



Universitatea „Babeş-Bolyai”  
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică  
Cluj-Napoca



**Teză doctorat**

**PROCEDEE NECONVENȚIONALE DE DETECȚIE  
ELECTROCHIMICĂ A UNOR SPECII CHIMICE  
DE INTERES ÎN BIOTEHNOLOGII ȘI  
PROTECȚIA MEDIULUI**

**Conducător științific:  
Prof. Ionel Cătălin Popescu**

**Doctorandă:  
Lidia Varvari**

**2011**

## Cuprins

|   |    |
|---|----|
| <b>I. Introducere</b> .....   | 1  |
| <b>II. Studiu bibliografic</b> .....  | 1  |
| 1. Electrozi ion-selectivi de tipul PVC-ionofor (EIS-PVC-I) .....                                   | 1  |
| 1.1. Principiul de funcționare a EIS-PVC-I .....  | 1  |
| 1.2. Aplicații ale EIS-PVC-I .....  | 2  |
| 1.2.1. EIS-PVC-I pentru ioni de interes biologic .....  | 2  |
| 1.2.2. EIS-PVC-I pentru ioni de interes în protecția mediului .....                                 | 3  |
| 1.3. Concluzii și perspective .....   | 4  |
| 2. Modalități de determinare a activității antioxidante (AAO) .....                                 | 4  |
| 2.1. Generalități despre antioxidanți (AO) și AAO .....   | 5  |
| 2.2. Metode pentru evaluarea AAO .....  | 5  |
| 2.2.1. Metoda ORAC .....  | 5  |
| 2.2.2. Metoda TRAP .....  | 5  |
| 2.2.3. Metoda PCL .....   | 5  |
| 2.2.4. Metoda bazată pe detecția DPPH .....   | 6  |
| 2.2.5. Metoda Folin-Ciocalteu .....   | 6  |
| 2.3. Concluzii și perspective .....   | 6  |
| <b>III. Rezultate experimentale originale</b> .....   | 6  |
| 1. Comportamentul electrochimic al unor EIS-PVC-I .....   | 7  |
| 1.1. Scopul cercetării .....  | 7  |
| 1.2. Parametrii electroanalitici evaluați .....   | 7  |
| 1.3. Condiții experimentale .....   | 9  |
| 1.4. Rezultate și discuții .....  | 11 |
| 1.5. Concluzii .....  | 17 |
| 2. Evaluarea AAO folosind senzori amperometrici pentru detecția H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..... | 17 |
| 2.1. Principiul de funcționare .....  | 17 |
| 2.1.1. Biosenzorul pe bază de HRP pentru H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                        | 17 |
| 2.1.2. Biosenzorul pe bază de HRP și XOD pentru XA .....  | 18 |
| 2.1.3. Senzorul pe bază de Prussian Blue pentru detecția H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....        | 18 |
| 2.2. Definirea AAO .....  | 19 |
| 2.3. Condiții experimentale .....   | 20 |
| 2.4. Rezultate și discuții .....  | 22 |
| 2.4.1. Caracterizarea bioelectroanalitică .....   | 22 |
| 2.4.1.1. Studiul stabilității G/RP/HRP .....  | 22 |
| 2.4.1.2. Evaluarea parametrilor electroanalitici .....  | 24 |
| 2.4.1.3. Evaluarea AAO a unor probe reale .....   | 27 |
| 2.5. Concluzii .....  | 31 |
| <b>IV. Concluzii generale</b> .....   | 32 |
| <b>V. Bibliografie</b> .....  | 33 |

## **I. Introducere**

Monitorizarea selectivă și precisă a numeroase specii chimice este în atenția laboratoarelor dintr-o varietate de domenii: analize clinice, protecția mediului, controlul calității etc.

Electrozii ion-selectivi de tipul PVC-ionofor (EIS-PVC-I) se pretează foarte bine acestor cerințe. De asemenea, ei prezintă avantajul rapidității măsurărilor, al simplității procedurilor experimentale, al posibilității de miniaturizare și, adesea, al costului redus al materialelor și aparaturii necesare, motive pentru care adesea sunt adesea preferați analizoarelor mai performante, dar foarte costisitoare, precum spectrometrul de masă cu plasmă cuplată inductiv.

Un interes deosebit în domeniul alimentației îl reprezintă monitorizarea antioxidanților (AO), substanțe cu un rol extrem de important în prevenirea unor maladii (cancer, boli cardiovasculare etc.) și în încetinirea unor procese degradative precum îmbătrânirea. În momentul de față există o varietate de metode utilizate în monitorizarea activității antioxidante (AAO). Totuși, datorită, în principal, complexității modului de acțiune a AO, încă nu s-a stabilit o metodă standard pentru evaluarea AAO.

În acest context, lucrarea de față a vizat (i) caracterizarea unor compuși macrociclici – unul [4.4.4.4]ciclofanic și 9 calixarenici – ca și ionofori pentru EIS-PVC-I (incluzând evaluarea comparativă a parametrilor electroanalitici în soluții de:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  și  $\text{Zn}^{2+}$  și (ii) studiul comparativ al unor senzori amperometrici pentru  $\text{H}_2\text{O}_2$ , studiu ce a vizat prepararea, optimizarea, caracterizarea și utilizarea acestor senzori în probe sintetice și reale (vinuri și sucuri de fructe).

## **II. Studiu bibliografic**

### **1. Electrozi ion-selectivi de tipul PVC-ionofor (EIS-PVC-I)**

#### **1.1. Principiul de funcționare a EIS-PVC-I**

Începând din anul 1964, când s-a descoperit că unele antibiotice au proprietatea de a transporta ioni alcalini în mitocondrie, interesul pentru elaborarea, dezvoltarea și utilizarea în diferite domenii a EIS-PVC-I este în continuă expansiune.

Elementul sensibil al EIS-PVC-I îl constituie ionoforul (I), având în general o structură macrociclică, în cavitatea căreia pot pătrunde cationi sau anioni ce leagă preferențial I în funcție de dimensiuni și sarcină<sup>1</sup>. În alcătuirea membranei EIS-PVC-I intră, alături de ionofor, un plastifiant, care joacă un rol esențial în stabilitatea și elasticitatea membranei, o matrice polimerică, care asigură proprietățile mecanice ale membranei, și, adesea, un aditiv ionic, cu rol suplimentar în selectivitatea membranei. Proporțiile componentelor sunt, de regulă, următoarele: ionofor, 0,5-1%; plastifiant, 66%; matrice polimerică, 33%; aditiv ionic, max. 0,5%<sup>1</sup>.

Activitatea ionului de analizat A, având sarcina ionică  $z_A$ , se determină prin măsurarea potențialului de echilibru (E) dintre EIS-PVC-I și un electrod de referință extern. Potențialul E depinde de activitatea ionului A în interiorul membranei (faza organică) și de cea din soluția analizată, conform ecuației lui Nernst:

$$E = E_A^0 + \frac{RT}{z_A F} \ln \frac{a_{A(aq)}}{a_{A(org)}} \quad (1)$$

unde  $E_A^0$  este potențialul standard al speciei A și depinde direct de energia liberă de transfer al ionului A, fiind exprimat în funcție de potențialele chimice standard în cele două faze (schema 2). În condițiile în care membrana are un caracter suficient de lipofil, termenul  $a_{A(org)}$  este considerat constant și se include în expresia pantei din schema 1. Răspunsul EIS-PVC-I este considerat nernstian dacă sensibilitatea acestuia reprezintă  $59/z_A$  mV / decadă de concentrație (pIon). În procesul de generare a potențialului măsurat intervin însă diverse fenomene ce produc deviația sensibilității de la valoarea ideală.

$$E_A^0 = \frac{\mu_{A(aq)}^0 - \mu_{A(org)}^0}{z_A F} \quad (2)$$

Dacă în soluția de analizat sunt prezenți mai mulți ioni, A fiind considerat ionul primar, iar B, cei interferenți, dependența potențialului E de activitățile acestora este dată de ecuația Nernst-Nikolskii-Eisenman, care reprezintă o generalizare a ecuației 1:

$$E = E_A^0 + \frac{RT}{z_A F} \ln(a_A + \sum K_{A,B}^{pot} a_B^{z_A/z_B}) \quad (3)$$

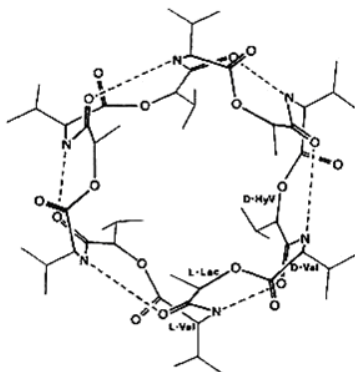
## 1.2. Aplicații ale EIS-PVC-I

### 1.2.1. EIS-PVC-I pentru ioni de interes biologic

O serie de ionofori selectivi pentru cationi de interes biologic, precum:  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  și  $Na^+$ , pentru cationi de metale tranzitionale, cu aplicații în monitorizarea mediului, cum ar fi:  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , dar și pentru ioni moleculari, precum surfactanții anionici,  $ClO_4^-$  și  $NO_3^-$ , vor fi prezentați în cele ce urmează.

### EIS-PVC-I pentru $K^+$

Monitorizarea clinică a  $K^+$  prezintă o importanță deosebită, mai ales în cazul pacienților care suferă modificări semnificative și bruște ale concentrației de  $K^+$ , ca de exemplu în cazul intervențiilor

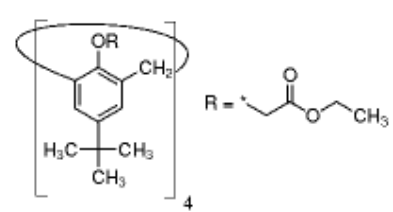


**Figura 1.** Structura valinomicinei

chirurgicale, comei diabetice și arsurilor. Câteva clase de ionofori pentru  $K^+$  menționați în literatura de specialitate sunt eterii (bis-)coroană și ionoforii hemisferanți<sup>2</sup>. Ionoforul cel mai des folosit pentru  $K^+$  este valinomicina (Fig. 1), un antibiotic produs din culturi de *Streptomyces fulvissimu*. Valinomicina prezintă proprietăți deosebite în materie de selectivitate, sensibilitate și timp de răspuns. Dezavantajul său îl constituie lipofilitatea scăzută.

Pentru contornarea acestei probleme, derivați ai

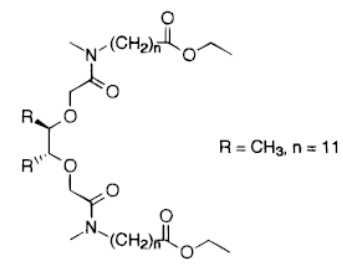
Pentru contornarea acestei probleme, derivați ai



**Figura 2.** Structura esterului de tetraetil acid tetraacetic 4-terț-butilcalix[4]arenic utilizat ca

Ionul de  $Na^+$  joacă un rol fundamental în funcționarea organismului uman, multe afecțiuni fiind cauzate de inversarea raportului concentrațiilor de  $Na^+$  extracelular și  $K^+$  intracelular<sup>3</sup>. Cei mai performanți ionofori pentru  $Na^+$  fac parte din clasa calix[4]arenelor, precum așa-numitul „ionofor X” (Fig. 2).

Monitorizarea este  $Ca^{2+}$  este deosebit de importantă în transplantul de organe și transfuzia de sânge, care pot cauza schimbări rapide ale concentrației de  $Ca^{2+}$ . Proprietăți remarcabile în acest sens prezintă ionoforul „ETH 1001” (Fig. 3), mai ales din punct de vedere al selectivității ( $\log K_{Ca,J}^{pot} = -3,4; -4,4$ , unde J reprezintă  $Na^+$ , respectiv  $Mg^{2+}$ ). Proprietăți asemănătoare ETH 1001 au și compușii didecilsulfat de calciu și bis-di-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenilfosfat de calciu<sup>4</sup>.



**Figura 3.** Structura ETH 1001, utilizat în evaluarea activității  $Ca^{2+}$

### 1.2.2. EIS-PVC-I pentru ioni de interes în protecția mediului

Dezvoltarea industriei în domeniul agriculturii, alimentației, construcțiilor, produselor de igienă și farmaceutice, energiei, transportului etc. a produs un număr impresionant de poluatori chimici ai apelor, aerului și solului. Dintre aceștia, mulți sunt monitorizați cu ajutorul EIS-PVC-I: compuși cu metale grele, surfactanți anionici și cationici, perclorați, etc.

Cuprul este un metal cu numeroase utilizări industriale. Câteva clase de compuși cu proprietăți de ionofori pentru evaluarea activității ionului  $\text{Cu}^{2+}$  sunt tieterii coroană de dimensiuni mici, ionoforii aciclici cu grupări ditiocarbamat și N, calix[4]arenele și bazele Schiff<sup>5</sup>.

Dintre utilizările plumbului, amintim obținerea aliajelor, muniției, petrolului, vopselelor și țevilor. Un număr însemnat de derivați calixarenici funcționalizați cu grupări ce conțin heteroatomii S, Se, N și P, ca de exemplu: tioeteri, tiaamiloxi-, ariliaalchiloxi-, piridil, benzotiazol, baze Schiff sunt menționați în literatură ca ionofori selectivi pentru  $\text{Pb}^{2+}$ <sup>6,7</sup>.

Zincul și compușii săi sunt utilizați pentru numeroase aplicații industriale: baterii, aliaje, catalizatori, explozivi, suplimente nutritive<sup>8</sup>. Monitorizarea  $\text{Zn}^{2+}$  se realizează cu ionofori din diferite clase: derivați ai disulfurilor, calixaren tiamide, benzopolieteri<sup>9</sup>.

Nichelul este folosit la obținerea oțelului, magneților, bateriilor reîncărcabile, aliajelor speciale, dar și în băile de galvanizare și în colorarea sticlei. Ca ionofori selectivi pentru  $\text{Ni}^{2+}$  au fost studiate baze Schiff derivate din liganzi ai salicilaldehidei polidentate, complexii aminici cu 4 atomi de N de diferite dimensiuni<sup>10</sup>, etc.

Cadmiul se folosește, în principal, la acoperirea obiectelor din oțel, fier, etc. cu un strat protector. Se folosește, de asemenea, în bateriile Ni-Cd. Ionoforii menționați în literatură ca fiind selectivi pentru  $\text{Cd}^{2+}$  sunt unii derivați ai eterilor coroană<sup>11</sup>.

Cobaltul, sub formă metalică și de compuși, este utilizat în baterii, aliaje, băi de galvanizare, sticlă cu rezistență la abraziune, agenți de uscare pentru lacuri etc. S-au menționat în literatură unele baze Schiff ca fiind selective pentru  $\text{Co}^{2+}$ <sup>12</sup>.

O aplicație importantă a EIS-PVC-I este evaluarea activității surfactanților anionici, utilizați la scară largă ca agenți de spălare în domeniul casnic și industrial. La ora actuală există ionofori din clasa poliazacilalcanilor pentru măsurarea activității lauril sulfatului și din clasa tetraazacicotetradecanilor pentru monitorizarea dodecil sulfatului<sup>13</sup>.

Ionul  $\text{ClO}_4^-$  se găsește adesea în concentrații mari ( $\geq 1000$  ppm) în apele de suprafață și în pânza freatică, provenind din perclorații folosiți în industria medicală datorită activității sale tirostatice<sup>14</sup>, dar și în industria carburanților, explozivilor, etc. Pentru evaluarea activității  $\text{ClO}_4^-$  există numeroși ionofori neutri constând din complecși ai  $\text{Ni}^{2+}$  sau  $\text{Pt}^{2+}$ <sup>15</sup>.

### 1.3. Concluzii și perspective

Datorită proprietăților lor de excepție privind selectivitatea față de un anumit ion, acuratețea și rapiditatea măsurărilor, simplitatea procedurii experimentale, posibilitatea de miniaturizare, etc., EIS-PVC-I reprezintă o temă de actuală, de interes, iar numărul EIS-PVC-I selectivi pentru diverse specii ionice (anioni și cationi metalici sau nemetalici) este în continuă creștere.

## 2. Modalități de determinare a activității antioxidante (AAO)

## 2.1. Generalități despre antioxidanți (AO) și AAO

AO îndeplinesc o complexitate de roluri și pot avea o mare varietate de structuri chimice. AAO se definește în funcție de o serie de parametri, precum: (i) specia radicalică sau neradicalică neutralizată; (ii) condițiile de lucru: mediu hidrofil/lipofil, timpul de reacție, etc.

Dintre speciile neutralizate de AO, amintim: radicalii superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ), peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ) și speciile reactive cu oxigen („reactive oxygen species”, ROS)<sup>16</sup>, care includ specii neradicalice cu proprietăți oxidante, ca de exemplu:  $H_2O_2$  și  $HOCl$ .

Cercetările în domeniul AO s-au intensificat în ultimii 20 de ani în special datorită descoperirilor efectelor benefice ale AO asupra sănătății umane. În organism, cantitatea excesivă de ROS, datorată acțiunii unor factori precum: poluarea, alimentația nesănătoasă, fumatul, poate produce boli cardiovasculare, cancer, diabet, sindroame inflamatorii și alte afecțiuni<sup>3</sup>. Studiile arată că incidența afecțiunilor amintite scade odată cu creșterea consumului alimentelor bogate în AO. Cât despre suplimentele de AO, păreri sunt împărțite; este totuși cunoscut faptul că un consum excesiv al acestor suplimente poate fi cauza unor procese nedorite, precum dereglarea sistemului imunitar<sup>17</sup>.

## 2.2. Metode pentru evaluarea AAO

### 2.2.1. Metoda ORAC

Această metodă („oxygen radical absorbance capacity”, ORAC) a fost propusă de Glazer (1990)<sup>18</sup>; ea măsoară capacitatea AO de a inhiba oxidarea indusă de  $ROO^{\cdot}$  generat prin descompunerea termică a unui compus azo.  $ROO^{\cdot}$  reacționează cu un substrat fluorescent (fluoresceină, roșu de pirogalol), producând un compus nonfluorescent. Metoda ORAC evaluează AAO folosind ariile de sub curbele ce descriu variația substratului fluorescent în prezența /absența AAO<sup>19</sup>. Valorile ORAC sunt exprimate de obicei în echivalenți Trolox.

### 2.2.2. Metoda TRAP

Metoda „total radical-trapping antioxidant parameter” (TRAP) monitorizează abilitatea AO de a interfera cu reacția dintre  $ROO^{\cdot}$  și un substrat fluorescent, precum acidul linoleic<sup>20</sup> sau  $\beta$ -ficoeritrina. Reacțiile de bază sunt similare celor de la ORAC. Spre deosebire de ORAC, metoda TRAP definește AAO în funcție de timpul de inhibiție, ce reprezintă extinderea, în prezența AO, a timpului necesar apariției substratului oxidat.

### 2.2.3. Metoda PCL

Această metodă are la bază măsurarea fotochemiluminescenței (PCL) produse prin reacția unor specii radicalice cu compuși excitabili fotochimic (luminol, lucigenină). Metoda PCL a fost

comercializată de Analytik Jena AG (Germania), kitul pentru evaluarea PCL fiind denumit „PHOTOCHEM”<sup>21</sup>. Sistemul acesta este extrem de eficient din punctul de vedere al costului; în plus, poate fi utilizat pentru AO hidrofilii și lipofili, la valori multiple de pH și temperatură.

#### **2.2.4. Metoda bazată pe detecția DPPH**

Radicalul DPPH<sup>•</sup> este utilizat ca sursă radicalică în evaluarea AAO<sup>22</sup>, monitorizarea acestuia fiind spectrofotometrică sau electrochimică<sup>23, 24</sup>. În prezența AO, DPPH<sup>•</sup> (culoare violetă) este redus la un compus galben pal; variația absorbției DPPH<sup>•</sup> este măsurată la 517 nm. Valorile AAO sunt exprimate ca și cantitatea de AO ce produce descreșterea DPPH<sup>•</sup> absorbției la 50%. Metoda DPPH este simplă, rapidă, se bazează pe un principiu simplu de detecție, însă o posibilă problemă o reprezintă evaluarea AAO a AO al căror spectru se suprapune cu cel al DPPH<sup>•</sup> (ex: carotenoizii).

#### **2.2.5. Metoda Folin-Ciocalteu**

Metoda Folin-Ciocalteu are la bază oxidarea acestora cu ajutorul unui molibdowolfram (Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>). Din această reacție rezultă O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, care reacționează cu molibdatul, formând ionul (Mo<sup>4+</sup>) (albastru), a cărui absorbție este urmărită spectrofotometric în intervalul 745-750 nm. Reacția are loc în puternic mediu bazic. Ca și AO de referință este utilizat acidul galic<sup>25</sup>. Metoda FC este simplă, specifică și rapidă. Totuși, este nevoie ca pH-ul de lucru să nu fie acid, ceea ce ar cauza reacții lente și nespecifice. O problemă a metodei este lipsa specificității față de polifenoli, fiind detectate, în egală măsură, monofenolii și alte tipuri de compuși ce pot fi reduși. Există o corelație bună în literatură între rezultatele obținute prin metoda Folin-Ciocalteu și cele obținute prin alte metode (ex. DPPH, TEAC), care evaluează o AAO totală<sup>26</sup>.

### **2.3. Concluzii și perspective**

Există o mare varietate de metode prin care se poate determina AAO. Totuși, acest termen este unul relativ, care ține cont de condițiile de reacție: tipul speciei neutralizate; mecanismul de interacțiune între AO și specia neutralizată (transfer de electron sau atom de H); tipul de AAO monitorizată (globală sau specifică pentru polifenoli); metoda de detecție (spectrofotometrică, electrochimică, etc.); tipul mediului de reacție (hidrofil sau lipofil); timpul necesar reacției; modul de interpretare a rezultatelor (parametrii luați în considerare). Această varietate a metodelor pentru evaluarea AAO are, pe lângă dezavantajul că îngreunează stabilirea unei metode standardizate, avantajul posibilității de a surprinde unele aspecte complementare, accesibile doar anumitor metode, a noțiunii complexe de „AAO”.

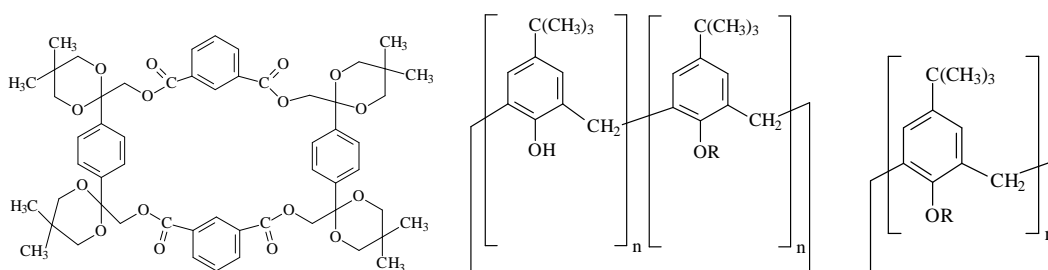
## **III. Rezultate experimentale originale**



# 1. Comportamentul electrochimic al unor EIS-PVC-I

## 1.1.Scopul cercetării

Prima parte a acestui studiu a constat din caracterizarea electroanalitică a 10 compuși macrociclici – un [4,4,4]ciclofan<sup>27</sup> sintetizat în cadrul colectivului de cercetare al prof. Ion Grosu (Catedra de Chimie Organică, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Cluj-Napoca)<sup>28</sup> și 9 derivați din clasa calixarenelor sintetizați în cadrul colectivului de cercetare condus de dr. Elisabeth-Jeanne Popovici (Institutul de Cercetare „Raluca Ripan”) (Fig. 3, Tabelul 1) – în calitate de ionofori pentru EIS-PVC-I<sup>29-33</sup>. În acest scop, EIS-PVC-I pe baza celor 10 compuși macrociclici au fost preparați și utilizați pentru o serie de cationi:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  și  $\text{Zn}^{2+}$ .



**Figura 3.** Structurile compușilor utilizați ca ionofori: stânga: compusul ciclofanic M7F2, mijloc, dreapta: compușii macrociclici

**Tabelul 1.** Structurile grupărilor R și numărul acestora (n) prezente în compușii calixarenici testați

| Denumire compus calixarenic | R | Denumire R          | n | Denumire compus calixarenic | R | Denumire R    | n |
|-----------------------------|---|---------------------|---|-----------------------------|---|---------------|---|
| <b>C4Es2Cr2</b>             |   | ester, crotil       | 2 | <b>C6Es3Cr3</b>             |   | ester, crotil | 3 |
| <b>C4P4</b>                 |   | fosfat-difenil      | 4 | <b>C6Cr3Am3</b>             |   | crotil, amidă | 3 |
| <b>C4PO4</b>                |   | fosfat-difenilester | 4 | <b>C6Am3</b>                |   | amidă         | 3 |
| <b>C6Es6</b>                |   | ester               | 6 | <b>C8Es8</b>                |   | ester         | 8 |
| <b>C6Es3</b>                |   |                     | 3 |                             |   |               |   |

## 1.2.Parametrii electroanalitici evaluați

## Sensibilitatea

Sensibilitatea (S) reprezintă parametrul ce exprimă variația potențialului de electrod în funcție de logaritmul activității ionice a analitului și este exprimată în mV/decadă de activitate (pIon). Formula de calcul a S este dată mai jos:

$$S = \frac{E_1 - E_2}{\log(a_1 / a_2)} \quad (9)$$

unde  $E_1$  și  $E_2$  sunt valorile de potențial între care se face evaluarea S, ambele aflate în domeniul de linearitate (vezi mai jos), iar  $a_1$  și  $a_2$  sunt activitățile ionice corespunzătoare potențialelor  $E_1$ , respectiv  $E_2$ .

Valorile S, în mod ideal date de raportul  $59/z_A$  mV/pIon<sup>34</sup>, au fost evaluate din fitarea liniară a curbelor de calibrare reprezentând dependența E de logaritmul activității ionice a speciei de interes sau, în cazul când nu s-au înregistrat suficiente valori ale E, de diferența între acestea pentru activitățile ionice luate în considerare.

## Limita de detecție

Limita de detecție (LD) reprezintă activitatea analitului aflată la intersecția extrapolărilor porțiunilor liniare ale curbei de calibrare<sup>35, 36</sup>.

## Domeniul de linearitate

Domeniul de linearitate (DL) reprezintă intervalul activităților de analit în care potențialul de electrod depinde liniar de logaritmul activității speciei utilizate. DL a fost calculat ca fiind intervalul cuprins între LD și limita superioară a domeniului de activități testate, dacă pătratul coeficientului de corelație liniară pe intervalul luat în calcul a fost cel puțin 0,99; în caz contrar, ca limită superioară s-a luat în considerare activitatea maximă de analit care a îndeplinit această cerință.

## Coeficientul de selectivitate

Coeficientul de selectivitate ( $K_{A,B}^{pot}$ ) este un parametru ce exprimă abilitatea electrodului de a răspunde preferențial la ionul primar A, față de interferenții B<sup>37</sup>. Conform ecuației Nernst-Nikolskii-Eisenmann, dacă termenul  $K_{A,B}^{pot}$  are valoare subunitară, electrodul este selectiv pentru A, iar dacă este supraunitar, electrodul este selectiv față de B<sup>38</sup>:

$$E = E_A^0 + \frac{RT}{z_A F} \ln(a_A + \sum K_{A,B}^{pot} a_B^{z_A / z_B}) \quad (10)$$

Evaluarea selectivității EIS-PVC-I s-a realizat în soluții mixte, conținând atât ionul primar cât și cel interferent, fiind variată concentrația unuia din cei doi ioni. Formula de calcul a  $K_{A,B}^{pot}$  este cea de mai jos:

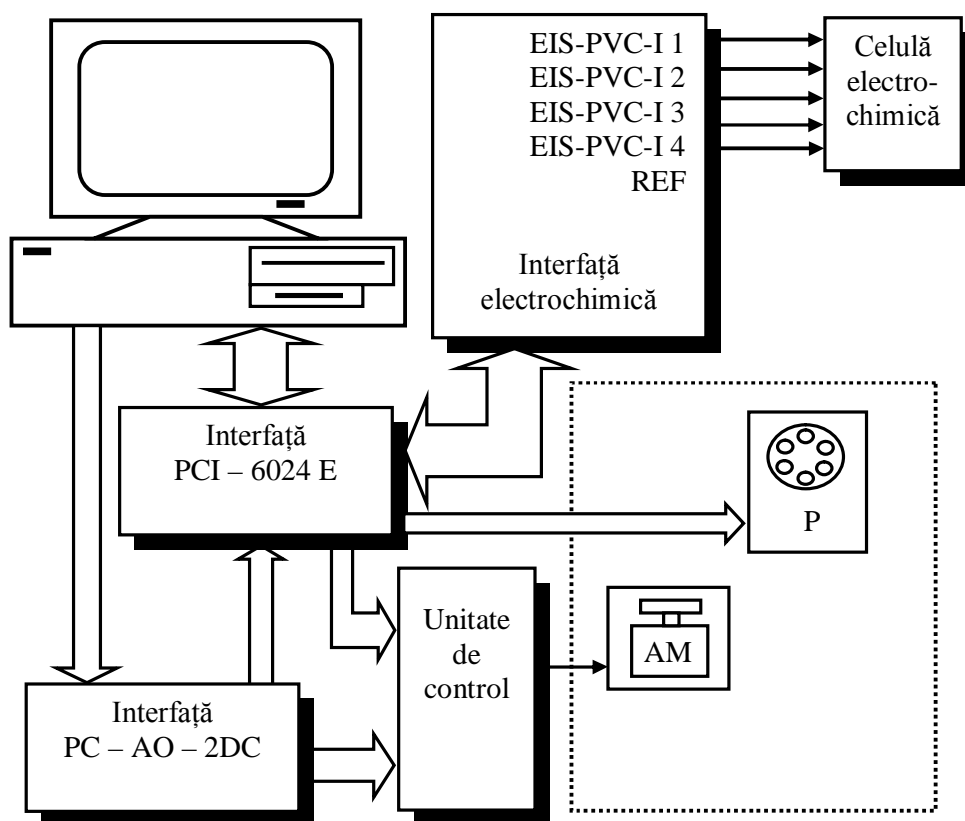
$$K_{A,B}^{pot} = \frac{a_A}{a_B^{z_A/z_B}} \quad (11)$$

unde  $a_A$  și  $a_B$  reprezintă activitățile ionice ale ionului primar, respectiv interferent în momentul decelării interferenței.

### 1.3. Condiții experimentale

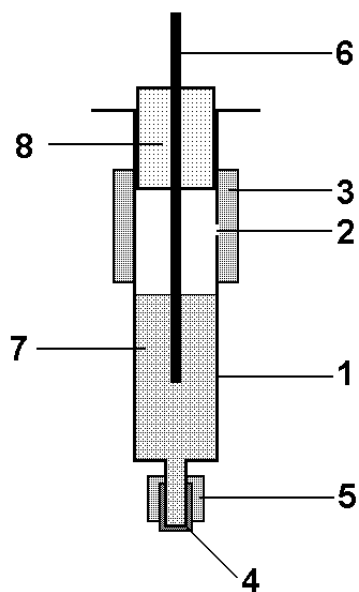
#### Dispozitivul experimental

Măsurătorile potențimetrice realizate s-au efectuat cu ajutorul unui stand de măsurători electrochimice controlat de calculator (Fig. 4)<sup>39</sup> care permite efectuarea automată a 17 adaosuri de soluție standard concentrată într-una diluată, volumele adăugate fiind presetate în așa fel încât să permită distribuția uniformă a punctelor experimentale ca funcție a logaritmului activității ionice.



**Figura 4.** Schema dispozitivului experimental pilotat de calculator utilizat în măsurătorile potențimetrice

EIS-PVC-I au fost conectați la sistemul de achiziție de date prin intermediul unei interfețe electrochimice cu patru canale având o impedanță de intrare foarte mare ( $> 10^{12}$  ohm). Interfața electrochimică precum și pompa peristaltică (P) folosită pentru efectuarea adaosurilor de soluție standard au fost conectate la calculator prin intermediul unei interfețe PCI-6024 E (National Instruments, SUA). Omogenizarea soluțiilor după fiecare adaos s-a efectuat cu ajutorul unui agitator magnetic (AM), a cărui funcționare a fost controlată cu ajutorul unei unități de control conectată la calculator prin intermediul interfeței PC-AO-2DC (National Instruments, SUA).



**Figura 5.** Componentele EIS-PVC-I: 1-corpul EIS-PVC-I; 2-orificiu de aerisire; 3-inel de cauciuc pentru obturarea orificiului; 4-membrană ion-selectivă; 5-inel de cauciuc pentru fixarea membranei; 6-electrod de referință intern Ag/AgCl; 7-soluție de referință internă; 8-dop cu filet pentru fixarea electrodului de referință

Controlul sistemului și achiziția datelor s-au realizat folosind aplicații elaborate cu ajutorul programului LabView 5.1 (National Instruments, SUA), iar datele experimentale obținute au fost prelucrate cu ajutorul programului Origin 6.0.

Celula electrochimică a conținut 4 EIS-PVC-I și un electrod de referință extern de calomel saturat cu dublă joncțiune (Radelkis, Budapesta) având, ca joncțiune internă, o soluție saturată de KCl, iar ca joncțiune externă o soluție de  $\text{CH}_3\text{COOLi}$  0,1 M. EIS-PVC-I (Fig. 5) au fost construiți artizanal din corpuri de seringă de volum 1 ml, care au fost umplute cu o soluție de referință internă (soluții ionice de clorura cationului investigat,  $\sim 5$  mM) și în care s-a introdus un electrod de referință intern, constând dintr-un fir de Ag pe care s-a depus electrochimic un strat de AgCl. La capătul inferior al seringilor s-au fixat, cu ajutorul unor inele de cauciuc siliconic, discuri de membrană cu diametru de 8 mm.

## Reactivi

Pentru prepararea membranelor EIS-PVC-I s-au utilizat următorii reactivi: compușii macrociclici studiați (ionofori); tetrakis(4-clorofenil)borat de potasiu (KTKClPB), Fluka, 60591 (aditiv ionic); 2-nitrofenil octil eter (o-NPOE), Fluka, cod 73732 (plastifiant); clorură de polivinil (PVC), Fluka, cod 81392 (matrice polimerică); tetrahidrofuran (THF), Fluka, cod 87369 (solvent).

Pentru efectuarea măsurătorilor s-au preparat soluții de diferite concentrații prin dizolvarea în apă bidistilată a următoarelor săruri: LiCl, NaCl, KCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , CsCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COOLi}$ , utilizându-se reactivi p.a. obținuți de la Fluka, Merck, Sigma sau Chimopar.

## Prepararea membranelor EIS-PVC-I

Compoziția membranelor EIS-PVC-I a fost următoarea: 0,7 sau 1% ionofor: 1% pentru toți compușii calixarenici și 0,7 sau 1% pentru M7F2 (electrozii corespunzători purtând denumirea M7F2(a), respectiv M7F2); 0,3% aditiv ionic (KTKClPB), în cazul membranei M7F2(a); 33% matrice polimerică (PVC) și 66% plastifiant (o-NPOE)(procente de masă). Masa totală a unei membrane a fost de ~1,5 g.

Masele necesare de ionofor, aditiv ionic și matrice polimerică, cântărite cu ajutorul unei balanțe analitice cu precizie de  $\pm 0,1$  mg, precum și volumul necesar de plastifiant (1,0 ml) au fost dizolvate succesiv în 2 ml de THF. Amestecul a fost supus agitării până la dizolvarea componentelor solide, după care a fost turnat într-un inel cilindric de sticlă ( $\Phi = 4,8$  cm) și lăsat să se usuce lent, timp de 24 ore, sub un clopot de sticlă, într-o atmosferă saturată de vapori de THF pentru a se evita formarea de bule în masa membranei. După uscare, membrana a fost „maturată” încă 24 de ore în aer liber, la întuneric, până la completa evaporare a solventului. Ulterior, cu ajutorul unei preducele, s-au decupat discuri de membrană cu diametrul de 8 mm, care au fost fixate pe corpurile de electrod, după care au fost condiționate în soluții 1 mM din clorurile cationilor investigați.

## Procedura de lucru

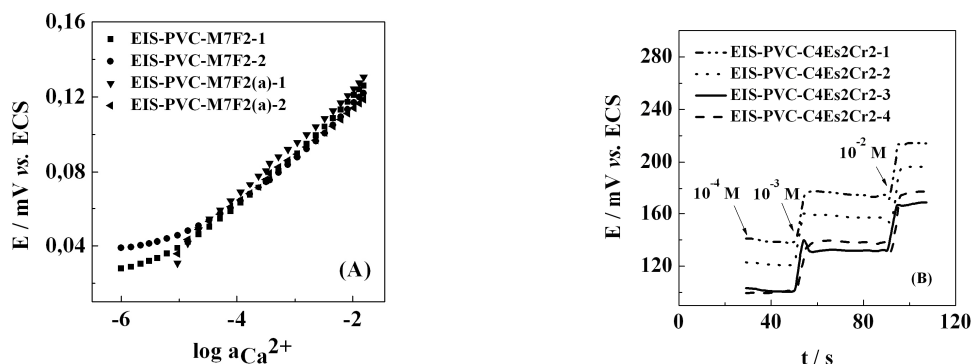
Evaluarea sensibilității, domeniului de linearitate și limitei de detecție s-a realizat folosind soluții cationice separate. Măsurătorile au constat din înregistrarea potențialelor de electrod în funcție de timp, iar din corelarea potențialelor obținute cu activitatea ionică corespunzătoare s-au obținut curbele de calibrare corespunzătoare. Măsurarea potențialelor s-a realizat folosind fie așa-zisa metodă a adaosului standard automat (conform procedurii tehnice descrisă în paragraful 1.3.1.), fie metoda adaosului standard manual, care necesită o procedură experimentală simplificată, măsurătorile constând din efectuarea manuală a 2 adaosuri standard succesive într-o soluție ionică diluată. Prin această metodă s-au înregistrat potențialele corespunzătoare concentrațiilor  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  și  $10^{-2}$  M, panta fiind citită între valorile  $10^{-3}$  și  $10^{-2}$  M. Pentru toate tipurile de măsurători, s-au preparat și utilizat în paralel doi sau patru EIS-PVC-I având compoziție similară, așa după cum se specifică în fiecare caz. Fiecare măsurătoare a fost repetată cel puțin de două ori succesiv în aceleași condiții experimentale, rezultatele fiind redată ca medie împreună cu deviația standard (DS) a acesteia.

## 1.4. Rezultate și discuții

În funcție de numărul și tipul grupărilor care intră în alcătuirea lor, cavitatea compușilor macrociclici utilizați ca ionofori capătă dimensiuni distincte, care determină afinități specifice pentru diferiți cationi. Pe baza acestor corelații, compușii macrociclici studiați au fost utilizați în prepararea de membrane EIS-PVC-I pentru diferite clase de cationi mono- și bivalenți făcând parte din categoria

elementelor alcaline, alcalino-pământoase și tranziționale, la care s-a adăugat ionul amoniu, care prezintă interes deosebit în domeniul biologic și ecologic.

Un tablou sintetic al măsurătorilor efectuate este prezentat în Tabelul 3, în care „P” indică faptul că ionul respectiv a fost utilizat ca ion primar pentru compusul macrociclic corespunzător; „am” și „aa” indică metoda de lucru – adaos manual [ex. Fig. 7(A)] sau automat [ex. Fig. 7(B)]; „ $I_{Me}$ ” indică ionul interferent, iar Me, pe cel primar; „-” indică faptul că tipul respectiv de experiment nu a fost realizat. Tabelele 4 – 6 prezintă sintetic parametri electroanalitici evaluați: sensibilitate, limită de detecție, domeniu de linearitate și coeficient de selectivitate.



**Figura 6.** (A) Dependența potențialului de electrod de logaritmul activității ionice urmărită cu EIS-PVC-M7F2 și EIS-PVC-M7F2(a); (B) Variația în timp a potențialului de electrod înregistrat cu EIS-PVC-C4Es2Cr2 în soluții de  $\text{Na}^+$   $10^{-4} \text{ M}$  la care s-au efectuat manual adaosuri standard de  $\text{Na}^+$   $1 \text{ M}$

**Tabelul 3.** Rezumatul măsurătorilor efectuate asupra compușilor macrociclici în calitate de ionofori pentru EIS-PVC-I

| <b>Cation</b>                     | <b>M7F2,<br/>M7F2(a)</b> | <b>C4Es2Cr2</b> | <b>C4P4</b>             | <b>C4PO4</b> | <b>C6Es6</b>           | <b>C6Es3</b>            | <b>C6Es3Cr3</b>         | <b>C6Cr3Am3</b> | <b>C6Am3</b> | <b>C8Es8</b> |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|--------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|--------------|--------------|
| <b>Li<sup>+</sup></b>             | -                        | -               | -                       | -            | P (aa)                 | -                       | -                       | -               | -            | -            |
| <b>Na<sup>+</sup></b>             | P (aa), I <sub>Ca</sub>  | P (am)          | P (am), I <sub>Ca</sub> | P (am)       | P (aa), I <sub>K</sub> | P (aa)                  | P (aa)                  | P (am)          | P (am)       | P (am)       |
| <b>K<sup>+</sup></b>              | P (aa), I <sub>Ca</sub>  | P (am)          | P (am), I <sub>Ca</sub> | P (am)       | P (aa)                 | P (am), I <sub>Na</sub> | P (am), I <sub>Na</sub> | P (am)          | P (am)       | P (am)       |
| <b>Cs<sup>+</sup></b>             | -                        | -               | -                       | -            | P (aa), I <sub>K</sub> | -                       | -                       | -               | -            | -            |
| <b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> | -                        | -               | -                       | -            | P (aa), I <sub>K</sub> | -                       | -                       | -               | -            | -            |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b>            | P (aa), I <sub>Ca</sub>  | P (am)          | P (am), I <sub>Ca</sub> | P (am)       | P (aa)                 | P (am), I <sub>Na</sub> | P (am), I <sub>Na</sub> | P (am)          | P (am)       | P (am)       |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>            | P (aa)                   | P (am)          | P (am)                  | P (am)       | P (aa)                 | P (am), I <sub>Na</sub> | P (am), I <sub>Na</sub> | P (am)          | P (am)       | P (am)       |
| <b>Ba<sup>2+</sup></b>            | -                        | P (am)          | P (am), I <sub>Ca</sub> | P (am)       | -                      | -                       | -                       | P (am)          | P (am)       | P (am)       |
| <b>Co<sup>2+</sup></b>            | -                        | -               | -                       | -            | -                      | P (aa)                  | P (aa)                  | -               | P (aa)       | -            |
| <b>Ni<sup>2+</sup></b>            | -                        | -               | -                       | -            | -                      | P (aa)                  | P (aa)                  | -               | P (aa)       | -            |
| <b>Zn<sup>2+</sup></b>            | -                        | -               | -                       | -            | -                      | P (aa)                  | P (aa)                  | -               | P (aa)       | -            |

**Tabelul 4.** Valorile sensibilităților (mV/pIon) evaluate pentru EIS-PVC-I pe bază de compuși macrociclici

| <b>Cation</b>                     | <b>M7F2,<br/>M7F2(a)</b> | <b>C4Es2Cr2</b> | <b>C4P4</b> | <b>C4PO4</b> | <b>C6Es6</b> | <b>C6Es3</b> | <b>C6Es3Cr3</b> | <b>C6Cr3Am3</b> | <b>C6Am3</b> | <b>C8Es8</b> |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|
| <b>Li<sup>+</sup></b>             | -                        | -               | -           | -            | 25,8 ± 3,6   | -            | -               | -               | -            | -            |
| <b>Na<sup>+</sup></b>             | 57,7 ± 7,0<br>39,8 ± 5,4 | 52,0 ± 0,5      | 20,8 ± 1,2  | 33,5 ± 0,5   | 55,8 ± 3,4   | 66,2 ± 4,1   | 57,8 ± 3,2      | 44,0 ± 2,0      | 42,5 ± 4,0   | 40,2 ± 0,2   |
| <b>K<sup>+</sup></b>              | 37,0 ± 5,1<br>39,3 ± 4,9 | 46,5 ± 2,0      | 25,0 ± 0,5  | 6,0 ± 2,0    | 51,9 ± 2,5   | 47,8 ± 0,7   | 44,5 ± 1,5      | 53,8 ± 1,2      | 46,0 ± 7,0   | 51,8 ± 0,8   |
| <b>Cs<sup>+</sup></b>             | -                        | -               | -           | -            | 29,2 ± 2,2   | -            | -               | -               | -            | -            |
| <b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> | -                        | -               | -           | -            | 52,9 ± 3,0   | -            | -               | -               | -            | -            |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b>            | 5,2 ± 0,4<br>32,6 ± 5,2  | 11,8 ± 0,2      | 18,0 ± 2,5  | 5,0 ± 2,0    | 12,2 ± 1,0   | 7,3 ± 1,9    | 8,8 ± 1,3       | 7,5 ± 0,5       | 4,5 ± 2,0    | 8,5 ± 0,5    |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>            | 29,0 ± 2,0<br>26,8 ± 1,1 | 21,0 ± 0,0      | 22,5 ± 1,0  | 4,5 ± 2,0    | 16,3 ± 2,7   | 11,4 ± 2,5   | 11,9 ± 3,6      | 8,0 ± 0,0       | 24,2 ± 0,2   | 11,5 ± 3,5   |
| <b>Ba<sup>2+</sup></b>            | -                        | 23,0 ± 0,0      | 14,8 ± 0,8  | 6,8 ± 0,2    | -            | -            | -               | 11,5 ± 1,0      | 25,8 ± 0,8   | 18,2 ± 0,2   |
| <b>Co<sup>2+</sup></b>            | -                        | -               | -           | -            | -            | 28,2 ± 9,5   | 21,1 ± 6,5      | -               | 23,2 ± 1,2   | -            |
| <b>Ni<sup>2+</sup></b>            | -                        | -               | -           | -            | -            | 48,5 ± 0,7   | 40,0 ± 2,8      | -               | 43,5 ± 0,7   | -            |
| <b>Zn<sup>2+</sup></b>            | -                        | -               | -           | -            | -            | 38,5 ± 1,7   | 23,3 ± 0,6      | -               | 29,0 ± 1,2   | -            |



**Tabelul 5.** Domeniile de linearitate (pIon) și limitele de detecție (mM) evaluate pentru EIS-PVC-I pe bază de compuși macrociclici

| Para-<br>metru               | DL (pIon)       |       |       |          |       | LD (mM)  |                       |                       |                       |       |
|------------------------------|-----------------|-------|-------|----------|-------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------|
|                              | M7F2<br>M7F2(a) | C6Es6 | C6Es3 | C6Es3Cr3 | C6Am3 | M7F2<br>M7F2(a)                                | C6Es6                 | C6Es3                 | C6Es3Cr3              | C6Am3 |
| Li <sup>+</sup>              | -               | 3,55  | -     | -        | -     | -  | 9,33*10 <sup>-2</sup> | -                     | -                     | -     |
| Na <sup>+</sup>              | 3,04<br>1,58    | 2,45  | 2,68  | 2,66     | -     | 3,02*10 <sup>-1</sup><br>8,62                  | 1,17                  | 6,88*10 <sup>-1</sup> | 7,24*10 <sup>-1</sup> | -     |
| K <sup>+</sup>               | 1,92<br>3,43    | 3,37  | -     | -        | -     | 4,00<br>1,23*10 <sup>-1</sup>                  | 1,41*10 <sup>-1</sup> | -                     | -                     | -     |
| Cs <sup>+</sup>              | -               | 4,17  | -     | -        | -     | -  | 2,23*10 <sup>-2</sup> | -                     | -                     | -     |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | -               | 3,59  | -     | -        | -     | -  | 8,60*10 <sup>-2</sup> | -                     | -                     | -     |
| Mg <sup>2+</sup>             | -<br>1,78       | 2,79  | -     | -        | -     | -<br>5,42                                      | 5,41*10 <sup>-1</sup> | -                     | -                     | -     |
| Ca <sup>2+</sup>             | 4,17<br>4,23    | 2,17  | -     | -        | -     | 2,22*10 <sup>-2</sup><br>1,92*10 <sup>-2</sup> | 2,24                  | -                     | -                     | -     |
| Co <sup>2+</sup>             | -               | -     | 1,93  | 2,04     | 1,64  | -  | -                     | 3,91                  | 3,02                  | 7,52  |
| Ni <sup>2+</sup>             | -               | -     | 2,33  | 2,20     | 1,91  | -  | -                     | 1,56                  | 2,07                  | 4,05  |
| Zn <sup>2+</sup>             | -               | -     | 2,11  | 2,45     | 1,98  | -  | -                     | 2,54                  | 1,18                  | 3,49  |

**Tabelul 6.** Logaritmi coeficienților de selectivitate evaluați pentru EIS-PVC-I pe bază de compuși macrociclici

| <b>Cation interferent</b>         | <b>M7F2<br/>M7F2(a)</b>  | <b>C4P4</b>   | <b>C6Es6</b>   | <b>C6Es3</b>  | <b>C6Es3Cr3</b>   |
|-----------------------------------|--|---|--|---|---|
| <b>Na<sup>+</sup></b>             | $\log K_{Ca,Na}^{pot} = 1,4$<br>$\log K_{Ca,Na}^{pot} = 2,2$<br>([Ca <sup>2+</sup> ] = 5*10 <sup>-3</sup> M)   | $\log K_{Ca,Na}^{pot} = -0,6$<br>([Na <sup>+</sup> ] = 10 <sup>-1</sup> M)  | $\log K_{K,Na}^{pot} = -1,2$<br>([K <sup>+</sup> ] = 10 <sup>-2</sup> M)   | -   | -   |
| <b>K<sup>+</sup></b>              | $\log K_{Ca,K}^{pot} = 1,3$<br>$\log K_{Ca,K}^{pot} = 4,6$<br>([Ca <sup>2+</sup> ] = 5*10 <sup>-3</sup> M)     | $\log K_{Ca,K}^{pot} = 1,8$<br>([K <sup>+</sup> ] = 10 <sup>-2</sup> M)     | -  | $\log K_{Na,K}^{pot} = 1,4$<br>([K <sup>+</sup> ] = 10 <sup>-4</sup> M) | $\log K_{Na,K}^{pot} = 1,5$<br>([K <sup>+</sup> ] = 10 <sup>-4</sup> M) |
|                                   |  |   |  | $\log K_{Na,K}^{pot} = 0,4$<br>([K <sup>+</sup> ] = 10 <sup>-2</sup> M) | $\log K_{Na,K}^{pot} = 0,1$<br>([K <sup>+</sup> ] = 10 <sup>-2</sup> M) |
| <b>Cs<sup>+</sup></b>             | -  | -   | $\log K_{K,Cs}^{pot} = -0,5$<br>([K <sup>+</sup> ] = 10 <sup>-2</sup> M)   | -   | -   |
| <b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> | -  | -   | $\log K_{K,NH_4}^{pot} = -0,8$<br>([K <sup>+</sup> ] = 10 <sup>-2</sup> M) | -   | -   |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b>            | $\log K_{Ca,Mg}^{pot} = -0,3$<br>$\log K_{Ca,Mg}^{pot} = -0,4$<br>([Ca <sup>2+</sup> ] = 5*10 <sup>-3</sup> M) | $\log K_{Ca,Mg}^{pot} = -0,6$<br>([Mg <sup>2+</sup> ] = 10 <sup>-3</sup> M) | -  | $\log K_{Na,Mg}^{pot} = -3,6$<br>([Mg <sup>2+</sup> ] = 1 M)            | $\log K_{Na,Mg}^{pot} = -3,2$<br>([Mg <sup>2+</sup> ] = 1 M)            |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>            | -  | -   | -  | $\log K_{Na,Ca}^{pot} = -3,1$<br>([Ca <sup>2+</sup> ] = 1 M)            | $\log K_{Na,Ca}^{pot} = -2,5$<br>([Ca <sup>2+</sup> ] = 1 M)            |
| <b>Ba<sup>2+</sup></b>            | -  | $\log K_{Ca,Ba}^{pot} = -2,1$<br>([Ba <sup>2+</sup> ] = 10 <sup>-1</sup> M) | -  | -   | -   |

## 1.5. Concluzii

În urma studiului parametrilor electroanalitici a zece compuși macrociclici, și anume un [4,4,4,4]ciclofan sintetizat în cadrul colectivului de cercetare al prof. Ion Grosu (Catedra de Chimie Organică, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Cluj-Napoca) și nouă compuși calixarenici sintetizați în cadrul Institutului de Cercetare „Raluca Ripan” (Cluj-Napoca), s-a constatat că marea lor majoritate prezintă proprietăți ion-selective, după cum urmează:

- Compusul M7F2, atât în forma cu aditiv, cât și în cea fără aditiv ionic, prezintă selectivitate pentru  $\text{Ca}^{2+}$  în raport cu cationul  $\text{Mg}^{2+}$  și ar putea fi valorificat ca ionofor pentru evaluarea activității  $\text{Ca}^{2+}$  din soluții cu nivel scăzut de  $\text{Na}^+$  și  $\text{K}^+$
- Compusul C4Es4Cr2 poate fi utilizat la elaborarea de EIS-PVC-I pentru determinarea activității  $\text{Na}^+$ , necesitând optimizarea compoziției membranei și a condițiilor experimentale.
- Compusul C4P4 poate fi utilizat la construcția de EIS-PVC-I pentru determinarea activităților  $\text{Ca}^{2+}$  și  $\text{K}^+$ , dar numai în situația în care cei doi cationi nu sunt prezenți simultan în mediul investigat.
- Compusul C4PO4 prezintă slabe proprietăți electroanalitice, răspunsurile înregistrate fiind net sub-nernstiene pentru toți cationii investigați.
- Compusul C6Es6 prezintă răspuns cvasi-nernstian pentru  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  și  $\text{Na}^+$  și un comportament selectiv pentru  $\text{K}^+$ , putând fi utilizat eventual la elaborarea de EIS-PVC-I pentru determinarea acestui ion.
- Compușii C6Es3 și C6Es3Cr3 prezintă o selectivitate semnificativă pentru ionii alcalini în raport cu cei alcalino-pământoși, sugerând faptul că EIS-PVC-I elaborați pe baza acestor compuși ar putea fi utilizați pentru determinarea  $\text{Na}^+$  în probe cu nivel scăzut de  $\text{K}^+$ . În plus, s-a observat existența unui răspuns cvasi-nernstian pentru EIS-PVC-C6Es3 în prezența  $\text{Co}^{2+}$  și pentru EIS-PVC-C6Am3 în soluții de  $\text{Zn}^{2+}$ , anticipându-se astfel eventuale aplicații în monitorizarea apelor reziduale provenite din industria metalurgică.
- Compușii C6Cr3Am3 și C8Es8 prezintă răspuns cvasi-nernstian pentru  $\text{K}^+$ , putând fi utilizați la elaborarea de EIS-PVC-I pentru determinarea activității acestui ion, dar numai după optimizarea compoziției membranelor și a condițiilor experimentale.

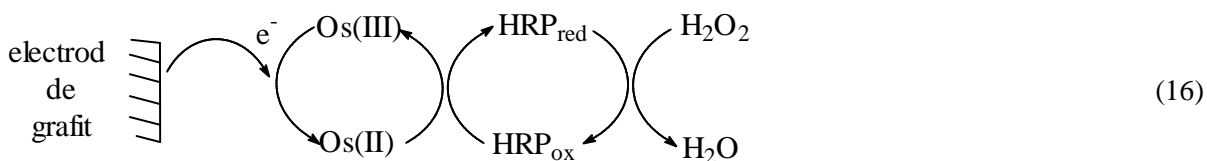
## 2. Evaluarea AAO folosind senzori amperometrici pentru detecția $\text{H}_2\text{O}_2$

### 2.1. Principiul de funcționare

#### 2.1.1. Biosenzorul pe bază de HRP pentru $\text{H}_2\text{O}_2$

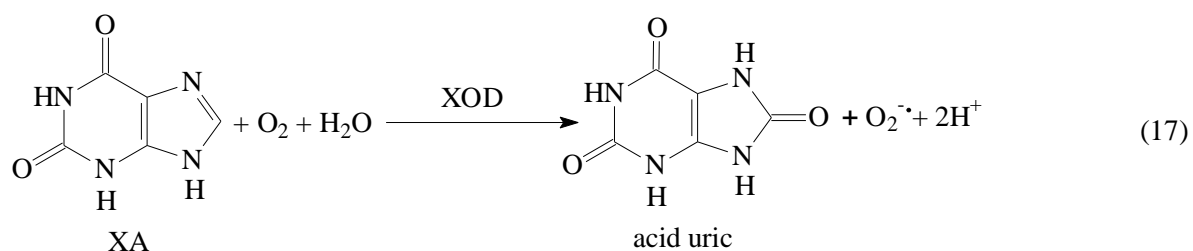
S-a realizat un biosenzor amperometric pentru detecția  $H_2O_2$ <sup>40</sup>, având denumirea prescurtată G/RP/HRP, constând dintr-o bară de grafit pirolitic modificat cu peroxidază din hrean (horseradish peroxidase, HRP) și un polimer redox, poli(1-vinilimidazol) complexat cu  $[Os(4-4'-dimetilbipiridină)_2Cl](II/III)^{+}$  (redox polymer, RP), folosit ca mediator electronic. Aceste componente au fost fixate pe grafit cu ajutorul agentului de reticulare poli(etilenglicol)diglicidil eter (PEGDGE).

Prin intermediul unor cicluri catalitice (schema 2),  $H_2O_2$  din faza de volum este redusă. Între electrodul de lucru și cel de referință este aplicat un potențial astfel ales încât se generează un curent de reducere proporțional cu concentrația  $H_2O_2$  pe suprafața G/RP/HRP. Un rol important în producerea semnalului amperometric îl au încărcarea enzimatică (cantitatea de HRP depusă pe grafit) și eficiența mediatorului (viteza transferului de sarcină).



### 2.1.2. Biosenzorul pe bază de HRP și XOD pentru XA

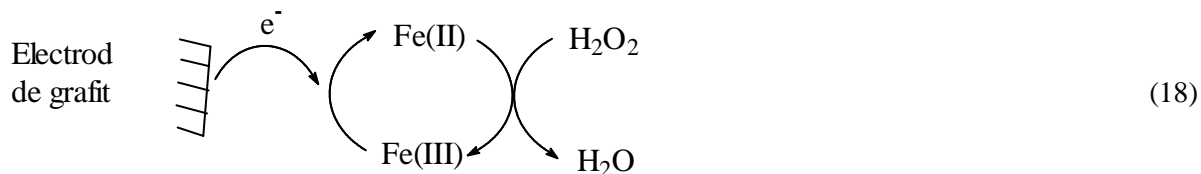
Principiul biosenzorului G/RP/HRP//XOD<sup>41</sup> este similar G/RP/HRP, cu diferența că sursa  $H_2O_2$  o constituie radicalii  $O_2^{\cdot-}$ , produși din reacția xantinei (XA) cu oxigenul, catalizată de xantin-oxidază (XOD) (schema 17). Mai departe, are loc dismutarea  $O_2^{\cdot-}$ , fie spontan, fie cu ajutorul superoxid dismutazei (SOD), rezultând  $H_2O_2$ :



### 2.1.3. Senzorul pe bază de Prussian Blue pentru detecția $H_2O_2$

Compusul Prussian Blue (PB) reprezintă un hexacianoferrat obținut dintr-un amestec echimolar de  $K_3Fe(CN)_6$  și  $FeCl_3$ . Este folosit cu succes ca mediator redox, în mod special pentru reducerea  $H_2O_2$ <sup>42, 43</sup>, motiv pentru care intră în componența a numeroși senzori pentru detecția glucozei, lactatului, persulfatilor, etc<sup>44</sup>. PB poate fi depus pe grafit, platină, cărbune sticlos, cărbune pastă, cerneală de cărbune („carbon ink”), etc., singur sau în combinație cu alte materiale. Printre avantajele PB, amintim: potențialul mic de lucru și costul redus<sup>42</sup>.

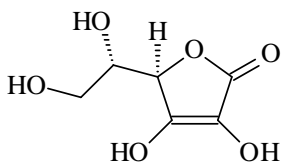
În cazul de față, senzorul a constat dintr-un strat de PB depus pe grafit pirolitic (G/PB). PB reprezintă mediatorul redox pentru electroreducerea  $H_2O_2$ , prin intermediul  $Fe^{II}/Fe^{III}$  (schema 5)<sup>45</sup>.



Dintre cei trei senzori prezentați, G/RP/HRP//XOD prezintă avantajul de a reflecta abordarea cea mai răspândită a definiției AAO, și anume aceea de capacitate de neutralizare a radicalilor liberi.

## 2.2. Definierea AAO

În general, AAO se definește ca abilitate a AO de a neutraliza diferiți radicali, precum:  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$  și  $ROO^{\cdot}$  (v. II.2.1). Unii cercetători definesc însă AAO ca și capacitate a AO de a se oxida în prezența  $H_2O_2$ <sup>16</sup>. În cazul de față, s-au luat în considerare ambele abordări. Astfel, senzorul

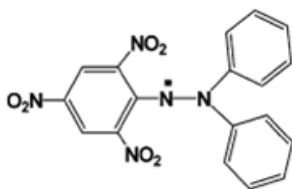


**Figura 9.** Structura chimică a acidului ascorbic

G/RP/HRP//XOD prezintă abilitatea AO de a neutraliza  $O_2^{\cdot-}$ , iar ceilalți doi senzori reflectă activitatea oxidantă față de  $H_2O_2$ . Rezultatele celor trei metode au fost comparate cu cele obținute prin trei metode de referință: (i) metoda Folin-Ciocalteu pentru evaluarea cantității de polifenoli; (ii) metoda bazată pe detecția electrochimică a DPPH<sup>•</sup>; (iii) metoda titrimetrică bazată pe sarea de sodiu a 2,6-diclorofenol-indofenolului (DCPIP) pentru evaluarea conținutului de acid ascorbic

(AA).

AO de referință ales a fost AA (Fig. 9), pentru următoarele considerente: (i) este ușor solubil în apă; (ii) este bine cunoscută abilitatea sa de a reacționa cu  $H_2O_2$ <sup>46</sup>; (iii) este unul dintre AO cei mai răspândiți în natură, prezent în fructe și legume; (iv) este folosit ca indice al calității alimentelor, datorită sensibilității sale la degradarea alimentelor prin procesare și stocare; (v) joacă un rol extrem de important în organismul uman, reprezentând o vitamină esențială.



**Figura 4.** Structura DPPH<sup>•</sup>

Pentru senzorii G/RP/HRP, G/RP/HRP//XOD și G/PB, evaluarea AAO a probelor sintetice și reale s-a făcut utilizând o curbă de calibrare pentru AA, constând din variația curentului în funcție de concentrația AA în prezența unei concentrații constante de  $H_2O_2$ . Separat, s-au efectuat măsurători amperometrice constând din adaosuri de AO în prezența unei concentrații constante de  $H_2O_2$ . Formula de calcul a AAO utilizează sensibilitatea curbei de

calibrare,  $S_{AA}$ , și variația curentului observată ca urmare a adaosului de AO,  $\Delta I_{AO}$  (schema 15). AAO rezultate s-au exprimat ca și concentrații echivalente de AA – valori absolute și relative (raportate la cea maximă dintre probele luate în lucru).

$$AAO = \Delta I_{AO} * \frac{1}{S_{AA}} \quad (15)$$

Pentru evaluarea prin metoda Folin-Ciocalteu a cantității totale de polifenoli prezenți în probele de AO, s-au înregistrat spectrele acestora în amestec cu reactivul Folin-Ciocalteu, iar AAO au fost date de valorile absorbanțelor corespunzătoare punctului maxim. De asemenea, s-au dat și valorile relative, obținute prin raportarea absorbanțelor la absorbanta maximă dintre toate probele.

Metoda bazată pe reducerea radicalului DPPH<sup>•</sup> (Fig. 7) s-a bazat pe același principiu de evaluare a AAO ca și cel prezentat mai sus, adaosurile de AO fiind realizate, în acest, în prezența unei concentrații constante de DPPH<sup>•</sup>. AO de referință a fost acidul (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman carboxilic (Trolox)<sup>23</sup>.

Conform metodei titrimetrice utilizate, cantitatea de AA din probe este dată de volumul de DCPIP utilizat în neutralizarea probelor, volum raportat la cel necesar reducerii unei cantități cunoscute de AA. Rezultatele sunt exprimate atât ca și concentrații de AA, cât și ca valori relative, obținute prin raportarea concentrațiilor la concentrația maximă.

## 2.3. Condiții experimentale

### Reactivi și aparatură

Toți reactivii au fost utilizați fără nici o purificare prealabilă: peroxidază din hrean 325 U/mg, superoxid dismutază din eritrocite bovine 5030 U/mg, catalază din ficat bovin 2950 U/mg solid, xantin oxidază din sursă microbială 8 U/mg, sarea de sodiu a xantinei, acid L-ascorbic - cristale fine (20-200 mesh), reactivul Folin-Ciocalteu 2N, DPPH<sup>•</sup>, acid citric (Sigma - Germania); xantin oxidază din lapte bătut 0,5 U/mg proteină (Calbiochem - SUA); poli(etilen glicol) diglicidil eter (Polysciences - SUA); poli(1-vinilimidazol) complexat cu [osmiu (4-4'-dimetilbipiridină)<sub>2</sub>Cl]<sup>III/III</sup> (Suedia - donație a Departamentului de Chimie Analitică, Universitatea din Lund); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck - Germania); acid (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman carboxilic, FeCl<sub>3</sub> (Fluka - Germania); K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (Polskie Odczynniki Chemiczne Gliwice - Polonia); H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 89% (Loba Chemie - Austria); sarea de sodiu a 2,6-diclorofenol-indofenolului, etanol (Riedel-de Haën - Europa); KCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Reactivul - România) și HCl 1 N (Microchim - România).

Pentru toate măsurătorile voltametrice și amperometrice au fost utilizate sisteme electrochimice formate din: (i) electrod de lucru - bară de grafit pirolitic (Ringsdorff, Germania) cu

diametrul de 3 mm, nemodificat (metoda DPPH) sau modificat (G/RP/HRP, G/RP/HRP//XOD și G/PB), încorporat într-un corp cilindric de teflon; (ii) electrod de referință - fir de Ag acoperit cu AgCl depus electrochimic, imersat în soluție apoasă saturată de KCl și așezat într-o capilară Luggin umplută cu aceeași soluție; (iii) contraelectrod - fir de Pt încorporat într-un corp de plastic, cu contact de Cu. Electrozii au fost imersați într-o celulă de sticlă (vol. 30 ml). Pentru măsurătorile amperometrice s-a utilizat un corp de electrod disc-rotitor Tachyprocesseur (Radiometer Analytical, Germania) sau un agitator magnetic (Heidolph MR 3000, Heidolph Instruments, Germania). Potențiostatele folosite au fost PARSTAT 2276 (Princeton Applied Research, SUA) și BioLogic SP-150 (Science Instruments, Franța) - potrivit pentru măsurarea unor curenți mai slabi. Pentru curățarea suprafeței de grafit prin ultrasonare s-a utilizat o baie de ultrasonare Elma S10 (Elmasonic, Germania). Pentru măsurătorile spectrofotometrice s-au folosit spectrofotometrul UV/VIS Jasco V-530 și cuve standard din cuarț ( $1,0 \times 1,0 \times 4,5 \text{ cm}^3$ ).

Înregistrarea datelor s-a realizat cu ajutorul programelor Power Suite 2.56 (pentru PARSTAT), EC-Lab V9.76 (pentru BioLogic) și Spectra Manager (pentru Jasco), iar interpretarea datelor s-a făcut cu ajutorul programului Origin 8.

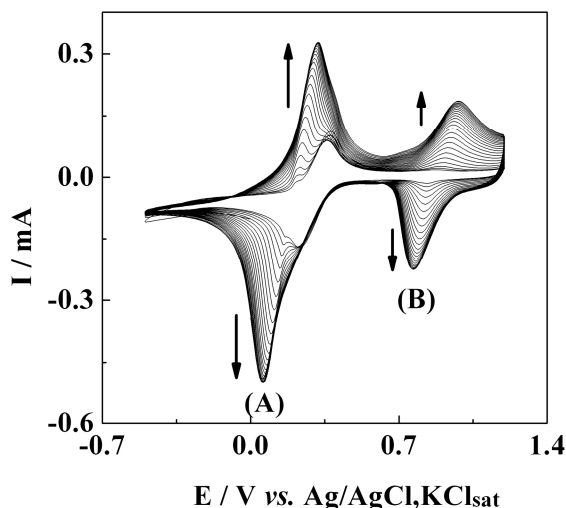
## **Prepararea senzorilor**

### **G/RP/HRP și G/RP/HRP//XOD**

Bara de grafit a fost curățată prin șlefuire cu hârtie abrazivă și cu hârtie de filtru, după care s-a ultrasonat timp de 2 minute. Lipsa existenței speciilor cu proprietăți redox pe suprafața de grafit s-a verificat voltametric prin baleierea potențialului în intervalul  $-0,200 - +0,500 \text{ V vs. Ag/AgCl, KCl}_{\text{sat}}$ , la viteza de  $50 \text{ mV/s}$ , folosind tampon fosfat (phosphate buffer solution, PBS) de pH 7,5, preparat din  $(\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4) 50 \text{ mM} + \text{KCl } 50 \text{ mM}$ . În cazul grafitului curat, singurul semnal observat a fost cel corespunzător reducerii  $\text{O}_2$ .

Pe bara de grafit s-au depus:  $4,7 \text{ U HRP}$ ,  $7,2 \text{ }\mu\text{g RP}$  și  $1,8 \text{ }\mu\text{g PEGDGE}$ , sub forma unui amestec preparat cu maximum 15 minute înainte de utilizare. Biosenzorul preparat a fost păstrat la  $\sim 5^\circ\text{C}$ , în atmosferă de PBS.

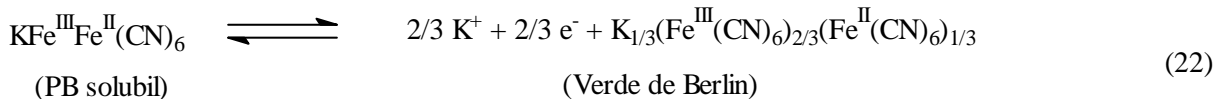
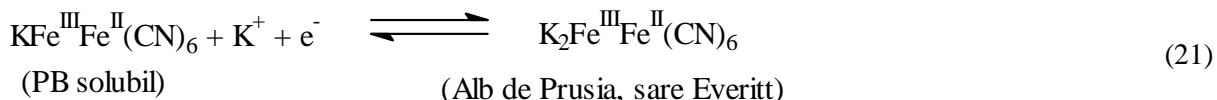
## G/PB



**Figura 11.** Depunerea electrochimică pe grafit a PB prin baleiaj ciclic de potențial în amestec de  $K_3Fe(CN)_6$  0,1 M și  $FeCl_3$  0,1 M; electrolit suport, PBS, pH 3,1; număr cicluri înregistrate = 25;  $v = 25$  mV/s respectiv (B).

Senzorul G/PB a fost preparat prin baleiaj ciclic de potențial. După activarea suprafeței de grafit prin aplicarea potențialului de +1,700 V vs. Ag/AgCl,  $KCl_{sat}$  timp de 3 minute în PBS pH 3,1, s-a efectuat baleierea în 25 cicluri succesive a potențialului între -0,500 și +1,200 V vs. Ag/AgCl,  $KCl_{sat}$  cu viteza de 25 mV/s într-un amestec de  $K_3Fe(CN)_6$  0,1 M și  $FeCl_3$  0,1 M (preparate în HCl 10 mM)<sup>47</sup> (Fig. 11).

Picurile observate sunt descrise de procesele redox din ecuațiile 21 și 22, ele corespunzând perechilor de picuri (A),



În concluzie, se poate afirma că, dintre senzorii G/RP/HRP, G/RP/HRP//XOD și G/PB, G/PB prezintă avantajul obținerii simple, rapide și la un cost redus.

## 2.4.Rezultate și discuții

### 2.4.1. Caracterizarea electroanalitică

#### 2.4.1.1. Studiul stabilității G/RP/HRP

Cunoașterea modului în care variază în timp performanțele electroanalitice ale biosenzorului G/PR/HRP s-a considerat a fi deosebit de importantă. Din acest motiv, s-a studiat stabilitatea operațională a acestuia, pentru diferiți biosenzori având aceeași compoziție, dar diferind prin temperatura de stocare și frecvența măsurătorilor pentru care s-au utilizat, prin efectuarea la diferite intervale de timp a unor măsurători amperometrice în PBS înainte și după un adaos de  $H_2O_2$ , urmat



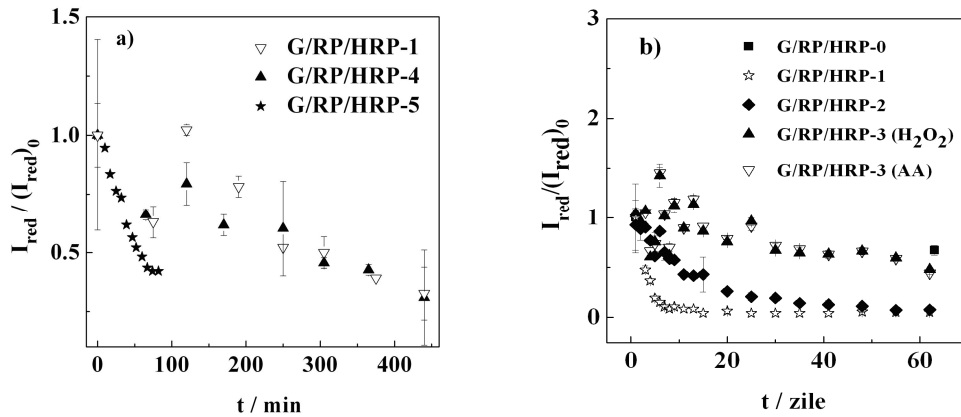
sau nu de un adaos de AA. Rezultatele sunt valori relative, exprimate ca valori ale curentului de reducere raportate la curentul maxim pentru fiecare biosenzor.

S-au realizat două tipuri de măsurători: (i) un adaos de  $H_2O_2$  130  $\mu M$  în PBS; (ii) un adaos de  $H_2O_2$  40  $\mu M$  în PBS, urmat de un adaos de AA 330  $\mu M$ . Condițiile de păstrare și lucru a biosenzorilor utilizați sunt prezentate în Tabelul 10. Frecvența măsurătorilor (1-7 zile) a variat identic pentru biosenzorii G/RP/HRP-1-3, scăzând odată cu creșterea duratei de utilizare.

**Tabelul 10.** Condițiile de utilizare și păstrare a G/RP/HRP pentru studiul stabilității operaționale

| Stabilitatea urmărită | Frecvența măsurătorilor | Temperatura de păstrare ( $^{\circ}C$ ) | Soluția test                         | Cod biosenzor |
|-----------------------|-------------------------|---|--------------------------------------|---------------|
| Termen lung           | Prima și a 63-a zi      | 5                                       | $H_2O_2$ 130 $\mu M$                 | G/RP/HRP-0    |
|                       | 1 – 7 zile              | 23                                      |                                      | G/RP/HRP-1    |
|                       |                         | 5                                       |                                      | G/RP/HRP-2    |
|                       |                         |   | $H_2O_2$ 40 $\mu M$ + AA 330 $\mu M$ | G/RP/HRP-3    |
| Termen scurt          | 1 oră                   | 23                                      | $H_2O_2$ 130 $\mu M$                 | G/RP/HRP-1    |
|                       |                         | 5                                       |                                      | G/RP/HRP-4    |
|                       | 7 – 10 minute           | 23                                      |                                      | G/RP/HRP-5    |

Din variațiile de curenți raportate, pentru fiecare biosenzor, la variația maximă (Fig. 12), se remarcă următoarele:



**Figura 12.** Studiul stabilității operaționale (a) pe termen scurt (7,5 ore) și (b) pe termen lung (63 zile) pentru biosenzorii G/RP/HRP-0-3 în prezența  $H_2O_2$  130  $\mu M$  și pentru G/RP/HRP-3(AA) în  $H_2O_2$  40  $\mu M$  + AA 330  $\mu M$ . Electroliu suport, PBS, pH 7,5;  $E_{apli} = -0,100$  V vs. Ag/AgCl,  $KCl_{sat}$ ;  $\omega = 1000$  rpm

- Pe o durată de 7,5 ore, nu s-a observat o variație semnificativă a curentului în funcție de temperatura de păstrare ( $23^{\circ}C$  pentru G/RP/HRP-1 și  $5^{\circ}C$  pentru G/RP/HRP-4); în schimb, după 10 zile scăderea curentului a fost mai mare cu 52% în cazul G/RP/HRP-1 comparativ cu G/RP/HRP-2
- Performanțele biosenzorilor au scăzut odată cu creșterea frecvenței măsurătorilor (G/RP/HRP-0, -2 și -3) și a concentrației  $H_2O_2$  utilizate (G/RP/HRP-2 și -3)

- Timpii de înjumătățire ( $t_{1/2}$ ) a variației curentului de reducere în cazul biosenzorilor utilizați pentru  $H_2O_2$  au fost de: 3 zile, 11 zile, 61 zile, 54 minute și 5,2 ore pentru biosenzorii G/RP/HRP-1 (termen lung), -2, -3, -4 și respectiv -5, conform unei interpolări de tip polinomial

### 2.4.1.2. Evaluarea parametrilor electroanalitici

Performanțele senzorilor G/RP/HRP, G/RP/HRP//XOD și G/PB au fost evaluate pentru diferite concentrații de  $H_2O_2$ , XA sau AA în prezență de  $H_2O_2$  sau XA. S-au evaluat, pornind de la curbele de calibrare, următorii parametri electroanalitici: sensibilitatea (S), domeniul de concentrații linear (DL), limita de detecție (LD), timpul de răspuns ( $t_{95}$ ) și deviația standard relativă (DSR).

Un studiu voltametric realizat pe grafit nemodificat în AA 10 mM a evidențiat un proces de oxidare în jurul valorii de 0 mV/Ag/AgCl,  $KCl_{sat}$ . Oxidarea AA la potențialul ales în măsurătorile amperometrice fiind nesemnificativă, nu există riscul interferenței acesteia cu procesul urmărit.

#### G/RP/HRP

Caracterizarea electroanalitică a G/RP/HRP a fost precedată de un studiu de optimizare ce a vizat încărcarea de HRP și pH-ul PBS utilizat ca electrolit suport, din care a rezultat că performanțele biosenzorului sunt optime în cazul încărcării HRP de 4,7 U și al pH-ului de 7,5.

Parametrii electroanalitici ai G/RP/HRP au fost evaluați din măsurători amperometrice efectuate la potențialul de -0,100 V vs. Ag/AgCl,  $KCl_{sat}$  pentru diverse concentrații de  $H_2O_2$  având ca electrolit suport PBS de pH 7,5. Parametrii electroanalitici s-au evaluat în condiții de repetabilitate maximă, cu ajutorul a 2 biosenzori de compoziție similară utilizați în paralel (Tabelul 11). Biosenzorul G/RP/HRP poate fi utilizat cu rezultate bune în intervalul de concentrații 28-159  $\mu M$ .

Un set de măsurători amperometrice folosind G/RP/HRP a fost realizat în AA în prezență de  $H_2O_2$  0,3 mM la potențialul de -0,100 V vs. Ag/AgCl,  $KCl_{sat}$ . Din Tabelul 12 rezultă că G/RP/HRP poate fi utilizat în condiții bune în intervalul de concentrații 93-185  $\mu M$ .

**Tabelul 11.** Parametrii electroanalitici ai biosenzorului G/RP/HRP evaluați pentru  $H_2O_2$

| Fitare lineară |                    |                   | Fitare MM                |                           |               |                     | $t_{95}$<br>(s) | DSR*<br>(%) | LD<br>( $\mu M$ ) |
|----------------|--------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|---------------------|-----------------|-------------|-------------------|
| S<br>(mA/M)    | $\frac{R^2}{N}$    | DL<br>( $\mu M$ ) | $I_{max}$<br>( $\mu A$ ) | $K_m^{ap}$<br>( $\mu M$ ) | S<br>(mA/M)   | $\frac{R^2}{N}$     |                 |             |                   |
| 59,1 ±<br>1,7  | $\frac{0,9983}{7}$ | 23,8 –<br>159,1   | 37,7 ±<br>1,1            | 0,49 ±<br>0,02            | 77,3 ±<br>4,1 | $\frac{0,9992}{17}$ | 13              | 2           | 0,5               |

\*calculată pentru  $H_2O_2$  300  $\mu M$

**Tabelul 12.** Parametrii electroanalitici ai G/RP/HRP evaluați în prezența AA în mediu de  $H_2O_2$  0,3 mM

| Fitare lineară |                 |            | Fitare MM                |                                      |               |                 | t <sub>95</sub><br>(s) | DSR*<br>(%) | LD<br>(μM) |
|----------------|-----------------|------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|-------------|------------|
| S<br>(mA/M)    | $\frac{R^2}{N}$ | DL<br>(μM) | I <sub>max</sub><br>(μA) | K <sub>m</sub> <sup>ap</sup><br>(μM) | S<br>(mA/M)   | $\frac{R^2}{N}$ |                        |             |            |
| 45,6 ±<br>3,2  | 0,9951 3        | 93 – 185   | 21,6 ±<br>1,1            | 0,3 ±<br>0,04                        | 74,6 ±<br>0,2 | 0,9952<br>17    | 4                      | 13,2        | 5,2        |

\* calculată pentru AA 94,0 μM

Au fost realizate măsurători amperometrice similare și în prezența Trolox-ului și a acidului cafeic, în mediu de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Trebuie menționat faptul că s-a efectuat în prealabil câte un studiu voltametric al Trolox-ului și acidului cafeic și că acești AO se află, la potențialul ales (-0,100 V vs. Ag/AgCl, KCl<sub>sat</sub>), sub formă redusă, deci pot fi utilizați fără interferențe în combinație cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Parametrii electroanalitici ai celor doi AO, prezentați în Tabelele 13 și 14, evidențiază faptul că dependența curentului de reducere de concentrația de AO este liniară pe întregul domeniu de concentrații.

**Tabelul 13.** Parametrii electroanalitici ai biosenzorului G/RP/HRP, obținuți în prezența Trolox-ului și a acidului cafeic în mediu de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,04 mM

| AO          | Fitare lineară |                     |            | t <sub>95</sub><br>(s) | DSR<br>(%) | LD<br>(μM) |
|-------------|----------------|---------------------|------------|------------------------|------------|------------|
|             | S<br>(mA/M)    | $\frac{R^2}{N}$     | DL<br>(mM) |                        |            |            |
| Trolox      | 0,7 ± 0,0      | $\frac{0,9999}{24}$ | 0,9 – 7,0  | 22                     | 0,1*       | 39,5       |
| Acid cafeic | 1,0 ± 0,0      | $\frac{0,9991}{17}$ | 0,9 – 6,3  | 65                     | 27,9**     | 40         |

\* calculată pentru Trolox 6,0 mM

\*\* calculată pentru acid cafeic 6,0 mM

### G/RP/HRP//XOD

În Tabelul 14 sunt prezentați parametrii electroanalitici ai biosenzorului G/RP/HRP//XOD, evaluați din măsurători amperometrice realizate la -0,100 V vs. Ag/AgCl, KCl<sub>sat</sub> la diferite concentrații de XA, având ca electrolit suport PBS conținând XOD 0,1 mU/ml. Prin comparație cu parametrii electroanalitici obținuți pentru G/RP/HRP în prezență de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observă câteva avantaje ale acestuia: (i) sensibilitatea obținută din fitarea lineară este cu 21% mai mare; (ii) domeniul linear este mai extins cu 70%; (iii) timpul de răspuns este de 4 ori mai scurt; (iv) deviația standard relativă pentru 300 μM analit este de 7 ori mai mică; (v) limita de detecție este de 3 ori mai scăzută. Aceste diferențe se datorează în principal complexității mai ridicate a sistemului G/RP/HRP//XOD față de cel G/RP/HRP.

**Tabelul 14.** Parametrii electroanalitici ai G/RP/HRP//XOD evaluați pentru XA

| Fitare lineară | Fitare MM | t <sub>95</sub> | DSR* | LD |
|----------------|-----------|-----------------|------|----|
|----------------|-----------|-----------------|------|----|

| S<br>(mA/M)       | $\frac{R^2}{N}$ | DL<br>( $\mu$ M) | $I_{max}$<br>( $\mu$ A) | $K_m^{ap}$<br>( $\mu$ M) | S<br>(mA/M)       | $\frac{R^2}{N}$     | (s) | (%) | ( $\mu$ M) |
|-------------------|-----------------|------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|-----|-----|------------|
| 49,0 $\pm$<br>2,1 | <u>0,9924</u> 5 | 23,8 –<br>93,0   | 17,7 $\pm$<br>0,5       | 0,24 $\pm$<br>0,01       | 76,9 $\pm$<br>3,8 | <u>0,9979</u><br>17 | 55  | 14  | 1,4        |

\*calculată pentru 300  $\mu$ M XA

Tabelul 15 cuprinde parametrii electroanalitici evaluați din curbele de calibrare în prezența AA, la potențialul -0,100 V vs. Ag/AgCl, KCl<sub>sat</sub>, în prezența electrolitului suport PBS pH 7,5 conținând XA 0,07 mM și XOD 0,1 mU/ml. Se obțin sensibilități și domenii asemănătoare cu ale G/RP/HRP, fapt ce confirmă similitudinea proceselor care au loc în cele două sisteme. Se poate deduce de aici că AA reacționează cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formată din dismutarea O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, acesta fiind un proces spontan ce are loc foarte rapid.

**Tabelul 15.** Parametrii electroanalitici ai G/RP/HRP//XOD corespunzători AA în prezență de XA 0,07 mM și XOD 0,1 mU/ml

| Fitare lineară    |                 |                  | Fitare MM               |                          |                   |                     | $t_{95}$<br>(s) | DSR*<br>(%) | LD<br>( $\mu$ M) |
|-------------------|-----------------|------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|-----------------|-------------|------------------|
| S<br>(mA/M)       | $\frac{R^2}{N}$ | DL<br>( $\mu$ M) | $I_{max}$<br>( $\mu$ A) | $K_m^{ap}$<br>( $\mu$ M) | S<br>(mA/M)       | $\frac{R^2}{N}$     |                 |             |                  |
| 43,6 $\pm$<br>0,8 | <u>0,9983</u> 7 | 23,8 –<br>159,1  | 4,7 $\pm$ 0,1           | 0,1 $\pm$<br>0,0         | 58,3 $\pm$<br>3,3 | <u>0,9976</u><br>16 | 90              | 12,1        | 0,7              |

\*calculată pentru AA 95  $\mu$ M

## G/PB

Parametrii electroanalitici ai senzorului G/PB (Tabelul 16) s-au estimat folosind curbele de calibrare în prezența H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> realizate pornind de la măsurători amperometrice la potențial constant, -0,100 V vs. Ag/AgCl, KCl<sub>sat</sub>, în soluție de electrolit suport PBS, pH 3,1.

Comparativ cu biosenzorul G/RP/HRP, G/PB prezintă un domeniu de lucru de cca 13 ori mai extins, ceea ce se explică prin faptul că suprafața activă pe care are loc reducerea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> este mult mai mare decât cea din cazul biosenzorului. În plus, sensibilitățile, timpii de răspuns, deviația standard și limita de detecție sunt mai bune față de cele ale G/RP/HRP.

În Tabelul 16 sunt prezentați parametrii electroanalitici corespunzători calibrării în AA, realizată din măsurători amperometrice efectuate la potențialul constant de -0,100 V vs. Ag/AgCl, KCl<sub>sat</sub>, în prezența H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,8 mM. Sistemul G/PB indică o eficiență relativ redusă pentru detecția AA în prezență de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dată de sensibilitatea relativ redusă față de cea obținută cu biosenzorii G/RP/HRP și G/RP/HRP//XOD.

**Tabelul 16.** Parametrii electroanalitici ai G/PB evaluați pentru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

| Fitare lineară |                 |            | Fitare MM         |                    |             |                 | $t_{95}$<br>(s) | DSR*<br>(%) | LD<br>( $\mu$ M) |
|----------------|-----------------|------------|-------------------|--------------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|------------------|
| S<br>(mA/M)    | $\frac{R^2}{N}$ | DL<br>(mM) | $I_{max}$<br>(mA) | $K_m^{ap}$<br>(mM) | S<br>(mA/M) | $\frac{R^2}{N}$ |                 |             |                  |

|             |                     |                |               |             |               |                     |   |   |     |
|-------------|---------------------|----------------|---------------|-------------|---------------|---------------------|---|---|-----|
| 89<br>± 2,2 | $\frac{0,9917}{15}$ | 0,03 –<br>17,3 | 4,4 ±<br>0,01 | 35 ±<br>4,5 | 126 ±<br>20,1 | $\frac{0,9978}{16}$ | 7 | 4 | 1,2 |
|-------------|---------------------|----------------|---------------|-------------|---------------|---------------------|---|---|-----|

\*calculată pentru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM

Din datele prezentate în acest subcapitol se poate concluziona că, dintre senzorii investigați, din punctul de vedere al parametrilor electroanalitici senzorul optim este G/PB.

**Tabelul 17.** Parametrii electroanalitici ai biosenzorului G/RP/HRP//XOD evaluați pentru AA în prezența H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,8 mM

| Fitare lineară |                     |            | Fitare MM                |                                      |             |                     | t <sub>95</sub><br>(s) | DSR*<br>(%) | LD<br>(µM) |
|----------------|---------------------|------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------|---------------------|------------------------|-------------|------------|
| S<br>(mA/M)    | $\frac{R^2}{N}$     | DL<br>(mM) | I <sub>max</sub><br>(mA) | K <sub>m</sub> <sup>ap</sup><br>(mM) | S<br>(mA/M) | $\frac{R^2}{N}$     |                        |             |            |
| 0,9 ± 0,0      | $\frac{0,9916}{11}$ | 0,5 – 44,9 | 0,1 ± 0,0                | 72,3 ±<br>20,3                       | 1,4 ± 0,4   | $\frac{0,9892}{12}$ | 10                     | 4,6         | 0,5        |

\*calculată pentru AA 8,5 mM

### 2.4.1.3. Evaluarea AAO a unor probe reale

#### Metode amperometrice

Probele reale pentru care s-a făcut evaluarea AAO au fost: vin roșu „Cabernet” (Recaș; data recoltării: 06.05.2009), vin alb “Feteasca Regală” (Jidvei; data recoltării: 06.05.2009), suc concentrat de mere „Pektinom” (Dej; data recoltării: 04.05.2009) (probe furnizate de Centrul de Biotehnologii Vegetale Aplicate „Proplanta”, Cluj-Napoca)<sup>48</sup> și sucuri proaspete de lămâie, grepfrut, portocală roșie, pară „Seckel”, nectarină, kiwi, portocală, măr „Red Delicious”, mandarină, struguri albi și struguri negri. Sucurile de fructe au fost obținute prin simpla stoarcere manuală a fructelor și au fost utilizate imediat după obținere.

Pentru evaluarea AAO pentru probele enumerate mai sus, s-au efectuat măsurători amperometrice într-o soluție de PBS conținând H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM pentru G/RP/HRP și 0,8 mM G/PB) sau XA 0,05 mM + XOD 0,1 mU/ml (pentru G/RP/HRP//XOD), la care s-a adăugat proba reală. Interpretarea rezultatelor a fost făcută prin raportarea variațiilor de curent obținute după adăugarea probei în soluția de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sau XA la curba de calibrare a AA (conform procedurii descrise în secțiunii 2.1). Rezultatele obținute din evaluarea AAO folosind senzorii amperometrici G/RP/HRP, G/RP/HRP//XOD și G/PB și metodele de referință sunt cuprinse în Tabelul 19, iar corelațiile valorilor AAO ce se stabilesc între diversele metode sunt prezentate în Tabelul 20.

#### Metode de referință

În cazul metodei bazate pe reducerea DPPH<sup>•</sup>, adaosurile de probă reală s-au realizat într-o soluție de DPPH<sup>•</sup> 50 μM, iar potențialul aplicat a fost de -0,100 mV/Ag/AgCl, KCl<sub>sat</sub>. Pentru a verifica dacă variațiile de curent au provenit exclusiv de la reacția probei cu DPPH<sup>•</sup> au fost efectuate amperograme similare cu cele descrise mai sus, dar în absența DPPH<sup>•</sup>. Pentru niciuna din probe nu s-au observat variații de semnal, ceea ce a confirmat proveniența variației curentului de reducere din interacțiunea radicalului DPPH<sup>•</sup> cu proba de AO.

În vederea evaluării AAO prin metoda Folin-Ciocalteu, s-a măsurat absorbanta probelor (diluante astfel ca absorbanta să fie cuprinsă între 0 și 1) conținând reactiv Folin-Ciocalteu 0,026 N și Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 13,2 g/l, după incubare la întuneric, la temperatura camerei, timp de 1,5 ore. Absorbantele luate în calcul au constat din maximele înregistrate față de apă în intervalul 400 - 800 nm, și anume, 668 nm pentru portocală și 662 nm pentru grepfrut. Absorbantele amestecurilor au fost măsurate la aceste lungimi de undă, timp de 5 minute, în cuve de cuarț, față de proba martor – soluție conținând reactivul Folin-Ciocalteu și Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> în concentrații egale cu cele ale probelor, în care sucul a fost înlocuit cu apă distilată.

Evaluarea concentrațiilor de AA din probele reale testate s-a făcut prin metoda ce utilizează DCPIP; în prezența AA, DCPIP se reduce la compusul DCPIPH (Fig. 10), amestecul fiind incolor în mediu acid. Consumul total al AA din sistem corespunde virajului de culoare de la incolor la roz. Rezultatele au fost evaluate din volumul de DCPIP 1 mM necesar neutralizării unui volum de 1 ml probă, prin comparație cu cel necesar neutralizării unui ml de AA 1 mM (0,4 ml).

**Tabelul 19.** Valorile AAO ale probelor reale obținute cu senzorii G/PB, G/RP/HRP și G/RP/HRP//XOD în comparație cu cele obținute prin metodele de referință

| <b>Probă<br/>Metodă</b>                 | <b>G/PB<br/>(mM AA, %)</b> | <b>G/RP/HRP<br/>(mM AA, %)</b> | <b>G/RP/HRP//XOD<br/>(mM AA, %)</b> | <b>Folin-Ciocâlțeu<br/>(absorbanță, %)</b> | <b>DPPH<br/>(mM Trolox, %)</b> | <b>DCPIP (mM, %)</b> |
|---|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--|--------------------------------|----------------------|
| <b>Lămâie</b>                           | 43 ± 12                    | 0,7 ± 0,3                      | -                                   | -  | 1,8 ± 0,0                      | 9,3 ± 0,0            |
|   | 30 ± 9                     | 31,8 ± 13,6                    | -                                   | -  | 8,8 ± 0,0                      | 27,9 ± 0,0           |
| <b>Grepfrut</b>                         | 44 ± 14                    | 2,2 ± 0,2                      | 2,2 ± 0,3                           | 0,5 ± 0,1                                  | 3,3 ± 0,3                      | 6,1 ± 0,6            |
|   | 31 ± 10                    | 100,0 ± 9,1                    | 75,9 ± 10,3                         | 79,6 ± 0,2                                 | 16,1 ± 1,3                     | 18,3 ± 1,8           |
| <b>Portocală roșie</b>                  | 46 ± 5                     | 1,3 ± 0,03                     | -                                   | -  | 3,6 ± 0,2                      | 19,0 ± 4,1           |
|   | 33 ± 4                     | 59,1 ± 1,4                     | -                                   | -  | 17,6 ± 1,0                     | 57,1 ± 12,3          |
| <b>Pară “Seckel“</b>                    | 51 ± 11                    | -                              | -                                   | -  | -                              | -                    |
|   | 36 ± 8                     | -                              | -                                   | -  | -                              | -                    |
| <b>Nectarină</b>                        | 57 ± 12                    | -                              | -                                   | -  | 1,4 ± 0,3                      | 0,6 ± 0,0            |
|   | 40 ± 9                     | -                              | -                                   | -  | 6,8 ± 1,6                      | 1,8 ± 0,0            |
| <b>Kiwi</b>                             | 59 ± 7                     | 1,2 ± 0,3                      | -                                   | -  | 1,8 ± 0,2                      | 4,0 ± 0,3            |
|   | 42 ± 5                     | 54,5 ± 13,6                    | -                                   | -  | 8,8 ± 1,2                      | 12,0 ± 0,9           |
| <b>Portocală</b>                        | 61 ± 13                    | 1,2 ± 0,2                      | 2,9 ± 0,4                           | 0,7 ± 0,0                                  | 3,7 ± 0,2                      | 8,3 ± 0,5            |
|   | 43 ± 9                     | 54,5 ± 9,1                     | 100,0 ± 13,8                        | 100,0 ± 0,3                                | 18,0 ± 0,8                     | 24,9 ± 1,5           |
| <b>Vin alb “Fetească<br/>Regală“</b>    | 61 ± 8                     | 0,1 ± 0,04                     | -                                   | -  | 1,2 ± 0,2                      | 1,1 ± 0,3            |
|   | 43 ± 6                     | 4,5 ± 1,8                      | -                                   | -  | 5,9 ± 0,8                      | 3,3 ± 0,9            |
| <b>Măr “Red Delicious“</b>              | 63 ± 5                     | -                              | -                                   | -  | 1,4 ± 0,2                      | 1,9 ± 0,0            |
|   | 45 ± 4                     | -                              | -                                   | -  | 6,8 ± 1,0                      | 5,7 ± 0,0            |
| <b>Struguri negri</b>                   | 72 ± 1                     | 0,04 ± 0,00                    | -                                   | -  | 0,8 ± 0,05                     | 2,0 ± 0,7            |
|   | 51 ± 1                     | 1,8 ± 0,0                      | -                                   | -  | 3,9 ± 0,3                      | 6,0 ± 2,1            |
| <b>Struguri albi</b>                    | 73 ± 9                     | 0,08 ± 0,03                    | -                                   | -  | 0,9 ± 0,04                     | 0,4 ± 0,0            |
|   | 52 ± 6                     | 3,6 ± 1,4                      | -                                   | -  | 4,4 ± 0,2                      | 1,2 ± 0,0            |
| <b>Mandarină</b>                        | 78 ± 8                     | 0,3 ± 0,07                     | -                                   | -  | 2,0 ± 0,4                      | 5,1 ± 0,6            |
|   | 55 ± 6                     | 13,6 ± 3,2                     | -                                   | -  | 9,8 ± 2,0                      | 15,3 ± 1,8           |
| <b>Vin roșu “Cabernet“</b>              | 87 ± 29                    | 0,3 ± 0,2                      | -                                   | -  | 20,5 ± 4,9                     | 33,3 ± 8,2           |
|   | 62 ± 21                    | 13,6 ± 9,1                     | -                                   | -  | 100,0 ± 24,0                   | 100,0 ± 24,6         |
| <b>Suc conc. de mere<br/>“Pektîrom“</b> | 141 ± 6                    | 0,2 ± 0,08                     | -                                   | -  | 17,3 ± 2,1                     | 9,6 ± 0,0            |
|   | 100 ± 4                    | 9,1 ± 3,6                      | -                                   | -  | 84,4 ± 10,2                    | 28,8 ± 0,0           |

**Tabelul 20.** Corelații ale valorilor AAO probelor de vinuri și sucuri de fructe observate între diversele metode utilizate

| Metoda                | G/PB  | G/RP/HRP   | G/RP/HRP//XOD        |
|-----------------------|---|--|----------------------|
| <b>G/RP/HRP</b>       | lămâie < kiwi $\approx$ portocală ( $R^2 = 0,9890$ )<br>struguri negri < struguri albi < mandarină ( $R^2 = 0,9984$ )<br>lămâie < grepfrut<br>lămâie < portocală roșie<br>vin alb „Feteasca Regală” < vin roșu „Cabernet”<br>vin alb „Feteasca Regală” < suc conc. de mere „Pektirom”   | -  | -                    |
| <b>G/RP/HRP//XOD</b>  | grepfrut < portocală  | -  | -                    |
| <b>Folin-Ciocâlțu</b> | grepfrut < portocală  | -  | grepfrut < portocală |
| <b>DPPH</b>           | Struguri negri < struguri albi < mandarină ( $R^2 = 0,9934$ )<br>lămâie < grepfrut < portocală roșie < portocală < suc conc. de mere „Pektirom” ( $R^2 = 0,9788$ )<br>vin alb „Feteasca Regală” < vin roșu „Cabernet”<br>vin alb „Feteasca Regală” < măr „Red Delicious”<br>nectarină < kiwi<br>portocală < suc conc. de mere „Pektirom”        | struguri negri < struguri albi < vin alb „Feteasca Regală” < mandarină ( $R^2 = 0,9844$ )<br>kiwi < portocală roșie<br>vin alb „Feteasca Regală” < kiwi<br>vin alb „Feteasca Regală” < portocală<br>suc conc. de mere „Pektirom” < vin roșu „Cabernet” | -                    |
| <b>DCPIP</b>          | nectarină < vin alb „Feteasca Regală” < măr „Red Delicious” ( $R^2 = 0,8995$ )<br>kiwi < madarină < suc conc. de mere „Pektirom” ( $R^2 = 0,9987$ )<br>grepfrut < portocală<br>măr „Red Delicious” < struguri negri<br>măr „Red Delicious” < mandarină<br>portocală roșie < vin roșu „Cabernet”<br>struguri albi < suc conc. de mere „Pektirom” | vin alb „Feteasca Regală” < suc conc. de mere „Pektirom” < vin roșu „Cabernet” ( $R^2 = 0,9274$ )<br>struguri negri < portocală<br>kiwi < grepfrut<br>struguri albi < mandarină<br>lămâie < portocală roșie  | grepfrut < portocală |



Conform Tabelului 20, cele mai multe corelații s-au stabilit între metoda G/PB și metodele G/RP/HRP, DPPH și DCPIP. Se deduce, așadar, similitudinea principiilor de funcționare a metodelor G/PB și G/RP/HRP. Similaritatea rezultatelor obținute față de metoda DPPH indică aspectul de capacitate de reducere a AO surprins de valorile AAO evaluate. Numeroasele corelațiile stabilite față de metoda de determinare a AA indică faptul că principalul AO detectat în probele utilizate este AA.

Numeroase rezultate obținute prin metoda G/RP/HRP se corelează cu cele obținute prin metoda DPPH. Comparativ cu rezultatele metodei DCPIP, se observă că toate AAO estimate folosind biosenzorul G/RP/HRP sunt de 3 până la 50 de ori mai mici. Acest fapt poate fi explicat de existența unor reacții secundare în care este implicat AA prezent în sistem, care duce la scăderea concentrației acestuia.

Pentru cele două probe reale testate cu biosenzorul G/RP/HRP//XOD, s-a observat o bună concordanță față de cele trei metode de referință. Similaritatea față de metoda DPPH indică aspectul de capacitate de reducere a probei de AO evidențiat de valorile AAO, așa cum s-a precizat și mai sus. Valorile mici obținute comparativ cu cele corespunzătoare metodei determinării AA cu ajutorul DCPIP ar putea fi explicate, ca și în cazul biosenzorului G/RP/HRP, de existența unor reacții secundare în care este implicat AA, reacții care nu implică și consumul de  $H_2O_2$ .

## 2.5. Concluzii

Studiul de față cuprinde descrierea comparativă privind principiul de funcționare, realizarea, optimizarea, caracterizarea și utilizarea în AO sintetici și probe reale a doi biosenzori (G/RP/HRP și G/RP/HRP//XOD) și un senzor amperometrici (G/PB).

Principial, G/RP/HRP, G/PB și G/RP/HRP//XOD reprezintă senzori pentru  $H_2O_2$ . În prezența probei de AO,  $H_2O_2$  reacționează cu acesta, determinând o variație a curentului de reducere. Evaluarea valorilor AAO s-a realizat prin raportarea acestor variații de curent la sensibilitățile curbelor de calibrare obținute în cazul fiecărui senzor în AA, ales ca AO de referință.

Din perspectiva modului de obținere, G/PB prezintă avantajul simplității, rapidității și costului redus. G/RP/HRP//XOD necesită prepararea cea mai laborioasă, însă are avantajul de a reflecta cel mai fidel conceptul de „capacitate antioxidantă”, conform definiției celei mai larg răspândite, și anume, aceea de activitate antiradicalică.

În urma studiilor de optimizare au rezultat următoarele concluzii: (i) pentru G/RP/HRP sensibilitatea maximă în  $H_2O_2$  este obținută la pH neutru (7,5) și încărcare enzimatică medie, 4,7 U HRP/electrod; (ii) parametrii optimi a biosenzorului G/RP/HRP//XOD se obțin cu XOD dizolvat și nu necesită prezența SOD.

Studiul de caracterizare s-a realizat pe senzorii optimizați și a cuprins următoarele aspecte: durata medie de viață (G/RP/HRP), efectul electrocatalitic pentru  $H_2O_2$  (G/RP/HRP și G/PB) și XA (G/RP/HRP//XOD) și parametrii (bio)electroanalitici.

Din studiul de stabilitate a rezultat faptul că durata medie de viață – evaluată ca fiind timpul necesar scăderii sensibilității biosenzorului cu jumătate din sensibilitatea inițială – a fost, în condițiile de utilizare folosite, de 3 zile pentru un biosenzor păstrat la temperatura camerei și de 11 zile pentru unul identic păstrat la  $\sim 5^\circ C$ , biosenzorii fiind utilizați odată la 1-7 zile. Pentru biosenzorii utilizați mai frecvent în cursul unei singure zile, nu s-a observat o diferență semnificativă în variația sensibilității relative în funcție de temperatura de păstrare. Demnă de remarcat este observația că utilizarea mai frecventă a unui biosenzor duce la pierderea mai rapidă a performanțelor sale analitice.

Efectul electrocatalitic pentru  $H_2O_2$  a fost cel mai bine pus în evidență în cazul G/PB. În cazul biosenzorilor, nu s-au observat diferențe majore între picurile voltamogramelor înregistrate în absența / prezența  $H_2O_2$ .

Din punctul de vedere al parametrilor (bio)electroanalitici: sensibilitate, domeniu de lucru, limită de detecție, timp de răspuns și deviații standard, cele mai bune performanțe au fost obținute în cazul G/PB.

Biosenzorii G/RP/HRP și G/RP/HRP//XOD și senzorul G/PB au fost utilizați pentru AA, și, în plus pentru G/RP/HRP, Trolox și acid cafeic. Pentru AA, domeniul de lucru cel mai larg a fost obținut pentru G/RP/HRP, dar sensibilitatea maximă a prezentat-o G/PB. Aplicațiile în probe reale au constat din evaluarea AAO a unor vinuri și sucuri de fructe, folosind AA ca AO de referință. Rezultatele au fost comparate cu cele obținute prin trei metode de referință: Folin-Ciocalteu, DPPH<sup>\*</sup> și determinarea titrimetrică a AA. Cele mai multe corelații s-au obținut între rezultatele metodelor G/PB, G/RP/HRP, DPPH<sup>\*</sup> și determinarea titrimetrică a AA, fapt ce indică faptul că există similitudini în mecanismul interacțiunilor AO cu specia neutralizată.

Datele obținute atât în partea de caracterizare cât și în cea aplicativă indică posibilitatea utilizării biosenzorilor G/RP/HRP și G/RP/HRP//XOD și a senzorului G/PB ca metode pentru evaluarea AAO din probe de vinuri și sucuri de fructe.

#### **IV. Concluzii generale**

Lucrarea de față a avut ca prim obiectiv evaluarea proprietăților de ionofor ale unui [4.4.4.4]ciclofan și a 9 compuși calixarenici, pentru care au fost evaluați parametri electrochimici: sensibilitate, limită de detecție și domeniu de linearitate folosind soluții ionice separate, precum și coeficienții de selectivitate, evaluați în soluții mixte. În cazul compusului M7F2, pentru care s-au preparat membrane atât cu, cât și fără aditiv ionic (KtKClPB), nu s-au observat diferențe

semnificative între parametrii electroanalitici ai celor două tipuri de membrane. Compușii M7F2 și C4P4 au prezentat selectivitate pentru ionul de  $\text{Ca}^{2+}$ ; compușii calixarenici C4Es2Cr2, C6Es3 și C6Es3Cr3 au manifestat un comportament selectiv pentru  $\text{Na}^+$ , iar compușii C4P4, C6Es6, C6Cr3Am3 și C8Es8 au răspuns preferențial față de  $\text{K}^+$ .

Al doilea obiectiv urmărit în lucrarea de față a constat din prepararea, optimizarea, caracterizarea și utilizarea în probe sintetice (AA, Trolox și acid cafeic) și probe reale (vinuri și sucuri de fructe) a trei senzori amperometrici pentru evaluarea AAO (G/RP/HRP, G/RP/HRP//XOD și G/PB). Luând în considerare simplitatea procedurii de preparare, costurile aferente precum și proprietățile electroanalitice, senzorul G/PB este optim. Dacă se ia în considerare relevanța AAO evaluate, biosenzorul G/RP/HRP-XOD este de preferat, datorită capacității antiradicalice determinate. Studiul stabilității operaționale efectuat pentru biosenzorul G/RP/HRP a arătat că durata de viață a acestuia scade odată cu creșterea temperaturii de păstrare a acestuia, a concentrației  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizate și a frecvenței măsurătorilor. Folosind cei trei senzori realizați și trei metode de referință (DPPH, Folin-Ciocalteu și DCPIP), s-au evaluat comparativ AAO ale unor vinuri (alb "Feteasca Regală"; roșu "Cabernet") și sucuri de fructe (lămâie, grepfrut, portocală roșie, pară "Seckel", nectarină, kiwi, portocală, măr "Red Delicious", struguri negri, struguri albi, mandarină, suc concentrat de mere "Pektirom"). S-au obținut multiple corelații între metodele utilizate, ceea ce demonstrează că, în anumite cazuri, metodele propuse pot fi utilizate cu succes în evaluarea AAO.

## V. Bibliografie

1. E. Bakker, K. Chumbimuni-Torres, Modern directions for potentiometric sensors, **2008**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 19(4), 621-629
2. P. Buhlmann, E. Pretsch, E. Bakker, Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 2. Ionophores for potentiometric and optical sensors, **1998**, *Chem. Rev.*, 98, 1593-1687
3. M. Gerson, O terapie naturala eficienta pentru tratarea cancerului si a altor boli grave, **2005**, *For You*,
4. J. Thomas, Devices for ion-sensing and pX measurements, **2001**, *Pure Appl. Chem.*, 73(1), 31-38
5. M. Kamyabi A. Abbaspour, Copper(II)-selective electrode based on dithioacetal, **2002**, *Anal. Chim. Acta*, 455, 225-231
6. M. Gholivand, M. Rahimi-Nasrabadi, M. Ganjali, M. Salavati-Niasari, Highly selective and sensitive copper membrane electrode based on a new synthesized Schiff base, **2007**, *Talanta*, 73, 553-560
7. V. Gupta, R.N. Goyal, N. Bachheti, L.P. Singh, S. Agarwal, A copper-selective electrode based on bis(acetylaceton)propylenediimine, **2005**, *Talanta*, 68, 193-197
8. Wikipedia, Zinc, <http://en.wikipedia.org/wiki/Zinc>,
9. V. Gupta, A. Jain, P. Kumar, PVC-based membranes of N,N'-dibenzyl-1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane as Pb(II)-selective sensor, **2006**, *Sens. Actuators B*, 120, 259-265
10. V. Gupta, R. Prasad, P. Kumar, R. Mangla, New nickel(II) selective potentiometric sensor based on 5,7,12,14-tetramethyldibenzotetraazaannulene in a poly(vinyl chloride) matrix, **2000**, *Anal. Chim. Acta*, 420, 19-27
11. V. Gupta, A. Jain, P. Kumar, PVC-based membranes of dicyclohexano-24-crown-8 as Cd(II) selective sensor, **2006**, *Electrochim. Acta*, 52, 736-741
12. V. Gupta, A. Singh, S. Mehtab, B. Gupta, A cobalt(II)-selective PVC membrane based on a Schiff base complex of N,N-bis(salicylidene)-3,4-diaminotoluene, **2006**, *Anal. Chim. Acta*, 566, 5-10
13. J. Lizondo-Sabater, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, M. Segui, J. Soto, Ion-selective electrodes for anionic surfactants using a cyclam derivative as ionophore, **2008**, *Talanta*, 75, 317-325
14. M. Ganjali, P. Norouzi, F. Faridbod, M. Yousefi, L. Najji, M. Salavati-Niasari, Perchlorate-selective membrane sensors based on two nickel-hexaazamacrocyclic complexes, **2007**, *Sens. Actuators B*, 120, 494-499

15. A. Soleymanpour, E. Asl, S. Nabavizadeh, Perchlorate selective membrane electrodes based on synthesized platinum(II) complexes for low-level concentration measurements, **2007**, *Sens. Actuators B* 120, 447-454
16. H. Seifried, D. Andersonb, E. Fishera, J. Milner, A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species, **2007**, *J. Nutr. Biochem.*, 18, 567-579
17. J. Gutteridge, B. Halliwell, Antioxidants: molecules, medicines, and myths, **2010**, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 393, 561-564
18. S. Ali, N. Kasoju, A. Luthra, A. Singh, H. Sharanabasava, A. Sahu, U. Bora, Indian medicinal herbs as sources of antioxidants, **2008**, *Food Res. Int.*, 41, 1-15
19. D. Huang, B. Ou, R. Prior, The chemistry behind antioxidant capacity assays, **2005**, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856
20. E. Frankel, A. Meyer, The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, **2000**, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1925-1941
21. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, **2005**, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302
22. P. Molyneux, Use of DPPH to estimate antioxidant activity, **2004**, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 26(2), 212-218
23. S. Milardovic, D. Ivekovic, B. Grabaric, V. Rumenjak, B. Grabaric, Use of DPPH<sup>•</sup> / DPPH redox couple for biamperometric determination of antioxidant activity, **2005**, *Electroanal.*, 17, 1847-1853
24. S. Milardovic, D. Ivekovic, B. Grabaric, A novel amperometric method for antioxidant determination using DPPH free radical, **2006**, *Bioelectrochem.*, 68, 175-180
25. L. Magalhaes, M. Segundo, S. Reis, J. Lima, Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, **2008**, *Anal. Chim. Acta*, 613, 1-19
26. V. Roginsky, E. Lissi, Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, **2005**, *Food Chem.*, 92, 235-254
27. L. Varvari, S. A. Dorneanu, I. C. Popescu, New [4.4.4.4]cyclophane as ionophore for ion-selective electrodes, **2008**, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia*, LIII(1), 113-118
28. N. Bogdan, I. Grosu, E. Condamine, L. Toupet, Y. Ramondenc, I. Silaghi-Dumitrescu, G. Pi, E. Bogdan, New [4.4]cyclophane diketals, monoketones, and diketones: design, synthesis, and structural analysis, **2007**, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007(28), 4674-4687
29. Materiale pe bază de calixarene cu proprietăți de recunoaștere a unor specii ionice și/sau moleculare de interes biologic și ecologic (CALIXMAT), PNII 71-062/2007, CNCSIS
30. Caracterizarea de electrozi ion-selectivi (EIS) pe bază de materiale compozite modificare cu noi compuși de tipul calixarenelor [bursă de cercetare științifică/creație artistică pentru tineri doctoranzi (BD)], 395/2008, CNCSIS
31. L. Varvari, S. A. Dorneanu, I. C. Popescu, Potassium-selective electrode based on a calix[6]arenic ester (C6Es6), **2009**, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia*, LIV(3), 247-252
32. L. Varvari, S. A. Dorneanu, I. C. Popescu, K<sup>+</sup>-selective electrode based on a calix[6]arenic compound, **2008**, *Proceedings of the 8th International Symposium on Metal Elements in Environment, Medicine and Biology*, Timisoara (România), 21-24
33. L. Varvari, S. A. Dorneanu, I. C. Popescu, Calix[6]arene ester as ionophore for ion-selective electrodes, **2008**, *Proceedings of the 2nd International Conference on Advanced Materials and Systems*, Bucuresti (Romania), 114-119
34. E. Bakker, P. Buhlmann, E. Pretsch, Polymer membrane ion-selective electrodes - what are the limits?, **1999**, *Electroanal.*, 11(13), 915-933
35. E. Bakker, P. Buhlmann, E. Pretsch, Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics, **1997**, *Chem. Rev.*, 97, 3083-3132
36. E. Bakker, E. Pretsch, Potentiometric sensors for trace-level analysis, **2005**, *Trends in Anal. Chem.*, 24(3), 199-207
37. E. Pungor, K. Toth, A. Hrabeczy-Pall, Selectivity coefficients of ion-selective electrodes, **1979**, *Pure & Appl. Chem.*, 51, 1913-1980
38. Y. Umezawa, P. Buhlmann, K. Umezawa, K. Tohda, S. Amemiya, Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part I. Inorganic cations (technical report), **2000**, *Pure & Appl. Chem.*, 72(10), 1851-2082
39. S. A. Dorneanu, V. Coman, I. C. Popescu, P. Fabry, Computer-controlled system for ISEs automatic calibration, **2005**, *Sens. Actuators B*, 105(2), 521-531
40. L. Varvari, L. Muresan, I. C. Popescu, New amperometric biosensor for determination of the total antioxidant capacity, **2008**, *Proceedings of the International Conference on Metrology of Environmental, Food and Nutritional Measurements*, Budapesta (Ungaria), 13-18
41. L. Varvari, V. Lates, I. C. Popescu, Determination of antioxidant capacity using xanthine-xanthine oxidase system coupled with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amperometric biosensor, **2011**, *Rev. Roum. Chim.*, 56(7), xx-xx
42. R. Ricci, A. Amine, C. Tuta, A. Ciucu, F. Lucarelli, G. Palleschi, D. Moscone, Prussian Blue and enzyme bulk-modified screen-printed electrodes for hydrogen peroxide and glucose determination with improved storage and operational stability, **2003**, *Anal. Chim. Acta*, 485, 111-120
43. A. Karyakin, E. Karyakina, L. Gorton, The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxide reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow, **1998**, *J. Electroanal. Chem.*, 456, 97-104

44. R. Koncki, Chemical sensors and biosensors based on Prussian Blues, **2001**, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 32(1), 79-96
45. L. Varvari, I. C. Popescu, New method for antioxidant activity evaluation using a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amperometric sensor, **2010**, *Rev. Roum. Chim.*, 55(11-12), 851-857
46. J. Deutsch, Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide, **1998**, *Anal. Biochem.*, 255, 1-7
47. F. Ricci, G. Palleschi, Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes, **2005**, *Biosens. Bioelectron.*, 21, 389-407
48. Senzori și aparatură pentru controlul calității unor produse alimentare (SENSALIM), PNII 71-098/2007, CNCSIS

## **VI. Lista rezultatelor diseminate**

### **Lista participărilor la manifestări științifice naționale și internaționale**

1. Lidia Varvari, Liana Mureșan, Ionel Cătălin Popescu, Antioxidant capacity determination in wines and fruit juices using an amperometric biosensor, The 59<sup>th</sup> Meeting of the International Society of Electrochemistry, Sevilla, Spania, 07-12 septembrie **2008**, poster
2. Lidia Varvari, Liana M. Mureșan, Ionel Cătălin Popescu, New amperometric biosensor for determination of the total antioxidant capacity, International Conference on Metrology of Environmental, Food and Nutritional Measurements, Budapesta, Ungaria, 09-12 septembrie **2008**, prezentare orală
3. Lidia Varvari, Sorin Aurel Dorneanu, Ionel Cătălin Popescu, Calix[6]arene esters as ionophores for ion-selective electrodes, 2nd International Conference on Advanced Materials and Systems, București, România, 23-24 octobrie **2008**, prezentare orală
4. Lidia Varvari, Sorin Aurel Dorneanu, Ionel Cătălin Popescu, Cation-selective electrode based on a calix[6]arenic compound, 8th International Symposium on Metal Elements in Environment, Medicine and Biology, Timișoara, 05-06 decembrie **2008**, prezentare orală
5. Vasilica Lateș, Lidia Varvari, Ionel Cătălin Popescu, Biocapteur ampérométrique pour la détermination de la capacité antioxydante, Journées d'Electrochimie, Sinaia, România, 06-10 iulie **2009**, prezentare orală
6. Lidia Varvari, Gabriella Szabo, Ionel Cătălin Popescu, Comparative study on the antioxidant activity evaluation of fruit juices and wines by using amperometric and spectrophotometric methods, Molecular Modeling in Chemistry and Biochemistry, Cluj-Napoca, România, 28 mai **2010**, prezentare orală
7. Lidia Varvari, Ionel Cătălin Popescu, Comparative study on the antioxidant evaluation of fruits by using amperometric and bioamperometric methods, 3rd EuCheMS Chemistry Congress, Nürnberg, Germania, 29 august-02 septembrie **2010**, poster

### **Lista lucrărilor publicate**

1. Lidia Varvari, Sorin Aurel Dorneanu, Ionel Cătălin Popescu, New [4.4.4]cyclophane as ionophore for ion-selective electrodes, **2008**, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Chemia*, LIII(1), 113-118
2. Lidia Varvari, Liana M. Mureșan, Ionel Cătălin Popescu, New amperometric biosensor for determination of the total antioxidant capacity, **2008**, *Proceedings of the International Conference on Metrology of Environmental, Food and Nutritional Measurements*, Budapesta (Ungaria), 13-18
3. Lidia Varvari, Sorin Aurel Dorneanu, Ionel Cătălin Popescu, Calix[6]arene ester as ionophore for ion-selective electrodes, **2008**, *Proceedings of the 2nd International Conference on Advanced Materials and Systems*, București (România), 114-119
4. Lidia Varvari, Sorin Aurel Dorneanu, Ionel Cătălin Popescu, K<sup>+</sup>-selective electrode based on a calix[6]arenic compound, **2008**, *Proceedings of the 8th International Symposium on Metal Elements in Environment, Medicine and Biology*, Timișoara (România), 21-24

5. Lidia Varvari, Sorin Aurel Dorneanu, Ionel Cătălin Popescu, Potassium-selective electrode based on a calix[6]arenic ester (C6Es6), **2009**, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia*, LIV(3), 247-255
6. Lidia Varvari, Ionel Cătălin Popescu, New method for antioxidant activity evaluation using a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amperometric sensor, **2010**, *Rev. Roum. Chim.*, 55(11-12), 851-857
7. Lidia Varvari, Vasilica Lateş, Ionel Cătălin Popescu, Determination of antioxidant capacity using xanthine-xanthine oxidase system coupled with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amperometric biosensor, **2011**, *Rev. Roum. Chim.*, 56(7), xx-xx