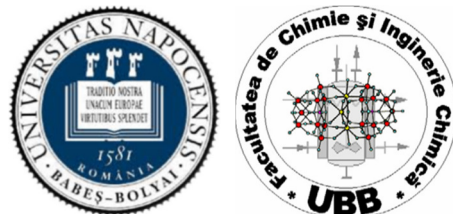


UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
CLUJ-NAPOCA



ELECTROD MODIFICAT CU HEMINĂ PENTRU
DETECȚIA AMPEROMETRICĂ A H₂O₂
TEZĂ DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. IONEL CĂTĂLIN POPESCU

DOCTORAND
SZEKELY GEORGETA MARIA
(CĂS. MARES)

-2014-

CUPRINS

CUPRINS	2
<i>Cuvinte cheie:</i>	4
LISTA DE SIMBOLURI ȘI ABREVIERI	5
INTRODUCERE.....	7
PARTEA I. INFORMARE BIBLIOGRAFICĂ.....	9
II. ELECTROZI MODIFICAȚI.....	9
II. BIOSENZORI	11
II.1. Generalități despre biosenzori	11
II.2. Clasificarea biosenzorilor	13
II.3. Tehnici de imobilizare a modificadorului/elementului biologic	17
II.4. Caracteristicile și calitățile necesare ale unui biosenzor	20
II.5. Utilizarea biosenzorilor	24
III. TRADUCTORI BAZAȚI PE ELECTROZI MODIFICAȚI CU.....	27
FILME POLIMERICE	27
III.1. Substratul electrodic	27
III.1.1. Materiale convenționale și neconvenționale pentru substratul electrodic	28
III.2. Electrozi modificați cu filme polimerice.....	36
III.2.1. Modificarea electrozilor cu filme polimerice.....	37
III.2.2. Etapele polimerizării electrochimice.....	38
III.2.3. Monomeri utilizați în polimerizarea electrochimică	39
III.2.4. Proprietățile filmului polimeric.....	42
III.2.5. Comportamentul electrozilor modificați cu straturi polimerice.....	43
IV. MEDIATORI UTILIZAȚI ÎN REALIZAREA DE.....	45
BIOSENZORI AMPEROMETRICI.....	45
IV.1. Electrocataliza: definiție și caracteristici	45
IV.2. Tipuri de electrocataliză.....	46
IV.2.1. Electrocataliza directă	46
IV.2.2. Electrocataliza mediată	47
IV.3. Mediatori – Generalități	48
IV.4. Hemina ($C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$).....	50
PARTEA II. CONTRIBUȚII ORIGINALE	53
Obiectivele cercetărilor	53
Metode de investigare	53

A.	Voltametria ciclică	55
B.	Voltametria de undă pătrată	60
C.	Amperometria/ Cronoamperometria	60
D.	Electrodul disc-rotitor (EDR)	62
	Aparatură	63
	Reactivi și soluții	64
V.	ELECTROD MODIFICAT G/Hm	65
V.1.	Preparare	65
V.2.	Influența vitezei de baleiaj/frecvenței asupra semnalului voltametric al electrodului modificat G/Hm	65
V.3.	Influența pH-ului	69
V.4.	Stabilitatea electrodului G/Hm	73
V.5.	Detecția H ₂ O ₂ cu electrodul G/Hm	77
V.6.	Concluzii	79
VI.	ELECTROD MODIFICAT CU Hm ÎNCORPORATĂ ÎN FILM DE POLIMERI FENOLICI OBȚINUȚI PRIN ELECTROPOLIMERIZARE	80
VI.1.	Filme de polimer obținute prin electropolimerizare	80
VI.2.	Reactivi și soluții	81
VI.3.	Măsurători electrochimice	82
VI.4.	Prepararea electrozilor: G/Hm-Res, G/Hm-Cat, G/Hm-HQ	82
VI.5.	Mecanisme posibile de înglobare a Hm în filmele de polimeri	86
VI.6.	Influența vitezei de baleiaj asupra semnalului voltametric al electrodului modificat G/Hm-Res, G/Hm-Cat și G/Hm-HQ	90
VI.7.	Studiul procesului de imobilizare a Hm în filmele polimerice de	94
	Cat și HQ	94
VI.8.	Studiul proprietății electrocatalitice a electrozilor G/Hm-Res, G/Hm-Cat și G/Hm-HQ pentru electroreducerea H ₂ O ₂ și a nitriților	99
VI.8.1.	Electroreducerea H ₂ O ₂	99
VI.8.2.	Electroreducerea nitriților	102
VI.9.	Concluzii	106
VII.	BIOSENZOR AMPEROMETRIC PE BAZĂ DE HRP și Hm	107
VII.1.	Enzime	107
VII.2.	Peroxidaze	108
VII.3.	Biosenzor amperometric conținând: Hm, Chit, HRP și Ga	111
VII.3.1.	Reactivi și soluții	111
VII.3.2.	Aparatură și condiții experimentale	112
VII.4.	Biosenzorul G/Hm/HRP	113
VII.4.1.	Prepararea biosenzorului G/Hm/HRP	113

VII.4.2. Măsurători electrochimice	114
VII.5. Modalități de imobilizare a Hm și HRP	115
VII.5.1. Depunerea modificatorilor în trei straturi: G/Hm/HRP/Chit/Ga și.....	115
G/Hm/Chit/HRP/Ga	115
VII.5.1.1. Preparare	115
VII.5.1.2. Detecția amperometrică a H ₂ O ₂	116
Chitosanul (Chit) și Glutaraldehida (Ga)	118
VII.5.2. Depunerea modificatorilor în două straturi: G/Hm-HRP/Chit/Ga.....	120
și G/Hm/HRP-Chit/Ga	120
VII.5.2.1. Preparare	120
VII.5.2.2. Detecția amperometrică a H ₂ O ₂	121
VII.5.3. Depunerea modificatorilor într-un strat: G/Hm-HRP-Chit/Ga.....	126
VII.5.3.1. Preparare	126
VII.5.3.2. Detecția amperometrică a H ₂ O ₂	127
VII.6. Concluzii	129
VIII. ELECTROD MODIFICAT DE Au/L-Cys/Hm	130
VIII.1. Reactivi și soluții	131
VIII.2. Prepararea electrodului modificat de Au/L-Cys/Hm.....	131
VIII.3. Aparatură	132
VIII.4. Rezultate și discuții	132
VIII.5. Comportamentul electrochimic al electrodului Au/L-Cys/Hm	135
VIII.5.1. Influența vitezei de baleiaj / frecvenței	135
VIII.5.2. Influența pH-ului	140
VIII.5.3. Determinarea pK _a respectiv k _s	142
VIII.6. Concluzii	144
CONCLUZII GENERALE	145
Lista rezultatelor diseminate	147
Lista participărilor la manifestări științifice naționale și internaționale.....	147
Lista lucrărilor publicate	148
BIBLIOGRAFIE	149
MULȚUMIRI.....	179

Cuvinte cheie: Hemină, peroxidază, chitosan, L-cisteină, voltametrie ciclică, voltametrie de undă pătrată, sistem auto-asamblat, biosenzor, nitrit, peroxid de hidrogen, electrod modificat electropolimerizare.

INTRODUCERE

Progresul cercetării impune existența unor metode cât mai performante, care să permită determinarea cu precizie a speciilor monitorizate (Popescu I. C. 1996; Murray R.W. 1992). Pe un loc important printre instrumentele folosite pentru această monitorizare se află electrozii modificați (EM), folosiți în domenii ce includ electrocataliza, electrosinteza și electroanaliza.

Unul dintre cele mai interesante domenii ale cercetării electrochimice pare a fi studiul structurii interfeței solid/electrolit și a proceselor care au loc la nivel atomic sau molecular (Bard A.J., Faulker L.R. 1980). Imobilizarea deliberată a diferitelor substanțe pe suprafața electrozilor se realizează cu intenția ca electrozii obținuți să prezinte o combinație dintre proprietățile materialului de electrod utilizat și cele caracteristice speciilor chimice imobilizate (Murray R.W. 1984).

O importantă proprietate a EM o constituie abilitatea acestora de a cataliza oxidarea sau reducerea unor specii chimice de interes practic, procese care, din cauză că pe electrozii convenționali se desfășoară cu suprapotențiale mari, sunt susceptibile la interferențe. Această caracteristică oferă EM o largă aplicabilitate, îndeosebi în domeniul detecției amperometrice a unor specii cu importanță biologică. Compușii redox imobilizați pe suprafața electrodului, facilitează cuplajul redox între acesta și centrul activ din numeroși compuși biologici cu rol important în diverse procese biochimice. Aceasta explică, în parte, și interesul declanșat de introducerea EM în bioelectrochimie, interes exemplificat și prin folosirea acestora ca interfețe electrochimice în realizarea de *biosenzori* (Spiridon I. 2004; Mateescu M. *et al.* 2004). Materialul biologic, cu grad înalt de selectivitate, joacă rol de receptor în sistemul analitic de detecție fiind sursă de informații referitoare la comportamentul materialului biologic, mecanismele de interacție intermoleculară și de transfer de sarcină în cadrul sistemelor biologice.

Ca matrici de susținere pentru biosenzori se folosesc frecvent polimerii conductori. Fiind în același timp biocompatibili, pot fi folosiți în soluții neutre, în condițiile necesare pentru asigurarea activității enzimei. Este exploatabilă de asemenea, proprietatea acestor polimeri de a putea fi depuși electrochimic pe electrozi în prezența diverselor specii biologice.

Merită remarcat faptul că, apariția EM a dinamizat cercetările spre realizarea de sisteme destinate analizei simultane a mai multor specii chimice, sisteme caracterizate de consum redus de reactivi și energie, având un grad ridicat de autonomie.

PARTEA I. INFORMARE BIBLIOGRAFICĂ

IV. MEDIATORI UTILIZAȚI ÎN REALIZAREA DE BIOSENZORI AMPEROMETRICI

Mediatorii sunt substanțe cu masa moleculară mică, naturale sau artificiale, care au o mare diversitate de structuri, proprietăți și valori ale potențialului redox. În procesul de transfer de electroni între centrul activ al enzimei și electrod, mediatorul este ciclat între forma oxidată și cea redusă; au rol de “navetă de electroni” între centrii activi ai sustratului/enzimei și cei ai electrodului, contribuind la stabilirea unui flux efectiv și eficient de electroni spre electrod.

IV.4. Hemina ($C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$)

Hemina sau fier (III) protoporfirina IX, conține în moleculă în locul atomilor de hidrogen din grupele -CH ale nucleelor pirolice, patru grupe metil, două grupe vinil și două resturi de acid propionic. În Figura 10 este prezentată structura heminei conform datelor <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=hemin>, consultat în 27 martie 2014.

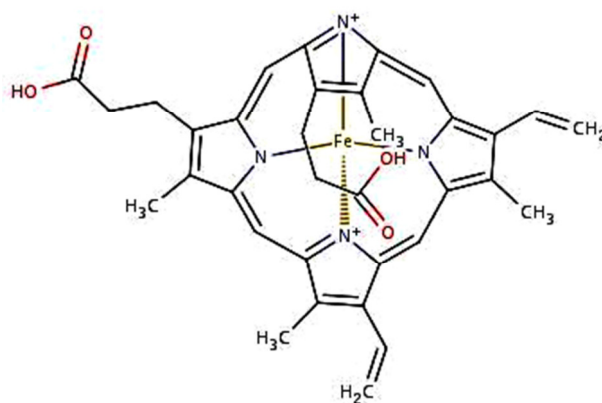


Figura 10. Structura heminei

În centrul moleculei se află ionul Fe^{3+} legat complex de cei patru atomi de azot. Cele două sarcini negative ale ionului de porfirină $C_{34}H_{32}O_4H_4^{2-}$ sunt repartizate uniform asupra celor patru atomi de N. Sarcina pozitivă rămasă la Fe este compensată de anionul Cl^- , printr-o legătură ionică. Comportamentul deosebit al heminei se datorează prezenței Fe^{3+} care se poate reduce la Fe^{2+} și a legăturilor duble, care fac posibilă extinderea conjugării.

Datorită prezenței cuplului redox $Fe(III)/Fe(II)$, **hemina** (Mares G. M. *et al.* 2013;

Zheng N. *et al.* 2002; Ye J. S. *et al.* 2004; Gao Y., Chen J. 2005; Zejli H. *et al.* 2010; Chen J. *et al.* 2011; Xu J. B. *et al.* 2012; Hasebe Y., Wang Y. 2013; Aoki K. J. *et al.* 2014; Varma S. 2002; Guo Y *et al.* 2011; Valentini F. *et al.* 2012; Ma S.-H. *et al.* 2013; Zhang Y. *et al.* 2013; Sun R. *et al.* 2014; Zhang F.-T. *et al.* 2014; Nan C. G. *et al.* 2002; Ma Q. *et al.* 2010; de Groot M. T. *et al.* 2005; Santos R. M. *et al.* 2013) manifestă o remarcabilă activitate electrocatalitică, exploatată cu succes în electroreducerea mediată a unor oxidanți, cum ar fi: **oxigen** (Gao Y., Chen J. 2005; Zejli H. *et al.* 2010; Chen J. *et al.* 2011; Xu J. B. *et al.* 2012; Hasebe Y., Wang Y. 2013; Aoki K. J. *et al.* 2014); **nitrit** (Valentini F. *et al.* 2012; Dai Z. *et al.* 2004; Feng J. J *et al.* 2006; Xu Y., Hu C., Hu S., 2008); **oxid de azot** (de Groot M. T. *et al.* 2005; Santos R. M. *et al.* 2013; Dai Z. *et al.* 2004); **peroxid de hidrogen** (Song H. 2013 ; Chen J. *et al.* 2011; Varma S. 2002; Guo Y *et al.* 2011; Valentini F. *et al.* 2012; Ma S.-H. *et al.* 2013; Zhang Y. *et al.* 2013; Sun R. *et al.* 2014; Zhang F.-T. *et al.* 2014; Han X. *et al.* 2002; Han X. *et al.* 2002; Dai Z. *et al.* 2004; Feng J. J. *et al.* 2006; Xu Y. *et al.* 2008; Kafi A. K. M. *et al.* 2007; Mares G. M. *et al.* 2013); **glucoză** (Guo Y. *et al.* 2011); fenol (Sun R. *et al.* 2014; Neto J. R. M. *et al.* 2011); **triptofan** (Zhang Y. *et al.* 2013; Nan C. G. *et al.* 2002); **acid ascorbic, acid uric și dopamină** (Zhang Y. *et al.* 2013); **L-tirozină** (Ma Q. *et al.* 2013); **nitrozamine, acetanilidă, sulfonamide, unele medicamente oxidante**, etc.

PARTEA II. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Obiectivele cercetărilor

Obiectivele de bază urmărite în activitatea de cercetare și implicit în realizarea prezentei teze au fost:

- (i) Imobilizarea heminei (Hm) pe suprafața unui electrod de grafit (G) sau de aur (Au) folosind diferite tehnici: adsorbție chimică, legare covalentă și înglobarea în chitosan sau polimeri fenolici obținuți prin electropolimerizarea catecolului, rezorcinei sau, hidrochinonei;
- (ii) Obținerea unui biosenzor amperometric enzimatic pe bază de peroxidază (HRP);
- (iii) Caracterizarea electrochimică a electrozilor modificați obținuți; determinarea parametrilor cinetici și analitici;
- (iv) Optimizarea structurii electrozilor modificați și urmărirea stabilității lor;
- (v) Utilizarea electrozilor modificați obținuți pentru detecția unor specii de interes practic (H_2O_2 și NO_2^-).

Reactivi și soluții

Au fost preparate soluții stoc: 5 mM de Hm ($3.25\mu\text{g}/\mu\text{L}$) în soluție de tampon TRIS; soluție stoc de HRP ($10\mu\text{g}/\mu\text{L}$); soluție de Chit ($10,67\mu\text{g}/\mu\text{L}$) în acid acetic (HAc) 0.1%; soluție de Ga 2,5%; tampon TRIS de concentrație 0.05M pH 10; tampon fosfat (TF) 0.1M pH 7; H_2O_2 10^{-2}M ; 0.1M de azotit de sodiu (NaNO_2); 5 mM Hm dizolvată în tampon TRIS 5 mM (pH 10) și 5 mM monomer (Cat, Res, HQ); pH-ul soluției finale a fost 8.6 (ajustat cu HCl); L-Cys 2 mM în alcool etilic.

Straturile de modificatori sunt aplicate cu micropipeta ($5\ \mu\text{L}$) iar în cazul electropolimerizării din amestec de monomer și Hm.

Grafitul respectiv firul de Au sunt curățați în prealabil, după protocolul cunoscut.

V. ELECTROD MODIFICAT G/Hm

V.2. Influența vitezei de baleiaj/frecvenței asupra semnalului voltametric al electrodului modificat G/Hm

Electrodul modificat G/Hm a fost investigat prin voltametrie ciclică (CV) și voltametrie de undă pătrată (SWV). Voltamogramele sunt redată în Figura 19.

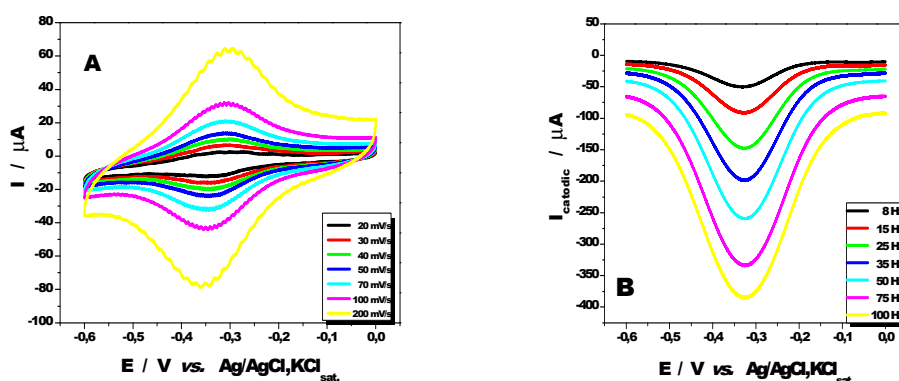


Figura 19. Voltamograma ciclică (A) și cea de undă pătrată (B) pentru electrodul modificat G/Hm. Condiții experimentale: soluție tampon fosfat 0.1M pH 7.02, soluție deaerată (Ar); potențial inițial 0 V vs. Ag/AgCl, $\text{KCl}_{\text{sat.}}$; (A) CV: diferite viteze de baleiaj (B) SWV: amplitudine 20mV, diferite frecvențe.

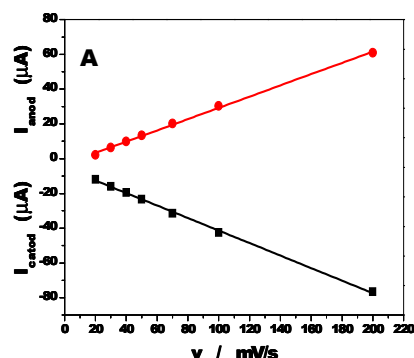


Figura 20. Dependența intensității curentilor de pic I_{anod} și I_{catod} de viteza de baleiaj pentru electrodul modificat G/Hm. Condiții experimentale: soluție tampon fosfat 0.1M pH 7.02, soluție deaerată (Ar); potențial inițial 0 V vs. Ag/AgCl,KCl_{sat.}.

La creșterea vitezei de baleiaj picurile se îndepărtează și potențialele de pic se deplasează spre valori absolute mai mari, sugerând un proces electrochimic cvasi-reversibil.

Atât din măsurătorile de CV, cât și din cele de SWV (Figura 21) rezultă în mod clar că răspunsul voltametric al electrodului G/Hm corespunde unui cuplu redox (Hm) imobilizat pe suprafața electrodului. Intensitatea curentului de pic variază liniar cu viteza de baleiaj/frecvența. Din voltamograma ciclică înregistrată la viteza de baleiaj de 50mV/s (Figura 19A) a fost evaluată valoarea potențialului standard formal [$E^{0'} = (E_{p,a} + E_{p,c})/2$, unde $E_{p,a}$ și $E_{p,c}$ sunt potențialele de pic anodic respectiv catodic] pentru cuplul redox al heminei.

Valoarea potențialului standard formal obținută prin calcul (-0.33V vs. Ag/AgCl,KCl_{sat.}) din date CV este în bună concordanță cu valoarea raportată (-0.34V vs. Ag/AgCl,KCl_{3M}) pentru hemină (Ye J.- S. *et al.* 2004).

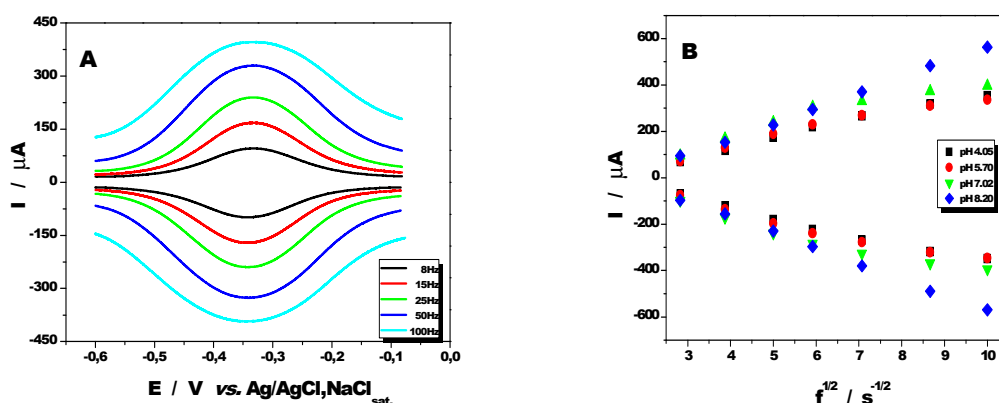


Figura 21. Voltamograma de undă pătrată (A) și dependența intensității curentului de pic anodic ($I_{p,a}$) și catodic ($I_{p,c}$) de rădăcina patrată a frecvenței (B) pentru electrodul modificat G/Hm. Condiții experimentale: soluție tampon fosfat 0.1M pH 7.02, soluție deaerată (Ar); potențial inițial 0 V vs. Ag/AgCl,KCl_{sat.}; amplitudine 20 mV, diferite frecvențe și pH.

Distanța între potențialele de pic anodic și catodic $\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c}$ este de 0.034V și valoarea raportului $I_{p,a}/I_{p,c} = 0.955$ (foarte apropiată de 1), la 50 mV/s (pH 7.02) respectiv valorile pantelor reprezentărilor $\log(I_p) - \log(v)$ apropiată de 1, confirmă adsorbția Hm pe suprafața electrodului de grafit, iar procesul redox investigat este unul cvasi-reversibil (Santos R. M. *et al.* 2013; Bart J. A., Faulker L. R. 1980).

Măsurătorile SWV confirmă faptul că hemina este imobilizată pe suprafața electrodului și se comportă după modelul speciilor redox adsorbite (Figura 21).

Tabel 12. Panta dreptei $\log I_p$ vs. $\log v$ pentru electrodul G/Hm (CV), pH 7.02.

Proces redox	Panta	R / Nr. pct. experim.
anodic	1.18 ± 0.05	0.990 / 6
catodic	0.82 ± 0.02	0.997 / 7

V.3. Influența pH-ului

În intervalul de pH 4-8, dependența $E^0 = f(\text{pH})$ este liniară, panta având valoarea de: CV: $(-0.041 \pm 0.005) \text{ V/pH}$, ($R = 0.962$ și $n = 4$); SWV: $(-0.033 \pm 0.001) \text{ V/pH}$, ($R = 0.99$ și $n = 4$), valori mai mici decât valoarea așteptată pentru un proces redox implicând transfer de $1e^-/1H^+$ (0.059 V/pH). Acest comportament a mai fost observat în cazul heminei (Sun J.-J. *et al.* 2011; Baron C. P., Andersen H. J. 2002).

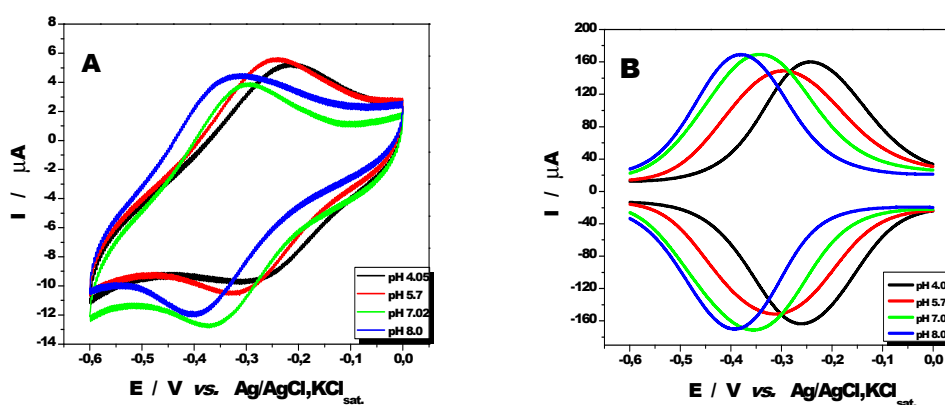


Figura 22. Influența pH-ului asupra răspunsului voltametric al electrodului modificat G/Hm în CV (A) și SWV (B). Condiții experimentale: soluție tampon fosfat 0.1M, soluție deaerată (Ar); potențial inițial, 0 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat}; viteza de baleiaj, 20 mV/s (A); frecvența 25Hz, amplitudine 20 mV (B).

Tabelul 15. Valorile parametrilor de pic anodic și catodic obținute din voltamogramele ciclice și de undă pătrată, la diferite valori de pH; v 20mV/s (CV); f 25Hz (SWV) amplitudine 20mV; f 100Hz amplitudine 50mV, pentru electrodul G/Hm.

	pH	E _c (V)	E _a (V)	ΔE _p (V)	E ^{0'} (V)
CV 20mV/s	4.05	-0.3131	-0.2179	0.0952	-0.2655
	5.70	-0.3346	-0.2408	0.0938	-0.2877
	7.02	-0.3703	-0.2921	0.0780	-0.3310
	8.0	-0.3960	-0.3104	0.0856	-0.3530
SWV 20mV 25Hz	4.05	-0.2626	-0.2417	0.0209	-0.25215
	5.70	-0.3142	-0.2957	0.0185	-0.30495
	7.02	-0.3566	-0.3447	0.0119	-0.35065
	8.0	-0.3896	-0.3793	0.0102	-0.38445

Din măsurătorile de SWV, efectuate la pH 7, amplitudine 50 mV, s-a estimat valoarea constantei eterogene de transfer de sarcină k_s , obținându-se valoarea de $(0.3612 \pm 0.02) s^{-1}$.

V.4. Stabilitatea electrodului G/Hm

După 30 cicluri complete, răspunsul voltametric al electrodului G/Hm arată o variație ne semnificativă, atât pentru picul anodic cât și pentru cel catodic. Variația în timp a gradului de acoperire a suprafeței electrodului arată că hemina este puternic adsorbită pe suprafața electrodului de grafit. Datele cuprinse în Tabelul 16 și 18 sintetizează variația în timp scurt/lung a gradului de acoperire pentru răspunsul voltametric înregistrat în voltametrie ciclică (CV) pentru electrodul G/Hm iar. Tabelul 18 sintetizează variația pe timp lung a parametrilor de pic.

Tabelul 16. Stabilitatea pe termen scurt pentru electrodul G/Hm.

Timp (s)	Γ _c (nmol/cm ²)	Γ _a (nmol/cm ²)	ΔΓ _c (%)	ΔΓ _a (%)
240	76.6	128	0.53	0.08
480	76.8	135	0.79	4.65
720	76.5	130	0.39	0.08

$$\Delta\Gamma_c = 100(\Gamma_{c,t} - \Gamma_{c,t=48})/\Gamma_{c,t=48}; \Delta\Gamma_a = 100(\Gamma_{a,t} - \Gamma_{a,t=48})/\Gamma_{a,t=48}$$

Tabel 18. Variația pe termen lung a parametrilor de pic pentru răspunsul voltametric al electrodului modificat G/Hm.

ΔI _{ap} (%)	ΔI _{cp} (%)	ΔΓ _c (%)	ΔΓ _a (%)	ΔE _p (mV)	I _{ap} /I _{cp}
7.6	2.4	6.5	9.3	23	1.15

$$\text{unde: } \Delta I_{cp} = 100(I_{cp, t=305} - I_{cp, t=0})/I_{cp, t=0}; \Delta I_{ap} = 100(I_{ap, t=305} - I_{ap, t=0})/I_{ap, t=0}$$

$$\Delta\Gamma_c = 100(\Gamma_{c,t=305} - \Gamma_{c,t=0})/\Gamma_{c,t=0}; \Delta\Gamma_a = 100(\Gamma_{a,t=305} - \Gamma_{a,t=0})/\Gamma_{a,t=0}$$

După o utilizare continuă timp de 2 ore, valoarea curentului catodic scade cu 2.01%, iar după 5 ore cu 2.74% din valoarea inițială. Datele din literatură confirmă comportamentul observat, comportament determinat de insolubilitatea heminei în mediu neutru și acid (Zheng N. *et al.* 2002) asociată cu o puternică interacțiune de tip π - π între hemină și grafit (Wang X. *et al.* 2002). Păstrarea electrodului se face în atmosferă saturată cu electrolit suport, la temperatura de 4°C. Valorile numerice susțin stabilitatea bună a electrodului modificat G/Hm.

V.5. Detecția H₂O₂ cu electrodul G/Hm

Electrodul modificat G/Hm, poate fi folosit pentru detecția H₂O₂; Hm acționează ca mediator redox pentru electroreducerea H₂O₂, prin intermediul ionului Fe(II)/Fe(III), așa cum reiese din schema de mai jos (Varvari L., Popescu I. C. 2010):

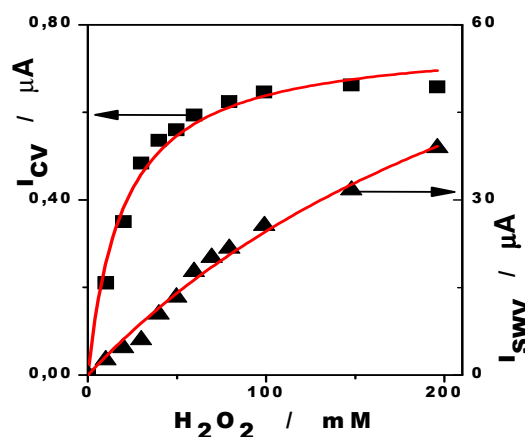
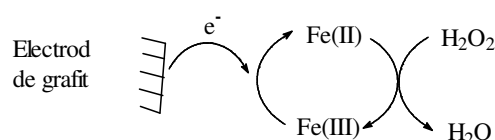


Figura 27. Curbele de calibrare pentru H₂O₂ folosind electrodul G/Hm obținute din CV și SWV. Condiții experimentale: electrolit suport, tampon fosfat 0.1 M (pH 7.0); potențial inițial, -0.6 V *vs.* Ag/AgCl, KCl_{sat.}, viteza de baleiaj 20 mV/s (CV); 0 mV *vs.* Ag/AgCl, KCl_{sat.}; amplitudine 20 mV; frecvența 25 Hz (SWV); soluție deaerată (Ar).

Analizând valorile parametrilor cinetici și analitici centralizate în tabelul 19, se observă faptul că, datele obținute în SWV sunt considerabil mai mari decât în CV (atât pentru parametri cinetici cât și pentru cei analitici). O explicație ar putea fi sensibilitatea mai înaltă de care dispune tehnica SWV (Mares G.M. *et al.* 2013).

Tabel 19. Parametrii analitici și cinetici pentru electrodul modificat G/Hm.

Metoda	CV	SWV
Parametri	Fitare Michaelis-Menten	
I_{\max} (μA)	0.77 ± 0.02	101 ± 16.1
K_M^{app} (mM)	20.2 ± 2.5	311 ± 68.3
Sensibilitate (mA/M)	0.038	0.325
R / N	0.9836 / 11	0.9861 / 12
	Fitare liniară	
Panta (A/mM)	16.0 ± 1.3	276.3 ± 11.9
Limita de detecție /mM	0.011	0.012
Domeniul linear (mM)	10 - 40	10 - 80
R / N	R = 0.979 / n = 5	R = 0.993 / n = 9

$$*\text{Sensibilitate} = I_{\max}/K_M^{\text{ap}}$$

VI. ELECTROD MODIFICAT CU Hm ÎNCORPORATĂ ÎN FILM DE POLIMERI FENOLICI OBȚINUȚI PRIN ELECTROPOLIMERIZARE

VI.4. Prepararea electrozilor: G/Hm-Res, G/Hm-Cat, G/Hm-HQ

În figurile 28-30 sunt prezentate voltamogramele ciclice pentru obținerea filmelor de polimer în absența și în prezența heminei.

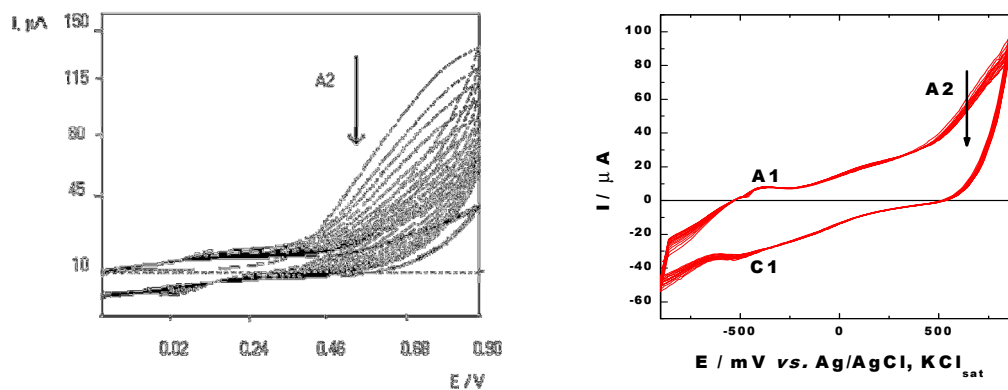


Figura 28. Voltamogramele ciclice corespunzătoare obținerii electrozilor modificați G/Res (negru) și G/Hm-Res (roșu). Condițiile experimentale: 10 ml soluție 5 mM Res în tampon TRIS (negru); 10 ml soluție ce conține: 5 mM Hm + 5 mM Res în tampon TRIS 5 mM (pH 10), pH soluție finală 8.6 (ajustare cu HCl) (roșu); viteza de baleiaj 100 mV/s, 30 cicluri între $-0,9 - +0,85$ V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} ; deaerare cu Ar; temperatura, $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

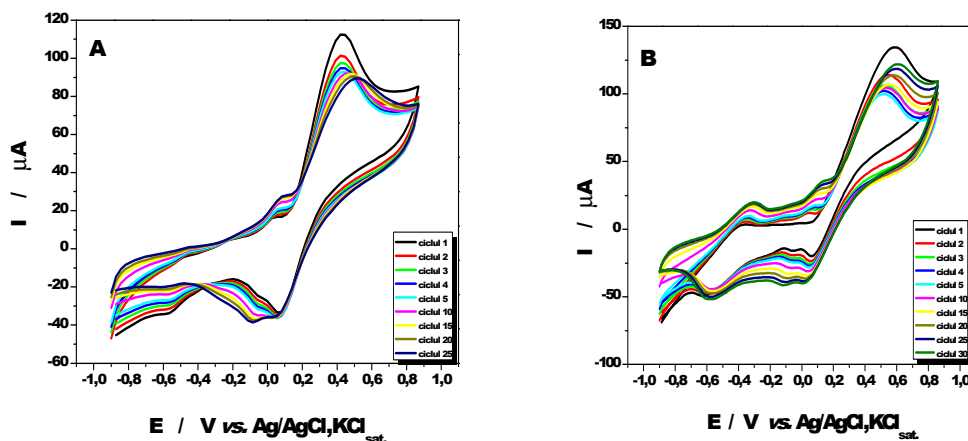


Figura 29. Voltamogramele ciclice corespunzătoare obținerii electrozilor modificați G/Cat (A) și G/Hm-Cat (B). Condițiile experimentale: 10 mL soluție 5 mM Cat în tampon TRIS 5 mM (pH 10) (A); 10 mL soluție conținând: 5 mM Hm + 5 mM Cat în tampon TRIS 5 mM (pH 10), pH soluție finală 8.6 (ajustare cu HCl) (B); viteza de baleiaj 100 mV/s, 30 cicluri între – 0,9 – +0,85 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} ; deaerare cu Ar; temperatura, $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

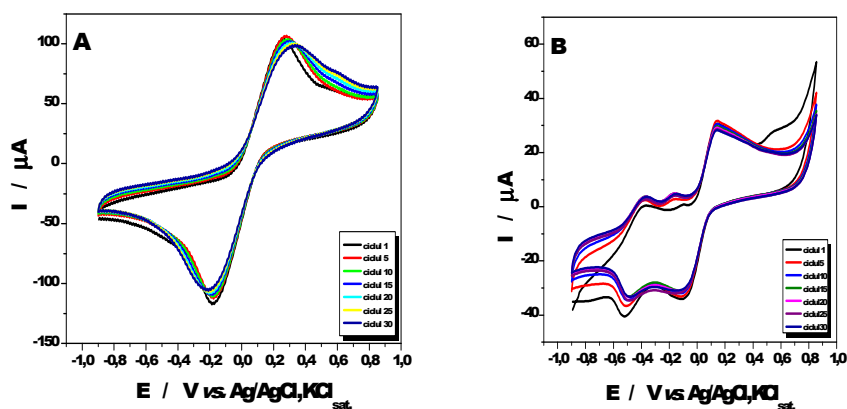


Figura 30. Voltamogramele ciclice corespunzătoare obținerii electrozilor modificați G/HQ (A) și G/Hm-HQ (B). Condițiile experimentale: 10 mL soluție 5 mM HQ în tampon TRIS 5 mM (pH 10) (A); 10 mL soluție conținând: 5 mM Hm + 5 mM HQ în tampon TRIS 5 mM (pH 10), pH soluție finală 8.6 (ajustare cu HCl) (B); viteza de baleiaj 100 mV/s, 30 cicluri între – 0,9 – +0,85 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} , deaerare cu Ar, temperatura, $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Din figurile 28 (A) – 30 (A), se observă că intensitatea picului anodic observat în cazul Cat, Res și HQ scade în timpul ciclării potențialului, ceea ce indică formarea unui film de polimer neconductor. În prezența heminei în voltamogramele ciclice, Figurile 28 (B) – 30 (B), apar picul anodic și cel catodic, caracteristice heminei, ale căror intensități cresc în timpul ciclării potențialului electrodului.

VI.5. Mecanisme posibile de înglobare a Hm în filmele de polimeri

1. Oxidarea chimică a derivatului fenolic de către Fe(III) din hemină, urmată de polimerizarea benzochinonei obținute. (<http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/>; (Zen J. M., Chung H.-H., Kumar A.S. 2002; Nakabayashi Y., Wakuda M., Imai H. 1998).

2. Inițierea reacției de polimerizare prin formarea de radicali după modelul polimerizării fenolului (Chen X. *et al.* 2002 ; <http://intel.ucc.ie/sensors/Electropolym.htm>; Hrapovic S., Luong J. H. T. 2003; Sayyah S.M., *et al.* 2011; www.intechopen.com).

În ambele mecanisme, după inițierea polimerizării derivatului fenolic, este posibilă formarea de sisteme auto-organizate (layer-by-layer), bazate pe interacțiuni electrostatice între sarcina pozitivă a heminei și sarcina negativă a derivatului fenolic, așa cum sunt prezentate în literatură (Turdean G. L. *et al.* 2002; Cheng L., Dong S. 2000; McCormac T. *et al.* 2001). Potențialele perechilor de picuri pentru Hm, se deplasează în funcție de poziția –OH din derivatul hidroxifenolic, așa cum se observă în Tabelul 21.

Tabelul 21. Influența poziției –OH din derivatul fenolic asupra potențialelor de pic.

Tipul de electrod	Picul Hm			Picul polimerului		
	Ea (V _{vs. ER})	Ec (V _{vs. ER})	E°' (Ea+Ec)/2	Ea (V _{vs. ER})	Ec (V _{vs. ER})	E°' (Ea+Ec)/2
G/Cat	-	-	-	+0.42	+0.055	0.2375
G/Cat-Hm	-0.35	-0.560	-0.455	+0.48	+0.06	0.270
G/Res	-	-	-	+0.80	-	-
G/Res-Hm	-0.44	-0.51	-0.475	-	-	-
G/HQ	-	-	-	+0.30	-0.20	0.050
G/HQ-Hm	-0.40	-0.50	-0.450	+0.10	-0.10	0

VI.6. Influența vitezei de baleiaj asupra semnalului voltametric al electrodului modificat G/Hm-Res, G/Hm-Cat și G/Hm-HQ

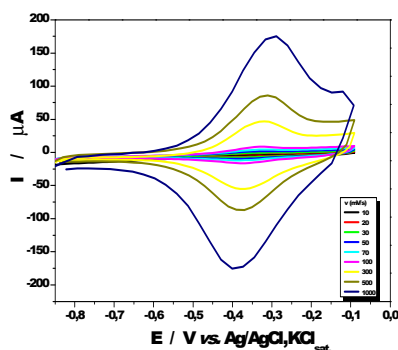


Figura 36. Influența vitezei de baleiaj asupra comportamentului electrochimic al Hm imobilizate într-un film de catecol depus pe un electrod de grafit. Condiții experimentale: soluție tampon fosfat 0.1 M, pH 8, potențial inițial -0.85 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} ; deaerare cu Ar; temperatura, $25 \pm 2^\circ C$.

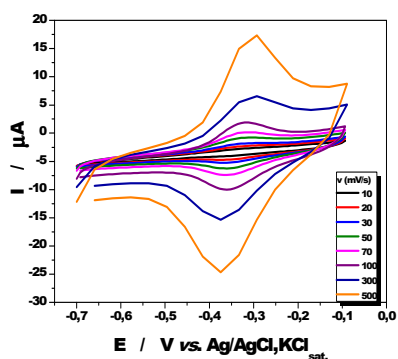


Figura 37. Influența vitezei de baleiaj asupra comportamentului electrochimic al Hm imobilizate într-un film de hidrochinonă depus pe un electrod de grafit. Condiții experimentale: soluție tampon fosfat 0.1 M, pH 8, potențial inițial, -0.85 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} ; deaerare cu Ar; temperatura $25 \pm 2^\circ C$.

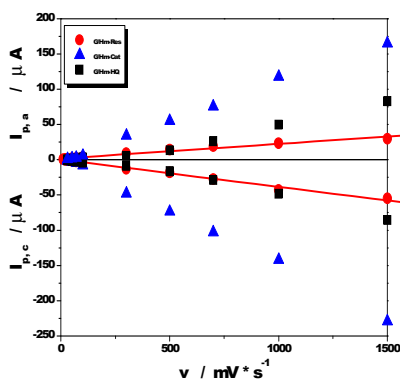


Figura 38. Dependența I_p vs. v pentru electrozii modificați G/Hm-Res (●), G/Hm-Cat (▲) și G/Hm-HQ (■). Condiții experimentale: soluție tampon fosfat 0.1 M, pH 8; potențial inițial -0.85 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} ; deaerare cu Ar; temperatura, $25 \pm 2^\circ C$.

Pentru toate tipurile de electrozi, dependențele $\log I$ vs. $\log v$ sunt liniare (tabelul 22) și au panta cuprinsă între 0,8 și 1,3 valori apropiate de valoarea teoretică (1), iar dependențele I vs. v trec prin origine (Figura 38), confirmând că specia redox studiată este adsorbită pe suprafața electrodului. În tabelul 22 sunt prezentați parametrii liniarizărilor $\log I$ vs. $\log v$.

Tabelul 22. Dependența I vs. v pentru diverse tipuri de electrozi

Tipul de electrod	Log I vs. Log v	R	Număr de puncte
G/Hm-Res	$\log I_{p,a} = -1.03 + 0.8 \log v$	0.997	11
G/Hm-Cat	$\log I_{p,a} = -7.9 + 1.3 \log v$	0.995	9
G/Hm-HQ	$\log I_{p,a} = -7.9 + 1.2 \log v$	0.986	9

VI.8. Studiul proprietății electrocatalitice a electrozilor G/Hm-Res, G/Hm-Cat și G/Hm-HQ pentru electroreducerea H_2O_2 și a nitriților

Proprietățile electrocatalitice ale atomului de Fe(III) din hemina înglobată în filme de catecol și de hidrochinonă, au fost investigate pentru reacția de reducere a unor specii de interes practic: apă oxigenată și nitriți.

VI.8.1. Electroreducerea H_2O_2

În prezența H_2O_2 de diferite concentrații, electrozii modificați realizați au prezentat un efectul electrocatalitic clar în reducerea peroxidului de hidrogen.

În literatura de specialitate, mecanismul după care are loc reducerea apei oxigenate în prezența heminei este următorul:

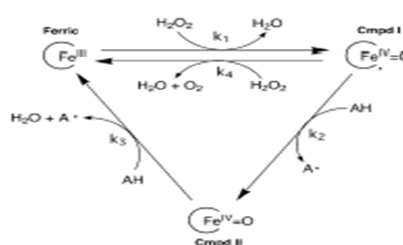
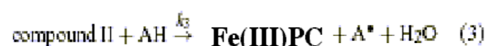


Figura 47. Ciclul catalitic de reducere a apei oxigenate și schema mecanismului de reacție.

Fe(III) din hemină se oxidează utilizând 2 electroni proveniți de la H₂O₂ pentru a forma un intermediar feril-oxo porfirin (Fe(IV)=O PC) cunoscut sub denumirea de Complex I (reacția 1, sensul direct). Ciclul se poate închide în două moduri:

- ❖ analog ciclului catalazei: prin reducerea complexului I de Fe(III) din hemină de către H₂O₂ și formarea oxigenului molecular (reacția inversă);
- ❖ analog ciclului peroxidazei: prin reducerea complexului I în două trepte succesive a câte 1 electron de către un substrat reducător exogen (A). Se generează 2 echivalenți de radical de substrat și hemina recuperează starea de Fe(III) prin intermediarul feril-oxo cunoscut sub denumirea de compusul II. (reacția 2 și 3, adică laturile triunghiului) (Li Y., Goodwin D. C. 2004; Laszlo J. A, Compton D. L. 2002).

VI.8.2. Electroreducerea nitriților

Reducerea nitriților are loc la un potential de pic peste $-0.70\text{ V vs. Ag/AgCl, KCl}_{\text{sat}}$, după mecanismul prezentat în literatura de specialitate. Primul pas în procesul catalitic implică formarea, în soluții apoase neutre, a unui complex fier-nitrosil, ca urmare a reducerii metalului central Fe (III)/Fe (II), urmată de legarea nitritului (picul plasat la $-0.45\text{ V vs. Ag/AgCl, KCl}_{\text{sat}}$), în concordanță cu mecanismul de mai jos:



unde: [FePC] simbolizează centrul fier hem.

Apoi urmează reducerea aductului fier-nitrosil (pic situat la $-0.750\text{ V vs. Ag/AgCl, KCl}_{\text{sat}}$), conform reacției:



Trebuie menționat că încă nu se poate caracteriza în detaliu procesul de reducere, deoarece în literatura de specialitate nu a fost stabilit un mecanism general pentru acest proces catalitic. (Mimica D., Zagal J. H., Bedioui F. 2001).

Valorile parametrilor de pic (potențial, intensitate), obținute din voltamogramele ciclice de reducere a H₂O₂ și NO₂⁻ sunt redată în Tabelul 29.

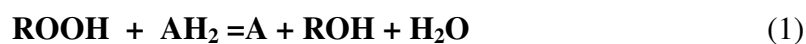
Tabelul 29. Valorile parametrilor de pic pentru electrocataliza H₂O₂ și NO₂⁻.

Analit	Concentrația (mM)	G/Hm-Res		G/Hm-Cat		G/Hm-HQ	
		E _c (V)	I _c (μA)	E _c (V)	I _c (μA)	E _c (V)	I _c (μA)
H ₂ O ₂	0	-0.182	-4,337	-0.157	-2,9053	-0.157	-4,229
	0.2	-0.207	-6,0155	-0.157	-5,505	-0.157	-5,264
	0.4	-0.266	-8,005	-0.157	-5,841	-0.157	-5,883
	0.8	-0.296	-1,0567	-	-	-	-
	0.9	-	-	-0.157	-8,133	-0.157	-8,157
NO ₂ ⁻	0	-0.753	-5.987	-0,710	-7.5043	-0.708	-4.1374
	0.01	-	-	-0,7104	-3.7475	-0.706	-5.0349
	0.1	-0.760	-6.9723	-0,7104	-9.5397	-0.709	-9.6460
	1	-0.784	-9.6147	-0,7104	-25.381	-0.716	-14.518

VII. BIOSENZOR AMPEROMETRIC PE BAZĂ DE HRP și Hm

VII.2. Peroxidaze

Peroxidazele formează un grup de enzime capabile să catalizeze eficient oxidarea diferitelor substraturi (AH₂-substrat reducător) de către compuși peroxo (ROOH):



Peroxidazele sunt omniprezente în organismele animale, plante și microorganisme, rolul lor fiziologic fiind important și foarte mult studiat (Bartonek-Roxa E., Holm C. 1999; Cherry J. R. *et al.* 1999; Duroux L., Welinder K. G., 2003; Folkes L. K., Wardman P. 2001).

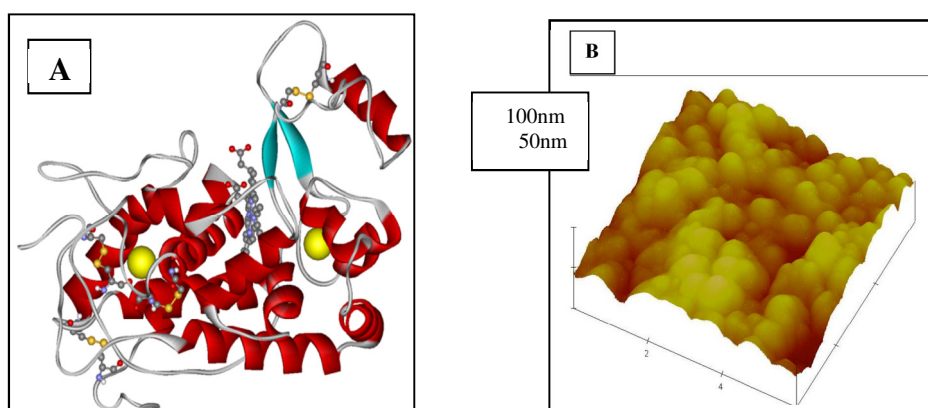


Figura 53. Structura spațială a HRP determinată prin cristalografie cu raze X conform datelor din Protein Data Bank (PDB); imaginea filmului de HRP prin microscopie de forță atomică (atomic force microscopy-AFM) (Armstrong F. A. *et al.* 1997; Rusling J. F., Z. Zhang 2003).

Peroxidaza din hrean **HRP** reprezintă prototipul acestui grup de enzime (Ahuja T. *et al.* 2007; Smeller László 2007; Smith A.T. 1990; Passardi F. *et al.* 2007; Folkes L. K. *et al.* 2002; Gaspar T. *et al.* 1982; Gaspar T. *et al.* 1992; Mittler R. 2002; Welinder K. G., 1992; Welinder K. G., Gajhed M. 1993; Welinder K.G. *et al.* 2002).

În condiții normale la pH cuprins între 5 și 10, HRP nativă prezintă o stabilitate remarcabilă pentru perioade lungi de timp. Din acest punct de vedere HRP este o enzimă ideală pentru aplicații analitice (Nagy G., Pungor E., 1988; Smeller L. 2007; Adányiné dr. Kisbódi N. 2003; Smeller L., Fidy J. 2002; Schlichter J. *et al.* 2001; Szigeti K. 2008).

Electrozii modificați pe bază de peroxidaze pot fi utilizați în detecția amperometrică a peroxidului de hidrogen, a unor peroxizi organici, a fenolilor și a aminelor aromatice, precum și a unor compuși nocivi (ex. cianuri), de la ioni anorganici până la compuși organici cu masa moleculară mare (Nagy G., Pungor E. 1988; Ahuja T. *et al.* 2007).

VII.3. Biosenzor amperometric conținând: Hm, Chit, HRP și Ga

S-a urmărit realizarea unui biosenzor amperometric pentru detecția H_2O_2 , pe bază de Hm, Chit, HRP și Ga (glutaraldehydă). În capitolele anterioare a fost prezentată posibilitatea imobilizării Hm pe electrod de grafit, atât prin simplă adsorbție cât și prin înglobare în chitosan respectiv polimeri dihidroxilici ai benzenului. În ambele cazuri s-a demonstrat posibilitatea utilizării electrozilor modificați obținuți în electroreducerea apei oxigenate.

VII.5.1. Depunerea modificatorilor în trei straturi: G/Hm/HRP/Chit/Ga și G/Hm/Chit/HRP/Ga

VII.5.1.2. Detecția amperometrică a H_2O_2

În tabelul 31 sunt centralizate valorile parametrilor cinetici pentru electrozii studiați.

Schimbarea ordinii de depunere a modificatorilor determină o scădere a sensibilității biosenzorului (de cca 30%), atunci când în structura matricei enzimatică stratul de chitosan acoperă stratul de HRP. Acest efect se poate explica prin faptul că stratul de chitosan acționează ca o barieră de difuzie în calea substratului. (Mares G.M. *et al.* 2013).

Tabelul 31. Valorile parametrilor cinetici corespunzători biosenzorilor G/Hm/Chit/HRP/Ga (A) și G/Hm/HRP/Chit/Ga (B).

Tipul liniarizării	$I_{\max.} / \mu\text{A}$	K_M / mM	$S=I_{\max.}/K_M$ ($\mu\text{A}/\text{mM}$)	R / n
Fitare MM (A)	0.82 ± 0.05	0.23 ± 0.03	3.6 ± 0.6	0.99 / 16
Lineweaver- Burk	0.9 ± 0.1	0.25 ± 0.04	3.6 ± 0.1	0.99 / 23
Eadie-Hofstee	0.84 ± 0.06	0.24 ± 0.03	3.5 ± 0.6	0.97 / 12
Hanes-Woolf	0.83 ± 0.06	0.23 ± 0.03	3.6 ± 0.2	0.99 / 13
Fitare MM (B)	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.2	1.9 ± 0.8	0.98 / 20
Lineweaver-Burk	0.8 ± 0.1	0.30 ± 0.06	2.7 ± 0.1	0.99 / 24
Eadie-Hofstee	0.57 ± 0.06	0.20 ± 0.03	2.9 ± 0.8	0.94 / 9
Hanes-Woolf	0.74 ± 0.09	0.30 ± 0.07	2.5 ± 0.3	0.96 / 13

VII.5.2. Depunerea modificatorilor în două straturi: G/Hm-HRP/Chit/Ga și G/Hm/HRP-Chit/Ga

VII.5.2.2. Detecția amperometrică a H_2O_2

În tabelul 32 și 33 sunt centralizate valorile parametrilor cinetici pentru biosenzorul G/Hm/HRP-Chit/Ga și G/Hm-HRP/Chit/Ga:

Tabelul 32. Valorile parametrilor cinetici pentru biosenzorul G/Hm/HRP-Chit/Ga.

G/Hm/ HRP-Chit//GA	$I_{\max} (\mu\text{A})$	$K_M (\text{mM})$	$S = I_{\max}/K_M$ ($\mu\text{A}/\text{mM}$)	R/n
Fitare M-M	$1,07 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$	$3,48 \pm 0,21$	0.99 / 40
Liniarizare L-B	$1,13 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,01$	$3,34 \pm 0,05$	0.99 / 42
Liniarizare E-H	$1,07 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$	$3,45 \pm 0,19$	0.99 / 36
Liniarizare H-W	$1,08 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$	$3,43 \pm 0,01$	0.99 / 38

Tabelul 33. Valorile parametrilor cinetici pentru biosenzorul **G/Hm-HRP/Chit/Ga.**

G/Hm-HRP/Chit/GA	I_{max} (μA)	K_M (mM)	S = I_{max}/K_M (μA/mM)	R/n
Fitare M-M	1,1 ± 0.1	0.39 ± 0.07	2,7 ± 0.8	0.98 / 25
Liniarizare L-B	1,2 ± 0.1	0.22 ± 0.04	5,4 ± 0.4	0.98 / 14
Liniarizare H-W	1,5 ± 0.1	0.33 ± 0.06	4,5 ± 0.5	0.99 / 18

Biosenzorul în structura căruia HRP este în contact direct cu Hm prezintă o sensibilitate (~**5,0 μA/mM**; calculată ca medie a datelor obținute din liniarizările L-B și H-W) semnificativ mai mare, cu cca 40%, decât sensibilitatea (~**3,4 μA/mM**; calculată ca medie a datelor obținute din liniarizările L-B, E-H și H-W) biosenzorului în structura căruia HRP nu este în contact direct cu Hm. O explicație a acestui comportament poate fi atribuită unei conectări electrice mai eficiente a HRP la electrod în primul caz decât în cel de al doilea.

VII.5.3. Depunerea modificatorilor într-un strat: **G/Hm-HRP-Chit/Ga**

VII.5.3.2. Detecția amperometrică a **H₂O₂**

Biosenzorul **G/Hm-HRP-Chit/Ga** a fost investigat prin CV și amperometrie. Valorile numerice obținute în urma prelucrării statistice a datelor liniarizărilor măsurătorilor sunt cuprinse în tabelul de mai jos (tabelul 34).

Tabelul 34. Valorile parametrilor cinetici pentru biosenzorul **G/Hm- HRP-Chit/Ga.**

G/Hm-HRP-Chit/Ga	I_{max} / μA	K_M / mM	S=I_{max}/K_M (μA/mM)	R / n	
Fitare M-M	2.74 ± 0.12	0.31 ± 0.07	8.78 ± 2.9	0.99 / 18	
Liniarizare L-B	3.02 ± 0.48	0.35 ± 0.08	8.59 ± 0.59	0.98 / 19	TI
Liniarizare E-H	2.82 ± 0.22	0.33 ± 0.04	8.50 ± 1.7	0.95 / 14	
Liniarizare H-W	2.85 ± 0.18	0.34 ± 0.04	8.42 ± 0.41	0.98 / 14	
Fitare M-M	3.15 ± 0.53	0.35 ± 0.09	9.0 ± 3.9	0.99 / 13	
Liniarizare L-B	5.89 ± 0.97	0.75 ± 0.15	7.86 ± 0.24	0.99 / 28	TII
Liniarizare E-H	5.93 ± 0.15	0.69 ± 0.04	8.56 ± 0.68	0.989 / 17	
Liniarizare H-W	5.94 ± 0.17	0.69 ± 0.04	8.56 ± 0.68	0.998 / 17	

Notațiile TI și TII din tabelul semnifică prima, respectiv, a doua testare.

Prima testare a electrodului s-a făcut în ziua imediat următoare preparării, iar a doua testare la cinci zile după aceea. Din valorile de sensibilitate din tabelul de mai sus reiese că, la retestarea electrodului s-au înregistrat valori apropiate de cele obținute la prima testare.

Acest comportament denotă o bună stabilitate pe termen scurt a bisenzorului **G/Hm-HRP-Chit/Ga**.

VIII. ELECTRODUL MODIFICAT DE Au/L-Cys/Hm

VIII.5.1. Influența vitezei de baleiaj / frecvenței

Voltamogramele înregistrate la diferite viteze de baleiaj (CV) respectiv frecvențe (SWV) (Figura 70) indică, în ambele cazuri, faptul că la creșterea vitezei de baleiaj/ frecvenței are loc o deplasare a valorilor potențialelor de pic spre valori absolute mai mari. Se observă o pereche de picuri stabile, bine conturate, caracteristice Hm.

Valoarea potențialului standard formal ($E^{0'}$) pentru Hm adsorbită ($E^{0'} = -70$ mV vs. Ag/AgCl, NaCl_{3M}; pH 7), care a fost estimată ca semisuma potențialelor de pic anodic (E_{pa}) și catodic (E_{pc}), este în bună concordanță cu valoarea raportată în literatură (Zejli H. *et al.* 2010; Zhang F.-T. *et al.* 2014; Turdean G. L. *et al.* 2006; Mares G. M. *et al.* 2013).

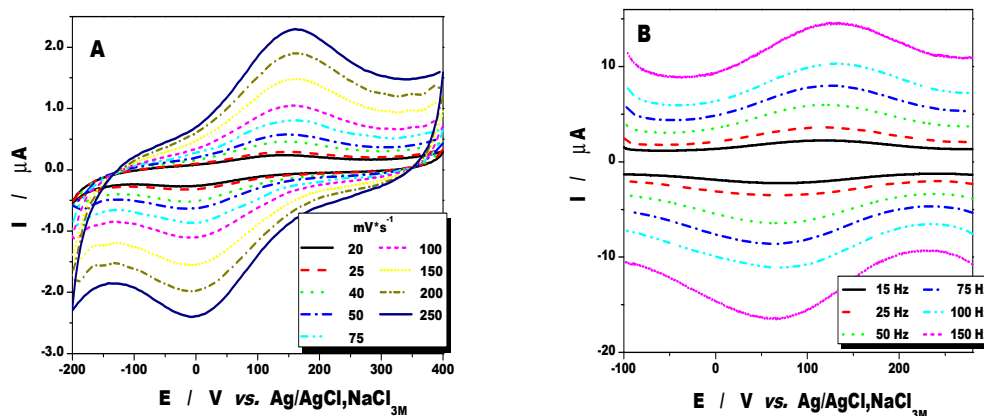
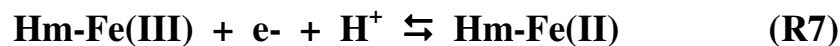


Figura 70. Influența vitezei de baleiaj/frecvenței asupra semnalului voltametric al electrodului Au/L-Cys/Hm: (A) CV; (B) SWV. Condiții experimentale: electrolit suport, soluție TF 0.1 M (pH 6.9); potențial inițial, 0.4 V vs. Ag/AgCl, NaCl_{3M}; SWV: amplitudine, 50 mV, soluție TF (pH 5); deaerare cu Ar.

Procesul de transfer sarcină cvasi-reversibil în care este implicat cuplul Fe(III)/Fe(II) din structura Hm, este descris de ecuația de mai jos (Hasebe Y., Wang Y. 2013; Dai Z. *et al.* 2004; Turdean G. L. *et al.* 2006; Pilloud D. L. *et al.* 2000; Wang Q. *et al.* 2004):



Intensitatea curenților de pic anodic ($I_{p,a}$) și catodic ($I_{p,c}$) prezintă o dependență liniară de viteza de baleiaj (v) în domeniul investigat de viteze de baleiaj, cuprins între 20 – 250 mV/s. (Figura 71A). În măsurătorile de SWV se observă același comportament al Hm, intensitatea curentului de pic prezintă o dependență liniară de radicalul frecvenței (ν) (Reeves J. H. 1993) (Figura 71B).

Independent de valoarea pH-ului, valoarea pantei reprezentării $\log I - \log v$ (Tabelul 37) are valori apropiate de valoarea teoretică 1, relevant un cuplu redox imobilizat pe electrod (panta ~ 1) (Murray R. W. 1983).

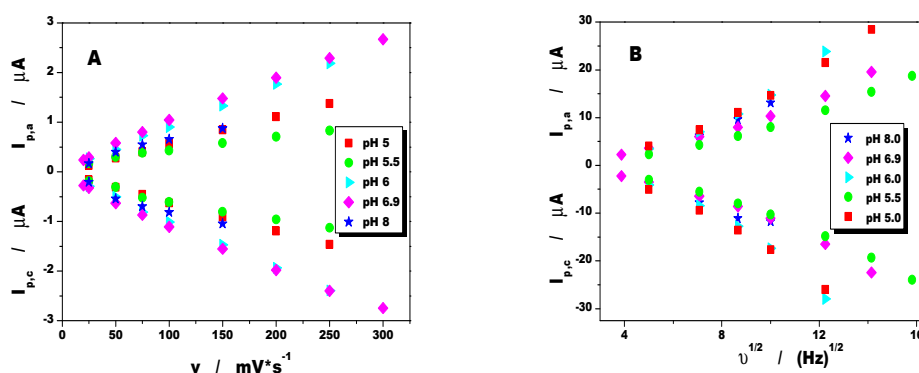


Figura 71. Dependența curentului de pic de viteza de baleiaj a potențialului CV (A) și de frecvență SWV (B) pentru electrodul modificat Au/L-Cys/Hm. Condiții experimentale: electrolit suport, soluție TF 0.1 M (diferite pH); potențial inițial, 0.4 V vs. Ag/AgCl, NaCl_{3M}; SWV: amplitudine, 50 mV; deaerare cu Ar.

Tabelul 37. Valorile pantelor dependenței $\log(I_p)$ vs. $\log(v)$ pentru electrodul modificat Au/L-Cys/Hm la diferite valori de pH.

pH	Panta dependenței $\log(I_p) - \log(v)$			
	anodic	R ² / N	cathodic	R ² / N
5.0	1.01 ± 0.01	0.9989 / 5	0.95 ± 0.02	0.9994 / 7
6.0	0.92 ± 0.02	0.9972 / 7	0.92 ± 0.01	0.9976 / 7
6.9	0.89 ± 0.01	0.9991 / 6	0.86 ± 0.01	0.9992 / 9
8.0	0.91 ± 0.08	0.9681 / 4	0.90 ± 0.12	0.9265 / 5

VIII.5.2. Influența pH-ului

Figurile 72 A și B prezintă voltamogramele ciclice (A) ($v=50\text{mV/s}$) și pe cele undă pătrată (B) (cu frecvența de 50 Hz și amplitudinea de 50mV) pentru electrodul modificat Au/L-Cys/Hm, la diferite valori de pH, în intervalul 5÷8.

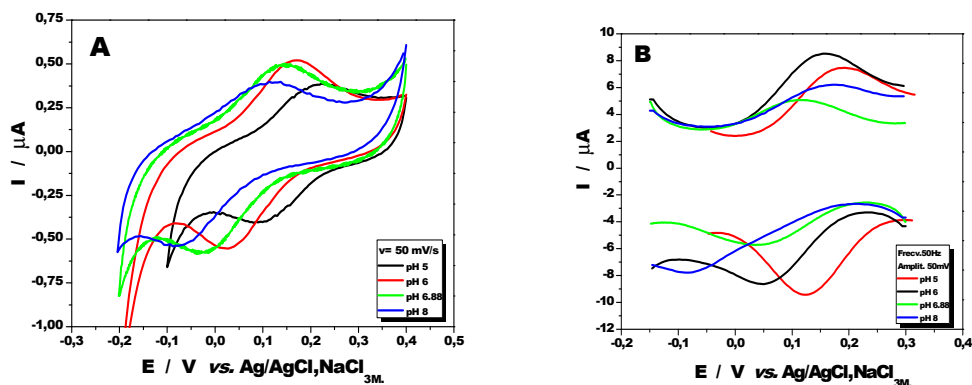


Figura 72. Dependența semnalului voltametric de pH, pentru electrodul Au/L-Cys/Hm obținută din măsurători de CV (A) și de SWV (B). Condiții experimentale: soluție TF 0.1M, diferite pH, viteza de baleiaj de 50mV/s, 2 cicluri (CV); frecvența 50 Hz, 50mV amplitudine (SWV), deaerare cu Ar.

Cantitativ, în domeniul de pH investigat (5 ÷ 8), valoarea pantei reprezentării E^0 vs. pH, obținută din măsurători de CV [(-0.040 ± 0.004) V/pH, cu $R^2 = 0.9751$ și $N = 4$; Figura 73A), este relativ apropiată de valoarea teoretică (0.059 V/pH), caracteristică unui proces redox care implică un transfer de $1e^-/1H^+$, conform ecuației R7.

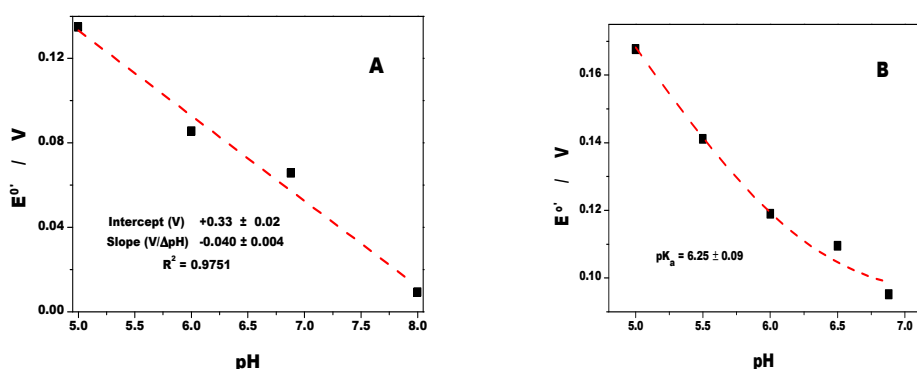


Figura 73. Dependența de pH a potențialului redox formal (E^0) pentru Hm adsorbită pe suprafața electrozului de Au modificat cu L-Cys: (A) CV and (B) SWV. Condiții experimentale: electrolit suport, soluție TF 0.1M; CV: viteza de baleiaj de potențial, 25 mV/s; SWV: frecvența, 75 Hz; amplitudinea, 50 mV.

Datele obținute din măsurători de SWV (Figura 73 B) sugerează că în domeniul de pH investigat are loc disocierea acidă a cuplului redox generator de răspuns voltametric.

VIII.5.3. Determinarea pK_a respectiv k_s

În determinările de SWV, în domeniul de pH 5 – 8, dependența $E^{0'}$ vs. pH (Figura 73 B) este neliniară. Fitarea neliniară a datelor experimentale a permis estimarea valorii constantei de aciditate pentru reacția de disociere a Hm adsorbite pe suprafața Au/L-Cys ($pK_a = 6.25 \pm 0.09$). Această valoare este mai mică decât cea raportată în cazul Hm dizolvate ($pK_a = 6.63$) (Hasinoff B. B. *et al.* 1969), datorită, probabil, interacțiunilor existente între Hm adsorbită și sarcina negativă a filmului de Au/L-Cys.

Pentru calculul valorii k_s din măsurători de CV s-a folosit metoda Laviron (Laviron E., 1979). În cazul SW valoarea k_s s-a calculat cu metoda elaborată de Reeves (Reeves H. J. *et al.* 1993) pentru un cuplu redox cvasi-reversibil adsorbit.

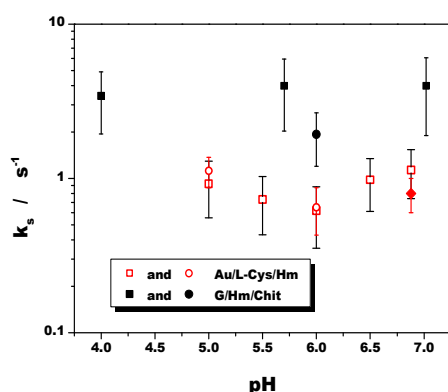


Figura 74. Influența pH-ului asupra valorii constantei de viteză a procesului de transfer eterogen de sarcină (k_s) pentru electrozodul modificat Au/L-Cys/Hm (□,○) și G/Hm/Chit (■,●), estimate din măsurători CV (□,■) și SWV (○,●).

Așa cum rezultă din Figura 74, în limita erorilor experimentale, și considerând ne semnificative oscilațiile cu pH-ul ale valorilor de k_s , rezultatele obținute pentru valoarea k_s , din prelucrarea datelor CV respectiv WSV sunt în relativă concordanță.

În paralel, se poate observa că valorile constantei k_s estimată în cazul Hm imobilizată pe electrozodul Au/L-Cys auto-asamblat [$(k_s)_{CV} = (0.65 \pm 0.22) s^{-1}$; $(k_s)_{SWV} = (0.62 \pm 0.27) s^{-1}$; la pH 6)] sunt cu un ordin de mărime mai mici decât în cazul imobilizării Hm în chitosan, estimată pentru electrozodul modificat G/Hm/Chi [$(k_s)_{CV} = (1.9 \pm 0.7) s^{-1}$; $(k_s)_{SWV} = (3.4 \pm 1.5) s^{-1}$; pH 6)] (Mares G.M. *et al.* unpublished results).

CONCLUZII GENERALE

În concordanță cu obiectivele formulate în partea de introducere, contribuțiile originale aduse de prezenta lucrare pot fi rezumate astfel:

1. S-au obținut electrozi modificați cu structură și arhitectură variată, având notația specificată, immobilizând hemina (Hm) pe suprafața electrodului de grafit (G) și aur (Au), prin: simplă adsorbție și fixare în polimeri obținuți prin electropolimerizarea de compuși dihidroxilici aromatici: rezorcină (Res), catecol (Cat) și hidrochinonă (HQ), legare de L-cisteină (L-Cys), care formează un sistem auto-asamblat pe suprafața electrodului de aur.

2. Electrozii modificați au fost caracterizați din punct de vedere electrochimic, fiind investigați prin voltametrie ciclică (CV) și voltametrie de undă pătrată (SWV). S-a studiat: influența vitezei de baleiaj/frecvenței, a pH-ului asupra răspunsului electrodului; stabilitatea mecanică și operațională a electrozilor modificați; efectul electrocatalitic în reducerea H_2O_2 și nitriților; au fost determinați parametrii de pic, potențialul standard formal, E° , intensitatea și potențialul de pic anodic și catodic, separarea picurilor, aria de sub pic și implicit gradul de acoperire, konstanta de transfer eterogen, k_s , iar în cazul immobilizării pe electrod de aur s-a calculat și valoarea constantei pKa.

3. Parametrii determinați au arătat faptul că hemina se găsește este fixată pe suprafața electrodului și este participantă într-un proces electrochimic cvasi-reversibil ce implică $1H^+/1e^-$.

4. Au fost exploatate interacțiile de natură electrostatică asociată cu suprafața electrodului modificat Au/L-Cys (disocierea grupării carboxil al L-Cys, predominantă la pH > 5) și sarcina pozitivă a regiunii din jurul Hm (localizat în jurul Fe legat coordinativ de N).

5. S-au obținut biosenzori amperometrici pentru detecția H_2O_2 , având în compoziție: Hm, Chit, HRP și glutaraldehidă (Ga).

6. S-a urmărit reducerea numărului straturilor de modificador, pentru a reduce durata de preparare și de a reduce barierele ce stau în calea procesului de transfer de sarcină.

7. În cazul biosenzorilor amperometrici, la a doua folosire, valoarea intensității curentului este mai mare, față de prima testare. Este posibilă regenerarea biosenzorului, dacă este ținut în atmosferă saturată de soluție electrolit suport (sau imersat în acesta - în cazul nostru soluție tampon fosfat de Na sau K), la frigider la temperatura de 4°C.

8. Prepararea electrozilor este simplă (cu atât mai simplă cu cât numărul straturilor ce urmează a fi depuse este mai mic) rapidă, stabilitatea și reproductibilitatea este bună.

9. În urma prelucrării rezultatelor experimentale obținute prin metodele de CV respectiv SWV, valorile rezultatelor obținute erau în concordanță între ele și cu cele din datele de literatură.

10. Au fost determinați parametrii bioelectrochimici: I_{\max} , K_m^{ap} , S . În acest sens a fost realizată simularea ecuației Michaelis-Menten și utilizarea liniarizărilor Lineweaver-Burk, Eadie-Hoffstee și Hanes-Woolf. Cea mai mare sensibilitate se observă în cazul co-immobilizării tuturor modificatorilor (Hm+Chit+HRP) timpul de răspuns, a fost între 6-30s, de fiecare dată mai mică de 30s.

Lista rezultatelor diseminate

Lista participărilor la manifestări științifice naționale și internaționale

1. **Mares Georgeta Maria**, Turdean Graziella Liana, Popescu Ionel Cătălin, *Hemin-modified Graphite Electrode: Electrochemical Characterization and Hydrogen Peroxide Detection Using Cyclic Voltammetry and Square Wave Voltammetry*, 18th International Conference on Chemistry, Băile Felix, România, 22-25 Noiembrie, **2012**, prezentare poster.
2. **Mares Georgeta Maria**, Turdean Graziella Liana, Popescu Ionel Cătălin, *Hemin-modified Gold Electrode: Electrochemical Characterization and k_s Determination Using Cyclic Voltammetry and Square Wave Voltammetry*, 19th International Conference on Chemistry, Baia-Mare, România, 21-24 Noiembrie, **2013**, prezentare poster.
3. **Mares Georgeta Maria**, Turdean Graziella Liana, Popescu Ionel Cătălin, *Biosenzor amperometric conținând hemină pentru detecția peroxidului de hidrogen*, Oradea, România, mai, **2013**, prezentare poster.

Lista lucrărilor publicate

1. **Georgeta Maria Mares**, Graziella Liana Turdean, Ionel Cătălin Popescu, **2013**, *Electrochemical behavior of the hemin modified graphite electrode for H_2O_2 detection*, Studia UBB Chemia, 58 (LVIII), 105-114, (ISSN 1224-7154).
2. **Mares Georgeta Maria**, Turdean Graziella Liana, Popescu Ionel Cătălin, **2013**, *Amperometric Biosensor with Hemin and Horseradish Peroxidase: Preparation, Electrochemical Characterization and Hydrogen Peroxide Detection*, Technical Review, edited by Hungarian Technical Scientific Society of Transilvania, 61, 17-28, (ISSN 1454-0746).
3. **Georgeta Maria Mares**, Adirian Nicoară, Graziella Liana Turdean, Ionel Cătălin Popescu, *Electrochemical Characterization of Au/L-Cysteine/ Hemin Modified Electrode*, **2014**, Rev. Roum. Chim., submitted.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Adanyi N., Varadi M., **2003**, *Development of organic phase amperometric biosensor for measuring cholesterol in food samples*, Eur. Food Res. Technol., 218, 99-104.

Adányiné dr. Kisbódi N., **2003**, *Szerves fázisban működő enzim alapú bioszenzorok fejlesztése és alkalmazása élelmiszerminták vizsgálatára*, Budapest, Phd Thesis.

Ahuja T., Mir I. A., Kumar D., Rajesh, **2007**, *Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing application*, Biomaterials 28, 791-805.

Aoki K. J., Li W., Chen J., Nishiumi T., **2014**, *Irreversibility of catalytic reduction of dioxygen by dissolved hemin*, J. Electroanal. Chem., 713, 131-135.

Armstrong F. A., Heering H. A., and Hirst J., **1997**. *Reactions of complex metalloproteins studies by protein film voltammetry*. J. Chem. Soc. Rev., 26, 169-179.

Bard A. J., Faulker L. R., **1980**, *Electrochemical Methods. Fundamental and Applications*, Wiley, New York.

Baron C.P., Andersen H.J., **2002**, *Myoglobin-Induced Lipid Oxidation*, J. Agric. and Food Chem., 50, 3887-3897.

Bart J.A., Faulker L.R., **1980**, „Electrochemical Methods”, Wiley-VCH, New York, 522.

Bartonek-Roxa E., Holm C., **1999**, *Production of catalytically active horseradish peroxidase-n in the insect cell-baculovirus expression system*. Biotech. Techniques 13, 69–73.

Chen J., Zhao L., Bai H., Shi G., **2011**, *Electrochemical detection of dioxygen and hydrogen peroxide by hemin immobilized on chemically converted grapheme*, J. Electroanal. Chem., 657, 34-38.

Chen X., Hu Y., Wilson G.S., **2002**, *Glucose microbiosensor based on alumina sol-gel matrix/electropolymerized composite membrane*, Biosens. Bioelectron, 17, 1005.

Chen X., Matsumoto N., Hu Y., Wilson G.S., **2002**, *Electrochemically mediated electrodeposition/electropolymerization to yield a glucose microbiosensor with improved characteristics*, Anal. Chem., 74, 368.

Cheng L., Dong S., **2000**, *Comparative studies on electrochemical behavior and electrocatalytic properties of heteropolyanion-containing multilayer films prepared by two methods*, J. Electroanal. Chem., 481, 168.

Cherry J. R., Lamsa M.H., Schneider P., Vind J., Svendsen A., Jones A., Pedersen A.H., **1999**, *Directed evolution of a fungal peroxidase*, Nature Biotechnol. 17, 379–384.

Dai Z., Liu S., Ju H., Chen.H., **2004**, *Direct electron transfer and enzymatic activity of hemoglobin in a hexagonal mesoporous silica matrix*, *Biosens. Bioelectron.*, 19, 861-867.

de Groot M. T., Merckx M., Wonders A. H., Koper M. T. M., **2005**, *Electrochemical reduction of NO by hemin adsorbed at pyrolytic graphite*, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 7579-7586.

de Prada A. G.-V., PenanN., Mena M. L., Reviejo A. J., Pingarron J. M., **2003**, *Graphite-Teflon composite bienzyme amperometric biosensors for monitoring of alcohols*, *Biosens. Bioelectron.*, 18, 1279-1288.

Dennison M. J., Turner A. P. F., **1995**, *Biosensors for environmental monitoring*, *Biotech. Adv.*, 13, 1-12.

Duroux L., Welinder K.G., **2003**, *The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview.*, *J. Mol. Evol.* 57, 397–407.

Feng J. J., Xu J. - J., Chen, H. - Y., **2006**, *Direct electron transfer and electrocatalysis of hemoglobin adsorbed onto electrodeposited mesoporous tungsten oxide*, *Electrochem. Commun.*, 8, 77-82.

Folkes L. K., Greco O., Dachs G. U., Stratford M. R. L., Wardman P., **2002**, *5-Fluoroindole-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potential for use in targeted cancer therapy*, *Biochem. Pharmacol.*, 63, 265–272.

Folkes L.K., Wardman P., **2001**, *Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species-a potential new role for plant auxins in cancer therapy.*, *Biochem. Pharmacol.*, 61, 129–136.

Gao Y., Chen J., **2005**, *Redox reaction of hemin-immobilized polyallylamine–polystyrene latex suspensions*, *J. Electroanal. Chem.*, 578, 129-136.

Gaspar T., Penel C., Greppin H., **1992.**, *Plant Peroxidases (1980–1990), Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects.*, University of Geneva, Geneva.

Gaspar T., Penel C., Thorpe T., Greppin H., **1982**, *Peroxidases (1970–1980), A Survey of their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants*, University of Geneva, Geneva.

Guo Y., Li J., Dong S. Dong, **2011**, *Hemin functionalized grapheme nanosheets-based dual biosensor platforms for hydrogen peroxide and glucose*, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 160, 295-300.

Hasebe Y., Wang Y., **2013**, *Sensitive voltammetric and amperometric responses of respiratory toxins at hemin-adsorbed carbon-felt*, *J. Environ. Sci.*, 25, 1055-1062.

Hasinoff B. B., Dunford H. B., Horne D. G., **1969**, *Temperature jump kinetics of binding of imidazole to ferriprotoporphyrin IX*, Can. J. Chem., 47, 3225-3232.

<http://intel.ucc.ie/sensors/Electropolym.htm>.

<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=hemin>, consultat în 27 martie 2014.

http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Dihydroxy-e.htm.

Ye J. S., Wen Y., Zhang W. D., Cui H. - F., Gan L. M., Xu G. Q., Sheu F. - S., **2004**, *J. Electroanal. Chem.*, 562, 241-246.

Kafi A. K. M., Lee D. - Y., Park S. - H., Kwon Y. - S., **2007**, *Amperometric biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin in poly-allylamine (PAA) film*, Thin Solid Films, 515, 5179-5183.

Laszlo J. A., Compton D. L., **2002**, *Comparison of peroxidase activities of hemin, cytochrome and microperoxidase-11 in molecular solvents and imidazolium-based ionic liquids*, J. Mol. "Cat. B: Enzy.", 18, 109.

Laviron E., **1979**, *General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems*, J. Electroanal. Chem., 101, 19-28.

Li Y., Goodwin D.C., **2004**, *Vital Roles of an interhelical insertion in catalase-peroxidase bifunctionality*, Biochem. Biophys Res. Comm., 318, 970.

Ma Q., Ai S., Yin H., Chen Q., Tang T., **2010**, *Towards the conception of an amperometric sensor of L-tyrosine based on Hemin/PAMAM/MWCNT modified glassy carbon electrode*, Electrochim. Acta, 55, 6687-6694.

Ma S.-H., Wang X.- J., Han X.-J., **2013**, *Hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of hemin in egg-phosphatidylcholine films*, Chin. J. Anal. Chem., 41, 1719-1723.

Mares G. M., Turdean G. L., Popescu I. C., **2013**, *Electrochemical behavior of the hemin modified graphite electrode for H₂O₂ detection*, Studia UBB Chemia, 58, 105-114.

Mares G. M., Nicoară A., Turdean G. L., Popescu I. C., **2014**, *Electrochemical Characterization of Au/L-Cysteine/Hemin Modified Electrode*, unpublished results.

Mares G.M., Turdean G.L., Popescu I.C., **2013**, *Amperometric Biosensor with Hemin and Horseradish Peroxidase: Preparation, Electrochemical Characterization and Hydrogen Peroxide Detection*, Technical Review, edited by Hungarian Technical Scientific Society of Transilvania, 61, 17-28.

Mares G.M., Turdean G.L., Popescu I.C., **2013**, *Electrochemical behavior of the hemin modified graphite electrode for H₂O₂ detection*, *Studia UBB Chemia*, 58, 105-114.

McCormac T., Farrell D., Drennan D., Bidan G., **2001**, *Immobilisation of a series of Dawson Type Heteropolyanions*, *Electroanalysis*, 13, 836.

Mirceski V., Gulaboski R., Scholz F., **2004**, *Square-wave thin-film voltammetry: influence of uncompensated resistance and charge transfer kinetics*, *J. of Electroanal. Chem.*, 566, 351-360.

Mittler R., **2002**, *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*, *Trends Plant Sci.*, 7, 405-410.

Murray R.W. in Bard A.J. (Ed.), **1984**, *A series of advances, "Electroanalytical Chemistry"*, Marcel Dekker, New York, vol. 13, 191.

Murray, R. W., **1992**, *Introduction to the Chemistry of Molecular Designed Electrode Surface*, in *„Techniques of Chemistry"*, Saunders, W. H. Jr., (ed.), vol XXII, Wiley, N. York.

Nagy G., Pungor E., **1988**, *Bioelectroanalytical sensors and analytical problems in their application*, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 20, 1-19.

Nakabayashi Y., Wakuda M., Imai H., **1998**, *Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as an electron transfer mediator*, *Anal. Sci.*, 14, 1069.

Nan C. G., Z. Feng Z., Li W. X., Ping D. J., Qin C. H., **2002**, *Electrochemical behavior of tryptophan and its derivatives at a glassy carbon electrode modified with hemin*, *Anal. Chim. Acta*, 452, 245-254.

Neto J. R. M., Santos W. J. R., Lima P. R., Tanaka S. M. C. N., Tanaka A. A., Kubota L. T., **2011**, *A hemin-based molecularly imprinted polymer (MIP) grafted onto a glassy carbon electrode as a selective sensor for 4-aminophenol amperometric*, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 152, 220-225.

Passardi F., Theiler G., Zamocky M., Cosio C., Rouhier N., Teixeira F., Margis-Pinheiro M., Ioannidis V., Penel C., Falquet L., Dunand Ch., **2007**, *PeroxiBase: the peroxidase database*, *Phytochemistry*, 68, 1605-1611.

Paulo T. D., Diogenes I. C. N., Abruna H. D., **2011**, *Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin immobilized on L-cysteine self-assembled gold electrode*, *Langmuir*, 27, 2052-2057.

Pilloud D. L., Chen X., Dutton P. L., Moser C. C., **2000**, *Electrochemistry of self-assembled monolayers of iron protoporphyrin IX attached to modified gold electrodes through thioether linkage*, J. Phys. Chem. B, 104, 2868-2877.

Popescu I. C., **1996**, *Senzori electrochimici*, Lito UBB-Cluj-Napoca, 6-22, 43-80.

Reeves J. H., Song S., Bowden E. F., **1993**, *Application of square wave voltammetry to strongly adsorbed quasireversible redox molecules*, Anal. Chem., 65, 683-688.

Rusling, J. F., Zhang. Z., **2003**, *Designing functional biomolecular films on electrodes*. in J. F. Rusling, Ed., Biomolecular Films, Marcel Dekker, N. Y., 1-64.

Santos R. M., Rodrigues M. S, Laranjinha J., Barbosa R.M., **2013**, *Biomimetic sensor based on hemin/carbon nanotubes/chitosan modified microelectrode for nitric oxide measurement in the brain*, Biosensors and Bioelectronics, 44, 152.

Schlichter J., Friedrich J., Herenyi L., Fidy J., **2001**, *Trehalose effect on low temperature protein dynamics: fluctuation and relaxation phenomena.*, Biophys J., 80, 2011–2017.

Sigma-Aldrich,

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=71747|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNOIBRAND_KEY&F=SPEC

Smeller L., **2007**, *A fehérvék konformációs és dinamikai tulajdonságai. Új eredmények nagy nyomással kombinált infravörös és fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel*, Phd-Thesis, Budapest, Universitatea Semmelweis-Institutul de Biofizică și Radio-biologie.

Smith A.T., **1990**, *Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in Escherichia coli and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and heme*, J. Biol. Chem., 265, 13335-13343.

Song H., Ni Y., Kokot S., **2013**, *A novel electrochemical biosensor based on the hemin graphene nano-sheets and gold nano-particles hybrid film for the analysis of hydrogen peroxide*, Anal. Chim. Acta, 788, 24-31.

Spiridon I., **2004**, *Biotehnologia în prevenirea dezastrelor provocate de factori naturali și antropici*, în „Fenomene cu risc major la scară națională”, Filip F. G., Simionescu, B. C. (coord.), Ed. Academiei Române, București, p. 349-352.

Sun R., Wang Y., Ni Y. and Kokot S., **2014**, J. Hazard. Mat., 266, 60-67.

Sun J.-J., Huang K. -Y., Zhao S. -F., Fan Y., Wu Z. -W., **2011**, *Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on chitosan-room temperature ionic liquid-TiO₂-graphene nanocomposite film modified electrode*, Bioelectrochem., 82, 125-130.

Szigeti K., **2008**, *A Ca^{2+} szerepe a tormaperoxidáz enzim aktiv szerkezetében*, Bp., Phd.Thesis.

Turdean G. L., Popescu I. C., Curulli A., Palleschi G., **2006**, *Iron(III) protoporphyrin IX-single-wall carbon nanotubes modified electrodes for hydrogen peroxide and nitrite detection*, *Electrochim. Acta*, 51, 6435.

Turdean G.L., Curulli A., Popescu I.C., Rosu C., Palleschi G., **2002**, *Electropolymerized architecture entrapping a trilacunary Keggin-type polyoxometalate for assembling a glucose biosensor*, *Electroanal.*, 14, 22, 1550.

Valentini F., Cristofanelli L., Carbone M., Palleschi G., **2012**, *Glassy carbon electrodes modified with hemin-carbon nanomaterial films for amperometric H_2O_2 and NO_2^- detection*, *Electrochim. Acta*, 63, 37-46.

Varma S., **2002**, *Electrochemical studies on reconstituted horseradish peroxidase modified carbon paste electrodes*, *Bioelectrochem.*, 56, 107-111.

Varvari L., Popescu I. C., **2010**, *New method for activity evaluation using a H_2O_2 amperometric sensor*, *Rew. Ruom. Chim.*, 55(11-12), 851-857.

Vasilescu I., Lițescu S., Penu R., Radu G. L., **2007**, *Obținerea unui electrod cu suprafață chimic modificată pe bază de L-cisteină și determinarea unor ioni metalici cu implicații în procese fiziologice*, *Rev.Chim, (București)*, 58 (12), 1161-1166.

Wang Q., Lu G., Yang B., **2004**, *Hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin immobilized on carbon paste electrode by a silica sol-gel film*, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 99, 50-57.

Welinder K. G., **1992**, *Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2, 388–393.

Welinder K. G., Gajhed M., **1993**, *Structure and evolution of peroxidases*. In: Welinder K. G., Rasmussen S. K., Penel C., Greppin H. (Eds.), *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. University of Geneva, Geneva, 35–42.

Welinder K.G., Justesen A.F., Kjærsgard, I.V.H., Jensen R.B., Rasmussen S.K., Jespersen H.M., Duroux L., **2002**, *Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*.*, *Eur. J. Biochem.*, 269, 6063–6081.

Xu J. B., Zhao T. S., Zeng L., **2012**, *Covalent hybrid of hemin and mesoporous carbon as a high performance electrocatalyst for oxygen reduction*, *Int. J. Hydrogen Energ.*, 37, 15976-15982.

Xu Y., Hu C., Hu S., **2008**, *Direct electron-transfer of native hemoglobin in blood: kinetics and catalysis*, *Bioelectrochem.*, 72, 135-140.

Ye J. S., Wen Y., Zhang W. D., Cui H. - F., Gan L. M., Xu G. Q., Sheu F. - S., **2004**, *Application of multi-walled carbon nanotubes functionalized with hemin for oxygen detection in neutral solution*, *J. Electroanal. Chem.*, 562, 241-246.

Zejlí H., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros J. L., Naranjo-Rodríguez I., Temsamani K. R., Marty J.-L., **2010**, *Sonogel-carbon electrode based on hemin for detection of superoxide*, *Talanta*, 80, 1805-1808.

Zen J.-M., Chung H.-H., Kumar A.S., **2002**, *Selective detection of o-diphenols on copper-plated screen-printed electrodes*, *Anal. Chem.*, 74, 1202.

Zhang F.-T., Long X., Zhang D.-W., Sun Y.-L., Zhou Y.-L., Ma Y.-R., Qi L.-M., Zhang X.-X., **2014**, *Layered double hydroxide-hemin nanocomposite as mimetic peroxidase and its application in sensing*, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 192, 150-156.

Zhang Y., Xia Z., Liu H., Yang M., Lin L., Li Q., **2013**, *Hemin-graphene oxide-pristine carbon nanotubes complexes with intrinsic peroxidase-like activity for the detection of H₂O₂ and simultaneous determination for Trp, AA, DA, and UA*, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 188, 496-501.