UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ DIN FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI BIOTEHNOLOGII

TEZĂ DE DOCTORAT

Metode moderne de analiză a extractelor marine utilizate în produsele cosmetice și farmaceutice

Student-Doctorand: Drăgoi (cas. Brînza) Andreea
Coordonator: Prof. Dr. habil Raluca-Ioana van Staden

2026

UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ DIN FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI BIOTEHNOLOGII

TEZĂ DE DOCTORAT

Metode moderne de analiză a extractelor marine utilizate în produsele cosmetice și farmaceutice

Student-Doctorand: Drăgoi (cas. Brînza) Andreea
Coordonator: Prof. Dr. habil Raluca-Ioana van Staden

Mentory Committee:

Nume	Instituția
Prof. Dr Ing. Gabriel Lucian Radu	Departamentul de Chimie Analitică și Ingineria Mediului, Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA București
Prof. Dr. Eugenia EftimieTotu	Departamentul de Chimie Analitică și Ingineria Mediului, Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA București
CSII Dr. Ruxandra-Maria Mihai	Laboratorul de Electrochimie și PATLAB, Institutul Național de Cercetare pentru Electrochimie și Materie Condensată

Prezenta teză de doctorat cuprinde 106 pagini, 175 de referințe bibliografice, 21 de tabele și 22 de figuri.

Cuprins

Mulțumiri.....7

INTRODUCERE.....8

CAPITOLUL 1.....10
ALGELE MARINE, PISICA DE MARE ȘI MEDUZELE – SURSE MARINE DE COMPUȘI ACTIVI UTILIZAȚI ÎN PRODUSELE FARMACEUTICE ȘI COSMETICE.....10

CAPITOLUL 2.....13
METODE UTILIZATE PENTRU DETERMINAREA SUBSTANȚELOR DE IMPORTANȚĂ FARMACEUTICĂ ȘI CLINICĂ DIN SURSE MARINE.....13
2.1. Introducere.....13
2.2. Senzori stochastici.....14
2.3. Spectroscopia de absorbție atomică.....14

CAPITOLUL 3.....16
DETERMINAREA METALELOR GRELE ÎN PRODUSELE MARINE DESTINATE CONSUMULUI [29].....16
3.3. Rezultate și discuții.....16

CAPITOLUL 4.....19
BENZI SENZORIALE PE BAZĂ DE MĂTASE PENTRU DETERMINAREA RAPIDĂ A ZINCULUI ȘI CUPRULUI DIN ALGE MARINE ȘI PISICA DE MARE [53].....19
4.3. Rezultate și discuții.....19
4.3.1. Caracteristicile de răspuns ale benzilor senzoriale.....19
4.3.2. Selectivitatea benzilor senzoriale.....22

4.3.3. Validarea metodei pentru determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II) în alge verzi, alge brune și pisica de mare.....23

CAPITOLUL 5.....28
ELECTROANALIZA RAPIDĂ, DIRECT LA LOCUL PRELEVĂRII, A ESTERULUI ETILIC AL ACIDULUI EICOSAPENTAENOIC DIN FICATUL ȘI CARNEA DE PISICĂ DE MARE UTILIZÂND O MINIPLATFORMĂ STOCHASTICĂ BAZATĂ PE UN MICROSENZOR STOCHASTIC 3D [71].....28
5.3. Rezultate și discuții..... 28
5.3.1. Performanțele analitice ale miniplatformei stochastice bazate pe un microsenzor stochastic 3D.....28
5.3.2. Selectivitatea miniplatformei stochastice 3D.....29
5.3.3. Reproductibilitatea și robustețea miniplatformei stochastice bazate pe un microsenzor stochastic 3D.....29
5.3.4. Validarea miniplatformei stochastice bazate pe un microsenzor stochastic 3D....29

CAPITOLUL 6.....31
RECUNOAȘTEREA MOLECULARĂ RAPIDĂ A ESTERULUI ETILIC AL ACIDULUI DOCOSAHEXAENOIC DIN FICATUL ȘI CARNEA DE PISICĂ DE MARE UTILIZÂND O MINIPLATFORMĂ BAZATĂ PE UN MICROSENZOR STOCHASTIC 3D [93].....31
6.3. Rezultate și discuții..... 31
6.3.1. Caracterizarea suprafeței active a senzorului.....31
6.3.2. Parametrii analitici obținuți pentru miniplatforma bazată pe un microsenzor stochastic 3D.....32
6.3.3. Selectivitatea miniplatformei.....33
6.3.4. Reproductibilitatea și robustețea miniplatformei utilizate pentru determinarea DHA.....34
6.3.5. Validarea miniplatformei dezvoltate.....34

CAPITOLUL 7.....37
DETERMINAREA RAPIDĂ, DIRECT LA LOCUL PRELEVĂRII, A CONȚINUTULUI DE ESTER ETILIC AL ACIDULUI EICOSAPENTAENOIC ȘI ESTER ETILIC AL ACIDULUI DOCOSAHEXAENOIC DIN ALGE MARINE UTILIZÂND O MINIPLATFORMĂ INTELIGENTĂ.....37
7.3. Rezultate și discuții..... 37
7.3.1. Caracteristicile de răspuns ale miniplatformei inteligente utilizate pentru determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic și a esterului etilic al acidului docosahexaenoic.....37
7.3.2. Selectivitatea miniplatformei inteligente utilizate pentru determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic și a esterului etilic al acidului docosahexaenoic.....38
7.3.3. Validarea determinării directe a esterului etilic al acidului eicosapentaenoic și a esterului etilic al acidului docosahexaenoic din alge 39

CAPITOLUL 8.....42
SENZOR STOCHASTIC 2D DE UNICĂ FOLOSINȚĂ PENTRU RECUNOAȘTEREA MOLECULARĂ ȘI DETERMINAREA HEPARINEI DIN MEDUZE.....42
8.3. Rezultate și discuții..... 42
8.3.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stochastic 2D de unică folosință.....42
8.3.2. Teste de selectivitate.....44
8.3.3. Validarea metodei de screening pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea heparinei din meduze.....44

CAPITOLUL 9.....46
DETERMINAREA ULTRASENSIBILĂ ȘI RAPIDĂ A ACIDULUI HIALURONIC DIN FICATUL DE PISICĂ DE MARE [160].....46
9.3. Rezultate și discuții..... 46
9.3.1. Caracterizarea senzorului stochastic bazat pe GMN/SPGE.....46
9.3.2.,Selectivitatea senzorului stochastic bazat pe GMN/SPGE.....50
9.3.3. Validarea senzorului stochastic ultrasensibil bazat pe GMN/SPGE pentru determinarea acidului hialuronic din ficatul de pisică de mare 50

CONCLUZII 53

Contribuții originale 56
Perspective de cercetare 58
Bibliografie 59
Anexa 1. Participări la conferințe naționale și internaționale 61
Anexa 2. Lucrări publicate în reviste ISI 62

Mulțumiri

Îi adresez sincere mulțumiri doamnei Profesor dr. habil. Raluca-Ioana van Staden, coordonatorul acestei teze de doctorat, pentru îndrumarea științifică, sprijinul permanent și profesionalismul deosebit, fără de care realizarea acestei lucrări nu ar fi fost posibilă.

De asemenea, adresez mulțumiri colegilor mei din cadrul Laboratorului de Electrochimie și PATLAB, care, pe parcursul activității de cercetare, mi-au oferit sprijin, colaborare și au devenit adevărați prieteni.

Mulțumesc, totodată, Facultății de Inginerie Chimică și Biotehnologii pentru cadrul academic și condițiile de cercetare oferite pe parcursul studiilor doctorale.

INTRODUCERE

Utilizarea medicamentelor care conțin substanțe active extrase din surse marine a cunoscut o dezvoltare semnificativă în ultimii ani. Produsele farmaceutice obținute din astfel de surse s-au dovedit a avea o eficiență terapeutică ridicată și efecte adverse reduse comparativ cu medicamentele de sinteză. Algele marine, meduzele și pisica de mare reprezintă surse naturale valoroase de acizi grași, proteine, acid hialuronic, venin și heparină, motiv pentru care valorificarea acestora prezintă un interes deosebit pentru industria farmaceutică și cosmetică.

Un aspect esențial îl reprezintă determinarea directă a acestor compuși din sursele marine, deoarece concentrațiile lor pot varia în funcție de specia analizată și de condițiile de mediu. În acest context, este necesară dezvoltarea unor metode de analiză fiabile, capabile să efectueze determinări rapide, direct la locul prelevării probelor, astfel încât să se poată evalua în timp real dacă sursa marină analizată este adecvată pentru extracția compușilor bioactivi utilizați ca substanțe active în formulările farmaceutice.

O altă problemă majoră este reprezentată de poluarea mediului marin și de capacitatea algelor, meduzelor și pisicii de mare de a acumula metale grele din apa mării. Determinarea rapidă, direct la locul prelevării, a metalelor grele din aceste organisme marine permite identificarea eventualelor contaminări și oferă posibilitatea adoptării unor măsuri de decontaminare atât a mediului acvatic, cât și a organismelor marine, înainte de extracția compușilor bioactivi.

Obiectivul principal al prezentei teze de doctorat a fost dezvoltarea unor metode moderne de analiză pentru extracte și surse marine, capabile să determine diferite categorii de compuși bioactivi utilizați în domeniul farmaceutic și cosmetic, în vederea obținerii unor produse cu eficiență terapeutică ridicată și efecte adverse reduse. În paralel, un obiectiv important al cercetării l-a constituit identificarea și determinarea metalelor grele din sursele marine, utilizând atât metode instrumentale bazate pe spectrometria cu plasmă cuplată inductiv (ICP), cât și metode rapide, ultrasensibile și portabile, destinate analizelor efectuate direct la locul prelevării probelor.

Obiectivele propuse au fost atinse prin dezvoltarea unor noi platforme și metode de screening destinate determinării esterului etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA) și esterului etilic al acidului docosahexaenoic (DHA) din ficatul și carnea de pisică de mare, precum și din alge marine. De asemenea, au fost dezvoltate metode pentru determinarea

heparinei din meduze și a acidului hialuronic din ficatul de pisică de mare. Metoda ICP a fost utilizată pentru determinarea metalelor grele din diferite surse marine, iar pentru evaluarea rapidă a ionilor de Cu(II) și Zn(II) au fost dezvoltate benzi senzoriale, capabile să stabilească în timp real gradul de contaminare al probelor și să indice dacă acestea pot fi utilizate pentru extracția compușilor bioactivi de interes.

În cadrul cercetării au fost proiectate și dezvoltate mai multe tipuri de senzori stocastici, caracterizați prin sensibilitate și selectivitate ridicate, care permit efectuarea unor determinări rapide și fiabile direct la locul prelevării probelor.

CAPITOLUL 1
ALGELE MARINE, PISICA DE MARE ȘI MEDUZELE – SURSE MARINE DE COMPUȘI ACTIVI UTILIZAȚI ÎN PRODUSELE FARMACEUTICE ȘI COSMETICE

Sursele marine reprezintă o resursă importantă de compuși bioactivi. Încă din cele mai vechi timpuri, extractele provenite din oceane și mări au fost utilizate pentru tratarea diferitelor afecțiuni ale pielii, dar și pentru alte aplicații terapeutice [1].



Figura 1.1. Alge marine

Dezvoltarea metodelor de analiză a algelor și a probelor de pește, de la metode optice la tehnici spectroscopice de înaltă rezoluție, precum și utilizarea metodelor cromatografice și de extracție cuplate cu detectoare performante, au permis identificarea compușilor de interes farmaceutic și cosmetic prezenți în alge, pisica de mare și meduze.

Dintre toate sursele marine, algele sunt cele mai intens studiate pentru conținutul lor de compuși utilizați în industria farmaceutică și cosmetică. Până în prezent, din alge au fost extrași numeroși antioxidanți naturali utilizați în domeniul farmaceutic, alimentar și cosmetic. Algele constituie surse importante de polifenoli, carotenoizi, vitamine, ficobiliproteine și polizaharide. De asemenea, compușii antiinflamatori identificați în alge au capacitatea de a modula diverși mediatori ai inflamației.

Algele reprezintă, totodată, o sursă importantă de acizi grași polinesaturați cu lanț lung, precum esterul etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA) și esterul etilic al acidului docosahexaenoic (DHA) [5,6]. Beneficiile EPA și DHA asupra sănătății cardiovasculare au

fost raportate încă din anii ’70, iar cercetările ulterioare au demonstrat efectele benefice ale acestora în prevenirea și tratamentul afecțiunilor metabolice, inflamatorii și neuropsihiatrice, datorită proprietăților lor antiinflamatoare și antioxidante.

Pisica de mare reprezintă, de asemenea, o sursă valoroasă de compuși bioactivi utilizați în industria farmaceutică și cosmetică. EPA și DHA au fost identificați atât în carnea, cât și în ficatul pisicii de mare, ceea ce face ca această specie să constituie o sursă importantă pentru extracția acestor acizi grași. În plus, acidul hialuronic, utilizat pe scară largă în produsele cosmetice, este prezent în cantități variabile în țesuturile acestei specii [7].

Meduzele sintetizează trei categorii principale de biomolecule: proteine (de exemplu, colagen), acizi grași și venin brut localizat în celulele urticante (nematocite). Totodată, meduzele reprezintă o sursă importantă de heparină, iar determinarea conținutului acesteia este esențială înaintea procesului de extracție.

Evaluarea gradului de puritate al algelor, pisicii de mare și meduzelor este indispensabilă înaintea determinării compușilor de interes farmaceutic și cosmetic. Sursele marine sunt considerate unele dintre cele mai curate surse naturale de compuși bioactivi, însă determinarea poluanților și a microplasticelor din apa mării prezintă o importanță deosebită înainte de recoltarea probelor marine.

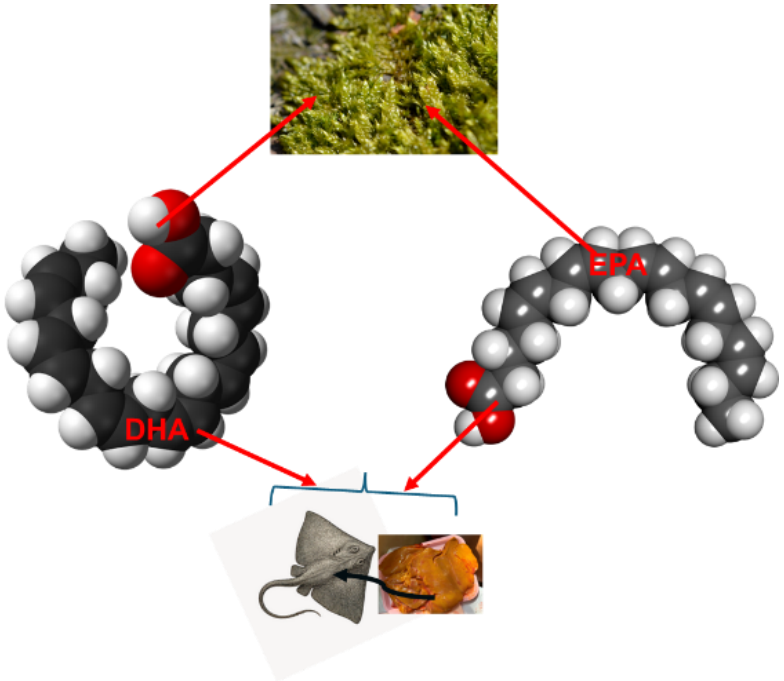


Figura 1.5. Structurile EPA și DHA.

EPA și DHA au fost identificați atât în alge, cât și în ficatul și carnea pisicii de mare, demonstrând că aceste surse marine reprezintă resurse valoroase de compuși bioactivi ce pot fi extrași și utilizați ulterior în formulări farmaceutice. În acest context, este esențială dezvoltarea unor metode capabile să determine fiecare compus în mod individual, precum și a unor metode care să permită determinarea simultană a celor doi acizi grași. De asemenea, acidul hialuronic a fost identificat în ficatul pisicii de mare, iar heparina în meduze.

Mediul marin reprezintă o sursă deosebit de valoroasă de compuși bioactivi, care pot fi extrași și utilizați atât în industria farmaceutică, cât și în cea cosmetică. Acești compuși sunt folosiți în tratamentul afecțiunilor cutanate, al bolilor cardiovasculare și al diabetului zaharat, precum și în formularea unei game variate de produse cosmetice.

CAPITOLUL 2
METODE UTILIZATE PENTRU DETERMINAREA SUBSTANȚELOR DE IMPORTANȚĂ FARMACEUTICĂ ȘI CLINICĂ DIN SURSE MARINE

2.1. Introducere

Determinarea diferitelor substanțe bioactive din surse marine reprezintă o provocare analitică, deoarece matricile biologice sunt foarte complexe, iar concentrațiile compușilor pot varia chiar și în cadrul aceleiași specii analizate. Din acest motiv, metodele utilizate trebuie să prezinte o sensibilitate, selectivitate și fiabilitate ridicate [10]. De asemenea, validarea acestor metode este esențială pentru a asigura că rezultatele obținute reflectă cu acuratețe concentrația reală a compușilor determinați în sursele marine.

Poluarea reprezintă un aspect deosebit de important în cazul Mării Negre, de unde au fost recoltate probele analizate în cadrul prezentei cercetări. Atât algele, cât și speciile de pești au capacitatea de a acumula metale grele din apa mării. În consecință, analiza apei, urmată de determinarea metalelor grele din organismele marine, este indispensabilă pentru evaluarea calității acestora, fiind necesare metode analitice fiabile pentru determinarea acestor contaminanți.

În vederea îmbunătățirii performanțelor analitice și a dezvoltării unor metode mai prietenoase cu mediul pentru determinarea compușilor de interes farmaceutic și cosmetic din surse marine, utilizarea senzorilor electrochimici pentru analize efectuate direct la locul prelevării probelor reprezintă o soluție eficientă [10]. Senzorii electrochimici pot fi integrați în platforme portabile de măsurare sau conectați la echipamente mobile. În funcție de principiul de funcționare, pot fi utilizați senzori potențiometrici, precum electrozii ion-selectivi, senzori amperometrici sau senzori voltametrici. Senzorii ion-selectivi funcționează în domenii de concentrație relativ ridicate, limitele de determinare fiind de ordinul μg/mL [11–13], în timp ce senzorii amperometrici și voltametrici permit determinări la concentrații foarte scăzute, limitele de detecție ajungând până la nivelul pg/mL [14].

Pentru creșterea fiabilității determinării analiților din matrici complexe prin metode electrochimice, a fost dezvoltată o nouă categorie de senzori – senzorii stocastici. Aceștia

permit atât identificarea calitativă, cât și determinarea cantitativă a compușilor de interes, chiar și în matrici biologice complexe [15–28].

2.2. Senzori stocastici

Principiul de funcționare al senzorilor stocastici este inspirat din procesele biologice și se bazează pe conductivitatea canalelor moleculare. Suprafața activă a acestor senzori conține un nanocanal sau un nanopor, prin care moleculele din proba analizată pătrund și sunt transportate în funcție de dimensiunea, geometria și viteza lor de pătrundere în canal.

Timpul necesar unei molecule pentru a pătrunde în nanocanal este denumit t_{off}, reprezentând semnătura caracteristică a analitului. Deoarece valoarea acestui parametru este specifică fiecărei molecule și nu este influențată de compoziția matricei analizate, el permite identificarea calitativă cu un grad ridicat de fiabilitate a compușilor din probe complexe.

Un parametru important al senzorilor stocastici îl constituie domeniul liniar de concentrație. În literatura de specialitate au fost raportate domenii cuprinse între 0,001 fg/mL și 0,001 g/mL, demonstrând capacitatea acestor senzori de a determina atât concentrații extrem de mici, cât și concentrații ridicate. Selectivitatea senzorilor este determinată exclusiv de semnătura caracteristică a analitului și nu de concentrația acestuia.

2.3. Spectroscopia de absorbție atomică

Spectroscopia de absorbție atomică (AAS) reprezintă o tehnică analitică precisă utilizată pentru determinarea concentrației elementelor metalice dintr-o probă prin măsurarea absorbției radiației electromagnetice la lungimi de undă caracteristice fiecărui element. Dezvoltată în anii 1950 de Sir Alan Walsh, metoda se bazează pe principiul conform căruia atomii aflați în stare fundamentală absorb radiație la lungimi de undă specifice tranzițiilor electronice către stări excitate. Fiecare element prezintă un spectru de absorbție caracteristic, ceea ce permite identificarea și cuantificarea selectivă a acestuia.

În cadrul analizei prin AAS, proba este supusă unui proces de atomizare, realizat de regulă într-o flacără sau într-un cuptor de grafit, pentru transformarea compușilor în atomi liberi. O sursă de radiație, reprezentată de obicei de o lampă cu catod cavitar (Hollow Cathode Lamp – HCL), emite radiație la lungimea de undă caracteristică elementului analizat. Radiația traversează proba atomizată, iar detectorul măsoară intensitatea luminii

transmise. Compararea semnalului obținut cu cel al soluțiilor etalon permite determinarea cu precizie a concentrației elementului analizat.

CAPITOLUL 3
DETERMINAREA METALELOR GRELE ÎN PRODUSELE MARINE DESTINATE CONSUMULUI [29]

3.3. Rezultate și discuții

Obiectivul acestui studiu a fost determinarea concentrațiilor a trei metale grele toxice din diferite produse marine destinate consumului uman (midii, creveți, caracatiță și calmar), comercializate pe piața din România, utilizând diferite tehnici de spectroscopie de absorbție atomică (AAS). Mercurul (Hg), datorită caracterului său volatil, a fost determinat prin spectroscopia de absorbție atomică cu vapori reci (CVAAS), cadmiul (Cd) prin spectroscopia de absorbție atomică în flacără (FAAS), iar plumbul (Pb) atât prin FAAS, cât și prin spectroscopia de absorbție atomică cu atomizare în cuptor de grafit (GFAAS), metodă caracterizată printr-o sensibilitate superioară.

Tabelul 3.2 prezintă limitele maxime admise pentru concentrațiile metalelor toxice, conform legislației europene în vigoare, aplicabilă și în România.

Tabelul 3.2. Limitele maxime admise pentru concentrațiile metalelor toxice analizate conform Regulamentului (CE) nr. 1881/2006, modificat prin Regulamentul (CE) nr. 629/2008 [52]

Probă	Concentrația metalelor (mg/kg greutate umedă)		
	Cd	Hg	Pb
Crustacee	0.5	0.5	0.5
Moluște bivalve	1		1.5
Cefalopode	1		1

Tabelele 3.3 și 3.4 prezintă concentrațiile metalelor grele determinate prin AAS în probele de produse marine analizate.

Tabelul 3.3. Concentrațiile de Cd, Hg și Pb determinate în probe de midii comercializate în România (mg/kg greutate umedă)

Nr. probă	Luna	Cd	Hg	Pb
1.	Martie	0.09 ± 0.01	-	<LOQ (0.10)
2.	Iunie	-	-	<LOD (0.03)
3.	Iulie	0.18 ± 0.02	<LOD (0.027)	0.13 ± 0.01
4.	Septembrie	0.10 ± 0.01	<LOD 0.027)	-
5.	Octombrie	0.16 ± 0.02	-	0.13 ± 0.02
6.	Noiembrie	-	-	0.12 ± 0.02
7.	Decembrie	0.1 ± 0.01	-	<LOD (0.03)

Tabelul 3.4. Concentrațiile de Cd, Hg și Pb determinate în produse marine importate (mg/kg greutate umedă)

Nr..	Produs marin / Proveniență	Luna	Cd	Hg	Pb
1.	Caracatiță, India	Aprilie	0.53±0.05	<LOD (0.03)	<LOD (0.01)*
2.	Calmar, China	Februarie	0.2±0.02	<LOD (0.03)	<LOQ (0.02)*
3.	Creveți, India	Februarie	<LOQ (0.04)	<LOD (0.03)	<LOD (0.03)
4.	Creveți, Vietnam	Aprilie	<LOQ (0.04)	<LOD (0.03)	<LOQ (0.01)
5.	Creveți, Vietnam	Iulie	-	-	<LOD(0.03)
6.	Creveți, Olanda	Septembrie	-	-	<LOD (0.03)

* Determinarea Pb a fost realizată prin metoda GFAAS.

LOQ – limita de cuantificare; LOD – limita de detecție.

Compararea valorilor prezentate în Tabelele 3.2–3.4 evidențiază faptul că toate concentrațiile determinate se situează sub limitele maxime admise de legislația europeană, iar

în numeroase cazuri valorile înregistrate au fost inferioare limitelor de cuantificare sau de detecție ale metodelor analitice utilizate. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele raportate în literatura de specialitate [50].

Prin urmare, produsele marine analizate nu prezintă contaminări cu cadmiu, mercur și plumb peste limitele admise, ceea ce indică faptul că acestea pot fi considerate sigure pentru consumul uman.

CAPITOLUL 4
BENZI SENZORIALE PE BAZĂ DE MĂTASE PENTRU DETERMINAREA RAPIDĂ A ZINCULUI ȘI CUPRULUI DIN ALGE MARINE ȘI PISICA DE MARE [53]

4.3. Rezultate și discuții

4.3.1. Caracteristicile de răspuns ale benzilor senzoriale

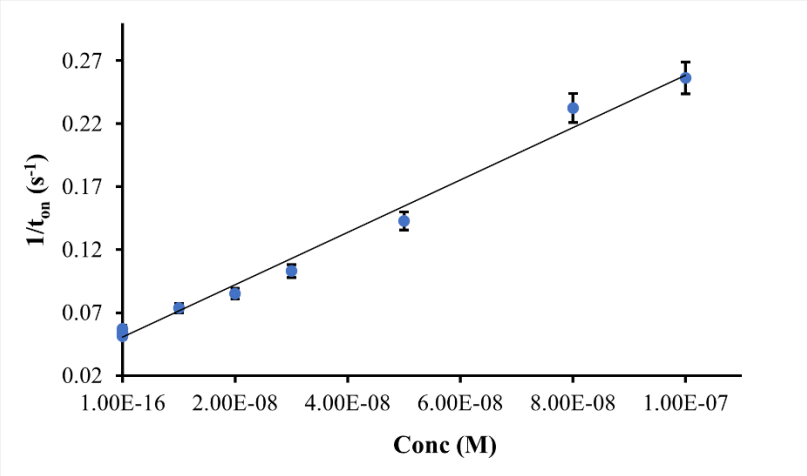
Tabelul 4.1 prezintă caracteristicile de răspuns obținute în modul stocastic pentru determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II).

Tabelul 4.1. Caracteristicile de răspuns ale benzilor senzoriale (N = 10).

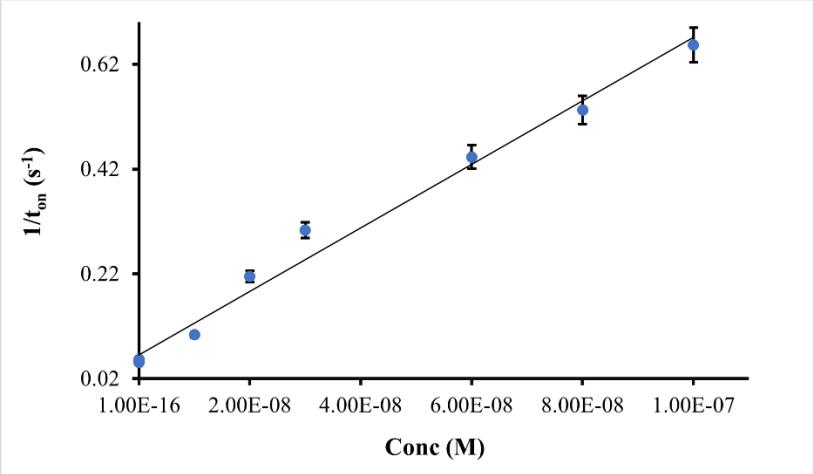
Ion	Semnătură (t_{off}), s	Ecuația de calibrare*	Domeniul liniar de concentrație, mol L^{-1}	Sensibilitate, s^{-1} $mol^{-1}L$	Limita de cuantificare, mol L^{-1}
Cu(II)	1.5±0.1	$1/t_{on} = 0.04 + 6.44\times10^{7}C_{Cu}^{2+}$, r=0.9496	1×10^{-16} - 1×10^{-3}	$6.44(\pm0.12)\times10^{7}$	1×10^{-16}
Zn(II)	1.9±0.1	$1/t_{on} = 0.04 + 1.08\times10^{9}C_{Zn}^{2+}$, r=0.9899	1×10^{-16} - 1×10^{-4}	$1.08(\pm0.10)\times10^{9}$	1×10^{-16}

*<t_{on}>=s; <C>=mol L^{-1}

Semnăturile diferite înregistrate pentru ionii de Cu(II) și Zn(II) au permis determinarea simultană a acestora în probe de alge și pisică de mare. Domeniul liniar larg de concentrație (Figura 4.2) a făcut posibilă determinarea celor doi ioni de la concentrații de ordinul mmol L^{-1} până la concentrații ultramici, facilitând identificarea contaminării imediat după expunerea algelor și a pisicii de mare la metalele respective.



(a)



(b)

Figura 4.2. Curbele de calibrare ale benzii senzoriale stocastice utilizate pentru determinarea (a) Cu(II) și (b) Zn(II).

Concentrațiile ridicate de Cu(II) și Zn(II) în alge și în organismele de tip pisică de mare pot provoca efecte toxice severe, mergând până la moartea acestora, și pot constitui un indicator timpuriu al contaminării mediului marin. Benzile senzoriale și sistemul de măsurare dezvoltate permit nu numai determinarea rapidă a acestor ioni, ci și transmiterea în timp real a rezultatelor către baze de date specializate, facilitând adoptarea rapidă a măsurilor necesare pentru decontaminarea apei.

Pentru determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II) au fost obținute sensibilități ridicate. Limita de detecție experimentală pentru ambii ioni a fost de $2,5 \times 10^{-17}$ mol L^{-1}, aceasta fiind definită ca cea mai mică concentrație a analitului pentru care valoarea 1 t_{off} este mai mică de 0,001 s^{-1}.

Comparativ cu metodele de analiză raportate în literatura de specialitate pentru determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II) [57–63, 69], benzile senzoriale dezvoltate au prezentat limite de cuantificare mai reduse, stabilite conform recomandărilor IUPAC [70], un domeniu liniar de concentrație mai extins și avantajul efectuării analizelor direct la locul prelevării probelor, fără a fi necesară prelucrarea acestora.

Tabelul 4.2. Instrumente și metode utilizate pentru determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II).

Instrument/Metodă	Limita de cuantificare	Referință
Cu(II)		
Kituri biofuncționale portabile / fluorescență	6.13 nmol L^{-1}	[57]
R-ficoeritrină – nanoparticule de Ag / fluorescență	100.00 nmol L^{-1}	[69]
Electrod integrat tip patch modificat cu nanoparticule de aur / electrochimie	700 pmol L^{-1}	[58]
Prezenta lucrare	0.10 fmol L^{-1}	-
Zn(II)		
Senzor electrochimic pe bază de nanotuburi de carbon cu pereți multipli / electrochimie	200.00 fmol L^{-1}	[59]
Spectrometrie de absorbție atomică în flacără	7.64 nmol L^{-1}	[60]
Spectrometrie UV/Vis	2.30 μmol L^{-1}	[61]
Prezenta lucrare	0.10 fmol L^{-1}	-

Tabelul 4.2 evidențiază faptul că limitele de cuantificare obținute pentru determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II) sunt considerabil mai mici decât cele raportate până în prezent în literatura de specialitate.

De asemenea, au fost evaluate reproductibilitatea și stabilitatea în timp ale benzilor senzoriale. În acest scop, au fost fabricate două serii a câte zece benzi senzoriale obținute din aceeași bucată de mătase, conform procedurii descrise anterior, iar acestea au fost calibrate în modul stocastic. Sensibilitățile determinate pentru ionii de Cu(II) și Zn(II) au fost comparate, obținându-se valori ale deviației standard relative de 0,03% pentru Cu(II) și 0,02% pentru

Zn(II), rezultate care demonstrează reproductibilitatea ridicată a procesului de fabricație a benzilor senzoriale.

Stabilitatea în timp a benzilor senzoriale a fost evaluată prin determinarea zilnică, timp de o lună, a sensibilității acestora pentru ionii de Cu(II) și Zn(II). Valorile deviației standard relative au fost de 1,12% pentru Cu(II) și 1,08% pentru Zn(II), confirmând stabilitatea și fiabilitatea metodei pe întreaga perioadă de testare. Determinările efectuate pe benzi diferite au fost utilizate pentru evaluarea reproductibilității procesului de fabricație, iar măsurătorile realizate pe aceeași bandă senzorială pe parcursul unei luni au permis evaluarea stabilității și fiabilității măsurătorilor în timp.

4.3.2. Selectivitatea benzilor senzoriale

Selectivitatea benzilor senzoriale stocastice este determinată de diferențele dintre semnăturile caracteristice ale ionilor de Cu(II) și Zn(II) și cele ale ionilor interferenți, precum Cr^{3+}, Fe^{3+}, Hg_2^{2+}, Pb^{2+} și Cd^{2+}. O diferență minimă de **0,2 s** între semnături asigură selectivitatea metodei. În modul stocastic, semnăturile caracteristice ale analiților sunt independente de concentrația acestora. Prin urmare, selectivitatea metodei nu este influențată de raportul dintre concentrația analitului de interes și cea a eventualilor interferenți. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 4.3.

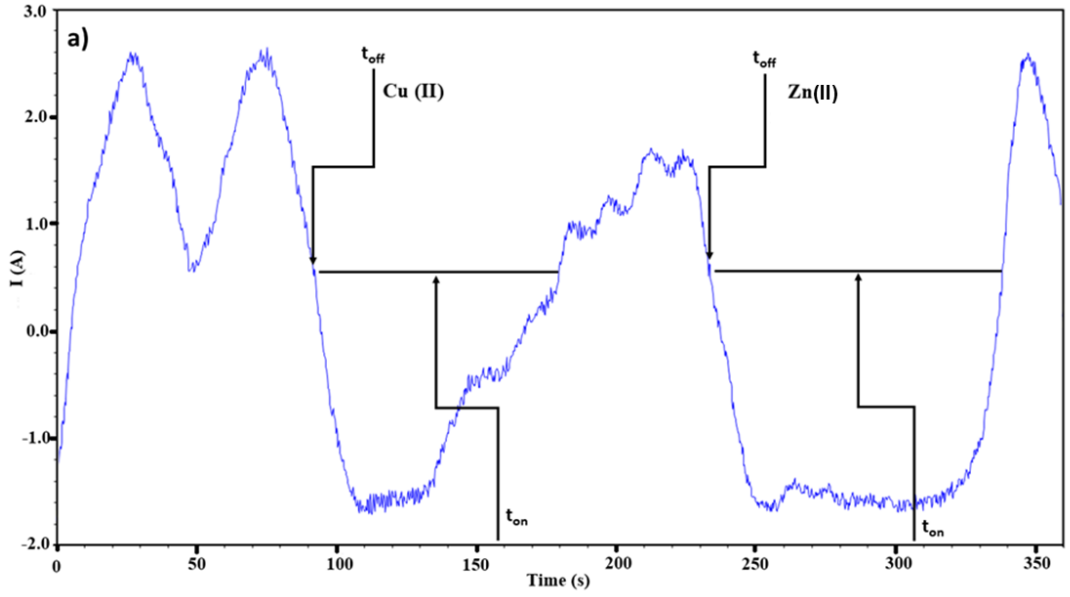
Tabelul 4.3. Selectivitatea benzilor senzoriale (N = 10)

Semnătură, s						
Cu^{2+}	Zn^{2+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Hg_2^{2+}	Pb^{2+}	Cd^{2+}
1.5±0.1	1.9±0.1	1.1±0.1	2.3±0.1	0.4±0.1	3.1±0.1	2.5±0.1

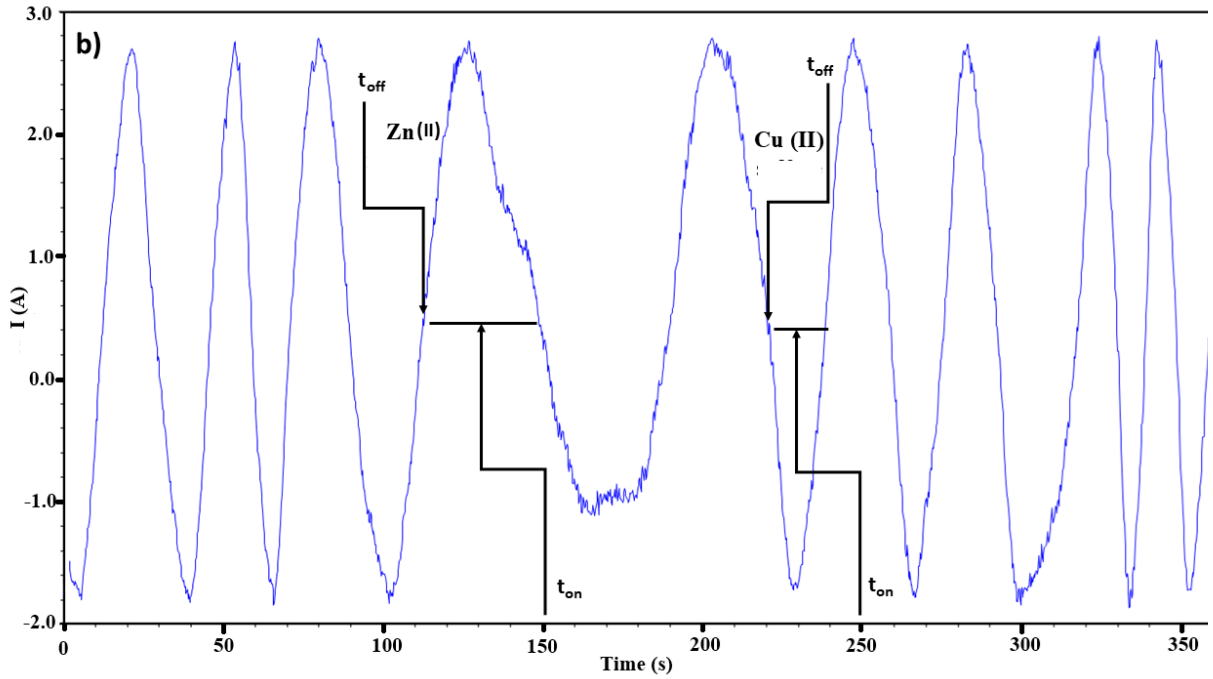
Rezultatele prezentate în Tabelul 4.3 demonstrează că benzile senzoriale dezvoltate sunt selective pentru determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II), în prezența ionilor Cr^{3+}, Fe^{3+}, Hg_2^{2+}, Pb^{2+} și Cd^{2+}, considerați principalii interferenți în analiza algelor verzi, algelor brune și a probelor de pisică de mare.

4.3.3. Validarea metodei pentru determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II) în alge verzi, alge brune și pisica de mare

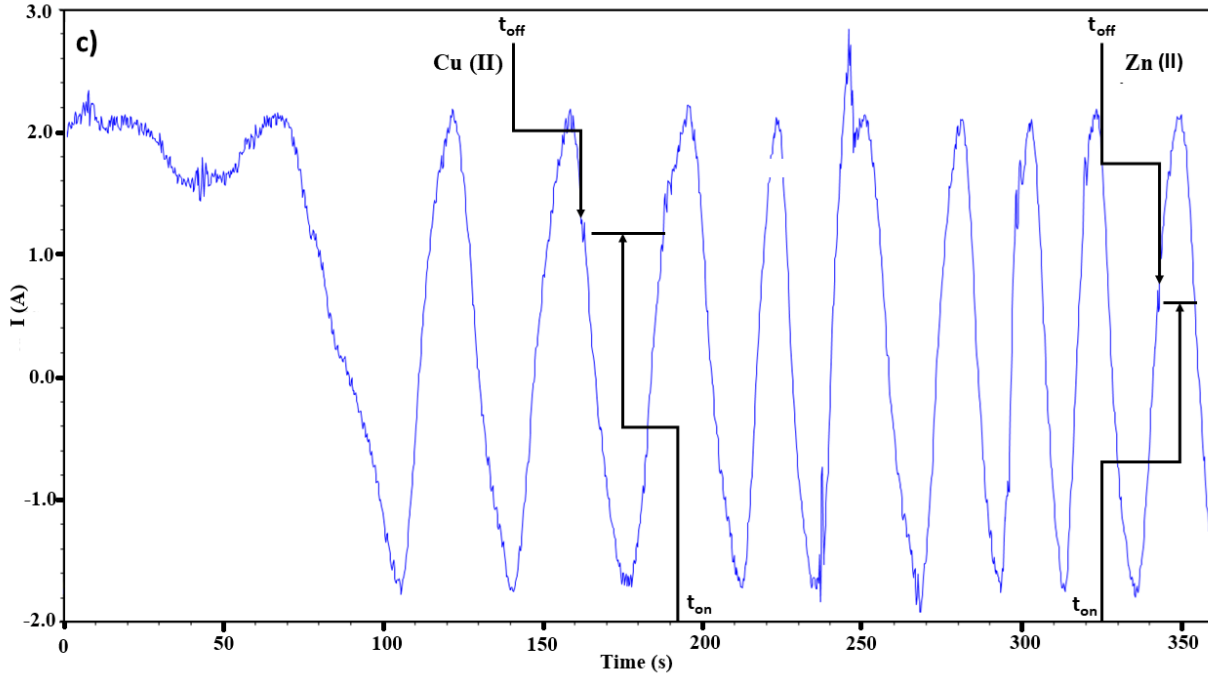
Pentru validarea metodei au fost analizate două tipuri de alge, respectiv alge brune și alge verzi. Determinările au fost efectuate direct pe probe, fără etape suplimentare de prelevare sau prelucrare, prin aplicarea algelor, a cărnii sau a ficatului de pisică de mare pe suprafața benzilor senzoriale. Semnăturile caracteristice ale ionilor de Cu(II) și Zn(II) au fost identificate în diagramele stochastice (Tabelul 4.1), iar ulterior au fost măsurate valorile corespunzătoare ale parametrului t_{on} (Figura 4.3). Concentrațiile ionilor de Cu(II) și Zn(II) au fost calculate conform principiului metodei stochastice și raportate la masa probei analizate.



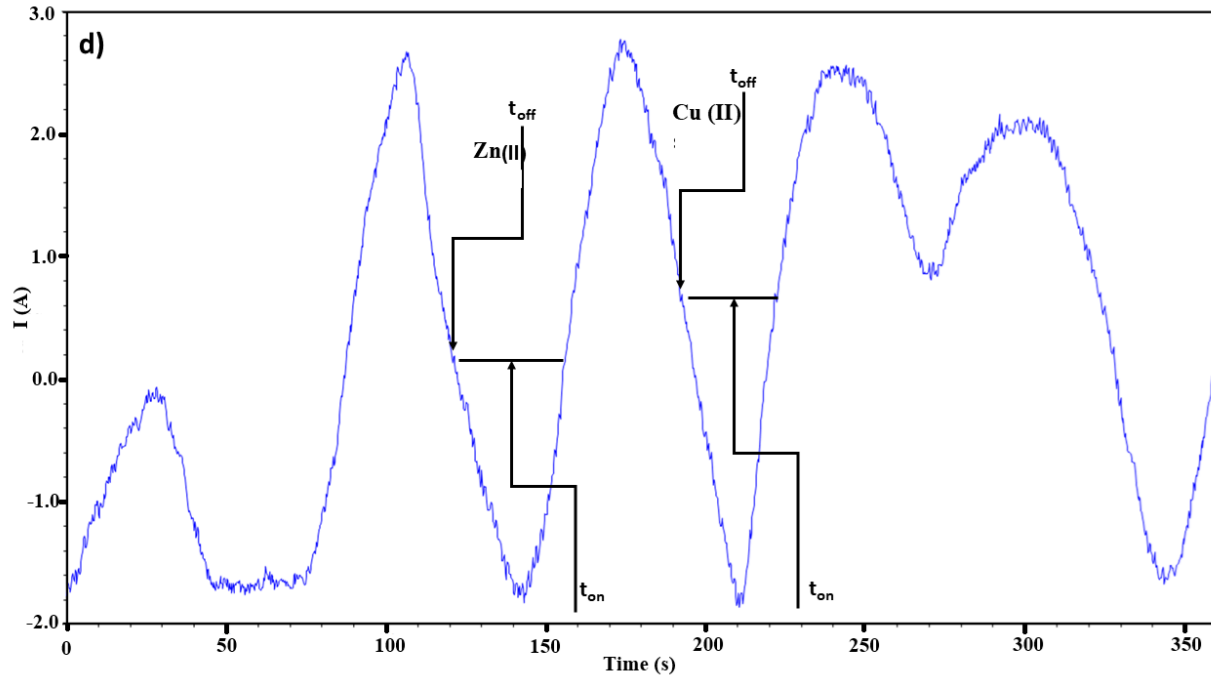
(a)


b)
t_{off}
Zn (II)
t_{on}
t_{off}
Cu (II)
t_{on}
I (A)
Time (s)

(b)


c)
t_{off}
Cu (II)
t_{on}
t_{off}
Zn (II)
t_{on}
I (A)
Time (s)

(c)



(d)

Figura 4.3. Diagrame obținute în urma analizei (a) algelor brune, (b) algelor verzi, (c) cărnii și (d) ficatului de pisică de mare utilizând benzile senzoriale stochastice propuse.

Rezultatele obținute au fost comparate cu cele furnizate de metoda de referință ICP-MS.

Tabelul 4.4. Determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II) în alge și pisica de mare (N = 10)

Probă	ng Cu/g probă		Testul Student	Testul F	Bias (%)
	Miniplatformă inteligentă	ICP MS			
Alge verzi	7.52 ± 0.04	7.60 ± 0.12	1.12	1.20	0.98
Alge brune	128.37 ± 0.05	129.00 ± 0.10	1.65	1.07	0.99
Carne de pisică de mare	39.47± 0.07	39.20± 0.08	1.40	1.25	1.00
Ficat de pisică de mare	22.20± 0.05	22.80± 0.12	1.32	1.09	0.97
	ng Zn/g of probă				

Alge verzi	5.26± 0.03	5.50± 0.04	1.02	2.08	0.96
Alge brune	3.04± 0.03	3.00± 0.05	1.10	1.03	1.01
Carne de pisică de mare	1.45± 0.08	1.38± 0.10	1.25	2.36	1.05
Ficat de pisică de mare	0.42± 0.06	0.50± 0.09	1.00	1.94	0.90

Analiza statistică a demonstrat o concordanță foarte bună între rezultatele obținute cu benzile senzoriale și cele furnizate de metoda ICP-MS. Testul Student pentru eșantioane pereche, efectuat la un nivel de certitudine de 99% (valoare din tablel:4,13), a evidențiat faptul că toate valorile calculate sunt inferioare valorii din tabel, ceea ce confirmă că nu există diferențe semnificative statistic între cele două metode.

De asemenea, compararea preciziei celor două metode a fost realizată utilizând testul F la un nivel de certitudine de 95%. Valorile obținute (Tabelul 4.4) sunt inferioare valorii din tabel (3,18), ceea ce conduce la acceptarea ipotezei nule și demonstrează că diferențele dintre deviațiile standard sunt atribuite exclusiv erorilor aleatorii.

Valorile Bias (%) prezentate în Tabelul 4.4 confirmă acuratețea ridicată a metodei de screening bazate pe benzi senzoriale stocastice pentru determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II) în alge, carne și ficat de pisică de mare.

Ca etapă suplimentară de validare au fost efectuate teste de recuperare prin adaos de cantități cunoscute de Cu(II) și Zn(II) în probele analizate. Cantitățile recuperate au fost comparate cu cele adăugate, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 4.5.

Tabelul 4.5. Recuperarea ionilor de Cu(II) și Zn(II) din alge și pisica de mare (N = 10)

Probă	Cu(II)			Zn(II)		
	Cantitate adăugată (ng)	Valoare medie recuperată (ng)	Recuperare (%)	Cantitate adăugată (ng)	Valoare medie recuperată (ng)	Recuperare (%)
Alge verzi	256.34	256.00	99.87± 0.04	315.25	315.09	99.95± 0.03

Alge brune	234.00	233.86	99.94± 0.03	320.00	319.78	99.93± 0.05
Carne de pisică de mare	235.59	235.38	99.91± 0.08	197.00	196.72	99.86± 0.07
Ficat de pisică de mare	230.00	229.65	99.85± 0.07	230.00	229.61	99.83± 0.05

Valorile ridicate ale recuperării demonstrează că benzile senzoriale pe bază de mătase permit determinarea cu acuratețe și fiabilitate a ionilor de Cu(II) și Zn(II) în probe de alge și pisică de mare.

CAPITOLUL 5
ELECTROANALIZA RAPIDĂ, DIRECT LA LOCUL PRELEVĂRII, A ESTERULUI ETILIC AL ACIDULUI EICOSAPENTAENOIC DIN FICATUL ȘI CARNEA DE PISICĂ DE MARE UTILIZÂND O MINIPLATFORMĂ STOCHASTICĂ BAZATĂ PE UN MICROSENZOR STOCHASTIC 3D [71]

5.3. Rezultate și discuții

5.3.1. Performanțele analitice ale miniplatformei stochastice bazate pe un microsenzor stochastic 3D

Determinarea stocastică presupune desfășurarea procesului analitic în două etape succesive. Prima etapă este reprezentată de recunoașterea moleculară a analitului, în cadrul căreia se înregistrează semnătura caracteristică (t_{off}). Aceasta este urmată de etapa de cuantificare, în care se determină valoarea parametrului t_{on}, utilizată ulterior pentru calculul concentrației esterului etilic al acidului eicosapentaenoic.

Pentru esterul etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA) a fost înregistrată o semnătură caracteristică t_{off} de 0,6 s, care permite identificarea acestuia în diagramele obținute în urma analizei probelor de carne și ficat de pisică de mare.

Ecuația de calibrare a miniplatformei stochastice 3D este:

$1/t_{on} = 0.03(\pm0.01) + 2.55(\pm0.07)\times10^4 C$, where $<t_{on}>$ = s, $<C>$ = g mL^{-1}; coeficientul de corelație fiind 0.9914.

Miniplatforma stochastică a prezentat o sensibilitate de 2,55 (±0,07) × 10^4 s^{-1} g^{-1} mL, pentru un domeniu liniar de concentrație cuprins între 5 × 10^{-15} și 5 × 10^{-6} g mL^{-1}. Limita de cuantificare a metodei a fost de 5 × 10^{-15} g mL^{-1}.

5.3.2. Selectivitatea miniplatformei stocastice 3D

Selectivitatea miniplatformei stocastice 3D a fost verificată în raport cu esterul etilic al acidului docosahexaenoic (DHA), omega-3 și omega-6. Singurul parametru responsabil de selectivitate este semnătura caracteristică a analitului. Pentru compușii investigați au fost obținute următoarele semnături: 1,2 s pentru esterul etilic al acidului docosahexaenoic, 1,8 s pentru omega-3 și 2,3 s pentru omega-6.

5.3.3. Reproductibilitatea și fiabilitatea miniplatformei stocastice bazate pe un microsenzor stocastic 3D

Studiile privind reproductibilitatea și fiabilitatea au fost realizate utilizând 10 miniplatforme fabricate conform procedurii descrise anterior, prin determinarea variației sensibilităților acestora în timp. Fiecare dintre cele 10 miniplatforme a fost evaluată în aceleași condiții, iar sensibilitățile au fost determinate și comparate după imersarea în soluții de ester etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA). Valoarea RSD (%) obținută pentru variația sensibilităților a fost de 1,02%, demonstrând reproductibilitatea procesului de realizare a miniplatformelor.

Fiabilitatea fiecărei miniplatforme a fost evaluată prin păstrarea a 10 miniplatforme timp de o lună. Fiecare miniplatformă a fost scoasă din spațiul de depozitare și imersată în soluții cu concentrații diferite de ester etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA), iar sensibilitățile obținute la fiecare determinare au fost înregistrate și comparate după finalizarea întregii perioade de testare, de 30 de zile. Rezultatele obținute la sfârșitul acestei perioade au evidențiat stabilitatea ridicată în timp a electrozilor, variația sensibilităților fiind mai mică de 0,37%.

5.3.4. Validarea miniplatformei stocastice bazate pe un microsenzor stocastic 3D

Determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic în ficatul și carnea de pisică de mare a fost realizată direct, fără prelucrarea probelor, precum și utilizând procedura

descrisă în secțiunea **Probe**. Rezultatele obținute cu ajutorul miniplatformei stochastice au fost comparate cu cele furnizate de metoda **LC-MS/MS** (Tabelul 5.1).

Tabelul 5.1. Determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic în probe biologice (N = 10)

Probă	**µg ester etilic al acidului eicosapentaenoic/g probă**		**Testul Student**
	Miniplatformă stochastică	LC-MS/MS[6]	
Ficat de pisică de mare	0.59 ± 0.11	0.60 ± 0.18	1.96
Carne de pisică de mare	1.20 ± 0.19	1.18 ± 0.56	1.45

Pentru compararea rezultatelor a fost aplicat testul Student pentru eșantioane pereche, la un nivel de certitudine de 99%, pentru care valoarea din tabel este 4,13. Valorile calculate ale testului t au fost inferioare valorii din tabel, demonstrând că nu există diferențe semnificative între rezultatele obținute cu miniplatforma stocastică dezvoltată și cele furnizate de metoda LC-MS/MS descrisă de Viswanathan și colab. [77].

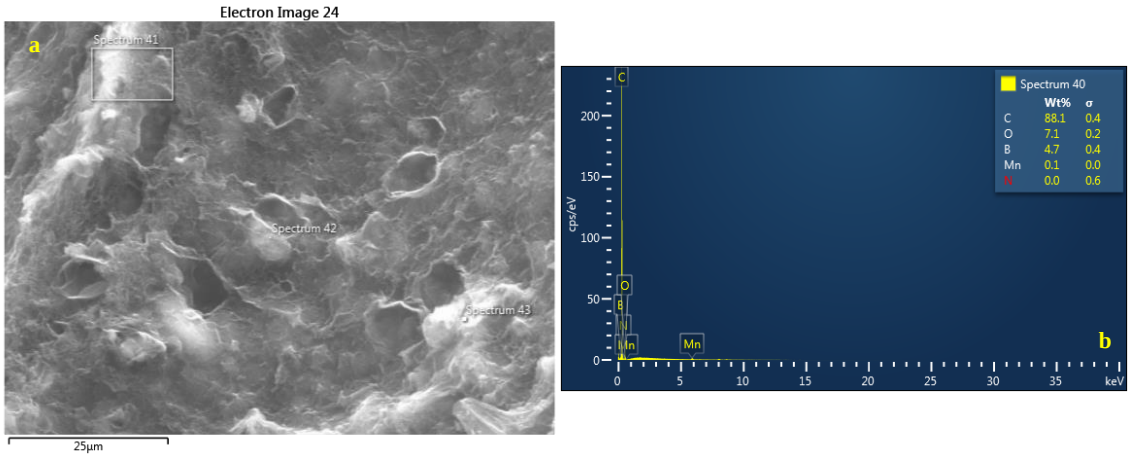
De asemenea, a fost efectuat un test de recuperare pentru determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA) din ficatul și carnea de pisică de mare. În ficat s-a obținut o recuperare medie de 99,95 ± 0,02% (N = 10), iar în carne recuperarea medie a fost de 99,98 ± 0,02% (N = 10). Valorile recuperării au fost superioare celor raportate anterior pentru metoda LC-MS/MS [77], la care limita de determinare este de ordinul ng mL^{-1}, comparativ cu limita de fg mL^{-1} obținută utilizând miniplatforma stocastică propusă.

CAPITOLUL 6
RECUNOAȘTEREA MOLECULARĂ RAPIDĂ A ESTERULUI ETILIC AL ACIDULUI DOCOSAHEXAENOIC DIN FICATUL ȘI CARNEA DE PISICĂ DE MARE UTILIZÂND O MINIPLATFORMĂ BAZATĂ PE UN MICROSENZOR STOCHASTIC 3D [93]

6.3. Rezultate și discuții

6.3.1. Caracterizarea suprafeței active a senzorului

Caracterizarea suprafeței active a senzorului a fost realizată prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) și spectroscopie cu dispersie de raze X (EDS) (Figura 6.3). Figura 6.3.a evidențiază prezența canalelor din membrană, care permit dezvoltarea semnalului stochastic. Figura 6.3.b arată că borul (B) este prezent într-un procent de 4,7%, în timp ce azotul (N) se regăsește într-o proporție foarte redusă (N < 0,1%).



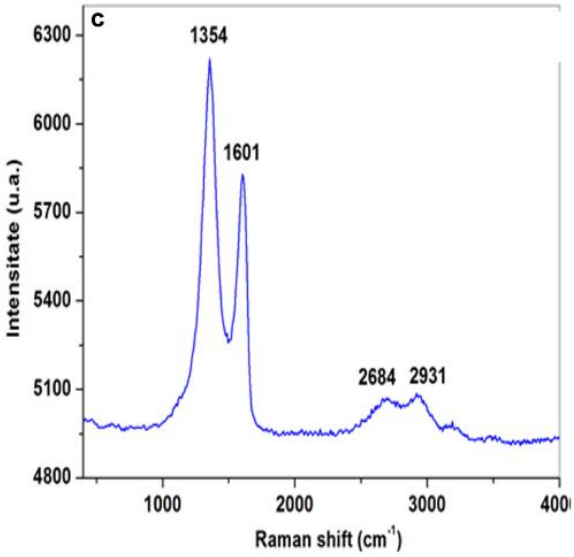


Figura 6.3. (a) Imagine SEM a suprafeței active a senzorului; (b) Spectrul obținut prin spectroscopie cu dispersie de raze X pentru suprafața activă a senzorului; (c) Spectrul Raman.

Conform spectrului Raman, intensitatea benzii D este mai mare decât intensitatea relativă a benzii G, indicând prezența atomilor de B și N, în concordanță cu rezultatele raportate de Kaykilarli și colab. [100].

6.3.2. Parametrii analitici obținuți pentru miniplatforma bazată pe un microsenzor stocastic 3D

Valoarea t_{off} (semnătura) corespunzătoare DHA a fost de 0,7 s, fiind utilizată ulterior pentru determinarea calitativă a acestuia în diagramele obținute în urma analizei probelor de pisică de mare. Ecuația de calibrare obținută prin metoda regresiei liniare a fost:

$1/t_{on} = 0.06(\pm0.02) + 1.65(\pm0.03)\times10^{5}C$, ($\langle t_{on}\rangle$ = s, $\langle C\rangle$ = g mL^{-1}). Coeficientul de corelație a fost 0.9995 (N=10). Curba de calibrare este prezentată în Figura 6.4.

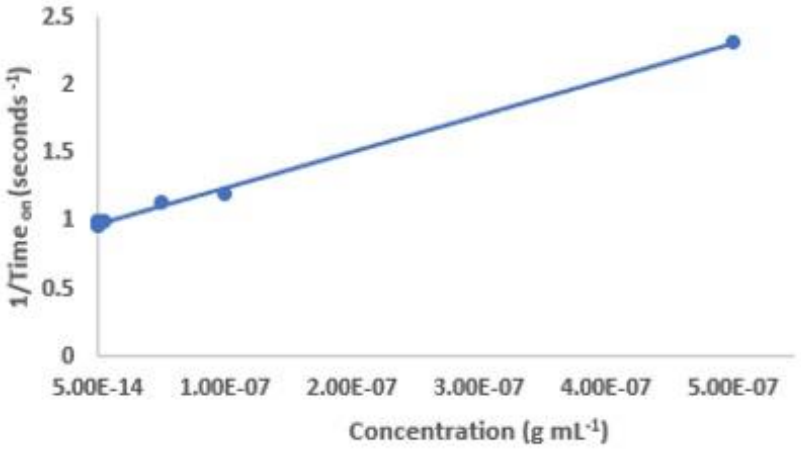


Figura 6.4. Curba de calibrare a microsenzorului stochastic 3D utilizat pentru determinarea esterului etilic al acidului docosahexaenoic.

A fost înregistrată o sensibilitate de 1,65 (±0,03) × 10^5 s^{-1} g^{-1} mL, pentru un domeniu liniar de concentrație cuprins între 5 × 10^{-14} și 5 × 10^{-7} g mL^{-1}. Limita de cuantificare (definită ca cea mai mică concentrație inclusă în domeniul liniar de concentrație, conform noilor recomandări IUPAC [99]) a fost de 5 × 10^{-14} g mL^{-1}. Comparativ cu metoda propusă de Viswanathan și colab. (2017), bazată pe LC-MS/MS (limită de cuantificare 4,06 × 10^{-9} g mL^{-1} și domeniu liniar de concentrație 4,06 × 10^{-9} – 3,28 × 10^{-6} g mL^{-1}), metoda propusă prezintă o limită de cuantificare mai redusă și un domeniu liniar de concentrație mai extins.

6.3.3. Selectivitatea miniplatformei

Testele de selectivitate au fost efectuate în prezența esterului etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA), precum și a acizilor grași omega-3 și omega-6. Parametrul utilizat pentru evaluarea selectivității acestui tip de senzor este reprezentat de semnătura caracteristică a DHA, comparată cu semnăturile potențialilor interferenți. Diferențe de cel puțin 0,2 s între semnătura DHA și semnăturile înregistrate pentru ceilalți compuși demonstrează selectivitatea miniplatformei. Pentru compușii considerați interferenți au fost obținute următoarele semnături: 1,0 s pentru esterul etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA), 3,2 s pentru omega-3 și 3,5 s pentru omega-6, comparativ cu semnătura DHA, de 0,7 s.

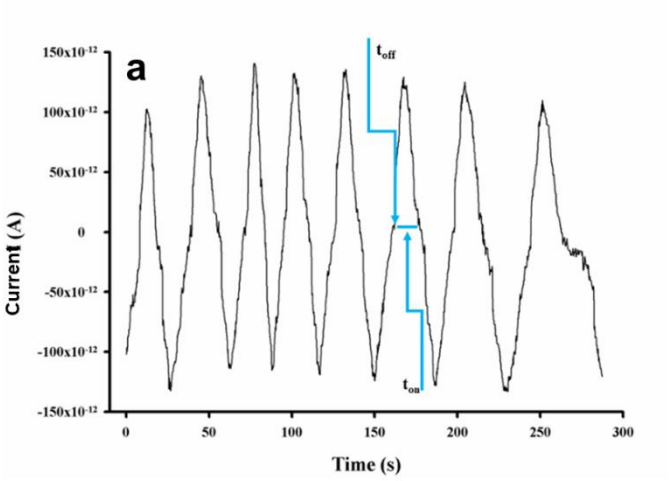
Deoarece toate diferențele au fost mai mari de 0,2 s, se poate concluziona că miniplatforma proiectată este selectivă față de compușii investigați.

6.3.4. Reproductibilitatea și fiabilitatea miniplatformei utilizate pentru determinarea DHA

Au fost realizate 10 miniplatforme conform procedurii descrise anterior și utilizate pentru evaluarea reproductibilită t_{off} și fiabilitatii. Pentru determinarea acestor parametri, sensibilitatea fiecărei miniplatforme a fost măsurată zilnic, pe o perioadă de 30 de zile. Compararea zilnică a sensibilităților determinate pentru fiecare miniplatformă a condus la o deviație standard relativă de 0,04%, confirmând reproductibilitatea procesului de realizare a miniplatformelor. Compararea sensibilităților înregistrate pe parcursul celor 30 de zile a evidențiat o deviație standard relativă de 0,12%, demonstrând fiabilitatii fiecărei miniplatforme pe întreaga perioadă de testare.

6.3.5. Validarea miniplatformei dezvoltate

Înaintea determinării DHA din ficatul și carnea de pisică de mare nu a fost necesară nicio etapă de pregătire a probelor. Determinările au fost efectuate utilizând miniplatforma propusă, iar achiziția și prelucrarea datelor s-au realizat cu ajutorul unui smartphone echipat cu un program capabil să identifice în diagrame semnătura caracteristică a DHA și să citească valoarea corespunzătoare a parametrului t_{on}, care a fost introdusă în ecuația de calibrare pentru determinarea concentrației de DHA (Figura 6.5).



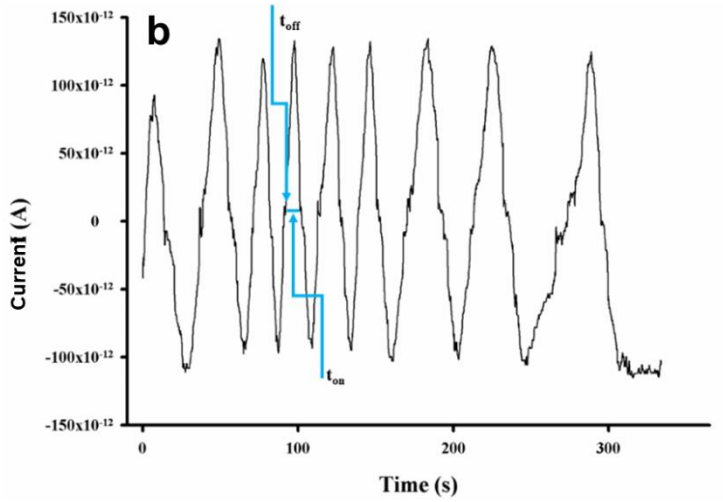


Figura 6.5. Diagrame înregistrate în urma analizei (a) ficatului și (b) cărnii de pisică de mare.

Rezultatele obținute cu ajutorul miniplatformei sunt prezentate în Tabelul 6.1, împreună cu cele obținute prin metoda LC-MS/MS.

Tabelul 6.1. Determinarea esterului etilic al acidului docosahexaenoic în ficatul și carnea de pisică de mare (N = 10)

Probă	µg DHA/g probă		Testul Student
	Miniplatformă stochastică	LC-MS/MS	

		(Viswanathan et al., 2017)	
Ficat de pisică de mare	0.38 ± 0.14	0.35 ± 0.21	2.12
Carne de pisică de mare	0.54 ± 0.19	0.50 ± 0.22	3.15

Pentru compararea rezultatelor a fost aplicat testul Student pentru eșantioane pereche, la un nivel de certitudine de 99% (valoarea tabelată 4,13). Valorile obținute pentru testul t au fost mai mici decât valoarea tabelată, demonstrând că nu există diferențe semnificative între rezultatele obținute cu miniplatforma dezvoltată și cele furnizate de metoda LC-MS/MS descrisă de Viswanathan și colab. [111].

De asemenea, a fost efectuat un test de recuperare pentru determinarea DHA din ficatul și carnea de pisică de mare, prin compararea concentrațiilor măsurate înainte și după adăugarea unei cantități cunoscute de DHA. În ficatul de pisică de mare s-a obținut o recuperare medie de 99,27 ± 0,03% (N = 10), iar în carne recuperarea medie a fost de 99,87 ± 0,02% (N = 10).

Rezultatele testului Student pentru eșantioane pereche, precum și cele ale testului de recuperare, au demonstrat că miniplatforma propusă, bazată pe un microsenzor stochastic 3D, permite determinarea fiabilă a concentrației de DHA în ficatul și carnea de pisică de mare.

CAPITOLUL 7
DETERMINAREA RAPIDĂ, DIRECT LA LOCUL PRELEVĂRII, A CONȚINUTULUI DE ESTER ETILIC AL ACIDULUI EICOSAPENTAENOIC ȘI ESTER ETILIC AL ACIDULUI DOCOSAHEXAENOIC DIN ALGE MARINE UTILIZÂND O MINIPLATFORMĂ INTELIGENTĂ

7.3. Rezultate și discuții

7.3.1. Caracteristicile de răspuns ale miniplatformei inteligente utilizate pentru determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic și a esterului etilic al acidului docosahexaenoic

Tabelul 7.1 prezintă caracteristicile de răspuns obținute în modul stochastic pentru determinarea EPA și DHA.

Tabelul 7.1. Caracteristicile de răspuns ale miniplatformei inteligente (N = 10)

Analit	Semnătură, s	Ecuația de calibrare*	Domeniul liniar de concentrație, g mL^{-1}	Sensibilitate, s^{-1} $g^{-1}mL$	Limita de cuantificare, g mL^{-1}
EPA	1.9±0.1	$1/t_{on} = 0.03 + 1.19\times10^{9}C_{EPA}$, R=0.9954	5×10^{-18} - 5×10^{-1}	$1.19(\pm0.10)\times10^{9}$	5×10^{-18}
DHA	1.6±0.1	$1/t_{on} = 0.04 + 6.58\times10^{7}C_{DHA}$, R=0.9954	5×10^{-18} - 5×10^{-1}	$6.58(\pm0.08)\times10^{7}$	5×10^{-18}

*$<t_{on}>$=s; <C>=g mL^{-1}

Semnăturile diferite obținute pentru EPA și DHA permit determinarea simultană a acestora în alge. Domeniul liniar larg de concentrație face posibilă determinarea EPA și DHA

nu numai în alge, ci și în produse de origine animală și în probe biologice umane. Pentru determinarea ambilor analiți au fost obținute sensibilități ridicate.

Comparativ cu metodele cromatografice raportate anterior [136, 137], miniplatforma inteligentă propusă prezintă limite de cuantificare mai reduse, un domeniu liniar de concentrație mai extins și poate fi utilizată pentru analiza directă a algelor, fără prelucrarea prealabilă a probelor.

Au fost efectuate studii privind reproductibilitatea și stabilitatea în timp a miniplatformei. În acest scop, au fost realizate zece miniplatforme conform procedurii descrise anterior și calibrate în modul stocastic. Sensibilitățile obținute pentru EPA și DHA au fost comparate, valorile deviației standard relative fiind de 0,04% pentru EPA și 0,05% pentru DHA, rezultate care confirmă reproductibilitatea ridicată a miniplatformei dezvoltate. Stabilitatea în timp a fost evaluată prin determinarea zilnică a sensibilității miniplatformei, obținându-se valori ale deviației standard relative de 1,05% pentru EPA și 1,00% pentru DHA, ceea ce demonstrează stabilitatea și fiabilitatea miniplatformei în timp.

7.3.2. Selectivitatea miniplatformei inteligente utilizate pentru determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic și a esterului etilic al acidului docosahexaenoic

Selectivitatea miniplatformei bazate pe microsenzorul stocastic 3D este determinată de diferențele dintre semnăturile caracteristice ale EPA și DHA și cele obținute pentru compușii considerați interferenți, respectiv omega-3 și omega-6. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 7.2.

Tabelul 7.2. Selectivitatea miniplatformei inteligente (N = 10)

Semnătură, s			
EPA	DHA	Omega 3	Omega 6
1.9±0.1	1.6±0.1	3.2±0.1	2.7±0.1

Rezultatele prezentate în Tabelul 7.2 demonstrează că miniplatforma propusă este selectivă față de omega-3 și omega-6, considerați principalii interferenți în determinarea EPA și DHA din algele verzi și brune.

7.3.3. Validarea determinării directe a esterului etilic al acidului eicosapentaenoic și a esterului etilic al acidului docosahexaenoic din alge

Au fost analizate două tipuri de alge: alge brune și alge verzi. Determinările au fost efectuate direct pe probe, fără prelucrare, prin introducerea vârfului senzorului combinat în masa algelor. Semnăturile caracteristice ale EPA și DHA au fost identificate mai întâi în diagrame (Tabelul 7.1), după care au fost măsurate valorile corespunzătoare ale parametrului t_{off} (Figura 7.1). Concentrațiile de EPA și DHA au fost determinate conform metodei stocastice și raportate la masa probelor de alge.

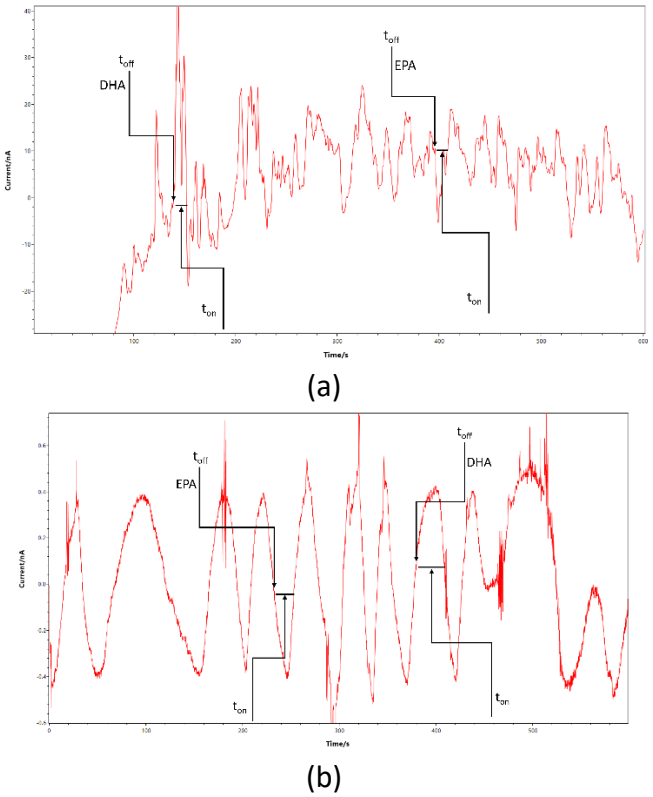


Figura 7.1. Diagrame obținute în urma analizei (a) algelor brune și (b) algelor verzi utilizând miniplatforma inteligentă.

Rezultatele obținute au fost comparate cu cele furnizate de metoda LC-MS/MS raportată anterior [137].

Tabelul 7.3. Determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic și a esterului etilic al acidului docosahexaenoic în alge (N = 10)

Alge	mg EPA/g of algae		Testul Student
	Miniplatformă inteligentă	LC-MS/MS [23]	
Verzi	2.75 ± 0.04	2.20 ± 0.47	2.11
Brune	9.09 ± 0.01	8.76 ± 0.40	1.90
	mg DHA/g alge		
Verzi	15.10± 0.04	14.98± 0.52	1.98
Brune	1.20± 0.05	1.00± 0.21	1.78

Concordanța dintre rezultatele obținute cu miniplatforma inteligentă și cele furnizate de metoda LC-MS/MS a fost evaluată prin testul Student pentru eșantioane pereche, efectuat la un nivel de certitudine de 99% (valoare tabelată 4,13). Valorile testului Student prezentate în Tabelul 7.3 sunt mai mici decât valoarea tabelată, ceea ce demonstrează că nu există diferențe semnificative între rezultatele obținute cu miniplatforma inteligentă și cele furnizate de metoda LC-MS/MS [136].

Ca a doua etapă de validare au fost efectuate teste de recuperare pentru determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic și a esterului etilic al acidului docosahexaenoic din alge. Probele de alge au fost suplimentate cu cantități cunoscute de EPA și DHA, iar cantitățile recuperate au fost comparate cu cele adăugate. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 7.4.

Tabelul 7.4. Recuperarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic și a esterului etilic al acidului docosahexaenoic din alge (N = 10)

Alge	Recuperare %	
	EPA	DHA
Verzi	98.87± 0.03	99.95± 0.02

Brune	98.84± 0.02	99.97± 0.01

Valorile recuperării demonstrează că atât EPA, cât și DHA pot fi determinate cu fiabilitate în alge utilizând miniplatforma inteligentă propusă, bazată pe un microsenzor stocastic 3D.

CAPITOLUL 8
SENZOR STOCASTIC 2D DE UNICĂ FOLOSINȚĂ PENTRU RECUNOAȘTEREA MOLECULARĂ ȘI DETERMINAREA HEPARINEI DIN MEDUZE

8.3. Rezultate și discuții

8.3.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic 2D de unică folosință

Modul stocastic a fost utilizat pentru determinarea parametrilor calitativi și cantitativi ai senzorului stocastic 2D de unică folosință. Tabelul 8.1 prezintă parametrii de răspuns ai senzorului.

Tabelul 8.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic 2D de unică folosință utilizat pentru determinarea heparinei (N = 10)

Semnătură, t_{off} (s)	Equation of calibration[a] r	Sensibilitate (s^{-1} U^{-1} mL)	Limita de cuantificare (U mL^{-1})	Domeniul liniar de concentrație (U mL^{-1})
0.4±0.1	$1/t_{on}$ = 0.30 (±0.08) + 5.33(±0.03) × 10^{-3} $C_{heparin}$ r=0.9998	5.33(±0.08) ×10^{-3}	1.2×10^{-20}	1.2×10^{-20}-1250

[a] $\langle 1/t_{on} \rangle = s^{-1}$; $\langle C \rangle$ = U mL^{-1}

Semnătura caracteristică a heparinei este de 0,4 s, această valoare fiind utilizată în diagrame (Figura 8.1) pentru recunoașterea moleculară a heparinei, în etapa de analiză calitativă.

Domeniul liniar de concentrație este foarte larg, permițând determinarea heparinei nu numai în meduze, ci și în sânge integral sau în alte probe în care concentrația acesteia este foarte redusă. Limita de cuantificare, definită conform celor mai recente recomandări IUPAC

ca fiind cea mai mică concentrație inclusă în domeniul liniar de concentrație, este de 1,2 × 10^{-20} U mL^{-1}. De asemenea, metoda prezintă o selectivitate ridicată.

Tabelul 8.2 prezintă limitele de cuantificare obținute prin diferite metode utilizate pentru determinarea heparinei.

Tabelul 8.2. Determinarea heparinei prin diferite metode de analiză

Metodă	**Limita de cuantificare**	**Referință**
HPLC / detecție prin împrăștiere rezonantă a luminii	0.2 ng mL^{-1}	[149]
HPLC / detecție prin dicroism circular	0.22 mg mL^{-1}	[150]
Senzor bazat pe fluorescență	60 pmol mL^{-1}	[151]
Platformă electrochimică	1.5×10^{-9} mmol mL^{-1}	[154]
Prezenta metodă	1.2×10^{-20}U mL^{-1}	-

Cea mai mică limită de cuantificare a fost obținută utilizând metoda propusă pentru determinarea heparinei (Tabelul 8.2). În plus, metoda propusă este mai rapidă și mai ușor de utilizat pentru determinarea heparinei.

Fiabilitatea senzorului stocastic 2D de unică folosință a fost evaluată prin teste de stabilitate efectuate timp de 20 de zile consecutive. Senzorul a fost calibrat zilnic, iar sensibilitatea a fost calculată prin metoda regresiei liniare. Compararea valorilor sensibilității obținute pe parcursul acestei perioade a evidențiat o abatere față de valoarea medie de 0,03%, demonstrând stabilitatea și fiabilitatea senzorului.

8.3.2. Teste de selectivitate

Testele de selectivitate au constat în determinarea semnăturii caracteristice a heparinei și a semnăturilor compușilor considerați potențiali interferenți, respectiv colagenul, proteina fluorescentă verde și coelenterazina. Diferențe mai mari sau egale cu 0,2 s între semnăturile analiților demonstrează selectivitatea senzorului.

Tabelul 8.3. Rezultatele testelor de selectivitate

Heparină	Colagen	Proteină fluorescentă verde	Coelenterazină
Semnătură, valoare t_{off} (s)			
0.4±0.1	2.6±0.1	3.1±0.1	1.8±0.1

Valorile semnăturilor prezentate în Tabelul 8.3 demonstrează că diferențele dintre semnătura heparinei și cele ale colagenului, proteinei fluorescente verzi și coelenterazinei sunt mai mari de 0,2 s. Prin urmare, senzorul propus este selectiv față de acești compuși.

8.3.3. Validarea metodei de screening pentru recunoașterea moleculară și cuantificarea heparinei din meduze

Analiza meduzelor a fost realizată direct la locul prelevării, pe litoral, utilizând instrumentația portabilă. Prima etapă a interpretării diagramelor a constat în identificarea semnăturii caracteristice a heparinei (Figura 8.1), urmată de determinarea valorii t_{on} dintre două valori succesive ale t_{off} (Figura 8.1). Ulterior, procedura specifică modului stocastic a fost aplicată pentru determinarea concentrației de heparină din meduze.

În cazul metodei HPLC [149], probele de meduze au fost transportate în laborator pentru prelucrare și analiză .

Rezultatele validării metodei de screening sunt prezentate în Tabelul 8.4**.**

Tabelul 8.4. Determinarea heparinei în meduze (N = 10)

Proba nr.	HPLC[7] (U mL^{-1})	Mod stochastic (pg mL^{-1})
1	61.40±0.20	61.32±0.03
2	151.93±0.32	152.18±0.02

Proba 1 reprezintă meduza albastră din Marea Neagră, iar proba 2 reprezintă meduza comună din Marea Neagră.

Pentru validarea metodei au fost aplicate testele Student. Rezultatele obținute prin metoda de screening bazată pe senzorul stocastic 2D au fost comparate cu cele furnizate de metoda HPLC [149]. Testul Student a fost efectuat la un nivel de certitudine de 99%. Valoarea obținută pentru test (2,32) este mai mică decât valoarea tabelată (4,18), ceea ce demonstrează că nu există diferențe semnificative între rezultatele obținute prin metoda HPLC și cele furnizate de metoda stocastică bazată pe senzorul stocastic 2D.

De asemenea, a fost efectuat un test F la un nivel de certitudine de 95%, comparând rezultatele obținute prin metoda HPLC [149] cu cele obținute în modul stocastic. Valoarea calculată a testului F a fost 0,74, fiind mai mică decât valoarea tabelată (3,18), ceea ce conduce la acceptarea ipotezei nule și indică faptul că diferențele dintre deviațiile standard ale probelor sunt datorate erorilor aleatorii.

Au fost efectuate și teste de recuperare prin adăugarea unei cantități cunoscute de heparină în probele de meduze și determinarea acesteia, după analiza probelor cu senzorul stocastic 2D de unică folosință, utilizând modul stocastic. Compararea concentrației determinate cu cea adăugată a evidențiat o recuperare a heparinei de 99,85%, cu o deviație standard relativă de 0,04% (N = 10).

Testele efectuate pentru validarea metodei și a senzorului au demonstrat că metoda stocastică și senzorul stocastic 2D de unică folosință pot fi utilizate cu fiabilitate pentru determinarea in situ a heparinei din meduze.

CAPITOLUL 9
DETERMINAREA ULTRASENSIBILĂ ȘI RAPIDĂ A ACIDULUI HIALURONIC DIN FICATUL DE PISICĂ DE MARE [160]

9.3. Rezultate și discuții

9.3.1. Caracterizarea senzorului stocastic bazat pe GMN/SPGE

9.3.1.1. Caracterizarea electrochimică a senzorului bazat pe GMN/SPGE

Comportamentul electrochimic al electrozilor a fost studiat într-o soluție de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L^{-1}, conținând 0,1 mol L^{-1} KCl, utilizată ca sistem redox. Au fost efectuate experimente de voltametrie ciclică (CV) și spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS) pentru investigarea suprafeței electroactive și a proceselor interfaciale.

Figura 9.2(A) prezintă voltamogramele ciclice înregistrate pentru electrodul SPGE nemodificat și pentru GMN/SPGE, evidențiind vârfuri de curent cu intensitate mai mare în cazul electrodului modificat, ceea ce sugerează îmbunătățirea performanțelor electrochimice după modificarea SPGE cu galactomanan.

Măsurătorile EIS au fost efectuate într-o soluție de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L^{-1}, conținând 0,1 mol L^{-1} KCl, într-un domeniu de frecvență cuprins între 0,1 Hz și 100 kHz. Diagramele Nyquist obținute au evidențiat un semicerc bine definit în regiunea frecvențelor înalte, urmat de o coadă liniară de tip Warburg la frecvențe joase, indicând un proces controlat prin difuzie. Datele experimentale au fost ajustate utilizând circuitul echivalent Randles. Rezistența la transferul de sarcină (Rct) a scăzut de la 238,1 Ω pentru electrodul SPGE nemodificat la 146,2 Ω pentru electrodul GMN/SPGE, așa cum este prezentat în Figura 9.2(B). Acest rezultat indică o cinetică îmbunătățită a transferului de electroni la interfața electrod–electrolit, atribuită stratului de galactomanan.

Suprafața electroactivă a electrodului nemodificat și a celui modificat a fost calculată utilizând ecuația Randles–Sevcik, prin reprezentarea intensității curentului de vârf în funcție de rădăcina pătrată a vitezei de scanare (Figurile 9.2(C) și 9.2(D)). Rezultatele au evidențiat o

creștere a suprafeței electroactive aparente de la 0,099 cm² pentru electrodul SPGE nemodificat la 0,112 cm² pentru electrodul GMN/SPGE, confirmând modificarea cu succes a electrodului SPGE cu galactomanan. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele obținute prin EIS, indicând creșterea suprafeței active și îmbunătățirea cineticii transferului de electroni datorită prezenței stratului de galactomanan.

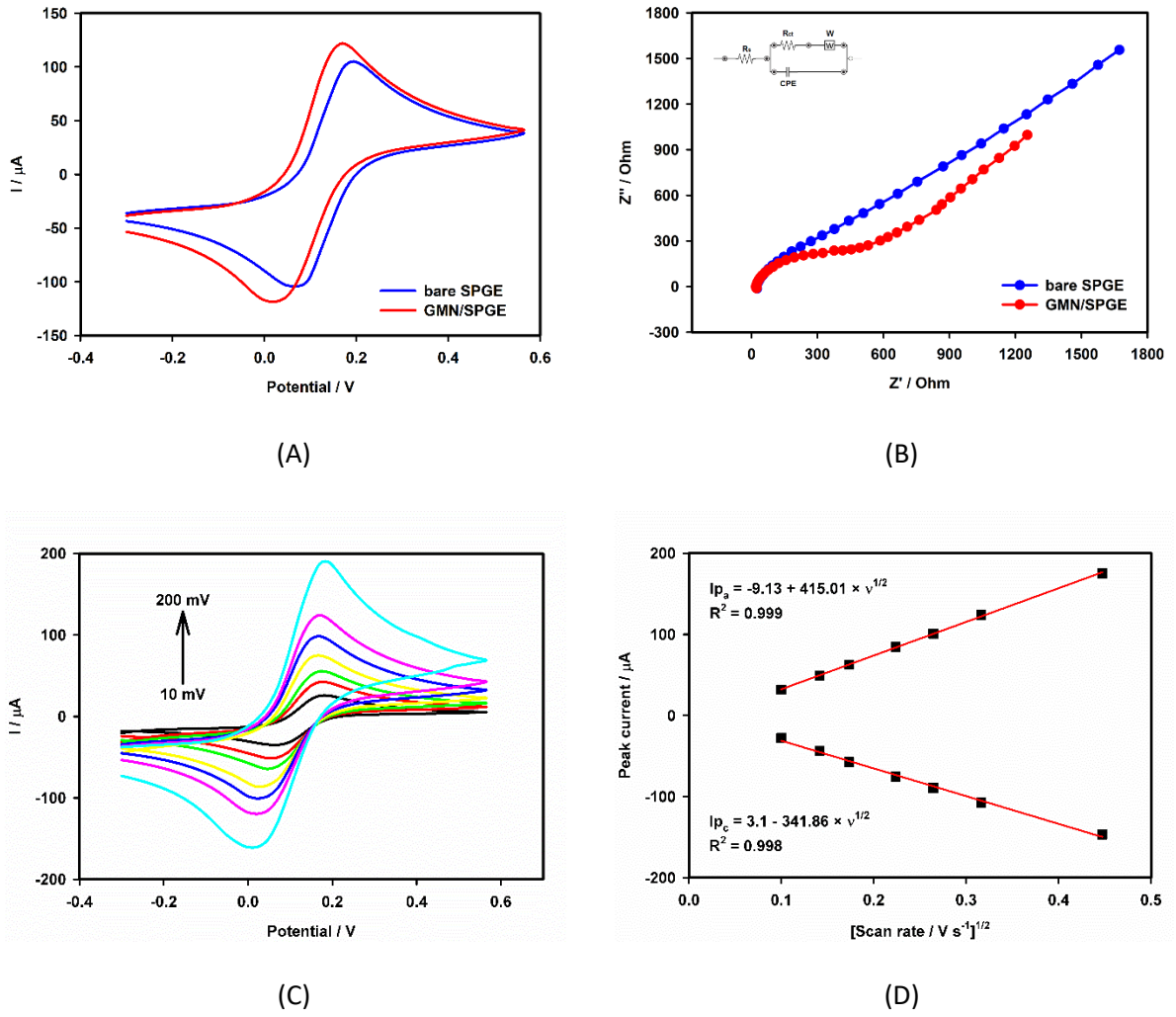


Figura 9.2. (A) Voltamograme ciclice ale electrozilor SPGE nemodificat și GMN/SPGE, înregistrate în intervalul de potențial −0,3 – 0,6 V, la o viteză de scanare de 100 mV s^{-1}; (B) Diagrame Nyquist pentru electrozii SPGE nemodificat și GMN/SPGE, înregistrate în domeniul de frecvență 0,1 Hz – 100 kHz, Eac = 10 mV, Edc = 200 mV (în inserție: circuitul echivalent Randles); (C) Voltamograme ciclice ale electrodului GMN/SPGE înregistrate la viteze de scanare cuprinse între 10 și 200 mV s^{-1}; (D) Intensitatea curentului de vârf în funcție de rădăcina pătrată a vitezei de scanare.

9.3.1.2. Influența volumului soluției de galactomanan asupra performanței electrochimice a senzorului stochastic bazat pe GMN/SPGE

Pentru optimizarea performanței electrochimice a electrodului modificat, volumul soluției de galactomanan utilizate pentru depunere a fost variat sistematic. Electrozii modificați au fost preparați prin depunerea a 2, 4, 6 și 8 µL dintr-o soluție hidroalcoolică de galactomanan cu concentrația de 0,05%. Suprafața electroactivă și proprietățile interfaciale corespunzătoare fiecărui volum de depunere au fost evaluate prin CV și EIS, utilizând o soluție de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L^{-1}, conținând 0,1 mol L^{-1} KCl. Pe baza rezultatelor prezentate în Figura 9.3, volumul de 4 µL a condus la obținerea celei mai mari suprafețe electroactive și a celei mai mici rezistențe la transferul de sarcină (Rct), indicând cele mai bune performanțe electrochimice. Prin urmare, acest volum a fost ales ca optim pentru studiile ulterioare.

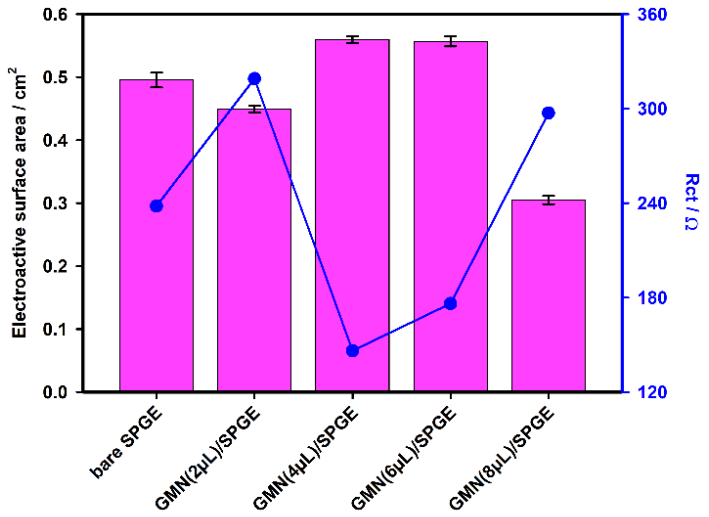


Figura 9.3. Influența volumului de soluție de galactomanan depus asupra suprafeței electroactive și a proprietăților de transfer interfacial al electronilor.

9.3.1.3. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic bazat pe GMN/SPGE

Senzorul stocastic propus a fost evaluat utilizând soluțiile standard preparate conform procedurii descrise anterior. Caracteristicile de răspuns sunt prezentate în Tabelul 9.1.

Tabelul 9.1. Caracteristicile de răspuns ale senzorului stocastic utilizat pentru determinarea acidului hialuronic, folosind soluții standard

Domeniul liniar de concentrație (g mL⁻¹)	**Ecuația de calibrare și r***	**Semnătură toff (s)**	**Sensibilitate (s^{-1} g^{-1} mL)**	**Limita de cuantificare (g mL^{-1})**
3.0×10^{-15}-3.0×10^{-11}	$1/t_{on} = 0.38 + 1.32 \times 10^{7} C_{HA}$; r=0.9995	1.2	1.32×10^{7}	3.0×10^{-15}

* $<t_{on}>$ = s; $<C_{HA}>$ = mg mL^{-1}.

Semnătura caracteristică determinată pentru acidul hialuronic (HA) a fost de 1,2 s. A fost obținută o sensibilitate ridicată, iar domeniul liniar de concentrație este larg. Limita de cuantificare, stabilită conform recomandărilor IUPAC ca fiind cea mai mică concentrație inclusă în domeniul liniar de concentrație, a fost de 3 fg mL^{-1}.

Tabelul 9.2. Alte metode utilizate pentru determinarea acidului hialuronic

Metodă/Instrument	**Limita de cuantificare**	**Referință**
Electroanaliză / Imunosenzor	156 pg mL^{-1}	[169]
Electroanaliză / Senzor bazat pe nanoparticule de aur	115 ng mL^{-1}	[174]
Electroanaliză / Senzor pe bază de hârtie conductoare imprimată molecular	32 ng mL^{-1}	[168]
HPLC-MS/MS	491 pg mL^{-1}	[166]
Metoda stocastică	3.0 fg mL^{-1}	Prezenta lucrare

Utilizarea senzorului stocastic propus pentru determinarea acidului hialuronic a condus la obținerea unei limite de cuantificare mai reduse comparativ cu cele raportate pentru celelalte metode de analiză (Tabelul 9.2).

Fiabilitatea procesului de realizare a senzorului a fost evaluată prin fabricarea a zece senzori stocastici conform procedurii descrise și optimizate anterior. Au fost calculate variațiile sensibilităților obținute, iar valoarea de 0,14% a demonstrat reproductibilitatea procesului de fabricație. Cei zece senzori au fost calibrați zilnic timp de încă 30 de zile, iar sensibilitățile au fost comparate; variația de 0,21% obținută a demonstrat stabilitatea în timp a senzorului stochastic propus.

9.3.2. Selectivitatea senzorului stocastic bazat pe GMN/SPGE

Selectivitatea senzorilor stocastici este determinată de diferențele dintre valorile semnăturilor caracteristice înregistrate pentru diferiți analiți dintr-un amestec. O diferență de 0,2 s indică faptul că senzorul stochastic este selectiv. Ca posibili interferenți au fost evaluați esterul etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA), esterul etilic al acidului docosahexaenoic (DHA), omega-3 și omega-6. Valorile obținute pentru semnăturile acestora au fost: 4,2 s pentru esterul etilic al acidului eicosapentaenoic, 3,8 s pentru esterul etilic al acidului docosahexaenoic, 2,8 s pentru omega-3 și 3,2 s pentru omega-6. Aceste valori sunt mai mari decât semnătura înregistrată pentru acidul hialuronic (1,2 s). Conform acestor rezultate, senzorul stocastic propus este selectiv față de acești compuși.

9.3.3. Validarea senzorului stocastic ultrasensibil bazat pe GMN/SPGE pentru determinarea acidului hialuronic din ficatul de pisică de mare

Toate probele au fost analizate direct la locul prelevării, utilizând senzorul dezvoltat, minipotențiostatul portabil și smartphone-ul, conform configurației prezentate în Figura 9.4.

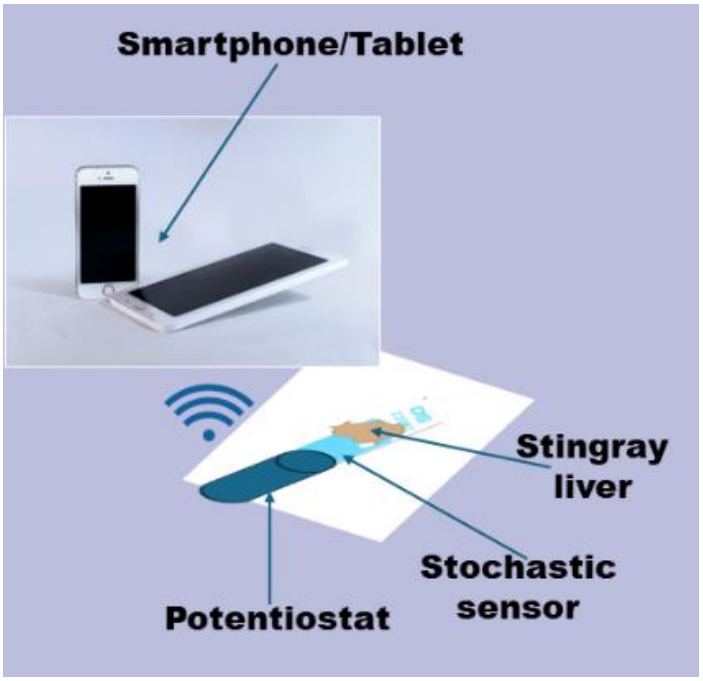


Figura 9.4. Configurația experimentală utilizată pentru determinarea acidului hialuronic din ficatul de pisică de mare.

Acidul hialuronic (HA) a fost identificat în diagrame pe baza valorii semnăturii sale caracteristice (Figura 9.1, Tabelul 9.1), după care valoarea t_{on} a fost citită și introdusă în ecuația de calibrare pentru determinarea concentrației de HA (Figura 9.1).

Rezultatele obținute pentru determinarea HA din ficatul de pisică de mare utilizând senzorul stocastic propus și metoda HPLC/UV sunt prezentate în Tabelul 9.3.

Tabelul 9.3. Determinarea acidului hialuronic din ficatul de pisică de mare utilizând senzorul stocastic și metoda HPLC/UV [165] (N = 10)

Metodă	**Acid hialuronic (ng/g ficat de pisică de mare)**
Senzor stocastic	348.63±0.11
HPLC	346.97±0.41
Testul Student:	2.54

Pentru compararea rezultatelor obținute prin metoda propusă pentru determinarea HA și metoda HPLC descrisă anterior [165] a fost aplicat testul Student pentru eșantioane

pereche, la un nivel de certitudine de 99%, pentru care valoarea teoretică tabelată este 4,032. Valoarea calculată a fost 2,54, mai mică decât valoarea tabelată, demonstrând că nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între rezultatele obținute prin cele două metode.

Pentru validarea senzorului și a metodei propuse a fost efectuat și un test de recuperare. O cantitate cunoscută de acid hialuronic a fost adăugată probei de pisică de mare, pregătită conform procedurii utilizate pentru analiza cromatografică, iar cantitatea determinată a fost comparată cu cea adăugată. S-a obținut o recuperare medie de 97,12%, calculată pe baza a 10 determinări consecutive, cu o deviație standard de 0,09%.

Ambele teste utilizate in vederea validarii senzorului și a metodei au demonstrat că acestea pot fi utilzate cu succes pentru determinarea la fata locului a HA in ficatul de pisica de mare.

CONCLUZII

Concentrațiile de Cd, Hg și Pb au fost determinate prin spectrometrie de absorbție atomică (AAS). Valorile obținute s-au încadrat în limitele maxime admise (0,5–1,5 mg/kg) și sunt similare celor raportate anterior în literatura de specialitate. În urma determinărilor efectuate s-a constatat că produsele marine analizate nu conțin concentrații de metale toxice care să depășească limitele reglementate, ceea ce indică faptul că acestea pot fi consumate fără a prezenta un pericol pentru sănătatea oamenilor și a animalelor. Totuși, având în vedere acumularea treptată a metalelor grele în organism, se recomandă un consum moderat al produselor marine, acestea nefiind indicate ca aliment de bază al dietei. Acest studiu a reprezentat un test important de screening pentru identificarea metalelor grele prezente în apele Mării Negre și, implicit, în pești și alge.

Benzile senzoriale propuse au fost utilizate cu succes pentru determinarea ionilor de Cu(II) și Zn(II) în alge și pisică de mare. Posibilitatea transmiterii rezultatelor către un smartphone, tabletă, laptop sau bază de date permite monitorizarea în timp real a acestor ioni și alertarea imediată a autorităților în cazul contaminării algelor și pisicii de mare cu metale care pot afecta calitatea ecosistemului marin. Metoda de screening este rapidă, ușor de utilizat comparativ cu metode clasice și are costuri reduse. Suportul din mătase poate fi recuperat după efectuarea determinărilor și reutilizat pentru o nouă depunere de cel puțin trei ori, prin tratarea cu plasmă rece a electrodului de lucru, a electrodului auxiliar și a electrodului de referință. Testele efectuate pe benzile reutilizate au evidențiat variații ale sensibilității mai mici de 1,00% față de valorile inițiale. Principalul avantaj al metodei îl reprezintă posibilitatea utilizării acesteia pentru evaluarea in situ a calității algelor și a pisicii de mare.

A fost proiectată o miniplatformă având ca element de detecție un microsenzor stocastic 3D, utilizată pentru determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA) din ficatul și carnea de pisică de mare. Pasta de diamant natural monocristalin a fost modificată cu o soluție de heptakis(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrină, obținându-se pasta modificată utilizată la realizarea microsenzorului stocastic 3D. Au fost obținute un domeniu liniar de concentrație larg ($5,0 \times 10^{-15} – 5,0 \times 10^{-8}$) și o limită de cuantificare foarte redusă ($5,0 \times 10^{-15}$). Miniplatforma propusă a fost utilizată cu succes pentru determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA) din ficatul și carnea de pisică de mare, obținându-se recuperări mai mari de 99,90% și valori ale RSD mai mici de 0,05 (N = 10).

Esterul etilic al acidului docosahexaenoic (DHA) are un rol important în prevenirea afecțiunilor neuropsihiatrice și neurodegenerative. Extracția acestuia din pești, precum pisica de mare, sub formă de ulei poate conduce la obținerea unor formulări farmaceutice importante pentru tratamentul acestor afecțiuni. Din acest motiv, este necesară dezvoltarea unor metode rapide de recunoaștere moleculară, capabile să realizeze atât analiza calitativă, cât și cea cantitativă a esterului etilic al acidului docosahexaenoic (DHA) din carnea și ficatul de pisică de mare. A fost proiectată și validată o miniplatformă care integrează un microsenzor stocastic 3D pentru recunoașterea moleculară a esterului etilic al acidului docosahexaenoic (DHA). Microsenzorul stocastic 3D a fost realizat prin modificarea unei paste de grafenă decorată cu azot și bor (NB-graphene paste) cu o soluție 10^{-3} mol L^{-1} de α-ciclodextrină. Au fost obținute un domeniu liniar de concentrație larg ($5,0 \times 10^{-14} – 5,0 \times 10^{-7}$ g mL^{-1}) și o limită de cuantificare redusă ($5,0 \times 10^{-14}$ g mL^{-1}). Miniplatforma a prezentat recuperări mai mari de 99,20% și valori ale deviației standard relative mai mici de 0,05 (N = 10) pentru determinarea esterului etilic al acidului docosahexaenoic (DHA) din ficatul și carnea de pisică de mare.

Algele marine reprezintă o excelentă sursă vegetală de ester etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA) și ester etilic al acidului docosahexaenoic (DHA). Determinarea rapidă in situ a concentrației acestor compuși în alge este esențială. În acest scop a fost dezvoltată o miniplatformă inteligentă bazată pe un microsenzor stocastic 3D. Microsenzorul a fost realizat prin modificarea unei matrice de grafenă cu 4-terț-butil-calix[4]arenă. Au fost obținute domenii liniare de concentrație foarte largi ($5,0 \times 10^{-18} – 5,0 \times 10^{-1}$ g mL^{-1}) și o limită de cuantificare de $5,0 \times 10^{-18}$ g mL^{-1}. Miniplatforma propusă permite determinarea simultană a esterului etilic al acidului eicosapentaenoic (EPA) și a esterului etilic al acidului docosahexaenoic (DHA), cu recuperări mai mari de 99,80%, precum și transmiterea rezultatelor prin Bluetooth către baze de date specializate.

Meduzele reprezintă o sursă valoroasă de heparină. A fost propus un senzor stocastic 2D de unică folosință pentru determinarea directă a heparinei din meduze. Senzorul poate fi utilizat într-un domeniu liniar de concentrație cuprins între $1,14 \times 10^{-21}$ și 1120 U mL^{-1}, având o sensibilitate de $5,33 \times 10^{-3}$ s^{-1} U^{-1} mL și o limită de cuantificare de $1,14 \times 10^{-21}$ U mL^{-1}. Recuperarea heparinei din meduze a fost de 99,85%, cu o deviație standard relativă de 0,04%. Senzorul și metoda stocastică au fost validate prin comparație cu metoda cromatografiei licida de inalta performanta HPLC. Atât testul Student (efectuat la un nivel de încredere de 99%), cât și testul F (efectuat la un nivel de încredere de 95%) au demonstrat că

metoda bazată pe senzorul stochastic reprezintă o alternativă viabilă la metoda cromatografică.

Ficatul de pisică de mare reprezintă una dintre sursele naturale de acid hialuronic. Determinarea in situ a acestuia este necesară pentru dezvoltarea ulterioară a unor produse farmaceutice și cosmetice care conțin acid hialuronic ca substanță activă. Pentru determinarea rapidă a acidului hialuronic din ficatul de pisică de mare a fost utilizat un senzor stocastic ultrasensibil bazat pe imobilizarea galactomananului pe un electrod de aur serigrafiat. Senzorul a prezentat un domeniu liniar de concentrație cuprins între 3,00 fg mL^{-1} și 30,00 pg mL^{-1}, precum și o sensibilitate ridicată de $1,32 \times 10^{7}$ s^{-1} g^{-1} mL. Pentru determinarea acidului hialuronic din ficatul de pisică de mare au fost obținute valori ale recuperării mai mari de 97,00%. Validarea senzorului stocastic și a metodei de screening a fost realizată prin comparație cu metoda HPLC. Determinarea in situ a acidului hialuronic din ficatul de pisică de mare cu ajutorul senzorului stocastic ultrasensibil poate sprijini industria farmaceutică și cosmetică în evaluarea posibilității obținerii acidului hialuronic prin extracție din această sursă naturală.

Contribuții originale

Prima noutate a cercetării este reprezentată de utilizarea benzilor senzoriale pe bază de mătase pentru determinarea rapidă, **in situ**, a ionilor de zinc și cupru din alge marine și pisică de mare. Benzile senzoriale sunt senzori stocastici combinați, conectați la un instrument portabil, capabil să transmită în timp real rezultatele către telefon, tabletă, laptop sau o bază de date specializată; acestea au fost dezvoltate pentru prima dată în laboratorul nostru, ca o nouă subclasă a senzorilor stocastici. De asemenea, configurația senzorului stocastic (electrodul de lucru al benzii senzoriale) este una nouă: electrodul de lucru este realizat dintr-un nanostrat subțire de nanografenă modificată cu maltodextrină având un echivalent de dextroză cuprins între 4 și 7. Grafena a fost aleasă ca matrice deoarece permite menținerea formei inițiale a porului, iar utilizarea nanografenei a condus la creșterea suprafeței active a senzorului și, implicit, la creșterea sensibilității benzii senzoriale. Maltodextrina cu cel mai mic echivalent de dextroză a fost aleasă datorită structurii sale, care asigură formarea porului necesar detecției stocastice. Utilizarea benzilor senzoriale pentru determinarea simultană, **in situ**, în timp real, a ionilor de Cu(II) și Zn(II) direct din alge și pisică de mare, fără prelucrarea probelor, reprezintă o abordare nouă a acestui tip de analiză, importantă pentru monitorizarea calității mediului.

O altă contribuție originală este dezvoltarea unei miniplatforme bazate pe un microsenzor stocastic 3D pentru determinarea esterului etilic al acidului eicosapentaenoic din ficatul și carnea de pisică de mare. Avantajele utilizării senzorilor stocastici pentru acest tip de analiză sunt reprezentate de faptul că probele nu necesită prelucrare înainte de analiză, analiza calitativă a esterului etilic al acidului eicosapentaenoic este realizată rapid și fiabil înaintea analizei cantitative, iar matricea probei nu influențează determinarea acestui compus. Integrarea senzorului propus în miniplatformă permite determinarea automată și transmiterea rezultatelor către o bază de date sau direct către utilizator.

A fost dezvoltată o nouă miniplatformă pentru determinarea esterului etilic al acidului docosahexaenoic din ficatul și carnea de pisică de mare. Pasta de grafenă decorată cu azot și bor (**NB-graphene paste**) a fost modificată cu o soluție de **α-ciclodextrină** de **10^{-3} mol L^{-1}**. Avantajul utilizării grafenei decorate cu azot și bor constă în menținerea cavității interne a α-ciclodextrinei în forma sa inițială, în timp ce atomii de azot și bor îmbunătățesc conductivitatea grafenei, prin crearea unor goluri în structura acesteia și transformarea ei într-

un semiconductor eficient, favorizând determinarea esterului etilic al acidului docosahexaenoic la concentrații foarte mici și cu sensibilitate ridicată.

Având în vedere importanța determinării **in situ** a conținutului de EPA și DHA din algele marine, a fost dezvoltată o metodă rapidă și fiabilă pentru determinarea simultană a acestor compuși. Noutatea constă în realizarea unei miniplatforme inteligente bazate pe un microsenzor stocastic 3D pentru determinarea rapidă, **in situ**, a EPA și DHA din alge. Configurația microsenzorului stocastic 3D este una originală, fiind bazată pe modificarea unei matrice de oxid de grafenă redus cu **4-terț-butil-calix[4]arenă**.

O altă contribuție originală este utilizarea unui senzor stochastic 2D de carbon, de unică folosință, prevăzut cu un canal de detecție special proiectat pentru determinarea **in situ** a heparinei din meduze. Avantajele utilizării senzorului stocastic, comparativ cu alte tipuri de senzori și cu metodele cromatografice, constau în faptul că nu este necesară pregătirea probelor înainte de analiză, determinările sunt realizate în mai puțin de **6 minute**, există posibilitatea efectuării analizelor direct la locul prelevării și transmiterii rezultatelor în timp real către o bază de date specializată, răspunsul senzorului nu este influențat de natura matricei, iar analiza calitativă și cantitativă poate fi realizată cu fiabilitate.

Noutatea determinării acidului hialuronic constă în utilizarea **galactomananului** ca modificator pentru realizarea unui electrod de aur serigrafiat. De asemenea, un element de originalitate îl reprezintă determinarea **in situ** a acidului hialuronic din ficatul de pisică de mare, fără prelucrarea prealabilă a probei.

Perspective de cercetare

Miniplatforma va fi validată în condiții reale, în Marea Neagră, în vederea creșterii nivelului de maturitate tehnologică (**TRL**) până la nivelul **8**. De asemenea, vor fi investigate un număr mai mare de metale grele și pesticide, pentru a evalua gradul de contaminare al apei, precum și al peștilor și algelor. Totodată, utilizând miniplatformele inteligente propuse, vor fi determinate și alte substanțe bioactive de interes farmaceutic și cosmetic.

Bibliografie

[1] C.E. Umeyor, P. Kolekar, P. Kumbhar, P. Negi, K. Kolekar, J. Disouza, V.B. Patravale, Chapter 14 - Marine-origin natural products to promote wound healing and regeneration, Eds: H. Sarma, S. Joshi, M.S. Kumar, A. Daverey, S. Joshi, H.S. Buttar, A. Vaksmaa, In Advances in Biotechnology and Bioengineering, Marine Biotechnology for Healthcare, Academic Press, 2026, 279-302.

[2] M. Moussa, S. Mirata, L. Moni, V. Asnaghi, M. Alloisio, S. Pettineo, M. Castellano, S. Vicini, M. Chiantore, S. Scarfì, Structural characterization and anti-Inflammatory Properties of an Alginate Extracted from the Brown Seaweed Ericaria amentacea, Mar. Drugs 2026, 24, 41

[3] A. Tong, D. Wang, N. Jia, Y. Zheng, Y. Qiu, W. Chen, H.R. El-Seed, C. Zhao, Algal active ingredients and their involvement in managing diabetic mellitus, Biology 2024, 13, 904.

[4] L. Keerthirathna, S. Sigera, M. Rathnayake, A. Senarathne, H. Udeshika, C. Kodikara, N.M. Sirimuthu, K.W. Samarakoon, D.C. Peiris, Chnoospora minima polysaccharide-mediated green synthesis of silver nanoparticles: potent anticancer and antimicrobial activities, Biology 2025, 14, 904.

[5] E. Peltoma, M.D. Johnson, S.J. Taipale, Marine cryptophytes are great sources of EPA and DHA, Mar. Drugs 2018, 16, 3.

[6] A.Mühlroth, K. Li, G. Røkke, P. Winge, Y. Olsen, M.F. Hohmann-Marriott, O. Vadstein, A.M. Bones, Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of chromista, Mar. Drugs 2013, 11, 4662-4697.

[7] Y. Li, J. Liao, S. Li, Z. Xiao, Z. Gao, J. Fan, Y. Wang, T. Wang, Q Zhang, C. Zhang, Z. Lin, Y. Guo, Marine materials: New hope for biomedical applications, Cell Biomat., 2026, 100370.

[8] I.M. Duarte, S.C. Marques, S.M. Leandro, R. Calado, An overview of jellyfish acquaculture: for food, feed, pharma, and fun. Rev. Aquacult., 14, 265-287, 2022.

[9] R.N. Kinawy, Mapping the global landscape of algae-based food research: a bibliometric analysis of trends, collaborations, and future directions, MethodsX, 16, 103923, 2026.

[10] Smith J.A; Polk B.J.; Kikas, T.; Levermore D.M.; Chemical sensors for the real world. ChemFETs. 2000.

[11] Wróblewski W.; Dawgul M.; Torbicz W.; Brzózka Z. Anion-selective CHEMFETs, Department of Analytical Chemistry, Warsaw University of Technology, Warsaw, 2000.

Anexa 1. Participări la conferințe naționale și internaționale

1. **Drăgoi Brînza Andreea,** Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Damaris Cristina Gheorghe, Gabriela Stanciu, Validation of a new method for the assay of docosahexaenoic acid ethyl ester in the liver of stingray, poster, p. 49, Eurachem Workshop Complex Matrices: Applications, Laboratory standards and Accreditation, May 26 – 27, 2025, Library Building of National University of Science and Technology POLITEHNICA Bucharest, Romania

2. **Drăgoi Brînza Andreea,** Stefan-van Staden Raluca-Ioana, Gheorghe Damaris-Cristina, Stanciu Gabriela, Poster: "Determination of eicosapentanoic acid ethyl ester in the liver of stingray – poster PN7", International Conference ″CHIMIA″ 2024, NOMARES Workshop A Constanța, 30 May 2024-01 June 2024, ISSN 2360-3941, p. 138

3. **Drăgoi Brînza Andreea**, Stefan van Staden Raluca-Ioana, Gheorghe Damaris-Cristina, Stanciu Gabriela, Determination of docosahexaenoic acid ethyl ester in the liver of stingray, S1 –P– ID 248, The 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE), 4 - 7 September 2024, Mamaia - Constanța, Romania.

Anexa 2. Lucrări publicate în reviste ISI

Fast on-site electroanalysis of eicosapentaenoic acid ethyl ester in the liver and meat of stingray using a stochastic miniplatform based on a 3D stochastic microsensor RI Stefan-van Staden, **A Drăgoi Brînza**, DC Gheorghe, G Stanciu **J Electrochem Soc**, 171, 0875120, 2024 **Q2 IF=3.3**

Fast molecular recognition of docosahexaenoic acid ethyl ester in the liver and meat of stingray using a miniplatform based on a 3D stochastic microsensor RI Stefan-van Staden, **A Drăgoi Brînza**, DC Gheorghe, G Stanciu **Anal.Lett.**, 58(15), 2569-2577, 2025 **Q2 IF=1.8**

Determination of heavy metals in seafood **A. Drăgoi-Brînza**, RI Stefan-van Staden, G Stanciu, C Cioates Negut **UPB Sci Bull**, 87(2), 15-22, 2025 **Q4, FI=0.147**

2D Disposable stochastic sensor for determination of heparin from jellyfish **A. Drăgoi Brînza**, R.I. Stefan-van Staden, D.C. Gheorghe **Submitted to journal**

Intelligent miniplatform based on 3D stochastic microsensor and its application for fast on-site molecular recognition of eicosapentaenoic acid ethyl ester and of docosahexaenoic acid ethyl ester in marine algae **A Drăgoi Brînza**, RI Stefan-van Staden, RM Ilie-Mihai, G Stanciu **Submitted to journal**

Silk-based sensing strips for fast assessment of Zinc and Copper in marine algae and stingray **A Drăgoi Brînza**, RI Stefan-van Staden, RM Ilie-Mihai **J Electrochem Soc.**, 173(5), 057501, 2026 **Q2 IF=3.3**

Ultrasensitive and fast on-site determination of hyaluronic acid in the liver of stingray **A Drăgoi Brînza**, RI Stefan-van Staden, BM Tuchiu-Stanca, IR Comnea-Stancu **J Electrochem Soc**, 173(13), 137501, 2026. **Q2 IF=3.3**