

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

ȘCOALA DOCTORALĂ

CLUJ-NAPOCA 2015

TEZĂ DE ABILITARE

Electrozi modificați pentru designul senzorilor electrochimici cu aplicații în analiza farmaceutică, biomedicală și de mediu

Conferențiar Dr. **Victoria Cecilia Cristea**

CUPRINS

ABSTRACT	9
REZUMAT	15
A. REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE, PROFESIONALE ȘI ACADEMICE	19
1. REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE REFERITOARE LA COMPORTAMENTUL ELECTROCHIMIC AL UNOR MOLECULE ORGANICE	21
1.1. Introducere	21
1.2. Comportamentul electrochimic al nitrociclopropanului și a derivaților de nitrociclopropan	22
1.3. Studii spectroelectrochimice ale unor derivați de acridină	30
1.4. Voltametrie directă pentru detecția vitaminei B2 în mediu apos pe electrod de carbon vitros	36
1.5. Comportamentul electrochimic al unor anestezice locale	38
1.6. Concluzii	42
2. REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE ÎN DOMENIUL SENZORILOR PENTRU ANALIZA FARMACEUTICĂ	43
2.1. Introducere	43
2.2. Biosenzor cu polifenoloxidază pe bază de filme de polipirol pentru detecția fenolilor în mediu organic	46
2.3. Biosenzor pe bază de alcoxid de zirconiu pentru detecția acetaminofenului	48
2.4. Nanoargile utilizate pentru designul unui biosenzor pentru detecția acetaminofenului	53
2.5. Biosenzori pentru detecția glucozei, acetaminofenului și dopaminei	55
2.5.1. Biosenzori cu nanotuburi de carbon (CNT)	58
2.5.1.1. Detecția glucozei cu biosenzori pe bază de CNT înglobate în filme de polietilenimină	59
2.5.1.2. Studii pe electrozi modificați cu diferite tipuri de CNT	59
2.5.1.3. Detecția acetaminofenului cu un biosenzor pe bază de CNT înglobate în filme de polietilenimină	67
2.5.2. Biosenzori pe bază de grafene	71
2.5.2.1 Biosenzor pe bază de grafene/ β -ciclodextrină și tirozinază pentru detecția dopaminei	71
2.6. Concluzii	76
3. REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE ÎN DOMENIUL IMUNOSENZORILOR PENTRU ANALIZA BIOMEDICALĂ ȘI FARMACEUTICĂ	77
3.1. Introducere	77
3.2. Exemple de imunosenzori pentru detecția biomarkerilor tumorali de tip mucină	79
3.2.1. Imunosenzor electrochimic de tip sandwich pentru detecția MUC1	81
3.2.2. Biodispozitiv optimizat pe bază de particule magnetice pentru detecția Muc1	85
3.2.3. Imunosenzor electrochimic bazat pe interacțiuni aptamer-proteină și polimeri funcționalizați pentru detecția MUC1	88
3.2.4. Aptasenzor nemarcat pentru MUC1 pe bază de nanoparticule de aur electrodeuse pe electrozi planari imprimați	94

3.3. Alți imunosenzori cu aplicații în analiza farmaceutică	97
3.3.1. Imunosenzori pe bază de particule magnetice modificate cu Proteina G pentru detecția selectivă a acetaminofenului	97
3.3.2. Imunosenzor pe bază de grafene oxidate activate pentru detecția acetaminofenului	100
3.4. Concluzii	106
4. REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE ÎN DOMENIUL SENZORILOR PENTRU ANALIZA DE MEDIU	107
4.1. Introducere	107
4.2. Detecția metalelor grele cu ajutorul electrozilor pe bază de pâslă de grafit ca atare și modificată	108
4.2.1. Electrozi pe bază de pâslă de grafit modificată cu derivați de tip aza oxo pentru detecția Pb^{2+}	111
4.2.2. Utilizarea unor săruri de aril diazoniu ca modificatori pentru electrozi pe bază de pâslă de grafit pentru detecția Cu^{2+}	115
4.2.3. Detecția Zn^{2+} pe electrozi pe bază de pâslă de grafit nemodificată	117
4.2.4. Detecția indirectă a Cu^{2+} pe GCE în prezența <i>N,N'</i> -bis(acetilaceton)etilen diiminei	118
4.3. Polimeri molecular imprimați utilizați pentru detecția unor poluanți	125
4.4. Concluzii	129
B. REALIZĂRI PROFESIONALE ȘI ACADEMICE	131
C. PLANUL DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ A CARIEREI ȘTIINȚIFICE, PROFESIONALE ȘI ACADEMICE	135
1. Planul de dezvoltare a carierei științifice	135
2. Planul de dezvoltare a carierei academice	138
REFERINȚE	139

REZUMAT

Prezenta teză de abilitare prezintă într-o manieră sintetică, cele mai importante rezultate ale cercetării științifice, profesionale și academice obținute de către autor după susținerea tezei de doctorat, pentru a dovedi calificarea acestuia pentru a obține atestatul de abilitare. Cea mai mare parte a cercetării științifice a fost realizată în domeniul chimiei analitice, în particular – utilizarea metodelor electroanalitice pentru caracterizarea unor molecule cu activitate farmacologică, precum și elaborarea de diverse configurații de senzori, biosenzori și imunosenzori pentru analiza farmaceutică, biomedicală și de mediu. Activitatea de cercetare a autorului a fost focalizată și pe înțelegerea mecanismelor electrochimice de reducere sau oxidare pentru numeroase molecule precum și pe dezvoltarea de nanoplatforme noi și inovative pentru elaborarea senzorilor.

Cele mai relevante rezultate obținute după susținerea tezei de doctorat sunt structurate în patru capitole principale.

Primul capitol cuprinde datele privind comportamentul electrochimic al mai multor compuși cu posibile aplicații farmacologice utilizând electrozi solizi. De exemplu, derivații de acridină au fost studiați ținând cont de utilizarea acestora ca și compuși bioactivi cu acțiune antimicrobiană și antiprotozoală. Studii recente au evidențiat capacitatea cromoforilor acridinici de a intercala ADN și de a inhiba enzima topoizomerază. Spectrul SERS al acridinei 9-substituită cu grupări CN și COOH a fost utilizat pentru elucidarea proprietăților vibraționale ale acestor compuși. A fost studiat de asemenea comportamentul electrochimic al acridinelor pe electrozi inerti (Pt) și s-a observat că transformarea redox decurge în mai multe etape. Și nitroderivați cum sunt nitrofenotiazinele și derivații de nitrociclopropan au fost studiați datorită posibilității de a fi utilizați în elaborarea senzorilor sau ca elemente de bază pentru sinteza unor biomolecule de importanță farmacologică. A fost investigat și comportamentul electrochimic al unor compuși farmaceutici cum sunt vitamina B₂ și anestezice locale pe electrozi de carbon vitros nemodificați.

În capitolul al doilea sunt prezentate rezultatele obținute la designul și optimizarea mai multor biosenzori. Conform definiției IUPAC, biosenzorul este un dispozitiv integrat de sine stătător capabil să furnizeze informații analitice specifice

cantitative sau semi-cantitative folosind un element de recunoaștere biologic (receptor biochimic) aflat în contact cu un traductor fizic. Un biosenzor electrochimic este alcătuit dintr-un traductor electrochimic care se bazează de fapt pe consumarea sau generarea speciilor electrochimic active în timpul procesului de bio-interacțiune cu producerea unui semnal electrochimic care poate fi apoi măsurat cu ajutorul unui detector electrochimic. Metodele electrochimice prezintă proprietăți superioare celorlalte tipuri de sisteme de măsură datorită rapidității, simplității și sensibilității ridicate.

Electrozii modificați chimic au devenit o temă de cercetare exploatată intens în ultimele decade, cu numeroase posibile aplicații cum este protecția anticorozivă, electrocataliza și senzorială. Ținând cont de performanțele analitice, metodele electrochimice și senzorii electrochimici nu prezintă selectivitate ridicată. Modificarea suprafețelor electrodeice a fost realizată chiar cu scopul creșterii selectivității metodelor și senzorilor electrochimici. Principalul avantaj al electrozilor comparativ cu alte metode analitice este ușurința cu care pot fi modificați cu ajutorul metodelor fizice, chimice sau electrochimice.

În general se utilizează trei tipuri de procedee pentru modificarea suprafețelor electrodeice: adsorbția; modificarea covalentă; modificarea cu film polimeric. Este posibilă și adesea utilizată combinarea acestor metode.

După o scurtă introducere despre senzori/biosenzori, sunt prezentate câteva exemple dezvoltate pe diferite platforme de imobilizare. Polimerii conductori cum sunt polipirolul și polietilenimina au fost utilizați în numeroase studii pentru imobilizarea biomoleculilor (tirozinază, glucozoxidază, peroxidază din rădăcină de hrean) la suprafața unei mari varietăți de traductori. Pentru îmbunătățirea proprietăților traductorilor utilizați în mod curent au fost imobilizate la suprafața acestora și nanoelemente, cum sunt: nanotuburile de carbon (uni și multistrat), grafene, nanoargile sau alcoxizi metalici, care au determinat atât creșterea sensibilității cât și a selectivității (bio)senzorilor obținuți.

Capitolul trei prezintă direcția de cercetare actuală: designul și optimizarea unor imunosenzori pentru aplicații biomedicale.

Incidența cancerului a crescut dramatic în ultimele decenii, mai ales în țările dezvoltate. În ciuda faptului că metodele imunochimice permit diagnosticul în stadii incipiente, biopsiile sunt în general metode invazive care crează disconfort pacienților. Astfel, necesitatea dezvoltării unor dispozitive de analiză, rapide, sensibile, ușor de

utilizat și non-invasive sau minim invazive este o temă de actualitate în multe grupuri de cercetare din întreaga lume.

În ultimul deceniu, în cercetarea imunologică au fost identificate mai multe molecule cu implicare potențială în mecanismele biologice binecunoscute care sunt afectate de cancer. Acești noi biomarkeri prezintă diferențe evidente comparativ cu markerii tumorali clasici. În timp ce aceștia din urmă au fost descoperiți datorită supra exprimării lor predominante în cancer și sunt astfel indicatori pentru extinderea tumorilor, în cazul biomarkerilor noi au fost descoperiți datorită influenței asupra mecanismelor biologice cunoscute care au loc în celulele canceroase și care pot fi astfel asociate cu comportamentul malignităților (ex., agresivitate, exprimarea pe căi metabolice). Vor fi discutate patru tipuri de imunosenzori pentru detecția proteinei Mucină 1 (MUC1). Glicoproteine din familia Mucinelor au fost utilizate pentru dezvoltarea unor teste pentru detecția cancerului de sân și ovarian.

Toți imunosenzorii elaborați prezintă limite de detecție bune și specificitate remarcabilă pentru MUC1. Imunosenzorii au fost testați pe probe de ser reconstituit și pe probe reale (probe de ser de la pacienți cu cancer de sân și ovarian).

Este de la sine înțeles că cercetările efectuate în acest domeniu dinamic implică și utilizarea unor biomarkeri care nu sunt încă disponibili comercial. Direcția de cercetare actuală cuprinde și posibilitatea utilizării unor baterii de imunosenzori cu scopul obținerii de dispozitive de diagnostic cu grad de încredere ridicat. Cercetările pe această temă sunt în curs de desfășurare.

Capitolul patru cuprinde date privind analiză probelor de mediu de mediu cu ajutorul senzorilor electrochimici. Însă detecția și cuantificarea ionilor metalici este un subiect de interes nu doar din acest punct de vedere. Metalele grele sunt compuși naturali care se găsesc și în biosferă. Cu toate că unele metale sunt esențiale pentru viață, toate metalele sunt toxice dacă se depășește o anumită concentrație. Dintre metalele grele, cuprul și zincul sunt importante nu doar din punct de vedere toxicologic și farmacologic. Aceste elemente sunt esențiale deoarece sunt implicate în numeroase procese biologice, dar în concentrații mari devin toxice pentru organismul uman. Plumbul este unul dintre metalele incriminate pentru declanșarea mai multor boli în primul rând datorită remanenței în celulele. S-a observat că foarte multe boli sunt asociate cu schimbarea concentrației ionilor metalici din țesuturi și fluide. Toate acestea dovedesc necesitatea detecției cuprului și zincului din medii biologice. Pe de altă parte,

datorită existenței unor suplimente alimentare și a unor medicamente cu conținut de cupru și zinc, este necesară și determinarea acestora în domeniul controlului medicamentelor. Și nu în ultimul rând, datorită efectelor lor toxice în corpul uman precum și asupra plantelor și animalelor, detectarea cuprului și zincului din alimente și mediu este foarte importantă, pentru a evita apariția efectelor negative datorate acumulării în exces a acestor elemente.

Alături de mercur și de toți derivații săi, inclusiv electrozii cu filme subțiri de mercur și bismut, unul dintre materialele pe bază de carbon utilizate pentru detecția metalelor grele prin intermediul unei etape de complexare, este pâsla de grafit. Acest material a fost utilizat cu succes în electrocataliză și electrosinteză organică.

În capitolul patru este descrisă utilizarea pâslei de grafit în senzorică. Datorită suprafeței specifice mari a pâslei de grafit este asigurat un contact optim între electrod și analitul de interes, ceea ce duce la îmbunătățirea cineticii reacțiilor care au loc la electrod determinând creșterea eficienței etapei de preconcentrare.

Electrodul de pâslă de grafit nemodificat și modificat cu 1,8-diamino-3,6-dioxaoctan au fost utilizați pentru detecția plumbului într-un sistem electrochimic în flux. Detecția se realizează în doi pași: preconcentrarea analitului prin complexarea în flux urmată de analiza prin voltametrie liniară de stripare a ionilor imobilizați într-o celulă electrochimică standard cu trei electrozi.

Pentru electrodul pâslă de grafit nemodificat situsurile disponibile pentru complexare sunt reprezentate de către grupările carboxil, prezente în starea naturală pe suprafața electrodică. Alți doi senzori pe bază de pâslă de grafit modificată cu sarea de diazoniu a 4-metoxibenzenului și *N,N'*-bis(acetilaceton)etilendiimină sunt prezentați împreună cu pașii de optimizare și performanțele analitice în ceea ce privește detecția Zn^{2+} și Cu^{2+} .

În cele din urmă, vor fi prezentați senzorii pe bază de polimerii moleculari imprimați (MIP) utilizați pentru detecția unor poluanți, chiar dacă aceasta este doar prima încercare în acest domeniu nou de cercetare.

Pe baza experienței științifice acumulate în ultimii ani, strategia de dezvoltare a carierei mele științifice se va focaliza pe două domenii principale: dezvoltarea de (imuno)senzori pentru analiza farmaceutică și biomedicală și pe implementarea unor metode de investigare (SECM, SERS, RAMAN și SPR) în bioanaliză.

Prima abordare se referă la designul unui senzor dual utilizat pentru detecția simultană a biomarkerilor care apar în unele tulburari neurologice care să fie înglobate în dispozitive sensibile și rapide, non invazive, utilizabile la patul bolnavului (point-of-care: POC). Altă direcție de cercetare se va focaliza pe designul și dezvoltarea mai multor POC pentru diagnostic și monitorizarea tratamentului. Mai multe detalii sunt prezentate în partea finală a acestei teze (în planul de dezvoltare ulterioară a carierei).