



Universitatea de Medicină și Farmacie
“TULIU HAȚIEGANU” Cluj-Napoca, România
Facultatea de Farmacie

BIOSENZORI ENZIMATICI ÎN ANALIZA FARMACEUTICĂ ȘI BIOMEDICALĂ

doctorand:
farmacist Veronica SIMA
căsătorită HÂRCEAGĂ

Coordonatori:

Profesor Dr. Robert Săndulescu

Universitatea de Medicină și Farmacie “TULIU HAȚIEGANU” Cluj-Napoca,
România, Facultatea de Farmacie, Departamentul de Chimie Analitică și Analiză
Instrumentală

Profesor Dr. Jean-Michel Kauffmann

Université Libre de Bruxelles, Belgia, Institutul de Farmacie, Departamentul de
Chimie Analitică Instrumentală și Bioelectrochimie

Teză prezentată pentru a obține titlul de Doctor în Științe
Farmaceutice

Noiembrie 2010

Cuprins

Mulțumiri	5
A. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	6
I. BIOSENZORI DEFINIȚIE ȘI CLASIFICARE	7
I.1. DEFINIȚIE	7
I.2. CLASIFICARE	8
I.3. BIOCOMPONENTUL	9
I.3.1. Element de recunoaștere biocatalitică	9
I.3.2. Element de recunoaștere prin biocomplexare și bioafinitate	11
I.4. TRANDUCTORUL	14
BIOSENZORI ELECTROCHIMICI	14
I.4.1. Biosenzori amperometrici	15
I.4.2. Biosenzori potențiometrici	16
I.4.3. Biosenzori conductometrici	17
I.4.4. Biosenzori FET	17
II. BIOSENZORI AMPEROMETRICI ENZIMATICI	18
II.1. CINETICĂ ENZIMATICĂ	19
II.2. METODE DE IMOBILIZARE	21
II.3. MECANISM DE ACȚIUNE	29
II.3.1. Analiți sau reacții monitorizate	29
II.3.2. Mecanism de reacție	32
II.4. AVANTAJE ȘI DEZAVANTAJE ALE BIOSENZORILOR AMPEROMETRICI ENZIMATICI	38
III. BIOSENZORII CU SPE	38
III.1. TEHNICI DE FABRICARE	38
III.2. SPEs MODIFICAȚI CU ENZIME	38
III.2.1. Fabricarea SPE modifi cați cu enzime	39
III.2.2. Așteptări în viitor	40
IV. REUȘITE ALE PREZENTULUI ȘI PERSPECTIVE ÎN VIITOR ÎN DOMENIUL BIOSENZORILOR	40
REFERINȚE	44
B. CONTRIBUȚII PERSONALE	50
I. APARATE ȘI METODE	50
1. Voltametrie ciclică	50
2. Amperometrie	50
II. BIOSENZORI PE BAZĂ DE HRP PENTRU DOZAREA ACETAMINOFENULUI ȘI SCREENINGUL POTENȚIALELOR ANTIDOTURI	51
II.1. Enzima utilizată la construcția biosenzorului, peroxidaza din hrean	51
II.1.1. Structură	51
II.1.1.1. Descrierea enzimei	51
II.1.1.2. Structura tridimensională	52
II.1.2. Mecanism de acțiune	52
II.2. Molecule studiate - Acetaminofen	53
II.3. Un biosenzor pe bază de peroxidază imobilizată prin intermediul particulelor magnetice de siliciu pentru studiul biotransformării și studii de inhibiție pentru acetaminofen	54
1. Introducere	54
2. Parte experimentală	58
2.1. Substanțe	58
2.2. Particule magnetice	59
2.3. Imobilizarea enzimei	59
2.4. Electrocul cu HRP-MMP	60
2.5. Aparatură și Determinări Electrochimice	61
3. Caracterizarea electrochimică a biosenzorului cu microparticule magnetice și HRP	62
3.1. Studii amperometrice	62
3.2. Voltametrie ciclică	64
3.3. Inhibition Studies	65
4. Concluzie	71
II.4. Un nou biosenzor cu gel nanoporos de alcoxid de zirconiu pentru detecția acetaminofenului	72
1. Introducere	72
2. Parte experimentală	73
2.1. Materiale	73
2.2. Prepararea filmului	73
2.3. Imobilizarea enzimei	73
2.4. Metode electrochimice	74
2.5. Microscopie și studii de suprafață	74
3. Comportamentul electrochimic a biosenzorului cu film de HRP și gel nanoporos de alcoxid de zirconiu	74
3.1. Modul de funcționare a biosenzorului	74

3.2. Caracterizarea filmului	76
3.3. Răspunsul amperometric al biosenzorului	80
3.4. Dozarea acetaminofenului	85
4. Concluzie.....	86
II.5. Electrozi printați modificați cu film cu HRP-alcoxid de zirconiu pentru dezvoltarea unui biosenzor aplicat la dectia paracetamolului.....	87
1. Introducere	87
2. Materiale și metode	89
2.1. Materiale.....	89
2.2. Prepararea filmului	90
2.3. Imobilizarea enzimei	90
2.4. Metode electrochimice	90
3. Studiul electrochimic al biosenzorului cu SPE-HRP-alcoxid de zirconiu.....	91
3.1. Caracterizarea filmului	91
3.2. Testarea amperometrică a biosenzorului și performanțele sale analitice.....	94
3.3. Dozarea paracetamolului din tablete	97
4. Concluzie.....	98
III. BIOSENZORI PE BAZĂ DE TIROZINAZĂ PENTRU STUDIUL AGENȚILOR DE ALBIRE A PIELII	99
III.1. Enzima folosită în construcția biosenzorului, tirozinaza	99
III.1.1. Rolul în sinteza melaninei	99
III.1.2. Mecanismul de reacție a tirozinazei	99
III.1.3. Inhibitori.....	100
III.2. Molecule studiate - L-tirozina, Acidul kojic, Acidul azelaic, Acidul benzoic, Acidul ascorbic.....	102
III.3. Imobilizarea tirozinazei la nivelul nanoparticulelor magnetice pentru determinarea amperometrică a inhibitorilor enzimatici: aplicație pentru agenții de albire a pielii	103
1. Introducere	103
2. Materiale și metode	106
2.1. Materiale.....	106
2.2. Construcția biosenzorului cu tirozinază și NMPS	106
2.3. Aparatură.....	108
2.4. Determinări amperometrice	108
3. Caracterizarea electrochimică a biosenzorului cu tirozinază și nanoparticule magnetice	109
3.1. Studiul condițiilor optime de funcționare a biosenzorului pe bază de tirozinază	109
3.1.1. Selectarea potențialului aplicat.....	109
3.1.2. Selectarea substratului	111
3.1.3. Selectarea pH-ului	112
3.1.4. Cantitatea de tirozinază-NMPS depusă la suprafața CPE.....	113
3.1.5. Selectarea concentrației de substrat pentru studiile de inhibiție	114
3.1.6. Curba Michaelis-Menten	116
3.2. Inhibitori ai biosenzorului enzimatic	117
3.2.1 Inhibitori enzimatici “adevărați”	118
3.2.2 Inhibitori ai procesului de melanogeneză	128
3.2.3 Stabilitate și reproductibilitate.....	130
3.2.4 Compuși ușor oxidabili.....	130
4. Concluzii.....	132
IV. CONCLUZII GENERALE ȘI COMENTARIILE FINALE.....	134
REFERINȚE	137
ANEXE.....	144

Cuvinte cheie: biosenzor amperometric, particule magnetice, alcoxid de zirconiu, HRP, acetaminofen, Tirozinază, agenți de albire a pielii

A. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

INTRODUCERE

Îmbunătățirea “calității vieții” este unul dintre cele mai importante obiective ale eforturilor cercetării globale. Bineînțeles calitatea vieții este strâns corelată cu controlul bolilor, a calității și siguranței medicamentelor și a mâncării și cu calitatea mediului înconjurător. În toate aceste domenii o monitorizare continuă, sensibilă, rapidă, exactă și precisă este necesară pentru a controla parametrii cheie[1]. Biosenzorii, un nou concept de senzori dezvoltati în ultimi 40 de ani[2], reprezintă dispozitive promițătoare în acest context.

Un biosenzor, conform definiției IUPAC, este un dispozitiv integrat, care este capabil să genereze informație analitică cantitativă sau semi-cantitativă folosind un element biologic cu rol de recunoaștere (receptorul biochimic) ce este fixat în contact spațial cu un traductor fizic[3]. De fapt acest sistem transformă reacția dintre un analit și componenta biologică într-un semnal detectat și monitorizat de către traductor, semnal ce reflectă concentrația substratului.

În domeniul medical au fost dezvoltati biosenzori pentru glucoză, fructoză, etanol, lactat, colesterol, pentru diferiți compuși din sânge (electroliți, uree, amoniu, glucoză sau hematocrit), biosenzori pentru proteina A și IgG (imunosenzori)[1,4] etc.

SCOP

Scopul acestei teze este de a dezvolta și de a explora biosenzorii amperometrici enzimatici ce folosesc ca și biocomponent peroxidaza din hrean sau tirozinaza, ca și traductor diferite tipuri de electrozi (electrozi pastă de carbon, electrozi de carbon vitros sau electrozi impimați) precum și diferite tehnici de imobilizare a enzimei la suprafața electrozilor (particule magnetice pe bază de siliciu, film pe bază de alcoxid de zirconiu și polietilenimină sau particule magnetice cu streptavidină), aplicate în analiza farmaceutică și biomedicală la dozarea paracetamolului la concentrații micromolare, la screeningul antidoturilor în caz de intoxicație cu paracetamol și la evaluarea acțiunii inhibitori asupra tirozinazei a unor agenți de albire a pielii folosiți în cremele depigmentare.

B. CONTRIBUȚII PERSONALE

BIOSENZORI PE BAZĂ DE HRP PENTRU DOZAREA ACETAMINOFENULUI ȘI SCREENINGUL POTENȚIALELOR ANTIDOTURI

Un biosenzor pe bază de peroxidază imobilizată prin intermediul particulelor magnetice de siliciu pentru studiul biotransformării și studii de inhibiție pentru acetaminofen

A fost dezvoltat un biosenzor cu HRP pentru dozarea paracetamolului din produse farmaceutice și pentru investigarea tiolilor care sunt inhibitori ai semnalului biosenzorului.

Imobilizarea HRP-ului s-a realizat prin retenție la suprafața și în interiorul microparticulelor nanoporoase magnetizate de siliciu, acestea fiind apoi fixate la suprafața unui electrod pastă de carbon cu ajutorul unui magnet. Nanostructura poroasă a microparticulelor a permis imobilizarea unui cantități ridicate de enzimă iar datorită proprietățile lor magnetice imobilizarea enzimei s-a realizat în strânsă proximitate cu suprafața electrodului, particulele fiind atrase la suprafața acestuia de un magnet fixat în interiorul electrodului.

Această configurație a fost aplicată la studiul oxidării biocatalitice a acetaminofenului în prezența apei oxigenate. În prima etapă, în prezența apei oxigenate, peroxidaza este oxidată la Compusul I. Apoi acest compus în reacție cu acetaminofenul este redus generând HRP-ul inițial și N-acetilparabenzochinonimina (NAPQI). În ultima etapă NAPQI, generată de către HRP-MMPs, este electroredușă la suprafața electrodului (Figura 1) iar curentul generat este înregistrat. Semnalul amperometric rezultat este proporțional cu concentrația acetaminofenului.

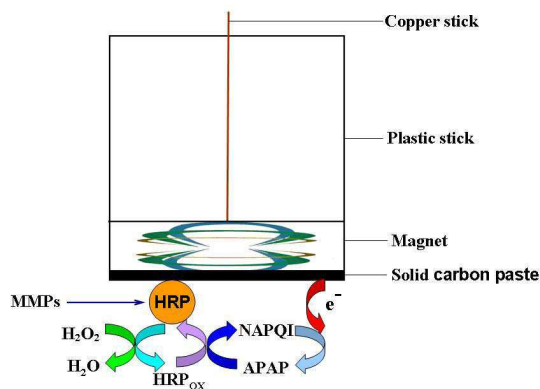


Figura 1. Reprezentarea schematică a peroxidării acetaminofenului (APAP) (pH 7.4) de către peroxidaza din hrean (HRP) imobilizată la nivelul microparticulelor magnetice (HRP-MMPs) urmată de electroreducerea NAPQI la nivelul electrodului pastă de carbon magnetizat

Biosenzorul a permis dozarea acetaminofenului la concentrații în domeniul micromolar și studiul comparativ a unor derivați tiolici, care se știe că reacționează cu compușii oxidați ai paracetamolului și care sunt folosiți ca produși de detoxifiere în caz de intoxicație cu paracetamol[5]. În prezența tiolilor are loc o adădire nucleofilă ducând la reducerea NAPQI și prin urmare și la scăderea semnalului amperometric (Figura 2).

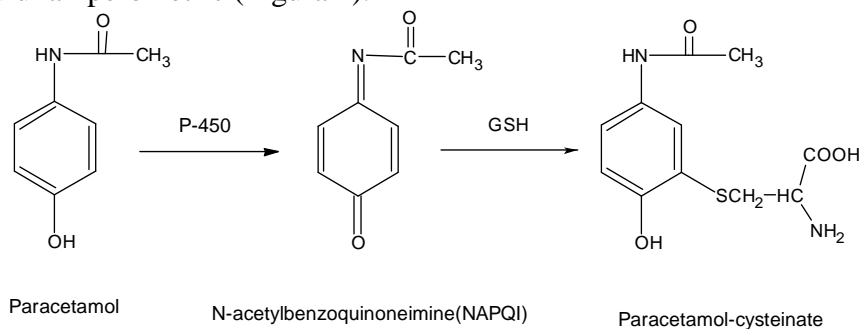


Figura 2. Oxidarea paracetamolului la NAPQI urmată de reducerea de către glutat

Domeniul de linearitate a curentului înregistrat versus concentrația APAP a fost determinat între 2×10^{-6} și 5.7×10^{-5} M ($R^2 = 0.9993$, RSD a pantei = 20%, n = 5). Limita de detecție a acestei metode pentru acetaminofen este 0,75ng/ml. Biosenzorul a fost aplicat la determinarea paracetamolului din forme farmaceutice (Perdolan[®]) folosind metoda adădiei standard. Rezultatele obținute cu ajutorul biosenzorului au fost 198.0 ± 0.8 mg/tabletă, n = 9. Voltametria ciclică, prin măsurarea curentului de oxidare, în domeniul de potențial de la - 0.2 la 0.9 V, a fost folosită ca metodă de referință pentru determinarea paracetamolului din tabletele de Perdolan[®]. Prin această metodă s-au obținut 199.8 ± 0.6 mg/tabletă, n = 9. Așadar rezultatele obținute cu ajutorul biosenzorului sunt comparabile cu cele obținute prin voltametrie ciclică și cu cele declarate de către producător; și anume 200 mg/tabletă.

Diferiți compuși care se conjugă printr-o legătură sulfhidril cu produsul de oxidare generat enzimatic din acetaminofen, NAPQI, au fost investigați ca potențiale antidoturi în caz de supradozare cu paracetamol. IC₅₀, concentrația de inhibitor care reduce cu 50% semnalul inițial, a fost calculat pentru fiecare din inhibitorii studiați pentru a compara puterea lor inhibitorie. Dintre potențialele antidoturi investigate cisteina a fost cea mai puternică urmată de glutat, lizinat de N-acetilcisteină, N-acetilcisteină și în final captopril.

Biosenzorul cu HRP reprezintă un dispozitiv analitic capabil să genereze enzimatic specii reactive oxidate care pot fi reduse electrochimic. Acesta poate fi utilizat și la alte investigații pentru a analiza peroxidarea și a altor medicamente sau la screeningul altor inhibitori a procesului de peroxidare. Ușurința procedurii experimentale precum și disponibilitatea comercială a HRP-ului fac utilizarea biosenzorului cu HRP atractivă pentru analize de laborator de rutină.

Un nou biosenzor cu gel nanoporos de alcoxid de zirconiu pentru detecția acetaminofenului

S-a dezvoltat un electrod compozit cu alcoxid de zirconiu și polietilenimină pentru construcția unui biosenzor cu HRP, pentru detecția și dozarea paracetamolului din forme farmaceutice.

Imobilizarea enzimei la suprafața unui electrod de carbon vitros s-a realizat prin intermediul unui film poros de polietilenimină și alcoxid de zirconiu, tehnică ce oferă o bună imobilizare și în același timp un mediu "protectiv" pentru biocomponent.

Modul de operare a biosenzorului cu HRP și alcoxid de zirconiu a constat în monitorizarea semnalului amperometric generat de reducerea electrochimică la suprafața electrodului a speciei oxidate a paracetamolului generate enzimatic, și anume N-acetilparabenzochinonimina (NAPQI).

Caracterizarea filmului

Pentru a studia dacă filmul cu ZrO_2 -PEI blochează accesul analitului la suprafața electrodului și dacă alcoxidul de zirconiu își manifestă activitatea catalitică, s-au realizat determinări prin voltametrie ciclică folosind un electrod de carbon vitros nemodificat și unul modificat cu film de ZrO_2 -PEI. În cazul electrodului modificat semnalul de oxidare și de reducere a acetaminofenului a fost mai mic față de semnalele obținute cu electrodul nemodificat. Putem spune că filmul cu ZrO_2 -PEI blochează accesul acetaminofenului la suprafața electrodului.

Se aștepta ca alcoxidul de zirconiu să își manifeste activitatea electrocatalitică și ca electrodul modificat cu film să prezinte un semnal mai mare. Pentru a vedea dacă într-adevăr alcoxidul de zirconiu își manifestă sau nu activitatea electrocatalitică și dacă PEI din structura filmului depus la suprafața electrodului nu blochează suprafața acestuia contrabalansând activitatea electrocatalitică a zirconiului, s-au realizat experimente cu electrozi de carbon vitros modificați cu film de ZrO_2 -PEI și film de PEI. S-a observat că datorită prezenței alcoxidului de zirconiu în film potențialul de oxidare și cel de reducere au fost cu aproximativ 50mV la valori mai puțin pozitive, respectiv mai puțin negative, astfel se poate spune că prezența zirconiului facilitează transferul de electroni. Intensitatea curentului a fost cu aproximativ 0.5×10^{-6} A mai mică în cazul filmului cu ZrO_2 -PEI. Sensibilitatea electrodului a fost de asemenea micșorată datorită prezenței filmului.

Pentru a obține o caracterizare completă a electrodului modificat și pentru o mai bună înțelegere a comportamentului acetaminofenului s-au realizat studii amperometrice pentru paracetamol folosind HRP-PEI-GCE și HRP- ZrO_2 -PEI-GCE. S-au observat o stabilitate redusă în cazul biosenzorului cu film fără alcoxid de zirconiu. Aceasta se poate datora fie pierderii HRP-ului din componența filmului fie inactivării acesteia.

Se poate spune că rolul alcoxidului de zirconiu este de a imobiliza enzima, de a menține hidratarea acesteia și de a păstra micromediu neschimbat și astfel de a crește timpul de viață a biosenzorului.

Răspunsul amperometric al biosenzorului

Comportamentul electrocatalitic a biosenzorului enzimatic față de reducerea electrochimică a acetaminofenului a fost studiată prin tehnica amperometrică. Răspunsul amperometric a fost diferit când HRP- ZrO_2 -PEI GCE a fost păstrat peste noapte în 0.1M tampon fosfat, într-o soluție de 1.13×10^{-4} M acetaminofen și 0.2mM H_2O_2 sau într-o soluție 1.13×10^{-4} M acetaminofen. Aceste diferențe pot apărea datorită hidratării diferite a filmului.

Pentru a îmbunătăți răspunsul senzorului HRP- ZrO_2 -PEI GCE, diferite cantități de enzimă au fost imobilizate la suprafața electrodului. Un studiu amperometric realizat timp de 18 zile a arătat faptul că crescând cantitatea de enzimă de la suprafața electrodului (de la 0.3mg la 0.6 mg) limita de detecție de 1.17×10^{-7} M acetaminofen și domeniul de linearitate de la 1.96×10^{-5} M la 2.55×10^{-4} M acetaminofen ale biosenzorului nu s-au schimbat.

S-a observat o mai bună repetabilitate cu creșterea timpul ce poate fi explicată de o mai bună hidratare și o rearanjare mai stabilă a filmului. Micșorarea răspunsului biosenzorului în timp se datorează inactivării enzimei și/sau pierderii acesteia de la suprafața electrodului.

Dozarea acetaminofenului

Biosenzorul a fost aplicat la dozarea acetaminofenului din tabletele de Perdolan® și din forma reconstituită a acestora preparată în laboratorul nostru, folosind metoda adiției standard. Adiția a aceleași cantități dintr-o soluție standard 2×10^{-3} M paracetamol, paracetamol din tabletele de

Perdolan[®] și din forma reconstituită a Perdolan[®]-ului în 5ml 0.1M tampon fosfat pH 7.4 a prezentat o suprapunere perfectă a curbelor amperometrice. Curentul generat a fost măsurat după 1 minut după adăugarea acetaminofenului în soluție. În concluzie biosenzorul dezvoltat poate fi aplicat la dozarea paracetamolului din forme farmaceutice.

Biosenzorul cu HRP și alcoxid de zirconiu reprezintă un dispozitiv analitic interesant pentru investigarea compușilor care pot fi peroxidați.

Electrozi imprințați modificați cu film cu HRP – alcoxid de zirconiu pentru dezvoltarea unui biosenzor aplicat la detecția paracetamolului

S-a realizat un biosenzor prin imobilizarea peroxidazei din hrean (HRP) la suprafața electrozilor imprințați (SPE) prin intermediul unui film de alcoxid de zirconiu, dispozitivul fiind aplicat la detecția paracetamolului și la dozarea acestuia din forme farmaceutice, și anume tabletele de Perdolan[®].

Imobilizarea enzimei la suprafața electrodului s-a realizat prin retenție cu ajutorul unui film de polietilenimină și gel de alcoxid de zirconiu, tehnică ce oferă o bună imobilizare și în același timp un mediu “protectiv” pentru biocomponent datorită proprietăților sale de hidratare. SPE oferă ca și avantaje faptul că sunt ușori produși în masă la costuri reduse având totodată caracteristici superioare față de materialele electrodice clasice. În această configurație alcoxidul de zirconiu își manifestă activitatea electrocatalitică.

Modul de operare a biosenzorului se bazează pe monitorizarea semnalului amperometric produs de reducerea electrochimică a speciilor oxidate generate enzimatic din acetaminofenului în prezența peroxidului de hidrogen.

Caracterizarea filmului

Între o celulă electrochimică clasică și SPE sunt diferențe clare. Se poate spune că SPE prezintă avantaje clare față de electrodul de carbon vitros. Activitatea catalitică a alcoxidului de zirconiu și transferul electronic îmbunătățit între analit și electrodul de lucru în cazul SPE, precum și semnalul electrochimic mai mare în cazul SPE modificat față de SPE nemodificat creează perspectivele unei limite de detecție mai scăzute și a unei sensibilități mai ridicate a analizei amperometrice a paracetamolului folosind biosenzorul cu HRP. Există și alte avantaje. Chiar și în cazul SPE nemodificat în comparație cu GCE nemodificat intensitatea curentului de oxidare și de reducere sunt mai mari datorită diametrului mai mare și a suprafeței rugoase care crește și mai mult suprafața activă electrodică a SPE.

Testarea amperometrică a biosenzorului și performanțele sale analitice

Sensibilitatea în cazul SPE este mult mai mare decât în cazul GCE, prepararea celor doi biosenzori fiind realizată folosind aceeași tehnică de fabricare (aceiași compoziție a filmului enzimatic) iar testarea lor folosind aceiași parametri electrochimici. Chiar dacă suprafața electroactivă a SPE este mai mare decât cea a GCE diferența de sensibilitate dintre cei doi electrozi este mult mai mare decât diferența dintre cele două arii, astfel supoziția că sensibilitatea mai mare se datorează unei suprafețe active mai mari este exclusă.

Răspunsul biosenzorului respectă cinetica unei proces tipic enzimatic ($K_M \text{ aparent} = 1.98 \times 10^{-5} \text{M}$ și $I_{\text{max}} = -2.30 \times 10^{-6} \text{A}$). Domeniul de linearitate a răspunsului biosenzorului HRP-ZrO₂-PEI-SPE versus concentrația paracetamolului a fost găsit între 4.35×10^{-7} și $4.98 \times 10^{-6} \text{M}$, în prezență de 0.2mM H₂O₂ în tampon fosfat 0.1M pH=7.4 ($y = -0.2812x - 1 \times 10^{-7}$, $R^2 = 0.990$, RSD of slope=8.27%, n=3) iar limita de detecție și de cuantificare de $6.21 \times 10^{-8} \text{M}$ și respectiv $2.07 \times 10^{-7} \text{M}$.

Răspunsul amperometric pentru un domeniu mai larg de concentrație de paracetamol a fost testat pentru a determina reproductibilitatea intra- și inter-zi. Între determinări biosenzorul a fost păstrat în 0.1M tampon fosfat pH=7.4 la 4°C. În timpul primei determinări a zilei răspunsul amperometric a fost întotdeauna mai mare în comparație cu următoarele două care au prezentat întotdeauna o bună reproductibilitate (R.S.D. a pantei a curbei linearizate a răspunsurilor amperometrice folosind metoda Lineweaver-Burk a fost mai mic de 15%). Pentru a explica dacă acest fenomen se datorează unei posibile modificări structurale a filmului indusă de analit sau de producția reacției enzimatice care trebuie să ajungă la suprafața electrodului pentru a fi reduși sau dacă se datorează modificării de potențial a pseudoreferinței electrodice în timpul stocării în tampon fosfat, s-au realizat determinări folosind un electrod de referință extern, Ag/AgCl (3M KCl). În cazul

utilizării unei referințe externe nu au mai apărut diferențe între prima și următoarele determinări. Se poate afirma că apar modificări ale suprafeței electrodului de pseudoreferință în timpul stocării și drept consecință potențialul său se modifică. După o determinare probabil se ajunge la un echilibru și de aceea următoarele determinări au o bună reproductibilitate. De la o zi la alta semnalul amperometric crește probabil datorită unei mai bune hidratări și a unei rearanjări a filmului de la suprafața SPE.

Dozarea acetaminofenului din tablete

Biosenzorul a fost aplicat la dozarea paracetamolului din tabletele de Perdolan® folosind metoda adității standard. Rezultate obținute ($198.86 \pm 4.19 \text{ mg/tabletă}$, $n=5$) sunt în corelație cu cele obținute cu biosenzorul cu HRP și microparticule magnetice ($198.0 \pm 0.8 \text{ mg/tabletă}$, $n=9$)²³ și cu cele declarate de către producător (200 mg/tabletă).

Având în vedere simplitatea preparării a acestui SPE biosenzor cu HRP și gel de alcoxid de zirconiu, acest dispozitiv reprezintă un sistem analitic interesant pentru investigarea și a altor compuși care pot fi peroxidați sau a inhibitorilor sistemului enzimatic.

BIOSENZOR PE BAZĂ DE TIROZINAZĂ PENTRU SCREENINGUL AGENȚILOR DE ALBIRE A PIELII

Imobilizarea tirozinazei la nivelul nanoparticulelor magnetice pentru determinarea amperometrică a inhibitorilor enzimatici: aplicație pentru agenții de albire a pielii

S-a realizat imobilizarea tirozinazei la nivelul particulelor magnetice cu streptavidină activate cu glutaraldehidă pentru studiul amperometric a inhibitorilor tirozinazei și a inhibitorilor procesului de melanogeneză folosiți ca agenți de albire a pielii.

Biosenzorul a fost construit prin retenția tirozinazei prin intermediul particulelor magnetice cu streptavidină activate cu glutaraldehidă la suprafața unei electrod pastă de carbon magnetizat, mCPE. Tirozinaza utilizată a fost tirozinaza din ciuperci datorită faptului că este omoloagă cu forma umană [6]. Substratul folosit a fost L-tirozină, substratul natural al enzimei în piele [7] iar inhibitorii testați au fost acidul kojic, acidul azelaic și acidul ascorbic, aceștia fiind cele mai frecvente substanțe active din produsele comercializate destinate hiperpigmentării, precum și acidul benzoic, un conservant des folosit în industria cosmetică. Dispozitivul obținut a fost folosit la monitorizarea curentului de reducere a speciei oxidate a L-tirozinei generate enzimatic, dopachinona, în prezența oxigenului molecular (Figura 3). Prezența inhibitorilor a determinat o diminuare a curentului de reducere proporțională cu concentrația și potența acestora. Acidul kojic, acidul azelaic și acidul benzoic se leagă de centrul activ al tirozinazei blocând capacitatea ei catalitică iar acidul ascorbic întrerupe sinteza melaninei prin reducerea intermediarului dopachinona la L-dopa [6].

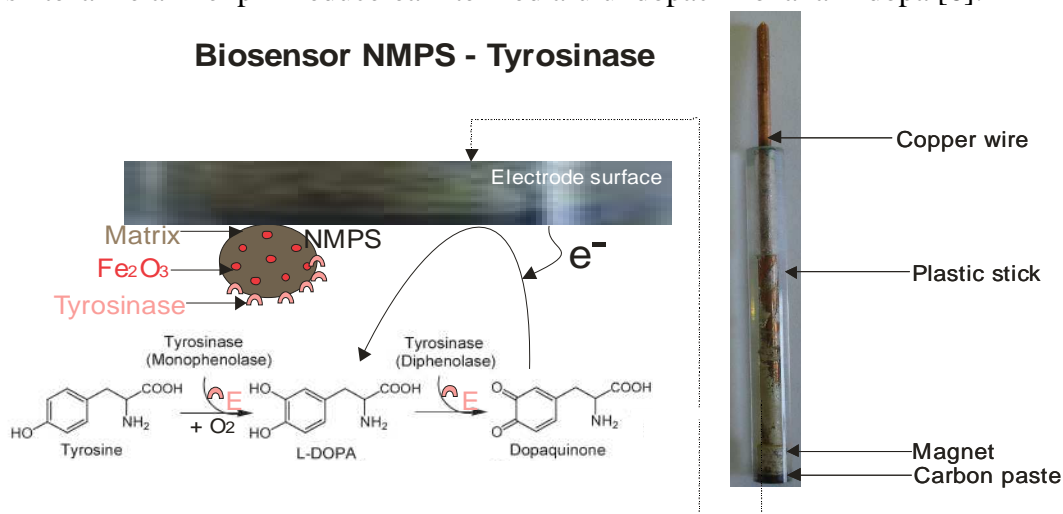


Figura 3. Mecanismul de acțiune al biosenzorului

Optimizarea condițiilor de lucru

S-a realizat optimizarea răspunsului biosenzorului iar condițiile optime pentru substratul L-tirozină au fost: 0.1M tampon fosfat pH=6.5, potențialul aplicat -100 mV, 1.25mg/ml suspensie tirozinază-NMPS depusă pe suprafața electrodului magnetizat pastă de carbon. Pentru evaluarea inhibitorilor o concentrație de 3.33×10^{-4} M L-tirozină a fost considerată optimă.

Inhibitori ale procesului enzimatic

Cu acest biosenzor au fost testați inhibitori care au două mecanisme diferite de acțiune: inhibitorii "adevărați" care se leagă de centrul activ al enzimei și inhibitorii care consumă intermediarul dopachinona din procesul de sinteză al melaninei.

Figura 4 ilustrează o curbă tipică în funcție de timp a răspunsului biosenzorului cu tirozinază și nanoparticule magnetice pentru L-tirozină urmată de aditii succesive de acid kojic. Se poate observa că o linie de bază stabilă este obținută în 600sec. La aditia în soluție la secunda 600 a L-tirozinei se observă apariția unui curent de reducere cu un platou de stare staționară stabil. Aditia succesivă de inhibitor în soluția de L-tirozină (3.33×10^{-4} M) produce o diminuare a magnitudinii curentului de reducere, clar indicând că acidul kojic interferează cu formarea dopachinonei la suprafața electrodului. Procentajul de inhibiție (In%) a crescut proporțional cu concentrația inhibitorului.

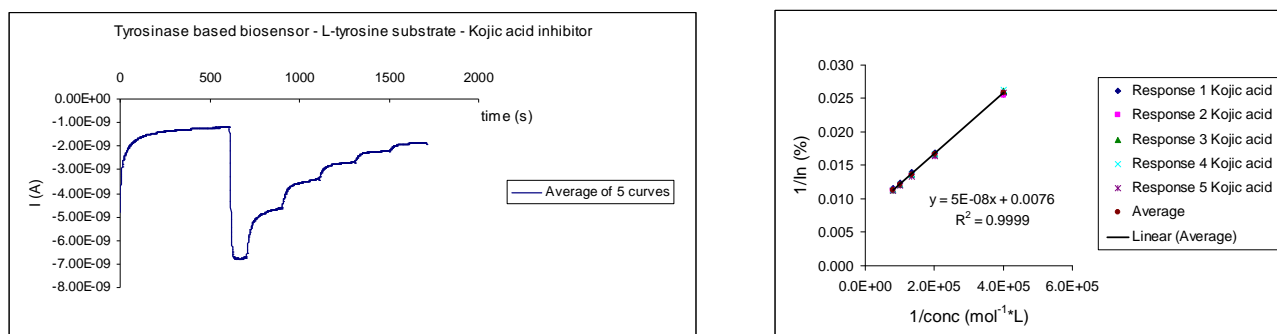


Figura 4. Răspunsul biosenzorului cu tirozinază pentru substratul L-tirozină 3.33×10^{-4} M și acidul kojic între 2.50×10^{-6} M și 1.24×10^{-5} M în 0.1M tampon fosfat pH=6.5, potențial aplicat -100mV, 10 μ l 1.25mg/ml suspensie de tirozinază-NMPS depusă la suprafața CPE

Comparând valorile IC_{50} obținute, în aceleași condiții experimentale, pentru toți cei 4 inhibitori testați, ordinea potenței lor este: acidul kojic ($IC_{50}=3.7 \times 10^{-6}$ M, RSD=1.6, n=5), acidul ascorbic ($IC_{50}=1.2 \times 10^{-5}$ M, RSD=4.8, n=5), acidul benzoic ($IC_{50}=7.2 \times 10^{-5}$ M, RSD=1.2, n=5) și acidul azelaic ($IC_{50}=1.3 \times 10^{-4}$ M, RSD=3.0, n=5). Rezultatele obținute sunt în acord cu așteptările, ținând cont de utilizarea lor practică și concluziile generale din literatură.

Trebuie subliniat faptul că dispozitivul propus permite cuantificarea și caracterizarea inhibitorilor din punctul de vedere al interacțiunii cu tirozinaza și cu reacția enzimatică în prezența substratului natural L-tirozina. În procesul de pigmentare a pielii acești compuși pot interveni și în alte etape biochimice ce au ca rezultat diminuarea formării melaninei.

Studiul cineticii și a mecanismului de inhibiție pentru acidul kojic, acidul benzoic și acidul azelaic a fost de asemenea realizat. Astfel, pentru același inhibitor, I_{max} nu s-a schimbat iar K_m^{app} a crescut proporțional cu concentrația inhibitorului, astfel toți cei trei inhibitori mai sus amintiți sunt inhibitori competitivi.

Stabilitatea pe termen lung a tirozinazei imobilizată la suprafața NMPS a fost evaluată măsurând răspunsul biosenzorului pentru L-tirozină (3.33×10^{-4} M) la diferite intervale de timp. Biosenzorul și-a păstrat 66% din semnalul inițial după o săptămână, 46% după două săptămâni, 23% după trei săptămâni și 5% după patru săptămâni. S-a observat că IC_{50} nu a fost afectat de pierderea activității enzimatice (RSD=1.5). Sistemul prezintă o bună repetabilitate; IC_{50} pentru 5 determinări consecutive a prezentat un RSD de 1.6, 1.2, 3.0 și 4.8 pentru acidul kojic, acidul benzoic, acidul azelaic și respectiv acidul ascorbic. Buna repetabilitate a rezultatelor este explicată prin faptul că semnalul de inhibiție a fost normalizat față de semnalul inițial pentru substrat pentru fiecare curbă. Astfel rezultatele finale nu au fost influențate de variația semnalului pentru substrat care poate apărea datorită modificării activității enzimatice sau datorită erorilor întâmplătoare care pot apărea în timpul

preparării biosenzorului. Astfel chiar dacă enzima își pierde destul de repede activitatea enzimatică evaluarea potenței inhibitorilor nu este influențată.

Dispozitivul nu poate fi aplicat la evaluarea activității inhibitorie a compușilor ușor oxidabili care pot fi oxidați de către oxidul de fier din compoziția particulelor nanomagnetice folosite la imobilizarea tirozinazei.

Alte substanțe care acționează prin unul din mecanismele mai sus amintite, și anume prin blocarea activității catalitice a enzimei sau prin reducerea intermediarului dopachinona, pot fi de asemenea evaluate folosind acest dispozitiv care se dorește a fi utilizat ca metodă analitică pentru screeningul și compararea capacității inhibitori a potențialilor agenți de albire a pielii. Având în vedere simplitatea fabricării și a utilizării a acestui biosenzor acesta reprezintă un dispozitiv analitic interesant și valoros în special pentru evaluarea afinității dintre tirozinază și inhibitor.

CONCLUZII GENERALE ȘI COMENTARIILE FINALE

Scopul acestei teze a fost de a dezvolta biosenzori amperometrici enzimatici aplicați în analiza farmaceutică și biomedicală.

În timp de conceptul biosenzorilor este simplu, realizarea acestor pentru comercializare este departe de a fi simplă. Multe astfel de dispozitive sunt la stagiul științific și doar foarte puține idei inovatoare descrise în literatură au ajuns pe piață iar domeniul lor clinic de aplicabilitate este foarte restrâns, cum ar fi spre exemplu biosenzorii portabili pentru glucoză [8]. Chiar dacă potențialul biosenzorilor este recunoscut, problemele ce apar cel mai des în construcția biosenzorilor se datorează biocomponentului, și anume datorită stabilității lui scăzute în timp și a slabei reproductibilități. Pentru a rezolva aceste probleme sunt necesare calibrări frecvente cu metode validate. În consecința avantajele biosenzorilor în favoarea altor dispozitive sunt reduse substanțial. Chiar dacă noi strategii de imobilizare a biocomponentului au fost propuse pentru a obține biosenzori ce prezintă un răspuns reproductibil, selectiv și stabil, eforturi însemnate mai trebuie încă făcute. Astfel îmbunătățirea stabilității biosenzorilor enzimatici, în viitorul apropiat, este posibilă prin folosirea de procese biotehnologice pentru a obține enzime mai stabile și mai bine definite care pot funcționa în condiții de stres pentru perioade mai lungi de timp [9]. După cum se poate ușor observa dezvoltarea biosenzorilor va continua să se orienteze spre miniaturizare și detecție multiplă.

REFERINȚE

-
- [1] Castillo J, Gaspar S, Leth S, Niculescu M, Mortari A, Bontidean I, et al. Biosensors for life quality Design, development and applications. *Sens Actuators B* 2004;102:179-194
 - [2] Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann NY Acad Sci* 1962;102:29-45
 - [3] Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and Classification. *Biosens Bioelectron* 2001;16:121-131
 - [4] Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Elskaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *ITBM-RBM* 2008;29:171-180
 - [5] Flanagan RJ, Meredith TJ. Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *Am J Med* 1991;91:131-139
 - [6] Chang TS. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int J Mol Sci* 2009;10:2440-2475
 - [7] Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1707-1723
 - [8] Wang J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *J Pharm Biomed Anal* 1999;19:47-53
 - [9] Campas M, Prieto-Simon B, Marty JL. A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors. *Semin Cell Dev Biol* 2009;20:3-9

VERONICA SIMA căsătorită HÂRCEAGĂ

28 ani - Căsătorită - Permis B

✉ strada Campului, nr. 193

Cluj-Napoca, Cluj, România

☎ 0040742029752

vero_sima@yahoo.com

Educație

- **2008** **Cadru universitar – preparator Catedră de Chimie Analitică și Analiză Instrumentală**
Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, România
- **2007-2008** **Master Complémentaire Interuniversitaire Pharmacien d’Industrie** (réussit avec “grand distinction”)
Université Libre de Bruxelles, Université Catholique de Louvain și Université de Liège Belgia
- **2007-...2010** **Rezidențiat în Farmacie Clinică** (clasată pe primul loc la Concursul Național de Rezidențiat, grupa Farmacie)
Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, România
- **2006-...2010** **Doctorantă cu frecvență la Catedră de Chimie Analitică și Analiză Instrumentală**
Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, România
- **2001-2006** **Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, România**
- **1997-2001** **Colegiul Național “Gh. Lazar” Sibiu, profil matematică – fizică – bilingvă**

Experiență profesională

- **experiență în studii clinice – formare pentru meseria de Monitor Clinic în timpul unui stagiu intens de trei luni în cadrul Laboratoire SERVIER Paris Departamentul Direction de la Zone des Opérations Cliniques (DZOC), în 2008**
- **experiență în cercetarea științifică – Departamentul de Analiză Instrumentală, Institutul de Farmacie, Université Libre de Bruxelles, Belgia, Prof. Dr. Jean-Michel Kauffmann în 2005, 2008 și 2009**

Burse și Recompense

- **2010 Agenția Universitară a Francofoniei: “Bursă de perfecționare în cercetare” în Bruxelles**
- **2009 Bursă de excelență WBI: Bourse d’excellence IN-WALLONIE-BRUXELLES INTERNATIONAL 01.07.2009-31.09.2009, pentru stagiul de cercetare la Université Libre de Bruxelles, Belgia**
- **2007 Bursă pentru Formare Inițială** Agenția Universitară a Francofoniei, programul: Susținerea excelenței universitare pentru anul academic 2007-2008
- **2007 Bursă de cercetare științifică pentru tinerii doctoranzi** Consiliul Național Român pentru Cercetarea științifică din Învățământul Superior pentru o perioadă de trei ani (selecție prin concurs la nivel național)
- **2006 Bursă GlaxoSmithKline Business School** (selecție prin concurs la nivel național)
- **2005 Bursă de tip Erasmus-Socrates a Uniunii Europene** pentru o perioadă de șase luni la Université Libre de Bruxelles, Belgia

Publicații

Articole publicate în extenso în reviste:

a. internaționale:

- prim autor

Screen-printed electrodes modified with HRP– zirconium alcoxide film for the development of a biosensor for acetaminophen detection

Central European Journal of Chemistry, 8(5), 1034-1040, Veronica Sima; Cecilia Cristea; Ede Bodoki; Gabriela Dutu; Robert Sandulescu

- prim autor

Electroanalytical properties of a novel biosensor modified with zirconium alcoxide porous gels for the detection of acetaminophen

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 48 (4-5), 1195-1200, Veronica Sima, Cecilia Cristea, Florina Lapadus, I.O. Marian, Ana Marian, R. Sandulescu (IF=2.629)

- coautor

A Peroxidase-Based Biosensor Supported by Nanoporous Magnetic Silica Microparticles for Acetaminophen Biotransformation and Inhibition Studies

Electroanalysis, 2006, 18(17), 1637-1642, Donghui Yu, Olga Dominguez Renedo, Bertrand Blankert, Veronica Sima, Robert Sandulescu, J. Arcos, Jean-Michel Kauffmann (IF=2.444)

b. naționale:

- coautor

The electrochemical behavior of some beta-blockers on screen printed electrodes modified with calixarene

Farmacia 2010, 58(4), 430-446

Gabriela Duțu, Cecilia Cristea, Bodoki Ede, Veronica Harceaga, Alina Saponar, Elisabeth-Jeanne Popovici, Robert Săndulescu

➤ coautor

Electrochemical behaviour of quercetine and its antioxidant capacity estimation

Acta Electrotehnica 2007, 48, 415-419, (ISSN 1841-3323) S. Mirel, V. Sima, S. Lotrean, V. Mirel, R. Săndulescu

➤ coautor

Evaluation of the antioxidant capacity of Vaccinium myrtillus and Aronia melanocarpa fruits extracts by voltametry

Acta Universitatis Cibiniensis, seria F, Chemia 2007, vol 10 nr. 2, 119-124 (ISSN 1583-5030), Simona Mirel, Veronica Sima, S. Lotrean, Bianca Cupșa, R. Săndulescu, M. Tămaș

Proceedings publicate in extenso:

a. internațional:

➤ coautor

Modified Screen Printed Electrodes for the Development of Biosensors

IFMBE Proceedings, International Conference on Advancements of Medicine and Health Care through Technology "MediTech 2009", 2009, 26, 89-92, Simona Vlad, R.V. Ciupa, Anca Nicu (Eds), Springer, Cecilia Cristea, E. Bodoki, Veronica Sima, R. Săndulescu

Congrese și Premii

Articole publicate în reviste de rezumat ale congreselor:

a. internațional:

- **prezentare orală:** Drug Analysis, Septembrie 21 - 24, 2010, Anvers, Belgia, *Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: application to skin whitening agents*, Veronica Sima Harceaga, Stephanie Patris, Zeynep Aydogmus, Ahmad Sarakbi, Robert Sandulescu, Jean-Michel Kauffmann
- poster: MediTech - Advancements of Medicine and Health Care through Technology, September 23 - 26, 2009, Cluj-Napoca, Romania, *Modified screen printed electrodes for the development of biosensors*, Cecilia Cristea, Bodoki Ede, Veronica Sima and Robert Sandulescu
- poster: Journée d'Electrochimie, 6-10 juillet 2009, Sinaia, Roumanie, *Développements des biocapteurs sur des électrodes planaires sérigraphies*, Veronica Sima, Cecilia Cristea, Iuliu Marian, Robert Sandulescu
- poster: The 12th International meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, 23-26 September 2007, Elba, Italy, *Analytical properties of a new paracetamol biosensor with zirconium alcoxide porous gels*, Veronica Sima, Cecilia Cristea, Ana Marian, Iuliu Marian, Robert Sandulescu
- poster: The 12 International meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, 23-26 September 2007, Italy, *Electroanalytical behavior and voltammetric determination of flavonoids in pharmaceutical dosage forms*, Simona Mirel, Veronica Sima, Valentin Mirel, Radu Oprean, Robert Săndulescu
- poster: The 5th Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry, 1-4 may 2007, Dublin, Irlanda, *Development and electroanalytical properties of composite electrodes modified with ZrO₂ nanogels*, Veronica Sima, Cecilia Cristea, Florina Lapadus, I.O. Marian, Robert Sandulescu
- poster: Agricultural and food sciences, processes and technologies, 26-27 april 2007, Sibiu, Romania, *Evaluation of the antioxydant capacity of Vaccinium myrtillus and Aronia melanocarpa fruits extracts by voltametry*, Simona Mirel, Veronica Sima, S. Lotrean, Bianca Cupșa, R Sandulescu
- poster: **Locul întâi la Secțiunea Prezentare Postere** - Pharmacy, 2005 International Mediterranean Student Congress, 29.10.2005 - 31.10.2005 Mersin, Turcia, *Development of a horseradish peroxidase electrode for the study of paracetamol*, Veronica Sima, Donghui Yu, Bertrand Blankert, Simion Lotrean, Robert Sandulescu, Jean-Michel Kauffmann

b. național:

- poster: **Locul trei** - Zilele UMF-ului Cluj-Napoca 2006, *Dezvoltarea unui electrod cu peroxidaza din hrean pentru studiul paracetamolului*, Veronica Sima, Donghui Yu, Bertrand Blankert, Simion Lotrean, Robert Sandulescu, Jean-Michel Kauffmann
- poster: Al XIII-lea Congres Național de Farmacie, 28-30 september 2006, Cluj-Napoca, România, secțiunea Analiza Medicamentului, *O nouă metodă de construcție a biosenzorilor: studiul comparativ al tehnicilor de imobilizare a a enzimei*, Veronica Sima, Donghui Yu, Bertrand Blankert, Simion Lotrean, Robert Sandulescu, Jean-Michel Kauffmann
- **prezentare orală: Locul întâi la Secțiunea Comunicări științifice** - Congresul Național al Studenților de Farmacie 2006, Cluj-Napoca, România, *O nouă tehnică de construcție a biosenzorilor*, Veronica Sima
- **prezentare orală:** Congresul Național al Studenților de Farmacie 2004, Cluj-Napoca, România, *Canale ionice artificiale în analiză*, Veronica Sima

Organizații profesionale

➤ Membră în colectivele de cercetare :

- Grant de cercetare de tip CEEX (Cercetare de excelență) BIOENZINIT (52-159/2008) 2008-2011 Directeur de proiect Prof. Dr. Robert Săndulescu „*Biosenzori pe bază de enzimă imobilizată covalent de polimeri pentru monitorizarea apei potabile*”
- Grant de cercetare de tip TD (tineri doctoranzi) CNCISIS (Consiliul Național Român pentru Cercetarea științifică din Învățământul Superior) 2008-2009 Director de proiect Veronica Sima „*Biosenzori enzimatici în analiza farmaceutică și biomedicală*”
- Grant de cercetare de tip CEEX (Cercetare de excelență) (6/2005) 2005-2008 Director de proiect Prof. Dr. Robert Sandulescu „*Elaborarea și implementarea de metode electrochimice și biosenzori în studiul moleculelor biologic active și toxice*”
- Grant de cercetare de tip A CNCISIS (A64/2004) 2004-2006 Director de proiect Prof. Dr. Robert Sandulescu „*Studiul și implementarea unor electrozi compoziți pentru detecția metalelor grele din medicamente*”
- 2006 Societatea de Științe Farmaceutice din România
- 2006 Colegiul Național al Farmaciștilor din România

Limbi

- Română: limbă maternă
- Franceză: Atestat de tip “Niveau DELF B2 du cadre européen commun de référence pour les langues, République Française, Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche, Commission Nationale du DELF et du DALF ”
- Engleză: Council of Europe Level B2
- Germană: citit, ascultat, vorbit și scris nivel începător – Certificat DaF1

Informatică

- Adobe Photoshop, Excel, Word, Access, Power Point
- Program SETHI (Suivi des **Etudes TH**érapeutiques **I**nternationales)



University of Medicine and Pharmacy
“IULIU HAȚIEGANU” Cluj-Napoca, Romania
Faculty of Pharmacy

ENZYMATIC BIOSENSORS IN PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS

PhD student:
pharmacist Veronica SIMA
married HÂRCEAGĂ

Coordinators:

Professor Dr. Robert Săndulescu

University of Medicine and Pharmacy “IULIU HAȚIEGANU” Cluj-Napoca,
Romania, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry and Instrumental
Analysis

Professor Dr. Jean-Michel Kauffmann

Université Libre de Bruxelles, Belgium, Institute of Pharmacy, Department of
Instrumental Analytical Chemistry and Bioelectrochemistry

Thesis presented to obtain the PhD degree in
Pharmaceutical Sciences

November 2010

Table of content

Acknowledgements.....	5
A. BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW	6
I. BIOSENSORS DEFFINITION AND CLASSIFICATION	7
I.1. DEFFINITION	7
I.2. CLASSIFICATION	8
I.3. THE BIOACTIVE COMPONENT	9
I.3.1. Biocatalytic recognition element	9
I.3.2. Biocomplexing or bioaffinity recognition element.....	11
I.4. TRANSDUCER	14
ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS	14
I.4.1. Amperometric biosensors	15
I.4.2. Potentiometric biosensors.....	16
I.4.3. Conductometric biosensors.....	17
I.4.4. Field-effect transistor (FET) biosensors	17
II. ENZYME AMPEROMETRIC BIOSENSORS	18
II.1. ENZYME KINETICS.....	19
II.2. IMMOBILISATION METHODS.....	21
II.3. MECHANISM OF ACTION	29
II.3.1. Analyte or reactions monitored	29
II.3.2. Reaction mechanism	32
II.4. ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF ENZYME AMPEROMETRIC BIOSENSORS.....	38
III. SCREEN-PRINTED BIOSENSORS	38
III.1. FABRICATION TECHNIQUE.....	38
III.2. ENYZME-MODIFIED SPEs	39
III.2.1. Fabrication of the enzyme-modified SPE	39
III.2.2. Future expectations	40
IV. PRESENT ACHIVEMENTS AND FUTURE PERSPECTIVES IN BIOSENSING.....	40
REFERENCES	44
B. ORIGINAL RESEARCH AND CONTRIBUTIONS	50
I. APPARATUS and METHODS	50
1. Cyclic voltammetry	50
2. Amperometry.....	50
II. HRP BASED BIOSENSORS FOR ACETAMINOPHEN QUANTIFICATION AND SCREENING OF POTENTIAL ANTIDOTES	51
II.1. Enzyme used in biosensors construction, the horseradish peroxidase.....	51
II.1.1. Structure	51
II.1.1.1. Enzyme description	51
II.1.1.2. Three-dimensional structure	52
II.1.2. Mechanism of action	52
II.2. Studied molecules - Acetaminophen	53
II.3. A peroxidase-based biosensor supported by nanoporous magnetic silica microparticles for acetaminophen biotransformation and inhibition studies.....	54
1. Introduction	54
2. Experimental.....	58
2.1. Chemicals.....	58
2.2. Magnetic Particles.....	59
2.3. Enzyme Immobilization	59
2.4. HRP-MMP Electrode	60
2.5. Apparatus and Electrochemical Measurements	61
3. Electrochemical characterization of the HRP-magnetic microparticles biosensor	62
3.1. Amperometric Studies.....	62
3.2 Cyclic Voltammetry	64
3.3 Inhibition Studies	65
4. Conclusion.....	71
II.4. A novel biosensor modified with zirconium alkoxide porous gels for the detection of acetaminophen	72
1. Introduction	72
2. Experimental.....	73
2.1. Chemicals.....	73
2.2. Film preparation	73
2.3. Enzyme immobilization	73
2.4. Electrochemical methods	74
2.5. Microscopy and surface studies	74

3. Electrochemical behavior of the HRP-zirconium alkoxide porous gel film biosensor.....	74
3.1. Biosensor's operation mode.....	74
3.2. Film characterization.....	76
3.3. Biosensor amperometric response.....	80
3.4. Acetaminophen assay.....	85
4. Conclusion.....	86
II.5. HRP – Zirconium alkoxide film modified screen printed electrodes for the development of a biosensor for paracetamol detection.....	87
1. Introduction.....	87
2. Materials and methods.....	89
2.1. Chemicals.....	89
2.2. Film preparation.....	90
2.3. Enzyme immobilization.....	90
2.4. Electrochemical methods.....	90
3. Electrochemical study of the HRP-zirconium alkoxide screen-printed biosensor.....	91
3.1. Film characterization.....	91
3.2. Amperometric testing of the biosensor and its analytical performances.....	94
3.3. Acetaminophen tablets assay.....	97
4. Conclusion.....	98
III. TYROSINASE BASED BIOSENSOR FOR SCREEANING OF SKI WHITENING AGENTS.....	99
III.1. Enzyme used in biosensors construction, the tyrosinase.....	99
III.1.1. Role in melanin synthesis.....	99
III.1.2. Reaction mechanism of tyrosinase.....	99
III.1.3. Inhibitors.....	100
III.2. Tyrosinase substrate and studied inhibitors.....	102
III.3. Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: application to the skin whitening agents.....	103
1. Introduction.....	103
2. Materials and methods.....	106
2.1. Materials.....	106
2.2. Construction of the tyrosinase-NMPS biosensor.....	106
2.3. Apparatus.....	108
2.4. Amperometric assay.....	108
3. Electrochemical characterization of the tyrosinase-nanomagnetic particles biosensor.....	109
3.1. Study of the optimal working conditions of the tyrosinase based biosensor.....	109
3.1.1. Selection of the applied potential.....	109
3.1.2. Selecting the substrate.....	111
3.1.3. Selection of the pH.....	112
3.1.4. Amount of tyrosinase-NMPS spiked onto the CPE.....	113
3.1.5. Selection of the substrate concentration for the inhibition studies.....	114
3.1.6. Michaelis-Menten curve.....	116
3.2. Inhibitors of the enzymatic biosensor.....	117
3.2.1 "True" enzyme inhibitors.....	118
3.2.2 Inhibitors of the melanogenesis process.....	128
3.2.3 Stability and reproducibility.....	130
3.2.4 Easily oxidable compounds.....	130
4. Conclusion.....	132
IV. GENERAL CONCLUSION AND FINAL COMMENTS.....	134
REFERENCES.....	137
ANNEXES.....	144

Key words: amperometric biosensor, magnetic particles, zirconium alkoxide, HRP, acetaminophen, Tyrosinase, skin whitening agents

A. BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW

INTRODUCTION

Improvement of “life quality” is one of the most important objectives of global research efforts. Naturally, the quality of life is closely linked to the control of diseases, drug and food quality and safety, and quality of our environment. In all these fields, a continuous, sensitive, fast and reliable monitoring is required to control key parameters [1]. Biosensors, a new concept of sensors developed during the last 40 years [2], represent very promising tools in this context.

A biosensor, according to the IUPAC definition, is a self-contained integrated device, which is capable of providing specific quantitative or semi-quantitative analytical information using a biological recognition element (biochemical receptor) which is retained in spatial contact with a physical transduction element [3]. Actually they transform the reaction between the analyte and the biological component into a signal detected and monitored by the transducer that reflects the concentration of the substrate.

In the medical field biosensors for glucose, fructose, ethanol, lactate, cholesterol, different blood components (electrolytes, urea, ammonium, glucose or hematocrit), biosensors for protein A and IgG (the immunosensors) have been made [1,4] etc.

AIM

The aim of this thesis is the development and the exploration of enzyme amperometric biosensors which employ the horseradish peroxidase or the tyrosinase as biocomponents, different types of electrodes as transducers (carbon paste electrodes, glassy carbon electrodes or screen printed electrodes) and different techniques for the enzyme immobilization onto the electrode surface (magnetized nanoporous silice microparticles, zirconium alkoxide and polyethyleneimine film and finally streptavidin magnetic particles) applied in the pharmaceutical and biomedical analysis to paracetamol quantification at micromolar concentrations, to the screening of paracetamol antidotes and to the evaluation of the tyrosinase inhibitory action of some skin whitening agents used in depigmentation creams.

B. ORIGINAL RESEARCH AND CONTRIBUTIONS

HRP BASED BIOSENSORS FOR ACETAMINOPHEN QUANTIFICATION AND SCREENING OF POTENTIAL ANTIDOTES

A peroxidase-based biosensor supported by nanoporous magnetic silica microparticles for acetaminophen biotransformation and inhibition studies

A homemade amperometric HRP-based biosensor for the quantification of acetaminophen in pharmaceutical products and the investigation of thiols which are inhibitors of the biosensor's response has been developed.

The HRP immobilization was performed by retention into and onto the surface of nanoporous magnetized silica microparticles. The latter were retained onto the surface of the carbon paste electrode by a magnet. The porous nanostructure of the microparticles permits a high quantity of enzyme loading and their magnetic properties allow the enzyme immobilization in a close proximity to the surface electrode, the beads being attracted by a magnet fixed inside the electrode and being retained at the electrode surface.

This configuration was applied to the study of the biocatalytic oxidation of acetaminophen in the presence of hydrogen peroxide. In the first step, in presence of the hydrogen peroxide, the horseradish peroxidase is oxidized to Compound I. In the next step Compound I in the reaction with acetaminophen will be reduced, generating the initial HRP and N-acetylbenzoquinoneimine (NAPQI). In the last step NAPQI, generated by the HRP-MMPs, is electroreduced to acetaminophen

at the electrode surface and the current is recorded (Figure 1). The recorded amperometric signal is proportional to acetaminophen concentration.

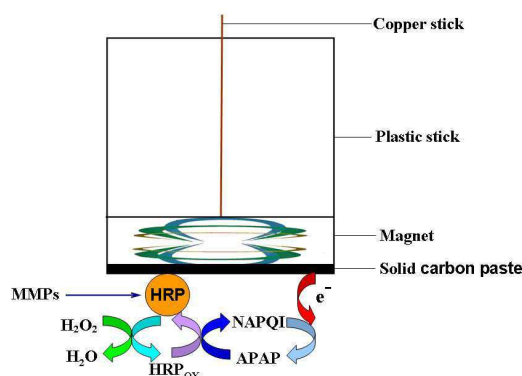


Figure 1. Schematic drawing of acetaminophen (APAP) peroxidation (pH 7.4) at the horseradish peroxidase (HRP) immobilized magnetic microparticles (HRP-MMPs) and subsequent electro-reduction at the magnetized sCPE

The biosensor allowed performing the quantification of acetaminophen in the micromolar concentration range and the comparative study of some thiols derivatives which are known to react with acetaminophen's oxidation product(s) and which are used as detoxifying molecules in case of paracetamol overdose [5]. In the presence of thiols a nucleophilic addition occurs leading to the reduction of NAPQI and subsequently to the reduction of the amperometric signal (Figure 2).

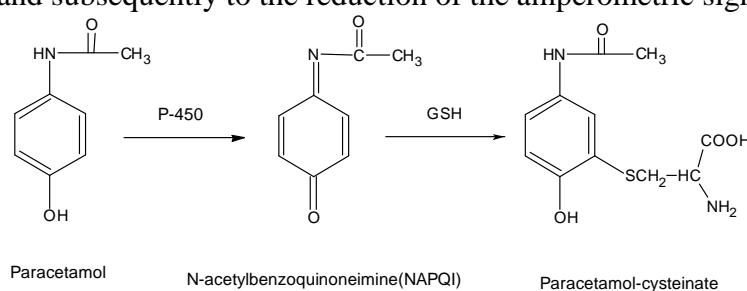


Figure 2. Paracetamol oxidation to NAPQI and subsequent reduction by GSH

A linear trend of current versus APAP concentration was found between 2×10^{-6} and 5.7×10^{-5} M ($R^2 = 0.9993$, RSD of slope = 20%, $n = 5$). The detection limit of this method for acetaminophen is 0,75ng/ml. The biosensor was applied to the assay of APAP in a drug formulation (Perdolan[®]) using the method of standard addition. The results obtained with the biosensor were 198.0 ± 0.8 mg/tablet, $n = 9$. Cyclic Voltammetry (potential range from -0.2 to 0.9 V) was used as a reference method to determine the paracetamol in Perdolan[®] tablets, thus the oxidation currents were measured. The standard addition permitted to determine the content of Perdolan[®]: 199.8 ± 0.6 mg/tablet, $n = 9$. Therefore the obtained results using the biosensor compared favorably with the results obtained by cyclic voltammetric oxidation of APAP at the sCPE and with the declared 200 mg/tablet value.

Different compounds that conjugate with the enzymatically generated oxidation product of acetaminophen, NAPQI, through a sulfhydryl bound, were investigated as potential antidotes in case of acetaminophen overdose. IC_{50} , the concentration of inhibitor inhibiting 50% of the initial signal, was calculated for each studied compound in order to compare their inhibition strength. It appeared that, among the investigated potential antidotes, cysteine was the most potent antidote followed by glutathione, lisinate of N-acetylcysteine, N-acetylcysteine and finally captopril.

The HRP biosensor is an analytical tool that is capable of enzymatically generating reactive oxidized species that can be reduced electrochemically. The HRP magnetized electrode may be used in further investigations to analyze the peroxidation of other drugs and for screening of other inhibitors of the peroxidation process. The ease of the experimental procedure and the availability of HRP make the use of the described HRP magnetized electrode attractive for routine laboratory analyses.

A novel biosensor modified with zirconium alkoxide porous gels for the detection of acetaminophen

The development of composite electrodes for biosensors construction based on HRP, zirconium alkoxide and polyethyleneimine film for acetaminophen detection and finally, acetaminophen quantification in pharmaceutical forms has been performed.

The enzyme immobilization onto the glassy carbon electrode was performed by entrapment in a polyethyleneimine and zirconium alkoxide porous gel film, technique that offers a good entrapping and in the mean times a “protective” environment for the biocomponent.

The operation mode of the HRP-zirconium alkoxide biosensor is based on monitoring the amperometric signal generated by the electrochemical reduction at the electrode surface of the enzymatically oxidized species of acetaminophen, the N-acetyl-parabenzo-quinoneimine (NAPQI) compound.

Film characterization

To study if the ZrO_2 -PEI film blocks the access of the analyte to the electrode surface and if zirconium alkoxide manifests its electrocatalytic activity, cyclic voltammetric studies have been done using an unmodified and a ZrO_2 -PEI film modified GCE. In the case of the modified electrode the signal for acetaminophen oxidation and reduction was smaller in comparison with the unmodified electrode. We can conclude that the film blocks the access of acetaminophen at the electrode surface.

The zirconium alkoxide was expected to manifest its electrocatalytic activity and to have a bigger signal in the case of the film modified electrode. Actually to see if the zirconium alkoxide manifests or not its electrocatalytic activity and if not the PEI blocking of the electrode surface does not counterbalance the electrocatalytic capacity of zirconium, experiments with ZrO_2 -PEI film and PEI film modified GCE have been performed. It was observed that due to the presence of the zirconium alkoxide the oxidation potential was less positive and the reduction potential less negative, approximately with 50mV, thus the presence of zirconium facilitates the electron transfer. The current intensity was 0.5×10^{-6} A smaller in the case of the ZrO_2 -PEI film. The sensitivity of the electrode was also lowered by the presence of the film.

To achieve a complete characterize of the modified electrode and for a better understanding of acetaminophen behavior at the HRP-PEI-GCE and at the HRP- ZrO_2 -PEI-GCE amperometric studies were performed for acetaminophen. A reduced stability of the biosensor in the case of the film without zirconium alkoxide gel in comparison with the film containing zirconium alkoxide was observed. It was caused either by the fast loss of the biocomponent or by the rapid inactivation of the HRP.

It can be assumed that the role of the ZrO_2 alkoxide is to immobilize the enzyme, to preserve the enzyme hydration and to keep the microenvironment unchanged and thus to enhance the life time of the biosensor.

Biosensor amperometric response

The electrocatalytic behavior of the enzymatic biosensor towards the electrochemical reduction of acetaminophen was studied using amperometry. A different behavior was observed when the HRP- ZrO_2 -PEI GC electrode was stored over night in 0.1M phosphate buffer, in a mixture of 1.13×10^{-4} M acetaminophen and 0.2mM H_2O_2 and in a solution of 1.13×10^{-4} M acetaminophen. It can be assumed that this behavior is due to the difference in the hydration of the thin film.

To improve the response of the HRP- ZrO_2 -PEI GC sensor, different quantities of enzyme were immobilized at the electrode surface. An amperometric study made during 18 days proved the fact that by increasing the quantity of the enzyme at the surface of the electrode (from 0.3mg to 0.6 mg) the limit of detection of 1.17×10^{-7} M and the linear range between 1.96×10^{-5} M and 2.55×10^{-4} M of the biosensor are not improved.

Better residuals and better repeatability with the increase of time were observed and this could be explained by film hydration. The loss of biosensor's response in time could be due either to the inactivation or to the loss of the enzyme from biosensor's surface.

Acetaminophen assay

The biosensor was applied to the acetaminophen assay in the drug formulation Perdolan[®] and in Perdolan[®] recovered pharmaceutical form prepared in our department. The standard addition method was used. The addition of the same amount of $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ acetaminophen standard solution, acetaminophen from Perdolan[®] and from Perdolan[®] recovered pharmaceutical form in 5ml 0.1M phosphate buffer pH 7.4 showed a perfect superposition of the corresponding responses. The current was measured after 1 min of acetaminophen addition. In conclusion the developed biosensor can be successfully applied to the quantification of acetaminophen in pharmaceutical forms.

The HRP Zr alcoxide porous gel biosensor may represent an interesting analytical device for investigation of other compounds that can be peroxidated.

HRP – Zirconium alcoxide film modified screen printed electrodes for the development of a biosensor for paracetamol detection

The development of a biosensor design by the immobilization of horseradish peroxidase (HRP) within a zirconium alcoxide film on screen-printed electrodes (SPE) for acetaminophen detection and finally, acetaminophen determination in pharmaceutical products, Perdolan[®] tablets, has been described.

The enzyme immobilization is performed by retention in a polyetilenimine and zirconium alcoxide porous gel film, technique that offers a good entrapping and at the same time a “protective” environment for the biocomponent due to the hydration properties of the immobilization layer. SPE offers the advantages of analytical devices simply mass-produced at low costs with superior characteristics in comparison with the classical electrode materials. In this configuration the zirconium alcoxide demonstrates its electrocatalytic activity.

The biosensor operation mode is based on monitoring the amperometric signal produced by the electrochemical reduction of the enzymatically generated electroactive oxidized species of acetaminophen in the presence of hydrogen peroxide.

Film characterization

Between the classical cell and the SPE there are clear differences. It can be concluded that the SPE has clear advantages compared to the glassy carbon electrode. The catalytic capacity of the zirconium alcoxide in the case of the SPE, the improved electronic transfer between the analyte and the working electrode, and a bigger electrochemical signal in the case of modified SPE in comparison with the unmodified SPE, creates the perspectives of a lower limit of detection and of a higher sensitivity for the amperometric analysis of paracetamol using the HRP biosensor. They have also other advantages. Even in the case of unmodified SPE the intensity of the oxidation and the reduction currents of paracetamol are much bigger compared with the unmodified glassy carbon electrode explained by a bigger diameter and its rugged surface which increases even more its active surface.

Amperometric testing of the biosensor and its analytical performances

The obtained sensitivity on the SPE is much better than the one obtained on the glassy carbon electrode. The two experiments were done using the same technique of fabrication of the biosensor (same composition of the enzymatic film), using the same electrochemical parameters. Even if the electrochemical active surface area of the SPE is bigger then the area of the GCE, the difference of sensitivity between the two electrodes is much bigger then the difference of the two areas, thus the supposition that better sensitivity is due to a bigger active area is excluded.

The biosensor response respected the kinetics of a typical enzymatic process ($K_{M \text{ apparent}} = 1.98 \times 10^{-5} \text{ M}$ and $I_{\text{max}} = -2.30 \times 10^{-6} \text{ A}$). The HRP-ZrO₂-PEI-SPE biosensor's linear trend of current versus paracetamol concentration was found between 4.35×10^{-7} and $4.98 \times 10^{-6} \text{ M}$ in the presence of 0.2mM H₂O₂ in phosphate buffer 0.1M pH=7.4 ($y = -0.2812x - 1 \times 10^{-7}$, $R^2 = 0.990$, RSD of slope=8.27%, n=3) and the LOD and LOQ for paracetamol were $6.21 \times 10^{-8} \text{ M}$ and $2.07 \times 10^{-7} \text{ M}$ respectively.

The amperometric response for a larger concentration interval of paracetamol was tested in terms of intra- and inter-day reproducibility. When not in use, the biosensor was stored in 0.1M phosphate buffer, pH=7.4 at 4°C. During the first determination of the day the amperometric signal was always bigger in comparison with the last two, which always showed a good reproducibility

(R.S.D. of the slopes of the linearized responses by the Lineweaver-Burk method were less than 15%). In order to explain if this phenomena is due to a possible structural modification of the film by the analyte or by its product of enzymatic reaction which has to reach the electrode's surface to be reduced or due to the modification of the potential of the pseudoreference electrode during storage in phosphate buffer, experiments with an external reference Ag/AgCl (3M KCl) electrode were carried out. In the case of the external reference there were no differences between the first and the next experiments. We can conclude that modifications of the surface of the pseudoreference electrode occur during storage and in consequence its potential changes. After one determination probably equilibrium is reached, that is the reason why the next determinations have a good reproducibility. From one day to the other the signal constantly increased probably due to better hydration and re-arrangement of the film on the surface of the SPE.

Acetaminophen tablets assay

The biosensor was applied for the assay of acetaminophen in drug formulation, Perdolan® tablets using the standard addition method. The obtained results ($198.86 \pm 4.19 \text{ mg/tablet}$, $n=5$) are correlated with those obtained with HRP-NMPs (nanomagnetic particles) biosensor ($198.0 \pm 0.8 \text{ mg/tablet}$, $n=9$)²³ and with the amount declared by the manufacturer (200mg/tablet).

Taking in consideration the simplicity of fabrication of this HRP Zr alkoxide porous gel on SPE biosensor, it may represent an interesting analytical device for investigation of other compounds that can be peroxidated and also for inhibitors of the enzymatic system.

TYROSINASE BASED BIOSENSOR FOR SCREENING OF SKI WHITENING AGENTS

Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: application to the skin whitening agents

The immobilization of tyrosinase onto glutaraldehyde activated streptavidine magnetic particles for the amperometric assay of the tyrosinase's "true inhibitors" and of the melanogenesis process inhibitors used as skin whitening agents has been performed.

The biosensor was fabricated using tyrosinase retained onto a magnetized carbon paste electrode, mCPE, via glutaraldehyde activated streptavidine magnetic particles. The employed tyrosinase was the mushroom tyrosinase as it is highly homology with the human enzyme [6]. The substrate used was the L-tyrosine, the enzyme's natural substrate in skin [7] and the investigated inhibitors were kojic acid, azelaic acid, ascorbic acid, the most frequently used active substances in marketed products for hyperpigmentation, and benzoic acid, a well known preservative in the cosmetic industry. The obtained configuration was used to monitor the reduction current of the enzymatically generated oxidized species of L-tyrosine i.e., the dopaquinone, in the presence of molecular oxygen (Figure 3). The presence of inhibitors induced a decrease of the reduction current proportional to the inhibitor concentration and strength. Kojic acid, azelaic acid and benzoic acid bind to tyrosinase active center reducing its catalytic activity, and ascorbic acid interrupts the synthesis pathway of melanin by reducing the melanin intermediate, dopaquinone back to L-dopa [6].

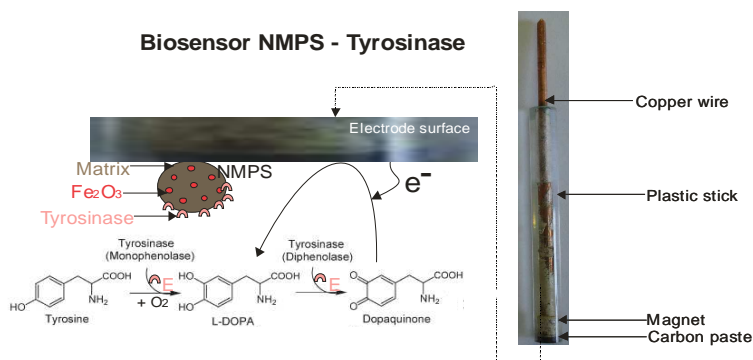


Figure 3. Biosensor's mechanism of action

Optimization of the working conditions

The optimization of the biosensor response was performed and the optimal conditions for L-tyrosine substrate were found to be: 0.1M phosphate buffer pH=6.5, applied potential minus 100 mV, 1.25mg/ml tyrosinase-NMPS suspension spiked onto the surface of the magnetized carbon paste electrode. For the inhibitors evaluation a concentration of 3.33×10^{-4} M L-tyrosine was considered optimal.

Inhibitors of the enzymatic biosensor

The proposed biosensor was intended to test inhibitors that have two different mechanisms of action, namely: true enzyme inhibitors which bind to the active site of the enzyme and inhibitors which consume the dopaquinone intermediate of the melanin synthesis pathway.

Figure 4 illustrates a typical time-dependent response of the tyrosinase-NMPSs biosensor to L-tyrosine substrate followed by stepwise additions of kojic acid. It can be seen that a stable baseline was reached within approximately 600s. By spiking L-tyrosine at second 600 into the cell, a sharp reduction current with a stable steady-state plateau was obtained. Subsequent successive additions of inhibitor into the L-tyrosine solution (3.33×10^{-4} M) decreased the reduction current magnitude, clearly indicating that kojic acid interfered in the formation of dopaquinone at the electrode surface. The inhibition percentage (In%) increased with the inhibitor concentration.

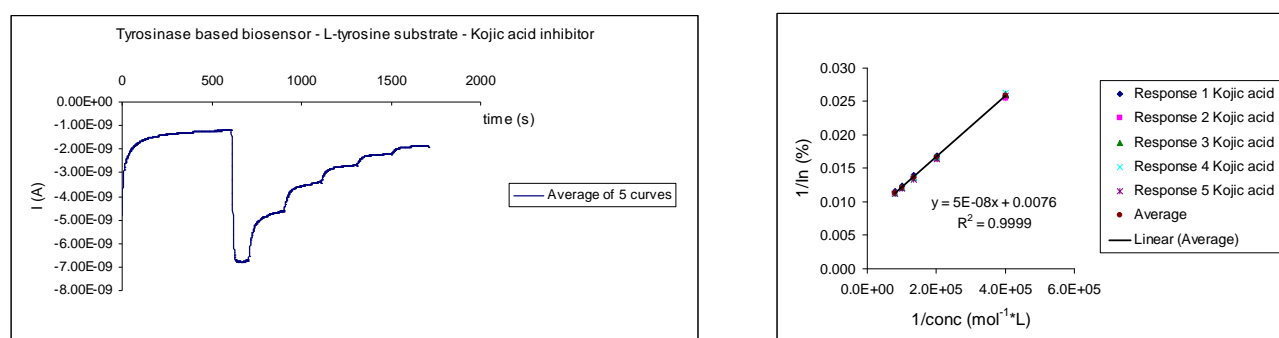


Figure 4. Tyrosinase based biosensor response for L-tyrosine substrate 3.33×10^{-4} M and Kojic acid inhibitor between 2.50×10^{-6} M and 1.24×10^{-5} M in 0.1M phosphate buffer pH=6.5, applied potential -100mV, $10 \mu\text{l}$ 1.25mg/ml tyrosinase-NMPS suspension spiked onto the CPE

By comparing the obtained IC_{50} , in the same experimental conditions, for all the four tested inhibitors, the order of their inhibitory potency was: kojic acid ($\text{IC}_{50} = 3.7 \times 10^{-6}$ M, RSD=1.6, n=5), ascorbic acid ($\text{IC}_{50} = 1.2 \times 10^{-5}$ M, RSD=4.8, n=5), benzoic acid ($\text{IC}_{50} = 7.2 \times 10^{-5}$ M, RSD=1.2, n=5) and azelaic acid ($\text{IC}_{50} = 1.3 \times 10^{-4}$ M, RSD=3.0, n=5). The obtained results are in agreement with the expected ranking of their inhibitory potency, based on their practical utilization and on the general conclusions from the literature.

It should be outlined that the developed device allowed the quantification and the characterization inhibitors from the point of view of their interaction with tyrosinase and the enzymatic reaction in the presence of the natural substrate L-tyrosine. In the skin pigmentation process these compounds may interference also in other biochemical steps having as final result a decrease in melanin formation.

The study of the kinetics and of the mechanism of inhibition of kojic acid, benzoic acid and azelaic acid was also carried out. Actually, for the same inhibitor, I_{max} did not change and K_m^{app} value increased proportionally with the inhibitor concentration, thus all the three tested inhibitors behaved in agreement with a competitive inhibition.

The long-term stability of the immobilized tyrosinase-NMPS was evaluated by measuring the biosensor response in the presence of L-tyrosine (3.33×10^{-4} M) at different time periods. The biosensor retained about 66% of the original response after one week, 46% after the second week, 23% after the third week and 5% after four weeks. Interestingly it was observed that IC_{50} was not affected by the loss of enzyme activity (RSD=1.5). The system presents a good repeatability; the IC_{50} for 5 consecutive determinations gave RSD values of 1.6, 1.2, 3.0 and 4.8 for kojic acid, benzoic acid, azelaic acid and ascorbic acid, respectively. The good repeatability of the results can be explained by the fact that the inhibition signal was normalized to the initial signal of the substrate for

each curve. Thus, the final results are not influenced by the variations of substrate's signal which can occur due to the loss of the enzyme activity or due to random errors that can happen during biosensor's preparation. So even if the enzyme lost its activity quite quickly the evaluation of inhibitory potency of different compounds was not influenced.

This device can't be applied to the evaluation of the inhibitory potency of the easily oxidable compounds that can be oxidized by the iron oxide from the nanomagnetic particles used in the immobilization process of tyrosinase.

Other substances acting through one of the above mentioned mechanisms, blocking the enzyme catalytic activity or reducing agents of the dopaquinone intermediate, should also be able to be evaluated using the developed device which is intended to be used as an analytical method for screening and comparing the inhibitory capacity of potential skin-whitening agents. Taking in consideration the simplicity of fabrication and use of this biosensor, it may represent an interesting and valuable analytical tool especially for the evaluation of tyrosinase - inhibitor affinity.

GENERAL CONCLUSION AND FINAL COMMENTS

The aim of this thesis was to develop enzyme amperometric electrochemical biosensor devices for pharmaceutical and biomedical analysis.

While the concept of biosensors is simple, its commercial realization is far from simple. A lot of such devices are at scientific stage and only a few of the innovative ideas described in the scientific literature have reached the marketplace and they are only limited applied in clinical practice, as for example the well known glucose portable analyzer for home diagnostic[8]. Although the potential of biosensors is recognized, their restraint is frequently caused by the biocomponent, mainly its stability for long-term application and its poor reproducibility. To overcome these problems, frequent calibrations with validated methods are necessary. As a consequence, possible advantages to decide in favor for the biosensor will thereby be diminished. Although new strategies for the immobilization of the biocomponent in order to obtain reproducible, selective and stable biosensors, have successfully been proposed, more effort still need to be undertaken. Furthermore, to improve the stability of enzyme-based biosensors, in the near future it may be possible via new biotechnological processes with better defined and more stable enzymes that can function under stress conditions for a longer period of time [9]. As it can be easily observed biosensor development will continue to focus on miniaturization and multi-analyte detection.

REFERENCES

-
- [1] Castillo J, Gaspar S, Leth S, Niculescu M, Mortari A, Bontidean I, et al. Biosensors for life quality Design, development and applications. *Sens Actuators B* 2004;102:179-194
 - [2] Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann NY Acad Sci* 1962;102:29-45
 - [3] Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and Classification. *Biosens Bioelectron* 2001;16:121-131
 - [4] Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Elskaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *ITBM-RBM* 2008;29:171-180
 - [5] Flanagan RJ, Meredith TJ. Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *Am J Med* 1991;91:131-139
 - [6] Chang TS. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int J Mol Sci* 2009;10:2440-2475
 - [7] Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1707-1723
 - [8] Wang J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *J Pharm Biomed Anal* 1999;19:47-53
 - [9] Campas M, Prieto-Simon B, Marty JL. A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors. *Semin Cell Dev Biol* 2009;20:3-9

VERONICA SIMA married HÂRCEAGĂ

28 years old - married – Driving License B

✉ 193 street Campului
Cluj-Napoca, Cluj, Romania
☎ 0040742029752
vero_sima@yahoo.com

Education

- **2008** **Academic staff - Department of Analytical Chemistry and Instrumental Analysis**
 “Universitatea de medicină și farmacie ”IULIU HAȚIEGANU” Faculty of Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania
- **2007-2008** **Industrial Pharmacy Postgraduate Master**
 “**Master Complémentaire Interuniversitaire Pharmacien d’Industrie**” (graduated with “big distinction”)
 “Université Libre de Bruxelles”, “Université Catholique de Louvain” and “Université de Liège” Belgium
- **2007-...2010** **Clinical Pharmacy Postgraduate Course** (first place at the National Entry Exam, Pharmacy group)
 “Universitatea de medicină și farmacie ”IULIU HAȚIEGANU” Faculty of Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania
- **2006-...2010** **PhD student Department of Analytical Chemistry and Instrumental Analysis**
 “Universitatea de medicină și farmacie ”IULIU HAȚIEGANU” Faculty of Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania
- **2001-2006** **Master’s Degree in Pharmaceutical Sciences**
 “Universitatea de medicină și farmacie ”IULIU HAȚIEGANU” Faculty of Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania
- **1997-2001** **Mathematics-Physics and Bilingual Secondary school**
 “Colegiul Național “Gh. Lazar”, Sibiu, Romania

Professional experience

- **experience in clinical research** – training in **Clinical Research Associate during an intense 3 months training period in the department “Direction de la Zone des Opérations Cliniques (DZOC)” des Laboratoires SERVIER Paris in 2008**
- **scientific research experience** – **Instrumental Analysis Department, Institut de Pharmacie, “Université Libre de Bruxelles” Belgium working with Prof. Dr. Jean-Michel Kauffmann, in 2005, 2008, 2009 and 2010**

Fellowships

- **2010 “Agence Universitaire de la francophonie “ scholarship:** “Bourse de perfectionnement en recherche” for research fellowship in Bruxelles
- **2009 “IN Wallonie Bruxelles International “ scholarship:** “Bourse d’excellence” for research fellowship in Bruxelles
- **2007 “Agence Universitaire de la francophonie “ scholarship:** “Supporting the universities’ excellencies” Inchoate Formation Program for the academic year 2007-2008
- **2007 Scientific Research Scholarship for young PhD students** hold out by The National Romanian Council for Scientific Research in Universities for a period of 3 years (national selection competition)
- **2006 GlaxoSmithKline Business School** (national selection competition)
- **2005 Erasmus-Socrates program of the European Union scholarship** at “Université Libre de Bruxelles” Belgium for a 6 months period

Publications

Articles published in extenso:

a. international:

- first author

Screen-printed electrodes modified with HRP– zirconium alcoxide film for the development of a biosensor for acetaminophen detection

Central European Journal of Chemistry, 2010, 8(5), 1034-1040, Veronica Sima, Cecilia Cristea, Ede Bodoki, Gabriela Dutu, Robert Sandulescu

- first author

Electroanalytical properties of a novel biosensor modified with zirconium alcoxide porous gels for the detection of acetaminophen

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 48 (4-5), 1195-1200, Veronica Sima, Cecilia Cristea, Florina Lapadus, I.O. Marian, Ana Marian, R. Sandulescu (IF=2.629)

- coauthor

A Peroxidase-Based Biosensor Supported by Nanoporous Magnetic Silica Microparticles for Acetaminophen Biotransformation and Inhibition Studies

Electroanalysis, 2006, 18(17), 1637-1642, Donghui Yu, Olga Dominguez Renedo, Bertrand Blankert, Veronica Sima, Robert Sandulescu, J. Arcos, Jean-Michel Kauffmann (IF=2.444)

b. national:

➤ coauthor

The electrochemical behavior of some beta-blockers on screen printed electrodes modified with calixarene

Farmacia 2010, 58(4), 430-446

Gabriela Duțu, Cecilia Cristea, Bodoki Ede, Veronica Harceaga, Alina Saponar, Elisabeth-Jeanne Popovici, Robert Săndulescu

➤ coauthor

Electrochemical behaviour of quercetine and its antioxidant capacity estimation

Acta Electrotehnica 2007, 48, 415-419 (ISSN 1841-3323) S. Mirel, V. Sima, S. Lotrean, V. Mirel, R. Săndulescu

➤ coauthor

Evaluation of the antioxidant capacity of Vaccinium myrtillus and Aronia melanocarpa fruits extracts by voltametry

Acta Universitatis Cibiniensis, seria F, Chemia 2007, vol 10 nr. 2, 119-124 (ISSN 1583-5030), Simona Mirel, Veronica Sima, S. Lotrean, Bianca Cupșa, R. Săndulescu, M. Tămaș

Proceedings published in extenso:

a. international:

➤ coauthor

Modified Screen Printed Electrodes for the Development of Biosensors

IFMBE Proceedings, International Conference on Advancements of Medicine and Health Care through Technology "MediTech 2009", 2009, 26, 89-92, Simona Vlad, R.V. Ciupa, Anca Nicu (Eds), Springer, Cecilia Cristea, E. Bodoki, Veronica Sima, R. Săndulescu

Congresses

Articles published in abstract reviews:

a. international:

➤ **oral presentation:** Drug Analysis, September 21 - 24, 2010, Anvers, Belgium, *Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: application to skin whitening agents*, Veronica Sima Harceaga, Stephanie Patris, Zeynep Aydogmus, Ahmad Sarakbi, Robert Sandulescu, Jean-Michel Kauffmann

➤ poster: MediTech - Advancements of Medicine and Health Care through Technology, September 23 - 26, 2009, Cluj-Napoca, Romania, *Modified screen printed electrodes for the development of biosensors*, Cecilia Cristea, Bodoki Ede, Veronica Sima and Robert Sandulescu

➤ poster: Journée d'Electrochimie, 6-10 juillet 2009, Sinaia, Roumanie, *Développements des biocapteurs sur des électrodes planaires sériographies*, Veronica Sima, Cecilia Cristea, Iuliu Marian, Robert Sandulescu

➤ poster: The 12th International meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, 23-26 September 2007, Elba, Italy, *Analytical properties of a new paracetamol biosensor with zirconium alcoxide porous gels*, Veronica Sima, Cecilia Cristea, Ana Marian, Iuliu Marian, Robert Sandulescu

➤ poster: The 12 International meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, 23-26 September 2007, Italy, *Electroanalytical behavior and voltammetric determination of flavonoids in pharmaceutical dosage forms*, Simona Mirel, Veronica Sima, Valentin Mirel, Radu Oprean, Robert Săndulescu

➤ poster: The 5th Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry, 1-4 may 2007, Dublin, Irlanda, *Development and electroanalytical properties of composite electrodes modified with ZrO₂ nanogels*, Veronica Sima, Cecilia Cristea, Florina Lapadus, I.O. Marian, Robert Sandulescu

➤ poster: Agricultural and food sciences, processes and technologies, 26-27 april 2007, Sibiu, Romania, *Evaluation of the antioxydant capacity of Vaccinium myrtillus and Aronia melanocarpa fruits extracts by voltametry*, Simona Mirel, Veronica Sima, S. Lotrean, Bianca Cupșa, R Sandulescu

➤ poster: **First place in Best Poster Presentation Section** - Pharmacy, 2005 International Mediterranean Student Congress, 29.10.2005 – 31.10.2005 Mersin, Turcia, *Development of a horseradish peroxidase electrode for the study of paracetamol*, Veronica Sima, Donghui Yu, Bertrand Blankert, Simion Lotrean, Robert Sandulescu, Jean-Michel Kauffmann

b. national:

➤ poster: **Locul trei** - The days of University of Medicine and Pharmacy "IULIU HAȚIEGANU" Cluj-Napoca 2006, *Development of an electrode with peroxidase for the study of paracetamol*, Veronica Sima, Donghui Yu, Bertrand Blankert, Simion Lotrean, Robert Sandulescu, Jean-Michel Kauffmann

➤ poster: The 13 National Pharmaceutical Congress 28-30 September 2006, Cluj-Napoca, Romania, section Drug analysis with the work, *A new method for biosensors' construction: comparative study of the enzyme immobilisation techniques*, Veronica Sima, Donghui Yu, Bertrand Blankert, Simion Lotrean, Robert Sandulescu, Jean-Michel Kauffmann

➤ **oral presentation: First place in Scientific Communication Section** - National Pharmaceutical Student Congress 2006, Cluj-Napoca, Romania, *A new technique for biosensors' construction*, Veronica Sima

➤ **oral presentation:** Scientific Communication Section - National Pharmaceutical Student Congress 2004, Cluj-Napoca, Romania, *Artificial ionic channels in analysis*, Veronica Sima

Professional affiliations

➤ Member in research team:

- Research project type CEEX (Excellence scientific research) BIOENZINIT (52-159/2008) 2008-2011 Project leader Prof. Dr. Robert Sandulescu „*Biosensors with enzymes covalently immobilized onto polymers for the analysis of drinking water*”

- Research project type TD (young PhD students) CNCSIS (The National Romanian Council for Scientific Research in Universities) 2008-2009 Project leader Sima Veronica „*Enzymes biosensors for the pharmaceutical and biomedical analyses*”
- Research project type CEEEX (Excellence scientific research) (6/2005) 2005-2008 Project leader Prof. Dr. Robert Sandulescu „*The development and the implementation of electrochemical methods and biosensors for the study of toxic and biological active molecules*”
- Research project type A CNCSIS (A64/2004) 2004-2006 Project leader Prof. Dr. Robert Sandulescu „*The development and the implementation of the composites electrodes for heavy metals detections in drugs*”
- Since 2006 member of The Romanian Society of Pharmaceutical Sciences
- Since 2006 member of National Pharmacists Organization

Languages

- Romanian: mother tongue
- French : “Niveau DELF B2 du cadre européen commun de référence pour les langues, République Française, Ministère de l’éducation nationale, de l’enseignement supérieur et de la recherche, Commission Nationale du DELF et du DALF ” Certificate
- English: Council of Europe Level B2
- German: reading, listening, speaking and writing beginner – DaF1 Certificate

Computer skills

- Adobe Photoshop, Excel, Word, Access, Power Point
- Program SETHI (Suivi des **E**tudes **T**Hérapeutiques **I**nternationales)