

RAPORT ȘTIINȚIFIC

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

ianuarie 2021-decembrie 2021

În acest an, 2021 s-au realizat activitățile prevăzute în planul de implementare al proiectului din Etapa 1: **Etapa 1 - Detecția moleculelor țintă și dezvoltarea de noi materiale sensibile** Dezvoltarea și caracterizarea biosenzorilor Dezvoltarea de modele inteligente și aplicarea acestora în analiza datelor Diseminarea rezultatelor Managementul proiectului.

Rezumatul etapei

În acest an de implementare al proiectului s-au realizat ceretări privind: (1) caracterizarea cromatografică a markerilor din uleiuri de măsline și din alte uleiuri vegetale prin metode spectroscopice (UV-Vis și FT-IR) și cromatografice (UHPLC-MS/MS); (2) s-au dezvoltat noi materiale sensibile pentru construirea unor noi biosenzori, pe bază de polimeri conductori și polimeri imprimați molecular; (3) s-a lucrat la dezvoltarea unei platforme multi-senzor necesară pentru analiza falsificării uleiurilor de măsline, pentru care biosenzorii au fost studiați și caracterizați în prezența markerilor fenolici, optimizându-se condițiile experimentale și parametrii de măsurare astfel încât performanțele electroanalitice să fie maxime, selectându-se astfel primii biosenzori care vor fi integrați în rețele de biosenzori pentru analiza markerilor din uleiul de măsline și determinarea falsificărilor cu diferite uleiuri vegetale; (4) pentru analiza datelor experimentale s-au dezvoltat modele inteligente de analiză multivariantă a datelor și care s-au aplicat pentru analiza datelor fizico-chimice, cromatografice, spectrometrice, spectroscopice și electrochimice cu scopul discriminării, clasificării probelor de uleiuri în funcție de autenticitatea lor și determinarea limitelor de la care sistemul de biosenzori este capabil să detecteze adaosul de alte uleiuri în uleiul de măsline. O parte din rezultatele obținute au fost prezentate la conferințe internaționale de prestigiu sau au fost publicate în reviste ISI. O serie de date importante sunt în procesare pentru scrierea unei cereri de brevet, care este un livrabil important al acestui proiect, dar și a altor articole în reviste ISI.

Activitatea 1.1 Analiza cromatografică a markerilor. Dezvoltarea de noi materiale sensibile. Sinteza polimerilor conductivi și polimerilor imprimați molecular

Analiza *cromatografică și spectroscopică* a markerilor fenolici

O parte din probele de ulei de măsline folosite în analiza spectrofotometrică și cromatografică, dar și în studiile de realizare și optimizare a unor noi biosenzori au fost furnizate de doamna Prof. dr. Maria Lisa Clodoveo de la Universitatea Carlos Moro din Bari și au constatat din probe fabricate de mici fermieri din regiunea Puglia și de asemenea din probe obținute în laboratorul Universității din Bari printr-un nou procedeu de extracție care implică folosirea ultrasunetelor. În total am avut 17 probe de ulei de măsline. O parte din probe sunt prezentate în Figura 1.

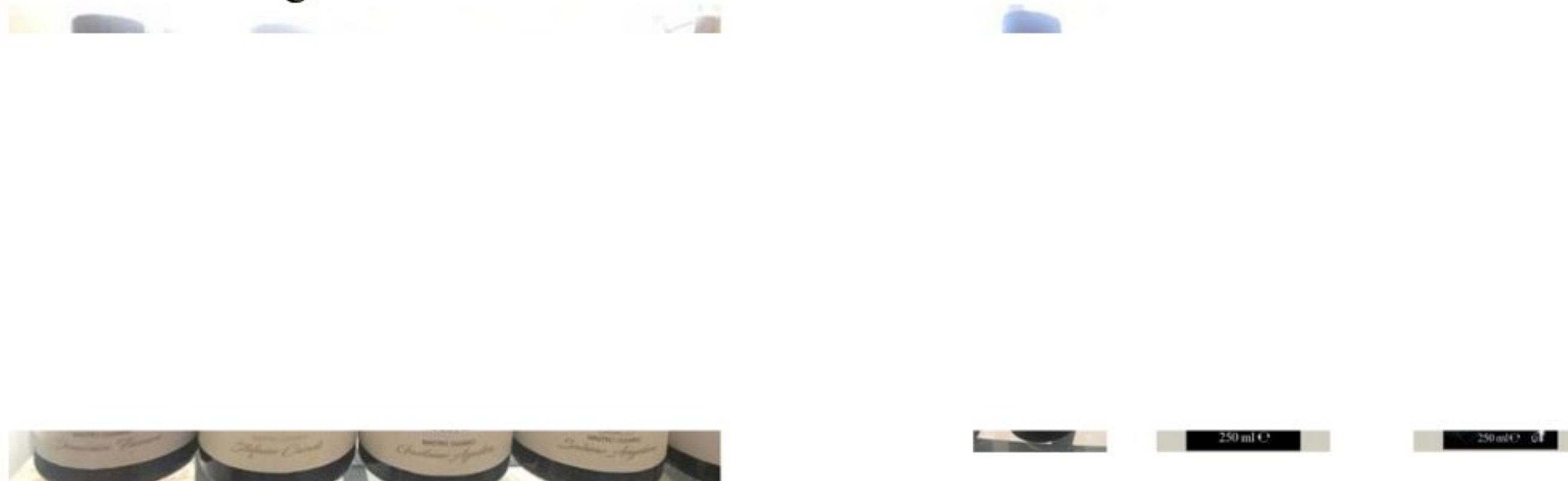


Figura 1. Imaginea unor probe de uleiuri de măsline de origine italiană analizate în proiect

Alte probe de uleiuri de măsline de la diferiți producători, din diferite soiuri de măsline precum și alte uleiuri vegetale au fost achiziționate din proiect (36 de probe).

Probele de ulei de măsline au fost analizate prin spectroscopie în domeniul IR, spectrofotometrie în domeniul UV și spectrofotometrie în domeniul Vis. Spectrele FTIR obținute se vor folosi ca amprente chimice a uleiurilor de măsline autentice fiind considerate etaloane în studiile de determinare a falsificării uleiurilor cu alte uleiuri vegetale.

Spectrele în domeniul UV obținute s-au folosit ca amprente chimice aparținând unor probe etalon dar și pentru evaluarea unor parametri caracteristici uleiurilor de măsline cum sunt valorile absorbanțelor la 225 nm, 232 nm, 270 nm, 266 nm, 274 nm.

Spectrele în domeniul vizibil au fost folosite ca date de intrare pentru calcularea parametrilor de culoare în sistemul CIELab, date care sunt utile în studiile de discriminare și clasificare (L^* , a^* , b^* , C, H, S).

Pentru determinarea compușilor cu proprietăți antioxidante prezenți în probele de ulei s-au utilizat metoda Folin-Ciocalteu pentru determinarea conținutului total de compuși polifenolici.

Alte modalități de apreciere a activității antioxidante au fost metodele de captare a radicalilor liberi. Au fost folosite metodele de capturare a radicalilor liberi DPPH, ABTS și galvinoxil.

Aceste rezultate se vor folosi în etapele de validare a biosenzorilor, pentru a se putea aprecia concordanța dintre răspunsurile biosenzorilor și alte tipuri de analize fizico-chimice, dar și diferențele dintre probele pure și cele falsificate cu alte uleiuri vegetale.

Pentru studiile în condiții de laborator am realizat amestecuri din diferite uleiuri în proporții diferite pentru a putea determina diferențele care apar și care sunt limitele de sensibilitate ale metodelor. Astfel au fost analizate peste 50 de amestecuri de uleiuri de măsline în care s-au adăugat alte uleiuri vegetale de la niveluri începând cu 0,1% până la 50%.

Uleiurile vegetale caracterizate prin HPLC-MS/MS sunt: ulei de măsline extra virgin (MS), ulei de nucă (N), ulei din sămburi de struguri (STR), ulei de dovleac (D), ulei de in (I), ulei de soia (SO), ulei de susan (SU), ulei de cânepă (C), ulei de mac (M), ulei de floarea soarelui (FL), ulei din porumb (P). De asemenea, s-a realizat un experiment de falsificare controlată a uleiului de măsline extra virgin cu diferite procente de ulei de porumb (0,5 -50%).

Extracția fracției polare din uleiurile vegetale investigate s-a realizat conform protocolului Consiliul Oleicol Internațional (COI/T.20/ DocNo 29, Nov. 2009). Pentru aceasta, 2 g de ulei se introduce într-un tub de extracție, se adaugă 1 mL standard intern (acidul siringic 0,015 mg/mL preparat în amestec metanol/apă 80/20 (v/v)) după care se omogenizează cu un vortex timp de 30 sec. Se adaugă 5 mL soluție de extracție (metanol/apă 80/20 (v/v)), se agită din nou în vortex timp de 1 minut, după care amestecul rezultat se supune extracției cu ultrasunete în baie cu ultrasunete, timp de 15 minute, la temperatura camerei. Ulterior, proba se centrifughează la 5.000 rpm timp de 25 de minute. O alicotă din faza supernatantului se filtrează printr-o seringă de plastic de 1 ml folosind filtre de seringă din nailon (0,45 μ m) înainte de injectarea în sistemul HPLC. Reprezentarea schematică a etapei de extracție a compușilor fenolici din fracția polară (nesaponificabilă) a uleiurilor vegetale este prezentată în figura 2.

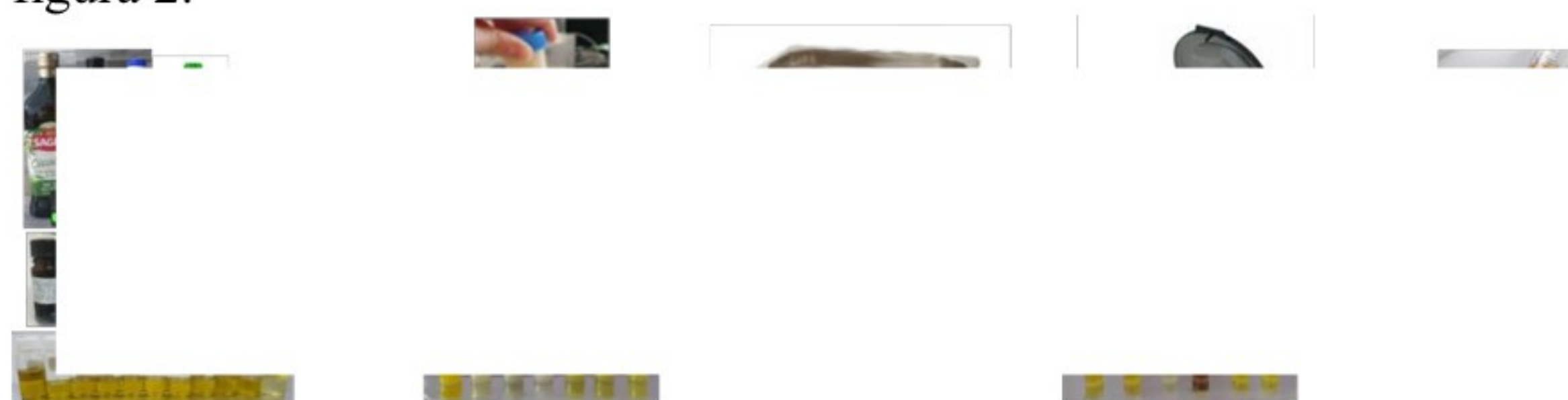


Figura 2. Reprezentarea schematică a extracției compușilor fenolici din uleiurile vegetale înainte de analiza prin UHPLC-MS/MS

Determinarea conținutului de polifenoli s-a realizat prin UHPLC-MS/MS cu ionizare ESI, folosind un spectrometru de masă de înaltă rezoluție Q Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole-OrbiTrap (ThermoFisher Scientific) echipat cu HESI, cuplat la un cromatograf de lichide de înaltă performanță UltiMate 3000 UHPLC (ThermoFisher Scientific). Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană Kinetex® C18 (100 × 2.1 mm, diametrul particulelor de 1.7 μm), la o temperatură de 30 °C. Faza mobilă: A – apă cu 0,1% acid formic și B – metanol cu 0.1% acid formic, eluția în gradient la un debit cuprins între 0.3 și 0.4 mL/min. Spectrul de masă s-a înregistrat în modul de ionizare negativă într-un domeniu cuprins între 100-800 m/z, la o rezoluție de 70.000. Azotul a fost folosit ca gaz de coliziune și gaz auxiliar la un debit de 11 și respectiv 48 unități arbitrare. Tensiunea aplicată a fost de la 2,5 kV și temperatura capilară a fost de 320 °C. Energia celulei de coliziune a variat între 30 eV și 60 eV. Datele au fost achiziționate și procesate folosind pachetul software Xcalibur (Versiunea 4.1). Calibrarea s-a realizat în intervalul de concentrație 0 - 1000 μg/L pentru fiecare dintre acizii fenolici și flavonoizi, prin diluarea în serie cu metanol a amestecului standard de concentrație 10 mg/L. Compușii fenolici determinați prin această metodă sunt: apigenină, galangin, kaempferol, izorhamnetin, chrysin, pinocembrin, acid galic, acid abscisic, acid p-cumaric, acid siringic, acid cafeic, acid clorogenic, acid ferulic, acid elagic, acid vanilic, acid p-hidroxibenzoic, 3,4- acid dihidroxibenzoic, acid t-cinamic, (+)-catechină și (-)-epicatechină. Identificarea compușilor fenolici cuantificați în uleiurile vegetale 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 ionizării în modul negativ (Tabelul 2). Identificarea principalilor acizi fenolici și flavonoizi în uleiul de măsline extra virgin este prezentată în figura 3. În absența standardelor pentru compușii fenolici majoritari din uleiul de măsline, identificarea altor compuși din extract s-a bazat pe căutarea moleculei deprotonate, [M-H]⁻ și a fragmentelor rezultate, dar și prin compararea cu literatura specifică. Astfel, pe lângă compușii cuantificați, în extractul rezultat din EVOO s-au identificat și alți compuși fenolici precum tirozol, oleocantal (p-HPEA-EDA), luteolin, dar și agliconul oleuropein mono-aldehidă (3,4-DHPEA-EA) (Figura 3).

Tabelul 2. Identificarea compușilor fenolici din uleiurile vegetale prin UHPLC-MS/MS

Nr.crt.	Compuși	Timp de retenție [min]	m/z [M-H] ⁻	Fragmentele de masă	Linearitate (μg/L), R ²
Acizi fenolici					
1	A				7
2	A				1
3	A				6
4	A				
5	A				2
6	A				6
7	A				6
8	A				9
9	A				6
10	A				1
11	A				5
Flavonoizi					
12	(-				3
13	(-				9
14	Q				8
15	N				7
16	Hesperidin	2.37	303.1027	217.0610	0.9998

17	I	65
18	I	16
19	I	37
20	A	77
21	I	97
22	C	99
23	C	89
24	I	33
Stilbeni		
25	t	88

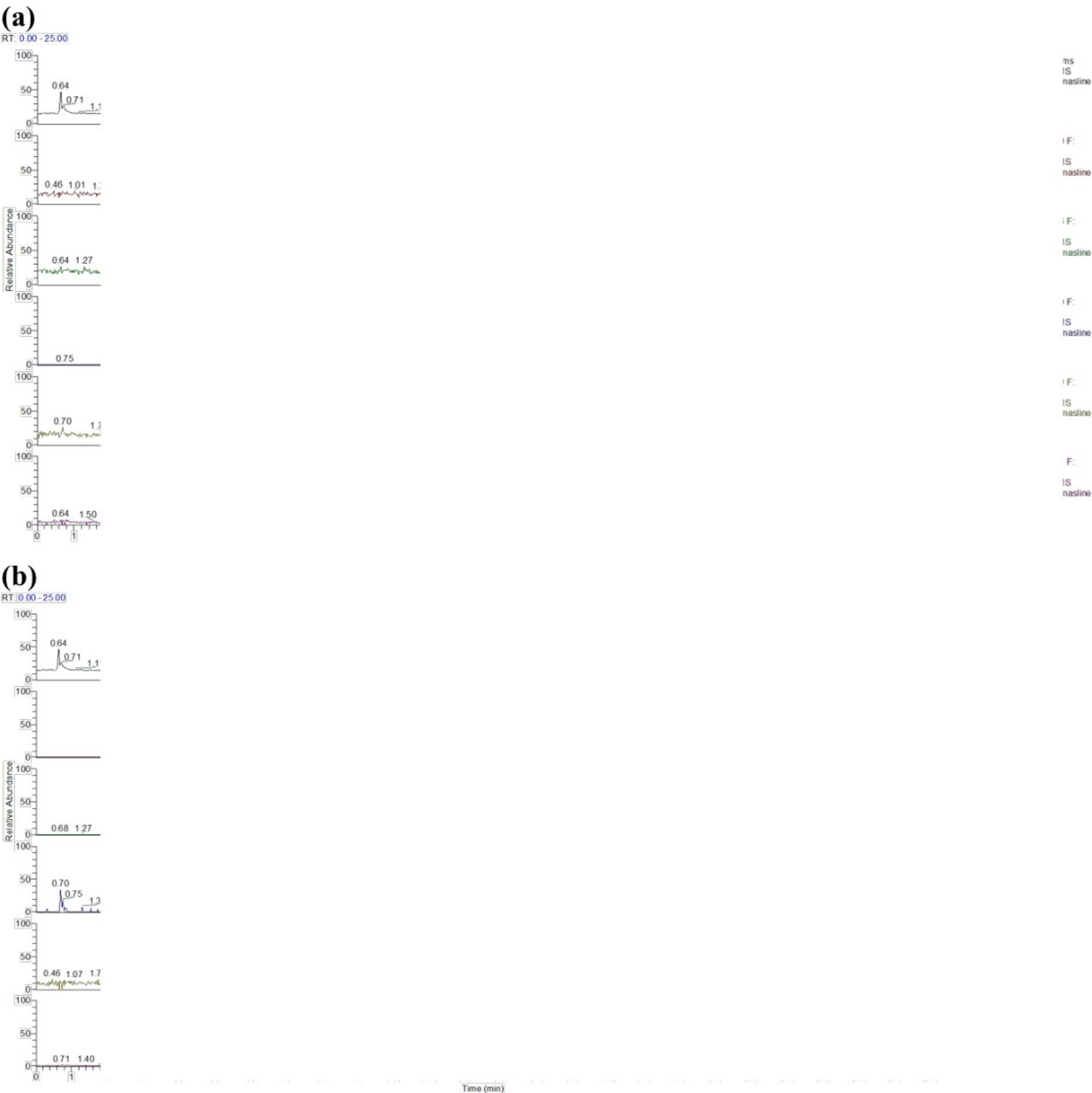


Figura 3. Identificarea compușilor fenolici din extractul lichid de ulei extravirgin de măsline (EVOO) prin UHPLC–MS/MS, ionizare negativă: (a) acizii fenolici, (b) flavonoizii

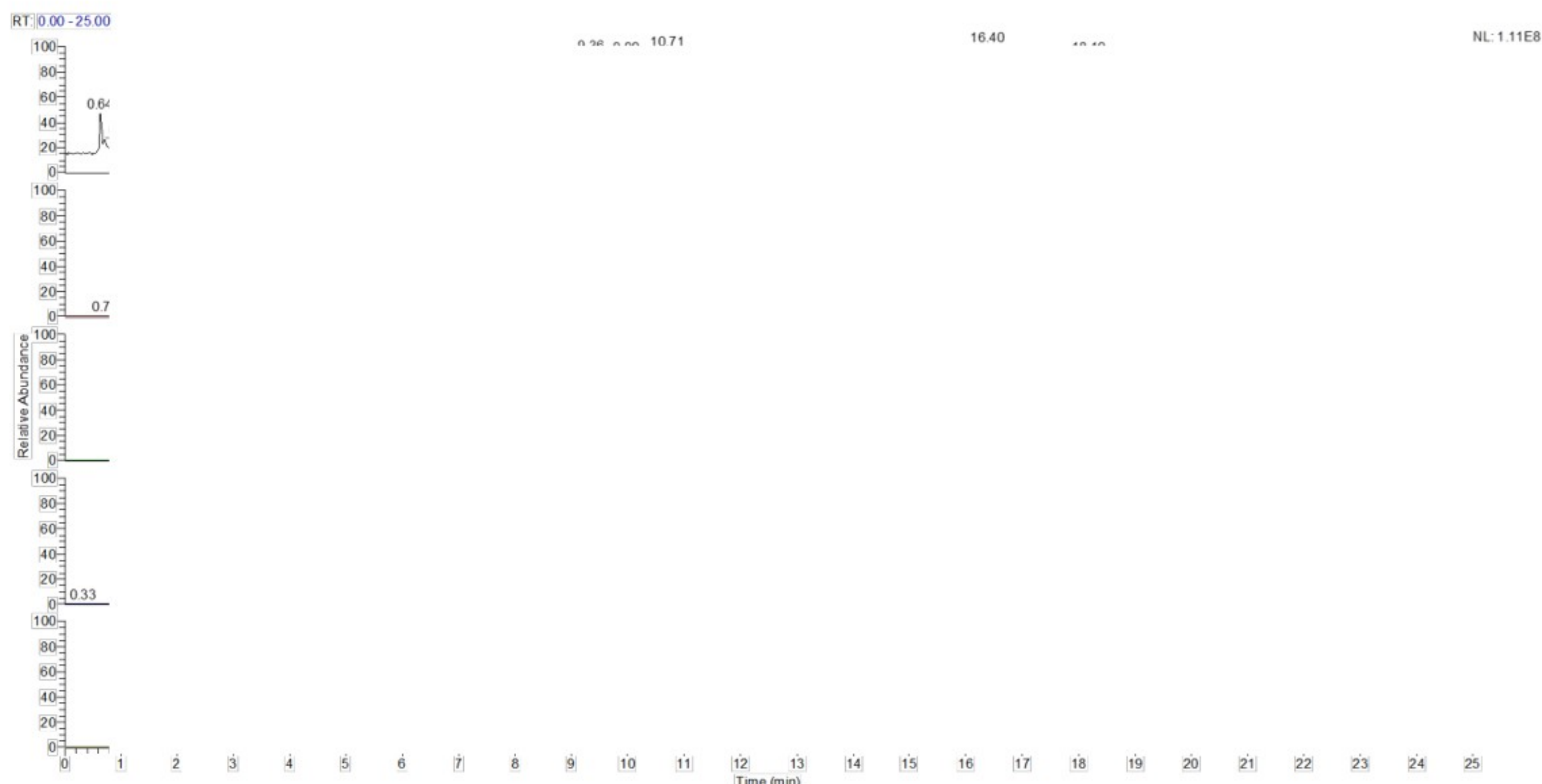


Figura 4. Identificarea compușilor fenolici reprezentativi din extractul lichid de ulei extravirgin de măsline (EVOO) prin UHPLC–MS/MS, ionizare negativă

Datele cantitative rezultate în urma investigării compușilor fenolici din uleiurile vegetale au indicat faptul că principalii acizi fenolici identificați sunt acizii p-cumaric, ferulic, elagic, abscisic și cinamic, conținutul acestora variind în funcție de tipul de ulei vegetal (Figura 5). După cum se observă, uleiul din nuci (N) și uleiul de măsline extra virgin (MS) prezintă un conținut mai mare de acid elagic (2,439 și respectiv 1,195 mg/kg), în timp ce uleiul din semințe de susan prezintă un conținut mai mare de acid ferulic (2,730 mg/kg), comparativ cu celelalte tipuri de uleiuri vegetale. Uleiul EVOO prezintă un conținut de acid cinamic de 2,242 mg/kg (valoare medie), valoare mult mai mare comparativ cu celelalte uleiuri (n.d. -0,359 mg/kg), fiind astfel un marker fenolic reprezentativ pentru EVOO. Dintre flavonoizii cuantificați, pinostrobinul, apigeninul, quercetinul și isorhamnetinul sunt majoritari, cu valori cuprinse între nd. - 5,085 mg/kg pentru pinostrobin, 0,011 – 1,651 mg/kg pentru apigenin, nd. – 1,048 mg/kg pentru quercetin și respectiv 0,003 – 0,506 mg/kg pentru isorhamnetin.

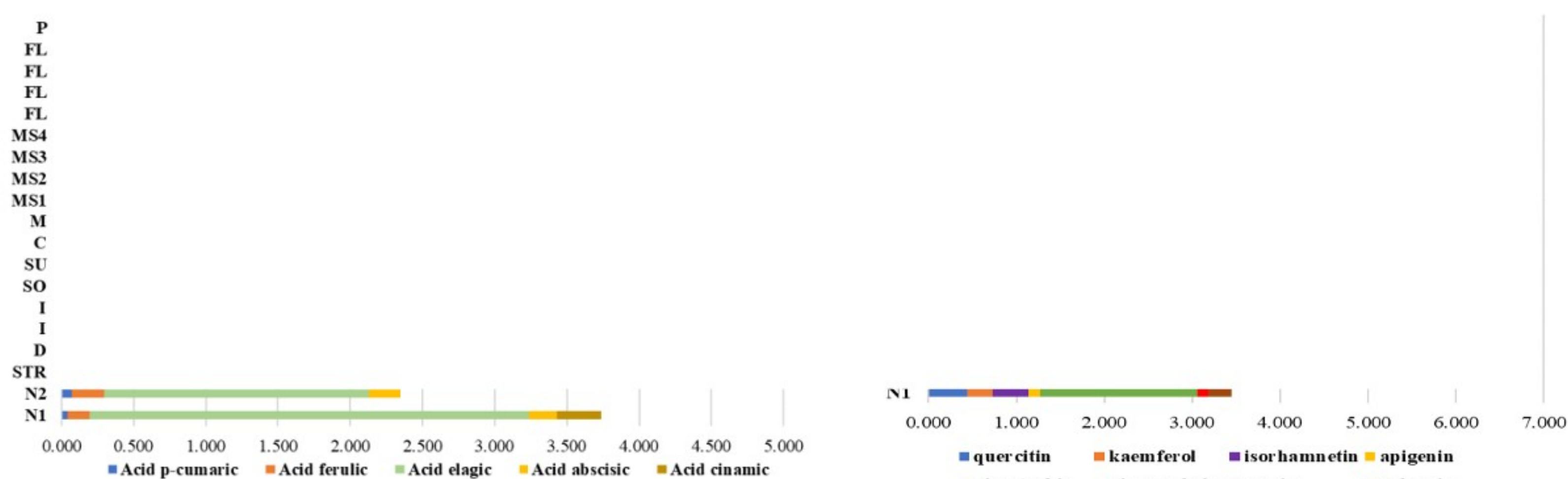


Figura 5. Profilul UHPLC-MS/MS al compușilor fenolici (acizi fenolici și flavonoizi) din uleiurile vegetale

Pentru analiza exploratorie a datelor polifenolice cantitative, s-a efectuat analiza componentelor principale (PCA). Primele două componente principale (PC 1 și PC 2) cu 53,64 % din totalul variațiilor au fost extrase pentru analiză. Distribuția uleiurilor vegetale în graficul scorului PC1-PC2 este prezentat în Figura 5. unde se observă o discriminare clară a uleiului de măsline extra virgin și a uleiului din nuci față de restul uleiurilor.

PC1 (31.58 %)

PC1 (31.58 %)

Figura 6. Analiza PCA a uleiurilor vegetale pe baza profilului compușilor fenolici (MS – ulei de măsline extra virgin, N – ulei din nuci, ulei din sâmburi de struguri (STR), ulei de dovleac (D), ulei de in (I), ulei de soia (SO), ulei de susan (SU), ulei de cânepă (C), ulei de mac (M), ulei de floarea soarelui (FL), ulei din porumb (P))

Rezultatele indică faptul că markerii fenolici specifici uleiului de măsline extra virgin sunt acizii cumaric și cinamic, apigenin, quercetin, isorhamnetin, pinocembrin și (+)-catechină, în timp ce markerii fenolici specifici uleiului din nuci sunt acizii p-hidroxibenzoic, clorogenic și abscisic, dar și flavonoizi precum galangin, rutin, kaempferil, hesperidin.

Analiza clusterelor ierarhice (HCA- Hierarchical Cluster Analysis) pe baza datelor cantitative referitoare la compușii fenolici din uleiurile vegetale, a grupat uleiurile investigate în patru cluster, și anume: clusterul C1 care grupează majoritatea uleiurilor de măsline investigate; clusterul C2 în care sunt grupate uleiurile de soia, cânepă, in, semințe de struguri și dovleac; clusterul C3 în care sunt grupate uleiurile din nuci și o probă de ulei de măsline extra virgin provenit din Bulgaria și clusterul C4 în care sunt grupate uleiurile de floarea soarelui, susan și porumb (Figura 7). După cum se observă, pe baza compușilor fenolici minoritari are loc o diferențiere foarte clară a uleiului de măsline extra virgin față de alte uleiuri vegetale, fiind grupate într-un cluster bine definit. Uleiurile vegetale obținute din soia și semințe (cânepă, mac, in, semințe de strugure) prezintă un profil asemănător al compușilor fenolici, fiind diferit de cel al uleiurilor vegetale obținute din susan, floarea soarelui și porumb.

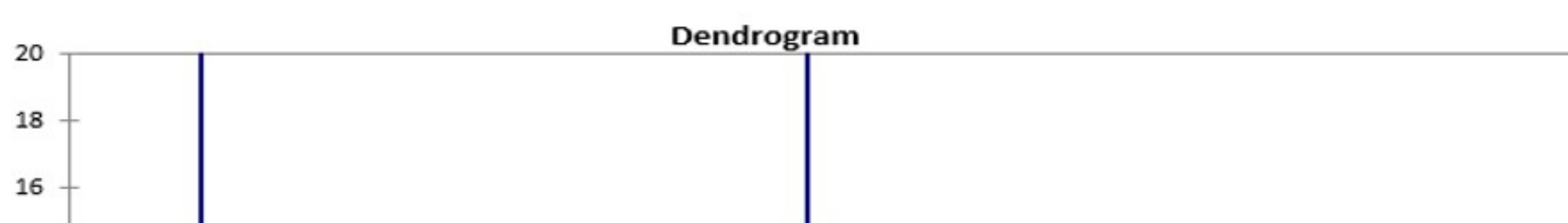


Figura 7. Analiza HCA a uleiurilor vegetale pe baza compușilor fenolici

Concluzionând datele referitoare la profilul compușilor fenolici din diferite uleiuri vegetale, se poate afirma faptul că uleiul de măsline extra virgin prezintă o compoziție aparte a compușilor

fenolici, fiind similară cu cea a uleiurilor din nuci, dar și cu uleiurile din floarea soarelui și porumb. Acest lucru indică faptul că uleiurile de floarea soarelui și porumb pot fi potențiali adulteranți ai uleiului de măsline extra virgin (EVOO), prin adăugarea acestora, în diferite procente, la EVOO.

În urma analizei PCA a datelor cantitative referitoare la compușii fenolici din probele de uleiuri rezultate prin amestecarea uleiului EVOO cu diferite procente de ulei de porumb (A2 – 0,5%, A3 – 1%, A4 – 2,25%, A5 – 3%, A6 – 5%, A7 – 7,5%, A8 – 10%, A9 – 19,5%, A10 – 50%) se observă diferențierea uleiurilor EVOO falsificate cu ulei de porumb, în mod special a uleiurilor EVOO falsificate care conțin peste 3% ulei de porumb (A5 – A10), fiind situate în partea stângă a axei PC1. Uleiurile EVOO falsificate cu procente mai mici de ulei de porumb (0,5%, 1% și 2,5% - A2, A3 și A4) sunt grupate în partea dreapta a axei PC1, alături de uleiul de măsline extra virgin nefalsificat. Principalii markeri fenolici care stau la baza diferențierii uleiurilor EVOO pure de cele falsificate sunt acizii elagic și cafeic, iar și flavonoizi precum galangin, crisin și pinocembrin (Figura 8).

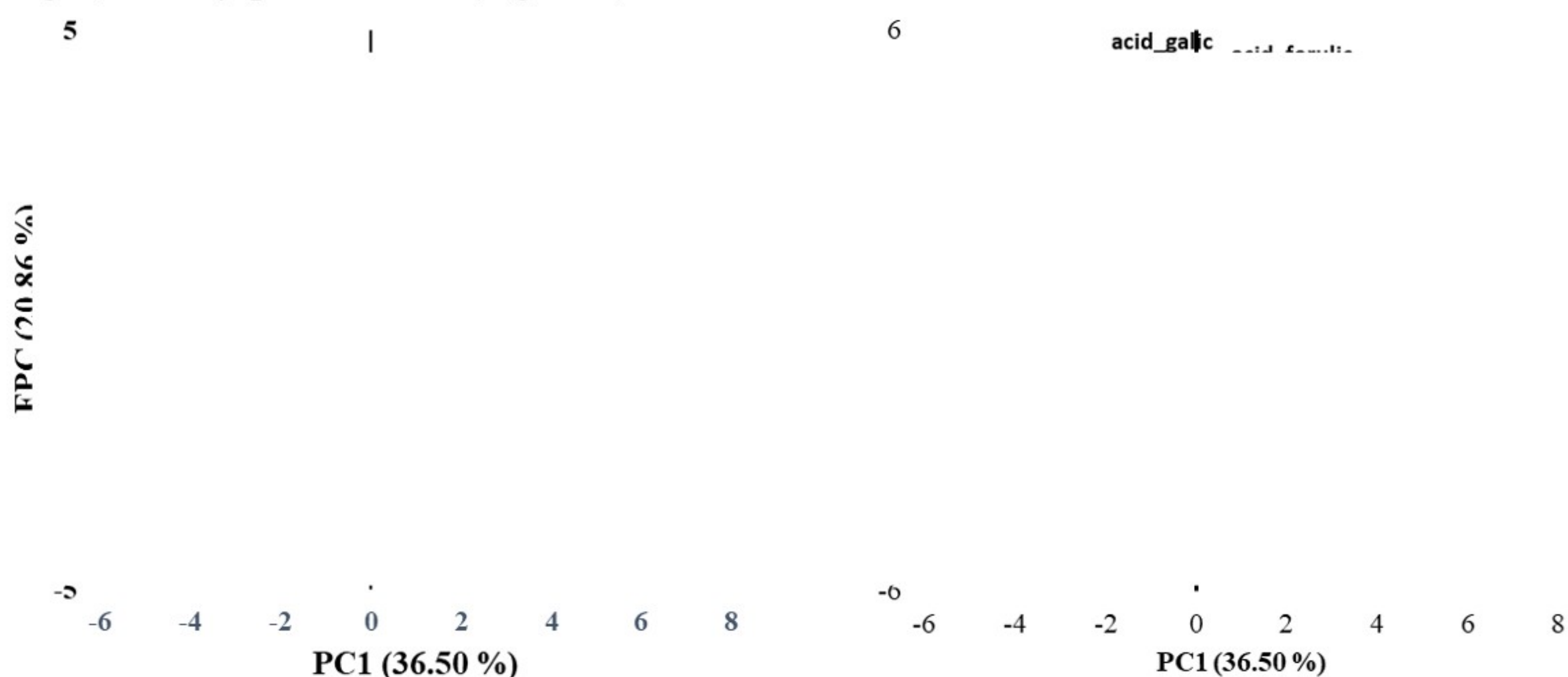


Figura 8. PCA a uleiurilor de măsline extra virgin falsificate cu diferite procente de ulei de porumb

Astfel, pe baza experimentului de falsificare controlată a EVOO cu diferite procente de ulei de porumb, Se poate concluziona faptul că profilul compușilor fenolici investigați a permis diferențierea uleiurilor EVOO falsificate cu mai mult de 3% ulei de porumb.

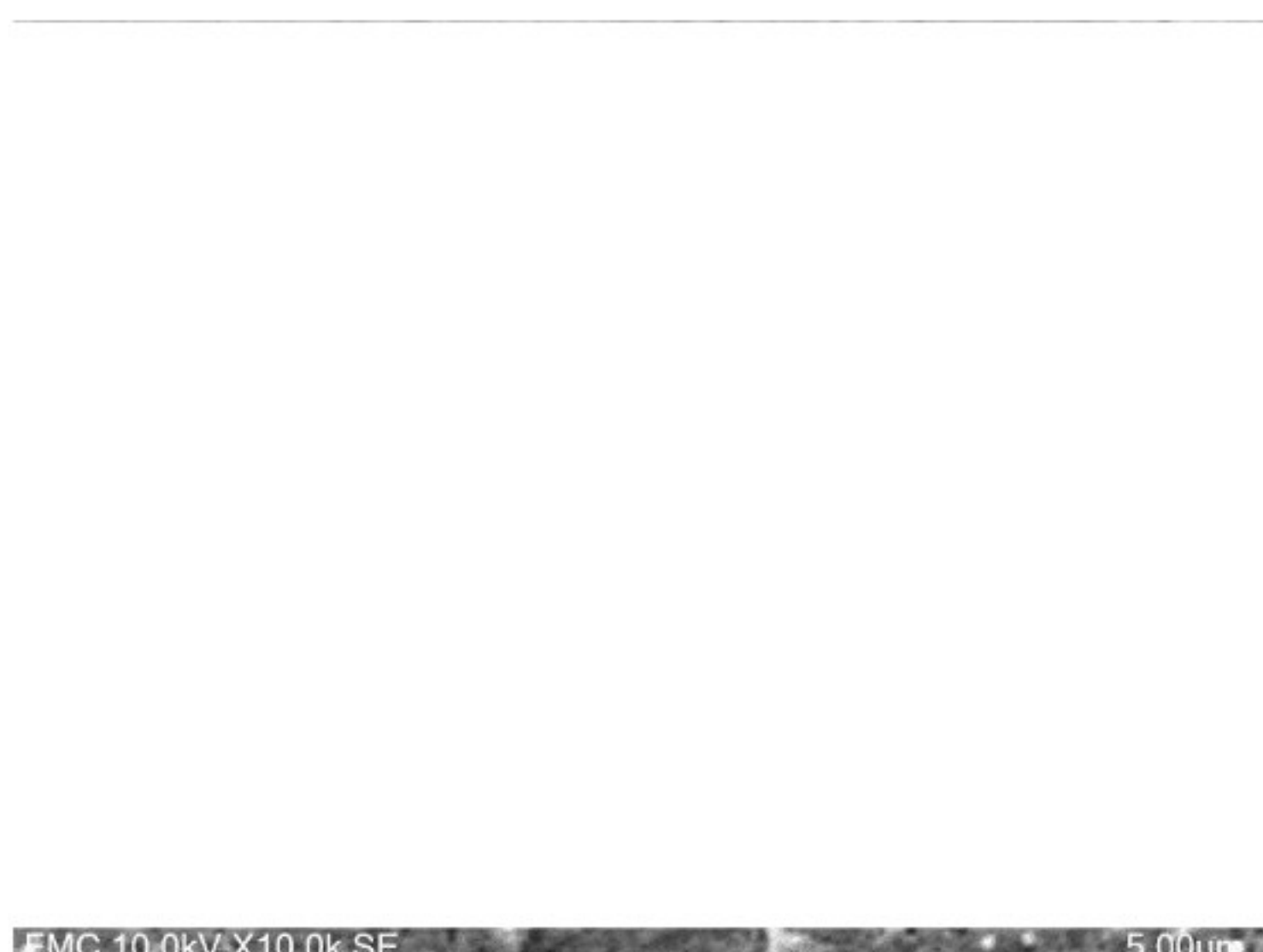
Dezvoltarea unor noi materiale sensibile

Pentru realizarea unor noi biosenzori pentru analiza biomarkerilor din probele de ulei de măsline s-au folosit electrozi serigrafiați pe bază de carbon (SPCE), oxid de staniu și zinc (ITO), aur (Au) și platină (Pt).

Acești electrozi serigrafiați au fost folosiți ca suport pentru imobilizarea unor nanomateriale pentru creșterea sensibilității și selectivității senzorilor electrochimici. De asemenea, acești senzori au fost folosiți pentru modificarea cu enzime, cu scopul creșterii sensibilității și selectivității. Nanomaterialulele folosite au fost nanotuburi de carbon funcționalizate cu grupări carboxil sau amido cu scopul de favoriza interacțiunile dintre enzimă și matricea de imobilizare, fără a fi necesară și etapa de reticulare. De asemenea, s-au utilizat nanofibre de carbon și grafen funcționalizat cu grupări hidroxil. Caracterizarea materialelor sensibile s-a realizat prin microscopie electronică de scanare și microscopie de forță atomică. O parte dintre rezultatele obținute se prezintă în continuare (Figura 9 și Figura 10).



a) Imaginea SEM a electrodului serigrafat de carbon modificați cu nanofibre de carbon

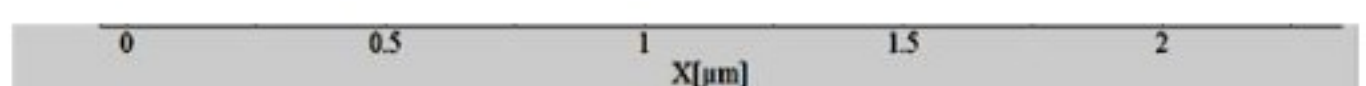


b) Imaginea SEM a electrodului serigrafat de carbon modificat cu nanotuburi de carbon și tirosinază

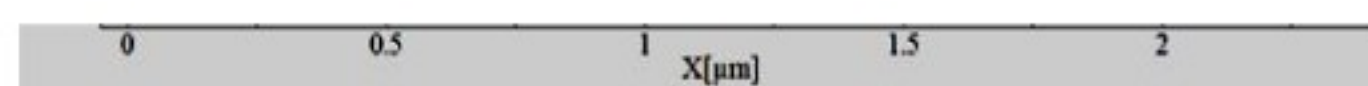
c) Imaginea SEM a electrodului serigrafat de carbon modificat cu puncte cuantice core-shell de ZnS/CdSe

d) Imaginea SEM a electrodului serigrafat de carbon modificat cu grafen și nanoparticule de aur

Figura 9. Imaginile SEM ale elementului sensibil



a) Imaginea AFM a unui strat sensibil ce conține ftalocianină de cobalt depus pe un suport de mică



b) Imaginea AFM a unui strat sensibil ce conține ftalocianină de cobalt și lacază depus pe un suport de mică

Figura 10. Imaginile AFM ale elementului sensibil

Sinteza polimerilor conductori și a polimerilor imprimați molecular

Pentru a realiza noi senzori electrochimici s-a realizat depunerea unor polimeri organici electroconductori folosind monomeri derivați de la tiofen (3,4-etilenedioxitiofen (EDOT),

hidroximetil-EDOT) și în prezența unor diferiți anioni dopanți (hexacianoferat (II) de potasiu, perclorat de litiu, perclorat de potasiu, Prussian Blue), unii dintre aceștia cu dublu rol, atât de agenți dopanți cât și de mediatori ai schimbului de electroni, process care are loc în timpul detecției electrochimice.

Astfel, s-au obținut senzori electrochimici inovatori pe bază de polimeri conductori dopați cu diferiți anioni (unii dintre aceștia cu proprietăți electrocatalitice sau de mediatori ai schimbului de electroni) care pot detecta cu succes markeri din uleiul de măsline. Pentru sinteza polimerilor imprimați molecular s-au folosit o serie de monomeri comerciali funcționalizați (pirol, acid acrilic, acid metacrilic), agenți dopanți și moleculele țintă (oleuropeină, tirosol, hidroxitirosol, verbacosid) După sinteză, moleculele șablon s-au eliminat prin tratare cu solvenții corespunzători eliberându-se situsurile active.

S-au obținut senzori electrochimici pe bază de polimeri imprimați molecular cu biomarkeri din uleiul de măsline, care pot fi folosiți cu succes pentru detectarea adaosurilor de alte uleiuri. O atenție deosebită a fost acordată trigonelinei, care se găsește în mai multe uleiuri vegetale dar nu se găsește în uleiul de măsline. S-au realizat polimeri imprimați molecular cu trigonelină care s-au folosit cu succes în determinarea uleiurilor adăugate în uleiurile de măsline.

Rezultatele obținute în Activitatea 1.2 sunt foarte bune și promițătoare, activitățile specifice propuse pentru acest an s-au realizat 100% și obiectivele pentru această etapă fiind îndeplinite în totalitate.

Activitatea 1.2 Dezvoltarea unei platforme multi-senzori. Caracterizarea biosenzorilor față de markeri Dezvoltarea de rețele multi-biosensing pentru analiza markerilor din uleiul de măsline

Dezvoltarea unei platforme multi-senzor

În proiect s-au desfășurat o serie de activități pentru realizarea unui sistem modular multisenzor, care să includă mai multe posibilități de măsurare folosind tehnici de detecție diferite: amperometrie, voltametrie, potentiometrie și conductometrie. De asemenea, s-a studiat modalitatea de integrare și măsurare simultană cu biosenzori colorimetrici folosind spectrometria în UV sau Vis.

S-a evaluat posibilitatea de a realiza măsurătorile simultan sau succesiv, care trebuie să fie design-ul celulei electrochimice, ce cantitate de probă este necesară pentru realizarea măsurătorilor.

Concluziile preliminare au fost că mai fezabilă este utilizarea doar a metodelor electrochimice. Se va studia dacă biosenzorii optici au un rol important în determinarea markerilor din uleiurile de măsline, care să justifice design-ul experimental mai complicat și utilizarea a două echipamente pentru control, măsurare și achiziția datelor experimentale.

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 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 hidroxitirosolului cu 3 noi biosenzori pe bază de ftalocianină de lutețiu și tirosinază, peroxidază sau lacază.

Rolul mediatorului schimbului de electroni la detecția electrochimică a hidroxitirosolului a fost evidențiat prin înregistrarea voltamogramelor ciclice într-o soluție 10^{-4} M hidroxitirosol și 10^{-1} M KCl, prezentate în Figura 11.

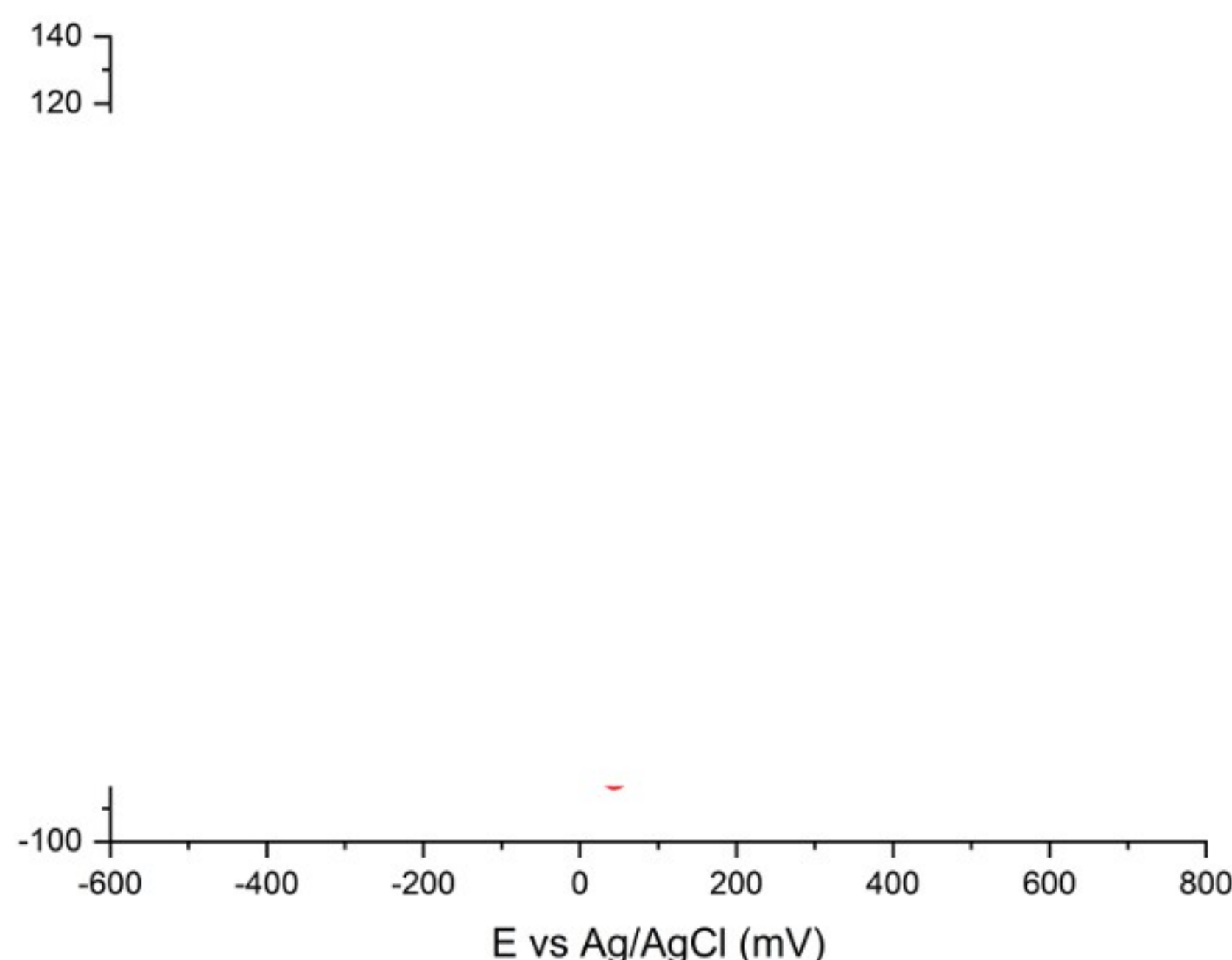
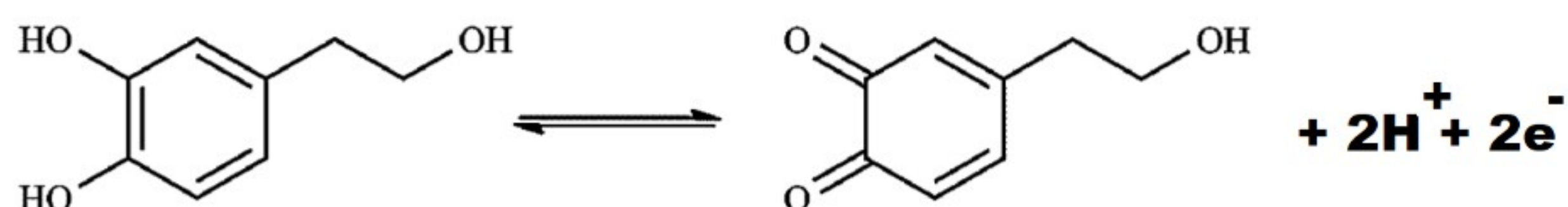


Figura 11. Voltamogramele ciclice ale biosenzorilor în soluție 10^{-4} M hidroxitirozol și 10^{-1} M KCl

Este evident că sensibilitatea biosenzorului crește foarte mult datorită efectului de mediator al LuPc₂, care facilitează transferul de electroni dintre reacția redox a hidroxitirozolului și suprafața sensibilă a biosenzorului. Mecanismul reacției redox cvasireversibile a hidroxitirozolului este prezentat în schema următoare și presupune scimbura a 2 electroni și doi protoni.



Pentru determinarea cât mai sensibilă a hidroxitirozolului s-au optimizat condițiile experimentale, pH-ul soluției de analizat, soluția tampon și tăria ionică, temperatura etc. Pentru determinarea sensibilității biosenzorului s-a realizat curba de etalonare prin înregistrarea voltamogramelor ciclice în soluție de hidroxitirozol de diferite concentrații, în domeniul 2-200 μM . Voltamogramele ciclice obținute se prezintă în Figura 12.



D
cc
(f

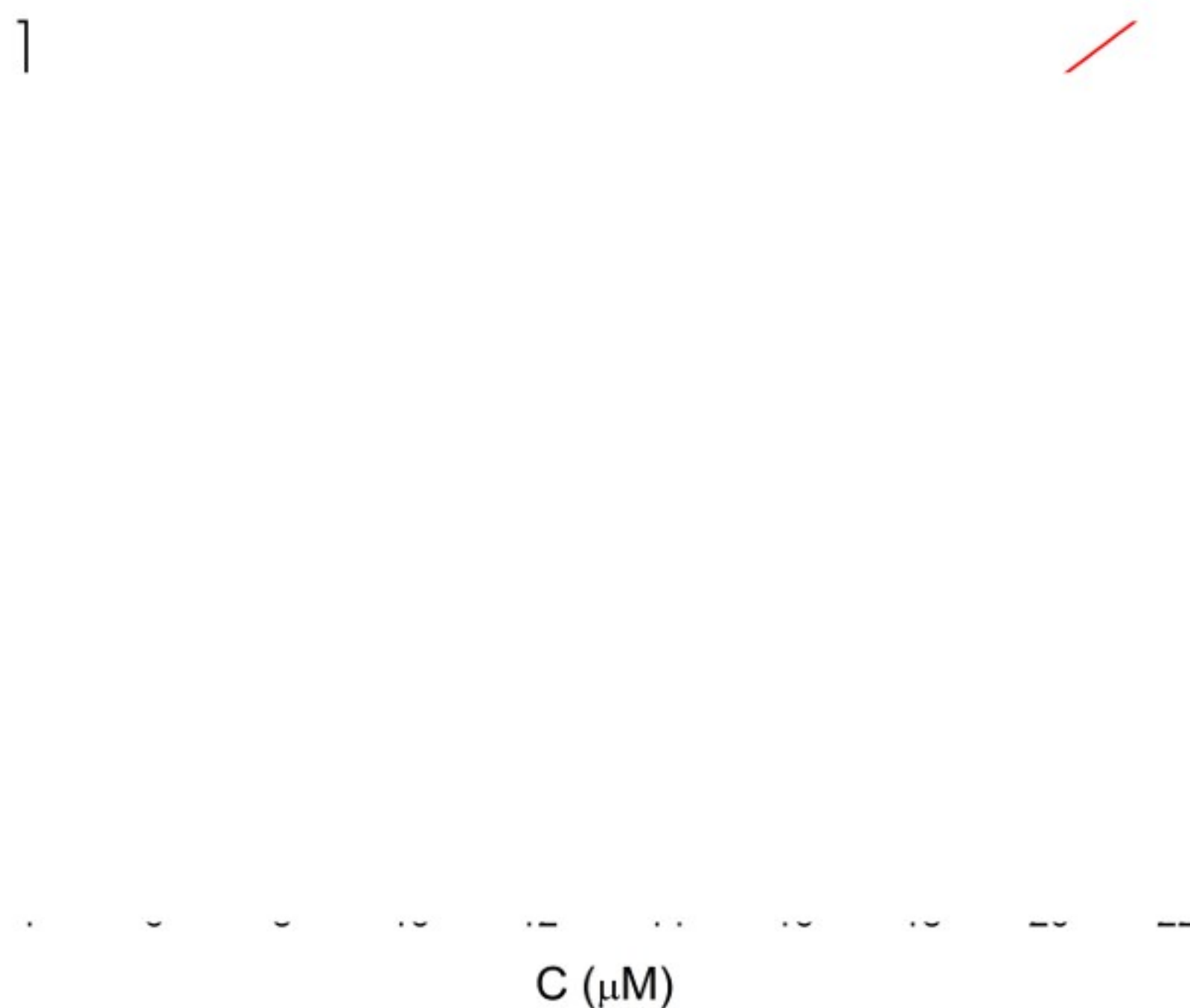


Figura 13. Dreapta de calibrare corespunzătoare picului anodic pentru hidroxitirosol

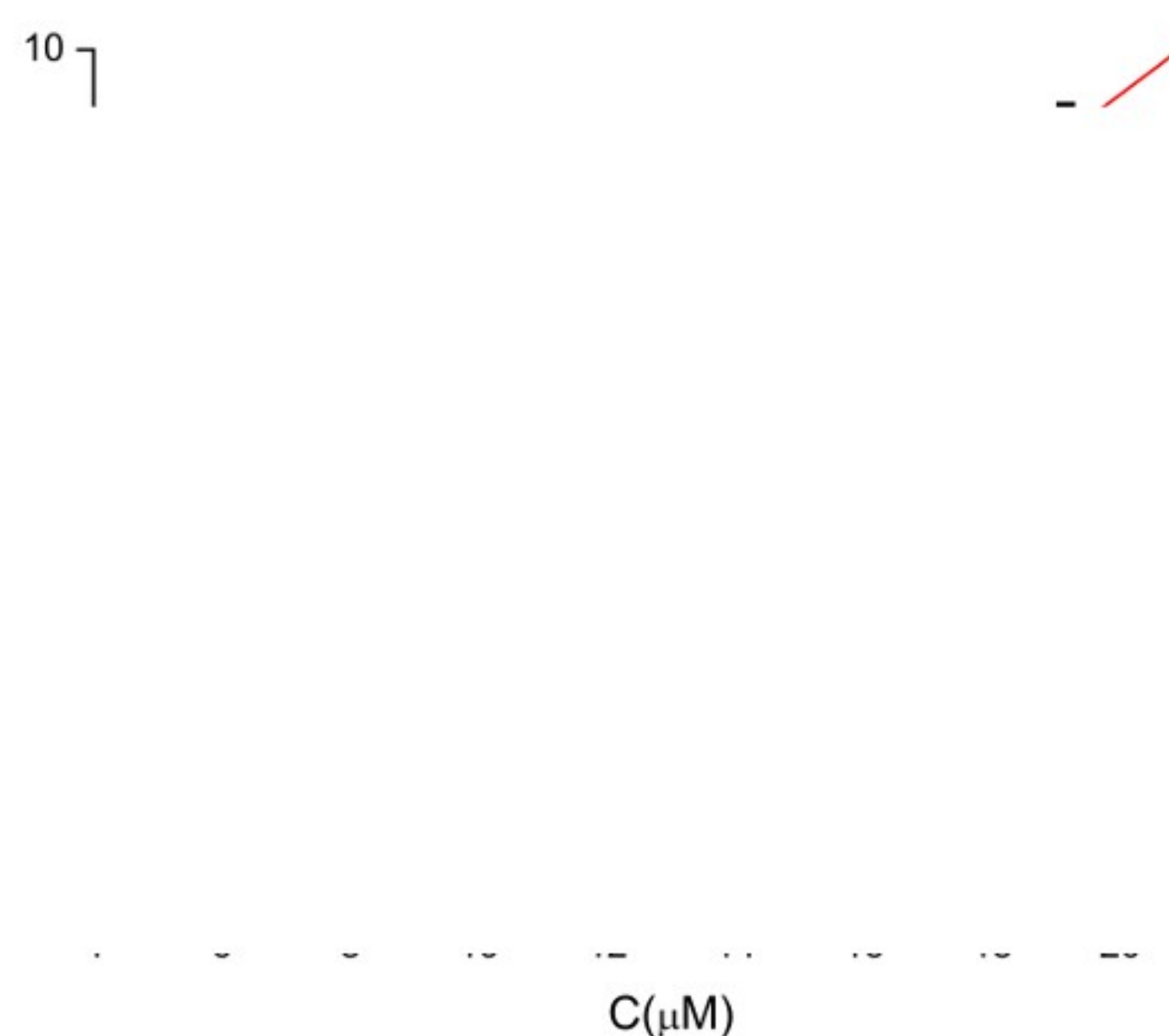


Figura 14. Dreapta de calibrare corespunzătoare picului catodic pentru hidroxitirosol
Pentru ambele picuri s-au obținut valori bune ale limitei de detecție, 1,36 μM pentru procesul catodic și 2,38 μM pentru picul anodic.

S-a determinat că cinetica procesului catodic, care corespunde reducerii derivatului ortochinonic al hidroxitirosolului format în reacția enzimatică, este de tip Michaelis-Menten

$$I = \frac{I_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M^{app} + [S]}$$

Constanta Michaelis Menten aparentă și viteza maximă a reacției se calculează din ecuația Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{I} = \frac{K_M^{app}}{I_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{I_{m\acute{a}x}}$$

folosind datele de la calibrare (figura 15).



Figura 15. Reprezentarea ecuației Lineweaver-Burk corespunzătoare picului anodic

Rezultatele obținute, K_M ($66,77\mu M$) și I_{max} ($24,22\mu A$) demonstrează că enzima imobilizată în biosenzor își păstrează activitatea, are o afinitate bună față de substrat și prin urmare biosenzorul are o sensibilitate foarte bună.

Rezultatele obținute pentru cei trei biosenzori din acest studiu sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3. Datele de sensibilitate ale biosenzorilor și parametrii cineticii enzimatică

Enzima	Picul de oxidare		Picul de reducere		Parametrii Michaelis-Menten	
	E (V)	LOD (μM)	E (V)	LOD (μM)	K_M (μM)	I_{max} (μA)
Tiro						
Perc						
Lac						

Biosenzorul cu performanțele analitice cele mai bune a fost utilizat pentru determinarea tirosolului și acidului cafeic din probe de ulei de măsline rafinat, virgin și extravirgin. Procedul de extracție a compușilor fenolici este prezentat în schema de mai jos:

Centrifugare

În condiții optimizate, 5 mL de standarde de hexan sau probe de ulei (1 sau 0,150 g în funcție de ulei) diluate la 5 mL cu hexan au fost introduse în eprubete. Apoi, s-au adăugat 100 μ L de soluție apoasă de HCl 1 M și amestecul a fost agitat timp de 2 minute folosind un agitator vortex. Apoi, fazele au fost separate prin centrifugare timp de 10 minute la 4000 rpm. Faza organică superioară a fost îndepărtată cu atenție cu o pipetă, iar faza apoasă acidă rămasă (adică, 40 μ L) a fost extrasă cu o seringă pentru analiza finală prin voltametrie ciclică folosind biosenzorul pe bază de ftalocianină de lutețiu și lacază. Rezultatele obținute se prezintă în Tabelul 4.

Tabelul 4. Determinarea acidului cafeic și tirosolului în uleiuri de măsline

	Acid cafeic	Tirosol
Proba	(	
ROO		
VOO		
EVOO		

^a Abaterea standard a trei analize replicate.

^b Coeficientul de variație este prezentat între paranteze.

Biosenzorii pe bază de ftalocianine și enzime s-au dovedit a fi adecvați pentru construirea rețelei de biosenzori pentru determinarea falsificării uleiurilor de măsline. Biosenzorii care vor constitui rețeaua de biosenzori pentru determinarea falsificării uleiurilor se va finaliza în anul al doilea de implementare, când se termină etapa de lucru și se va realiza livrabila prevăzută în planul de implementare general al proiectului.

Dezvoltarea unor rețele de biosenzori pentru analiza markerilor din uleiul de măsline

Pentru realizarea rețelei de biosenzori și integrarea biosenzorilor cu cele mai bune performanțe analitice s-au realizat o serie de design-uri experimentale care pot permite analiza simultană sau secvențială în aceeași probă de analizat cu cantități de probă mai mari sau mai mici. Un exemplu este prezenta în schema următoare.



Rețeaua cu 8 biosenzori
diferiți

Celula electrochimică

Multiplexor pentru măsurare
secvențială

Electrodul de referință și cel auxiliar vor fi integrați în același dispozitiv sau vor fi electrozi exteriori. Acest lucru se va decide în funcție de setup-ul experimental.

Activitatea realizată a fost laborioasă, s-au îndeplinit în totalitate obiectivele propuse în această etapă.

Activitățile specifice prevăzute în activitatea A1.2 au fost realizate în totalitate, iar gradul de îndeplinire al obiectivelor este de 100% pentru acest an de implementare al proiectului.

Activitatea 1.3 Dezvoltarea de modele inteligente și aplicarea acestora în analiza datelor

În această activitate au fost aplicate diverse 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- pomace, sansa), 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. S-au preparat 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 controlate.

Indiferent de natura datelor experimentale (spectrele în domeniul UV sau în domeniul Vis, spectrele FTIR, cromatograme, voltamograme ciclice, voltamograme de undă pătrată etc.) s-au abordat două strategii.

Prima metodă de analiză a constatat în analiza datelor experimentale, obținute ca atare cu ajutorul programelor care controlează echipamentele. În acest caz datele experimentale au fost exportate în formate compatibile cu programele Excel, Origin sau Matlab (.xls, .txt, .ascii, .dat). Apoi datele corespunzătoare variabilei determinate și caracteristică pentru proba analizată (absorbanță, intensitate, current) au fost aranjate sub forma unor matrici de tipul celei prezentate în Tabelul 5.

Tabelul 5. Structura matricii de intrare pentru aplicarea metodelor de analiză a datelor multivariante

	Variabila 1	Variabila 2	...	Variabila n
Proba				
Proba				

...					
Prot					

Această abordare este realizabilă cu dotările laboratorului și unele probleme au fost întâmpinate în momentul în care matricile au trebuit să fie transpuse pentru ca datele să aibă structura prezentată în tabelul 5. Problema a putut fi rezolvată folosind programele Matlab sau The Unscrambler, care au un număr suficient de mare de linii și coloane pentru a se putea realiza transpunerea matricii de intrare.

O altă metodă de realizare a matricii de date de intrare pentru analizele multivariante au presupus etape de pre-procesare a datelor. S-au folosit mai multe metode cum sunt:

- selectarea variabilelor relevante cu ajutorul algoritmilor genetici, implementată în Matlab
- calcularea coordonatelor de culoare în cazul spectrelor Vis
- aplicarea metodei Kernel pentru reducerea datelor voltametrice la un număr mic (de exemplu 10) prin calcularea integralelor pentru în diferite domenii de potential

Datele de intrare au fost analizate inițial prin diferite metode exploratorii cum sunt Analiza Componentelor Principale și Analiza Factorială Liniară.

În continuare se prezintă ca exemplu un studiu realizat pentru a se vedea eficiența metodei de pre-procesare a datelor de intrare. Au fost utilizați 6 biosenzori pe baza de lacaza, tirozinază și peroxidază și cu mediatori ferocen, Prussian Blue și ftalocianină de mangan și s-au analizat două grupuri de uleiuri, unele pure și celelalte falsificate.

În figurile 16, 17 și 18 se prezintă sub formă grafică matricea de intrare inițială și preprocesată prin metoda Kernel sau algoritmi genetici.

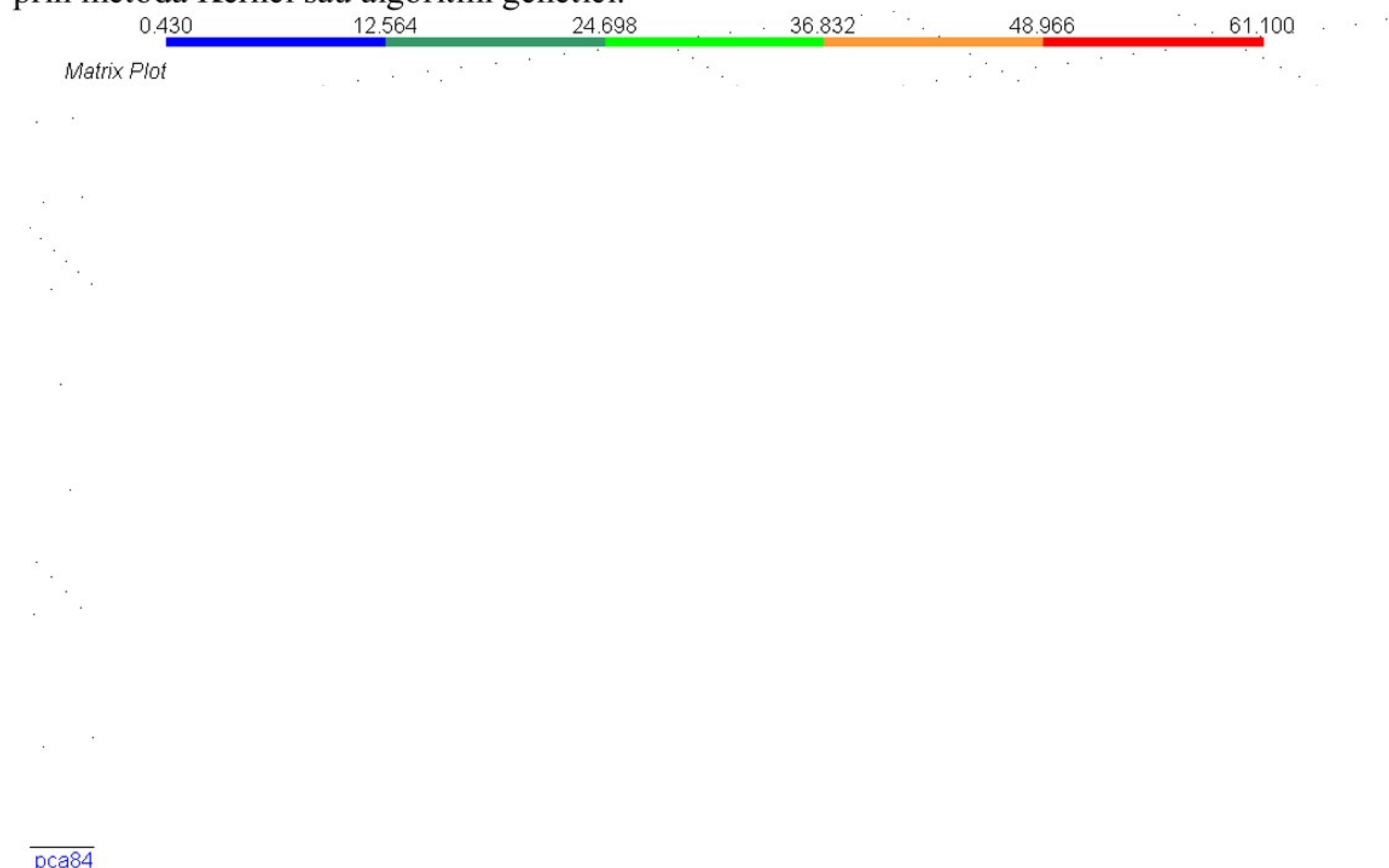


Figura 16. Prezentarea grafică a matricii de date neprocesate

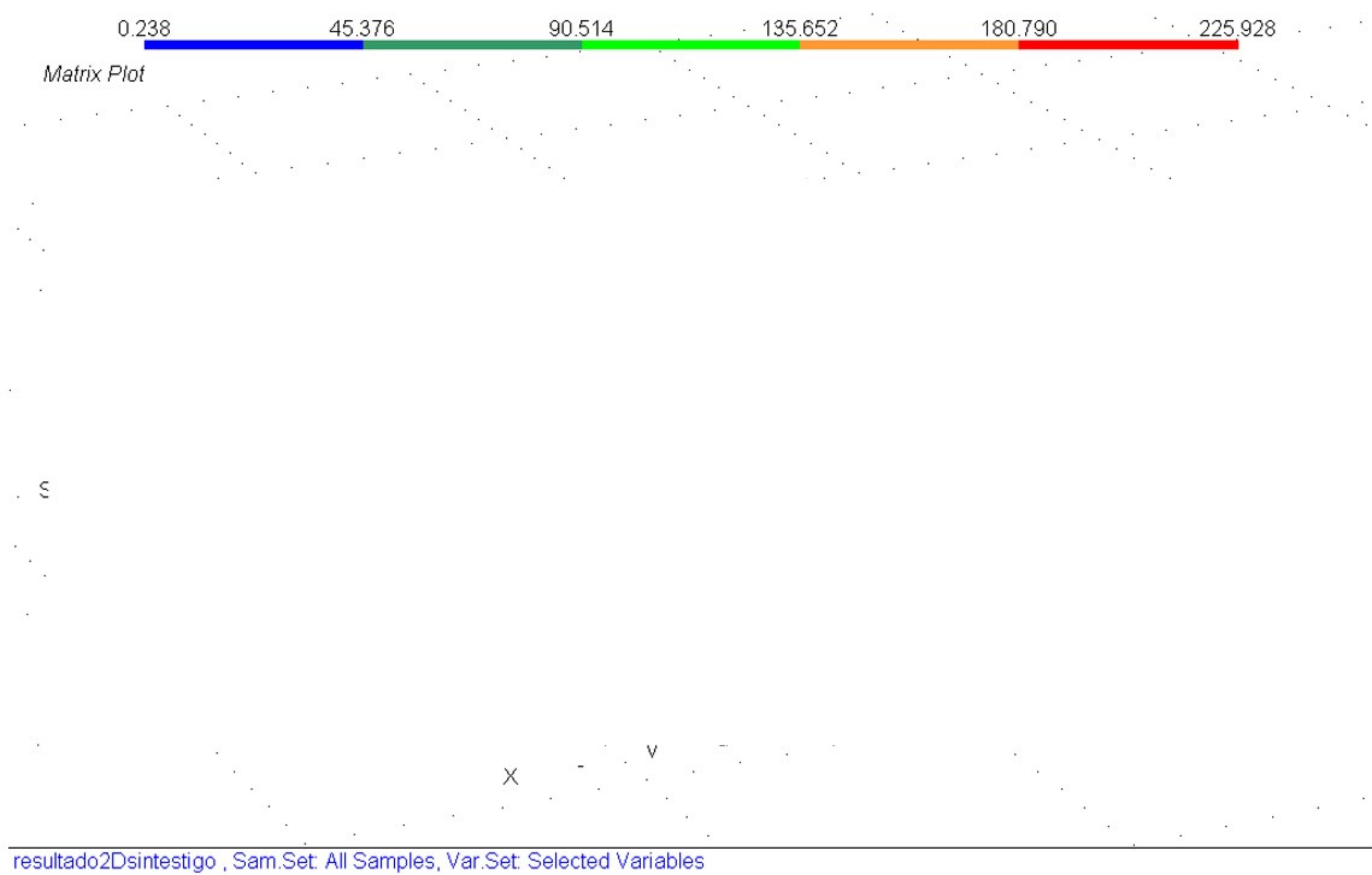


Figura 17. Prezentarea grafică a matricii de date procesate prin metoda Kernel

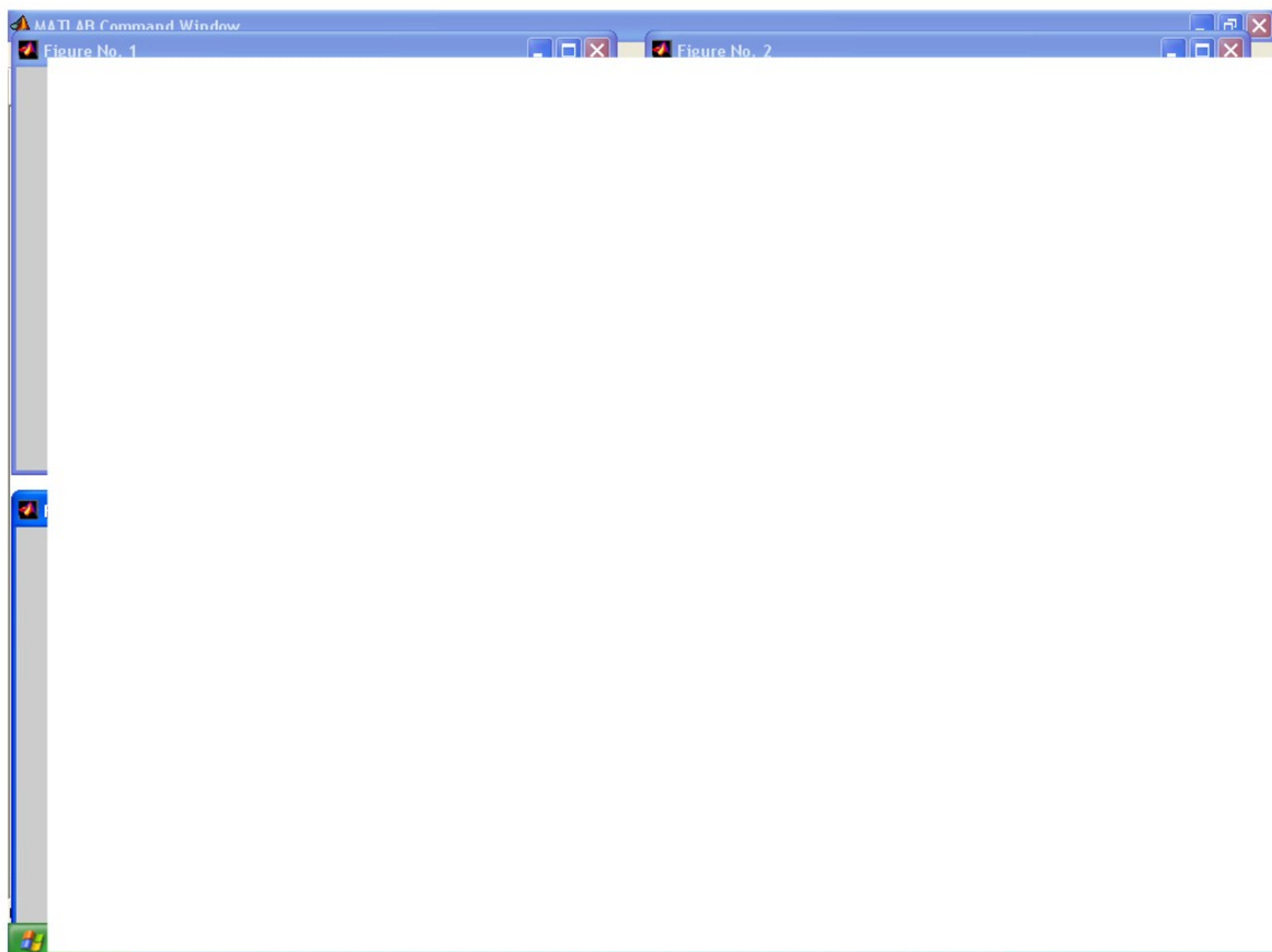


Figura 18. Aplicarea algoritmilor genetici pentru selectarea variabilelor relevante pentru clasificarea probelor de analizat

Rezultatele obținute prin aplicarea Analizei componentelor principale datelor originale și pre-procesate sunt prezentate sub forma graficelor scores (realizate în Matlab sau The

Unscrambler) în Figurile 19, 20 și 21. Cele două tipuri de probe sunt 1 – uleiuri falsificate și 2 – uleiuri pure.

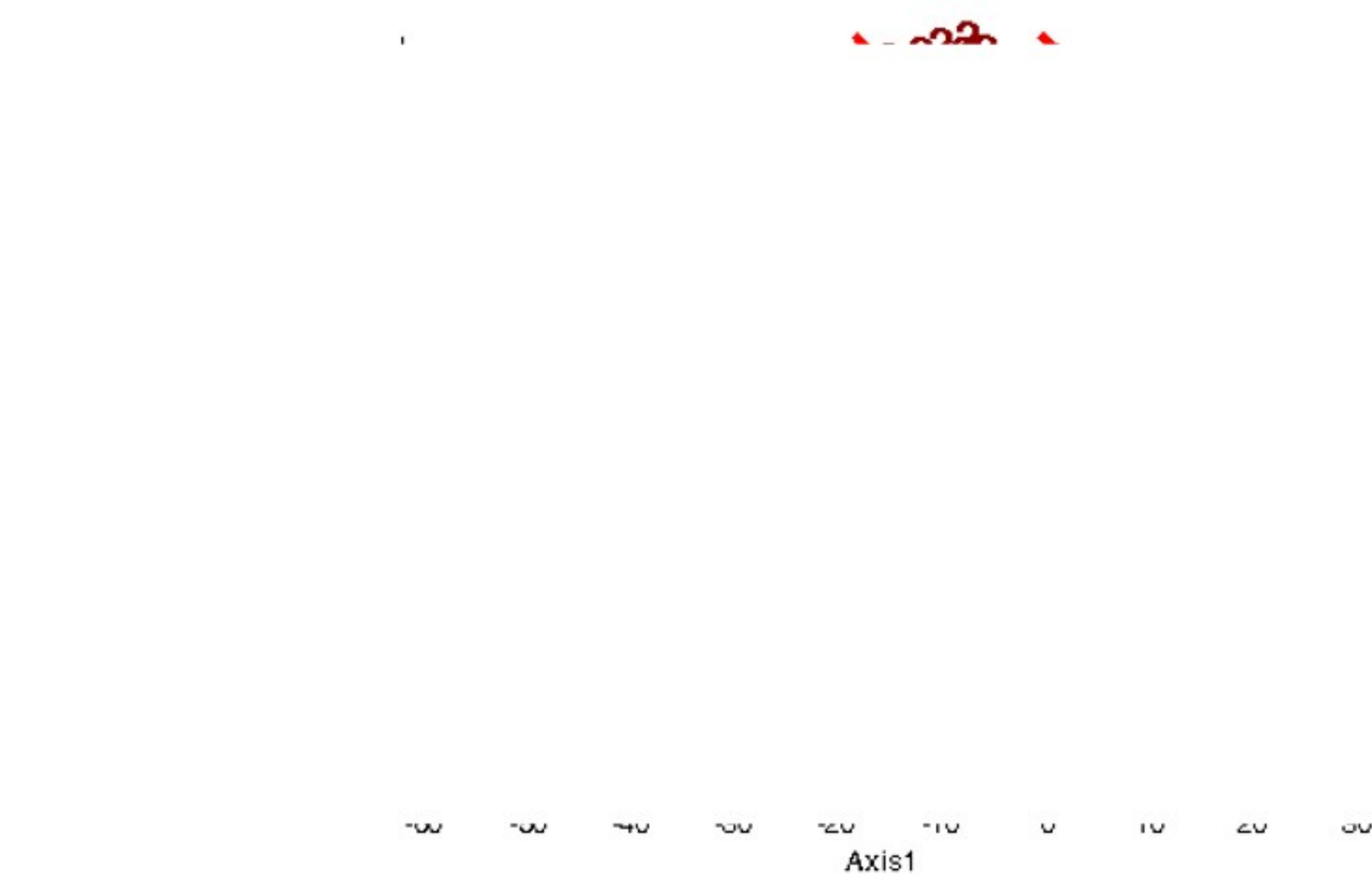


Figura 19. Graficul scores al PCA folosind voltamogramele de undă pătrată în totalitatea lor

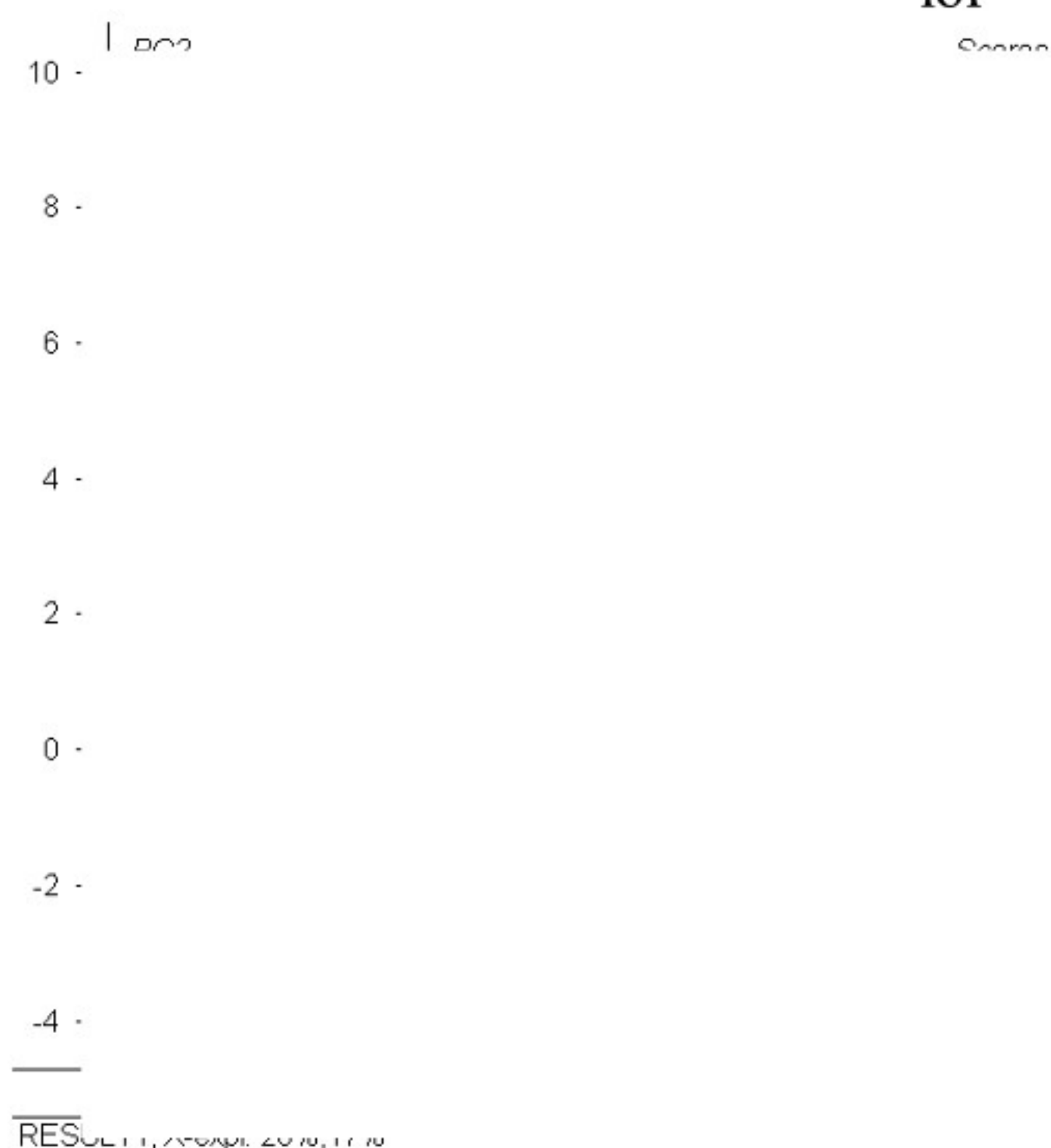


Figura 20. Graficul scores al PCA folosind metoda Kernel de pre-procesare a datelor voltametrice



Figura 21. Graficul scores al PCA folosind cele 160 de variabile reprezentative rezultate din aplicarea algoritmilor genetici

Se observă că cele mai bune rezultate se obțin atunci când se folosesc algoritmi genetici pentru selectarea variabilelor reprezentative.

Pentru clasificarea probelor și construirea modelelor de conformitate s-au folosit Analiza Discriminantă rezolvată prin metoda celor mai mici pătrate parțiale (PLS-DA) și SIMCA (Soft independent modelling of class analogies). De asemenea, s-au realizat modele de clasificare pe baza unor rețele neuronale artificiale. Un astfel de studiu a inclus analiza a trei tipuri de uleiuri de măsline clasificate în funcție de conținutul de polifenoli. Rezultatele PLS-DA se prezintă în Figura 22 și Tabelul 6.

Figura 22. Clasificarea probelor de ulei în funcție de conținutul de compuși polifenolici

Tabelul 6. Datele cantitative rezultate din PLS-DA

Tipul	
U1	
U2	
U3	

Se observă că se obține o clasificare foarte bună a uleiurilor de măsline în funcție de conținutul polifenolic cu coeficienți de corelație mai mari decât 0,95 atât la calibrare cât și la validare și erori RMSEC și RMSEP foarte mici.

O altă direcție de cercetare a presupus combinarea diferitelor tipuri de date, spectrale, electrochimice și cromatografice, cu scopul discriminării și clasificării probelor de ulei de măsline. S-a evaluat dacă fuziunea datelor experimentale crește capacitatea de clasificare a sistemului. În general, creșterea cantității de informație crește puterea de clasificare a sistemului analitic.

Pentru stabilirea corelațiilor dintre diferitele tipuri de date, care pot fi folosite pentru cuantificarea (prezicerea) proprietăților antioxidante (sub forma de conținut total de polifenoli sau capacitatea de captare a radicalilor liberi) dar și a concentrației unor biomarkeri reprezentativi pentru uleiurile de măsline.

Valorile prezise au fost comparate cu cele obținute experimental (figura 23).

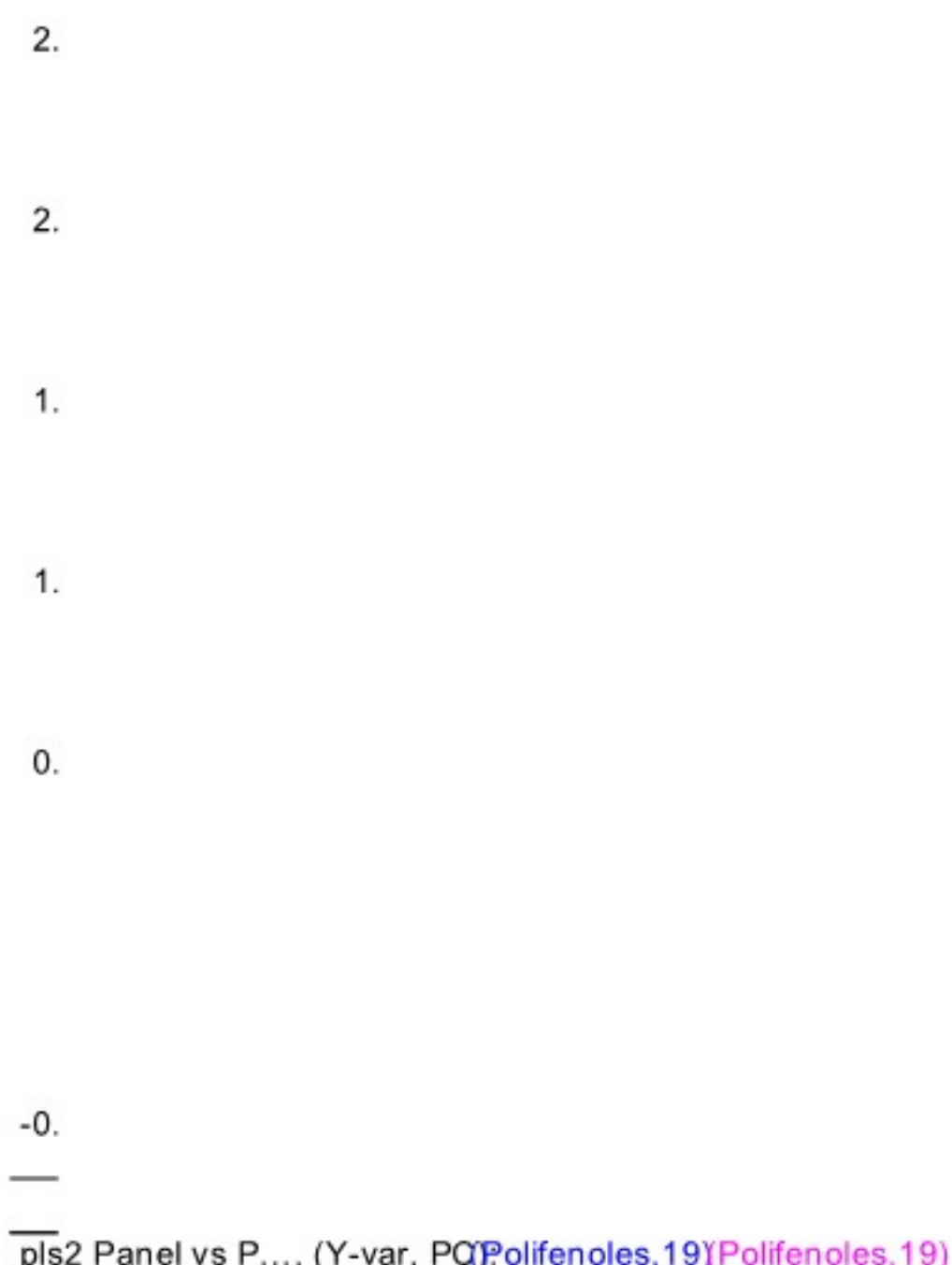


Figura 23. Graficul corelației dintre valoarea estimată a conținutului de polifenoli totali cu biosenzorii și valoarea determinată prin metoda Folin-Ciocalteu

S-au obținut corelații foarte bune între valorile cantitative determinate cu biosenzorii electrochimici și cele obținute prin tehnici standard de analiză.

În activitatea A1.3, activitățile specifice au fost realizate integral (100%), astfel fiind selectate metodele optime de analiză care vor fi finalizate până la terminarea integrală a activității și realizarea livrabilei finale pentru această activitate.

Activitatea 1.4 - Participarea la conferințe, publicarea în reviste ISI, cerere de brevet

Pentru acest proiect am realizat o pagină web care este actualizată periodic și care conține informațiile relevante privind progresul în implementarea proiectului. Adresa este: www.busdoa.ugal.ro

O parte dintre rezultatele obținute de către membrii echipei în perioada raportată au fost publicate în reviste științifice din banda roșie (cuartila Q1 a domeniului) sau au fost prezentate la conferințe internaționale. Acestea cuprind rezultate din majoritatea activităților specifice realizate în acest an de implementare al proiectului, cealaltă parte a rezultatelor obținute fiind în curs de redactare în vederea publicării în reviste ISI și a unei cereri de brevet.

Articole ISI:

1. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 3380. IF 5,923. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
2. Bounegru AV, Apetrei C. Laccase and Tyrosinase Biosensors Used in the Determination of Hydroxycinnamic Acids. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(9):4811. IF 5,923. <https://doi.org/10.3390/ijms22094811>
3. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Evaluation of Olive Oil Quality with Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 12708. IF 5,923. <https://doi.org/10.3390/ijms222312708>

Participarea la conferințe internaționale

1. Constantin Apetrei, Alexandra Virginia Bounegru, Irina Georgiana Munteanu, Irina Mirela Apetrei. Electrochemical sensors and biosensors based on polypyrrole for detection of phenolic compounds in olive oils. Scientific Conference of Doctoral Schools CDS-UDJG

2021, The Ninth Edition, Galați, 10th and 11th of June 2021, Oral, Abstract published in Abstract Book p. 117

2. C. Apetrei, I.M. Apetrei. Detection of Olive Oil Adulteration Using Electrochemical Sensors and Biosensors. XXVIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Online, 9-13 May, 2021, Cluj-Napoca, Romania. Abstract published in Abstract Book, S2-O-15, page 97, Oral presentation.

3. Alexandra Virginia Meresescu (Bounegru), Constantin Apetrei. Development of novel biosensor for the detection of p-coumaric acid in phenolic extracts from virgin olive oils. Biosensors 2021, The 31st Anniversary World Congress on Biosensors, 26-29 July 2021, poster, P1.008

4. C. Apetrei, A. V. Bounegru, I.G. Munteanu, I.M. Apetrei. Development of a sensitive method for the voltammetric detection of phenolic compounds in extra virgin olive oils. CSAC2021: 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry, session Electrochemical Devices and Sensors, 1st–15th July 2021, poster, sciforum-046141

Rezultatele etapei 1 au fost diseminate prin prezentarea orală la 4 conferințe internaționale de prestigiu și publicarea a 3 articole ISI în reviste științifice de prim nivel din zona roșie (Q1). Activitatea de diseminare prevăzută pentru acest an a fost realizată 100%.

Activitatea 1.5 - Activități de achiziție. Elaborarea rapoartelor științifice

Activitățile de achiziție s-au realizat în condiții bune, cu toate că au exista probleme cu furnizarea unor materiale datorită întârzierii livrărilor internaționale. Raportul științific anual a fost întocmit în conformitate cu cerințele Contractorului și este afișat pe pagina web a proiectului, în limba română și limba engleză.

Activitatea de achiziție a cuprins toate procesele, începând de la oferte, caiete sarcini, evaluarea ofertelor tehnice, până la recepția materialelor, echipamentelor, substanțelor chimice, probelor de ulei, etc. prevăzute în planul de implementare al proiectului și care au asigurat realizarea activităților prevăzute în primul an de implementare al acestui proiect.

Raportul de activitate științifică pentru anul 2021 a fost realizat de către echipa de implementare în condițiile stipulate de UEFISCDI. Raportul, în limba română și în limba engleză se regăsește și pe site-ul proiectului.

În acest an de implementare al proiectului au fost realizate toate activitățile prevăzute în planul de implementare, obiectivele prevăzute s-au îndeplinit 100% și s-au obținut rezultate valoroase, parțial diseminate în reviste științifice și prezentate la conferințe internaționale.

Director Proiect,
Apetrei Constantin