V s<sup>-1</sup>) într-o soluție de fericianură de potasiu de 5,00 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (0,10 mol L<sup>-1</sup> KCl) înregistrată la NGPE (linia albastră) și VMC/NGPE (linia roșie); **(B)** Spectrele de impedanță electrochimică înregistrate într-o soluție de 5,00 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de fericianură de potasiu (0,10 mol L<sup>-1</sup> KCl) (condiții de lucru: interval de frecvență 10<sup>5</sup> până la 122 Hz) înregistrate la NGPE (linia albastră) și VMC/NGPE (linia roșie). Inserție: diagramă de circuit echivalent Randles unde R<sub>s</sub> - rezistența soluției; CPE - element de fază constantă; W - rezistența la difuzie Warburg; R<sub>ct</sub> - rezistența la transferul de electroni; **(C)** Voltamograme cu undă pătrată cu PBS pH 10,00 care conțin 0,10 mol L<sup>-1</sup> KCl ca electrolit suport și 100 μmol L<sup>-1</sup> MP înregistrate la NGPE (linia albastră) și VMC/NGPE (linia roșie).

Activitățile electrocatalitice ale electrozilor nemodificat și modificat au fost studiate prin calcularea suprafeței lor electroactive utilizând ecuația Randles-Sevcik [30] pentru procese redox cvasi-reversibile controlate prin difuzie. După cum se arată mai jos, intensitățile curenților de vârf anodic și catodic sunt direct proporționale cu rădăcina pătrată a vitezei de baleiaj:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D_R^{1/2} v^{1/2}$$

unde: I<sub>p</sub> – curent de vârf (A), n – numărul de electroni transferați (în acest caz n = 1,00), A – suprafața activă a electrodului (cm<sup>2</sup>), C<sub>0</sub> – concentrația de fericianură de potasiu (mol cm<sup>-3</sup>), D<sub>R</sub> – coeficientul de difuzie (7,60 × 10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) și v – viteza de baleiaj (V s<sup>-1</sup>). CV au fost efectuate într-o soluție de 5,00 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de fericianură de potasiu (0,10 mol L<sup>-1</sup> KCl). După cum se arată în Fig. 4(A), a existat o corelație între creșterea ratei de scanare și intensitățile varfurilor anodice și catodice. Fig. 4(B) afișează dependențele liniare ale I<sub>pa</sub> și I<sub>pc</sub> față de v<sup>1/2</sup> pentru electrodul modificat. Această liniaritate indică un proces redox controlat prin difuzie care are loc la suprafața electrodului. Suprafețele electroactive calculate pentru NGPE și VMC/NGPE au fost 4,50 × 10<sup>-4</sup> cm<sup>2</sup> și, respectiv, 1,42 × 10<sup>-3</sup> cm<sup>2</sup>. Datorită modificării cu valinomicină, transferul de electroni este facilitat, îmbunătățind astfel suprafața electroactivă.



(A)

(B)

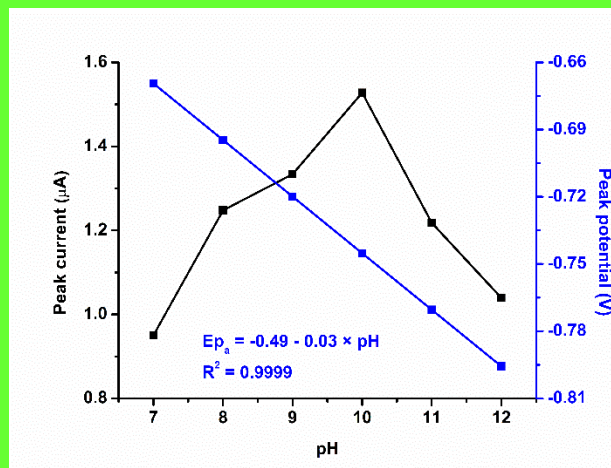
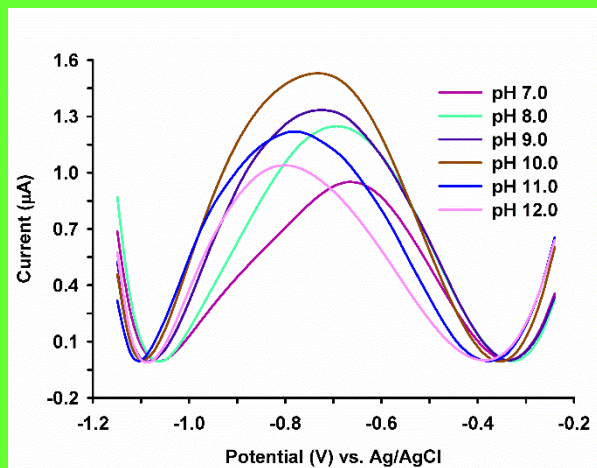
**Figura 4. (A)** Voltamogramele ciclice ale fericianurii de potasiu  $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl) soluție la diferite viteze de baleiaj (de la  $0,01 \text{ V s}^{-1}$  la  $0,10 \text{ V s}^{-1}$ ) înregistrate la VMC/NGPE; **(B)** Dependența liniară a curentului de vârf de rădăcina pătrată a vitezei de baleiaj înregistrată la VMC/NGPE.

#### **Optimizarea pH-ului și a electrolitului suport**

Tehnica SWV a fost folosită pentru a investiga condițiile optime de lucru pentru oxidarea MP. Pentru optimizarea pH-ului, soluțiile PBS care conțin  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  MP au fost examinate într-un interval de valori ale pH-ului de la 7,00 la 12,00. Vârful maxim de oxidare al MP a fost obținut într-un mediu bazic (pH 10,00), așa cum se arată în Fig. 5(A). Ca urmare, PBS pH 10,00 a fost utilizat pentru toate investigațiile ulterioare. Mai mult, așa cum se arată în Fig. 5(B), potențialul de vârf scade liniar de la pH 7,00 la 12,00 urmând relația  $E_{pa} = -0,49 - 0,03 \times \text{pH}$ , cu un coeficient de regresie excelent ( $R^2 = 0,9999$ ). Valoarea pantei este relativ apropiată de valoarea teoretică nernstiană ( $0,059 \text{ V pH}^{-1}$ ).

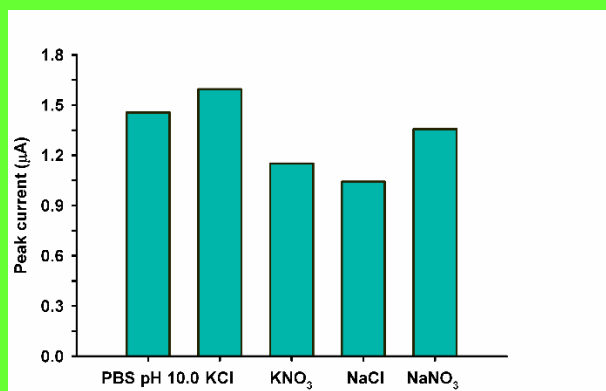
Influența electrolitului suport asupra curentului de vârf corespunzător electrooxidării MP a fost examinată prin adăugarea separată a soluțiilor de NaCl, KCl, NaNO<sub>3</sub> și KNO<sub>3</sub> într-o concentrație de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  la o soluție de PBS pH 10,00 care conține  $100,00 \mu\text{mol L}^{-1}$  MP. Curentul maxim de vârf a fost observat la  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl, așa cum se arată în Fig. 4(C). În consecință,  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl a fost utilizat ca electrolit suport în prepararea tuturor soluțiilor de lucru MP.





(A)

(B)

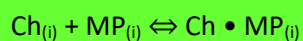


(C)

**Figura 5. (A)** Voltamograme cu unde pătrate ale PBS pH cuprins între 7,00 și 12,00 și  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  MP înregistrate la VMC/NGPE; **(B)** Dependențe liniare ale pH-ului cu potențialul de vârf și respectiv curentul de vârf; **(C)** Influența diversilor electroliți suport ( $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCl,  $\text{KNO}_3$ , NaCl,  $\text{NaNO}_3$ ) asupra electrooxidării a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  MP (PBS pH 10,00).

### **Caracteristicile de răspuns ale senzorului 3D integrat în platforma multimod - în modul stocastic**

Detecția stocastică este o metodă în două etape, în funcție de conductivitatea canalului. În prima etapă, analitul intră prin canal, îl blochează (durata de timp în care canalul este blocat este dată de  $t_{\text{off}}$  și indică semnătura analitului), iar curentul scade la zero. În a doua etapă, analitul se leagă de peretele canalului (un proces caracterizat prin parametrul  $t_{\text{on}}$ ), rezultând în ecuația de echilibru:





unde Ch – canalul și i – interfața.

Tabelul 1 prezintă caracteristicile de răspuns ale senzorului 3D VMC/NGPE în modul stocastic. Un interval de concentrație liniar de la  $1,00 \times 10^{-9}$  la  $1,00 \times 10^4 \mu\text{mol L}^{-1}$  MP și o limită de cuantificare (LOQ) de  $1,00 \times 10^{-9} \mu\text{mol L}^{-1}$  MP au fost obținute atunci când s-a folosit senzorul 3D VMC/NGPE în modul stocastic. Rezultatele obținute au fost corelate cu sensibilitatea ridicată, concluzionând astfel că senzorul propus poate fi aplicat pentru analiza MP din comprimate farmaceutice și probe de apă de suprafață fără nici un tratament prealabil. Această tehnică poate fi utilă pentru controlul calității farmaceutice in-situ pentru a asigura puritatea substanței active și pentru a testa uniformitatea conținutului de MP în comprimate. În plus, poate fi utilizat pentru monitorizarea in-situ a calității a mediului acvatic.

**Tabelul 1.** Caracteristicile de răspuns ale senzorului 3D VMC/NGPE în modul stocastic.

Ecuția de calibrare și coeficientul de corelație (r)	Domeniu liniar de concentrație ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$t_{\text{off}}$ (s)	Sensibilitate ( $\text{s}^{-1}\text{mol L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
$1/t_{\text{on}} = 0,24 + 1,19 \times 10^3 \times C_{\text{MP}}$ $r = 0,9997$	$1,00 \times 10^{-9} - 1,00 \times 10^4$	0,5	$1,19 \times 10^3$	$1,00 \times 10^{-9}$

$$\langle C_{\text{MP}} \rangle = \mu\text{mol L}^{-1} \quad \langle t_{\text{on}} \rangle = \text{s}$$

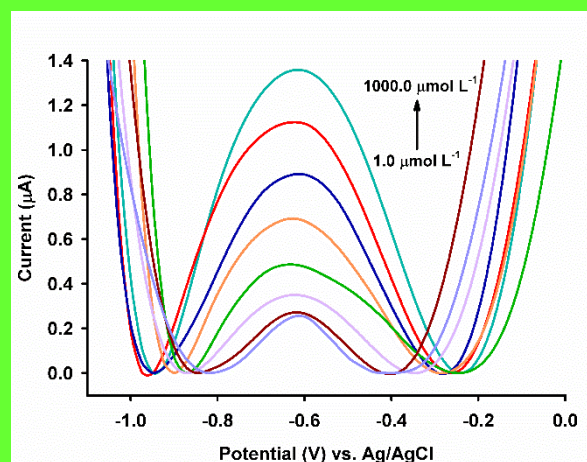
### **Caracteristicile de răspuns ale senzorului 3D integrat în platforma multimod – în modul voltametrie cu undă pătrată**

Au fost studiate caracteristicile de răspuns ale senzorului 3D VMC/NGPE la electrooxidarea MP. Măsurătorile SWV au fost înregistrate la PBS pH 10,00 conținând  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  KCL ca electrolit suport și diferite concentrații de MP în intervalul  $1,00 - 1000 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Fig. 6(A)). Când intensitatea curentului de vârf a fost reprezentată în raport cu concentrația MP (Fig. 6 (B)), a fost observată o dependență liniară. Relația este reprezentată de ecuația de regresie  $I_{\text{pa}} = 0,25 + 1,10 \times 10^{-3} \times C_{\text{MP}}$  ( $R^2 = 0,9991$ ,  $n = 10$ ). Sensibilitatea calculată (m) a fost  $1,10 \times 10^{-3} \mu\text{A} \mu\text{mol L}^{-1}$ . Următoarele ecuații au fost utilizate pentru a calcula LOQ și limita de detecție (LOD) conform ghidurilor ICH:  $\text{LOQ} = 10\text{s/m}$  și  $\text{LOD} = 3\text{s/m}$ , unde s este abaterea standard a curentului de vârf al martorului (5 măsurători) și m este panta curbei de calibrare [31,32]. Ca rezultat, LOQ și LOD au fost determinate a fi  $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$  și, respectiv,

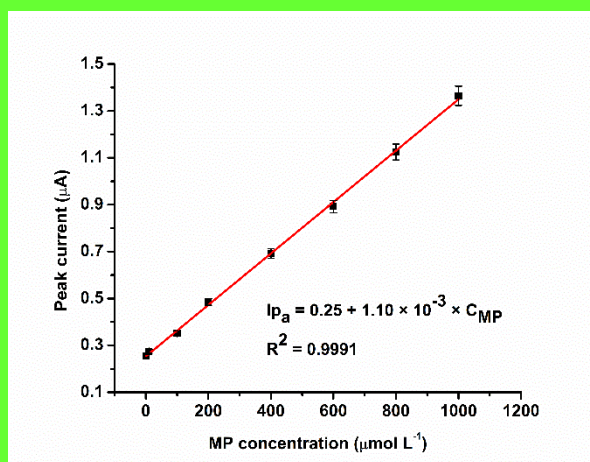
0,30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . VMC/NGPE a fost supus unor teste suplimentare, în timpul cărora au fost determinați parametrii de validare precum repetabilitatea, reproductibilitatea și precizia. Acești parametri ai curbei de calibrare sunt prezentați în Tabelul 2.

**Table 2.** Caracteristicile de răspuns ale senzorului 3D integrat în platforma multimod - în modul voltametrie cu undă pătrată.

Parametrii	Valoare
Domeniu liniar de concentrație ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	1,00 – 1,00 $\times 10^3$
Ordonata la origine ( $\mu\text{A}$ )	0,25
Sensibilitate ( $\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}$ )	$1,10 \times 10^{-3}$
Coeficient de corelație	0,9991
LOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	1,00
LOD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,30
Numărul de puncte de date	8
Reproductibilitatea curentului de vârf (RSD %)	2,66



(A)



(B)

**Figura 6.** (A) Voltamograme cu undă pătrată în PBS pH 10,00 conținând 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$  KCl ca electrolit suport și concentrații de MP variind de la 1,00 la 1000,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  înregistrate la VMC/NGPE; (B) Curba de calibrare obținută la VMC/NGPE în domeniul liniar de concentrație de la 1,00 la 1000,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  MP.

Modul stocastic a dat un domeniu liniar de concentrație mai larg și o limită inferioară de cuantificare. În comparație cu alți senzori dezvoltați pentru determinarea MP raportați în literatură, electrodul multimod propus a prezentat un domeniu liniar de concentrație mai larg și un LOQ mai mic, așa cum se arată în Tabelul 3.

**Tabelul 3.** Compararea diferiților electrozi propuși pentru determinarea metilprednisolonului.

Electrod	Metoda	Domeniu liniar de concentrație ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LOD/LOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Ref.
Electrod de carbon vitros modificat cu fulerenă-C60-	DPV	$5,00 \times 10^{-3} - 1,00$	$5,60 \times 10^{-3}$ (LOD)	[28]
EPPGE modificat cu SWNT <sup>a</sup>	SWV	$5,00 \times 10^{-3} - 0,50$	$4,5 \times 10^{-3}$ (LOD)	[29]
VMC/NGPE	SWV	1,00 – 1000,00	0,30 (LOD)	Această lucrare
	stocastic	$1,00 \times 10^{-6} - 1,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^{-9}$ (LOQ)	

<sup>a</sup> EPPGE modificat cu SWNTs – electrod de grafit pirolitic modificat cu nanotuburi de carbon cu perete unic

### **Studii de interferență**

Selectivitatea senzorului propus a fost studiată pentru ambele moduri. În acest scop, ionii anorganici precum  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NH}_4^+$ , și molecule organice precum zaharoza, glucoza și betametazona au fost selectate ca posibile specii de interferență în determinarea MP, pe baza substanțelor întâlnite în mod obișnuit cu MP în comprimate și în probele de apă.

### **Studii de interferență în modul stocastic**

Valorile parametrului  $t_{\text{off}}$  (semnăturile) determinate pentru posibilele specii interferente dictează selectivitatea VMC/NGPE față de MP în modul stocastic. Această semnătură poate fi considerată ca o semnătură a moleculei. Când se utilizează VMC/NGPE în modul stocastic, semnalele individuale dobândite pentru moleculele alese sunt enumerate în Tabelul 4, care prezintă aceste rezultate. Rezultatele au demonstrat o selectivitate ridicată a senzorului, ceea ce a permis aplicarea acestuia la determinarea din comprimate, precum și în probele de apă de suprafață.

**Tabelul 4.** Selectivitatea senzorului multimod VMC/NGPE în modul stocastic.

Specii interferente	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Betametazonă	Sucroză	Glucoză
t <sub>off</sub> (s)	0,2	0,3	0,7	0,8	1,0	1,5	1,2	1,3	0,9	1,8	1,4	2,8	2,0

### Studii de interferență în modul SWV

Studiul a fost realizat folosind metoda SWV în PBS pH 10,00 care conține 0,10 mol L<sup>-1</sup> KCl ca electrolit suport, 100 μmol L<sup>-1</sup> MP și diferite concentrații ale speciilor posibil interferente. Limita de toleranță a fost stabilită ca fiind cea mai mare concentrație a posibilelor specii interferente care a indus o variație acceptabilă a intensității curentului în termeni de eroare relativă (%) și eroarea sistematică (bias) (%). Rezultatele nu au arătat o variație semnificativă a intensității curentului MP pentru un exces de 50 de ori de Mn<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, zaharoză, glucoză, un exces de 25 de ori de Fe<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, betametazonă și un exces de 10 ori de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, așa cum se arată în Tabelul 5.

**Tabelul 5.** Influența unor posibile specii interferente asupra detectării MP

Posibile specii interferente	Concentrația speciilor posibile interferente (μmol L <sup>-1</sup> )	Limita de toleranță	Eroare relativă (%)	Bias (%)
Mn <sup>2+</sup>	5000,00	50	-0,67	0,68
Na <sup>+</sup>	5000,00	50	1,64	0,01
K <sup>+</sup>	5000,00	50	-0,09	-0,80
Cl <sup>-</sup>	5000,00	50	-4,03	-1,16
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5000,00	50	-1,10	-1,86
Sucroză	5000,00	50	-4,29	6,71
Glucoză	5000,00	50	-2,15	3,51
Fe <sup>3+</sup>	2500,00	25	1,18	1,67
Mg <sup>2+</sup>	2500,00	25	-1,28	2,76
Ca <sup>2+</sup>	2500,00	25	3,33	-3,22
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2500,00	25	1,13	2,19
Betametazonă	2500,00	25	-0,82	-1,67
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1000,00	10	-0,26	-0,48

Rezultatele indică faptul că VMC/NGPE are o selectivitate ridicată pentru detectarea MP în ambele moduri.

### ***Reproductibilitate, repetabilitate și stabilitate***

Repetabilitatea, reproductibilitatea și stabilitatea senzorului propus au fost evaluate în modul SWV într-o soluție de PBS pH 10,00 care conține 0,10 mol L<sup>-1</sup> KCl ca electrolit suport și 100 μmol L<sup>-1</sup> MP μmol L<sup>-1</sup>. Trei senzori modificați au fost produși și testați în mod similar pentru a evalua reproductibilitatea, obținând o valoare a abaterii relative standard (RSD%) de 2,66% (n = 5). Repetabilitatea pe parcursul unei zile a fost evaluată prin înregistrarea a 5 măsurători consecutive folosind același electrod modificat, obținându-se o valoare RSD calculată de 1,37% (n = 5). Pentru a evalua stabilitatea, unul dintre senzorii modificați a fost ținut la frigider timp de zece zile și apoi testat pentru a determina MP. Semnalul a scăzut cu 4,81% față de valorile inițiale din prima zi de testare.

Stabilitatea VMC/NGPE a fost studiată în modul stocastic pentru o perioadă de cinci luni. În această perioadă, sensibilitatea senzorilor nu s-a schimbat semnificativ (RSD% ≤ 1,00%), indicând că are o stabilitate bună în timp.

### **Determinarea metilprednisolonului în comprimate și în probe de apă de suprafață**

Aplicația analitică a VMC/NGPE a fost investigată folosind atât modul SWV, cât și cel stocastic. Senzorul a fost folosit pentru a determina MP din comprimate farmaceutice și în probe de apă de suprafață.

### ***Mod voltametrie cu undă pătrată***

Curenții de vârf realizați în modul SWV au fost înregistrați pentru 10 probe de comprimate preparate urmând metoda descrisă anterior. Concentrațiile de MP au fost calculate prin înlocuirea valorii curentului de vârf în ecuația de calibrare. Metoda adiției standard a fost utilizată pentru analiza analitului din probele de apă de suprafață. În Tabelul 6 și Tabelul 7 sunt prezentate rezultatele testului MP în comprimate farmaceutice și, respectiv, probe de apă de suprafață. Valorile de recuperare calculate pentru probele de comprimate farmaceutice variază de la 98,29% la 102,06% cu valori ale RSD sub 1,74% și valori ale bias variind de la -2,02 la 1,74%. În ceea ce privește analiza probelor de apă de suprafață, s-au obținut valori de recuperare în intervalul 94,08 – 102,35%, cu valori ale RSD sub 0,78% și valori ale bias cuprinse între -2,30 și 6,30%.

**Tabelul 6.** Determinarea MP în probele de comprimate farmaceutice (16,00 mg MP per comprimat) utilizând VMC/NGPE în modul SWV.

Probe	MP, cantitate cunoscută în probă ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	MP, cantitate găsită în probă ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	MP, Recuperare (%)	RSD (%)	Bias (%)
Comprimat 1	1000,00	982,92	98,29	1,74	1,74
Comprimat 2	1000,00	992,47	99,25	0,18	0,76
Comprimat 3	100,00	101,55	101,55	0,34	-1,53
Comprimat 4	100,00	100,05	100,05	0,16	-0,05
Comprimat 5	50,00	50,60	101,19	0,85	-1,18
Comprimat 6	50,00	49,82	99,64	0,74	0,36
Comprimat 7	10,00	10,21	102,06	0,10	-2,02
Comprimat 8	10,00	10,06	100,57	0,05	-0,57
Comprimat 9	1,00	0,99	98,92	0,03	1,10
Comprimat 10	1,00	1,00	100,30	0,06	-0,30

n = 5

**Tabelul 7.** Determinarea MP în probele de apă de suprafață utilizând VMC/NGPE în modul SWV.

Probe	MP, cantitate cunoscută în probă ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	MP, cantitate găsită în probă ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	MP, Recuperare (%)	RSD (%)	Bias (%)
Apa 1	1000,00	1002,88	100,29	0,05	-0,29
Apa 2	1000,00	989,01	98,90	0,78	1,11
Apa 3	100,00	97,90	97,90	0,44	2,14
Apa 4	100,00	100,94	100,94	0,22	-0,94
Apa 5	50,00	48,55	97,10	0,17	2,98
Apa 6	50,00	50,28	100,56	0,05	-0,56
Apa 7	10,00	9,41	94,08	0,07	6,30
Apa 8	10,00	10,23	102,35	0,10	-2,30
Apa 9	1,00	1,00	99,84	0,01	0,16

Apa 10	1,00	1,01	101,40	0,01	-1,38
--------	------	------	--------	------	-------

n = 5

Pentru modul stocastic, comprimatele tamponate și probele de apă de suprafață au fost investigate folosind VMC/NGPE, atât pentru analiza calitativă, cât și cantitativă a MP. După identificarea semnăturii MP, valoarea citită a  $t_{on}$  a fost utilizată pentru a calcula concentrația MP, așa cum este detaliat în secțiunea privind modul stocastic (Fig. 7(A),(B)). Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 8 și Tabelul 9.

**Table 8.** Determinarea MP în probele de comprimate farmaceutice (16,00 mg MP per comprimat) utilizând VMC/NGPE in modul stocastic.

Probe	MP, cantitate cunoscută în probă ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	MP, cantitate găsită în probă ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	MP, Recuperare (%)	RSD (%)	Bias (%)
Comprimate	16	15,90 ± 0,02	99,38	0,01	0,63

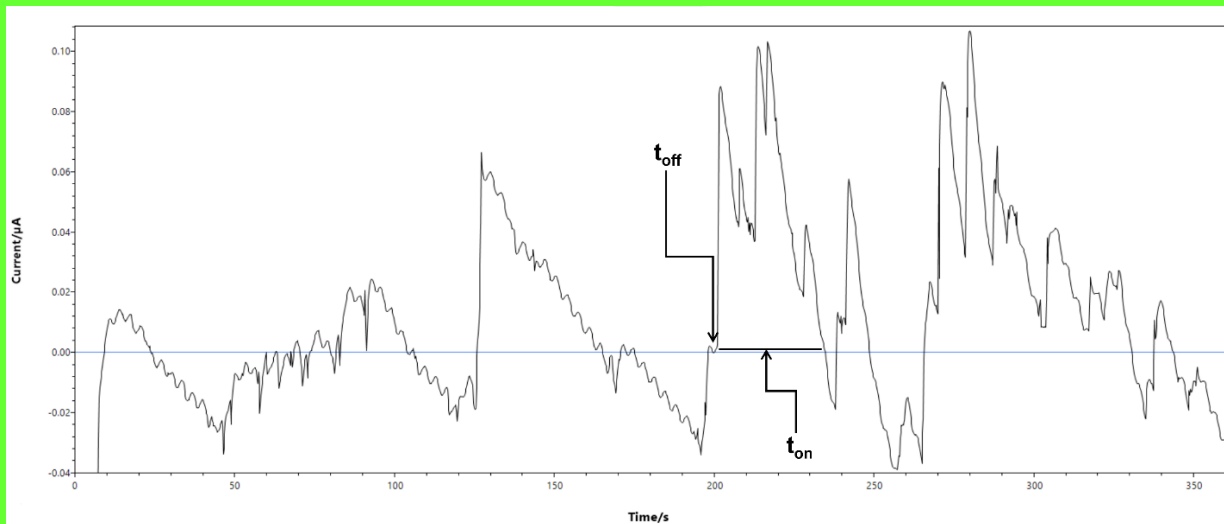
n = 10

**Table 9.** Determinarea MP în probele de apă de suprafață utilizând VMC/NGPE in modul stocastic.

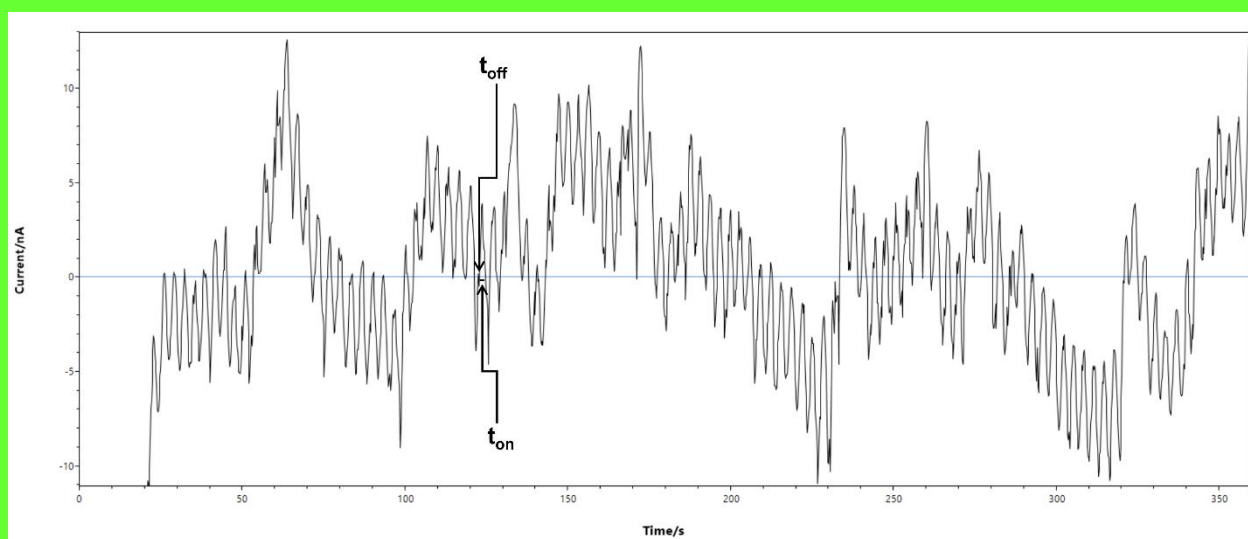
Probe	MP, cantitate găsită în probă ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	MP, Recuperare (%)	RSD (%)
Apa 1	$5,90 \times 10^{-7}$	99,20	0,03
Apa 2	$6,40 \times 10^{-6}$	98,01	0,01
Apa 3	$7,00 \times 10^{-7}$	100,3	0,05

n = 10





(A)



(B)

**Figura 7.** Diagrame de mod stocastic obținute folosind VMC/NGPE pentru determinarea MP în **(A)** comprimate farmaceutice și **(B)** probe de apă de suprafață.

Ambele seturi de rezultate arată că senzorul propus poate fi utilizat în mod fiabil pentru determinarea calitativă și cantitativă a MP în probe reale cu selectivitate ridicată față de analit. Mai mult, modul stocastic permite testarea conținutului de uniformitate al comprimatelor cu pretratare minimă a probei. De asemenea, poate fi un instrument util în analiza calității apei atunci când sunt vizate substanțele farmaceutice.

Datorită fiabilității lor, instrumentul și metoda propuse reprezintă un adaos bun la cele mai fiabile instrumente și metode dezvoltate până în prezent pentru analiza farmaceutică [33-36]. În comparație cu metodele cromatografice dezvoltate anterior [11], metoda propusă are o fiabilitate mai mare, intervale de concentrație liniare mai largi și o limită mai mică de cuantificare.

## Referințe

1. R.S. Hardy, K. Raza and M.S. Cooper, *Nat Rev Rheumatol.* **16**, 133 (2020).
2. A.J. Raamsteeboers, H.J. Bogaard and A.V. Noordegraaf, *Eur Respir Rev.* **23**, 147 (2014).
3. C. Schauer, V. Avery, S. Seleq, P. Garg, M.T.M. Wang, M. Chieng, C. Rowan, A. Sekra, M. Lane and R. Walmsley, *J Gastroenterol Hepatol.* **36**, 2762 (2021).
4. O. Penack, M. Marchetti, T. Ruutu, M. Aljurf, A. Bacigalupo, F. Bonifazi, F. Ciceri, J. Cornelissen, R. Malladi, R.F. Duarte, S. Giebel, H. Greinix, E. Holler, A. Lawitschka, S. Mielke, M. Mohty, M. Arat, A. Nagler, J. Passweg, H. Schoemans, G. Socié, C. Solano, R. Vrhovac, R. Zeiser, N. Kröger and G.W. Basak, *Lancet Haematol.* **7**, E157 (2020).
5. P.J. Jongen, I. Stavrakaki, B. Voet, E. Hoogervorst, E. van Munster, W.H. Linssen, L.G. Sinnige, W.I. Verhagen, L.H. Visser, R. van der Kruijk, F. Verheul, J. Boringa, M. Heerings, W. Gladdines, F. Lönnqvist and P. Gaillard, *J Neurol.* **263**, 1641 (2016).
6. C.M. Hamilton, M.J. Winter, L. Margiotta-Casaluci, S.F. Owen and C.R. Tyler, *Environ Int.* **162**, 107163 (2022).
7. Council of Europe, European Pharmacopoeia, 10th ed., Strasbourg (2017).
8. P. Yu, Q. Wang, X. Zhang, X. Zhang, S. Shen and Y. Wang, *Anal Chim Acta.* **678**, 50 (2010).
9. P. Yu, H. Ma, Y. Shang, J. Wu and S. Shen, *J Chromatogr A.* **1348**, 27 (2014).
10. Y. Deceuninck, E. Bichon, F. Monteau, J.P. Antignac and B. Bizec, *Anal Chim Acta.* **700**, 137 (2011).
11. S. Siddiraju, M.L. Lal Prasanth and T. Sirisha, *Asian J Pharm Sci.*, **11**, 459 (2016).
12. Á. Tölgyesi, V.K. Sharma, S. Fekete, D. Lukonics and J. Fekete, *J Chromatogr B* **906**, 75 (2012).
13. H.F. Chang, J.Q. Wang, B. Wang and A.P. Deng, *Chin Chem Lett.* **24**, 937 (2013).
14. A. Panusa, M. Orioli, G. Aldini and M. Carini, *J Pharm Biomed Anal.* **51**, 691 (2010).
15. R. Georgescu State, J. (Koos) F. van Staden, R.N. State and F. Papa, *Food Chem.* **385**, 132616 (2022).

16. I.R. Comnea-Stancu, J. (Koos) F. van Staden, R.I. Stefan-van Staden and R.N. State, *Chemosphere*. **310**, 136909 (2023).
17. A.R. Niculae, R.I. Stefan-van Staden, J.F. van Staden and R. Georgescu State, *Sensors*. **22**, 5851 (2022).
18. I.R. Comnea-Stancu, J. (Koos) F. van Staden and R.-I. Stefan-van Staden, *J Electrochem Soc*. **169**, 037527 (2022).
19. R.I. Stefan-van Staden, A.R. Niculae, J.F. van Staden, R. Georgescu State and P. Sfirloaga, *Anal Bioanal Chem*. **414**, 6813 (2022).
20. M.A. El-Shal, H.A.M.H. Hendawy, G.M.G. Eldin and Z.A. El-Sherif, *J Iran Chem Soc*. **16**, 1123 (2019).
21. R. Jain, Dhanjai, *Colloids Surf B Biointerfaces*. **105**, 278 (2013) 278–283.
22. B.-M. Ţuchiu, R.-I. Stefan-van Staden, J. (Koos) F. van Staden and H.Y. Aboul-Enein, *ACS Omega*. **7**, 42537 (2022).
23. L.A. Gugoasa and R.-I. Stefan-van Staden, *Curr Med Chem*. **25**, 4037 (2018).
24. R.I. Stefan-van Staden and I.R. Comnea-Stancu, *Chirality*. **33**, 51 (2021).
25. R.I. Stefan-van Staden, I. Moldoveanu and J.F. van Staden, *J Neurosci Methods*. **229**, 1 (2014).
26. L.A. Gugoasa, R.I. Stefan-Van Staden, B. Calenic and J. Legler, *J Mol Recognit*. **28**, 10 (2015).
27. Y. Tachihara, Y. Nakagawa, T. Miyazaki, Y. Anraku and H. Cabral, *Nano Select*. **3**, 1242 (2022).
28. R.N. Goyal, N. Bachheti, A. Tyagi and A.K. Pandey, *Anal Chim Acta*. **605**, 34 (2007).
29. R.N. Goyal, S. Chatterjee and A.R.S. Rana, *Talanta*. **80**, 586 (2009).
30. P. Zanello, *Inorganic Electrochemistry: Theory, Practice and Application*, Royal Society of Chemistry (2003).
31. M.E. Swartz and I.S. Krull, *Analytical Method Development and Validation*, 1st ed., Marcel Dekker, New York, USA (1997).
32. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, n.d. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> (accessed November, 2022).
33. Z.A. Al-Othman, A. Al-Warthan and I. Ali, *J. Sep. Sci.*, **37**, 1033 (2014).

34. I. Ali, Z.A. AL-Othman, N. Nagae, V.D. Gaitonde and K.K. Dutta. *J. Sep. Sci.*, **35**, 3235 (2012).
35. H. Y. Aboul-Enein and I. Ali, *Fres. J. Anal. Chem.*, **370**, 951 (2001).
36. I. Ali, H.Y. Aboul-Enein and A. Ghanem, *Curr. Pharm. Anal.*, **1**, 109 (2005).