
DOCTORAL THESIS

The development of sensitive and selective electrochemical methods for the detection of antibiotics

PhD student **Adrian - Marian Blidar**

PhD supervisors **Prof. Dr. Cecilia Cristea**
 Prof. Dr. Karolien De Wael



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 17 |
| STATE OF THE ART | |
| Chapter I. Antibiotics and antibiotics resistance | 21 |
| 1.1. Antibiotics | 21 |
| 1.2. Antibiotics resistance | 22 |
| Chapter II. Analytical methods for antibiotics detection | 25 |
| 2.1. Microbiological assays | 26 |
| 2.2. Immunoassays | 27 |
| 2.3. Liquid Chromatography methods | 27 |
| 2.4. Electrochemical methods | 28 |
| 2.5. Biosensors | 29 |
| Chapter III. Electroanalytical methods and electrochemical sensors for the detection of antibiotics | 31 |
| 3.1. Direct detection | 31 |
| 3.2. Indirect detection. Electrochemical (bio)sensors | 31 |
| Chapter IV. Specific electrochemical strategies employed in the present work | 35 |
| 4.1. Electrochemical fingerprint | 35 |
| 4.2. Biomimetic sensors. Biomimetic elements | 37 |
| 4.3. Nanomaterials employed in the construction of electrochemical sensors | 42 |
| 4.4. Photoelectrochemical methods – Singlet oxygen strategy | 44 |
| PERSONAL CONTRIBUTION | |
| Chapter I. The development of direct electrochemical methods for the detection of antibiotics | 49 |
| 1. The complex fingerprint of vancomycin by electrochemical and mass spectrometry analysis | 49 |
| 1.1. Introduction | 49 |
| 1.2. Experimental | 49 |
| 1.3. Results and discussion | 51 |
| 1.3.1. The electrochemical fingerprint of vancomycin | 51 |
| 1.3.2. The mechanism of electrooxidation | 54 |
| 1.3.3. Selectivity tests and real samples analysis | 56 |
| 1.4. Conclusions | 58 |
| 2. The direct electrochemical detection of vancomycin using a graphene–gold nanostructures composite platform | 59 |
| 2.1. Introduction | 59 |
| 2.2. Experimental | 60 |
| 2.3. Results and discussion | 61 |
| 2.3.1. Vancomycin interaction with Au and Au nanostructures | 61 |
| 2.3.2. Optimization of the modification with Au nanostructures | 63 |

| | |
|---|-----|
| 2.3.3. Analytical performance | 66 |
| 2.4. Conclusions | 68 |
| Chapter II. The development of biomimetic-based electrochemical methods for the detection of antibiotics | 69 |
| 1. Molecularly imprinted polymer-based sensor for the detection of cefalexin | 69 |
| 1.1. Introduction | 69 |
| 1.2. Experimental | 70 |
| 1.3. Results and discussion | 73 |
| 1.3.1. Elaboration of the sensor | 73 |
| 1.3.2. Electrode characterization | 74 |
| 1.3.3. Optimization of the sensor | 77 |
| 1.3.4. Analytical parameters of the sensor | 79 |
| 1.4. Conclusions | 82 |
| 2. Aptasensor for oxytetracycline based on innovative Au-based nanostructured platforms | 83 |
| 2.1. Introduction | 83 |
| 2.2. Experimental | 84 |
| 2.3. Results and discussions | 87 |
| 2.3.1. Generation and characterization of the platforms | 87 |
| 2.3.2. Electrochemical characterization of the platforms | 92 |
| 2.3.3. Selection of a platform for aptasensor elaboration | 94 |
| 2.3.4. Analytical performance of the developed aptasensor | 99 |
| 2.4. Conclusions | 102 |
| Chapter III. The development of photoelectrochemical methods for the detection of antibiotics | 103 |
| 1. Photoelectrochemical detection of rifampicin | 103 |
| 1.1. Introduction | 103 |
| 1.2. Experimental | 105 |
| 1.3. Results and discussion | 107 |
| 1.3.1. Photoelectrochemical detection of rifampicin | 107 |
| 1.3.2. Kinetics of rifampicin preconcentration on the modified electrodes | 109 |
| 1.3.3. Rifampicin adsorption by the modifying layer | 111 |
| 1.3.4. Molecular modeling of the rifampicin-photosensitizer interactions | 112 |
| 1.3.5. Optimization of the detection protocol | 114 |
| 1.3.6. Analytical performance | 116 |
| 1.4. Conclusions | 118 |
| GENERAL CONCLUSIONS | 119 |
| ORIGINALITY OF THE THESIS | 121 |
| REFERENCES | 123 |

Keywords: Antibiotics; (Bio)sensors, Aptamer; Molecularly Imprinted Polymer; Nanomaterial; Electrochemistry

INTRODUCTION

The discovery of antibiotics represented one of the greatest breakthroughs in medicine. Their success combined with an increasing intensive use is apparently bound to be also their undoing. This is due to the development of acquired antibiotic resistance, which represents the acquirement by the bacteria of resistance to the action of one or several antibiotics, leading to inefficient antibiotherapy and even to the impossibility of treatment and death. The development and spread of antibiotic resistance are fueled by the widespread presence of trace levels of antibiotics residue, in various media, from environment to aliments.

A solution to this is the rigorous monitoring of the levels of antibiotics, which in term requires an almost constant development of new, more accessible analytical methods, especially screening methods, capable of decentralized analysis. In this direction, the electrochemical detection of antibiotics represents a very viable alternative. In this context, the main objective of this doctoral research was the development of various electrochemical methods for the detection of antibiotics, from a wide variety of matrices, using different strategies.

The use of biomimetic elements, allows for an easy and versatile functionalization of the electrodes, resulting in a new direction in the development of electrochemical sensors for antibiotics. These strategies are aimed more at indirect detection, but there are also new emerging approaches for direct detection, like electrochemical fingerprinting. Another recent, innovative strategy is the use of photosensitizers, compounds capable of generating singlet oxygen that oxidizes specifically phenolic compounds, coupled with the electrochemical detection of the resulting products.

All the approaches mentioned above were tested and employed, throughout the work presented in this thesis, for the development of new electrochemical strategies for the detection of several antibiotics, belonging to different antibiotic groups. The work resulted in the creation of several sensitive and selective electrochemical methods which were successfully applied for the detection of antibiotics in various matrices.

STATE OF THE ART

In the *first part* of the thesis, an analysis of the literature data is presented by introducing the developed work research. Thereby, the *first chapter* presents general information about antibiotics and about the problem of antibiotic resistance.

Chapter II presents briefly the main analytical methods used for antibiotics detection, grouped largely in five types: microbiological assays, immunoassays, liquid chromatography methods, electrochemical methods and biosensors.

Chapter III is focusing specifically on the presentation of electroanalytical methods and electrochemical sensors employed for the detection of antibiotics. The methods are divided in two groups, the first based on direct detection and the second

on indirect detection. The second group is presented in more detail, further divided based on the element of recognition used.

The **last chapter** describes the specific electrochemical strategies employed in the work presented in the thesis. There are four main subjects presented in this context, two strategies, namely electrochemical fingerprinting and singlet oxygen strategy for photoelectrochemical detection, and two types of electrode modifiers employed in the construction of electrochemical sensors, biomimetic elements and nanomaterials.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

The second part of the thesis presents the motivation, the objectives, the methods used to reach the proposed objectives and the results obtained.

Chapter 1, concerning **direct detection methods**, presents two studies concerning the development of electrochemical methods for the detection of the antibiotic vancomycin (VAN), based on its intrinsic electrochemical behaviour.

1. The complex electrochemical fingerprint of vancomycin¹

The aim of this study was the development of a complex fingerprint, involving a battery of tests, using commercially available screen-printed electrodes (SPEs).

A complex electrochemical fingerprinting for VAN was constructed, which includes the electrochemical behavior of VAN at different commercially available SPEs, in several electrolytes, for successive analyses, after simple pretreatments, and using both anodic and cathodic peaks.

In order to explain the electrochemical behavior of VAN, its anodic oxidation mechanism was elucidated. RP-HPLC-MS/MS analyses allowed the identification of the oxidation product obtained after small scale electrolysis and an electrochemical mechanism was proposed.

This complex fingerprint approach offers a wide image of the behavior of VAN and allows the easy adaptation of electrochemical methods for the detection of VAN to the specifics of the sample to be analyzed.

2. The direct electrochemical detection of vancomycin using a graphene-gold nanostructures composite platform²

The combination of graphene and gold nanostructures (AuNSs) or gold nanoparticles (AuNPs) can represent a viable alternative due to the synergic electrocatalytic effect of graphene and AuNSs towards electrooxidation of VAN, but also due to the interaction between the AuNSs and VAN, usable in the cathodic domain^{1,3}. There are previously reported interactions between VAN and different forms of Au (AuNPs or ionic AuCl_4^-), which can be exploited in electroanalysis^{1,4-6}.

Considering all of the above, herein, in this study, we developed a simple electrochemical method for VAN sensing that uses a hybrid graphene-AuNSs nanocomposite electrode. This method allows a double detection, in one analysis,

directly, in the oxidation domain and also indirectly, in reduction, using the electro-active AuNSs as probe to monitor the current changing due to the interaction between Au and VAN.

The developed method was able to successfully detect VAN in the linear dynamic range (LDR) of 1 – 100 μM with a limit of detection (LOD) of 0.29 μM for the direct approach and 0.5 μM for the indirect one. The selectivity of the method was tested in the presence of other antibiotics and drugs. The method was also successfully applied for the detection of VAN from commercial human serum samples.

Chapter II, dedicated to ***Biomimetic-based electrochemical methods for the detection of antibiotics***, holds another main objective of the thesis, which is the development of electrochemical sensors for antibiotics, using biomimetic elements of recognition, like molecularly imprinted polymers (MIP) and aptamers.

1. Molecularly imprinted polymer-based sensor for the detection of cefalexin⁷

The objective of this study was the development of a MIP-based electrochemical sensor for the sensitive and selective detection of CFX. Indole-3-acetic acid (I3AA) was chosen as the monomer because it presents functional groups capable to interact with CFX and it can be electropolymerized⁸.

The MIP was obtained through “green chemistry”, the electropolymerization of the monomer (I3AA) being performed in aqueous solution, on a glassy carbon electrode (GCE) or on a boron doped diamond electrode (BDDE) in the presence of CFX, as the template molecule. The two electrodes were used in order to assess how different electrode material and structure translate to the performance of the MIP sensor. The MIP film was characterized by surface and electrochemical analyses, and it was optimized.

The developed sensors presented good selectivity, with low interferences from other antibiotics and pharmaceutical compounds and very good sensitivity, with low LODs, of 3.2 nM for the BDDE and 4.9 nM for the GCE. The MIP-based sensor was successfully applied for the detection of CFX from pharmaceuticals and river water samples.

2. Aptasensor for oxytetracycline based on innovative Au-based nanostructured platforms

A common strategy in the development of electrochemical aptasensors is the use of classical gold electrodes, with a relative flat surface, as a starting platform, which is further functionalized with APTs, *via* S-Au bonds⁹. But, an increasing number of recent studies revealed that nanostructures can enhance interfacial molecular recognition by accelerating the molecular diffusion and reducing steric hindrance¹⁰. The nanostructuring of the electrode surface results in high-curvature electrodes which exhibit higher efficiency for the interaction of the DNA sequence with the target. These properties inspired us to explore the advantages of structured platforms for the development of an electrochemical aptasensor and to investigate how the

architectures of the nano- and micro-structures obtained influence the analytical performance of the aptasensors.

The study focused on the development of a “signal-on” aptasensor for the detection of OXT, using a C-SPE-based platform, modified with AuNSs.

C-SPEs were modified with AuNSs, using five different electrodeposition protocols. The morphologies, topographies, and structural composition of the AuNSs were investigated using SEM, AFM and XPS, all platforms presenting distinctive architectures for the AuNSs. Further, the platforms were modified with a ferrocen-labelled aptamer (Fc-APT) and the influence of the platforms morphologies and architectures on the analytical performance of the aptasensor, was evaluated based on the redox signal of Fc-APT.

Using the optimum platform, that exhibited a thistle-like gold structures, an aptasensor was developed for OXT in the range 0.05 to 1.2 μM . The robustness of this method was successfully confirmed when the aptasensor was applied for the detection of OXT in real samples, represented by wastewater treatment plant effluent and cow milk.

In *Chapter III*, entitled *The development of photoelectrochemical methods for the detection of antibiotics*, is presented a new strategy of photoelectrochemical detection, the singlet oxygen-based strategy. This strategy was used for the development of a detection method for the phenolic antibiotic rifampicin (RIF).

1. Photoelectrochemical detection of rifampicin¹¹

RIF, an antibiotic from the rifamycins group, contains three phenolic hydroxyls grafted on its naphthalene core structure (**Fig. 1**). Two of them, at positions 1 and 4 form a hydroquinone-like moiety^{12,13}. RIF is slowly oxidized by oxygen in aqueous solutions to form rifampicin quinone RIF-Q. This makes RIF a good target for detection by the singlet oxygen-based detection strategy¹⁴.

Although the singlet oxygen-based strategy has certain limitations in discerning between different phenolic compounds, a limited selectivity can be reached based on the differences in the oxygenation kinetics by $^1\text{O}_2$ for different phenols at different pH values^{14,15}. Additionally, enhanced selectivity and sensitivity of detection of phenolic analytes could be also based on their interactions with the photosensitizer or its supporting matrix e.g., TiO_2 or SiO_2 .

The photosensitizer used, F_{64}PcZn , exhibits a strong hydrophilic metal center and a highly hydrophobic ligand cavity, both opposite features being simultaneously imparted by the fluorine substituents¹⁶. The hydrophilic Zn center may thus contribute to the binding of an analyte via coordination bonds, in addition to van der Waals (vdW) interactions, the latter being observed for non-sterically hindered phthalocyanine materials that adsorb polycyclic aromatic rings^{17,18}.

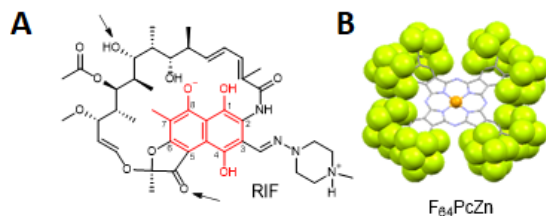


Fig. 1. Molecular structures of (A) Rifampicin and (B) F₆₄PcZn

In this study, we showed that indeed there are molecular interactions between the supported F₆₄PcZn photosensitizer deposited on an electrode and RIF. Experimental and modeling studies suggest the appearance of a preconcentration effect in a comparatively thick electrically nonconductive layer, which results in a favorable LOD, 7 nM (6 ppb). Thus, functionalizing a robust photocatalyst and a supporting material with the aim of preconcentration of an analyte is an attractive strategy to fabricate cost-effective and ultrasensitive photoelectrochemical sensors.

GENERAL CONCLUSIONS and ORIGINALITY OF THE THESIS

The aim of this thesis was to develop new electrochemical methods for the detection of antibiotics by employing and expanding on several strategies, like biomimetic sensors and electrochemical fingerprinting.

The five studies detailed in this thesis, can be roughly -divided in three categories, based on the analytical strategy employed.

The first group, presented in the first chapter of *Personal contributions*, is represented by direct electrochemical methods. The second group focuses on the use of biomimetic elements, MIPs and APT. The hyphenation of electrochemical methods with other analytical methods was explored in the last chapter. In the last study, presented in this chapter, the singlet oxygen-based photoelectrochemical approach was used for the detection of a phenolic antibiotic, RIF.

The originality of the thesis consists in the testing and development of new approaches to various strategies used in electrochemical detection, revealing new insights in the field of electrochemical detection of antibiotics. Antibiotics less detected electrochemically, like VAN were explored. The complex electrochemical fingerprint and the mechanism of the electrochemical oxidation were created and investigated, respectively, for VAN.

New sensitive nanoplatfroms were prepared by employing and combining new protocols. We developed a new graphene-AuNPS composite which we used for electrode modification for the development of a method for VAN direct detection. We also developed new platforms for the development of an aptasensor for oxytetracycline, based on a cost-accessible substrate, C-SPE, which we modified with AuNSs of various architectures.

Additional important contributions were brought through the study involving the singlet oxygen-based detection of RIF. We demonstrated how a photocatalyst can

exhibit analyte selectivity by strongly interacting with a complex phenolic compound, the antibiotic RIF and not with other simpler phenols like HQ.

Summing up, the studies presented in this thesis will have an important impact in the field of electrochemical detection of antibiotics in particular and in the fields of chemical analysis of antibiotics, biosensors and electroanalysis in general.

SELECTED REFERENCES

1. Feier, B., Blidar, A., Vlase, L. & Cristea, C. The complex fingerprint of vancomycin using electrochemical methods and mass spectrometry. *Electrochem. commun.* **104**, 106474 (2019).
2. Blidar, A., Feier, B., Pusta, A., Drăgan, A.-M. & Cristea, C. Graphene–Gold Nanostructures Hybrid Composites Screen-Printed Electrode for the Sensitive Electrochemical Detection of Vancomycin. *Coatings* (2019) doi:10.3390/coatings9100652.
3. Hadi, M. & Mollaei, T. Electroanalytical Determination of Vancomycin at a Graphene-modified Electrode: Comparison of Electrochemical Property Between Graphene, Carbon Nanotube, and Carbon Black. *Electroanalysis* 1–6 (2018) doi:10.1002/elan.201800497.
4. Hur, Y. E. & Park, Y. Vancomycin-Functionalized Gold and Silver Nanoparticles as an Antibacterial Nanoplatfrom Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **16**, 6393–6399 (2016).
5. Mohammed Fayaz, A. *et al.* Vancomycin bound biogenic gold nanoparticles: A different perspective for development of anti VRSA agents. *Process Biochem.* **46**, 636–641 (2011).
6. Wang, S. G., Chen, Y. C. & Chen, Y. C. Antibacterial gold nanoparticle-based photothermal killing of vancomycin-resistant bacteria. *Nanomedicine* **13**, 1405–1416 (2018).
7. Feier, B., Blidar, A., Pusta, A., Carciuc, P. & Cristea, C. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer for the detection of cefalexin. *Biosensors* **9**, (2019).
8. Prasad, B. B. & Pandey, I. Electrochemically imprinted molecular recognition sites on multiwalled carbon-nanotubes/pencil graphite electrode surface for enantioselective detection of d- and l-aspartic acid. *Electrochim. Acta* (2013) doi:10.1016/j.electacta.2012.10.095.
9. Ferapontova, E. E., Olsen, E. M. & Gothelf, K. V. An RNA aptamer-based electrochemical biosensor for detection of theophylline in serum. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4256–4258 (2008).
10. Peng, X. X. *et al.* Nanostructuring Synergistic Base-Stacking Effect: An Enhanced Versatile Sandwich Sensor Enables Ultrasensitive Detection of MicroRNAs in Blood. *ACS Sensors* **5**, 2514–2522 (2020).
11. Blidar, A. *et al.* Enhanced Photoelectrochemical Detection of an Analyte Triggered by Its Concentration by a Singlet Oxygen-Generating Fluoro Photosensitizer. *ACS Sensors* **5**, 3501–3509 (2020).
12. Caudana, F., Ermondi, G., Vallaro, M., Shalaeva, M. & Caron, G. Permeability prediction for zwitterions via chromatographic indexes and classification into ‘certain’ and ‘uncertain’. *Future Med. Chem.* **11**, 1553–1563 (2019).
13. Wicher, B., Pyta, K., Przybylski, P., Tykarska, E. & Gdaniec, M. Redetermination of rifampicin pentahydrate revealing a zwitterionic form of the anti-biotic. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **68**, 209–212 (2012).
14. Trashin, S. *et al.* Singlet oxygen-based electroensing by molecular photosensitizers. *Nat. Commun.* **8**, 1–10 (2017).
15. Neven, L. *et al.* Optimized Photoelectrochemical Detection of Essential Drugs Bearing Phenolic Groups. *Anal. Chem.* **91**, 9962–9969 (2019).
16. Carrión, E. N. *et al.* Fluoroalkyl phthalocyanines: Bioinspired catalytic materials. *J. Porphy. Phthalocyanines* **22**, 371–397 (2018).
17. Hayatsu, H. Cellulose bearing covalently linked copper phthalocyanine trisulphonate as an adsorbent selective for polycyclic compounds and its use in studies of environmental mutagens and carcinogens. *J. Chromatogr. A* **597**, 37–56 (1992).
18. Ivo, Š. & Šafaříková, M. Copper Phthalocyanine Dye Immobilized on Magnetite Particles: An Efficient Adsorbent for Rapid Removal of Polycyclic Aromatic Compounds from Water Solutions and Suspensions. *Sep. Sci. Technol.* **32**, 2385–2392 (1997).

TEZĂ DE DOCTORAT

Dezvoltarea unor metode electrochimice sensibile și selective pentru detecția de antibiotice

Doctorand **Adrian - Marian Blidar**

Coordonatori **Prof. Dr. Cecilia Cristea**
științifici **Prof. Dr. Karolien De Wael**

CUPRINS

| | |
|--|----|
| INTRODUCERE | 17 |
| STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII ÎN DOMENIU | |
| Capitolul I. Antibiotice și rezistența la antibiotice | 21 |
| 1.1. Antibiotice | 21 |
| 1.2. Rezistența la antibiotice | 22 |
| Capitolul II. Metode analitice pentru detecția antibioticelor | 25 |
| 2.1. Metode microbiologice | 26 |
| 2.2. Metode imunochimice | 27 |
| 2.3. Metode cromatografice | 27 |
| 2.4. Metode electrochimice | 28 |
| 2.5. Biosenzori | 29 |
| Capitolul III. Metode electroanalitice și senzori electrochimici pentru detecția antibioticelor | 31 |
| 3.1. Detectare directă | 31 |
| 3.2. Detectare indirectă. Senzori (bio) electrochimici | 31 |
| Capitolul IV. Strategii electrochimice specifice utilizate în prezenta lucrare | 35 |
| 4.1. Amprenta electrochimică | 35 |
| 4.2. Senzori biomimetici. Elemente biomimetice | 37 |
| 4.3. Nanomateriale utilizate în construcția senzorilor electrochimici | 42 |
| 4.4. Metode fotoelectrochimice - Strategia bazată pe oxigen singlet | 44 |
| CONTRIBUȚII PERSONALE | |
| Capitolul I. Dezvoltarea de metode electrochimice directe pentru detecția antibioticelor | 49 |
| 1. Amprenta electrochimică complexă a vancomicinei | 49 |
| 1.1. Introducere | 49 |
| 1.2. Materiale și metode | 49 |
| 1.3. Rezultate și discuții | 51 |
| 1.3.1. Amprenta electrochimică a vancomicinei | 51 |
| 1.3.2. Mecanismul electrooxidării | 54 |
| 1.3.3. Testele de selectivitate și analiza probelor reale | 56 |
| 1.4. Concluzii | 58 |
| 2. Detecția electrochimică directă a vancomicinei folosind o platformă compozită grafenă-nanostructuri de aur | 59 |
| 2.1. Introducere | 59 |
| 2.2. Materiale și metode | 60 |
| 2.3. Rezultate și discuții | 61 |
| 2.3.1. Interacțiunea vancomicină cu Au și nanostructuri de Au | 61 |
| 2.3.2. Optimizarea modificării cu nanostructuri de Au | 63 |
| 2.3.3. Performanță analitică | 66 |

| | |
|--|------------|
| 2.4. Concluzii | 68 |
| Capitolul II. Dezvoltarea de metode electrochimice biomimetice pentru detecția antibioticelor | 69 |
| 1. Senzor pe bază de polimer imprimat molecular pentru detecția cefalexinei | 69 |
| 1.1. Introducere | 69 |
| 1.2. Materiale și metode | |
| 1.3. Rezultate și discuții | 73 |
| 1.3.1. Elaborarea senzorului bazat pe polimer imprimați molecular | 73 |
| 1.3.2. Caracterizarea electrozodului | 74 |
| 1.3.3. Optimizarea senzorilor | 77 |
| 1.3.4. Parametri analitici ai senzorilor | 79 |
| 1.4. Concluzii | 82 |
| 2. Aptasenzor pentru detecția oxitetraciclinei dezvoltat pe platforme nanostructurate de Au | 83 |
| 2.1. Introducere | 83 |
| 2.2. Materiale și metode | 84 |
| 2.3. Rezultate și discuții | 87 |
| 2.3.1. Generarea și caracterizarea platformelor | 87 |
| 2.3.2. Caracterizarea electrochimică a platformelor | 92 |
| 2.3.3. Selectarea platformei pentru elaborarea aptasenzorului | 94 |
| 2.3.4. Performanță analitică a aptasenzorului bazat pe AuNSs | 99 |
| 2.4. Concluzii | 102 |
| Capitolul III. Dezvoltarea de metode fotoelectrochimice pentru detecția de antibiotice | 103 |
| 1. Detecția fotoelectrochimică a rifampicinei | 103 |
| 1.1. Introducere | 103 |
| 1.2. Materiale și metode | 105 |
| 1.3. Rezultate și discuții | 107 |
| 1.3.1. Detecția fotoelectrochimică a rifampicinei | 107 |
| 1.3.2. Cinetica preconcentrării rifampicinei în stratul modifcator | 109 |
| 1.3.3. Adsorbția rifampicinei de către stratul modifcator | 111 |
| 1.3.4. Modelarea moleculară a interacțiunilor rifampicină-fotosensibilizator | 112 |
| 1.3.5. Optimizarea protocolului de detecție | 114 |
| 1.3.6. Performanță analitică | 116 |
| 1.4. Concluzii | 118 |
| CONCLUZII GENERALE | 119 |
| ORIGINALITATEA TEZEI | 121 |
| BIBLIOGRAFIE | 123 |

Cuvinte cheie: Antibiotice; (Bio)senzori, Aptamer; Polimeri Imprimați Molecular (PIM); Nanomateriale; Electrochimie;

INTRODUCERE

Descoperirea antibioticelor a reprezentat una dintre cele mai mari descoperiri în medicină. Sucesul lor în tratarea diverselor patologii a condus la utilizarea lor intensivă ceea ce în final poate conduce, în mod paradoxal la limitarea utilizării lor în viitor. Acest lucru se datorează dezvoltării rezistenței antibiotice care reprezintă dobândirea de către bacterii a rezistenței la acțiunea unuia sau mai multor antibiotice, ducând la o antibioterapie ineficientă și chiar la imposibilitatea tratamentului și în final la deces. Dezvoltarea și răspândirea rezistenței la antibiotice sunt alimentate de prezența pe scară largă a reziduurilor de antibiotice, în diferite medii, de la mediu la alimente.

O soluție la această situație este monitorizarea riguroasă a nivelurilor de antibiotice, care, la rândul ei necesită dezvoltarea aproape constantă a unor noi metode analitice mai accesibile, în special metode de screening, capabile să efectueze analize descentralizate. În această direcție, detecția electrochimică a antibioticelor reprezintă o alternativă foarte viabilă. În acest context, obiectivul principal al acestei cercetări doctorale a fost dezvoltarea de diverse metode electrochimice pentru detecția antibioticelor, dintr-o varietate de matrici, utilizând diferite strategii.

Utilizarea elementelor biomimetice permite o funcționalizare ușoară și versatilă a electrozilor, reprezentând o direcție relativ nouă în dezvoltarea senzorilor electrochimici pentru antibiotice. Aceste strategii vizează mai mult detecția indirectă, dar există și noi abordări pentru detecția directă, cum ar fi amprenta electrochimică. O altă strategie recentă și inovatoare este utilizarea fotosensibilizatorilor, compuși capabili să genereze oxigen singlet, care duce la oxidarea compușilor fenolici, urmată de detecția electrochimică a produșilor rezultați.

Toate abordările menționate mai sus au fost testate și utilizate, de-a lungul studiilor prezentate în această teză, pentru dezvoltarea de noi metode electrochimice pentru detecția mai multor antibiotice, aparținând unor clase diferite de antibiotice. Lucrarea a dus la crearea mai multor metode electrochimice sensibile și selective care au fost aplicate cu succes pentru detectarea antibioticelor în diferite matrici.

STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII ÎN DOMENIU

În *prima parte* a tezei, o analiză a datelor din literatură este prezentată prin introducerea temelor de cercetare. Prin urmare, *primul capitol* prezintă informații generale despre antibiotice și despre problema rezistenței la antibiotice.

Capitolul II prezintă sumar principalele metode analitice utilizate pentru analiza antibioticelor, grupate în cinciclasă: metode microbiologice, metode imunochimice, metode cromatografice, metode electrochimice și biosenzori.

Capitolul III se concentrează în mod special pe prezentarea metodelor electroanalitice și a senzorilor electrochimici utilizați pentru detecția antibioticelor. Metodele sunt împărțite în două grupuri, primul bazat pe detecția directă și al doilea

pe detecția indirectă. Al doilea grup este prezentat mai detaliat, împărțit în continuare pe baza elementului de recunoaștere utilizat.

Ultimul capitol descrie strategiile electrochimice specifice utilizate în studiile prezentate în teză. Patru subiecte principale sunt prezentate în acest context, două strategii particulare, și anume amprentarea electrochimică și strategia bazată pe oxigen singlet pentru detecția fotoelectrochimică și două tipuri de modificatori utilizați în construcția senzorilor electrochimici, a elementelor biomimetice și a nanomaterialelor.

CONTRIBUȚII PERSONALE

A doua parte a tezei prezintă motivația, obiectivele, metodele utilizate pentru atingerea obiectivelor propuse și rezultatele obținute.

Capitolul I, se axează pe **Metodele de detecție directă** și prezintă două studii privind dezvoltarea de metode electrochimice pentru detecția antibioticului vancomicină (VAN), pe baza comportamentului său electrochimic intrinsec.

1. Amprenta electrochimică complexă a vancomicinei¹¹

Scopul acestui studiu a fost dezvoltarea unei amprente electrochimice complexe, care implică o baterie de teste, utilizând electrozi planari imprimați serigrafic, disponibili în comerț (SPE).

În cadrul studiului, s-a construit o amprentă electrochimică complexă pentru VAN, care include comportamentul electrochimic al VAN pe diferiți SPE, în mai mulți electroliți, în ambele domenii, anodic și catodic, pentru analize succesive și după pretratamente simple.

Pentru a explica comportamentul electrochimic al VAN, mecanismul său de oxidare anodică a fost investigat. Analizele de cromatografie de lichide cuplată cu spectroscopia de masă (HPLC-MS/MS) au permis identificarea produsului de oxidare obținut după electroliza la scară mică și pe baza lui a fost propus un mecanism al oxidării electrochimice.

Această abordare complexă a amprentelor electrochimice oferă o imagine mai largă a comportamentului VAN și permite adaptarea ușoară a metodelor electrochimice pentru detecția VAN în funcție de specificul probei de analizat.

2. Detecția electrochimică directă a vancomicinei folosind o platformă compozită grafenă-nanostructuri de Au²

Combinăția dintre nanostructurile de grafen și aur (AuNS) sau nanoparticulele de aur (AuNPs) poate reprezenta o alternativă viabilă datorită efectului sinergic electrocatalitic al grafenului și AuNS-urilor către electrooxidarea VAN, dar și datorită interacțiunii dintre AuNS și VAN, utilizabilă în domeniul catodic^{1,3}. Există interacțiuni raportate anterior între VAN și diferite forme de Au (AuNPs sau AuCl⁴⁻), care pot fi exploatate în electroanaliză^{1,4-6}.

Având în vedere toate cele de mai sus, aici, în acest studiu, am dezvoltat o metodă electrochimică simplă pentru detectarea VAN care utilizează un electrod hibrid grafen-AuNSs nanocompozit. Această metodă permite o detectare dublă, într-o singură analiză, direct, în domeniul oxidării și, de asemenea, indirect, în reducere, folosind AuNS-urile electroactive ca sondă pentru a monitoriza schimbarea curentului datorită interacțiunii dintre Au și VAN.

Metoda dezvoltată a reușit să detecteze cu succes VAN în domeniul dinamic liniar (LDR) de 1 - 100 μM cu o limită de detecție (LOD) de 0,29 μM pentru abordarea directă și 0,5 μM pentru cea indirectă. Selectivitatea metodei a fost testată în prezența altor antibiotice și medicamente. Metoda a fost, de asemenea, aplicată cu succes pentru detectarea VAN din probe comerciale de ser uman.

Capitolul II, dedicat **Metodelor electrochimice biomimetice pentru detecția antibioticelor**, abordează un alt obiectiv principal al tezei, care este dezvoltarea de senzori electrochimici pentru antibiotice, utilizând elemente biomimetice de recunoaștere, cum ar fi polimerii imprimați molecular (PIM) și aptamerii.

1. Senzor pe bază de polimer imprimat molecular pentru detecția cefalexinei⁷

Obiectivul acestui studiu a fost dezvoltarea unui senzor electrochimic bazat pe utilizarea de polimeri imprimați molecular (PIM) pentru detecția sensibilă și selectivă a CFX. Acidul indol-3-acetic (I3AA) a fost ales ca monomer deoarece prezintă grupări funcționale capabile să interacționeze cu CFX și poate fi electropolimerizat⁸.

PIM-ul a fost obținut prin electropolimerizarea monomerului (I3AA), în soluție apoasă, utilizând un electrod de carbon vitros (GCE) sau pe un electrod de diamant dopat cu bor (BDDE) în prezența CFX. Cei doi electrozi au fost folosiți pentru a evalua modul în care materialele și structurile diferite ale electrozilor influențează performanța senzorului PIM. Filmul PIM a fost optimizat și caracterizat utilizând tehnici microscopice și electrochimice.

Senzorii dezvoltați au prezentat o sensibilitate foarte bună și o selectivitate bună, alte antibiotice și compuși farmaceutici prezentând o interferență limitată. Senzorul bazat pe PIM a fost aplicat cu succes pentru detecția CFX din probe farmaceutice și din probe de apă de râu.

2. Aptasenzor pentru detecția oxitetraciclinei dezvoltat pe platforme nanostructurate de Au

O strategie comună în dezvoltarea aptasenzorilor electrochimici este utilizarea electrozilor clasici de aur, cu o suprafață relativă plană, ca platformă de pornire, care este funcționalizată în continuare cu aptameri (APT), prin legături S-Au⁹. Dar, un număr din ce în ce mai mare de studii recente au arătat că nanostructurile de Au (AuNSs) pot facilita recunoașterea moleculară interfacială prin accelerarea difuziei moleculare și reducerea obstacolelor sterice¹⁰. Nanostructurarea suprafeței electrodului are ca rezultat electrozi ce prezintă o rugozitate crescută, care prezintă o eficiență mai mare pentru interacțiunea secvenței de ADN cu ținta. Aceste proprietăți ne-au inspirat să explorăm avantajele platformelor structurate pentru dezvoltarea

unui aptasenzor electrochimic și să investigăm modul în care arhitecturile nano- și micro-structurilor obținute influențează performanța analitică a aptasenzorilor.

Studiul s-a concentrat pe dezvoltarea unui aptasenzor „signal-on” pentru detecția OXT, utilizând o platformă bazată pe electrozi planari imprimați serigrafic pe bază de grafit (C-SPE), modificați cu AuNSs.

C-SPE au fost modificați cu AuNS-uri, utilizând cinci protocoale diferite de electrodepunere. Morfologiile, topografiile și compoziția structurală a AuNS-urilor au fost investigate folosind microscopia electronică de baleiaj (SEM), microscopia de forță atomică (AFM) și spectroscopia de fotoelectroni cu raze X (XPS), toate platformele prezentând arhitecturi distincte ale AuNS-urilor. Mai departe, platformele au fost modificate cu un aptamer marcat cu ferocen (Fc-APT) și influența morfologiei și arhitecturii platformelor asupra performanțelor analitice ale aptasenzorului au fost evaluate pe baza semnalului redox al Fc-APT.

Folosind platforma optimă, cea modificată cu o structură de tip ciulin, a fost dezvoltat aptasenzorul pentru detecția OXT, în intervalul de concentrație 0,05 - 1,2 μM . Aplicabilitatea acestei metode a fost confirmată prin utilizarea aptasenzorului pentru detecția OXT în probe reale, reprezentate de efluent de la instalația de tratare a apelor uzate și din lapte de vacă.

În Capitolul III, intitulat **Dezvoltarea metodelor fotoelectrochimice pentru detecția antibioticelor**, este prezentată o nouă strategie de detectare fotoelectrochimică, strategia bazată pe generarea de oxigen singlet. Această strategie a fost utilizată pentru dezvoltarea unei metode de detectare a antibioticului fenolic rifampicină (RIF).

1. Detecția fotoelectrochimică a rifampicinei

RIF, un antibiotic din grupul rifamicinelor, conține trei grupări fenolice atașate pe structura lor centrală de tip naftalină (**Fig. 1**). Doi dintre ei, din pozițiile 1 și 4 formează un fragment asemănător cu hidrochinona^{12,13}. RIF este oxidat lent de oxigen în soluții apoase pentru a forma rifampicină chinonă RIF-Q. Acest lucru face ca RIF să fie o țintă bună pentru detecția prin strategia bazată pe generarea de oxigen singlet¹⁴.

Deși strategia bazată pe oxigen singlet are anumite limitări în a discerne între diferiți compuși fenolici, o selectivitate limitată poate fi atinsă pe baza diferențelor în cinetica procesului de oxigenare cu $^1\text{O}_2$ pentru fenoli diferiți la valori de pH diferite^{14,15}. În plus, selectivitatea și sensibilitatea detecției analiților fenolici poate fi îmbunătățită și pe baza interacțiunilor analiților cu fotosensibilizatorul sau matricea sa suport, de exemplu, TiO_2 sau SiO_2 .

Fotosensibilizatorul utilizat, F_{64}PcZn , prezintă un centru metalic puternic hidrofil, înconjurat de o cavitate extrem de hidrofobă, ambele caracteristici fiind determinate de către substituenții fluorurați¹⁶. Centrul hidrofil reprezentat de către atomul de Zn poate contribui la legarea unui analit prin legături de coordonare, în plus pe lângă posibilele interacțiuni van der Waals (vdW) formate cu analitul, aceste

interacțiuni fiind menționate în literatură pentru ftalocianine, care pot adsorbi compuși ce au în structura lor inele aromatice policiclice^{17,18}.

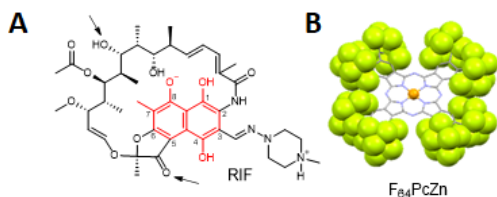


Fig. 1. Structurile chimice ale (A) Rifampicinei și (B) F₆₄PcZn

În acest studiu, am arătat prezența interacțiunilor moleculare între fotosensibilizatorul F₆₄PcZn, depus pe electrod și RIF. Rezultatele experimentale și ale studiilor de modelare moleculară sugerează apariția unui efect de preconcentrare în stratul modifier, neconductiv, care are ca rezultat o limită de detecție favorabilă, de 7 nM (6 ppb). Pe baza acestor descoperiri, funcționalizarea unui fotocatalizator și a unui material de susținere, cu scopul preconcentrării unui analit, reprezintă o strategie atractivă pentru fabricarea de senzori fotoelectrochimici ultrasensibili.

CONCLUZII GENERALE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI

Scopul acestei teze a fost de a dezvolta noi metode electrochimice pentru detecția antibioticelor prin utilizarea și extinderea mai multor strategii, cum ar fi senzorii pe bază de elemente biomimetice și amprentarea electrochimică.

Cele cinci studii detaliate în această teză pot fi grupate aproximativ în trei grupuri, pe baza strategiei analitice utilizate.

Primul grup, prezentat în primul capitol al *Contribuțiilor personale*, este reprezentat de metode electrochimice directe. Al doilea grup se concentrează pe utilizarea elementelor biomimetice, PIM și aptameri. Cuplarea metodelor electrochimice cu alte metode analitice a fost explorată în ultimul capitol. În ultimul studiu, prezentat în acest capitol, detecția fotoelectrochimică, utilizând strategia bazată pe oxigen singlet, a fost folosită pentru analiza unui antibiotic fenolic, RIF.

Originalitatea tezei constă în testarea și dezvoltarea de noi abordări ale diferitelor strategii utilizate în detectarea electrochimică, prezentând noi perspective în domeniul detecției electrochimice a antibioticelor. Au fost testate antibiotice mai puțin analizate electrochimic, cum ar fi VAN. Amprenta electrochimică și mecanismul oxidării electrochimice au fost studiate și propuse pentru VAN.

Au fost create noi nanoplatforme sensibile prin utilizarea și combinarea de protocoale noi. Am dezvoltat un nou compozit grafen-nanoparticule de Au pe care l-am folosit pentru modificarea electrodului și dezvoltarea unei metode de analiză directă a VAN. De asemenea, am dezvoltat noi platforme pentru dezvoltarea unui aptasenzor pentru oxitetracilină, bazat pe un substrat accesibil din punct de vedere al costurilor, C-SPE, pe care l-am modificat cu AuNS-uri cu diferite arhitecturi.

Contribuții importante suplimentare au fost aduse prin intermediul studiului care implică detecția RIF utilizând abordarea bazată pe oxigen singlet. Am demonstrat

că un fotocatalizator poate prezenta selectivitate pentru un analit, prin interacțiunea sa puternică cu un compus fenolic complex, precum antibioticul RIF și nu cu alți fenoli mai simpli, precum HQ.

Rezumând, studiile prezentate în această teză vor avea un impact important în domeniul detecției electrochimice sensibile și selective a antibioticelor, în special, și în domeniile analizei chimice a antibioticelor, în dezvoltarea de noi senzori și biosenzori și în domeniul electroanalizei în general.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Feier, B., Blidar, A., Vlase, L. & Cristea, C. The complex fingerprint of vancomycin using electrochemical methods and mass spectrometry. *Electrochem. commun.* **104**, 106474 (2019).
2. Blidar, A., Feier, B., Pusta, A., Drăgan, A.-M. & Cristea, C. Graphene–Gold Nanostructures Hybrid Composites Screen-Printed Electrode for the Sensitive Electrochemical Detection of Vancomycin. *Coatings* (2019) doi:10.3390/coatings9100652.
3. Hadi, M. & Mollaei, T. Electroanalytical Determination of Vancomycin at a Graphene-modified Electrode: Comparison of Electrochemical Property Between Graphene, Carbon Nanotube, and Carbon Black. *Electroanalysis* 1–6 (2018) doi:10.1002/elan.201800497.
4. Hur, Y. E. & Park, Y. Vancomycin-Functionalized Gold and Silver Nanoparticles as an Antibacterial Nanoplatfrom Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **16**, 6393–6399 (2016).
5. Mohammed Fayaz, A. *et al.* Vancomycin bound biogenic gold nanoparticles: A different perspective for development of anti VRSA agents. *Process Biochem.* **46**, 636–641 (2011).
6. Wang, S. G., Chen, Y. C. & Chen, Y. C. Antibacterial gold nanoparticle-based photothermal killing of vancomycin-resistant bacteria. *Nanomedicine* **13**, 1405–1416 (2018).
7. Feier, B., Blidar, A., Pusta, A., Carciuc, P. & Cristea, C. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer for the detection of cefalexin. *Biosensors* **9**, (2019).
8. Prasad, B. B. & Pandey, I. Electrochemically imprinted molecular recognition sites on multiwalled carbon-nanotubes/pencil graphite electrode surface for enantioselective detection of d- and l-aspartic acid. *Electrochim. Acta* (2013) doi:10.1016/j.electacta.2012.10.095.
9. Ferapontova, E. E., Olsen, E. M. & Gothelf, K. V. An RNA aptamer-based electrochemical biosensor for detection of theophylline in serum. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4256–4258 (2008).
10. Peng, X. X. *et al.* Nanostructuring Synergetic Base-Stacking Effect: An Enhanced Versatile Sandwich Sensor Enables Ultrasensitive Detection of MicroRNAs in Blood. *ACS Sensors* **5**, 2514–2522 (2020).
11. Blidar, A. *et al.* Enhanced Photoelectrochemical Detection of an Analyte Triggered by Its Concentration by a Singlet Oxygen-Generating Fluoro Photosensitizer. *ACS Sensors* **5**, 3501–3509 (2020).
12. Caudana, F., Ermondi, G., Vallaro, M., Shalaeva, M. & Caron, G. Permeability prediction for zwitterions via chromatographic indexes and classification into ‘certain’ and ‘uncertain’. *Future Med. Chem.* **11**, 1553–1563 (2019).
13. Wicher, B., Pyta, K., Przybylski, P., Tykarska, E. & Gdaniec, M. Redetermination of rifampicin penta-hydrate revealing a zwitterionic form of the anti-biotic. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **68**, 209–212 (2012).
14. Trashin, S. *et al.* Singlet oxygen-based electrosensing by molecular photosensitizers. *Nat. Commun.* **8**, 1–10 (2017).
15. Neven, L. *et al.* Optimized Photoelectrochemical Detection of Essential Drugs Bearing Phenolic Groups. *Anal. Chem.* **91**, 9962–9969 (2019).
16. Carrión, E. N. *et al.* Fluoroalkyl phthalocyanines: Bioinspired catalytic materials. *J. Porphy. Phthalocyanines* **22**, 371–397 (2018).
17. Hayatsu, H. Cellulose bearing covalently linked copper phthalocyanine trisulphonate as an adsorbent selective for polycyclic compounds and its use in studies of environmental mutagens and carcinogens. *J. Chromatogr. A* **597**, 37–56 (1992).
18. Ivo, Š. & Šafaříková, M. Copper Phthalocyanine Dye Immobilized on Magnetite Particles: An Efficient Adsorbent for Rapid Removal of Polycyclic Aromatic Compounds from Water Solutions and Suspensions. *Sep. Sci. Technol.* **32**, 2385–2392 (1997).