

---

PhD THESIS

# Molecular recognition and enantiospecific interactions in sensing applications

---

PhD Student **Adrian – Ioan Stoian**

---

Scientific coordinator **Prof. Dr. Radu Oprean**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>Literature review</b>	
<b>1. Molecular recognition</b>	17
<b>2. Sensors</b>	19
<b>3. Recognition elements used in sensors</b>	21
3.1. Biological recognition systems	21
3.1.1. Natural receptors	21
3.1.2. Bioelements	21
3.2. Biomimetic receptors	26
3.2.1. Ligands	26
3.2.2. Molecularly imprinted polymers	31
<b>4. Molecular recognition in chiral analysis</b>	35
4.1. Chiral biological macromole adsorption recognition	38
4.2. Guest-host recognition	39
4.3. Chiral ligand exchange recognition	39
4.4. Molecularly imprinted recognition	39
4.5. Other electrochemical chiral recognition mechanisms	40
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	
<b>1. Objectives</b>	43
<b>2. Biomimetic electrochemical sensor for the highly selective detection of azithromycin in biological samples</b>	45
<b>3. A chiral electrochemical system based on L-Cysteine modified gold nanoparticles for propranolol enantiodiscrimination: Electroanalysis and Computational modelling</b>	65
<b>4. Chiral enhancement via surface-confined supramolecular self-assembly at the liquid/solid interface</b>	83
<b>5. General conclusions</b>	113
<b>6. Originality of the thesis</b>	115
<b>REFERENCES</b>	117

**Key words:** Molecular recognition; enantiospecific interactions; electrochemical sensors; surface functionalization; biomimetic receptors;

## INTRODUCTION

Molecular recognition is defined as the ability of one molecule to recognize another molecule and it generally refers to the specific interaction between two or more molecules through complementary non-covalent bonding, such as electrostatic and hydrophobic interactions, hydrogen bonding, van der Waals forces,  $\pi$ - $\pi$  interactions, or metal coordination. Molecular recognition determines and regulates crucial cellular interactions such as: enzyme – substrate interaction, antigen – antibody interactions, transport across membranes or the transmission of cellular signals. Understanding the underlying physical forces that are responsible for affinity, reactivity and selectivity is essential for rational drug design.

The most impressive and acknowledged analytical use of molecular recognition and specific interactions has been perhaps reported in separation sciences, particularly in affinity chromatographic applications and in solid phase extraction-based purifications. The progress made in affinity chromatography encouraged researchers to exploit molecular recognition in immobilized ligand-based methods, such as chromatographic separations and also in optical and electrochemical chemo- and biosensing. Electrochemical sensors can provide a viable alternative for the selective and sensitive determination of small to medium-sized molecules because they come with a low cost, simple instrumentation, high sensitivity, short analysis time and are compatible with miniaturization and portability. The key component in any sensor device is represented by the recognition elements, enabling the sensor to respond selectively to an analyte or a group of analytes, while avoiding interferences from other substances. Many biological and synthetic recognition elements have been successfully used in detection systems for laboratory and field-based applications. Although demonstrating remarkable affinity and specificity, the implementation of natural receptors as recognition elements is often complicated by their poor chemical and thermal stability and high costs. Thus, a great effort was expended in the development of artificial biomimetic receptors with comparable selectivity to the biological systems, but with good chemical and thermal stability. More so, they proved that they can be specifically tailored for a wide range of analytes. A wide range of cyclodextrin and derivatives, calixarenes, various ligands and molecularly imprinted polymers have been integrated in sensors design.

Chiral molecular recognition and enantio-differentiation is a very specific part of the much broader area of molecular recognition. It can be considered the highest form of molecular recognition because of the very small energetic differences between the forming transient complexes. In consequence, a great interest has been directed lately in understanding the chiral molecular recognition mechanism. Analytical techniques capable of discriminating enantiomers of chiral molecules are very important, particularly in pharmaceutical industry. The most popular techniques employed for enantioseparation are represented by chromatographic techniques and capillary

electromigration technique. However, besides separation sciences, several papers proved that other techniques can be successfully applied for enantiodifferentiation, such as electrochemical sensors, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, UV spectroscopy, fluorimetry, IR spectroscopy or other chiroptical methods

The scope of this thesis was the development of various electrochemical sensors using different receptors based on molecular recognition, but also to investigate in more detail various chiral enhancement mechanisms occurring at the electrified solid/liquid interface.

The first objective of this work was the development of a molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensor for the determination of azithromycin, a broad-spectrum macrolide antibiotic, from various biological samples (urine, tears, plasma).

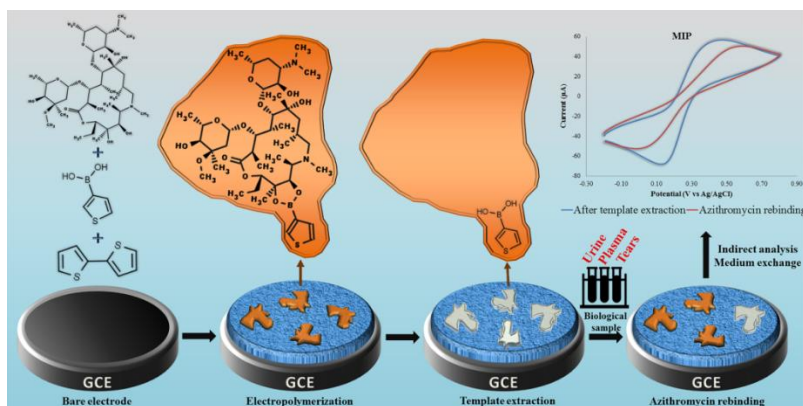
The second objective of this work was focused on investigating the interaction mechanism of the enantiomers of propranolol with the surface of bare and L-Cysteine modified gold nanoparticles employing various electrochemical techniques and computational modeling.

In the last part of this project, the goal was to develop a new simple and convenient strategy for boosting the enantioselectivity of cyclodextrins, exploiting the gainful effects of surface-confined supramolecular associations. The study was conducted on a co-assembly of physisorbed propranolol enantiomers on gold nanoparticles and different cyclodextrins, employing various electroanalytical techniques, isothermal titration calorimetry and computational modeling.

## **PERSONAL CONTRIBUTIONS**

### **1. Biomimetic electrochemical sensor for the highly selective detection of azithromycin in biological samples**

In the current study, a simple method for the fabrication of a MIP-based biomimetic electrochemical sensor for the fast and highly selective determination of azithromycin (AZI) from various conventional (urine, plasma) and nonconventional (tears) biological fluids has been successfully demonstrated. The proposed MIP sensor explored the benefits of the covalent imprinting strategy via reversible boronate ester bonds, ensuring the required thermodynamically and kinetically stable interactions between the functional monomer and the template molecule. Thus, highly defined imprinted sites with superior selectivity can be achieved, accessible only to AZI molecules, even in the presence of structurally-related analogues.



**Fig. 1.** Schematics of MIP-based sensor fabrication and its use for AZI analysis

For sensor development a very simple, one-pot synthesis approach has been adopted, based on the electropolymerization of 2,2' -bithiophene (Bth) as crosslinker along with a boronic acid functional monomer, 3-Thienyl boronic acid (3-TBA), at the surface of a glassy carbon electrode (GCE) in the presence of AZI. For the controlled MIP film electrodeposition, the electrode was immersed into a solution containing 5mM Bth, 20mM 3-TBA, 50mM Tetrabutylammonium hexafluorophosphate (4BA6FPh) and 10mM AZI, followed by 5 cycles of potentiodynamic electropolymerization on the range of  $-0.85 - +1.35\text{V}$  at a scan rate of  $100\text{mV/s}$ . For excess reagent and template removal, the electrode was immersed for 10 minutes into a stirred solution of glacial acetic acid:methanol 10:90 (v/v). Template rebinding assays from aqueous standard solutions or spiked biological matrix were performed by immersing the sensor into the stirred sample solution containing AZI for 10 minutes. The schematic procedure of MIP-based sensor fabrication and its use for AZI analysis is presented in Fig. 1.

In order to attain the highest sensitivity of the developed biomimetic sensor and demonstrate optimal selectivity towards AZI, different key constituents of the polymerization mixture were tested. Also, the number of cycles used for MIP electrodeposition and the influence of the extraction and rebinding time for template was also optimized.

The sensor calibration was performed on the range of  $13.33\text{ nM} - 66.67\text{ }\mu\text{M}$  AZI under the optimized conditions using CV in two different media, one in  $100\text{ mM}$  PBS,  $\text{pH}=7.00$  and another in AZI spiked urine, diluted 10 times with PBS. A linear regression between the cathodic peak current of  $10\text{ mM}$  ferro/ferricyanide and the logarithm of AZI molar concentration ( $\log\text{ CM}$ ) has been obtained in all cases. The lack of statistically significant difference between the regression parameters obtained in spiked urine vs PBS indicate no matrix effect of the developed MIP-base sensor.

To assess the selectivity of the AZI-imprinted sites, the electrodes were exposed to different potentially interfering molecules (such as: other antibiotics, structurally-related or not and often co-administered drugs) proving excellent selectivity. The reusability of the sensor was also assessed, showing that the developed sensor withholds ~80 % of its original response signal after seven repeated measurements. The shelf life of the developed sensor was also tested showing a decrease of the current response to ~92 % after 1 month of storage in air at room temperature.

In order to demonstrate the applicability of the developed sensor for real sample analysis, AZI was determined from three different biological matrices: spiked urine, tears and plasma and with very good recoveries.

## **2. A chiral electrochemical system based on L-Cysteine modified gold nanoparticles for propranolol enantiodiscrimination: Electroanalysis and Computational modelling**

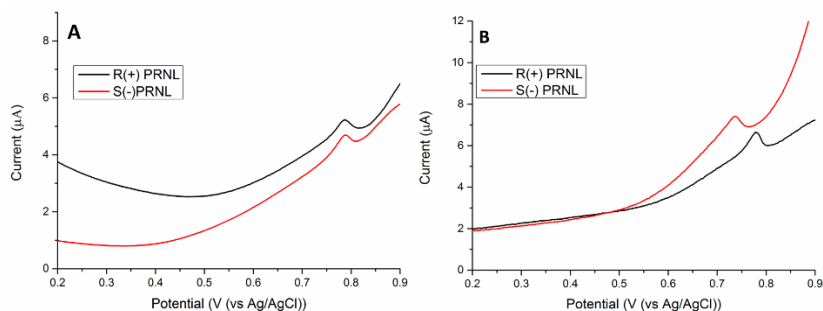
The second study aimed to provide a deeper understanding of the enantioselective interaction of a model chiral drug molecule, propranolol (PRNL), at the surface of L-Cys functionalized gold nanoparticles (L-Cys-AuNPs) by means of electrochemical techniques (differential pulse voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy). Moreover, attempts in gaining further insights of the chiral molecular recognition mechanism responsible of the electrochemical enantiodiscrimination was sought through computational modeling.

The working protocol is pretty simple, L-Cys@AuNPs were deposited on the electrode's surface in potentiostatic mode. Next, the target enantiomer was adsorbed on the gold surface by immersing for 5 min in a stirred 100 mM phosphate buffer solution (pH = 7.00) containing 10 mg/mL R(+)- or S(-)-PRNL.

After the potentiostatic deposition of bare AuNPs (in the absence of L-Cys) on the GCE surface, the obtained voltammograms and recorded oxidation peak current intensities (~ 0.55  $\mu$ A) were very similar (+0.778 V and +0.780 V for S(-)-PRNL and R(+)-PRNL, respectively) (Fig. 2A).

Due to the high affinity of thiol groups towards the gold surface, by the addition of 0.1mM L-Cys in the HAuCl<sub>4</sub> solution serving for the potentiostatic deposition of AuNPs, a spontaneous L-Cys functionalization of the AuNPs surface is also achieved. Since PRNL enantiomers tend to be strongly adsorbed on the gold surface, during this physisorption process, diastereoisomeric complexes with the chiral selector (L-Cys) will also be formed. The peak potential of S(-)-PRNL (+0.742 V) suffered more than 40mV cathodic shift, whereas for R(+)-PRNL its value remained practically unchanged (+0.784 V) in comparison with the pristine AuNPs modified GCE (Fig. 2B). the cathodic shift of the S(-)-PRNL's oxidation peak potential might be a consequence of a favored orientation of

the surface adsorbed enantiomer towards electron transfer and/or a weaker interaction with the chiral selector.



**Fig. 2.** Differential pulse voltammograms upon 5 minutes exposure to  $10\mu\text{g/mL}$  R(+) PRNL or S(-) PRNL on AuNPs@GCE (A) and L-Cys-AuNPs@GCE (B)

To further validate the differential interaction of PRNL enantiomers with the L-Cys-AuNPs surface and to confirm the analytical value of the studied electrochemical sensor, test solutions of  $10\mu\text{g/ml}$  PRNL with different enantiomeric ratios were analyzed in the aforementioned conditions. In all cases a single, broad oxidation peak was recorded, showing a linear correlation between the recorded peak potential and the relative content of R(+) enantiomer (Fig. 2).

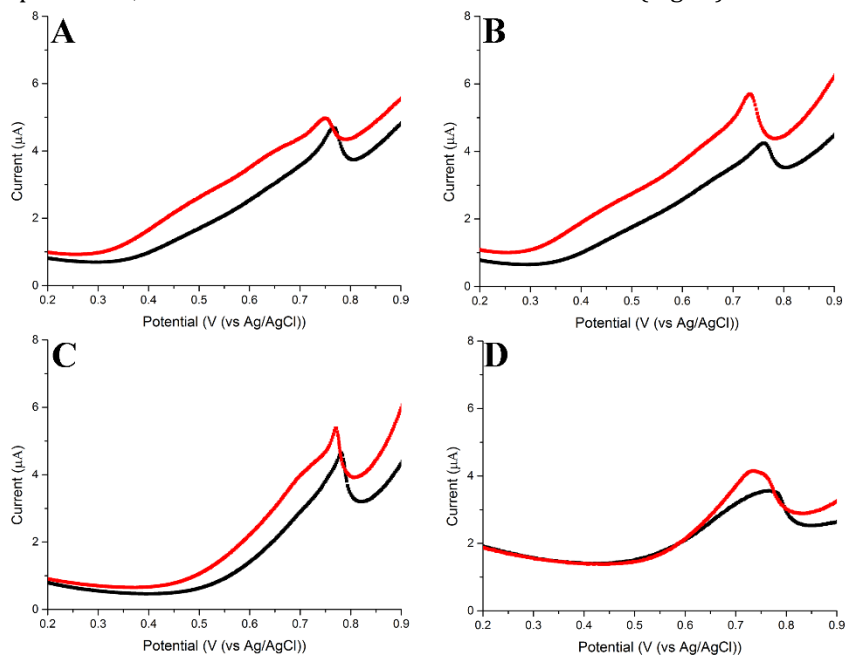
The main attractive force modulating the molecular interaction between the covalently bound L-amino acid and enantiomer adsorbates is hydrogen bonding. Due to the conformational differences of the two enantiomers, a significantly higher number of H-bonds is developed by the adsorbed R(+) antipode, involving mainly its amino N atom as H-bond donor and the oxygen atoms of cysteine's carboxyl group, as H-bond acceptor. Since the secondary amine of the enantiomers is also involved in the electron transfer process during the electrochemical oxidation, energetic and/or positional differences of the electroactive group (and the whole molecule itself) is eventually transposed to enantiospecific shifts in the recorded peak potentials.

### 3. Chiral enhancement via surface-confined supramolecular self-assembly at the liquid/solid interface

In the present study, the attention was focused on providing a new simple and convenient strategy for boosting the enantioselectivity of cyclodextrins (CDs) as highly available homochiral macrocyclic hosts using the co-assembly of physisorbed propranolol (PRNL) enantiomers on gold nanoparticles (AuNPs) and different CDs, exploiting the gainful effects of surface-confined supramolecular associations. All the experiments were conducted both in bulk enantiomer solution (unrestricted, homogenous system) and on the antipodes physisorbed at the gold-liquid interface (surface confined, heterogenous system), employing various electroanalytical

techniques (differential pulse voltammetry, cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy), isothermal titration calorimetry and computational modeling.

In the unrestricted, homogenous system, where the freedom of movement of PRNL molecules is not hampered, no clear enantioselectivity in the calculated diffusion coefficients of the two antipodes was observed for any given CD. However, by limiting the degrees of freedom of PRNL antipodes upon their adsorption to a non-chiral surface of electrochemically-generated AuNPs, differences may occur between the recorded peak potentials, due to the interaction with the studied CDs (Fig. 3).



**Fig. 3.** Differential pulse voltammograms of R(+)-PRNL (black) or S(-)-PRNL (red) after 5 min exposure to 1mM of  $\alpha$ -CD (A),  $\beta$ -CD (B),  $\gamma$ -CD (C) and CM- $\beta$ -CD (D) in 100mM phosphate buffer pH=7.00.

Even though in case of  $\alpha$ -CD and  $\gamma$ -CD reduced enantiomeric discrimination was observed, when  $\beta$ -CD and CM- $\beta$ -CD were deployed as host molecules perceptible differences between the interaction energies of PRNL enantiomers were observed, the R(+)-antipode forming more stable complexes. The main attractive force modulating the molecular interaction between PRNL enantiomers and the CDs is hydrogen bonding with a clear correlation between the interaction energy and the number of H-bonds.

The enantiospecific features of the recorded electrochemical signal seem to depend on multiple factors, such as the type of the supramolecular complex, but also the various shape and functional restrains/interactions emerging in a time dependent manner between the surface confined guest and the incoming host molecules



## CONCLUSIONS

The aim of this thesis was to develop new electrochemical sensors based on molecular recognition and enantiospecific interactions suited for the determination of different target analytes of biopharmaceutical interest.

To develop the sensors, different artificial biomimetic receptors, such as MIPs and different CDs and enantiospecific interactions between PRNL and L-Cys@AuNPs were investigated.

One objective of these work was the development of a MIP-based electrochemical sensor for the determination of azithromycin. The covalent approach was used for the interaction between the template and the functional monomer. The sensor's fabrication is easy, cost-effective, using small amounts of reagents, making it prone to mass-productions. Moreover, it can be applied for the detection of AZI in complex matrices, being the first time when an electrochemical molecularly imprinted sensor was applied for the detection of azithromycin in tears.

Another objective was the investigation of the interaction mechanism of the enantiomers of propranolol with the surface of bare and L-Cysteine modified gold nanoparticles. A correlation between the observed electrochemical signal and enantioselective molecular interactions occurring at the surface of the electrode was demonstrated using electrochemical techniques and computational modeling.

In the third study, the goal was to develop a new simple and convenient strategy for boosting the enantioselectivity of cyclodextrins, exploiting the gainful effects of surface-confined supramolecular associations. By limiting the degrees of freedom of PRNL antipodes upon their adsorption to a non-chiral surface of electrochemically-generated AuNPs, a striking amplification of the conformational differences between the resulting supramolecular complexes with native CDs may arise.

---

TEZĂ DE DOCTORAT

# Recunoașterea moleculară și interacțiuni enantiospecifice cu aplicații senzorialice

---

Doctorand **Adrian – Ioan Stoian**

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Radu Oprean**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>Stadiul actual al cunoașterii</b>	
<b>1. Recunoașterea moleculară</b>	17
<b>2. Senzori</b>	19
<b>3. Elemente de recunoaștere folosite în senzori</b>	21
3.1. Sisteme de recunoaștere biologică	21
3.1.1. Receptori naturali	21
3.1.2. Bioelemente	21
3.2. Receptori biomimetici	26
3.2.1. Liganzi	26
3.2.2. Polimeri imprimați molecular	31
<b>4. Recunoașterea moleculară în analiza chirală</b>	35
4.1. Recunoașterea chirală bazată pe adsorbția de macromolecule biologice	38
4.2. Recunoașterea de tip gazdă - oaspete	39
4.3. Recunoașterea bazată pe schimb de liganzi	39
4.4. Recunoașterea bazată pe imprimarea moleculară	39
4.5. Other electrochemical chiral recognition mechanisms	40
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	
<b>1. Obiective</b>	43
<b>2. Senzor electrochimic biomimetic pentru detecția foarte selectivă a azitromicinei din probe biologice</b>	45
<b>3. Sistem electrochimic chiral bazat pe nanoparticule de Au modificate cu L-Cisteină pentru enantiodiscriminarea propranololului: Electroanaliză și modelare computațională</b>	65
<b>4. Îmbunătățirea enantiodiscriminării prin restricționarea gradului de libertate la interfața lichid / solid prin autoasamblarea supramoleculară</b>	83
<b>5. Concluzii generale</b>	113
<b>6. Originalitatea tezei</b>	115
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	117

**Cuvinte cheie:** Recunoașterea moleculară; Interacțiuni enantiospecifice; Senzori electrochimici; funcționalizare de suprafețe; receptori biomimetici;

## INTRODUCERE

Recunoașterea moleculară este definită ca fiind capacitatea unei molecule de a recunoaște o altă moleculă și se referă în general la interacțiunea specifică dintre două sau mai multe molecule prin legături complementare necovalente, precum interacțiunile electrostatice și hidrofobe, legăturile de hidrogen, forțele van der Waals, interacțiunile  $\pi$ - $\pi$  sau coordonarea metalică. Recunoașterea moleculară determină și reglează interacțiuni celulare cruciale, precum: interacțiunea enzimă - substrat, interacțiunile antigen - anticorp, transportul între membrane sau transmiterea semnalelor celulare. Înțelegerea forțelor fizice care sunt responsabile pentru afinitate, reactivitate și selectivitate este esențială pentru proiectarea rațională a medicamentelor.

Cea mai impresionantă și recunoscută utilizare analitică a recunoașterii moleculare și a interacțiunilor specifice a fost probabil raportată în științele separării, în special în aplicațiile cromatografice de afinitate și în purificări pe bază de extracție în fază solidă. Progresul realizat în cromatografia de afinitate i-a încurajat pe cercetători să exploateze recunoașterea moleculară în metode bazate pe imobilizarea unui ligand, precum separările cromatografice și, de asemenea, în senzorialistica chimică, biochimică sau optică. Senzorii electrochimici pot oferi o alternativă viabilă pentru determinarea selectivă și sensibilă a moleculelor mici sau medii deoarece necesită o instrumentație simplă, au sensibilitate ridicată, au un timp scurt de analiză și pot fi miniaturizați. Componenta cheie al oricărui senzor este reprezentată de elementul de recunoaștere, acesta permițându-i senzorerului să răspundă selectiv la un analit sau la un grup de analiți, evitând în același timp interferenții. Multe elemente de recunoaștere biologică și sintetică au fost utilizate cu succes în diferite aplicații de laborator sau de teren. Deși demonstrează o afinitate și o specificitate remarcabilă, implementarea receptorilor naturali ca elemente de recunoaștere este adesea complicată din cauza costurilor ridicate și a stabilității lor chimice și termice scăzute. Astfel, s-a depus un effort considerabil în dezvoltarea receptorilor biomimetici artificiali cu selectivitate comparabilă cu sistemele biologice, dar cu o stabilitate chimică și termică bună. Mai mult, s-a dovedit că structura lor poate fi modulată pentru o gamă largă de analiți. O gamă largă de ciclodextrine și derivați, calixarene, diferiți liganzi și polimeri imprimați molecular a fost integrată în proiectarea senzorilor.

Recunoașterea moleculară chirală și enantiodiferențierea sunt o parte foarte specifică a recunoașterii moleculare. Aceasta poate fi considerată cea mai înaltă formă de recunoaștere moleculară din cauza diferențelor energetice foarte mici dintre complexe tranzitorii ce se formează. În consecință, un mare interes s-a îndreptat în înțelegerea mecanismului de recunoaștere moleculară chirală. Tehnicile analitice capabile să discrimineze enantiomerii moleculelor chirale sunt foarte importante, în special în industria farmaceutică. Cele mai populare tehnici utilizate pentru

enantioseparare sunt reprezentate de tehnicile cromatografice și tehnicile de electromigrare capilară. Cu toate acestea, pe lângă aceste tehnici, mai multe studii au demonstrat că și alte tehnici pot fi aplicate cu succes pentru enantiodiferențiere, precum spectrometria de masă, rezonanța magnetică nucleară, spectroscopia UV, fluorimetria, spectroscopia IR sau senzorii electrochimici.

Scopul acestei teze a fost dezvoltarea de diverși senzori electrochimici folosind recunoașterea moleculară, ce utilizează diferiți receptori, dar și investigarea în detaliu a diferitelor mecanisme de amplificare chirală care au loc la interfața electrificată solid-lichid.

Primul obiectiv al acestei lucrări a fost dezvoltarea unui senzor electrochimic pe bază de polimeri imprimați molecular pentru determinarea azitromicinei, un antibiotic macrolidic cu spectru larg, din diferite probe biologice (urină, lacrimi, plasmă).

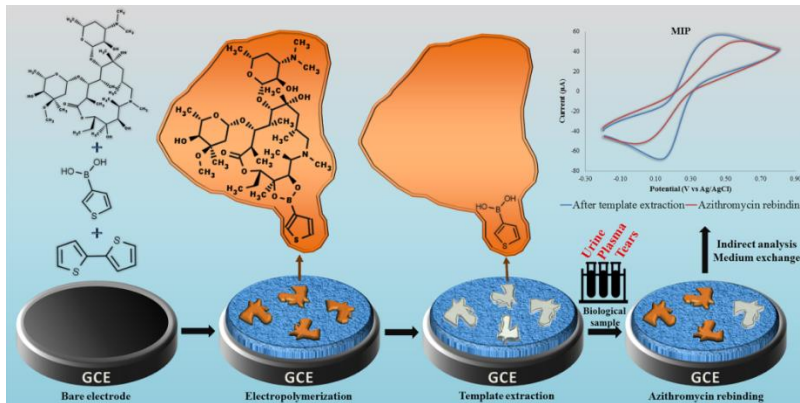
Al doilea obiectiv al acestei lucrări s-a axat pe investigarea mecanismului de interacțiune al enantiomerilor propranololului cu suprafața nanoparticulelor de aur goale și modificate de L-cisteină, folosind diverse tehnici electrochimice și de modelare computațională.

În partea finală al acestui proiect, a fost dezvoltată o strategie simplă și convenabilă pentru creșterea enantioselectivității ciclodextrinelor, exploatănd efectele benefice datorate restricționării gradului de libertate al enantiomerilor. Studiul a fost realizat pe un ansamblu alcătuit din enantiomerii propranololului adsorbiți pe nanoparticule de aur și diferite ciclodextrine, folosindu-se titrarea calorimetrică izotermă, diverse tehnici electroanalitice și modelarea computațională.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### 1. Senzor electrochimic biomimetic pentru detecția foarte selectivă a azitromicinei din probe biologice

În acest studiu, a fost dezvoltat un senzor electrochimic biomimetic bazat pe polimeri imprimați molecular (MIP) pentru determinarea rapidă și foarte selectivă a azitromicinei (AZI) din diferite probe biologice convenționale (urină, plasmă) și neconvenționale (lacrimi). Senzorul a fost dezvoltat folosind strategia de imprimare covalentă, obținându-se esteri ciclici stabili și reversibili de tip boronat cu ajutorul interacțiunilor termodinamice și cinetice stabile între monomerul funcțional și molecula șablon. Astfel, rezultă cavități imprimate foarte selective, accesibile doar moleculelor de azitromicină, chiar și în prezența unor analogi structurali.



**Fig. 1.** Reprezentarea schematică a senzorului și utilizarea acestuia pentru detecția azitromicinei

Pentru dezvoltarea senzorului s-a folosit o metodă foarte simplă, bazată pe electropolimerizarea 2,2' -bitiofenului (Bth) folosit ca agent de reticulare împreună cu un derivat de acid boronic, acidul 3-Thienyl boronic (3-TBA) folosit ca monomer funcțional, la suprafața unui electrod de tip carbon vitros, în prezența AZI. Pentru electrodepunerea controlată a filmului de MIP, electrodul a fost scufundat într-o soluție conținând 5mM Bth, 20mM 3-TBA, 50mM tetrabutilamoniu hexafluorofosfat (4BA6FPh) și 10mM AZI, urmat apoi de 5 cicluri de electropolimerizare în intervalul de -0,85 - + 1,35V la o viteză de baleiaj de 100mV / s. Pentru îndepărtarea excesului de reactivi și a șablonului, electrodul a fost expus timp de 10 minute, sub agitare, la o soluție de acid acetic glacial: metanol 10:90 (v / v). Relegarea analitului din soluții apoase sau din probe biologice s-a realizat prin imersarea sub agitare a senzorului în soluții ce conțin AZI, timp de 10 minute. Reprezentarea schematică a senzorului și utilizarea acestuia pentru detecția azitromicinei este prezentată în Fig. 1.

Pentru a atinge cea mai mare sensibilitate a senzorului biomimetic și pentru a demonstra selectivitatea optimă față de AZI, au fost testați diferiți constituenți cheie ai amestecului de polimerizare. De asemenea, a fost optimizat și numărul de cicluri utilizate pentru electrodepunerea MIP-ului și influența timpului de extracție și de relegare a moleculei șablon.

Calibrarea senzorului a fost efectuată în intervalul de 13,33 nM - 66,67 μM AZI în condiții optimizate, utilizând voltmetria ciclică. S-au testat două medii diferite, unul în 100 mM tampon fosfat, pH = 7,00 și altul în urină îmbogățită cu AZI și diluat de 10 ori cu PBS. O regresie liniară între intensitatea picului de oxidare catodic a 10 mM fero / fericianură și logaritmul concentrației molare AZI (log CM) a fost obținută în toate cazurile. Lipsa diferențelor semnificative statistic între parametrii de regresie obținuți în urina îmbogățită cu AZI în comparație cu PBS indică lipsa unui efect matricial al senzorului

Pentru a evalua selectivitatea situsurilor imprimate, electrozii au fost expuși la diferiți interferenți (alte antibiotice, cu structură asemănătoare sau nu și medicamente adesea co-administrate) dovedind o selectivitate excelentă. Reutilizarea senzorului a fost, de asemenea, evaluată, arătând că senzorul dezvoltat păstrează ~ 80% din semnalul original după șapte măsurători. Stabilitatea senzorului a fost și ea testată, arătând o scădere a răspunsului la ~ 92% după o lună de depozitare la temperatura camerei.

Pentru a demonstra aplicabilitatea practică a senzorului, acesta a fost utilizat pentru a determina azitromicina din trei probe biologice diferite: urină, lacrimi și plasmă, obținându-se recuperări foarte bune.

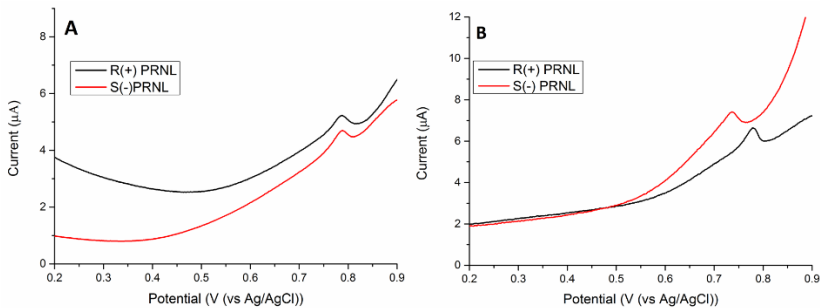
## **2. Sistem electrochimic chiral bazat pe nanoparticule de Au modificate cu L-Cisteină pentru enantiodiscriminarea propranololului: Electroanaliză și modelare computațională**

Al doilea studiu a urmărit să ofere o înțelegere mai profundă a interacțiunii enantioselective a unei molecule chirale model, propranololul (PRNL) cu o suprafață de nanoparticule de aur funcționalizate cu L-Cys (L-Cys-AuNPs) prin intermediul tehnicilor electrochimice (voltametrie puls diferențială, spectroscopie de impedanță electrochimică). Mai mult decât atât, modelarea computațională a fost folosită pentru studierea mecanismului de recunoaștere moleculară chirală responsabil de enantiodiscriminarea electrochimică.

Protocolul de lucru este destul de simplu, L-Cys-AuNPs au fost depuse potențostatic pe suprafața electrodului de tip carbon vitros. Apoi, enantiomerul țintă a fost adsorbit pe suprafața aurului prin imersarea sub agitare, timp de 5 minute, într-o soluție tampon fosfat 100 mM (pH = 7,00) ce conține 10 mg / ml R(+)- sau S(-)-PRNL.

După depunerea potențostatică a AuNP-urilor goale (în absența L-Cys) pe suprafața GCE, intensitatea (~ 0,55  $\mu$ A) și potențialele picurilor de oxidare au fost foarte similare (+0,778 V și +0,780 V pentru S(-)-PRNL și respectiv R(+)-PRNL) (Fig. 2A).

Datorită afinității ridicate a grupărilor tiol față de suprafața de AuNPs, prin adăugarea de 0,1 mM L-Cys în soluția H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> ce se folosește la depunerea potențostatică a AuNPs, se realizează și o funcționalizare spontană cu L-Cys a acestora. Deoarece enantiomerii PRNL tind să fie puternic adsorbiți pe suprafața aurului, în timpul acestui proces de fizisorbție, se vor forma și complexe diastereoizomerice cu selectorul chiral (L-Cys). Potențialul de oxidare al S(-)-PRNL (+0,742 V) a suferit o deplasare catodică de aproximativ 40mV, în timp ce pentru R(+)-PRNL valoarea sa a rămas practic neschimbată (+0,784 V) în comparație cu AuNPs neterminate cu L-Cisteină. Deplasarea catodică a potențialului de oxidare a S(-)-PRNL ar putea avea loc datorită unei orientări favorabile a enantiomerului pe suprafața de AuNPs ce permite transferul de electroni și/sau datorită unei interacțiuni mai slabe cu selectorul chiral.



**Fig. 2.** Voltamogramele puls diferențiale rezultate în urma expunerii timp de 5 minute la soluții de 10 µg/mL R(+) PRNL sau S(-) PRNL a electrodului modificat cu AuNPs goale (A) sau cu AuNPs modificate cu L-Cisteină (B)

Pentru a valida interacțiunea diferențiată a enantiomerilor PRNL-ului cu suprafața de L-Cys-AuNPs și, totodată, pentru a confirma valoarea analitică a senzorului electrochimic studiat, au fost analizate diferite soluții de 10 µg / ml PRNL ce conțin diferite raporturi enantiomerice. S-a obținut o corelație liniară între potențialul de oxidare înregistrat și conținutul relativ de enantiomer R (+).

Principala forță atractivă care modulează interacțiunea moleculară dintre L-aminoacidul legat covalent și enantiomerii propranololului este legătura de hidrogen. Datorită diferențelor conformaționale ale celor doi enantiomeri, un număr semnificativ mai mare de legături de hidrogen este dezvoltat de enantiomerul R(+), implicând în principal atomul de N din gruparea amino ca donor și atomii de O ai grupării carboxil al cisteinei, ca acceptor. Deoarece amina secundară a enantiomerilor este, de asemenea, implicată în procesul de transfer al electronilor în timpul oxidării electrochimice, diferențele energetice și / sau de poziție ale grupului electroactiv (și ale întregii molecule în sine) sunt transpuse în cele din urmă în diferențe ale potențialelor de oxidare a celor doi enantiomeri.

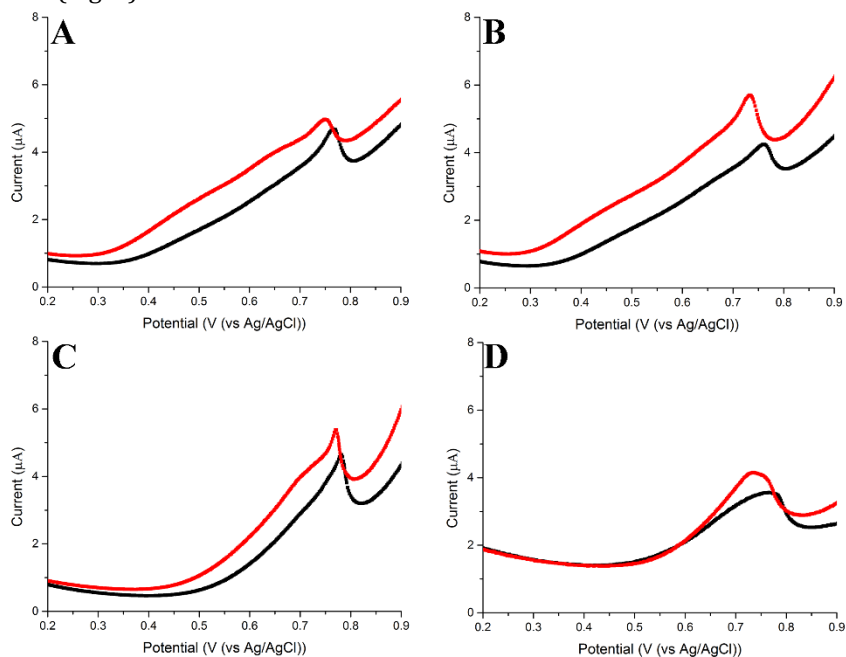
### 3. Îmbunătățirea enaniodiscriminării prin restricționarea gradului de libertate la interfața lichid / solid prin autoasamblarea supramoleculară

Scopul acestui studiu a fost de a furniza o strategie nouă și simplă pentru creșterea enantioselectivității ciclodextrinelor, utilizând asamblul format din enantiomerii PRNL-ului adsorbiți pe nanoparticulele de aur și diferite ciclodextrine, exploatându-se astfel efectele benefice rezultate în urma restricționării gradului de libertate la interfața solid / lichid prin autoasamblarea supramoleculară. Toate experimentele au fost realizate atât pe sistemul omogen, nerestricționat (în care libertatea de mișcare a moleculelor PRNL nu este împiedicată), cât și pe sistemul heterogen (în care este restricționat gradul de libertate al enantiomerilor), folosindu-se titrarea calorimetrică izotermă, diferite



tehnică electroanalitică (voltametria puls diferențială, voltametria ciclică, spectroscopia de impedanță electrochimică), sau modelarea computațională.

În sistemul nerestricționat, omogen, în care libertatea de mișcare a moleculelor de PRNL nu este împiedicată, nu au fost observate diferențe între coeficienții de difuzie calculați ai celor doi enantiomeri, indiferent de ciclodextrina folosită. Cu toate acestea, prin limitarea gradului de libertate a enantiomerilor, prin adsorbția lor de o suprafață nechirală de nanoparticule de Au generate electrochimic, pot apărea diferențe între potențialele de oxidare ale PRNL-ului, datorită interacțiunii diferite cu ciclodextrinele studiate (Fig. 3).



**Fig. 3.** Voltametriile puls diferențială ale R(+)-PRNL (negru) sau S(-)-PRNL (roșu) după expunerea timp de 5 minute la o soluție de 1mM  $\alpha$ -CD (A),  $\beta$ -CD (B),  $\gamma$ -CD (C) și CM- $\beta$ -CD (D) în 100mM PBS pH=7.00.

Chiar dacă în cazul  $\alpha$ -CD și  $\gamma$ -CD a fost observată o discriminare enantiomerică redusă, atunci când  $\beta$ -CD și CM- $\beta$ -CD au fost folosite ca molecule gazdă, au fost observate diferențe perceptibile între energiile de interacțiune ale enantiomerilor, enantiomerul R-(+) formând complexe mai stabile. Principala forță atractivă care modulează interacțiunea moleculară dintre enantiomerii PRNL și CD-urile este legătura de hidrogen, existând o corelație clară între energia de interacțiune și numărul de legături de hidrogen.

Diferențele enantiospecifice ale semnalului electrochimic înregistrat par să depindă de mai mulți factori, cum ar fi tipul complexului supramolecular, dar și diferitele interacțiuni /forme și restricții funcționale care apar într-un mod dependent de timp între oaspete și moleculele gazdă folosite.

## CONCLUZII

Scopul acestei teze a fost de a dezvolta noi senzori electrochimici pe baza recunoașterii moleculare și a interacțiunilor enantiospecifice pentru determinarea diferiților analiți țintă de interes biofarmaceutic.

Pentru a dezvolta acești senzorii, au fost investigați diferiți receptori biomimetici artificiali, cum ar fi polimerii imprimați molecular și ciclodextrinele, precum și interacțiunile enantiospecifice între PRNL și nanoparticulele de Au modificate cu L-Cisteină.

Un obiectiv al acestei lucrări a fost dezvoltarea unui senzor electrochimic bazat pe polimeri imprimați molecular pentru determinarea azitromicinei. Abordarea covalentă a fost utilizată pentru interacțiunea dintre molecula șablon și monomerul funcțional. Fabricarea senzorului este ușoară, rentabilă, utilizând cantități mici de reactivi, putând fi folosit la producții în masă. Mai mult, poate fi aplicat pentru detectarea AZI în matrici complexe, acesta fiind primul senzor electrochimic imprimat molecular ce s-a folosit pentru detectarea azitromicinei din lacrimi.

Un alt obiectiv a fost investigarea mecanismului de interacțiune al enantiomerilor PRNL-ului cu suprafața nanoparticulelor de aur goale și modificate cu L-cisteină. O corelație între semnalul electrochimic observat și interacțiunile moleculare enantioselective ce au loc la suprafața electrodului a fost demonstrată folosind tehnici electrochimice și modelare computațională. Aceste rezultate pot duce la o proiectare mai rațională a viitoarelor platforme de detectare electrochimică.

În cel de-al treilea studiu, scopul a fost dezvoltarea unei noi strategii simple și convenabile pentru creșterea enantioselectivității ciclodextrinelor, exploatând efectele benefice rezultate în urma restricționării gradului de libertate la interfața solid / lichid prin autoasamblarea supramoleculară. Prin limitarea gradului de libertate a enantiomerilor PRNL-ului după adsorbția lor de o suprafață nechirală de nanoparticule de Au, pot apărea diferențe conformaționale între complexele supramoleculare rezultate în urma interacțiunii cu ciclodextrinele studiate