

RAPORT ȘTIINȚIFIC

Noi biosenzori și instrumente inteligente pentru detecția ultrasensibilă a falsificării uleiurilor de măsline, PN-III-P4-ID-PCE-2020-0923

ianuarie 2022-decembrie 2022

În anul 2022 s-au realizat activitățile prevăzute în planul de implementare al proiectului din Etapa 2: **Detecția moleculelor țintă și dezvoltarea de noi materiale sensibile; Dezvoltarea și caracterizarea biosenzorilor; Dezvoltarea de modele inteligente și aplicarea acestora în analiza datelor; Validarea integrării sistemului; Diseminarea rezultatelor; Managementul proiectului.**

Descrierea științifică

Activitatea 2.1 Analiza cromatografică a markerilor. Dezvoltarea de noi materiale sensibile. Sinteza polimerilor conductivi și polimerilor imprimați molecular

Analiza cromatografică și spectrometrică a markerilor fenolici

Majoritatea probelor de uleiuri de măsline (uleiuri de măsline virgin extra de la diferiți producători, obținute prin tehnologii diferite, din diferite soiuri de măsline, din diferite țări dar și uleiuri de turte de măsline) și a uleiurilor vegetale de semințe (de porumb, de floarea soarelui, de in, de cânepă, de rapiță etc.) analizate în acest an prin cromatografie, spectrometrie și cu biosenzori au fost uleiuri comerciale. S-au analizat și uleiuri de măsline furnizate de doamna Prof. dr. Maria Lisa Clodoveo de la Universitatea Carlos Moro din Bari.

Cercetarea de față a vizat într-o primă etapă dezvoltarea unei metode țintite de cuantificare a unor compuși specifici uleiurilor vegetale și, în special, uleiului de măsline, și anume tirosol, hidroxitirosol, trigonelină, oleuropeină, verbacozidă, acid măslinic și acid oleanolic prin UHPLC-MS/MS (FullMS-vDIA), care ulterior a fost utilizată pentru cuantificarea compușilor respectivi în probe de uleiuri vegetale în vederea discriminării acestora folosind analiza componentelor principale – PCA și analiza de clustere – HCA. De asemenea, s-a realizat și determinarea compusilor fenolici minoritari din uleiuri prin UHPLC-MS/MS, folosind metoda de analiză dezvoltată în cadrul etapei 1. Procesarea datelor HRMS s-a realizat cu ajutorul software-ului Compound Discoverer v. 2.0 (Thermo Scientific, SUA) folosind un șablon de lucru pentru metabolomica, făcând posibilă identificarea altor clase de compuși prin raportarea la baze de date, inclusiv Chempider, MzCloud etc.

Determinarea compușilor fenolici specifici (tirosol, hidroxitirosol, oleuropeină), a compușilor terpenici (acizii măslinic și oleanolic) și trigonelinei din uleiurile vegetale prin UHPLC-MS/MS implică trei etape importante, și anume: (i) eșantionarea și extracția probelor de uleiuri (extracția pe faza solidă - SPE); (ii) achiziționarea datelor în modul FullMS-vDIA, care s-a realizat cu ajutorul spectrometrului de masă de înaltă rezoluție Q Exactive Focus (Thermo Scientific, SUA) cuplat la un cromatograf de lichide de înaltă performanță UHPLC Dionex pentru separarea analiților; (iii) procesarea și identificarea datelor care s-a realizat cu ajutorul software-ului Xcalibur. De asemenea, prin procesarea datelor spectrale cu ajutorul software-ului Compound Discoverer v. 2.0 (Thermo Scientific, SUA), folosind un șablon de lucru pentru metabolomica, a fost posibilă și identificarea altor clase de compuși prin raportarea la baze de date, inclusiv Chempider, MzCloud, MassBank etc. Uleiurile vegetale investigate în acest studiu sunt: ulei de măsline extra virgin (EVOO), uleiuri de măsline de la producători locali din Italia (MS*), uleiuri de măsline disponibil comercial (MS), dar și alte tipuri de uleiuri vegetale disponibile comercial, precum: ulei de nucă (N), ulei din sămburi de struguri (STR), ulei de dovleac (D), ulei de in (In), ulei de soia (So), ulei de susan (SU), ulei de palmier (Palm), ulei de cânepă (Cp), ulei de cocos (Co), ulei de floarea soarelui (FL).

Izolarea compușilor de interes din uleiurile vegetale investigate s-a realizat prin extracție SPE folosind cartușe SPE și un sistem de eluare sub vid (Vaccum Manifold, Varian). Pentru optimizarea extracției s-au folosit trei tipuri de cartușe, și anume: cartușe Strata NH₂ (55 μm, 70 Å), 500 mg/6 mL, cartușe Strata Silica (55 μm, 70 Å), 500 mg/6 mL și cartușe HyperSep

silica 500 mg/6 mL, studiile de recuperare realizate demonstrând performanțe mai bune (rata de recuperare cuprinsă între 75-98%) pentru cartușele Strata Silica (55 μm , 70 Å), 500 mg/6 mL care au fost utilizate în continuare pentru extracția compușilor fenolici majoritari din uleiurile vegetale. Protocolul de extracție SPE constă în: condiționarea cartușelor SPE cu 6 mL metanol și 6 mL hexan, urmată de adăugarea soluției de probă (2,5 g ulei în 6 mL hexan) și pătrunderea acesteia în cartuș; spălarea cartușelor cu 3x3 mL hexan și eluarea compușilor din cartuș cu 10 mL metanol. Soluția de probă rezultată este concentrată la sec în curent de azot, după care extractul este reluat cu 1 mL soluție metanol:apă ultrapură = 80:20, filtrat prin membrană filtrantă de 0,45 μm și supus analizei. Reprezentarea schematică a etapei de extracție a compușilor fenolici majoritari din uleiurile vegetale folosind protocolul SPE este prezentată în Figura 1.



Figura 1. Reprezentarea schematică a extracției compușilor fenolici majoritari din uleiurile vegetale înainte de analiza prin UHPLC-MS/MS

Pentru detecția prin UHPLC-MS/MS s-au optimizat și ulterior s-au setat următoarele categorii de parametri operaționali: parametri de ionizare HESI, parametri de separare cromatografică (compoziția fazei mobile, gradient, debit), parametri de operare MS (achiziția Full scan urmată de fragmentare). Separarea analiților s-a realizat pe o coloană analitică Kinetex C18 column (100 $\times$ 2,1 mm, 1,7 μm), la 30 °C, sub acțiunea unui gradient de faze mobile: apă HPLC cu 0,1% acid formic și metanol HPLC cu 0,1% acid formic. Spectrometrul de masă a rulat în modul de ionizare H- ESI (negativ), la o tensiune aplicată de 3,0 kV. Debitul de azot a fost de 48 L/min, iar cel auxiliar de 11 L/minut la o temperatură de 413°C, temperatura capilarului de 320°C. Datele au fost achiziționate în modul Full MS – vDIA cu înregistrarea simultană a precursorului și a fragmentelor MS/MS rezultate. Datele spectrale de masă au fost înregistrate la intervalul de scanare de m/z 100–1500, cu rezoluție completă de scanare la 70.000, iar rezoluția de achiziție MS/MS la 35.000. Energia de coliziune normalizată în trepte (NCE) a fost setată la 35 eV. Procesarea datelor s-a realizat cu ajutorul software-ului Xcalibur, iar cuantificarea datelor s-a realizat prin metoda standardului extern, într-un domeniu de linearitate 25-1000 ng/mL. Coeficientul de liniaritate a variat în domeniul 0,990 la 0,995, în timp ce limita de detecție a metodelor a fost calculată pe baza unui raport semnal / zgomot 3:1. Pentru evaluarea performanțelor metodei de analiză s-a urmărit investigarea efectului de matrice prin îmbogățirea probelor de ulei cu concentrații cunoscute de standard la un nivel de concentrație de 100 ng/mL, urmată de analiza probelor rezultate și estimarea procentului de recuperare, rezultatele obținute fiind cuprinse între 75-98%.

Identificarea compușilor s-a realizat pe baza comparării timpilor de retenție cu cei ai substanțelor de referință și prin identificarea ionului molecular și a fragmentelor rezultate în urma fragmentării în modul negativ (Tabelul 1 și Figura 2). De exemplu, în uleiul de masline extravirgin s-au identificat compuși precum: acidul elenolic, inclusiv derivații hidroxilați și formele aldehidice, oleacina și derivatul hidroxilat, derivați de la oleuropeină, oleocantal, ligstrosid, acid elenaic (Figura 2).



Figura 2. Identificarea compușilor specifici în uleiul de măsline extravirgin prin UHPLC–MS/MS, ionizare negativă și procesarea datelor cu software-ul Compound Discoverer

Tabelul 1. Identificarea compușilor fenolici din uleiurile vegetale prin UHPLC-MS/MS

Compus	Timp de	Formula	Masa	m/z	Fragmentele de masă
Trig					
Hid					
Tiro					
Ver					
Ole					25
Aci					49,
Aci					

Conținutul de compuși fenolici majoritari specifici din uleiurile analizate variază în funcție de timpul de ulei, astfel: (i) în uleiurile de măsline originale, compușii majoritari cuantificați sunt trigonelina cu valori cuprinse între 0,834-22,514 mg/kg și hidroxitirosolul, cu valori cuprinse între 0,008-24,582 mg/kg, în timp ce tirosolul, verbacozida și oleuropeina au prezentat valori mai mici, respectiv n.d.-2,553 mg/kg, 0,314-0,758 mg/kg și n.d.-0,243 mg/kg; (ii) în EVOO s-au identificat cantități mai mari de trigonelină (5,774-34,062 mg/kg) și tirosol (n.d.-4,363

mg/kg) comparativ cu uleiurile de măsline originale, în timp ce conținutul de hidroxitirosol, verbacosidă și oleuropeină este mai mic; (iii) în uleiurile de măsline comerciale s-au identificat cantități mai mari de trigonelina (2,074-26,985 mg/kg) și tirosol (n.d.-10,386 mg/kg) comparativ cu uleiurile de măsline originale, în timp ce conținutul de verbacosidă și oleuropeină este asemănător; (iv) în uleiurile vegetale analizate, dintre compușii majoritari sunt trigonelina (n.d.-65,129 mg/kg), cu concentrații mai mari în uleiul de semințe de struguri și uleiul de rapiță și tirosolul (n.d.-12,758 mg/kg), cu concentrații mai mari în uleiurile de nuci, în și cânepă. Referitor la compușii terpenici analizați, cantități mai mari de acid măslinic și acid oleanolic corespund uleiurilor de măsline comerciale, cu valori cuprinse între 0,241-18,733 mg/kg pentru acidul măslinic și 0,075-16,074 mg/kg pentru acidul oleanolic (Tabelul 2).

Tabelul 2. Conținutul compușilor specifici analizați în uleiurile vegetale

Tipul de ulei	mg/kg	Trigo	Uti	Ti	Verb	Oleu	MA	OA
Ulei								46
Ulei								5
c								74
Ulei								3
								9
								4
								7

Datele cantitative rezultate în urma investigării compușilor fenolici minoritari din uleiurile analizate au indicat faptul că principalii acizi fenolici sunt acizii hidroxibenzoic (HyB), dihidroxibenzoic (DHyB), p-cumaric (Ap-Coum), ferulic (AF), elagic (Ael), cinamic (Acin), dar și flavoniozi precum apigenina (Apg) și pinocembrina (PinoC), conținutul acestora variind în funcție de tipul de ulei vegetal (Tabelul 3). După cum se observă, concentrații mai mari de acid dihidroxibenzoic corespund uleiurilor de măsline (n.g.-0,118 mg/kg), în timp ce acidul hidroxibenzoic a fost cuantificat în cantități mai mari în uleiurile vegetale (n.d.-0,381 mg/kg), cu valori mai mari pentru uleiul de nuci și uleiul din semințe de dovleac. Acidul p-cumaric a fost cuantificat în cantități mai mari în uleiurile de măsline comerciale (n.d.-0,806 mg/kg) și uleiurile de măsline originale (0,008-0,708 mg/kg), în timp ce cantități mai mari de acid ferulic (n.d.-1,007 mg/kg) și acid elagic (0,015-0,731 mg/kg) corespund celorlaltor tipuri de uleiuri vegetale investigate. Acidul cinamic este predominant în uleiurile de măsline, cu valori cuprinse între 0,023-4,832 mg/kg în uleiurile de măsline originale și n.d.-5,076 în uleiurile de măsline comerciale. De asemenea, conținutul de apigenină și pinocembrină este mai mare în uleiurile de măsline și uleiurile de măsline extravirgine, comparativ cu celelalte tipuri de uleiuri vegetale.

Tabelul 3. Conținutul compușilor fenolici analizați în uleiurile vegetale

Tipul de ulei	mg/kg	DHyB	HyB	Ap-Coum	AF	Ael	Acin	Apg	PinoC
Ulei									
Ulei									
	10148	0,003	0,120	0,700	0,230	0,130	4,032	1,770	0,377

Pentru analiza exploratorie a datelor referitoare la conținutul de tirosol, hidroxitirosol, trigonelină, oleuropeină, verbacozidă, acid măslinic și acid oleanolic, s-a efectuat analiza componentelor principale (PCA). Distribuția uleiurilor vegetale în graficul **scores** PC1-PC2 este prezentat în Figura 3, unde se observă o discriminare clară a uleiurilor de măsline și a uleiurilor de măsline extra virgine, originale și a celor disponibile comercial, față de restul uleiurilor. Rezultatele indică faptul că markerii specifici uleiurilor de măsline sunt: trigonelina, verbacosida, hidroxitirosolul, acizii măslinic și oleanolic, dar și oleuropeina și tirosolul, distribuția acestora fiind, în principal, către uleiurile de măsline și mai puțin către celelalte tipuri de uleiuri.

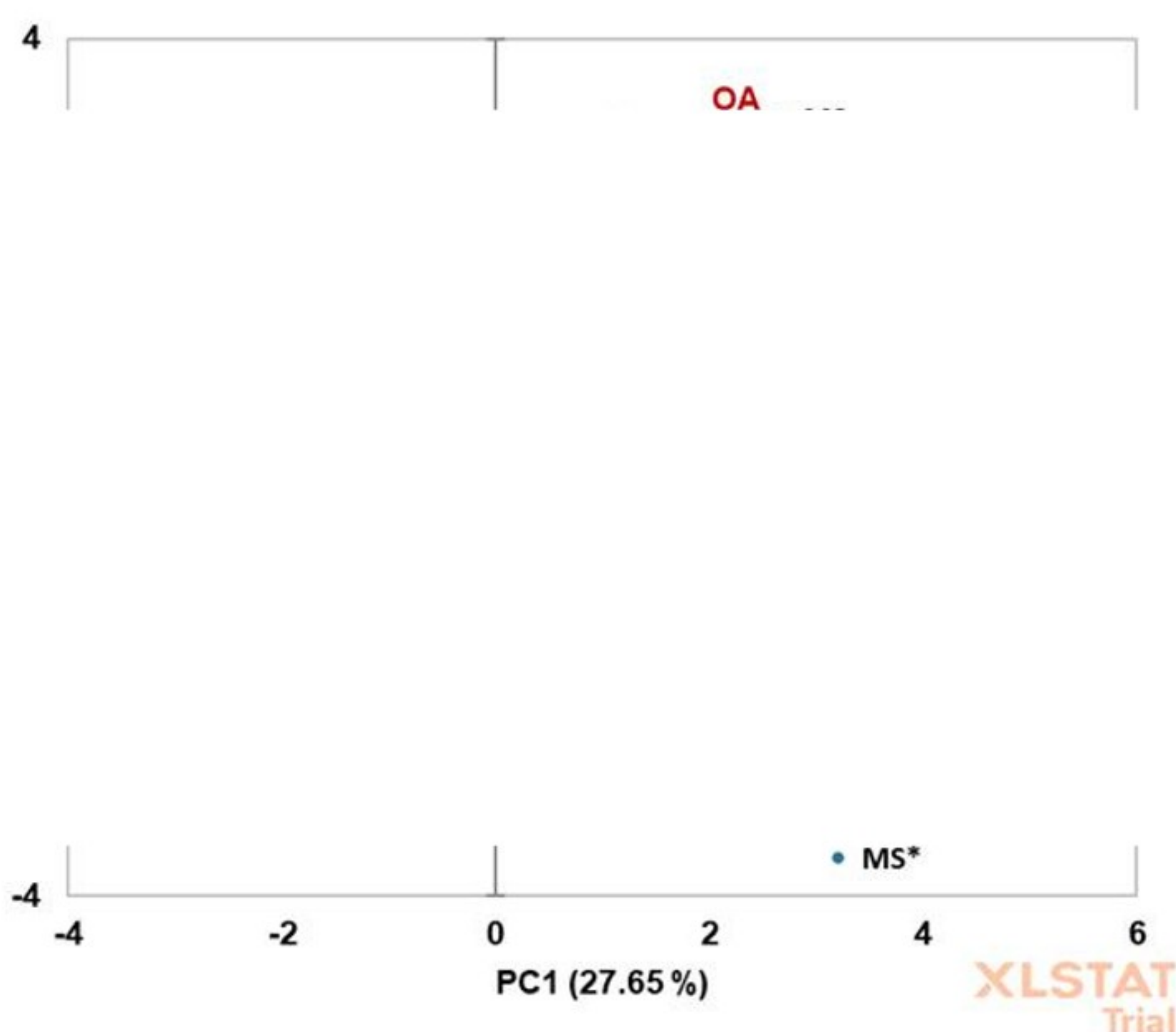


Figura 3. Graficul scores al PCA a uleiurilor vegetale pe baza profilului compușilor fenolici specifici

Pentru a înțelege rolul compușilor determinați ca indicatori de calitate ai uleiurilor de măsline și uleiurilor de măsline extravirgine s-a utilizat și analiza de clusteri-HCA pentru gruparea uleiurilor în funcție de originea botanică. Figura 4 prezintă o dendrogramă ierarhică pentru gruparea uleiurilor pe baza conținutului celor 7 markeri specifici studiați. Se observă gruparea uleiurilor în trei clustere principale, și anume: clusterul 1 care corespunde uleiului din semințe de struguri, clusterul 2 care grupează majoritatea uleiurilor de măsline, EVOO, dar și alte tipuri de uleiuri vegetale precum uleiul de orez, nuci, susan și rapiță și clusterul 3 în care sunt grupate în principal uleiurile vegetale, dar și uleiuri de măsline (figura 4).

DENDROGRAM

Figura 4. Analiza HCA a uleiurilor vegetale pe baza conținutului de tirosol, hidroxitirosol, trigonelină, oleuropeină, verbacozidă și acizii măslinic și oleanolic

Dezvoltarea unor noi materiale sensibile

S-au realizat o serie de noi biosenzori pentru analiza biomarkerilor din probele de ulei de măsline. Pentru construirea biosenzorilor s-au folosit electrozi serigrafiați pe bază de carbon (SPCE), oxid de staniu și zinc (ITO), aur (Au) și platină (Pt) care au fost modificați cu diferite nanomateriale, peptide și enzime. Nanomaterialele folosite au fost nanotuburi de carbon, nanofibre de carbon, carbon mezoporos, și grafen ca atare sau funcționalizate cu diferite tipuri de grupări hidrofile: -OH, >C=O, -COOH, -COONH₂ etc. Ca mediatori ai schimbului de electroni s-au folosit, de exemplu, ftalocianina de mangan, ftalocianina de cobalt, Prussian Blue sau peptide. A fost folosită și o gamă variată de enzime din clasa oxidazelor, de exemplu tirozinază, lacază, peroxidază, colesterol oxidază.

De exemplu, într-un studiu, prima etapă pentru construirea biosenzorilor enzimatici a fost modificarea unor electrozi serigrafiați pe bază de carbon (SPE/C) cu nanotuburi de carbon cu strat simplu. Acest procedeu a fost realizat prin dispersarea pe suprafața activă a electrodului suport a unui volum de 10 μL dintr-o suspensie preparată în prealabil din SWCNT. Pentru prepararea suspensiei de SWCNT s-au dispersat 10 mg de pulbere de nanotuburi de carbon cu strat simplu într-un amestec de solvenți alcătuit din dimetilformamidă și apă ultrapură în raport 1:1. Pentru o dispersare optimă, suspensia a fost ultrasonicată timp de 30 de minute.

Volumul de suspensie optim (10 μL) a fost adăugat pe suprafața electrozilor SPE/C cu ajutorul unei micropipete Eppendorf în două etape succesive. După fiecare etapă electrozii s-au uscat într-un exicator, la temperatura de 25 °C timp de 2 ore.

A doua etapă a constat în construirea a două tipuri de biosenzori enzimatici prin modificarea SPE/SWCNT cu lacază, respectiv tirozinază. Soluțiile enzimatică au fost adăugate pe suprafața SWCNT/SPE prin tehnica turnării, urmată de reticulare cu ajutorul vaporilor de glutaraldehidă. După adăugarea a 5 μL de soluție enzimatică, electrozii au fost păstrați în exicator timp de o oră pentru uscare. Încă 5 μL au fost adăugați în același mod. Expunerea la vaporii de glutaraldehidă a fost timp de 1 minut pentru fiecare electrod. Reticularea asigură o conexiune electrică favorabilă a SWCNT cu enzima. Totuși, un timp de expunere mai lung ar putea scădea activitatea enzimatică datorită modificărilor în structura tridimensională a heteroproteinei. După imobilizare, biosenzorii au fost păstrați la 4 °C până la utilizare, maximum 72 ore. În Figura 5 sunt prezentate etapele procesului de preparare a biosenzorilor pe bază de lacază și tirozinază și schemele reacțiilor care au loc între glutaraldehidă și enzime.



Figura 5. Procesul de preparare a biosenzorilor pe bază de tirozinază și respectiv lacază imobilizate pe electrozi serigrafiați de carbon modificați cu nanotuburi de carbon

Pentru prepararea senzorului GPH-MnPc/SPE modificat au fost parcurse mai multe etape. Inițial, s-a adăugat, prin tehnica **drop-and-dry**, secvențial, cu pauze de uscare, o cantitate de 10 μL soluție de ftalocianină de mangan 10⁻⁵ M în cloroform pe suprafața electrodului serigrafiat modificat cu grafen (GPH). Uscarea s-a realizat la temperatura camerei, timp de 30 minute. Adăugarea soluției de ftalocianină de mangan s-a realizat cu ajutorul unei micropipete Eppendorf. Pentru prepararea biosenzorului MnPc-Tyr/SPE, s-a folosit ca suport GPH-MnPc/SPE. Utilizând tehnica **drop-and-dry**, a fost adăugat un volum de 10 μL, secvențial, în

două etape (câte 5 μL în fiecare etapă), cu o pauză pentru uscare de 3 ore între cele două adăugări. Reticularea enzimei s-a realizat prin menținerea senzorului deasupra unui recipient cu 5 mL glutaraldehidă 2%, timp de 1 minut. Vaporii de glutaraldehidă au asigurat imobilizarea tirozinazei pe suprafața electrodului prin reticulare. Biosenzorii au fost păstrați la 4 $^{\circ}\text{C}$ până la utilizare.

Caracterizarea materialelor sensibile depuse (a suprafeței active a biosenzorilor) s-a realizat prin microscopie electronică de scanare și microscopie de forță atomică. De asemenea, s-au folosit metode electrochimice (voltametria ciclică (CV), voltametria puls diferențială (DPV), spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS)) și metode spectrometrice (FTIR). O parte dintre rezultatele obținute se prezintă în continuare. În figura următoare se prezintă imaginile SEM ale unor biosenzori realizați, GPH-MnPc-Tyr/SPE (Figura 6) și OMC-Lac (Figura 7).

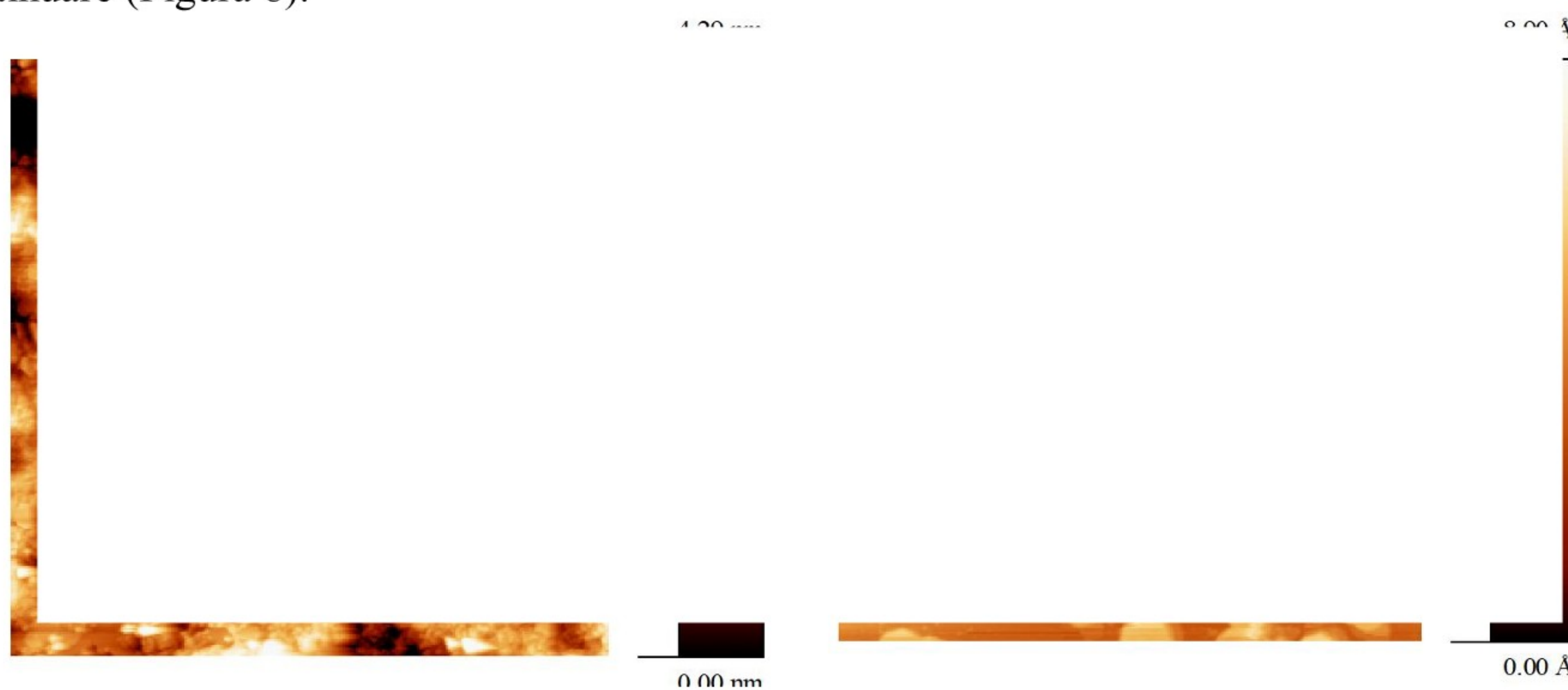


Figura 6. Imaginea SEM a suprafeței biosenzorului GPH-MnPc-Tyr/SPE



Figura 7. Imaginea SEM a suprafeței biosenzorului OMC-Lac

De asemenea, o serie de imagini AFM ale elementului sensibil al unor biosenzori se prezintă în continuare (Figura 8).



a) Imaginea AFM a unui strat sensibil care conține tirozinază și ftalocianină de mangan

b) Imaginea AFM a unui strat sensibil -lacază depusă pe carbon mezoporos

Figura 8. Imaginile AFM ale elementului sensibil

După construirea biosenzorilor a fost realizată caracterizarea suprafețelor modificate prin mai multe metode. CV a fost prima metodă prin intermediul căreia s-a urmărit evidențierea imobilizării enzimelor pe electrodul suport.

În Figura 9 se poate observa oxidarea tirozinazei la potențialul $E_{pa}=0,433\text{ V}$ ($I_{pa}= 5,970\text{ }\mu\text{A}$) și reducerea enzimei la $E_{pc}=-0,171\text{ V}$ ($I_{pc}=14,739\text{ }\mu\text{A}$). Procesul redox este cvasireversibil. La scanări successive nu se observă diferențe semnificative în comportamentul electrochimic al tirozinazei. În cazul lacazei, picul de oxidare apare doar la prima scanare la un potențial $E_{pa}= 0,914\text{ V}$ ($I_{pa}=$

13,913 μA), acesta fiind ireversibil. La scanarea a doua și a treia, nu se mai evidențiază picuri de oxidare și reducere, semnalul fiind stabil.

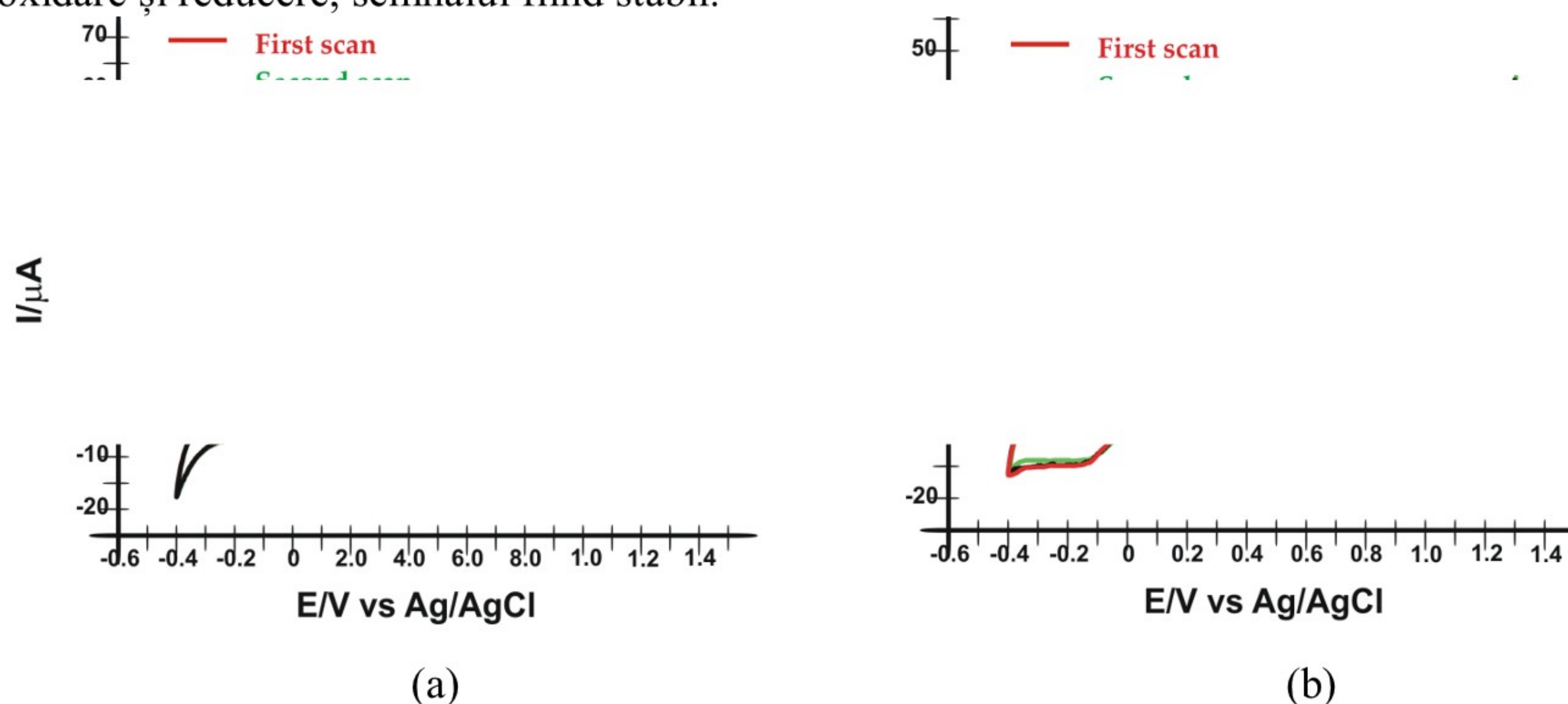


Figura 9. Voltamogramele ciclice înregistrate în soluție tampon fosfat (PBS) 10^{-1} M cu biosenzorul SPE/SWCNT/Lac la pH 5.0 (a) și SPE/SWCNT/Tyr la pH 7.0 (b).

Analizând Figura 9, se poate afirma că enzimele au fost imobilizate pe suprafața electrozilor suport, observându-se în ambele situații comportamentul electrochimic al acestora, însă SPE/SWCNT/Tyr se remarcă printr-un semnal mai stabil și picuri mai evidente.

În următoarea etapă, cei doi biosenzori au fost analizați prin intermediul EIS. Într-un sistem cu trei electrozi, analiza EIS se realizează prin fixarea unei tensiuni aplicate, iar diagrama Nyquist obținută (utilizată de obicei pentru analiza sistemelor rezistive), arată rezistența soluției produse (R_s), rezistența la transferul de sarcină (R_{ct}) și impedanța Warburg (W).

Procesele electrochimice ce au loc la interfața dintre SPE/SWCNT/Lac, respectiv SPE/SWCNT/Tyr și electrolitul ales pentru analiză (în cazul de față $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10^{-3} M și KCl 10^{-1} M în raport molar 1:1) se transpun sub forma unui circuit echivalent care implică rezistoare, condensatoare și inductoare. Circuitul echivalent Randles prezintă într-o manieră simplificată rezistența soluției (R_s), capacitatea stratului dublu la suprafața electrodului (C_{dl}), rezistența la transferul de sarcină (R_{ct}) și rezistența Warburg (Z_w), motiv pentru care este utilizat cel mai frecvent. Conform Figurii 10, diagramele Nyquist obținute în acest studiu (sub forma unui semicerc) corespunde unui circuit Randles simulat, și el prezentat în figură.

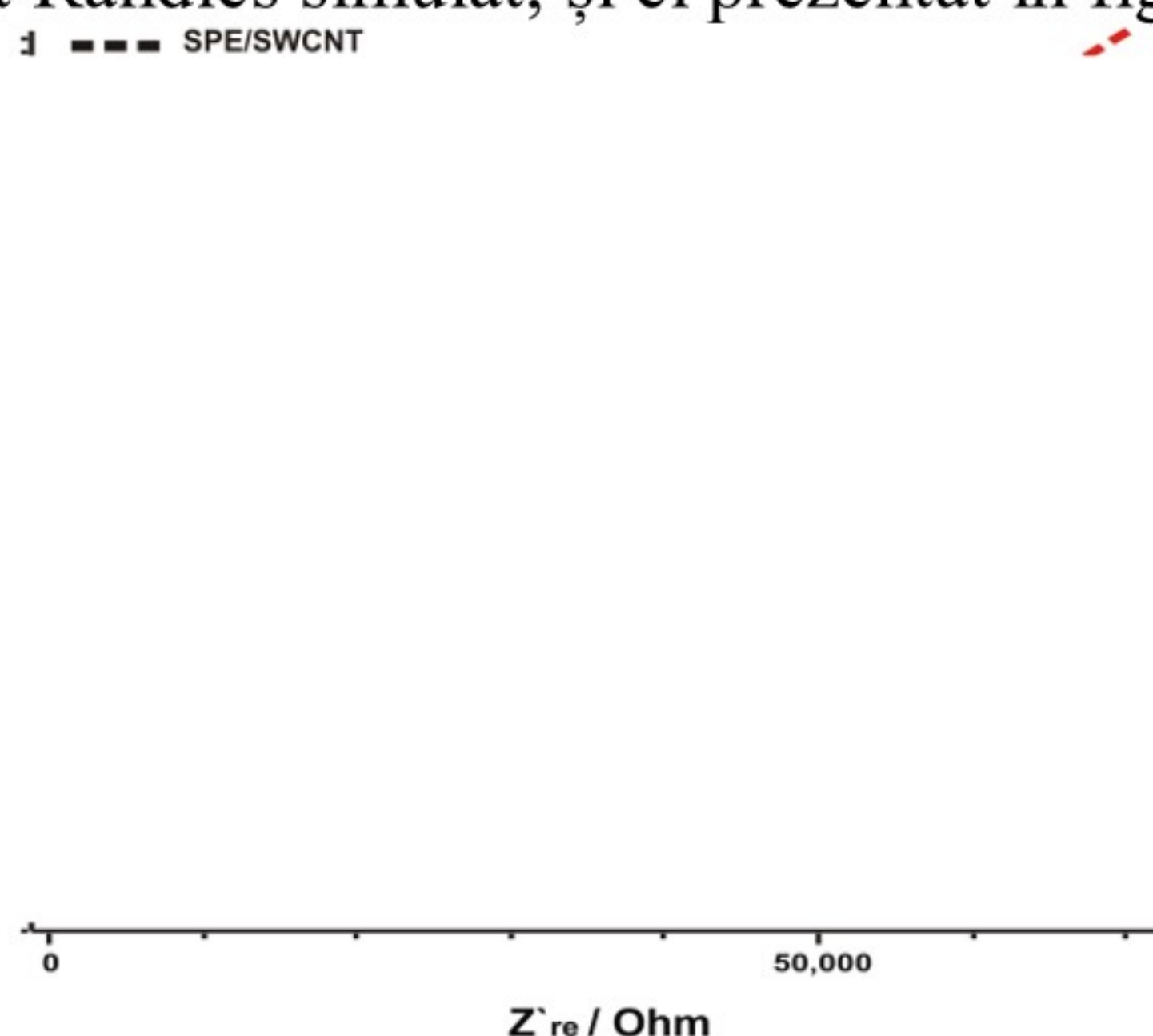


Figura 10. Graficele Nyquist ale EIS pentru SPE/SWCNT (linia neagră), SPE/SWCNT/Tyr (linia roșie), SPE-SWCNT-Lac (linia verde) în soluție de KCl 10^{-1} M și 10^{-3} M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ în domeniul de frecvență de la 0,01 Hz și 10 kHz, amplitudinea 10 mV. Figura inserată: Circuitul echivalent folosit pentru ajustarea spectrelor de impedanță electrochimică.

O altă metodă prin care s-a studiat imobilizarea enzimelor este tehnica FTIR. Spectrele FTIR a SPE/SWCNT, SPE/SWCNT/Lac și SPE/SWCNT/Tyr (Figura 10) au fost înregistrate în modul reflectanță totală atenuată (ATR) în domeniul $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ cu o rezoluție de 4 cm^{-1} .

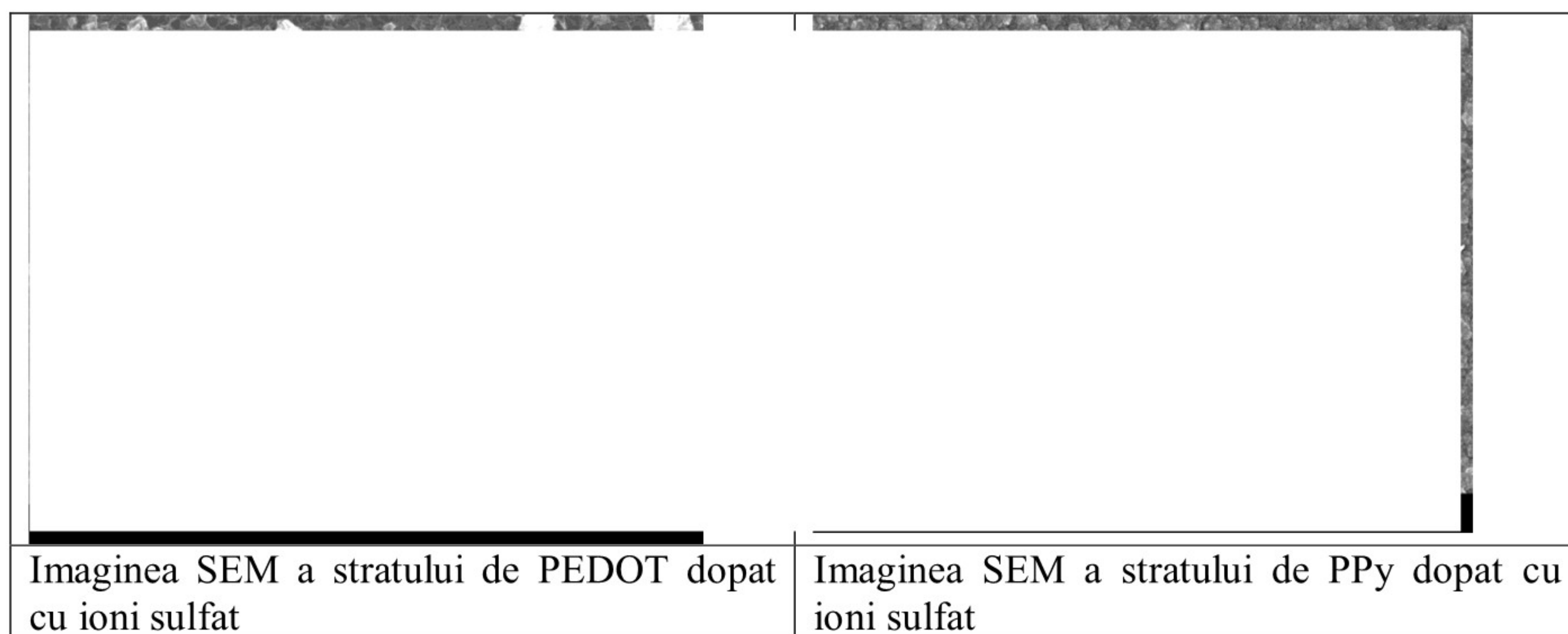


Figura 11. Imagini SEM a unor straturi sensibile de polimeri conductori

Răspunsurile electrochimice ale senzorilor pe bază de polimeri conductori au variat în funcție de natura polimerului dar și de natura agentului dopant. Astfel, în Figura 12 se prezintă răspunsurile senzorilor pe bază de PPY/FCN și PEDOT/FCN imersați în soluție de KCl 0,1M. Se observă picuri redox relaționate cu polimerul conductor iar în cazul agentului dopant ferocianură (FCN) și picuri datorate acestuia.

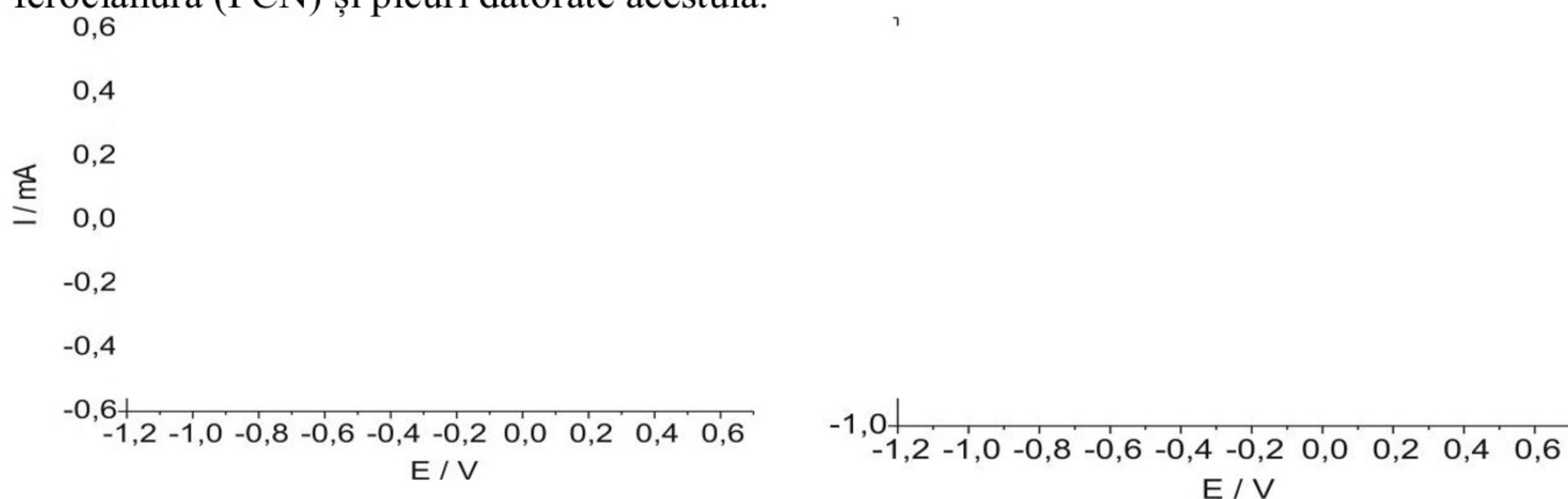


Figura 12. Semnalele senzorilor în soluție PPY/FCN și PEDOT/FCN imersați în soluție de KCl 0,1 M în timpul procesului de stabilizare a semnalului voltametric.

Senzorii obținuți pot fi folosiți ca atare pentru obținerea amprente chimice a uleiurilor de măsline sau pot fi transformați în biosenzori prin imobilizarea unor enzime, cu rol biocatalitic în determinarea markerilor din uleiul de măsline. Astfel au fost obținuți biosenzori cu o bună sensibilitate și selectivitate pentru biomarkeri din uleiul de măsline.

În figura 13 se prezintă voltamogramele ciclice ale biosenzorului PPY/FCN/Tyr când este imersat în soluție de tirosol de concentrație variabilă și curba de calibrare corespunzătoare.

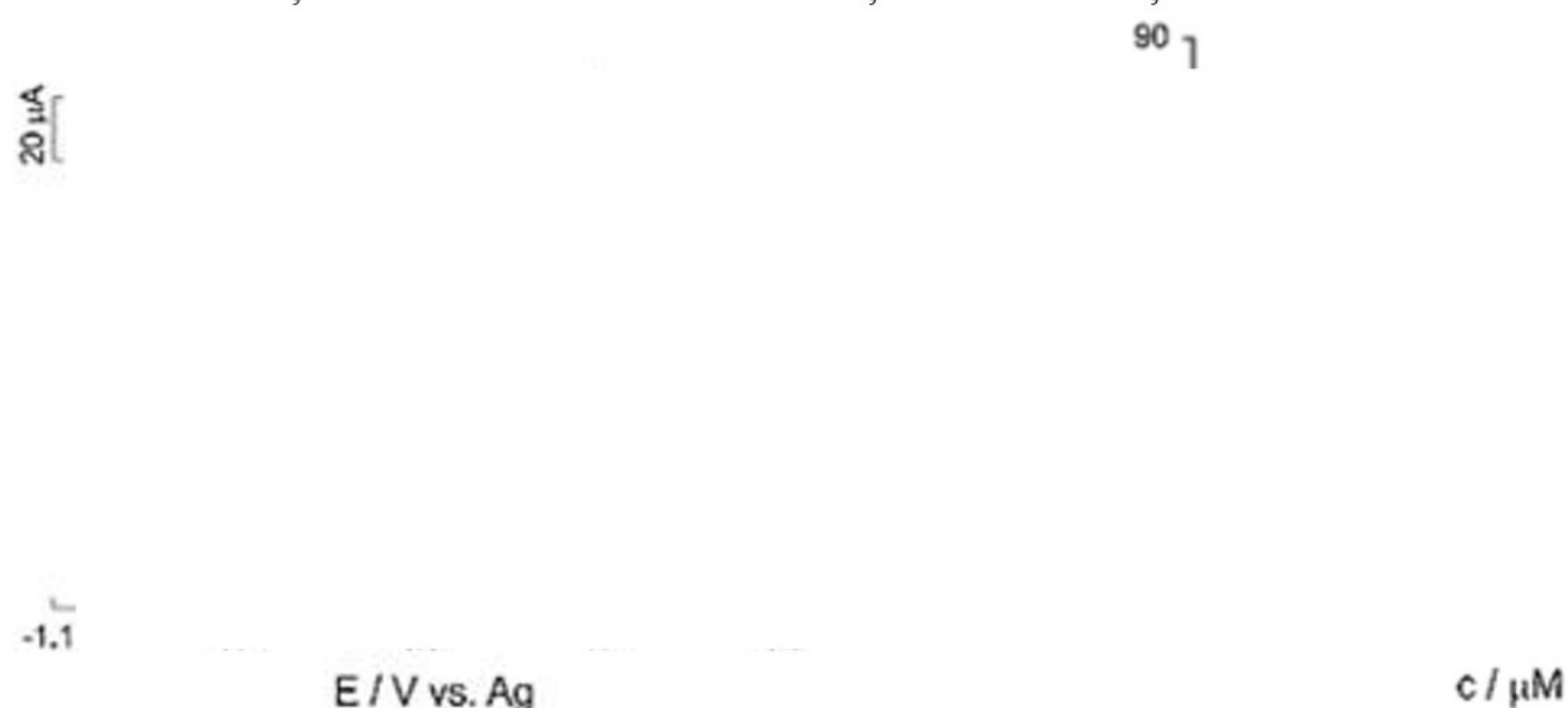


Figura 13. Voltamogramele ciclice ale PPY/FCN/Tyr imersat în soluție de tirosol de concentrație variabilă; b) Curba de calibrare

Principalii biosenzori pe bază de polimeri conductori, enzimele folosite, compușii țintă și limitele de detecție (LOD) se prezintă în Tabelul 5.

	M
PE	
PE	
PE	
PP	
PP	
PP	

Senzorii astfel obținuți s-au caracterizat prin AFM iar în Figura 14 sunt prezentate suprafețele senzorilor (a) C/poliacrilat/Verbascozidă și (b) C/polimetacrilat/Trigonelină. Pot fi evidențiate omogenitatea distribuției centrilor activi de pe suprafața senzorilor.

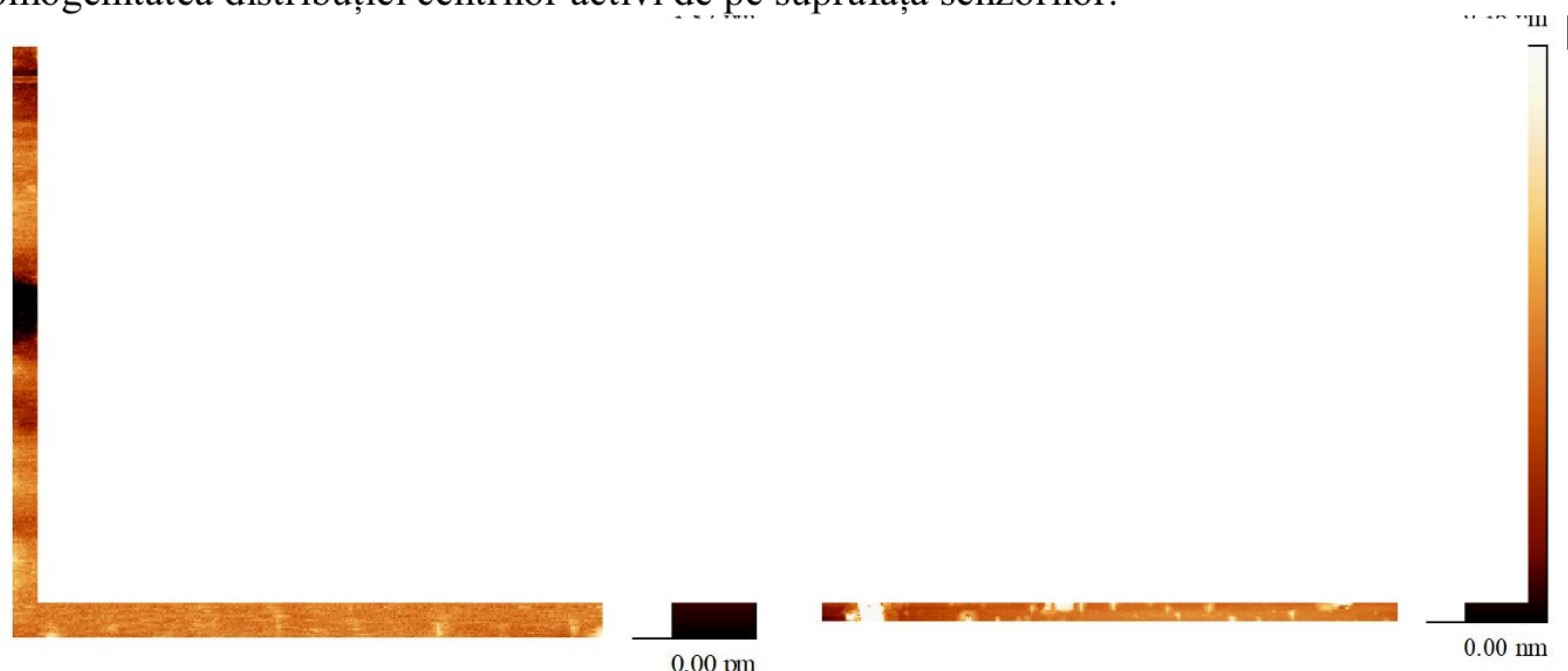


Figura 14. (b) Imaginea AFM a senzorului C/polimetacrilat/Trigonelină

11



Figura 15. Răspunsurile senzorului în soluție de hidoxitirozol în domeniul 50-300 nM și dreapta de etalonare

În Tabelul 6 se prezintă principalii senzori pe bază de polimeri imprimați molecular dezvoltăți în acest proiect și limitele de detecție ale acestora.

Tabelul 6. Senzori pe bază de polimeri imprimați molecular

Senzor	LOD/nM	Senzor	LOD/nM
C/pc			
C/pc			
C/pc			

Prin această metodă s-au obținut senzori pe bază de polimeri imprimați molecular cu biomarkeri din uleiul de măsline, care pot fi folosiți cu succes pentru detectarea adaosurilor de alte uleiuri în uleiul de măsline. Cele mai bune rezultate s-au obținut în cazul trigonelinei.

Rezultatele obținute în Activitatea 2.1 sunt foarte bune și promițătoare, activitățile specifice propuse pentru cel de al doilea an de implementare s-au realizat 100% și obiectivele generale și specifice ale acestei etape s-au îndeplinit în totalitate.

Activitatea 2.2 Dezvoltarea unei platforme multi-senzori. Caracterizarea biosenzorilor în prezența markerilor. Dezvoltarea unor rețele de biosenzori pentru analiza markerilor din uleiul de măsline

Dezvoltarea unei platforme multi-senzor

În proiect s-a realizat un sistem modular multisenzor bazat pe biosenzori electrochimici pentru determinarea markerilor din uleiurile de măsline și a adaosurilor de uleiuri vegetale în uleiul de măsline extravirgin.

Caracterizarea biosenzorilor în prezența markerilor

Pentru analiza uleiurilor de măsline pure sau falsificate folosind biosenzorii electrochimici s-au realizat mai multe procedee pentru extragerea fracțiunii polare: extracție cu metanol-apă, extracție în soluție de HCl, emulsii cu Triton x-100, solvenți eutectici. Biosenzorii preparați și caracterizați morfologic, spectrometric și electrochimic în etapele anterioare au fost utilizați pentru detecția unor biomarkeri din uleiul de măsline.

În continuare se prezintă, ca exemplu, studiile desfășurate pentru detecția electrochimică a oleuropeinei cu doi biosenzori pe bază de tirosinază și lacază. În prima etapă s-a studiat comportamentul electrochimic al oleuropeinei folosind cei doi biosenzori nou construiți, SPE/SWCNT/Lac și SPE/SWCNT/Tyr, prin intermediul CV și voltametriei de undă pătrată (SWV). Pentru fiecare biosenzor s-a preparat o soluție 10^{-4} M de oleuropeină, cu pH 5.0 (pentru Lac) și pH 7.0 (pentru Tyr).

CV a fost aplicată în domeniul de potențial de la -0,4 la +1,3 V, la o viteză de scanare de 0,1 V/s. În Figura 16 (a) se poate observa procesul de oxido-reducere a oleuropeinei pentru SPE/SWCNT/Lac și pentru SPE/SWCNT/Tyr înregistrat prin CV. În ambele situații se observă picuri bine evidențiate care corespund oxidării și reducerii oleuropeinei, cu intensități

ale curentului apropiate, însă la potențiale vizibil diferite, ceea ce sugerează performanțe electrochimice diferite ale celor doi biosenzori.

SWV a fost aplicată după optimizarea, în prealabil, a parametrilor: f (frecvența) = 15 Hz; E_{sw} (impulsul aplicat) = 90 mV, E_s (creșterea de potențial) = 2 mV. Figura 16 (b) prezintă voltamogramele de undă pătrată înregistrate cu aceeași biosenzori în soluție de oleuropeină de concentrație 10^{-4} M (electrolit PBS 10^{-1} M).

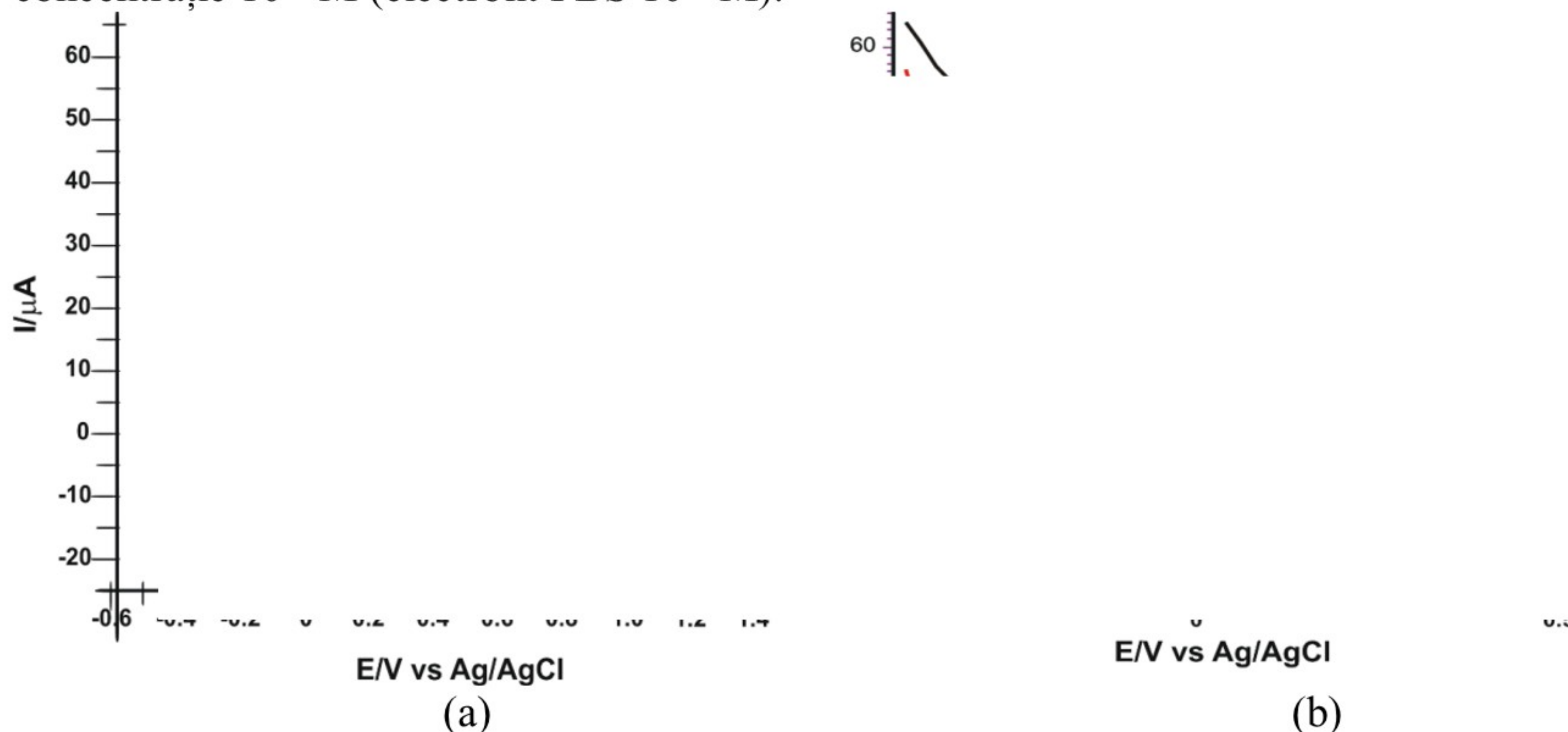


Figura 16. (a) Voltamogramele ciclice ale SPE/SWCNT (linia verde), SPE/SWCNT/Tyr (linia neagră) și SPE/SWCNT-Lac (linia roșie) în PBS 10^{-1} M (pH 7.0) care conține 10^{-4} M OLEU. (b) Voltamogramele de undă pătrată a SPE/SWCNT/Tyr (linia neagră) și SPE/SWCNT-Lac (linia roșie) în PBS 10^{-1} M (pH 7.0) care conține 10^{-4} M OLEU

Pentru realizarea curbei de calibrare s-au înregistrat voltamogramele de undă pătrată ale celor doi biosenzori în soluții de oleuropeină în domeniul de concentrație $0,01 \mu M - 28,62 \mu M$.

Ecuatiile regresiilor liniare au fost utilizate pentru calcularea limitelor de detecție ($LOD = 3\sigma / m$, unde σ este deviația standard și m panta curbei de calibrare) și limitelor de cuantificare ($LOQ = 10\sigma / s$) iar rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabelul 7. Ecuația dependenței liniare, R^2 , LOD și LOQ pentru cei doi biosenzori

B				
SPE/SWCNT				
SPE/SWCNT/Tyr	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000

SPE/SWCNT/Tyr se remarcă prin limite de detecție și cuantificare mai reduse, confirmându-se astfel proprietățile electrocatalitice foarte bune ale acestui biosenzor.

Principalii biosenzori realizați în acest an de implementare a proiectului, compușii țintă și limitele de detecție se prezintă în Tabelul 8.

Tabelul 8. Biosenzori pe bază de nanomateriale și enzime

Material sensibil	Enzima	Analit	LOD/ μA
Nan			
de a			
Nan			
mult			
carb			
Nan			
mult			
amic			
Carl			

Activitatea 2.3 Dezvoltarea de modele inteligente și aplicarea acestora în analiza datelor

În această activitate au fost dezvoltate modele inteligente prin aplicarea de metode de analiză a datelor multivariante provenite de la diferite tipuri de măsurători realizate pentru probe de uleiuri de măsline (extravirgin sau din turte de măsline), alte uleiuri vegetale cum sunt ulei de floarea soarelui, ulei de porumb, ulei de rapiță, ulei de cocos, ulei de susan, ulei de palmier și amestecuri ale acestora. Probele de uleiuri au fost analizate individual și sub formă de amestecuri din ulei de măsline extravirgin și alte uleiuri în diferite proporții pentru antrenarea sistemelor și pentru a se determina care sunt limitele de detecție în condiții de laborator. În funcție de complexitatea analizei s-au realizat 3, 4 sau 6 replici ale măsurătorilor pentru a crește semnificația și robustețea modelelor dezvoltate.

Modelele au fost realizate prin mai multe metode dintre care se pot menționa analiza componentelor principale (PCA), analiza discriminantă rezolvată prin minime pătrate parțiale (PLS-DA), modelarea soft și independentă a analogiei claselor (SIMCA) și regresii prin minime pătrate parțiale (PLS1 și PLS2).

În al treilea an de implementare, atunci când numărul de probe analizate va fi suficient de mare se vor dezvolta modele de clasificare pe bază de rețele neuronale artificiale (ANN) și mașină de învățare (ML).

În A2.3 au fost realizate integral (100%) activitățile specifice. Au fost selectate și optimizate principalele metode de analiză a datelor, metode care vor fi definitive până la terminarea activității și realizarea raportului final pentru această activitate.

Activitatea 2.4 Validarea sistemului multi-parametric în analiza de probe reale

Pentru validarea rezultatelor obținute cu sistemul de biosenzori cuplat cu analize de date multivariante s-au analizat datele obținute pentru discriminare, clasificare și stabilirea de corelații atunci când sunt folosite diferite uleiuri vegetale sau uleiuri de măsline virgin extra clasificate în funcție de: tehnologia de fabricare, soiul de măsline folosit, țara de proveniență etc. De asemenea, s-au studiat diferențele dintre uleiurile de măsline virgin extra și cele de turte de măsline. În plus, s-a determinat performanța sistemului multi-parametric la clasificarea probelor de uleiuri de măsline virgin extra în care s-au adăugat concentrații diferite de uleiuri de semințe.

În continuare se prezintă o serie de rezultate privind discriminarea sau clasificarea probelor de ulei analizate și corelarea dintre datele obținute cu biosenzorii și proprietățile lor antioxidante. Discriminarea probelor de uleiuri vegetale de semințe: în (USI), cânepă (USC), dovleac (USD), susan (USS), rapiță (UR), struguri (GSO), orez (SOR), soia (US) se prezintă în Figura 17. Se poate observa că sistemul de biosenzori este capabil să diferențieze uleiurile în funcție de originea biologică.

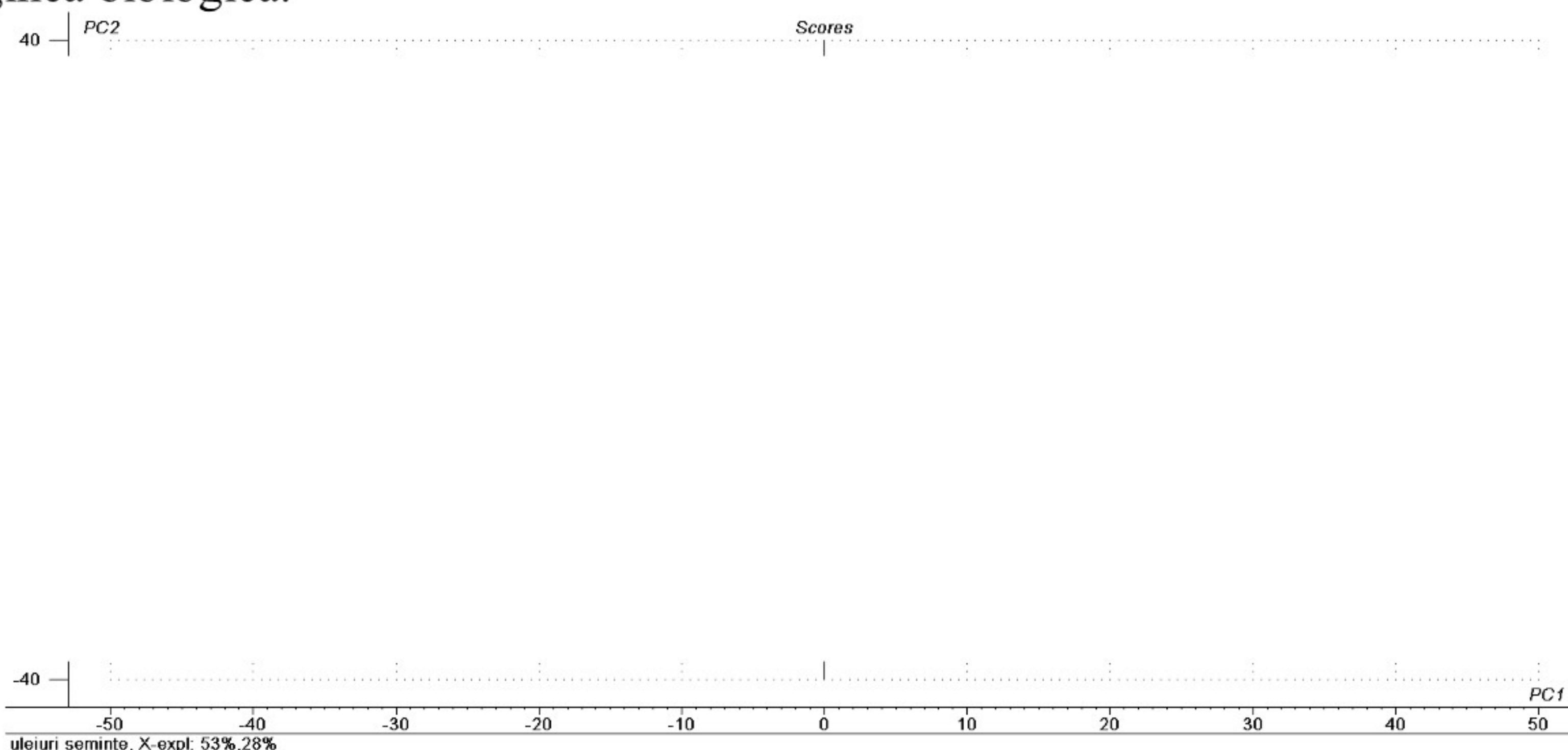


Figura 17. Graficul scores al PCA privind discriminarea uleiurilor de semințe

Analiza datelor rezultate din măsurătorile voltametrice a unor amestecuri de ulei de măsline virgin extra și ulei de porumb a condus la rezultatele prezentate în Figura 18 și Figura 19.

COEVOO total, X-expl: 52%,42%,3%

Figura 18. Graficul scores al PCA privind diferențierea probelor de ulei de măsline virgin

Conc reduse, X-expl: 76%,22%,1%

Figura 19. Graficul scores al PCA proba 1 -> c% adulterant = 0%, proba 2 -> c% adulterant = 0,5%, proba 3 -> c% adulterant = 1% (adulterantul este uleiul de porumb).

Se poate aprecia că uleiul de porumb pur (proba 1 din Figura 18) este discriminat de probele care conțin ulei de măsline virgin extra. De asemenea, uleiurile falsificate cu ulei de porumb sunt diferențiate chiar dacă concentrația de adulterant este de 0,5% (Figura 19).

Un alt studiu a constatat în diferențierea și clasificarea unor probe de uleiuri în funcție de tipul acestora, de originea biologică, de tehnologia de obținere și în funcție de țara de proveniență. Rezultatele sunt prezentate sub formă graficelor scores tridimensionale (Figura 20), diferențiate după EVOO sau POO - (Figura 20A), după tipul de ulei – POO, EVOO și ulei de floarea soarelui (Figura 20B), după tehnologia de producție –EVOO biologic, EVOO nefiltrat, EVOO clasic și EVOO ecologic (Figura 20C) și după țara de origine –Tunisia, Grecia și Italia (Figura 20D). În Figura 20 se prezintă graficele scores ale PLS-DA în care se observă o separare grupurilor constituite pe baza a diferite criterii de clasificare.

X-expl: 48%,19%,6% Y-expl: 33%,20%,12%

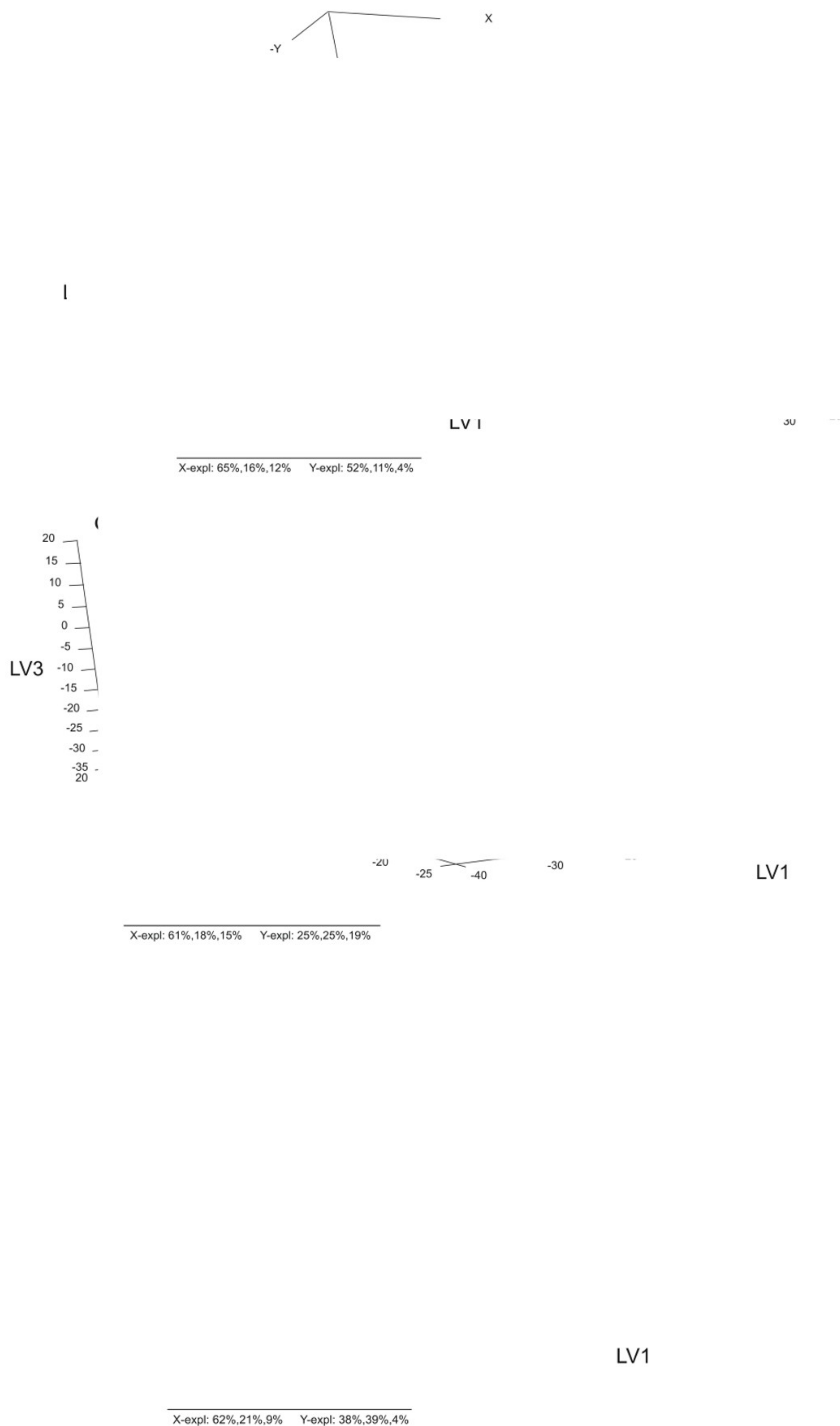


Figura 20. Graficul scores al PLS-DA care rezultă din datele biosenzorilor (matricea X) corespunzătoare diferitelor clase de uleiuri (matricea Y): (A) EVOO versus POO; (B) POO versus EVOO versus ulei de floarea soarelui; (C) EVOO biologic versus EVOO nefiltrat versus EVOO clasic versus EVOO ecologic; (D) Tunisia versus Grecia versus Italia.

Datele cantitative ale tuturor modelelor PLS-DA prezintă în toate cazurile coeficienți de corelație mai mari de 0,9 și erori pătratice medii mici atât la calibrare, cât și la validare.

PLS1 a fost folosită ca tehnică de predicție pentru a corela datele obținute cu biosenzorii cu activitatea antioxidantă cuantificată prin capacitatea de inhibare procentuală a DPPH și galvinoxil. Rezultatele modelelor de regresie PLS1 sunt prezentate ca dependența dintre rezultatele prezise în funcție de rezultatele măsurate ale activității antioxidante (Figura 21).

Figura 21. Graficul inhibării procentuale prezisă din datele biosenzorilor vs. inhibarea procentuală măsurată obținută din metodele spectrofotometrice pentru testul galvinoxil.

Toate cele șase măsurători repetate corespunzătoare fiecărei probe de ulei au fost incluse în modelele de regresie. Primul număr din codificarea probei (de la 1 la 25) reprezintă proba de ulei, iar al doilea reprezintă replicile (de la 1 la 6).

Din aceste rezultate se poate concluziona că datele electrochimice obținute cu biosenzori pot fi utilizate cu succes pentru clasificarea uleiurilor pe baza diferitelor criterii precum tipul de ulei, tehnologia de producție sau țara de origine și pentru determinarea falsificării uleiurilor.

În cadrul Activității 2.4 au fost realizate integral (100%) activitățile prevăzute în acest an de implementare. Sistemul multisenzor a fost validat pe o serie de uleiuri și procesul aceasta se va încheia la sfârșitul perioadei de implementare a proiectului, așa cum este prevăzut în planul de activități.

Activitatea 2.5 Participarea la conferințe, publicarea în reviste ISI, cerere de brevet

Pentru acest proiect am actualizat periodic pagina web, incluzând informațiile relevante privind activitățile de cercetare realizate în cadrul proiectului și activitatea de diseminare.

Adresa site-ului web al proiectului este: www.busdoa.ugal.ro

Au fost diseminate următoarele rezultate:

Articole în reviste *Clarivate Analytics*:

1. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Studies on the Detection of Oleuropein from Extra Virgin Olive Oils Using Enzymatic Biosensors. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 12569. IF 6,208. <https://doi.org/10.3390/ijms232012569>

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

3. Dăscălescu, D.; Apetrei, C. Development of a Novel Electrochemical Biosensor Based on Organized Mesoporous Carbon and Laccase for the Detection of Serotonin in Food Supplements. *Chemosensors* **2022**, *10*, 365. IF 4,229.

<https://doi.org/10.3390/chemosensors10090365>

4. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Sensitive Detection of Hydroxytyrosol in Extra Virgin Olive Oils with a Novel Biosensor Based on Single-Walled Carbon Nanotubes and Tyrosinase. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 9132. IF 6,208. <https://doi.org/10.3390/ijms23169132>

5. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Assessment of the Antioxidant Activity of Catechin in Nutraceuticals: Comparison between a Newly Developed Electrochemical Method and Spectrophotometric Methods. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 8110. IF 6,208. <https://doi.org/10.3390/ijms23158110>

6. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Simultaneous Determination of Caffeic Acid and Ferulic Acid Using a Carbon Nanofiber-Based Screen-Printed Sensor. *Sensors* **2022**, *22*, 4689. IF 3,847. <https://doi.org/10.3390/s22134689>

Participarea la conferințe internaționale

1. Alexandra Virginia Bounegru, Irina Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei. Development of an electroanalytical method for detecting adulteration of extra virgin olive oils. SCDS-UDJG 2022 The Tenth Edition, Galați, 9-10 iunie 2022. Prezentare orală invitată, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 39.
2. Alexandra Virginia Bounegru, Constantin Apetrei. Sensors and Biosensors for Evaluating Olive Oil Quality. SCDS-UDJG 2022 The Tenth Edition, Galați, 9-10 iunie 2022. Prezentare orală, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 161.
3. Andreea Loredana Comănescu, Constantin Apetrei. Discrimination of vegetable oils by using spectrometric data and chemometrics methods. SCDS-UDJG 2022 The Tenth Edition, Galați, 9-10 iunie 2022. Poster, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 241.
4. Andrei Geman, C. Apetrei. Determination of the addition of maize oil to extra virgin olive oil by FTIR method coupled with multivariate data analysis methods. SCDS-UDJG 2022 The Tenth Edition, Galați, 9-10 iunie 2022. Poster, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 242.
5. Constantin APETREI. Spectrometric and electroanalytical methods for the determination of virgin olive oils adulteration. International Summer School - FOOD SAFETY AND HEALTHY LIVING -FSHL – 2022, 5-8 Septembrie 2022, Brașov – Romania, Prezentare orală invitată, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 142.
6. Constantin APETREI, Elisabeta-Irina GEANĂ, Irina Mirela APETREI. Electroanalytical method coupled with chemometry for detection of virgin olive oil adulteration. The 6th International Conference New Trends on Sensing - Monitoring – Telediagnosis for Life Sciences NT-SMT-LS 2022 Brașov, Septembrie 8-10, 2022. Prezentare orală, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 43.
7. Alexandra Virginia BOUNEGRU, Constantin APETREI. Electrochemical determination of hydroxytyrosol in extravirgin olive oils using screen-printed electrodes modified with single wall carbon nanotubes and tyrosinase The 6th International Conference New Trends on Sensing - Monitoring – Telediagnosis for Life Sciences NT-SMT-LS 2022 Brașov, Septembrie 8-10, 2022. Poster, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 62.
8. Irina-Georgiana Bulgaru (Munteanu), Constantin Apetrei. Comparative study on the antioxidant activity of extra virgin olive oil samples using a newly developed electrochemical method and DPPH spectrophotometric assay. The 6th International Conference New Trends on Sensing - Monitoring – Telediagnosis for Life Sciences NT-SMT-LS 2022 Brașov, Septembrie 8-10, 2022. Poster, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 81.
9. Constantin Apetrei, Andreea Loredana Comănescu, Andrei Daniel Geman, Irina Georgiana Munteanu, Alexandra Virginia Bounegru, Irina Mirela Apetrei, Elisabeta Irina Geană. Electrochemical (bio)sensor array coupled with multivariate data analysis for the assessment of virgin olive oil quality. “Priorities of Chemistry for a Sustainable Development”, PRIOCHEM XVIII, București, 26-28 Octombrie 2022. Prezentare orală invitată, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 11.
10. Elisabeta-Irina Geana, Corina Teodora Ciucure, C. Apetrei. Authentication and detection of adulteration of extra virgin olive oil based on the composition of phenolic compounds. “Priorities of Chemistry for a Sustainable Development”, PRIOCHEM XVIII, București, 26-28 Octombrie 2022. Prezentare orală, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 63.

Participarea la conferințe naționale

1. Alexandra Virginia Bounegru, Constantin Apetrei. Noi biosenzori enzimatici pentru determinarea electrochimică a oleuropeinei din uleiuri de măsline extravirgine. Oral presentation. A XXXVI-a CONFERINȚĂ NAȚIONALĂ DE CHIMIE –CNChim-2022 Călimănești – Căciulata. Prezentare orală, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 28.

Rezultatele etapei 2 au fost diseminate prin 6 prezentări orale și 4 postere la diferite conferințe internaționale, 1 prezentare orală la o conferință națională și publicarea a 6 articole în reviste științifice Clarivate Analytics de prim nivel (5 din cvartila Q1 și 1 din

cvartila Q2). Activitatea de diseminare prevăzută pentru acest an a fost realizată integral, 100%.

Activitatea 2.6 - Activități de achiziție. Elaborarea rapoartelor științifice

Activitățile de achiziție s-au realizat în condiții bune anul acesta fără întârzieri. Raportul științific anual pentru 2022 a fost întocmit în conformitate cu cerințele Contractorului și este afișat pe pagina web a proiectului, în limba română și în limba engleză.

Activitatea de achiziție a asigurat realizarea integrală a tuturor activităților prevăzute în al doilea an de implementare a proiectului.

În al doilea an de implementare a proiectului BUSDOA au fost realizate toate activitățile prevăzute în planul de implementare, s-au îndeplinit obiectivele prevăzute 100% și s-au obținut rezultate științifice valoroase, o mare parte dintre acestea fiind diseminate prin publicarea în reviste științifice de prestigiu și, de asemenea, prezentate la conferințe internaționale.

Sumar al progresului: livrabile realizate, indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor

Nr. crt.	Livrabile/indicatori planificați	Nr.	Livrabile/indicatori realizați în etapa 2	Grad de realizare Etapa 2	Grad de realizare Etapa 1 și 2
1	Analiza cromatografică a markerilor		Da	100%	100%
2	Dezvoltarea unor noi materiale sensibile		Da	100%	100%
3	Sinteza polimerilor conductori și a polimerilor imprimați molecular		Da	100%	100%
4	Dezvoltarea unei platforme multi-senzor		Da	100%	100%
5	Caracterizarea biosenzorilor în prezența markerilor		Da	100%	100%
6	Dezvoltarea unor rețele de biosenzori pentru analiza markerilor din uleiul de măsline		Da	100%	100%
7	Dezvoltarea de modele inteligente și aplicarea acestora în analiza datelor		Da	100%	50%*
8	Validarea sistemului multi-parametric în analiza de probe reale		Da	100%	30%**
9	Participarea la conferințe, publicarea în reviste ISI, cerere de brevet (pe întreaga durată a proiectului)	6 6 1	6 11 0	100% 100% 0%	100% 100% 0%***
10	Activități de achiziție			100%	100%
11	Elaborarea rapoartelor științifice				
	Raport pentru etapa 2	1	Da	100%	100%
	Rezumat executiv pentru etapa 1 și 2	1	Da	100%	100%

* Livrabila se va finaliza în etapa 3, când sunt prevăzute activități timp de 6 luni

* Livrabila se va finaliza în etapa 3, când sunt prevăzute activități timp de 12 luni

*** Cererea de brevet se va depune în etapa 3, când sunt prevăzute activități timp de 12 luni

Director Proiect,
Apetrei Constantin

