

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

pentru întreaga perioadă de implementare a proiectului **Noi biosenzori și instrumente inteligente pentru detecția ultrasensibilă a falsificării uleiurilor de măsline, PN-III-P4-ID-PCE-2020-0923**

ianuarie 2021-decembrie 2023, , www.busdoa.ugal.ro

• **Obiectivele prevăzute/realizate**

Obiectivul principal al acestui proiect a fost dezvoltarea de noi dispozitive de biodetecție electrochimice și optice, și instrumente inteligente, integrate într-un dispozitiv portabil, pentru detectarea falsificării uleiurilor de măsline.

Proiectul a avut următoarele obiective specifice:

O1: dezvoltarea de noi materiale sensibile și nanotehnologii adecvate pentru fabricarea biosenzorilor;
O2: dezvoltarea și caracterizarea de noi biosenzori utili pentru detectarea falsificării uleiurilor de măsline;

O3: calibrarea și validarea biosenzorilor pentru detectarea ultrasensibilă a compușilor relaționați cu falsificarea uleiurilor de măsline;

O4: integrarea biosenzorilor într-un dispozitiv portabil multiparametric;

O5: dezvoltarea unui algoritm multivariat bazat pe fuziunea datelor și modele de instrumente inteligente pentru recunoașterea rapidă a falsificării uleiurilor de măsline;

O6: demonstrarea și validarea sistemelor multiparametrice de detectare a falsificării uleiurilor de masline;

O7: integrarea și pregătirea studenților în echipa multidisciplinară.

Rezultatele activităților de cercetare derulate pe perioada de implementare a proiectului, precum și diseminarea acestora în reviste cotate ISI indică faptul că obiectivul general și obiectivele specifice ale proiectului au fost îndeplinite integral.

Obiectivul general a fost atins prin dezvoltarea și implementarea de noi biosenzori electrochimici și optici special concepuți pentru detectarea ultrasensibilă a compușilor specifici uleiului de măsline, precum și a markerilor prezenți în adulteranți. Datele care au provenit de la diferiți biosenzori au fost procesate dezvoltând și folosind modele statistice avansate, iar informațiile rezultate din aceste modele au permis detectarea rapidă și precisă a falsificării uleiurilor de măsline la niveluri de concentrație cuprinse între 1% și 5%.

În tabelul următor se prezintă livrabile/indicatorii planificați, livrabilele/rezultatele realizate, precum și gradul de realizare a acestora, care demonstrează realizarea integrală a livrabilelor/indicatorilor planificați și astfel, îndeplinirea în procent de 100% a obiectivelor specifice asumate.

| Nr. | Livrabile/indicatori planificați | Nr. | Livrabile/indicatori realizați | Grad de realizare |
|-----|---|-----|--------------------------------|-------------------|
| 1 | Analiza cromatografică a markerilor | | Da | 100% |
| 2 | Dezvoltarea unor noi materiale sensibile | | Da | 100% |
| 3 | Sinteza polimerilor conductori și a polimerilor imprimați molecular | | Da | 100% |
| 4 | Dezvoltarea unei platforme multi-senzor | | Da | 100% |
| 5 | Caracterizarea biosenzorilor în prezența markerilor | | Da | 100% |
| 6 | Dezvoltarea unor rețele de biosenzori pentru analiza markerilor din uleiul de măsline | | Da | 100% |
| 7 | Dezvoltarea de modele inteligente și aplicarea acestora în analiza datelor | | Da | 100% |

| | | | | |
|----|--|------------------|---------------------------|------|
| 8 | Validarea sistemului multi-parametric în analiza de probe reale | | Da | 100% |
| 9 | Participarea la conferințe, publicarea în reviste ISI, cerere de brevet | 6 6 1 | Da, 26 Da, 12 Da, 1 | 100% |
| 10 | Activități de achiziție | | Da | 100% |
| 11 | Elaborarea rapoartelor științifice Raport pentru etapa 1 Raport pentru etapa 2 Rezumat executiv pentru etapa 1 și 2 Raport final | 1 1 1 1 | Da Da Da Da | 100% |

- **Prezentarea rezultatelor obținute, a indicatorilor de rezultat realizați; a nerealizărilor înregistrate față de rezultatele estimate prin cererea de finanțare (dacă este cazul), cu justificarea acestora;**

Procesul de implementare a proiectului s-a desfășurat în trei etape în conformitate cu contractul de implementare al proiectului. În continuare se prezintă principalele rezultatele obținute în cadrul activităților de cercetare și indicatorii de rezultat realizați pe toată perioada de implementare a proiectului.

Activitatea 1. Detectia moleculelor țintă și dezvoltarea de noi materiale sensibile

Activitatea 1.1. Analiza cromatografică a markerilor

Probele de uleiuri investigate în cadrul proiectului au fost uleiuri comerciale, și anume: uleiuri de măsline (uleiuri de măsline virgin extra de la diferiți producători, obținute prin tehnologii diferite, din diferite soiuri de măsline, din diferite țări precum și uleiuri de turte de măsline), dar și uleiuri vegetale de semințe (de porumb, de floarea soarelui, de in, de cânepă, de rapiță etc.), care au fost analizate prin cromatografie de lichide, spectrometrie de masă și folosind diferiți biosenzori. De asemenea, s-au analizat și uleiuri de măsline virgin extra (obținute de producători locali din regiunea Bari, Italia), furnizate de doamna Prof. dr. Maria Lisa Clodoveo de la Universitatea Carlos Moro din Bari precum și uleiuri de măsline dezodorizate și rafinate. În cadrul proiectului s-au analizat și probe de uleiuri adulterate, preparat în laborator din uleiuri de măsline virgin extra și adaosuri controlate din alte uleiuri vegetale. În total s-au analizat mai mult de 250 de probe de ulei, datele obținute fiind folosite pentru construirea și validarea sistemului multiparametric.

Cercetarea de față a vizat într-o prima etapă dezvoltarea unei metode țintite de cuantificare a unor compuși specifici uleiurilor vegetale și, în special, uleiului de măsline, și anume tirosol, hidroxitirosol, trigonelină, oleuropeină, verbacozidă, acid măslinic și acid oleanolic prin UHPLC-MS/MS (FullIMS-vDIA), care ulterior a fost utilizată pentru cuantificarea compușilor respectivi în probe de uleiuri vegetale în vederea discriminării acestora folosind analiza componentelor principale (PCA) și analiza de clustere (HCA) și clasificării folosind analiza discriminantă (PLS-DA), rețele neuronale artificiale (ANN) și mașină de învățare (ML). De asemenea, s-a realizat și determinarea compușilor fenolici minoritari din uleiuri prin UHPLC-MS/MS, folosind metoda de analiză dezvoltată în cadrul etapei 1. Procesarea datelor HRMS s-a realizat cu ajutorul software-ului Compound Discoverer v. 2.0 (Thermo Scientific, SUA) folosind un șablon de lucru pentru metabolomică, făcând posibilă identificarea altor clase de compuși prin raportarea la baze de date, inclusiv Chempider, MzCloud etc.

Determinarea compușilor fenolici specifici (tirosol, hidroxitirosol, oleuropeină), a compușilor terpenici (acizii măslinic și oleanolic) și trigonelinei din uleiurile vegetale prin UHPLC-MS/MS implică trei etape importante, și anume: (i) eșantionarea și extracția probelor de uleiuri (extracția pe faza solidă - SPE);

(ii) achiziționarea datelor în modul FullMS-vDIA, care s-a realizat cu ajutorul spectrometrului de masă de înaltă rezoluție Q Exactive Focus (Thermo Scientific, SUA) cuplat la un cromatograf de lichide de înaltă performanță UHPLC Dionex pentru separarea analiților; (iii) procesarea și identificarea datelor care s-a realizat cu ajutorul software-ului Xcalibur. De asemenea, prin procesarea datelor spectrale cu ajutorul software-ului Compound Discoverer v. 2.0 (Thermo Scientific, SUA), folosind un șablon de lucru pentru metabolomică, a fost posibilă și identificarea altor clase de compuși prin raportarea la baze de date, inclusiv Chemspider, MzCloud, MassBank etc.

Izolarea compușilor de interes din uleiurile vegetale investigate s-a realizat prin extracție SPE folosind cartușe SPE și un sistem de eluare sub vid (Vaccum Manifold, Varian). Pentru optimizarea extracției s-au folosit trei tipuri de cartușe, și anume: cartușe Strata NH₂ (55 μm, 70 Å), 500 mg/6 mL, cartușe Strata Silica (55 μm, 70 Å), 500 mg/6 mL și cartușe HyperSep silica 500 mg/6 mL, studiile de recuperare realizate demonstrând performanțe mai bune (rata de recuperare cuprinsă între 75-98%) pentru cartușele Strata Silica (55 μm, 70 Å), 500 mg/6 mL care au fost utilizate în continuare pentru extracția compușilor fenolici majoritari din uleiurile vegetale. Protocolul de extracție SPE constă în: condiționarea cartușelor SPE cu 6 mL metanol și 6 mL hexan, urmată de adăugarea soluției de probă (2,5 g ulei în 6 mL hexan) și pătrunderea acesteia în cartuș; spălarea cartușelor cu 3x3 mL hexan și eluarea compușilor din cartuș cu 10 mL metanol. Soluția de probă rezultată este concentrată la sec în curent de azot, după care extractul este reluat cu 1 mL soluție metanol:apă ultrapură = 80:20, filtrat prin membrană de 0,45 μm și supus analizei.

Pentru detecția prin UHPLC-MS/MS s-au optimizat și ulterior s-au setat următoarele categorii de parametri operaționali: parametri de ionizare HESI, parametri de separare cromatografică (compoziția fazei mobile, gradient, debit), parametri de operare MS (achiziția Full scan urmată de fragmentare). Separarea analiților s-a realizat pe o coloană analitică Kinetex C18 column (100 × 2,1 mm, 1,7 μm), la 30 °C, sub acțiunea unui gradient de faze mobile: apă HPLC cu 0,1% acid formic și metanol HPLC cu 0,1% acid formic. Spectrometrul de masă a rulat în modul de ionizare H-ESI (negativ), la o tensiune aplicată de 3,0 kV. Debitul de azot a fost de 48 L/min, iar cel auxiliar de 11 L/minut la o temperatură de 413°C, temperatura capilarului de 320°C. Datele au fost achiziționate în modul Full MS – vDIA cu înregistrarea simultană a precursorului și a fragmentelor MS/MS rezultate. Datele spectrale de masă au fost înregistrate la intervalul de scanare de m/z 100–1500, cu rezoluție completă de scanare la 70.000, iar rezoluția de achiziție MS/MS la 35.000. Energia de coliziune normalizată în trepte (NCE) a fost setată la 35 eV. Procesarea datelor s-a realizat cu ajutorul software-ului Xcalibur, iar cuantificarea datelor s-a realizat prin metoda standardului extern, într-un domeniu de liniaritate 25-1000 ng/mL. Coeficientul de liniaritate a variat în domeniul 0,990 la 0,995, în timp ce limita de detecție a metodelor a fost calculată pe baza unui raport semnal / zgomot 3:1. Pentru evaluarea performanțelor metodei de analiză s-a urmărit investigarea efectului de matrice prin adăugarea de concentrații cunoscute de standard la un nivel de concentrație de 100 ng/mL, urmată de analiza probelor rezultate și estimarea procentului de recuperare, rezultatele obținute fiind cuprinse între 75-98%. Identificarea compușilor s-a realizat pe baza comparării timpilor de retenție cu cei ai substanțelor de referință și prin identificarea ionului molecular și a fragmentelor rezultate în urma fragmentării în modul negativ (Tabelul 1).

Tabelul 1. Identificarea compușilor fenolici din uleiurile vegetale prin UHPLC-MS/MS

| Compus | Timp de retenție (min) | Formula moleculară | Masa moleculară | m/z [M-H] ⁻ | Fragmentele de masă |
|----------|------------------------|--------------------|-----------------|------------------------|---------------------|
| Trigonel | | | | | 24 |
| Hidroxit | | | | | 138 |

| | |
|---------------|----------|
| Tirosol | 9.0230 |
| Verbacosidă | |
| Oleuropein | 275.0925 |
| Acid oleic | 325.1843 |
| Acid linoleic | |

Conținutul de compuși fenolici majoritari specifici din uleiurile analizate variază în funcție de timpul de ulei, astfel: (i) în uleiurile de măsline originale, compușii majoritari cuantificați sunt trigonelina cu valori cuprinse între 0,834-22,514 mg/kg și hidroxitirosolul, cu valori cuprinse între 0,008-24,582 mg/kg, în timp ce tirosolul, verbacosida și oleuropeina au prezentat valori mai mici, respectiv n.d.-2,553 mg/kg, 0,314-0,758 mg/kg și n.d.-0,243 mg/kg; (ii) în EVOO s-au identificat cantități mai mari de trigonelină (5,774-34,062 mg/kg) și tirosol (n.d.-4,363 mg/kg) comparativ cu uleiurile de măsline originale, în timp ce conținutul de hidroxitirosol, verbacosidă și oleuropeină este mai mic; (iii) în uleiurile de măsline comerciale s-au identificat cantități mai mari de trigonelină (2,074-26,985 mg/kg) și tirosol (n.d.-10,386 mg/kg) comparativ cu uleiurile de măsline originale, în timp ce conținutul de verbacosidă și oleuropeină este asemănător; (iv) în uleiurile vegetale analizate, dintre compușii majoritari sunt trigonelina (n.d.-65,129 mg/kg), cu concentrații mai mari în uleiul de semințe de struguri și uleiul de rapiță și tirosolul (n.d.-12,758 mg/kg), cu concentrații mai mari în uleiurile de nuci, în și cânepă.

Datele cantitative rezultate în urma investigării compușilor fenolici minoritari din uleiurile analizate au indicat faptul că principalii acizi fenolici sunt acizii hidroxibenzoic (HyB), dihidroxibenzoic (DHyB), p-cumaric (Ap-Coum), ferulic (AF), elagic (Ael), cinamic (Acin), dar și flavoniozi precum apigenina (Apg) și pinocembrina (PinoC), conținutul acestora variind în funcție de tipul de ulei vegetal. Concentrații mai mari de acid dihidroxibenzoic corespund uleiurilor de măsline (n.d.-0.118 mg/kg), în timp ce acidul hidroxibenzoic a fost cuantificat în cantități mai mari în uleiurile vegetale (n.d.-0,381 mg/kg), cu valori mai mari pentru uleiul de nuci și uleiul din semințe de dovleac. Acidul p-cumaric a fost cuantificat în cantități mai mari în uleiurile de măsline comerciale (n.d.-0,806 mg/kg) și uleiurile de măsline originale (0,008-0,708 mg/kg), în timp ce cantități mai mari de acid ferulic (n.d.-1,007 mg/kg) și acid elagic (0,015-0,731 mg/kg) corespund celorlaltor tipuri de uleiuri vegetale investigate. Acidul cinamic este predominant în uleiurile de măsline, cu valori cuprinse între 0,023-4,832 mg/kg în uleiurile de măsline originale și n.d.-5,076 în uleiurile de măsline comerciale. De asemenea, conținutul de apigenină și pinocembrină este mai mare în uleiurile de măsline și uleiurile de măsline virgin extra, comparativ cu celelalte tipuri de uleiuri vegetale.

De asemenea, în uleiul de măsline virgin extra s-au identificat markeri specifici precum: acidul elenolic, inclusiv derivații hidroxilați și formele aldehidice, oleacina și derivatul hidroxilat, derivați de la oleuropeină, oleocantal, ligstrosid, acid elenaic.

Determinarea sterolilor și diolilor triterpenici din uleiurile vegetale prin RP-UHPLC-DAD implică următoarele etape: (i) eșantionarea probelor de uleiuri; (ii) saponificarea probei cu o soluție etanolică de KOH în vederea izolării fracției nesaponificabile; (iii) extracția L-L a fracției nesaponificabile; (iv) uscarea și evaporarea la sec a solventului de extracție; (v) reluarea extractului și filtrarea prin membrana filtrantă de 0,45 μm; (vi) analiza RP-UHPLC-DAD.

Izolarea fracției nesaponificabile din uleiuri reprezentată de către steroli și compuși triterpenici s-a realizat prin saponificare, urmată de extracția L-L. Protocolul de extracție este următorul: 1 g de probă este supus saponificării cu 50 mL soluție etanolică de KOH 2M, la o temperatură de 70 °C, sub agitare constantă. După răcire la temperatura ambiantă, amestecul a fost transferat într-o pâlnie de separare pentru a extrage fracția nesaponificabilă cu 2 x 25 mL de hexan (spălare prin agitare timp de 3 minute

de fiecare dată). Hexanul (conținând sterolii) a fost uscat cu sulfat de sodiu anhidru și evaporat până la sec folosind concentratorul Multivapor MP6, la 50°C. Reziduu s-a dizolvat în 2 mL metanol, apoi se filtrat printr-o membrană de 0,45 μm și este supus analizei cromatografice. În Figura 1 este prezentată reprezentarea schematică a etapei de extracție a sterolilor și compușilor triterpenici din uleiurile de măsline și uleiurile din semințe.

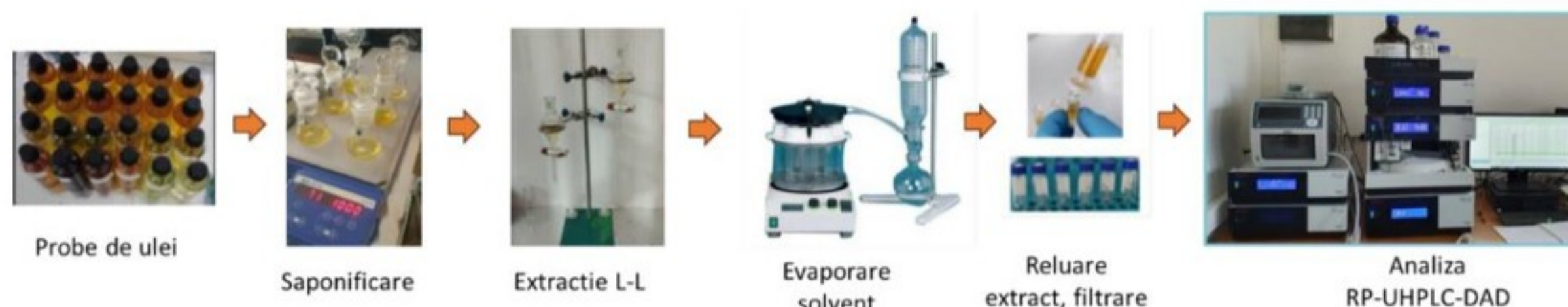


Figura 1. Reprezentarea schematică a extracției sterolilor și diolilor triterpenici din uleiurile vegetale înainte de analiza prin RP-UHPLC-DAD

Separarea compușilor s-a realizat prin cromatografie pe fază inversă, utilizând o coloană cromatografică Prevail C18, 5 μm (15 × 0,4 cm i.d.) și eluția izocratică a fazei mobile metanol:acetonitril 30:70 (v/v), la un debit de 1,0 mL/min. Detecția s-a realizat la lungimea de undă de 205 nm, iar volumul de injecție a fost de 25 μL.

Procesarea datelor s-a realizat cu ajutorul software-ului Chromeleon (Thermo Fisher Scientific), iar cuantificarea rezultatelor s-a realizat prin metoda standardului extern, într-un domeniu de concentrație cuprins între 1-100 mg/L. Coeficientul de liniaritate a variat de la 0,990 la 0,995, în timp ce limita de detecție a metodelor, care a fost calculată pe baza unui raport semnal / zgomot 3: 1. Pentru evaluarea performanțelor metodei de analiză s-a urmărit investigarea efectului de matrice prin îmbogățirea probelor de ulei cu concentrații cunoscute de standard la un nivel de concentrație de 10 mg/L, urmată de analiza probelor rezultate și estimarea procentului de recuperare, rezultatele obținute fiind cuprinse între 80-96%. Identificarea compușilor s-a realizat pe baza comparării timpilor de retenție cu cei ai substanțelor de referință.

În Tabelul 2 sunt prezentate rezultatele cantitative cu privire la conținutul de steroli și dioli triterpenici din probele de uleiuri analizate.

Tabelul 2. Conținutul de steroli și dioli triterpenici în uleiurile analizate

| Ulei | mg/100g | Eritrodiol | Brasicaserol+ Avanestrol | Colesterol | Campestrol+ Stigmasterol | Squalen | Sitosterol |
|----------|---------|------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|---------|------------|
| P | Min | 20.20 | 12.40 | 6.60 | 8.50 | 21.16 | 122.10 |
| | Max | | | | | | |
| | Media | | | | | | |
| V | Min | | | | | | |
| | Max | | | | | | |
| | Media | | | | | | |
| I | Min | | | | | | |
| | Max | | | | | | |
| | Media | | | | | | |
| E | Min | | | | | | |
| | Max | | | | | | |
| | Media | 2.11 | 33.40 | n.d. | n.d. | 307.01 | 67.47 |

P-uleiuri din turte de măsline, V – uleiuri din semințe, I – uleiuri de măsline virgin extra origine Italia și E – uleiuri de măsline virgin extra comerciale, n.d. nedetectat.

Rezultatele cantitative obținute indică faptul că profilul compozițional al sterolilor și diolilor triterpenici determinați în uleiurile analizate variaza în funcție de tipul de ulei, astfel: (i) eritrodolul este prezent în cantități mai mari în uleiurile din turte de măslină, cu o valoare medie de 38,88 mg/100 g, în comparație cu 2,30 mg/100g în uleiurile de măslină virgin extra de proveniență Italia, 4,48 mg/100g în uleiurile de măslină virgin extra comerciale și 5,71 mg/100 g în uleiurile din semințe; (ii) colesterolul a fost detectat numai în uleiurile din turte de măslină, cu valori cuprinse în domeniul 8,50-25,44 mg/100g; (iii) squalenul reprezintă compusul majoritar cuantificat în uleiuri, cu valori mai mari în uleiurile de măslină virgin extra (155,46-469,80 mg/100g) și mai mici în uleiurile din semințe (n.d.-162,36 mg/100g).

Probele de ulei de măslină au fost, de asemenea, analizate prin spectroscopie în domeniul IR, spectrofotometrie în domeniul UV și spectrofotometrie în domeniul Vis. Pentru determinarea compușilor cu proprietăți antioxidante prezenți în probele de ulei s-au utilizat metoda Folin-Ciocalteu pentru determinarea conținutului total de compuși polifenolici. Alte modalități de apreciere a activității antioxidante au fost metodele de captare a radicalilor liberi. Au fost folosite metodele de capturare a radicalilor liberi DPPH, ABTS și galvinoxil.

Aceste rezultate s-au folosit în etapele de validare a biosenzorilor, pentru a se putea aprecia concordanța dintre răspunsurile biosenzorilor și alte tipuri de analize fizico-chimice, dar și diferențele dintre probele pure și cele falsificate cu alte uleiuri vegetale.

Activitatea 1.2. Dezvoltarea unor noi materiale sensibile

S-au realizat o serie de noi biosenzori pentru analiza biomarkerilor din probele de ulei de măslină. Pentru construirea biosenzorilor s-au folosit electrozi serigrafiați pe bază de carbon (SPCE), oxid de staniu și indiu (ITO), aur (Au) și platină (Pt) care au fost modificați cu diferite nanomateriale, peptide și enzime. Nanomaterialele folosite au fost nanotuburi de carbon, nanofibre de carbon, carbon mezoporos, și grafen ca atare sau funcționalizate cu diferite tipuri de grupări hidrofili: -OH, >C=O, -COOH, -COONH₂ etc. Ca mediatori ai schimbului de electroni s-au folosit, de exemplu, ftalocianina de mangan, ftalocianina de cobalt, Prussian Blue sau peptide. A fost folosită și o gamă variată de enzime din clasa oxidazelor, de exemplu tirozinază, lacază, peroxidază, colesterol oxidază.

Acești electrozi serigrafiați au fost folosiți ca suport pentru imobilizarea unor nanomateriale pentru creșterea sensibilității și selectivității senzorilor electrochimici. De asemenea, acești senzori au fost folosiți pentru modificarea cu enzime, cu scopul creșterii sensibilității și selectivității. Nanomaterialele folosite au fost nanotuburi de carbon funcționalizate cu grupări carboxil sau amido cu scopul de favoriza interacțiunile dintre enzimă și matricea de imobilizare, fără a fi necesară și etapa de reticulare. De asemenea, s-au utilizat nanofibre de carbon și grafen funcționalizat cu grupări hidroxil.

Pentru biosenzorii colorimetrici s-au preparat straturi de silicagel cu și fără enzimă (lacază sau tirozinază un amestec de tetrametoxisilan și metil-trimetoxisilan care s-au depus pe electrozi serigrafiați de ITO.

De exemplu, într-un studiu, prima etapă pentru construirea biosenzorilor enzimatici a fost modificarea unor electrozi serigrafiați pe bază de carbon (SPE/C) cu nanotuburi de carbon cu strat simplu. Acest procedeu a fost realizat prin dispersarea pe suprafața activă a electrodului suport a unui volum de 10 μL dintr-o suspensie preparată în prealabil din SWCNT. Pentru prepararea suspensiei de SWCNT s-au dispersat 10 mg de pulbere de nanotuburi de carbon cu strat simplu într-un amestec de solvenți alcătuit din dimetilformamidă și apă ultrapură în raport 1:1. Pentru o dispersare optimă, suspensia a fost ultrasonată timp de 30 de minute.

Volumul de suspensie optim (10 μL) a fost adăugat pe suprafața electrozilor SPE/C cu ajutorul unei micropipete Eppendorf în două etape succesive. După fiecare etapă electrozii s-au uscat într-un exicator, la temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ timp de 2 ore.

A doua etapă a constat în construirea a două tipuri de biosenzori enzimatici prin modificarea SPE/SWCNT cu lacază, respectiv tirozinază. Soluțiile enzimatică au fost adăugate pe suprafața SWCNT/SPE prin tehnica turnării, urmată de reticulare cu ajutorul vaporilor de glutaraldehidă. După adăugarea a 5 μL de soluție enzimatică, electrozii au fost păstrați în exicator timp de o oră pentru uscare. Încă 5 μL au fost adăugați în același mod. Expunerea la vaporii de glutaraldehidă a fost timp de 1 minut pentru fiecare electrod. Reticularea asigură o conexiune favorabilă a SWCNT cu enzima. Totuși, un timp de expunere mai lung ar putea scădea activitatea enzimatică datorită modificărilor în structura tridimensională a heteroproteinei. După imobilizare, biosenzorii au fost păstrați la 4 $^{\circ}\text{C}$ până la utilizare, maximum 72 ore. În Figura 2 sunt prezentate etapele procesului de preparare a biosenzorilor pe bază de lacază și tirozinază și schemele reacțiilor care au loc între glutaraldehidă și enzimă.



Figura 2. Procesul de preparare a biosenzorilor pe bază de tirozinază și respectiv lacază imobilizate pe electrozi serigrafiați de carbon modificați cu nanotuburi de carbon

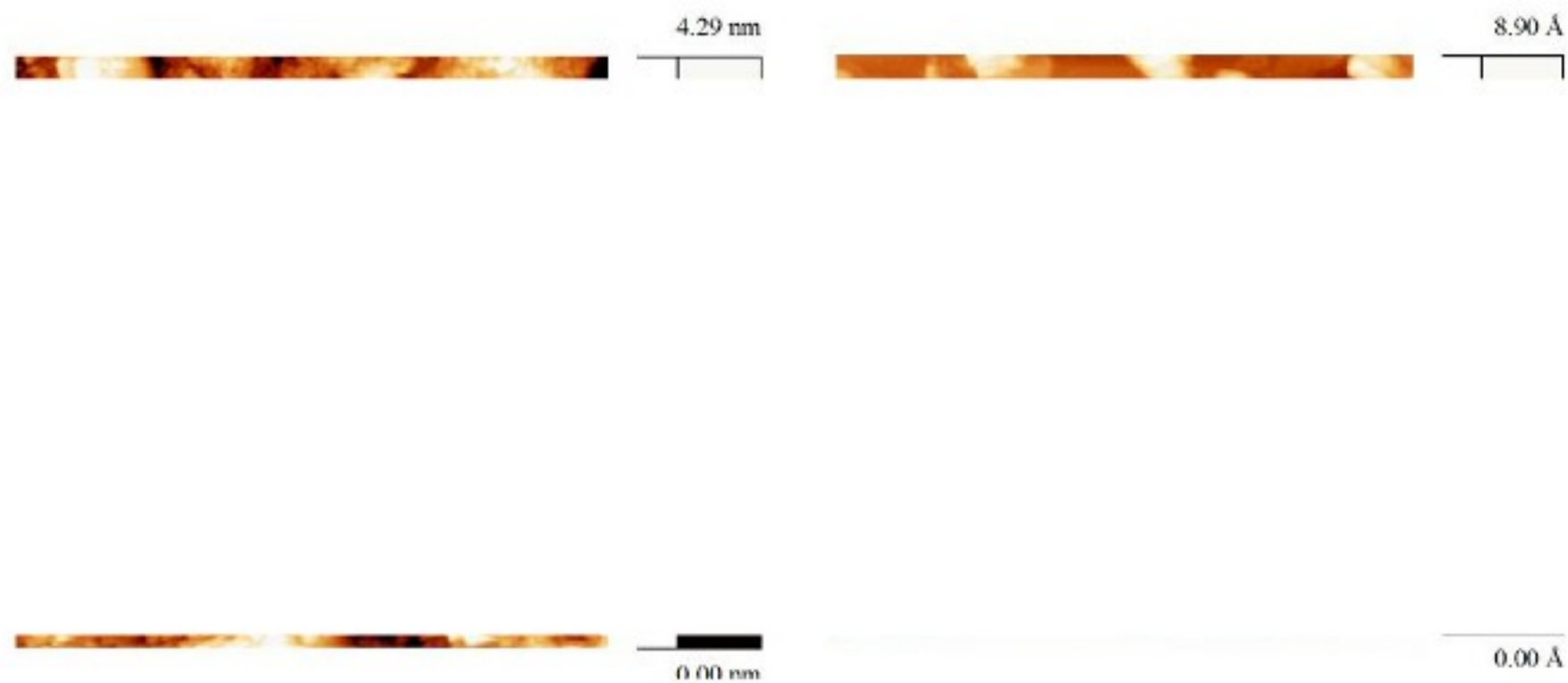
Caracterizarea materialelor sensibile depuse (a suprafeței active a biosenzorilor) s-a realizat prin microscopie electronică de scanare și microscopie de forță atomică. De asemenea, s-au folosit metode electrochimice (voltametrie ciclică (CV), voltametrie puls diferențială (DPV), spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS)) și metode spectrometrice (FTIR). O parte dintre rezultatele obținute se prezintă în continuare. În figura următoare se prezintă imaginile SEM ale unor biosenzori realizați, GPH-MnPc-Tyr/SPE (Figura 3) și OMC-Lac (Figura 4).



Figura 3. Imaginea SEM a suprafeței biosenzorului GPH-MnPc-Tyr/SPE

Figura 4. Imaginea SEM a suprafeței biosenzorului OMC-Lac

În Figura 5 se prezintă imagini AFM ale elementului sensibil al unor biosenzori realizați în cadrul proiectului.



Imaginea AFM a unui strat sensibil care conține tirozinază și ftalocianină de mangan

Imaginea AFM a unui strat sensibil - lacază depusă pe carbon mezoporos

Figura 5. Imaginile AFM ale elementului sensibil

Pentru biosenzorii optici s-a preparat matrice de silicagel cu și fără enzimă (lacază sau tirosinază) folosind un amestec de silani, tetrametoxisilan și metil-trimetoxisilan, formarea unui gel în prezența apei și a acidului clorhidric urmată de depunerea pe electrozi serigrafiați de ITO.

Procedura a constat în prepararea unei soluții formată din 1400 μL de tetrametoxisilan și 600 μL metil-trimetoxisilan, 500 μL de apă și 50 μL de soluție de HCl 0,01 M și amestecarea lentă a acesteia timp de o oră. A doua soluție preparată a fost soluția tampon fosfat de pH 5 (pentru lacază) sau 7 (pentru tirosinază) și concentrație 0,1 M ce conține 5 mg/mL enzimă. Apoi volume egale din cele două soluții se amestecă rapid și apoi 20 μL din amestec se depun pe electrodul de ITO și după formarea gelului (5 minute) electrodul se introduce în soluție tampon fosfat de pH 6,5 și concentrație 0,1 M și se păstrează la 4 °C până la utilizare. Spectrele UV-Vis s-au înregistrat pentru compușii fenolici și pentru biosenzor înainte și după interacțiunea biocatalitică folosind o cuvetă de cuarț ce conține 3 mL soluție tampon fosfat 0,1 M de pH 5 (pentru lacază) sau 7 (pentru tirosinază).

În continuare se prezintă rezultatele obținute la analiza catecolului pentru biosenzorul pe bază de lacază. În urma interacțiunii enzimă-substrat se observă o scădere a absorbantei de la 275 nm și apariția unei benzi de absorbție la 400 nm, care poate fi folosită pentru monitorizarea procesului de oxidare a catecolului biocatalizat de lacază. În Figurile 6 și 7 se prezintă spectrul catecolului înainte și după interacțiunea cu lacaza din stratul sensibil al biosenzorului și curba de calibrare a biosenzorului optic pe bază de lacază față de catecol obținută prin monitorizarea absorbantei la 400nm.



Figura 6. Spectrul de absorbție a catecolului (linia roșie) și al produsului de reacție (linia albastră) obținut în reacția catalizată de lacază.



Figura 7. Curba de calibrare a biosenzorului pe bază de lacază față de catecol obținută prin monitorizarea absorbantei la 400nm

În Tabelul 3 se prezintă principalii biosenzori optici pe bază de silicagel realizați în acest proiect care diferă prin enzimele folosite, compușii țintă și limitele de detecție (LOD).

Tabelul 3. Biosenzori optici realizați în proiect

| Enzimă | Analit | LOD/ μM |
|-------------------------------------|-------------|--------------------|
| T | | |
| L | | |
| l | | |
| Lacaza din <i>Agaricus bisporus</i> | VCIBUSOZINA | 0,11 |

Se poate observa că biosenzorii optici au, în general, limite de detecție mai mari comparativ cu senzorii electrochimici, deci sunt mai puțin sensibili la detecția markerilor din uleiul de măsline.

Activitatea 1.3. Sinteza polimerilor conductori și a polimerilor imprimați molecular

Pentru a realiza noi senzori electrochimici s-a realizat depunerea unor polimeri organici electroconductori folosind monomeri derivați de la tiofen (3,4-etilenedioxitiofen (EDOT), hidroximetil-EDOT) și pirol în prezența unor diferiți anioni dopanți (hexacianoferrat (II) de potasiu, perclorat de litiu, sulfatul de sodiu, Prussian Blue etc.), unii dintre aceștia cu dublu rol, atât de agenți dopanți cât și de mediatori ai schimbului de electroni, proces important în timpul detecției electrochimice. Astfel, s-au obținut senzori electrochimici inovatori pe bază de polimeri conductori dopați cu diferiți anioni care pot detecta cu succes markeri din uleiul de măsline. În Tabelul 4 se prezintă centralizat modul de fabricare a senzorilor.

Tabelul 4. Condițiile experimentale pentru obținerea polimerilor conductori

| Monomer | c (M) | Agenti dopanti | Conditii electro- | Solutii de electroliti folosite la |
|---------|-------|----------------|-------------------|------------------------------------|
| EC | | | | |
| HI | | | | |
| Pi | | | | |

Straturile de polimer electrosintetizate prin cronoamperometrie în prezența de diferiți agenți dopanți au fost caracterizate prin SEM și electrochimic. În Figura 8 se prezintă imagini SEM a unor straturi de polimeri conductori obținute prin electropolimerizare.

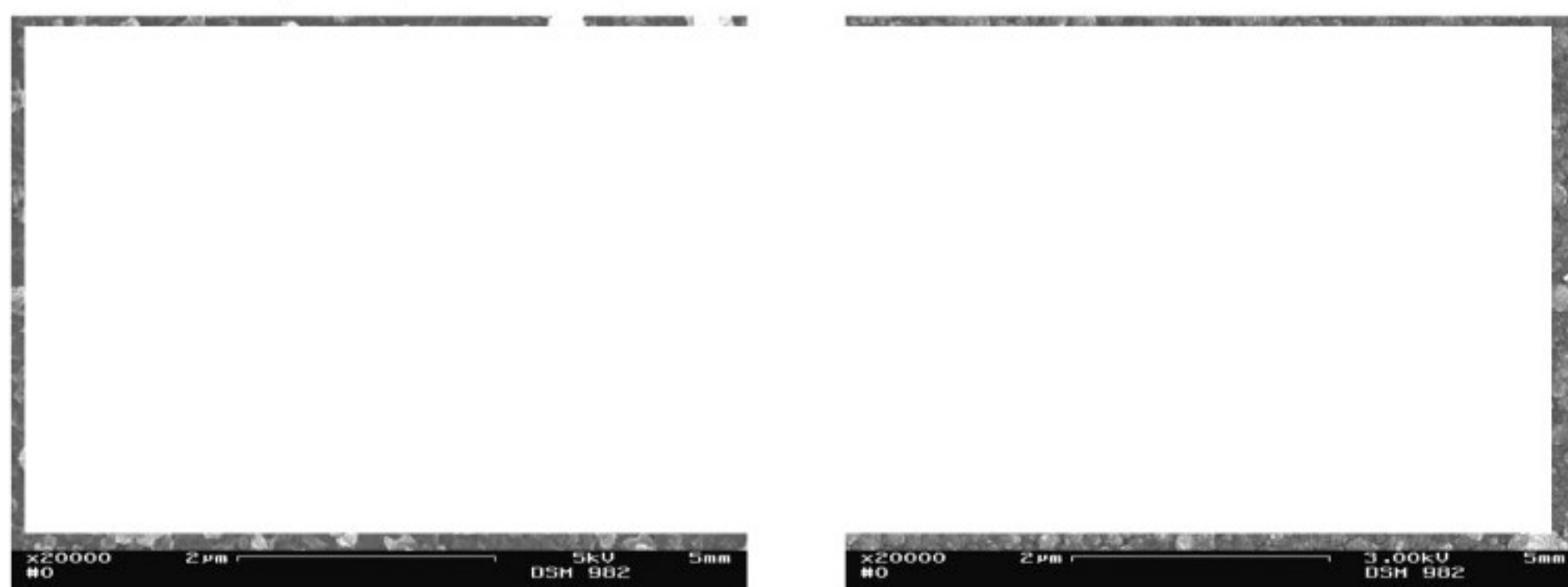


Figura 8. Imagini SEM a PEDOT dopat cu ioni sulfat (stânga) și PPy dopat cu ioni sulfat (dreapta)

Răspunsurile electrochimice ale senzorilor pe bază de polimeri conductori au variat în funcție de natura polimerului dar și de natura agentului dopant. Astfel, în Figura 9 se prezintă răspunsurile senzorilor pe bază de PPY/FCN și PEDOT/FCN imersați în soluție de KCl 0,1M. Se observă picuri redox relaționate cu polimerul conductor iar în cazul agentului dopant ferocianură (FCN) și picuri datorate acestuia.



Figura 9. Semnalele senzorilor în soluție PPY/FCN și PEDOT/FCN imersați în soluție de KCl 0,1 M în timpul procesului de stabilizare a semnalului voltametric.

Senzorii obținuți pot fi folosiți ca atare pentru obținerea amprente chimice a uleiurilor de măsline sau pot fi transformați în biosenzori prin imobilizarea unor enzime, cu rol biocatalitic în determinarea markerilor din uleiul de măsline. Astfel au fost obținuți biosenzori cu o bună sensibilitate și selectivitate pentru biomarkeri din uleiul de măsline.

În Figura 10 se prezintă voltamogramele ciclice ale biosenzorului PPY/FCN/Tyr când este imersat în soluție de tirosol de concentrație variabilă și curba de calibrare corespunzătoare.



Figura 10. Voltamogramele ciclice ale biosenzorului PPY/FCN/Tyr imersat în soluție de tirosol de concentrație variabilă; b) Curba de calibrare

Principali biosenzori pe bază de polimeri conductori, enzimele folosite, compușii țintă și limitele de detecție (LOD) se prezintă în Tabelul 5.

Tabelul 5. Biosenzori pe bază de polimeri conductori

| Senzor | Enzimă | Analit | LOD/nM |
|--------|--------|--------|--------|
| PEI | | | |
| PEI | | | |
| PH | | | |
| PH | | | |
| PP' | | | |
| PP' | | | |
| PP' | | | |

Pentru sinteza polimerilor imprimați molecular s-au folosit ca monomeri acid acrilic și acid metacrilic, iar ca moleculele țintă oleuropeina, tirosolul, hidroxitirosolul, verbascosida și trigonelina. Procedul este similar pentru cei doi monomeri iar agentul de reticulare și inițiatorul au fost etilen-glicol-acrilatul de dimetil și peroxidul de benzoil pentru toate cazurile. În continuare se prezintă procesul realizat pentru obținerea de senzori de acest tip.

0,02 g de acid acrilic (monomer) și 0,02 g de trigonelină (moleculă șablon) s-au dizolvat în 20 mL etanol și amestecul a fost supus ultrasonicării pentru 30 min. Într-un alt pahar, 400 μL de etilen glicol acrilat de dimetil (agent de reticulare) și 0,0050 g de peroxid de benzoil (inițiator) au fost dizolvate în 5 mL etanol și soluția a fost lăsată în repaus 30 de minute. Cele două soluții se amestecă și apoi se agită energetic timp de 1 oră la 25 °C. Ulterior, amestecul se încălzește la 50 °C timp de 90 min pentru finalizarea procesului de polimerizare. Aductul polimer molecular-trigonelină obținut sub formă solidă se spală repetat cu etanol până când molecula șablon trigonelina este complet îndepărtată din aduct. Polimerul molecular imprimat molecular se usucă și se păstrează la rece, în absența luminii.

Polimerul imprimat molecular astfel obținut se dispersează în etanol prin ultrasonare și apoi se depune pe suprafața electrozilor serigrafiați de carbon și se obțin astfel senzori pe bază de polimer imprimat molecular selectivi pentru detecția markerilor din uleiul de măsline.

În Figura 11 se prezintă răspunsurile sensorului C/poliacrilat/Hidroxitirosol la cantități crescătoare de hidoxitirosol înregistrate prin DPV și dreapta de etalonare. Sensorul are selectivitate și sensibilitate adecvate pentru determinarea hidoxitirosolului din mostre complexe.



Figura 11. Răspunsurile sensorului în soluție de hidoxitirosol în domeniul 50-300 nM și dreapta de etalonare

În Tabelul 6 se prezintă principalii senzori pe bază de polimeri imprimați molecular dezvoltati în acest proiect și limitele de detecție ale acestora.

Tabelul 6. Senzori pe bază de polimeri imprimați molecular

| Senzor | LOD/nM | Senzor | LOD/nM |
|--------|--------|--------|--------|
| C/ț | | | |
| C/ț | | | |
| C/ț | | | |

Prin această metodă s-au obținut senzori pe bază de polimeri imprimați molecular cu biomarkeri din uleiul de măsline, care pot fi folosiți cu succes pentru detectarea adaosurilor de alte uleiuri în uleiul de măsline. Cele mai bune rezultate s-au obținut în cazul trigonelinei.

Rezultatele obținute în Activitatea 1 sunt în concordanță cu obiectivele proiectului, activitățile specifice s-au realizat 100% și obiectivele generale și specifice s-au îndeplinit în totalitate.

Activitatea 2. Dezvoltarea și caracterizarea biosenzorilor

Activitatea 2.1. Dezvoltarea unei platforme multi-senzor

În proiect s-au desfășurat o serie de activități pentru realizarea unui sistem modular multisenzor, care să includă mai multe posibilități de măsurare folosind tehnici de detecție diferite: amperometrie, voltametrie, potentiometrie și conductometrie. De asemenea, s-a studiat modalitatea de integrare și măsurare simultană cu biosenzori colorimetrici folosind spectrometria în UV sau Vis. S-a evaluat posibilitatea de a realiza măsurătorile simultan sau succesiv, care trebuie să fie design-ul celulei electrochimice și ce cantitate de probă este minim necesară pentru realizarea măsurătorilor.

Activitatea 2.2. Caracterizarea biosenzorilor în prezența markerilor

Biosenzorii preparați și caracterizați morfologic, spectrometric și electrochimic în etapele anterioare au fost utilizați pentru detecția unor biomarkeri din uleiul de măsline.

În continuare se prezintă studiile desfășurate pentru detecția electrochimică a hidroxitirosolului cu 3 noi biosenzori pe bază de ftalocianină de lutețiu și tirozinază, peroxidază sau lacază.

Rolul mediatorului schimbului de electroni la detecția electrochimică a hidroxitirosolului a fost evidențiat prin înregistrarea voltamogramelor ciclice într-o soluție 10^{-4} M hidroxitirosol și 10^{-1} M KCl, prezentate în Figura 12.

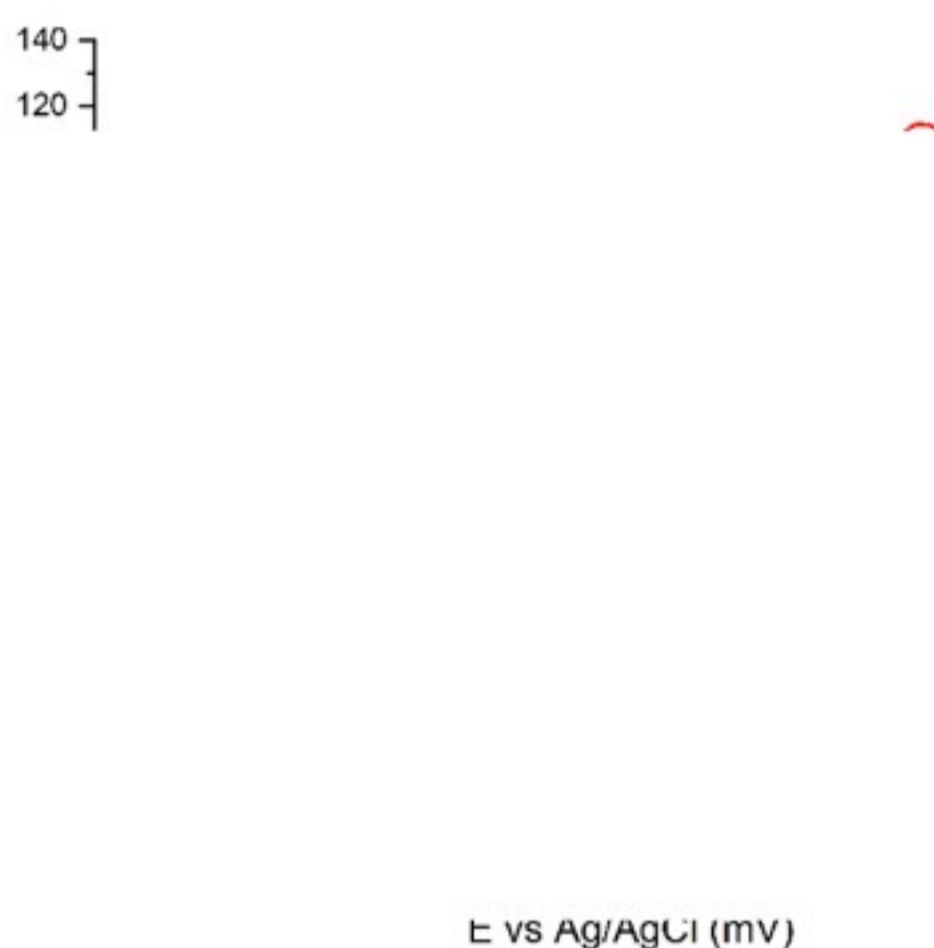
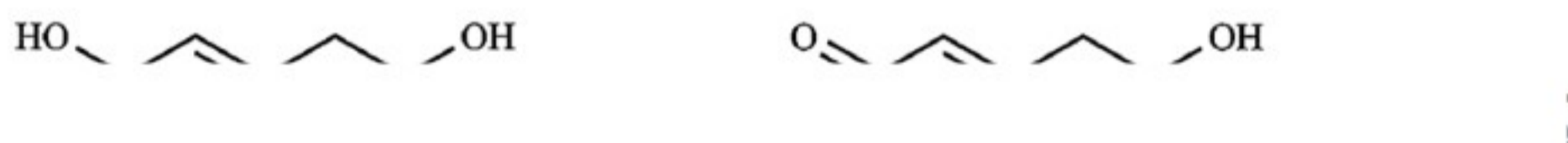


Figura 12. Voltamogramele ciclice ale biosenzorilor în soluție 10^{-4} M hidroxitirosol și 10^{-1} M KCl. Este evident că sensibilitatea biosenzorului crește foarte mult datorită efectului de mediator al LuPc₂, care facilitează transferul de electroni dintre reacția redox a hidroxitirosolului și suprafața sensibilă a biosenzorului. Mecanismul reacției redox cvasireversibile a hidroxitirosolului este prezentat în schema următoare și presupune schimbul a 2 electroni și doi protoni.



Pentru determinarea cât mai sensibilă a hidroxitirosolului s-au optimizat condițiile experimentale, pH-ul soluției de analizat, soluția tampon și tăria ionică, temperatura etc.

Pentru determinarea sensibilității biosenzorului s-a realizat curba de etalonare prin înregistrarea voltamogramelor ciclice în soluție de hidroxitirosol de diferite concentrații, în domeniul 2-200 μM . Voltamogramele ciclice obținute se prezintă în Figura 13.



E vs Ag/AgCl (mV)

Figura 13. Voltamogramele ciclice ale biosenzorului pe bază de tirozinază în soluții de hidroxitirozol de diferite concentrații

Din reprezentarea grafică a curenților picului anodic și respectiv catodic în funcție de concentrația analitului s-au obținut liniarități bune, cu coeficienți de corelație mai mari de 0,9 (Figurile 14 a și b).

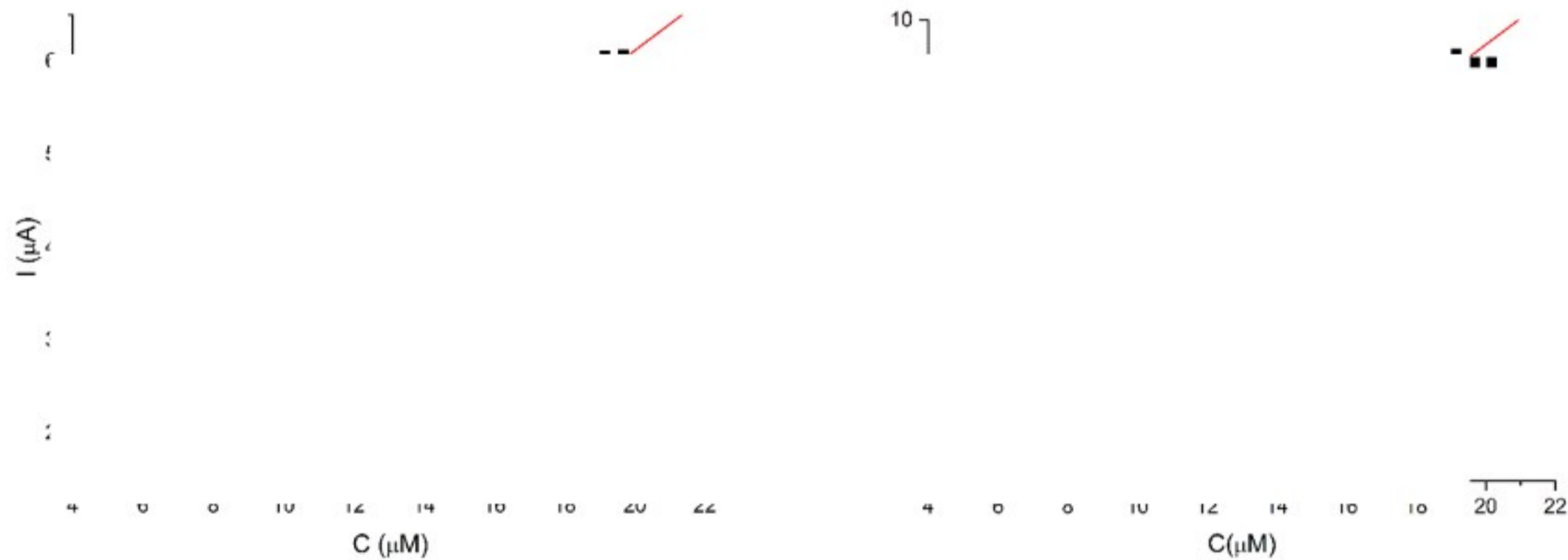


Figura 14. a) Dreapta de calibrare corespunzătoare picului anodic pentru hidroxitirozol; b) Dreapta de calibrare corespunzătoare picului catodic pentru hidroxitirozol

Pentru ambele picuri s-au obținut valori bune ale limitei de detecție, 1,36 μM pentru procesul catodic și 2,38 μM pentru picul anodic.

S-a determinat că cinetica procesului catodic, care corespunde reducerii derivatului ortoquinonic al hidroxitirosolului format în reacția enzimatică, este de tip Michaelis-Menten. Rezultatele obținute, K_M (66,77 μM) și I_{max} (24,22 μA) demonstrează că enzima immobilizată în biosenzor își păstrează activitatea, are o afinitate bună față de substrat și prin urmare biosenzorul are sensibilitate ridicată.

Rezultatele obținute pentru cei trei biosenzori din acest studiu sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabelul 7. Datele privind sensibilitatea biosenzorilor și parametrii cineticii enzimatiche

| Enzima | Picul de oxidare | | Picul de reducere | | Parametrii Michaelis-Menten | |
|--------|------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| | E (V) | LOD(μM) | E (V) | LOD(μM) | K_M (μM) | I_{max} (μA) |
| Ti | | | | | | ! |
| Pe | | | | | | ; |
| | | | | | | ; |

În continuare se prezintă, ca exemplu, studiile desfășurate pentru detecția electrochimică a oleuropeinei cu doi biosenzori pe bază de tirozinază și respectiv lacază. În prima etapă s-a studiat comportamentul electrochimic al oleuropeinei folosind cei doi biosenzori nou construiți, SPE/SWCNT/Lac și SPE/SWCNT/Tyr, prin intermediul CV și voltametriei de undă pătrată (SWV). Pentru

fiecare biosenzor s-a preparat o soluție 10^{-4} M de oleuropeină, cu pH 5,0 (pentru Lac) și pH 7,0 (pentru Tyr). În ambele situații se observă picuri bine evidențiate care corespund oxidării și reducerii oleuropeinei, diferențele datorându-se efectului biocatalitic diferit al celor două enzime. Pentru realizarea curbei de calibrare s-au înregistrat voltamogramele de undă pătrată ale celor doi biosenzori în soluții de oleuropeină în domeniul de concentrație 0,01 μ M-28,62 μ M. În Tabelul 8 sunt prezentate ecuațiile regresii liniare utilizate pentru calcularea limitelor de detecție și cuantificare.

Tabelul 8. Ecuația dependenței liniare, R^2 , LOD și LOQ pentru cei doi biosenzori

| Biosenzor | Sensibilitatea μ A $\times\mu$ M ⁻¹ ·cm ⁻² | R ² | LOD (M) | LOQ (M) |
|---------------|---|----------------|-----------------------|-----------------------|
| SPE/SWCNT/Lac | 0,0012 | 0,9753 | 0,75·10 ⁻⁸ | 0,05·10 ⁻⁷ |
| SPE/SWCNT/Tyr | 0,0012 | 0,9753 | 0,75·10 ⁻⁸ | 0,05·10 ⁻⁷ |

SPE/SWCNT/Tyr se remarcă prin limite de detecție și cuantificare mai reduse, confirmându-se astfel proprietățile electrocatalitice foarte bune ale acestui biosenzor.

În Tabelul 9 se prezintă principalii biosenzori realizați în proiect, compușii țintă și limitele de detecție.

Tabelul 9. Biosenzori pe bază de nanomateriale și enzime

| Material sensibil | Enzima | Analit | LOD/nM |
|-------------------|------------------------|---------------------|--------|
| Carbon mezeneros | Colesterol oxidaza din | β -sitosterol | 0,15 |
| Nar | | | |
| Nar fun | | | |
| Nar fun | | | |
| Car | | | |
| Nar fun | | | |
| Oxi | | | |
| Car | | | |
| Nar aur | | | |
| Nar | | | |
| Car | | | |
| Oxi | | | |
| Gra | | | |
| Nar | | | |
| Car | | | |
| Car | | | |

Majoritatea biosenzorilor realizați în proiect s-au dovedit a fi adecvați pentru construirea rețelei de biosenzori pentru determinarea falsificării uleiurilor de măsline. Opt biosenzori, cu cele mai bune caracteristici și cu selectivități diferite au fost aleși pentru construirea rețelei de biosenzori pentru determinarea falsificării uleiurilor de măsline: PEDOT/FCN/Tirosinaza, PPY/FCN/Tirosinaza, C/poliacrilat/ Trigonelină, Nanofibre de carbon/nanoparticule de aur/Colesterol dehidrogenaza, Nanotuburi de carbon cu un singur perete, funcționalizate cu grupări carboxyl /Lacaza, Carbon /Ftalocianină de cobalt/Lacaza, Oxid de grafen / Lacaza, C/polimetacrilat/Oleuropeină.

Concluzia obținută pe baza rezultatelor obținute a fost că pentru o fiabilitate superioară a sistemului să se folosească ca tehnică de detecția electrochimică (amperometrie și voltametrie), măsurătorile să se realizeze succesiv și celula electrochimică să aibă un volum cât mai mic.

Activitatea 2.3. Dezvoltarea unor rețele de biosenzori pentru analiza markerilor din uleiul de măsline

Pentru analiza uleiurilor de măsline pure sau falsificate folosind biosenzorii electrochimici s-au realizat mai multe procedee pentru extragerea fracțiunii polare: extracție cu metanol-apă, extracție în soluție de HCl, emulsii cu Triton x-100 și solvenți eutectici. În toate cazurile s-au obținut semnale electrochimice bune cu senzori sau biosenzori electrochimici. Cu toate acestea, metoda de extracție cu metanol-apă s-a dovedit a fi cel mai simplu de realizat experimental, extractul poate fi analizat atât cu biosenzori cât și cu HPLC, și prin urmare această metodă s-a utilizat pentru pre-tratamentul probelor de ulei în vederea analizei cu sistemul multiparametric.

Pentru design-ul rețelei de biosenzori care include biosenzorii cu cele mai bune performanțe analitice și selectivitate încrucișată pentru analiza simultană sau secvențială a probelor de ulei de măsline au fost luate în considerare mai multe variante constructive. După o analiză minuțioasă s-a decis utilizarea unui sistem care include 8 biosenzori diferiți, fiecare prevăzut cu contraelectrod și electrod de referință. Prin intermediul unui multiplexor fiecare sistem cu trei electrozi se activează secvențial și se înregistrează semnalele electrochimice cu fiecare biosenzor.

Cei 8 biosenzori pot face parte din aceeași plăcuță de aluminiă sau fiecare poate fi individual, iar conectarea la potențiostat se face prin intermediul unui cablu pentru control și achiziția datelor. În Figura 15 se prezintă design-ul sistemului multibiosenzor precum și celula electrochimică (capacitate 100 μ L) individuală pentru fiecare biosenzor.

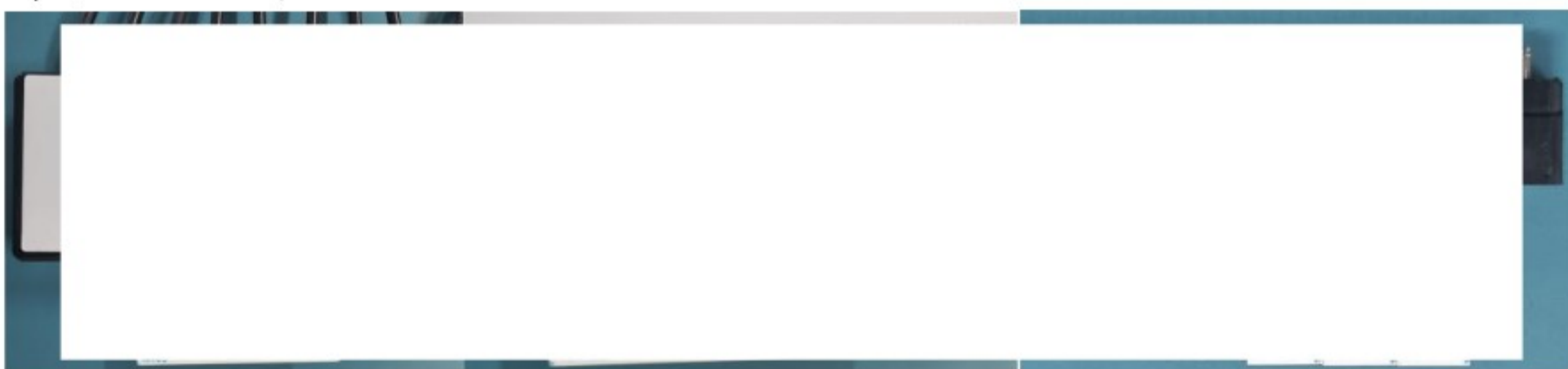


Figura 15. Rețeaua cu 8 biosenzori pe aceeași plăcuță de aluminiă, celula electrochimică pentru fiecare biosenzor și sistemul cu biosenzori individuali

După ce semnalele biosenzorilor sunt înregistrate acestea sunt procesate pentru determinarea concentrației markerilor și/sau a purității probelor de ulei. Portabilitatea sistemului este asigurată prin folosirea unui potențiostat/galvanostat portabil și biosenzori electrochimici, lichid/lichid a fracțiunii polare din ulei cu metanol/apă și timp de analiză de maxim 5 minute pentru o probă.

Activitățile specifice prevăzute în activitatea A2 au fost realizate în totalitate, iar gradul de îndeplinire al obiectivelor este de 100%.

Activitatea 3. Dezvoltarea de modele inteligente și aplicarea acestora în analiza datelor

În această activitate au fost dezvoltate modele inteligente prin aplicarea de metode de analiză a datelor multivariante provenite de la diferite tipuri de măsurători realizate pentru probe de uleiuri de măsline (extravirgin sau din turte de măsline), alte uleiuri vegetale cum sunt ulei de floarea soarelui, ulei de porumb, ulei de rapiță, ulei de soia, ulei de arahide, ulei de dovleac, ulei de sâmburi de struguri, ulei de cocos, ulei de susan, ulei de palmier și amestecuri ale acestora. Probele de uleiuri au fost analizate individual și sub formă de amestecuri din ulei de măsline extravirgin și alte uleiuri în diferite proporții pentru antrenarea sistemelor și determinarea limitelor de detecție. Modelele au fost realizate prin mai multe metode dintre care se pot menționa analiza componentelor principale (PCA), analiza hărții termice (heatmap analysis – HMA), analiza discriminantă rezolvată prin minime pătrate parțiale (PLS-DA), modelarea soft și independentă a analogiei claselor (SIMCA) și regresii prin minime pătrate parțiale (PLS1 și PLS2). În plus s-au dezvoltat modele de clasificare pe bază de rețele neuronale artificiale (ANN) și mașină de învățare (machine learning - ML).

De exemplu, metodele PCA și HMA au fost utilizate pentru diferențierea uleiurilor de măsline virgin extra de alte uleiuri vegetale pe baza datelor obținute prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție (HRMS) țintită și nețintită la determinarea compușilor fenolici, triterpenici și alți compuși biologic activi. În Figura 16 este prezentată distribuția uleiurilor vegetale în graficul scores PC1-PC2 al PCA.



Figura 16. Rezultatele PCA (scores și loadings) ale diferitelor uleiuri vegetale bazate pe: (A) analiza HRMS țintită a biomarkerilor compuși fenolici și acizi triterpenici și (B) analiza de screening HRMS nețintită. (EVOO*-ulei de măsline virgin extra origine Italia; EVOO-ulei de măsline virgin extra comercial; VOO-ulei de măsline virgin comercial; SF-ulei de floarea soarelui; GS-ulei de semințe de struguri; P-ulei de dovleac; L-ulei de in; Se - ulei de susan; He - ulei de cânepă; Rp - ulei de rapiță; W - ulei de nucă; P-ulei de palmier; R-ulei de orez; A-ulei de migdale; CN-ulei de cocos și So - ulei de soia).

PCA a indicat o discriminare clară între uleiurile de măsline (EVOO*, EVOO și VOO) și alte uleiuri vegetale, dar nu a fost observată o discriminare clară între diferitele uleiuri din semințe și nuci, probabil din cauza unei varietăți foarte mari de uleiuri vegetale analizate.

Pentru HMA mostrele de ulei studiate au fost grupate în două grupuri principale, clusterul C1 corespunzând uleiurilor de măsline (EVOO*, EVOO și VOO), și clusterul C2 corespunde uleiurilor obținute din semințe și nuci. În plus, variabilele cuantificate au fost grupate în două grupuri: G1, care grupează variabilele reprezentative pentru uleiurile de măsline și gruparea G2, care include compușii fenolici reprezentativi pentru semințe și nuci. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 17 A și B.

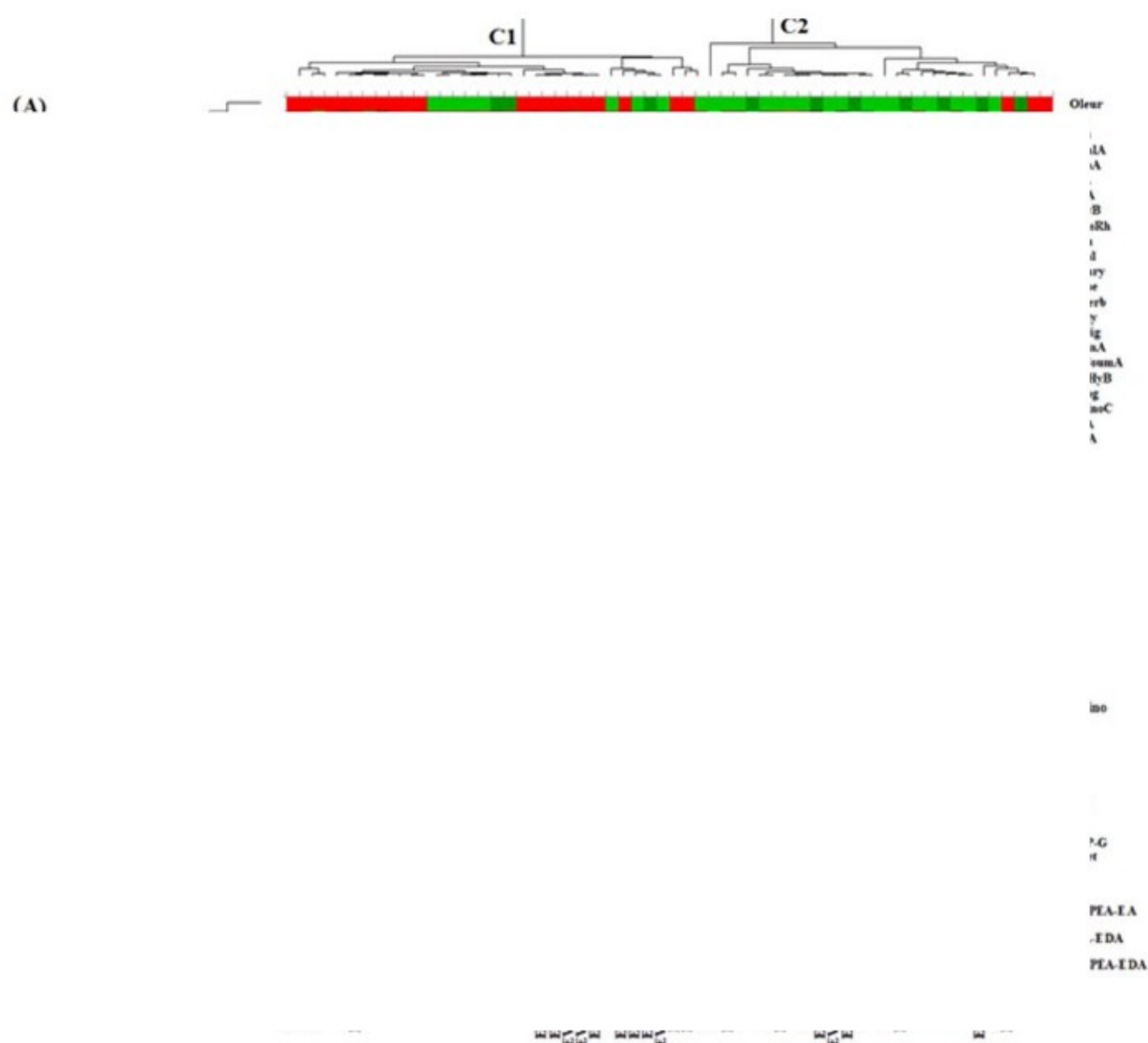


Figura 17. Harta termică a caracteristicilor discriminante în funcție de diferitele tipuri de uleiuri vegetale analizate (celulele roșii și verzi corespund nivelurilor scăzute și, respectiv, ridicate a compușilor în probe. Coloanele sunt mostre de ulei, iar rândurile sunt compușii determinați, colorați în funcție de ponderea lor în diferitele tipuri de ulei). (A) Analiza HRMS țintită a compușilor fenolici și a acizilor triterpenici și (B) analiza de screening HRMS nețintită. Scala de culori: roșu (valori mai mari) până la verde (valori mai mici).

Pentru stabilirea corelațiilor dintre semnalele obținute cu biosenzorii și rezultatele obținute prin HPLC s-au realizat modele de regresie multivariante pentru compușii fenolici specifici din uleiurile de măsline virgin extra. În Figura 18 se prezintă graficul corelației dintre conținutul de oleuropeină determinat practic prin HPLC și cel prezis de sistemul multibiosenzor din modelul de regresie PLS2.



Figura 18. Corelația dintre conținutul de oleuropeină determinat practic prin HPLC și cel prezis de sistemul multibiosenzor

Se observă că valorile prezise de sistemul de biosenzori sunt apropiate ca valoare de cele obținute experimental, cu coeficienți de corelație mai mari de 0,96 atât la calibrare cât și la validare.

În A3 au fost realizate integral (100%) activitățile specifice fiind selectate și optimizate metodele de analiză a datelor și s-au realizat modele de discriminare, clasificare și regresie.

Activitatea 4. Validarea sistemului multi-parametric în analiza de probe reale

Sistemul constituit din 8 biosenzori cu cele mai bune performanțe a fost validat prin analiza unor probe de uleiuri de măsline virgin extra comerciale și probe de uleiuri de măsline virgin extra furnizate de Universitatea din Bari precum și probe adulterate la nivel de laborator cu ulei de măsline rafinat, cu ulei de măsline dezodorizat, cu uleiuri de turte de măsline, cu uleiuri de floarea soarelui, porumb, soia, rapiță, nuci, sâmburi de struguri și in. Concentrațiile de ulei adăgat în probele de uleiuri de măsline virgin extra au fost de 1%, 2% și 5%. Prepararea probelor s-a realizat prin cântărirea uleiurilor și omogenizarea lor s-a realizat prin folosirea unor agitatoare de tip vortex.

Probele pure și cele adulterate s-au analizat prin HPLC pentru identificarea biomarkerilor fenolici și steroidici, prin spectrometrie în domeniul IR, spectrofotometrie UV-Vis și cu sistemul multibiosenzor. Datele obținute au fost folosite pentru realizarea de modele de clasificare și modele de regresie PLS2 pentru evaluarea corelațiilor dintre datele obținute cu biosenzori și cele obținute prin spectrometrie și HPLC. Pentru clasificarea probelor de ulei adulterate la nivel de laborator s-au folosit metode de clasificare precum PLS-DA, SIMCA, rețele neuronale - perceptron multinivel și mașină de învățare - machine learning. A fost studiată și utilizarea altor metode de clasificare precum clasificatori bazați pe vectori suport, arbori de decizie, cel mai apropiat vecin și rețele bayesiene. Ca rezultat principal al metodelor de clasificare s-a obținut și analizat matricea de confuzie, numită și tabelul de clasificare greșită, care este o reprezentare a exactității clasificării statistice.

În continuare se prezintă rezultatele obținute în cazul probelor de ulei de măsline virgin extra adulterate cu alte uleiuri cu concentrații ale uleiului adulterant de 1%, 2% și 5% (Tabelul 10).

Tabelul 10. Probele de uleiuri folosite pentru validarea sistemului multibiosenzor

| Ulei de măsline virgin extra | | Ulei adulterant |
|------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| <i>Universitatea Bari</i> | <i>Comerciale</i> | <i>Ulei de măsline rafinat</i> |
| Fr | | |
| Il | | |
| Tu | | |
| Di | | |
| Ca | | |
| Fa | | |
| | | , de dovleac, de in, de susan, de s |
| | COSTA U ORO, II BIOLOGICO | |

Toate probele s-au analizat în triplicat cu sistemul de biosenzori și în continuare se prezintă o parte dintre rezultatele obținute la discriminarea sau clasificarea probelor de uleiuri pure sau adulterate folosind semnalele voltametrice ale biosenzorilor.

În prima etapă s-au analizat datele obținute cu senzorii la analiza extractelor de ulei provenite de la uleiurile pure (6 probe de uleiuri de măsline virgin extra, 6 uleiuri de turte de măsline, 3 uleiuri de măsline rafinate, 3 uleiuri de măsline dezodorizate parțial, 2 uleiuri de porumb și 6 uleiuri de floarea soarelui) (Figura 19).

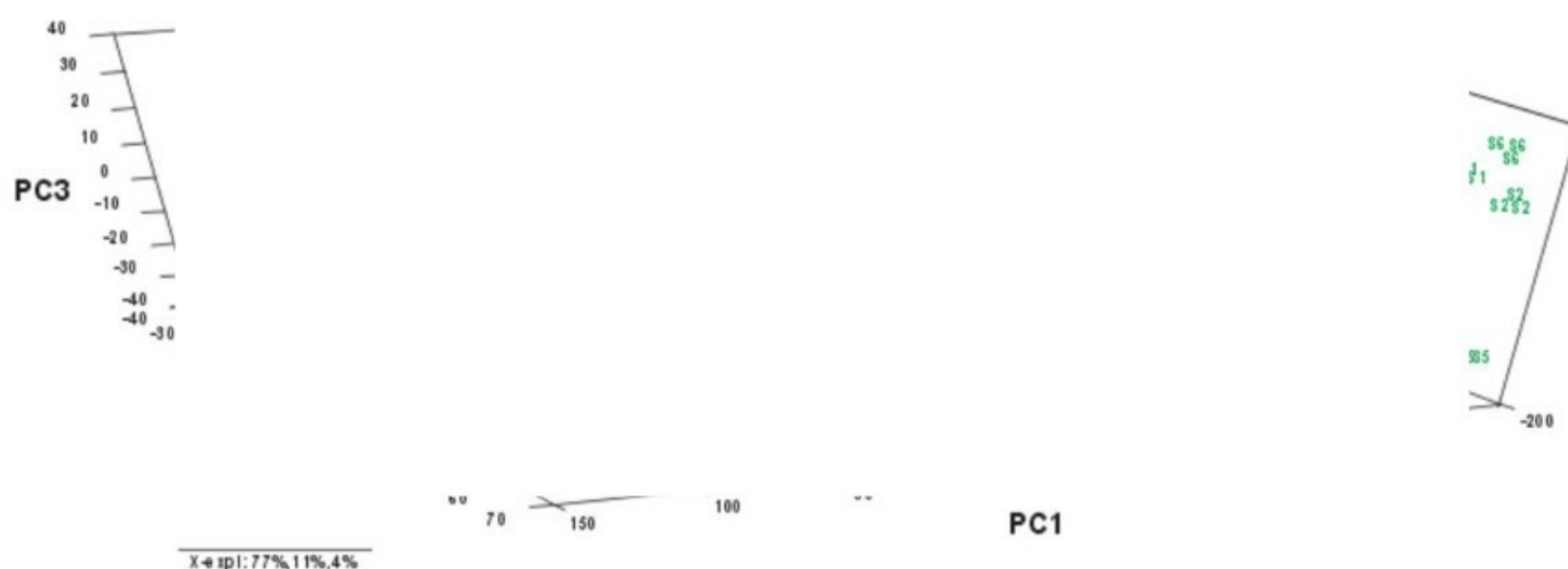


Figura 19. Graficul scores al PCA privind discriminarea probelor de ulei de uleiuri vegetale

Graficul scores al PCA ilustrează că sistemul de biosenzori este capabil să diferențieze uleiurile în funcție de sursa vegetală (măsline, floarea soarelui, porumb) și în cadrul aceleiași surse de producție sunt separate pe categorii (virgin extra, turte, rafinat, dezodorizat). Analiza discriminantă, PLS-DA, a probelor de uleiuri de măsline virgin extra adulterate cu uleiuri de porumb sau floarea soarelui, pe de o parte și uleiuri de măsline de turte, rafinate sau dezodorizate pe de altă parte au condus următoarele rezultate, prezentate în Tabelul 11.

Tabelul 11. Datele cantitative ale PLS-DA pentru clasificarea probelor de uleiuri de măsline virgin extra și cele adulterate cu alte uleiuri vegetale în procent de 5%.

| Tipul de ulei | Calibrare | Validare |
|-----------------------|-----------|----------|
| Ulei | | 8 |
| Ulei de t | | 1 |
| Ulei de n | | 3 |
| Ulei de n | | 1 |
| Ulei floarea soarelui | | 1 |

R_c —coeficientul de corelație la calibrare; R_p — coeficientul de corelație la validare; RMSEC— Eroarea pătratică medie la calibrare; RMSEP— Eroarea pătratică medie la validare.

Se poate aprecia că probele de uleiuri adulterate se diferențiază de uleiurile pure la niveluri ale concentrației de adulterant la niveluri de concentrație sub 5% cu o precizie bună cu coeficienți de corelație mai mari de 0,9 și erori mici, atât la calibrare cât și la validare.

Pentru aplicarea metodei de clasificare SIMCA s-au realizat modele PCA pentru uleiurile pure și probele adulterate s-au folosit ca probe test. Conform rezultatelor prezentate sub forma graficelor Coomans probele adulterate se constituie sub formă de clustere separate de cele ale uleiurilor pure. Așa cum se observă în Figura 20, probele de uleiuri extra virgin falsificate cu uleiuri de turte de măsline sunt statistic diferite de cele pure la niveluri ale concentrației de 1%.

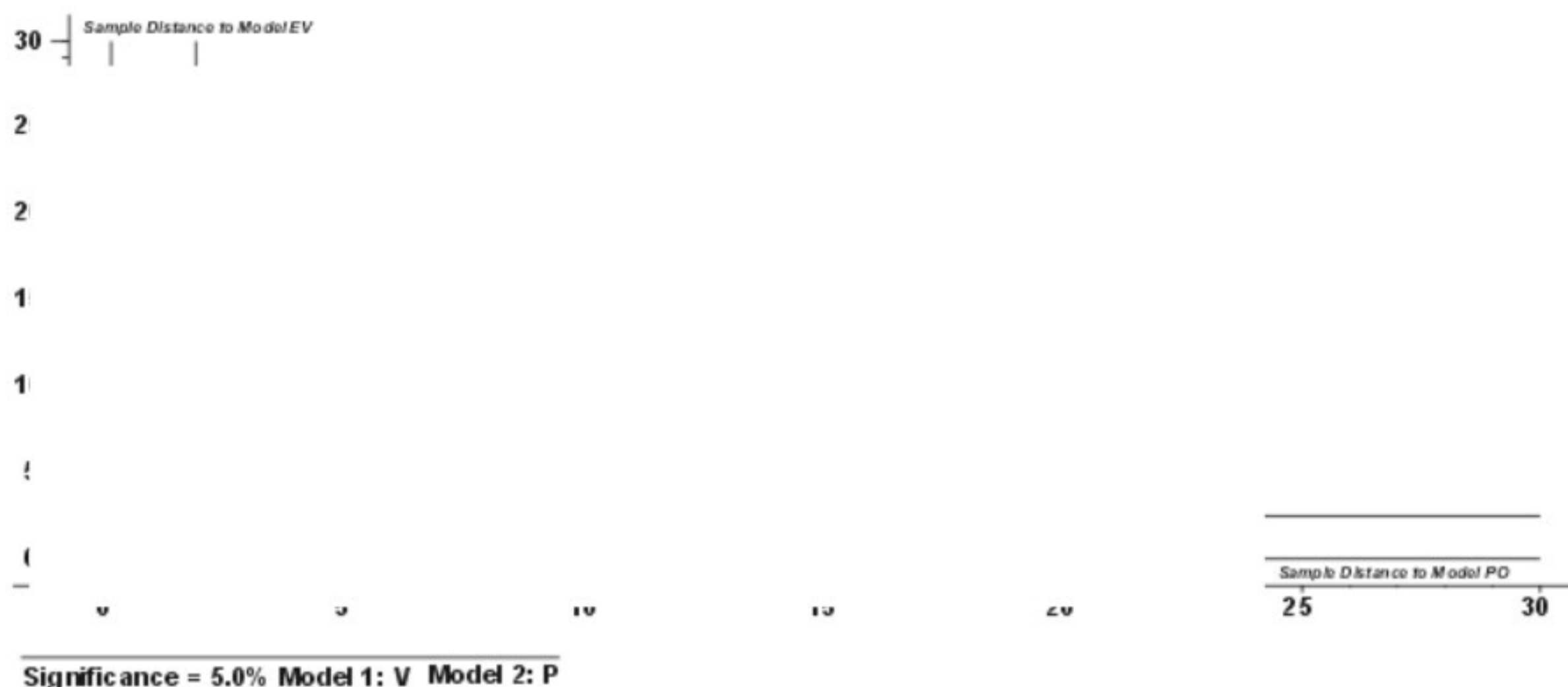


Figura 20. Graficul *Coomans* al SIMCA privind clasificarea probelor de ulei virgin extra adulterate cu 1% uleiuri de turte de măsline.

În Tabelul 12 se prezintă o parte dintre rezultatele obținute la clasificarea probelor de uleiuri analizate cu metoda SIMCA.

Tabelul 12. Tabelul de clasificare probelor prin metoda SIMCA

| Model | Proba analizată | Probe clasificate corect / % | Probe clasificate incorect / % |
|---------|-----------------|------------------------------|--------------------------------|
| UI ulei | | | |
| UI ulei | | | |
| UI | | | |
| Ulei d | | | |
| | S/EV 5% | 100 | 0 |

Se poate concluziona că modele SIMCA asigură o clasificare corectă a probelor de ulei în funcție de gradul de adulterare dacă concentrația de adulterant este în domeniul 2-5% pentru uleiurile de măsline de calitate inferioară și 2% dacă uleiul adulterant este de porumb sau de floarea soarelui.

Prin urmare este necesară dezvoltarea unor modele mai complexe pentru a clasifica cu acuratețe probele adulterate la niveluri de concentrații de 1%. Aplicarea metodelor de clasificare rețele

neuronale - perceptron multinivel și mașină de învățare - machine learning au condus la următoarele rezultate, prezentate sub forma tabelelor de clasificare. Pentru validarea modelelor s-au folosit metoda încrucișată total sau metoda cu grup de testare, folosind trei grupuri, două fiind uleiurile pure și al treilea uleiurile adulterate la același nivel al concentrației (1%, 2%, 5%).

Clasificarea cu algoritm machine learning se prezintă în tabelele 13, 14, 15 pentru probele de uleiuri de măsline virgin extra, uleiuri din turte de măsline și uleiuri măsline virgin extra ce conțin 1% uleiuri din turte de măsline.

Tabelul 13. Rezumatul modelului de clasificare mașină de învățare

| | |
|-----|-------|
| Pro | 7 % |
| Pr | % |
| Ka | |
| Me | |
| Er | 0,107 |

Tabelul 14. Acuratețea clasificării detaliată în funcție de clasă

| Proba | TP | FP Rate | Precision | Recall | F | MCC | ROC | PRC |
|---------------------------|-------|---------|-----------|--------|-------|-------|-------|-------|
| U | | | | | | | | |
| U | | | | | | | | |
| Ulei din turte de măsline | 1,000 | 0,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Tabelul 15. Matricea de confuzie

| Proba | Ulei virgin extra | Ulei din turte de măsline | Ulei adulterat 1% |
|---------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
| Ulei virgin extra | 0 | 0 | 6 |
| Ulei din turte de măsline | 0 | 0 | 6 |
| Ulei adulterat 1% | 0 | 0 | 6 |

Se poate observa că probele de ulei sunt corect clasificate cu excepția a 2 probe de ulei de măsline virgin extra, ceea ce dovedește acuratețea foarte bună a sistemului multibiosenzor.

Același set de date a fost folosit pentru realizarea clasificării folosind rețele neuronale - perceptron multinivel iar rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 16.

Tabelul 16. Rezumatul modelului de clasificare rețele neuronale - perceptron multinivel

| | |
|-----|-------|
| Pro | 100 % |
| Pr | % |
| Ka | |
| Me | |
| Er | 0,107 |

Modelele de clasificare realizate cu clasificatori bazați pe vectori suport, arbori de decizie, cel mai apropiat vecin și rețele bayesiene au condus în majoritate la o clasificare 100% corectă a tuturor probelor de ulei, atât cele pure cât și cele adulterate (Tabelul 17).

Tabelul 17. Rezumatul datelor a modelelor de clasificare

| Proba | Metoda | Acuratețe de decizie | Calitatea modelului | Rețea bayesiene |
|-------|--------|----------------------|---------------------|-----------------|
| Pro | | | | |
| Pro | | | | |
| Ka | | | | |
| Mec | | | | |
| Er | | | | |

Corelațiile dintre semnalele electrochimice ale biosenzorilor și rezultatele altor analize (HPLC, FTIR, UV-Vis) determinate din modele de regresie multivariante PLS2 prin au fost foarte bune, cele mai bune rezultate fiind obținute pentru biomarkerii fenolici, cu coeficienți de corelație mai mari decât 0,95 atât la calibrare cât și la validare.

Din aceste rezultate se poate concluziona că datele electrochimice obținute cu biosenzori pot fi utilizate cu succes pentru determinarea falsificării uleiurilor de măsline cu uleiuri de măsline de calitate inferioară și uleiuri vegetale la concentrații de 1% ulei adulterant în ulei de măsline virgin extra.

În cadrul Activității 4 au fost realizate integral (100%) activitățile prevăzute în proiect. Sistemul multisenzor a fost validat pe probe de uleiuri pure și adulterate.

Activitatea 5. Participarea la conferințe, publicarea în reviste ISI, depunere cerere de brevet

Articole publicate în reviste Clarivate Analytics:

1. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 3380. IF 5,923. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
2. Bounegru AV, Apetrei C. Laccase and Tyrosinase Biosensors Used in the Determination of Hydroxycinnamic Acids. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(9):4811. IF 5,923. <https://doi.org/10.3390/ijms22094811>
3. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Evaluation of Olive Oil Quality with Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 12708. IF 5,923. <https://doi.org/10.3390/ijms222312708>
4. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Studies on the Detection of Oleuropein from Extra Virgin Olive Oils Using Enzymatic Biosensors. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 12569. IF 6,208. <https://doi.org/10.3390/ijms232012569>
5. Munteanu, I.G.; Grădinaru, V.R.; Apetrei, C. Sensitive Detection of Rosmarinic Acid Using Peptide-Modified Graphene Oxide Screen-Printed Carbon Electrode. *Nanomaterials* 2022, 12, 3292. IF 5,719. <https://doi.org/10.3390/nano12193292>
6. Dăscălescu, D.; Apetrei, C. Development of a Novel Electrochemical Biosensor Based on Organized Mesoporous Carbon and Laccase for the Detection of Serotonin in Food Supplements. *Chemosensors* 2022, 10, 365. IF 4,229. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090365>
7. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Sensitive Detection of Hydroxytyrosol in Extra Virgin Olive Oils with a Novel Biosensor Based on Single-Walled Carbon Nanotubes and Tyrosinase. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 9132. IF 6,208. <https://doi.org/10.3390/ijms23169132>
8. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Assessment of the Antioxidant Activity of Catechin in Nutraceuticals: Comparison between a Newly Developed Electrochemical Method and Spectrophotometric Methods. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 8110. IF 6,208. <https://doi.org/10.3390/ijms23158110>
9. Bounegru, A.V.; Apetrei, C. Simultaneous Determination of Caffeic Acid and Ferulic Acid Using a Carbon Nanofiber-Based Screen-Printed Sensor. *Sensors* 2022, 22, 4689. IF 3,847. <https://doi.org/10.3390/s22134689>
10. Trifan, A.G.; Apetrei, I.M. Development of Novel Electrochemical Biosensors Based on Horseradish Peroxidase for the Detection of Caffeic Acid. *Appl. Sci.* 2023, 13, 2526. <https://doi.org/10.3390/app13042526>

11. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Classification and Antioxidant Activity Evaluation of Edible Oils by Using Nanomaterial-Based Electrochemical Sensors. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24, 3010. IF 5,6. <https://doi.org/10.3390/ijms24033010>

12. Geana, E.-I.; Ciucure, C.T.; Apetrei, I.M.; Clodoveo, M.L.; Apetrei, C. Discrimination of Olive Oil and Extra-Virgin Olive Oil from Other Vegetable Oils by Targeted and Untargeted HRMS Profiling of Phenolic and Triterpenic Compounds Combined with Chemometrics. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24, 5292. IF 5,6. <https://doi.org/10.3390/ijms24065292>

Participarea la conferințe internaționale

1. Constantin Apetrei, Alexandra Virginia Bounegru, Irina Georgiana Munteanu, Irina Mirela Apetrei. Electrochemical sensors and biosensors based on polypyrrole for detection of phenolic compounds in olive oils. Scientific Conference of Doctoral Schools CDS-UDJG 2021, The Ninth Edition, Galați, 10-11 iunie 2021. Prezentare orală, rezumat publicat în Abstract Book, p. 117

2. C. Apetrei, I.M. Apetrei. Detection of Olive Oil Adulteration Using Electrochemical Sensors and Biosensors. XXVIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Online, 9-13 Mai 2021, Cluj-Napoca, Romania. Prezentare orală, rezumat publicat în Abstract Book, S2-O-15, p. 97.

3. Alexandra Virginia Meresescu (Bounegru), Constantin Apetrei. Development of novel biosensor for the detection of p-coumaric acid in phenolic extracts from virgin olive oils. Biosensors 2021, The 31st Anniversary World Congress on Biosensors, 26-29 iulie 2021, poster, P1.008

4. C. Apetrei, A. V. Bounegru, I.G. Munteanu, I.M. Apetrei. Development of a sensitive method for the voltammetric detection of phenolic compounds in extra virgin olive oils. CSAC2021: 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry, session Electrochemical Devices and Sensors, 1–15 iulie 2021, poster, sciforum-046141

5. A. V. Bounegru, I. G. Munteanu, C. Apetrei. Development of an electroanalytical method for detecting adulteration of extra virgin olive oils. SCDS-UDJG 2022 The Tenth Edition, Galați, 9-10 iunie 2022. Prezentare orală invitată, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 39.

6. Alexandra Virginia Bounegru, Constantin Apetrei. Sensors and Biosensors for Evaluating Olive Oil Quality. SCDS-UDJG 2022 The Tenth Edition, Galați, 9-10 iunie 2022. Prezentare orală, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 161.

7. Andreea Loredana Comănescu, Constantin Apetrei. Discrimination of vegetable oils by using spectrometric data and chemometrics methods. SCDS-UDJG 2022 The Tenth Edition, Galați, 9-10 iunie 2022. Poster, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 241.

8. Andrei Geman, C. Apetrei. Determination of the addition of maize oil to extra virgin olive oil by FTIR method coupled with multivariate data analysis methods. SCDS-UDJG 2022 The Tenth Edition, Galați, 9-10 iunie 2022. Poster, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 242.

9. C. Apetrei. Spectrometric and electroanalytical methods for the determination of virgin olive oils adulteration. International Summer School - FOOD SAFETY AND HEALTHY LIVING -FSHL–2022, 5-8 Sept. 2022, Brașov – Romania, Prezentare orală invitată, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 142.

10. Constantin APETREI, Elisabeta-Irina GEANĂ, Irina Mirela APETREI. Electroanalytical method coupled with chemometry for detection of virgin olive oil adulteration. The 6th International Conference New Trends on Sensing - Monitoring – Telediagnosis for Life Sciences NT-SMT-LS 2022 Brașov, Septembrie 8-10, 2022. Prezentare orală, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 43.

11. Alexandra Virginia BOUNEGRU, Constantin APETREI. Electrochemical determination of hydroxytyrosol in extravirgin olive oils using screen-printed electrodes modified with single wall carbon nanotubes and tyrosinase The 6th International Conference New Trends on Sensing - Monitoring –

Telediagnosis for Life Sciences NT-SMT-LS 2022 Braşov, Septembrie 8-10, 2022. Poster, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 62.

12. Irina-Georgiana Bulgaru (Munteanu), Constantin Apetrei. Comparative study on the antioxidant activity of extra virgin olive oil samples using a newly developed electrochemical method and DPPH spectrophotometric assay. The 6th International Conference New Trends on Sensing - Monitoring – Telediagnosis for Life Sciences NT-SMT-LS 2022 Braşov, Septembrie 8-10, 2022. Poster, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 81.

13. Constantin Apetrei, Andreea Loredana Comănescu, Andrei Daniel Geman, Irina Georgiana Munteanu, Alexandra Virginia Bounegru, Irina Mirela Apetrei, Elisabeta Irina Geană. Electrochemical (bio)sensor array coupled with multivariate data analysis for the assessment of virgin olive oil quality. “Priorities of Chemistry for a Sustainable Development”, PRIOCHEM XVIII, Bucureşti, 26-28 Octombrie 2022. Prezentare orală invitată- keynote, rezumat publicat în Book of abstracts, p. 11.

14. Elisabeta-Irina Geana, Corina Teodora Ciucure, C. Apetrei. Authentication and detection of adulteration of extra virgin olive oil based on the composition of phenolic compounds. “Priorities of Chemistry for a Sustainable Development”, PRIOCHEM XVIII, Bucureşti, 26-28 Octombrie 2022. Prezentare orală, rezumat publicat în Book of abstracts Nr. 18/2022 ISSN 2601 - 419X, p. 63.

15. A. D. Geman, A. L. Comănescu, C. Apetrei. Classification of extra virgin olive oils using chemometry analysis applied to spectrometric data. The 18th International Conference of Constructive Design and Technological Optimization in Machine Building Field OPROTEH 2023, Bacău, 11-13 Mai, 2023, Prezentare orală. Rezumat publicat în Conference Proceedings-ABSTRACTS, p. 78.

16. A. L. Comănescu, A. D. Geman, C. Apetrei. Chemometric analysis of FTIR spectroscopic data used for the detection of olive oils adulteration with vegetable oils. The 18th International Conference of Constructive Design and Technological Optimization in Machine Building Field OPROTEH 2023, Bacău, 11-13 Mai, 2023, Prezentare orală. Rezumat publicat în Conference Proceedings-ABSTRACTS, p. 78.

17. Irina Mirela Apetrei, Alexandra Virginia Bounegru, Irina Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei. Detection of olive oils adulteration with electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and enzymes. The 18th International Conference of Constructive Design and Technological Optimization in Machine Building Field OPROTEH 2023, Bacău, 11-13 Mai, 2023, Prezentare orală. Rezumat publicat în Conference Proceedings-ABSTRACTS, p. 79.

18. C. Apetrei, I.G. Munteanu, A.V. Bounegru. Determination of antioxidant properties by spectrometric and electrochemical methods. Correlations among results. International Summer School FOOD SAFETY AND HEALTHY LIVING FSHL – 2023. Prezentare orală. Rezumat Book of Abstracts, p. 64.

19. Irina Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei. Novel peptide-based sensors designed to detect antioxidant phenolic compounds. Eurosensors XXXIV, Lecce, Italy, 10-13 Septembrie 2023. Poster. Rezumat publicat în Proceedings 2023.

20. Elisabeta-Irina Geană, Corina Teodora Ciucure, Constantin Apetrei. Authenticity of olive oil: classification of botanic and geographic origins and detection of adulteration based on phenolic compounds composition coupled with chemometric analysis. SCDS-UDJG 2023, The Eleventh Edition, GALAŢI, 8-9 iunie 2023, Prezentare orală. Rezumat publicat în Book of abstracts, p. 105.

21. Irina-Georgiana Munteanu, Constantin Apetrei. Electrochemical peptide-based Sensor for direct detection and quantification of verbascoside in extra virgin olive oil. SCDS-UDJG 2023, The Eleventh Edition, GALAŢI, 8-9 iunie 2023, Prezentare orală. Rezumat publicat în Book of abstracts, p. 106.

22. Andreea-Loredana Comănescu, Constantin Apetrei. Determination of extra virgin olive oil adulteration by using multivariate methods. SCDS-UDJG 2023, The Eleventh Edition, GALAŢI, 8-9 iunie 2023, Poster. Rezumat publicat în Book of abstracts, p. 297.

23. A.D. Geman, C. Apetrei. Study of olive oil quality with spectrometric methods. SCDS-UDJG 2023, The Eleventh Edition, GALAȚI, 8-9 iunie 2023, Poster. Rezumat publicat în Book of abstracts, p. 297.

24. C. Apetrei, I. G. Munteanu, A. V. Bounegru, I. M. Apetrei. Biosensors array for the detection of virgin oils adulteration with seed oils. 24th International Conference "New Cryogenic and Isotope Technologies for Energy and Environment" - EnergEn 2023, Băile Govora, Romania, 18–20 octombrie, 2023, prezentare keynote, rezumat publicat în Book of abstracts ISSN 2601-9965, p. 235-236.

25. Irina-Georgiana MUNTEANU, Constantin APETREI. An ecofriendly approach for the electrochemical determination of olive oils polyphenols using deep eutectic solvents. "PRIORITIES OF CHEMISTRY FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT" PRIOCHEM -XIXth Edition, București, 11-13 Octombrie, 2023, Poster, rezumat publicat în Book of abstracts Nr. 19/2023 ISSN 2601 - 419X, p. 27.

Participarea la conferințe naționale

26. A. V. Bounegru, C. Apetrei. Noi biosenzori enzimatici pentru determinarea electrochimică a oleuropeinei din uleiuri de măsline extravirgine. Prezentare orală. A XXXVI-a Conferință Națională de Chimie, Călimănești–Căciulata, 4-7 Octombrie 2022. Prezentare orală, Book of abstracts, p. 28.

Cerere de brevet

1. Constantin Apetrei. Straturi polimerice imprimate molecular cu trigonelină înglobate în nanomateriale de carbon pentru realizarea de senzori electrochimici și procedeu de obținere a acestora, OSIM, cerere brevet național, A/00669, 9.11.2023.

Activitatea 6. Managementul proiectului

Activitățile de achiziție din cadrul proiectului s-au realizat în condiții foarte bune, cu anumite întârzieri ale livrărilor în 2021 din cauza pandemiei covid-19. Site-ul proiectului, www.busdoa.ugal.ro, a fost actualizat și include planul, realizările și rapoartele pentru fiecare etapă de implementare a proiectului precum și o prezentare succintă a rezultatelor obținute (un text pe înțelesul publicului) – rezumatul implementării proiectului și cele mai importante rezultate.

• Impactul estimat al rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut

Impactul cel mai important al acestui proiect este cel științific și anume publicarea a 12 articole științifice în reviste ISI cu un factor de impact cumulat 64, participarea la conferințe științifice internaționale cu 25 de lucrări și depunerea 1 cereri de brevet – care poate fi considerat **cel mai semnificativ rezultat al proiectului**. **Impactul socio-economic** al proiectului este susținerea dezvoltării în carieră a patru tineri cercetători, doi studenți și doi doctoranzi, care au lucrat într-un domeniu științific multidisciplinar alături de cercetători cu experiență, rezultatele obținute fiind diseminate comunității științifice atât prin publicarea de articole științifice în reviste ISI cu factor de impact ridicat cât și prin participarea la conferințe internaționale. De asemenea, proiectul a condus la creșterea experienței științifice a membrilor echipei iar rezultatele obținute au crescut vizibilitatea internațională a echipei. Efectuarea unui stagiu de cercetare la Universitatea din Ilmenau, Germania, extinde colaborările internaționale permițând echipei proiectului să participe cu propuneri noi de cercetare la nivel internațional. **Impactul economic** va crește prin transferul brevetului către industrie pentru aplicarea senzorilor imprimați molecular dezvoltați în proiect în controlul falsificării uleiurilor de măsline.

Director Proiect,
Apetrei Constantin



V