



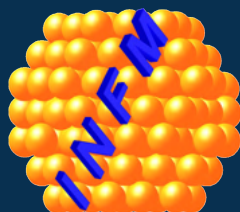
UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020



REZULTATE DIN CADRUL PROIECTULUI NANOBIO SURF

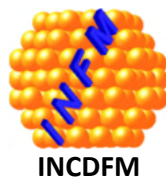
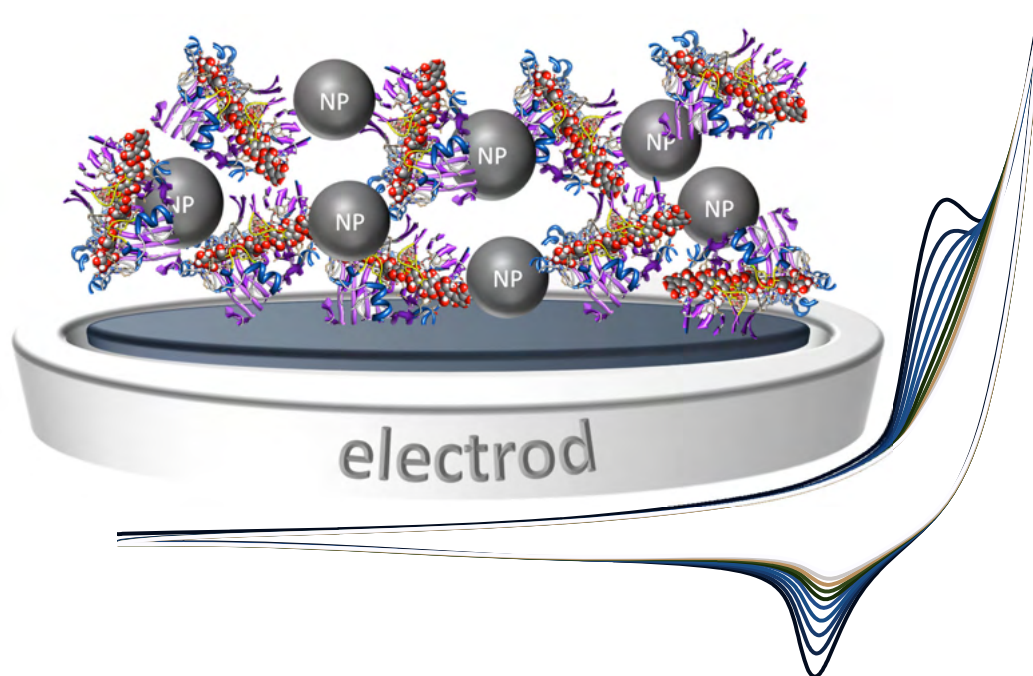


Proiect cofinanțat din Fondul European de Dezvoltare Regională prin
Programul Operațional Competitivitate 2014-2020

**Biosenzori electrochimici nanostructurați pentru diagnoză medicală
și *screening* de compuși cu proprietăți farmaceutice: dezvoltare,
caracterizarea suprafețelor și aplicații
NANOBIOSURF-SMIS 103528**

REZULTATE DIN CADRUL PROIECTULUI NANOBIOSURF

Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica Materialelor



CUPRINS

Obiective, rezultate, aprecieri.....	3
Exploatarea materialelor magnetice în dezvoltarea de biosenzori	7
Electrozi și biosenzori flexibili pentru monitorizare continuă de <i>biomarker</i> -i.....	10
Detecrie de compuși cu proprietăți farmaceutice și <i>biomarker</i> -i prin intermediul unor noi biosenzori și imunosenzori electrochimici.....	14
Mecanismul redox al metioninei: studii voltametrice și de spectrometrie de masă	17
Detecria electrochimică a leziunilor oxidative în proteine.....	19
Dendrimeri cu conținut ridicat de hidrazide pentru dezvoltarea de bio(senzori). Sinteza și aplicații.	21
Biosenzori pentru dectecția mutațiilor genetice	23
Evaluarea electrochimică a interacției dintre compuși farmaceutici și acidul dezoxiribonucleic.....	25
Efectul stresului oxidativ asupra celulelor vii	27
Listă de publicații rezultate din implementarea proiectului	32

Obiective, rezultate, aprecieri...

Victor C. Diculescu

Obiectivul principal al proiectului a fost de a impulsiona activitatea laboratorului creat în cadrul INCDFM, L2. *Producția, prelucrarea și analiza materialelor pentru creșterea calității vieții* prin demararea de studii privind dezvoltarea de (bio)senzori nanostructurați pentru detectarea de (bio)molecule, *biomarker*-i ai afecțiunilor medicale și pentru *screening*-ul de liganzi inhibitori și compuși cu proprietăți farmaceutice. Pentru atingerea acestui obiectiv au fost efectuate diverse activități administrative și activități de cercetare fundamentală sau dezvoltare experimentală.

În privința activităților administrative, în mare parte acestea s-au axat pe două direcții. Prima dintre acestea se referă la achiziția de echipamente necesare demarării investigațiilor necesare atingerii obiectivelor științifice. Într-o primă etapă au fost achiziționate potențiostate/galvanostate și analizoare electrochimice, un sistem de cromatografie lichidă de înaltă performanță, un spectrometru de rezonanță a plasmonilor de suprafață precum și diverse echipament uzuale de laborator (centrifugă, agitator de incubare, etc), **Fig 1**.

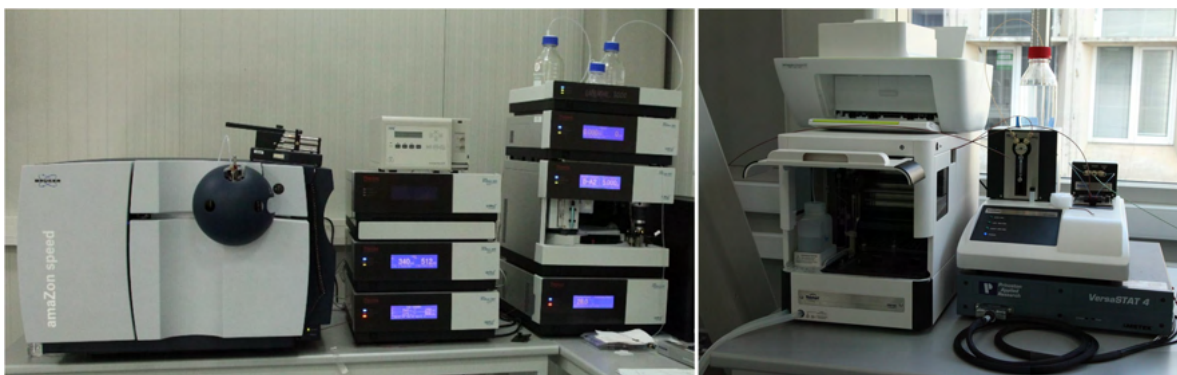


Fig. 1. Fotografii ale (de la stânga la dreapta) sistemului de cromatografie lichidă de înaltă performanță și spectrometrului de rezonanță a plasmonilor de suprafață.

De asemenea, în urma derulării activităților de cercetare fundamentală și de dezvoltare experimentală s-a constatat necesitatea unui laborator de *Biologie și culturi celulare* unde se remarcă echipamente precum un spectrometru cititor de plăci, un spectrometru pentru citometrie în flux, un microscop de fluorescență și diverse alte echipamente necesare culturilor celulare (hotă în flux, congelatoare, etc), **Fig. 2**. Este evidențiată contribuția fundamentală în dezvoltarea acestui laborator a membrilor echipei de implementare, cu precădere a domnilor Dr. George Stan și Dr. Adrian Enache, dar și a colaboratorilor Dr. Ionuț Enculescu (INCDFM), Dr. Elena Butoi (IBPC-NS) și Dr. Mihaela Bacalum (IFIN-HH).

A doua activitate administrativă a avut ca obiectiv dezvoltarea unei echipe de cercetare. Astfel, s-a avut în vedere atragerea de personal înalt calificat necesar implementării activităților de cercetare. În acest context au fost ocupate două poziții de *post-doc* prin atragerea a doi cercetători experimentați, cu pregătire internațională în domeniul bioelectrochimiei și biosenzorilor.



Nu în ultimul rând, au fost ocupate și cele două poziții de *doctorand* prin atragerea de tineri cercetători, licențiați în Chimie la Universități de prestigiu din străinătate.

Cu referire la activitățile administrative, este evidențiată contribuția fundamentală a tuturor membrilor echipei de management dar și a doamnei Ec. Dumitra Agachi în gestiunea generală a proiectului.



Fig. 2. Fotografii ale laboratorului de Biologie și culturi celulare (de sus în jos și de la stânga la dreapta): hotă, microscop de fluorescență și spectrometru pentru citomerie în flux, și spectrometru cititor de plăci.

În privința activităților de cercetare, este de menționat că acestea s-au concentrat pe trei direcții specifice, cu referire directă la biomolecule (relevanța acestora în acord cu noile descoperiri în Biologie), la tehnicile și procedurile de detecție precum și la controlul asupra suprafeței electrodului pentru imobilizarea biomoleculilor. Astfel, au fost implementate șase activități de cercetare:

- **Activitatea 1. Strategii de imobilizare**, a necesitat caracterizarea de noi suprafețe nanostructurate conductoare și semi-conductoare, integrarea biomoleculilor cu aceste materiale pentru dezvoltarea de noi proceduri de imobilizare. Se remarcă electrozii de nichel care au permis utilizarea proprietăților magnetice ale acestui metal în sinergie cu cele ale metalelor cu proprietăți electrocatalitice. Un alt tip de material care a căpătat o importanță deosebită în timpul implementării proiectului este dat de fibre polimerice electrofilate, cu acoperire metalică. Nu în ultimul rând este de menționat că unele cercetări din cadrul acestei activități au dus și la dezvoltarea unor materiale cu aplicații în diverse alte domenii, precum electro- și foto-cataliza.
- **Activitatea 2. Caracterizarea interacțiilor biomoleculilor**, a avut în vedere pe de o parte caracterizarea interacțiilor dintre proteine și biomolecule precum substrății enzimatici dar și dintre proteine și ioni metalici. Se remarcă dezvoltarea unui biosenzor pentru determinarea gradului de carbonilare a proteinelor în urma interacției cu specii reactive de oxigen. Tot în această direcție este important de menționat studiul asupra interacției proteinei prion dar și a trombinei cu diferiți ioni metalici. Pe de altă

parte, efectul toxic al unor compuși chimici cu proprietăți farmaceutice a fost investigat cu ajutorul biosenzorilor cu ADN.

- **Activitatea 3. Biosenzori electrochimici pentru detecția biomarker-ilor**, a fost dedicată dezvoltării de biosenzori cu anticorpi pentru detecția de antigene, cu aptameri pentru detecția de proteine sau cu ADN pentru identificarea mutațiilor genetice. Se remarcă aici imunosenzorul pentru detecția proteazomului 20S, un complex enzimatic implicat în diverse anomalii medicale; biosenzorii cu aptameri pentru detecția proteinei prion implicată în bolile neurodegenerative sau a trombinei, o enzimă implicată în procesele de coagulare sangvină; genosenzorul pentru detecția modificărilor genetice în cazul leucemiei mieloid cronice.
- **Activitatea 4. Caracterizarea activității enzimatice** la suprafața biosenzorilor nou dezvoltată a fost esențială pentru *screening*-ul de compuși inhibitori. A fost caracterizată activitatea unor enzime printre care se remarcă proteazomul 20S, piruvat-kinaza, superoxid-dizmutaza și diverse oxidaze.
- **Activitatea 5. Biosenzori electrochimici pentru screening-ul de liganzi inhibitori și compuși cu proprietăți farmaceutice**. În cadrul acestora au fost efectuate studii asupra inhibiției proteazomului 20S dar și asupra piruvat-kinazei sau mai nou kinazei SRC, enzime cu înaltă relevanță în diverse tipuri de anomalii medicale. Au fost testați compuși chimici sintetici, molecule cu proprietăți farmacologice cunoscute dar și compuși chimici naturali din extracte de plante.
- **Activitatea 6. Dezvoltarea experimentală**, a avut în vedere trei direcții de cercetare. Au fost caracterizate extracte de plante și testat efectul inhibitor al unor compuși chimici naturali. În același timp, atenția s-a îndreptat către dezvoltarea unui sistem automatizat cu detecție electrochimică pentru analiza de probe multiple. Totodată au fost testate noi sisteme de detecție în *biosensing* precum tranzistorii cu canal nanofir dar a fost dezvoltat și un dispozitiv cu detecție electrochimică pentru cuantificarea de ADN. De asemenea, au fost efectuate teste pe culturi celulare în vederea dezvoltării de (bio)senzori pentru cuantificarea gradului de oxigenare și detecția de *biomarker*-i ai stresului oxidativ.

Principalele rezultate științifice obținute în cadrul proiectului până la data acestei sesiuni de comunicări sunt: 26 lucrări indexate în baza de date *Web of Science* dintre care 8 cu factor de impact mai mare ca 5; 6 cereri de brevet depuse la OSIM, aprox. 10 proiecte naționale și 3 internaționale dintre care 5 au obținut

finanțare în valoare de mai mult de 600 000 Euro. Este de menționat că un număr de aprox. 12 articole și 2 brevete de invenție se află în faza de redactare la momentul actual.

Implementarea proiectului precum și rezultatele obținute au condus la deschiderea de noi linii și direcții de cercetare avându-se în vedere fructificarea acestora prin propunerea de noi proiecte de cercetare la concursuri naționale și internaționale, programe de dezvoltare experimentală, achiziția de noi echipamente, integrarea de noi dispozitive electronice de de-

Cercetări concretizate în:

Tehnologii de:

- imobilizare a biomoleculelor: i) prin nanoparticule magnetice, ii) cu referire la ADN, prin grupări tiofosfat;
- fabricarea unor senzori purtabili pentru determinarea de *biomarker*-i în transpirație;
- *screening* de inhibitori ai proteazomului 20S și/sau ai piruvat-kinazei;
- fabricare de *array*-uri de anticorpi și peptide pentru detecția de antigene și *biomarker*-i.

Metode de:

- sinteza de dendrimeri cu conținut ridicat de hidrazide;
- detecție electrochimică în flux pentru probe multiple, printr-un dispozitiv automatizat.

(Bio)Senzori pentru:

- determinarea de electroliți, de glucoza, de acid uric în transpirație;
- cuantificarea de ADN/ARN;
- detecția de proteazom 20S;
- *screening*-ul de inhibitori ai proteazomului 20S și ai piruvat-kinazei;
- detecția de prion prin intermediul aptamerilor (aptasenzor);
- detecția leucemiei mieloid cronice (genosenzor);

tecție pentru investigații în culturi celulare și crearea unui *start-up*. Nu în ultimul rând este de remarcat că implementarea acestui proiect a deschis posibilitatea de colaborări naționale și internaționale, atât în cadrul INCDFM cât și în afara acestuia.

La final, aduc mulțumirile mele pentru ajutorul în implementarea proiectului și pentru suportul moral:

- *membrilor echipei de implementare:*

Dr. Mădălina Maria Ignat-Bârsan	Dr. George Stan
Dr. Teodor Adrian Enache	Dr. Ștefan Neațu
MSc. Ricardo Jose Branco-Leote	Dr. Cristian Teodorescu
Dr. Daniel Crișan	Dr. Nicoleta Apostol
Dr. Monica Enculescu	Dr. Ruxandra Costescu
Dr. Nicoleta Preda	

- *membrilor echipei de management:*

Dr. Cristian Teodorescu	Dr. Mihaela Baibarac
Ec. Mirela Crișan	Ing. Ioana-Cristina Bucur

- *colaboratorilor din INCDFM:*

Dr. Elena Matei	MSc. Melania Onea
Ec. Dumitra Agachi	Dr. Andreea Costăș
Dr. Ionuț Enculescu	Dr. Camelia Florica
Dr. Mihaela Beregoi	Dr. Victor Kuncser
Dr. Anca Aldea	Dr. Andrei Kuncser
Dr. Alexandru Evanghelidis	Dr. Mihaela Florea
Dr. Caroline Gomes Sanz	Dr. Florentina Neațu
MSc. Ariana Șerban	Chim. Florica Frumosu
M.Sc. Andreea Luminița Rădulescu	

- *colaboratorilor externi:*

Prof. Dr. Francisco Armijo. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile;

MSc. Francisco Martínez-Rojas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile;

Prof. Dr. Adam Lesner. University of Gdansk, Gdansk, Polonia;

Dr. Elena Butoi. Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, București, România;

Prof. Dr. Cecilia Cristea. Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj, România;

Dr. Mihaela Bacalum, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică și Inginerie Nucleară Horia Hulubei, Măgurele, România

Prof. Dr. Eric de Souza Gil. Universidade Federal de Goias, Goias, Brazilia;

Dr. Ana Maria Chiorcea Paquim, Instituto Pedro Nunes, Coimbra, Portugalia;

Dr. Catarina Sofia Henriques de Jesus, Instituto Pedro Nunes, Coimbra, Portugalia;

nume a căror ordine nu are absolut nici o relevanță, nici din punct de vedere profesional și nici personal, dar fără de care implementarea proiectului ar fi fost extrem de dificilă, probabil imposibil de realizat.

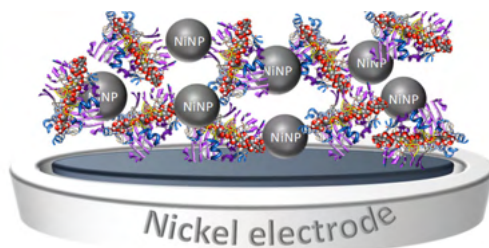
În continuare se dau câteva exemple a unora dintre cele mai relevante activități de cercetare fundamentală și de dezvoltare experimentală, împreună cu o listă a articolelor științifice publicate până la data de 31 Mai 2021.

Exploatarea materialelor magnetice în dezvoltarea de biosenzori

Victor C. Diculescu, Mădălina M. Bârsan, Teodor A. Enache,
Cristian M. Teodorescu, Nicoleta Apostol, Ruxandra Costescu,
George Stan, Elena Matei, Monica Enculescu, Andrei Kuncser, Ionuț Enculescu

Un biosenzor este un dispozitiv integrat receptor-traductor care folosește biomoleculile ca elemente de recunoaștere în scopul măsurării proceselor specifice de interacție prin metode electrice, termice sau optice. Primul și cel mai important pas în proiectarea unui biosenzor este reprezentat de procedura de imobilizare a biomoleculei la suprafața electrodului.

Unul dintre obiectivele proiectului NANOBIO SURF a fost dezvoltarea de noi metodologii de imobilizare și integrare de biomolecule cu materiale nanostructurate. În acest context a fost propusă o arhitectură de biosenzor în care nanoparticule de nichel sunt folosite ca vectori de transport a biomoleculilor la suprafața electrozilor de nichel dopați cu paladiu exclusiv prin intermediul forțelor magnetice [1,2], și fără aplicarea de câmpuri magnetice externe, **Schema 1**.



Schema 1. Reprezentare schematică a arhitecturii electrodului magnetic cu nanoparticule magnetice. Preluată din [1].

În această arhitectură este prevăzut ca electrozii magnetici să aibă un dublu rol: de suport pentru moleculele biologice dar și de transductor al reacțiilor biologice.

Electrozi și nanoparticule de nichel

Electrozii de nichel au fost obținuți prin electrodepunere la $-1,00$ V (vs. SCE) timp de 60s în baie Watts. Ca electrod de lucru s-a folosit un electrod de tip Au/Ti/SiO₂/Si preparat prin evaporare termică. La rândul lor, nanoparticulele de nichel au fost obținute prin reducerea chimică a NiCl₂ cu hidrazină în prezență de PVP.

Într-o primă fază, electrozii (Ni/Au/Ti/SiO₂/Si) și nanoparticulele de Ni (NiNP) au fost caracterizate din punct de vedere morfologic, structural și compozițional, **Fig. 1**.

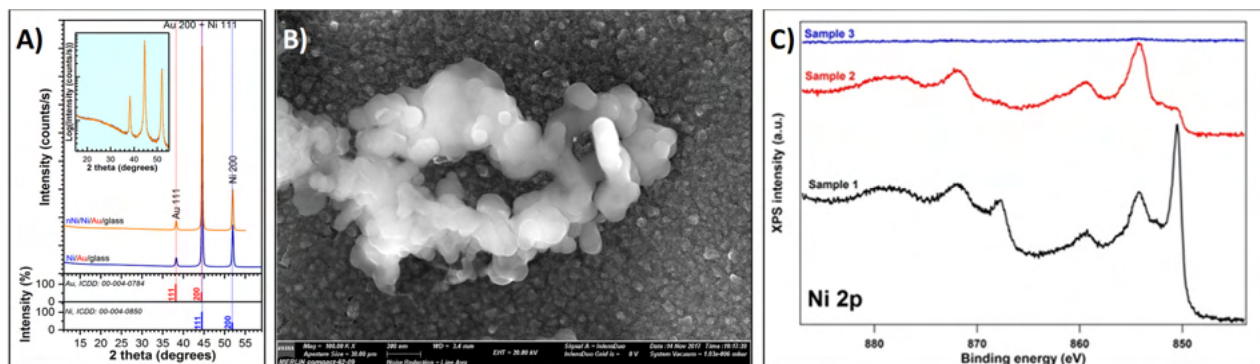


Fig. 1. A) Diagrama de difracție a electrodului de Ni în absența (albastru) și în prezența (orange) nanoparticulelor de Ni; B) imagine SEM a electrodului și nanoparticulelor de Ni; și C) spectru XPS al electrodului de Ni în absența (negru) și în prezența (roșu) nanoparticulelor de Ni. Adaptată din [1].

Structura cristalină a Ni/Au/Ti/SiO₂/Si în absența și în prezența nanoparticulelor a fost investigată prin difracție de raze X (XRD), **Fig. 1A**. Aceste studii au permis și determinarea dimensiunii cristalitelor de ~66 nm pentru electrodul de Ni și ~10 nm pentru nanoparticule. În continuare, imaginile de microscopie electronică de baleiaj (SEM), **Fig. 1B**, au arătat o structură granulată pentru Ni/Au/Ti/SiO₂/Si precum și șiraguri de nanoparticule cu dimensiuni cuprinse între 50 și 200 nm înglobate în matricea polimerică. În același timp, spectroscopia de fotoelectroni de raze X (XPS), **Fig. 1C**, au demonstrat prin prezența maximului de la 852,1 eV un caracter metalic al electrodului de Ni înainte de depunerea NiNP, un fapt esențial pentru a menține caracterul magnetic al electrodului. Pe de altă parte, după depunerea NiNP s-a observat prezența predominantă a speciilor Ni²⁺, importante pentru interacția enzimă-nanoparticulă.

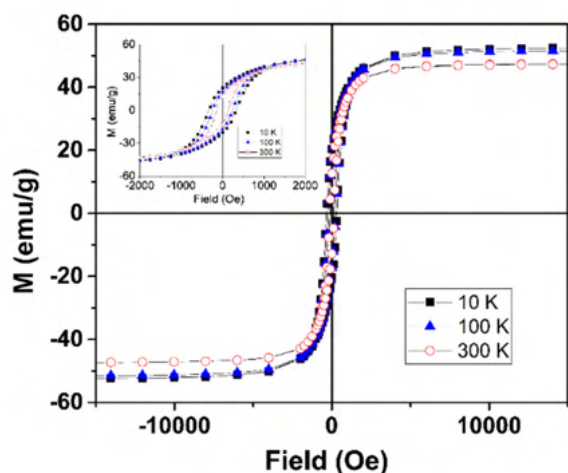


Fig 2. Curbe histeresis ale NiNP înregistrate la diferite temperaturi. Preluată din [1].

Pentru a demonstra posibilitatea atragerii de NiNP la suprafața Ni/Au/Ti/SiO₂/Si exclusiv prin forțe magnetice, au fost investigate distribuția câmpului magnetic la suprafața electrodului precum și efectul acestuia asupra NiNP, **Fig. 2**. În aceste condiții forța care acționează asupra unei NiNP a fost calculată ca $\vec{F} = -\text{grad}U$, unde energia magnetică $U = -\vec{m} \cdot \vec{B}$, și unde m este momentul magnetic al NiNP iar B câmpul magnetic creat de electrod într-o poziție determinată. În aceste condiții a fost arătat că forța magnetică care acționează asupra unei NiNP are o valoare de aproximativ 10^{-11} N, cu 7 ordine de mărime mai mică decât componenta gravitațională a cărei valoare este de aproximativ 10^{-18} N.

Pentru determinarea proceselor electrochimice de la suprafața electrozilor de Ni au fost efectuate măsurători de voltametrie ciclică și spectroscopie de impedanță electrochimică.

Pentru demonstrarea capacităților de *biosensing* ale electrodului Ni/Au/Ti/SiO₂/Si s-a folosit ca enzimă model glucoz-oxidaza (GOx). GOx este o enzimă care catalizează oxidarea glucozei în prezența de O₂ și formarea de glucolactonă și peroxid de hidrogen. H₂O₂ este un compus electroactiv ce poate fi determinat electrochimic la suprafața Ni/Au/Ti/SiO₂/Si. Într-o primă fază au fost investigați parametrii optimi de detecție de H₂O₂.

Construcția biosenzorului a fost făcută în doi pași. În primul pas, NiNP au fost conjugate cu GOx prin incubarea celor două componente. În al doilea pas, Ni/Au/Ti/SiO₂/Si a fost imersat în soluția mixtă de GOx-NiNP, ceea ce a permis imobilizarea enzimei la suprafața electrodului exclusiv prin forța magnetică.

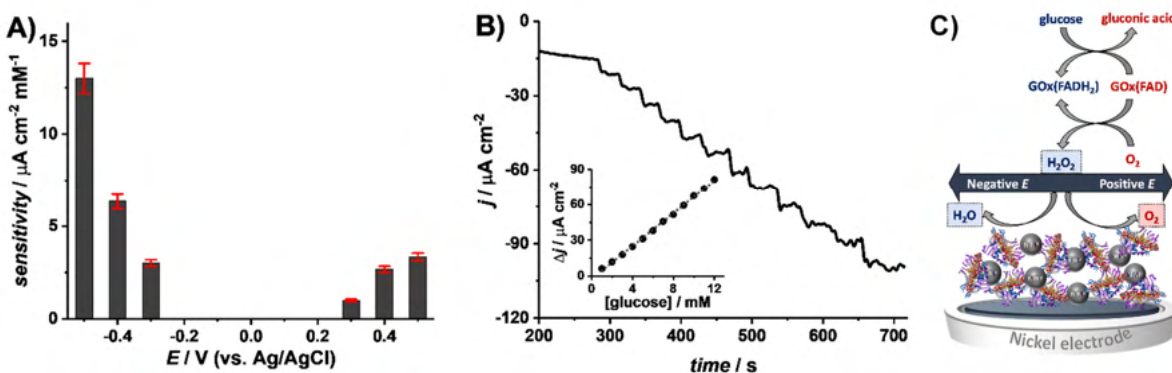


Fig. 3. A) Studiul de potențial în tampon fosfat 0,1 M pH 7.4 cu biosenzorul GOx-NiNP/Ni/Au/Ti/SiO₂/Si. **B)** Răspunsul amperometric al biosenzorului la -0,40 V și injecții succesive de glucoză; Curba de calibrare. **C)** Mecanismul enzimatic propus. Adaptată din [1].

Sensibilitatea biosenzorului la injecții de glucoză a fost investigată în funcție de potențialul aplicat demonstrându-se că acesta prezintă răspuns electrochimic atât în zona anodică cât și în cea catodică, **Fig. 3A**. Performanțe superioare au fost observate în zona catodică de potențial datorită faptului că potențialul redox al co-factorului enzimei FAD/FADH₂ se situează la $\sim -0,45$ V. Pe de altă parte, profilul amperometric, **Fig. 3B**, a demonstrat faptul că detecția reacției enzimatice se bazează pe reducerea H₂O₂ la suprafața electrodului Ni/Au/Ti/SiO₂/Si, **Fig. 3C**. Sensibilitatea biosenzorului a fost de $\sim 7,0 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$.

Electrozi de nichel dopat cu paladiu și nanoparticule de nichel

Pentru îmbunătățirea sensibilității biosenzorului electrozii de nichel au fost dopați cu paladiu. Astfel, electrodul Pd@Ni/Au/Ti/SiO₂/Si beneficiază de capacitățile magnetice ale Ni în sinergie cu cele electrocatalitice ale Pd. Ca și în cazul precedent, electrozii Pd@Ni/Au/Ti/SiO₂/Si au fost caracterizați din punct de vedere morfologic, structural și compozițional, înainte și după interacția cu NiNP. Imaginile SEM ale Pd@Ni/Au/Ti/SiO₂/Si, **Fig. 4**, au demonstrat menținerea structurii granulare a Ni și apariția unor noi nanoparticule datorate Pd a cărui prezență la suprafața electrodului a fost de asemenea confirmată și prin XRD și XPS.

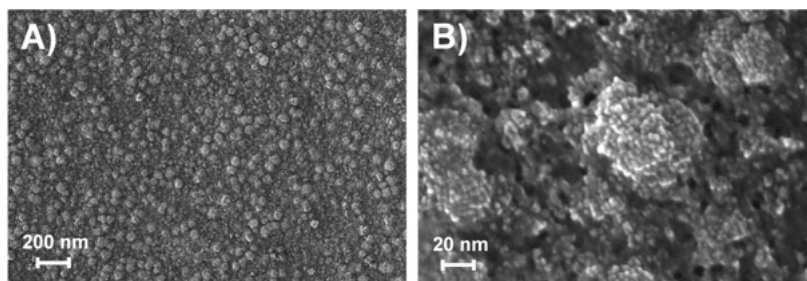
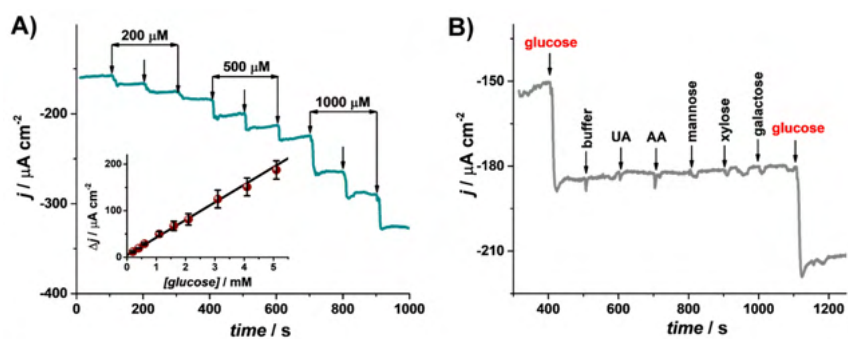


Fig. 4. Imagini SEM ale electrodului Pd@Ni/Au/Ti/SiO₂/Si la magnificare de **A)** 50k și **B)** 500k. Adaptată din [2].

Proprietățile redox ale electrodului Pd@Ni/Au/Ti/SiO₂/Si au fost investigate în diferite medii, în absența și în prezența H₂O₂. S-a demonstrat că H₂O₂ poate fi oxidat și redus la potențiale de aprox. +0,30 V respectiv -0,05 V.

Fig. 5. Răspunsul amperometric al biosenzorului la -0,05 V și injecții succesive de: **A)** glucoză și **B)** 1 mM glucoză și 2 mM interferenți, în tampon fosfat 0,1 M pH 7,0. Adaptată din [2].



Imobilizarea GOx la suprafața electrodului Pd@Ni/Au/Ti/SiO₂/Si a fost făcută prin intermediul NiNP și investigată prin XPS. Măsurătorile electrochimice, **Fig. 5**, au arătat că biosenzorul GOx-NiNP/Pd@Ni/Au/Ti/SiO₂/Si are o sensibilitate de $\sim 40 \text{ mA cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ și permite o limită de detecție de $\sim 30 \mu\text{M}$ glucoză.

Bibliografie

- [1] M.M. Barsan, T.A. Enache, N. Preda, G. Stan, N.G. Apostol, E. Matei, A. Kuncser, V.C. Diclescu, Direct Immobilization of Biomolecules through Magnetic Forces on Ni Electrodes via Ni Nanoparticles: Applications in Electrochemical Biosensors. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 11 (2019) 19867.
- [2] M.M. Barsan, E. Matei, M. Enculescu, R. Costescu, N. Preda, T.A. Enache, I. Enculescu, V.C. Diclescu, Nanostructured palladium doped nickel electrodes for immobilization of oxidases through nickel nanoparticles. *Electrochim. Acta*. 315 (2019) 102

Electrozi și biosenzori flexibili pentru monitorizare continuă de *biomarker-i*

Ricardo J. B. Leote, Victor C. Diculescu, Mădălina M. Bârsan, Mihaela Beregoi, Anca Aldea, Alexandru Evanghelidis, Elena Matei, Ionuț Enculescu

Monitorizarea continuă a proceselor (bio)chimice și fiziologice ale unui organism este un factor cheie în asistența medicală preventivă, permițând recunoașterea riscurilor primare prin detectarea/diagnosticarea timpurie a posibilelor afecțiuni medicale [1]. Monitorizarea continuă este crucială pentru populațiile vulnerabile, persoanele în vârstă sau copii și este importantă pentru personalul care lucrează în condiții de stres fizic, chimic sau biologic extrem. Furnizarea de informații în timp real prezintă beneficii enorme, reducând efectele secundare neplăcute ale tratamentului medical, dar și din punct de vedere socio-economic, deoarece reduce drastic costurile intervenției medicale.

Progresele recente în nanotehnologie și științe biomedicale [2], [3] au condus la conceptul de biosenzori sau de dispozitive bioanalitice extrem de sensibile, rapide, economice, ce permit monitorizarea continuă a stării de sănătate a unei persoane deci cu aplicații directe în asistență medicală și diagnosticarea medicală timpurie [4].

Transpirația este probabil cel mai accesibil fluid biologic pentru monitorizarea continuă. Transpirația este compusă dintr-un număr de *biomarker-i* precum H^+ , Na^+ , Cl^- , K^+ , NH_4^+ , molecule mici precum cortizolul, ureea, lactatul, glucoza sau acidul uric și chiar peptide sau proteine furnizând o matrice foarte complexă care conține informații despre procesele fiziologice și semnele vitale. De exemplu, monitorizarea H^+ oferă informații asupra ratei de deshidratare; cea a electroliților Na^+ și Cl^- este un instrument de diagnostic valoros în cazul fibrozei chistice; cuantificarea glucozei este crucială în monitorizarea diabetului; în timp ce cantitatea de acid uric oferă informații despre diabet, insuficiență cardiacă sau boli neurodegenerative.

În vederea dezvoltării de senzori și biosenzori electrochimici cu performanțe ridicate au fost folosite, ca transductori, plase metalizate fabricate din fibre electrofilate. Fibrele polimerice de dimensiuni nanometrice au fost realizate prin metoda electrofilării, în condiții controlate de temperatură și umiditate, și ulterior metalizate prin depunere asistată de magnetron, **Fig. 1**.

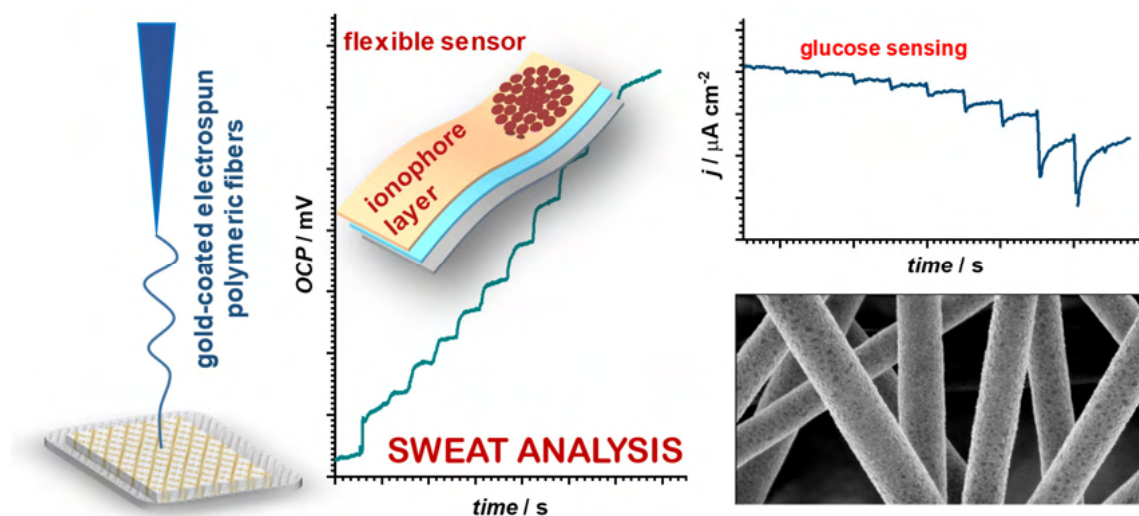


Fig. 1. Reprezentarea schematică a procesului de obținere de electrozi din fibre polimerice metalizate pentru detecția de electroliți [1,2] și glucoză [3].

Ca punct de pornire, electrozii pe bază de fibre polimerice metalizate au fost testați ca senzori potențiometrici pentru detecția de electroliți (H^+ , Cl^- , Ca^{2+} , NH_4^+), amperometrici pentru detecția de H_2O_2 , produs al multor reacții enzimatică, și ca biosenzori enzimatici pentru detecție amperometrică a glucozei și a acidului uric prin imobilizarea glucoz-oxidazei (Gox) respectiv a uricazei (Urox).

Senzorul de pH

Fabricarea senzorului de pH a implicat doi pași. Primul pas a necesitat producerea a doi electrozi. Electrocul de lucru a fost construit prin depunerea electrochimică a unui strat de Pd pe fibre polimerice electrofilate acoperite cu Au. Ulterior, electrocul a fost supus unui tratament termic timp de 4 ore la 150 °C pentru formarea unui strat de PdO. Electrocul de referință a fost construit prin acoperirea cu Ag a fibrelor polimerice electrofilate urmată de anodizarea în soluție de HCl pentru formarea unui strat de AgCl, **Fig. 2**.

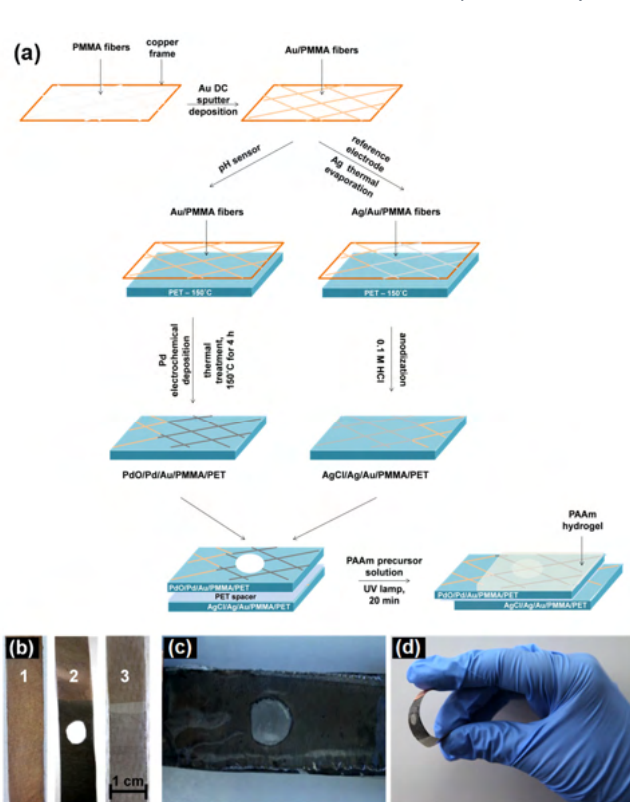


Fig 2. Reprezentare schematică a procesului de fabricare a senzorului de pH. Preluată din [1].

De asemenea, suprafața electrocului de Pd/PdO a fost caracterizată din punct de vedere electrochimic atât prin spectroscopie de impedanță electrochimică cât și prin voltametrie ciclică. Răspunsul la variațiile de pH a fost investigat prin măsurarea potențialului de circuit deschis.

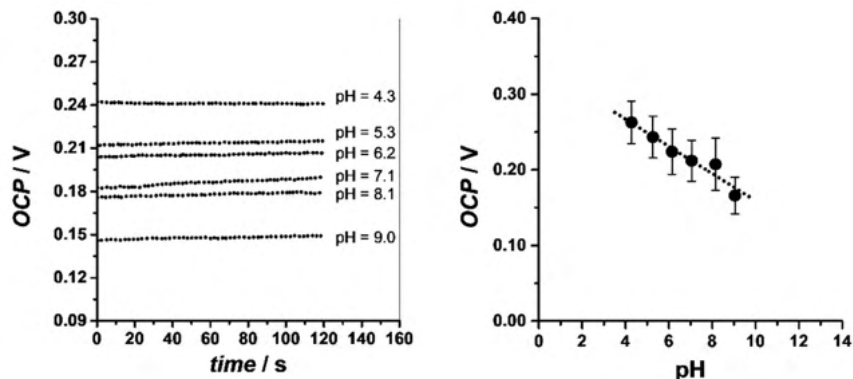


Fig. 3. A) Variația potențialului de circuit deschis (OCP) cu pH-ul transpirației artificiale.
B) Sensibilitatea senzorului în transpirație artificială. Preluată din [1].

Răspunsul senzorului de pH format din ansamblul celor doi electrozi a fost investigat în soluție de transpirație artificială, **Fig. 3**, cu diferite valori de pH. S-a demonstrat că variația OCP este dată de ecuația: $OCP / mV = +33,8 - 18 \text{ pH}$, senzorul fiind capabil să răspundă la un volum minim de transpirație de 250 nL.

Senzori cu ionofori pentru electroliți

Ionoforii sunt molecule capabile de a transporta specii ionice printr-o barieră hidrofobă, ca de exemplu o membrană biologică. Ionoforii sintetici sunt molecule macrociclice, cu cavități bine definite, care au abilitatea de a selecta ionii din medii/faze apoase. Procesul de complexare ion-ionofor este extrem de selectiv ceea ce a permis utilizarea acestor macromolecule în dezvoltarea de electrozi selectivi de ioni.

În acest context, electrozi flexibili obținuți din fibre polimerice electrofilate acoperite cu Au, au fost folosiți pentru imobilizarea în matrice de nafion a ionoforilor specifici ionilor Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- și H^+ , **Schema 1**.

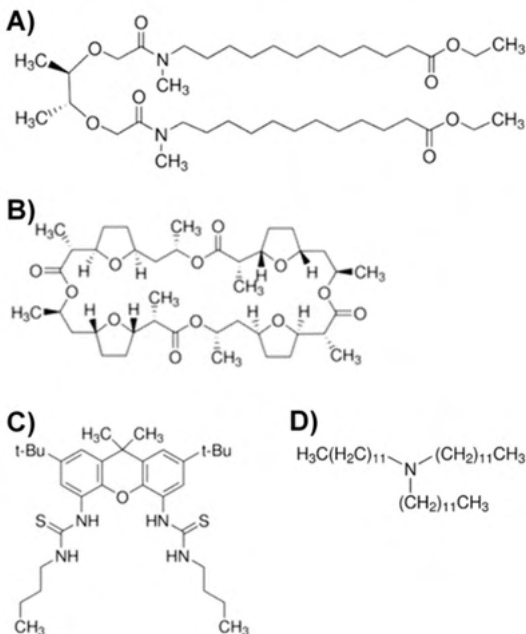


Fig 4. Structurile chimice ale ionoforilor de A) calciu, B) clor, C) amoniu și D) hidrogen.

PET/PMMA/Au | Ca^{2+} ionofor în Nafion™ | A.S. + X M CaCl_2 || 3.5 M KCl | AgCl | Ag

unde A.S. reprezintă transpirația artificială. Răspunsul tipic al sensorului de Ca^{2+} poate fi observat în **Fig. 5**, unde se evidențiază creșterea OCP în timp, în urma injecțiilor de diferite concentrații de Ca^{2+} în celula electrochimică.

S-a observat că potențialul de circuit deschis variază liniar cu logaritmul zecimal al concentrației de ioni, conform ecuației:

$$\Delta OCP / \text{mV} = +285,0 + 6,5 \log[\text{Ca}^{2+}]$$

Limita de detecție calculată este $\text{LOD} = 1,4 \times 10^{-8} \text{ M}$, iar sensorul a arătat un timp de răspuns $t_{90} \sim 10 \text{ s}$.

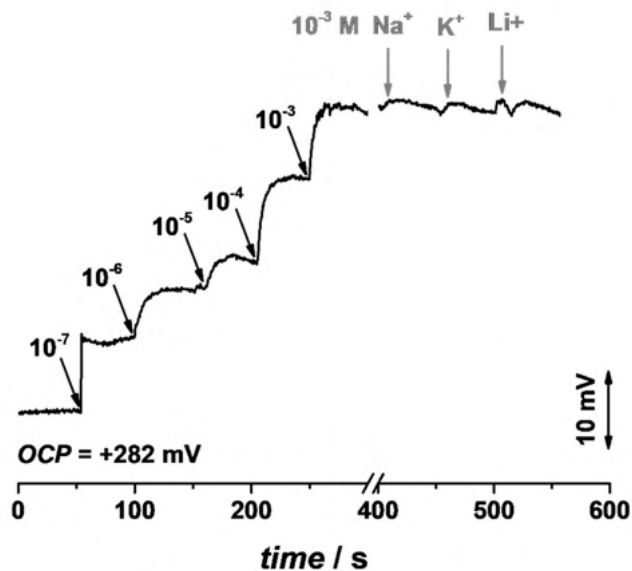
De asemenea, au fost efectuate experimente de control în care suprafața electrodului a fost acoperită cu membrană de nafion (în absența ionoforului), în aceste condiții neobservându-se nicio variație a OCP.

Nu în ultimul rând, selectivitatea sensorului a fost investigată în transpirație artificială în prezența ionilor de sodiu, potasiu sau litiu.

Este de menționat că experimente similare au fost efectuate și cu ionoforii specifici NH_4^+ , Cl^- și H^+ .

Suprafața senzorilor a fost investigată prin SEM cuplat cu spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX) pentru a înțelege și evidenția morfologia și dispersia ionoforului la suprafața electrodului. Pe de altă parte, studiile de spectroscopie de infra-roșu cu transformată Fourier (FTIR) au arătat că ionoforul poate fi încorporat în matrice de nafion, fără modificări structurale sau funcționale, permițând interacția specifică cu ionul țintă. De asemenea, studiile electrochimice prin EIS și CV au demonstrat că ionoforul imobilizat în matrice de nafion permite difuzia ionului țintă prin acest tip de membrană.

Determinarea ionilor specifici cu ajutorul ionoforilor imobilizați în matrice de nafion la suprafața electrodului flexibil obținut din fibre polimerice electrofilate acoperite cu Au a implicat măsurători potențiometrice ale OCP într-o celulă electrochimică a cărei configurație, în cazul ionoforului de calciu este:



Biosenzori de glucoză și acid uric

În prezentările anterioare s-a demonstrat posibilitatea folosirii electrozilor obținuți din fibre polimerice electrofilate cu acoperire metalică ca senzori flexibili pentru determinarea de electroliți în transpirație artificială. Sisteme mai complexe pot fi de asemenea dezvoltate pe platforme asemănătoare. Cercetările ulterioare s-au îndreptat către dezvoltarea de biosenzori pentru determinarea unor *biomarker*-i în transpirație artificială cu precădere pentru glucoză și acid uric. Ambii biosenzori au fost dezvoltați modificând suprafața electrodului cu glucoz-oxidază respectiv uricază. Este de remarcat că enzimele oxidază au ca produs de reacție peroxidul de hidrogen, iar din acest motiv, într-o primă fază, cercetările s-au concentrat pe detecția electrochimică a acestuia.

Detecția electrochimică a H_2O_2 a fost investigată prin voltametrie ciclică și prin amperometrie (o tehnică cu avantaje în tehnologia biosenzorilor), **Fig. 6**. Au fost folosiți electrozi de Au și Pd precum și electroliți de suport cu diferite valori de pH.

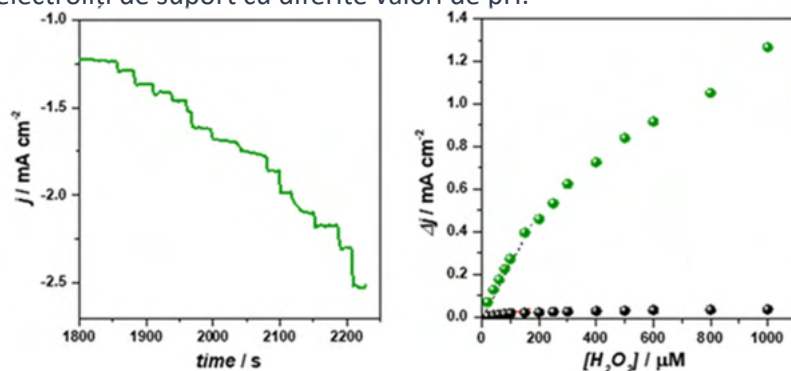


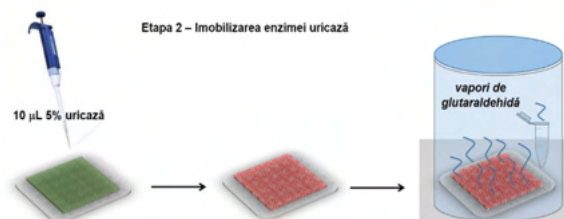
Fig 6. A) Amperogramă la $-0,1$ V (vs. Ag/AgCl) pentru detecția de H_2O_2 în tampon fosfat $0,1$ M pH 8,5 cu electrodul Pd/Au/PMMA/PET. **B)** Curbe de calibrare a H_2O_2 cu Pd/Au/PMMA/PET și Au/PMMA/PET.

Rezultatele au arătat că H_2O_2 suferă reacții de oxidare și de reducere dar și că poate fi detectat atât la suprafața electrodului de Au cât și a celui de Pd. Electrodul de Pd a demonstrat o sensibilitate mult mai mare decât cel de Au și în același timp un potențial de detecție aproape de 0V (vs. $-0,40$ V pentru electrodul de Au), un fapt foarte important pentru reducerea efectului interferențelor la aplicațiile în medii complexe.

În continuare, investigațiile s-au concentrat pe imobilizarea enzimelor glucoz-oxidază și uricază la suprafața electrozilor de Au respectiv Pd. Au fost testate mai multe metode de imobilizare precum reticulare cu glutaraldehidă și BSA, adsorbția liberă sau prin formarea de legături covalente.

În cazul glucoz-oxidazei s-a optat pentru imobilizarea covalentă iar în cazul uricazei s-a demonstrat o mai mare stabilitate prin imobilizarea în vapori de glutaraldehidă, **Schema 1**. Au fost efectuate studii cu diverși interferenți precum manoză, xiloză și galactoză în cazul glucoz-oxidazei sau precum xantină și hipoxantină în cazul acidului uric.

Performanțele biosenzorilor au fost investigate atât în medii simple cât și în probe complexe de transpirație artificială sau ser cu rate de recuperare între 98 și 110%.



Schema 1. Reprezentare schematică a procesului de imobilizare a uricazei.

Bibliografie

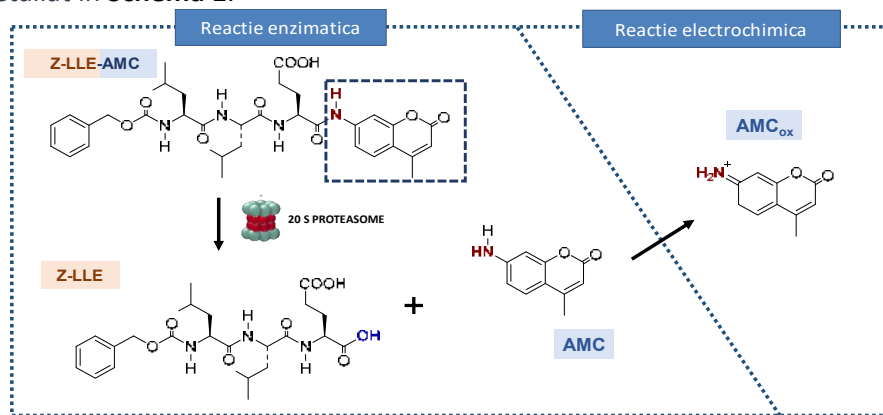
- [1]. V.C. Diculescu, M. Beregoi, A. Evanghelidis, R.F. Negrea, N.G. Apostol, I. Enculescu. Palladium/palladium oxide coated electrospun fibers for wearable sweat pH-sensors. *Sci. Rep.* 9 (2019) 8902. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45399-2>
- [2]. A. Aldea, E. Matei, R.J.B. Leote, I. Rau, I. Enculescu, V.C. Diculescu, Ionophore- Nafion TM modified gold-coated electrospun polymeric fibers electrodes for determination of electrolytes. *Electrochim. Acta.* 363 (2020) 137239. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.137239>
- [3]. A. Aldea, R.J.B. Leote, E. Matei, A. Evanghelidis, I. Enculescu, V.C. Diculescu, Gold coated electrospun polymeric fibres as new electrode platform for glucose oxidase immobilization. *Microchemical J.* 165 (2021) 106108. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106108>

Detecție de compuși cu proprietăți farmaceutice și *biomarker*-i prin intermediul unor noi biosenzori și imunosenzori electrochimici

Mădălina Maria Bârsan, Caroline G. Sanz, Melania Onea, Victor C. Diculescu

Proteazomul este un complex enzimatic implicat în degradarea proteică. S-a constatat că atât o activitate crescută a acestuia cât și un nivel crescut de proteazom circulator sunt corelate cu diverse boli, făcând ca acesta să devină o țintă importantă în găsirea unor noi metode de diagnostic dar și în dezvoltarea unor noi terapii medicamentoase. Astfel, obiectivele principale ale acestui studiu au vizat: i) dezvoltarea de noi biosenzori electrochimici pe bază de proteazom pentru cuantificarea activității acestuia și *screening*-ul de compuși cu proprietăți farmaceutice, inhibitori enzimatici ai proteazomului și ii) dezvoltarea unui imunosenzor electrochimic pentru detecție de proteazom, ca *biomarker* în diverse boli autoimune, cronice și cancer.

Activitatea proteazomului se poate cuantifica electrochimic prin utilizarea unor peptide marcate cu un compus electroactiv, în cazul de față amino-metil-cumarina (AMC), care se eliberează în urma acțiunii proteolitice a proteazomului și se oxidează la electrod la un potențial de aproximativ +0,80 V vs. Ag/AgCl, așa cum este detaliat în **Schema 1**.



Schema 1. Principul de detecție electrochimică a activității proteazomului utilizând peptide marcate cu AMC.

S-au fabricat noi biosenzori electrochimici prin imobilizarea proteazomului la suprafața unor electrozi de carbon vitros (GCE) prin intermediul anticorpilor specifici acestuia, cu rol de anticorpi de captură. O primă strategie a implicat utilizarea de GCE pe suprafața căruia s-au imobilizat 3 feluri de anticorpi, specifici subunităților α și β și unul nespecific, prin reticulare cu aldehidă glutarică. Proteazomul a fost apoi imobilizat pe suprafața electrodului GCE/Ab prin intermediul interacțiilor de bioafinitate tip antigen-anticorp, obținându-se astfel biosenzorii GCE/Ab-20S, așa cum este prezentat schematic în **Fig. 1A** [1].

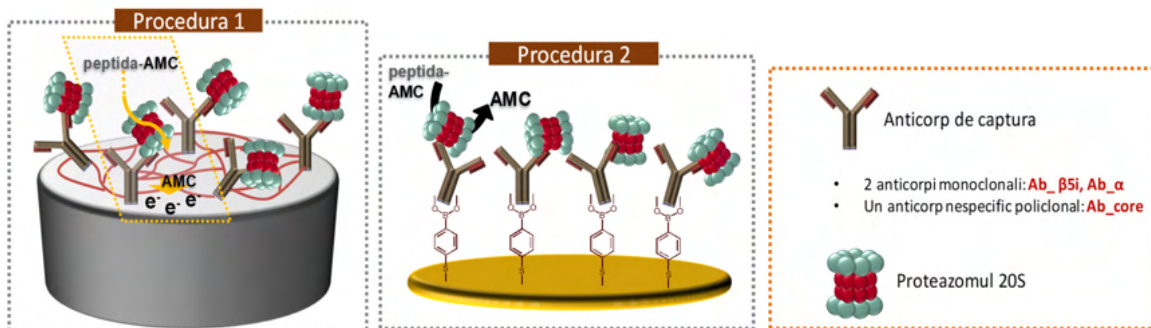


Fig. 1. Reprezentare schematică a biosenzorilor cu proteazomul 20S obținuți prin două proceduri: **A)** cu anticorpi imobilizați prin reticulare și **B)** cu anticorpi imobilizați prin cuplarea chimică cu acid mercaptofenilboronic; **C)** componentele biosenzorilor. Adaptată din [2].

S-a observat că cei trei anticorpi utilizați au dus la obținerea de biosenzori cu proprietăți analitice diferite utilizând același substrat enzimatic, cel mai sensibil fiind cel bazat pe anticorpul specific subunității β , cu o sensibilitate de $24,0 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$ și o limită de detecție de $0,4 \mu\text{M}$. Acest biosenzor a fost utilizat pentru evaluarea celor trei tipuri de activitate ale proteazomului, aceea de caspază, chimotripsină și tripsină, utilizând 6 substraturi enzimatic diferite, observându-se o sensibilitate mărită în cazul substratilor enzimatici ce vizează activitatea de chimotripsină.

S-au realizat studii de inhibiție enzimatică a doi compuși: epoxomicina și bortezomibul, ambii ducând la o scădere a sensibilității biosenzorului cu proteazom, ca urmare a efectului inhibitor al acestora. S-a putut determina, de asemenea, că epoxomicina are un efect inhibitor ireversibil în timp ce bortezomibul inhibă reversibil activitatea proteazomului 20S.

O a doua strategie de fabricare a biosenzorilor a implicat utilizarea unui electrod de Au modificat în prealabil cu un monostrat auto-asamblat de acid mercapto-fenil-boronic care permite adsorbția unui strat subțire de anticorpi cu o orientare ridicată ce a permis imobilizarea într-o manieră favorabilă a proteazomului (Au/MPBA/Ab-20S), așa cum este detaliat în **Fig. 1B** [2]. În urma evaluării electrochimice a acestui tip de biosenzor, s-a putut observa că acesta este superior din punct de vedere analitic celui obținut utilizând procedura 1, cu o sensibilitate de aproximativ 10 ori mai mare, de $160,1 \pm 10,3 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$.

Pentru *screening*-ul de inhibitori ai proteazomului s-a utilizat și o altă strategie, care implică utilizarea unei peptide sintetice cu *marker* electroactiv, imobilizată pe suprafața electrodului. Astfel, activitatea proteazomului se analizează monitorizând clivajul peptidei sub acțiunea proteazomului ca urmare a imersiei electrodului/peptidă în soluție de proteazom pentru timpi crescânzi de incubare.

Imunosenzorul electrochimic pentru detecția de proteazom 20S s-a fabricat utilizând biosenzorul obținut prin procedura 2: Au/MPBA/Ab-20S. Pentru aceasta, pe lângă anticorpul de captură, s-a utilizat și un al doilea anticorp de detecție, marcat cu enzima fosfatază alcalină, așa cum se poate observa în **Fig. 2A**. Această enzimă catalizează reacția de defosforilare a unui compus ne-electroactiv într-un compus electroactiv, ce poate fi cuantificat prin tehnici electrochimice. În cazul de față s-a folosit ca substrat enzimatic aminofenilfosfatul care sub acțiunea enzimei fosfatază alcalină trece în aminofenol, detectabil electrochimic la potențiale foarte aproape de $0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

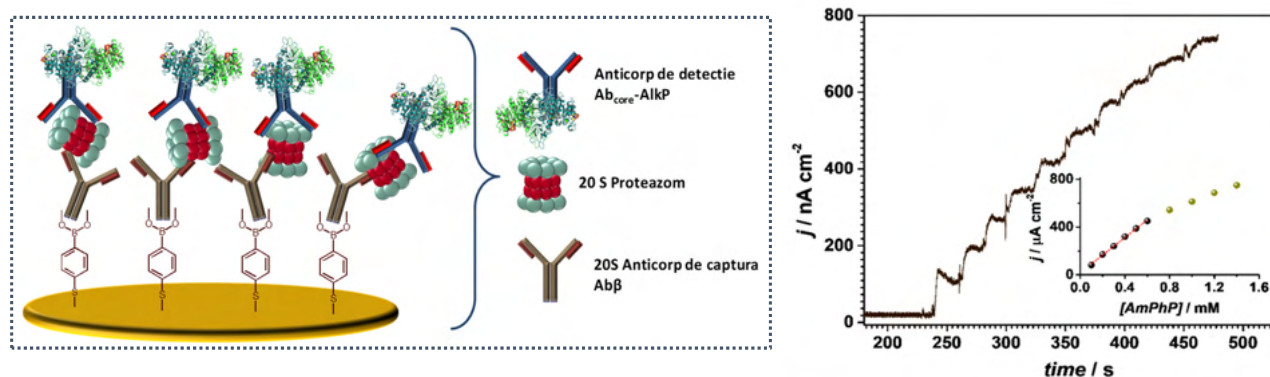


Fig. 2. A) Reprezentare schematică a imunosenzorului pentru proteazomul 20S și **B)** cuantificarea electrochimică a proteazomului utilizând imunosenzorul prin monitorizarea aminofenolului. Adaptată din [2].

Construcția imunosenzorului a fost investigată prin tehnica microbalanței de cristal de cuarț (QCM) și a rezonanței plasmonilor de suprafață (SPR).

Adsorbția chimică de 4-MBPA a dus la depunerea unei mase de 30 ng , ce a indicat acoperirea completă a suprafeței cristalului de cuarț (AuQC). A fost determinată o masă totală de $233,3 \text{ ng cm}^{-2}$ de Ab β imobilizat, de peste două ori mai mare decât cea raportată pentru strategii similare de imobilizare. Următorul pas a vizat imobilizarea 20S, care a fost realizată prin imersia AuQC/4-MPB/Ab β în soluții de 20S cu concentrații crescânde de $5, 50, 100, 250 \mu\text{g mL}^{-1}$, ceea ce a dus la adsorbția de $1,68, 11,54, 24,0$ și respectiv $33,0 \text{ ng}$, cu o masă totală de $70,2 \text{ ng}$ 20S.

Rezultatele obținute utilizând tehnica SPR sunt prezentate în **Fig. 3**, unde se observă că după injecții consecutive ale fiecărei componente ale imunosenzorului ($Ab\beta$, 20S și Ab_{core} -AlkP) în soluția de tampon, **Fig. 3a**, semnalul SPR crește, ca urmare a proceselor de asociere/interacțiune după injectarea fiecărei componente. A fost posibilă determinarea constantelor de asociere și disociere $k_a = 3,08 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ și $k_d = 1,64 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ pentru complexul 4-MPBA/ $Ab\beta$, valori care arată stabilitatea complexului format. A fost efectuat un experiment similar pentru diferite concentrații de 20S (1, 2 și 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) injectate consecutiv pe suprafața Au/4-MPBA/ $Ab\beta$ (**Fig. 3B**). Creșterea semnalului SPR cu creșterea concentrațiilor de 20S a fost observată atât în timpul fazelor de asociere, cât și de disociere. Analiza curbei a fost realizată prin fitarea datelor experimentale cu un model „One-to-One Two-State” caracterizat printr-o interacțiune slabă inițial, urmată de una mai puternică. Valoarea constantei de echilibru $K_D = 6,01 \times 10^{-14} \text{ M}$ pentru complexul $Ab\beta$ -20S arată o stabilitate foarte mare a acestuia.

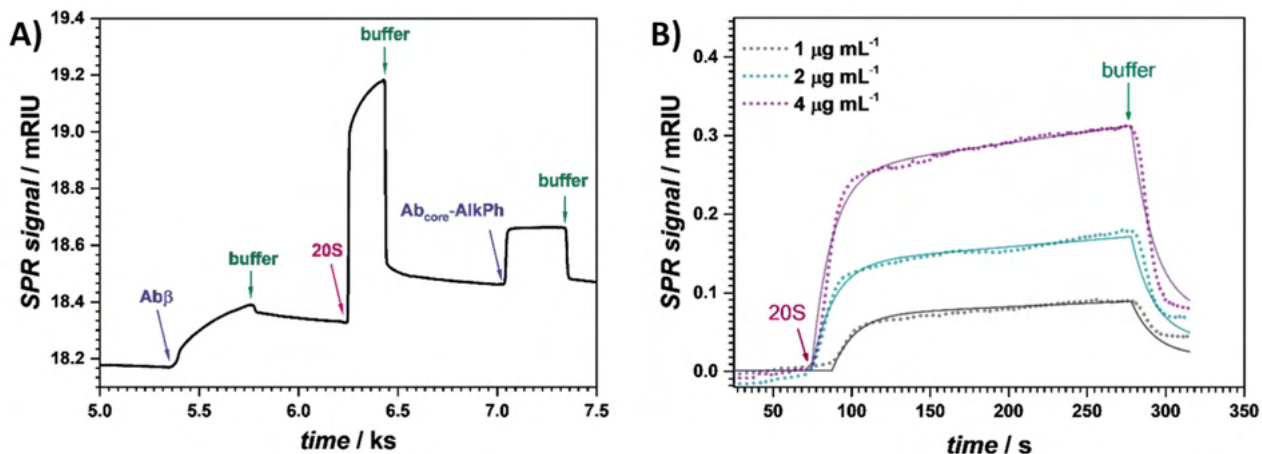


Fig. 3. Semnalul SPR înregistrat: **A)** la Au/4-MPBA după injecții consecutive de anticorp $Ab\beta$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 20S și Ab_{core} -AlkP; **B)** la Au/4-MPBA/ $Ab\beta$ după injecții consecutive de 1, 2 și $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 20S. Preluată din [2].

Imunosenzorul astfel obținut a fost utilizat pentru cuantificarea electrochimică de proteazom 20S. S-au obținut două domenii de linearitate a sensibilității imunosenzorului cu logaritmul zecimal al concentrației de 20S, primul domeniu până la aprox. $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ în timp ce al doilea domeniu, care are și o valoare a pantei mai mare, cuprinde intervalul de concentrație de la 20 până la $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Imunosenzorul a prezentat și o dependență liniară a sensibilității pentru intervalul de concentrație 20S între 5 și $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 20S, care corespunde concentrațiilor de proteazom circulator în ser în cazul situațiilor patologice.

Bibliografie

- [1]. M.M. Barsan, V.C. Diclescu, An antibody-based amperometric biosensor for 20S proteasome activity and inhibitor screening. *Analyst* 146 (2021) 3216. <https://doi.org/10.1039/D0AN02426K>
- [2]. M.M. Barsan, C.G. Sanz, M. Onea, V.C. Diclescu, Immobilized antibodies on mercaptophenylboronic acid monolayers for dual-strategy detection of 20s proteasome, *Sensors* 21(8) (2021) 2702. <https://www.mdpi.com/1424-8220/21/8/2702>

Mecanismul redox al metioninei: studii voltametrice și de spectrometrie de masă

Adrian Enache, Victor Diculescu

Metionina, **Fig. 1**, este un aminoacid esențial cu rol protectiv, antioxidant, al componentelor proteice din structura celulelor umane. Datorită atomului de sulf din structura sa reprezintă unul dintre aminoacizii cei mai susceptibili pentru oxidare iar elucidarea mecanismului său de oxidare este crucială pentru înțelegerea proceselor biologice complexe.

Totodată, este singurul aminoacid constituent al proteinelor și enzimelor din celulele animale pentru care există un sistem biologic enzimatic, metionină sulfoxid reductază/tioredoxină cu rol de conversie al produsului de oxidare, sulfoxidul de metionină, înapoi la metionină.

Încă de la primele studii privind mecanismul de electro-oxidare al metioninei a fost propusă, ca produs interimar, formarea de dehidrometionină și sulfoxidul de metionină ca produs final. Pe lângă acestea, studii teoretice și experimentale demonstrează faptul că stabilizarea produșilor intermediari poate avea loc cu suport catalitic de la grupările amino și carboxil.

În acest studiu, comportamentul electrochimic al metioninei a fost investigat folosind metodele voltametrice și un electrod de carbon vitros. Prin corelarea rezultatelor obținute cu rapoarte deja publicate a fost propus un mecanism de oxidare electrochimică a metioninei, confirmat prin spectroscopie de masă, **Fig. 2**.

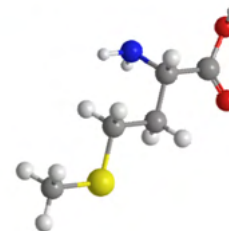


Fig. 1. *Reprezentare schematică a structurii chimice a metioninei.*

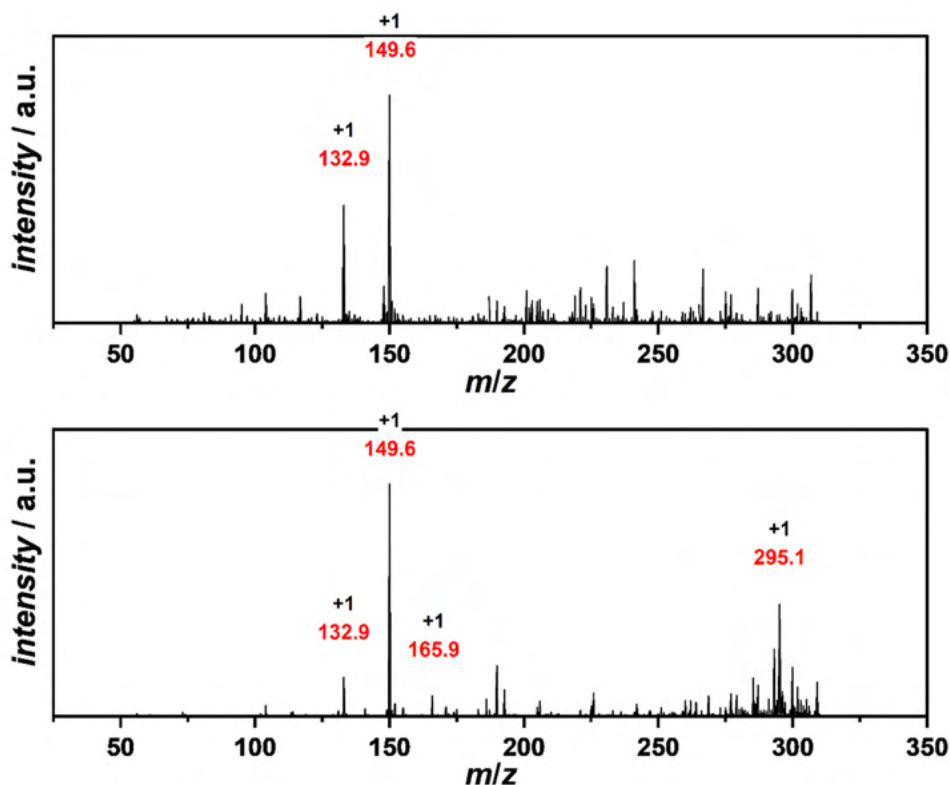


Fig. 2 Spectrele de masă ale metioninei înainte (sus) și după (jos) electroliză. Preluată din [1].

În vederea elaborării mecanismului propus, **Fig. 3**, s-a avut în vedere faptul că în funcție de pH-ul soluției, metionina poate exista ca anion, zwitterion sau cation. S-a constatat că electro-oxidarea are loc numai pentru formele cationice și zwitterionice, în două etape, la potențiale relativ mari, peste +1,0 V. În

medii acide, unde există metionină în forma cationică, ambele etape sunt dependente de pH iar mecanismul de oxidare implică protoni din grupa amino protonată, în timp ce în medii ușor acide sau bazice cele două reacții de oxidare au loc cu un singur electron și sunt independente de pH.

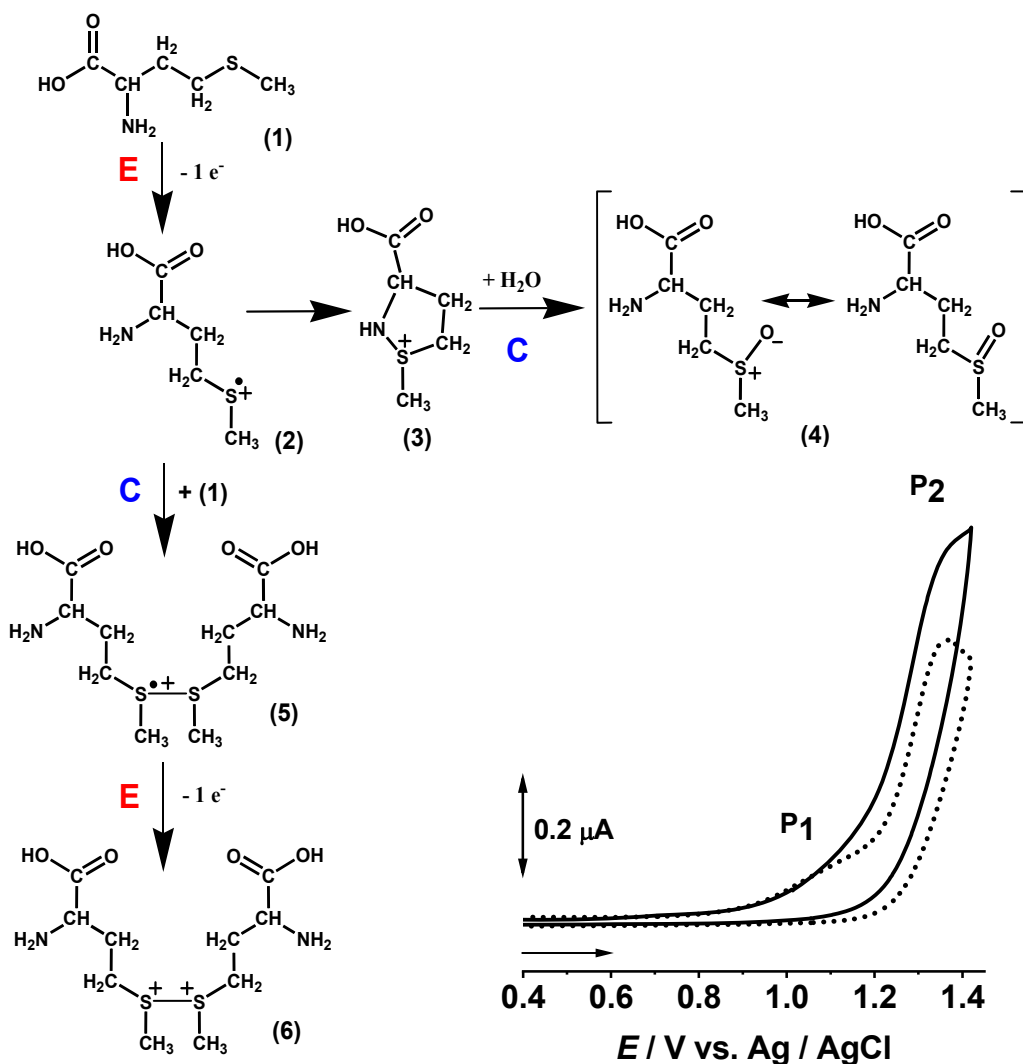


Fig. 3 Mecanismul de electro-oxidare al metioninei și voltamograme ciclice în soluție de metionină. Adaptată din [1].

Conform mecanismului primul pas reprezintă oxidarea cu un singur electron a fragmentului tioeter și formarea unui radical cationic. După aceasta, radicalul metionină este stabilizat fie de gruparea amino și, în cele din urmă, transformat în sulfoxid de metionină prin hidroliza intermediarului dehidrometionină, fie prin interacțiunea cu o metionină neutră rezultând formarea unui radical cationic dimer de metionină care poate fi apoi oxidat într-un dication.

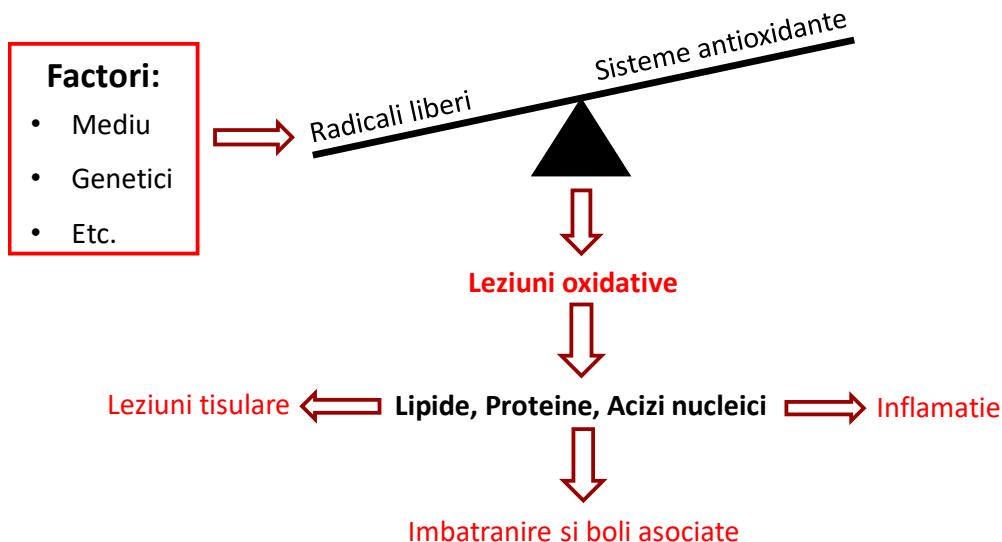
Bibliografie

- [1]. V.C. Diculescu, T.A. Enache, Voltammetric and mass spectrometry investigation of methionine oxidation, J. Electroanal. Chem., 834 (2019), 124. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.12.058>

Detecția electrochimică a leziunilor oxidative în proteine

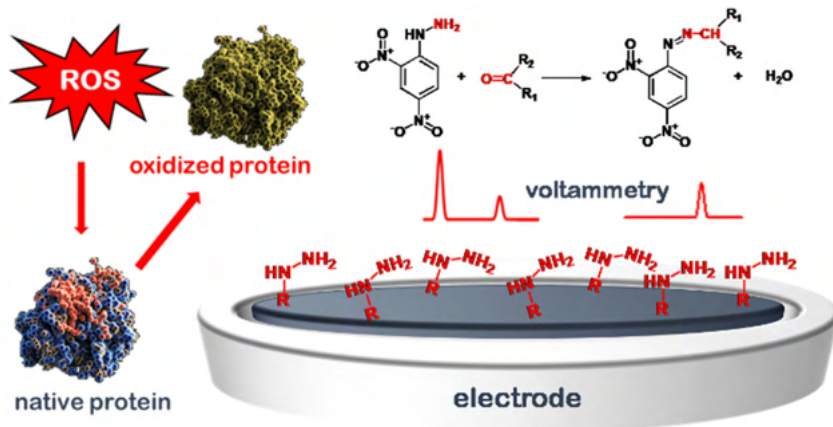
Adrian Enache, Victor Diclescu

Stresul oxidativ este rezultatul dezechilibrului dintre speciile oxidante, e.g. radicalii liberi rezultați în urma reacțiilor metabolice, și capacitatea organismului de a neutraliza acești radicali. Acest dezechilibru, favorizat de tratamentele medicale, prezența de corpuri străine în organism, razele UV, etc, poate afecta diverse componente celulare și influența procesele biologice precum adeziunea, creșterea și diviziunea celulară ducând la îmbătrânire și dezvoltarea de anomalii medicale asociate îmbătrânirii, **Schema 1**.



Schema 1. Influența stresului oxidativ asupra organismelor vii

Interacția radicalilor liberi cu proteinele are ca rezultat apariția de leziuni oxidative atât în lanțul peptidic cât și în reziduurile laterale ale proteinelor. Printre aceste leziuni, cele mai răspândite sunt reprezentate de formarea de grupări carbonil ce duc la pierderea funcțiilor biologice.



Schema 2. Model de biosenzor pentru detecția de proteine supuse leziunilor oxidative.

carbonil din proteinele oxidate a fost imobilizat la suprafața unui electrod de carbon vitros dinitrofenil hidrazină (DNPH), compus chimic cu afinitate ridicată pentru grupările carbonil. Avantajul folosirii acestei molecule constă în faptul că, datorită grupării hidrazină, prezintă proprietăți electroactive care dispar după conjugarea hidrazinei cu gruparea carbonil a proteinelor, **Fig. 1**.

Datorită stabilității chimice ridicate aceste grupări pot fi considerate biomarker-i de interes biologic. Mai mult, dezvoltarea unui senzor electrochimic pentru cuantificarea grupărilor carbonil prezintă avantajul unor determinări analitice rapide, cu sensibilitate ridicată și cu costuri reduse, **Schema 2**.

În vederea dezvoltării unui senzor pentru determinarea grupărilor car-

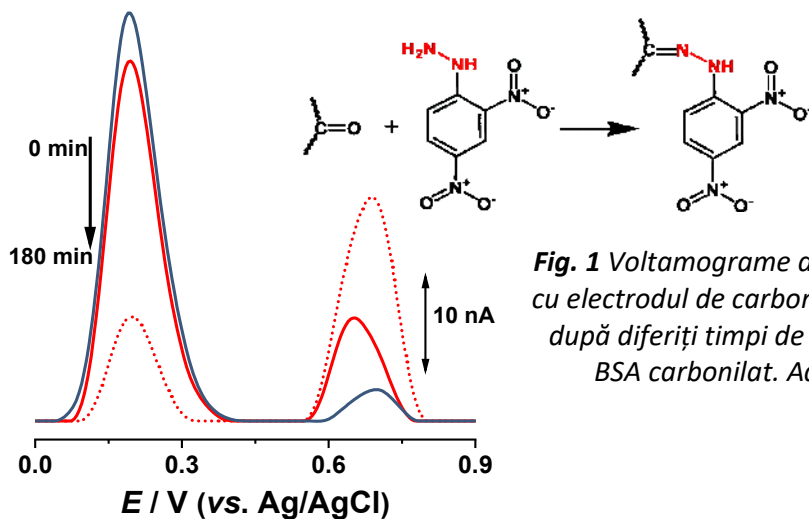


Fig. 1 Voltamograme de impuls diferențial cu electrodul de carbon în soluție de DNPH după diferiți timpi de incubare cu BSA și BSA carbonilat. Adaptată din [1].

Imobilizarea DNPH la suprafața electrodului a fost realizată printr-o matrice polimerică Nafion-sulfat de stiren (1:1) și, într-o primă etapă, demonstrată prin măsurători de rezonanță a plasmonilor de suprafață folosind ca proteină model albumina serică bovină (BSA), **Fig. 2**.

Răspunsul voltametric al senzorului dezvoltat pe suprafața unui electrod de carbon vitros, **Fig. 3**, a arătat o scădere a maximului de oxidare al DNPH, la $E_p = 0,2$ V, simultan cu creșterea concentrației de BSA carbonilat.

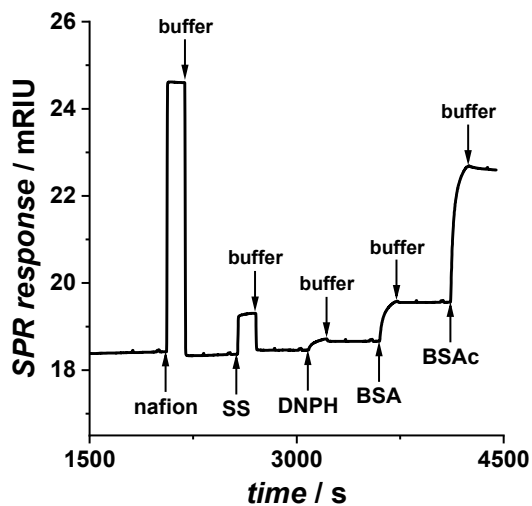


Fig. 2 Răspunsul plasmonic al unui senzor de aur după diferite injecții de: nafion, sulfat de stiren, DNPH, BSA și BSA carbonilat. Adaptată din [1].

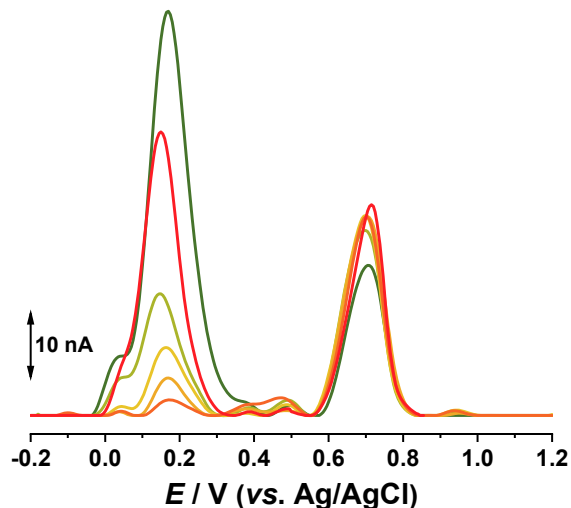


Fig. 3. Voltamograme de puls diferențial obținute cu senzorul de carbonil după incubarea timp de 30 s în soluții conținând diferite concentrații de BSA carbonilat. Adaptată din [1].

Senzorul a arătat o sensibilitate de 0,015 nmol carbonil per mg de proteină oxidată și o limită de detecție de 50 μ g BSA oxidat care conține 0,75 pmol carbonil.

Bibliografie

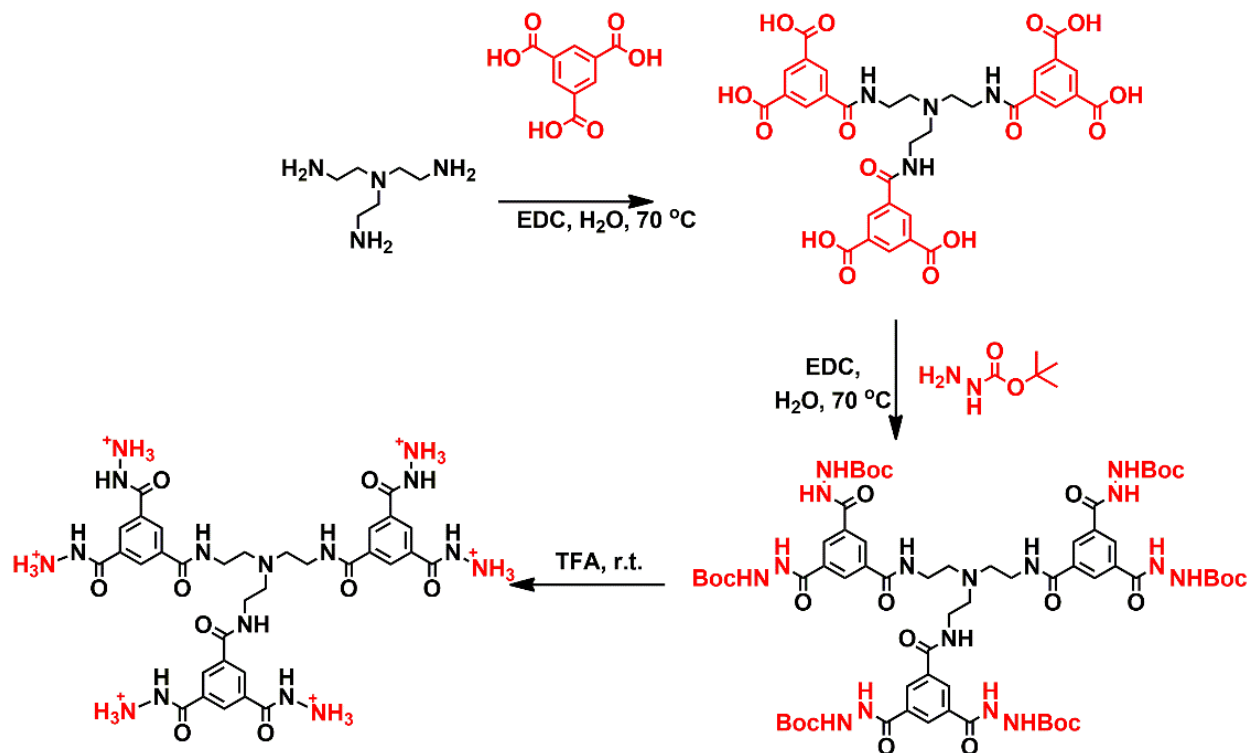
- [1]. T. A. Enache, E. Matei, V. C. Diculescu, Electrochemical Sensor for Carbonyl Groups in Oxidized Proteins. *Anal. Chem.* 91 (2019) 1920. DOI: [10.1021/acs.analchem.8b03969](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03969)

Dendrimeri cu conținut ridicat de hidrazide pentru dezvoltarea de bio(senzori). Sinteză și aplicații.

Daniel N. Crișan, Teodor A. Enache, Victor C. Diculescu

Dezvoltarea de noi metodologii (bio)senzoriale electrochimice presupune sinteza de noi molecule redox cu rol receptor în vederea recunoașterii moleculare la suprafața biosenzorului prin formarea de legături chimice cu analiți de interes. Hidrazidele sunt molecule cu grupări chimice funcționale, care îndeplinesc această proprietate atât prin prisma activității electrochimice pe care o dețin cât și prin multitudinea de funcționalizări chimice de tip „click” pe care o permit.

Dendrimerii, molecule polimerice mono-disperse, de dimensiuni nanometrice, cu structură bine definită și simetrică pot reprezenta o soluție la necesitatea dezvoltării de noi metodologii de fabricare de biosenzori. În acest context, au fost sintetizate noi molecule dendimerice având un conținut ridicat de hidrazide cu rolul de a crește disponibilitatea moleculelor de interes biologic la suprafața senzorilor. A fost explorată sinteza acestora în condiții de reacție cât mai simple (i.e. în apă, temperaturi de reacție apropiate de ambient, tehnici de purificare relativ nenocive etc.), prin formarea de legături peptidice între molecule de tip tri-amine și acizi tri-carboxilici, urmate de introducerea grupărilor hidrazide, **Schema 1**.



Schema 1. Schema reacției de sinteză a dendrimerilor

Dendrimerii sintetizați au fost caracterizați prin rezonanță magnetică nucleară (¹H RMN, ¹³C RMN, 2D RMN), cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC), spectrometrie de masă (MS), spectroscopie în infraroșu (FT-IR) și Raman, precum și prin metode electrochimice, **Fig. 1**. Spectrele ¹H RMN corelate cu cele ¹³C și 2D au dus la atribuirea semnalelor corespunzătoare celor 4 respectiv 7 medii ale protonilor din compusul intermediar D₁S₀₁ și a dendimerul protejat Boc-D₁G₁.

Cromatograma dendimerului deprotejat D₁G₁ a demonstrat puritatea înaltă obținută. Din voltametria ciclică s-a putut observa că în urma deprotejării dendimerului, gruparea hidrazidă este disponibilă pentru reacții chimice și electrochimice.

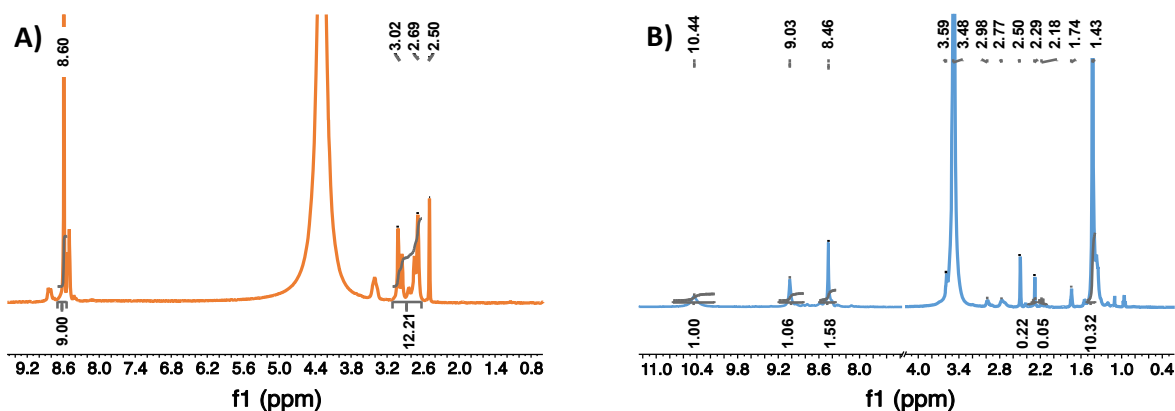


Fig. 1: Spectrele ^1H RMN ale **A)** compusului intermediar D_1S_{01} și **B)** ale dendrimerului protejat D_1G_1 .

De asemenea, interacția dintre terminațiile hidrazină și grupările carbonil a fost explorată și evidențiată prin HPLC, spectrofotometrie UV-Vis și electrochimic, **Fig. 2**.

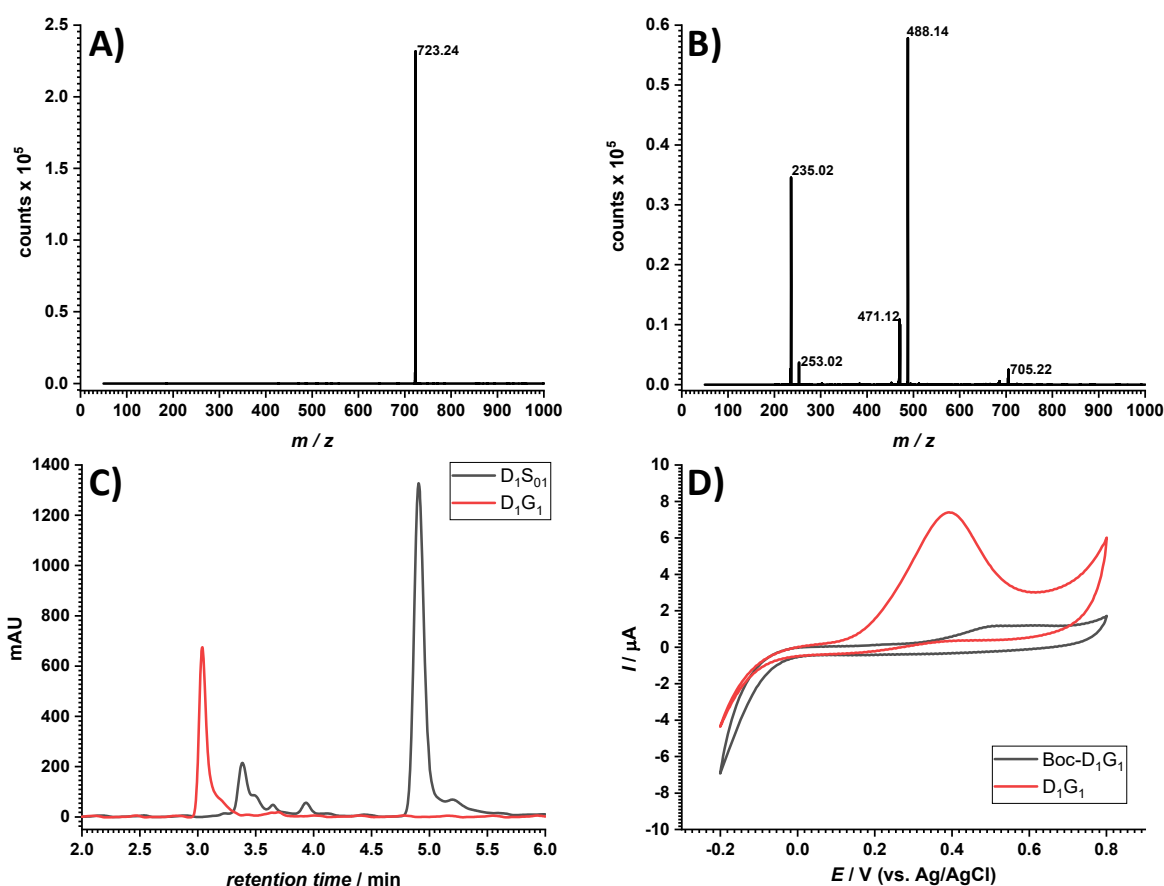


Fig. 2: Spectrul de masă ale intermediarului D_1S_{01} **A)** MS0 și **B)** MS2. **C)** Cromatograma compusului intermediar și a dendrimerului (C18 column, flux = 1 mL min $^{-1}$, eluent = 20% AcCN (0,1% TFA) – 80% H $_2$ O (0,1% TFA), 20 °C). **D)** Voltametria ciclică ale dendrimerului protejat și deprotejat demonstrând activitatea electrochimică a hidrazidelor.

Performanțele senzorialice ale acestor noi molecule dendrimerice au fost evidențiate prin integrarea lor în senzori, ca element de recunoaștere moleculară, pentru determinarea leziunilor oxidative din proteine. Astfel, au fost dezvoltați senzori impedimetrici pentru cuantificarea grupărilor carbonil din proteine, rezultate în urma interacției cu reactivi Fenton, folosind albumina serică bovină ca model proteomic și electrozi de aur fabricați prin fotolitografie ca transductori electrochimici.

Biosenzori pentru detecția mutațiilor genetice

Victor C. Diculescu, Anca Aldea

Mutațiile genetice generează proteine cu activități necorespunzătoare și reprezintă principala cauză a afecțiunilor medicale. Discriminarea mutațiilor în ADN este importantă și poate fi realizată electrochimic folosind biosenzori cu ADN. Testele pentru determinarea mutațiilor în ADN implică experimente de hibridizare bazate pe complementaritatea între cele două catene ce formează dublă elice. O strategie pentru detecția fenomenelor de hibridizare implică monitorizarea semnalelor unor indicatori electrochimici ce interacționează selectiv fie cu o singură catenă fie cu elicea dublă a ADN-ul. În cazul de față s-a avut în vedere fabricarea unui biosenzor pentru detecția genei BCR/ABL caracteristică leucemiei mieloide cronice.

Biosenzorul este constituit dintr-o secvență de ADN, o oligonucleotidă (ODN) complementară mutației BCR/ABL numită sondă, immobilizată la suprafața unui electrod de Au. Au fost testați electrozi de tip Au/Ti/SiO₂/Si și Au/PMMA/PET. La proiectarea sondei, s-a avut în vedere modificarea părții centrale cu o grupare tiofosfat, prin substituirea unui atom de oxigen din grupul fosfat cu un atom de sulf (ceea ce duce la o secvență de ADN fosfortiolată denumită PS-ODN). Această modificare a fost esențială pentru immobilizarea sondei la suprafața electrodului, **Fig. 1A**.

Strategia utilizată pentru investigarea reacțiilor de hibridizare în cazul biosenzorilor pe bază de ODN, include trei pași, aceștia fiind immobilizarea sondei pe suprafața electrodului, hibridizarea cu lanțul complementar și în final, transducția, **Fig. 1B**.

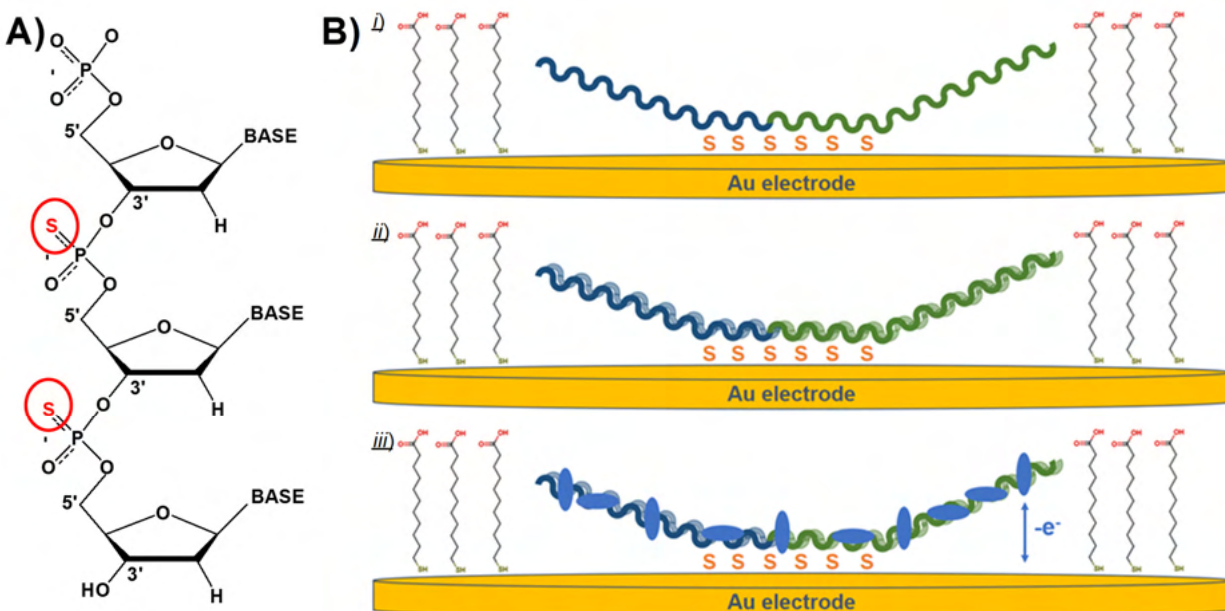


Fig. 1. Reprezentare schematică a: **A)** structurii chimice a ODN fosfortiolate și **B)** etapelor de fabricare ale biosenzorului: i) immobilizarea sondei, ii) hibridizare cu lanțul complementar și iii) transducția- interacție cu albastru de metilen (MB).

Pentru a demonstra importanța grupărilor de sulf din structura PS-ODN în immobilizarea acestora pe suprafața de aur s-a utilizat rezonanță cu plasmoni de suprafață (SPR), **Fig. 2**. Măsurătorile au fost efectuate alternând ciclurile de asociere (injecții cu PS-ODN)-disociere (injecții cu apă)-spălare (acid sulfuric) în flux de tampon fosfat 0,1 M pH 7,0. S-au efectuat injecții consecutive de diferite concentrații de PS-ODN demonstrându-se adsorbția acestora la suprafața electrodului de Au. De asemenea, au fost efectuate experimente de control utilizând o secvență ODN dar fără grupări tiofosfat demonstrându-se necesitatea acestei modificări pentru o immobilizare robustă a sondei.

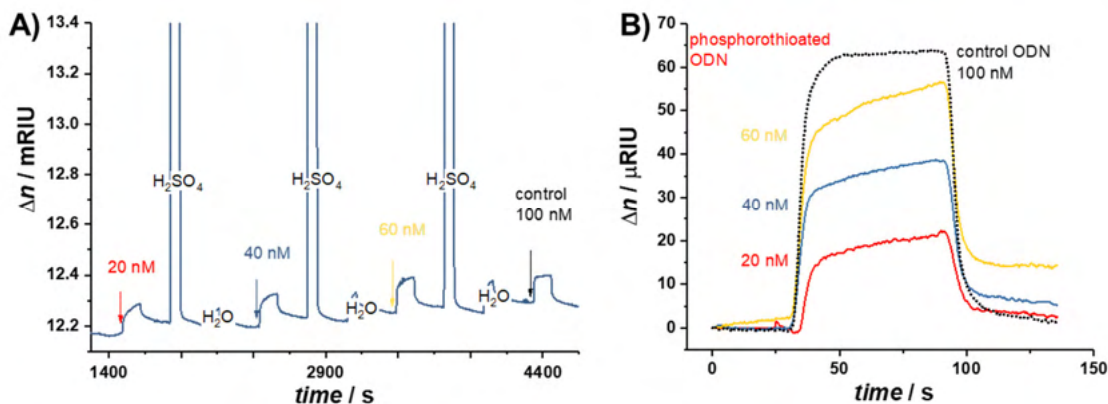


Fig. 2. Sensograme SPR obținute pentru adsorbția PS-ODN la diferite concentrații.

Următorul pas, a fost hibridizarea sondei imobilizate la suprafața electrodului prin incubarea biosenzorului într-o soluție ce conține secvența caracteristică genei BCR/ABL denumită și probă, **Fig. 1B ii**. Transducerea procesului de hibridizare a fost făcută prin voltametrie cu impuls diferențial urmărind *peak*-ul de reducere al albastrului de metilen, un compus electroactiv care interacționează prin intercalare dar și prin interacții electrostatice cu ADN-ul și care permite diferențierea între o secvență de monocatenară și un duplex.

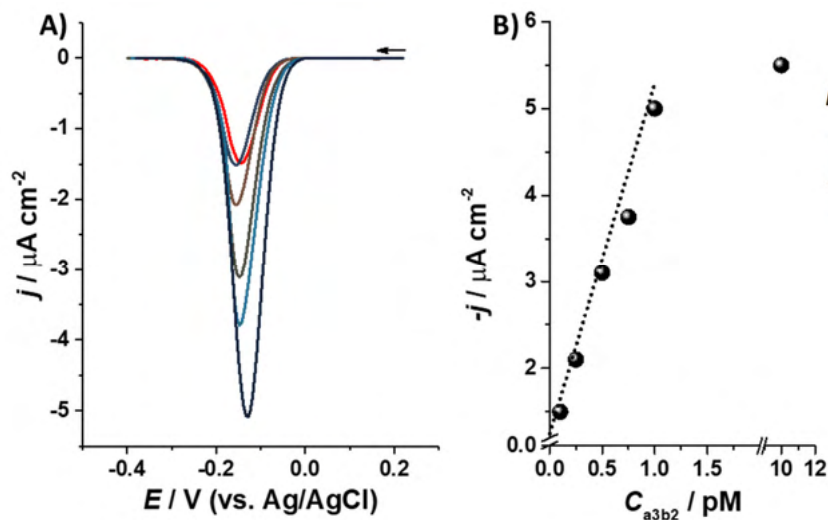


Fig. 3. A) Voltamograme cu impuls diferențial înregistrate în tampon fosfat 0,1 M pH 7 după incubarea biosenzorului în soluții de diferite concentrații de probă. **B)** Curba de calibrare corespunzătoare.

Biosenzorul a fost incubat în soluții cu diferite concentrații de probă, **Fig. 3**, iar voltamogramele au arătat o creștere a curentului de reducere al MB cu creșterea concentrației de probă ceea ce a permis construirea unei curbe de calibrare cu o sensibilitate de $5,05 \mu\text{A cm}^{-2} \text{pM}^{-1}$ și determinarea unei limite de detecție a genei BCR/ABL de 1,12 pM. Nu în ultimul rând, trebuie menționat că au fost efectuate experimente de control cu secvențe parțial complementare sau necomplementare sondei, toate acestea demonstrând selectivitate biosenzorului pentru secvența caracteristică genei BCR/ABL a leucemiei mieloide cronice.

Evaluarea electrochimică a interacției dintre compuși farmaceutici și acidul dezoxiribonucleic

Teodor Adrian Enache, Victor C. Diculescu, Mihaela Bunea

Interacția acidului dezoxiribonucleic (ADN) cu moleculele biologic active reprezintă una din preocupările fundamentale din domeniul științelor vieții. Un prim pas necesar în elucidarea mecanismelor de interacție îl reprezintă dezvoltarea de modelele experimentale adecvate studiilor la nivel de laborator. Pe de altă parte, procesele biologice sunt guvernate de reacțiile de transfer de electroni, ceea ce înseamnă că metodele electrochimice pot fi utilizate cu succes pentru a simula interacțiuni complexe biochimice ce au loc *in vivo*.

Azatioprina

În vederea identificării mecanismului de interacției a ADN-ului cu azatioprina, compus farmacologic cu rol imunosupresiv, a fost realizat un biosenzor electrochimic pe baza de ADN prin modificarea suprafeței transductorului, reprezentat de un electrod de carbon vitros, cu o soluție concentrată de ADN.

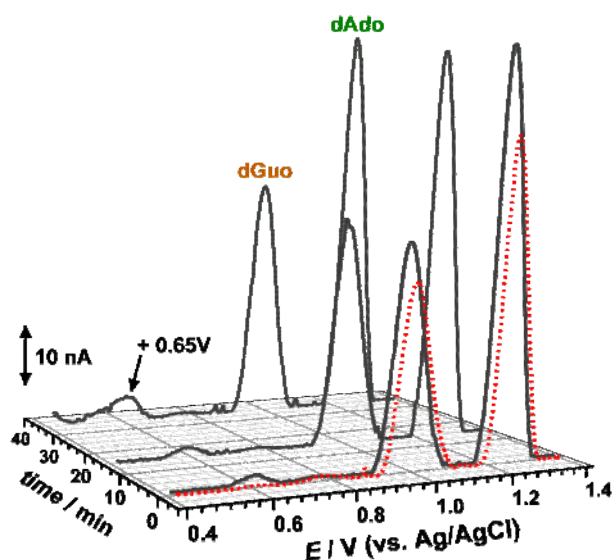


Fig. 1 Voltamograme de puls diferențial obținute în tampon acetat pH = 4.5 pentru (•••) biosenzorul de ADN (—) incubat cu 100 μM azatioprina.

Voltamograma de puls diferențial înregistrată pentru biosenzorul de ADN a prezentat două maxime de oxidare corespunzând reziduurilor de guanină, la potențialul de 0,9 V, și adenină, la potențialul de 1,25 V, **Fig. 1** (•••). În urma incubării biosenzorului de ADN cu azatioprină a fost observată atât apariția unui nou maxim de oxidare, la potențialul de 0,65 V, cât și modificări ale potențialelor și curenților de oxidare ale guaninei și adeninei, **Fig. 1** (—).

Pentru clarificarea mecanismului de interacție dintre ADN și azatioprină au fost de asemenea efectuate studii de spectrometrie de masă folosind ca probă filmul de ADN al biosenzorului supus digestiei acide după interacția cu azatioprină sub potențial aplicat. Astfel, după fabricarea biosenzorului acesta a fost introdus într-o soluție de azatioprină unde timp de 10 min a fost aplicat potențialul de -0,65 V după care filmul de ADN a fost înlăturat și supus digestiei acide în 1 M HClO_4 , urmând apoi ca soluția finală să fie neutralizată cu NaOH, **Schema 1**.



Schema 1 Protocolul de preparare al probei pentru spectrometria de masă

În spectrul de masă obținut folosind soluția de ADN preparată conform protocolului descris anterior au fost identificați atât produsul de oxidare al guaninei cât și complexe moleculare formate din reziduuri de adenină și fragmente de azatioprină, **Fig. 2**.

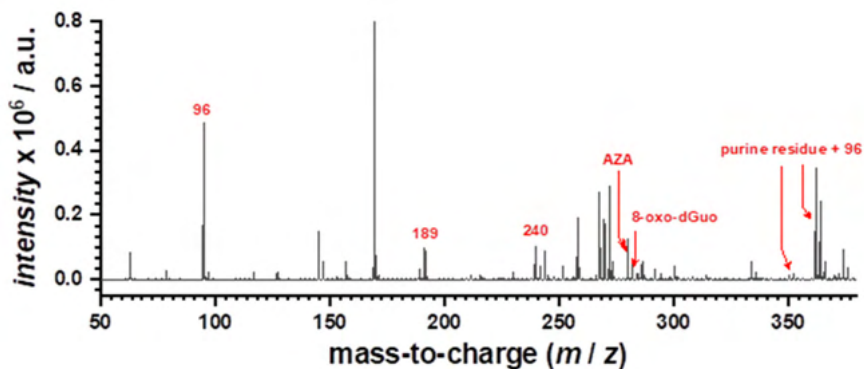


Fig. 2 Spectrul de masă al ADN-ului obținut după interacția cu azatioprina și digestie acidă.

În acest studiu biosenzorul electrochimic de ADN a fost folosit pentru a studia interacțiunea dintre ADN și azatioprină și a fost demonstrat faptul că în urma interacției au loc modificări structurale ale ADN-ului și leziuni oxidative identificate prin apariția maximului de oxidare al 8-oxo-deoxiguanozină, produsul de oxidare al guaninei. Totodată, studiile de spectrometrie de masă au demonstrat și formarea de complexe moleculare între bazele purinice și fragmente de azatioprină.

Bortezomib

Totodată a fost investigat și mecanismul de interacție dintre ADN și bortezomib, cu ajutorul biosenzorului cu ADN dar și în soluții incubate atât prin voltametrie cât și prin spectrometrie de masă.

Experimentele electrochimice inițiale, în soluții incubate, au demonstrat că în urma interacției ADN-

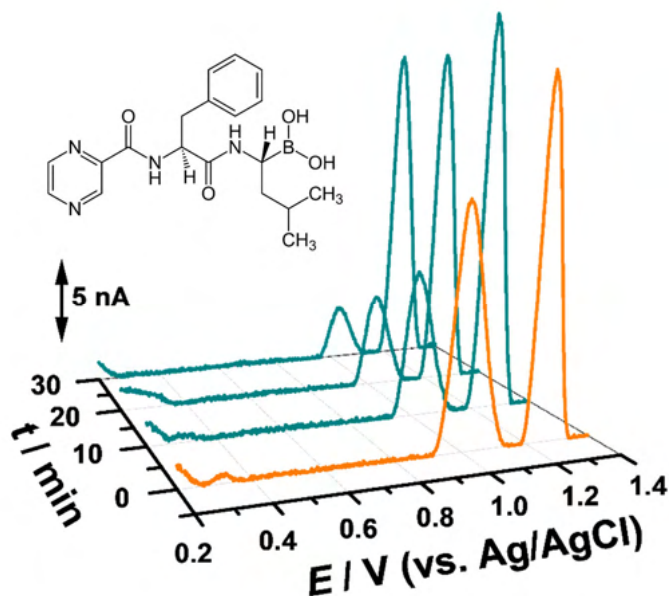


Fig. 3 Voltamograme de puls diferențial obținute în tampon acetat pH = 4,5 pentru biosenzorul de ADN înainte (orange) și după incubarea la +0,85 V cu 100 μM bortezomib.

Aceste rezultate, împreună cu spectrometria de masă, au indicat o interacție directă între reziduurile de guanină din structura ADN-ului și bortezomib, cu formarea unui aduct. A fost propus un mecanism de interacție între ADN și radicalii redox ai bortezomibului.

bortezomib, centrii electroactivi ai bortezomibului sunt intercalați între bazele azotate ale ADN-ului, devenind astfel indisponibili oxidării electrochimice. Pe de altă parte, experimentele cu biosenzorul electrochimic cu ADN, au permis generarea *in situ* de radicali ai bortezomibului și investigarea interacției acestora cu ADN-ul imobilizat la suprafața electrodului, **Fig. 3**. Astfel, incubarea biosenzorului într-o soluție de bortezomib și la un potențial aplicat de +0,85 V corespunzător reacțiilor redox ale compusului, au demonstrat scăderea progresivă, atât cu timpul de incubare cât și cu concentrația, a *peak*-ului de oxidare a guaninei.

Efectul stresului oxidativ asupra celulelor vii

Adrian Enache, Luminița Andreea Rădulescu, Caroline Sanz, Melania Onea,
Victor Diculescu

Efectul stresului oxidativ asupra sistemelor biologice implică diverse etape chimice și biologice. Efectele directe au ca și cauză principală interacția componentelor celulare (ADN, proteine, lipide etc.) cu specii reactive de oxigen cum ar fi ionul superxid O_2^- , radicalul hidroxil, sau peroxidul de hidrogen. Efectele indirecte sunt datorate, în mare măsură, alterării proceselor biologice normale și a componentelor celulare.

Evaluarea efectului indus de diverși factori de stres oxidativ asupra celulelor a fost realizată folosind două linii celulare, L929 – fibroblaste de șoarece și B16 – melanom de șoarece, în condiții experimentale specifice. Factorii de stres oxidativ investigați au fost:

- Peroxidul de hidrogen (H_2O_2)
- Potențialul aplicat
- Compuși farmaceutici
- Materiale nanostructurate

Efectul peroxidului de hidrogen asupra celulelor B16 a fost investigat prin studii de voltametrie ciclică și microscopie electronică de baleiaj și de fluorescență. Atât pentru studiile voltametrice cât și pentru

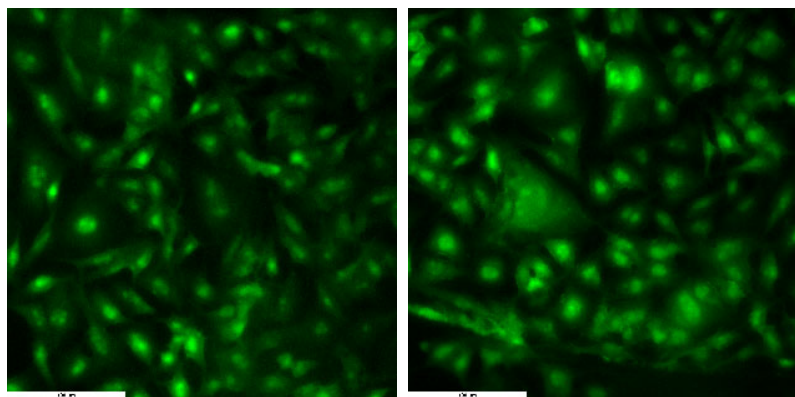


Fig. 1. Imagini de microscopie de fluorescență realizate pentru celulele B16 crescute pe suprafețe de sticlă (stânga) și aur (dreapta) la o magnificare 40X; indicator fluorescent: acridin orange

sticlă cât și pe cea de aur, celulele prezintă o morfologie specifică, au nucleul bine definit și sunt prezente pe întreaga suprafață, ceea ce demonstrează o viabilitate celulară ridicată.

De asemenea, morfologia celulelor crescute pe electrozi de aur ($d = 1 \text{ mm}$) a fost evaluată prin microscopie electronică de baleiaj (SEM), **Fig. 2**, folosind ca agenți de fixare 3% formaldehidă și 0,25% glutaraldehidă și pentru postfixare 0,1 % OsO_4 . Imaginile SEM înregistrate după 24 de ore de incubare a celulelor pe suprafața electrodului prezintă morfologia specifică celulelor B16 confirmând biocompatibilitatea acestui material.

Pentru a evalua efectul peroxidului de hidrogen asupra celulelor B16 au fost înregistrate voltamograme ciclice, pentru celulele crescute pe suprafața electrozilor timp de 24 h, înainte și după incubarea, timp de 30 min, cu diferite concentrații de H_2O_2 , **Fig. 3**. De asemenea au fost efectuate experimente control folosind doar mediul de cultură.

microscopie au fost folosite suprafețe de aur ca suport pentru culturile celulare.

Verificarea biocompatibilității suprafețelor de aur a fost verificată folosind microscopia de fluorescență. Astfel, celulele B16 au fost însămânțate pe suprafețele de aur și sticlă la o densitate de 5000 celule/ cm^2 și după 48 de ore de incubare, folosind acridin orange ca indicator fluorescent, au fost înregistrate imagini de microscopie, **Fig. 1**.

După cum se poate observa din imaginile de microscopie de fluorescență, atât pe suprafața de

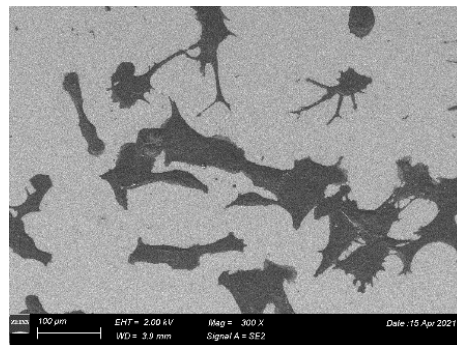


Fig. 2 Imagini SEM obținute pentru celulele B16 crescute pe aur.

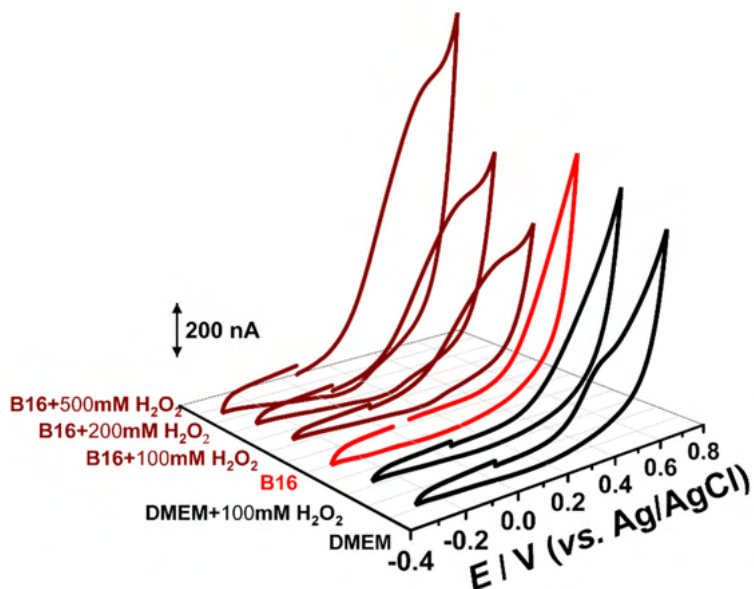


Fig. 3 Voltamograme ciclice înregistrate cu electrozi de aur pentru mediul de cultură și celulele B16 înainte și după incubarea cu H_2O_2 .

Rezultatele voltametrice au arătat că H_2O_2 induce apariția unui maxim de oxidare, în jurul valorii de potențial de 0,5 V, pentru culturile celulare dar nu și pentru mediul de cultură, **Fig. 3**. Mai mult, curentul maximului de oxidare crește o dată cu creșterea concentrației de H_2O_2 . Acest lucru demonstrează faptul că în prezența H_2O_2 culturile celulare eliberează compuși electroactivi ca răspuns la stresul oxidativ.

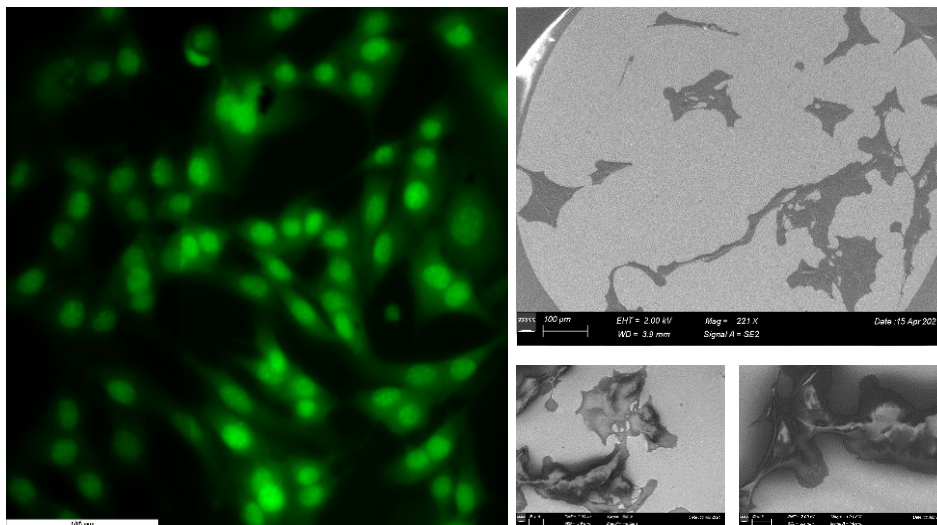


Fig. 4 Imagini de microscopie de fluorescență (stânga) și electronică de baleiaj (dreapta) obținute pentru celulele B16 crescute 48 și 24 h pe electrozi de aur și incubate timp de 30 min cu H_2O_2 .

Au fost de asemenea efectuate imagini de microscopie de fluorescență și electronică de baleiaj pentru culturile celulare B16 crescute pe suprafețe de aur timp de 48 h (**Fig. 4 – stânga**) și 24 h (**Fig. 4 – dreapta**) și incubate 30 min cu H_2O_2 . Imaginile obținute au arătat că deși celulele prezintă aceeași morfologie specifică, **Fig. 4**, numărul acestora scade în comparație cu rezultatele obținute fără incubarea cu H_2O_2 , **Fig. 1 și 2**.

Influența potențialului aplicat asupra culturilor celulare crescute pe suprafețe conductoare a fost investigat folosind linia celulară de fibroblaste de șoarece L929 și electrozi serigrafiați, de unică folosință, de carbon și aur. Astfel, după 24 h de creștere a celulelor pe suprafețele electrozilor în condiții controlate au fost înregistrate voltamograme ciclice, **Fig. 5**.

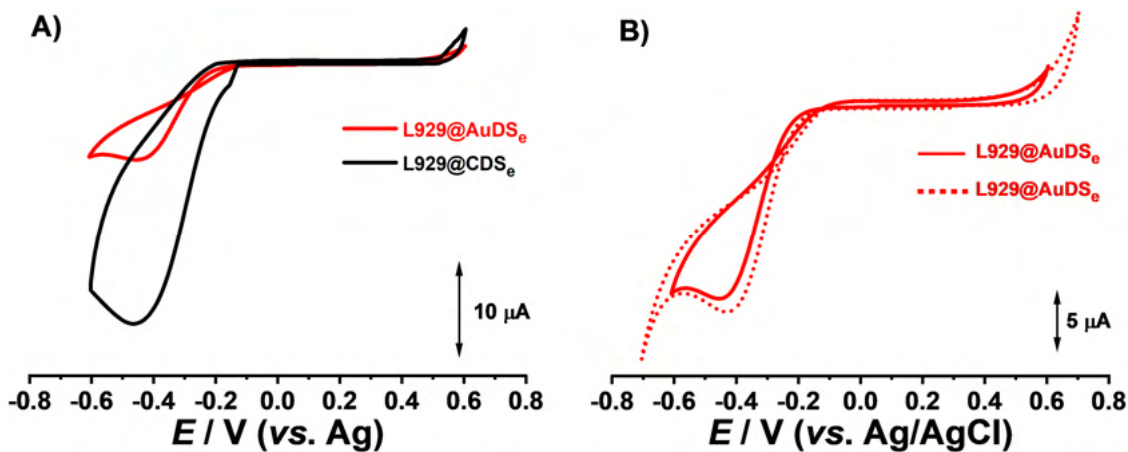


Fig. 5 Voltamograme ciclice obținute pentru culturile celulare L929 crescute 24 h pe electrozi Dropsens de aur (AuDS_e) și carbon (CDS_e).

Rezultatele voltametrice au evidențiat prezența unui maxim de reducere, în jurul valorii de -0,4 V, atât la electrozii de aur cât și la cei de carbon, unde intensitatea curentului a fost mult mai mare, **Fig. 5 – stânga**. De asemenea, a fost observat faptul că modificarea limitelor de potențial, *i.e.* V_{\min} și V_{\max} , duce la modificări ale potențialului și curentului maximului de reducere ceea ce indică faptul că potențialul aplicat culturilor celulare influențează eliberarea de specii electroactive de către acestea.

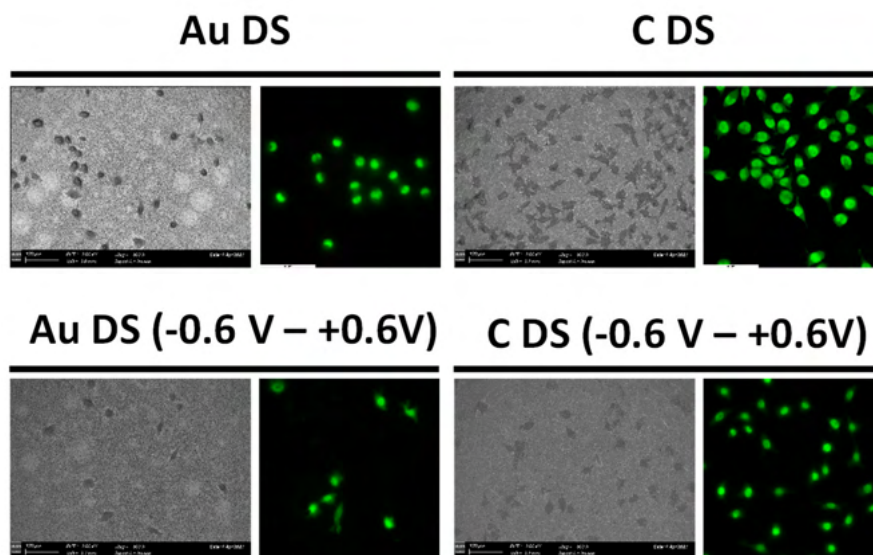


Fig. 6 Imagini de microscopie electronică de baleiaj și de fluorescență obținute pentru celulele L929 crescute 24 h pe suprafețe de carbon și aur.

În vederea clarificării comportamentului redox al celulelor crescute pe suprafețele de aur și carbon au fost înregistrate imagini de microscopie electronică de baleiaj și de fluorescență, **Fig. 6**. Atât imaginile SEM cât și de fluorescență, folosind indicator acridin orange, au demonstrat o viabilitate mult mai redusă a celulelor crescute pe suprafețe de aur în comparație cu cele crescute pe carbon, fapt ce explică diferențele dintre curenții de reducere obținuți folosind cei doi electrozi (**Fig. 5 – stânga**). Mai mult, a fost evidențiat faptul că după înregistrarea unei voltamograme pe intervalul de potențial -0,6 - +0,6 V are loc o scădere a numărului de celule, ceea ce înseamnă că aplicarea de potențiale ridicate poate induce moartea celulară. Pentru studiul viabilității celulare și/sau a citotoxicității induse de anumite medicamente, *i.e.* azatioprina și grupările componente – mercaptopurina și nitroimidazol, bortezomib și shikonin și de nanofirele de ZnO și CdTe a fost folosită linia celulară L929 derivată din fibroblaste de șoarece. Celulele fibroblaste au fost crescute în placa de cultură cu 96 de godeuri (densitate inițială 7000 celule/godeu), folosind mediu de

cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) cu conținut redus de glucoză (1g/L), suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotice (streptomycină și penicilină), în condiții controlate (umiditate, 5% CO₂, 37°C), în prezența medicamentelor și a nanofirelor. După cultivarea celulelor timp de 24 h, gradul de proliferare celulară a fost investigat folosind testul MTS, care are la bază transformarea sării de tetrazoliu MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), sub acțiunea succinat-dehidrogenazei mitocondriale din celulele viabile, în formazan. Pentru determinarea proliferării celulare, după 3 ore de incubare produsul de reducere al MTS a fost determinat prin măsurarea adsorbanței la 490 nm, utilizând un cititor de microplăci.

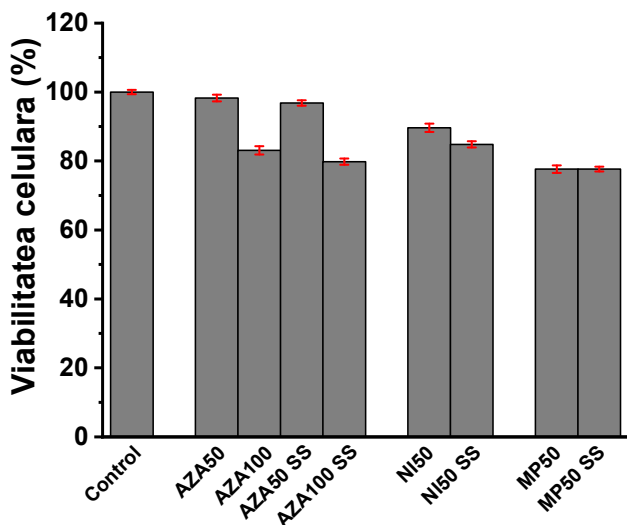


Fig. 7. Viabilitatea celulară raportată la control (placă de cultură) obținută pentru culturi celulare L929 incubate cu soluții de 50 și 100 μM azatioprină, nitroimidazol și mercaptopurină (AZA50/100, NI50 și MP50) expuse timp de 90 min la simulatorul solar (AZA50/100 SS, NI50 SS, MP50 SS)

Pentru a studia efectul azatioprinei (AZA) și a părților componente ale acesteia, nitroimidazol (NI) și mercaptopurina (MP), asupra celulelor vii au fost efectuate studii de viabilitate celulară folosind soluții de AZA, NI și MP preparate înainte și după expunerea timp de 90 de minute la simulatorul solar, **Fig.7**. Concentrațiile folosite pentru incubarea culturilor celulare au fost de 50 și 100 μM pentru AZA și 50 μM pentru NI și MP.

În cazul celulelor incubate cu soluții de AZA studiile au arătat o scădere a viabilității celulare, în comparație cu controlul, de aproximativ 20 de procente pentru concentrația de 100 μM, **Fig. 7**. Pentru soluțiile de AZA expuse simulatorului solar viabilitatea observată a fost cu câteva procente mai scăzută în comparație cu soluțiile neexpuse. De asemenea, a fost observat faptul că viabilitatea celulară a scăzut pentru celulele incubate cu NI și MP,

unde cele mai mici valori ale viabilității au fost obținute pentru celulele incubate cu soluții de MP, **Fig. 7**.

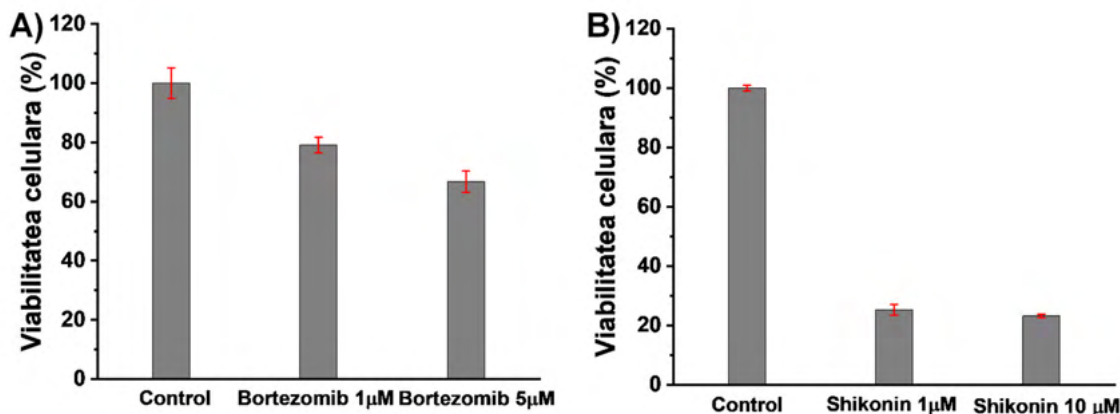


Fig. 8. Viabilitatea celulară raportată la control (placă de cultură) obținută pentru culturi celulare L929 incubate cu soluții de **A)** 1 și 5 μM bortezomib și **B)** 1 și 10 μM shikonin.

Pentru inhibitorul de proteazom, bortezomib, testele de citotoxicitate au arătat o scădere graduală a viabilității o dată cu creșterea concentrației de compus, **Fig. 8A**. În comparație cu controlul, valoarea viabilității a scăzut în jurul valorii de 80% pentru concentrațiile de 1 μM ajungând până la 70% în cazul concentrației de 5 μM. În mod similar, shikonin, inhibitor de kinază, a indus o scădere a viabilității celulare

la aproximativ 20% pentru concentrații de ordinul micromolar, **Fig. 8B**. Nu au existat diferențe ale viabilității pentru concentrațiile de 1 și 10 μM sikonin. Aceste studii au arătat că la concentrații scăzute inhibitorii enzimatici induc scăderi semnificative ale viabilității celulare prin blocarea mecanismelor enzimatic, **Fig. 8**.

Efectul nanofirelor de ZnO și CdTe asupra celulelor L929 a fost investigat prin studii de viabilitate celulară. A fost evidențiat faptul că nanofirele de ZnO nu afectează viabilitatea celulară, însă cele de CdTe au indus o scădere a viabilității celulare la aproximativ 20%, **Fig. 9**.

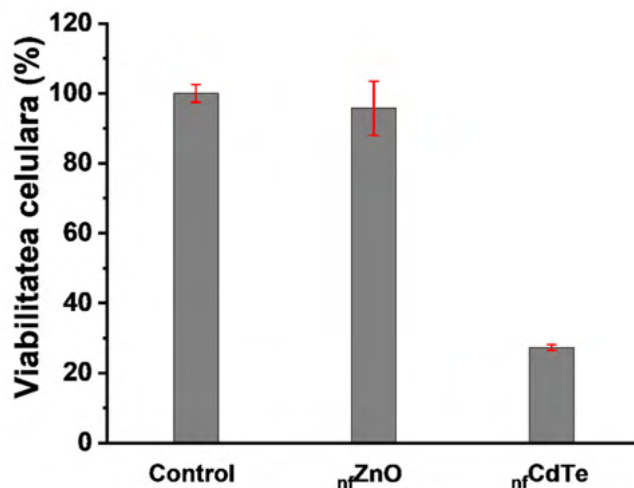


Fig. 9. Viabilitatea celulară raportată la control (placă de cultură) obținută pentru culturi celulare L929 incubate cu nanofire de ZnO și CdTe în suspensie

Dezvoltarea laboratorului de biologie celulară în cadrul proiectului NANOBIO SURF a deschis noi direcții de cercetare în cadrul Institutului de Cercetare Dezvoltare pentru Fizica Materialelor făcând posibilă explorarea biocompatibilității noilor materiale fabricate și integrarea culturilor celulare în modele experimentale complexe. Astfel, prin perfecționarea tehnicilor de litografie a fost posibil obținerea de suprafețe de aur cu biocompatibilitate ridicată ce au permis evidențiere efectelor stresului oxidativ asupra celulelor folosind metodele voltametrice. De asemenea, posibilitatea de a investiga efectele a diferiți compuși chimici, de interes biologic, sau a diverse nanostructuri asupra viabilității celulare permite o mai bună înțelegere a mecanismelor de interacție dintre aceștia și componentele celulare, pe de o parte, cât și integrarea culturilor celulare în sisteme senzorialice complexe.

Listă de publicații rezultate din implementarea proiectului 31 Mai 2021

1. Henriques de Jesus, C.S.; Chiorcea Paquim, A.M.; Diculescu, V.C. Voltammetric and atomic force microscopy characterization of chymotrypsin, trypsin and caspase activities of proteasome. *Catal. Today* **2018**, *306*, 287–293, doi:10.1016/j.cattod.2017.01.012.
2. Evanghelidis, A.; Beregoi, M.; Diculescu, V.C.; Galatanu, A.; Ganea, P.; Enculescu, I. Flexible Delivery Patch Systems based on Thermoresponsive Hydrogels and Submicronic Fiber Heaters. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 17555, doi:10.1038/s41598-018-35914-2.
3. Beregoi, M.; Preda, N.; Evanghelidis, A.; Costas, A.; Enculescu, I. Versatile Actuators Based on Polypyrrole-Coated Metalized Eggshell Membranes. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6*, 10173–10181, doi:10.1021/acssuschemeng.8b01489.
4. Henriques de Jesus, C.S.; Chiorcea-Paquim, A.M.; Barsan, M.M.; Diculescu, V.C. Electrochemical assay for 20S proteasome activity and inhibition with anti-cancer drugs. *Talanta* **2019**, *199*, doi:10.1016/j.talanta.2019.02.052.
5. Florica, C.; Costas, A.; Preda, N.; Beregoi, M.; Kuncser, A.; Apostol, N.; Popa, C.; Socol, G.; Diculescu, V.; Enculescu, I. Core-shell nanowire arrays based on ZnO and Cu₂O for water stable photocatalysts. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-53873-0.
6. Enache, T.A.; Matei, E.; Diculescu, V.C. Electrochemical Sensor for Carbonyl Groups in Oxidized Proteins. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, doi:10.1021/acs.analchem.8b03969.
7. Diculescu, V.C.; Enache, T.A. Voltammetric and mass spectrometry investigation of methionine oxidation. *J. Electroanal. Chem.* **2019**, *834*, 124–129, doi:10.1016/j.jelechem.2018.12.058.
8. Diculescu, V.C.; Beregoi, M.; Evanghelidis, A.; Negrea, R.F.; Apostol, N.G.; Enculescu, I. Palladium/palladium oxide coated electrospun fibers for wearable sweat pH-sensors. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-45399-2.
9. Barsan, M.M.; Matei, E.; Enculescu, M.; Costescu, R.; Preda, N.; Enache, T.A.; Enculescu, I.; Diculescu, V.C. Nanostructured palladium doped nickel electrodes for immobilization of oxidases through nickel nanoparticles. *Electrochim. Acta* **2019**, doi:10.1016/j.electacta.2019.04.143.
10. Barsan, M.M.; Enache, T.A.; Preda, N.; Stan, G.; Apostol, N.G.; Matei, E.; Kuncser, A.; Diculescu, V.C. Direct Immobilization of Biomolecules through Magnetic Forces on Ni Electrodes via Ni Nanoparticles: Applications in Electrochemical Biosensors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, doi:10.1021/acsmi.9b04990.
11. Barsan, M.M.; Diculescu, V.C. New electrochemical sensor based on CoQ₁₀ and cyclodextrin complexes for the detection of oxidative stress initiators. *Electrochim. Acta* **2019**, *302*, doi:10.1016/j.electacta.2019.02.060.
12. Serban, A.; Evanghelidis, A.; Onea, M.; Diculescu, V.; Enculescu, I.; Barsan, M.M. Electrospun conductive gold covered polycaprolactone fibers as electrochemical sensors for O₂ monitoring in cell culture media. *Electrochem. Commun.* **2020**, *111*, 106662, doi:10.1016/j.elecom.2020.106662.
13. Preda, N.; Costas, A.; Enculescu, M.; Enculescu, I. Biomimetic 3D fibrous networks based on ZnO, CuO and ZnO–CuO composite nanostructures prepared from eggshell membranes. *Mater. Chem. Phys.* **2020**, *240*, 122205, doi:10.1016/j.matchemphys.2019.122205.
14. Neațu, Ș.; Neațu, F.; Diculescu, V.C.; Trandafir, M.M.; Petrea, N.; Somacescu, S.; Krumeich, F.; Wennmacher, J.T.C.; Knorpp, A.J.; Van Bokhoven, J.A.; et al. Undoped SnO₂ as a Support for Ni Species to Boost Oxygen Generation through Alkaline Water Electrolysis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 18407–18420, doi:10.1021/acsmi.9b19541.

15. Neațu, F.; Abramiuc, L.E.; Trandafir, M.M.; Negrea, R.F.; Florea, M.; Teodorescu, C.M.; Neațu, S. Degenerated TiO₂ Semiconductor Modified with Ni and Zn as Efficient Photocatalysts for the Water Splitting Reaction. *ChemCatChem* **2020**, *12*, 4642–4651, doi:10.1002/cctc.202000691.
16. Martínez-Rojas, F.; Diculescu, V.C.; Armijo, F. Electrochemical Immunosensing Platform for the Determination of the 20S Proteasome Using an Aminophenylboronic/Poly-indole-6-carboxylic Acid-Modified Electrode. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 4941–4948, doi:10.1021/acsabm.0c00478.
17. de Jesus, C.S.H.; Enache, T.A.; Diculescu, V.C. Charge transfer reaction mechanisms of epoxyketone and boronated peptides at glassy carbon and boron doped diamond electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **2020**, *878*, doi:10.1016/j.jelechem.2020.114733.
18. Apostol, N.G.; Lizzit, D.; Lungu, G.A.; Lacovig, P.; Chirilă, C.F.; Pintilie, L.; Lizzit, S.; Teodorescu, C.M. Resistance hysteresis correlated with synchrotron radiation surface studies in atomic sp² layers of carbon synthesized on ferroelectric (001) lead zirconate titanate in an ultrahigh vacuum. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 1522–1534, doi:10.1039/c9ra09131a.
19. Aldea, A.; Matei, E.; Leote, R.J.B.; Rau, I.; Enculescu, I.; Diculescu, V.C. Ionophore- NafionTM modified gold-coated electrospun polymeric fibers electrodes for determination of electrolytes. *Electrochim. Acta* **2020**, *363*, doi:10.1016/j.electacta.2020.137239.
20. Teodorescu, C.M. Spin asymmetry originating from densities of states: Criterion for ferromagnetism, structures and magnetic properties of 3d metals from crystal field based DOSs. *Results Phys.* **2021**, *25*, 104241, doi:10.1016/j.rinp.2021.104241.
21. Teodorescu, C.M. Ferroelectricity in thin films driven by charges accumulated at interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23*, 4085–4093, doi:10.1039/d0cp05617k.
22. Apostol, N.G.; Husanu, M.A.; Lizzit, D.; Hristea, I.A.; Chirilă, C.F.; Trupină, L.; Teodorescu, C.M. CO adsorption, reduction and oxidation on Pb(Zr,Ti)O₃(001) surfaces associated with negatively charged gold nanoparticles. *Catal. Today* **2021**, *366*, 141–154, doi:10.1016/j.cattod.2020.02.042.
23. Apostol, N.G.; Bucur, I.C.; Lungu, G.A.; Tache, C.A.; Teodorescu, C.M. CO adsorption and oxidation at room temperature on graphene synthesized on atomically clean Pt(001). *Catal. Today* **2021**, *366*, 155–163, doi:10.1016/j.cattod.2020.02.006.
24. Aldea, A.; Leote, R.J.B.; Matei, E.; Evanghelidis, A.; Enculescu, I.; Diculescu, V.C. Gold coated electrospun polymeric fibres as new electrode platform for glucose oxidase immobilization. *Microchem. J.* **2021**, *165*, doi:10.1016/j.microc.2021.106108.
25. Barsan, M.M.; Diculescu, V.C. An antibody-based amperometric biosensor for 20S proteasome activity and inhibitor screening. *Analyst* **2021**, doi:10.1039/d0an02426k.
26. Barsan, M.M.; Sanz, C.G.; Onea, M.; Diculescu, V.C. Immobilized antibodies on mercaptophenylboronic acid monolayers for dual-strategy detection of 20s proteasome. *Sensors* **2021**, *21*, 16–18, doi:10.3390/s21082702.

Contact

Director proiect : Dr. Victor Diculescu

E-mail : victor.diculescu@infim.ro

Telefon : 021.241.81.00

Fax : 021.369.01.77

Adresa : Str. Atomiștilor, Nr. 405A, 077125, Măgurele, România

Website proiect: <https://projects.infim.ro/NANOBIOSURF/>

COD QR



Biosenzori electrochimici nanostructurați pentru diagnostic medicală și screening de compuși cu proprietăți farmaceutice: dezvoltare, caracterizarea suprafețelor și aplicații

Proiect cofinanțat din Fondul European de Dezvoltare Regională prin Programul Operațional Competitivitate 2014-2020

**Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica Materialelor
Mai 2021**

Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României