

**UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI**

**Școala doctorală de inginerie**

---

# **TEZĂ DE ABILITARE**

## **REALIZAREA UNOR NOI SENZORI ȘI BIOSENZORI CU APLICABILITATE ÎN ANALIZA ALIMENTELOR**

## **DEVELOPMENT OF NOVEL SENSORS AND BIOSENSORS WITH APPLICATIONS IN FOOD ANALYSIS**

**Conf. dr. APETREI Constantin**

**Domeniul de doctorat,  
CHIMIE**

---

**GALAȚI 2015**

## ABSTRACT

This habilitation thesis presents the main results of the scientific research activities carried out in the period 2008-2015, after having finished my PhD thesis in 2007. The activity carried out was based on the research experience achieved during the PhD studies including the development of novel chemical sensors based on different sensitive materials and technologies, development of biosensors based on nanostructured materials and enzymes, and development of sensors/biosensors arrays for the analysis of complex real samples. The data analysis methods employed for different purposes has been continuously improved and several novel techniques and strategies have been developed. The main achievements are summarized in the following paragraphs.

### **1. Development of novel sensors**

#### ***Sensors based on phthalocyanines***

For the development of this type of sensors I have employed phthalocyanine compounds (lutetium (III) bisphthalocyanine, cobalt (II) phthalocyanine and derivatives of cobalt (II) phthalocyanine, dilithium phthalocyanine, lutetium (III) bis-octachloro-phthalocyaninate etc.) as sensitive materials. The methods employed for construction of sensors were based on carbonaceous paste electrodes, screen-printed electrodes, drop-and-dry modification of screen-printed electrodes, Langmuir-Blodgett thin films etc. The carbonaceous materials used were graphite, carbon nanotubes, carbon nanofibers, carbon nanoparticles, carbon microspheres etc. In all studies the sensors were constructed, the sensitive layer was characterized by spectrometric and/or microscopic methods, determination of optimal parameters for the maximum sensibility, performance characteristics and the exploring of potential applications in real samples analysis. The sensors developed were used for detection and quantification of different compounds from complex samples with high precision.

#### ***Sensors based on different carbonaceous materials***

For different applications the use of sensors based only on carbonaceous materials were developed, characterized and applied for analysis of antioxidants and catecholamines. Carbonaceous materials employed for the fabrication of this type of sensors were graphite, carbon nanotubes, carbon microspheres, and graphene. The methods used for fabrication were carbon paste electrodes and screen-printed electrodes. The sensors based on carbon paste electrodes were fabricated, completely characterized and used for detection of antioxidants. On the other hand, the sensors based on screen-printed electrodes modified with different carbonaceous materials were electrochemically characterized and were established their capability to detect catecholamines in plasma.

#### ***Sensors based on novel synthesized compounds***

Thin films of 5-(dimethylamino)-5'-nitro-2,2'-bithiophene were deposited by Langmuir-Blodgett techniques. The structure and properties of thin films were studied by UV-Vis spectroscopy,

IR spectrometry and AFM microscopy. Optical and electrochemical sensing properties of LB based sensor were also studied.

## **2. Development of different biosensors**

### ***Biosensors based on phthalocyanines, carbonaceous materials and tyrosinase***

For the construction of novel biosensors based on nanostructured materials, Ty was included in mixed Langmuir films of arachidic acid and lutetium bisphthalocyanine. Enzyme immobilization was proven through FTIR absorption spectroscopy, and a preserved activity was confirmed with the electrochemical detection of phenolic compounds. The biosensor developed showed excellent properties and enhanced sensitivity towards phenolic compounds.

Other studies have established that the biomimetic environment provided by a bilayer of arachidic acid on Langmuir-Blodgett film helps preserve the enzymatic functionality, while increasing the number of active sites with respect to tyrosinase-based carbon paste biosensors. LB based biosensors present superior properties comparing with biosensors based on carbon paste electrodes.

Furthermore, a novel amperometric biosensor based on Ty/SWCNT-COOH modified SPE was developed for tyramine detection. The novel biosensor shows large linear working range, low detection limit and rapid response. The biosensor was successful used in the determination of tyramine in pickled and smoked fish samples.

### ***Biosensor based on polypyrrole and tyrosinase***

The biosensor based on polypyrrole and tyrosinase was developed and employed for monitoring phenolic compounds in aqueous medium. Polypyrrole was as a suitable matrix for the immobilization of tyrosinase. The biosensor exhibits fast response, high sensitivity and stability for the amperometric detection of phenolic compounds. This type of biosensor was used for detection and quantification of phenols in natural waters and of tyramine in food samples.

## **3. Development of e-tongue systems and their application**

Electronic tongue systems developed were based on a number of (bio)sensors and advanced mathematical procedures for signal processing based on pattern recognition and/or multivariate data analysis. The array of sensors is based on sensors and biosensors developed and characterized in the previous chapters. The data analysis includes the pre-processing of data by several methods developed in collaborations with other researchers, such as kernel method, discrete wavelet transform and genetic algorithms. For multivariate data analysis unsupervised methods (e.g. Principal Component Analysis) and supervised methods (Soft Independent Modeling of Class Analogy) were employed, and for establishing of correlations regression models were constructed (e.g. PLS2 models). In some cases, additional electronic systems (e-nose and e-eye) were also employed for a complete characterization of food samples. The multisensors systems were used for the analysis, monitoring, and authentication of samples of great interest in food industry (wines, olive oils, beers, and fish).

## REZUMAT

Această teză de abilitare prezintă principalele rezultate ale activităților de cercetare științifică desfășurate în perioada 2008-2015, după terminarea tezei de doctorat în 2007. Activitatea realizată s-a bazat pe experiența în cercetare acumulată în timpul studiilor doctorale, și include dezvoltarea de senzori chimici pe bază de diferite materiale sensibile și noi tehnologii, dezvoltarea de biosenzori pe bază de materiale nanostructurate și enzime și dezvoltarea de rețele de senzori/biosenzori pentru analiza mostrelor reale complexe. Metodele de analiză a datelor utilizate pentru diferite scopuri au fost îmbunătățite continuu și, de asemenea, s-au elaborat mai multe metode și strategii noi de analiză a datelor. Principalele realizări sunt cuprinse în următoarele paragrafe.

### **1. Realizarea unor noi senzori**

#### ***Senzori pe bază de ftalocianine***

Pentru dezvoltarea acestui tip de senzori am utilizat ca materiale sensibile o serie de ftalocianine (bisftalocianină de lutețiu (III), ftalocianină și cobalt (II) și derivați ai ftalocianinei de cobalt (II), ftalocianină de dilitiu, bis-octacloro-ftalocianină de lutețiu (III) etc.). Metodele utilizate pentru construcția senzorilor s-au bazat pe electrozi de pastă de carbon, electrozi serigrafiați, modificarea *drop-and-dry* a electrozilor serigrafiați, filme subțiri Langmuir-Blodgett etc. Materialele pe bază de carbon folosite au fost grafit, nanotuburi de carbon, nanofibre de carbon, nanoparticule de carbon, microsferă de carbon etc. În toate studiile realizate s-au dezvoltat senzori noi, stratul sensibil a fost caracterizat prin metode spectrometrice și/sau microscopice, s-au determinat parametrii optimi pentru obținerea sensibilității maxime, s-au determinat caracteristicile de performanță și s-au explorat aplicațiile potențiale în analiza probelor reale. Senzorii dezvoltați au fost utilizați pentru detectarea și cuantificarea cu mare precizie a diferiților compuși din probe complexe.

#### ***Senzori pe bază de diferite materiale din carbon***

Pentru diferite aplicații s-au realizat senzori pe bază de materiale din carbon, s-au caracterizat și s-au aplicat pentru analiza unor antioxidanți și a unor catecolamine. Materiale din carbon utilizate pentru fabricarea acestui tip de senzori au fost grafit, nanotuburi de carbon, microsferă de carbon și grafen. Metodele folosite pentru fabricarea senzorilor au fost metoda electrozilor de pastă de carbon și a electrozilor serigrafiați. Senzorii pe bază de electrozi de pastă de carbon au fost fabricați, au fost complet caracterizați și s-au utilizat pentru detectarea unor antioxidanți. Pe de altă parte, senzorii pe bază de electrozi serigrafiați modificați cu diferite materiale din carbon au fost caracterizați electrochimic și s-a stabilit capacitatea lor de a detecta catecolamine în plasmă.

#### ***Senzori pe bază de compuși sintetici noi***

Cu ajutorul tehnicii Langmuir-Blodgett s-au depus filme subțiri de 5-(dimetilamino)-5'-nitro-2,2'-ditiofen. Structura și proprietățile filmelor subțiri au fost studiate prin spectroscopie UV-Vis,

spectrometrie IR și microscopie AFM. De asemenea, au fost studiate proprietățile optice și electrochimice ale senzorului pe bază de filme LB.

## **2. Dezvoltarea unor noi biosenzori**

### ***Biosenzori pe bază de ftalocianine, materiale din carbon și tirozinază***

Pentru construcția de noi biosenzori pe bază de materiale nanostructurate, tirozinaza a fost inclusă în filme Langmuir mixte de acid arachidic și bisftalocianină de lutețiu. Imobilizarea enzimei a fost dovedită prin spectrometrie de absorbție FTIR, și menținerea activității biocatalitice a fost confirmată prin detectarea electrochimică a compușilor fenolici. Biosenzorul dezvoltat prezintă proprietăți excelente și sensibilitate ridicată față de compușii fenolici.

În alte studii s-a stabilit că mediul biomimetic furnizat de stratul dublu de acid arachidic din filmul Langmuir-Blodgett ajută la păstrarea funcționalității enzimei, ceea ce conduce la creșterea numărului de centri activi, față de biosenzorii pe bază de pastă de carbon modificaliți cu tirozinază. Biosenzorii pe bază de filme LB prezintă proprietăți superioare față de biosenzorii pe bază de electrozi de pastă de carbon.

În alt studiu s-a realizat un biosenzor amperometric pe bază de electrozi serigrafiați modificaliți cu Ty/SWCNT-COOH pentru detecția tiraminei. Noul biosenzor prezintă un domeniu de liniaritate amplu, o limită de detecție scăzută și un timp de răspuns foarte rapid. Biosenzorul a fost folosit cu succes pentru determinarea tiraminei în mostre de pește marinat și pește afumat.

### ***Biosenzori pe bază de polipirol și tirozinază***

Biosenzorul pe bază de polipirol și tirozinază a fost dezvoltat și utilizat în monitorizarea compușilor fenolici în mediu apos. Polipirolul este o matrice adecvată pentru imobilizarea tirozinazei. Biosenzorul prezintă un răspuns rapid, o sensibilitate ridicată și stabilitate pentru detectarea amperometrică a compușilor fenolici. Acest tip de biosenzor a fost utilizat pentru detectarea și cuantificarea fenolilor din apele naturale și a tiraminei din alimente.

## **3. Dezvoltarea sistemelor e-tongue și aplicațiile acestora**

Sistemele denumite limbi electronice dezvoltate s-au bazat pe o serie de (bio)senzori și metode matematice avansate de procesare a semnalului bazate pe recunoașterea de patroni și/sau analiza datelor multivariate. Rețelele de (bio)senzori s-au bazat pe senzorii și biosenzorii dezvoltați și caracterizați în capitolele anterioare. Analiza datelor include prelucrarea datelor prin mai multe metode dezvoltate în colaborare cu alți cercetători, cum ar fi metoda *kernel*, *discrete wavelet transform* și algoritmi genetici. Pentru analiza datelor multivariate s-au folosit metode nesupervizate (de exemplu, Analiza Componentelor Principale) și metode supervizate (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*), iar pentru stabilirea corelațiilor au fost construite modelele de regresie (de exemplu, modelele de tip PLS2). În unele cazuri, au fost folosite sisteme electronice suplimentare (*e-nose* sau *e-eye*) pentru caracterizarea completă a unor alimente. Sistemele multisenzor au fost folosite pentru analiza, monitorizarea și autentificarea unor probe de mare interes în industria alimentară (vinuri, uleiuri de măsline, bere și pește).