REZUMAT

Teza de abilitare cu titlul “Studii pentru ameliorarea performantelor analitice ale (bio)senzorilor pentru screenigul probelor cu matrice complexa ” reprezintă o sinteză a activității științifice pe care am desfășurat-o după ce am obținut titlul de Doctor în anul 2005.

Activitatea de cercetare științifică ce face obiectul acestei teze de abilitare a urmărit dezvoltarea unor metode de analiză rapide și ușor de utilizat care să poate fi aplicate pentru probe cu compoziție complexă necesitând doar prelucrări minime. Senzorii si biosenzorii dezvoltați au fost testați în aplicații din domeniul protecției mediului sau controlul calității alimentelor, iar cercetările au fost extinse și către alte aplicații cum ar fi obținerea unor suprafețe care să prezinte o buna rezistență la absorbție nespecifică sau o coroziune în medii agresive.

Teza de abilitare este structurată în două părți, având la bază 20 de articole științifice personale publicate în reviste indexate ISI și 1 brevet național, toate rezultatele fiind obținute în mod indepenent după susținerea doctoratului. Secțiunea I detaliază principalele realizări profesionale și științifice ale candidatului din domeniul chimiei analitice si electrochimiei, Secțiunea II prezintă planurile de dezvoltare științifică și profesională, în timp ce Secțiunea III include o listă de referințe utilizate în această teză de abilitare.

În prima parte a Secțiunii I sunt prezentate evoluția profesională după acordarea titlului de doctor și principale realizări științifice din carieră. In cursul carieri am publicat 40 de articole originale și 3 articole review în reviste cotate ISI, am peste 50 de prezentări la conferințe științifice internaționale și am peste 750 de citări corespunzând la un indice Hirsch 17 (fără autocitări). Am fost director sau responsabil pentru 9 proiecte de cercetare.

În a doua parte a Secțiunii I sunt prezentate o parte din rezultatele științifice obținute după teza de doctorat și este împărțită în două subcapitole: I.3. Dezvoltarea de metode bioanalitice performante pentru screeningul probelor complexe și I.4. Funcționalizarea suprafeței electrozilor cu straturi organice pentru ameliorarea performantelor analitice. Biosenzorii enzimatici dezvoltați cu performante îmbunătățite s-au bazat atât pe utilizarea caracteristicilor particulare a catalizei enzimatice pentru substrat cât și pe utilizarea inhibiției enzimatice pentru realizarea de măsurători cu selectivitate ridicată. Funcționalizarea suprafețelor conductive a urmărit trei direcții și anume dezvoltarea de electrozi modificați cu grupări funcționale pentru detecția metalelor grele, dezvoltarea de suprafețe funcționalitate cu proprietăți antiadsorptive pentru utilizarea senzorilor in probe cu compoziție complexă și obținerea unor straturi organice electrodepuse care prezintă proprietăți anticorozive aceasta fiind o extindere a domeniului de cercetare și aplicarea cunoștințelor din electrochimie către alte aplicații practice.

Biosenzorii dezvoltați pentru analiza selectiva a substratului au fost aplicați pentru controlul calității alimentelor. Un prim sistem a vizat analiza amestecurilor metanol-etanol din băuturi falsificate utilizând biosenzori bazați pe alcool dehidrogenază și alcool oxidază și se bazează pe diferențele între compușii catalizați de fiecare enzimă in parte. Astfel, alcool dehidrogenaza oxidează doar etanolul nu și metanolul, în timp ce alcool oxidaza recunoaște atât

metanolul cât și etanolul ceea ce permite identificarea metanolului prin diferența între semnalele a doi biosenzori. Detecția aspartamului a fost realizată cu un biosenzor enzimatic bazat pe carboxietil esterază și alcool oxidază pentru hidroliza analitului cu producere de metanol care este cuantificat electrochimic. Acest sistem a fost extins la estimarea cantității totale de aromatizanți esterici din alimente bazat pe hidroliza acestora și producerea de alcooli. Determinarea acrilamidei din alimente se bazează pe utilizarea mecanismului natural de detoxifiere catalizat de glutation-S-transferază: reacția dintre glutation și acrilamidă ceea ce determină scăderea concentrației de glutation in funcție de cantitatea de acrilamidă din probă. Determinarea cu interferențe reduse a capacității antioxidante a fost realizată folosind biosenzori cu xantin oxidaza și măsurători amperometrice în reducere. Acest sistem este relevant întrucât reproduce *in vitro* procese biologice complexe în care este implicat radicalul superoxid ($O_2^{\bullet -}$) care este produs folosind xantin oxidaza.

Utilizarea inhibiției enzimatice pentru realizarea de biosenzori cu selectivitate ridicată se bazează pe caracteristicile inhibiției enzimatice (K_I, tip de inhibiție, reversibilitate) și parametrici cinetici ai catalizei substratului care sunt dependente de diverși factori cum ar fi: organismul sursă al enzimei, variații în structura enzimei, modul de măsură (substratul este prezent concomitent cu inhibitorul sau nu), prezenta simultană a mai multor inhibitori, timpul de contact între inhibitor și enzime, etc. Detecția L-cisteinei bazată pe biosenzori amperometrici cu tirozinază fără interferențe din partea compușilor tiolici a fost realizată prin utilizarea a două fenomene care au loc în paralel: inhibarea tirozinazei de către toți tioli cu excepția L-Cys și consumul de chinonă de către tiolii inclusiv L-Cys, ambele procese ducând la o scădere a cantității de chinonă măsurată. Detectarea β-carbolinelor din alimene afumate a fost realizata cu biosenzori bazți pe inhibarea monoamin-oxidazelor A și B care permit atât o estimare globală a cantității de carboline prin inibiția competitivă și reversibilă a MAO-A, cât și analiza selectivă numai a norharmanul care este un un inhibitor specific al MAO-B. Screening-ul larg al insecticidelor neurotoxice a fost realizat folosind un biosenzor bienzimatic care are acetilcolinesterază și butirilcolinesterază. Deoarece insecticidele au afinitate mai mare pentru una dintre enzime, in cazul unor probe care conțin inhibitori necunoscuți se poate realiza un screening larg într-o singură măsurătoare semnalul scăzând chiar dacă doar o enzimă este inhibată. În cazul unor probe complexe, se poate face o separare si preconcentrare a insecticidelor prin eluție din coloane folosind amestecuri ternare de apă și solvenți organici utilizate care au un impact negativ minim asupra acetilcolinesterazei. Detectarea acroleinei bazată pe inhibarea alcool dehidrogenazei, aceasta fiind varianta optimă dintre dehidrogenaze care au comportamente diferite în contact cu acest compus toxic.

Dezvoltarea de microbiosenzori permite realizarea unor analize cu sensibilitate ridicată datorate unui raport semnal-zgomot favorabil. Optimizarea imobilizării acetilcolinesterazei pe microelectrozi folosind nitrofenil diazoniu a permis punerea la punct a unei proceduri geenrale de imobilizare și detectarea sensibilă a insecticidelor organofosforice în comparație cu biosenzorii care folosesc același protocol pe electrozi cu dimensiuni clasice. Dezvoltarea de microbiosenzori amperometrici sensibili a fost realizată și prin modificarea microelectrozilor cu albastru de Prusia stabilizat cu ioni de cupru pentru o stabilitate operațională și sensibilitate îmbunătățite in combinație cu oxidaze pentru detecția de lactat și alcool.

Funcționalizarea suprafeței electrozilor cu straturi organice a fost realizată pentru ameliorarea performantelor analitice și se bazează pe utilizarea a numeroși compuși, nu toți disponibili comercial. A fost efectuată sinteza unor derivați ai 4,4'-dipiridinei prin reacții de alcilare și, pentru reduce impactul negativ asupra mediului, a fost studiată depoluarea acestora din ape folosind cărbune activ. Dezvoltarea de electrozi modificați cu grupări funcționale pentru detecția metalelor grele a utilizat metode de electrodepunere dirijată bazate pe grupări instabile diazoniu. Determinarea argintului(I) prin voltametrie a fost realizată folosind un electrod de carbon sticlos modificat cu N-(2-aminoetil)-4,4'-bipiridină care a fost sintetizată și imobilizată prin intermediul nitrofenil diazoniului. Electrodul dezvoltat a fost ulterior modificat cu nanoparticule din polimer de coordonare 4,4′-bipiridină-argint pentru determinarea sensibilă a Hg(II), Cu(II) și Pb(II). Pentru modificarea suprafeței electrozilor și introducerea unor grupări funcționale care realizează legături covalent coordinative cu metalele grele a fost utilizat un compus bifuncțional 4-aminotiofenol care conține atât o grupare amino care este transformată in situ în diazoniu cât și gruparea complexantă tiolică. Pentru evitarea pasivării electrodului a fost necesară modificarea acestuia la curent constant in în prezenta radicalilor liberi DPPH, obținând o buna sensibilitate pentru Pb(II) și Cd(II). În cazul modificării electrozilor folosind 4-nitrofenil-izotiocianat pentru detectarea metalelor grele, grupările nitro fiind electroreduse la amino într-o prima etapa a procesului de modificare a suprafeței.

O altă direcție de cercetare urmărită a fost dezvoltarea de suprafețe funcționalitate cu proprietăți antiadsorptive pentru utilizarea senzorilor in probe cu compoziție complexă. Metodele electrochimice au avantajul ca pot fi utilizate și in soluții complexe, tulburi și care conțin diverse substanțe care au potențial mare de a interfera, dar trebuie evitată adsorbția acestora pe suprafața electrodului pentru a evita reducerea semnalului analitic. În scopul dezvoltării unor metode electrochimice de analiză cu aplicabilitate și pentru probe cu matrice care are tendința de a se absorbi pe electrod, am dezvoltat electrozi modificați cu 4,4'-bipiridină folosind procedeul bazat pe diazoniu sau polietilen glicol cu grupare tiol care se chemosoarbe pe aur.

O extindere a direcțiilor de cercetare a urmărit obținerea de straturi organice cu proprietăți anticorozive prin electrodepunerea bazată pe diaziniu a unor compuși cu diverse grupări funcționale. A fost obținută o inhibiție a coroziunii de peste 90%, suprafețele fiind caracterizate prin tehnici elecrochimice adaptate: spectroscopie de impedanță, zgomot electrochimic sau polarizare potențiodinamică.

În Secțiunea II a tezei de abilitare este prezentat planul de evoluție și dezvoltare a carierei profesionale, științifice și academice, obiectivele propuse și direcțiile de cercetare viitoare. Planul meu se concentrează pe continuarea și aprofundarea cercetărilor în chimia analitică și electrochimie, în special în: dezvoltarea (bio)senzorilor pentru aplicații în protecția mediului, controlul calității alimentelor și analiza biomedicală, dezvoltarea de materiale funcționale cu proprietăți controlate pentru performanță analitică și durabilitate îmbunătățite, integrarea nanomaterialelor pentru creșterea sensibilității și selectivității, aplicarea metodelor electrochimice în alte domenii, cum ar fi inhibarea coroziunii, cataliză și remedierea mediului. În plus, planul profesional include implicarea continuă în mentorat academic și managementul proiectelor de cercetare, cu scopul de a consolida colaborarea cu instituții de cercetare naționale și internaționale și de a îndruma formarea a specialiști în chimie analitică și electrochimice.

Teza de abilitare se încheie cu 148 referințe bibliografice. Rezultatele demonstrează atât inovație metodologică, cât și aplicabilitate practică în îmbunătățirea performanțelor analitice, confirmând contribuția candidatului în domenile (bio)senzorilor și funcționalizare electrochimică a suprafețelor.

ABSTRACT

The habilitation thesis entitled “Studies for Improving the Analytical Performance of (Bio)Sensors for the Screening of Samples with Complex Matrices” represents a synthesis of the scientific activity I have carried out since obtaining my Ph.D. title in 2005.

The scientific research activity that is the subject of this habilitation thesis has aimed at developing fast and easy-to-use analytical methods that can be applied to samples with complex compositions, requiring only minimal pre-treatment. The sensors and biosensors developed were tested in applications related to environmental protection and food quality control, and the research was later extended to other areas, such as the development of surfaces with enhanced resistance to nonspecific adsorption or corrosion in aggressive media.

The habilitation thesis is structured into two main parts, based on 20 original scientific papers published in ISI-indexed journals and one national patent, all the results being obtained in an independent manner after the doctorate. Section I details the candidate’s main professional and scientific achievements in the field of analytical and electrochemistry. Section II presents the scientific and professional development plans, while Section III includes the list of references used in this thesis.

The first part of Section I presents the professional evolution after the completion of the Ph.D. and the main scientific achievements throughout my career. During my career, I have published 40 original papers and 3 review articles in ISI-ranked journals, delivered more than 50 presentations at international scientific conferences, and accumulated over 750 citations, corresponding to an h-index of 17 (excluding self-citations). I have been the project leader or responsible for 9 research projects.

The second part of Section I presents some of scientific results obtained after the doctoral thesis and is divided into two parts I.3. Development of High-Performance Bioanalytical Methods for Screening Complex Samples and I.4 Functionalization of Electrode Surfaces with Organic Layers for the Improvement of the Analytical Performances. The enzymatic biosensors developed with improved performance were based both on the specific characteristics of enzymatic catalysis for substrates and on the use of enzymatic inhibition to achieve highly selective measurements. The functionalization of conductive surfaces pursued three directions: the development of electrodes modified with functional groups for heavy metal detection, the creation of functionalized surfaces with anti-adsorptive properties for use in complex samples, and the electrodeposition of organic layers with anticorrosive properties — extending electrochemical research knowledge toward other practical applications.

The biosensors developed for the selective analysis of substrates were applied in food quality control. A first system targeted the analysis of methanol–ethanol mixtures in adulterated beverages, using biosensors based on alcohol dehydrogenase and alcohol oxidase. The method exploits the catalytic differences between these two enzymes: alcohol dehydrogenase oxidizes only ethanol (not methanol), whereas alcohol oxidase recognizes both methanol and ethanol. Thus,

methanol can be identified by comparing the signals generated by the two biosensors. The detection of aspartame was achieved using an enzymatic biosensor based on carboxyethyl esterase and alcohol oxidase. This system hydrolyzes the analyte, releasing methanol, which is then quantified electrochemically. The same approach was extended to estimate the total quantity of ester flavorants in foods, based on their hydrolysis and the resulting alcohols formation. The determination of acrylamide in foods relied on the natural detoxification mechanism catalyzed by glutathione-S-transferase, through the reaction between glutathione and acrylamide, leading to a decrease in glutathione concentration proportional to the acrylamide content of the sample. The determination of antioxidant capacity with minimal interferences was achieved using biosensors with xanthine oxidase and amperometric measurements under reducing conditions. This system is particularly relevant as it reproduces in vitro complex biological processes involving the superoxide radical ($O_2^{\bullet -}$) generated by xanthine oxidase.

The use of enzymatic inhibition for designing highly selective biosensors relies on the kinetic parameters of enzyme catalysis (such as inhibition constant K_I, inhibition type, reversibility), which depend on various factors — the biological source of the enzyme, structural variations, measurement mode (the substrate being in contact with the inhibitor or not), the coexistence of multiple inhibitors, and enzyme–inhibitor contact time. The detection of L-cysteine with amperometric biosensors based on tyrosinase with minimal interference from other thiol compounds was achieved by exploiting two concurrent processes: tyrosinase inhibition by all thiols except L-cysteine and quinone consumption by all thiols (including L-cysteine), both phenomena inducing a measurable decrease in quinone concentration. The detection of β-carbolines in smoked foods was carried out using biosensors based on monoamine oxidases A and B, which enabled both the global estimation of carboline content through competitive and reversible inhibition of MAO-A, and the selective detection of norharman, a specific inhibitor of MAO-B. The broad-spectrum screening of neurotoxic insecticides was performed using a bienzymatic biosensor containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Since the insecticides have different affinities toward the two enzymes, unknown inhibitors in a sample can be detected through a single measurement — the signal decreases even if only one enzyme is inhibited. For complex samples, insecticides were separated and preconcentrated by elution from columns using ternary mixtures of water and organic solvents, which minimize the negative impact on acetylcholinesterase activity. The detection of acrolein was achieved by monitoring the inhibition of alcohol dehydrogenase, which proved to be the optimal variant among several dehydrogenases exhibiting distinct behaviors toward this toxic compound.

The development of microbiosensors allows analyses with enhanced sensitivity due to a favorable signal-to-noise ratio. The optimization of acetylcholinesterase immobilization on microelectrodes using nitrophenyl diazonium led to the establishment of a general immobilization procedure and to the sensitive detection of organophosphorus insecticides, outperforming biosensors using the same protocol on conventional electrodes. Highly sensitive amperometric microbiosensors were also obtained by modifying microelectrodes with Prussian blue stabilized with copper ions, which improved operational stability and sensitivity when coupled with oxidases for lactate and alcohol detection.

The functionalization of electrode surfaces with organic layers aimed to enhance analytical performance and was based on various compounds, not all commercially available. Derivatives of 4,4'-bipyridine were synthesized through alkylation reactions, and their removal from wastewater using activated carbon was investigated to reduce environmental impact. Electrodes modified with functional groups for heavy metal detection were obtained using directed electrodeposition methods based on unstable diazonium groups. For example, Ag(I) was determined voltammetrically using a glassy carbon electrode modified with N-(2-aminoethyl)-4,4'-bipyridine, which was synthesized and immobilized through a nitrophenyl diazonium intermediate. The developed electrode was later modified with coordination polymer nanoparticles of 4,4′-bipyridine–silver for the sensitive detection of Hg(II), Cu(II), and Pb(II). For the introduction of metal-complexing functional groups, a bifunctional compound (4-aminothiophenol) was used, containing both an amino group (converted in situ to diazonium) and a thiol complexing group. To prevent electrode passivation, the modification was performed under constant current in the presence of the DPPH radical, achieving high sensitivity for Pb(II) and Cd(II). In another approach, 4-nitrophenyl isothiocyanate was used for surface modification, where nitro groups were electrochemically reduced to amino groups during the first stage.

Another research direction focused on developing functionalized surfaces with anti-adsorptive properties for the use of sensors in complex samples. Electrochemical methods offer the advantage of being applicable in complex, turbid solutions containing potentially interfering substances, but adsorption of these substances onto the electrode surface must be prevented to avoid signal loss. To develop electrochemical analytical methods suitable for samples with matrices prone to electrode surface adsorption, we designed electrodes modified with 4,4'-bipyridine using diazonium-based procedures, as well as thiol-terminated polyethylene glycol chemisorbed on gold.

An additional extension of the research involved obtaining organic layers with anticorrosive properties electrodeposited via diazonium-based electrodeposition of compounds bearing various functional groups. Corrosion inhibition efficiencies above 90% were achieved, with the surfaces being characterized using advanced electrochemical techniques such as electrochemical impedance spectroscopy, electrochemical noise analysis, and potentiodynamic polarization.

Section II of the habilitation thesis presents the plan for professional, scientific, and academic development, outlining the main objectives and future research directions. My plan focuses on the continuation and deepening of research in analytical chemistry and electrochemistry, particularly in: the design (bio)sensors for applications in environmental protection, food quality control, and biomedical analysis, the development of functional materials with controlled properties for improved analytical performance and durability, the integration of nanomaterials to enhance sensitivity and selectivity, the application of electrochemical methods in other domains such as corrosion inhibition, catalysis, and environmental remediation. Furthermore, the professional plan includes the continuous involvement in academic mentoring and research project management, aiming to strengthen collaboration with national and international research institutions and to tutor young specialists in analytical and electrochemical sciences.

The habilitation thesis concludes with 148 bibliographic references. The results demonstrate both methodological innovation and practical applicability in improving analytical performance, confirming the contribution of the candidate to the advancement of modern (bio)sensing technologies and electrochemical surface functionalization.