
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Detecția selectivă a unor stupefiante cu ajutorul unor senzori biomimetici modificați cu nanomateriale

Doctorand

Florina Maria Truță

Conducător de doctorat

Prof. dr. Cecilia Cristea



UMF

UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Stupefiante – traficul și consumul în secolul XXI

- 1.1. Clasificarea stupefiantelor
 - 1.1.1. Clasificarea stupefiantelor după originea acestora
 - 1.1.2. Clasificarea stupefiantelor după efectul lor psihoactiv
 - 1.1.2.1. Stimulante
 - 1.1.2.2. Deprimante
 - 1.1.2.3. Narcotice
 - 1.1.2.4. Halucinogene
- 1.2. Sănătatea publică și consumul de stupefiante
- 1.3. Stupefiante – implicații toxicologice și de mediu

2. Detectarea stupefiantelor – provocări actuale și noi metode inovatoare

- 2.1. Metode de detectare actuale
- 2.2. Provocări
- 2.3. Dispozitive portabile pentru detectarea stupefiantelor

3. Nanomateriale și nanoMIP-uri

- 3.1. Clasificarea nanomaterialelor utilizate în fabricarea senzorilor
 - 3.1.1. Grafene și derivați de grafene
 - 3.1.2. Nanotuburi de carbon (CNTs)
- 3.2. nanoMIP-uri
 - 3.2.1. Sinteza nanoMIP-urilor
 - 3.2.2. Caracterizarea nanoMIP-urilor
 - 3.2.3. Metode de imobilizare a nanoMIP-urilor utilizate în dezvoltarea de senzori

4. Senzori și metode electrochimice utilizate în detectarea stupefiantelor

- 4.1. Considerații generale privind senzorii biomimetici care utilizează nanomateriale
- 4.2. Metode directe de detecție electrochimică a stupefiantelor
- 4.3. Biosenzori pentru detecția stupefiantelor

Contribuții personale

Capitolul I. Detectarea electrochimică directă a stupefiantelor frecvent utilizate

Studiul 1. Senzor electrochimic pe bază de nanomateriale conceput pentru detectarea directă a metamfetaminei

1.1. Introducere

1.2. Materiale și metode

1.2.1. Materiale și instrumente

1.2.2. Caracterizarea electrochimică a metamfetaminei cu ajutorul voltametriei ciclice (CV)

1.2.3. Detectarea amprentelor electrochimice ale metamfetaminei/adulteranților cu ajutorul voltametriei de undă pătrată (SWV)

1.2.4. Performanța analitică în detectarea metamfetaminei

1.2.5. Analiza probelor reale de stradă

1.3. Rezultate și discuții

1.3.1. Caracterizarea electrochimică a metamfetaminei

1.3.2. Influența compoziției platformei și a pH-ului electrolitului asupra detecției metamfetaminei

1.3.3. Performanță analitică pentru detectarea metamfetaminei

1.3.4. Teste de selectivitate pentru detectarea metamfetaminei

1.3.5. Analiza probelor reale de stradă

1.4. Concluzii

Studiul 2. Analiza chemometrică în detectarea a patru substanțe stupefiante

2.1. Obiective

2.2. Introducere

2.3. Materiale și metode

2.3.1. Materiale și instrumente

2.3.2. Prepararea probelor

2.3.3. Masurători voltametrice

2.3.4. Procesarea datelor

2.4. Rezultate și discuții

2.4.1. Răspunsul voltametric și analiza stupefiantelor în formă pură

2.4.2. Analiza combinațiilor de stupefiante

2.4.3. Analiza probelor reale de stradă

2.5. Concluzii

Capitolul II. Senzori pe bază de nanoMIP-uri pentru detectarea specifică și selectivă a două substanțe stupefiante

Studiul 3. Senzori pe bază de nanoMIPs-uri pentru detectarea amfetaminei (AMF) din probele reale de stradă

3.1. Introducere

3.2. Materiale și metode

3.2.1. Materiale și instrumente

3.2.2. Modelarea moleculară a nanoMIP-urilor

3.2.3. Sinteza nanoMIP-urilor

3.2.4. Elaborarea senzorilor

3.2.5. Caracterizarea nanoMIP-urilor

3.2.6. Măsurători electrochimice

3.2.7. Analizarea stupefiantelor din probele reale de stradă cu ajutorul UPLC-MS/MS

3.2.8. Analizarea probelor reale de stradă

3.3. Rezultate și discuții

3.4. Concluzii

Studiul 4. Senzori pe bază de nanoMIPs-uri pentru detecția MDMA-ului din probele reale de stradă

4.1. Introducere

4.2. Materiale și metode

4.2.1. Materiale și instrumente

4.2.2. Modelarea moleculară a nanoMIPs-urilor

4.2.3. Sinteza nanoMIP-urilor

4.2.4. Caracterizarea nanoMIP-urilor

4.2.5. Elaborarea senzorilor

4.2.6. Caracterizarea electrochimică

4.2.7. Analizarea probelor reale de stradă cu ajutorul UPLC-MS

4.2.8. Analizarea probelor reale de stradă

4.3. Rezultate

4.4. Discuții

4.5. Concluzii

5. Concluzii generale

6. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei

REFERINȚE

CUVINTE CHEIE: substanțe stupefiante, aplicații pentru domeniul criminalistic, metode de detecție electrochimică, nanomateriale, probe de stradă, nanoMIP-uri

INTRODUCERE

Consumul și abuzul substanțelor stupefiante reprezintă o de sănătate publică actuală și o provocare pentru autoritățile din întreaga lume. Anual, un număr semnificativ de decese sunt înregistrate datorită consumului de droguri. De asemenea, mulți dintre consumatori se confruntă cu riscuri adiționale consumului, cum ar fi: infecțiile datorate folosirii necorespunzătoare a acelor, patologii conexe sau implicații sociale cum ar fi: violența domestică, infracționalitatea sau pierderea locului de muncă.

Unul dintre obiectivele principale ale acestei teze a fost dezvoltarea unor platforme electrochimice elaborate cu ajutorul nanomaterialelor, potrivite pentru detectarea rapidă, specifică și selectivă a celor mai întâlnite stupefiante, precum și aplicarea acestora pentru detecția pe probe reale de stradă. Pentru dezvoltarea acestor senzori, au fost utilizate platforme electrochimice pe bază de nanomateriale precum grafitul, grafenul (GPH) și nanotuburile de carbon (CNT), cu ajutorul cărora s-au investigat profilele electrochimice ale celor mai frecvent consumate substanțe de abuz. Cu toate acestea, datorită asemănărilor structurale dintre aceste substanțe, în special în ceea ce privește grupurile redox, deseori apar profile electrochimice similare. Acest comportament se manifestă și în cazul agenților de umplere, frecvent întâlniți în probele reale alături de substanțele de abuz, acest lucru putând duce la obținerea de rezultate fals pozitive sau fals negative. Pentru a depăși aceste provocări, s-au efectuat analize chemometrice cu ajutorul unor metode de analiză cum ar fi discriminarea liniară (LDA).

Pentru a îmbunătăți sensibilitatea și selectivitatea senzorilor, au fost sintetizate două tipuri de nanoparticule imprimabile molecular (nanoMIPs), care au fost imobilizate pe suprafața electrozilor planari imprimați pe bază de grafit (SPEs). Acești senzori au fost special concepuți pentru detectarea amfetaminei (AMF) și a 3,4-metilendioxi-metamfetaminei (MDMA). NanoMIP-urile, cunoscute și ca anticorpi sintetici, permit detectarea specifică și sensibilă a analiților țintă din diverse matrici. În plus, aceste nanoparticule pot fi produse la scară industrială cu costuri reduse. Au fost explorate mai multe abordări pentru imobilizarea nanoparticulelor pe suprafața electrozilor și au fost alese cele mai eficiente din punct de vedere al stabilității și al răspunsului electrochimic. Acești senzori au fost aplicați cu succes în detectarea substanțelor ilicite menționate anterior chiar și din probe reale de stradă.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Clasificarea stupefiantelor poate fi făcută după mai multe criterii. În primul rând pot fi clasificate după originea acestora, unele având proveniență naturală, iar altele fiind sintetizate în laborator. Totuși, cea mai populară metodă de clasificare se bazează pe efectele psihoactive ale acestora, grupându-le în: stimulante (stimulante de tip

amfetaminic, cocaină), deprimante (barbiturice), narcotice (derivatele din opiu) și halucinogene (LSD, marijuana, MDMA)(1).

Detectia stupefiantelor poate fi efectuată de către agenții de poliție în diferite locații, precum porturi, aeroporturi sau direct pe stradă. De obicei, primele teste pentru detectarea drogurilor sunt teste prezumtive, acestea fiind folosite doar pentru confirmarea sau infirmarea prezenței drogurilor. Astfel, ele nu sunt suficiente pentru o identificare completă a drogurilor, iar mostrele trebuie analizate suplimentar cu ajutorul testelor de laborator. Cele mai consacrate metode de detecție în laborator sunt cromatografia în fază gazoasă cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS), cromatografia în strat subțire (TLC), cromatografia lichidă cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS) și altele (2). Aceste metode prezintă dezavantaje precum timpul îndelungat de analiză, aparatură costisitoare și prelucrarea în prealabil a probelor (3)–(5). În ultimul deceniu, metodele de detecție electrochimice au apărut ca o alternativă promițătoare la analizele cromatografice și spectrale pentru detectarea stupefiantelor (6), (7). Aceste metode oferă o soluție rapidă, portabilă, cu costuri reduse și sensibilă pentru detectarea stupefiantelor, ceea ce le face ușor de implementat de către agenții de poliție (8). Diverse tehnici electrochimice sunt folosite în mod obișnuit pentru detectarea acestor substanțe, câteva exemple sunt: voltametria ciclică (CV), voltametria prin diferență de impuls (DPV), voltametria de undă pătrată (SWV) și tehnici amperometrice precum: cronoamperometria, amperometria multipuls și spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS).

În ultimele decenii, nanomaterialele au început să prindă un avânt semnificativ în dezvoltarea de senzori electrochimici pentru diferite aplicații, incluzând dezvoltarea de senzori pentru detecția de stupefianți. În studiul curent, grafitul (GPH) și nanotuburile de carbon (CNT) au fost alese pentru dezvoltarea senzorilor.

În ciuda avantajelor legate de detectarea electrochimică directă a substanțelor ilicite, în unele cazuri aceste metode nu pot fi aplicate datorită complexității structurilor chimice ale compușilor analizați, compoziției amestecului analizat sau a concentrației reduse a compușilor analizați. nanoMIP-urile sunt receptori sintetici care prezintă un mecanism specific de recunoaștere a moleculelor țintă selectate și reprezintă o alternativă potrivită pentru situațiile menționate anterior. Avantajele nanoMIP-urilor sunt reprezentate de heterogenitatea redusă, solubilitatea bună, stabilitatea ridicată, sinteza rapidă, producția cu costuri reduse, selectivitate ridicată, afinitate ridicată și fabricarea ușoară în comparație cu anticorpii, aptamerii și alte particule biomimetice (10)–(13). Diverse metode sunt utilizate pentru sinteza nanoMIP-urilor, precum: polimerizarea prin precipitare, polimerizarea prin emulsionare și polimerizarea de tip miez-coajă (12). Pentru caracterizarea nanoMIP-urilor astfel sintetizate există mai multe tehnici fiecare având particularitățile sale. Printre exemple se numără: dispersia dinamică a luminii (DLS), indicele de polidispersie (PDI), microscopia cu forță atomică (AFM), microscopia electronică de scanare (SEM), microscopia electronică de transmisie (TEM), etc.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Senzor electrochimic pe bază de nanomateriale conceput pentru detectarea directă a metamfetaminei

1.1. Introducere

În cadrul acestui studiu, s-a evaluat și analizat transformarea electrochimică directă a metamfetaminei (MAP) și impactul funcționalizării electrozilor de carbon imprimați pe suport planar (SPCEs) cu diferite nanomateriale, cum ar fi grafenul (GPH) și nanotuburile de carbon cu pereți multipli (MWCNTs). S-a determinat intervalul de concentrații pentru care există o variație a semnalului analitic în funcție de concentrația de MAP, iar apoi a fost testată selectivitatea senzorului față de analitul țintă în soluții multicomponente, în care acesta se află în combinație cu alte droguri ilicite, dar și cu adulteranți sau agenți de umplere obișnuiți. Validarea senzorului a fost realizată prin teste pe teren, cu ajutorul unui potențostat portabil, pentru detectarea MAP în probe reale (probe confiscate de pe stradă), dar și prin compararea rezultatelor cu cele obținute prin metodele convenționale, aplicate în prezent în analiza amestecurilor de droguri.

1.2. Materiale și metode

În cadrul acestei cercetări, au fost evaluate amprentele electrochimice ale metilamfetaminei (MAP) și ale unor adulteranți frecvent întâlniți în probele de stradă alături de MAP. Metodele electrochimice utilizate au fost: CV și SWV. S-a investigat influența pH-ului soluției și a vitezei de scanare asupra intensității semnalului analitic folosind metode voltametrice, cu scopul de a evalua comportamentul electrochimic al MAP. Metoda SWV a fost folosită pentru testarea a douăsprezece probe reale de stradă. Rezultatele obținute prin intermediul metodelor electrochimice au fost comparate cu cele obținute prin cromatografia în fază gazoasă cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS), cromatografia în fază gazoasă cuplată cu detectorul de ionizare în flacără (GC-FID), Ramanul portabil și spectroscopia infraroșu cu transformare Fourier (FT-IR), acestea fiind utilizate ca metode de laborator în practica curentă.

1.3. Rezultate și discuții

Comportamentul electrochimic al MAP a fost analizat pe electrozii planari imprimați modificați cu GPH și MWCNTs, folosind tehnici electrochimice precum CV și SWV, precum și diverși parametri experimentali. Cele mai bune rezultate au fost obținute pe SPE-urile modificate cu GPH, la pH 12. În această situație, s-a observat un semnal de oxidare la aproximativ 0,674 V, procesul de oxidare fiind ireversibil.

Senzorul a fost testat cu succes folosindu-se SWV optimizată pe un domeniu de concentrații cuprinse între 1 și 500 μM . Pentru a evalua selectivitatea senzorilor dezvoltăți, s-au testat soluții care conțin MAP în combinație cu alți adulteranți. Rezultatul a fost că cinci din zece adulteranți nu au interferat cu semnalul MAP.

Rezultate promițătoare au fost obținute atunci când senzorul dezvoltat a fost aplicat pentru testarea a douăsprezece probe reale. Precizia obținută a fost de aproximativ 92%.

Rezultatele obținute prin testarea cu ajutorul SWV au fost comparate cu cele obținute prin GC-MS, GC-FID, Raman portabil și FT-IR. Detectarea electrochimică a MAP pe electrozii modificați cu GPH a prezentat o performanță similară cu cea a testelor FTIR (92% acuratețe față de 100%) și o performanță net superioară în comparație cu metoda Raman.

1.4. Concluzii

Astfel, noul senzor electrochimic pe bază de GPH, se evidențiază ca o soluție inovatoare pentru detectarea MAP. Aceasta metoda prezintă un cost mai redus, o portabilitate cescută și o limită scăzută de detecție de 300 nM. Se constată o bună selectivitate în analiza de probe reale complexe, pretându-se astfel la detectare substanțelor ilicite chiar din probe reale de stradă

2. Analiza chemometrică pentru detectarea a patru substanțe stupefiante

2.1. Introducere

Pentru a îmbunătăți testarea și analiza decentralizată a substanțelor stupefiante, este necesară dezvoltarea unor senzori compacți care să fie suficient de sensibili și selectivi, ieftini și adecvați pentru producția în masă. Cu toate acestea, din cauza similitudinilor structurale dintre multe droguri, în special în ceea ce privește grupurile redox prezente, exista riscul de a se obține amprente electrochimice similare. Din nefericire, acest comportament apare și în cazul agenților de umplere, în special adulteranți care sunt de obicei utilizați în probele de pe stradă alături de substanțele stupefiante, generând astfel rezultate fals pozitive. Mai mult, acești adulteranți electroactivi ar putea suprima sau modifica amprenta electrochimică specifică (EF) a fiecărei substanțe stupefiante, ducând astfel la rezultate fals negative (14). În cadrul acestui studiu, s-a evaluat potențialul unei limbi voltametrice electrochimice (ET) pentru analiza simultană a mai multor substanțe stupefiante diferite. În acest studio s-a urmărit discriminarea și identificarea cocainei, MDMA-ului, MAP și PVP-ului din probe reale de stradă.

2.2. Materiale și metode

Experimentele au fost efectuate folosind SPE ca atare și modificați cu nanomateriale precum GPH și MWCNTs, iar răspunsurile acestora față de diferitele droguri și unii dintre cei mai comuni agenți de tăiere și adulteranți au fost evaluate cu ajutorul metodei SWV. Identificarea amprentei caracteristice a drogurilor selectate a fost realizată prin interpretarea chemometrică a voltammogramelor astfel obținute, care au fost supuse analizei LDA.

2.3. Rezultate și discuții

Primul pas a constat în analiza amprentelor electrochimice ale diferitelor substanțe ilicite, cu ajutorul a trei tipuri de platforme electrochimice: electrozi planari

imprimați ca atare, electrozi modificați cu nanotuburi de carbon multistrat (MWCNTs) și electrozi modificați cu graphene (GPH). Majoritatea drogurilor au prezentat un singur pic de oxidare, ireversibil, la valori de potențial diferite, în funcție de platformele testate. Pentru a facilita interpretarea amprentelor menționate anterior și pentru a evalua dacă acestea sunt suficient de diferențiate pentru a distinge drogurile, s-a utilizat analiza componentelor principale (PCA), o metoda des întâlnită în chemometrie. Se poate observa o grupare clară pentru fiecare dintre droguri, confirmând faptul că se obțin amprente diferite. Cu toate acestea, în cazul probelor reale de stradă, drogurile se află rareori în forma pură, de cele mai multe ori fiind adulterate (amestecate) cu diferite substanțe (cunoscute sub numele de agenți de umplere sau adulteranți).

În cea de-a doua fază, drogurile au fost analizate în combinație cu adulteranții cei mai des întâlniți în probele de stradă, utilizând o metodă de analiză superioară, analiza de discriminare liniară (LDA). Pentru a evalua performanța modelului LDA, a fost construită matricea de confuzie pentru subsetul de testare, obținându-se un procent de succes în clasificare pentru subsetul de testare de 100%. În cele din urmă, 35 de probe reale de stradă care conțineau cinci dintre cele mai comune droguri din Spania au fost analizate utilizând modelul LDA. Pentru a evalua performanța modelului, a fost construită și matricea de confuzie, obținându-se un procent de succes în clasificare pentru subsetul de testare de 100%.

2.4. Concluzii

Rezultate prezentate anterior demonstrează faptul că prin utilizarea unei baterii de senzori compuși din electrozi planari imprimați ca atare și electrozi modificați cu nanomateriale cum ar fi GPH și MWCNTs și prin analizarea rezultatelor cu ajutorul unor metode chemometrice cum ar fi LDA se pot obține rezultate promițătoare care ar putea contribui la testarea substanțelor stupefiante din probe reale de stradă.

3. Senzori pe bază de nanoMIPs-uri pentru detectarea amfetaminei (AMF) din probele reale de stradă

3.1. Introducere

AMF este o substanță puternic stimulentă a sistemului nervos central. Această substanță reprezintă în același timp și un tratament aprobat de către FDA pentru simptomele asociate cu narcolepsia și ADHD-ul (15), (16). Metodele folosite în prezent de către autorități pentru detectarea AMF includ GC-MS, LC-MS, HPLC, etc. Aceste metode prezintă din păcate anumite dezavantaje cum ar fi: timpul îndelungat de analiză și costul crescut. Sensorii electrochimici reprezintă o alternativă potrivită datorită costului redus, portabilității și rapidității răspunsului (13), (17). Cu toate acestea, AMF nu poate fi detectată direct prin metode electrochimice uzuale, deoarece nu este un compus electroactiv. Scopul studiului de față a fost de a sintetiza nanoMIP-uri electroactive pentru detectarea selectivă și specifică a AMF din probe reale de stradă (18), (19).

3.2. Materiale și metode

Sinteza nanoMIP-urilor, special proiectate pentru recunoașterea AMF, s-a realizat prin sinteză pe fază solidă. Aceste nanoMIP-uri au fost imobilizate pe electrozii planari imprimați de carbon (SPEs) și pe electrozii planari imprimați de platină (SPPE), utilizând un amestec de cerneală pe bază de grafen, electropolimerizarea cu diferiți polimeri, respectiv integrarea într-un amestec de chitosan și nanoMIP-uri, respectiv chitosan, nanoMIP-uri și GPHOx. Ferocenilmetil metacrilat-ul a fost folosit pe post de transductor pentru senzorul elaborat, fiind încorporat în structura nanoMIP-urilor, permițând astfel detectarea electrochimică a compusului de interes. Semnalul electrochimic al ferocenului a fost înregistrat prin utilizarea metodei electrochimice denumita DPV și s-a dovedit a fi dependent de concentrația AMF din soluția care interacționează cu nanoMIP-urile. De asemenea, au fost testate și probe reale de stradă cu ajutorul acestui senzor, iar rezultatele au fost comparate cu cele obținute prin analiza ajutorul metodei UPLC-MS/MS.

3.3. Rezultate și discuții

Diametrul hidrodinamic al nanoMIP-urilor a fost determinat a fi de aproximativ $269,6 \pm 28$ nm. NanoMIP-urile depuse pe SPE-uri cu ajutorul cernelii pe bază de grafen au demonstrat o bună sensibilitate de aproximativ $0,103 \mu\text{A/nM}$ în intervalul liniar între 75 – 220 nM, cu o limită de detecție (LOD) de 62 nM. În cazul amestecului de depunere conținând nanoMIP-uri și chitosan, AMF a fost detectată cu succes în intervalul liniar între 1 – 250 nM, cu o limită de detecție (LOD) de 0,3 nM. Prin adăugarea GPHOx la amestecul de depunere anterior, LOD obținut a fost de aproximativ 0,3 nM în intervalul liniar între 1 – 200 nM. Selectivitatea senzorilor a fost evaluată prin testarea unor amestecuri de soluții conținând atât AMF, cât și alte substanțe stupefiante frecvent întâlnite în probele de stradă alături de AMF. Acest senzor a fost testat cu succes pe probe de stradă, cu o sensibilitate ridicată, iar gradele de recuperare astfel obținute au avut valori satisfăcătoare (între 100,9% și 107,6%). Aceste rezultate au fost validate cu ajutorul metodei UPL-MS/MS.

3.4. Concluzii

În concluzie, putem afirma faptul că senzorii pe bază de nanoMIP-uri/cerneală de grafen/SPPE reprezintă o opțiune potrivită pentru producția industrial datorită timpului redus de dezvoltare. Acești senzori prezintă, de asemenea, o stabilitate satisfăcătoare, dar, pe de altă parte, sensibilitatea lor este redusă. În schimb, senzorii pe bază de nanoMIP-uri/chitosan/GPHOx prezintă o sensibilitate mai mare în detectarea AMF și pot reprezenta o opțiune potrivită pentru detectarea AMF din fluide biologice. Această abordare va fi investigată în studiile viitoare.

4. Senzori pe bază de nanoMIPs-uri pentru detecția MDMA-ului din probele reale de stradă

4.1. Introducere

MDMA-ul reprezintă o substanță stupefiantă sintetică cu efecte stimulante puternice. Este frecvent întâlnită în probele de stradă, în special în "pastilele de petrecere", dar și în porturi și în laboratoare clandestine. Metodele actuale de detectare, care au fost deja prezentate în partea de **Introducere**, sunt costisitoare, consumatoare de timp și necesită personal special instruit.

Obiectivul acestui studiu a fost dezvoltarea unui senzor portabil cu ajutorul nanoMIP-urilor special sintetizate pentru detecția selectivă și specifică a MDMA-ului, chiar și la concentrații scăzute. În final scopul dezvoltării acestui senzor a fost utilizarea lui în situații reale, chiar și atunci când MDMA-ul se regăsește în probe complexe de stradă.

4.2. Materiale și metode

Pentru dezvoltarea unui senzor specific și selectiv, nanoMIP-uri special proiectate pentru detecția selectivă a MDMA-ului au fost sintetizate cu ajutorul sintezei pe fază solidă. În plus, includerea monomerului funcționalizat cu ferocen asigură prezența în nanopolimer a sondei redox ca etichetă, astfel permițând detectarea indirectă a analitului țintă prin variația semnalului său de oxidare, care s-a dovedit a fi dependent de concentrația analitului. Semnalul electrochimic al ferocenului a fost înregistrat folosind metoda DPV. Pentru imobilizarea nanoparticulelor pe suprafața electrozilor planari imprimați, s-a utilizat un compozit format din chitosan, rGPHOx și nanoMIP-uri. În plus, s-au testat probe reale de pe stradă utilizând acest senzor, iar rezultatele au fost comparate cu cele obținute cu ajutorul metodei UPLC-MS/MS.

4.3. Rezultate și discuții

Senzorul dezvoltat a prezentat o sensibilitate satisfăcătoare (106,8 nA/μM) în intervalul liniar între 5 - 250 nM, cu o limită de detecție (LOD) de 5,1 nM. Selectivitatea senzorului a fost evaluată prin testarea unor soluții de MDMA în combinație cu alte substanțe de abuz și adulteranți, frecvent întâlnite în probele reale de pe stradă, obținându-se grade de recuperare satisfăcătoare (78% - 96,5%). De asemenea, cinci probe reale de stradă au fost testate, iar rezultatele obținute au fost comparate cu cele obținute folosind metoda UPLC-MS/MS, obținându-se grade de recuperare bune (92% - 99%).

4.4. Concluzii

În prezentul studiu s-a demonstrat faptul că nanoMIP-urile electroactive pot fi proiectate, sintetizate și integrate în senzori portabili. Astfel, nanoMIP-urile proiectate pot lega selectiv MDMA-ul cu o afinitate și specificitate ridicate, reprezentând un instrument puternic pentru detectarea MDMA-ului, chiar și din probe reale de stradă.

CONCLUZII GENERALE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI

Originalitatea tezei constă în dezvoltarea unor senzori rapizi și selectivi, împreună cu strategii pentru detectarea electrochimică a substanțelor stupefiante mai puțin studiate, precum MAP, MDMA, PVP, heroina și ketamina.

În cadrul acestor studii, s-a creat un model chemometric, aducând astfel o nouă abordare în evaluarea substanțelor ilicite. S-a dezvoltat o metodă inovatoare de detectare numită limbă electrochimică (ET), construită cu ajutorul analizei voltametrice și instrumentelor chemometrice. Deși această metodă a mai fost utilizată în alte domenii, cum ar fi detectarea alimentelor, aplicarea sa în analiza substanțelor stupefiante este încă limitată. În plus, s-a investigat utilizarea nanomaterialelor și influența acestora asupra semnalului stupefiantelor, o arie anterior neexplorată.

Probele confiscate de către poliție de pe stradă conțin adesea substanțe ilicite, în combinație cu alte substanțe complexe introduse cu diverse scopuri. Această situație a complicat analiza electrochimică directă a probelor. Mai mult, anumite molecule precum AMF nu pot fi detectate eficient utilizând metode electrochimice directe. În acest context, s-au dezvoltat nanoMIP-uri inovatoare și personalizate care au capacitatea de a se lega și a detecta specific AMF. Procesul de sinteză a fost realizat prin metoda de sinteză pe fază solidă. Un aspect de originalitate a fost introducerea ferocenului, care acționează ca un transductor, în matricea polimerică. S-a utilizat o abordare similară pentru detectarea MDMA, diferența constând în monomerii utilizați pentru sinteza nanoMIP-urilor. Acești senzori reprezintă un instrument mai eficient pentru detectarea rapidă a probelor reale direct la locul capturării.

În concluzie, studiile prezentate în această teză aduc o contribuție semnificativă la dezvoltarea viitoare a senzorilor electrochimici și dispozitivelor analitice inovatoare. Obținerea nanomaterialelor noi și a componentelor biomimetice, precum și îmbunătățirea celor existente, deschide calea către avansul detectării descentralizate a substanțelor stupefiante. Aceste cercetări reprezintă, de asemenea, un temelie solid pentru potențialele aplicații clinice, oferind instrumente adecvate pentru detectarea drogurilor ilicite în fluidele biologice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Fundamentals of Forensic Science - 2nd Edition [Internet]. [cited 2023 Apr 19]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/T/A/9780123749895>
2. Recommended Methods for the Identification and Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and their Ring-substituted Analogues in Seized Materials [Internet]. [cited 2023 May 3]. Available from: <https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/recommended-methods-for-the-identification-and-analysis-of-amphetamine--methamphetamine-and-their-ring-substituted-analogues-in-seized-materials.html>
3. Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials [Internet]. [cited 2023 May 3]. Available from: <https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/recommended-methods-for-the-identification-and-analysis-of-cocaine-in-seized-materials.html>
4. Dragan AM, Parrilla M, Feier B, Oprean R, Cristea C, De Wael K. Analytical techniques for the detection of amphetamine-type substances in different matrices: A comprehensive review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2021 Dec 1;145:116447.
5. Harper L, Powell J, Pijl EM. An overview of forensic drug testing methods and their suitability for harm reduction point-of-care services. *Harm Reduct J* [Internet]. 2017 Jul 31 [cited 2023 May 3];14(1):1–13. Available from: <https://harmreductionjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12954-017-0179-5>
6. Su L. Overview on the sensors for direct electrochemical detection of illicit drugs in sports. *Int J Electrochem Sci* [Internet]. 2022 [cited 2023 May 13];17:221260. Available from: www.electrochemsci.org
7. Muzetti Ribeiro MF, da Cruz Júnior JW, Dockal ER, Mccord BR, de Oliveira MF. Voltammetric Determination of Cocaine Using Carbon Screen Printed Electrodes Chemically Modified with Uranyl Schiff Base Films. *Electroanalysis* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2023 May 13];28(2):320–6. Available from: https://www.academia.edu/82111375/Voltammetric_Determination_of_Cocaine_Using_Carbon_Screen_Printed_Electrodes_Chemically_Modified_with_Uranyl_Schiff_Base_Films
8. Dragan AM, Truta FM, Tertis M, Florea A, Schram J, Cernat A, et al. Electrochemical Fingerprints of Illicit Drugs on Graphene and Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Front Chem*. 2021 Mar 16;9:67.
9. Truta F, Florea A, Cernat A, Tertis M, Hosu O, de Wael K, et al. Tackling the Problem of Sensing Commonly Abused Drugs Through Nanomaterials and (Bio)Recognition Approaches. *Front Chem*. 2020 Nov 4;8:880.
10. Garcia-Cruz A, Ahmad OS, Alanazi K, Piletska E, Piletsky SA. Generic sensor platform based on electro-responsive molecularly imprinted polymer nanoparticles (e-NanoMIPs). *Microsystems & Nanoengineering* 2020 6:1 [Internet]. 2020 Oct 19 [cited 2023 May 6];6(1):1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41378-020-00193-3>

11. Canfarotta F, Poma A, Guerreiro A, Piletsky S. Solid-phase synthesis of molecularly imprinted nanoparticles. *Nature Protocols* 2016 11:3 [Internet]. 2016 Feb 11 [cited 2023 May 6];11(3):443–55. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2016.030>
12. Refaat D, Aggour MG, Farghali AA, Mahajan R, Wiklander JG, Nicholls IA, et al. Strategies for Molecular Imprinting and the Evolution of MIP Nanoparticles as Plastic Antibodies—Synthesis and Applications. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Dec 2 [cited 2023 May 6];20(24). Available from: [/pmc/articles/PMC6940816/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32440816/)
13. Alanazi K, Garcia Cruz A, Di Masi S, Voorhaar A, Ahmad OS, Cowen T, et al. Disposable paracetamol sensor based on electroactive molecularly imprinted polymer nanoparticles for plasma monitoring. *Sens Actuators B Chem.* 2021 Feb 15;329:129128.
14. Schwarzhoff R, Cody JT. The effects of adulterating agents on FPIA analysis of urine for drugs of abuse. *J Anal Toxicol* [Internet]. 1993 [cited 2023 Jun 1];17(1):14–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8429620/>
15. Berman SM, Kuczenski R, McCracken JT, London ED. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: A review. *Mol Psychiatry.* 2009;14(2):123–42.
16. Bramness JG, Gundersen ØH, Guterstam J, Rognli EB, Konstenius M, Løberg EM, et al. Amphetamine-induced psychosis - a separate diagnostic entity or primary psychosis triggered in the vulnerable? *BMC Psychiatry.* 2012;12.
17. Parrilla M, Felipe Montiel N, Van Durme F, De Wael K. Derivatization of amphetamine to allow its electrochemical detection in illicit drug seizures. *Sens Actuators B Chem* [Internet]. 2021;337(March):129819. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129819>
18. Almagadi MH, Truta FM, Adamu G, Cowen T, Tertis M, Drăgan AM, et al. Integration of smart nanomaterials for highly selective disposable sensors and their forensic applications in amphetamine determination. *Electrochim Acta.* 2023 Apr 1;446:142009.
19. Graham SP, El-Sharif HF, Hussain S, Fruengel R, McLean RK, Hawes PC, et al. Evaluation of Molecularly Imprinted Polymers as Synthetic Virus Neutralizing Antibody Mimics. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 May 24;7:115.

PhD THESIS SUMMARY

Nanomaterials-Enhanced Biomimetic Sensors for Accurate Illicit Drugs Detection

PhD Student **Florina Maria Truță**

PhD Supervisor **Prof. dr. Cecilia Cristea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION

STATE OF THE ART

1. Illicit drugs – trafficking and consumption in XXI century

1.1. Classification of illicit drugs

1.1.1. Classification of illicit drugs based on their origin

1.1.2. Classification based on their psychoactive effects

1.1.2.1. Stimulants

1.1.2.2. Depressants

1.1.2.3. Narcotics

1.1.2.4. Hallucinogens

1.2. Public health and illicit drugs consumption

1.3. Illicit drugs – toxicological and environmental implications

2. Illicit drugs detection – actual challenges and new innovative methods

2.1. Current detection methods

2.2. Challenges

2.3. Portable devices for illicit drug detection

3. Nanomaterials and nanoMIPs

3.1. Classification of nanomaterials in sensors fabrication

3.1.1. Graphene and graphene derivatives

3.1.2. Carbon nanotubes (CNTs)

3.2. nanoMIPs

3.2.1. Synthesis of nanoMIPs

3.2.2. Characterization of nanoMIPs

3.2.3. nanoMIPs immobilization methods in sensors development

4. Electrochemical sensors and methods for illicit drug detection

4.1. General considerations of biomimetic sensors based on nanomaterials

4.2. Direct electrochemical detection of illicit drugs

4.3. Biosensors for illicit drug detection

PERSONAL CONTRIBUTIONS

CHAPTER I. Electrochemical direct detection of the commonly used illicit drugs of abuse

Study 1. Electrochemical sensor based on nanomaterials for direct detection of methamphetamine

1.1. Introduction

1.2. Materials and methods

1.2.1. Materials and instrumentation

1.2.2. Methamphetamine electrochemical characterization *via* CV

1.2.3. Electrochemical fingerprinting of methamphetamine/adulterants by SWV

1.2.4. Analytical performance for methamphetamine detection

1.2.5. Assessment of real samples

1.3. Results and discussions

1.3.1. The electrochemical characterization of methamphetamine on different platforms

1.3.2. Influence of the platform composition and the pH of the electrolyte

1.3.3. Analytical performance for methamphetamine detection

1.3.4. Selectivity tests for methamphetamine detection

1.3.5. Assessment of real samples

1.4. Conclusions

Study 2. Chemometric analysis for the detection of four drugs of abuse

2.1. Objectives

2.2. Introduction

2.3. Materials and methods

2.3.1. Materials and instrumentation

2.3.2. Samples preparation

2.3.3. Voltametric measurements

2.3.4. Data processing

2.4. Results and discussion

2.4.1. Voltammetric response and analysis of pure drugs

2.4.2. Analysis of drugs mixtures

2.4.3. Analysis of seized drugs

2.5. Conclusions

Chapter II. nanoMIPs-based sensors for specific and selective detection of two commonly used illicit drugs

Study 3. nanoMIPs-based sensors for AMF detection from street samples

3.1. Introduction

3.2. Materials and methods

3.2.1. Materials and instrumentation

3.2.2. NanoMIPs molecular modelling

3.2.3. NanoMIP synthesis

- 3.2.4. Sensors elaboration
 - 3.2.4.1. (SAM) of silanes on platinum electrodes
 - 3.2.4.2. Graphene ink strategy
 - 3.2.4.3. nanoMIPs ink embedded in polyethylenimine
 - 3.2.4.4. nanoMIPs ink embedded in polyaniline
 - 3.2.4.5. nanoMIPs ink embedded in bithiophene polymer
 - 3.2.4.6. nanoMIPs suspension embedded in chitosan
 - 3.2.4.7. nanoMIPs suspension embedded in chitosan and GPHOx
- 3.2.5. Characterization of nanoMIPs
- 3.2.6. Electrochemical measurements
- 3.2.7. Seized illicit drug samples analyzed by UPLC-MS/MS
- 3.2.8. Assessment of seized drug samples
- 3.3. Results and discussions
 - 3.3.1. Characterization of the electroactive polymers
 - 3.3.2. Characterization of the nanoMIPs-based sensors
 - 3.3.2.1. Morphologic characterization of sensors
 - 3.3.2.2. Electrochemical characterization of the sensors based on chitosan
 - 3.3.4. Analytical performance of the nanoMIPs-based sensors
 - 3.3.5. Selectivity and stability of the sensors
 - 3.3.6. Analysis of real samples (seized illicit drugs)
- 3.4. Conclusions

Study 4. nanoMIPs-based sensor for MDMA detection from street samples

- 4.1. Introduction
- 4.2. Materials and methods
 - 4.2.1. Materials and instrumentations
 - 4.2.2. NanoMIPs molecular modelling
 - 4.2.3. Synthesis of nanoMIPs specific for MDMA
 - 4.2.4. Characterization of nanoMIPs
 - 4.2.5. Sensor elaboration
 - 4.2.6. Electrochemical characterization
 - 4.2.7. Seized illicit drug samples analyzed by UPLC-MS
 - 4.2.8. Seized drug samples assessment
- 4.3. Results
 - 4.3.1. Synthesis and characterization of electroactive polymers
 - 4.3.2. Electrochemical characterization of the sensor
 - 4.3.3. Analytical performance of the nanoMIP-based sensor
 - 4.3.4. Street samples assessment, selectivity and stability of the sensor
- 4.4. Discussions

4.5. Conclusions

5. General conclusions

6. Originality of the thesis

REFERENCES

KEY WORDS: illicit drugs detection, forensic applications, electrochemical methods, nanomaterials, street samples, nanoMIPs

INTRODUCTION

The use and abuse of illicit drugs present an increasingly significant challenge for authorities worldwide. In recent years, these substances have been classified as the latest group of “emerging pollutants” due to a significant rise in their consumption. Each year, thousands of people die because of drugs consumption, while others face the risk of infections due to the improper needle use. Furthermore, drugs consumption contributes to high levels of crime, domestic violence, and job losses.

The main objective of this thesis was to develop various nanomaterials-based electrochemical platforms suitable for the selective, specific, and rapid detection of the most encountered illicit drugs and applying them in real case scenarios. To accomplish this, electrochemical platforms based on nanomaterials such as graphite, graphene (GPH), and carbon nanotubes (CNTs) were employed to establish a database of electrochemical fingerprints for above mentioned substances. However, due to the structural similarities between many drugs, especially in regards to the redox groups of those, similar electrochemical fingerprints might be obtained. Unfortunately, this behaviour also occurs for cutting agents, particularly adulterants that are usually used in street samples, thus creating false positives results if not properly accounted for. To overcome the challenges related to the presence of different cutting agents or other possible interfering compounds, a linear discriminant analysis (LDA) was performed.

For enhanced sensor sensitivity and selectivity, two types of molecularly imprinted nanoparticles (nanoMIPs) were synthesized and immobilized onto the screen-printed electrodes (SPEs) surface. These sensors were especially designed for the detection of amphetamine (AMF) and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). The nanoMIPs, known as synthetic antibodies, enables the specific and sensitive detection of the target analytes from different matrices. Furthermore, they can be manufactured at an industrial scale with low production costs. Various approaches for immobilizing the nanoparticles onto the surface of SPEs were also explored. These sensors were successfully applied for the detection of aforementioned illicit drugs in real street samples.

STATE OF THE ART

Illicit drugs come in a broad range of forms, from naturally occurring to synthetic, and have a full range of psychoactive effects. The most popular way of classifying them is based on their psychoactive effects, grouping them in: stimulants (amphetamine-type stimulants, cocaine), depressants (barbiturates), narcotics (opium derivatives) and hallucinogens (LSD, marijuana, MDMA)(1).

Illicit drugs analysis can be performed by the law enforcement agencies (LEAs) in different settings, like harbours, airports, or directly on the street. Usually, the first-hand tests for drugs detection are the presumptive tests, these being used only for confirming or infirming the presence of drugs. Thus, they are not enough for a complete drug identification, and the samples must be analysed by additional laboratory tests such as Gas Chromatography – Mass spectrometry (GC-MS), Thin Layer Chromatography (TLC), Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS), and others (2). These methods present some disadvantages, like time-consuming procedures, expensive apparatus, and tedious and complicated sample pre-treatment (3–5). Over the past decade, electrochemical techniques have emerged as a promising alternative to chromatographic and spectral analysis for detecting illicit drugs (6,7). These methods offer a rapid, portable, low-cost, and sensitive solution for illicit drugs detection, making them easily deployable by LEAs (8). Various electrochemical techniques are commonly employed based on the method used to generate and analyze these signals. For the detection of illicit drugs, the most commonly used methods are cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), square wave voltammetry (SWV), and amperometric techniques such as: chronoamperometry, multipulse amperometry and electrochemical impedance spectroscopy (EIS).

Over the past few decades, the development of nanomaterials for sensor applications has emerged as a significant research area. These nanomaterials can also be involved in the elaboration of (bio)sensors especially design for illicit drugs detection. The nanomaterials, are especially used to modify the electrochemical capabilities of an electrode, working as a label/loading agent for nanomaterials and biomolecules in the case of electrochemical transduction (9). In the current study graphene (GPH) and carbon nanotubes (CNTs) were employed in the sensor's elaboration.

Despite of the advantages related with the direct electrochemical detection of illicit drugs, in some cases these methods cannot be applied due to the complexity of the compound's chemical structures, the composition of the analyzed mixture, or the low concentration of the analyzed compound. nanoMIPs are synthetic receptors that exhibit a specific recognition mechanism towards selected target molecules, and represent a suitable alternative for the aforementioned situations. nanoMIPs exhibit lower heterogeneity, better solubility, and possess numerous benefits such as high stability, rapid synthesis, low-cost production, good selectivity, high affinity, and ease of manufacturing when compared to antibodies, aptamers, and other biomimetics (10–

13). Various synthesis methods are commonly employed for nanoMIPs, including precipitation polymerization, emulsion polymerization, core-shell polymerization with subsequent grafting, and solid-phase synthesis (12). Moreover, there are several techniques used for nanoMIPs characterization, each of them having their own particularities. Among them some examples are: dynamic light scattering (DLS), polydispersity index (PDI) atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), etc.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Study 1 – Electrochemical sensor based on nanomaterials for direct detection of methamphetamine

1.1. Introduction

In this study, an extensive investigation was conducted to assess the direct electrochemical transformation of methamphetamine (MAP) and the impact of the functionalization of planar screen-printed carbon electrodes (SPCEs) with different nanomaterials such as GPH and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs).

The range of concentrations for which there is a variation of the analytical signal with the concentration of MAP was determined, then the selectivity of the sensor towards the target analyte in multicomponent solutions, where it is in combination with other illicit drugs but also with common adulterants/cutting agents, was tested. The validation of the sensor was carried out by field testing, with the help of a portable potentiostat, for MAP detection in real samples (confiscated street samples), but also by comparing the results with those obtained with conventional methods, currently applied in the analysis of drug samples.

1.2. Materials and methods

The electrochemical fingerprints of MAP and its most encountered adulterants were assessed by using two electrochemical techniques: CV and SWV. The influence of solution pH and scan rate on the intensity of the analytical signal was investigated using voltammetry to assess the electrochemical behavior of MAP. The SWV method was used to test twelve real street samples. The results obtained using the developed electrochemical methods being compared with those obtained by GC-MS, gas chromatography – flame ionization detector (GC-FID), Portable Raman and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), used as control methods.

1.3. Results and discussions

The electrochemical behavior of MAP was investigated on different platforms by using CV and SWV, with the help of different electrode materials (SPEs modified with GPH and MWCNTs) and under different experimental conditions. The best results being obtained on the SPEs modified with GPH, at pH 12. In this case, an anodic oxidation peak was observed at about 0.674 V, the oxidation process being irreversible.

The optimized SWV method demonstrated high precision and accuracy at concentrations ranging between 1-500 μM . The selectivity of the developed sensors was successfully assessed by testing solutions containing MAP in combination other adulterants. As a result, five out of ten adulterants didn't interfere with MAP signal.

Promising results were obtained when the developed sensor was applied for testing twelve real samples. The obtained accuracy was about 92%.

The results obtained using SWV were compared with those obtained by GC-MS, GC-FID, Portable Raman and FT-IR. The electrochemical detection of MAP on the disposable graphene SPEs exhibited a similar performance to the FTIR device (92% vs 100% accuracy), and a net superior performance to the Raman.

1.4. Conclusions

This study introduces a novel electrochemical sensor using a GPH-based SPEs platform for the detection of MAP. The method offers cost advantages compared to existing techniques, with portability and a low detection limit of 300 nM. It proves a good selectivity in analyzing complex real samples, suggesting its adaptability for various illicit drug detection applications.

2. Study 2 – Chemometric analysis for the detection of four drugs of abuse

2.1. Introduction

To improve the decentralized drug testing and drug checking, the development of compact sensors that are sufficiently sensitive and selective, inexpensive, and amenable for mass production is required. However, due to the structural similarities between many drugs, especially in regards to the redox groups present, similar electrochemical fingerprints might be obtained. Unfortunately, this behaviour also occurs for cutting agents, particularly adulterants that are usually used in street samples, thus creating false positives results if not properly accounted for. Moreover, these electroactive adulterants might suppress or modify the specific electrochemical fingerprint (EF) of each illicit drug, thus creating false negative results (14).

In this study the potential of a voltammetric electronic tongue (ET) for the analysis of different drugs was evaluated. Moreover, the discrimination and identification of cocaine, MDMA, MAP and PVP in both synthetic and real samples was targeted.

2.2. Materials and methods

The experiments were performed using SPCEs as such, and modified with GPH and MWCNTs, and their responses towards the different drugs and some of the more common cutting agents and adulterants were assessed by means of SWV. The identification of the characteristic fingerprint of the selected drugs was performed through the chemometric interpretation of the voltammograms that were submitted to LDA.

2.3. Results and discussions

The first step was to analyze the voltammetric fingerprints of the different drugs with the considered sensor arrays with three types of platforms: graphite, CNT and GPH-based SPEs. Most drugs presented a single irreversible oxidation peak at different potential values depending on the tested platforms. To facilitate the interpretation of the above fingerprints and assess whether those are differentiated enough to discriminate the different drugs, principal component analysis (PCA) was used. Clear clustering for each of the drugs can be observed, confirming that different fingerprints are obtained. However, it has to be mentioned that in real scenarios, on the street, drugs are rarely found in such high purity, but adulterated (mixed) with different substances (known as cutting agents or adulterants).

Next, the drugs were analysed in combination with the most commonly found adulterants in street samples by using a supervised analysing method (LDA). To assess the performance of the LDA model, the confusion matrix for the test subset was built, achieving a percentage of classification success for the testing subset of 100%. Lastly, 35 real street samples containing five of the more common drugs in Spain were analyzed by using the LDA model. To evaluate its performance, the confusion matrix was also built, achieving a percentage of classification success for the testing subset of 100%. The efficiency of the classifier can also be evaluated in terms of sensitivity and to its specificity. The average values for the classes considered for those two metrics was 100% for both of them.

2.4. Conclusions

The above presented results demonstrate that the combination of an array of SPCEs, GPH and CNTs-based platforms with some pattern recognition methods such as LDA represents a promising approach for decentralized drug testing or drug checking.

3. Study 3 – nanoMIPs-based sensors for amphetamine detection from street samples

3.1. Introduction

AMF is a potent central nervous system stimulant, but in the same time an FDA approved treatment of narcolepsy and ADHD (15,16). The methods currently used by the authorities for AMF detection are GC-MS, LC-MS, HPLC, etc. Electrochemical sensors are a suitable alternative because of their simplicity, portability and fast response (13,17). However, AMF cannot be directly detected using electrochemical methods as it is not an electroactive compound. The objective of this study was to synthesize electroactive nanoMIPs for the selective and specific detection of AMF (18,19).

3.2. Materials and methods

nanoMIPs were produced by solid-phase synthesis. The nanoMIPs were immobilized onto carbon SPEs, and screen-printed platinum electrodes (SPPEs) respectively, by using graphene ink, electropolymerization with different polymers, and integration into a mixture of chitosan and nanoMIPs, and chitosan, nanoMIPs and

GPHOx respectively. Ferrocenylmethyl methacrylate was used as a transducer for the elaborated sensor and was incorporated in nanoMIPs allowing electrochemical detection. The electrochemical signal of the ferrocene was recorded by using DPV, and has proven to be dependent on the presence of AMF interacting with nanoMIPs. Real street samples were also tested by using this sensor and the results were compared with the results obtained by analyzing this samples with the help of UPLC-MS/MS method.

3.3. Results and discussions

The hydrodynamic diameter of the nanoMIPs was found to be about 269.6 ± 28 nm. The nanoMIPs deposited onto the SPEs with the help of graphene ink demonstrated a good sensitivity of $0.103 \mu\text{A/nM}$ in the linear range between 75 – 220 nM with a LOD of 62 nM. In the case of the deposition mixture containing nanoMIPs and chitosan the AMF was successfully detected in the linear range between 1 – 250 nM with a LOD of 0.3 nM. After adding GPHOx to the previous deposition mixture the obtain LOD was about 0.3 nM in the linear range between 1 – 200 nM. The selectivity of the sensors was assessed by testing solution mixtures containing both AMF and the most encountered illicit drugs, good recoveries being obtained.

This sensor was successfully tested with street samples, with high sensitivity and satisfactory recoveries (from 100.9% to 107.6%). These results were validated with UPL-MS/MS.

3.4. Conclusions

In conclusion we can affirm that nanoMIPs/graphene ink/ SPPEs sensors are suitable for industrial production due to the rapid preparation with the help a commercial printer. These sensors also exhibit a satisfactory stability, but on the other side their sensitivity is too low. On the contrary nanoMIPs/chitosan/GPHOx-based sensors possess higher sensitivity of AMF detection and can represent a suitable option for AMF detection from biological fluids. This approach will be investigated in future studies.

4. Study 4 – nanoMIPs-based sensor for MDMA detection from street samples

4.1. Introduction

MDMA is a stimulant synthetic drug of abuse that is frequently found in street samples, especially in “party pills”, but also in harbours and in clandestine laboratories. The current detection methods, that were already presented in the **Introduction** part are expensive, time-consuming and requires trained personeel.

The objective of this study was to develop a portable and highly sensitive nanoMIPs-based sensor for the specific detection of MDMA, even at low concentrations. The aim was to use this sensor for sensitive and selective detection of MDMA from street samples, even in the presence of commonly used adulterants.

4.2. Materials and methods

The sensor developd in this study utilized electroactive nanoMIPs computationally designed to recognize MDMA and then produced using solid-phase

synthesis. In addition, the inclusion of the monomer functionalized with ferrocene ensures the presence in the nanopolymer of the redox probe as a label, this being very useful because it allows the indirect detection of the target analyte through the variation of its oxidation signal, which proved to be dependent on the illicit drug concentration in the solution from which the analyte was captured. The electrochemical signal of the ferrocene was recorded by using DPV method. For the immobilization of nanoparticles onto the SPEs, a composite comprising chitosan, rGPHOx, and nanoMIPs was used.

Real street samples were also tested by using this sensor and the results were compared with the results obtained by analyzing these samples with the help of UPLC-MS/MS method.

4.3. Results and discussions

The developed sensor displayed a satisfactory sensitivity (106.8 nA/ μ M) in the linear range between 5 – 250 nM, with a LOD of 5.1 nM. The selectivity of the sensor was assessed by testing solutions containing MDMA in combination with other drugs of abuse and adulterants, that are frequently found in real street samples, good recoveries being obtained (78% - 96.5%)

Five real samples were also tested and the obtained results were compared with the ones obtained using UPLC-MS/MS, good recoveries being obtained (92% – 99%).

4.4. Conclusions

Herein, it was demonstrated that electroactive nanoMIPs can be designed, synthesized, and integrated into portable sensors. Thus, the designed nanoMIPs can selectively bind to MDMA with high affinity and specificity, representing a powerful tool for MDMA detection, as it can be used in various sensing technologies, including electrochemical sensors for illicit drugs detection.

THE ORIGINALITY AND THE INNOVATIONS OF THE THESIS

The thesis originality consists in the development of rapid and selective sensors and strategies for the electrochemical detection of less studied illicit drugs, such as MAP, MDMA, PVP, heroin, and ketamine.

A chemometric model was developed in these studies, representing a new approach in the illicit drugs assessment. The electrochemical tongue (ET), created through voltametric analysis and chemometric tools, represents a new and innovative detection method. While this method has been used in other domains, such as food detection, its application in forensic analysis has been limited. Additionally, the use of nanomaterials and their influence on the signal of illicit drugs signal was previously underexplored.

Street samples often contain illicit drugs, along with other complex substances introduced for various purposes. This complicated the direct electrochemical analysis

of the probe. Moreover, certain molecules like AMF cannot be detected effectively using direct electrochemical methods. In these studies, new and innovative nanoMIPs were computationally designed and synthesized for the selective binding and detection of AMF. The synthesis was performed using solid-phase synthesis method. An element of originality was introduced by incorporating ferrocene, which acts as a transducer, into the polymer matrix. Another novel aspect was the deposition method of nanoMIPs onto the SPEs achieved through a composite material consisting of chitosan and reduced GPHOx. A similar approach was used for the detection of MDMA, with the difference consists in the monomers used for nanoMIPs synthesis. These sensors represent a more effective tool for the rapid, on-site detection of captured illicit probes. These sensors have been successfully applied to detect illicit drugs from real street samples, demonstrating good selectivity and sensitivity.

Summing up, the studies presented in this thesis contribute significantly to the future development of novel electrochemical sensors and analytical devices. The novel nanomaterials and biomimetic components obtained, as well as the improvements made to existing ones, hold promise for the advancement of decentralized detection of illicit substance. Furthermore, they provide a strong foundation for potential clinical applications, serving as suitable tools for the detection of illicit drugs in biological fluids.

SELECTED REFERENCES

1. Fundamentals of Forensic Science - 2nd Edition [Internet]. [cited 2023 Apr 19]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/T/A/9780123749895>
2. Recommended Methods for the Identification and Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and their Ring-substituted Analogues in Seized Materials [Internet]. [cited 2023 May 3]. Available from: <https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/recommended-methods-for-the-identification-and-analysis-of-amphetamine--methamphetamine-and-their-ring-substituted-analogues-in-seized-materials.html>
3. Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials [Internet]. [cited 2023 May 3]. Available from: <https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/recommended-methods-for-the-identification-and-analysis-of-cocaine-in-seized-materials.html>
4. Dragan AM, Parrilla M, Feier B, Oprean R, Cristea C, De Wael K. Analytical techniques for the detection of amphetamine-type substances in different matrices: A comprehensive review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2021 Dec 1;145:116447.
5. Harper L, Powell J, Pijl EM. An overview of forensic drug testing methods and their suitability for harm reduction point-of-care services. *Harm Reduct J* [Internet]. 2017 Jul 31 [cited 2023 May 3];14(1):1-13. Available from: <https://harmreductionjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12954-017-0179-5>
6. Su L. Overview on the sensors for direct electrochemical detection of illicit drugs in sports. *Int J Electrochem Sci* [Internet]. 2022 [cited 2023 May 13];17:221260. Available from: www.electrochemsci.org

7. Muzetti Ribeiro MF, da Cruz Júnior JW, Dockal ER, Mccord BR, de Oliveira MF. Voltammetric Determination of Cocaine Using Carbon Screen Printed Electrodes Chemically Modified with Uranyl Schiff Base Films. *Electroanalysis* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2023 May 13];28(2):320–6. Available from: https://www.academia.edu/82111375/Voltammetric_Determination_of_Cocaine_Using_Carbon_Screen_Printed_Electrodes_Chemically_Modified_with_Uranyl_Schiff_Base_Films
8. Dragan AM, Truta FM, Tertis M, Florea A, Schram J, Cernat A, et al. Electrochemical Fingerprints of Illicit Drugs on Graphene and Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Front Chem*. 2021 Mar 16;9:67.
9. Truta F, Florea A, Cernat A, Tertis M, Hosu O, de Wael K, et al. Tackling the Problem of Sensing Commonly Abused Drugs Through Nanomaterials and (Bio)Recognition Approaches. *Front Chem*. 2020 Nov 4;8:880.
10. Garcia-Cruz A, Ahmad OS, Alanazi K, Piletska E, Piletsky SA. Generic sensor platform based on electro-responsive molecularly imprinted polymer nanoparticles (e-NanoMIPs). *Microsystems & Nanoengineering* 2020 6:1 [Internet]. 2020 Oct 19 [cited 2023 May 6];6(1):1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41378-020-00193-3>
11. Canfarotta F, Poma A, Guerreiro A, Piletsky S. Solid-phase synthesis of molecularly imprinted nanoparticles. *Nature Protocols* 2016 11:3 [Internet]. 2016 Feb 11 [cited 2023 May 6];11(3):443–55. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2016.030>
12. Refaat D, Aggour MG, Farghali AA, Mahajan R, Wiklander JG, Nicholls IA, et al. Strategies for Molecular Imprinting and the Evolution of MIP Nanoparticles as Plastic Antibodies—Synthesis and Applications. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Dec 2 [cited 2023 May 6];20(24). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/346940816/>
13. Alanazi K, Garcia Cruz A, Di Masi S, Voorhaar A, Ahmad OS, Cowen T, et al. Disposable paracetamol sensor based on electroactive molecularly imprinted polymer nanoparticles for plasma monitoring. *Sens Actuators B Chem*. 2021 Feb 15;329:129128.
14. Schwarzhoff R, Cody JT. The effects of adulterating agents on FPIA analysis of urine for drugs of abuse. *J Anal Toxicol* [Internet]. 1993 [cited 2023 Jun 1];17(1):14–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8429620/>
15. Berman SM, Kuczynski R, McCracken JT, London ED. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: A review. *Mol Psychiatry*. 2009;14(2):123–42.
16. Bramness JG, Gundersen ØH, Guterstam J, Rognli EB, Konstenius M, Løberg EM, et al. Amphetamine-induced psychosis - a separate diagnostic entity or primary psychosis triggered in the vulnerable? *BMC Psychiatry*. 2012;12.
17. Parrilla M, Felipe Montiel N, Van Durme F, De Wael K. Derivatization of amphetamine to allow its electrochemical detection in illicit drug seizures. *Sens Actuators B Chem* [Internet]. 2021;337(March):129819. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129819>
18. Alabadi MH, Truta FM, Adamu G, Cowen T, Tertis M, Drăgan AM, et al. Integration of smart nanomaterials for highly selective disposable sensors and their forensic applications in amphetamine determination. *Electrochim Acta*. 2023 Apr 1;446:142009.
19. Graham SP, El-Sharif HF, Hussain S, Fruengel R, McLean RK, Hawes PC, et al. Evaluation of Molecularly Imprinted Polymers as Synthetic Virus Neutralizing Antibody Mimics. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019 May 24;7:115.